

1 EINLEITUNG

Aus dem Kulturfiltrat von *Phytophthora sojae*, einem pflanzenpathogenen Oomyceten wurde ein 42kDa-Glykoprotein (GP42) mit Transglutaminase(TGase)-Aktivität isoliert, dass schon in geringen Konzentrationen eine Immunantwort in Pflanzen hervorruft.

Die Transglutaminasen (EC 2.3.2.13) umfassen Enzyme, die eine Acyltransferreaktion zwischen der γ -Carboxyamid-Gruppe eines proteingebundenen Glutaminrestes und der ϵ -Amino-Gruppe eines proteingebundenen Lysinrestes bzw. verschiedenen primären Aminen katalysiert. Diese irreversible Reaktion resultiert in der Ausbildung einer kovalenten Isopeptidbindung der Aminosäurereste Glutamin und Lysin, die besonders proteinaseresistent ist.

Der katalytische Mechanismus weist starke Ähnlichkeiten mit dem von Cysteinproteasen auf. Es konnte gezeigt werden, dass TGasen ein aktives Zentrum besitzen, das aus einer katalytischen Cys-His-Asp-Triade besteht, wobei das hoch reaktive Cystein ein charakteristisches Merkmal aller TGasen ist.

Die Selektivität gegenüber dem 1. Substrat, dem Glutaminrest, ist relativ hoch, bezüglich des Acylakzeptors zeigen die TGasen jedoch nur geringe Spezifität. Deshalb katalysieren TGasen Nebenreaktionen wie Desamidierung, Amininkorporation und Esterifikation.

Da sie an der posttranskriptionellen Modifikation von Proteinen, durch die kovalente Einbringung von primären Aminen oder die Deamidation von Glutaminresten beteiligt sind, vernetzen sie Proteine häufig zu unlöslichen supramolekularen Strukturen.

Die TGase aus *Phytophthora* ist ein neues Mitglied innerhalb der TGase-Familie, weil sie kaum Sequenzübereinstimmungen mit den anderen Vertretern aufweist, aber über sehr ähnliche biochemische Eigenschaften verfügt. Die Aktivität der GP42 ist strikt Ca^{2+} -abhängig und nicht durch Mg^{2+} oder Mn^{2+} substituierbar. Durch Chelatierung mit EDTA wird die TGase-Aktivität vollständig gehemmt.

TGase-Inhibitoren wie Cu^{2+} , Iodacetamid, Cystamin und N-ethylmaleimid blockieren effektiv die Aktivität der GP42.

Die Sequenzunterschiede der GP42 zu den tierischen TGasen könnte zum einen eine Folge des evolutionären Abstandes der Oomyceten zu den Metazoa sein. Zum anderen könnte sich aufgrund der gleichen enzymatischen Aktivität der GP42 durch konvergente Evolution eine katalytische Triade entwickelt haben.

1.A Zielsetzung

Die Transglutaminasen sind in Säugetierorganismen an vielen physiologischen Prozessen äußerst vielfältig und komplex beteiligt. Da die Funktion und Relevanz der TGasen bis jetzt nur in Ansätzen verstanden ist, sind sie ein begehrtes Forschungsthema.

In der Medizin liefert die Erforschung dieser Enzymklasse Ansätze gegen Krankheiten wie: Krebs, Autoimmunreaktionen, neurodegenerative Erkrankungen sowie chronisch entzündliche Störungen bei rheumatischer Arthritis. Sie sind wichtig für die Eigenschaften von Haut und Haaren und spielen eine Rolle bei der Zell-Matrix-Interaktion, Gewebeintegrität und Apoptose.

GP42 ist z.B. auch in der Lage, wie die TGasen, Proteine über Transglutaminase-Aktivität zu vernetzen.

Da es bis jetzt jedoch noch keine 3D-Struktur des GP42 gibt, und kaum Sequenzhomologie zu anderen Transglutaminasen vorhanden ist, bildet GP42 eine neuartige Gruppe innerhalb der TGase-Enzymklasse. Dies macht die Forschung an diesem Glykoprotein sehr interessant.

