

Université de Montréal

**Expression et étude mécanistique et d'inhibition de la transglutaminase et de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase**

Par  
Dany Halim

Département de Chimie  
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
En vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.) en Chimie

Décembre 2006



© Dany Halim, 2006

①  
3

U54  
2007  
V.019



**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Expression et étude mécanistique et d'inhibition de la transglutaminase et de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase**

Présenté par :  
Dany Halim

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Joelle Pelletier (F.A.S. - Chimie)

Présidente-Rapporteuse

Jeffrey W. Keillor (F.A.S. - Chimie)

Directeur de recherche

William D. Lubell (F.A.S. - Chimie)

Membre du jury

Mémoire accepté le : .....

## SOMMAIRE

Les aminoacyltransférases sont une catégorie d'enzyme jouant plusieurs rôles physiologiques importants. La transglutaminase tissulaire (E.C. 2.3.2.13), faisant partie de cette grande famille, catalyse la formation de liens isopeptidiques entre une glutamine et une lysine peptidiques ou protéiques. Une activité mal contrôlée de l'enzyme peut entraîner des maladies neurodégénératives et immunitaires chez l'être vivant.

Dans cette optique, deux séries d'inhibiteurs irréversibles potentiels ont d'abord été synthétisées. Les squelettes de la première et de la deuxième série sont respectivement Cbz-X-Gly-OMe et Cbz-X-OBz, où X est un acide aminé comprenant un groupement maléimide sur une chaîne latérale de 2 à 4 carbones. Les rendements globaux de synthèse sont d'environ 10 % pour chacun de ces composés. Les tests d'inhibition envers la transglutaminase ont dévoilé que leur valeur de  $k_{inact}/K_I$  était  $10^3$ - $10^4$  fois plus faible que ceux rapportés par d'autres inhibiteurs synthétiques antérieurs. Ainsi, les dérivés maléimides ne sont pas un bon choix pour inhiber la transglutaminase.

La transglutaminase recombinante de foie de cobaye est le modèle couramment utilisé pour l'étude de l'enzyme humaine puisque qu'elles ont 80 % d'homologie. Or, une deuxième partie de mon projet fut d'exprimer la transglutaminase tissulaire humaine soluble afin que notre groupe puisse l'étudier davantage. Plusieurs systèmes d'expression furent tentés et plusieurs paramètres d'expression furent variés. Malgré tous ces tests, soit que l'enzyme n'était pas exprimée, soit qu'elle précipitait.

La  $\gamma$ glutamyltranspeptidase (E.C.2.3.2.2) est un autre exemple d'aminotransférase, celle-ci catalysant le transfert le résidu  $\gamma$ -glutamyle provenant du glutathion à un accepteur de type acide aminé ou peptide. Le nucléophile de l'enzyme humaine est encore inconnu. L'enzyme humaine recombinante a été incubée en présence d'un inhibiteur irréversible, l'acide 2-amino-4-[mono(4-cyanophényl)phosphono]butanoïque. Des études de spectroscopie de masse ont démontré que la masse de la petite sous-unité de la protéine augmente spécifiquement de 165 Da. Plus précisément, des études de nanoLCMS-MS ont démontré, pour la première fois, que le résidu Thr381 est le nucléophile de l'enzyme.

**Mots clés :** aminoacyltransférase, transglutaminase, inhibition, cinétique, spectrophotométrie, expression,  $\gamma$ glutamyltranspeptidase, spectroscopie de masse, nucléophile catalytique.

## ABSTRACT

Aminoacyltransferases are a category of enzymes that play important physiological roles. Tissue transglutaminase (E.C. 2.3.2.13), a member of this family, catalyses the formation of isopeptidic bonds between a glutamine and a lysine of peptides or proteins. However, it can also be involved in many human physiological disorders.

Along this line, two series of potential inhibitors were synthesized. The backbone of the first and the second series were Cbz-X-Gly-OMe and Cbz-X-OBz respectively, where X is an amino acid containing a maleimide group on a side chain of 2 to 4 carbons. The overall yields of these syntheses were about 10 %. Inhibition tests against transglutaminase revealed their  $k_{\text{inact}}/K_I$  values to be about  $10^3$ - $10^4$  times lower than previous irreversible inhibitors. The maleimide group doesn't seem to be a good choice of electrophile to react with transglutaminase.

Recombinant guinea pig transglutaminase is currently utilized as a model of the human enzyme because of their 80 % sequence homology. A second part of my project was to express soluble human tissue transglutaminase to facilitate the study of this enzyme. Many expression systems were attempted and many expression parameters were varied, but either the protein was not expressed, or it precipitated.

$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase is another example of an aminoacyltransferase. This one catalyses the transfer of a  $\gamma$ -glutamyl group from a molecule of glutathione to an acceptor such as an amino acid or a peptide. The nucleophile of this enzyme is not yet known. The human recombinant enzyme was incubated with an irreversible inhibitor, the 2-amino-4-[mono(4-cyanophenyl)phosphono]butanoic acid. Mass spectroscopy demonstrated that specifically the small subunit increased by 165 Da. More precisely, nanoLCMS-MS demonstrated, for the first time, that Thr381 is the catalytic nucleophile of this enzyme.

**Key words :** aminoacyltransferase, transglutaminase, inhibition, kinetics, spectrophotometry, expression,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, mass spectroscopy, catalytic nucleophile.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>xi</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 : GÉNÉRALITÉS SUR LES AMINOACYLTRANSFÉRASES .....	1
1.2 : LES TRANSGLUTAMINASES .....	3
1.2.1 : Réactions générales catalysées.....	3
1.2.2 : Les différents types de transglutaminases .....	4
1.2.3 : La transglutaminase tissulaire .....	5
1.2.4 : Rôles et désordres physiologiques de la transglutaminase tissulaire .....	7
1.2.5 : Mécanisme catalytique .....	10
1.2.6 : Expression et purification de la transglutaminase tissulaire .....	11
1.3 : LA $\gamma$ GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE .....	13
1.3.1 : Réactions générales catalysées.....	13
1.3.2 : Rôles et désordres physiologiques de la GGT et de la régulation du glutathion .....	14
1.3.3 : Structure de la GGT.....	17
1.3.4 : Mécanisme catalytique .....	19
1.3.5 : Expression et purification de la GGT.....	22
1.4 : LES OBJECTIFS DU PROJET .....	23
1.4.1 : Synthèse et évaluation d'inhibiteurs de la transglutaminase tissulaire .....	23
1.4.2 : Expression de la transglutaminase tissulaire humaine .....	23
1.4.3 : Identification du résidu catalytique de la $\gamma$ -glutamyltranspeptidase.....	23

<b>CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION D'INHIBITEURS IRRÉVERSIBLES DE LA TRANSGLUTAMINASE TISSULAIRE .....</b>	<b>24</b>
2.1 : IMPORTANCE DES INHIBITEURS IRRÉVERSIBLES.....	24
2.2 : CONCEPTION DES INHIBITEURS IRRÉVERSIBLES .....	26
2.2.1 : Réactivité de la transglutaminase.....	27
2.2.2 : Affinité de la transglutaminase .....	28
2.3 : SUIVI DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE .....	31
2.4 : TEST D'INHIBITION .....	34
2.5 : DISCUSSION.....	41
2.6 : RÔLE DE L'EDTA LORS DES TESTS CINÉTIQUES .....	42
2.7 : LIAISON DE L'INHIBITEUR IRRÉVERSIBLE AU SITE ACTIF DE L'ENZYME .....	43
2.8 : CONCLUSION .....	45
<b>CHAPITRE 3 : BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET EXPRESSION DE LA TRANSGLUTAMINASE TISSULAIRE HUMAINE .....</b>	<b>47</b>
3.1 : INTRODUCTION.....	47
3.2 : LES PROCESSUS DE SOUS-CLONAGE ET D'EXPRESSION PROTÉIQUE .....	48
3.3 : ESSAIS D'EXPRESSION DE LA HTGASE.....	51
3.3.1 : Expression dans BL21(DE3)- pJLP4.....	51
3.3.2 : Sous-clonage et expression dans XL-1-pDnaKJ-pQE32-HTG.....	55
3.3.3 : Expression dans BL21(DE3)-pET30-Ek/LIC-HTG .....	59
3.4 : DISCUSSION.....	60
3.5 : CONCLUSION.....	63
3.6 : PERSPECTIVES .....	64



<b>CHAPITRE 4 : IDENTIFICATION DU NUCLÉOPHILE DE LA</b>	
<b><math>\gamma</math>GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE HUMAINE .....</b>	<b>67</b>
4.1 : INTRODUCTION.....	67
4.2 : EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA HGGT .....	67
4.2.1 : Dernière étape de la purification : la désalinisation.....	70
4.3 : ÉTUDE PAR LCMS (ESI-MSD-TOF) .....	72
4.4 : ÉTUDE PAR LCMS-MS .....	76
4.5 : CONCLUSION .....	80
<b>CHAPITRE 5 : CONCLUSION .....</b>	<b>81</b>
<b>CHAPITRE 6 : PARTIE EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>83</b>
6.1 : PARTIE EXPÉRIMENTALE DE LA SYNTHÈSE ORGANIQUE.....	83
6.1.1 : Matériels .....	83
6.1.2 : Procédures générales de synthèse .....	84
6.2 : PARTIE EXPÉRIMENTALE DE L'ÉTUDE ENZYMOLOGIQUE SUR LA TGASE .....	91
6.2.1 : Matériel.....	91
6.2.2 : Test AL-5.....	91
6.2.3 : Test d'inhibition.....	92
6.2.4 : Détermination des paramètres cinétiques d'inhibition .....	93
6.2.5 : Détermination de l'importance de l'EDTA lors d'un test d'activité de la TGase recombinante .....	94
6.2.6 : Vérification de la liaison des inhibiteurs de type maléimide au site actif de la TGase .....	95

6.3 : PARTIE EXPÉRIMENTALE DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET DE L'EXPRESSION DE LA TGASE .....	96
6.3.1 : <i>Matériel</i> .....	96
6.3.2 : <i>Biologie moléculaire; Sous-clonage</i> .....	96
6.3.2.1 : Mini-prep .....	96
6.3.2.2 : Amplification par PCR (avec gradient de température d'hybridation). 96	
6.3.2.3 : Précipitation d'ADN au <i>n</i> -butanol .....	97
6.3.2.4 : Digestion par enzymes de restriction (exemple avec <i>EcoRI</i> et <i>SalI</i> )....	97
6.3.2.5 : Purification par QIAEX .....	97
6.3.2.6 : Ligaturation.....	97
6.3.2.7 : Préparation de cellules compétentes .....	98
6.3.2.8 : Transformation chimique.....	98
6.3.3 : <i>Expression de la transglutaminase tissulaire de foie de cobaye</i> .....	99
6.3.4 : <i>Expression de la TGase humaine</i> .....	99
6.4 : PARTIE EXPÉRIMENTALE DE L'ÉTUDE SUR LA HGGT.....	100
6.4.1 : <i>Matériel</i> .....	100
6.4.2 : <i>Expression et purification de la hGGT</i> .....	100
6.4.3 : <i>Spectroscopie de masse par LCMS</i> .....	104
6.4.4 : <i>Spectroscopie de masse LCMS-MS</i> .....	105

## **ANNEXE 1 : CARACTÉRISATION DES PRODUITS CHIMIQUES**

<b>SYNTHÉTIQUES .....</b>	<b>107</b>
---------------------------	------------

<b>ANNEXE 2 : PUBLICATION .....</b>	<b>122</b>
-------------------------------------	------------

<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>123</b>
------------------------	------------

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1 :</b> Schéma général simplifié de l'élongation de la chaîne peptidique lors de la traduction effectuée dans un ribosome (spécifiquement dans les sites A et P) où on y présente la réaction d'élongation catalysée par la peptidyltransférase et de translocation par l'aminocyltransférase II. ....	1
<b>Figure 1.2 :</b> Structure schématique d'un peptidoglycane où il est indiqué la position du pont pentaglycine. ....	2
<b>Figure 1.3 :</b> Réaction de transamidation catalysée par la TGase, où il y a formation d'un lien isopeptidique entre un résidu glutamine et lysine. ....	3
<b>Figure 1.4 :</b> Réaction d'hydrolyse catalysée par la TGase. ....	4
<b>Figure 1.5 :</b> Structure cristalline de transglutaminase tissulaire de la dorade japonaise. <sup>24</sup> ....	6
<b>Figure 1.6 :</b> Mécanisme catalytique de la TGase. ....	10
<b>Figure 1.7 :</b> Exemples de réactions catalysées par la GGT. ....	13
<b>Figure 1.8 :</b> Synthèse du glutathion en tant qu'élément du cycle $\gamma$ -glutamyle du métabolisme du glutathion. ....	14
<b>Figure 1.9 :</b> Rôles du glutathion. ....	16
<b>Figure 1.10 :</b> Structure cristalline de la GGT bactérienne. <sup>67</sup> ....	18
<b>Figure 1.11 :</b> Structure chimique de deux inhibiteurs irréversibles de la GGT ....	19
<b>Figure 1.12 :</b> Mécanisme catalytique de la GGT ....	20
<b>Figure 1.13 :</b> Structure du site de liaison du substrat de la GGT bactérienne. <sup>67</sup> ....	21
<b>Figure 2.1 :</b> (G) Détection de la protéine chimère NOSs-RFP (Red Fluorescent Protein) dans des cellules HEK293T, correspondant au contrôle négatif. (H) Détection de NOSs après incubation des cellules HEK293T avec l'inhibiteur irréversible fluorescent. ....	24
<b>Figure 2.2 :</b> (A) Structure du substrat de l' $\alpha$ -glucosidase, un oligosaccharide $\alpha$ -lié et (B) d'un inhibiteur irréversible, le 5-fluoro- $\alpha$ -D-glucose. ....	25
<b>Figure 2.3 :</b> Structure de EKB-569, inhibiteur de EGFR. ....	25
<b>Figure 2.4 :</b> Réaction enzymatique entre le groupement thiolate du site actif de l'enzyme et l'accepteur de Michael de type amide $\alpha,\beta$ -insaturé. ....	27
<b>Figure 2.5 :</b> Réaction enzymatique entre le groupement thiolate du site actif de l'enzyme et le dérivé maléimide. ....	27

<b>Figure 2.6 :</b> A) Structure de $N^{\alpha}$ -carbobenzyloxy-L-glutaminy-L-glycine (CBz-Gln-Gly) B) de $N^{\alpha}$ -Carbobenzyloxy-L-2-amino-(3-acryloylamino)propionylglycine C) de $N^{\alpha}$ -carbobenzyloxy-L-2,4-diamino- $N^{\beta}$ -maléimido-propionylglycine méthylester (pour n=2).....	29
<b>Figure 2.7 :</b> Structure de $N^{\alpha}$ -carbobenzyloxy-L-2,5-diamino- $N^{\beta}$ -maléimidopropionyle benzyloxyester (pour n=2).....	30
<b>Figure 2.8 :</b> Test à l'hydroxamate.....	31
<b>Figure 2.9 :</b> Test au DMPDA.....	32
<b>Figure 2.10 :</b> Test au GDH.....	33
<b>Figure 2.11 :</b> Suivi de l'activité de la TGase par l'hydrolyse enzymatique de AL-5 .....	34
<b>Figure 2.12 :</b> (A) Représentation schématique d'une inhibition irréversible où il y a compétition entre le substrat S et l'inhibiteur I pour le site actif de l'enzyme E. (B) Détection du p-nitrophénolate par spectrophotométrie UV-Vis.....	35
<b>Figure 2.13 :</b> Courbe théorique de saturation d'un inhibiteur où il est indiqué la portion linéaire de la courbe qui est obtenue expérimentalement pour tous les inhibiteurs testés. ....	36
<b>Figure 2.14 :</b> (A) Représentation schématique d'une inhibition irréversible où il n'y a aucun substrat venant en compétition avec l'inhibiteur I pour le site actif de l'enzyme E. (B) Diminution de l'activité résiduelle (pente initiale) de la TGase en fonction du temps d'incubation (pour 1, 5 et 7 minutes) avec 25 $\mu$ M de l'inhibiteur 4e. (C) Valeurs des pentes initiales (activités résiduelles) de la TGase incubée pendant 0, 1, 5 et 7 minutes en présence de 25 $\mu$ M du composé 4e. ....	37
<b>Figure 2.15 :</b> Activité résiduelle (vitesse initiale) de la TGase en fonction du temps d'incubation en présence de 1200 $\mu$ M du composé 2e, courbe permettant de calculer le $k_{obs}$ d'inactivation, pour chaque concentration d'inhibiteur. ....	38
<b>Figure 2.16 :</b> $k_{obs}$ en fonction de la concentration d'inhibiteur, donnant la portion linéaire de la courbe de saturation, dans le cas du composé 4e. ....	39
<b>Figure 2.17 :</b> Test enzymatique de la TGase hydrolysant le substrat AL-5, avec 0, 0.1, 0.5 et 1 mM d'EDTA présent dans le milieu réactionnel. ....	43
<b>Figure 2.18 :</b> A) Activité résiduelle de la TGase suite à une incubation de l'enzyme avec l'inhibiteur 2e ou avec l'inhibiteur 2e et 4 $K_M$ de ZQG. B) Vitesses initiales rapportées. ....	44
<b>Figure 3.1 :</b> Formation des bouts collants. Exemple de digestion par <i>EcoRI</i> , qui reconnaît spécifiquement la séquence 5' GAATTC 3'.....	49
<b>Figure 3.2 :</b> Processus général du sous-clonage.....	49
<b>Figure 3.3 :</b> Structure du galactose comparativement à son analogue synthétique, l'IPTG. ....	50
<b>Figure 3.4 :</b> Processus général d'expression. ....	51

<b>Figure 3.5 :</b> SDS-PAGE obtenu lors de la vérification de l'expression de hTGase dans le système bactérien BL21(DE3)-pJLP4 .....	53
<b>Figure 3.6 :</b> A) Séquence des amorces utilisées pour l'amplification de hTGase. B) Amplification de hTGase par PCR selon 5 températures d'hybridation.....	55
<b>Figure 3.7 :</b> Purification de la hTGase amplifié et digéré et de pQE32 linéaire.....	56
<b>Figure 3.8 :</b> Vérification de la présence du gène de la hTGase pour 11 colonies à l'intérieur de pQE32 par digestion avec <i>NdeI</i> et <i>EcoRV</i> .....	57
<b>Figure 3.9 :</b> XL1-pDnaKJ-pQE32-HTG .....	58
<b>Figure 3.10:</b> SDS-PAGE typique obtenu lors de la vérification de l'expression de hTG dans le système bactérien BL21(DE3)-pET30-Ek/LIC-HTG .....	59
<b>Figure 3.11 :</b> Croissance des bactéries dans un milieu de culture.....	62
<b>Figure 3.12 :</b> Deux mutations retrouvées dans la séquence du gène de la hTGase de pJLP4. ...	63
<b>Figure 3.13 :</b> Mutation d'un nucléotide du gène codant pour la $\beta$ -globine provoquant l'anémie falciforme.....	64
<b>Figure 4.1 :</b> Schéma général de l'expression et purification de la hGGT .....	68
<b>Figure 4.2 :</b> Coloration au nitrate d'argent d'un gel SDS-PAGE montrant la fraction purifiée de la hGGT et où on remarque la présence des deux sous-unités de l'enzyme. ....	69
<b>Figure 4.3 :</b> Test d'activité enzymatique de la hGGT .....	71
<b>Figure 4.4 :</b> Séquence de la GGT humaine recombinante .....	72
<b>Figure 4.5 :</b> A) Glycosylation de type « Riche en mannoses » sur un résidu Asn B) Maturation des saccharides riche en mannoses .....	73
<b>Figure 4.6 :</b> Spectre de masse totale de la (A) petite sous-unité et de la (B) grande sous-unité de la GGT humaine recombinante.....	74
<b>Figure 4.7 :</b> Structure de l'inhibiteur irréversible utilisé avant et après réaction.....	75
<b>Figure 4.8 :</b> Spectre de masse totale de la petite sous-unité de la GGT humaine recombinante inhibée par l'acide 2-amino-4-[mono(4-cyanophényl)phosphono]butanoïque.....	76
<b>Figure 4.9 :</b> Séquence du fragment tryptique N-terminal de la petite sous-unité de la hGGT, dont sa masse est augmentée de 165 Da en présence d'inhibiteur.....	77
<b>Figure 4.10 :</b> Analyse de la nanoLCMS-MS des peptides tryptiques de la hGGT .....	79
<b>Figure 6.1 :</b> Préparation des solutions d'incubation et de test d'activité résiduelle lors des tests d'inhibition.....	93

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I :</b> Paramètres cinétiques de trois séries d'inhibiteurs de la TGase développées dans le groupe. ....	26
<b>Tableau II :</b> Paramètres cinétiques déterminés pour l'inhibition de la TGase tissulaire. ....	40
<b>Tableau III :</b> Rendement et activité spécifique de la hTGase exprimé selon différents systèmes. ....	51
<b>Tableau IV :</b> Activités spécifiques obtenues dans le surnageant de lyse de BL21(DE3) et BL21(DE3)-pJLP4, toutes deux incubées en présence de 1 mM d'IPTG. ....	53
<b>Tableau V :</b> Expression dans BL21(DE3) pJLP4. ....	54
<b>Tableau VI :</b> Expression dans XL-1 pDnaKJ pQE32-HTG. ....	58
<b>Tableau VII :</b> Expression dans BL21(DE3) pET30-Ek/LIC-HTG. ....	60
<b>Tableau VIII :</b> Masse, activité et activité spécifique de la hGGT recombinante suite à chaque étape de purification de 300 mL de culture de <i>Pichia pastoris</i> . ....	69
<b>Tableau IX :</b> Volume de chacun des constituants de la solution tampon AL-5 pour les différentes concentrations en EDTA. ....	94
<b>Tableau X :</b> Volume de chacun des constituants de la solution d'incubation avec ou sans substrat donneur ZQG. ....	95

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BMGY	« Buffered glycerol-complex Medium »
BMMY	« Buffered methanol-complex Medium »
BOC	Groupement protecteur <i>tert</i> -butoxycarbonyle
Cbz	Carbobenzyloxy
CCM	Chromatographie sur couche mince
COS	Cellules de singe modifiées par le virus SV40
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DIC	Diisopropylcarbodiimide
DIEA	Diisopropyléthylamine
D.O. <sub>600 nm</sub>	Densité optique à 600 nm
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMPDA	<i>N,N</i> -diméthylaminopyridine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDC	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR	Récepteur de facteur de croissance de l'épiderme
ESI-MSD-Tof	« Electrospray Ionisation-Mass Spectra Data-Time of flight »
femABX	Famille des peptidyltransférases
GDH	Glutamate déshydrogénase
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
GGT	$\gamma$ glutamyltranspeptidase

GTP	Guanosine triphosphate
HBTU	Hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
hGGT	$\gamma$ glutamyltranspeptidase humaine
HO-Bt	Benzotriazole
HTG	Transglutaminase humaine
HTGase	Transglutaminase humaine
IPTG	Isopropylthiogalactoside
I.R.I.C.	Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie
$K_i$	Constante d'inhibition irréversible
$k_{inact}$	Constante de vitesse d'inactivation
$K_M$	Constante de Michaelis
$k_{obs}$	Constante observée expérimentalement
LCMS	« Liquid Chromatography-Mass Spectrometry »
Man	Mannose
MBP	« Maltose Binding Protein »
MeOH	Méthanol
MOPS	Acide 3-[N-morpholino]propanesulfonique
MS	Spectroscopie de masse
mQ	Eau désionisée de marque Millipore
NADH	Nicotinamide adénosyl dinucléotide phosphate
Ni-NTA	Chromatographie d'affinité Nickel-acide nitrilotriacétique
NOS	Oxyde nitrique synthétase
OBn	Benzylester
OMe	Méthylester
pb	paire de base
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PMSF	Fluorure de phénylméthane sulfonyle
Py	Pyridine
RFP	« Red Fluorescent Protein »
RMN	Résonance magnétique nucléaire



SDS-PAGE	« Sodium dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis »
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium tétrafluoroborate
TFA	Acide trifluoroacétique
TGase	Transglutaminase
TMS	Triméthylsilane
T.P.	Température pièce
T.R.A.I.L.	« Tumor Necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand »
U.A.	Unité arbitraire
U.V.-Vis	Ultra-violet - visible
YNB	Source d'azote « Yeast Nitrogen Base »
YPD	Milieu de culture « Yeast Peptone Dextrose »

## REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier le professeur Jeffrey W. Keillor pour m'avoir donné la chance de travailler dans un laboratoire aussi multidisciplinaire. Je le remercie aussi de m'avoir soutenu et encouragé dans les moments difficiles, que ce soit en recherche ou dans ma vie personnelle.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du groupe qui m'ont supporté pendant ces deux années☺. Je n'aurais jamais réussi sans leur présence et leur aide dévoués. Je n'oublie pas non plus de remercier tous les membres du groupe de Joëlle Pelletier pour leurs précieux conseils.

Mon passage à l'Université de Montréal n'aurait pu être réalisable sans le support moral et financier de mes parents, qui ont toujours cru en mes capacités.

Je tiens également à remercier mon bon ami Stéphane pour toute son écoute et tout son support moral. Je le remercie aussi d'avoir officialisé et répandu mon surnom de DanyBoy dans le groupe☺.

Je ne saurais terminer sans adresser toute ma reconnaissance à ma tendre et douce fiancée, ♥ Nathalie ♥, sans qui je n'aurais jamais eu la force d'affronter tous les obstacles qu'apporte le domaine de la recherche.

*L'humanité se divise en deux classes:  
Ceux qui ont trouvé sans être satisfaits,  
Ceux qui cherchent sans trouver.*

*Proverbe arabe*

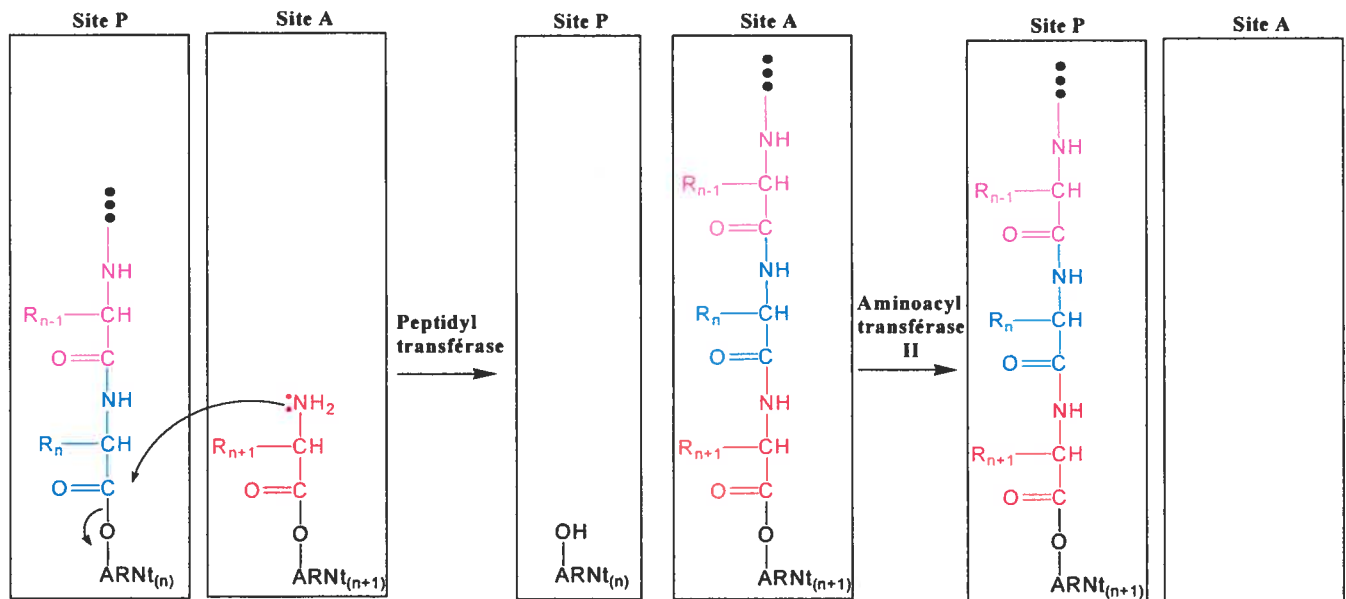
# CHAPITRE 1

# 1 : INTRODUCTION

## 1.1 : Généralités sur les aminoacyltransférases

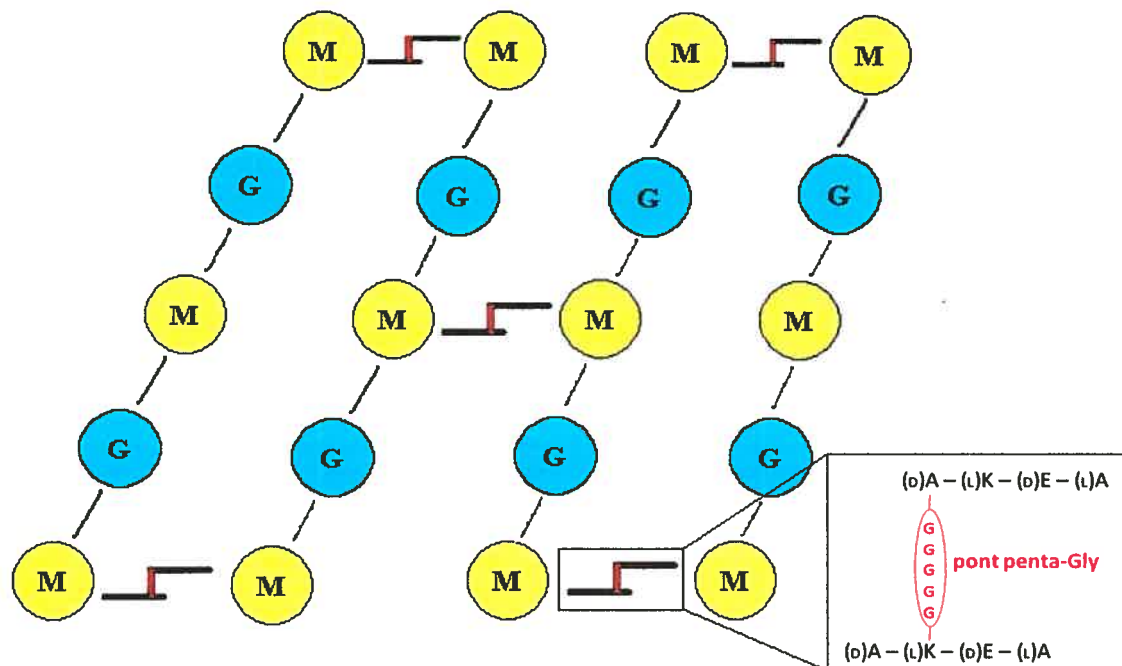
Les aminoacyltransférases sont des enzymes jouant plusieurs rôles physiologiques cruciaux chez l'être vivant puisqu'elles catalysent la formation de liens amides entre deux acides aminés, deux peptides ou deux protéines.

