

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

TRANSZGLUTAMINÁZOK SZERKEZETVIZSGÁLATA

Ambrus Attila

**Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
Debrecen, 2001**

TRANSZGLUTAMINÁZOK SZERKEZETVIZSGÁLATA

Doktori értekezés tézisei

Ambrus Attila

Témavezető: Prof. Dr. Fésüs László

**Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet**

**Debrecen
2001**

BEVEZETÉS

A transzglutaminázok olyan Ca^{2+} -függő aciltranszferázok, amelyek amidkötések kialakítását katalizálják peptidkötésű glutaminok γ -karboxamid csoportjai és különböző aminok primer aminocsoportjai mint szubsztrátok (pl., fehérjék lizinjeinek ϵ -aminocsoportjai) között. A TGáz reakciók megértéséhez elsősorban annak Ca^{2+} -aktivációs mechanizmusait kell megismernünk. Disszertációmban a Faktor XIII-A₂, a TGáz 2 és a TGáz 3 (mind humán eredetű) enzimeket vizsgáltam.

A XIII-as Faktor két formában létezik. A plazma enzim két A és két B alegységből álló heterotetramer, míg a celluláris enzim csak két A alegységet tartalmaz. A plazma koagulációs Faktor XIII a véralvadási kaszkád utolsó enzime; stabilizálja a fibrin soft alvadékot és érzéketleníti azt fibrinolízis ellen azáltal, hogy keresztbeköti a fibrint és/vagy az α_2 -antiplazmint (a plazmin inhibitorát) az alvadékban. A celluláris enzim szerepe nem ismert. Nemrégén röntgenkrisztallográfiával megoldották 2.1Å-ös felbontásban a celluláris enzim szerkezetét. ⁴³Ca NMR-rel megállapították korábban, hogy a B alegység nem köt kalcium-iont. Röntgenadatokat azt mutatják hogy az A alegység egy nagyaffinitású Ca^{2+} -kötőhellyel rendelkezik, amely telítés esetén sem okoz jelentős konformáció-változást. Egyensúlyi dialízis eredmények két nagy- és hat kisebb affinitású helyet mutattak a FXIII-A₂B₂ tetrameren kevésbé magasabb Ca^{2+} -koncentráció esetén. Az összevont Ca^{2+} -affinitás a FXIII esetében $K_d \approx 0,1\text{mM}$. Fiziológiai körülmények között mind a plazma, mind pedig a celluláris enzim proteolitikus hasítással aktiválódik (thrombin), a hasítás az Arg37 és a Gly38 között játszódik le. *In vitro* azonban, egy alacsony Ca^{2+} -koncentráció jelenléte mellett is egy magas ionerő alkalmazása a celluláris enzim esetében, míg relative kis ionerő mellett is egy magas Ca^{2+} -koncentráció mind a plazma, mind a celluláris enzim esetében aktiv konformáció kialakulásához vezet proteolitikus hasítás nélkül is. Mindeztáig nincs adat arra vonatkozóan, hogy ilyen körülmények között hogyan írható le az enzimek kalcium-ionkötő sajátosságai. Korábban kiderült hogy a plazma FXIII képes (többek között a Mg^{2+} kivételével) számos két és háromértékű kationt megkötni.

A humán szöveti transzglutamináznak (TGáz 2) szerepe van a stimulus szekrécióban, receptor mediált endocitózisban, programozott sejthalálban, extracelluláris mátrix organizációjában, sejtek kapcsolódásában, növekedésében és proliferációjában valamint a tumornövekedésben is. A fehérjemolekula monomerként van jelen; kristályosítani még nem sikerült. A XIII-as faktorhoz való homológia miatt homológia modell építhető. Mostanában egy 2.5Å-ös felbontású (relative kisfelbontású az elérhető 2.1Å-ös FXIII szerkezethez képest) TGáz 2 szerkezetet publikáltak; az enzim egy vöröstengeri keszegből származik. A szerkezet 666 aminosavat tartalmaz a teljes 695-ből. A humán TGáz 2 analóghoz való szekvenciaazonosság 43.6%.