Für die GP42 TGase wurde das reaktive Cystein 290 identifiziert. Dem Charge-Transfer-Komplex gehört neben dem Cystein noch ein Histidin und ein Aspartat an. Die GP42 enthält jedoch sechs Histidine. GP42-Konstrukte mit einzelnen Aminosäureaustauschen wurden hergestellt. Jedes Histidin wurde gegen Alanin ausgetauscht. Alanin kann keine Wasserstoffbrückenbindungen wie das Histidin eingehen. Die Mutation, die das katalytische Histidin betrifft, sollte zum totalen Verlust der enzymatischen Aktivität führen. Eigentlich sollte gezeigt werden, ob sich ein reaktives Histidin identifizieren lässt.

Da jedoch keine His-Mutanten zur Verfügung standen, führten wir den Versuch nur mit dem Wildtyp (WT) und der negativen C290S-Kontrolle (Cystein290 durch Serin ersetzt) durch.

Um korrekt gefaltetes und gereiftes Protein zu erhalten, wurde GP42 aus *Pichia methanolica* exprimiert. Dieses rekombinante Protein besaß die gleiche Aktivität wie die TGase aus dem Kulturfiltrat von *Phytophthora sojae*.

2 DURCHFÜHRUNG

(i) Tag 1

Es wurden je 4 Klone von einer positiven (WT GP42) und einer negativen (C290S GP42) Kontrolle in 15 ml BMDY-Medium in einem 50 ml Falcon-Tube angeimpft und über Nacht kultiviert.

(ii) Tag 2: Induktion der Expression

Nach 23 h wurde die OD₆₀₀ gemessen (Tabelle 1). Dazu wurden 900 µl BMDY mit 100 µl Hefe-Übernachtskultur gemischt.

Tabelle 1: Ergebnisse der Extinktionsmessung der Über-Nacht-Kultur

Probe	OD₆₀₀
WT GP42-1	0.738
WT GP42-2	0.615
WT GP42-3	0.375
WT GP42-4	0.469
C290S GP42-1	0.443
C290S GP42-2	0.393
C290S GP42-3	0.470
C290S GP42-4	0.594

Die Idealwerte sollten zwischen 0.2 und 1.0 liegen. Die Übernachtskulturen wurden bei 1500 g und 20 °C 5 min lang herunterzentrifugiert und 3 ml des Überstandes in 15 ml Falcon-Röhren in flüssigem Stickstoff eingefroren, der restliche Überstand wurde verworfen. Die Hefen wurden in 5 ml BMMY-Medium resuspendiert und wieder geschüttelt.

(iii) Tag 3 und 4: 24h/48h-Probenentnahme

Von jeder Kultur wurden 500 µl entnommen, in 1.5 ml Eppendorfcups überführt, und bei 13200 rpm 2 min bei 20 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Zugabe von 500 µl 10x Methanol wurden die Hefen weiter kultiviert. Nach weiteren 24 h wurde diese Prozedur wiederholt.

(iv) Tag 5: Aufarbeitung des Kulturfiltrats

Nach insgesamt 72 h wurden die Hefen bei 5000 rpm 15 min bei 20 °C abzentrifugiert und je 2.5 ml des Überstands zur Entsalzung auf PD-10 Säulen aufgetragen, die zuvor mit 5 x 4 ml 5 mM Natriumacetat pH 5.2 äquilibriert wurden.

Nach Zugabe von 3.5 ml 5 mM Natriumacetat pH 5.2 wurde die Proteinprobe in 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt, und in flüssigem Stickstoff eingefroren und über das Wochenende gefriergetrocknet.

(v) Tag 7: TGase-Aktivitätsbestimmung

Die Enzymaktivität wurde mit dem in vitro-Assay nach Slaughter et al. (1992) bestimmt. Dieser macht sich die Aktivität der Transglutaminase zu Nutze um Biotin-markierte primäre Amine an Casein kovalent zu binden. Ein Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat bindet spezifisch an das gebundene Biotin. Alkalische Phosphatase setzt para-Nitrophenylphosphat zu para-Nitrophenol um. Dies führt zu einer Zunahme der Absorption bei 405 nm. Da die Aktivität der Phosphatase, und nicht direkt die Aktivität der Transglutaminase gemessen wird ist dieser Assay ein indirekter Enzymtest.

Die Reaktionszeit beträgt 1 h, und die spezifische Aktivität der GP42 und seiner Derivate lässt sich in mOD/min/μg darstellen.