La peptidyltransférase et les aminoacyltransférases I et II sont des exemples d'enzymes faisant partie de cette grande famille. Elles font l'objet de plusieurs études depuis leur isolation dans les années '60, car elles jouent un rôle primordial pour la survie de l'être vivant. En effet, elles sont impliquées dans la traduction des ARNm en protéines<sup>1</sup>. L' aminoacyltransférase I, liée au GTP, aurait le rôle de lier l' aminoacyl-ARNt au site A vacant du complexe ribosomique. La peptidyltransférase catalyserait alors le transfert de la peptidyl-ARNt endogène (du site P) au nouvel aminoacyl-ARNt, provoquant ainsi l'élongation de la chaîne peptidique. Enfin, l' aminoacyltransférase II jouerait un rôle dans le transfert du site A au site P du nouveau peptidyl-ARNt dans le but de laisser le site A vacant pour le prochain aminoacyl-ARNt à insérer.



**Figure 1.1 :** Schéma général simplifié de l'élongation de la chaîne peptidique lors de la traduction effectuée dans un ribosome (spécifiquement dans les sites A et P) où on y présente la réaction d'élongation catalysée par la peptidyltransférase et de translocation par l' aminoacyltransférase II.

Les aminoacyltransférases femABX sont un autre exemple de cette classe d'enzymes. Elles jouent le rôle de catalyser la formation des ponts pentaglycine formant le réseau de peptidoglycane (**figure 1.2**) de la paroi bactérienne<sup>2,3</sup>, leur conférant ainsi une résistance à certains antibiotiques et à certains désordres environnementaux. Puisque les eucaryotes n'ont pas ces enzymes, les femABX restent des cibles de choix pour la création d'antibiotiques agissant comme inhibiteurs de la formation de la paroi bactérienne<sup>4</sup>, permettant ainsi une meilleure action de la pénicilline<sup>5</sup>.



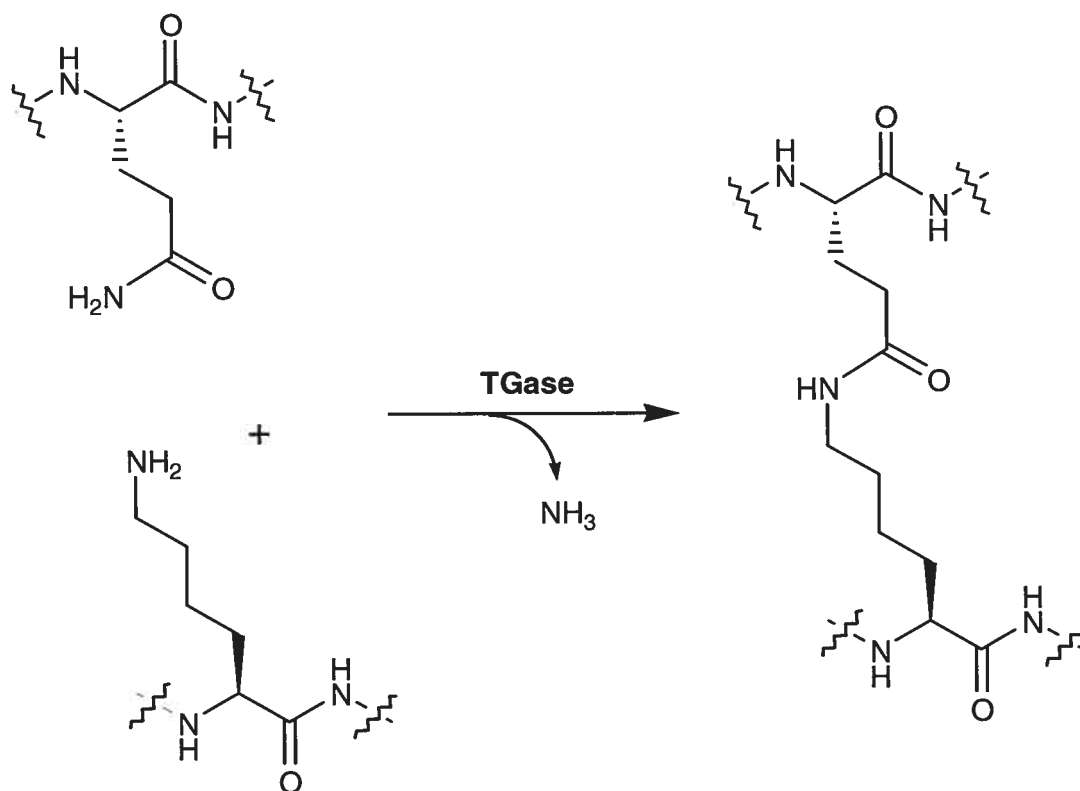
**Figure 1.2 :** Structure schématique d'un peptidoglycane où il est indiqué la position du pont pentaglycine. Abréviations : G = N-acétylglucosamine, M = acide N-acétylmuramique, D = Même configuration que le D-glycéraldéhyde, L = Même configuration que le L-glycéraldéhyde, A = Alanine, K = Lysine, E = Glutamate.

Il existe plusieurs autres aminoacyltransférases ayant des rôles physiologiques différents dans la formation de liens peptidiques. La transglutaminase tissulaire et la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase sont deux d'entre elles qui feront l'objet de mon projet de recherche.

## 1.2 : Les transglutaminases

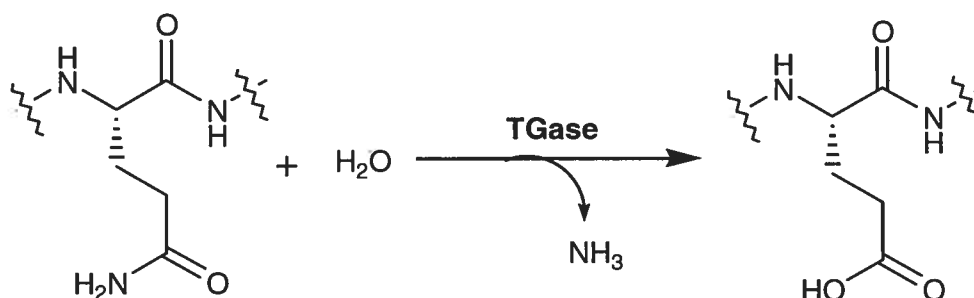
### *1.2.1 : Réactions générales catalysées*

Les transglutaminases (TGase, EC 2.3.2.13) sont une famille d'enzymes dont l'activité est dépendante de la présence de calcium<sup>6</sup>, à l'exception de la transglutaminase microbienne<sup>7</sup>. Faisant partie de la classe des aminoacyltransférases, elles catalysent la réaction de transfert d'un groupement acyle entre une glutamine protéique ou peptidique (substrat donneur d'acyle)<sup>8</sup> et une amine primaire (substrat accepteur d'acyle)<sup>9</sup>. Typiquement, elles catalysent la formation d'un lien isopeptidique entre le groupement amide de la chaîne latérale de la glutamine et la fonction amine de la chaîne latérale d'une lysine<sup>10</sup>, et ce, en relâchant une molécule d'ammoniac (**figure 1.3**).



**Figure 1.3 :** Réaction de transamidation catalysée par la TGase, où il y a formation d'un lien isopeptidique entre un résidu glutamine et lysine.

Les transglutaminases peuvent aussi catalyser l'hydrolyse d'une glutamine protéique ou peptidique pour ainsi former l'acide glutamique et libérer de l'ammoniac (**figure 1.4**), cette réaction étant toutefois plus lente que celle de la transamidation avec un substrat accepteur<sup>11</sup>.



**Figure 1.4 :** Réaction d'hydrolyse catalysée par la TGase.

### 1.2.2 : Les différents types de transglutaminases

Puisque la distribution des transglutaminases est très vaste chez le mammifère, elles auront des spécificités différentes. En effet, elles sont toutes capables de former le lien  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine afin de réticuler les protéines entre elles, mais n'ont pas toutes le même rôle physiologique<sup>12</sup>. De cette façon, on catégorise six grands types de TGase.

#### - La TGase de type I (ou TGase de kératinocyte)<sup>13,14</sup>

Les kératinocytes sont des cellules retrouvées majoritairement au niveau de l'épiderme squameux. Elles sont enrobées d'une enveloppe de protéines réticulées entre elles leur permettant d'être remarquablement cohésives, une propriété encore plus évidente dans les tissus de cheveux et d'ongles. Le rôle important de la TGase de kératinocyte est donc de catalyser cette réticulation de protéines et d'assurer cette cohésion inter-cellulaire.

#### - La TGase de type II (ou TGase tissulaire)<sup>13,15,16</sup>

La TGase tissulaire est exprimée dans tous les tissus, notamment dans les cellules endothéliales et dans les muscles lisses des artères, des veines et des capillaires. Elle se retrouve aussi en forte concentration dans les cellules interstitielles réno-



médullaires. En plus de son activité de transglutaminase, la TGase tissulaire se distingue des autres TGases de sa famille en catalysant l'hydrolyse du GTP et d'ATP dans le cytosol d'une cellule. Cet ouvrage fera en grande partie référence à cette enzyme.

- La TGase de type III (ou TGase épidermale)<sup>13,17</sup>

La TGase épidermale est une protéine zymogène, nécessitant donc une activation par des protéases. Elle est responsable de la cornification des enveloppes protéiques des cellules de l'épiderme.

- La TGase de type IV (ou TGase prostatique)<sup>18</sup>

Ce type de TGase est connu pour son rôle dans la formation du caillot post-coïtal protéique chez le rat.

- La TGase plasmatique (ou Facteur XIII chez l'humain)<sup>13,19</sup>

Sans doute la plus connue des TGases, le facteur XIII nécessite une activation par la thrombine pour former le facteur XIIIa. Elle est impliquée dans le processus de réticulation de protéines lors de la coagulation sanguine.

- EP4.2<sup>20</sup>

La bande EP4.2 est une protéine structurale importante formant le squelette des érythrocytes. Elle a une grande homologie de séquence avec la TGase, mais ne contient la cystéine catalytique du site actif. Malgré sa structure très semblable, elle n'a pas l'activité catalytique de la transglutaminase.

### ***1.2.3 : La transglutaminase tissulaire***

Les transglutaminases tissulaires sont des enzymes de 76 à 85 kDa<sup>21,22,23,24</sup>. Elles sont non-glycosylées malgré la présence de six sites de glycosylation potentiels et ne contiennent aucun pont disulfure malgré la présence de 17 cystéines dans sa séquence<sup>21</sup>. La structure cristalline de la TGase tissulaire de la dorade japonaise (ou Red Sea Bream) a préalablement été déterminée<sup>25</sup>. Sa structure tertiaire est constituée de quatre sous-

domaines, soit d'un sandwich- $\beta$  en *N*-terminale, d'un cœur  $\alpha$ - $\beta$  où est situé le site actif de l'enzyme et de deux barils- $\beta$  en *C*-terminale (figure 1.5).

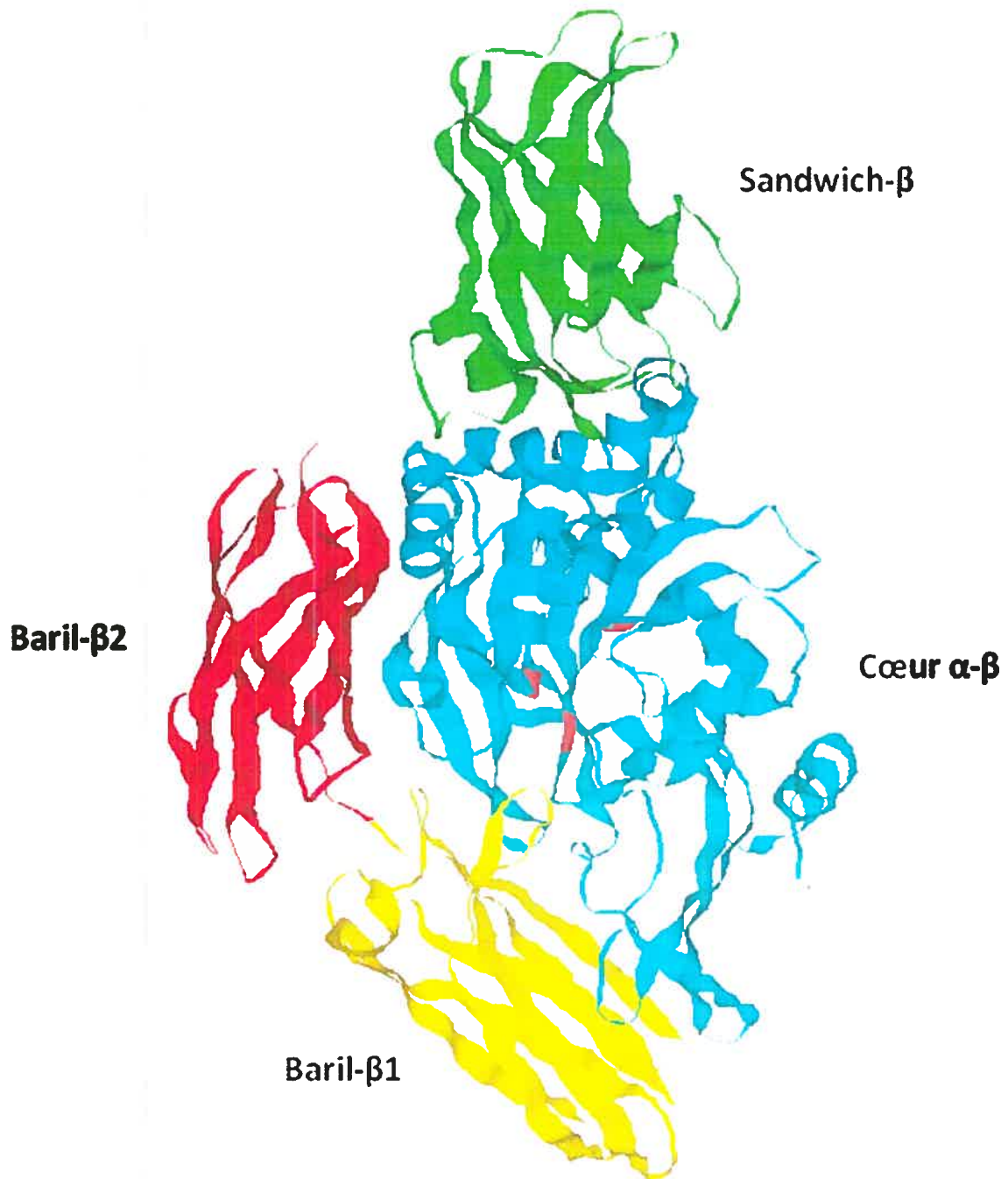


Figure 1.5 : Structure cristalline de transglutaminase tissulaire de la dorade japonaise.<sup>25</sup>

### ***1.2.4 : Rôles et désordres physiologiques de la transglutaminase tissulaire***

La transglutaminase tissulaire participe à quelques processus cellulaires, lui accordant donc des rôles physiologiques importants. Entre autres, elle participe à l'endocytose médiée par un récepteur, à l'apoptose, à l'adhésion et à la différenciation cellulaire.

#### **- Endocytose médiée par un récepteur**<sup>26</sup>

Ce type d'endocytose est le processus par lequel la cellule laisse entrer des macromolécules extra-cellulaires (ligands) spécifiques au récepteur membranaire par l'entremise de vésicules formées à même sa membrane plasmique. La TGase tissulaire aurait donc un rôle à jouer dans ce processus. En effet, l'endocytose médiée par l' $\alpha_2$ -macroglobuline de rein de rat marqué par la rhodamine serait inhibée par une large gamme de composés qui inhibent spécifiquement la TGase, tels que le *N*-benzyloxycarbonyl-5-diazo-4-oxo-norvaline *p*-nitrophényl ester. Ce type de composés inhiberait la formation des vésicules d'endocytose, sans inhiber la liaison ligand-récepteur.

#### **- Apoptose**<sup>27</sup>

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique requis non seulement dans des cas d'agression physique ou chimique, mais aussi dans le développement embryonnaire et le renouvellement des tissus adultes et pathologiques. Deux processus biochimiques essentiels surviennent lors de l'apoptose. Premièrement, des endonucléases activées par une libération d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  viennent digérer l'ADN de la cellule. À son tour, la TGase est activée par la présence des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et vient effectuer un pontage protéique autour des corps apoptotiques afin de prévenir leur éclatement avant la phagocytose. Sans son action, le déversement du matériel intracellulaire occasionnerait une réponse inflammatoire importante.

#### **- Adhésion et différenciation cellulaire**<sup>28,29,30,31,32</sup>

Des hypothèses portent à croire que la TGase est impliquée dans des interactions cellules-cellules dans les hépatocytes de rats. De plus, sur la surface de la membrane des

hépatocytes, elle serait responsable du pontage entre des protéines membranaires telles que les fibrinogènes et fibronectines. Enfin, la TGase a une affinité considérable pour la fibronectine, la fibrine et le collagène de type I et pourrait donc se lier à ses protéines de la matrice extracellulaire.

Or, la TGase tissulaire joue plusieurs rôles indispensables pour la survie de l'humain. Par contre, une activité trop élevée de la TGase tissulaire peut provoquer plusieurs maladies neurodégénératives (telles que la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer) et auto-immunitaires (telle que la maladie céliaque).

#### - Maladie de Huntington<sup>33</sup>

La maladie de Huntington est caractérisée par la mort de cellules neuronales spécifiques. Ces cellules démontrent la présence de corps d'inclusions, c'est-à-dire d'agrégats de protéines devenus insolubles. Selon des études, ces agrégats seraient constitués de poly-glutamines. La transamidation de ces protéines serait due à une action trop élevée de la TGase tissulaire.

#### - Maladie de Parkinson<sup>34</sup>

La maladie de Parkinson est caractérisée par l'agrégation des  $\alpha$ -synucléines et d'autres protéines formant des corps d'inclusions cytoplasmiques, provoquant la dégénération des neurones dopaminergiques. Or, les études indiquent que la TGase tissulaire est non seulement présente dans les cellules atteintes, mais aussi présente dans les agrégats d' $\alpha$ -synucléines. De plus, il a été démontré que la TGase stimule l'agrégation des  $\alpha$ -synucléines dans des cellules COS 7 surexprimant les  $\alpha$ -synucléines.

#### - Maladie d'Alzheimer<sup>35,36</sup>

Le vieillissement des cellules neuronales provoque, avec le temps, la liaison anormale de neurofilaments tels que la protéine tau, un précurseur de l'amyloïde. Cette agglomération de protéines peut amener à la formation de plaques séniles de type Alzheimer (maladie d'Alzheimer). Selon les études, la TGase tissulaire aurait un rôle à

jouer dans la formation de ces agrégats de protéines. En effet, l'incubation de ces neurofilaments (*in vitro*) en présence de TGase, de calcium, et de dansylcadavérine forme un polymère insoluble fluorescent, ce processus étant associé à une diminution de neurofilaments solubles.

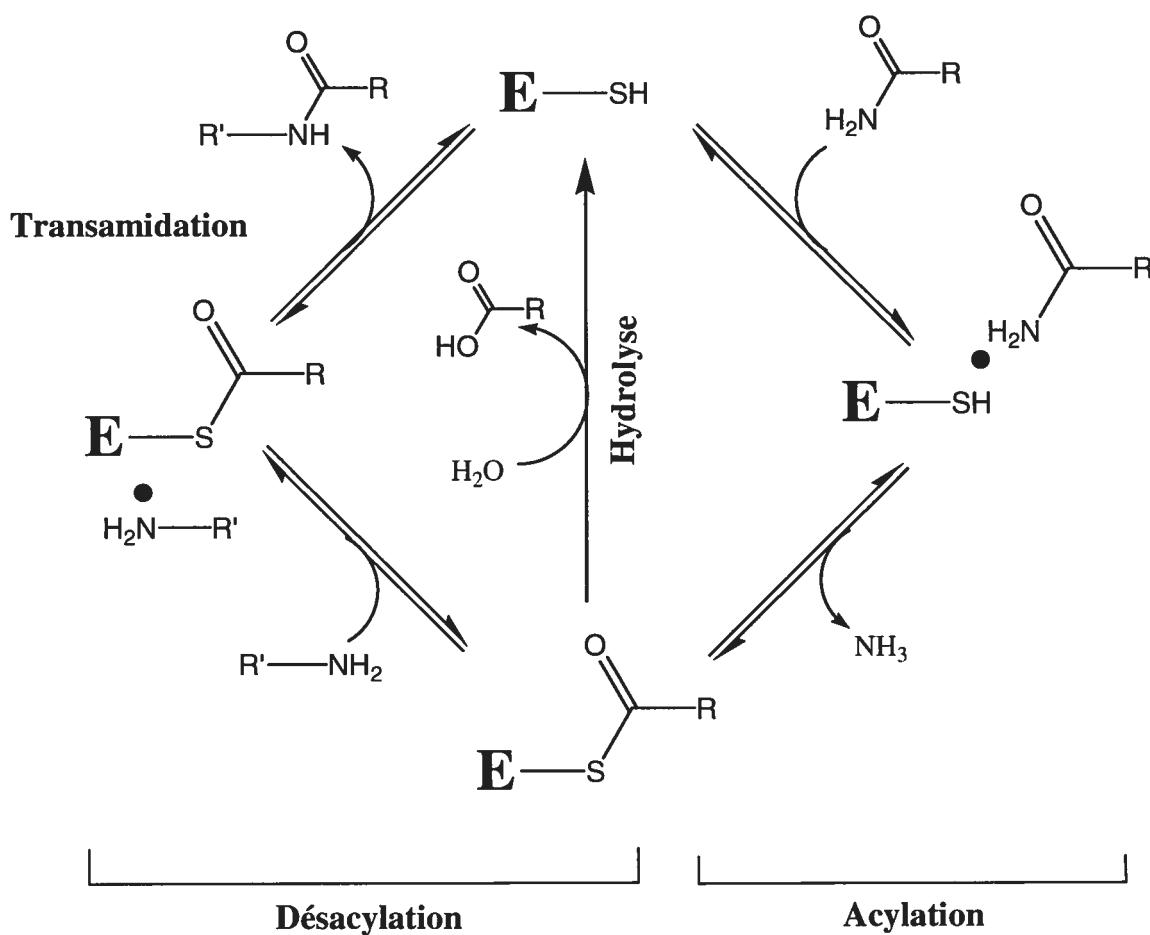
#### - Maladie céliaque<sup>37,38</sup>

La maladie céliaque est une maladie immunitaire inflammatoire menant à la destruction des microvillosités de la paroi interne des intestins. Elle provient d'une intolérance au glutène ingéré. Le glutène, une protéine trouvée dans le blé et certaines autres céréales, est digéré en plusieurs peptides non-hydrolysables nommés les gliadines- $\alpha$ . Ces peptides, contenant plusieurs résidus glutamines, sont de bons substrats donneurs de la TGase. Celle-ci catalyse alors l'hydrolyse de ces glutamines, formant donc des glutamates. En temps normal, l'humain élimine ces peptides sans problème. Par contre, le système immunitaire de certaines personnes ayant un bagage génétique unique perçoit ces peptides comme des antigènes et provoque alors une réponse immunitaire d'origine inflammatoire, décrivant la maladie céliaque.

À des fins thérapeutiques, la TGase tissulaire demeure donc une enzyme de choix à étudier en profondeur. Que ce soit pour des études d'inhibition ou de marquage, la conception d'inhibiteurs de haute affinité de la TGase tissulaire reste un défi jusqu'à ce jour. Devant l'implication de l'enzyme face à toutes ces maladies, il est effectivement étonnant de constater que peu est connu sur son mécanisme d'action. La **section 1.2.5** montre son mécanisme catalytique général proposé dans la littérature et défendu par des études de modélisation effectuées dans le groupe.

### 1.2.5 : Mécanisme catalytique

Il s'agit d'un mécanisme ping-pong modifié démontrant une réaction d'acylation suivie d'une réaction de transamidation ou d'hydrolyse, constituant l'étape de désacylation (**figure 1.6**)<sup>39</sup>. Ce mécanisme est ordonné, c'est-à-dire que la liaison du substrat donneur entraîne un changement de conformation de l'enzyme de telle sorte que le substrat accepteur puisse se lier à son tour.



**Figure 1.6 :** Mécanisme catalytique de la TGase.

Le mécanisme proposé indique une première liaison réversible du substrat donneur d'acyle à l'enzyme. Ce rapprochement des réactifs dû à leur affinité conduit à l'acylation de l'enzyme. L'intermédiaire acyl-enzyme change la conformation de la protéine, de telle sorte que le substrat accepteur d'acyle puisse s'introduire dans le site actif. Ce nouveau complexe fera une transamidation, pour libérer le produit final et régénérer l'enzyme libre. En absence de substrat accepteur, l'eau présente dans le milieu effectue l'hydrolyse de l'acyl-enzyme, formant le dérivé acide du donneur d'acyle et régénérant l'enzyme libre. Cette hydrolyse explique le qualificatif « modifié » du mécanisme ping-pong. La transamidation et l'hydrolyse sont les deux seules réactions possibles pour désacyler l'enzyme.

Des études mécanistiques<sup>6</sup>, soutenues par les études de modélisation effectuées dans le groupe,<sup>40</sup> démontrent que la triade catalytique de la transglutaminase tissulaire est constituée d'une cystéine catalytique, d'une histidine impliquée dans la déprotonation du groupement thiol de la cystéine et d'un résidu aspartate activant l'histidine. En d'autres termes, l'aspartate oriente l'histidine, qui déprotonera la cystéine pour former le thiolate réactif. Le thiolate ainsi formé est le nucléophile de l'enzyme.

Pour effectuer ces études mécanistiques de l'enzyme, il est évident que nous devons la posséder. Les anciennes méthodes constituaient à purifier l'enzyme provenant de l'organe même. Aujourd'hui, il existe plusieurs systèmes d'expression bactériens permettant de surexprimer l'enzyme recombinante.

### ***1.2.6 : Expression et purification de la transglutaminase tissulaire***

La transglutaminase tissulaire de foie de cobaye était anciennement purifiée directement de l'organe de l'animal<sup>41</sup>. Cependant, il s'agit aujourd'hui d'une technique dépassée qui ne donne pas un rendement satisfaisant. Récemment, la transglutaminase recombinante de foie de cobaye contenant une queue à six histidines (His-Tag) en *N*-terminale a pu être surexprimée avec une bonne pureté et un bon rendement<sup>42</sup>.

L'expression d'une protéine recombinante comporte au moins trois avantages. Premièrement, il est préférable éthiquement d'exprimer une protéine recombinante, car cette technique ne requiert aucun sacrifice d'animaux. Deuxièmement, il s'agit d'une méthode plus fiable, plus reproductible et offrant un meilleur rendement d'expression. Dernièrement, elle permet d'effectuer aisément des mutations sur la protéine exprimée. En effet, la réaction de PCR permet d'introduire, d'enlever ou de muter une ou plusieurs paires de bases dans la séquence même du gène codant pour la protéine.

La transglutaminase de foie de cobaye est souvent utilisée en tant que modèle à la transglutaminase humaine à des fins d'études cinétiques et de cristallisation. En effet, ces deux enzymes ont 80 % d'homologie. La transglutaminase humaine recombinante est maintenant disponible depuis quelques années<sup>43</sup>, mais son expression n'est réalisée qu'à un très faible rendement dû à sa faible solubilité. Il serait donc intéressant de tenter d'optimiser cette surexpression. Des tests d'inhibition et de marquage de la transglutaminase humaine seraient alors possibles afin d'élucider les détails de son mécanisme d'action et/ou de développer des agents thérapeutiques désirés.

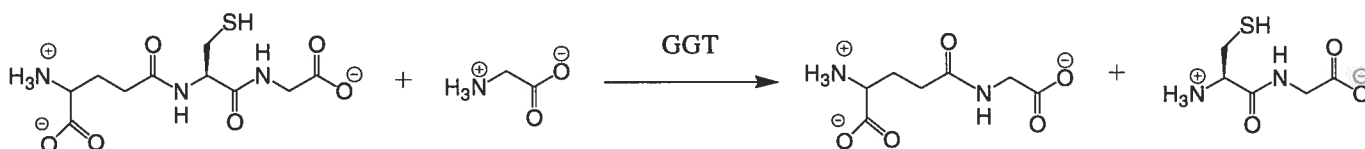


### 1.3 : La $\gamma$ -glutamyltranspeptidase

#### 1.3.1 : Réactions générales catalysées

La  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT, EC 2.3.2.2) est aussi une aminoacyltransférase, tout comme la TGase. Toutefois, elle catalyse la réaction de transamidation sur des résidus différents. Elle transfère le résidu  $\gamma$ -glutamyle provenant du glutathion, son substrat donneur *in vivo*, (ou provenant d'autres substrats analogues possédant un groupement  $\gamma$ -glutamyle) à un accepteur de type acide aminé ou peptide.<sup>44,45</sup> En fait, tous les acides aminés (sauf la proline) et une large gamme de peptides peuvent servir de substrat accepteur.<sup>45</sup> En absence d'accepteur, la GGT catalyse l'hydrolyse du glutathion<sup>45</sup>, cette réaction étant plus lente que celle de la transamidation. À de fortes concentrations de glutathion, elle peut catalyser l'autotranspeptidation<sup>46</sup> de ce composé (**figure 1.7**).

