

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A TRANSZGLUTAMINÁZ 2 SZUBSZTRÁT SPECIFICITÁSÁNAK
KARAKTERIZÁLÁSA FÁG BEMUTATÓ RENDSZER, LOGISZTIKUS
REGRESSZIÓS ANALÍZIS ÉS SZERKEZETI RENDEZETLENSÉG
VIZSGÁLATÁVAL**

Csász Éva

Témavezető: Prof. Dr. Fésüs László

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

DEBRECEN

2008

BEVEZETŐ

A transzglutaminázok (E.C. 2.3.2.13.) a fehérjék poszttranszlációs módosítását katalizáló enzimek, amelyek $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lizin}$ keresztkötéseket hoznak létre a fehérjék vagy polipeptid láncok glutamin és lizin oldalláncai között. Emberben 9 transzglutamináz gént azonosítottak, ebből 8 kódol aktív enzimet. A XIIIa véralvadási faktor (FXIIIa), keratinocita transzglutamináz (TG1), szöveti transzglutamináz (TG2) és az epidermális transzglutamináz (TG3) jól karakterizált fehérjék, de kevesebb információval rendelkezünk a prosztatata transzglutamináz (TG4), TG5, TG6 és TG7 enzimekről. Az eritrocita 4.2 sávfehérje nem rendelkezik transzglutamináz aktivitással, a vörös vértest membránszkeletonjának felépítésében vesz részt. A TG2 az enzimes család gyakran előforduló tagja, amely sok szövet- és sejtfeleségben megtalálható. A sejten belül jelen lehet a sejtmagban, citoszólban, különböző sejt szervecskékben, vagy a sejthártyához kapcsolódva, de megjelenhet a sejt külső felszínén és az extracelluláris mátrixban is. A humán TG2 76 kDa-os fehérje, amely 688 aminosavval rendelkezik és a 20q12 kromoszómán levő, ~37 kb TG2 gén kódolja.

A TG2 szerkezete és működési mechanizmusa

A TG2 által katalizált transzamidálás acil transzfer reakció, amelyben az aktív centrumban lévő Cys277 tiol csoportja reagál a glutamin γ -karboxamid csoportjával létrehozva az acil-enzim köztiterméket. A következő lépésben a lizin vagy primér amin ϵ -amino csoportja megtámadja a tioészter kötést és felszabadul a keresztkötött termék. Ha amin donor szubsztrát nincs jelen, akkor a víz is megtámadhatja a tioészter kötést és deamidált termék (glutamát) keletkezik. A reakció sebesség-meghatározó lépése az acil-enzim intermedier keletkezése. A transzamidáló/deamidáló funkció mellett a TG2 kináz, protein diszulfid izomeráz illetve GTP/ATPáz aktivitásokkal is rendelkezik.

A humán TG2 4 doménből áll, egy központi "core" domén, amely a Cys277-His335-Asp358 katalitikus triádot tartalmazza, egy N-terminális β -szendvics domén és két C-terminális β -hordó domén alkotja. A nukleotid kötő zsebet a Phe174, Val479, Met483, Arg580, Leu582 és Tyr583 oldalláncai alkotják, és lehetővé teszik egy molekula GTP/GDP megkötését.

Fiziológias körülmények között a TG2 két formával rendelkezik, GTP/GDP kötött transzamidálás szempontjából inaktív, zárt formával és Ca^{2+} -kötött, nyitott, aktív formával. Az átmenet a zárt és nyitott forma között nagy konformációváltozással jár, a C-terminális β -hordó domének kb. 120 angströmnyit elmozdulnak a core doménhez viszonyítva, létrehozva egy csatornát, amely az aktív helyhez vezet. A TG2 GTP/GDP kötött, zárt formában G fehérjeként működik és bizonyos jelátviteli folyamatokban vesz részt, de amikor a

citoszólikus Ca^{2+} -szint megemelkedik és a GTP szint csökken, a TG2 aktiválódik és keresztköti a sejt fehérjéit.

A TG2 által katalizált potenciális biológiai funkciók

A TG2 multifunkcionális enzim, amely változatos élettani szereppel rendelkezik. A transzglutamináz enzimcsalád többi tagjával ellentétben, amelyeknek többé-kevésbé jól meghatározott specifikus funkcióval bírnak, a TG2-nek különféle szerepe lehet. Mint transzglutamináz módosítja a citoszkeleton fehérjéit (aktin, miozin, ROCK-2) és szerepet játszik a sejtek mozgásában és adhéziójában. Befolyásolja a gyulladáshoz szükséges citokinek termelését azáltal, hogy módosítja a szabad $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ fehérjét, elősegítve ezzel a NF κ B sejtmagba való transzlokációját, valamint az annexin I módosításával növeli annak gátló hatását. Sejtípustól függően a TG2 pro- vagy antiapoptotikus funkcióval rendelkezik. Amint az apoptózis beindul és a citoszól Ca^{2+} koncentrációja megnő, a TG2 aktiválódása a szubsztát fehérjék keresztbekötését eredményezi oldhatatlan fehérje hálót hozva létre. Nem tisztázott, hogy milyen szerepe van a TG2-nek a sejtek energiaháztartásának szabályozásában, de a foszfoglicerát dehidrogenáz, foszforiláz kináz, mitokondriális akonitáz, α -ketoglutarát dehidrogenáz és a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz enzimeket kovalensen módosítja és egyeseknek csökkenti aktivitását. A hő sokk fehérjék családjába tartozó hsp60, hsp70, hsp90, hsp27 és krisztallin, valamint az ubikvitin ugyancsak szubsztátrként szolgálnak a TG2 transzglutamináz aktivitásának azt sugallva, hogy a TG2-nek szerepe lehet a rosszul feltekeredett fehérjék elleni védekezésben.

