

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

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

Blaskó Bernadett

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

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK	4
2. BEVEZETÉS	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
3.1. A protein diszulfid izomerázról	6
3.2. A protein diszulfid izomeráz szerkezeti és funkcionális tulajdonságai	7
3.3. A tioredoxin szerepe	9
3.4. A transzglutamináz fehérje család	10
3.5. Transzglutamináz alacsonyabb rendű szervezetekben	12
3.6. A <i>Caenorhabditis elegans</i> , mint modell szervezet	13
4. CÉLKITŰZÉS	14
5. ANYAG ÉS MÓDSZER	15
5.1. ANYAGOK	15
5.1.1. Alkalmazott baktérium törzsek, plazmidok, bakteriofágok	15
5.2. MÓDSZEREK	15
5.2.1. A baktériumok fenntartása és szaporítása	15
5.2.2. Lambda fág szaporítása	16
5.2.3. <i>E. coli</i> transzformálása plazmid DNS-sel	16
5.2.4. Plazmid DNS és lambda fág DNS tisztítás	16
5.2.5. DNS endonukleáz emésztés, feltöltés, defoszfátálás és ligálás	16
5.2.6. DNS elválasztás agaróz gélelektroforézissel	16
5.2.7. DNS fragmentumok tisztítása	16
5.2.8. DNS amplifikálás polimeráz láncreakcióval (PCR)	17
5.2.9. A rekombináns fehérje termeltetése	17
5.2.10. Helyspecifikus mutagenézis	17
5.2.11. Western blot	18
5.2.12. Protein diszulfid izomeráz aktivitás mérése	18
5.2.13. Alkalikus foszfatáz aktivitás mérése	18
5.2.14. Transzglutamináz aktivitásmérések	18
5.2.14.1. Mikrotiter lemezes módszer (ELISA):	18
5.2.14.2. Dot blot:	19
5.2.14.3. Kolorimetriás módszer:	19
5.2.15. A fehérje aktív centrumában lévő hisztidin kémiai módosítása	19
5.2.15. Szekvencia összehasonlítás és homológ modellezés	20
5.2.16. CD spektroszkópia	20
6. EREDMÉNYEK	21
6.1. A <i>Caenorhabditis elegans</i> PDI-3 gént kódoló klón kiválasztása	21
6.2. A <i>C. elegans</i> PDI-3 klónozása és expressziója	22
6.3. Rekombináns PDI fehérje diszulfid izomeráz aktivitásának meghatározása <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i>	23
6.4. A rekombináns PDI-3 fehérje Ca^{2+} -ion függő transzglutamináz aktivitással is rendelkezik	25
6.5. PDI-3 deléciós mutánsok készítése és a rekombináns fehérjék transzglutamináz aktivitásának meghatározása	27
6.6. A PDI-3 aktív centrumának mutagenézise	28
6.7. A tioredoxin domén mutagenézise	31
6.8. A PDI és Trx aminosav szekvencia-analízise	33
6.9. Lehetséges transzglutamináz aktív hely meghatározása a PDI-n és Trx-en belül	35

6.10. A PDI és Trx konformáció-változása.....	37
7. MEGBESZÉLÉS	40
7.1. A protein diszulfid izomeráz és a tioredoxin transzglutamináz aktivitásának biokémiai jellemzése.....	40
7.2. PDI és Trx transzglutamináz aktivitásának lehetséges szerkezeti magyarázata	41
7.3. A PDI-3 és Trx konformáció változása szükséges a transzglutamináz aktivitáshoz	42
7.4. A PDI/Trx családhoz kapcsolódó TGáz aktivitás lehetséges fiziológias jelentősége ...	44
7.4.1. A PDI géntermék hiánya nematódákban.....	44
7.4.2. Multifunkcionális enzimek.....	45
8. ÖSSZEFOGLALÁS	48
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	49
10. IRODALOM	50
11. KÖZLEMÉNYEK	57
11.1. A tézisek alapjául szolgáló közlemények.....	57
11.2. Egyéb közlemények	57
11.3. Elsőszerzős posztterek.....	57
11.4. Elsőszerzős előadások	58

1. RÖVIDÍTÉSEK

bp	bázispár
BSA	marha szérum albumin
CD	cirkuláris dikroizmus
cCMP	ciklikus citidin monofoszfát
DEP	dietil-pirokarbonát
DTT	ditiotreitol
ECL	erősített kemilumineszcencia
ELISA	enzimhez kötött immunológiai kimutatás
GSH	glutation
GSSH	oxidált glutation
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
GST	glutation-S-transzferáz
IgG	immunglobulin G
IPTG	izopropil β -D-1-tiogalakto-piranozid
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
nm	nanométer
PCR	polimeráz láncreakció
PDI	protein diszulfid izomeráz
RNSi	RNS interferencia
rPDI-3	rekombináns PDI-3
RNáz	ribonukleáz
TG1, TG2..	különböző transzglutamináz családok
TGáz	transzglutamináz
Trx	tioredoxin

2. BEVEZETÉS

A transzglutaminázok (TGáz, EC 2. 3. 2. 13) széles körben elterjedtek, intra- és extracelluláris térben egyaránt megtalálhatók, Ca^{2+} -függő módon katalizálják a fehérjék poszt-transzlációs módosítását. A reakció végtermékeként (-glutamil) lizin izopeptid kötés jön létre két fehérjelánc között. Alacsonyabbrendű (baktérium) és magasabbrendű (gerincesek) szervezetekben egyaránt megtalálhatók. Az alacsonyabbrendű szervezetekben lévő transzglutaminázokról jóval kevesebb ismeretanyag áll rendelkezésünkre. Az utóbbi évek publikációi rámutattak arra, hogy az alacsonyabbrendűek TGáz-a nem mutat homológiát az emlős TGáz-ok egyikével sem. Több fonalféreg TGáz-áról bebizonyosodott, hogy jelentős homológiát mutat a protein diszulfid izomerázzal. Ezek a fehérjék kétféle aktivitással is rendelkeztek, transzglutamináz és protein diszulfid izomeráz aktivitással is.

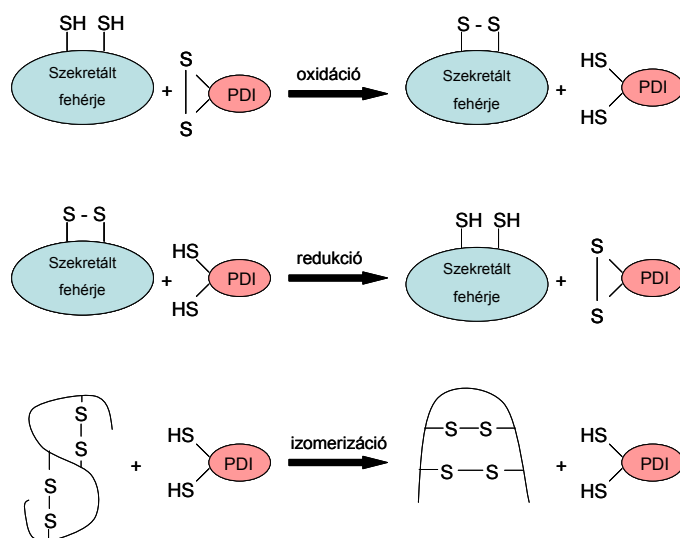
A *C. elegans* transzglutaminázáról még csak kevés adat áll rendelkezésünkre (Mádi, 1998). A transzglutaminázt jelenlétét kimutatták féregextraktumból, biokémiaileg jellemezték, immunhisztokémiai módszerekkel az enzim konstitutív expresszióját lokalizálták.

Értekezésem témája, a DE OEC Biokémia és Molekuláris Biológia Intézetében évek óta folyó transzglutamináz illetve *C. elegans* kutatásokhoz szerves módon kapcsolódik.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A protein diszulfid izomerázról

Egy sejtnak vannak olyan fehérjéi, amelyet a sejtmembrán külső felszínére, vagy a sejtközötti térbe kell kijuttatni. A sejt citoplazmájában redukáló környezetet találhatunk. A frissen megszintetizálódott, eredetileg redukált állapotban lévő fehérje mindkét esetben oxidálódni fog a rendeltetési helyén. Az oxidáció hibás helyen lévő diszulfidhidak létrejöttével vagy más oxidált aminosav-oldalláncok (metionin) torzító hatásával járhat. Ha a diszulfidhidak túl gyorsan alakulnak ki, könnyen lehet, hogy helytelen állapotban fogják a fehérjét rögzíteni. Közel 40 évvel ezelőtt Anfinsen úttörő kísérlete bizonyította, hogy a redukált, denaturált ribonukleáz A *in vitro* képes újra kialakítani a diszulfidkötéseket (Anfinsen, 1973). Bár az enzim újra-feltekeredése (refolding-ja) azonban sokkal lassúbb volt kémcsőben, mint az élő sejtben. A diszulfidhidak kialakulása a sejtek endoplazmatikus retikulumában (ER) zajlik, a protein diszulfid izomeráz (PDI) közreműködésével. A protein diszulfid izomerázhoz kétféle aktivitást is társíthatunk: mint oxidoreduktáz, katalizálja a diszulfidkötések létrejöttét, az izomerizációt és a redukciót (Freedman, 1994), emellett, molekuláris chaperonként, diszulfidhidakkal segíti a tekeredő fehérje megfelelő szerkezetének kialakulását (Darby, 1995) (**1. ábra**).

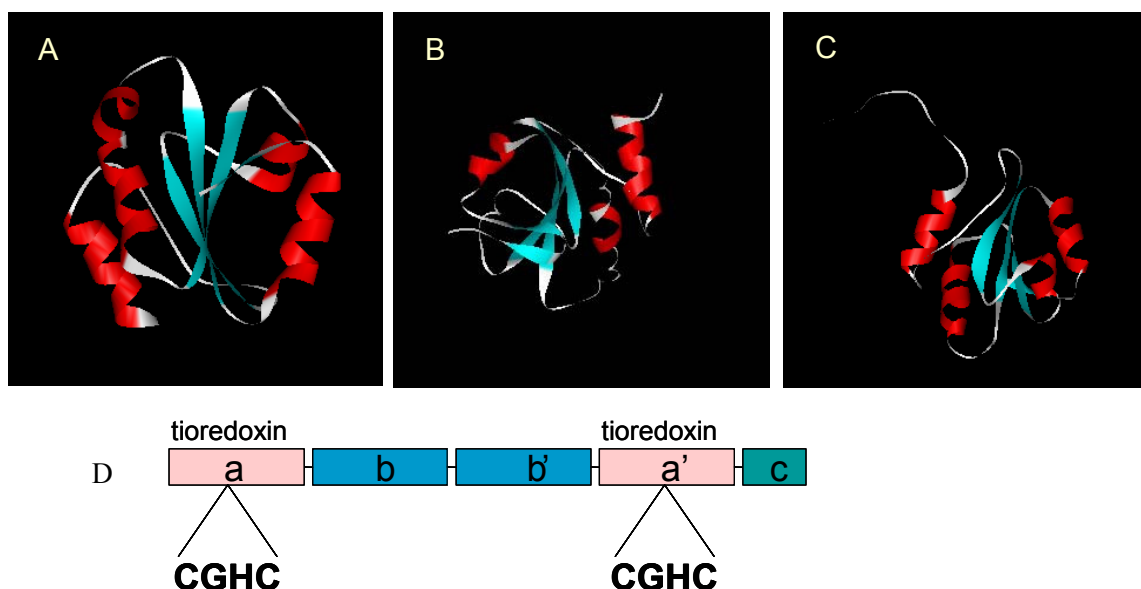


1. ábra. A protein diszulfid izomeráz által katalizált reakciók

Az endoplazmatikus retikulum átmenetet jelent a citoplazma és az extracelluláris környezet redox-potenciálja között. Ez a redoxgradiens a protein diszulfid izomerázzal együtt képes arra, hogy fokozatosan készítse fel plazmamembrán külső oldalára kerülő fehérjéket a szekrécióra, illetve a sejten kívüli tér sokkal oxidatívabb környezetére.

3.2. A protein diszulfid izomeráz szerkezeti és funkcionális tulajdonságai

A PDI-család fehérjéi domén szerkezetűek. A funkcionális doméneknek tipikus tioredoxin (Trx) motívuma (foldja) van, az α -hélixek és β -lemezek váltakoznak egymással, azaz: β - α - β - α - β - α - β - α (Kemmerink, 1997) (2. ábra A.). Az **a** és **a'** domén redox-aktív tioredoxin szerkezetű domének, míg a **b** és **b'** domén redox-inaktív. A protein diszulfid izomeráz teljes szerkezete még nem ismert, csak az **a** és **b** domén szerkezetét határozták meg (Kemmerink, 1996; 1999) (2. ábra B, C). A **c** domén egy feltételezett Ca^{2+} -kötő domén (2. ábra D).



2. ábra. A tioredoxin fold A, humán tioredoxin szerkezete; B, humán protein diszulfid izomeráz **a** doménjének szerkezete; C, humán protein diszulfid izomeráz **b** doménjének szerkezete; D, humán protein diszulfid izomeráz szerkezetének sematikus rajza.

Az **a** és az **a'** domén igen nagy szekvencia homológiát mutat a tioredoxinnal, tartalmazza az enzim két aktív centrumát, ami a Cys-X-X-Cys szekvenciával jellemezhető. A **b** és **b'** domén az evolúció során pontmutációkkal elvesztette a Cys-X-X-Cys aktív helyét (Ferrari, 1998). A PDI oxidoreduktáz/izomeráz funkciója, csakúgy mint a tioredoxiné, az **a** és **a'** doménon belül az N-terminális ciszteinhez köthető (Vuori, 1992, Wunderlich, 1995). A PDI chaperon aktivitásáért, az enzim peptidkötő tulajdonságáért - amikor is kölcsönhatásba kerül a helytelen szerkezetű fehérjékkel-, a **b** domén a felelős (Noiva, 1993).

A PDI multifunkcionális voltát mutatja, hogy képes kisméretű ligandok kötésére, például ösztadiol (Tsibris, 1989), 3,3',5-trijód-L-thyronin (Yamauchi, 1987), ATP (Nigam, 1994), de fehérjék alegységeként is előfordul: például a prolil-hidroxiláz β alegységéről régóta ismert, hogy PDI aktivitással rendelkezik (Vuori, 1992), és a mikroszómális triglicerid transzfer protein komplex egyik alegysége szintén PDI (Wetterau, 1990). A széles körben elterjedt PDI család fehérjéinek homológjai *Escherichia coli*-ban is megtalálhatók (DsbA, DsbC) (Bardwell, 1991, Zapun, 1995), élesztőben (Eug1) (Tachibana, 1992) is, és az emlős PDI-családnak is számos tagja van, amint azt az **1. Táblázat** is mutatja.

Fehérje	Méret	Domén szerkezet	Celluláris lokalizáció	Egyéb
PDI	55 kDa	a-b-b'-a'-c	ER, sejtmag, plazma membrán, sejt felszín, citoszol, szekretálódik	
ERp57 (ERp60, GRp58, ERp61)	54 kDa	a-b-b'-a'	ER, sejtmag, plazma membrán, sejt felszín, citoszol, szekretálódik	nukleáris lokalizációs szignál (NLS)
PDIp	55kDa	a-b-b'-a'	ER	Pankreász specifikus PDI
P5 (CaBP1)	46 kDa	a ⁰ -a-b-c	ER	A legkisebb redox-aktív fehérje, nem stressz-indukálható.
ERp72 (CaBP2)	71 kDa	c-a ⁰ -a-b-b'-a'	ER, sejt felszín, szekretálódik	
PDIR	57 kDa	b- a ⁰ -a-a'	ER	Minden egyes a doménnek különböző aktív centruma van.
ERp29 (ERp31, ERp28)	28 kDa		ER	Thioredoxin foldja van, Trx-aktív helye nincs.
ERp44	44kDa		ER	Szokatlan Trx-aktív hely, egy Trx-fold.
PDI-Dβ (ERp28)	26 kDa	b-D	ER	Nincs Trx-aktív helye.

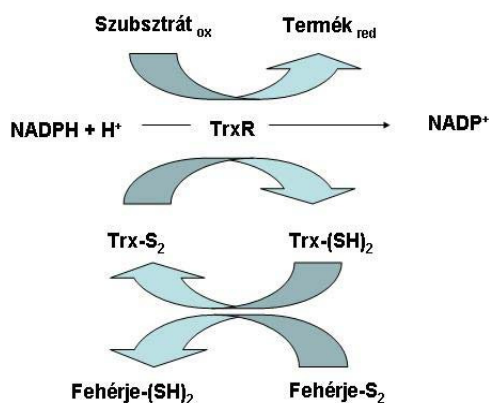
1. Táblázat. Az emlős PDI homológjai

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 (Lewis, 1986). Mind a PDI-t, mind az ERp57-et kimutatták a sejtmagban is, és azt is bizonyították, hogy ezen enzimek szabályozzák egyes transzkripció faktorok DNS-kötő képességét (Gerner,

1999, Coppari 2002). PDI jelen van a mitokondriumokban (Rigobello, 2000), a sejten kívül, mind pedig a sejt felszínén, mind szekretált fehérje formájában (Terada, 1995).