2.B Protokoll des TGase-Enzymtests

Die Mikrotiterplatte wurde schon am Freitag mit N,N-di-Methylcasein beschichtet.

Die Proben in Reihe D jeder Platte wurde mit 5 μl 0,4mM Iodacetamid, das als Inhibitor speziell für Thiolgruppen fungiert, und den aktiven Cysteinrest acetyliert, für 15 – 30 min vorinkubiert.

Danach wurden 5 μl Enzym, bzw. Wasser als Negativkontrolle, zugegeben.

Die TGase-Reaktion wurde mit der Zugabe von 200 μl TGase-Substrat-Lösung gestartet. Die Reaktionsdauer betrug 1 h, und wurde durch 2maliges Waschen mit je 300 μl 200 mM EDTA pH 8, pro well gestoppt.

Danach wurde mit 300 μl 100 mM Tris pH 8.5 gewaschen.

Darauf folgte die Immunomarkierung mit 200 μl ID-Lösung pro well. Nach 1 h bei RT wurde wieder 2mal mit 300 μl 100 mM Tris pH 8.5 + 0.01% Triton X-100 und danach nochmals mit

300 µl 100 mM Tris pH 8.5 gewaschen um nicht gebundenes Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugate zu entfernen.

Im Anschluss an die Waschschrirte wurden 200µl pro well P-Lösung dazugegeben, und 2 h bei 405nm gemessen. In jede Reihe wurde eine andere TGase-Substrat-Lösung zugegeben:

A:

- 5 mM CaCl₂
- 10 mM DTT
- 0.5 mM 5-(Biotinamido)pentylamin (BAPA)
- 100 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5.2)
- H₂O dd

B:

- 5 mM MgCl₂
- 1 mM EGTA
- 10 mM DTT
- 0.5 mM BAPA
- 100 mM NaAc-Puffer
- H₂O dd

C:

- 5 mM CaCl₂
- 5 mM EDTA
- 10 mM DTT
- 0.5 mM BAPA
- 100 mM NaAc-Puffer
- H₂O dd

D:

- 5 mM CaCl₂
- Iodacetamid
- 10 mM DTT
- 0.5 mM BAPA
- 100 mM NaAc-Puffer
- H₂O dd

3 ERGEBNISSE

Das GP42 wurde in *Pichia methanolica* exprimiert. Dies ist zwar wesentlich ineffektiver, als z.B. die Expression in *Aspergillus oryzae*, liefert aber ausreichend Protein für die Aktivitätsstudien.

Hier wurde ein indirekter colorimetrischer Assay zur Bestimmung von TGase-Aktivität genutzt. Dieser Test ist äußerst sensitiv, Enzymmengen im ng-Bereich können detektiert werden und durch die Verwendung von mit N,N-Di-methylcasein beschichteten Microtiterplatten ist ein hoher Durchsatz möglich.

Die verschiedenen Substratlösungen induzieren eine unterschiedliche Zunahme der OD bei 405nm.

Da GP42 eine Ca-abhängige Transglutaminase ist, sollte man mit Lösung A die höchste Aktivität messen. Hier sind keine störenden Faktoren beigemischt.

In Lösung B wurden Ca^{2+} gegen Mg^{2+} ausgetauscht, und EGTA, welches ein spezifischer Ca-Ionenfänger ist, eingesetzt. Diese beiden Faktoren sollten zu einem Rückgang der Enzymaktivität führen.

In Lösung C wurde EDTA anstelle von EGTA eingesetzt. EDTA bindet Metallionen viel stärker als EGTA. Darum erwartet man hier keine TGase-Aktivität.

Lösung D wurde Iodacetamid als spezifischer Inhibitor für Thiolgruppen zugesetzt. Auch hier wird keine TGase-Aktivität erwartet, weil das Iodacetamid das Cystein acetyliert.