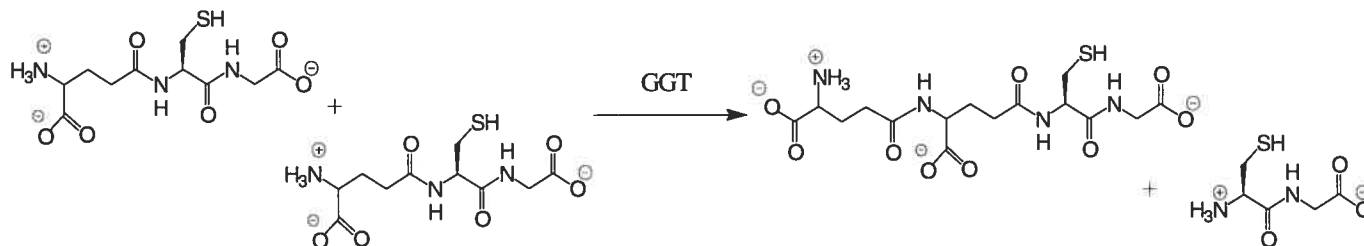
A)



B)



C)

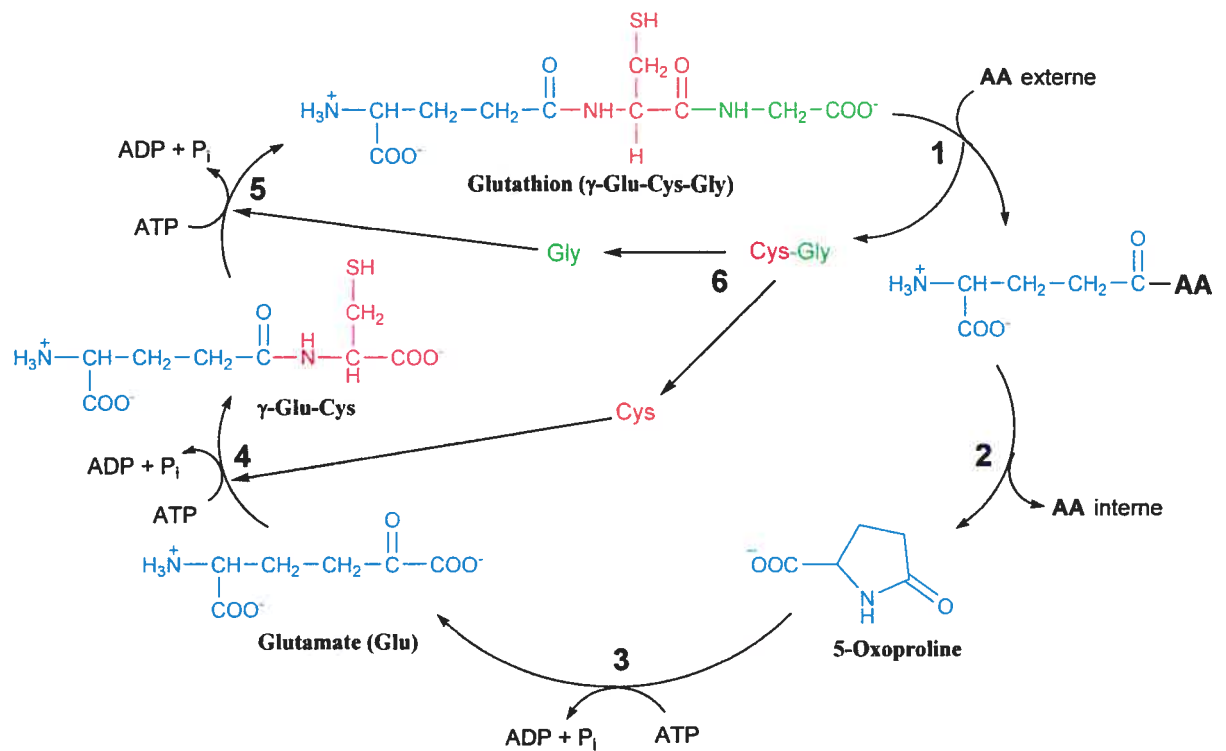


**Figure 1.7 :** Exemples de réactions catalysées par la GGT : A) avec la glycine comme substrat accepteur, B) l'hydrolyse et C) l'autotranspeptidation.

### 1.3.2 : Rôles et désordres physiologiques de la GGT et de la régulation du glutathion

La GGT est distribuée dans plusieurs tissus animaux dont le foie et le pancréas, mais elle se retrouve majoritairement sur la surface basolatérale des cellules épithéliales des reins.<sup>47,48,49,50</sup>

Comme déjà mentionné, le glutathion est le substrat donneur *in vivo* de la GGT. Ainsi, les rôles physiologiques de la GGT seront en grande partie reliés à la nature de ce composé. Le rôle général de la GGT sera de réguler la concentration du glutathion dans les tissus de l'être vivant, suivant le cycle du  $\gamma$ -glutamyle<sup>51</sup>.



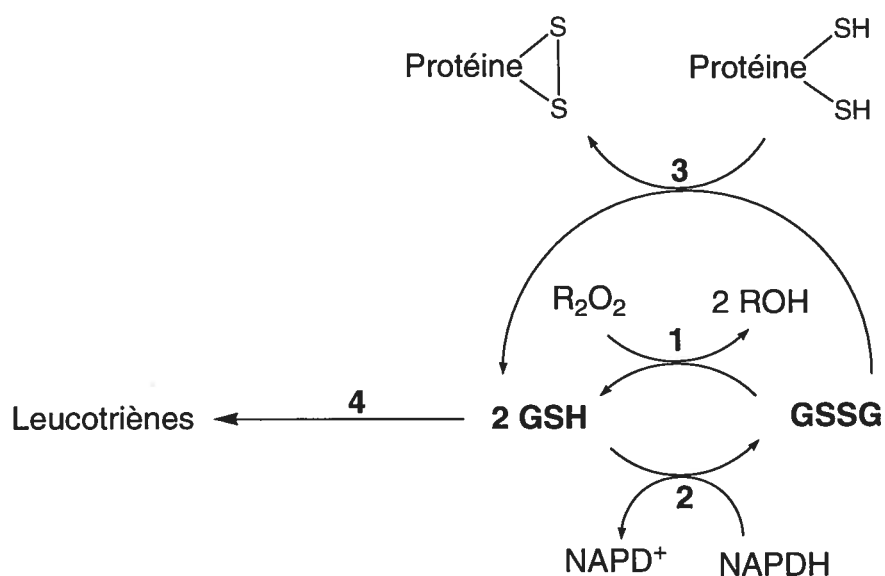
**Figure 1.8 :** Synthèse du glutathion en tant qu'élément du cycle  $\gamma$ -glutamyle du métabolisme du glutathion.

À l'étape 1, la GGT ancrée sur la membrane de la cellule catalyse la réaction de transpeptidation entre une molécule de glutathion et un acide aminé, toutes deux extracellulaires. Cette réaction est accompagnée par un transport des produits formés à l'intérieur de la cellule. L'étape 2 montre que le dipeptide  $\gamma$ -glutamyl-AA formé réagit avec une  $\gamma$ -glutamyl cyclotransférase afin de subir une cyclisation du  $\gamma$ -glutamyle,

formant le 5-oxoproline, suivit de la libération de l'acide aminé dans le cytosol. Ainsi, il y a transport des acides aminés extracellulaires vers le milieu intracellulaire à l'aide des activités successives de la GGT et de la  $\gamma$ -glutamyl cyclotransférase. Par la suite, l'étape 3 décrit qu'une 5-oxoprolinase catalyse l'ouverture du cycle de la 5-oxoproline, à l'aide d'une molécule d'ATP, formant une molécule de glutamate. À partir de ce point, la cellule régénère la molécule de glutathion suivant les étapes 4 et 5. Respectivement, la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase ajoute un résidu cystéine en position  $\gamma$  du glutamate et la synthétase de glutathion ajoute le résidu glycine en C-terminale de la cystéine. Pour effectuer ces deux étapes, les enzymes ont besoin d'une molécule d'ATP pour activer l'amidation. La cystéine et la glycine de ces deux dernières étapes proviennent du clivage de Cys-Gly (provenant de l'étape 1) par une peptidase intracellulaire quelconque, décrivant l'étape 6 du cycle.

Le cycle  $\gamma$ -glutamyle indique donc deux rôles importants de la GGT. Premièrement, la GGT est impliquée dans le transport d'acides aminés extracellulaires vers le cytosol de la cellule<sup>52</sup>. Enfin, comme déjà mentionné, la GGT participe à la régulation de la concentration du glutathion intra et extracellulaire. Mais à quoi sert cette molécule de glutathion *in vivo*?

Le glutathion, le très abondant tripeptide *N*-L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinylglycine, est impliqué dans plusieurs réactions de protection contre des agents oxydants<sup>53</sup>. Par exemple, il est un précurseur de l'acide mercapturique et protège alors les cellules contre les radicaux libres oxydatifs et contre les blessures toxiques<sup>54</sup>. En fait, des études ont montré que la GGT est exprimée de façon anormalement importante dans plusieurs tissus tumoraux humains, incluant ceux du foie, des poumons, des seins et des ovaires<sup>55</sup>. De plus, le glutathion est aussi impliqué dans la biosynthèse de leucotriènes, contrôlant la bronchoconstriction dans les cas d'asthme<sup>56,57</sup>. Enfin, l'équilibre entre la forme réduite et la forme oxydée du glutathion permet de maintenir les groupes sulfhydryles des protéines intracellulaires dans leurs états d'oxydo-réduction corrects<sup>51</sup>. La **figure 1.9** illustre ces rôles du glutathion<sup>51</sup>.



**Figure 1.9 :** Rôles du glutathion. Équilibre entre le glutathion réduit et oxydé permettant la détoxification des peroxydes par la glutathion peroxydase (1), la modulation par la thiol transférase de l'équilibre thiol-disulfure protéique (3) et la synthèse des leucotriènes par la glutathion-S-transférase (4) La régénération du glutathion réduit se fait par la glutathion réductase (2).

Tout comme la TGase et une panoplie d'autres enzymes, la GGT est impliquée dans plusieurs désordres physiologiques. Par exemple, elle hydrolyse rapidement les complexes formés entre le glutathion et le cisplatine, un agent chimiothérapeutique, créant ainsi une forme de résistance aux médicaments<sup>58</sup>. Elle serait aussi impliquée dans quelques maladies telles que la maladie de Parkinson. En effet, une activité trop élevée de la GGT engendre une augmentation de la concentration de cystéine dans la cellule. Ces cystéines en surplus forment un produit toxique en se complexant avec la dopamine. Ce produit formé inhiberait la formation des complexes mitochondriaux I, pouvant être une des causes possibles de la maladie de Parkinson<sup>59,60</sup>. Enfin, une activité trop élevée de la GGT serait aussi une cause d'inhibition de l'apoptose<sup>61,62</sup>, de diabète et de quelques maladies cardiovasculaires<sup>63</sup>. Pour remédier à ces maladies, il est important d'étudier la structure tridimensionnelle de cette enzyme, ainsi que son mécanisme catalytique.

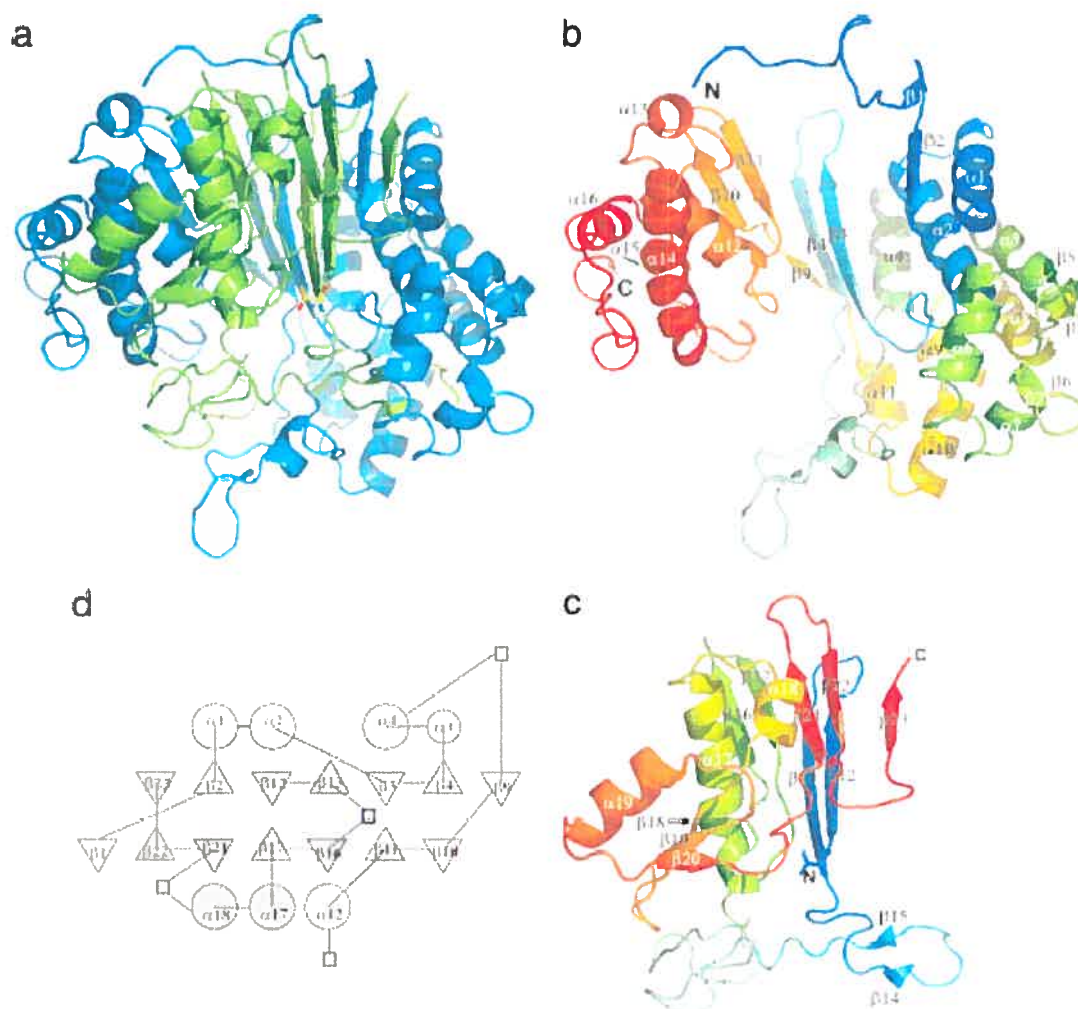
### 1.3.3 : Structure de la GGT

Même si la GGT catalyse aussi une réaction de transamidation, sa structure est complètement différente de celle de la TGase.

Il s'agit d'une protéine hétérodimérique hautement glycosylée dont son unique chaîne polypeptidique a été clivée post-traductionnellement<sup>49,50</sup> de façon à former une grande et une petite sous-unité de 60-66 kDa et 20-22 kDa<sup>64</sup> respectivement. Les différents groupements saccharides que peuvent avoir les GGT démontrent la spécificité de l'enzyme dans chaque organe<sup>65</sup>. Il y a six sites possibles pour la *N*-glycosylation dans la grosse sous-unité et un seul site dans la petite sous-unité<sup>66</sup>.

L'hétérodimère résultant du clivage post-traductionnel reste associé à la membrane dû à une ancre membranaire composée de 20 acides aminés hydrophobes en *N*-terminale de la grande sous-unité. L'enzyme, exposant son site actif vers le milieu extra-cellulaire, permettra à la cellule d'utiliser le glutathion extracellulaire et ainsi être responsable du statut du glutathion dans l'environnement cellulaire.<sup>49,50,67</sup>

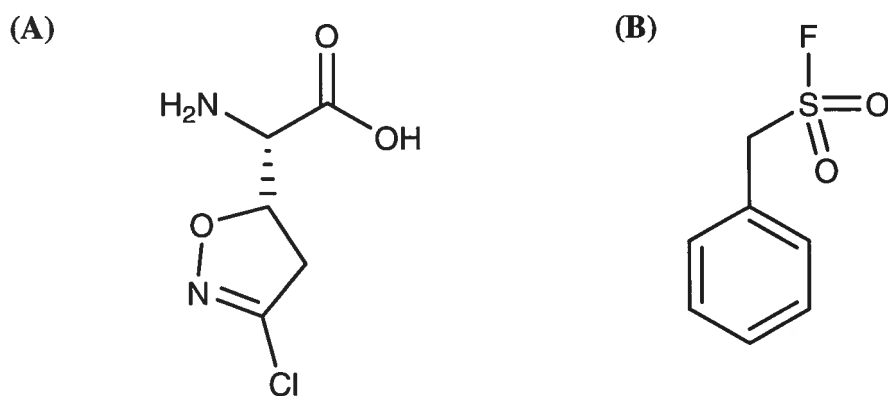
La structure cristalline de la GGT recombinante bactérienne a récemment été déterminée<sup>68</sup> (**figure 1.10**). Évidemment, puisqu'il s'agit d'un système d'expression bactérien, la protéine n'est pas glycosylée; le résultat obtenu représente uniquement la structure tertiaire formée de la séquence en acides aminés de la protéine. La grande sous-unité est composée des résidus 25-390 et la petite est composée des résidus 391-580, les 24 premiers acides aminés constituant le peptide signal pour l'ancre membranaire. L'hétérodimère a un corps- $\alpha\beta\beta\alpha$ ; les brins- $\beta$  forment deux feuillets- $\beta$  centraux enfouis autour d'hélices- $\alpha$ . Cette structure est très similaire aux protéines de la superfamille des Ntn-hydrolase, telles que l'aspartylglucosaminidase<sup>69</sup> et la pénicilline acylase<sup>70</sup>. Étonnement, les deux résidus séparés par le clivage post-traductionnel, soit le résidu *C*-terminale de la grande sous-unité et le résidu *N*-terminale de la petite sous-unité, sont relativement éloignés l'un de l'autre, avec une distance calculée à 36 Å.



**Figure 1.10 :** Structure cristalline de la GGT bactérienne. (A) Représentation en rubans de l'hétérodimère de la GGT. *En bleu* : grande sous-unité. *En vert* : petite sous-unité. (B) Grande sous-unité uniquement. (C) Petite sous-unité uniquement, où le résidu *N*-terminale (Thr-391) est représenté en bâtonnets. (D) Diagramme topologique de la GGT. *Cercles* : hélices- $\alpha$ . *Triangles* : brins- $\beta$ . *Carrés* : Insertions non-conservées parmi les Ntn-hydrolases. *En gris* : petite sous-unité. *En blanc* : grande sous-unité.<sup>68</sup>

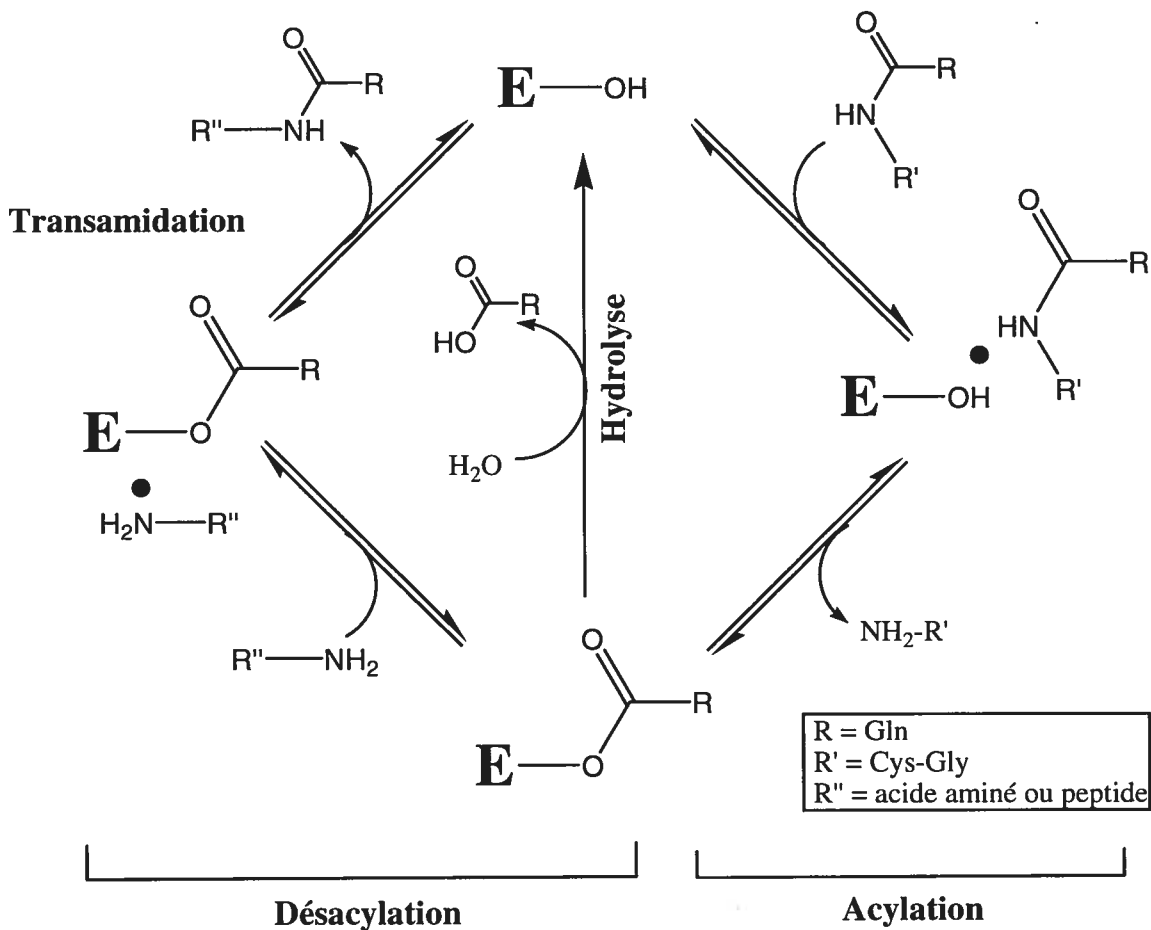
### 1.3.4 : Mécanisme catalytique

Le mécanisme enzymatique de la GGT demeure encore peu connu. Nous savons qu'il s'agit d'un mécanisme « ping-pong modifié », tout comme la TGase<sup>58,71</sup>. Par contre, des expériences d'inhibition irréversible ont démontré que le nucléophile de la GGT doit être une sérine ou une thréonine, comparativement à la cystéine de la TGase. Entre autres, l'acivicine<sup>72,73</sup> (**figure 1.11A**) marquée avec un radio-isotope <sup>14</sup>C lie de façon irréversible la Thr-523 de la petite sous-unité. De plus, l'incubation de fluorure de phénylméthane sulfonyl (PMSF, **figure 1.11B**), reconnu pour être un inhibiteur des protéases à sérine, a permis d'inactiver la GGT lorsque mise en présence de maléate<sup>74</sup>.



**Figure 1.11** : Structure chimique de deux inhibiteurs irréversibles de la GGT (A) l'acivicine et (B) la PMSF.

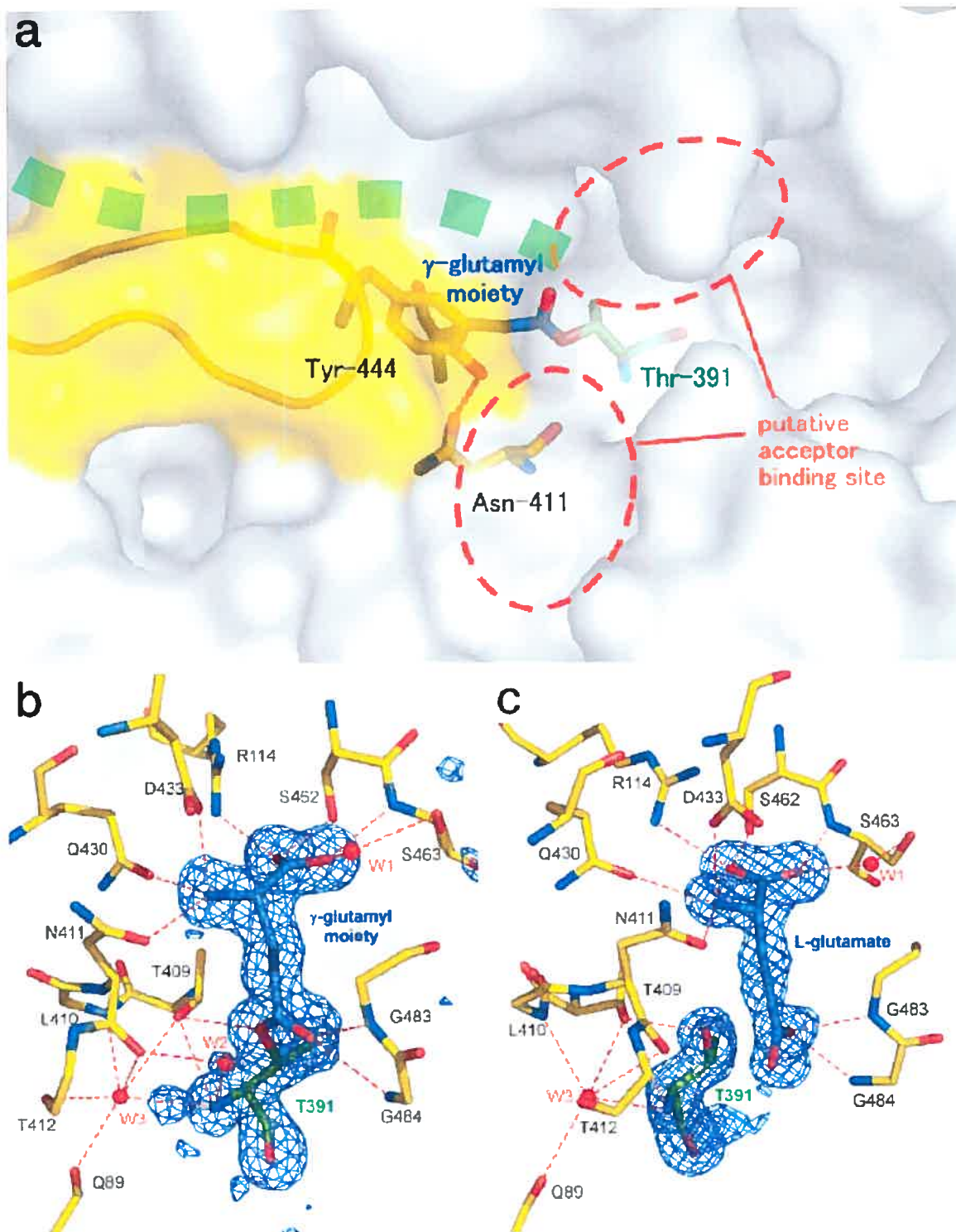
Puisqu'il s'agit toujours d'une réaction globale de transamidation, le mécanisme catalytique général de la GGT ressemble beaucoup à celui de la TGase. La première étape est celle de l'acylation, où il y a formation de l'intermédiaire acyl-enzyme accompagné du départ du groupe partant (Cys-Gly dans le cas du glutathion comme substrat donneur). Par la suite, la désacylation peut se faire soit par transamidation en présence de substrat accepteur, soit par hydrolyse (**figure 1.12**).



**Figure 1.12** : Mécanisme catalytique de la GGT

Finalement, des études récentes de cristallisation de l'intermédiaire acyl-enzyme de la GGT bactérienne liée au groupement  $\gamma$ -glutamyle<sup>68</sup> ont permis de confirmer que la Thr-391 était le nucléophile de cette enzyme (**figure 1.13**). De plus, ces études ont permis de décrire beaucoup plus précisément les résidus impliqués dans la liaison au substrat à l'intérieur de la cavité du site catalytique.





**Figure 1.13** : Structure du site de liaison du substrat de la GGT bactérienne. (A) La Thr-391 est représentée en bâtonnets, liée au résidu  $\gamma$ -glutamyle (intermédiaire acyl-enzyme). Les résidus formant le mur pour le substrat sont aussi représentés en bâtonnets (la Tyr-444 et l'Asn-411). (B) Les interactions intermoléculaires entre le résidu  $\gamma$ -glutamyle, lié de façon non-covalente à l'enzyme, et la séquence peptidique du site actif. (C) Rotation de  $40^\circ$  sur l'axe vertical de la figure B.<sup>68</sup>

### ***1.3.5 : Expression et purification de la GGT***

Plusieurs procédures ont été publiées pour l'isolation de l'enzyme provenant de différentes sources comme les reins de bœuf<sup>75</sup>, les reins de porc<sup>76</sup>, les hépatomes<sup>77</sup> et les reins de rats<sup>78</sup>. Par contre, il est évident qu'un système d'expression de la protéine recombinante serait beaucoup plus simple et efficace à réaliser pour les raisons mentionnées dans la **section 1.2.6** sur la transglutaminase.

Ainsi, la GGT recombinante bactérienne et de reins de rats ont été surexprimées dans des systèmes d'expression bactériens par quelques groupes de recherche<sup>79,80,81,82</sup>. Toutefois, puisqu'il s'agit de cellules procaryotes, aucune automaturation de la protéine peut avoir lieu; pas de clivage post-traductionnel et pas de glycosylation de la GGT.

Or, le gène codant pour la GGT humaine a déjà été cloné dans des plasmides puis transformé dans quelques souches de cellules eucaryotes<sup>83,84,85</sup>. Ainsi, il est possible d'obtenir la GGT mature. Cependant, ces systèmes se sont avérés à toujours avoir un défaut; soit qu'on obtient une faible activité spécifique, soit que le protocole d'expression lui-même est très complexe.