Az enzim sejtmagba való bekerülése a hisztonok, SP1 transzkripciós faktor, androgén receptor és retinoblasztóma fehérje módosításához vezet. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a TG2 transzkripciós szabályozó szereppel is rendelkezik. A TG2 jelen van a sejtek felszínén, segíti a sejt-extracelluláris mátrix közötti kapcsolatokat úgy, hogy fibronectinhez és integrinokhoz kötődik, valamint módosítja az extracelluláris fehérjéket. Szerepet játszik az extracelluláris mátrix átalakulásaiban és a sebgyógyulásban. A sejten kívüli keresztköti aktivitása a jelátviteli utak felerősítését/csendesítését eredményezheti, mivel hormonok (inzulin, glukagon), hormonkötő fehérjék (IGFBP-1 és 3, tireoglobulin) és más jelmolekulák (VIP, P anyag, hisztamin, szerotonin, efrinA, midkin) módosulnak az enzim hatására.

A TG2 szubsztát preferenciája a rendelkezésünkre álló adatok tükrében

A TG2 fiziológiai és patológiai szerepét igazán akkor érthetjük meg, ha megismerjük a TG2 *in situ* szubsztátjait, valamint azokat a hatásokat, amelyek meghatározzák a szubsztátspecifitást. Kezdetben a szubsztát glutamin és lizin oldalláncok körüli szekvenciákat intenzíven tanulmányozták, hogy kiderítsék a különböző oldalláncok jelenlétének a szubsztátok felismerésére gyakorolt hatását. A β -kazeinből származó

peptideket vizsgálva megállapították a Val -5, Leu -2, Lys +2, Val +3, Leu +4 és Pro +5 jelenlétének fontosságát. Másik tanulmányban összehasonlították a szubsztrát fehérjékben a szubsztrát glutaminok szekvencia-környezetében előforduló aminosavakat. A töltött és poláros aminosavak jelenléte a szubsztrát glutaminok szomszédságában azok felszíni elhelyezkedésükre utalt. Gyakran két közvetlenül egymás mellett levő glutamin szolgált szubsztrátként és sok esetben a szubsztrát glutamin a fehérje N- vagy C- terminálisához közel helyezkedett el. A P anyag-analógok vizsgálatával újabb részletekre derült fény a szubsztrát glutamin szekvencia környezetét illetően. A prolin +1 pozícióban gátolta, míg -1 pozícióban segítette a szubsztrát felismerését. Az aszparagin és glicin segítette, míg a pozitív töltésű oldalláncok +2 vagy +4 pozícióban nem voltak hatással a szubsztrátfelismerésre. Coussons és mtsai. a szubsztrát glutaminok környezetéből hiányzó oldalláncokat vizsgálták. A PDB adatbázisban megtalálható kristályszerkezeteket tanulmányozták, de az eredményeket szekvencia szinten interpretálták hangsúlyozva a pozitív töltések fontosságát, mint gátló tényezőket, a szubsztrátok felismerésében.

A növényi eredetű raktározó fehérjében, a gliadinban, a TG2 a QxP szekvenciát részesíti előnybe a QP és QxxP szekvenciákkal szemben. A keletkezett deamidált peptid antigénként szolgál, és immunreakciót indukál coeliákiás betegekben. A prolin fontosságát más kísérlet is megerősítette, ahol fág bemutató könyvtárat alkalmaztak a TG2 által preferált szekvenciák keresésére. Az enzim leggyakrabban a QxP ϕ D(P), QxP ϕ , és Qxx ϕ DP szekvenciákat (ϕ a hidrofób aminosavakat jelöli) módosította.

A lizin szubsztrátpreferenciáról kevesebb információval rendelkezünk. Megállapították, hogy az enzim kevésbé szelektív a lizin szubsztrátokra nézve és nagyobb toleranciával bír a szubsztrátokban levő szerkezeti eltérésekkel szemben. A glutaminok szubsztrátpreferencia vizsgálatához hasonlóan, a lizin szubsztrátok esetében is megvizsgálták a szubsztrát oldalláncok környezetében előforduló aminosavak hatását a szubsztrátspecificitásra. A módosított α A-krisztallin szekvenciákon végzett kísérletek bizonyították hogy a szubsztrát lizinek előtt elhelyezkedő prolin, hisztidin és triptofán kevésbé kedvező, míg a glicin és aszpartát jelenléte erősen kedvezőtlen a szubsztrátfelismerés szempontjából. A valin, arginin és fenilalanin valamint kisebb mértékben a szerin, alanin, leucin, tirozin és aszparagin segítik a szubsztrátfelismerést.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A szakirodalomban fellelhető, eddig azonosított TG2 szubsztrátok összegyűjtése
2. Transzglutamináz szubsztrát adatbázis létrehozása
3. A fág bemutató rendszer alkalmazása a TG2 által preferált glutamin donor szekvenciák kiszűrésére
4. *In silico* módszerek fejlesztése a szubsztrát és nem szubsztrát glutaminok szekvencia-környezetének összehasonlítására
5. Új módszerek keresése, amelyek lehetővé teszik a szubsztrát és nem szubsztrát oldalláncok térbeli környezetének összehasonlítását
6. Olyan prediktor aminosavak keresése, amelyek szerepet játszanak a szubsztrátfelismeréshez szükséges térbeli forma meghatározásában
7. Olyan faktorok azonosítása, amelyek lehetővé teszik a szubsztrát oldalláncok kiválogatását azokban a fehérjékben, amelyek nem rendelkeznek kristályszerkezettel.

MÓDSZEREK

Fág bemutató könyvtár alkalmazása

A peptideket kereskedelmi forgalomban lévő random heptapeptideket tartalmazó fág könyvtárból válogattuk ki, amely az M13 fág felszínén tartalmazza a különböző (2.8×10^9 lehetséges variáció) szekvenciájú heptapeptideket. A GST-TG2 fehérjét glutation-szefaróz 4B gyöngyökön immobilizáltuk és háromszor mostuk, majd 0,5% BSA felhasználásával blokkoltuk. Az 5 mM CaCl_2 , 10 mM DTT, és 10 mL fágot (2×10^{12} PFUs) tartalmazó 50 mL reakcióelegyet a gyöngyökhöz adtuk és 1 órán át inkubáltuk folyamatos rázogatózás mellett. A nem kötődött fágok eltávolítására a gyöngyöket 10X mostuk TBST-vel, és a kötött fágokat 100 mM glicin-HCl pH 2,0 pufferrel eluáltuk, majd Tris-HCl pH 8.0 pufferrel semlegesítettük. Az eluált fágokat *E. coli* ER2537 sejtekben amplifikáltuk, majd PEG/NaCl segítségével tisztítottuk, titráltuk és a következő körökben (10^{11} PFUs) használtuk. A harmadik és negyedik körben a kötött fágok elúciójához 5 mM specifikus amin donor szubsztrátot, 5BPA-t használtunk és a keletkező fág klónokat felszaporítottuk, belőlük DNS-t izoláltunk és annak szekvenciáját meghatároztuk.

