

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A *C. ELEGANS* PROTEIN DISZULFID IZOMERÁZ
TRANSZGLUTAMINÁZ AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA**

Blaskó Bernadett

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2003**

1. BEVEZETÉS

1.1. A protein diszulfid izomeráz

A sejtekben számos olyan fehérje fordul elő, melyet a sejtmembrán külső felszínére, vagy a sejtközötti térbe kell kijuttatni. A sejt citoplazmájában redukáló környezetet találhatunk. Az eredetileg redukált állapotban lévő fehérje mindkét esetben oxidálódni fog a rendeltetési helyén. Az oxidáció rossz helyen lévő diszulfidhidak létrejöttével járhat. Ha a diszulfidhidak túl gyorsan alakulnak ki, könnyen lehet, hogy helytelen állapotban fogják a fehérjét rögzíteni. A diszulfidhidak kialakulása az endoplazmatikus retikulumban (ER) zajlik, kulcsenzime, a protein diszulfid izomeráz (PDI).

A protein diszulfid izomerázhoz kétféle aktivitást is társíthatunk: egyrészt mint oxidoreduktáz, katalizálja a diszulfid kötések formálását, az izomerizációt és a redukción, másrészt, mint molekuláris chaperon, diszulfidhidakkal segíti a stabilizálódó fehérje korrekt szerkezetének kialakulását. A protein diszulfid izomeráz teljes szerkezete még nem ismert. A PDI-család fehérjéi igen összetett szerkezetűek. A humán PDI **a-b-b'-a'-c** doménből épül fel. Idáig csak az **a** és **b** domén szerkezetét határozták meg. Mindegyik doménnek tipikus tioredoxin (Trx) foldja van (ahol az α -hélixek és β -lemezek váltakoznak egymással, azaz: β - α - β - α - β - α - β - α). Az **a** és **a'** domén redox-aktív tioredoxin szerkezetű domének, míg a **b** és **b'** domén redox-inaktív. A **c** domén egy feltételezett Ca^{2+} -kötő domén. Az **a** és **a'** domén tartalmazza az enzim két aktív centrumát, ami a Cys-X-X-Cys motívummal jellemezhető. A **b** és **b'** domén az evolúció során pontmutációkkal elvesztette a Cys-X-X-Cys aktív helyét. A PDI redox/izomeráz funkciója, csakúgy mint a tioredoxiné, az **a** és **a'** doméneken belül az N-terminális ciszteinhez köthető. A PDI chaperon aktivitásáért, az enzim peptidkötő tulajdonságáért -amikor is kölcsönhatásba kerül a helytelen szerkezetű fehérjékkel-, a **b** domén a felelős.

A PDI multifunkcionális voltát az is mutatja, hogy képes kis ligandok kötésére, mint az ösztadiol, a 3,3',5-trijód-L-tironin, és ATP, valamint fehérjék alegységeként is megjelenik, mint például a prolil-hidroxiláz, és a mikroszómális triglicerid transzfer protein komplex alegysége. A protein diszulfid izomeráz fehérje C-terminálisán KDEL-szekvencia, ún. ER retenciós szignál található. Az ERp57-ről kimutatták, hogy nemcsak az endoplazmatikus retikulumban, hanem a citoszolban is nagyobb mennyiségben megtalálható. Mind a PDI-t, mind a ERp57-et detektálták a sejtmagban is, és bizonyították, hogy ezen

enzimek transzkripciós faktorok DNS-kötő képességét befolyásolják. PDI jelen van a mitokondriumokban, valamint a sejten kívül is, sejt felszínén, vagy szekretált fehérje formájában.

1.2. Transzglutamináz alacsonyabb rendű szervezetekben

A kalciumion-függő, proteineket kovalensen keresztbekötő transzglutaminázok (TGáz) aciltranszfer reakciókat katalizálnak. Az enzim a sejtfehérjék glutamin és lizin oldalláncai között izopeptid keresztköteéseket hoz létre stabil, oldhatatlan fehérjehálózatot képezve ezzel az apoptotikus sejtekben. Az enzim aktív centrumában ciszteint tartalmaz, mely egy hisztidinnel és egy aszpartáttal a papain (cisztein) proteáz család katalitikus centrumához (Cys - His - Asp) igen hasonló katalitikus triádot alkot. Az enzimreakció szintén hasonló a cisztein proteázok által katalizált reakcióhoz, annak reverz formája.