C'est pourquoi notre groupe a axé ses recherches sur l'expression de la GGT humaine dans des cellules de levures. Énormément d'efforts ont été consacrés pour construire un plasmide d'expression contenant le gène de la GGT humaine. Celui-ci a été tronqué afin d'enlever la séquence codant pour le peptide constituant l'ancre membranaire. À la place, on y a introduit une séquence d'ADN codant pour un peptide signal de sécrétion. Ainsi, la GGT humaine est sécrétée de la cellule, ce qui simplifie énormément la purification de la protéine. Enfin, ce système d'expression a été conçu dans des levures *Pichia pastoris*. Étant des eucaryotes, ces cellules sont aptes à glycosyler la GGT. De cette manière, on obtient la GGT humaine recombinante et glycosylée en solution avec une activité spécifique de 280 U/mg et un rendement de 1 mg/L de culture<sup>86</sup>.

## **1.4 : Les objectifs du projet**

### ***1.4.1 : Synthèse et évaluation d'inhibiteurs irréversibles de la transglutaminase tissulaire***

Cette enzyme est impliquée dans plusieurs maladies lorsque son activité n'est pas régulée. Or, la synthèse d'inhibiteurs irréversibles de la TGase pourrait permettre de développer des molécules de marquage de haute affinité, permettant ainsi de définir plus précisément la structure du site actif ainsi que son mécanisme d'action. De plus, ces inhibiteurs pourraient devenir des précurseurs à la synthèse de nouveaux médicaments agissant contre toutes ces maladies. Dans cette optique, la première partie de mon projet est la synthèse d'inhibiteurs de la TGase tissulaire ainsi que leur évaluation cinétique.

### ***1.4.2 : Expression de la transglutaminase tissulaire humaine***

La transglutaminase de foie de cobaye a été étudiée pendant plusieurs années en tant que modèle de l'enzyme humaine. Ce n'est que depuis 2002 que la TGase humaine a été exprimée, et ce, à de faibles rendements dus à sa faible solubilité. Or, la deuxième partie du projet consiste à développer la solubilité de la TGase humaine lors de son expression afin d'avoir de meilleurs rendements.

### ***1.4.3 : Identification du résidu catalytique de la $\gamma$ -glutamyltranspeptidase***

Il est confirmé dans la littérature que le nucléophile de la GGT est la thréonine située en *N*-terminale de la petite sous-unité. Par contre, ceci n'a jamais été prouvé pour l'enzyme humaine. Puisque la GGT recombinante humaine est maintenant disponible dans le groupe, il sera possible pour moi d'effectuer des études par spectroscopie de masse afin d'identifier le résidu catalytique de cette enzyme.

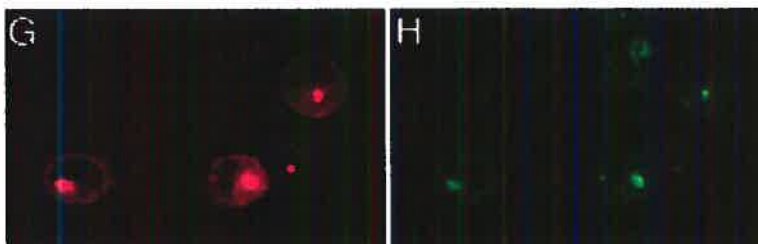
# CHAPITRE 2

## 2 : Synthèse et évaluation d'inhibiteurs irréversibles de la transglutaminase tissulaire

### 2.1 : Importance des inhibiteurs irréversibles

Les inhibiteurs irréversibles d'enzymes jouent plusieurs rôles capitaux dans le domaine de la recherche scientifique. En effet, ils ont plusieurs applications intéressantes puisqu'ils lient de façon covalente le nucléophile d'une enzyme.

Ce type d'inhibiteur peut servir premièrement de marqueur fluorescent pour détecter la présence et la localisation de l'enzyme dans une cellule. Par exemple, la synthétase d'oxyde nitrique (NOSs) peut maintenant être détectée à l'intérieur d'une cellule lorsque celle-ci est incubée en présence d'un inhibiteur irréversible spécifique et fluorescent<sup>87</sup> (**figure 2.1**). Puisque cette enzyme est impliquée dans plusieurs maladies lorsqu'elle est trop active, ce genre d'imagerie peut être très utile à des fins médicales.

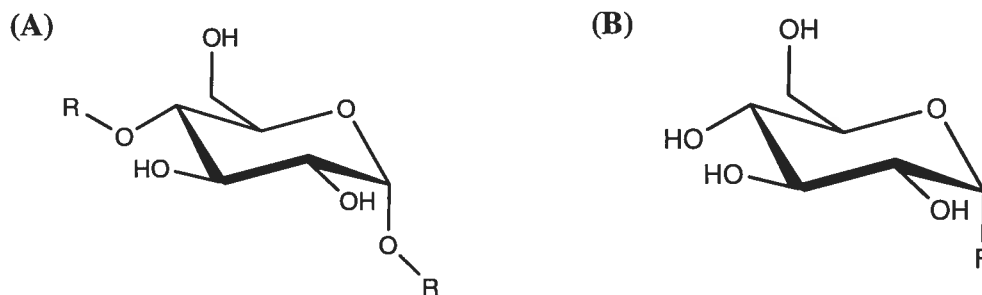


**Figure 2.1 :** (G) Détection de la protéine chimère NOSs-RFP (Red Fluorescent Protein) dans des cellules HEK293T, correspondant au contrôle négatif. (H) Détection de NOSs après incubation des cellules HEK293T avec l'inhibiteur irréversible fluorescent.<sup>87</sup>

Un peu de la même façon, l'inhibiteur irréversible peut servir à détecter la présence d'une enzyme dans un homogénat de tissus ou d'organes.

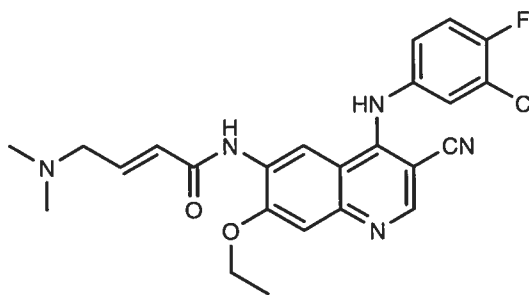
Un inhibiteur irréversible peut aussi servir de marqueur afin d'identifier le nucléophile d'une enzyme. En effet, puisqu'il est lié de façon covalente à celle-ci, cette dernière est piégée sous sa forme acyl-enzyme. Une digestion par une protéase suivie d'une étude par LCMS-MS permet de déterminer exactement quel résidu de la protéine est toujours lié à l'inhibiteur. Par exemple, le 5-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranoside, un dérivé du glucose, piège l' $\alpha$ -glucosidase sous sa forme acyl-enzyme. Par la suite, après

digestion et étude par LCMS-MS, les chercheurs ont déterminé que l'inhibiteur demeurait lié au résidu Asp-224, celui-ci étant donc le résidu catalytique de l'enzyme<sup>88</sup>.



**Figure 2.2 :** (A) Structure du substrat de l' $\alpha$ -glucosidase, un oligosaccharide  $\alpha$ -lié et (B) d'un inhibiteur irréversible, le 5-fluoro- $\alpha$ -D-glucopyranoside.<sup>88</sup>

Enfin, les inhibiteurs irréversibles ne sont pas utiles uniquement à des fins de marquage. Leur forte inhibition peut aussi servir de médicaments agissant contre des protéines trop actives. Par exemple, une activité excessive du récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGFR) est une des causes de cancer. Ainsi, des chercheurs ont synthétisé un inhibiteur irréversible de ce récepteur (EKB-569, **figure 2.3**) afin de ralentir son activité<sup>89</sup>. Après encore quelques études approfondies, ce médicament sera probablement bientôt administré à des patients atteints de tumeurs.



**Figure 2.3 :** Structure de EKB-569, inhibiteur de EGFR.<sup>89</sup>

Or, les inhibiteurs irréversibles sont d'importance capitale dans le monde de la recherche médicale. Pour toutes ces raisons, plusieurs groupes de recherche, dont le nôtre, se sont mis à concevoir des inhibiteurs irréversibles de la transglutaminase tissulaire, une enzyme qui est aussi impliquée dans plusieurs maladies lorsqu'elle est trop active.

Par exemple, des dérivés de dihydroisoxazoles<sup>90</sup>, d'époxydes<sup>91</sup>, d'amides  $\alpha,\beta$ -insaturés<sup>91</sup> et de 1,2,4-thiadiazoles<sup>92</sup> ont déjà été synthétisés et testés en tant qu'inhibiteurs de la TGase. Le **tableau I** résume les résultats cinétiques obtenus pour ces trois dernières séries.

**Tableau I** : Paramètres cinétiques de trois séries d'inhibiteurs de la TGase développées dans le groupe.

Dérivés 1,2,4-thiadiazoles				Dérivés amides $\alpha,\beta$ -insaturés				Dérivés époxydes			
n	$k_{inact}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{inact}/K_I$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ )	n	$k_{inact}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{inact}/K_I$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ )	n	$k_{inact}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{inact}/K_I$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ )
2	0.88	1.3	0.71	2	0.59	0.48	1.24	2	0.81	1.23	0.66
3	1.2	2.3	0.55	3	0.54	0.28	1.95	3	0.63	0.56	1.12
4	1.2	1.7	0.72	4	0.46	0.15	3.00	4	0.59	0.59	1.00

Ces composés sont de bons inhibiteurs de la TGase puisque leur  $K_I$  respectif est de l'ordre du faible micromolaire. Par contre, il serait intéressant de concevoir des inhibiteurs encore plus spécifiques à la TGase, et ce, en combinant les critères d'affinité et d'efficacité catalytique de l'enzyme. Soit dans le but d'effectuer du marquage spécifique, soit dans le but de développer une nouvelle série de précurseurs de médicaments encore plus spécifiques, nous avons conçu deux nouvelles séries d'inhibiteurs irréversibles de la TGase que nous présenterons dans cette section.

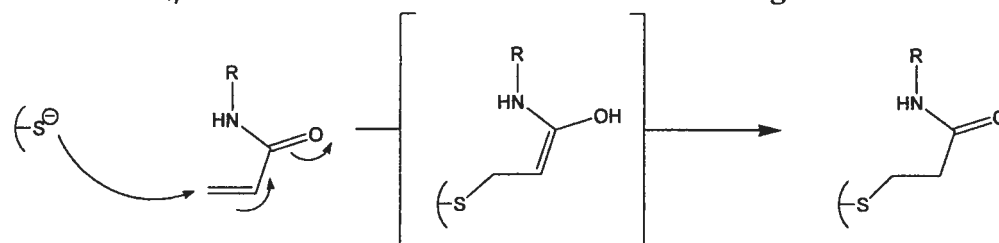
## 2.2 : Conception des inhibiteurs irréversibles

Pour développer des inhibiteurs irréversibles spécifiques d'une enzyme, nous devons nous baser sur deux paramètres cinétiques indispensables: la réactivité de l'enzyme et son affinité pour certains substrats. En d'autres termes, nous devons

premièrement connaître la nature de son résidu catalytique afin de concevoir un électrophile adéquat qui réagira avec elle. Deuxièmement, nous devons connaître la structure de la ou les molécules envers lesquelles elle exhibe une haute affinité afin qu'il y ait une forte interaction entre l'inhibiteur et l'enzyme. Pour ces raisons, ces paramètres ont été étudiés spécifiquement pour la transglutaminase tissulaire afin d'en concevoir deux séries d'inhibiteurs irréversibles.

### 2.2.1 : Réactivité de la transglutaminase

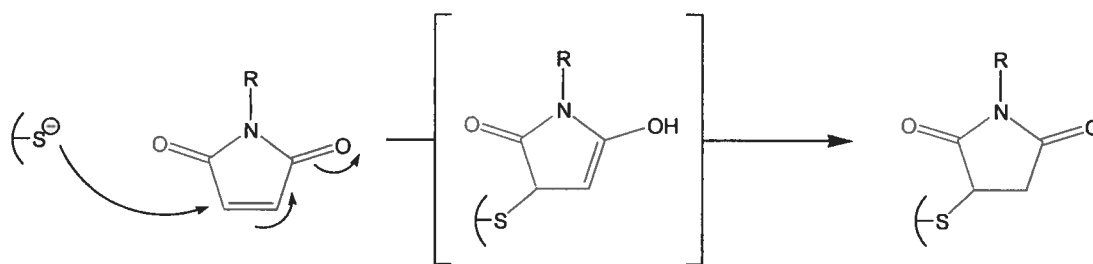
La triade catalytique de la TGase possède une cystéine jouant le rôle de nucléophile. Son groupement thiolate réagit rapidement sur des accepteurs de Michael, tel un amide  $\alpha,\beta$ -insaturé<sup>93</sup>. La réaction est illustrée dans la **figure 2.4**.



**Figure 2.4 :** Réaction enzymatique entre le groupement thiolate du site actif de l'enzyme et l'accepteur de Michael de type amide  $\alpha,\beta$ -insaturé.

Le lien covalent formé entre l'enzyme et l'inhibiteur est stable et résistant à l'hydrolyse ou l'amidation subséquente et piège l'enzyme sous cette forme inactive, conférant ainsi le caractère irréversible de cette inhibition.

Les dérivés maléimides sont aussi reconnus comme étant des inhibiteurs irréversibles d'enzymes dont le résidu catalytique est une cystéine. En effet, l'unique différence du dérivé maléimide avec le dérivé amide  $\alpha,\beta$ -insaturé est l'ajout d'un carbonyle venant cycliser le groupement électrophile.



**Figure 2.5 :** Réaction enzymatique entre le groupement thiolate du site actif de l'enzyme et le dérivé maléimide.



Or, il est connu dans la littérature que la *N*-éthylmaléimide inhibe irréversiblement la TGase, mais aucun paramètre cinétique n'est rapporté<sup>94</sup>. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détails le comportement des dérivés maléimides contenant un squelette de meilleure affinité avec la TGase et ainsi rapporter, pour la première fois, des paramètres cinétiques pour ce type d'inhibiteur.

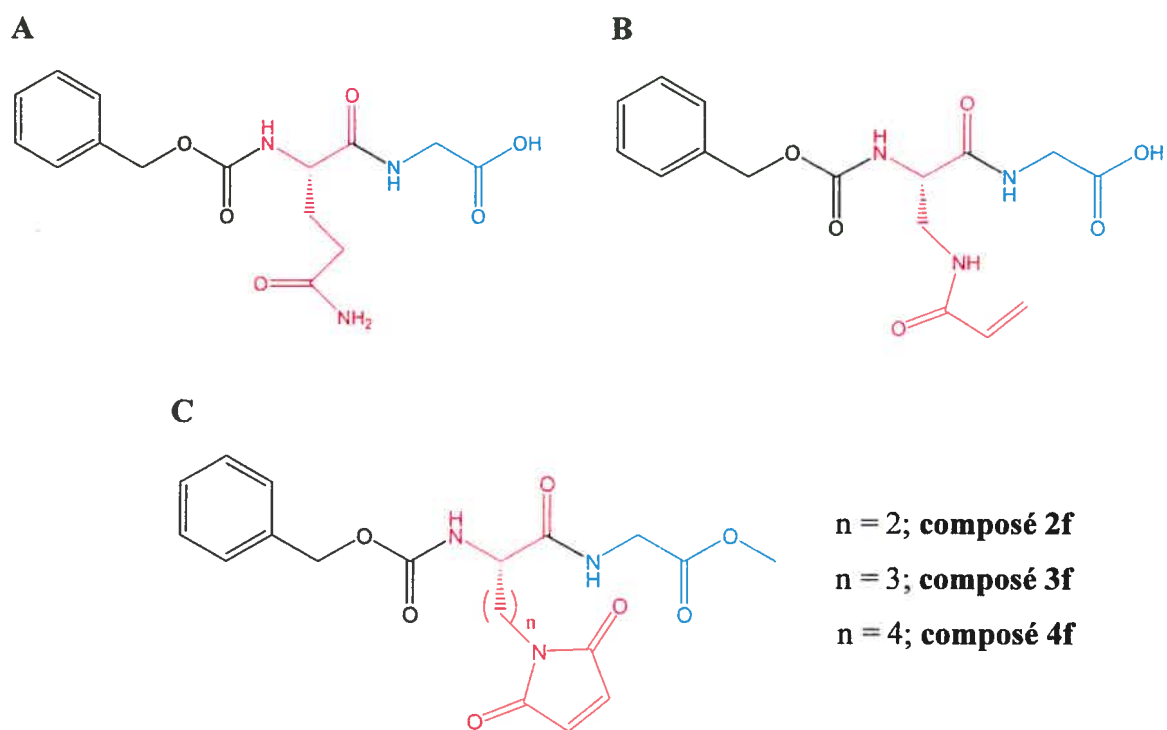
Le fait d'ajouter un carbonyle et d'ainsi cycliser le groupement réactif (par rapport au groupement amide  $\alpha,\beta$ -insaturé) apporte premièrement une certaine rigidité à l'électrophile, ainsi qu'un certain volume. Ce nouveau carbonyle est susceptible d'effectuer des interactions dipôle-dipôle avec un autre résidu du site actif. De plus, le groupement maléimide ne contient pas d'hydrogène sur l'atome d'azote, perdant ainsi la possibilité d'effectuer un pont hydrogène avec le site actif de l'enzyme. Enfin, ce carbonyle augmente la résonance dans la molécule, augmentant ainsi le caractère électrophile du carbone subissant l'attaque du groupement thiol. La réactivité pourrait donc être améliorée de cette façon.

Comme déjà mentionné, ce groupement électrophile doit être synthétisé sur un squelette de bonne affinité pour la TGase afin d'augmenter la spécificité de l'enzyme envers l'inhibiteur. Cette affinité pour l'enzyme est étudiée dans la section suivante.

### ***2.2.2 : Affinité de la transglutaminase***

Dans le but de synthétiser des inhibiteurs spécifiques de la TGase, il est effectivement important d'ajouter à l'électrophile un squelette qui aura une bonne affinité avec l'enzyme. Pour élaborer un médicament sans trop d'effets secondaires ou pour marquer la protéine sans trop de bruit de fond, il est important que l'inhibiteur soit le plus spécifique possible à sa cible, empêchant ainsi d'autres interactions parmi la mer de protéines constituant les cellules de l'être humain.

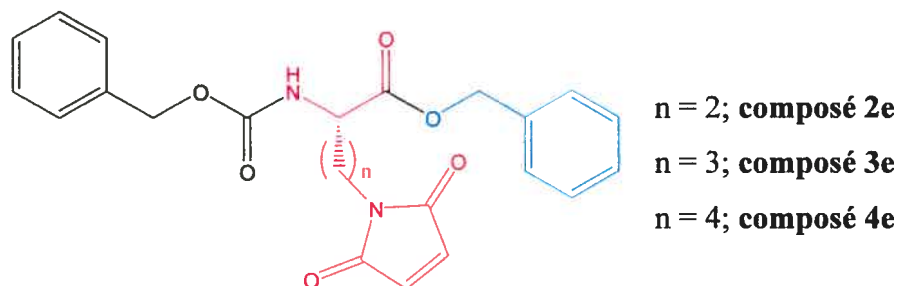
Depuis une cinquantaine d'années, le dipeptide Z-Q-G (carbobenzyloxy-glutaminyglycine) est un des substrats donneurs les plus utilisés de la transglutaminase tissulaire, ayant un  $K_M$  relativement bas, soit de 3 mM<sup>7</sup>. Comme déjà mentionné dans la **section 2.1**, des inhibiteurs contenant ce squelette peptidique mais dont le groupement  $\gamma$ -glutamyle a été remplacé par un électrophile de type dihydroisoxazole, amide  $\alpha,\beta$ -insaturé, époxyde ou 1,2,4-thiadiazole ont déjà été synthétisés et testés cinétiquement<sup>90,91,92</sup>, ces composés ayant des  $K_i$  de l'ordre du micromolaire. Ainsi, à des fins de comparaison, il serait intéressant de construire un inhibiteur contenant ce même squelette peptidique, mais dont l'électrophile serait un groupement maléimide, qui potentiellement pourrait améliorer l'affinité ou la réactivité envers la TGase (**figure 2.6 C**).



**Figure 2.6 :** A) Structure de  $N^\alpha$ -carbobenzyloxy-L-glutaminy-L-glycine (CBz-Gln-Gly) B) de  $N^\alpha$ -Carbobenzyloxy-L-2-amino-(3-acryloylamino)propionylglycine C) de  $N^\alpha$ -carbobenzyloxy-L-2,4-diamino- $N^\beta$ -maléimido-propionylglycinate de méthyle (pour  $n=1$ )

La fonction méthylester est ajoutée à la glycine simplement pour des raisons de simplicité de synthèse. Il est rapporté dans la littérature<sup>8</sup> que cette fonction n'affecte d'aucune façon l'efficacité catalytique de la TGase envers le substrat Cbz-Gln-Gly-OMe. En variant la longueur de la chaîne latérale entre 2 et 4 carbones, il s'agira d'une première série d'inhibiteurs à synthétiser.

Une deuxième série est envisageable. Au lieu d'avoir une glycineméthylester en C-terminale du composé, il serait intéressant d'ajouter un groupement protecteur hydrophobe tel qu'un benzylester. En effet, des études de modélisation de la transglutaminase tissulaire effectuée dans le groupe ont démontré que le substrat donneur devait se lier dans un sillon majoritairement hydrophobe<sup>40</sup>. Or, afin d'augmenter la possibilité d'interactions de Van der Waals entre les inhibiteurs et l'enzyme dans le but d'améliorer leur affinité, une deuxième série de composés sera synthétisée, en variant la longueur de la chaîne latérale de 2 à 4 carbones.



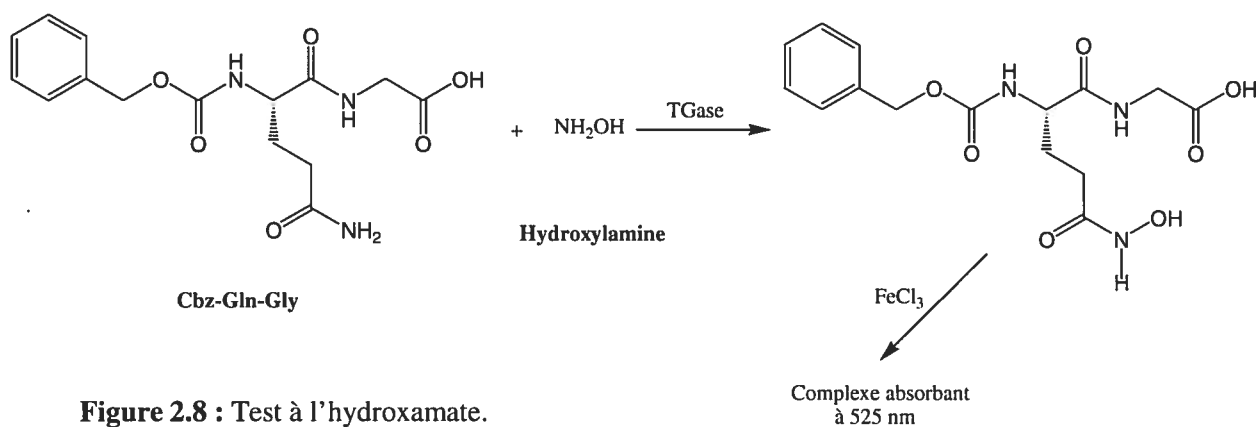
**Figure 2.7 :** Structure de  $N^{\alpha}$ -carbobenzyloxy-L-2,5-diamino- $N^{\beta}$ -maléimidopropionylate de benzyle (pour n=1)

De cette façon, deux séries de trois composés, formant au total six molécules synthétiques, ont été conçues dans l'espoir de découvrir de nouveaux inhibiteurs irréversibles de la TGase tissulaire. Toutes les étapes de la synthèse sont décrites dans l'**annexe 2** (article). La caractérisation des intermédiaires ainsi que des produits finaux est incluse dans l'**annexe 1**. La section suivante décrit toutes les expériences ainsi que les résultats des études d'inhibition.

### 2.3 : Suivi de la réaction enzymatique

Pour vérifier si l'enzyme est inhibé par la présence d'un composé synthétique, il fallait d'abord choisir une méthode de dosage de la TGase parmi celles déjà existantes dans la littérature.

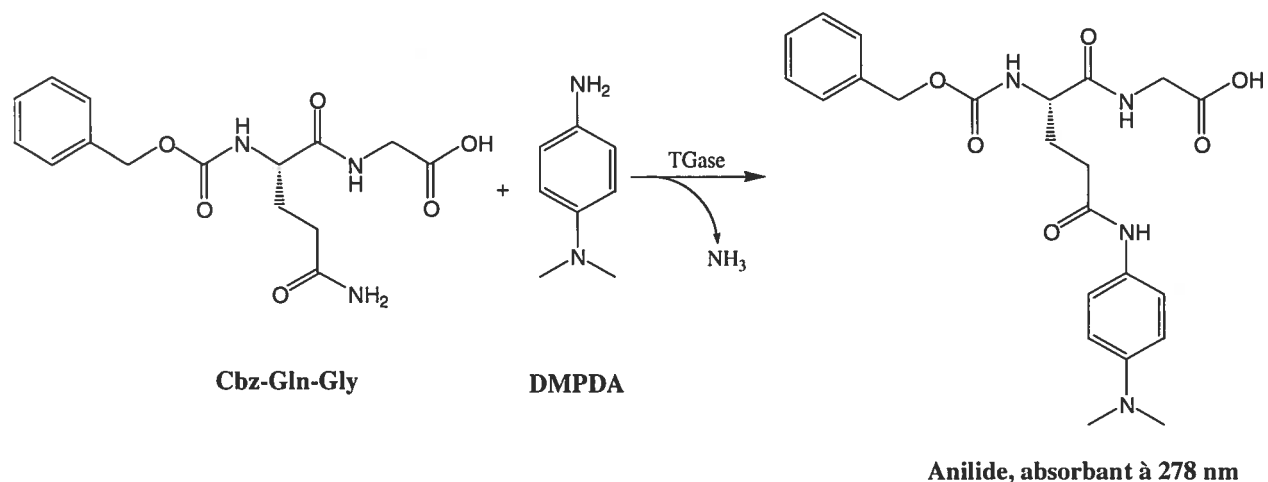
Le test à l'hydroxamate a été le premier développé<sup>8,95</sup>. Dans ce test, la TGase catalyse la formation du lien isopeptidique entre le substrat donneur Cbz-Gln-Gly et le substrat accepteur hydroxylamine. La réaction est arrêtée subitement par l'ajout d'une solution de FeCl<sub>3</sub>, qui se complexe au produit et forme un adduit détectable à 525 nm.



**Figure 2.8 :** Test à l'hydroxamate.

Le désavantage principal de cette méthode est le fait qu'elle soit discontinue. En effet, la réaction doit être arrêtée après plusieurs intervalles de temps pour doser la quantité de produits formés en fonction du temps, ce qui demande des étapes supplémentaires de travail. Pour cette raison, cette méthode ne sera pas choisie pour effectuer des expériences de compétition entre le substrat et les inhibiteurs synthétiques.

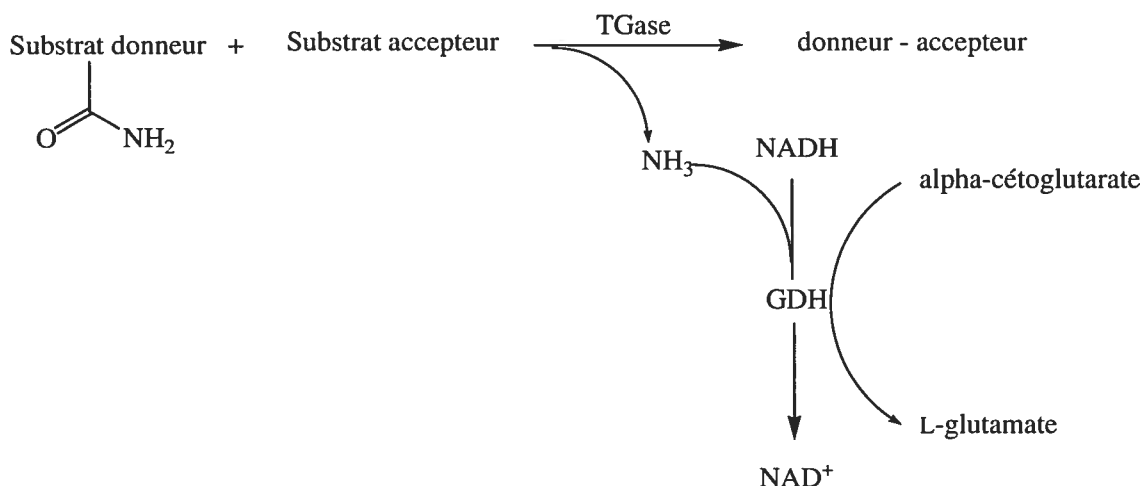
Pour remédier au problème de la discontinuité de la méthode de dosage, notre groupe a réussi à développer une méthode continue de dosage de l'activité de la TGase; il s'agit du test au DMPDA<sup>96</sup>. Dans ce cas-ci, l'hydroxylamine est remplacée par du *N,N*-diméthyl-*p*-phénylènediamine (DMPDA) en tant que substrat accepteur. L'anilide formé suite à la réaction de transamidation est détectable directement par spectrophotométrie, à une longueur d'onde de 278 nm.



**Figure 2.9 :** Test au DMPDA.

Cette méthode de dosage a effectivement l'avantage d'être continue. Ainsi, l'inhibition irréversible pourrait être directement vérifiée en mesurant la diminution de la vitesse initiale de la formation du produit en fonction de la concentration d'inhibiteur utilisée. Cette méthode pourrait donc être utilisée pour évaluer les paramètres cinétiques des inhibiteurs de la TGase. Par contre, il serait encore plus intéressant d'utiliser une méthode qui détecte spécifiquement la réaction d'acylation en dosant la vitesse de libération du groupement partant, puisque les inhibiteurs irréversibles devraient inactiver cette étape du mécanisme.