ELISA

A véletlenszerűen kiválogatott plakkokból származó fágokat amplifikáltuk és tisztítottuk, majd a 260 nm-en mért abszorbancia-értékekből kiszámoltuk a fág koncentrációját. A fágokból hígítási sort (10^{-4} – 10 nM) készítettünk 0,5% BSA 10 mM DTT és 5 mM CaCl_2 tartalmú oldattal. A 96-lyukú lemezeket 10 mg/mL GST-TG2-vel fedtük be és BSA-val blokkoltuk. Három TBST mosás után a fágokat tartalmazó oldatok 50 mL-t mértük a lyukakba; 1 h át inkubáltuk, majd 10x TBST-vel mostuk. A kötött fágok detektálására és kvantifikálására HRP-vel konjugált anti-M13 antitestet használtunk. A mosás után a lemezt 1 mg/mL tetramethyl-benzidindine-el 10 percen át inkubáltuk majd kénsavas színelőhívás után az abszorbanciát Wallac 1420 Victor2 készülék segítségével 450 nm-en olvastuk le.

In vitro transzglutamináz aktivitásmérés

A TG2 által katalizált transzamidálás vizsgálatára a reakcióelegy 5 mM CaCl_2 , 5 mM DTT és 1 mM 5BPA-t (amin donor) tartalmazott Tris-HCl pH 8.5 pufferben. A különböző glutamin donor szubsztrátokat különböző koncentrációban alkalmaztuk. Az amplifikált fágokat 15% glicerint tartalmazó Tris-HCl-ban oldottuk fel. A SGYGQQGQTPYYNQSPHPQQQQP peptidet 200 mM-ra hígítottuk, és amin donorként 5BPA-t vagy 5BKP-t alkalmaztunk. A térbeli aminosav mintázat alapján TG2 szubsztrátként jószolt fehérjék esetében a reakcióelegy 0,5 mM glutamin donor szubsztrátot (orexin B vagy neuropeptid Y) tartalmazott. Az exendin (amin szubsztrátnak jószolt peptid) esetében a NQEQVSP LLLK peptidet használtuk glutamin

donor szubsztrátként. Mindenik reakciót a rekombináns TG2 hozzáadásával indítottuk és 1 vagy 2 órán át inkubáltuk 37°C-on, majd 5 mM EDTA hozzáadásával leállítottuk. A reakciók termékeit Western blot vagy tömegspektrométer segítségével vizsgáltuk.

Western blot

Az 5×10^{10} fágot tartalmazó TG2 által katalizált keresztkötés végtermékét 10% SDS-PAGE gélen futtattuk. A fehérje sávokat festettük és/vagy Immobilion-P PVDF membránra blottoltuk. A biotinizált fehérjéket HRP-konjugált streptavidinnel, majd kemilumineszcens festéssel detektáltuk.

Tömegspektrometriás mérések

A folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás méréseket (nanoLC/MS) turbó elektropray ionforrással ellátott 4000 QTRAP nano LC/MS/MS tömegspektrométerrel végeztük. A neuropeptid Y, orexin B és exendin 4-t tartalmazó mintákat Zorbax 300SB-C18 oszlopra injektáltuk és a komponenseket 0,5 μ L/min átfolyási sebesség mellett elválasztottuk. A SGYGGQQGQTPYYNQSPHPQQQP peptid 100 mL-t RP-HPLC C18 Tagra oszlopra injektáltuk és az elválasztást 6 mL/min sebességgel végeztük. A keletkező peptid tömeg értékeket a gyártó által rendelkezésünkre bocsátott Analyst programmal azonosítottuk.

Adatbázis lekeresés

A fág bemutató rendszer alkalmazásával szelektált heptapeptid szekvenciákat vizsgáltuk. A konszenzus motívum megállapítása után megvizsgáltuk a kérdéses motívum jelenlétét a már azonosított transzglutamináz szubsztrát fehérjékben. Átfogóbb keresésben, a GQQQTPY peptidet, mint a fágokon jelen levő reprezentatív szekvenciát, vizsgáltuk és BLAST keresés segítségével olyan fehérjéket próbáltunk találni a PIR adatbázisban (NCBI), amelyek tartalmazzák az említett szekvenciát. A legjobb találatot, az SWI1/SNF1 kromatin remodeling faktorok családját, további analíziseknek vetettük alá.

Szekvencia és szerkezeti adatok

A szekvenciák összehasonlítására és a rendezetlenség vizsgálatára a szekvencia adatokat az UniProt adatbázisból nyertük. A térbeli környezet vizsgálatához használt kristályszerkezeti adatok a PDB adatbázisból származtak. Az aminosavak felszíni elhelyezkedését is megvizsgáltuk és 18%-os határértéket állapítottunk meg. Azokat az aminosavakat, amelyeknek kevesebb, mint 18%-a volt a felszínen kitöröltük a szerkezetből. A teljes és a csak felszíni elhelyezkedésű aminosavakat tartalmazó szerkezeteket külön-külön vizsgáltuk.

A TG2 szubsztrát szekvenciák összehasonlítása

A glutamin és lizin oldalláncok mindkét oldalán 5-5 aminosavnyi „ablakot” vizsgáltuk és a SEQSTAT program segítségével összehasonlítottuk az egyes aminosavak előfordulási gyakoriságát a szubsztrát illetve a nem szubsztrát oldalláncok környezetében. Az eredményeket khi-négyzet teszt segítségével elemeztük és a szignifikáns különbségeket értékeltük. A szekvencia összehasonlítások során szubsztrátként definiáltunk minden olyan glutamint, amelyet az irodalomban TG2 szubsztrátként azonosítottak.