A TGáz 2 molekulához kötődő nagyaffinitású Ca^{2+} -ok számát hatra becsülték egyensúlyi dialízissel és mindegyik Ca^{2+} -nak hasonló affinitást javasoltak egy hiperbólikus affinitásgörbe alapján; a látszólagos affinitási konstans 90 μM -osnak találták alacsony Ca^{2+} -koncentrációk mellett titrálva. Magasabb Ca^{2+} -koncentrációknál egy SDS gélen "gyorsmozgású" TGáz 2-t detektáltak és ebből alacsony affinitású Ca^{2+} -kötohelyek létezésére tettek javaslatot, azonban azok számát, lokalizációjukat és affinitási konstansukat nem említik.

A GTP csökkenti a TGáz 2 Ca^{2+} -affinitását és transzamidáz aktivitását azáltal, hogy a molekula központi doménjéhez kötődik a 159-173 aminosav tartományba, jelentős konformációs változásokat okozva. Az azonban hogy hány darab és melyik Ca^{2+} -kötohely érintett az máig nem világos. A Ca^{2+} és a GTP befolyásolja az enzim proteolitikus hasíthatósági és tekeredési (folding) tulajdonságait is, ezáltal a farmakológiai reguláció egy másik szintje valósul meg a két effektor által.

A TGáz 3 monomer molekula és alapvető szerepe van a keratinizációban azáltal, hogy résztvesz az elhaló keratinocitákban az oldhatatlan cornified envelope kialakításában. Eddig még nem vizsgálták az enzim Ca^{2+} -köto tulajdonságait. Annyi azonban ismert, hogy az enzimaktivitás az enzimaktivációhoz elengedhetetlen proteolitikus hasítás után egy 50kDa méretű részen marad; nagyon valószínű, hogy ez a fragmentum köt Ca^{2+} -mot.

Számos fehérjét tanulmányoztak már eddig ^{43}Ca , ^{25}Mg és más fém NMR-rel különböző elméleti és technikai megoldásokat felhasználva. Ezek a módszerek egyedülálló és teljesen ionspecifikus eszközök mind kvalitatív, mind kvantitatív információgyűjtésre fémionköto fehérjék esetében.

Rekombináns fehérjék előállítása során gyakran kell szembenézni a termék oldhatósági problémájával. Ha a keletkezett fehérje mennyisége a citoplazmában nem jelentős, akkor nagyon valószínű, hogy a fehérje ún. inklúziós testeket alkot. Egy sikeres visszatekerő (refolding) eljárás azonban szolgáltat rekombináns aktív fehérjét, valamint olyan adatokat amelyek kinetikai és szerkezeti információkat hordozhatnak.

CÉLKITŰZÉSEK

A transzglutaminázoknak számos fiziológiailag fontos funkciója van, ezért részletes szerkezeti vizsgálatukra szükség van a kapcsolódó molekuláris mechanizmusok felderítése érdekében. A fenti eredmények egyértelműen mutatják, hogy számos megválaszolatlan kérdés van még a TGázok Ca^{2+} -köto tulajdonságaival kapcsolatban. Ezért döntöttük el, hogy ^{43}Ca NMR-rel, felszíni polaritás-analízissel és többszörös szekvenciaillesztéssel megcélazzuk a három TGáz Ca^{2+} -köto sajátosságainak elemzését. Mindenekelőtt felkívántuk térképezni ezen TGázok összes potenciális Ca^{2+} -kötohelyeit. A humán szöveti TGáz pontos homológ modelljének a megalkotása is elengedhetetlen volt ennek a

célnak az eléréséhez. Továbbá az enzimek Ca^{2+} -komplexei disszociáció-állandóinak és kötőhely-szimmetria paramétereinek meghatározása és a FXIII-A₂ ^{25}Mg NMR-je is a célok között szerepelt vizsgálódásainknak első részében. Munkánk második fázisában a Ca^{2+} /GTP-hatását akartuk vizsgálni a rekombináns humán TGáz 2 folding folyamataira vonatkozóan.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