Ainsi, notre groupe de recherche a développé une troisième méthode, celle-ci permettant d'étudier spécifiquement l'étape d'acylation; il s'agit du test au GDH, ou glutamate déshydrogénase.<sup>97</sup> En effet, cette méthode mesure la quantité d'ammoniac libéré après l'acylation de l'enzyme. Ce dosage de l'ammoniac est résumé dans la **figure 2.10**.



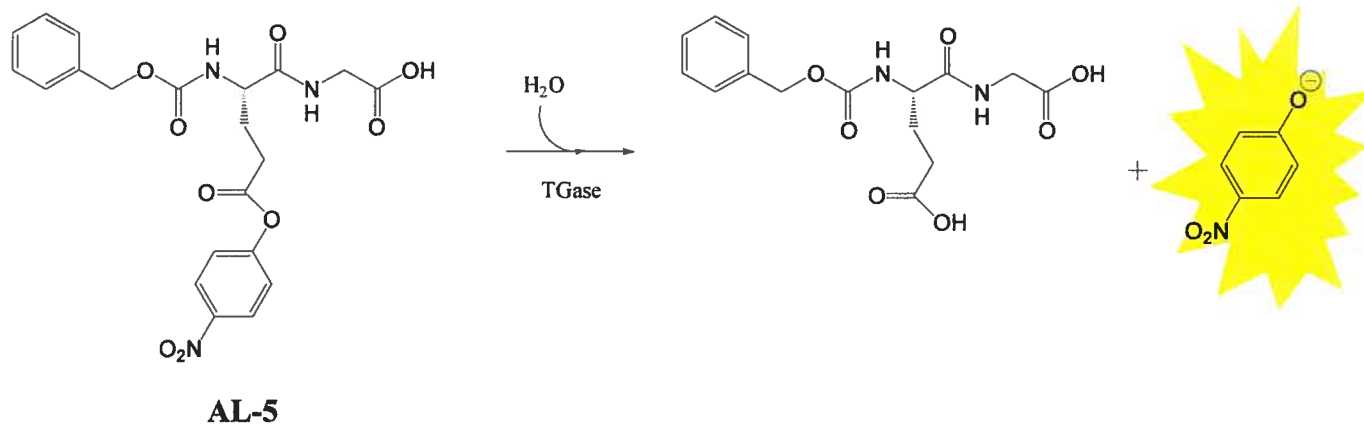
**Figure 2.10 :** Test au GDH.

L'ammoniac libéré suite à l'acylation de la TGase, ainsi qu'une molécule de NADH présente dans le milieu, sont consommés par la GDH pour catalyser la transformation de l' $\alpha$ -cétoglutarate en L-glutamate. Pendant cette réaction, on dose la consommation de NADH, absorbant à 340 nm. Ainsi, s'il y a libération d'ammoniac par la TGase, la GDH est activée et consomme le NADH présent. C'est ainsi qu'on mesure la diminution de la concentration de NADH, demeurant une indication de l'acylation de la TGase.

Par contre, il s'agit d'une méthode indirecte, car elle implique la réaction d'une deuxième enzyme. De plus, de façon pratique, la méthode est assez fastidieuse, car la réaction dosée est très lente et elle implique la préparation de plusieurs réactifs de départ.

C'est ainsi qu'une méthode plus simple et directe a été développée dans le groupe; c'est le test AL-5. Il s'agit du test le plus couramment utilisé dans notre groupe pour doser l'activité de la TGase<sup>98</sup>. AL-5 est une molécule reconnue par la TGase en tant que substrat donneur contenant un groupement chromophore. C'est un dérivé du CBz-Gln-Gly, mais dont le groupement amide de la chaîne latérale de la glutamine est remplacé par un groupement *p*-nitrophénylester. Lors de la réaction enzymatique, le

groupe partant n'est plus l'ammoniac, mais le *p*-nitrophénolate, qui est distinguable par sa couleur jaune et ainsi détectable à 400 nm par un spectrophotomètre UV-Vis (**figure 2.11**).



**Figure 2.11** : Suivi de l'activité de la TGase par l'hydrolyse enzymatique de AL-5. L'équation globale de la réaction enzymatique y est indiquée, où on remarque la libération du *p*-nitrophénolate.

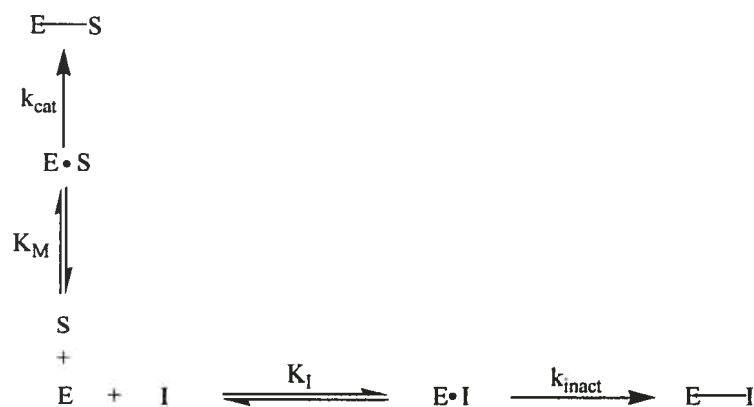
Puisqu'il s'agit d'un test direct, continu, très simple et mesurant la réaction d'hydrolyse de la TGase, les expériences de compétition entre ce substrat et les inhibiteurs seront effectuées à partir de cette méthode.

#### 2.4 : Test d'inhibition

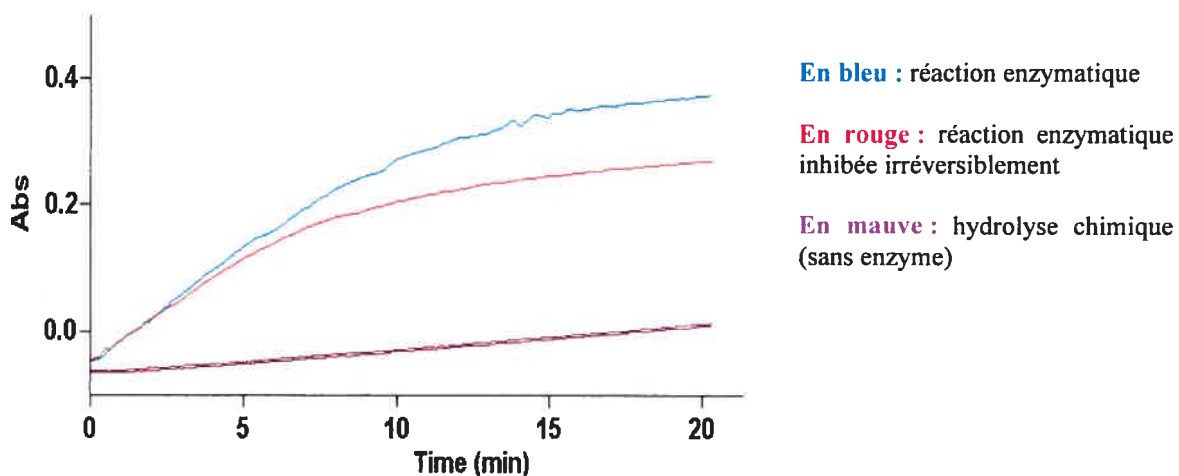
Les premiers tests cinétiques ont été effectués par compétition entre le substrat AL-5 et l'inhibiteur. Il s'agit de la méthode de Kitz & Wilson, demeurant la méthode la plus couramment utilisée pour déterminer les paramètres cinétiques d'un inhibiteur irréversible. Pour ce faire, on mesure l'hydrolyse enzymatique de AL-5 par la TGase en fonction du temps, et ce, en présence de différentes concentrations d'inhibiteur. Ce dernier compétitionne avec le substrat pour entrer dans le site actif de l'enzyme (un test de compétition a été effectué et les résultats sont représentés plus loin dans cette section). Plus l'enzyme a une meilleure spécificité pour l'inhibiteur, plus il sera piégé sous sa forme d'acyl-enzyme. Dans ce cas, puisqu'il y aurait moins d'enzymes disponibles, l'hydrolyse du substrat diminuerait avec le temps, jusqu'à atteindre un

plateau. Ce plateau n'indique plus l'hydrolyse complète du substrat, mais indique plutôt que l'enzyme est complètement inhibée. Ainsi « morte », l'enzyme ne catalyse plus l'hydrolyse du substrat et ainsi il n'y a plus d'augmentation de densité optique.

(A)



(B)



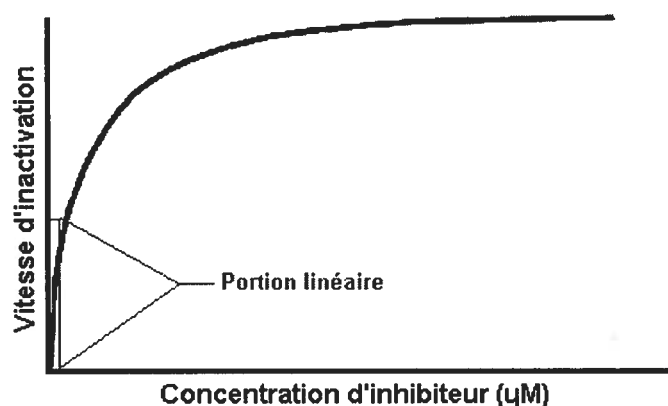
**Figure 2.12 :** (A) Représentation schématique d'une inhibition irréversible où il y a compétition entre le substrat S et l'inhibiteur I pour le site actif de l'enzyme E. (B) Détection du *p*-nitrophénolate par spectrophotométrie UV-Vis où on remarque l'augmentation de l'absorbance à 400 nm lors de l'hydrolyse enzymatique de AL-5 (en bleu), lors de l'hydrolyse enzymatique de AL-5 inhibée par un inhibiteur irréversible (en rouge) et lors de l'hydrolyse chimique de AL-5 (en mauve).

Pour chacune des concentrations d'inhibiteur testées, la pente initiale de la courbe expérimentale, représentant la vitesse initiale de la réaction, est calculée. Avec



ces valeurs, le graphique de la vitesse initiale en fonction de la concentration d'inhibiteur est tracé, correspondant à une courbe de saturation (**figure 2.12**). À partir de ce graphique, il est possible de déterminer les paramètres cinétiques tels que le  $K_I$  et le  $k_{inact}$  de l'enzyme envers chacun des inhibiteurs testés.

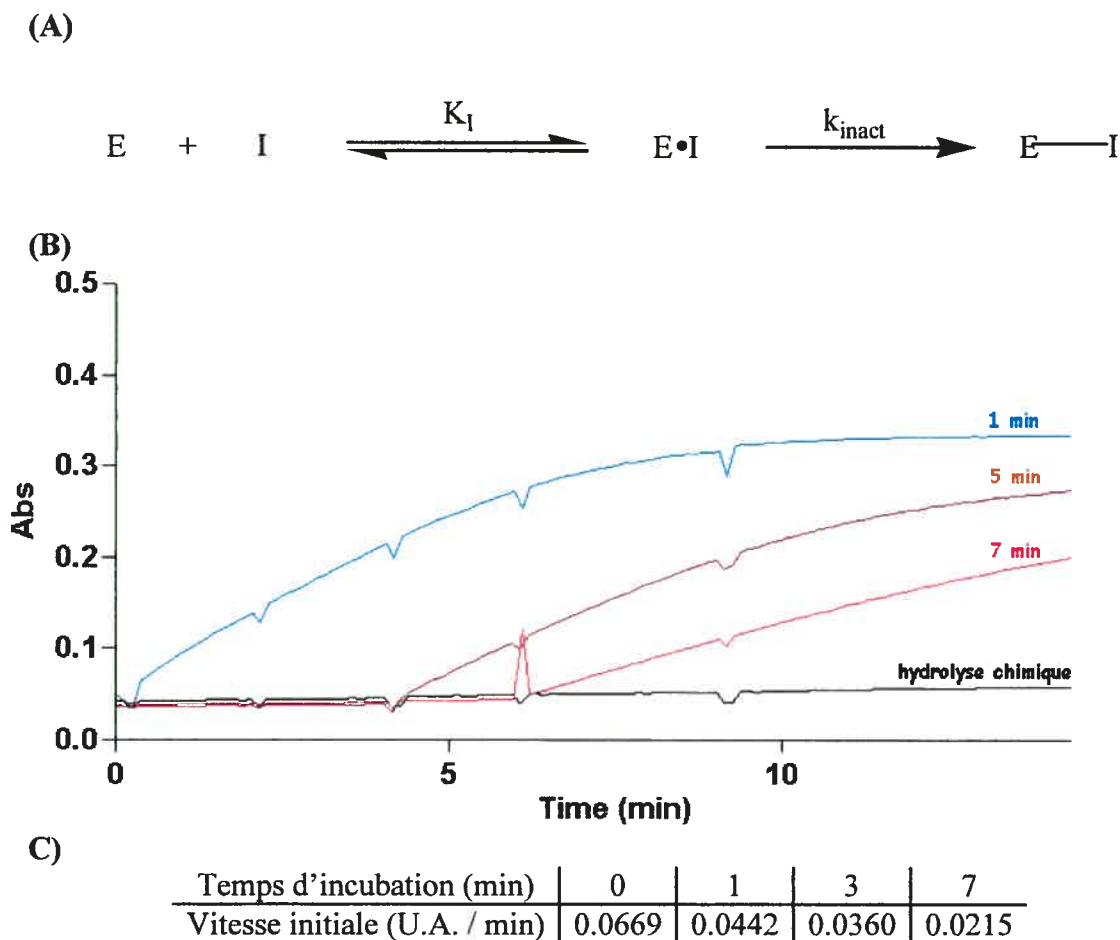
Par contre, dû à une faible solubilité des inhibiteurs et à une faible affinité envers l'enzyme, cette méthode ne nous a pas permis de déterminer les paramètres cinétiques des inhibiteurs. En effet, jusqu'à leur limite de solubilité, le plateau de la courbe de saturation n'était pas atteint ; seule la portion linéaire était obtenue. Dans ce cas, il était impossible de déterminer le  $K_I$  et le  $k_{inact}$  distinctement.



**Figure 2.13** : Courbe théorique de saturation d'un inhibiteur où il est indiqué la portion linéaire de la courbe qui est obtenue expérimentalement pour tous les inhibiteurs testés.

Pour tenter de minimiser les erreurs expérimentales, nous avons dû trouver un moyen d'éviter la compétition entre le substrat et les inhibiteurs puisque ces derniers semblent avoir une mauvaise affinité envers la TGase. C'est ainsi qu'une deuxième méthode a été développée et tentée.

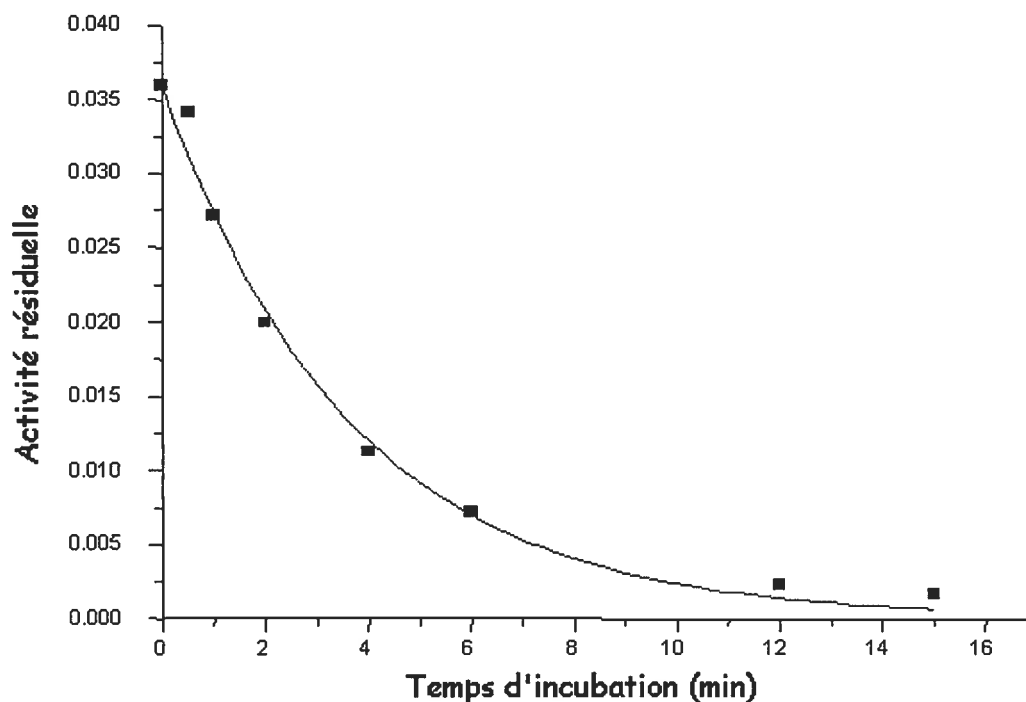
En absence de substrat, la TGase est incubée avec l'inhibiteur. Après différents temps d'incubation, un aliquot de cette solution est retiré et ajouté à une deuxième solution contenant le substrat AL-5, diluant par le fait même l'inhibiteur par un facteur de 40. L'activité résiduelle de la TGase est alors mesurée par spectrophotométrie en observant l'hydrolyse du substrat (**figure 2.14**). Cette méthode a donc l'avantage d'éliminer toute compétition entre le substrat et l'inhibiteur.



**Figure 2.14 :** (A) Représentation schématique d'une inhibition irréversible où il n'y a aucun substrat venant en compétition avec l'inhibiteur I pour le site actif de l'enzyme E. (B) Diminution de l'activité résiduelle (pente initiale) de la TGase en fonction du temps d'incubation (pour 1, 5 et 7 minutes) avec 25  $\mu\text{M}$  de l'inhibiteur 4e. Chaque pointe verticale représente le début d'un nouveau test d'activité résiduelle pour les différents temps x d'incubation. (C) Valeurs des pentes initiales (activités résiduelles) de la TGase incubée pendant 0, 1, 5 et 7 minutes en présence de 25  $\mu\text{M}$  du composé 4e.

Ces résultats bruts montrent une diminution de l'activité enzymatique en fonction du temps d'incubation avec l'inhibiteur. En d'autres termes, plus l'enzyme est incubé longtemps avec le composé synthétique, plus son activité résiduelle diminue. Dans le cas présenté à la **figure 2.14**, cette activité chute à 32 % de son activité normale lorsque la protéine est incubée pendant 7 minutes en présence de 25  $\mu\text{M}$  du composé 4e.

Pour chaque composé et pour chaque concentration d'inhibiteur utilisée (entre 15 et 1200  $\mu\text{M}$ ), un graphique de l'activité résiduelle de l'enzyme en fonction du temps d'incubation avec l'inhibiteur est tracé. La courbe correspondante suit une régression non-linéaire d'une fonction exponentielle d'ordre 1, pendant environ cinq demi-vies (figure 2.15).



**Figure 2.15 :** Activité résiduelle (vitesse initiale) de la TGase en fonction du temps d'incubation en présence de 1200  $\mu\text{M}$  du composé **2e**, courbe permettant de calculer le  $k_{\text{obs}}$  d'inactivation, pour chaque concentration d'inhibiteur.

Cette courbe exponentielle d'ordre 1 est décrite selon l'équation suivante :

$$y = Ae^{-k_{\text{obs}}t} \quad \text{où}$$

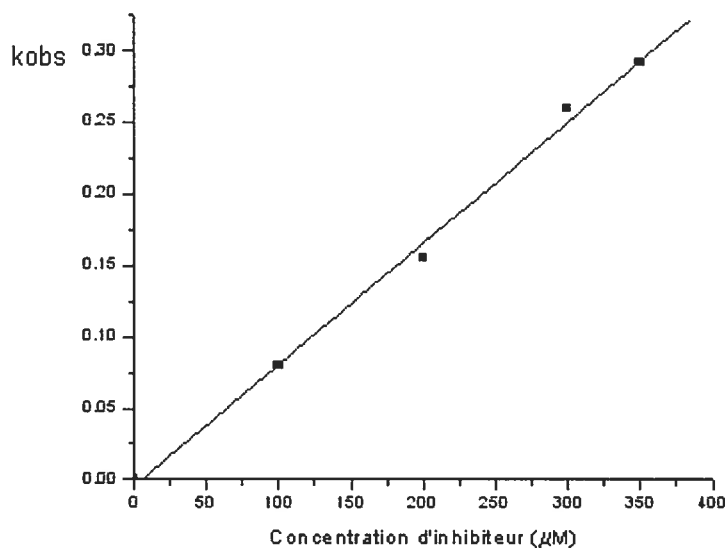
- $y$  représente l'activité résiduelle de la TGase
- $A$  représente l'amplitude de la courbe
- $k_{\text{obs}}$  représente l'intensité de la courbure
- $t$  représente le temps d'incubation de la TGase avec l'inhibiteur

Le  $k_{\text{obs}}$ , mesurant l'intensité de « la courbure » de la fonction, est une indication de l'inactivation de la TGase. Pour une concentration d'inhibiteur, plus le  $k_{\text{obs}}$  est élevé, plus l'enzyme est inhibée. Dans le cas présenté à la **figure 2.15**, 1200  $\mu\text{M}$  du composé **2e** donne une valeur de  $k_{\text{obs}}$  de  $0.274 \pm 0.015 \text{ min}^{-1}$ . Puisque le coefficient de régression

de ces courbes est autour de 0.99, on peut conclure que les valeurs de  $k_{obs}$  calculées sont représentatives.

Tous les inhibiteurs testés suivent ce type de courbe. Celle-ci nous permet de mieux voir que l'activité catalytique de la TGase est presque nulle après 15 minutes d'incubation avec 1200  $\mu\text{M}$  de **2e**. Le fait que la désactivation suive une cinétique de premier ordre indique qu'un complexe  $E \cdot I$  est formé, c'est-à-dire que l'inhibiteur est lié à l'enzyme *avant* de réagir. Une inactivation provoquée par un agent en solution et non lié à l'enzyme suivrait une cinétique de deuxième ordre. À l'aide de cette équation exponentielle de premier ordre, le  $k_{obs}$  est déterminé pour chaque concentration d'inhibiteur, et ce, pour tous les inhibiteurs.

Finalement, la relation entre le  $k_{obs}$  calculé et la concentration en inhibiteur qui y est associée devrait suivre une fonction exponentielle décrivant une courbe de saturation. Mais comme attendu, toujours jusqu'à la limite de solubilité des inhibiteurs, le plateau de la courbe n'est toujours pas atteint; on ne voit donc que la portion linéaire de la courbe (**figure 2.16**).



**Figure 2.16 :**  $k_{obs}$  en fonction de la concentration d'inhibiteur, donnant la portion linéaire de la courbe de saturation, dans le cas du composé **4e**.

Ainsi, jusqu'à la limite de solubilité des inhibiteurs (ici, 350  $\mu\text{M}$ ), les graphiques obtenus pour les différents composés suivent tous cette droite, représentant toujours la portion linéaire de la courbe de saturation.

Ainsi, il semblerait que les inhibiteurs inactivent bel et bien l'enzyme, mais leur affinité envers elle est relativement basse. En effet, il est impossible de déterminer la constante d'affinité  $K_I$  puisqu'elle serait beaucoup trop élevée, au-delà de la limite de solubilité des inhibiteurs. Par contre, la seule possibilité de déterminer les paramètres cinétiques sera de calculer le rapport  $k_{\text{inact}}/K_I$ , représentant la spécificité de l'enzyme envers l'inhibiteur; il s'agit de la pente retrouvée dans la courbe de saturation tracée. Pour cette raison, seuls les  $k_{\text{inact}}/K_I$  sont rapportés pour chacun des six inhibiteurs. Puisque le coefficient de régression se rapproche de 1, ces valeurs de pentes sont représentatives. Elles sont toutes indiquées dans le **tableau II**, en comparaison avec leur analogue de type amide  $\alpha,\beta$ -insaturé (composés **2g-4g**).

**Tableau II** : Paramètres cinétiques déterminés pour l'inhibition de la TGase tissulaire.

Composés	$k_{\text{inact}}/K_I$ ( $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{inact}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_I$ ( $\text{mM}^{-1}$ )
<b>2e</b>	$0.67 \pm 0.08$	-	-
<b>3e</b>	$6.26 \pm 1.69$	-	-
<b>4e</b>	$17.08 \pm 0.12$	-	-
<b>2f</b>	$0.28 \pm 0.03$	-	-
<b>3f</b>	$0.43 \pm 0.05$	-	-
<b>4f</b>	$0.83 \pm 0.01$	-	-
<b>2g</b>	1180	0.60	0.51
<b>3g</b>	890	0.75	0.85
<b>4g</b>	2200	0.49	0.23

## 2.5 : Discussion

Considérons premièrement l'influence de la longueur de la chaîne latérale ( $n$ ) sur l'efficacité d'inhibition des composés. Dans le cas des composés **2f**, **3f** et **4f**, les valeurs de  $k_{\text{inact}} / K_{\text{I}}$  doublent à chaque atome de carbone ajouté. Dans le cas des composés **2e**, **3e** et **4e**, elles augmentent d'un ordre de grandeur. Ces augmentations sont expliquées par le phénomène d'accessibilité du groupement électrophile au nucléophile du site actif. Selon les études de modélisation effectuées dans le groupe<sup>40</sup>, la chaîne latérale pénètre à l'intérieur du tunnel donnant accès au site actif de l'enzyme. Si cette chaîne n'est pas assez longue, l'électrophile aura de la difficulté à atteindre le nucléophile, causant ainsi une diminution de la réactivité. En d'autres termes, le paramètre  $k_{\text{inact}}$  (du rapport  $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ ) est diminué, car l'inhibiteur met plus de temps à atteindre le nucléophile. Il ne faut pas oublier que le dipeptide Cbz-Asn-Gly<sup>8</sup>, contrairement au Cbz-Gln-Gly, n'est pas du tout reconnu par l'enzyme en temps que substrat, ce qui nous mène à croire qu'une longueur minimale de la chaîne latérale est essentielle pour la réactivité.

Deuxièmement, considérons l'influence du groupement protecteur R sur l'efficacité d'inhibition des composés. Selon les valeurs obtenues, les esters de benzyle sont plus efficaces pour inhiber l'enzyme que les dipeptides. Toujours selon les études de modélisation effectuées dans le groupe<sup>40</sup>, le sillon où le composé devrait se lier à l'enzyme est majoritairement hydrophobe. De cette manière, cette cavité entraîne des interactions hydrophobes avec les deux groupements aromatiques de ces composés. Cette interaction pourrait avoir l'effet de diminuer le  $K_{\text{I}}$  et ainsi augmenter le rapport  $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ , expliquant la tendance parmi les valeurs cinétiques obtenues.

Dernièrement, comparons la différence entre les dérivés maléimides et acrylamides. Les paramètres cinétiques indiquent que les analogues maléimides sont environ  $10^3$ - $10^4$  fois moins efficaces à inhiber l'enzyme. Pourtant, les composés ne diffèrent que par un seul carbonyle venant compléter l'hétérocycle. Normalement, la réactivité des maléimides est supérieure à celle des acrylamides, car la présence du deuxième carbonyle vient activer le lien double, le rendant plus électrophile. Par ce raisonnement, on supposerait que le  $k_{\text{inact}}$  des analogues maléimides serait plus élevé que

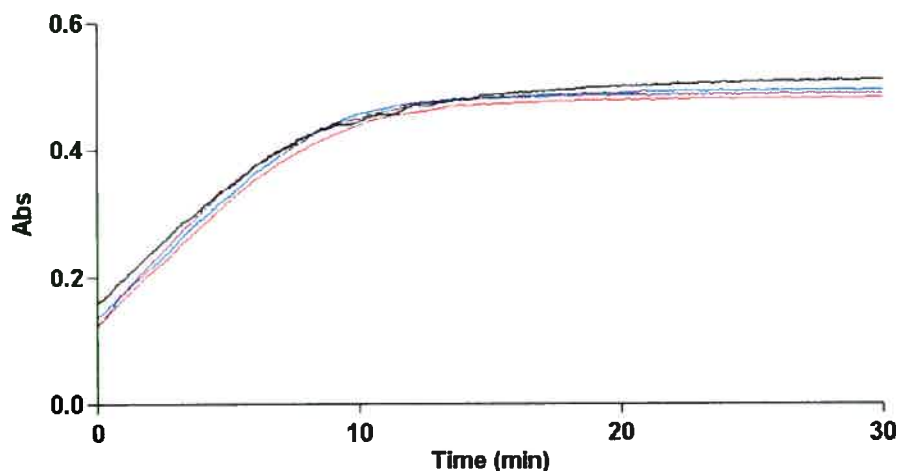
celui des acrylamides. Par contre, les valeurs des ratios sont plus petites. Ces valeurs observées s'expliqueraient donc par un  $K_I$  très élevé dû à une mauvaise affinité. Cette affirmation explique la raison pour laquelle la saturation n'a pas été atteinte lors des tests d'inhibition. Cette diminution flagrante d'affinité serait causée par le grand volume du maléimide. En effet, cet hétérocycle, étant plus volumineux que l'acrylamide, aurait de la difficulté à pénétrer dans le tunnel menant au site actif de la TGase, étant très restreint stériquement selon les études de modélisation du groupe<sup>40</sup>. L'électrophile ne pouvant pas rejoindre le nucléophile, l'efficacité d'inhibition des dérivés de maléimide se trouve très faible. La perte possible d'un pont hydrogène entre les dérivés maléimides et l'enzyme (par la perte de l'atome d'hydrogène sur l'azote) pourrait aussi être une des causes de cette baisse d'affinité.