A térbeli környezet tanulmányozása

A teljes és a csak felszíni aminosavakat tartalmazó szerkezeteket elemeztük az ATOMDIST program segítségével a glutaminokra, illetve a lizinekre vonatkozóan. Az ATOMDIST megszámlálja, hogy a glutaminok esetében a delta C atomtól (CD), a lizinek esetében, pedig a zeta N (NZ) atomtól számított 15 Å sugarú gömbben, adott távolságra milyen és hány darab aminosav található. Mindenik aminosavat egyetlen atommal definiáltunk. Ebben a vizsgálatban az irodalom által effektív szubsztrátként említett oldalláncokat szubsztrátként, a TG2 által nem használt oldalláncokat, pedig nem szubsztrátként definiáltuk.

Statisztikai elemzés

Az ATOMDIST program eredményét statisztikai elemzésnek vetettük alá. A 15 Å sugarú gömbben levő aminosavak számát az indikátor módszer szerint kódoltuk. Mindenik kódolt változót kereszt táblázatba vittük be és kiszámoltuk az esélyhányadost (odds ratio) és annak 95%-os konfidenciaintervallumát. Azokat a változókat, amelyek esetében az esélyhányados 95%-os konfidenciaintervalluma nem tartalmazta az 1,0 értéket kiválogattuk, és többváltozós logisztikus regresszióval vizsgáltuk. A logisztikus regressziós analízisben szignifikánsnak bizonyuló változókat felhasználtuk a modellépítéshez. Az analízisünk ellenőrzésére a „leave-one-out” módszert használtuk. A predikció teljesítményének meghatározásához kiszámoltuk a szenzitivitást és specificitást. A különböző predikciós modellek összehasonlításához elkészítettük a megfelelő ROC görbéket és kiszámoltuk a görbe alatti területet (AUC).

A SEQSTAT program eredményeinek összehasonlítására khi-négyzet tesztet alkalmaztunk, míg a rendezetlenség vizsgálatánál Mann-Whitney U tesztet használtunk.

A rendezetlenség vizsgálata

A szubsztrát fehérjék szekvenciájában jelen levő rendezetlenség jóslására az IUPred (<http://iupred.enzim.hu>) és PONDR-VSL2 (www.pondr.com) prediktorokat használtuk. Rendezetlen régióknak azt a szekvencia-részletet fogadtuk el, amelyet mindkét prediktor rendezetlennek jósolt. A következő lépésben azokat a fehérjéket vizsgáltuk tovább, amelyek tartalmaztak mind szubsztrát mind nem szubsztrát oldalláncokat és a szubsztrát régió

rendezetlen volt. Ezen fehérjékben 10-10 aminosavat vizsgáltunk a glutamin ill. lizin oldalláncok mindkét oldalán és megbecsültük a relatív rendezetlenség mértékét és a rendezetlenséget elősegítő aminosavak számát. A szubsztrát és nem szubsztrát oldalláncokra vonatkozó eredményeket Mann-Whitney U teszt segítségével hasonlítottuk össze.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

Az elmúlt 40 év során több mint 130 fehérjéről derült ki, hogy *in vitro* vagy *in situ* körülmények között részt vesz a TG2 által katalizált poszttranszlációs módosításokban. Ezek a fehérjék a sejtek különböző kompartmentjeiben, a sejtek felszínén vagy az extracelluláris térben helyezkednek el. A széles szubsztrátspecifitás biztosítja a TG2 változatos funkcióit, ugyanakkor különböző szabályozó tényezők jelenléte szükséges ahhoz, hogy az enzim csak az adott biológia funkcióhoz rendelt szubsztrátokat módosítsa.

A TG2 szubsztrátspecifitásának vizsgálatát az eddig publikált szubsztrátok összegyűjtésével kezdtük, majd az információkat a TRANSDAB Wiki transzglutamináz szubsztrát adatbázisba rendeztük. Az adatbázisban lévő kiterjedt szerkezeti információkat felhasználva megvizsgáltuk a TG2 szubsztrátspecifitását a szekvencia és a térszerkezet szintjén. *In silico* és *in vitro* módszerek alkalmazásával megkíséreltük felfedni e széles szubsztrátspecifitással rendelkező enzim szubsztrát preferenciáját.

TRANSDAB Wiki – az interaktív transzglutamináz szubsztrát adatbázis

Az adatbázis készítésénél az volt a célunk, hogy olyan szerkezeti információkat tartalmazó adatbázist hozzunk létre, amely adatokat szolgáltat a szubsztrát és nem szubsztrát oldalláncok mikrokörnyezetéről. Az irodalomban fellelhető szubsztrát fehérjéket és interakciós partnereket összegyűjtöttük és ezeket az információkat a TRANSDAB Wiki (<http://genomics.dote.hu/wiki>) adatbázisba rendeztük. Az adatbázist web 2.0 felületen készítettük kihasználva a wiki adta lehetőségeket, hogy az itt található információk könnyen hozzáférhető, jól kezelhető módon álljanak a felhasználók rendelkezésére. Jelenleg a TRANSDAB Wiki 247 szubsztrátokról szóló cikkel rendelkezik és tartalmazza a XIIIa véralvadási faktor, TG1, TG2, TG3, TG5 és a mikrobiális transzglutamináz szubsztrátjait és interakciós partnereit. Kutatásunk előterében főként a TG2 transzglutamináz funkciója áll, de az adatbázis a transzglutamináz szubsztrátok mellett tartalmazza a kináz és deamidáz funkciók szubsztrátjait is.