Az utóbbi években transzglutamináz aktivitást detektáltak egyre több alacsonyabb rendű létformánál (pl.: baktériumok, fonalféreg, növények). Ámbár több transzglutamináz sikeresen klónoztak, egy részük nem mutatott sem szerkezeti, sem funkcionális hasonlóságot az ismert emlős transzglutaminázokkal. (Például *Bacillus subtilis*-ből, *Streptoverticillium mobaraense*-ből klónozott transzglutaminázok, semmilyen hasonlóságot nem mutattak az eddig ismert TGáz család génjeivel.) Hasonlóan, az *Escherichia coli* citotoxikus nekrotizáló faktor 1 fehérjéje és a *Bordetella pertussis* dermonekrotikus toxinja is képesek katalizálni a transzglutamináz reakciót, tartalmazzák a katalitikus cisztein és hisztidin aminosavakat, és képesek a Rho GTPáz deaminálására is, de semmiféle homológiát nem mutatnak az emlős transzglutaminázokkal.

Az első nematóda, a *Brugia malayi* volt, amelyből a TGáz fehérjét tisztították. A fehérje N-terminális aminosav sorrendjét is meghatározták, de semmilyen ismert transzglutaminázzal vagy ismeretlen funkciójú fehérjével nem találtak szekvenciális hasonlóságot. A fehérje ismert N-terminális részére tervezett antitest egy 56-kDa nagyságú fehérjét ismert fel a *B. malayi* extraktumból. Ugyanezt az antitestet használták a *Dirofilaria immitis* fonalféreg extraktum vizsgálatára. Az immunreaktív fehérjét tisztították, és a cDNS klónt teljes hosszában meghatározták. A cDNS nukleotid szekvenciája és az ebből származtatott aminosav sorrend semmilyen ismert transzglutaminázzal nem mutatott hasonlóságot, azonban jelentős homológiát mutatott a protein diszulfid izomeráz-rokon, endoplazmatikus retikulumból származó ERp60 fehérjével. Újabb érdekesség, hogy a nematóda TGáz fehérje két olyan különálló régiót tartalmazott, ami megfelelt a

PDI/tioredoxin-család két aktív centrumának. A fehérjét expresszálták *E. coli*-ban, és a rekombináns fehérjének mind protein diszulfid izomeráz, mind pedig kalcium-függő transzglutamináz aktivitását mutatták ki. A rekombináns fehérje aktivitását TGáz-specifikus inhibitorokkal gátolni lehetett. Hasonlóképpen, később izolálták a *Giardia lamblia*-ból a protein diszulfid izomeráz 3 izoformáját, és mindhárom izoforma rendelkezett PDI és TGáz aktivitással is.

A parazita nematódák transzglutaminázainak biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálata során kiderült, hogy tulajdonságaikban nagyon hasonlítanak egymáshoz, de a fent említett, „klasszikus”-transzglutaminázoktól élesen elkülönülve az enzim egy új típusú családját alkotják. Az új transzglutamináz fehérjék azonosítása a két tioredoxin aktív centrummal új szemszögét mutatja be a fehérjék poszt-transzlációs modifikálásának e primitív életformákban.

A *C. elegans* transzglutaminázának biokémiai vizsgálata rámutatott arra, hogy az enzim a gerincesek szöveti transzglutaminázától erősen eltérő sajátosságokkal bír, de nagyon hasonlít a más nematódákban leírt enzimekhez. A szöveti transzglutamináz evolúciós kialakulásáról még nagyon keveset tudunk. Néhány gerinctelen fajból biokémiaileg kimutatott enzim sajátosságait vizsgálva, azonban feltételezhetjük, hogy a transzglutamináznak egymással homológ (funkció és szerkezet tekintetében rokon) és analóg (funkció tekintetében azonos, de szerkezetileg nem rokon) formái is létezhetnek az élővilágban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során a következőkre kerestük a választ:

1. *A C. elegans protein diszulfid izomeráza – más nematódákhoz hasonlóan- rendelkezik-e transzglutamináz aktivitással?*

Kísérleteinket a molekuláris genetika eszköztárával kivitelettük, rekombináns fehérjét bakteriális expresszió segítségével, fúziós formában akartuk előállítani. A rekombináns PDI izomeráz aktivitás méréséhez egy új kísérleti rendszert kellett beállítanunk. A transzglutamináz aktivitást a már ismert, intézetünkben alkalmazott ELISA módszerrel teszteljük. A rekombináns fehérjét a transzglutamináz aktivitás szempontjából megpróbáltuk biokémiaileg jellemezni.