## **2.6 : Rôle de l'EDTA lors des tests cinétiques**

À la toute fin de ces expériences d'inhibition enzymatique, on a constaté que le protocole standard utilisé dans le groupe comportait une petite ambiguïté. Dans la solution de préincubation de la TGase avec l'inhibiteur, il y avait 10 fois plus d'EDTA que dans la solution où l'activité résiduelle est mesurée. C'est alors que nous avons voulu vérifier si l'EDTA intervient ou non dans l'activité catalytique de la TGase.

L'EDTA est un agent chélateur très puissant, chélatant tous les cations présents, sauf le  $Ca^{2+}$ . Anciennement, il était ajouté à la solution de TGase qui était purifiée directement à partir de l'organe animal. En effet, puisque l'enzyme provenait d'un homogénat d'organe, il était effectivement important de chélater les ions pour qu'ils n'interfèrent pas dans la réaction enzymatique mesurée par la suite. Or, maintenant qu'on travaille avec la TGase recombinante, et en plus qu'elle soit désalinisée en dernière étape de purification, l'EDTA est-il toujours utile? L'utilisons-nous encore que pour des raisons historiques? C'est pour cette raison que l'importance de l'EDTA a donc été testée de la manière suivante.

Un test AL-5 typique a été effectué, mais en variant la concentration d'EDTA présent dans le tampon, soit de 0, 0.1, 0.5 et de 1 mM. Les résultats sont représentés à la **figure 2.17**.



**Figure 2.17** : Test enzymatique de la TGase hydrolysant le substrat AL-5, avec 0, 0.1, 0.5 et 1 mM d'EDTA présent dans le milieu réactionnel.

Le graphique montre que toutes les vitesses initiales sont constantes, peu importe la concentration de EDTA. Par ces résultats, nous pouvons conclure avec certitude que l'EDTA n'est plus d'utilité lors de tests enzymatiques impliquant des protéines recombinantes. Ainsi, nous avons prouvé que l'erreur dans le protocole des tests d'inhibition n'a aucun effet sur les paramètres cinétiques obtenus.

### **2.7 : Liaison de l'inhibiteur irréversible au site actif de l'enzyme**

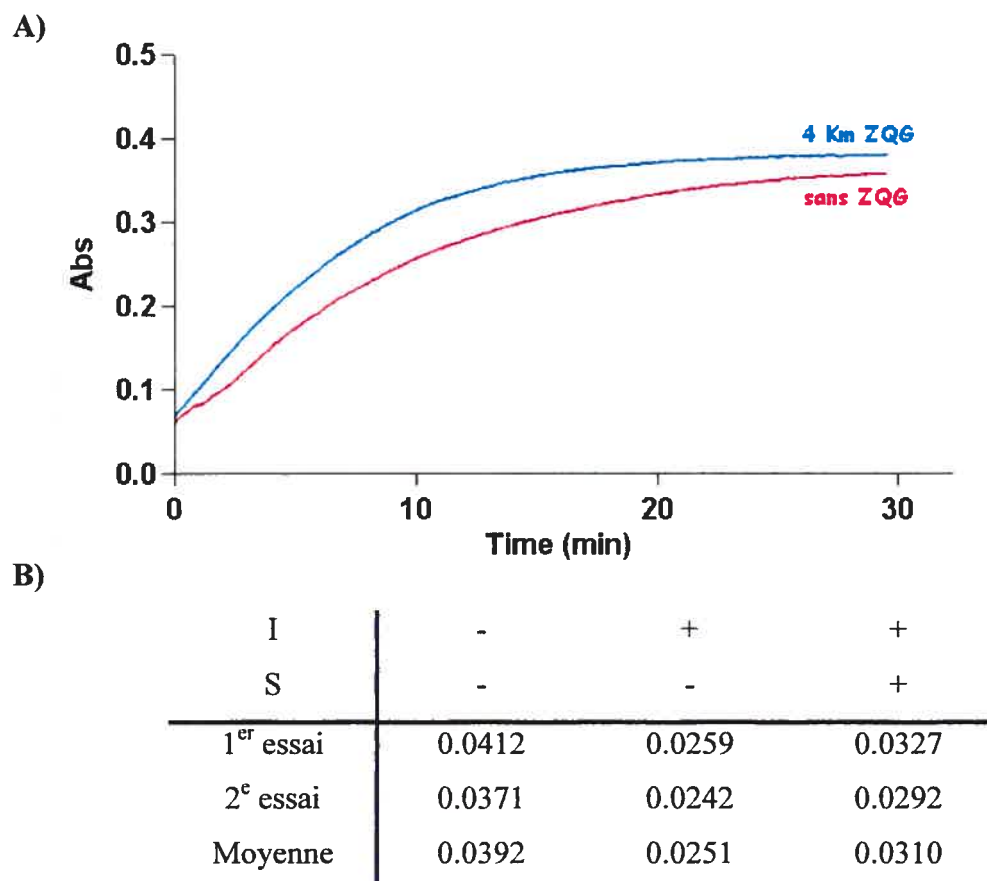
Pour valider les résultats d'inhibition obtenus, il fallait effectuer une dernière expérience. La courbe de saturation obtenue pour tous les inhibiteurs irréversibles de type maléimide de la TGase ont été une droite; aucun plateau n'a été atteint. Or, on pourrait se poser les questions suivantes : « S'agit-il d'une cinétique de saturation? L'inhibiteur se lie-t-il au site actif pour inhiber l'enzyme? Ou se lie-t-il ailleurs? »

Le  $k_{obs}$  d'inactivation en fonction du temps d'incubation suit une exponentielle de premier ordre (**figure 2.15**). Or, il reste à vérifier s'il s'agit d'une cinétique de pseudo-premier ordre. En effet, ce type de cinétique est retrouvé dans des réactions de



deuxième ordre où la concentration initiale d'un des deux réactifs est beaucoup plus grande que l'autre. Dans notre cas, la concentration de l'enzyme est au moins 10 fois plus faible que la plus petite concentration d'inhibiteur utilisée. Le cas du pseudo-premier ordre est alors possible.

Pour vérifier si l'enzyme se lie bien au site actif de l'enzyme, des expériences de compétition entre l'inhibiteur et le substrat Cbz-Gln-Gly ont été effectuées. Pour ce faire, 100  $\mu\text{M}$  d'inhibiteur et 12 mM de ZQG ( $4 K_M$ ) sont incubés avec l'enzyme pendant 20 minutes à la température de la pièce. Suite à cette incubation, un aliquot de cette solution de préincubation est prélevé et ajouté dans une autre solution contenant AL-5. L'activité résiduelle de la TGase est alors mesurée par hydrolyse d'AL-5.



**Figure 2.18 :** A) Activité résiduelle de la TGase suite à une incubation de l'enzyme avec l'inhibiteur **2e** ou avec l'inhibiteur **2e** et  $4 K_M$  de ZQG. B) Vitesses initiales rapportées.

En présence de 100  $\mu\text{M}$  d'inhibiteur **2e**, l'activité catalytique de la TGase chute à 64 % de son activité maximale. Par contre, en présence de 4  $K_M$  de substrat, l'enzyme est active à 80 %. La TGase est donc plus active en présence de substrat, car celui-ci protège le site actif de l'enzyme.

Donc, en présence de beaucoup de substrat, l'inhibiteur arrive mal à inhiber la TGase. On peut donc conclure que l'inhibiteur se lie au site actif de l'enzyme, car il est maintenant prouvé qu'il compétitionne pour ce site avec le substrat.

### **2.8 : Conclusion**

En résumé de cette étude cinétique, les deux séries d'inhibiteurs de type maléimide présentées confirment la validité de la structure d'inhibiteur de type peptidique de la TGase, contenant un électrophile sur une longue chaîne latérale. Le groupement maléimide, pourtant connu pour sa capacité d'inhiber les enzymes thiol-dépendants, est trop volumineux pour permettre une bonne insertion et une orientation productive dans le tunnel menant au site actif de l'enzyme. Les dérivés maléimides ne sont donc pas de bons inhibiteurs de la TGase, étant  $10^2$ - $10^4$  fois moins efficaces que leurs analogues  $\alpha,\beta$ -insaturés. Ainsi, les prochaines générations d'inhibiteurs irréversibles de la TGase ne devront pas contenir ce groupement électrophile. Ces résultats ont été publiés dans un « Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters ».<sup>99</sup>

L'importance de la présence d'EDTA lors des tests cinétiques d'AL-5 a été testée. Pour ce faire, la vitesse initiale enzymatique de libération du *p*-nitrophénolate a été comparée avec 0-1 mM d'EDTA. De toute évidence, la vitesse enzymatique n'a aucunement été affectée sans EDTA. En fait, cet agent chélateur était anciennement utilisé lors des tests cinétiques d'enzymes purifiés d'un organe, où la concentration en ions est très élevée. Une enzyme recombinante provenant d'une surexpression dans une cellule n'a donc pas besoin d'EDTA.

Finalement, nous avons prouvé que les composés synthétiques inactivent l'enzyme en se liant spécifiquement à son site actif. Cette affirmation a été vérifiée en

étudiant la compétition entre le substrat donneur ZQG et l'inhibiteur **2e**. En présence de  $4 K_M$  de substrat, l'inhibiteur inactive approximativement deux fois moins efficacement l'enzyme. Le substrat semble protéger le site actif de l'enzyme, car l'enzyme a plus de difficulté à y pénétrer.

# CHAPITRE 3

## **3 : Biologie moléculaire et expression de la transglutaminase tissulaire humaine**

### **3.1 : Introduction**

La simplicité des processus de clonage et de sous-clonage d'aujourd'hui contribue largement à la possibilité de synthétiser des protéines rapidement, avec un meilleur rendement et avec une plus grande pureté.

En fait, il est connu depuis plusieurs années que la synthèse protéique effectuée *in vivo* est plus efficace que *in vitro*. La synthèse *in vitro*, qu'elle soit sur support solide ou en solution, demande le couplage d'un acide aminé protégé suivi d'un clivage du groupement protecteur, et ce, pour chaque résidu additionné. Malgré les récentes améliorations significatives apportées par le domaine de la chimie des protéines synthétiques<sup>100</sup>, il est envisageable d'utiliser une méthode *in vivo* afin de produire une protéine recombinante de plus de 700 acides aminés telle que la transglutaminase tissulaire. Pour ce faire, on modifie génétiquement une bactérie ou une levure pour lui demander de surexprimer la protéine à l'aide de sa propre machinerie métabolique, un processus relativement plus simple. C'est de cette façon que la pluridisciplinarité de la chimie bio-organique apporte l'avantage de tirer profit des meilleures techniques de plusieurs champs d'étude.

Lors de l'expression d'une protéine, celle-ci se replie de sorte à ce que la majorité de ces résidus hydrophobes s'enfouit vers le centre de la protéine, exposant ainsi les résidus hydrophiles à la surface. Cette conformation qu'elle adopte augmente évidemment sa solubilité dans l'eau. Idéalement, les protéines bactériennes devraient être exprimées dans des cellules procaryotes, tandis que des protéines humaines dans des cellules eucaryotes. Toutefois, l'expression d'une protéine recombinante humaine dans des bactéries est une méthode généralement utilisée, car elle est simple et rapide. En contre partie, ceci ne représente pas nécessairement un système adéquat, la machinerie métabolique de la bactérie étant différente de celle d'un eucaryote, ceci pouvant donc empêcher un bon repliement de la protéine. Or, pour favoriser un meilleur repliement, il

est possible de varier les paramètres de l'expression dans le but de ralentir la synthèse protéique et ainsi donner plus de temps à la protéine de mieux se replier. De plus, on peut modifier génétiquement la bactérie pour lui demander de synthétiser des chaperones protéiques ayant le rôle d'aider au bon repliement des protéines *in vivo*. Plusieurs moyens sont donc à notre disposition pour améliorer la solubilité d'une protéine.

Prenant en considération toutes ces analyses, l'expression de la transglutaminase humaine (hTGase) a été tentée dans plusieurs systèmes bactériens et selon plusieurs conditions différentes. La **section 3.3** décrit en détails tous les essais d'expression effectués dans le cadre de mon projet de maîtrise.

Une présentation générale des principes de base de la biologie moléculaire et de l'expression sera d'abord présentée à la **section 3.2**, afin d'assurer une meilleure compréhension des expériences effectuées.

### **3.2 : Les processus de sous-clonage et d'expression protéique**

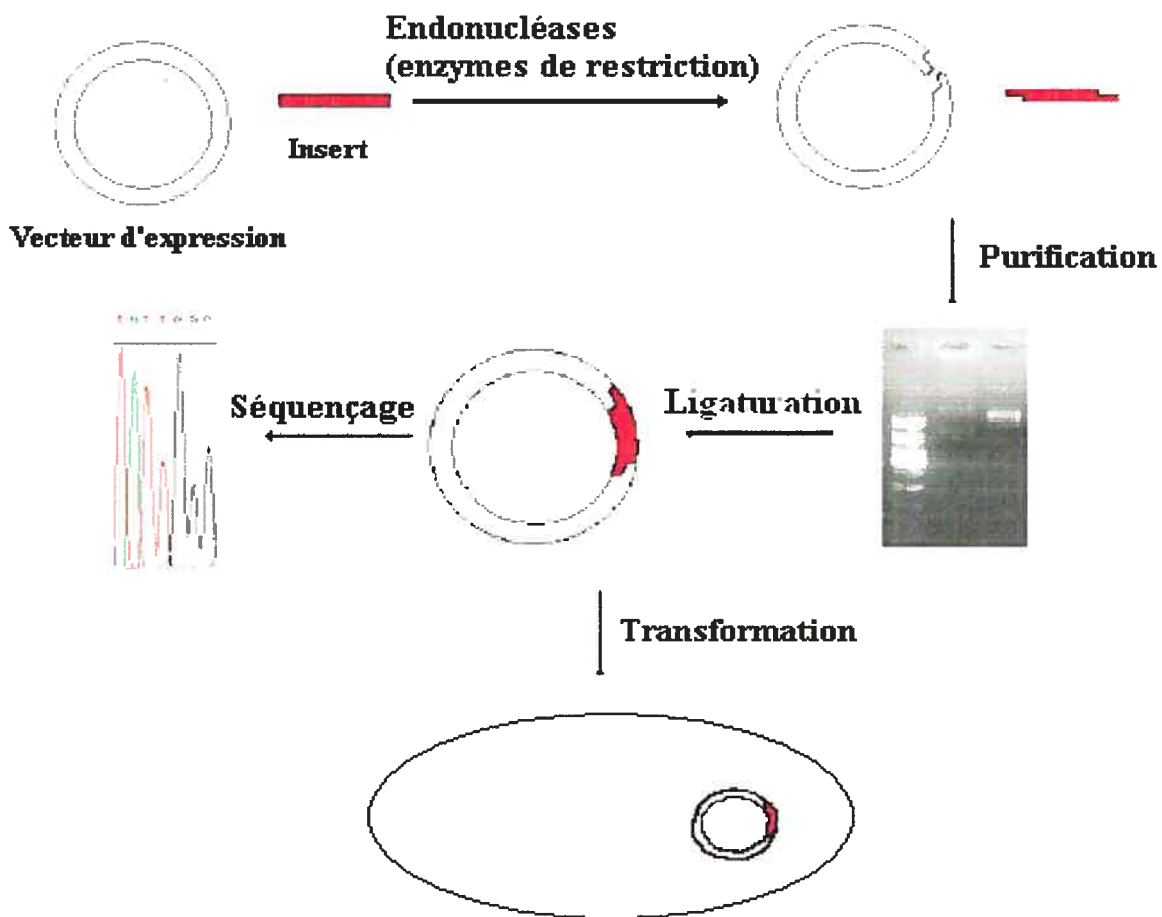
Le sous-clonage est le processus par lequel on introduit un gène désiré dans un vecteur d'expression afin d'exprimer la protéine que ce gène code. Pour ce faire, on doit d'abord amplifier ce gène par PCR. La PCR, ou « Polymerase Chain Reaction », est un processus très simple par lequel on amplifie une section d'ADN selon la succession de trois étapes : dénaturation de l'ADN en portant la température à 92 °C afin de séparer les deux brins, hybridation d'amorces qui délimitent la section d'ADN à amplifier en diminuant la température à 55-65 °C et élongation du gène effectuée par une polymérase thermostable en fixant la température à 72 °C. Ce cycle est répété une trentaine de fois et contrôlé uniquement par une variation de température: dénaturation / hybridation / élongation. Ceci permettra d'amplifier de manière exponentielle le gène désiré.

Par la suite, on doit digérer le gène amplifié et le vecteur désirés par deux enzymes de restriction, coupant à des séquences très spécifiques d'ADN, permettant de former des « bouts collants ».



**Figure 3.1 :** Formation des bouts collants. Exemple de digestion par *EcoRI*, qui reconnaît spécifiquement la séquence 5' GAATTC 3'.

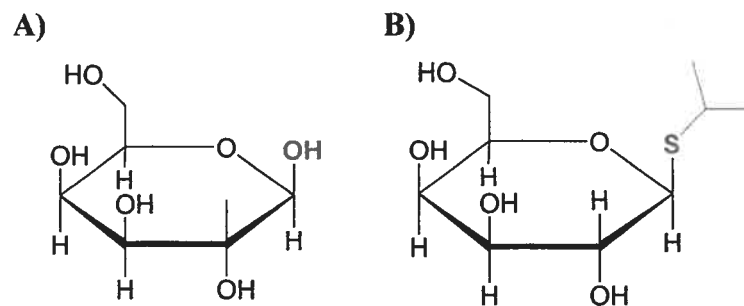
Après avoir purifié le vecteur et le gène digérés, on effectue la ligaturation des bouts collants à l'aide de la T4 ligase. Enfin, le plasmide est maintenant construit. Il faut ensuite effectuer une transformation (chimique ou électrophorétique) ou une transfection afin d'introduire le plasmide à l'intérieur de la souche bactérienne désirée, puis sélectionner les colonies positives (donc contenant le plasmide) et enfin tenter l'expression. Afin de vérifier si le gène est introduit dans le bon cadre de lecture et sans mutation, un séquençage est normalement effectué.



**Figure 3.2 :** Processus général du sous-clonage.

Une fois que la bactérie a été transformée, elle est maintenant apte à surexprimer la protéine d'intérêt. L'expression se fait généralement de la manière suivante. Une préculture est effectuée pour faire croître les bactéries au maximum. Ensuite, une fraction de cette préculture est ajoutée dans un plus grand volume de milieu de culture frais. On laisse croître les bactéries jusqu'à une densité optique désirée (normalement  $D.O._{600nm} = 0.6$ ). Enfin, on induit l'expression par l'ajout d'IPTG.

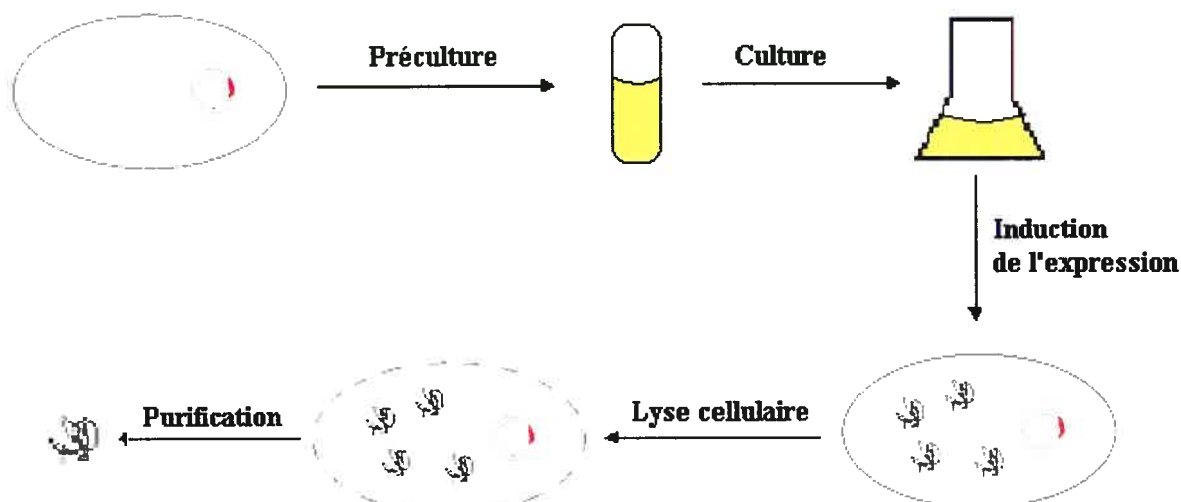
L'IPTG, ou isopropylthiogalactoside, est un analogue synthétique du galactose, inducteur *in vivo* de l'expression dans l'opéron *lac* présent dans le vecteur. Étant non hydrolysable par la cellule, ce composé ne change pas de concentration une fois à l'intérieur (contrairement au galactose). Son rôle est donc d'induire la transcription d'un gène, et ce, en liant fortement le répresseur qui empêche la liaison de l'ARN polymérase au promoteur de l'opéron *lac* du vecteur.



**Figure 3.3** : Structure du galactose (A) comparativement à son analogue synthétique, l'IPTG (B).

On laisse donc l'expression se faire pendant un certain temps. Ensuite, on effectue une lyse cellulaire (généralement par sonication ou par French Press) pour en extraire le contenu. Ensuite, il ne suffira qu'à purifier la protéine. Tout ce processus d'expression est illustré à la **figure 3.4**.





**Figure 3.4 :** Processus général d'expression.

Afin d'améliorer les rendements d'expression de la protéine, tous ces paramètres d'expression décrits dans la section 3.2 peuvent être variés. Dans les sections suivantes, on rapporte tous les essais d'expression de la transglutaminase tissulaire humaine, et ce, dans différents systèmes d'expression.

### **3.3 : Essais d'expression de la hTGase**

#### ***3.3.1 : Expression dans BL21(DE3)- pJLP4***

Le plasmide pJLP4 est un vecteur pET28a où le gène de la hTGase a été cloné entre les sites de restriction *Hind*III et *Nde*I<sup>101</sup>. Après une recherche littéraire, on a constaté que ce plasmide introduit dans la souche BL21(DE3) de *E. coli* était le système d'expression de la hTGase offrant de loin le meilleur rendement.

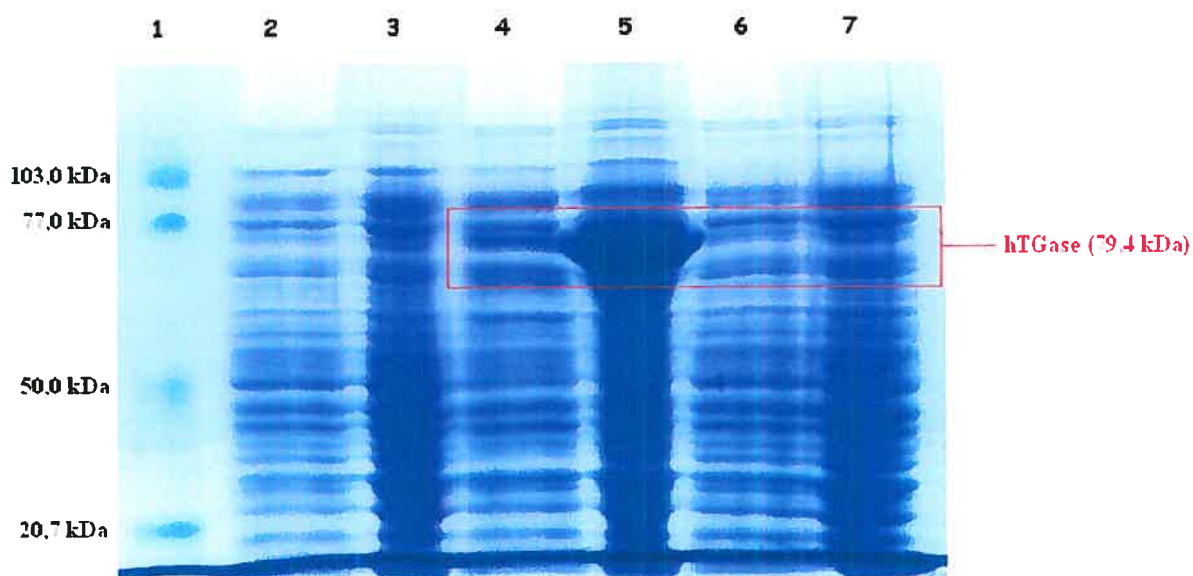
**Tableau III :** Rendement et activité spécifique de la hTGase exprimé selon différents systèmes.

Groupe	Système d'expression	Rendement (mg/L)	Activité spécifique (μmol/min mg)
Khosla <sup>101</sup>	BL21(DE3)pET28a-HTG (pJLP4)	5.0-8.0	-
Kim <sup>102</sup>	BL21(DE3)pET30 Ek/LIC-HTG	0.6	0.73
Cerione <sup>103</sup>	BL21(DE3)-pGEX-MCS-HTG	-	1.0

Construit par le groupe de Khosla, pJLP4 nous a été gracieusement fourni. De plus, nous avons eu la confirmation de leur part que le gène avait été complètement séquencé et qu'aucune mutation n'avait été détectée. Ainsi, ce système d'expression ainsi que le protocole de Khosla furent le point de départ afin d'obtenir la hTGase pour la première fois dans notre groupe.

pJLP4 a été transformé chimiquement dans des BL21(DE3), une souche provenant de *E. coli*. En fait, avec un système d'expression pET tel que pJLP4, nous n'avons autre choix que d'utiliser une souche telle que BL21(DE3). Effectivement, le promoteur du vecteur pET, c'est-à-dire la séquence d'ADN du vecteur ayant une affinité pour la polymérase, est un promoteur T7 ayant uniquement une affinité avec la polymérase T7. Or, cette polymérase est exprimée dans la souche BL21(DE3). Par contre, la souche XL1 exprime plutôt la Taq polymérase, ayant uniquement une affinité pour le promoteur T5 contenu dans les vecteurs pQE. Il faut donc faire le bon choix de vecteur pour la bonne souche bactérienne, sinon on aura une bonne surprise!

Le plasmide a donc été transformé dans des BL21(DE3). Ensuite, selon le protocole de Khosla, l'induction de l'expression devait se faire avec 1  $\mu$ M d'IPTG, pendant 20 heures à 20 °C. En utilisant si peu d'IPTG et en incubant à une température aussi basse, ce groupe de recherche a tenté de ralentir l'expression pour permettre un bon repliement de la protéine, qui est assez hydrophobe donc peu soluble (**figure 3.1**). Cette condition d'expression a été tentée dans notre laboratoire, mais sans succès : aucune expression de la hTGase n'a été détectée, et ce vérifiée par SDS-PAGE. Pour tenter le tout pour le tout, la même expérience a été refaite, mais avec 1 mM d'IPTG. À cette concentration d'IPTG, l'expression a bel et bien eu lieu, mais la totalité de la hTGase a précipité (**figure 3.5**).



**Figure 3.5 :** SDS-PAGE obtenu lors de la vérification de l'expression de hTGase dans le système bactérien BL21(DE3)-pJLP4 (coloration au bleu de Coomassie). *Puits 1* : Low range marqueur; *Puits 2, 3* : surnageant et culot après la lyse de BL21(DE3); *Puits 4, 5* : surnageant et culot après la lyse de BL21(DE3)-pJLP4 avec 1 mM IPTG; *Puits 6, 7* : surnageant et culot après la lyse de BL21(DE3)-pJLP4 avec 1  $\mu$ M IPTG.

Un test d'activité à l'hydroxamate (**figure 2.8**) ainsi qu'un test de concentration de Bradford ont été effectués sur les surnageants de lyse du contrôle (BL21(DE3) vide) et du BL21(DE3)-pJLP4 toutes deux incubées en présence de 1 mM d'IPTG afin de vérifier si ces fractions contenaient une quelconque activité de transglutaminase. De cette manière, l'activité spécifique des deux échantillons a été calculée ; le **tableau IV** présente ces résultats.

**Tableau IV :** Activités spécifiques obtenues dans le surnageant de lyse de BL21(DE3) et BL21(DE3)-pJLP4, toutes deux incubées en présence de 1 mM d'IPTG.

Souche bactérienne	Concentration d'IPTG (mM)	Concentration en protéines dans le surnageant de lyse (mg/mL)	Activité spécifique dans le surnageant de lyse (U/mg)
BL21(DE3)	1	18,0	0,117
BL21(DE3)-pJLP4	1	23,2	0,110

\* Une unité d'activité réfère à un  $\mu$ mol de complexe absorbant à 525 nm formé par minute.

Selon ces résultats, il semble qu'il y ait autant d'activité dans la souche vide que dans la souche contenant le plasmide. Ceci démontre avec certitude que la protéine est complètement insoluble dans ces conditions d'expression.

C'est donc ainsi qu'on a tenté de varier ces conditions d'expression et de purification afin d'améliorer la solubilité de la protéine. Pour ce faire, on a varié les paramètres suivants : la concentration d'IPTG ajouté, la température d'incubation, le temps d'incubation et la méthode de lyse cellulaire (French Press et sonication). Le **tableau V** résume les résultats de toutes ces tentatives.

**Tableau V** : Expression dans BL21(DE3) pJLP4.

Conditions d'induction			Méthode de lyse cellulaire	Résultats	
Concentration d'IPTG ( $\mu$ M)	Température ( $^{\circ}$ C)	Temps (h)			
1000	28	20	Sonication	Précipitation	
1	24			Aucune expression	
1000				Précipitation	
1	20			Aucune expression	
2				Aucune expression	
5				Aucune expression	
10				Précipitation	
20				Précipitation	
50				Précipitation	
100				Précipitation	
1000		Précipitation			
1	20	20	French Press	Aucune expression	
100				Précipitation	
1000				Précipitation	
1000	20	0	Sonication	Aucune expression	
		1		Précipitation	
		2		Précipitation	
		3		Précipitation	
		4		Précipitation	
		5		Précipitation	
		20		Précipitation	
		0.5		Précipitation	
	13	13		1	Précipitation
				2	Précipitation
3			Précipitation		
4			Précipitation		

Il semblerait que ce système d'expression ne convienne pas pour exprimer la hTGase dans notre laboratoire. Selon toutes les conditions testées, la protéine précipite dès qu'elle est exprimée. De plus, aucune activité n'est détectée dans les surnageants de

lyse. Pour tenter de remédier à ce problème, nous pourrions utiliser un autre système d'expression où on demanderait à la bactérie d'exprimer non seulement la hTGase, mais aussi des chaperones protéiques ayant comme rôle d'aider au bon repliement des protéines. Justement, dans notre laboratoire, nous utilisons le système de XL-1-pDnaKJ-pQE32-GTG pour exprimer la transglutaminase de foie de cobaye, pDnaKJ étant le plasmide exprimant les chaperones DnaK et DnaJ. Alors, je reproduirai ce système pour l'enzyme humaine, et ce, en faisant un sous-clonage.