A TG2 által preferált lineáris szekvenciák vizsgálata fág bemutató rendszer segítségével

A TG2 által preferált glutamin szubsztrát szekvenciák kiszűréséhez fág bemutató rendszert alkalmaztunk, amely lehetővé tette a rekombináns humán TG2-höz specifikusan kötődő peptid szekvenciák kiszűrését random heptapeptideket bemutató fág könyvtárból. A fágok felszínén bemutatott peptidek hozzákötődtek az immobilizált TG2 fehérjéhez és a kötődött fágokat alacsony pH-jú oldattal eluáltuk a TG2 felszínéről. A keletkezett fágokat felszaporítottuk és a folyamatot megismételtük annyi különbséggel, hogy a második és harmadik körökben az elúciót specifikus amin donor szubsztráttal, 5BPA-al végeztük. A

második kör után a szelektált fágok 46%-a tartalmazott egy vagy több glutaminnal rendelkező peptidet, de ez az arány 75%-ra nőtt a harmadik kört követően. Összesen 26 glutamint tartalmazó peptidet azonosítottunk. Annak eldöntésére, hogy az azonosított peptideket ténylegesen felhasználja-e az enzim szubsztrátként, *in vitro* transzglutamináz aktivitásmérést alkalmaztunk. Az 5BPA beépülését a fágokba Western blot segítségével vizsgáltuk. Az MPPPMRS és LMAKPTR szekvenciát tartalmazó fágokat negatív kontrollként használtuk és esetükben nem tapasztaltunk 5BPA beépülést. A TG2 a GQQQTPY, GLQQASV és WQTPMNS peptideket módosította leghatékonyabban és a módosított peptidek szekvenciája alapján a pQx(P,T,S)l szekvencia motívumot találtuk jellemzőnek a TG2 szubsztrátfelismerése szempontjából. Ez a motívum jelen van a már azonosított szubsztrát fehérjékben (TRANSDAB Wiki) és jól egyezik az irodalomban közölt adatokkal. Hasonló szekvenciákat és konszenzus motívumokat találtak fontosnak más fág bemutató rendszert alkalmazó kísérlet során, ahol a fágok felszínén megjelenő dodekapeptideket glutamin donor szubsztrátként használták a TG2 által katalizált transzglutaminálási reakcióban. Az 5BPA-al jelzett preferált szekvenciák alapján a QxPφD(P), QxPφ, és QxxφDP szekvenciákat (φ a hidrofób oldalláncokat jelöli) találták legkedvezőbbnek a TG2 számára.

A GQQQTPY -szerű motívumok transzamidálása natív peptidekben

A GQQQTPY peptidet, mint a fág könyvtárból kiszűrt, reprezentatív példát a TG2 által preferált szekvenciákra, további vizsgálatoknak vetettük alá. BLAST keresés segítségével olyan fehérjéket kerestünk a PIR adatbázisban, amelyek a GQQQTPY peptidhez hasonló régiókat tartalmaznak. A legjobb találatot reprezentáló SWI1/SNF1 kromatin remodeling faktort, amely két GQQQTPY-szerű szekvenciát tartalmaz egyik konzervált glutamin-prolin gazdag régiójában, tovább vizsgáltuk. A ¹SGYGQQGQTPYYNQSPHPQQQPPYS²⁷ szekvenciával rendelkező 27-mer peptidet megszintetizáltunk és tömegspektrometriával követett, *in vitro* transzglutamináz aktivitásméréssel teszteltük. A rekombináns humán TG2 szubsztrátként használta a peptidet és a Gln6, Gln8 és Gln22 oldalláncokat módosította, azt sugallva, hogy a kombinatórikus módszerrel meghatározott szekvenciáknak *in situ* relevanciája lehet.

A TG2 által preferált szekvencia-környezet in silico vizsgálata

A szubsztrát fehérjékben jelen levő glutamin és lizin oldalláncok körüli szekvenciákat összehasonlítottuk, hogy megvizsgáljuk az egyes oldalláncok szerepét a szubsztrátfelismerésben. A SEQSTAT program segítségével 96 szubsztrát glutamin körüli szekvenciát hasonlítottunk össze 602 nem szubsztrát glutamin körüli szekvenciával és a szignifikáns különbségeket tanulmányoztuk. A glutamin a -1, -2, +1 pozíciókban sokkal gyakrabban fordult elő, mint bármely más aminosav, ugyanakkor a szubsztrát glutaminok N-

terminális közeli elhelyezkedése is megfigyelhető volt. A Gly -1 és Pro +5, a poláros Thr -3, Gln +2, Ser +5, a pozitívan töltött Lys +2 jelenléte valamint a Leu -1 Ser +3 hiánya szignifikánsan gyakrabban fordult elő a szubsztrát glutaminok környezetében.

A lizin oldalláncok környezetét hasonló módon vizsgáltuk, 63 amin donor szubsztrát szekvenciát hasonlítottunk össze 472 nem szubsztrát szekvenciával és a szignifikáns eltéréseket értékeltük. A szubsztrát lizinek gyakrabban fordultak elő a C-terminushoz közeli pozíciókban és a korábbi adatokkal összhangban, a Pro -2 és -3 valamint a pozitívan töltött Arg -4, Arg +5, Lys -2, Lys +2 jelenléte szignifikánsan gyakoribb volt a szubsztrát lizinek környezetében. A Lys +1 jelenléte fontos gátló tényezőnek bizonyult és eredményeink nem erősítik meg a Grootjans és mtsai. által részletesen tanulmányozott -1 helyzetben levő oldalláncok fontosságát a szubsztrátszelekció szempontjából.

A TG2 szubsztrát felismerésére jellemző pQx(P,T,S)I motívum a szekvencia környezet összehasonlításából nyert adatokkal együtt sem tudja pontosan megmagyarázni, hogyan választja ki a TG2 az általa használt szubsztrátfehérjéket.

A TG2 szubsztrátspecifitását meghatározó térbeli tényezők

A TG2 szubsztrát-preferenciájának felderítése érdekében a szubsztrát fehérjék másodlagos és harmadlagos szerkezetét kezdtük tanulmányozni, hogy megtaláljuk azt a térbeli formát/alakot, amely a szubsztrát glutamin illetve lizin oldalláncok térbeli elhelyezkedésére jellemző. VMD alkalmazásával meghatároztuk, hogy a glutamin és lizin oldalláncok milyen másodlagos szerkezeti elemekben helyezkednek el. A szubsztrát glutaminok inkább a turn régiókat kedvelik, és kisebb mértékben helyezkednek el béta redőkben, míg a szubsztrát lizinek gyakrabban fordultak elő turn régiókban és béta redőben, de kevesebb szubsztrát lizin található coil és hélix régiókban.