2. *Ha a PDI transzglutamináz aktivitással rendelkezik, melyik az a régiója az enzimnek, amely a transzglutamináz aktivitásért felelős?*

- Megterveztük a PDI aktív centrumának molekuláris genetikai vizsgálatát, valamint ismerve a PDI fehérje domén szerkezetét, az enzim különféle deléciós változataival megpróbáltuk lokalizálni a transzglutamináz aktivitásért felelős régiót.
3. *Molekuláris biológiai magyarázatot találni arra, hogyan lehetséges e két, különböző reakció katalizálása egy enzimfehérjén belül.*
- Különféle fehérje szerkezet vizsgálati módszerekkel próbáltuk modellezni, és magyarázni, a kétféle mechanizmus katalizálását.

3. MÓDSZEREK

3.1. Plazmid konstrukciók, rekombináns PDI termeltetése és tisztítása

A PDI-3 gént PCR reakcióban sokszoroztuk fel az yk83g12 EST klónt használva templátként. A PCR terméket pGEX-4T3 expressziós vektor *SalI* és *NotI* helyére klónoztuk. Ezt a konstrukciót transzformáltuk *E. coli* JM83 törzsbe. A GST-PDI-3 fúziós fehérjét termeltettük és affinitás kromatográfia segítségével tisztítottuk *E. coli* JM83 sejtmentes extraktumából. Az enzim aktív centrumában hely-specifikus mutagenézissel egyszeres és kétszeres mutáns enzimeket állítottunk elő a QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit segítségével.

3.2. PDI aktivitás mérése

A PDI aktivitás meghatározása a redukált, denaturált RNáz reaktiválásának mérésével történt. A PDI katalizálja a denaturált RNáz molekulán belüli- és közötti diszulfid hidak kialakítását, ezzel a natív konformáció kialakítását eredményezve. Az aktív RNáz alakulását spektrofotometriásan mértük cCMP, az RNáz szubsztrát hidrolízisével 296 nm-en, az irodalomban leírtak szerint.

3.3. Komplementációs kísérlet

A PDI bakteriális homológjai a DsbA fehérjék. A DsbA fehérje a baktérium periplazmájában expresszálódik. A kísérletben használt modellfehérje az alkalikus foszfatáz volt, amely feltekeredéséhez igényli a DsbA fehérjét. A PDI-3 gént egy olyan IPTG-vel indukálható vektorba klónoztuk, amely a periplazmában expresszálódik. A kapott konstrukcióval transzformáltuk a *dsbA* törzset. Indukció után az rPDI képes volt

komplementálni a *dsbA* mutáns törzset, amelyről alkalikus foszfatáz aktivitás méréssel bizonyosodtunk meg.

3.4. Transzglutamináz aktivitás kimutatása és mérései

3.4.1. Dot blot. A dot blot kísérletben transzglutamináz-reakció mintájára a reakcióelegy *N,N*-dimetil-kazeint (szubsztrát), 1mM *N*-(5-aminopentil)-biotinamidot és 5mM CaCl₂-t tartalmazott. A rekombináns fehérjével való inkubálás után a reakcióelegyből 10 µl-t aktivált PVDF membránra cseppentettem, majd avidin és biotinált peroxidáz anti-egér IgG (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) hozzáadása után, ECL-technikával mutattam ki a transzglutamináz aktivitást.

3.4.2. ELISA. A lemezeket 12 órán keresztül *N,N*-dimetil-kazeinnel inkubáltam 4 °C-on, a fedetlenül maradt felületeket sovány tejporos oldattal blokkoltam. A reakcióelegy 10mM DTT-t, 5mM CaCl₂-ot és 1mM *N*-(5-aminopentil)-biotinamidot tartalmazott. A mintákat 1 óráig inkubáltam 55 °C-os vízfürdőben, és a reakciókat EDTA oldatos mosással állítottam le. A kovalensen kazeinbe épült biotinált-amin szubsztrátot streptavidin-konjugált alkalikus foszfatázos inkubálás után *p*-nitrofenil-foszfát oldat hozzáadásával 405 nm-en detektáltam.