3.3. A tioredoxin szerepe

A tioredoxin-tioredoxin reduktáz rendszer központi szerepet tölt be az oxidatív stresszválasz kialakításában, baktériumokban és eukarióta sejtekben is. A tioredoxin reduktáz segítségével, az oxidált tioredoxin közreműködésével a fehérjékben található diszulfidhidak redukálódnak. A reakció reverzibilis, és NADPH-t igényel (3. ábra).



3. ábra. A tioredoxin reakciója

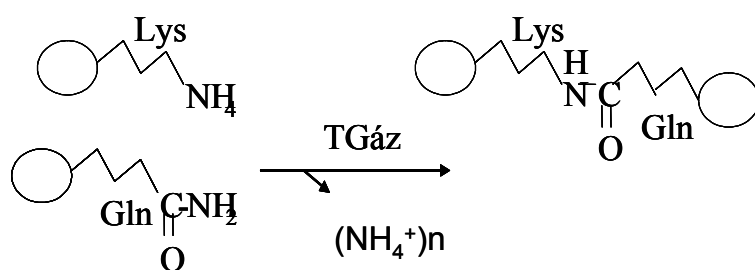
A tioredoxin 13 kDa molekulatömegű fehérje, aktív centrumában tartalmaz konzerválódott egy redox aktív diszulfid/ditiol csoportot (C-X-X-C). A tioredoxin nélkülözhetetlen az intracelluláris folyamatokban, kofaktorként vagy antioxidánsként működhet (Laurent, 1964; Silverman, 1988; Powis, 1995), szerepe van a DNS repair-ben (Xanthoudakis, 1992), transzkripció regulátora lehet például az NFκB-nek, AP-1-nek és a p53 fehérjének is (Hirota, 2000; Ueno, 1999), de leírták, mint növekedési faktort is. A tioredoxin oxidatív stressz hatására transzlokálódik a citoplazmából a sejtmagba (Hirota, 1999).

A tioredoxin nem klasszikus módon szekretálódhat a sejtől (Rubartelli, 1992), bár az még nem tisztázott, hogy az extracelluláris Trx-nak mi a célpontja: egy Trx-specifikus receptor, vagy esetleg a sejt felszínén megtalálható Trx-reduktáz, vagy más faktorok

igényelhetik a diszulfidhidak redukcióját. Az extracelluláris Trx felvétele és a sejtbe jutása transzkripciós faktorokat befolyásolhat, ami a génexpresszió megváltozásához vezetnek (Powis, 2001).

3.4. A transzglutamináz fehérje család

A kalciumion-függő transzglutaminázok (TGáz) egy aciltranszfer reakcióban vesznek részt, mely során fehérjék kovalens keresztkötését katalizálják. Az enzim a sejtfehérjék glutamin és lizin oldalláncai között izopeptid keresztkötéseket hoz létre (Folk, 1977) így stabil, oldhatatlan fehérjehálózatot képez az apoptotikus sejtekben.



4. ábra. A transzglutamináz által katalizált reakció

A reakció során a glutamin γ -aminocsoportja lehasad, és ammónia szabadul fel (**4. ábra**).

A transzglutamináz aktív centrumában ciszteint tartalmaz, mely egy hisztidinnel és egy aszpartáttal a papain proteáz család katalitikus centrumához igen hasonló katalitikus triádot alkot (Cys - His - Asp). Maga az enzimreakció szintén hasonló a cisztein proteázok által katalizált reakcióhoz, annak reverz formája.

A transzglutamináz család legkorábban ismert tagja a véralvadási kaszkád utolsó enzime, a XIII faktor (Laki-Lóránd faktor), a plazmában található zimogén formában. A XIII faktort a véralvadás során trombin és Ca^{2+} aktiválja, az aktív enzim fibrin molekulákat kapcsol egymáshoz, hogy stabil, úgynevezett kemény alvadék jöjjön létre (Muszbek, 1996).

A TG1 és TG3 (keratinocita és epidermális transzglutamináz) az epidermális differenciáció különböző stádiumaiban expresszálódnak, és strukturális fehérjéket kötnek össze. A fehérjék keresztkötése stabilizálja az elhalt hámsejteket, és így az a bőr elszarusodott rétegét alkothatja (Aeschlimann és Paulsson, 1994).

A TG4 (prosztata transzglutamináz) androgén hormon által szabályozott fehérje, mely az ondóképzésben játszik szerepet (Dubbink, 1996).

A TG5 a család legújabb tagja, szintén keratinocitákban írták le, ahol 2 különböző formában (alternatív splice variánsok) található meg. Az enzim széleskörű expressziót mutat fejlődő és felnőtt szervezetben egyaránt (Aeschlimann, 1998).

Fehérje	Szinoníma	Méret	Kifejeződés	Lokalizáció	Funkció
XIII A faktor	Fibrin-stabilizáló faktor, Laki-Lóránd faktor, profibrinoligáz, plazma proTGáz	83 kDa	vérlemezkék, asztrociták, bőridegsejt, porc-sejt, placenta, plazma	citoszol, extracelluláris tér	véralvadás, csont növekedés
TG1	TG _K , keratinocita TGáz	90 kDa	keratinociták, agy	membán, citoszol	sejt burok kialakítás
TG2	TG _T , szöveti TGáz, endotél TGáz, eritrocita TGáz	80 kDa	mindenütt	citoszol, sejtmag, membrán, sejt felszín, extracelluláris tér	többszörös
TG3	TG _E , epidermális TGáz,	77 kDa	epitél sejtek, agy	citoszol	sejt burok kialakítás
TG4	TG _P , prosztata TGáz	77 kDa	prosztata		ondó képződés
TG5	TG _X	81 kDa	mindenütt, kivéve központi idegrendszer		
TG6	TG _Y				
TG7	TG _Z		mindenütt		

2. Táblázat. Humán transzglutaminázok (Lorand, 2003 nyomán)

A szöveti transzglutamináz (TG2) igen sokféle sejtben, illetve szövettípusban megjelenik (Thomázy és Fésüs, 1989). Bár igen elterjedt enzim, pontos fiziológiai funkciója nem teljesen tisztázott, valószínűleg eltérő szövetekben eltérő funkciót lát el. A TG2 nem hordoz szignál peptidet, vagy szénhidrát láncokat, melyek a szekretált fehérjék jellemzői, és transzportja az extracelluláris térbe a mai napig tisztázatlan (Aeschlimann és Paulsson, 1994). Mint GTP-áz aktivitással rendelkező fehérje (Nakaoka, 1994), szignalizációs szerepet is tulajdonítanak neki. A TG2-nak a fehérjéket keresztlinkáló képességén kívül számos funkciója is lehet: amin-beépítés, hely-specifikus deamidálás, és izopeptidáz-aktivitás, valamint kijutva a sejtől közvetítheti integrin receptorok és fibronectinek közti kölcsönhatást, elősegítve ezzel a sejt-mátrix kapcsolat létrejöttét (Fésüs, 2002).

3.5. Transzglutamináz alacsonyabb rendű szervezetekben

Az utóbbi években transzglutamináz aktivitást mutattak ki egyre több alacsonyabb rendű létformánál (pl.: baktériumok, fonalférgek, növények). Bár több transzglutaminázt sikeresen klónoztak, egy részük nem mutatott sem szerkezeti, sem funkcionális hasonlóságot az ismert emlős transzglutaminázokkal. Például két baktériumtörzsből (*Bacillus subtilis*, *Streptovorticillium mobaraense* (Kobayasi, 1998, Pasternack, 1998)) is klónozták a transzglutaminázt, de a gén semmilyen hasonlóságot nem mutatott az eddig ismert TGáz család génjeivel. Hasonlóan, az *Escherichia coli* CNF1 (citotoxikus nekrotizáló faktor 1) fehérjéje és a *Bordetella pertussis* DNT (dermonekrotikus toxinja) fehérjéje tartalmazzák a katalitikus cisztein és hisztidin aminosavakat, képesek katalizálni a transzglutamináz reakciót, és képesek a Rho GTPáz deaminálására is (Schmidt, 1998), de semmiféle homológiát nem mutatnak az emlős transzglutaminázokhoz.

Az első nematóda, a *Brugia malayi* volt amelyből a TGáz fehérjét tisztították. A fehérje N-terminális aminosav sorrendjét meghatározták, de semmilyen ismert transzglutaminázzal vagy ismeretlen funkciójú fehérjével nem mutatott szekvenciális hasonlóságot (Singh, 1994). 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 (Chandrashekar, 1998). A cDNS nukleotid szekvenciája és az ebből származtatott aminosav sorrend semmilyen ismert transzglutaminázzal nem mutatott hasonlóságot. Jelentős homológiát találtak azonban a protein diszulfid izomeráz-rokon, endoplazmatikus retikulumból származó ERp60 fehérjével. Újabb érdekesség, hogy a nematóda TGáz fehérje két, olyan régiót is tartalmazott, melyek megfeleltek a PDI/tioredoxin-család két aktív centrumának. A fehérjét expresszálták *E. coli*-ban, és azt találták, hogy a rekombináns fehérjének mind protein diszulfid izomeráz, mind pedig kalcium-függő transzglutamináz aktivitása volt. A rekombináns fehérje aktivitását TGáz-specifikus inhibitorokkal gátolni lehetett (Chandrashekar, 1998). Később izolálták a *Giardia lamblia*-ból a protein diszulfid izomeráz 3 izoformáját, és mindhárom izoforma rendelkezett PDI és TGáz aktivitással is (Knodler, 1999).

A parazita nematódák transzglutaminázainak biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálata során kiderült, hogy tulajdonságaikban nagyon hasonlóak, de a „klasszikus”-transzglutaminázoktól eltérően a transzglutaminázok egy új típusú családját alkotják. Az új

transzglutamináz fehérjék azonosítása a két thioredoxin aktív centrummal új szemszögét mutatja be a fehérjék poszt-transzlációs modifikálásának a primitív életformákban.

3.6. A *Caenorhabditis elegans*, mint modell szervezet

A fejlődésgenetika közismert modell-szervezete, a *C. elegans*, a mérsékelt égövön mindenütt előforduló talajlakó fonálféreg (Nematoda). Gyors egyedfejlődése és önmegtermékenyítéssel való szaporodása révén a *C. elegans* a genetikai vizsgálatok kedvelt organizmusává vált. Az állandó sejtszámú *C. elegans* egyedülálló lehetőséget biztosít a fejlődésbiológiai kutatásokra, - ezen belül a programozott sejthalál vizsgálatára -, mert ontogenezise során az egyedfejlődés meghatározott szakaszában 1090 szomatikus sejtmagból 131 a programozott elhalás eredményeként eltűnik (Wood, 1988). Az elhaló sejtek az élő nematódában Nomarski optikával megfigyelhető, mivel az állat kültakarója átlátszó.

A genom-projekteknek köszönhetően ma már a *C. elegans* teljes genomja ismert (The *C. elegans* Sequencing Consortium), és adatbázisokból elérhető (The biology and genome of *C. elegans*, www.wormbase.org). Egyes gének célzott inaktiválására transzgenikus állatok előállítása több módon is lehetséges (Fire, 1999).

Intézetünkben, Mádi András már kimutatta a transzglutamináz fehérje jelenlétét *C. elegans* extraktumból. Egyedfejlődéssel kapcsolatos vizsgálatai kimutatták, hogy az ontogenezis során a konstitutív módon jelenlévő enzim mennyisége a felnőtt férgekben, és a sejthalál-folyamatokkal bíró L1 stádiumokban a legnagyobb (Mádi, 1998).

A *C. elegans* transzglutaminázának biokémiai vizsgálata rámutatott arra, hogy az enzim a gerincesek szöveti transzglutaminázától erősen eltérő sajátságokkal bír, de nagyon hasonlít a más nematódákban leírt enzimekhez (Mádi, 1998; Singh, 1994). A szöveti transzglutamináz evolúciós kialakulásáról még nagyon keveset tudunk. Néhány gerinctelen fajból biokémiai kimutatott enzim sajátságait 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 (Mehta, 2002). Ezt a feltételezést megerősíti a *Dirofilaria immitis*-ben klónozott transzglutamináz példája, ami a protein diszulfid izomerázzal mutatott szekvenciális homológiát, és a fehérje mindkét enzimre jellemző aktivitással is rendelkezett (Chandrashekar, 1998).

4. CÉLKITŰZÉS

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 kiviteleztek, 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 teszteltük. A rekombináns fehérjét a transzglutamináz aktivitás szempontjából megpróbáltuk biokémiaiailag 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.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. ANYAGOK

Az ampicillint, CBZ-L-glutaminil-glicint, ciklikus citidin-monofoszfátot (cCMP), dietil-pirokarbonátot (DEPC), ditiotreitolt (DTT), guanidin-hidrokloridot, hidroxilamint, para-nitrofenil-foszfátot, *N,N*-dimetil-kazeint, jódcetamidot, ribonukleázt (RNáz), streptavidin/alkalikus foszfátázt, marha szérum albumint (BSA), tengerimalac szöveti transzglutaminázt, marha protein diszulfid izomerázt, *E. coli* és humán tioredoxint, anti-glutation-S-transzferázt, anti-egér IgG antitest a Sigma cégtől származnak. A *Pfu* DNS polimerázt a Promega cégtől vettük.

5.1.1. Alkalmazott baktérium törzsek, plazmidok, bakteriofágok

E. coli DH5 α

E. coli JM83

E. coli JCB570 (*dsbA*⁺), *E. coli* JCB571 (*dsbA*⁻) törzseket Prof. Dr. Frances Gillin (Center for Molecular Genetics, University of California, San Diego) küldte el Intézetünkbe.

A pGEX-4T3 plazmidot a Promega, a pMALp2 vektort a New England Biolabs cégtől szereztük be. A *C. elegans* PDI-3 cDNS-t (yk83g12 klón) lambda fág formájában küldte el Intézetünkbe Dr. Yuji Kohara (National Institute of Genetics, Mishima, Japan).

5.2. MÓDSZEREK

5.2.1. A baktériumok fenntartása és szaporítása

Az *E. coli* törzseket LB táptalajon (ha szükséges a megfelelő antibiotikumokkal kiegészítve) tartjuk. 4°C-on tároljuk, havonta átoltjuk. 2ml LB tápoldatba oltva, rázógépből levegőztetve 37°C-on éjszakán át szaporítjuk.

5.2.2. Lambda fág szaporítása

A bakteriofágokat kettős agarréteg technika segítségével szaporítottam a megfelelő gazdán. Petri csészében megszilárdult LB agar táptalajra 4ml lágyagar (olvasztott, majd 45°C-ra hűtött 50 µl 1M MgSO₄ jelenlétében), 0.3 ml egyéjszakás gazdabaktérium szuszpenzió és 0.1 ml fáguszuszpenzió keverékét öntöttem. A fedőréteg megszilárdulása után 12-15 órára 37°C-os termosztátba helyeztem. Az inkubáció után a lizált fágokat SM pufferrel mostam le a táptalaj felszínéről.

5.2.3. *E. coli* transzformálása plazmid DNS-sel

A transzformálást a CaCl₂ hősokk módszerrel végeztem, a leírtak szerint (Inoue, 1990).

5.2.4. Plazmid DNS és lambda fág DNS tisztítás

A Wizard Plus SV minipreps-hez valamint a Wizard Lambda Preps-hez mellékelt leírás alapján végeztem (Promega).

5.2.5. DNS endonukleáz emésztés, feltöltés, defoszfatálás és ligálás

Az enzimeket (restrikciós endonukleázok, CIAP, Klenow és T4 DNS ligáz) a MBI Fermentas cégtől vásároltuk. A reakciókat a gyártó javaslata alapján végeztem.

5.2.6. DNS elválasztás agaróz gélelektroforézissel

A különböző DNS struktúrák elválasztására horizontális agaróz gélelektroforézist alkalmaztam. Kísérleteim során 1%-os agaróz gélét használtam.

5.2.7. DNS fragmentumok tisztítása

A különböző nagyságú DNS fragmentumokat, PCR termékeket agaróz gélből való izolálását a GeneClean Spin Kit-tel, a gyártó előírásai szerint tisztítottam (BIO 101).