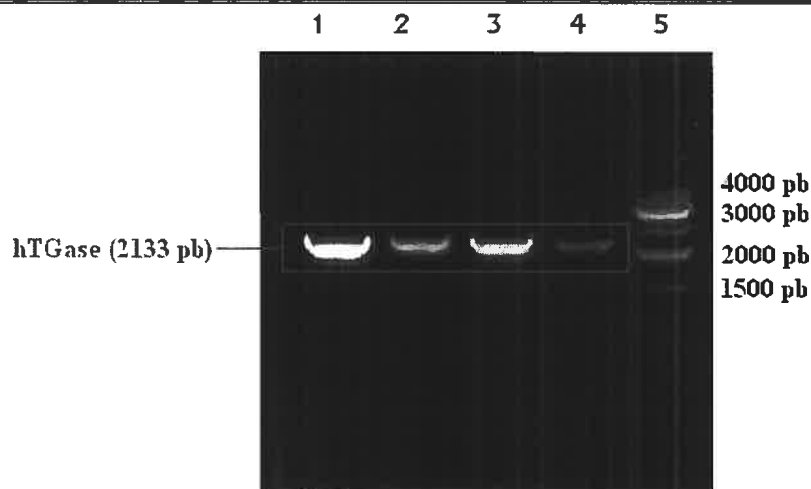
### 3.3.2 : Sous-clonage et expression dans XL1-pDnaKJ-pQE32-HTG

Premièrement, le plasmide pJLP4 et le vecteur pQE32 circulaire ont été purifiés à l'aide de la trousse de purification de QIAGEN. Ensuite, une réaction de PCR a été réalisée sur le plasmide pJLP4 afin d'amplifier spécifiquement le gène de la hTGase. Les amorces ont été conçues de sorte à ajouter les sites *SphI* et *HindIII* aux extrémités du gène. La séquence de ces amorces utilisées ainsi que le résultat de la PCR sont représentés à la **figure 3.6**.

A)

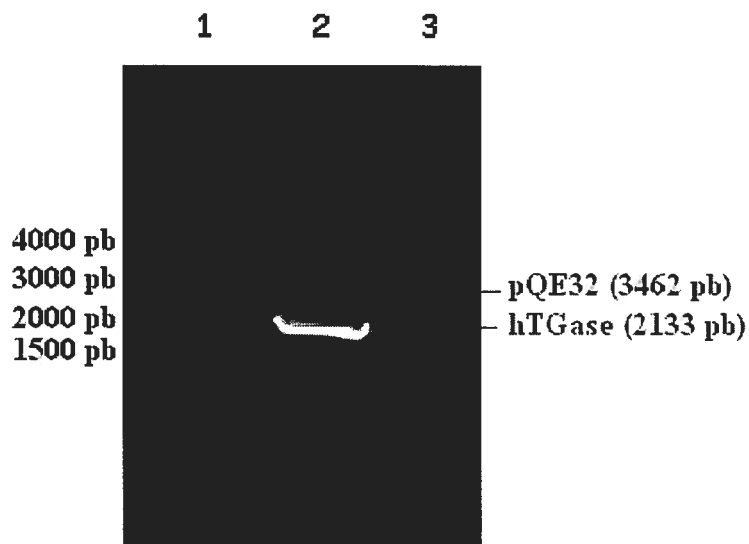
Amorces	Séquence 5' → 3'
Forward	CACACACGGGGCCAATGATGACA
Reverse	ACACACATGGCCGAGGAGCTGGTC

B)



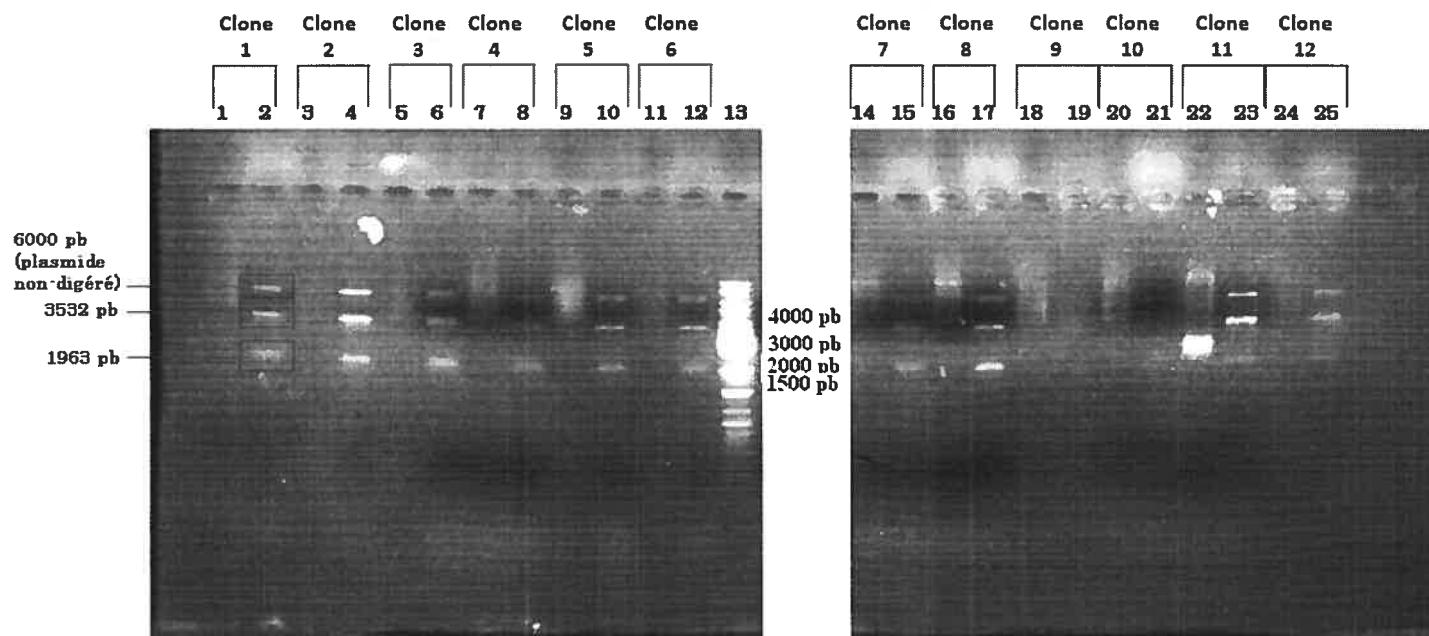
**Figure 3.6** : A) Séquence des amorces utilisées pour l'amplification de hTGase. B) Amplification de hTGase par PCR selon 5 températures d'hybridation. Puits 1: 55.8 °C; Puits 2: 57.3 °C; Puits 3: 59.0 °C; Puits 4: 61.5 °C; Puits 5: Gene Ruler DNA Ladder Mix.

Selon le gel d'agarose, la température d'hybridation idéale est de 55,8 °C, car c'est à cette condition que le gène a été le plus amplifié. Avant d'effectuer la digestion enzymatique pour former des bouts collants, il est nécessaire de concentrer et purifier l'ADN amplifié par une précipitation au *n*-butanol. Après l'élimination du surnageant contenant le mélange de la PCR, l'ADN précipité et resuspendu avec de l'eau mQ. Ce n'est qu'après cette précipitation que le gène hTGase amplifié et le vecteur pQE32 ont été digérés par *SphI* et *HindIII*, pour ensuite être purifiés par le kit QIAEX (figure 3.7).



**Figure 3.7 :** Purification de la hTGase amplifié et digéré et de pQE32 linéaire, avant la ligaturation. *Puits 1 :* Gene Ruler DNA Ladder Mix; *Puits 2 :* hTGase digéré et purifié; *Puits 3 :* pQE32 linéaire et purifié.

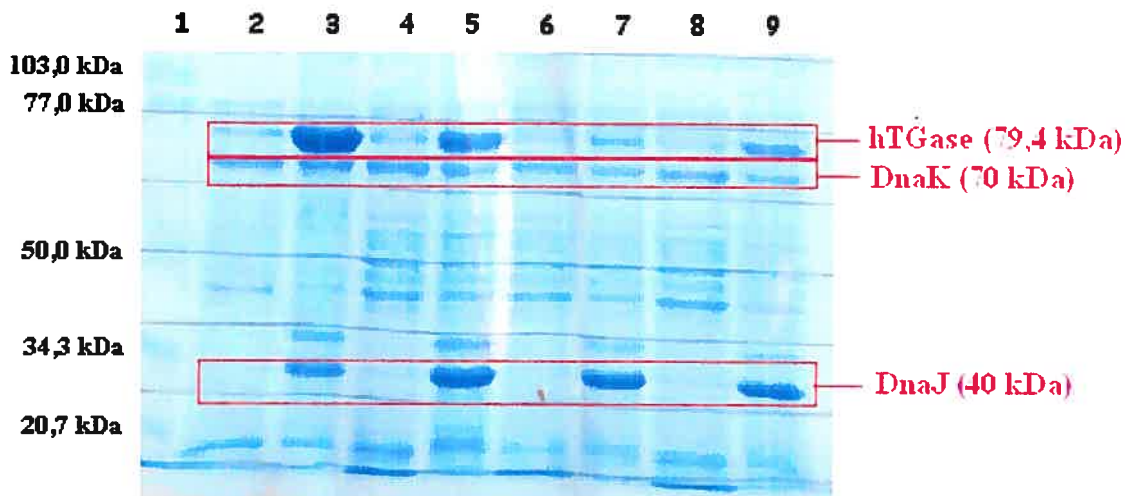
Une fois la hTGase et le pQE32 bien purifiés, ils ont été ligaturés par la T4 ligase. Le nouveau plasmide construit, pQE32-HTG, a finalement été transformé dans des XL1-pDnaKJ compétentes pour former des XL-1-pDnaKJ-pQE32-HTG. Avant de tenter la première expression dans ce nouveau système, une purification du plasmide a été effectuée sur 12 colonies qui étaient donc résistantes à l'ampicilline et au chloramphénicol (l'ampicilline étant le gène de résistance du vecteur pQE32 et le chloramphénicol du plasmide pDnaKJ). Une digestion par *NdeI* et *EcoRV* (*NdeI* coupant une seule fois sur la séquence du vecteur et *EcoRV* coupant une seule fois à l'intérieur de la séquence de la hTGase) a ensuite été faite sur ces 12 clones pour vérifier s'il s'agissait de pQE32 recircularisé ou bien s'il s'agissait bien du vecteur contenant hTGase (figure 3.8).



**Figure 3.8 :** Vérification de la présence du gène de la hTGase pour 12 clones à l'intérieur de pQE32 par digestion avec *NdeI* et *EcoRV*. *Puits 1* : Purification du plasmide du clone 1. *Puits 2* : Test de digestion correspondante sur le plasmide du clone. Même principe appliqué pour les autres puits, pour les 10 autres clones, à l'exception du puits 13 indiquant le marqueur Gene Ruler DNA Ladder Mix

Selon la séquence du nouveau plasmide, la digestion complète par *NdeI* et *EcoRV* formerait deux segments d'ADN, soit de 1963 pb et 3532 pb. Or, nous observons la présence de ces deux bandes spécifiquement, en plus d'une troisième aux environs de 6000 pb. Cette bande correspondrait au plasmide digéré de façon partielle, obtenant donc le plasmide linéarisé. De cette manière, nous pouvons conclure que le gène de la hTGase s'est bien inséré dans le vecteur suite à tout le processus de sous-clonage. Par la confirmation de la présence de l'insert, une expression a immédiatement été testée.

L'expression a été tentée entre 50 et 1000  $\mu\text{M}$  d'IPTG, à des températures d'incubation de 20 et 28 °C, pour une durée totale de 20 heures. Après ce temps d'expression, les cellules sont lysées par sonication. Enfin, un gel SDS-PAGE est effectué pour vérifier si la hTGase se retrouve dans la fraction soluble ou non-soluble. La **figure 3.9** et le **tableau VI** résument les résultats obtenus.



**Figure 3.9 :** XL1-pDnaKJ-pQE32-HTG. *Puits 1* : Low range marqueur; *Puits 2, 3* : surnageant et culot de XL1-pDnaKJ-pQE32-HTG avec 500  $\mu$ M IPTG; *Puits 4, 5* : surnageant et culot de XL1-pDnaKJ-pQE32-HTG avec 100  $\mu$ M IPTG; *Puits 6, 7* : surnageant et culot de XL1-pDnaKJ-pQE32-HTG avec 75  $\mu$ M IPTG; *Puits 8, 9* : surnageant et culot de XL1-pDnaKJ-pQE32-HTG avec 50  $\mu$ M IPTG.

**Tableau VI :** Expression dans XL-1 pDnaKJ pQE32-HTG.

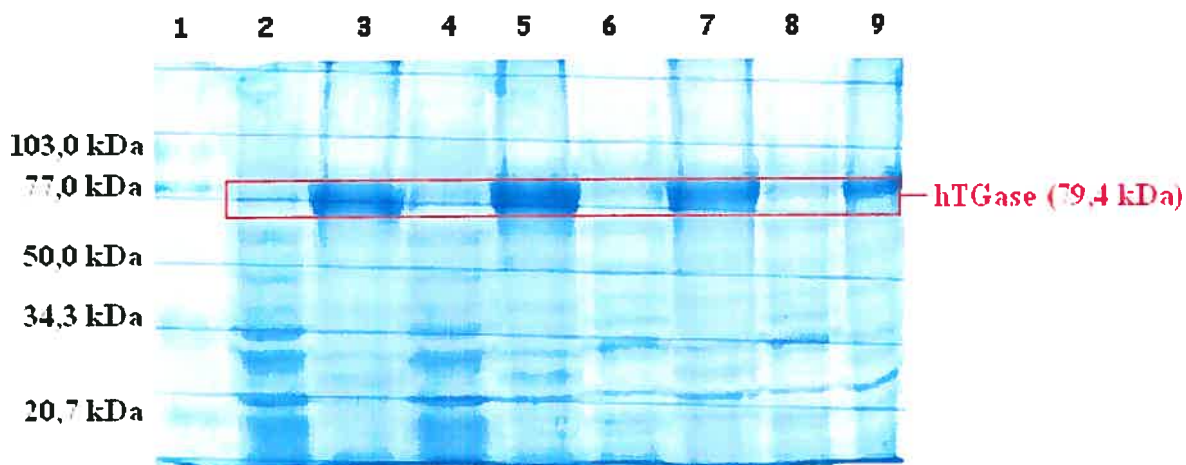
Conditions d'induction			Méthode de lyse cellulaire	Résultats
Concentration d'IPTG ( $\mu$ M)	Température ( $^{\circ}$ C)	Temps (h)		
50	20	20	Sonication	Aucune expression
75				Aucune expression
100				Précipitation
500	28			Précipitation
1000				Précipitation

Ainsi, dès le moment où il y a expression, la hTGase précipite malgré la présence de chaperones. Selon le gel SDS-PAGE, l'expression a bel et bien été ralentie sous 100  $\mu$ M d'IPTG, mais la hTGase se retrouve toujours dans la portion non-soluble. De plus, le gel confirme la présence des chaperones (à 70 kDa pour DnaK et 40 kDa pour DnaJ). Et toujours de la même façon, aucune activité de la transglutaminase n'a été détecté dans les surnageants de lyse. Puisque ces chaperones protéiques n'ont pas pu résoudre le problème, une autre solution est envisagée. Nous avons décidé de nous baser sur un autre système d'expression publié, par contre offrant de moins bons rendements. Il s'agit de la méthode provenant du groupe de Kim<sup>102</sup>. Leur plasmide exprimant la hTGase, le pET30-Ek/LIC-HTG, nous a gracieusement été envoyé.



### 3.3.3 : Expression dans BL21(DE3)-pET30-Ek/LIC-HTG

Le plasmide a donc été transformé dans des BL21(DE3), tout comme pJLP4, car il s'agit d'un vecteur pET. Ensuite, selon le protocole de Kim, l'induction de l'expression devait se faire lorsque le milieu de culture atteint 1.0 d'absorbance à 600 nm. 1 mM d'IPTG est alors ajouté et le milieu est incubé pendant 3 heures à 37 °C. Cette condition d'expression a été tentée, mais toujours sans succès : la hTGase précipite totalement, et ce, toujours vérifié par SDS-PAGE (figure 3.10) et par test d'activité.



**Figure 3.10** : SDS-PAGE typique obtenu lors de la vérification de l'expression de hTG dans le système bactérien BL21(DE3)-pET30-Ek/LIC-HTG. *Puits 1* : Low range marqueur; *Puits 2, 3* : surnageant et culot de BL21(DE3)-pET30-Ek/LIC-HTG avec 10  $\mu$ M IPTG; *Puits 4, 5* : surnageant et culot BL21(DE3)-pET30-Ek/LIC-HTG avec 20  $\mu$ M IPTG; *Puits 6, 7* : surnageant et culot de BL21(DE3)-pET30-Ek/LIC-HTG avec 50  $\mu$ M IPTG; *Puits 8, 9* : surnageant et culot de BL21(DE3)-pET30-Ek/LIC-HTG avec 1 mM IPTG.

Ainsi, les conditions d'expression, telles que la concentration d'IPTG, la température d'incubation et le temps d'incubation, ont été variés afin de ralentir l'expression et ainsi espérer retrouver une partie de la hTGase soluble. De plus, la densité optique à 600 nm de milieu de culture lors de l'induction de l'expression a aussi été variée, car une absorbance de 1.0 semblait relativement élevée pour une expression dans un système bactérien.

**Tableau VII** : Expression dans BL21(DE3) pET30-Ek/LIC-HTG.

D.O. <sub>600nm</sub>	Conditions d'induction			Résultats
	Concentration d'IPTG (μM)	Température (°C)	Temps (h)	
0.7 1.1	1000	37	3	Précipitation Précipitation
0.6	10	20	0.5 1 20	Aucune expression Précipitation Précipitation
0.6	1000	20	0.5 1 20	Précipitation Précipitation Précipitation
1.0	10 20 50 1000	37	1	Aucune expression Aucune expression Précipitation Précipitation
1.0	10 20 50 1000	37	2	Précipitation Précipitation Précipitation Précipitation
1.0	10 20 50 1000	37	4	Précipitation Précipitation Précipitation Précipitation
1.0	10 20 50 1000	37	5	Précipitation Précipitation Précipitation Précipitation
1.0	1	37	3	Aucune expression

Comme dans les systèmes d'expression précédents, la hTGase précipite dès le moment qu'elle est exprimée. Décidément, son hydrophobie cause énormément de problèmes de solubilité. Ainsi, même ce système d'expression n'est pas adéquat pour l'expression de cette protéine.

### **3.4 : Discussion**

Trois systèmes d'expression différents ont été conçus afin d'exprimer la transglutaminase tissulaire humaine : BL21(DE3)-pJLP4, XL1-pDnaKJ-pQE32-HTG et BL21(DE3) pET30-Ek/LIC-HTG. Parmi ces trois systèmes, tous les paramètres

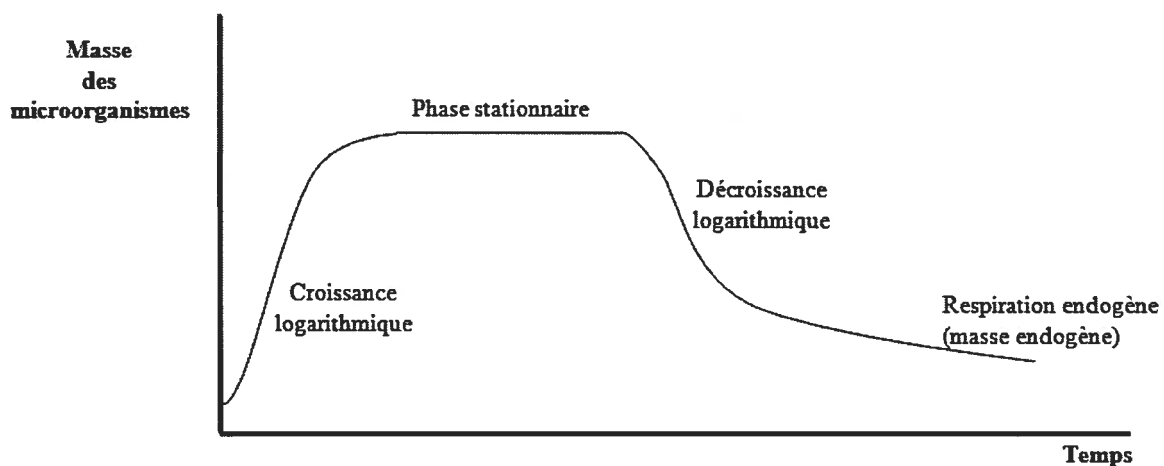
d'expression ont été variés afin de ralentir le plus possible l'expression de la hTGase afin d'en obtenir une fraction soluble.

En premier lieu, la concentration en IPTG a été diminuée de sorte à ralentir le plus possible l'expression. Par contre, on pourrait comparer l'induction de l'expression par l'IPTG comme un interrupteur « on/off ». Ainsi, il n'y a pas beaucoup de jeu entre la concentration d'IPTG maximale sans induction et minimale avec induction<sup>104</sup>. Ce ralentissement de l'expression a été réussi dans le système XL-1-pDnaKJ-pQE32-HTG avec 100  $\mu$ M IPTG à 20 °C (**figure 3.9**). Par contre, même si l'expression a été ralentie, la hTGase a été retrouvée totalement dans la fraction insoluble.

En deuxième lieu, la température ainsi que la durée d'expression ont été diminuées, toujours dans le but de ralentir l'expression. Dans le système BL21(DE3)pJLP4, une expression à 13 °C pendant 0.5 heure a été tentée. L'expression a bel et bien été ralentie, par contre la hTGase est toujours retrouvée en totalité dans la fraction insoluble.

En troisième lieu, la méthode de lyse cellulaire a aussi été variée. En effet, il est probable avec tous ces résultats que l'expression soit efficace, mais que la lyse cellulaire provoque la précipitation de la protéine. La sonication, une méthode très efficace et très utilisée pour lyser des cellules bactériennes, provoque une augmentation relativement élevée de la température du milieu. Même si cette technique est effectuée sur glace, cette particularité pourrait influencer la mauvaise solubilité de la hTGase. Pour cette raison, la technique du French Press a été tentée comme alternative, celle-ci étant reconnue pour ne pas provoquer d'augmentation de température et ainsi reconnue pour son utilisation lors de purification de protéines peu solubles. Le French Press a donc été tenté sur le système BL21(DE3) pJLP4. Par contre, la hTGase se retrouve toujours en totalité dans la fraction insoluble. Nous pouvons donc conclure que la méthode de lyse cellulaire n'est pas en cause dans la précipitation de la hTGase.

En dernier lieu, la densité optique du milieu de culture avant l'induction de l'expression a été variée, variant entre 0.6 à 1.1. La quantité de cellules présentes ainsi que leur « état de santé » est effectivement un paramètre important d'expression. En effet, les cellules doivent être en forme pour bien exprimer une protéine. Leur santé dépend énormément de leur concentration dans un milieu de culture. Au départ, les bactéries se multiplient rapidement, jusqu'à atteindre un seuil où la concentration en bactéries est maximale. Suite à ce point maximal, les bactéries commencent à mourir, car leurs nutriments s'épuisent et la concentration en déchets organiques augmente.



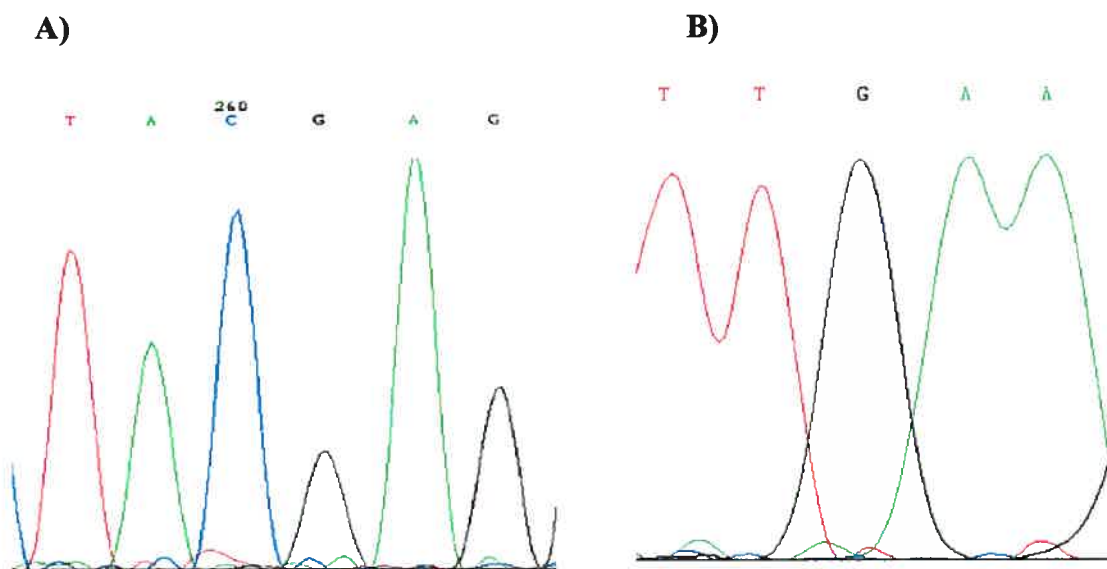
**Figure 3.11 :** Croissance des bactéries dans un milieu de culture<sup>105,106</sup>.

Ainsi, il est important d'avoir la bonne densité optique afin d'avoir la bonne quantité de bactéries toujours en phase exponentielle de croissance, là où elles sont le plus « en forme ». Or, cette attention à la densité optique lors de l'expression de la hTGase n'a malheureusement pas influencé la solubilité de la protéine.

### 3.5 : Conclusion

Malgré toutes les tentatives et toutes les variations d'expression de la hTGase sous forme soluble, aucune n'a effectivement porté fruit. C'est alors que nous nous sommes posés la question si la séquence en nucléotides du gène de la hTGase est sans mutation. Même si nous avons eu la confirmation de la part des deux groupes de recherche que la séquence était bonne, nous avons décidé de vérifier cette affirmation afin de nous en convaincre, suite à tous ces insuccès.

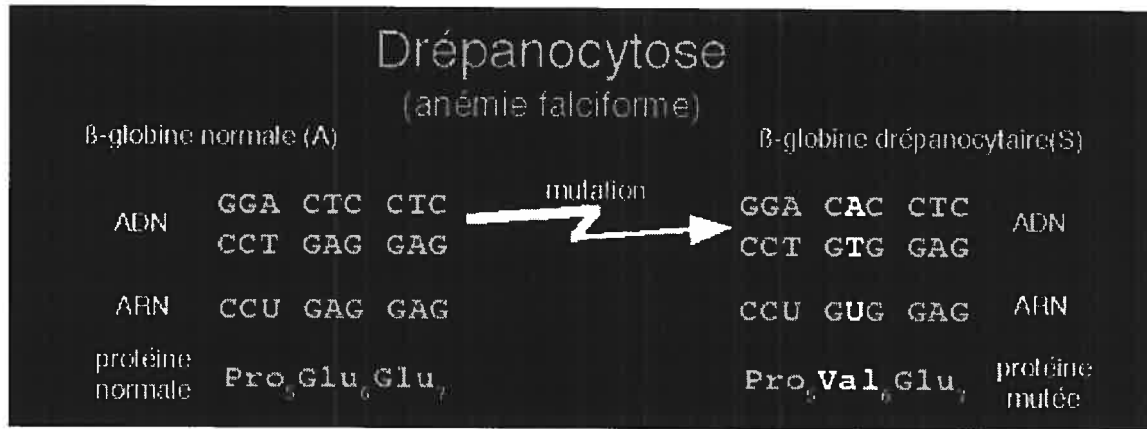
Le plasmide pJLP4 a été envoyé en séquençage à l'Institut de Recherche en Immunologie Clinique (IRIC). La PCR a été effectuée à l'aide des amorces universelles T7+ (forward) et T7- (reverse). À notre grande surprise, deux mutations ont été retrouvées, changeant deux glutamines au cœur de la séquence peptidique en deux glutamates.



**Figure 3.12** : Deux mutations retrouvées dans la séquence du gène de la hTGase de pJLP4.

Nous ne pouvons pas confirmer que ces deux mutations sont la cause évidente du problème de solubilité de la hTGase. Par contre, la formation de deux résidus chargés négativement pourrait influencer fortement la structure tertiaire de la protéine. Un exemple célèbre de mutation provoquant un changement de conformation est la mutation

d'une thymine en adénine dans le gène de la  $\beta$ -globine. Cette mutation provoque le changement d'un résidu glutamate en valine, formant la  $\beta$ -globine drépanocytaire, caractéristique de l'anémie falciforme.



**Figure 3.13 :** Mutation d'un nucléotide du gène codant pour la  $\beta$ -globine provoquant l'anémie falciforme.<sup>107</sup>

### 3.6 : Perspectives

Toutes ces tentatives d'amélioration de la solubilité de la hTGase n'ont pas apporté de bons résultats. Plusieurs autres moyens pourraient par contre être testés.