3.4.3. Kolorimetriás módszer. CBZ-L-glutaminil-glicin (10 mM) dipeptidhez hidroxilamin (50 mM) szubsztrátot adtam 5mM CaCl₂ jelenlétében, majd vas-klorid hozzáadása után, a színreakciót 620 nm-en mértem.

3.5. A fehérje aktív centrumában lévő hisztidin kémiai módosítása

A hisztidin aminosav kémiai módosítása dietil-pirokarbonáttal (DEPC) történt 50 mM Na-foszfát pufferben, pH: 6,8-on 25 °C-on.

3.6. Szekvencia összehasonlítás és homológ modellezés

A reprezentatív fajokban végzett szekvencia összehasonlításokat CLUSTAL program segítségével végeztem el. A szekvencia alignment-ek elkészítése után a homológ modellezést Swiss-PdbViewer programmal készülték, a humán PDI a doménját használva templátként.

3.7. CD spektroszkópia

A minták koncentrációja $5\mu\text{M}$ PDI és $25\mu\text{M}$ tioredoxin volt $0,1\text{ M}$ Tris-HCl-ben (pH: 8,5). A mérések Jasco-810 spektropolariméteren egy termosztálható (RTE-111, NesLab) küvettában 25°C és 55°C -on történtek.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. Rekombináns PDI-3 biokémiai és molekuláris genetikai vizsgálata

A *C. elegans* genomjában három PDI található. Szekvencia összehasonlító vizsgálatokkal azt a PDI gént akartuk kiválasztani, amelyik legnagyobb homológiát mutat az ERp60 fehérjével. Ez a PDI az irodalom szerint kétféle enzimaktivitással (PDI, TGáz) is rendelkezik. Úgy találtuk, hogy a legnagyobb homológiát a *C. elegans* PDI-3 mutatja az ERp60-nal. A PDI-3 cDNS klónját azonosítottuk a *C. elegans* Genome Sequencing Center-ben (yk83g12). A gént egy IPTG-vel indukálható GST-fúziós expressziós vektorba klónoztuk (pGEX-4T3), a rekombináns fehérjét kifejeztettük és tisztítottuk.

A rekombináns fehérje izomeráz aktivitását az RNáz „refolding”-képességével mértük. A PDI-3 képes volt visszaállítani a denaturált RNáz helyes szerkezetét, tehát izomeráz aktivitással rendelkezett.

A rekombináns PDI fehérje képes volt komplementálni a *dsbA*⁻ mutáns *E. coli* törzset. A DsbA fehérjék (Dsb = disulphide binding) a PDI bakteriális homológjai, és a baktérium periplazmájában expresszálódnak. A kísérletben használt modellfehérje az alkalikus foszfatáz volt, amely feltekeredéséhez igényli a DsbA fehérjét. A PDI-3 gént egy olyan IPTG-vel indukálható vektorba klónoztuk, amely a –DsbA fehérjéhez hasonlóan a periplazmában expresszálódik. A kapott konstrukcióval transzformáltuk a *dsbA*⁻ törzset, amely az indukció után képes volt komplementálni a *dsbA*⁻ mutáns törzset.

Az rPDI-3 fehérje a biotinált pentilamin kazeinbe történő beépülésén alapuló ELISA-módszer segítségével mérhető transzglutamináz aktivitást adott Ca²⁺ jelenlétében, 55°C-on. Az enzimaktivitás transzglutamináz-specifikus inhibitorokkal gátolható volt. A reakció csak 55°C-on játszódott le, TGáz aktivitást csak ezen a hőmérsékleten tudtunk kimutatni. 37°C illetve 25°C-on, transzglutamináz aktivitás nem volt mérhető.

A primer aminok spontán módon is beépülhetnek fehérjékbe, mint pl. a humán α_2 -makroglobulin esetében, egy belső tioészter kötés felbontásával, így előfordulhat, hogy a biotinált-amin magával a PDI-vel reagál. Ennek a lehetőségnek a kizárására dot blot kísérletet végeztünk. Azt találtuk, hogy a PDI-3 nem építi be önmagába az amint, hanem valóban az amin-transzfert katalizálja a kazein és biotinált-amin között.

Azt vizsgálva, hogy az ELISA reakcióban nem glutaminnal hanem más aminosavval reagál az enzim, dipeptid szubsztráttal is meghatároztuk a rekombináns enzim

transzglutamináz aktivitását. A méréskor CBZ-L-glutaminil-glicin dipeptidet használtunk amin akzeptorként, és hidroxilamint, amin donorként. A rekombináns PDI specifikus aktivitása és K_M értéke összehasonlítható értéket adott a tengerimalac TGáz-ra vonatkozó adatokkal.