5.2.8. DNS amplifikálás polimeráz láncreakcióval (PCR)

Az izolált lambda fág klón DNS 10 ng-ját használtuk a PCR reakcióhoz, mely 1.5 mM MgCl₂ 2.5 mM nukleozid trifoszfát, 1 unit *Pfu* DNS polimeráz jelenlétében zajlott (PCR reakció puffer: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, pH 9.0). A PDI-3 gén 1500 bázispárnyi fragmentjét 30 ciklusban sokszoroztuk fel, az alábbiak szerint: első ciklus: denaturáció: 3 perc, 94 °C, hibridizáció: 57 °C, 2 perc, lánchosszabbítás: 72 °C, 3.5 perc, további ciklusok: denaturáció: 1 perc, 94 °C, hibridizáció: 57 °C, 1 perc, lánchosszabbítás: 72 °C, 3.5 perc. Az alkalmazott primerek: 5'-ACG CGT CGA CAT GAT TTG GGT CCA GGC AGC-3' elülső primerként, 5'-TCT TCA ATG CGG CCG CTT ACA ATT CAG TCT TCT TCT TCT T-3' hátulsó primerként.

5.2.9. A rekombináns fehérje termeltetése

A pGEX4T-3 expressziós vektorba klónozott gén a glutation-S-transzferáz (GST) enzimhez kapcsolt fúziós fehérje formájában fejeztethető ki. A *tac* promótert 0,1mM izopropil β-D-1-tiogalakto-piranoziddal (IPTG) 25 °C-on 6 órán át indukáljuk. Az expresszió *E. coli* JM83 törzsben történt. A rekombináns fehérje tisztítása affinitás kromatográfia segítségével, Glutathion Sepharose 4B oszlopon történt, a gyártó (Amersham Pharmacia Biotech) javaslatai alapján.

5.2.10. Helyspecifikus mutagenézis

A helyspecifikus mutagenézishez a QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit-et (Stratagene) használtuk. Az egyszeres és kétszeresen mutált enzimek generálásához az alábbi primereket alkalmaztuk: a1UP, 5'-CGC TCC CTG GGC CGG CCA CTG CAA G-3'; a1DOWN, 5'-CTT GCA GTG GCC GGC CCA GGG AGC G-3'; a2UP, 5'-TAT GCT CCC TGG GCC GGA CAT TGC AAA TC-3'; a2DOWN, 5'-GAT TTG CAA TGT CCG GCC CAG GGA GCA TA-3', a tioredoxin domén mutagenéziséhez pedig a következőket: t1UP, 5'- CCC TGG TGC GGA CAT GCC AAG AAA AT-3'; t1DOWN, 5'- CAA TTT TCT TGG CAT GTC CGC ACC AGG G-3'; t2UP, 5'- CGC TCC CTG GGC CGG CCA CGC CAA GAA AAT TG-3'; t2DOWN, 5'- CAA TTT TCT TGG CGT GGC CGG CCC AGG GAG CG-3'.

5.2.11. Western blot

A rekombináns fehérjéből készített mintákat 10% SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk, majd Immobilon P membránra (Millipore) blottoltuk nedves blot technikával. A membránt sovány tejporos oldattal (5% sovány tejpor/PBS/0.01% Tween-20 oldattal) blokkoltuk egy éjszakán át 4°C-on. Az immunreakcióhoz használt első antitestet (anti-GST 1:5000 hígításban) és a második antitestet (peroxidáz enzimmel kapcsolt anti egér IgG, 1:10000) 1% sovány tejpor-0.01% Tween-20/PBS oldatban 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránnal. A blot előhívása ECL kittel (Amersham) történt, kék fényre érzékeny filmre.

5.2.12. Protein diszulfid izomeráz aktivitás mérése

A mérés elve az, hogy a denaturált RNáz diszulfid hidjait a protein diszulfid izomeráz helyreállítja, vagyis az RNáz szubsztrát (45 mM cCMP) hozzáadása után, RNáz aktivitást mérünk GSH (0.1 M) és GSSH (20 mM) jelenlétében 296 nm-en (Lyles, 1991). A redukált, denaturált RNáz (5mg) 1 órán át inkubáltam 37 °C-on 2mM EDTA, 6M guanidin hidroklorid, 0.14 M DTT, pH:8.0 jelenlétében, majd Bio-Gel P4 (Bio Rad) sómentesítő oszlopon centrifugáltam. A reakcióelegy 900µl puffert (0.1 M Tris, pH: 8.0), 10µl GSH-t, 10 µl GSSH-t és 100µl cCMP-t tartalmazott.

5.2.13. Alkalikus foszfatáz aktivitás mérése

A mérés a következő színreakción alapul: *para*-nitrofenil foszfát (szintelen) ^{-alkalikus foszfatáz} → *p*-nitrofenol + P_i (sárga). A lizozimmal feltárt baktériumsejtekhez 200 µl 15mM Sigma 104 szubsztrátot adtunk. A reakciót 10 perc múlva 200µl 1 M KH₂PO₄-tal állítottam le, és 420 nm-en fotometráltam (Humphreys 1995).

5.2.14. Transzglutamináz aktivitásmérések

5.2.14.1. Mikrotiter lemezes módszer (ELISA):

A lemezeket 12 órán keresztül *N,N*-dimetil-kazeinnel (20mg/ml 100mM Tris/HCL, pH: 8.5 pufferben) inkubáltam 4 °C-on, a fedetlenül maradt felületeket sovány tejporos oldattal (0.5% 100mM Tris/HCL, pH: 8.5 pufferben) blokkoltam. A reakcióelegy 10mM DTT-t, 5mM CaCl₂-ot és 1mM *N*-(5-aminopentil)-biotinamidot tartalmazott. A mintákat 1

óraig inkubáltam 55 °C-os vízfürdőben (Chandrashekar, 1998), és a reakciókat EDTA oldatos mosással (200mM EDTA 100 mM Tris/HCL, pH: 8.5 pufferben) állítottam le. A kovalensen kazeinbe épült biotinált-amin szubsztrátot streptavidin-konjugált alkalikus foszfatázos inkubálás (1.67µg/ml tejporos oldat, 1 óra, 25 °C) után *p*-nitrofenil-foszfát oldat (25mM 100 mM Tris/HCL, pH: 8.5 pufferben) hozzáadásával 405 nm-en detektáltam. Összehasonlító vizsgálataim során a vad típusú enzim aktivitását vettem kontrollnak (100%), és ehhez viszonyítottam a többi, mutáns fehérjénél mért értékeket. A mérések során fehérjét nem tartalmazó „enzimvakot” is készítettem, és a detektálható abszorpció-növekedés esetén ezek értékeit az eredeti aktivitásból levontam. A transzglutamináz inhibitorok alkalmazásánál az alábbi koncentrációkat alkalmaztam: 10mM EDTA, 10 mM jóacetamid, 10mM NH₄Cl, 10mM MgCl₂.

5.2.14.2. Dot blot:

A 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.

5.2.14.3. 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 (Folk, 1966).

5.2.15. 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 (Sinha, 1985; Keresztessy, 1994).

5.2.15. 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 végeztem el, a humán PDI a doménját használva templátként.

5.2.16. CD spektroszkópia

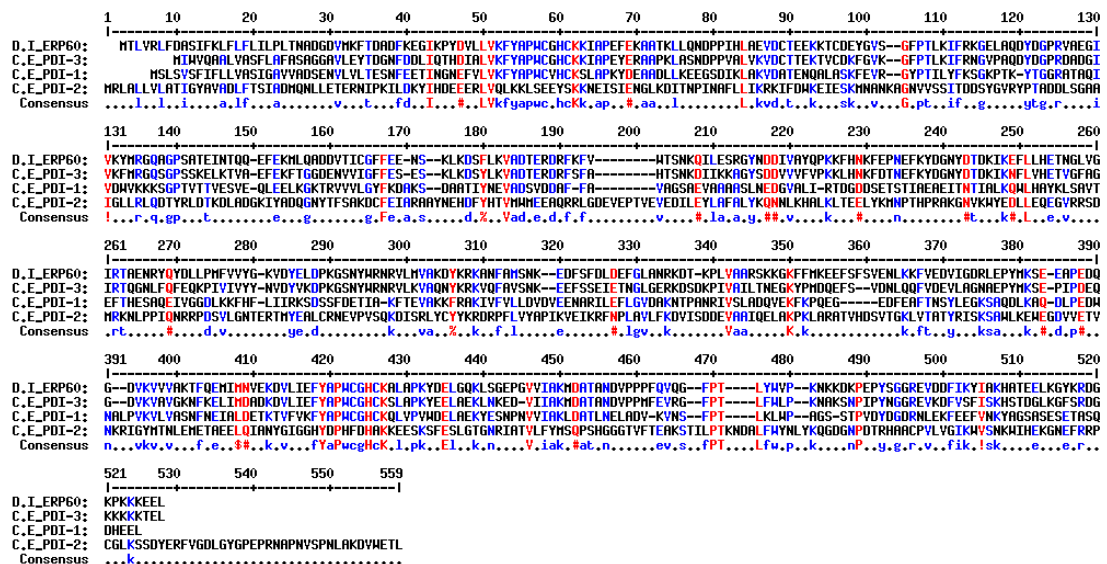
A CD spektrumok felvételei a Debreceni Egyetem Természettudományi Karának Szerves Kémiai Tanszékén, dr. Kurtán Tibor segítségével készültek. A minták koncentrációja 5 μ M PDI és 25 μ M Trx volt 0,1 M Tris-HCl-ben (pH: 8,5). A készülék típusa Jasco-810 spektropolariméter volt, egy termosztáttal kiegészítve (RTE-111, NesLab). A mérések 25 °C és 55 °C-on történtek. Az ellipticitást (θ) $\text{deg.cm}^2\text{dmol}^{-1}$ -ban fejeztük ki, az alábbi képletet használva: $[\theta] = \frac{MW\theta}{1000cl}$, ahol θ volt a mért ellipticitás (m.deg), MW a molekulatömeg, c a minta koncentrációja (mol/dm^{-3}), l a fényút hossza (cm) és n az aminosavak száma.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A *Caenorhabditis elegans* PDI-3 gént kódoló klón kiválasztása

Intézetünkben már kimutatták, hogy a *C. elegans* rendelkezik transzsglutamináz aktivitással (Mádi, 1998), ennek ismeretében megpróbáltuk a genom-adatbázisokban azonosítani a transzsglutamináz aktivitásért felelős gént. Szekvencia-összehasonlításokat végeztünk, de az emlős transzsglutaminázokkal semmilyen homológ fehérjét nem találtunk. Irodalmi adatokból ismert, hogy a *Dirofilaria immitis* fonalféregből tisztított transzsglutamináz (ERp60) protein diszulfid izomeráz aktivitással is rendelkezik, (Chandrashekar, 1998) és a *Girardia lamblia* protein diszulfid izomerázának mindhárom izoformájánál is mérték transzsglutamináz aktivitást (Knodler, 1999). Mivel a *C. elegans* extraktumból a TGáz fehérjét már több módszerrel kimutatták (aktivitásmérés, Western blot) (Mádi, 1998), ezért az irodalmi adatokra támaszkodva próbáltuk meg azonosítani a transzsglutaminázért felelős gént.

A *C. elegans* genomjában három PDI található (www.wormbase.org). A kétféle aktivitást is mutató ERp60 fehérjével legnagyobb homológiát mutató gént szerettük volna kiválasztani, ezért szekvencia összehasonlító vizsgálatokat végeztünk. (5. ábra).



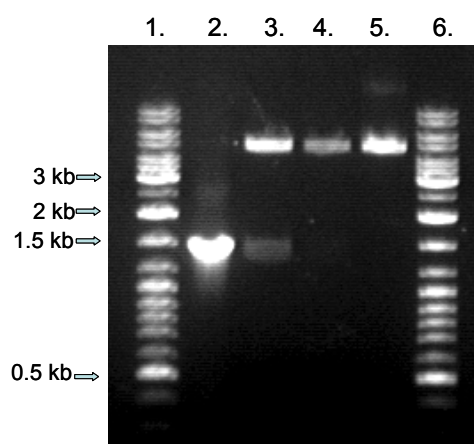
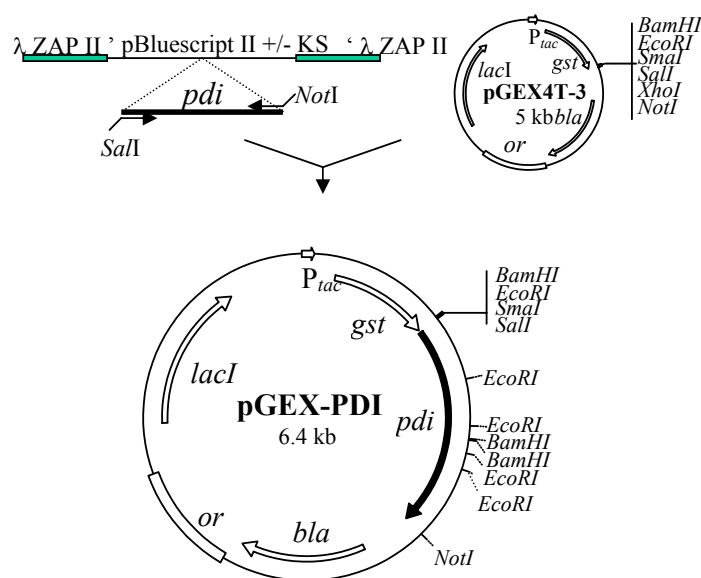
5. ábra. ERp60 és PDI-1,-2,-3 fehérjék összehasonlítása

Rövidítések: D.i.: *Dirofilaria immitis*, C.e.: *Caenorhabditis elegans*, Szimbólumok: !: I vagy V, \$: L vagy M, %: F vagy Y, #: N, D, Q, E, B vagy Z.

Az összehasonlításokból kiderült, hogy a PDI-3 gén 80%-os homológiát mutat az ERp60-nal. Vizsgálatainkat ezután csak a PDI-3-ra korlátoztuk, és a PDI-3 cDNS-t kódoló klónt meg is találtuk a *C. elegans* Genome Sequencing Center-ben (klón neve: yk83g12).

6.2. A *C. elegans* PDI-3 klónozása és expressziója

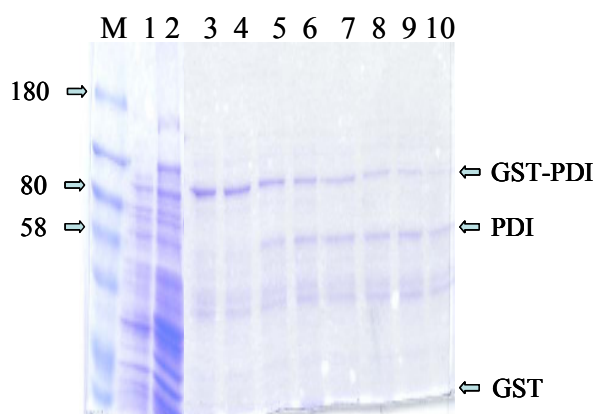
A PDI-3 cDNS-ét kódoló klónt lambda fág formájában kaptuk meg (Dr. Yuji Kohara, National Institute of Genetics, Mishima, Japan). A PDI-3 gén szekvenciája ismeretében primereket terveztünk a gén amplifikálásához, majd a PCR-terméket kettős emésztést (*SalI*, *NotI*) követően IPTG-vel indukálható GST-fúziós expressziós vektor (pGEX-4T3) sokklónózó helyére klónoztuk (6. ábra).



6. ábra. A PDI-3 gént tartalmazó konstrukció előállítás

1. DNS létra, 2. PCR termék, 3. pGEX-PDI konstrukció kettős emésztése (*SalI*, *NotI*), 4. pGEX-4T3 plazmid kettős emésztése (*SalI*, *NotI*), 5. pGEX-4T3 emésztetlen plazmid kontroll, 6. DNS létra.

A kapott plazmiddal (pGEX-PDI) *E. coli* JM83-at transzformáltunk, a transzformánsokból baktérium kultúrát növesztettünk. A szuszpenziót IPTG-vel indukáltuk és a rekombináns fehérjét kifejeztettük. A rekombináns fehérje tisztítása affinitás kromatográfia segítségével történt. A fúziós fehérjéről a GST trombin kezeléssel lehasítottuk (7. ábra).