Beispielhaft werden hier nur die Steigungen der 1. Mikrotiterplatte dargestellt:

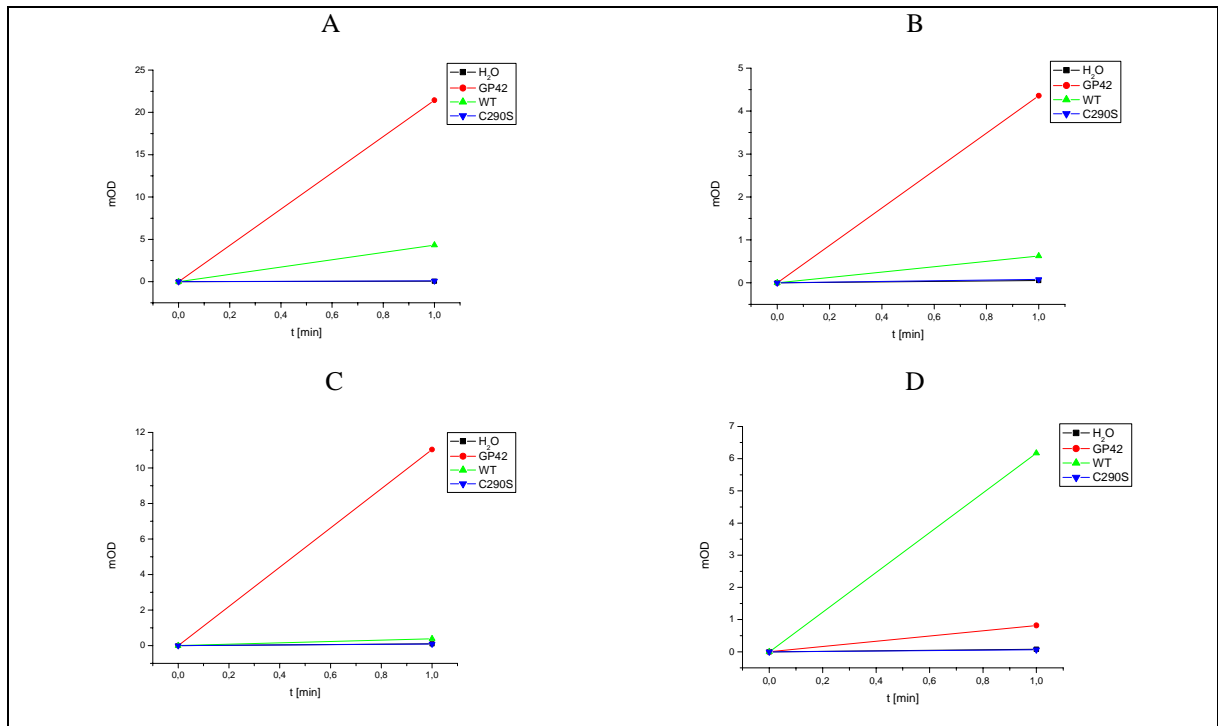
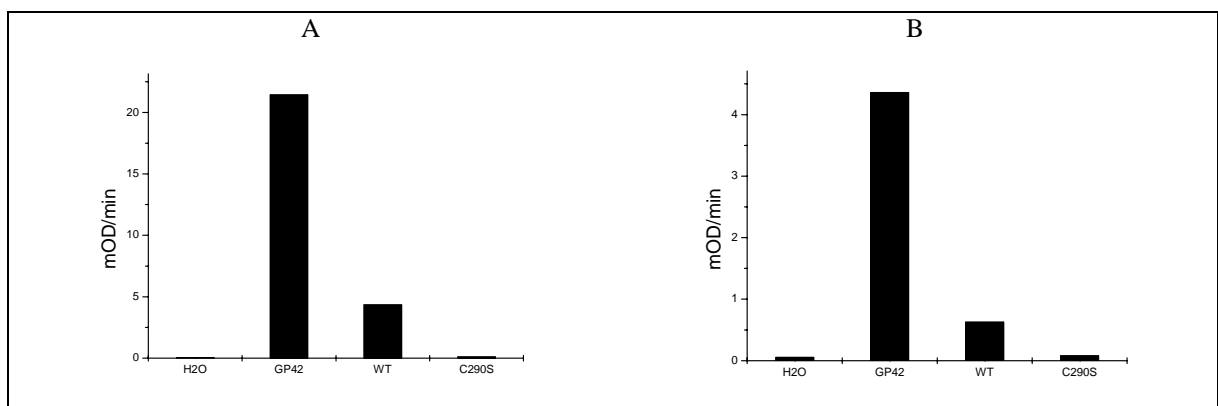


Abb.3.1. Absorptions/Zeit-Diagramm der spezifischen TGase-Aktivität des rekombinanten GP42. Es ist dargestellt die Aktivität der negativen H₂O-Probe (schwarzer Graph), des gereinigten GP42 (roter Graph), des Wildtypproteins (grüner Graph) und der C290S-Mutante (blauer Graph) in den jeweiligen Lösungen A-D. Die Umsetzung der Phosphatase-Substrate wurde bei 405nm über 2h vermessen. Im Diagramm ist die erste Minute der Messung angezeigt. Die Werte sind Ergebnisse von Doppelbestimmungen.