4.2. A rekombináns PDI-3 transzglutamináz aktivitása a tioredoxin doménhez kötött

Annak meghatározására, hogy a PDI-3 melyik doménje felelős a kimutatott transzglutamináz aktivitásért, többféle deléciós mutánst állítottunk elő. A deléciós mutánsok analízise feltárta, hogy az **a** és **a'** domént (tioredoxin domén) tartalmazó fehérjék már rendelkeztek transzglutamináz aktivitással. Ez összhangban van az irodalomban leírtakkal, miszerint a *Giardia lamblia* három PDI izoformája közül a legkisebb, egy 13 kDa nagyságú fehérje, -ami csak egy tioredoxin domént kódol- (gPDI-3), szintén rendelkezett TGáz aktivitással.

A *C. elegans* PDI-3 gén két CGHC szekvenciával rendelkezik az **a** és az **a'** doménen belül. Mindegyikben az első cisztein a felelős a PDI diszulfid izomeráz aktivitásáért. Hely-specifikus mutagenezist alkalmazva a katalitikus aktivitásért felelős ciszteineket alaninra cseréltük ki mind az **a**, mind pedig az **a'** doménben, majd a mutáns fehérjék (rPDI_{ACGH-CGHC}, rPDI_{CGHC-AGHC}, és rPDI_{AGHC-AGHC}) aktivitásait összehasonlítottuk a vad típusúval (rPDI_{CGHC-CGHC}). Az egyszeres mutánsok izomeráz aktivitása fele a vad típusú enzimnek. A kétszeres mutáns nem rendelkezett mérhető PDI aktivitással, inaktív volt. A PDI aktív centrumában lévő katalitikus ciszteinek megváltoztatása nem mutatott szignifikáns különbséget a mutáns és a vad típusú enzimek transzglutamináz aktivitásában. Így megállapítható, hogy a vizsgált mutánsoknál a transzglutamináz aktivitás független a PDI katalitikus cisztein aminosavaitól, azok alaninra való cserélése nincs hatással a TGáz aktivitásra.

4.3. A transzglutamináz aktivitásban szerepet játszó aminosavak meghatározása a tioredoxin doménben belül

Miután megállapítottuk, hogy a PDI aktív centrumában (CGHC) lévő első, katalitikus cisztein alaninra cserélése nem befolyásolta a transzglutamináz aktivitást, helyspecifikus mutagenezissel a második ciszteint is alaninra cseréltük. Mivel sikerült az rPDI-3 transzglutamináz aktivitását lokalizálnunk az **a** és **a'** doménre (tioredoxin domén), a

helyspecifikus mutagenezist már csak az **a** doménon alkalmaztuk. Az így létrehozott mutáns csonka fehérjék (**a**_{AGHC}, **a**_{CGHA}, **a**_{AGHA}) transzglutamináz aktivitásait összehasonlítottuk a vad típusú PDI **a** doménjével (**a**_{CGHC}). A CGHC motívum második ciszteinjének eliminálása a transzglutamináz aktivitás teljes elvesztését eredményezte, mind az indirekt ELISA-val, mind pedig a kolorimetriás módszerrel mérve, ami azt sugallja, hogy ez az a cisztein, amely az aktív helyet szolgáltatja a transzamidálási reakcióhoz.

A transzglutaminázok katalitikus centrumát három aminosav adja, a Cys-His-Asp, a humán TG2 szerkezetvizsgálatakor a Cys-277, His-335, Asp-358 katalitikus triádot határozták meg. A PDI-3 mindkét tioredoxin doménje egyetlen hisztidint tartalmaz. Amikor a fehérjét hisztidin-specifikus gátlószerekkel (diethyl-piropikronát) kezeltük, az enzim teljesen elvesztette a transzglutamináz aktivitását, tehát valószínűleg a tioredoxin doménban található egyetlen hisztidin játszik szerepet a transzglutamináz reakció katalizálásában.

A PDI tioredoxin doménjai közeli rokonságban vannak a tioredoxin fehérjékkel. A tioredoxinok diszulfid redukázok, melyek aktív centruma CXXC tioredoxin motívummal jellemezhető. Megvizsgálva az *E. coli* és humán tioredoxinokat, azt találtuk, hogy 55°C-on ezek is rendelkeznek Ca²⁺-függő transzglutamináz aktivitással. A transzglutamináz aktivitást mindkét módszerrel (indirekt ELISA, kolorimetriás módszer) kimutattuk.