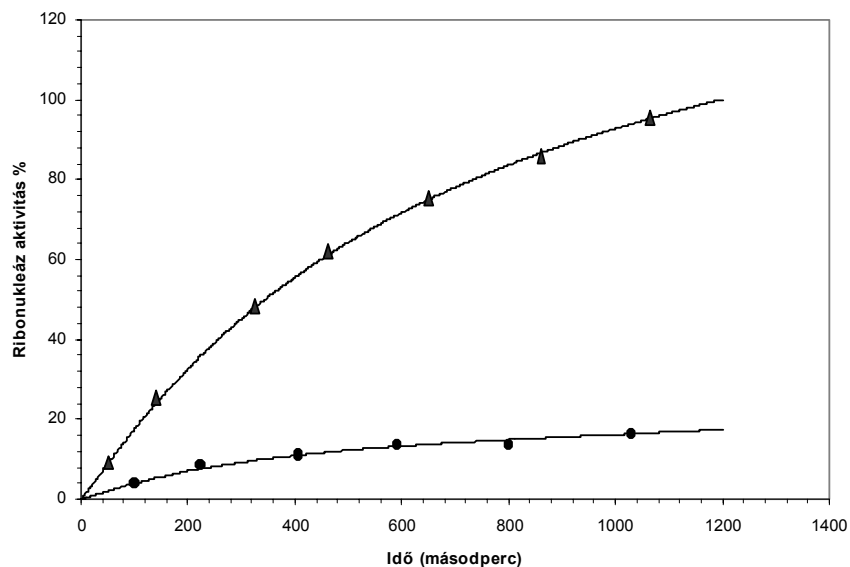
7. ábra. PDI-3 rekombináns fehérje tisztítása

M: Molekula súly standard, 1: nem indukált sejtmentes extraktum, 2: IPTG-vel indukált sejtmentes extraktum, 3: affinitás kromatográfiával tisztított fúziós fehérje, 4-10: fúziós fehérje hasítása trombinnal, 0 perctől-6 óráig.

A rekombináns fehérje aktivitásméréseikor összehasonlítottuk a fúziós fehérje aktivitásait a GST-nélküli fehérje aktivitásaival, azonban különbséget nem találtunk. Így a további kísérletekben a fúziós fehérje formát alkalmaztuk.

6.3. Rekombináns PDI fehérje diszulfid izomeráz aktivitásának meghatározása *in vitro* és *in vivo*

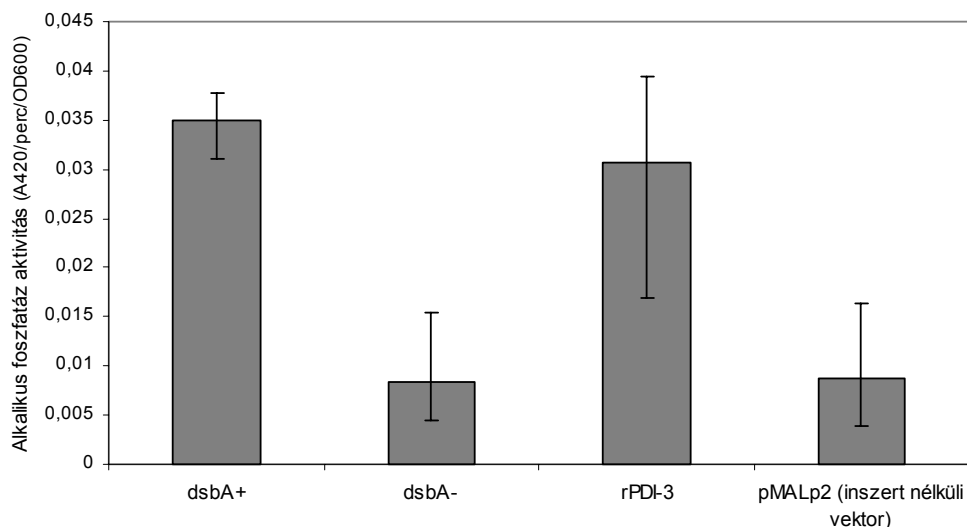
A rekombináns fehérje protein diszulfid izomeráz aktivitását *in vitro* a denaturált, redukált RNáz aktív szerkezetének visszaállítással („refolding”-képességével) mértem (8. ábra). A kísérletet megelőzően az RNáz-t redukáltam, és denaturáltam, majd a rekombináns PDI és RNáz szubsztrát (cCMP) hozzáadása után, a helyreállított RNáz aktivitását mértem fotométeren.



8. ábra. A rekombináns PDI-3 katalizálja a denaturált, redukált RNáz natív szerkezetének helyreállítását

Jelölések: ●: denaturált, redukált RNáz aktivitása, ▲: rPDI-3.

A rekombináns fehérje működőképességéről komplementációval *in vivo* is meggyőződünk. A protein diszulfid izomeráz bakteriális homológjai a DsbA fehérjék (Dsb = disulphide binding). A DsbA fehérje a baktérium periplazmájában expresszálódik. A kísérletben használt modellfehérje az alkalikus foszfatáz volt, amely feltekeredéséhez igényli a fehérjét. Rendelkezésünkre állt egy olyan *E. coli* törzs (*dsbA*⁻), amely defektes volt az funkcionális alkalikus foszfatáz kialakításában. 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 (9. ábra).



9. ábra. Komplementációs kísérlet: alkalikus foszfatáz aktivitásmérés

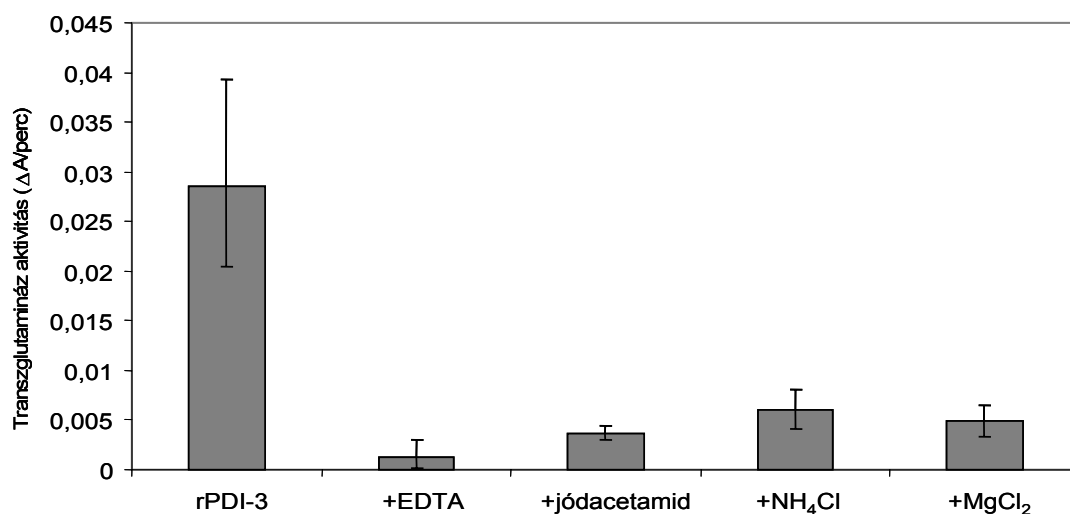
Az *E. coli* *dsbA*⁺, a *dsbA*⁻, valamint a rPDI-3-at tartalmazó expressziós vektort és az inszert nélküli vektort tartalmazó *dsbA*⁻ törzs aktivitásai. Az ábra három független mérés eredményeinek átlagát mutatja.

6.4. A rekombináns PDI-3 fehérje Ca²⁺-ion függő transzglutamináz aktivitással is rendelkezik

Az irodalmi adatokra támaszkodva, ahol a *D. immitis* TGáz-ánál jelentős szekvenciális homológiát találtak a PDI-vel, valamint a fehérje mindkét enzimre jellemző aktivitást mutatott (Chandrashekar, 1998), és a *G. lamblia* mindhárom PDI fehérjéje TGáz aktivitást mutatott (Knodler, 1999), mi is teszteltük, hogy a *C. elegans* PDI-je rendelkezik-e TGáz aktivitással. A kísérletek során az irodalomban is alkalmazott, nagy érzékenységű ELISA módszert alkalmaztuk. Az rPDI-3 fehérje a biotinált pentilamin kazeinbe történő beépülésén alapuló ELISA-módszer segítségével detektálható transzglutamináz aktivitást adott.

A reakció csak 55°C-on játszódott le, TGáz aktivitást csak ezen a hőmérsékleten tudtunk kimutatni. A kísérletet megismételtük 37°C illetve 25°C inkubációs hőmérsékleten is, transzglutamináz aktivitás azonban nem volt detektálható.

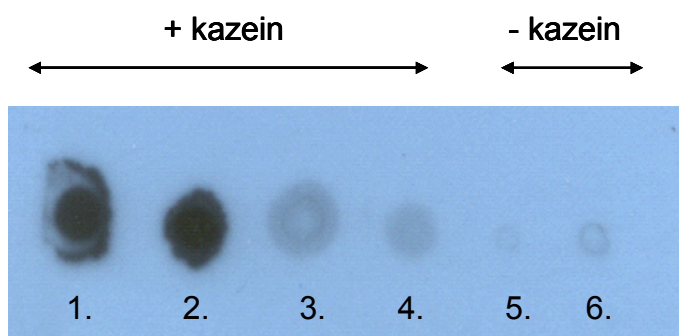
Az enzim aktivitása transzglutamináz-specifikus inhibitorokkal gátolható volt (10. ábra).



10. ábra. rPDI-3 transzglutamináz aktivitásának meghatározása

A mérés 55°C-on, ELISA-módszerrel történt Ca^{2+} jelenlétében/hiányában, valamint vizsgáltuk különböző inhibitorok hatásait. Az ábra három független mérés eredményeinek átlagát mutatja.

A következőkben, annak eldöntésére, hogy a rekombináns PDI-3 esetleg önmagába építi be a szubsztrátot (biotinált ament), nem egy artefactum-ról van szó, dot blot kísérletet végeztünk. Az ELISA-reakciót ez esetben Eppendorf csőben végeztük el, szintén 55°C-os inkubációs hőmérsékleten, majd a reakcióelegyből membránra cseppentettünk, avidin és biotinált peroxidáz anti-egér IgG hozzáadása után, a jelet ECL-technikával mutattuk ki. A kereskedelmi forgalomban beszerezhető tengerimalac TGáz-t használtuk pozitív kontrollként, és azt találtuk, hogy a tengerimalac TGáz-ával egyenértékű jelet ad a rPDI-3. A PDI-3 nem építi be magába a biotinált ament, hanem valóban transzamidációt katalizál a kazein és az ament között (11. ábra).

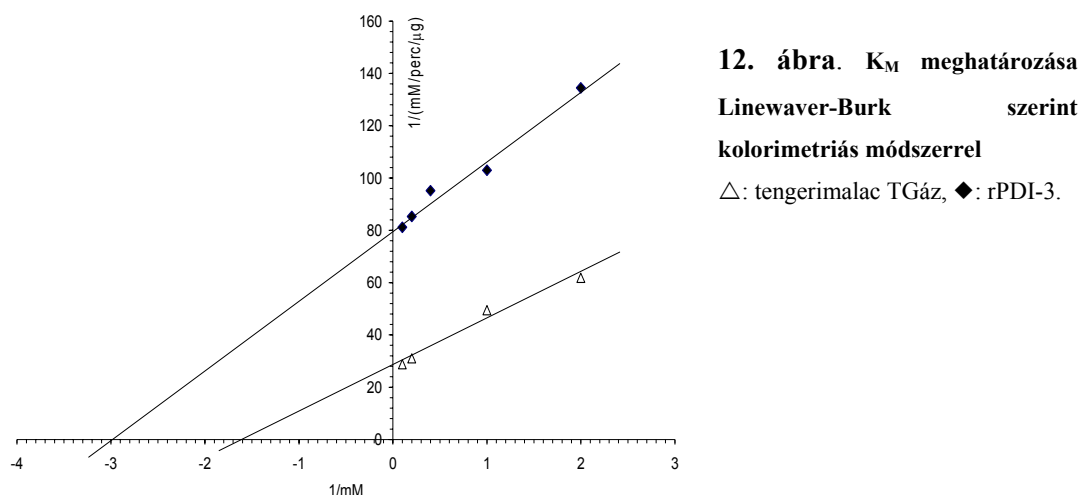


11. ábra. A dot-blot kísérlet azt mutatja, hogy a rPDI-3 nem építi be önmagába a biotinált pentilamint

1: kazein + Ca^{2+} + tengerimalac TGáz, 2: kazein + Ca^{2+} + rPDI-3, 3: kazein + rPDI-3, 4: kazein + Ca^{2+} , 5: rPDI-3 + Ca^{2+} , 6: rPDI-3. A biotinált pentilamin mindegyik mintában jelen van.

A rekombináns fehérje transzglutamináz aktivitásáról kolorimetriás módszert alkalmazva is meggyőződünk. A kísérletben CBZ-L-glutaminglicin dipeptid volt az amin akceptor, és a hidroxilamin az amindonor. A keletkező hidroxamát termék színreakciót ad a vas-kloriddal, ami fotométeren mérhető. Azt szeretnénk volna kizárni, hogy a PDI-3 a kazeinben esetleg nem a Glu oldallánccal reagál, hanem egy másik aminosavval. A módszer a másik előnye az, hogy az enzim specifikus aktivitása meghatározható.

Az enzimek K_M értékét meghatároztuk: rPDI-3 esetében ez 0,33 mM volt; ami nagyságrendben összevethető értéket adott a tengerimalac TGáz-ával (0,62 mM). Hasonló értékeket tapasztaltunk az enzimek specifikus aktivitásának meghatározásakor is: rPDI-3: 12,3 $\mu\text{mol/perc}/\mu\text{g}$ volt, tengerimalac TGáz-ánál (34,7 $\mu\text{mol/perc}/\mu\text{g}$) (12. ábra).

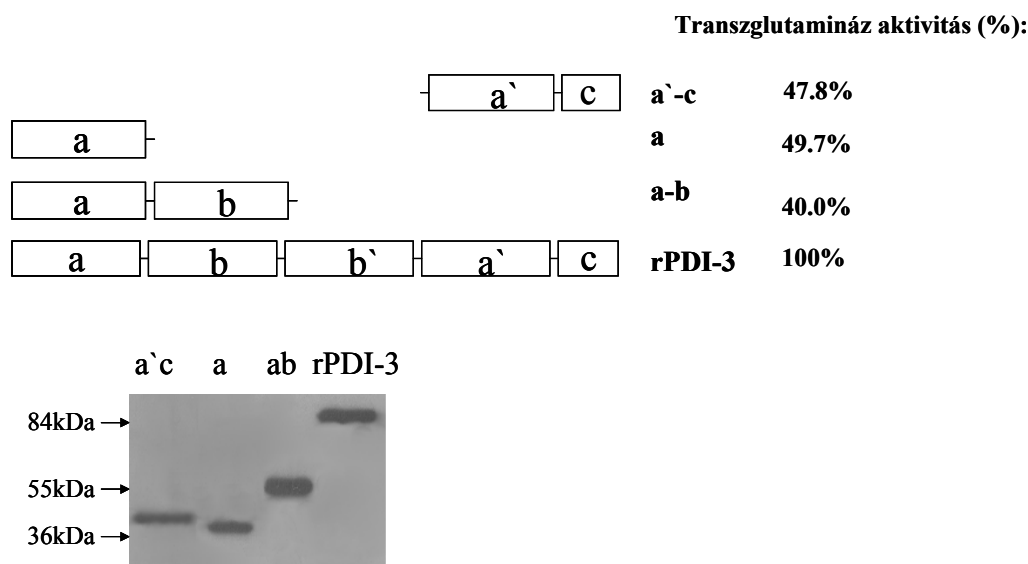


6.5. PDI-3 deléciós mutánsok készítése és a rekombináns fehérjék transzglutamináz aktivitásának meghatározása

Annak meghatározására, hogy a PDI-3 melyik doménje felelős a kimutatott transzglutamináz aktivitásért, többféle deléciós mutánt állítottunk elő.

A deléciós fehérjék előállítása molekuláris genetikai eszközökkel történt: ismertük a PDI fehérje doménhatárait (Ferrari, 1999), a PDI-3 génben egyedi restrikciós helyeket kerestünk a doménhatároknál, majd a restrikciós emésztés két, különböző enzimmal történt. Az emésztési reakció után, dNTP-t és Klenow fragmentet adtunk a reakcióelegyhez, ami tompa végű DNS-szállá egészítette ki a restrikciós enzimek hagyta ragadós véget. A tompa

végű konstrukciót, ami tartalmazta a gén bizonyos részletét és az expressziós vektort, ezután önmagával ligáltuk. A kapott konstruktok segítségével a deléciós fehérjéket expresszáztattuk, és tisztítottuk. A deléciós fehérjék helyes molekulatömegéről Western blottal bizonyosodtunk meg, ahol GST-elleni antitestet használtunk (13.ábra).



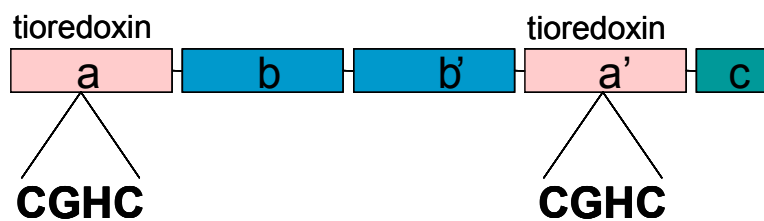
13. ábra. rPDI-3 deléciós származékainak Western blotja és transzglutamináz aktivitása

Mindegyik deléciós mutáns GST-fúziós fehérje.