In mOD/min ergeben sich folgende Säulen-Diagramme.



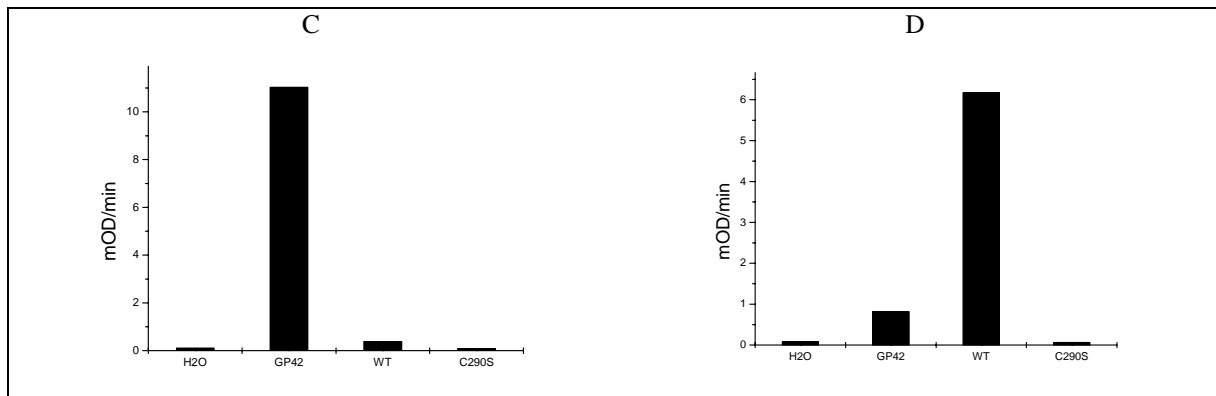


Abb.3.2: Vergleich der verschiedenen Substratlösungen A-D mit den jeweiligen Enzymen. Die spezifische TGase-Aktivität der verschiedenen Enzymproben in den verschiedenen Substratlösungen A-D wurden im colorimetrischen Mikrotiterassay nach Slaughter *et al.*,(1992) gemessen. Die Werte sind Ergebnisse von Doppelbestimmungen.

Betrachtet man nun die verschiedenen Enzyme gegenüber den verschiedenen Substratlösungen erhält man folgende Diagramme.