NMR-kísérletek

A ^{25}Mg NMR kísérleteket 22,05MHz-en (360MHz proton) végeztük 5mm-es inverz szélessávú fejjel egy Bruker AM-360-as spektrométeren. Tipikusan 256 tranzienst vettünk fel a jó jel/zaj viszonyhoz és az integráláshoz. A ^{43}Ca NMR kísérleteket 33,7MHz-en (500MHz proton) egy Bruker DRX-500MHz-es spektrométeren végeztük 10mm-es direkt szélessávú fejet alkalmazva. Általában 64 vagy több tranzienst alkalmaztunk a jó jel/zaj viszony elérésére. A T_1 -méréseket inverzióátviteli kísérlettel oldottuk meg a standard Bruker mikroprogramot felhasználva. A T_2 méréséhez CPMG szekvenciát alkalmaztunk, szintén egy standard Bruker mikroprogrammal. A T_2 CPMG által történő meghatározásának számos előnye van a hagyományos jelszélesedés meghatározással szemben. CPMG esetében az alkalmazott mágneses tér inhomogenitása kiküszöbölődik. Ez az inhomogenitás néha akár a mért hatás 50%-át is kiteheti, a legrosszabb azonban az, hogy az effektus még változik is mintáról-mintára az NMR-cső geometriájától és minőségétől függően. A hőmérséklet mindig stabil $300 \pm 1\text{K}$ volt. Minden NMR kísérlet után a fehérjekoncentrációt újra meghatároztuk.

NMR eredmények kiértékelése

A FID-eket a Bruker 1D WinNMR programcsomagjával analizáltuk. A csúcsmagasság- és integrál-idő egyszeres exponenciálisokat a Microsoft Excel 5.0-ban illesztettük. A relaxációs paraméterek kiértékelése egy "házi" nemlineáris paraméterbecslő Gauss-Newton-Marquard algoritmussal történt. Több exponenciális tag beépítése nem szolgáltatott jelentősen jobb illeszkedést. Hiperbolikus illesztéshez (relaxációsebesség-totál Ca^{2+} -konc.) a Sigmaplot 2001 programot használtuk 100 iterációs lépést beépítve. Az enzim molekulák pontos móltömegei a Swissprot adatbázisból származnak.

TGáz aktivitás assay

A TGáz aktivitásmeghatározásokat egy amin-beépüléssel ELISA-tányéron határoztuk meg. A biotinált aminoszubsztrát beépült a falhoz kötött dimetilált kazeinbe. A színreakciót streptavidin-konjugált alkalikus foszfátással hívtuk.

Többszörös szekvenciaillesztés

A TGázok többszörös szekvenciaillesztését a GCG program PILEUP és FASTA funkcióival végeztük.

Homológ modellezés

A TGáz homológ modelljének elkészítéséhez - felhasználva a FXIII finomított nagyfelbontású szerkezetét - az összes ismert TGáz és kapcsolódó fehérjék elsődleges szerkezetét azonosítottuk a GCG programmal, mint első lépés. A GCG program STRINGSEARCH funkcióval és a "transzglutaminase" szó felhasználásával az összes TGáz szekvenciát kinyertük a GENEMBL adatbázisból és a GCG program FASTA funkciójával és a TGáz 2 szekvenciájával minden homológ szekvenciát azonosítottunk a SWISSPROT adatbázisból. A páros szekvenciaillesztést a BESTFIT-tel végeztük. Szerkezeti illesztést az UCLA Fold Prediction szerverén végeztünk. Az illesztéseket összehasonlítva nagy- és kismértékben konzervált régiókat különítettünk el. Az "O" nevű program alkalmazásával a FXIII konzervált régióiban az oldalláncokat egyszerűen a megfelelő TGáz 2 oldalláncokra cseréltük. A többi régiót töröltük és újraépítettük egy adatbázis alapján, amely az adott szekvenciákra ismert eddigi szerkezeteket tartalmazza. Energiaminimalizálást az XPLOD programmal végeztünk. Az első körökben elektrosztatikus potenciál és explicit hidrogénatomok figyelembevétele nélkül számoltattunk, hogy elkerülhessük a túl közeli atomkontaktusokat. A számítások későbbi szakaszában elektrosztatikus energiát és poláris hidrogénatomokat is figyelembe vettünk. Minden ciklus után a kapott szerkezetet szuperponáltuk a FXIII eredeti szerkezetére a CCP4 programállomás LSQKAB programjával. A szerkezetvalidációt a PROCHECK nevű programmal hajtottuk végre. Minden olyan kötéstávolságot és kötésszöget amelyek nagyon eltértek azok ideális értékétől, manuálisan ellenőriztünk és korrigáltunk, ahol lehetett. Azonosítottuk a potenciális hidrogén- és sóhidakat. A feltehetően konzerválódott aktív centrum geometriájára megszorításokat alkalmaztunk az energiaminimalizálás végső ciklusában.