A deléciós mutánsok transzglutamináz aktivitását ELISA módszerrel mértük, hasonlóan az előző mérésekhez 55°C-os inkubációs hőmérsékleten. A vad típusú enzim aktivitását 100%-nak vettük, ehhez viszonyítottuk a többi fehérje aktivitását. A deléciós mutánsok analízise feltárta, hogy az **a** és **a'** domént tartalmazó fehérje is rendelkezett transzglutamináz aktivitással (13. ábra).

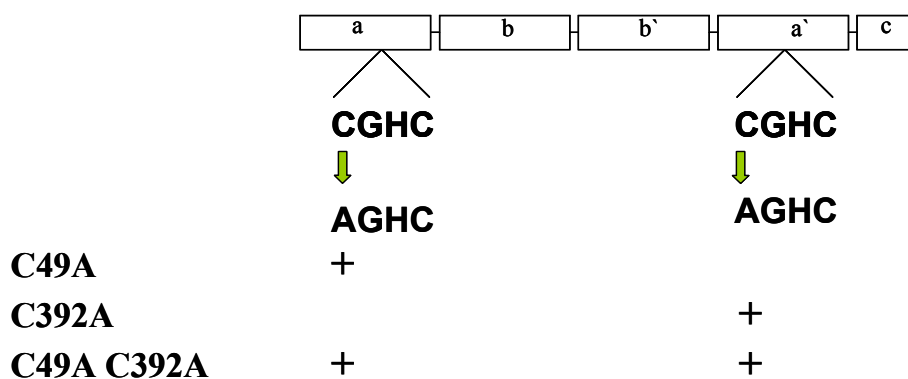
6.6. A PDI-3 aktív centrumának mutagenézise

A *C. elegans* PDI-3 gén két aktív CGHC szekvenciával, vagy más néven tioredoxin motívummal rendelkezik az **a** és az **a'** doménen belül (14. ábra). Mindegyik tioredoxin motívumban az első cisztein a felelős a PDI diszulfid izomeráz aktivitásáért (Wunderlich, 1995).



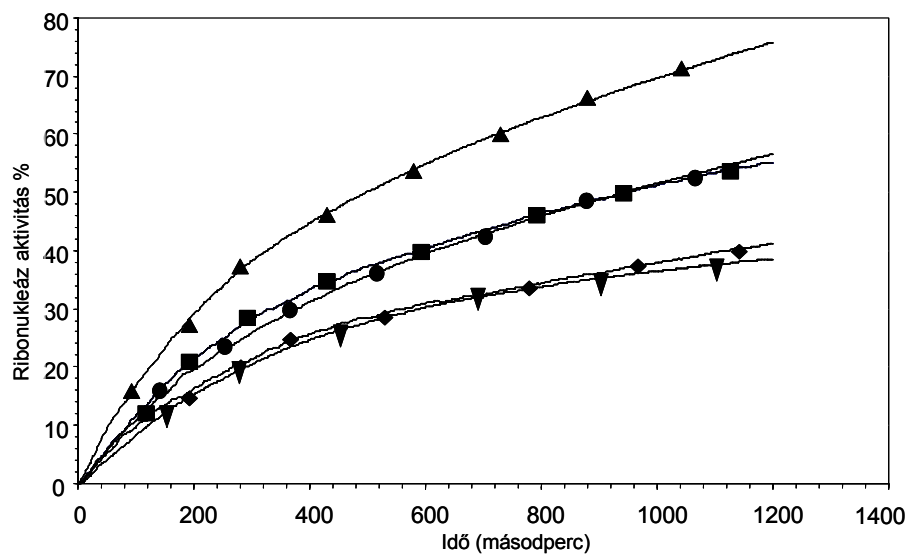
14. ábra. A PDI szerkezete

Hely-specifikus mutagenézist alkalmazva a katalitikus aktivitásért felelős ciszteineket alaninra cseréltük ki mind az **a**, mind pedig az **a'** doménben, létrehozva így két egyszeres és egy kétszeres mutánst (15. ábra).



15. ábra. Pontmutások létrehozása

A mutáns enzimek különféle variációit (rPDI_{AGHC-CGHC}, rPDI_{CGHC-AGHC}, rPDI_{AGHC-AGHC}) ezután összehasonlítottuk a vad típusú enzimmel (rPDI_{CGHC-CHGC}), diszulfid izomeráz (16. ábra) aktivitásukat meghatároztuk.

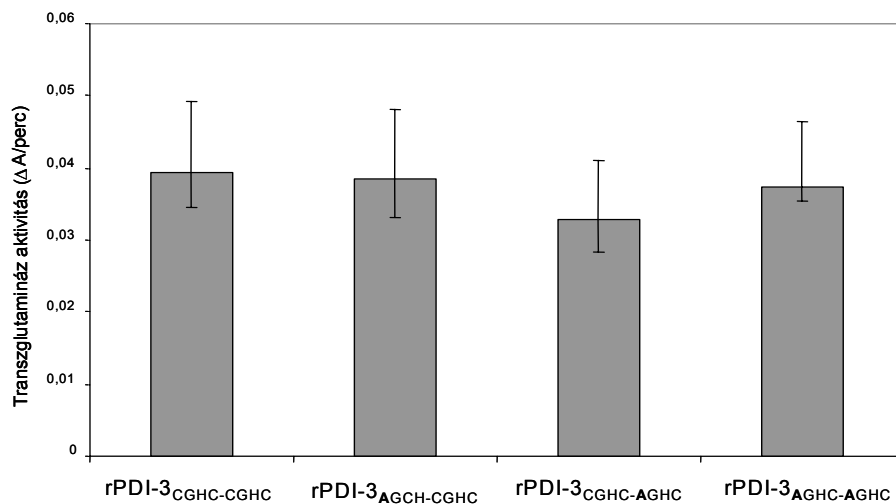


16. ábra. Mutáns rPDI-3 fehérjék diszulfid izomeráz aktivitása

Jelölések: rPDI-3_{CGHC-CGHC} : ▲, rPDI-3_{AGHC-CGHC} : ■, rPDI-3_{CGHC-AGHC} : ●, rPDI-3_{AGHC-AGHC} : ▼, denaturált, redukált RNáz: ◆.

Látható, hogy az egyszeres mutánsok izomeráz aktivitása fele a vad típusú enzimnek. A kétszeres mutáns nem rendelkezett mérhető PDI aktivitással, inaktív volt.

Ezek után megvizsgáltuk a mutáns fehérjék transzglutamináz aktivitását is (17. ábra).



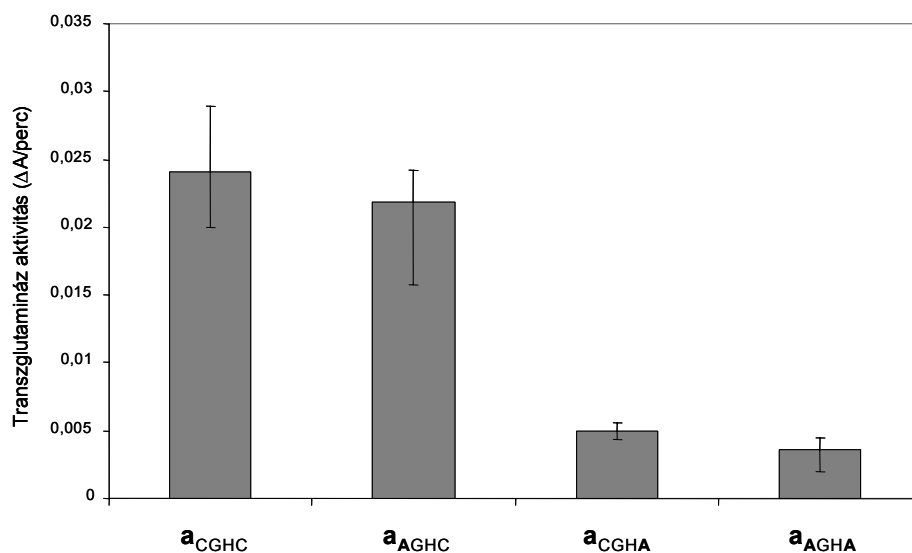
17. ábra. Mutáns rPDI-3 fehérjék transzglutamináz aktivitása

Az ábra három független mérés eredményeinek átlagát mutatja.

A fehérjék transzglutamináz aktivitásmérése ELISA módszerrel, 55°C-on történt. 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.

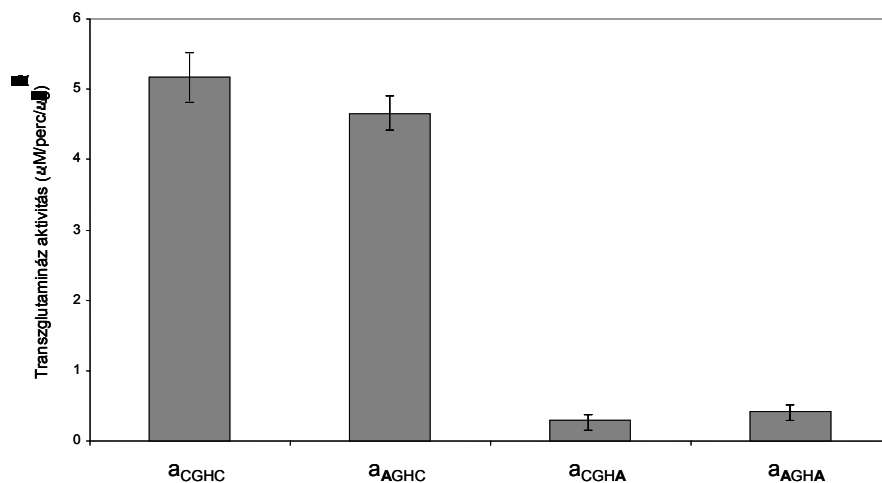
6.7. A tioredoxin domén mutagenézise

Miután megállapítottuk, hogy a PDI aktív centrumában (CGHC) lévő első, katalitikus cisztein alaninra cserélése nem befolyásolta a transzglutamináz aktivitást, helyspecifikus mutagenézissel a második ciszteint is kicseréltük egy alaninra. Mivel sikerült az rPDI-3 transzglutamináz aktivitását lokalizálnunk az **a** és **a'** doménre (tioredoxin domén) (6.5. alfejezet), a helyspecifikus mutagenézist már csak az **a** doménen 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 mutáns fehérjék transzglutamináz aktivitását mind az ELISA (18. ábra), mind pedig a kolorimetriás módszerrel (19. ábra) meghatároztuk.



18. ábra. Mutáns rPDI-3 **a** doménjét tartalmazó csonka fehérjék transzglutamináz aktivitása ELISA módszerrel

Az ábra három független mérés eredményeinek átlagát mutatja.

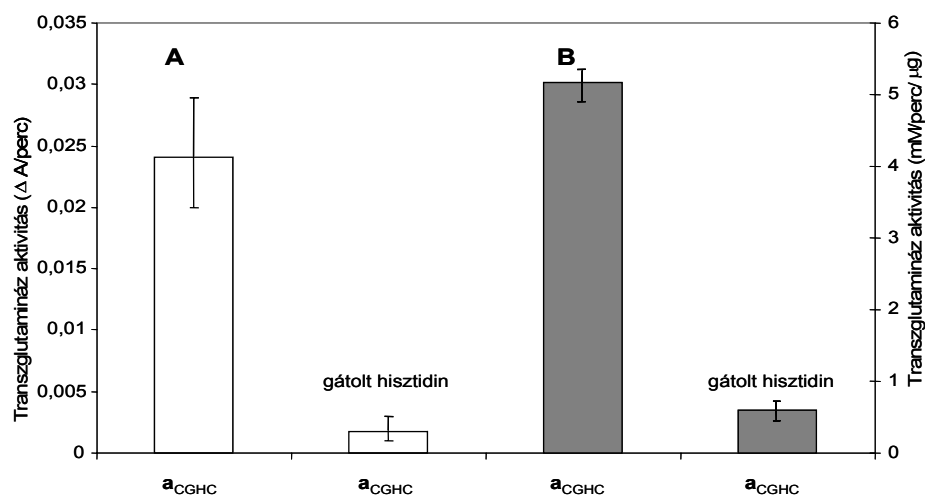


19. ábra. Mutáns rPDI-3 a doménját tartalmazó csonka fehérjék transzglutamináz aktivitása kolorimetriás módszerrel

Az ábra három független mérés eredményeinek átlagát mutatja.

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 aktív centrumát három aminosav adja, a Cys-His-Asp, a humán TG2 szerkezetvizsgálatakor a Cys-277, His-335, Asp-358 katalitikus triádot határozták meg (Liu, 2002). A PDI-3 mindkét tioredoxin doménje egyetlen hisztidint tartalmaz.



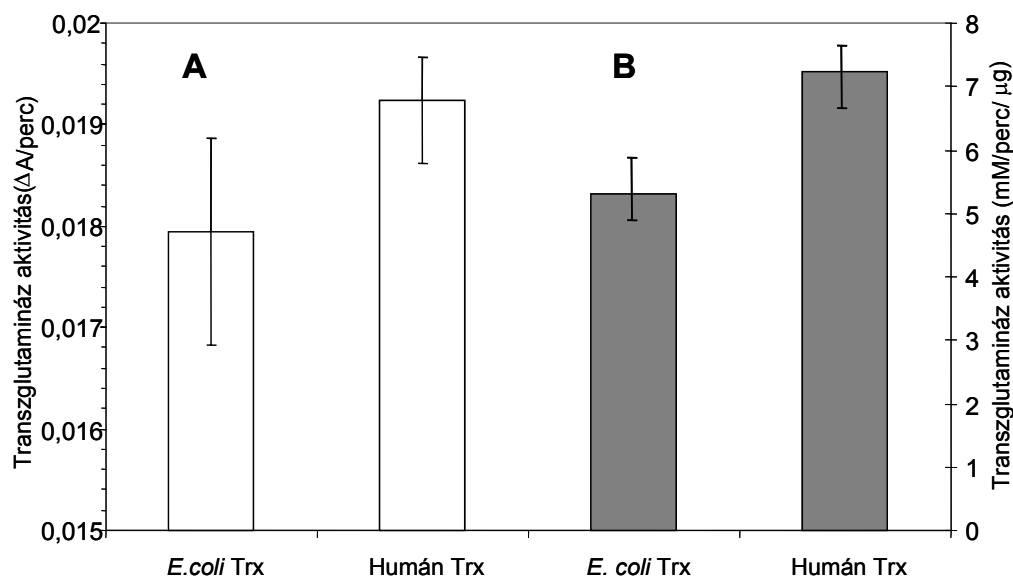
20. ábra. PDI-3 a domén hisztidinjének kémiai módosítása

A, transzglutamináz aktivitás meghatározása ELISA-módszerrel, B, kolorimetriás módszerrel. Az ábra három független mérés eredményeinek átlagát mutatja.

Amikor a fehérjét hisztidin-specifikus gátlószerekkel (dietil-pirokarbonát) kezeltük, az enzim teljesen elvesztette a transzglutamináz aktivitását (**20. ábra**), tehát valószínűleg a tioredoxin doménban található egyetlen hisztidin szerepet játszik a transzglutamináz reakció katalizálásában.

A PDI tioredoxin doménjai közeli rokonságban vannak a tioredoxin fehérjékkel. A tioredoxinok diszulfid reduktázok, melyek aktív centruma CXXC tioredoxin motívummal jellemezhető.

Megvizsgálva az *E. coli* és humán tioredoxinokat, azt találtuk, hogy ezek is rendelkeznek Ca^{2+} -függő transzglutamináz aktivitással (**21. ábra**). A transzglutamináz aktivitást mindkét módszerrel kimutattuk (indirekt ELISA, kolorimetriás módszer), a mérés mindegyik esetben 55°C-on történt.



21. ábra. A tioredoxin fehérjék transzglutamináz aktivitással rendelkeznek

A, transzglutamináz aktivitás meghatározása ELISA-módszerrel, B, kolorimetriás módszerrel történt. Az ábra három független mérés eredményeinek átlagát mutatja.