A harmadlagos szerkezeten alapuló logisztikus regressziós analízis

Megvizsgáltuk a kristályosított fehérjék térbeli szerkezetét és külön vizsgáltuk a teljes szerkezetet és a csak felszíni aminosavakat tartalmazó szerkezeteket. Mindkét típusú fájlokat az ATOMDIST bemenő adataiként használtuk és a kimenő adatokat logisztikus regresszióval elemeztük. A szubsztrát és nem szubsztrát oldalláncok térbeli környezete közötti szignifikáns különbséget azok az aminosavak jelentik, amelyeknek szerepük lehet a TG2 szubsztrát felismerésében. A számítások által eredményezett, a glutamin CD és a lizin NZ atomjaitól különböző távolságban található aminosavaknak pozitív vagy negatív hatása volt a szubsztrát szelekcióra, segítve vagy gátolva az illető oldallánc felhasználását TG2 szubsztrátként.

A glutamin szubsztrátspecifitást befolyásoló térbeli tényezők

Amikor a számításokban a felszínen elhelyezkedő aminosavakat tartalmazó szerkezeteket használtuk, a számos, különböző távolságra lévő aminosav közül a glutaminok CD-től 5 Å-re levő Thr, 10 Å-re levő Arg, His és Leu, 11 Å-re levő Val és a 15 Å-re levő Arg és Phe fordultak elő szignifikánsan gyakrabban a szubsztrát glutaminok környezetében. A fenti aminosavak jelenléte pozitív hatást gyakorolt a szubsztrátfelismerésre. Amikor a teljes szerkezetet használtuk a számításokban, a 10 Å-re levő Asp, Gly és Phe, a 11 Å-re levő Ser, a 12 Å-re levő Val és a 14 Å-re levő Asn jelenléte gyakoribb volt a nem szubsztrát glutaminok környezetében, azt sugallva, hogy ezen aminosavak csökkentik az illető glutamin szubsztrátként történő felhasználását.

A lizin szubsztrátspecifitást befolyásoló térbeli tényezők

A felszínen elhelyezkedő aminosavakat tartalmazó szerkezetek tanulmányozásánál úgy tűnt, hogy a Gly, Ser és Asp jelenléte játszik szerepet a szubsztrátfelismerésben. Egy Gly és Asp jelenléte 6 Å-re, egy Ser jelenléte 14 Å-re és egy Gly jelenléte 15 Å-re a lizin oldalláncok NZ atomjától, segítette a szubsztrátfelismerést. A teljes szerkezet tanulmányozásánál több aminosav bizonyult fontosnak; egy His jelenléte 5 Å-re, egy Ser és egy Gly jelenléte 6 Å-re, két Gly jelenléte 11 Å-re, egy Pro jelenléte 12 Å-re, két Asp jelenléte 13 Å-re és egy Gly jelenléte 15 Å-re segítette az illető lizin kiválasztását és módosítását.

Módszerünk egyik hátránya, hogy minden oldalláncot egyetlen atommal definiáltunk. Így például a 14 Å-re levő Asn jelenléte azt jelenti, hogy az Asn gamma C atomja 14 Å-re található a glutamin CD vagy a lizin NZ atomjától, és nem ad információt sem az oldallánc térbeli helyzetéről sem arról, hogy milyen konformációban van az illető oldallánc a vizsgált glutaminhoz/lizinhez viszonyítva. Módszerünk másik hibája a bemenő adatok zajossága. Az irodalomban szubsztrátként említett fehérjék szolgálnak a vizsgálataink elsődleges bemenő adataiként, de ezek közül kevés származik nagyon pontos tömegspektrometriás mérésekből, a szubsztrátok nagy részét különböző érzékenyséű módszerekkel azonosították. Ezen korlátozó tényezők mellett is a ROC görbék esetében a görbe alatti terület minden predikciónál nagyobb, mint 0,785, ami a módszerünk jó predikciós erejére utal. A Thr jelenléte 5 Å, Arg, His és Leu jelenléte 10 Å, Val jelenléte 11 Å, Arg és Phe jelenléte 15 Å távolságra és az Asp, Gly és Phe hiánya 10 Å, a Ser hiánya 11 Å, a Val hiánya 12 Å és az Asn hiánya 14 Å távolságban segíti az illető glutamin szubsztrátként való felismerését.

A lizin donor szubsztrátok esetében a His jelenléte 5 Å, Gly, Ser és Asp jelenléte 6 Å, két Gly jelenléte 11 Å, egy Pro jelenléte 12 Å, két Asp jelenléte 13 Å, egy Ser jelenléte 14 Å

és egy Gly jelenléte 15 Å távolságban pozitív hatással rendelkeznek, segítik a szubsztrátfelismerést.

Új szubsztrátok jóslása a logisztikus regressziós analízissel nyert adatok alapján

Ismert volt, hogy a TG2 képes bizonyos peptid hormonok, mint inzulin, glukagon, VIP, P anyag, ACTH és béta endorfin módosítására, ezért a továbbiakban néhány neuropeptid molekulát vizsgáltunk meg. A prediktor aminosavak jelenlétét vagy hiányát, mint szelekciós kritériumokat felhasználva 17, véletlenszerűen kiválasztott, neuropeptidet vizsgáltunk. A vizsgált és szubsztrátként jóslt peptidek közül a neuropeptid Y, orexin B és exendin 4 peptideket tovább analizáltuk és úgy találtuk, hogy a TG2 mindháromat felhasználja szubsztrátként. A neuropeptid Y és az orexin B a központi idegrendszerben található és szerepet játszanak a táplálékbevitel szabályozásában. Az orexin B orexin receptorokon hatva szerepet játszik az ébrenlét szabályozásában. Az exendin 4 vagy exenatid a *Glia monster* gyík nyálából származik és GIP-1 inkretinhez hasonló módon viselkedve szerepet játszik a II. típusú diabetesz gyógyszeres kezelésében Byetta (Amylin, Lilly) néven. Természetesen, további kutatások szükségesek annak kiderítésére, hogy a fenti neuropeptidek szubsztrátként szerepelnek-e a sejten belül, és ha igen, akkor milyen szerepet játszik a TG2 funkcióik szabályozásában. Egyik lehetőség a rendelkezésre álló aktív (monomer) neuropeptidek mennyiségének szabályozása.