Felszíni potenciál-analízis

Ezeket a kalkulációkat a GRASP nevű programmal hajtottuk végre felhasználva a FXIII zimogén nemrég meghatározott 3D szerkezetét és saját TGáz 2 homológ modellünket. Mindkét molekulára azonos színmélységet alkalmaztunk (piros: 19,73, kék:14,37).

Inklúziós testek preparálása

A procedúra optimalizálása után a plazmid expresszióját LB Broth bázison valósítottuk meg 100ug/ml ampicillin jelenlétében 37⁰C-on. Az expresszió inicializálása OD=0.5-nél történt 1mM IPTG hozzáadásával. 105 percig hagytuk expresszálni a fehérjét. A kultúrát centrifugáltuk (4⁰C, 500g, 15 perc) és erősen homogenizáltuk 4⁰C-on 3ml lízispufferben (50mM Tris, 1mM EDTA, 100mM KCl, 133μM PMSF, pH=8.0) a baktérium minden (nedves) grammjára. A szonikációt egy Branson Sonifier 450-es gépen hajtottuk végre (duty cycle=40, output=6, 3,5 perc). A homogenizátumot centrifugáltuk (12000g, 4⁰C, 15 perc). A pelletet újrassuszpendáltuk szobahőmérsékleten 5 percig 5ml 2M ureában a pellet minden (nedves) grammjára számolva. Ezt követően újra centrifugáltunk (25⁰C, 12000g, 15 perc) és a pelletet megtartottuk mint inklúziós test preparátumot.

Elektronmikroszkópia

Az inklúziós testek elektronmikroszkópiás felvételeit Marston és mtsai módszere nyomán készítettük el. Röviden, a mintákat 2%-os glutáraldehydben fixáltuk és telített uranil-acetáttal festettük 2⁰C-on. A grideket lizinnel fedtük be. A mintákat nem dehidráltuk; levegőn szárítottunk. A transzmissziós elektronmikroszkóp egy JEOL 100B (Japán, 1973) volt.

EREDMÉNYEK

1. Megalkottunk egy új homológiamodellt a humán szöveti transzglutamináz enzim esetében a celluláris FXIII zimogén legnagyobb felbontású (2.1A) szerkezete alapján. Modellünk jelenleg a legpontosabb elérhető humán TGáz 2 szerkezet.
2. Felszíni polaritás analízist végeztünk a celluláris FXIII zimogén legnagyobb felbontású szerkezetén és az általunk készített TGáz 2 homológ modellen. Az eredményeket kombináltuk a TGázok többszörös illesztésével és ebből azonosítani tudtuk ezen molekuláknak valószínűleg az összes potenciális Ca²⁺-kötő helyeit; számuk többnek adódik, mint azt korábban publikálták. A TGáz 2 korábban feltételezett három kötőhelye közül kettő rendelkezik negatív