6.8. 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 (Singh, 1994; Chandrashekar, 1998; Knodler, 1999; Natsuka, 2001; Eschenlauer, 2002). Feltételezhető, hogy a PDI képes egy transzglutamináz-szerű katalitikus triádot formálni

szervezetén belül. Amint azt a reprezentatív fajokban végzett többszörös szekvencia-összehasonlítás is mutatja, a cisztein és hisztidin csoportok erősen konzerváltak (**22.ábra**). Emellett két aszpartát-gazdag régiót is találtunk, amelyek közül az egyik erősen konzervált elrendeződést mutat, és ez közelebb helyezkedik el a CGHC motívum második ciszteinijéhez.

```

      22                                     82
PDI_3_Ce VLEYTDGNFDLIQTH---DIALVKFYAPWCGCHCKKIAPEYERAAPKLASNDPPVALVKVDCTT IGEN
PDI_1_Ce VLVLTESNFEETINGN---EFVLVKFYAPWCVHCKSLAPKYDEAADLLKEEGSDIKLAKVDATE IGEN
PDI_2_Ce VIVLTGDNFDEVINGN---EFLVFVEYPWFCHCKSLAPEYAKAATQLKEEGSDIKLGKLDATV IGEN
PDI_Bt   VLVLHKGNFDEALAAH---KYLLEVEFYAPWCGCHCKALAPEYAKAAGLKAE GSEIRLAKVDATE IGEN
ERp60_Hs VLELTDNNFSERISDTGSAGMLMVEFFAPWCGCHCKRLAPEYEAAAATRLKG---IVPLAKVDCTANV
ERp60_Di VMKFTEADDFKEGIKP Y---DVLLVKFYAPWCGCHCKKIAPEFEKAATKLLQNDDPHLAEVDCTE IGEN
PDI_Mm   DNLVKKSNFEEALAAD---KYLLVEFYAPWCGCHCKALAPEYAKRAAKLKAE GSEIRLAKVDATE NV
PDI_Dm   VLVATVDNQFKLIADN---EFVLVEFYAPWCGCHCKALAPEYAKAAQQLAEKESPIKLAKVDATVNV
PDI_1_Gl VVELGKDDEFNTLRNSGA--SMSVV-FYAPWCGCHCKNLKPEYAKAGAELDGV---VDLYMV DCTNI GEN
PDI_2_Gl VSAEQDNFKSELEKHK---NFLVK-FYAPWCGCHKQLAPTWEEMSGEFSV---MPVAEVDCTI GEN
PDI_3_Gl MTLVTSS-FKAELAKGK--PMMVK-FFAPWCGCHCKALAPKYVDLSDDAPEG---VVIAEVDCTI GEN
          * : * .                      : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Prim.cons LVLTKDDFKELIA HK EFLLFVEYPWCGCHCKALAPEYAKAATKLKEEGSPIKLAKVDCTE

```

Rövidítések: NV: nem vizsgált, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Bt: *Bos taurus*, Hs: *Homo sapiens*, Di: *Dirofilaria immitis*, Mm: *Mus musculus*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Gl: *Giardia lamblia*. Az azonos aminosavakat csillag, a hasonlókat pont, míg az egyes aminosavak hiányát kötőjel jelzi. A konzervált aminosavakat a kiemelt háttér mutatja. A vastag betűs aminosavak jelzik a tioredoxin motívumot.

Consensus. VK I S DF I AA DKLIVVDFYATWCGPCKMI P SLA KYS V FLKVDVD D A CEVK M

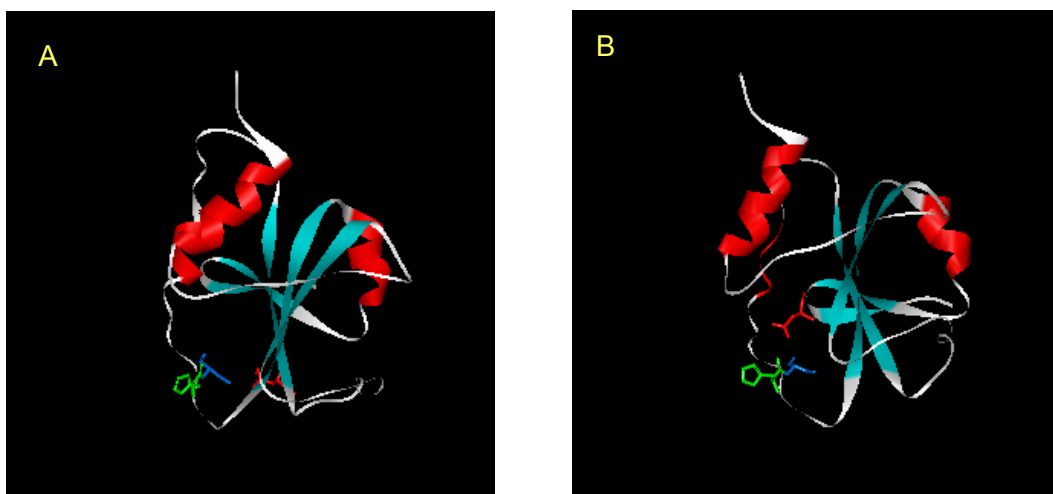
23. ábra. Trx többszörös szekvencia összehasonlítása reprezentatív fajokból

Rövidítések: NV: nem vizsgált, Ec: *Escherichia coli*, Hs: *Homo sapiens*, Ce: *Caenorhabditis elegans* Mm: *Mus musculus*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*. Az azonos aminosavakat csillag, a hasonlókat pont, míg az egyes aminosavak hiányát, pedig kötőjel jelzi. A konzervált aminosavakat a kiemelt háttér mutatja. A vastag betűs aminosavak jelzik a tioredoxin motívumot.

6.9. Lehetséges transzglutamináz aktív hely meghatározása a PDI-n és Trx-en 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 három dimenziós szerkezete adhat. A humán PDI teljes háromdimenziós szerkezete még nem ismert, eddig csak külön-külön az **a** (Kemink, 1996) és a **b** domének (Kemink, 1999) szerkezetét határozták meg.

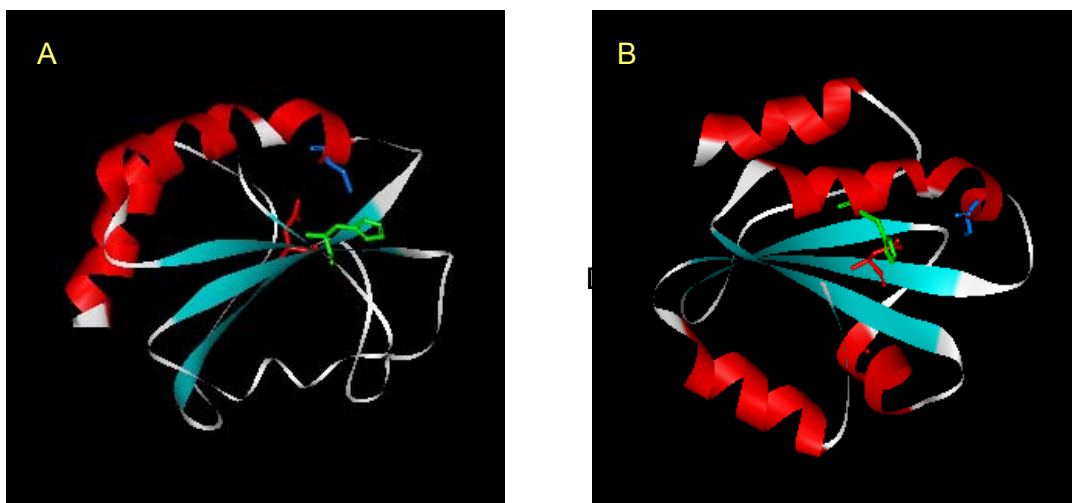
A humán PDI **a** doménjének ismeretében homológ modellezés segítségével megszerkesztettük a *C. elegans* PDI-3 **a** doménjének szerkezetét (**24. ábra**). Az ábrákon látható, hogy a ciszteinek és az egyetlen hisztidin hasonló régiókban helyezkednek el. A két konzervált aszpartát régióból pedig a tioredoxin motívum N-terminálisán lévő aszpartátot ugyanott találhatjuk. A katalitikus aminosavak távolsága (Cys-His) a humán PDI **a** doménjében 7 Å, a nematóda PDI-3 esetében 7.5 Å.



24. ábra. PDI-k a doménjének háromdimenziós szerkezete

A, humán PDI a doménjének szerkezete, B, homológ modellezéssel elkészített *C. elegans* PDI-3 a doménjének szerkezete. A transzglutamináz reakcióban szerepet játszható aminosavak jelölése: kék: cisztein, zöld: hisztidin, piros: aszpartát.

A humán és bakteriális tioredoxin szerkezete is ismert (Weichsel, 1996; Katti, 1999). Kísérleteink szerint mindkét fehérje mutatott mérhető transzglutamináz aktivitást. A TGáz-ra jellemző katalitikus triádot itt is a tioredoxin motívum körül találjuk (25. ábra).



25. ábra. Tioredoxinok háromdimenziós szerkezete

A, humán Trx, B, *E. coli* Trx. A transzglutamináz reakcióban szerepet játszható aminosavak jelölése: kék: cisztein, zöld: hisztidin, piros: aszpartát.

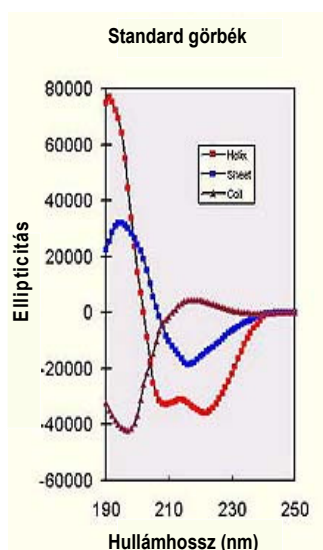
A katalitikus Cys-His távolsága a humán Trx-ban 8.2 Å, míg *E. coli*-ban 9.8 Å. Ezek a távolságok mind a PDI, mind a Trx esetében nagyobbak, mint a tradicionális transzglutaminázok katalitikus aminosavainak távolsága (humán TG2-nél ez 3.9 Å). A transzglutamináz aktivitás azonban mégis kimutatható, így feltételezzük, hogy a PDI, és a Trx is 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.

6.10. A PDI és Trx konformáció-változása

A fent említett háromdimenziós szerkezet-analízis bemutatta, hogy mind a PDI a doménjeiben, mind a Trx-ban szükség van valamilyen konformációs változásra ahhoz, hogy ezek a fehérjék TGáz-ként 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 TGáz-hoz 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 kísérleteket a TGáz aktivitás nem volt mérhető. Az irodalomban publikált emlős és nematoda PDI-k esetében is 55°C inkubációs hőmérsékleten mértek TGáz aktivitást (Chandrashekar, 1998; Knodler, 1999; Natsuka, 2001; Eschenlauer, 2002).

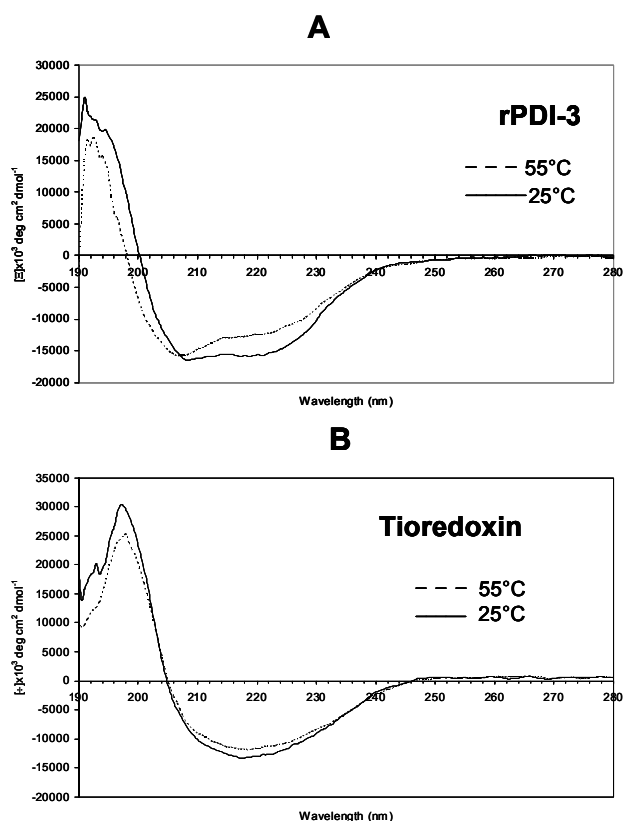
Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával egyszerűen és gyorsan nyerhetünk információt a fehérjék szerkezetéről, illetve a szerkezet megváltozásáról, pl. szubsztrátkötés, oligomerizáció, denaturáció, stb. során. A távoli ultraibolya (UV) tartományban (180-260nm) felvett CD spektrumból következtethetünk a fehérje térszerkezetében másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -lemez, rendezetlen/random coil láncok) meglétére, illetve ezek arányára. A **26. ábra** a jellemző másodlagos szerkezetek CD spektrumait mutatja.



26. ábra. Jellemző másodlagos szerkezetek CD spektrumai (Greenfield, 1969)

Jelölések: piros: α -hélix, kék: β -lemez, barna: coil-szerkezet

A **27. ábra** a rekombináns PDI-3 és Trx hőmérsékletfüggő CD spektrumát mutatja. A CD spektrumok tipikusan mindkét fehérje esetében α -hélix lefutást mutatnak, - összehasonlítva a másodlagos szerkezetekre jellemző CD spektrumokkal (**26. ábra**). A tioredoxin elemében dominánsan α -hélixek találhatók (Ferrari, 1999).



27. ábra. A fehérjék CD spektruma

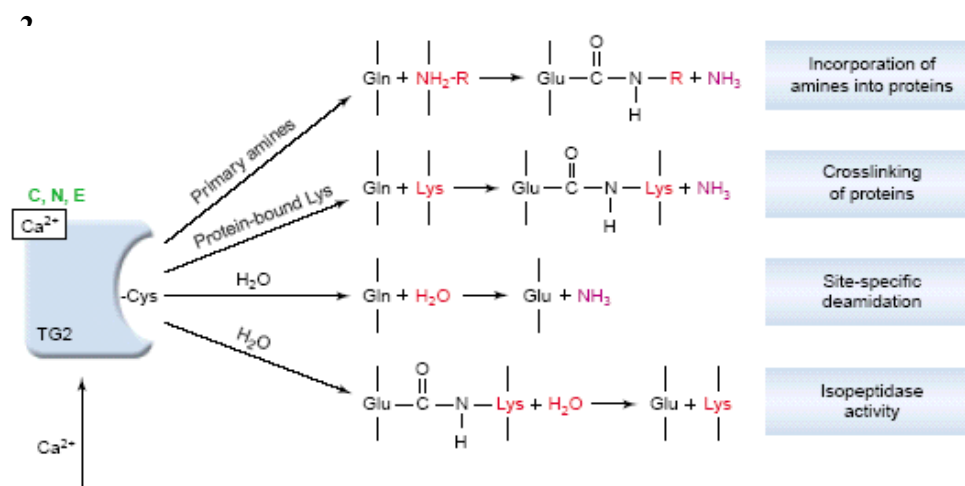
A, rekombináns PDI-3, B, Tioredoxin. Jelölések: szaggatott vonal: 55°C, folyamatos vonal: 25°C. Az ábra három független spektrumfelvétel átlagát mutatja.

A **27. ábrán** látható, hogy mindkét fehérje kimutatható szerkezet-változáson megy keresztül. Hőmérséklet-emelés hatására az α -hélixek elveszítik struktúrájukat, vagyis akkor, amikor az enzim-oldatot 55°C-ra melegítjük, ami viszont a TGáz reakció szempontjából kedvezőbb 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.

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. A protein diszulfid izomeráz és a tioredoxin transzglutamináz aktivitásának biokémiai jellemzése

Az evolúció folyamata alatt a transzglutaminázok különféle formáit megtalálhatjuk mindegyik élő szervezetben; kilenc különböző transzglutaminázt találhatunk az emlősökben (Lorand, 2003), beleértve a multifunkcionális TG 2-t. A TG 2 a fehérjék keresztkötésén kívül aminosav beépülését is katalizálja különféle fehérjékbe, de képes deamidálni is, valamint izopeptidáz-aktivitással is rendelkezik (Fésüs, 2002) (28. ábra).



28.ábra. Transzglutamináz által katalizált reakciók (Fésüs, 2002)

Napjainkban a transzglutaminázokat három fő családba sorolják (Lorand, 2003): a papain-szerű TGáz-ok (fXIIIA, TG2, TG3), a bakteriális toxinok (*E. coli* citotoxikus faktor, *B. bronchiseptica* neurotoxin) amelyek inkább deamidálnak, de képesek transzamidációs reakcióra is, valamint a protein diszulfid izomeráz-szerű enzimek, amelyeknek egyszerre van TGáz és diszulfid izomeráz aktivitásuk is.

Intézetünkben már kimutatták a TGáz fehérje jelenlétét *C. elegans* extraktumban, és jellemezték keresztkötő képességét is (Mádi, 1998), valamint transzamidálási reakció több potenciális szubsztrátját is azonosították (Mádi, 2001). A papain-szerű TGáz-okkal, illetve a bakteriális toxinokkal rokon TGáz-okkal homológ fehérjét a *C. elegans* genom-adatbázisában nem találtunk.