4.4. A PDI és Trx aminosav szekvencia-analízise

Az utóbbi időkben több publikáció is beszámolt arról, hogy mind magasabb-, mind alacsonyabb rendű fajokból származó PDI-k transzglutaminázokként funkcionálhatnak. Feltételezhető, hogy a PDI képes egy transzglutamináz-szerű katalitikus triádot formálni szerkezetén belül. Amint azt a reprezentatív fajokban végzett többszörös szekvencia-összehasonlítás is mutatja, a cisztein és hisztidin csoportok erősen konzerváltak. Emellett két aszpartát-gazdag régiót is találtunk, amelyek közül az egyik erősen konzervált elrendeződést mutat, és ez közelebb helyezkedik el a CGHC motívum második ciszteinjéhez.

Mivel annak lehetőségét már bizonyítottuk, hogy a Trx is katalizálhat transzglutamináz reakciót, a vizsgált fajokban található tioredoxinok aminosav szekvenciáját is összehasonlítottuk. Azt találtuk, hogy a ciszteinek erősen konzerválódtak a tioredoxin motívumban, és hogy itt is megtalálható a két konzervált aszpartát régió, a

tioredoxin motívum C- és N-terminális részén. A hisztidinek azonban nem mutatnak olyan konzerválódottságot, mint a vizsgált PDI-k esetében.

4.5. Lehetséges transzglutamináz aktív hely meghatározása a PDI és Trx szerkezetén belül

A kísérletes biokémiai és szekvenciális adatok néhány részletet feltártak a PDI és Trx transzglutamináz aktivitásának katalitikus mechanizmusáról, de végső magyarázatot a transzglutaminázokkal való hasonló reakció lejátszódására ezeknek a fehérjéknek a háromdimenziós szerkezete adhat. A humán PDI teljes három dimenziós szerkezete még nem ismert, eddig csak külön-külön az **a** és a **b** domének szerkezetét határozták meg.

A humán PDI **a** doménjének ismeretében homológ modellezés segítségével megszerkesztettük a *C. elegans* PDI-3 **a** doménjének szerkezetét. Mindkét fehérje szerkezetének (humán és nematóda PDI) vizsgálata feltárta, hogy a TGáz aktivitásért felelős katalitikus aminosavak ugyanabban a régióban található, elérhető közelségben helyezkednek el szubsztrát fehérjék számára. A két konzervált aszpartát régióból pedig a tioredoxin motívum N-terminálisán lévő aszpartátot ugyanott találhatjuk.

A humán és bakteriális tioredoxin szerkezete is ismert. Kísérleteink szerint mindkét fehérje mutatott mérhető transzglutamináz aktivitást. A TGáz-ra jellemző katalitikus triádot itt is a tioredoxin motívum körül találjuk.

A katalitikus aminosavak távolsága (Cys-His) a humán PDI **a** doménjében 7 Å, a nematóda PDI-3 esetében 7.5 Å, a humán Trx-ban 8.2 Å, míg *E. coli*-ban 9.8 Å. Ezek a távolságok mind a PDI, mind a Trx esetében nagyobbak, mint a tradicionális transzglutaminázok katalitikus aminosavainak távolsága (humán TG2-nél ez 3.9 Å). A transzglutamináz aktivitás azonban mégis kimutatható, így feltételezzük, hogy a PDI, és a Trx is magasabb hőmérsékleten olyan konformáció-változáson/változásokon megy keresztül, melyek során a katalitikus centrumot alkotó aminosavak térben közelebb kerülhetnek egymáshoz, így a triád kialakulhat, és a reakció lejátszódhat.

4.6. A PDI és Trx konformáció-változása

A fent említett három dimenziós szerkezet-analízis bemutatta, hogy mind a PDI **a** doménjeiben, mind a Trx-ban szükség van valamilyen konformációs változásra ahhoz, hogy ezek a fehérjék TGázként működjenek, azaz katalizálják a TGáz reakciót. Ez a

szerkezet-változás bekövetkezhet a Ca^{2+} -kötésével (a PDI és Trx nem igényel Ca^{2+} -ot a diszulfid izomeráz/oxidoreduktáz reakciójához, -TGáz aktivitásuk azonban a többi TGázhoz hasonlóan- Ca^{2+} -függő).