A rendezetlenség szerepe a szubsztrát felismerésben

Vizsgálataink során a TG2 szubsztrátfehérjéket két csoportba osztottuk, az egyik csoport jól meghatározott kristályszerkezettel rendelkezik, a másik csoport fehérjei nem rendelkeznek kristályszerkezettel, vagy ha rendelkeznek, akkor a szubsztrát oldalláncokat tartalmazó részek hiányoznak a szerkezetből. A logisztikus regressziós analízist jól tudtuk alkalmazni a kristályszerkezettel rendelkező fehérjék esetében a TG2 szubsztrátfelismerése szempontjából fontos prediktor aminosavak meghatározására, de a második csoport szubsztrátjai vizsgálatánál új megközelítés alkalmazása vált szükségessé.

A rendezetlenség gyakran előfordul a fehérjék szerkezetében és az esetek nagy részében szabályozó funkciókkal társul. A rendezetlenségnek fontos szerepe van a fehérje-fehérje interakciókban a kötődő partner felismerésében és szerepet játszik a fehérjék bizonyos poszttranszlációs módosításában, mint a foszforiláció és a deacetilálás helyének felismerésében. A TG2 szubsztrátok esetében a szubsztrát oldallánc gyakran helyezkedik el a fehérjék N- és C-terminusai közelében és sok esetben a szubsztrát régiókat nem lehet röntgen kristallográfiás mérésekkel meghatározni. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a rendezetlenségnek szerepe lehet a transzglutaminálás helyének meghatározásában is. Hipotézisünk bizonyítására megvizsgáltuk a szubsztrát fehérjék szekvenciáját és rendezetlen

régiókat kerestünk. Eredményeink azt mutatták, hogy a szubsztrát fehérjék mintegy felében a szubsztrát régiók rendezetlen részben helyezkedtek el. Az eredmények további finomítása érdekében minden olyan fehérjében, amely egyaránt tartalmazott szubsztrát és nem szubsztrát glutamin illetve lizin oldalláncokat valamint a szubsztrát régió rendezetlen volt, a glutamin illetve lizin oldalláncok környezetét részletesebb vizsgálatnak vetettük alá. A 21 aminosav hosszú szekvencia részletekben megbecsültük a relatív rendezetlenség mértékét és a rendezetlenségért felelős aminosavak számát. Mind a glutamin, mind a lizin szubsztrátok esetében a relatív rendezetlenség és a rendezetlenségért felelős aminosavak száma szignifikánsan nagyobb volt, mint a nem szubsztrát oldalláncok esetében, igazolva feltevésünket, hogy a szerkezeti rendezetlenségnek szerepe van a TG2 szubsztrát felismerésében.

ÖSSZEFOGLALÁS

A 2 típusú transzglutamináz (TG2) a fehérjék Ca^{2+} -függő poszttranszlációs módosítását katalizáló enzim, amely izopeptid kötéseket hoz létre a glutamin és lizin oldalláncok között. A TG2 több mint 130 azonosított szubsztráttal rendelkezik, de a pontos szubsztrát felismerési mechanizmus még nem ismert. A szubsztrátpreferencia vizsgálatához összegyűjtöttük az eddig azonosított TG2 szubsztrátokat és létrehoztuk a TRANSDAB Wiki (<http://genomics.dote.hu/wiki>) transzglutamináz szubsztrát adatbázist.

A TG2 által preferált szekvenciák vizsgálatára fág bemutató rendszert alkalmaztunk és a random heptapeptideket bemutató könyvtárból kiszűrtük a rekombináns TG2-höz kötődő fágokat. A kapott peptidok szekvenciájában leggyakrabban előforduló, a szubsztrát glutaminok környezetére jellemző pQx(P,T,S)l konszenzus motívum összhangban van az eddig azonosított szubsztrátok szekvenciájával. A pQx(P,T,S)l motívum jelenléte alapján szubsztrátnak jósolt SWI1/SNF1 kromatin remodeling faktor N-terminális részletét megszentizáltuk és bebizonyítottuk, hogy a TG2 felhasználja szubsztrátként. Eredményeink azt sugallják, hogy a kombinatórikus módszerrel meghatározott szekvenciáknak *in situ* relevanciája lehet. Az fág bemutató rendszer mellett *in silico* módszereket alkalmazva is megpróbáltuk feltérképezni a szubsztrát glutamin illetve lizin oldalláncok környezetében jelen levő aminosav oldalláncok fontosságát, de sem az *in vitro* sem az *in silico* megközelítés nem adott teljes magyarázatot a TG2 szubsztrátspecifitására.

A TRANSDAB Wiki adatbázisban található szerkezeti információkat felhasználva megkíséreltünk fényt deríteni arra, hogy milyen térbeli kritériumok szerint válogatja ki a TG2 szubsztrátjait. A glutamin illetve lizin oldalláncok térszerkezeti elemzéséből nyert nagy mennyiségű adatot logisztikus regressziós analízis segítségével összehasonlítottuk és olyan prediktor aminosavakat kerestünk, amelyek meghatározzák, hogy mely oldalláncokat módosítja a TG2. A prediktor aminosavak jelenlétét vagy hiányát, mint szelekciós kritériumokat felhasználva sikerül három új TG2 szubsztrátot azonosítani.

Azokban a fehérjékben, amelyek nem rendelkeznek kristályszerkezettel a TG2 szubsztrátspecifitásának egyik meghatározó tényezője a rendezetlenség jelenléte; a TG2 azokat az oldalláncokat használta fel nagyobb valószínűséggel szubsztrátként, amelyek rendezetlen régióban helyezkedtek el.

Az összegyűjtött szekvencia és szerkezeti adatok új megvilágításba helyezik e változatos enzimaktivitással rendelkező fehérje szubsztrátspecifitását. A sejtben a TG2 számos kompartmentben fordul elő és transzglutaminázként működve változatos szubsztrát fehérjéket módosít, de rendelkezik GTP/ATPáz aktivitással, kinázként, protein diszulfid izomerázként is működhet vagy a sejtek felszínén integrinhez vagy fibronectinhez kapcsolódhat. A szubsztrátok felismeréséhez szükséges komplex fiziko-kémiai interakciók

megértéséhez nem elég csak a lineáris szekvenciában rejlő információkat használni, hanem szükség van a térbeli szerkezetben kódolt információkra és a rendezetlenség jelenlétének vizsgálatára.

A tézisek alapjául szolgáló közlemények

Csősz, E., Keresztessy, Zs. and Fésüs. L. (2002). Transglutaminase substrates: from test tube experiments to living cells and tissues. *Minerva Biotec.* 14, 149-153.