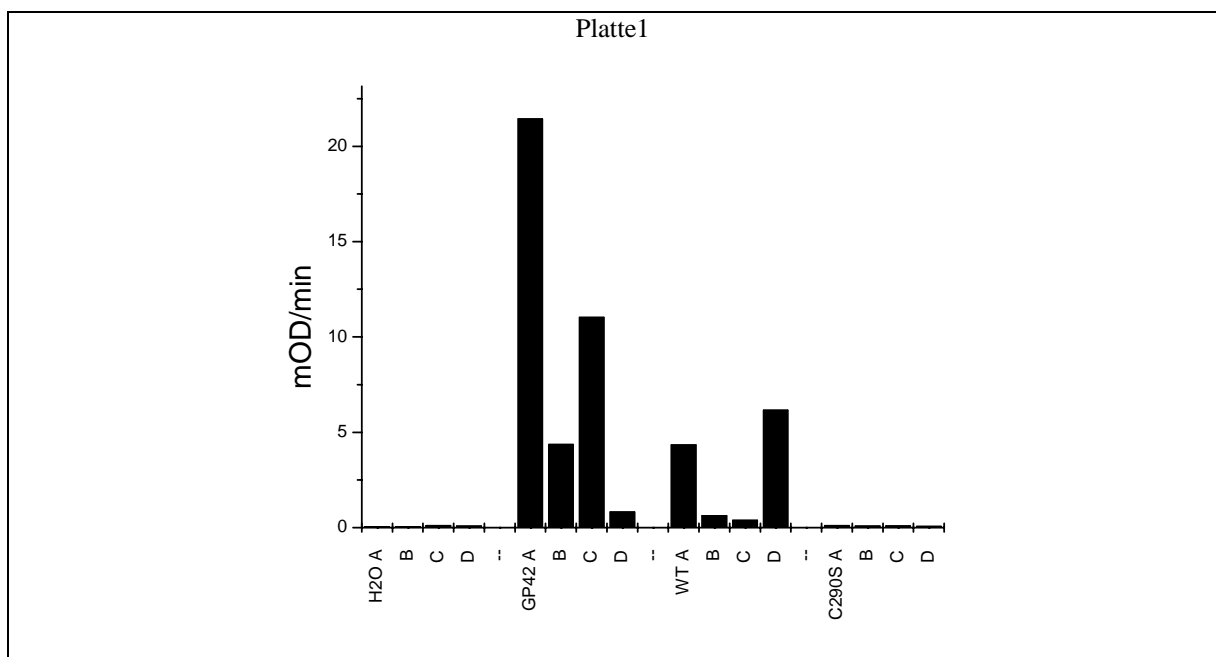


Abb.3.3: Auftragung aller Proben gegen mOD/min. Die TGase-Aktivität aller Enzymproben (H₂O, GP42, WT und C290S) in allen Substratlösungen A-D im direkten Vergleich gegen mOD/min. Alle Werte sind Ergebnisse von Doppelbestimmungen gemessen nach Slaughter *et al.* (1992) bei 405nm.

Die Aktivität des WT gegenüber dem gereinigten GP42 ist sehr viel geringer. In C erhält man für GP42 untypische Werte, da hier die Aktivität viel niedriger als in B sein müsste, wegen der höheren Affinität des EDTA zu Metallionen gegenüber dem, nur für Ca²⁺-Ionen

spezifischen, EGTA. In D erhält man untypische Werte für den WT, da hier die Anwesenheit des Inhibitor Iodacetamid die TGase-Aktivität sehr viel stärker hemmen müsste.

Zum Vergleich Platte 2:

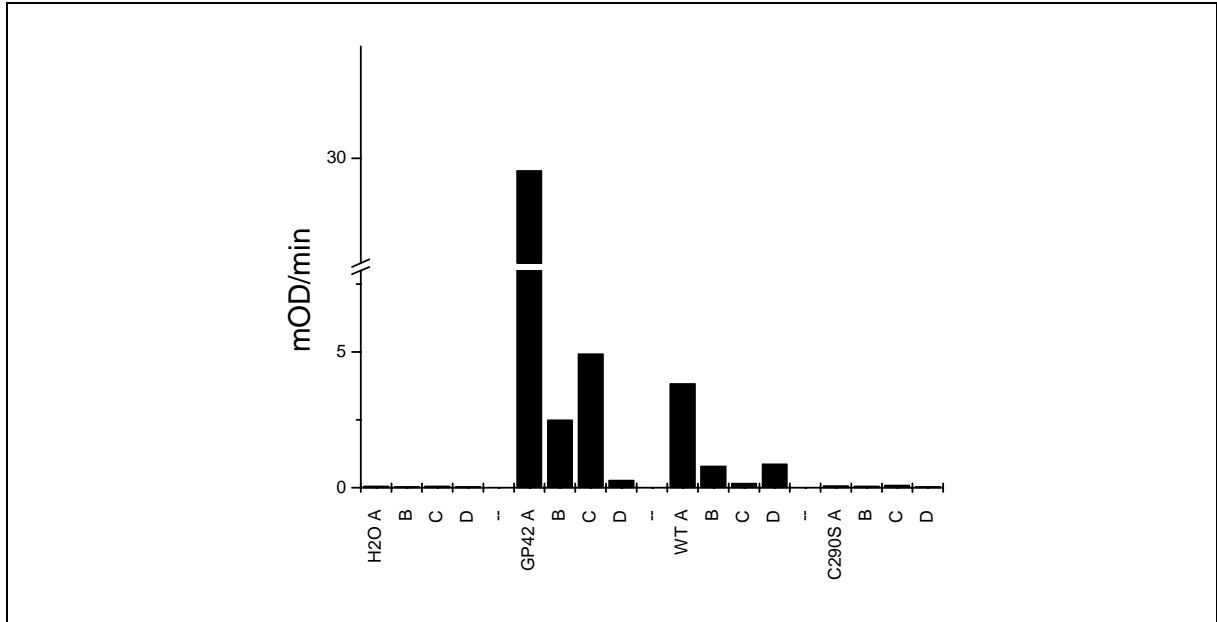


Abb.3.4: Auftragung aller Proben gegen mOD/min der zweiten Platte .Die TGase-Aktivität aller Enzymproben (H₂O, GP42, WT und C290S) in allen Substratlösungen A-D im direkten Vergleich gegen mOD/min. Alle Werte sind Ergebnisse von Doppelbestimmungen gemessen nach Slaughter *et al.* (1992) bei 405nm.

Nun kann man die GP42-Proben gegen mOD/min/ μ g auftragen:

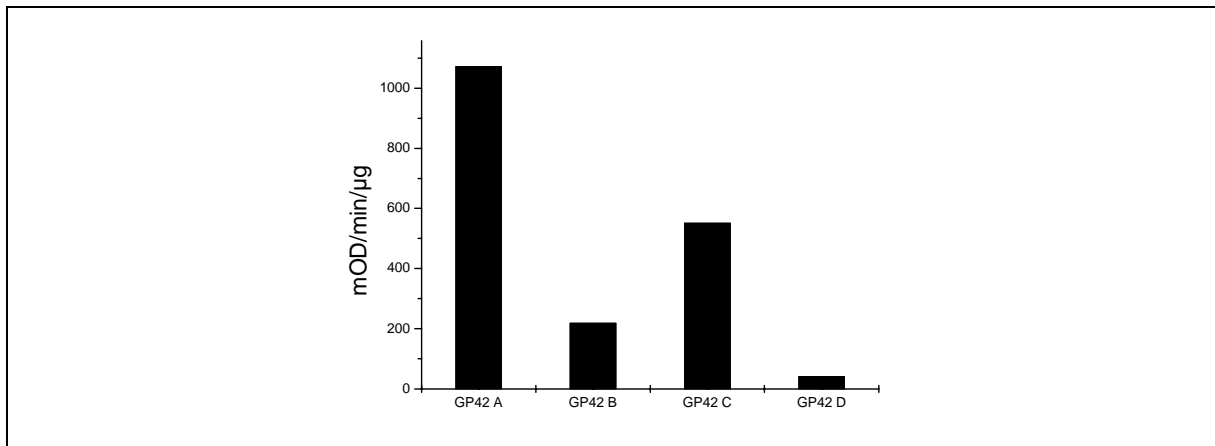


Abb.3.5. TGase-Aktivität des gereinigten GP42. Die spezifische TGase-Aktivität wurde im colorimetrischen Mikrotiterassay nach Slaughter *et al.*, (1992) gemessen. Es wurden 20 ng gereinigtes GP42 aufgetragen und auf mOD/min/ μ g extrapoliert. Die Werte sind Ergebnisse von Doppelbestimmungen mit den jeweiligen Substratlösungen A-D.

Die mit Lösung A versetzten Proben besitzen die höchste TGase-Aktivität. Bei dem gereinigten GP42 erhält man in Lösung A eine mOD/min/ μ g von 1072, in Lösung B 218, was einer Aktivität von 20,3% entspricht.

In Lösung C, 552. Dies entspricht 51,5% der Aktivität unter optimalen Bedingungen.

Dieser Wert sollte jedoch deutlich niedriger sein, da hier EDTA eingesetzt wurde.

In Lösung D, mit dem Inhibitor, 41, also 3,8%.

Nimmt man die GP42-Werte als 100%-Werte, erhält man für die TGase-Konzentrationen des WT folgende Werte:

Lösung	GP42 [ng]
A	4,04
B	2,87
C	0,7
D	150,46

4 DISKUSSION

Durch die Zugabe der Substratlösungen erwartete man eine schrittweise Abnahme der TGase-Aktivität von Lösung A zu Lösung D für die Proben mit gereinigtem GP42 und dem WT-Produkt. Mit jeder Substratlösung nimmt die Stärke der Hemmung, durch Austausch von Ca^{2+} durch Mg^{2+} und Zugabe von EGTA in Lösung B, Zugabe von EDTA in Lösung C und schliesslich Zugabe von Iodacetamid in Lösung D, zu.