A konformáció-változás reakció körülmények megváltozásának következménye is lehet. Ezt alátámasztja az a tény, hogy transzglutamináz aktivitásokat csak 55°C -on tudtuk kimutatni mind a PDI, mind a Trx esetében, 37°C vagy 25°C fokon megismételve a TGáz aktivitás nem volt mérhető. Az irodalomban publikált emlős és nematoda PDI-k esetében is 55°C inkubációs hőmérsékleten mértek TGáz aktivitást.

Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával egyszerűen és gyorsan nyerhetünk információt a fehérjék szerkezetéről, illetve a szerkezet megváltozásáról, pl. szubsztrátkötés, oligomerizáció, denaturáció, stb. során. Felvettük mind a rekombináns PDI-3, mind a Trx hőmérsékletfüggő CD spektrumát. A CD spektrumok mindkét fehérje esetében tipikusan α -hélix lefutást mutatnak, a tioredoxin elemet pedig dominánsan α -hélixek alkotják. Azt találtuk, hogy mindkét fehérje kimutatható szerkezet-változáson megy keresztül. Hőmérséklet-emelés hatására az α -hélixek elvesztítik struktúrájukat, (vagyis akkor, amikor az enzim-oldatot 55°C -ra melegítjük,) a TGáz reakció szempontjából viszont 55°C a hőmérséklet-optimum. Amikor a fehérje rendezettsége módosul, vagy bármilyen módon megváltozik, az említett katalitikus aminosavak közelebb kerülhetnek egymáshoz, és a transzglutaminázra jellemző aktív centrum kialakulhat, a reakció lejátszódhat.

4.7. A PDI és Trx mint multifunkcionális enzim

A természetben gyakori jelenség, hogy fehérjéknek többféle funkciójuk/aktivitásuk van, beleértve összefüggésbe hozható ill. az össze nem függő funkciókat. Logikus kérdés felvetni azt, hogy vajon a PDI és Trx transzglutamináz aktivitása között lehetséges-e összefüggés, vagy az enzimek ezen felismert, új aktivitása nem függ össze. Realizálnunk kell, hogy a három vizsgált fehérjecsald (PDI, Trx, TGáz) tagjai több, egymással átfedő tulajdonsággal rendelkeznek. Transzglutaminációra mindannyian képesek mint redox katalizálók/fehérjék, a TGáz-ok szokatlan nagy számú szabad cisztein-SH csoportot tartalmaznak, amelyek általában reaktívak. Azonfelül, a transzglutamináz nem katalitikus kölcsönhatása sejten kívüli és belüli fehérjékkel a TGáz chaperon funkciójára utal, mint az a PDI/Trx család esetében már ismert. Nincs azonban közvetlen bizonyíték arra, hogy a

nem megfelelő szerkezetű, károsodott vagy oxidálódott fehérjék megmentését a PDI izomeráz vagy a Trx diszulfid reduktáz funkciója próbálná megkísérelni. Ez a „mentési kísérlet” magában foglalhatja a target fehérje transzglutamilációval való stabilizálását (deamidálás, keresztkötés, primer aminok beépítése). Ezt a folyamatot/reakciót vagy a PDI és Trx transzglutamináz aktivitása, vagy a transzglutamináz önmaga is katalizálhatja, mint redox katalizáló, chaperon vagy keresztkötő fehérje. Elképzelhető, hogy ha egy fehérje megmentése, stabilizálása már nem lehetséges, akkor az enzim keresztkötő tulajdonságával kovalensen kapcsolódik a tönkrement fehérjékhez –talán az ubikvitinálással párhuzamosan-, és elindítja a feleslegessé vált fehérjét az lebontás, a proteaszóma rendszer irányába.

Több, további közös tulajdonság is figyelhető meg a PDI, Trx és TGáz enzimes család tagjai között. Mindhárom enzimes család jelen van az élő szervezetek minden típusában, az eukarióta sejtek mindegyik compartment-jében -, fontos szerepük lehet az extracelluláris térben, ahová szekretálódásuk után kerülnek, annak ellenére, hogy szignál szekvenciával egyik sem rendelkezik. Mind indukálható enzimek, mind reagálnak stressz körülményekre, oxigén gyökökre, sejt- és szöveti károsodásokra. Ezekre az adatokra támaszkodva elképzelhető, hogy ez a három nagy fehérje/enzim család egy általános celluláris védő rendszer elemeit jelenti, amely a konvergens evolúció folyamán a megosztott enzimaktivitások széles változatosságával a célból keletkezett, hogy védje és stabilizálja a fehérjéket, sejteket és szöveteket.