IF: 0.217

Keresztessy, Zs.*, Csősz, E.*, Hársfalvi, J., Csomós, K., Gray, J., Lightowers, R.N., Lakey, J.H., Balajthy, Z. and Fésüs, L. (2006). Phage display selection of efficient glutamine-donor substrate peptides for transglutaminase 2. *Protein Sci.* 15, 2466-2480. (* mindkét szerző egyenlő arányban járult hozzá)

IF: 3.46

Csősz, E., Meskó, B. and Fésüs, L. (2008). Transdab wiki: the interactive transglutaminase substrate database on web 2.0 surface. *Amino Acids.* Jul 2.

IF: 2.78

Csősz, E., Bagossi, P., Nagy, Z., Dosztányi, Zs., Simon, I. and Fésüs, L. (2008). Substrate preference of transglutaminase 2 revealed by logistic regression analysis and intrinsic disorder examination. *J Mol Biol. Közlésre elfogadva.*

IF: 4.89

Egyéb publikációk:

Nemes, Z., Csősz, É., Petrovski, G. and Fésüs, L. (2005). Structure-function relationship of transglutaminases – a contemporary view. *Prog Exp Tumor Res.* 38, 19-36.

IF: 4.214

Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Csősz É, Sblattero D, Marzari R, Mäki M, Fésüs L, Korponay-Szabó IR. Coeliac autoantibodies recognize a composite main epitope on transglutaminase 2 involving amino acids from 3 domains. (Kézirat).

Kiraly R, Csősz É, Kurtan T, Antus S, Szigeti K, Vecsei Z, Korponay-Szabo, IR, Keresztessy Z, Fesüs L. Functional significance of five non-canonical Ca²⁺-binding sites of transglutaminase 2 characterised by site directed mutagenesis. (Közlésre beküldve).

Posztterek:

Első szerzős posztterek:

Csősz É., Hársfalvi J., Keresztessy Zs. and Fésüs L.: A humán szöveti transzglutamináz szubsztrátpreferenciájának vizsgálata random heptapeptid fágbemutató könyvtár szűrésével. A Magyar Biokémiai Társaság 8. Vándorgyűlése, Keszthely, 2002.

Csősz É. and Fésüs L.: A TRANSDAB – transzglutamináz szubsztrát adatbázis – ismertetése. A Magyar Biokémiai Társaság 9. Vándorgyűlése, Sopron, 2004.

Csősz É., Bagossi P. and Fésüs L. An *in silico* study of substrate preference of transglutaminase 2. 30. FEBS és 9. IUBMB Konferencia, Budapest, 2005. Absztrakt - FEBS Journal, 272, Supplement 1, 410.

Csősz É., Bagossi P. and Fésüs L.: An *in silico* study of substrate preference for transglutaminase 2. 8th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases (PCL8), Lubeck, Németország, 2005.

Csősz É., Bagossi P. and Fésüs L.: An *in silico* study of substrate specificity of transglutaminase 2 – a possible role of unstructured conformations in substrate specificity. EMBO/SPINE2 Workshop, Intrinsically Unfolded Proteins: Biophysical Characterization & Biological significance, Budapest, 2007.

Csősz É., Bagossi P., Dosztányi Zs., Simon I. and Fésüs L.: A humán szöveti transzglutamináz szubsztrát specificitásának tanulmányozása *in silico* módszerekkel – a rendezetlen régiók szerepe a szubsztrát felismerésében. A Magyar Biokémiai Társaság 2007. évi Vándorgyűlése, Debrecen, 2007.

Csősz É., Bagossi P., Nagy Z., Dosztányi Zs., Simon I. and Fésüs L.: Structural features influencing the transglutaminase 2 substrate selection. 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, Athén, Görögország, 2008. Absztrakt - FEBS Journal; 275, Suppl 1, 215.

Társszerzős posztetek:

Király R, László É, Keresztessy Z, Fésüs L. A humán szöveti transzglutamináz Ca^{2+} -kötő helyeinek felderítése irányított mutagenézis alkalmazásával. A Magyar Biokémiai Társaság 6. Vándorgyűlése, Sárospatak, 2001.

Kiraly R, Csőszt É, Keresztessy Z, Fesüs L: Identification of Ca^{2+} -binding sites in the human transglutaminase 2 by surface potential engineering using site directed mutagenesis. 7th International Conference on Transglutaminases and Protein Crosslinking Reactions. Ferrara, Olaszország, 2002. Absztrakt - *Minerva Biotec.* 14, 193.

Király R, Csőszt É, Keresztessy Z, Fésüs L. A humán szöveti transzglutamináz Ca^{2+} -kötő helyeinek felderítése irányított mutagenézis alkalmazásával. A Magyar Biokémiai Társaság 9. Vándorgyűlése, Sopron, 2004.

Kiraly R, Csőszt É, Keresztessy Z, Fesüs L: An attempt to identify the Ca^{2+} -binding sites of human transglutaminase 2 using site directed mutagenesis. 8th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases, Lübeck, Németország, 2005.

Vecsei Z, Király R, Korponay-Szabó IR, Csőszt É, Mäki M, Fésüs L: Calreticulin can mask the coeliac epitopes of transglutaminase 2. 8th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases, Lübeck, Németország, 2005.

Kiraly R, Csőszt É, Kurtan T, Keresztessy Z, Fesüs L: Kísérlet a humán szöveti transzglutamináz Ca^{2+} -kötő helyeinek felderítésére irányított mutagenézis alkalmazásával. Előadás, A Magyar Biokémiai Társaság 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006.

Kiraly R, Csőszt É, Kurtan T, Keresztessy Z, Fesüs L: Ca^{2+} -binding sites of transglutaminase 2 revealed by site directed mutagenesis. 32th FEBS Congress, Bécs, Ausztria, 2007. Absztrakt - FEBS Journal; 274, Suppl 1, 167.

Kiraly R, Csőszt É, Kurtan T, Keresztessy Z, Fesüs L: Ca^{2+} -binding sites of transglutaminase 2 revealed by site directed mutagenesis. 9th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases, Marrakech, Marokkó, 2007.