- felszíni potenciállal, a harmadik nem. Érdekes, hogy a FXIII nemrégiben meghatározott nagyaffinitású kötőhelyében csak egy aminosav mutat jelentékeny felszíni polaritást. Ezen analízis eredménye alapján minden TGáz potenciális Ca^{2+} -kötőhelyei megjósolhatóak.
3. A felszíni polaritásvizsgálattal kapott nagyszámú negatív klaszter jelenléte összhangban van a ^{43}Ca NMR által szolgáltatott magasabb (de még mindig millimólos nagyságrendű) átlagos disszociációs konstansokkal, amelyeket egy szélesebb Ca^{2+} -koncentráció skálán mértünk szemben az egyensúlyi dialízissel végzett kísérletek esetében használt alacsonyabb skálával. Ezen eredmények azt mutatják, hogy mind a FXIII-A-n mind a TGáz 2-n léteznek alacsony affinitású Ca^{2+} -kötőhelyek is a jól ismert nagyaffinitásuk mellett.
 4. A sókoncentráció növelésével vagy trombinos aktiválásra a FXIII-A₂ részlegesen elveszíti eredeti Ca^{2+} -affinitását ellentétben az előzőleg publikált adatokkal, amelyek nem jeleztek effektust.
 5. NMR adataink azt mutatják, hogy a FXIII só- és proteolitikus aktivációs mechanizmusa különböző szerkezeti alapokon nyugszik.
 6. Az NMR adatok szerkezeti bizonyosságot nyújtanak arra vonatkozóan, hogy a TGáz 2-n a GTP-indukálta konformációváltozás megszünteti a molekula összes Ca^{2+} -kötőhelyét.
 7. NMR adataink először nyújtanak adatokat a TGáz 3 Ca^{2+} -kötő tulajdonságairól; a TGáz 3 köti a Ca^{2+} -t a legerősebben a vizsgált fehérjék közül, amely kötés csökken a proteolitikus aktivációt követően.
 8. A vizsgált TGázok nagyon szimmetrikus Ca^{2+} -kötőhelyekkel rendelkeznek és nem tartalmaznak EF-hand motívumokat.
 9. A rekombináns TGáz 2 molekula katalitikusan aktív formába történő visszatekeredése inklúziós testekből alapvetően megkívánja egy nagymóltömegű segítőmolekula jelenlétét, de kizárólag a kezdeti fázisokban. Normál körülmények között ez a molekula valószínűleg egy chaperon, míg in vitro ez lehet pl., PEG is.
 10. A Ca^{2+} és a GTP a TGáz 2 szerkezeti rekonstitúciójának kezdeti fázisában effektor molekulákként szerepelnek. A leghatékonyabb kondíció amikor mind a két effektor jelen van a refolding pufferben.
 11. Két optimális PEG-koncentrációt (amelyek valószínűleg két külön folding útvonalhoz tartoznak) és egy relative hosszú időskálát azonosítottunk a TGáz refoldingja és végső szerkezetének kialakulására során.
 12. Megalkottunk egy optimalizált refolding procedúrát a nem-fúzionált TGáz 2 előállítására vonatkozóan.

ÖSSZEFOGLALÁS

- megalkottuk a humán TGáz 2 egy új és pontosabb homológ modelljét,
- Ca^{2+} -affinitásokat, Ca^{2+} -kötőhely szimmetria-paramétereket és (valószínűleg az összes) potenciális Ca^{2+} -kötőhelyeket határoztunk meg a FXIII-A₂, a TGáz 2 és a TGáz 3 enzimek esetében,
- kimutattuk, hogy a FXIII-A₂ trombin- és sóaktivációja különböző szerkezeti alapokon nyugszik,
- azt találtuk, hogy a TGáz-ok nagyon szimmetrikus Ca^{2+} -kötőhelyekkel rendelkeznek és ezek nem EF-hand típusúak,
- kifejlesztettünk egy sikeres refolding procedúrát, amely kinetikai és szerkezeti információkat is nyújt a TGáz 2-re vonatkozóan,
- két optimális PEG-koncentrációt találtunk a TGáz 2 refoldingjának elindításához,
- azt találtuk, hogy a humán TGáz 2 PEG-mediált refoldingját a Ca^{2+} és a GTP együttes jelenléte befolyásolja a legpozitívabban

TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Közlemények, amelyeken a disszertáció alapult:

Attila Ambrus and László Fésüs, Polyethylene glycol enhanced refolding of the recombinant human tissue transglutaminase. Prep. Biochem. & Biotechnol. 31(1) 59-70 (2001) IF: 0.447

Attila Ambrus, István Bányai, Manfred Weiss, Rolf Hilgenfeld, László Muszbek, Zsolt Keresztessy and László Fésüs, Calcium binding of transglutaminases: a ^{43}Ca NMR study combined with surface polarity analysis. J Biomol Struct Dyn (közlés alatt) IF: 1.643

Σ IF: 2.090

Poszterek:

Attila Ambrus, L. Fésüs (1999) Structural investigations of human tissue transglutaminase. 4th Work-meeting of the Molecular Biology Section of the Hungarian Biochemical Society, Eger, Hungary, Abstract No. DP-1, p.66.

Attila Ambrus, István Bányai, Manfred Weiss, Rolf Hilgenfeld, László Muszbek, Zsolt Keresztessy, László Fésüs (2000) Calcium binding of transglutaminases: a ^{43}Ca NMR study combined with surface polarity analysis. Sixth International Transglutaminase Conference, Lyon, France, Abstract No. 1.

Attila Ambrus, István Bányai, Manfred Weiss, Rolf Hilgenfeld, László Muszbek, Zsolt Keresztessy, László Fésüs (2000) Calcium binding of transglutaminases: a ^{43}Ca NMR study combined with surface polarity analysis. "The present students – the future scientists", The Day of Science, Budapest, Hungary, Abstract No.: 12.

Egyéb közlemények:

Ambrus Attila, Batta Gyula, Kövér E. Katalin, Examination of the structure of Calretinin: Backbone assignment and secondary structure elements of domain I-II. Biokémia (közlés alatt) IF: -.

Małgorzata Palczewska, Attila Ambrus, Patrick Groves, Gyula Batta, Katalin E. Kövér, Werner Klaus, Agata Kaleta and Jacek Kuźnicki, Calcium-dependent properties of neuronal calretinin modules I-II (residues 1-100) differ from those of homologous calbindin $\text{D}_{28\text{k}}$ modules I-II (residues 1-93). (kézirat előkészületben)

Imre Tóth, Attila Ambrus and István Bányai, On the mechanism of cyanide substitution of $\text{Ti}(\text{EDTA})\text{CN}^{2-}$ complex. (kézirat előkészületben).

Attila Ambrus and István Bányai, Study of deuterium isotope effect in proton exchange reaction of HCN. (kézirat előkészületben)

Gyula Batta, Attila Ambrus, Patrick Groves and Jacek Kuznicki, Backbone assignment and secondary structure elements of the calcium-dependent neuronal calretinin modules I-II (residues 1-100), (kézirat előkészületben)

Egyéb poszterek:

Batta Gyula, Ambrus Attila, E. Kövér Katalin, Patrick Groves, Małgorzata Palczewska, Jacek Kuznicki (2000) NMR assignment and dynamic examination of Calretinin protein modules I-II. Conference of Chemists 2000, Debrecen, Hungary.

Batta, G., Ambrus, A., Kövér, K.E., Groves, P., Palczewska, M. and Kuznicki, J. (2000) The first (CR I-II) domain of Calretinin, a neuronal calcium binding protein. XIX. International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Florence, Italy, Abstract: p. 122 (top).

Batta Gyula, Ambrus Attila, E. Kövér Katalin, Patrick Groves, Malgorzata Palczewska, Jacek Kuznicki (2000) NMR assignment and dynamic examination of Calretinin protein modules I-II. “The present students – the future scientists”, The Day of Science, Budapest, Hungary, Abstract No.: 13.