A PDI és a Trx fehérjék nagy mennyiségben vannak jelen a sejten belül/kívül illetve a sejt felszínén. Az, hogy ezek a fehérjék kétféle aktivitással is rendelkeznek, mind a bakteriális fehérjénél (*E. coli* Trx), mind a fonalféregben (*C. elegans*), mind a gerinceseknél (humán Trx, PDI), a fehérje motívum funkcióbeli konzerválódottságra utal. A PDI több katalitikus reakciója már régóta ismert: redukció, izomerizáció, fehérjék helyes szerkezetének kialakítása, tehát egyfajta poszt-transzlációs módosítás. A tioredoxin szerepe szintúgy széleskörű: redox szignálok, fotoszintézis, apoptózis szabályozása, immunválasz kialakítása. A transzglutamináznak is egyre több funkciója válik ismertté; keresztkötő fehérje, részt vesz szignálútvonalakban, mint G-fehérje, szerepe van az apoptózisban, sőt, a fagocitózisban is. Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a fehérjék szerepe ma még korántsem tisztázott, és szabályozásuk megértése, illetve a körülmények és/vagy a sejten belüli kölcsönhatások döntik el, hogy a fehérjének melyik funkciója „kapcsol be”. Ezen folyamatok feltárása nagy lépés lehet előre az *in vivo* kutatásokban.

A tézisek alapjául szolgáló közlemények

Blaskó B, Madi A, Fesus L. (2003) Thioredoxin motif of *Caenorhabditis elegans* PDI-3 provides Cys and His catalytic residues for transglutaminase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 1142-1147. IF: 3.26

Blaskó B, Madi A, Fesus L. (2003) Structural elements responsible for transglutaminase activity of protein disulfide isomerases and thioredoxins. *J. Biol. Reg. Homeo. Ag.* (közlésre elfogadva) IF: 0.71

Egyéb közlemények

Szegezdi E, Kiss I, Simon A, **Blaskó B**, Reichert U, Michel S, Sandor M, Fesus L, Szondy Z. (2003) Ligation of retinoic acid receptor alpha regulates negative selection of thymocytes by inhibiting both DNA binding of nur77 and synthesis of bim. *J. Immunol.* 170, 3577-84. IF: 7.06

Elsőszerzős előadások és poszterek belföldi és nemzetközi konferenciákon

Blaskó B., Kovács A., Mádi A. és Fésüs L.: Protein diszulfid izomeráz jellemzése *Caenorhabditis elegans*-ban, Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Munkaértekezlete, Sárospatak, 2001. (poszter)

Blaskó B., Kovács A., Mádi A. és Fésüs L.: Protein diszulfid izomeráz jellemzése *Caenorhabditis elegans*-ban, poszter, X. Sejt-és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2002. (poszter)

Blaskó B.: Funkcionális transzglutamináz-e a *C. elegans* protein diszulfid izomeráza? előadás, TDK/PhD konferencia, Debrecen, 2002. (előadás)

B. Blaskó, A. Mádi and L. Fésüs: The *C. elegans* transglutaminase; is it the protein disulfide isomerase? COST 884 conference, Nottingham, 2002. (lecture)

B. Blaskó, A. Mádi and L. Fésüs: Does protein disulfide isomerase of *Caenorhabditis elegans* function as a transglutaminase? 7th International Conference on Transglutaminases and Protein Crosslinking Reactions, Ferrara, 2002. (lecture)

Blaskó B.: A protein diszulfid izomeráz transzglutamináz aktivitása thioredoxin doménhez kötött, TDK/PhD konferencia, Debrecen, 2003. (előadás)

Blaskó B., Mádi A. és Fésüs L.: A protein diszulfid izomeráz transzglutamináz aktivitásáért felelős aminosavak meghatározása. Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Munkaértekezlete, Tihany, 2003. (poszter)

B. Blaskó, A. Mádi and L. Fésüs: Structural basis of the transglutaminase activity exhibited by protein disulphide isomerases and thioredoxins. 2nd Japanese-Hungarian Transglutaminase Conference, Hévíz, 2003. (lecture)