A *Brugia malayi* transzglutaminázáról ismert, hogy PDI aktivitással is rendelkezik (Singh, 1994), majd később publikálták a *Dirofilaria immitis* és *Giardia lamblia* PDI fehérjékről, hogy azok is TGáz aktivitással rendelkeznek (Chandrashekar, 1998; Knodler, 1999; Chandrashekar, 2000). Kutatásainkkal egyidőben jelent meg a *C. elegans* PDI-3-ról, hogy transzglutamináz aktivitással rendelkezik (Natsuka, 2001; Eschenlauer, 2002), továbbá, hogy a *C. elegans* PDI-1-nek és PDI-2-nek, ugyancsak TGáz aktivitása van (Eschenlauer, 2002). Ezek a transzglutamináz aktivitás-mérések mind az indirekt ELISA módszerrel történtek. A megelőző kísérletek azonban nem vették figyelembe, hogy a primer aminok spontán módon is beépülhetnek fehérjékbe, mint pl. a humán α_2 -macroglobulin esetében, egy belső tioészter kötés felbontásával (Leuven, 1984), és így esetleg előfordulhat, hogy a biotinált-amin magával a PDI-vel reagál. Ennek a lehetőségnek a kizárására, végeztük a dot blot kísérletet, ahol azt találtuk, hogy a PDI-3 nem építi be önmagába az aminosavat, hanem valóban az amin-transzfert katalizálja a kazein és biotinált-amin között. Az irodalomtól eltérő módon nemcsak ELISA módszerrel, hanem kolorimetriás módszerrel is meghatároztuk a rekombináns enzim aktivitását. Ennek a módszernek több előnye is van, egyrészt, mert így kizárhattuk, hogy az ELISA reakcióban nem a kazein glutaminjával hanem más aminosavval reagál az enzim, másrészt, az enzim specifikus aktivitása és K_M értéke is meghatározható volt. A rekombináns PDI specifikus aktivitása, és a K_M értéke összehasonlítható adatot adott a tengerimalac TGáz értékeivel.

Az enzim transzglutamináz aktivitása gátolható volt különböző TGáz inhibitorokkal, hasonlóan, mint a *C. elegans* szöveti homogenizátumban lévő TGáz (Mádi, 1998), vagy az irodalomban leírt, más fonalférgek PDI-k aktivitása (Chandrashekar, 1998; Knodler, 1999; Chandrashekar, 2000).

Mindezek alapján bizonyítottnak látszik, hogy a *C. elegans* protein diszulfid izomeráza felelős a fehérje transzamidációért a fonalféregben.

7.2. PDI és Trx transzglutamináz aktivitásának lehetséges szerkezeti magyarázata

Kísérleteinkben azt próbáltuk kideríteni, hogy a PDI melyik doménje felelős a transzglutamináz aktivitásért. Sikertelenül próbáltuk a a doménre, vagyis a tioredoxin doménre szűkíteni a detektált aktivitást. 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 (Knodler, 1999). A PDI tioredoxin doménje igen közeli rokonságban van a tioredoxin fehérjékkel, melyek protein diszulfid reduktázok. Az általunk vizsgált rekombináns *E. coli* és humán tioredoxinoknak ugyancsak volt mérhető TGáz aktivitása.

Megkíséreltük meghatározni, hogy a PDI mely aminosav oldalláncai felelősek a fehérje TGáz aktivitásáért. Mind a protein diszulfid izomerázokban, mind a transzglutaminázokban ciszteinek találhatunk az aktív centrumban, így valószínűsíthető volt, hogy a transzamidáció ugyanazt a ciszteint igényli, mint az izomerizációs reakció. Helyspecifikus mutagenézis kísérleteink azonban azt mutatták, hogy a transzglutamináz reakció független a PDI katalitikus cisztein aminosavaitól, a transzglutamináz aktivitás az aktív centrumban található második ciszteinhez (CGHC) rendelhető. A transzglutamináz reakcióhoz általában három, meghatározott aminosav szükséges, cisztein, hisztidin és aszpartát. A transzglutamináz aktivitással rendelkező tioredoxin domén csupán egyetlen egy hisztidint tartalmaz, -ezt is a tioredoxin motívumon belül-, és amikor ezt a hisztidint kémiai módosítottuk, a TGáz aktivitás megszűnt. Ez azt mutatja, hogy a tioredoxin motívum hisztidinje része a katalitikus triádnak. Ez azt jelenti, hogy a nagy gyakorisággal előforduló tioredoxin domén nemcsak a diszulfid izomeráz (mint a PDI-knél), nemcsak a diszulfid reduktáz (mint a tioredoxinoknál) aktivitásért felelős katalitikus centrum része, hanem a transzamidáz katalitikus centrum kialakulásában is szerepet játszik.

A PDI-3 tioredoxin doménjában több aszpartát oldallánc van (szám szerint 14, mindkét doménben). Szekvencia-összehasonlító vizsgálataink két erősen konzerválódott régió jelenlétét mutatták, amelyek közül a tioredoxin motívum C-terminálisán lévő Asp erősebb konzerválódottságot mutatott. Lehetséges azonban, hogy az Asp oldalláncok nem részei a katalitikus centrumnak a transzglutamináz reakció szempontjából, hiszen vannak olyan bakteriális transzglutaminázok, ahol a katalitikus triád nem tartalmaz aszpartátot, a Cys-His- és a fehérjelánc egy oxigénje alkotja azt (Buetow, 2001), vagy ahol egyetlen cisztein oldallánc jelenléte elegendő a katalitikus reakcióhoz (Pasternack, 1998).

7.3. A PDI-3 és Trx konformáció változása szükséges a transzglutamináz aktivitáshoz

Kísérleteink során (*in vitro*, *in silico*) néhány részlet feltárult a PDI és Trx transzglutamináz aktivitásának mechanizmusáról, a reakciók hasonlóságára ezeknek a fehérjéknek a háromdimenziós szerkezete adott.

A humán PDI **a** doménját (Kemink, 1996) használva modelleztük a *C. elegans* PDI **a** doménját, majd összevetettük őket egymással, illetve a tradicionális transzglutaminázok szerkezetével. Mindkét fehérje szerkezetének (humán és nematóda PDI) vizsgálata feltárta, hogy a TGáz aktivitásért felelős katalitikus aminosavak ugyanabban a régióban találhatók, elérhető közelségben helyezkednek el szubsztrát fehérjék számára. A lehetséges katalitikus aminosavak közötti távolságokat molekula modellezés segítségével meghatároztuk. Ezek a távolságok a humán és *C. elegans* PDI esetében a Cys-His között 7.0 és 7.5 Å, His és Asp között 17.0 és 16.0 Å; valamint a Cys-Asp esetében 10.0 és 10.0 Å. Összevetve ezeket az adatokat az ismert humán TG2 (Liu, 2002), TG3 (Ahvazi, 2002) és mikrobiális (*Streptovorticillium mobaranesi*) transzglutaminázzal (Kashiwagi, 2002), ahol a távolság Cys-His/Asp között: 3.9, 2.9, és 3.4 Å. (A mikrobiális TGáz-nál ugyanis a His helyett Asp található a szerkezetben ill. a mechanizmusban.) A TG2, TG3 és mikrobiális TGáz további katalitikus aminosavainak távolsága; His/Asp-Asp/His-nél: 3.7, 4.3 és 5.6 Å, valamint az Cys-Asp/His között: 6.8, 5.8 és 5.0 Å. Mindkét PDI esetében a katalitikus triád aminosavainak távolsága nagyobb, mint a tradicionális TGáz-ok esetében. Ez azt jelenti, hogy a PDI **a** doménjának jelentős konformációs változáson kell keresztülmennie, hogy a transzglutaminázokra jellemző katalitikus triád kialakulhasson.

A humán és a bakteriális tioredoxin szerkezete ugyancsak ismert (Weichsel, 1996; Katti, 1990). Ezekben a fehérjékben a transzglutamináz reakciót katalizáló triád ugyancsak a tioredoxin box körül található. A reakcióban résztvevő aminosavak távolsága ezekben a fehérjékben is nagyobb, mint a klasszikus transzglutaminázok esetében: Cys-His között 8.2 és 9.8 Å, a His-Asp között 6.6 és 11.5 Å, valamint a Cys-Asp között 5.72 és 8.0 Å. Így hasonlóan a PDI-hez, a tioredoxin esetében is konformáció változás szükséges ahhoz, hogy az aminosav oldalláncok közelebb kerülhessenek egymáshoz, és a transzglutamináció végbemenjen.

Mivel a transzglutamináz aktivitást csak 55°C-on tudtuk kimutatni, 25°C-on nem, ezért in vitro hőmérséklet-indukált szerkezetváltozást tételeztünk fel. A CD spektrumok változása ezt látszik igazolni.

Az PDI/Trx enzim hőmérséklet-indukált transzglutamináz tulajdonsága azért is érdekes, mert a *C. elegans* extraktumban lévő transzglutamináz magasabb hőmérsékletekkel szemben igen érzékenynek bizonyult. A fehérjeminták tíz perces 40°C-on történő előkezelés hatására aktivitásuk több mint a felét elvesztették, míg 60°C-os kezelés hatására teljesen inaktiválódtak (Mádi, 1998). Az ellentmondást úgy lehet feloldani, ha feltételezzük, hogy a

nematódákban kétféle transzglutamináz is létezik, az egyik az emlősökéhez valamilyen szinten hasonló, a másik azoktól teljesen letérő PDI-szerű fehérje. A képet tovább bonyolítja, hogy a nematódákban kimutatott fehérje nem mutat szekvencia-hasonlóságot az emlős transzglutaminázokkal, ugyanakkor a nematóda enzimet a humán enzim elleni antitest felismerte (Mádi, 1998). A transzglutamináz expressziót Western blottal igazolták, tehát valamilyen hasonlóságnak léteznie kell. Ráadásul a két fehérje molekulatömege (nematóda TGáz, PDI) közel azonos.

A PDI kétfunkciós volta egy másik érdekes kérdést is felvet, ez pedig az enzim Ca^{2+} -függése. Az enzim transzglutamináz aktivitása erős Ca^{2+} -függéssel volt jellemezhető, amit két, független aktivitás-mérési módszer, valamint a dot blot is kimutatott. A protein diszulfid izomeráz szerkezete tartalmaz egy Ca^{2+} -kötő domént, annak ellenére, hogy az enzim eredeti funkciójához (izomeráz, reduktáz, chaperon) nem igényel Ca^{2+} -ot. Az, hogy a Ca^{2+} -kötése egy fehérjében szerkezetváltozást okoz, már ismert a TG3 esetében (Ahvazi, 2002). Ebben az enzimfehérjében a Ca^{2+} -hatására egy csatorna képződik, ami a szubsztrátnak az aktív centrumhoz való hozzáférését biztosítja. A PDI tioredoxin doménjainak és magának a tioredoxinnak is szüksége volt a Ca^{2+} -ra hogy mérhető transzglutamináz aktivitással rendelkezzen. Lehetséges, hogy ezeknek a fehérjéknek a transzglutamináz aktivitását az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változása kapcsolja be.

7.4. A PDI/Trx családhoz kapcsolódó TGáz aktivitás lehetséges fiziológiás jelentősége

7.4.1. A PDI géntermék hiánya nematódákban

Az első olyan közlemény, amelyben a kétfunkciójú TGáz/PDI-ről írtak öt évvel ezelőtt jelent meg a parazita *Dirofilaria immitis*-ről (Chandrashekar, 1998). Azóta sem derült fény a jelenség fiziológiás szerepére. Ugyan a *C. elegans* genomjának a teljes szekvenálása is már elkészült (The *C. elegans* Sequencing Consortium), de ez sem adott választ a kérdésre. A feladat azért is meglehetősen nehéz, mert specifikus TGáz aktív helyet gátló inhibitorok még nem állnak rendelkezésünkre.

Eschenlauer és munkatársai RNS interferencia módszerével előállították a PDI géntermékét nem tartalmazó fonalférget. Kísérleteik széles körűek és alaposak voltak, mert a „gén elhallgattatás” („gene silencing”) mindhárom ismert módszerét alkalmazták: az

injektálást, a merítést (fiatal-L1 állapotú- állatokat RNS oldatba merítik) és az etetési-kísérletet. A PDI-3 transcript hiányának következménye több mutáns törzsben a legyengített kutikula volt, a férgek tömzsik lettek („dumpy” fenotípus), abnormális hím és hermafrodita farok morfológiát mutattak. A vad típusú nematódák nem mutattak morfológiai eltérést, ám a *pdi-3* RNSi következtében a kutikula kollagén szerkezete megváltozott (Eschenlauer, 2002). Azt feltételezték, hogy a PDI-3-nak szerepe van az extracelluláris mátrix összetartásában. Más parazita nematódákban (*Brugia malayi*) a TGáz aktivitás gátlása a felnőtt egyedek életképességét csökkentette (Chandrashekar, 2000), míg a szintén parazita *Onchocerca volvulus*-ban vedlési zavarokat okozott (L3 lárvalakból L4-be) (Lustigman, 1995). Hasonlóan, a *Dirofilaria immitis*-ben úgy találták, hogy az ERp60 fehérje TGáz aktivitásának az L3-ból L4-be történő vedléskor van szerepe (Chandrashekar, 2002).

A nematódák TGáz aktivitásának pontos funkciója még nem tisztázott, de lehetséges, hogy a kutikuláris ECM komponensek összetartását és keresztkötését katalizálják, hiszen az exoskeleton struktúrák igen gazdagok izopeptid kötésekben. A fehérjék stabilizációja mind az enzim transzglutamináz aktivitását (keresztkötő funkció), mind annak diszulfid izomeráz aktivitását (chaperon funkció) igényelheti.

7.4.2. Multifunkcionális enzimek

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 fehérjecsalád (PDI, Trx, TGáz) tagjai több, egymással átfedő tulajdonsággal rendelkeznek. Transzglutamilációra mindannyian képesek, mint redox katalizálók/fehérjék, a TGáz-ok szokatlan nagy számú szabad cistein-SH csoportot tartalmaznak, amelyek általában reaktívak (Lai, 2001). Azonfelül, a transzglutamináz nem katalitikus kölcsönhatása sejten kívüli és belüli fehérjékkel a TGáz chaperon funkciójára utal (Fésüs, 2002; Piredda, 1999), mint az a PDI/Trx család esetében már ismert (Ferrari, 1999; Hirota, 2002). 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 „megmentési 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. Ismeretes, hogy a proteaszóma gátlásakor egyes hősokkfehérjék és az ER-ban lévő más chaperonok mennyisége megnő. Magyarázatot adhat erre, hogy a proteaszóma gátlásakor a sejtben lévő abnormális fehérjék lebontása is gátolt, szintjük emelkedése pedig maga után vonja a chaperonok mennyiségének növekedését, vagy azért, hogy a sok, hibás fehérjét megkíséreljék kijavítani, vagy azért, hogy a proteaszóma rendszerbe próbálják irányítani. A proteaszóma rendszer a feleslegessé vált, valamint az anti- és proapoptotikus molekulák szabályozott lebontásával fontos regulációs eleme lehet az apoptotikus folyamatnak is. Az, hogy a transzglutamináz expressziója az apoptózis folyamán megnő, régóta közismert (Fésüs, 1987).

Több, további közös tulajdonság is figyelhető meg a PDI, Trx és TGáz enzimesalád tagjai között. Mindhárom enzimesalád jelen van az élő szervezetek minden típusában (Lorand, 2003; Ferrari, 1999; Hirota, 2002), 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 (Ferrari, 1999; Hirota, 2002; Nardacci, 2003; Mastroberardino, 2002; Griffin, 2002). 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 sejtben belül/kívül illetve a sejtfelszínen. 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, fejlődésbiológia, immunválasz kialakítása. A transzglutamináznak is egyre több funkciója válik ismertté;

keresztköti fehéré, részt vesz szignálútvonakban, mint G-fehérje, szerepe van az apoptózisban, sőt, a fagocitózisban is. Arra hívja fel a figyelmet, hogy fehérjék szerepe korántsem tisztázott, és szabályozásuk megértése, illetve a körülmények és/vagy a sejtben belüli kölcsönhatások, -amelyek eldöntik, hogy a fehérjének melyik funkciója „kapcsol be”- feltárása nagy lépés lehet előre az in vivo kutatásokban.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Sikeresen klónoztuk a *C. elegans* PDI-3 cDNS-ét egy indukálható, expressziós vektorba, melynek segítségével előállítottuk a rekombináns fehérjét (rPDI-3).
2. A rekombináns fehérje mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérletekben aktívnek bizonyult. Az rPDI-3 diszulfid izomeráz aktivitását meghatároztuk, és bizonyítottuk, hogy képes komplementálni a dsbA⁻ deficiens *E. coli* törzset.
3. A rekombináns fehérje transzglutamináz aktivitással rendelkezett, erről két független mérési módszerrel is megbizonyosodtunk. A transzglutamináz aktivitás csak 55 °C-on volt detektálható, 25°C-on nem. Meggyőződünk arról, hogy nem artefactumról van szó, a PDI valóban katalizálja az amin- transzfert a kazein és biotinált amin között, ezt dot blot kísérlettel is igazoltuk. A rekombináns PDI specifikus aktivitását is megmértük, azt a tengerimalac szöveti transzglutaminázával nagyságrendben összehasonlítható értéket adott.
4. Deléciós mutánsok segítségével sikerült lokalizálnunk, hogy a detektált transzglutamináz aktivitásért a fehérje tioredoxin doménje a felelős.
5. Hely-specifikus mutagenezissel kimutattuk, hogy a rekombináns PDI-3 TGáz aktivitása független a PDI katalitikus centrumában található cisztein oldalláncoktól.
6. A tioredoxin domén mutagenezise bebizonyította, hogy a transzamidációban a CGHC tioredoxin motívumban található második cisztein játszik kritikus szerepet.
7. A vizsgált *E. coli* és humán tioredoxin is transzglutamináz aktivitást mutatott.
8. Mivel tioredoxin doménban egyetlen hisztidin található, ezért megvizsgáltuk, hogy vajon szerepet játszik-e a transzamidációs reakcióban. A hisztidin oldallánc kémiai módosítása a TGáz aktivitás szinte teljes elvesztését eredményezte. Szekvencia összehasonlításokkal két konzerválódott Asp régiót találtunk mind a PDI-ben, mind a tioredoxinban. A PDI-ben, és Trx-ben lehetséges katalitikus triádokat azonosítottunk. Homológ modellezés segítségével megszerkesztettük a *C. elegans* PDI-3 a doménjának a szerkezetét.
9. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia segítségével kimutattuk, hogy mind a PDI, mind a Trx egy hőmérséklet-indukálta szerkezetváltozáson megy keresztül, ami szükséges feltétele a transzglutamináz reakció *in vitro* lejátszódásához.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Prof. Dr. Fésüs Lászlónak**, amiért tudásával, és tapasztalatával irányította, és segítette munkámat.