Bei der Wasser-Probe durfte man ebenfalls keine Aktivität erwarten, da hier kein Enzym enthalten ist.

Ebenso sollte die C290S-Probe keine TGase-Aktivität aufweisen, da ohne das katalytische Cystein keine Enzymaktivität vorhanden ist.

Wie erwartet zeigt die C290S-Mutante keine TGase-Aktivität mit keiner Substratlösung.

Dies bestätigt, daß das C290 die Funktion des katalytischen Cysteins inne hat.

Auch zeigt das gereinigte GP42-Enzym die höchste Aktivität mit jeder Substratlösung.

Einzige Ausnahme ist Substratlösung D mit dem Inhibitor. Hier zeigt der Wildtyp jeweils eine viel stärkere Aktivität. Dies lässt darauf schließen, dass im WT-Produkt noch viele andere Proteine mit enthalten sind, und dafür die Konzentration des Iodacetamids zur Hemmung zu niedrig gewählt wurde.

Auch erstaunlich ist, dass bei Lösung C (mit EDTA) die Aktivität des gereinigten GP42 jeweils höher liegt als dies bei Lösung B der Fall ist. Eigentlich sollte es umgekehrt sein.

Dieses Ergebnis kann an Pipettierfehlern oder Fehlern bei der Verdünnung der eingesetzten Lösung, insbesondere des EDTA, liegen.

Die Wildtypreihe zeigt gute Werte für die Lösungen A, B und C. Die Aktivität nimmt mit jeder Lösung ab.

In Lösung D müsste jedoch eine sehr viel grössere Menge an GP42 enthalten sein, als in den restlichen WT-wells. Dieser Werte lässt sich wohl eher darauf zurückführen, dass hier das Iodacetamid vergessen wurde.

Um die Proteinmenge der C290S-Mutante angeben zu können, hätte man einen Western-Blot durchführen müssen.

Zur Auswertung wurde nur die erste Platte benutzt, da die Werte schon bei der nächsten Messung der 2. Platte, nach ca. 2 Stunden, stark abnahmen.

Zum eigentlichen Ziel dieses Versuches, der Identifizierung des reaktiven Histidins, ist zu sagen, dass durch den nukleophilen Angriff des katalytischen Histidins auf das katalytische Cystein, das Cystein hoch reaktiv wird. Grenzstruktur ist ein Thiol-Imidazolium-Ionenpaar, welches durch eine Wasserstoffbrückenbindung aus dem katalytischen Aspartat stabilisiert wird. Die drei Aminosäuren verbinden sich über H-Brückenbindungen zu einem Ionenrelais, wobei das Cystein eine negative Partialladung erhält. Das Histidin ist essentiell bei der Aktivierung des Cysteins.

Durch den Austausch des Histidin durch Alanin fehlt die aktivierende Wirkung auf das katalytische Cystein.

Beim Austausch des H291 geht die Enzymaktivität zwar um 94% zurück, die direkte Nachbarschaft zum C290 schliesst jedoch aus, dass es zur katalytischen Triade gehört.

Die H194A-Mutation zeigt noch über 20% Restaktivität gegenüber dem WT. Daher lässt auch sie sich ausschliessen.

Bei der H491A-Mutante wurde zwar ein vollständiges Fehlen der TGase-Aktivität entdeckt, diese wird aber wohl eher der gestörten Proteinstabilität zugeordnet, da sie wie die Histidine H309 und H354 direkt neben einer geladenen Aminosäure liegen, und somit deren Sequenz eher etwas mit den Proteasen gemein hat. Vollständig auszuschliessen ist es jedoch nicht.

Eine Beteiligung des H354 an der katalytischen Triade der GP42 ist dagegen auszuschliessen, da dieses Derivat sogar eine höhere Aktivität als der WT aufweist.

Da das H309 nicht unter den GP42-Homologen konserviert ist, ist auch dessen Beteiligung an der Triade unwahrscheinlich.

Somit bleiben die beiden Histidine H368, weil es nicht exprimiert wurde, und das H491, weil es keine Restaktivität verzeichnete noch im Rennen und es bedarf weiteren Untersuchungen zur Identifizierung des katalytischen Histidins der GP42.