Köszönöm, **dr. Punyiczki Mária** tanárnőnek, és **dr. Mádi Andrásnak** a számos elvi és gyakorlati tanácsukat.

Köszönöm közvetlen kollegáimnak; **Kiss Ildikónak**, **Kovács Andrásnak** és **Király Róbertnek** a kísérleti munka során tett számtalan segítségüket.

Hálás vagyok **Darai Zoltánnénak** a laboratóriumi munkában, - különösképpen a transzglutamináz mérésekkor - nyújtott segítségéért.

Köszönöm **dr. Kurtán Tibornak** a CD spektroszkópia során nyújtotta önzetlen segítségét.

Köszönöm a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet **minden dolgozójának**, aki valamilyen módon szerepet vállalt munkámban.

Köszönöm **Szabó Lórándnak**, aki hihetetlen türelmével, és tudásával mindig támogatott.

10. IRODALOM

Aeschlimann D, Koeller MK, Allen-Hoffmann BL, Mosher DF. (1998) Isolation of a cDNA encoding a novel member of the transglutaminase gene family from human keratinocytes: Detection and identification of transglutaminase gene products based on RT-PCR with degenerate primers. *J. Biol. Chem.* 273, 3452-3460.

Aeschlimann D, Paulsson M. (1994) Transglutaminases: Protein crosslinking enzymes in tissues and body fluids. *Thromb. Haemostasis* 71, 402-415.

Ahvazi B, Kim HC, Kee SH, Nemes Z, Steinert PM. (2002) Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation. *EMBO J.* 21, 2055-2067.

Anfinsen, CB. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181, 223-230.

Bardwell JC, McGovern K, Beckwith J. (1991) Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo *Cell* 67, 581-589.

Buetow L, Flatau G, Chiu K, Boquet P, Ghosh P. (2001) Structure of the Rho-activating domain of E. Coli Cytotoxic Necrotizing Factor 1. *Nat. Struct. Biol.* 8, 584-588.

Chandrashekar R, Devarajan E, Mehta K. (2002) *Dirofilaria immitis*: further characterization of the transglutaminase enzyme and its role in larval molting. *Parasitol Res.* 88, 185-191.

Chandrashekar R, Mehta K. (2000) Transglutaminase-catalyzed reactions in the growth, maturation and development of parasitic nematodes. *Parasitol Today.* 1, 11-17.

Chandrashekar R, Tsuji N, Morales T, Ozols V, Mehta K. (1998) An ERp60-like protein from the filarial parasite *Dirofilaria immitis* has both transglutaminase and protein disulfide isomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 531-536.

Coppari S, Altieri F, Ferraro A, Chichiarelli S, Eufemi M, Turano C. (2002) Nuclear localization and DNA interaction of protein disulfide isomerase Erp57 in mammalian cells. *J. Cell Biochem.* 85, 325-333.

Darby NJ, Creighton TE. (1995) Functional properties of the individual thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, 34, 11725-11735.

- Dubbink HJ, Verkaik NS, Faber PW, Trapman J, Schröder FH, Romijn JC.** (1996) Tissue-specific and androgen-regulated expression of human prostate-specific transglutaminase. *Biochem. J.* 315, 901-908.
- Eschenlauer SC, Page A.** (2002) The *Caenorhabditis elegans* Erp60 homolog protein disulfide isomerase-3 has disulfide isomerase and transglutaminase-like cross-linking activity and is involved in the maintenance of body morphology. *J. Biol. Chem.* 278, 4227-4237.
- Ferrari DM, Soling HD.** (1999) The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.* 339, 1-10.
- Ferrari DM, Van Nguyen P, Kratzin HD, Söling HD.** (1998) ERp28, a human endoplasmic-reticulum-lumenal protein, is a member of the protein disulfide isomerase family but lacks a CXXC thioredoxin-box motif. *Eur. J. Biochem.* 255, 570-579.
- Fésüs L, Thomazy V, Falus A.** (1987) Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett.* 224, 104-108.
- Fésüs L, Piacentini, M.** (2002) Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 10, 534-539.
- Fire A.** (1999) RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15, 358-363.
- Folk JE, Cole PW.** (1966) Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity, *J. Biol. Chem.* 241, 5518-5525.
- Folk JE, Finlayson JS.** (1977) The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv. Protein Chem.* 31, 1-133.
- Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF.** (1994) Protein disulfide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* 19, 331-336.
- Gerner C, Holzmann K, Meissner M, Gotzmann J, Grimm R, Sauermann G.** (1999) Reassembling proteins and chaperones in human nuclear matrix protein fractions. *J. Cell. Biochem.* 74, 145-151.
- Greenfield N, Fasman GD.** (1999) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* 10, 4108-4116.
- Griffin M, Casadio R, Bergamini CM.** (2002) Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem. J.* 368, 377-396.
- Hirota K, Matsui M, Murata M, Takashima Y, Cheng FS, Itoh T, Fukuda K, Yodoi J.** (2000) Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF- κ B, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 177-182.

- Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J.** (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 274, 27891-27897.
- Hirota K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J.** (2002) Thioredoxin superfamily and thioredoxin-inducing agents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957, 189-199.
- Humphreys DP, Weir N, Mountain A, Lund PA.** (1995) Human protein disulfide functionally complements a dsbA mutation and enhances the yield of pectate lyase C in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 28210-28215.
- Inoue H, Nojima H, Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* 96, 23-28.
- Kashiwagi T, Yokoyama K, Ishikawa K, Ono K, Ejima D, Matsui H, Suzuki E.** (2002) Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *J. Biol. Chem.* 277, 44252-44260.
- Katti SK, LeMaster DM, Eklund H.** (1990) Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1, 167-184.
- Kemmink J, Darby NJ, Dijkstra K, Nilges M, Creighton TE.** (1996) Structure determination of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase using multidimensional heteronuclear ¹³C/¹⁵N NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 35, 7684-7691.
- Kemmink J, Darby NJ, Dijkstra K, Nilges M, Creighton TE.** (1997) The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. *Curr. Biol.* 7, 239-245.
- Kemmink J, Dijkstra K, Mariani M, Scheek RM, Penka E, Nilges M, Darby NJ.** (1999) The structure in solution of the b domain of protein disulfide isomerase. *J Biomol NMR.* 13, 357-368.
- Keresztessy Z, Kiss L, Hughes MA.** (1994) Investigation of active site of the cyanogenetic beta-D-glucosidase (linamarase) from *Manihot esculenta* Crantz (cassava). I. Evidence for an essential carboxylate and a reactive histidine residue in a single catalytic center, *Arch. Biochem. Biophys.* 314, 142-152.
- Knodler LA, Noiva R, Mehta K, McCaffery JM, Aley SB, Svard SG, Nystul TG, Reiner DS, Silberman JD, Gillin FD.** (1999) Novel protein-disulfide isomerases from the early-diverging protist *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 274, 29805-29811.
- Kobayashi K, Hashiguchi K, Yokozeki K, Yamanaka S.** (1998) Molecular cloning of the transglutaminase gene from *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 6, 1109-1114.

- Lai TS, Hausladen A, Slaughter TF, Eu JP, Stamler JS, Greenberg CS.** (2001) Calcium regulates S-nitrosylation, denitrosylation, and activity of tissue transglutaminase. *Biochemistry* 16, 4904-4910.
- Laurent TC, Moore EC, Reichard P.** (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 239, 3436-3444.
- Leuven F.** (1984) Human alpha 2 macroglobulin. *Mol. Cell. Biochem.* 58,121-128.
- Lewis MJ, Mazzarella RA, Green M.** (1986) Structure and assembly of the endoplasmic reticulum: Biosynthesis and intracellular sorting of ERp61, ERp59, and ERp49, three protein components of murine endoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 245, 389-403.
- Liu S, Cerione RA, Clardy J.** (2002) Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5, 2743-2747.
- Lorand L, Graham RM.** (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2,140-56.
- Lustigman S, Brotman B, Huima T, Castelhana AL, Singh RN, Mehta K, Prince AM.** (1995) Transglutaminase-catalyzed reaction is important for molting of *Onchocerca volvulus* third-stage larvae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9, 1913-1019.
- Lyles MM, Gilbert HF.** (1991) Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer, *Biochemistry* 30, 613-619.
- Mádi A, Punyiczki M, di Rao M, Piacentini M, Fésüs L.** (1998) Biochemical characterization and localization of transglutaminase in wild-type and cell-death mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Biochem.* 3, 583-590.
- Mastroberardino PG, Iannicola C, Nardacci R, Bernassola F, De Laurenzi V, Melino G, Moreno S, Pavone F, Oliverio S, Fesus L, Piacentini M.** (2002) 'Tissue' transglutaminase ablation reduces neuronal death and prolongs survival in a mouse model of Huntington's disease. *Cell Death. Differ.* 9, 873-880.
- Mehta K, Rao RU, Chandrashekar R.** (2002) Transglutaminases of the lower organisms. *Minerva Biotech.* 14, 129-134.
- Muszbek L, Ádány R, Mikkola H.** (1996) Novel aspects of blood coagulation factor XIII: structure, distribution, activation and function. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 33, 357-421.

- Nakaoka H, Perez DM, Baek KJ, Das T, Husain A, Misono K, Im MJ, Graham RM.** (1994) Gh: A GTP binding protein with transglutaminase activity and receptor signalling function. *Science* 264, 1593-1596.
- Nardacci R, Lo Iacono O, Ciccocanti F, Falasca L, Addesso M, Amendola A, Antonucci G, Craxi A, Fimia GM, Iadevaia V, Melino G, Ruco L, Tocci G, Ippolito G, Piacentini M.** (2003) Transglutaminase type II plays a protective role in hepatic injury. *Am. J. Pathol.* 4, 1293-1303.
- Natsuka S, Takubo R, Seki R, Ikura K.** (2001) Molecular cloning and expression of *Caenorhabditis elegans* ERp57-homologue with transglutaminase activity. *J Biochem (Tokyo)*. 6, 731-735.
- Nigam SK, Goldberg AL, Ho S, Rohde MF, Bush KT, Sherman MY.** (1994) A set of endoplasmic reticulum proteins possessing properties of molecular chaperones includes Ca(2+)-binding proteins and members of the thioredoxin superfamily. *J. Biol. Chem.* 269, 1744-1749.
- Noiva R, Freedman RB, Lennarz WJ.** (1993) Peptide binding to protein disulfide isomerase occurs at a site distinct from the active sites. *J. Biol. Chem.* 268, 19210-19217.
- Pasternack R, Dorsch S, Otterbach JT, Robenek IR, Wolf S, Fuchsbauer HL.** (1998) Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense* - purification, characterisation and sequence of the zymogen. *Eur. J. Biochem.* 257, 570-576.
- Piredda L, Farrace MG, Lo Bello M, Malorni W, Melino G, Petruzzelli R, Piacentini M.** (1999) Identification of 'tissue' transglutaminase binding proteins in neural cells committed to apoptosis. *FASEB J.* 2, 355-364.
- Powis G, Briehl M, Oblong J.** (1995) Redox signaling and the control of cell growth and death. *Pharmac. Ther.* 68, 149-173.
- Powis G, Montfort WR.** (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 421-455.
- Rigobello MP, Donella-Deana A, Cesaro L, Bindoli A.** (2000) Isolation, purification, and characterization of a rat liver mitochondrial protein disulfide isomerase. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 266-272.
- Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E, Sitia R.** (1992) Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 24161-24164.

- Schmidt G, Selzer J, Lerm M, Aktories K.** (1998) The Rho-deamidating cytotoxic necrotizing factor 1 from *Escherichia coli* possesses transglutaminase activity. Cysteine 866 and histidine 881 are essential for enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 273,13669-13674.
- Silverman RB, Nandi DL.** (1988) Reduced thioredoxin: a possible physiological cofactor for vitamin K epoxide reductase. Further support for an active site disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 1248-1254.
- Singh RN, Mehta K.** (1994) Purification and characterization of a novel transglutaminase from filarial nematode *Brugia malayi*. *Eur. J Biochem.* 2, 625-634.
- Sinha U, Brewer JM.** (1985) A spectrophotometric method for quantitation of carboxyl group modification of proteins using Woodward's Reagent K, *Anal. Biochem.* 151, 327-333.
- Tachibana C, Stevens TH.** (1992) The yeast EUG1 gene encodes an endoplasmic reticulum protein that is functionally related to protein disulfide isomerase. *Mol Cell Biol.* 10, 4601-4611.
- Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui HO, Stockert RJ, Schilsky ML.** (1995) Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 20410-20416.
- The C. elegans Sequencing Consortium.** Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. (1998) *Science.* 282, 2012-2018.
- Thomazy V, Fésüs L.** (1989) Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 255, 215-224.
- Tsibris JC, Hunt LT, Ballejo G, Barker WC, Toney LJ, Spellacy WN.** (1989) Selective inhibition of protein disulfide isomerase by estrogens. *J. Biol. Chem.* 264, 13967-13970.
- Ueno M, Masutani H, Arai R, Yamauchi A, Hirota K, Sakai T, Inamoto T, Yamaoka Y, Yodoi J, Nikaido T.** (1999) Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J. Biol. Chem.* 274, 27891-27897.
- Vuori K, Myllylä R, Pihlajaniemi T, Kivirikko K.** (1992) Expression and site-directed mutagenesis of human protein disulfide isomerase in *Escherichia coli*. This multifunctional polypeptide has two independently acting catalytic sites for the isomerase activity. *J. Biol. Chem.* 267, 7211-7214.
- Weichsel A, Gasdaska JR, Powis G, Montfort WR.** (1996) Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure* 6, 735-751.

Wetterau JR, Combs KA, Spinner SN, Joiner BJ. (1990) Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J. Biol. Chem.* 265, 9801-9807.

Wood WB. (ed) (1988) The nematode *Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Wunderlich M, Otto A, Maskos K, Mucke M, Seckler R, Glockshuber, R. (1995) Efficient catalysis of disulfide formation during protein folding with a single active-site cysteine. *J. Mol. Biol.* 247, 28-33.

Xanthoudakis S, Miao G, Wang F, Pan YCE, Curran T. (1992) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.*, 11, 3323-3335.

Yamauchi K, Yamamoto T, Hayashi H, Koya S, Takikawa H, Toyoshima K, Horiuchi R. (1987) Sequence of membrane-associated thyroid hormone binding protein from bovine liver: Its identity with protein disulfide isomerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146, 1485-1492.

Zapun A, Missiakas D, Raina S, Creighton TE. (1995) Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli* *Biochemistry* 34, 5075-5089.

11. KÖZLEMÉNYEK

11.1. A tézisek alapjául szolgáló közlemények

Blasko 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.

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

11.2. Egyéb közlemények

Szegezdi E, Kiss I, Simon A, **Blasko 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.

11.3. Elsőszerzős posztterek

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

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

Blaskó B., Kovács A., Mádi A. és Fésüs L.: Funkcionális transzglutamináz-e a *C. elegans* protein diszulfid izomeráza? Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Munkaértekezlete, Keszthely, 2002.

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

11.4. Elsőszerzős előadások

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

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

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.

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

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.