Premièrement, il serait possible de récupérer toute la fraction insoluble (contenant la hTGase) et l'incuber en présence d'urée ou de détergent tel que le Triton-X. Ce composé va dénaturer la protéine, brisant donc toute sa forme tertiaire mal repliée. Puis, on retire le détergent et donne la chance à la protéine de se replier à nouveau, en espérant qu'elle le fasse convenablement cette fois-ci. Ainsi, il est possible de récupérer une fraction soluble de la protéine. Cette technique a fréquemment été utilisée lorsqu'une protéine est exprimée de manière majoritairement insoluble. Par exemple, l'expression et la purification très récente de la TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) a demandé l'utilisation de cette méthode.<sup>108</sup> En fait, la TRAIL est reconnue pour sa formation de corps d'inclusion lorsqu'elle est exprimée. Ce groupe de recherche a donc extrait ces corps d'inclusion des débris cellulaires par centrifugation, puis il les a solubilisés dans 8 M d'urée. Il a ensuite appliqué cet échantillon dans une colonne favorisant repliement des protéines afin de retrouver la

protéine native. Ce type d'expérience a été effectué dans plusieurs cas semblables d'expression de protéines insolubles.

Deuxièmement, un analogue à l'IPTG, appelé « The Inducer », est maintenant disponible commercialement. Ce nouvel inducteur a la particularité d'induire une expression lente de protéine désirée, permettant à celle-ci de se replier proprement, de demeurer soluble et ainsi de diminuer les corps d'inclusion. Cette méthode a été expérimentée dans le cas de l'expression de la glutaminase mitochondriale, un autre exemple d'enzyme peu soluble.<sup>109</sup> En utilisant « The Inducer » pour effectuer l'induction, ce groupe de recherche a remarqué la diminution des corps d'inclusion.

Troisièmement, il serait possible d'avoir recours au plasmide pMal, exprimant la protéine MBP de manière très soluble. À l'aide de la biologie moléculaire, il est possible d'exprimer une protéine chimère, c'est-à-dire une protéine greffée à une seconde protéine. Or, si on prépare un cDNA comprenant la hTGase combinée à une séquence d'ADN codant pour une protéine qui est reconnue pour sa bonne solubilité telle que MBP, il est envisageable que le bon repliement de cette protéine aide au bon repliement de la hTGase, l'aidant ainsi à améliorer sa solubilité.

Pour ce faire, MBP, ou Maltose Binding Protein, est un exemple de protéine qui se replie très bien. Le plasmide pMal contient le gène de MBP et un site de multiclonaage en C-terminale de la protéine. Ainsi, par la biologie moléculaire, on peut ajouter la hTGase en C-terminale de MBP, les deux protéines séparées par une séquence reconnue par l'endopeptidase thrombine. Si le cadre de lecture est bien respecté, la protéine chimère MBP-hTG peut être exprimée. Ensuite, il sera possible de séparer les deux protéines une fois exprimée à l'aide d'un clivage par la thrombine. Ce genre de protéine chimère a déjà été exprimé à quelques reprises afin d'améliorer la solubilité d'une protéine. Par exemple, la protéine chimère His<sub>6</sub>MBP-RNaseA a été exprimée de manière très soluble, comparativement à la RNaseA seule étant pratiquement totalement insoluble.<sup>110</sup>

Enfin, si toutes ces alternatives ne fonctionnent pas, il serait possible d'utiliser un système d'expression utilisant des cellules eucaryotes plutôt que procaryotes. Ainsi, l'expression pourrait se faire dans des cellules de levure par exemple. Puisque la cellule eucaryote est un organisme beaucoup plus complexe que la procaryote, celle-ci est dotée de système pré-établi afin d'augmenter la solubilité des protéines exprimées. Le seul inconvénient de cette méthode est l'augmentation de la charge de travail lorsqu'on manipule des cellules eucaryotes. Cette expression est plus longue, plus complexe et demande plus d'étapes. Par contre, s'il s'agit d'une méthode efficace pour exprimer la hTGase de manière soluble avec de bons rendements, ces inconvénients dérangerait beaucoup moins.

Bref, il existe une panoplie d'alternatives afin d'exprimer une protéine de manière soluble. Il s'agit tout simplement d'avoir le temps d'effectuer ces tests.



# **CHAPITRE 4**

## **4 : Identification du nucléophile de la $\gamma$ glutamyltranspeptidase humaine**

### **4.1 : Introduction**

La  $\gamma$ glutamyltranspeptidase (GGT) est une enzyme dont le mécanisme catalytique n'est toujours pas complètement connu. Nous savons aujourd'hui qu'il s'agit d'une protéine initialement monomérique, mais clivée de façon post-traductionnelle pour former un hétérodimère. Le précurseur est donc exprimé d'un gène contigu. Nous savons aussi que la thréonine *N*-terminale de la petite sous-unité est impliquée dans ce processus d'automaturation. Tout récemment, il a été découvert par des études de spectroscopie de masse que cette même thréonine est aussi le résidu catalytique de la GGT bactérienne<sup>68</sup>. Or, pour compléter ces études, il serait intéressant d'effectuer ce type d'expérience, mais pour la GGT humaine (hGGT) que nous avons maintenant en notre possession. La **section 4.2** explique les principes d'expression et de purification de la hGGT ainsi que les résultats obtenus, ceux-ci étant établis dans le groupe par Roselyne Castonguay, complétés par Mylène Morin et terminés par moi-même. Les **sections 4.3** et **4.4** démontrent les études de spectroscopie de masse effectuées afin de déterminer le nucléophile de la hGGT.

### **4.2 : Expression et purification de la hGGT**

Le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  a préalablement été construit et transfecté dans la souche X33 des *Pichia pastoris* dans le groupe. Nos conditions efficaces de purification ont aussi été établies. À mon tour, j'ai poursuivi l'optimisation en ajoutant une dernière étape de purification (**section 4.2.1**).

Le gène de la hGGT a été modifié et conçu pour que la protéine soit sécrétée. Pour cette raison, le gène ne contient plus la portion codant l'ancre membranaire (résidus 1 à 26); cette section a été remplacée par une séquence signal de sécrétion, le facteur  $\alpha$ , celui-ci étant présent dans le vecteur pPICZ $\alpha$ A (**figure 4.4**).

Une préculture de X33 (transfecté par pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ ) suivi d'une culture dans un milieu frais ont d'abord été effectuées. Lorsque la densité optique à 600 nm a atteint une valeur de 10, les levures ont été centrifugées puis resuspendues dans un milieu de culture contenant du méthanol, l'inducteur de l'expression de la hGGT selon le vecteur pPICZ $\alpha$ A. Après une semaine d'incubation, elles ont été à nouveau centrifugées et le surnageant a été conservé afin d'en recueillir la hGGT sécrétée. Les deux tiers du milieu de culture ont été conservés à  $-80$  °C pour purification ultérieure. L'autre tiers contenant la protéine désirée a été concentré par ultrafiltration. La hGGT a ensuite été purifiée par une colonne d'affinité Ni-NTA puis désalinisée par une colonne de désalinisation. Cette dernière fraction recueillie correspond à la fraction pure de la hGGT. Tous les détails du protocole d'expression et de purification sont décrits au chapitre 6.

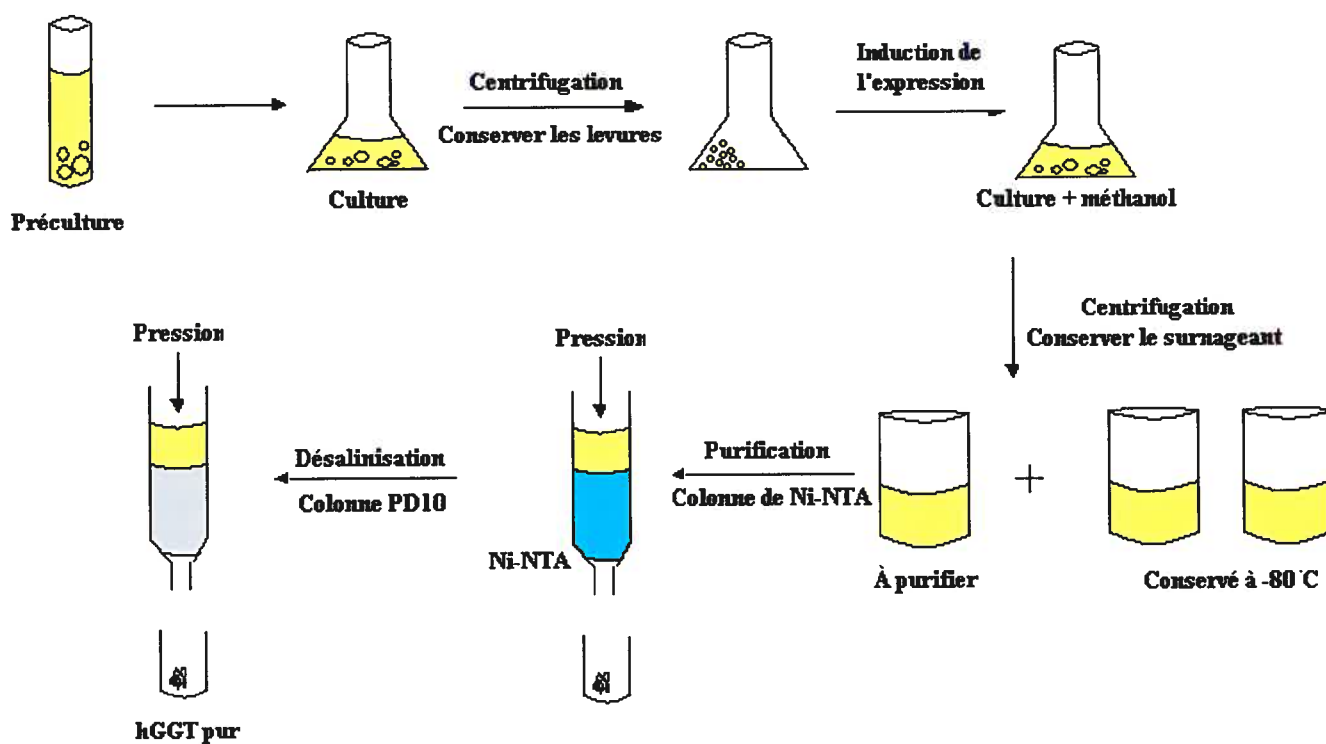


Figure 4.1 : Schéma général de l'expression et purification de la hGGT

La pureté de hGGT est premièrement vérifiée par migration sur gel SDS-PAGE (figure 4.2). Ce gel, révélant toutes les protéines présentes dans un échantillon selon leur poids moléculaire, dévoile deux bandes distinctes, vers 50 kDa et 20 kDa, correspondant

respectivement à la grande et à la petite sous-unité de la hGGT. On remarque aussi la présence de protéines de masse supérieure à la grande sous-unité. Celles-ci correspondraient toujours à la grande sous-unité de la hGGT, mais contenant des glycoformes immatures. Cette affirmation est supportée par des études ultérieures de spectroscopie de masse (section 4.3). Bref, la hGGT a été purifiée avec succès.



**Figure 4.2 :** Coloration au nitrate d'argent d'un gel SDS-PAGE montrant la fraction purifiée de la hGGT et où on remarque la présence des deux sous-unités de l'enzyme.

Pour chacune des étapes de purification, la quantité de protéines ainsi que l'activité de la hGGT ont été mesurées. Ces valeurs sont résumées dans le **tableau VIII**.

**Tableau VIII :** Masse, activité et activité spécifique de la hGGT recombinante suite à chaque étape de purification de 300 mL de culture de *Pichia pastoris*.

Étapes de purification	Masse protéique (mg)	Activité (U)*	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)
Surnageant	9.9	99.7	10.1	100
Concentration par ultrafiltration	6.0	80.4	13.2	81.0
Colonne de Ni-NTA :				
Lavage 5 mM d'imidazole	0.4	0.6	1.5	0.6
Lavage 10 mM d'imidazole	0.2	0.8	4.2	0.8
Élution 250 mM d'imidazole	0.4	86.5	237	86.0

\* Une unité d'activité réfère à un  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitroanilide libéré par minute provenant de L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (section 4.2.1).

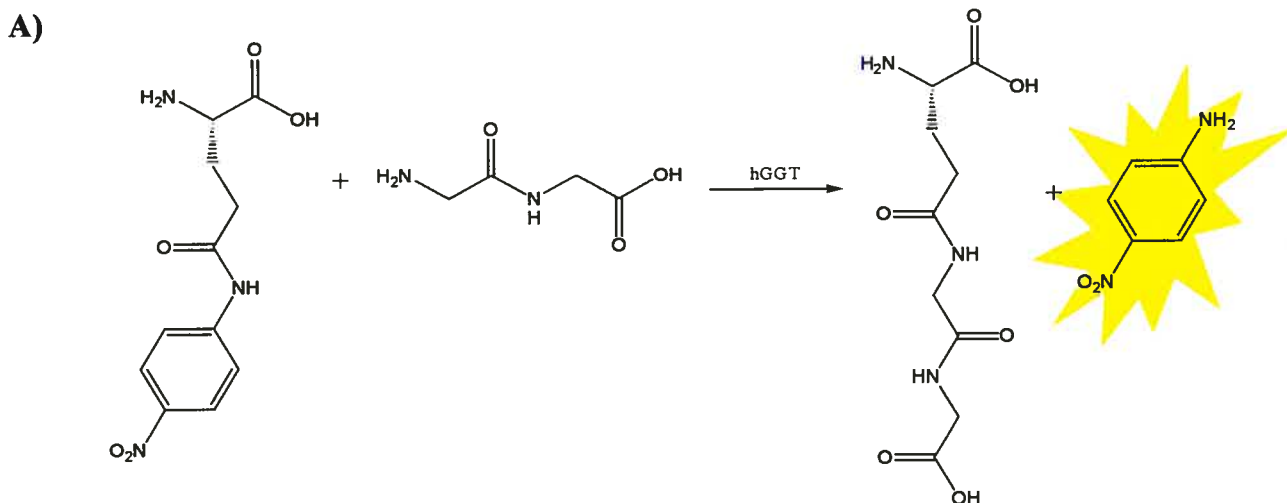
La quantité de protéines a été déterminée à l'aide du test de Bradford standard. L'activité de la GGT est déterminée par un test d'activité décrit à la **section 4.2.1**.

Après l'étape de concentration par ultrafiltration, on retrouve 81 % de l'activité totale initiale. Une petite partie de hGGT est donc perdue lors de cette étape. Cette légère perte serait due à une adhésion de la protéine à la membrane de filtration. De plus, un petit volume de surnageant concentré serait perdu lors de son transfert dans un tube de polypropylène pour l'étape de ligation à la résine de Ni-NTA. Les étapes de lavage de la résine de Ni-NTA avec 5 ou 10 mM d'imidazole entraînent une très légère perte de hGGT. Par contre, l'élution à 250 mM permet de récupérer la totalité de l'activité. Grâce à toutes ces étapes de purification, l'activité spécifique se trouve au moins 20 fois améliorée par rapport à celle mesurée avant purification.

#### ***4.2.1 : Dernière étape de la purification : la désalinisation***

L'étape de désalinisation de l'échantillon d'élution suite à la colonne de Ni-NTA est une étape importante de purification. En effet, la forte concentration en imidazole présente dans la solution d'élution pourrait interagir avec l'enzyme et ainsi interférer son activité. Elle pourrait même inactiver l'enzyme à court ou à long terme. Par exemple, notre groupe a remarqué une perte d'activité complète de la transglutaminase tissulaire recombinante lorsque celle-ci est en présence de 250 mM d'imidazole pendant toute la nuit à 4 °C. Pour cette raison, j'ai voulu désaliniser l'échantillon de hGGT purifié avant d'entamer les études de spectroscopie de masse.

Pour ce faire, une colonne de désalinisation a été effectuée. Un volume maximal de 3 mL d'échantillon est utilisé par colonne. Ensuite, l'élution se fait avec 4 mL de tampon 100 mM Tris acétate pH 8.0. Un test d'activité est effectué avant et après désalinisation afin de vérifier toute perte d'activité (**figure 4.3**). La transpeptidation entre le  $\gamma$  glutamyl-*p*-nitroanilide et le dipeptide glycinyglycine catalysée par la GGT provoque la libération d'un *p*-nitroanilide, détectable par spectrophotométrie à 410 nm<sup>111</sup>.



B)

	Concentration	Quantité	Volume	Activité	Activité totale	Activité spécifique
	(mg/mL)	(mg)	(mL)	(U)	(U)	(U/mg)
<b>Avant désalinisation</b>	0.051	0.153	3	0.0022	0.0067	43.5
<b>Après désalinisation</b>	0.035	0.140	4	0.0018	0.0071	51.3

\* Une unité d'activité réfère à un  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitroanilide libéré par minute provenant de L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (section 4.2.1).

**Figure 4.3 :** Test d'activité enzymatique de la hGGT. A) Équation chimique de la réaction enzymatique, où la libération de *p*-nitroanilide est détectée à 410 nm par spectrophotométrie. B) Activité de la hGGT avant et après désalinisation.

Ces résultats démontrent clairement qu'il n'y a aucune perte d'activité spécifique suite à la désalinisation. En effet, pour cette expérience-ci, elle passa de 43.5 U/mg à 51.3 U/mg suite à la désalinisation.

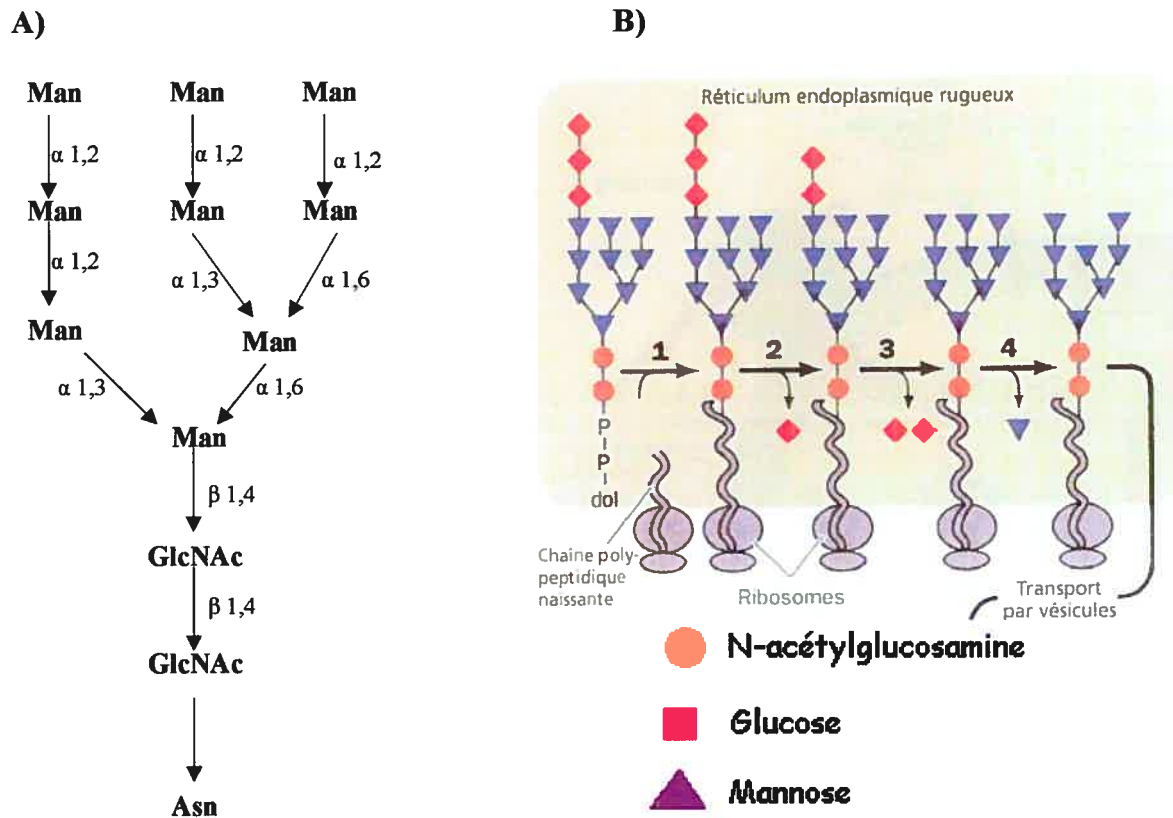
### 4.3 : Étude par LCMS (ESI-MSD-TOF)

Le séquençage du gène de la GGT humaine recombinante a déjà été effectué dans le groupe. La figure ci-dessous présente la séquence en acides aminés de la hGGT, répondant à cette séquence d'ADN.

Peptide de sécrétion (9.6 kDa)	<p><b>MRFPSIFTAVLFAASSALAAPV</b><u>NTT</u>TEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL<b>PFS</b><u>NSTN</u>  <b>GLLF</b><u>NTT</u>IASIAAKEEGVSLEKREAEAEF</p>
Grosse sous-unité (38.5 kDa)	<p>SASKEPDNHVYTRAAVAADAKQCSKIGRDAIRDGGSVDAIAALLCVGLMNAHSMGIGG  LFLTIY<b>NST</b>TRKAEVINAREVAPRLAFATMF<b>NS</b>SEQSQKGGLSVAVPGEIRGYELAHQRH  RLPWARLFQPSIQLARQGFVPGKGLAAALENKRTVIEQQPVLCEVFCRDRKVLREGERLI  PQLADTYETLAIEGAQAFY<b>NGS</b>LTAQIVKDIQAAGGIVTAEDLNNYRAELIEHPL<b>NI</b>SLG  AVLYMPSAPLSGPVLALILNLKGY<b>NFS</b>RESVESPEQKGLTYHRIVEAFRFAYAKRTLLC  PKFVDVTEVVR<b>NMT</b>SEFFAAQLRAQISDDTTHPISYKPEFYTPDDGG</p>
Petite sous-unité (23 kDa)	<p><b>TA</b>HLSVVAEDGSAVSATSTINLYFGSKVRSPVSGILFNNEMDDFSSPSITNEFGVPPSPA  FIQPGKQPLSMCPTIMVGQDQVRMVVGAAGGTQITATALAIINLWFGYDVKRAVEE  RLHNQLLP<b>NVT</b>TVERNIDQAVTAALETRHHHTQIASTFIAVVQAIVRTAGGWAAASDSRK  GEPAGYAAASFLEQKLISEEDLNSAVD<b>HHHHHH</b></p>

**Figure 4.4 :** Séquence de la GGT humaine recombinante. La masse de la séquence peptidique a été calculée et y est indiquée pour le peptide de sécrétion et pour chacune des deux sous-unités. **En mauve :** la thréonine catalytique hypothétique. **En bleu :** la queue polyhistidine. **En rouge :** les sites de glycosylation prédites suivant la formule N-X-S/T.

La glycosylation de la GGT se fait sur des résidus Asn<sup>66</sup>, répondant à la séquence N-X-S/T. Ce processus s'effectue par l'activité d'au moins 4 enzymes, dont la transférase d'oligosaccharide membranaire, les  $\alpha$ -glucosidase I et II ainsi que l' $\alpha$ -1,2-mannosidase (figure 4.5).<sup>112</sup> Selon la séquence peptidique, on retrouve six sites de glycosylation sur la grande sous-unité et un seul sur la petite sous-unité. Le type de glycosylation le plus commun est celui de type « riche en mannoses »<sup>112</sup>. Son processus de maturation des saccharides sur les résidus Asn est résumé dans la figure 4.5, formant un saccharide final comprenant deux résidus *N*-acétylglucosamine et neuf résidus hexose (GlcNAc<sub>2</sub>-Hex<sub>9</sub>). Le saccharide initial additionné sur le peptide en processus de traduction comporte trois résidus glucose et un mannose de plus. Lors du processus de maturation, ces quatre résidus se font cliver successivement par des glucosidases spécifiques.



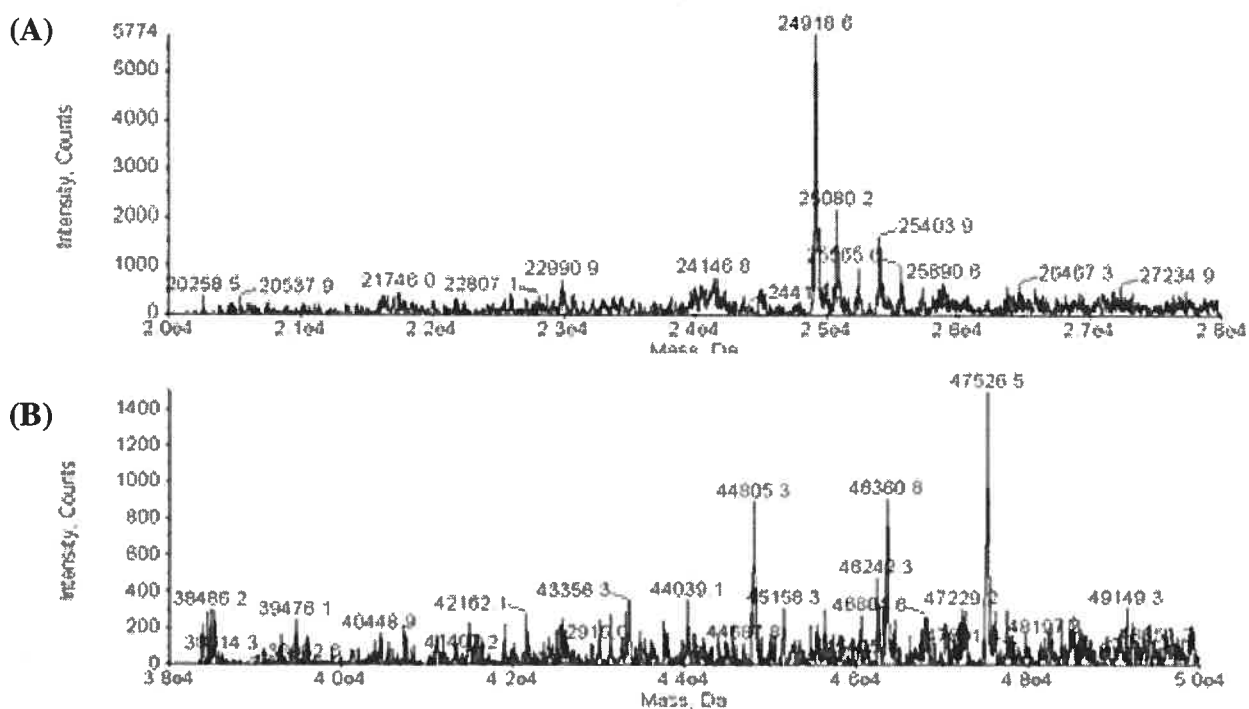
Ainsi, chaque site de glycosylation contient 11 unités de sucre pour un total de 1860 Da par site. Puisque la grosse sous-unité contient six sites et que la petite n'en contient qu'un seul, la masse calculée de chacune s'élèvera donc à environ 50 kDa (38.5 kDa + 6 × 1.86 kDa) et 25 kDa (23 kDa + 1 × 1.86 kDa) respectivement. Ces masses correspondent aux masses approximatives estimées par SDS-PAGE (figure 4.2). Pour vérifier l'exactitude de ces calculs, des études de spectre de masse par LCMS ont été effectuées. La masse totale des deux sous-unités a été déterminée par Alexandra Furtos du département de chimie de l'Université de Montréal.

La grande sous-unité a élué en premier à 8.14 minutes, présentant différentes masses supérieures à la masse peptidique théorique de 38489.78 Da, la masse majoritaire étant de 47528.66 Da. Cette hétérogénéité serait due aux différents patrons de glycosylation présents sur le peptide, probablement causée par une activité



glucosidase I et II incomplète.<sup>112</sup> Ceci explique donc les masses supérieures de la grande sous-unité observées sur le gel SDS-PAGE (**figure 4.2**). De plus, les masses majeures mesurées indiquent clairement que le peptide de sécrétion est clivé efficacement par la protéase Kex2 de la souche X-33.

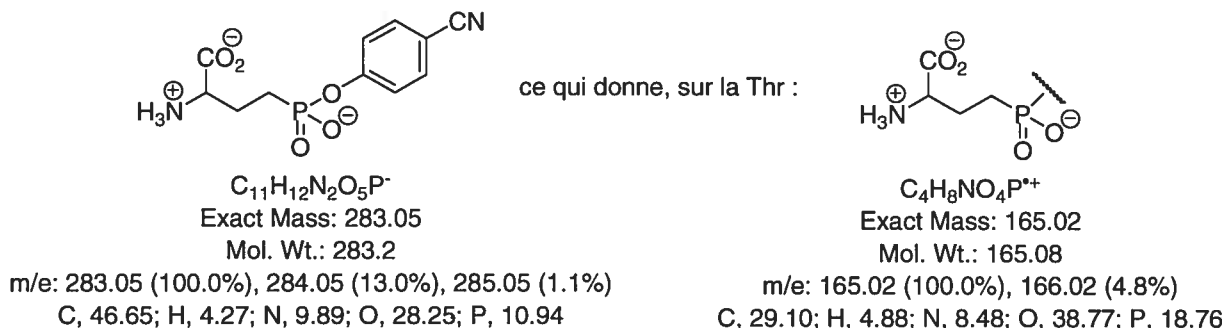
La petite sous-unité a élué en deuxième à 8.64 minutes, présentant une masse de 24918.43 Da. Cette masse correspondrait exactement à la masse peptidique prédite (23051.80 Da), additionnée d'un GlcNAc<sub>2</sub>-Hex<sub>9</sub> positionné sur l'Asn511, correspondant également au gel SDS-PAGE de la **figure 4.2**. De plus, on remarque la présence de quelques masses supérieures à celle-ci, correspondant à des unités d'hexose supplémentaires sur le saccharide, toujours due à la glycosylation hétérogène de la souche X33.



**Figure 4.6 :** Spectre de masse totale de la (A) petite sous-unité et de la (B) grande sous-unité de la GGT humaine recombinante.

Ainsi, la masse totale des deux sous-unités de la hGGT a pu être déterminée séparément grâce à la LCMS. De plus, nous avons pu étudier les différents patrons de glycosylation possibles sur cette protéine.

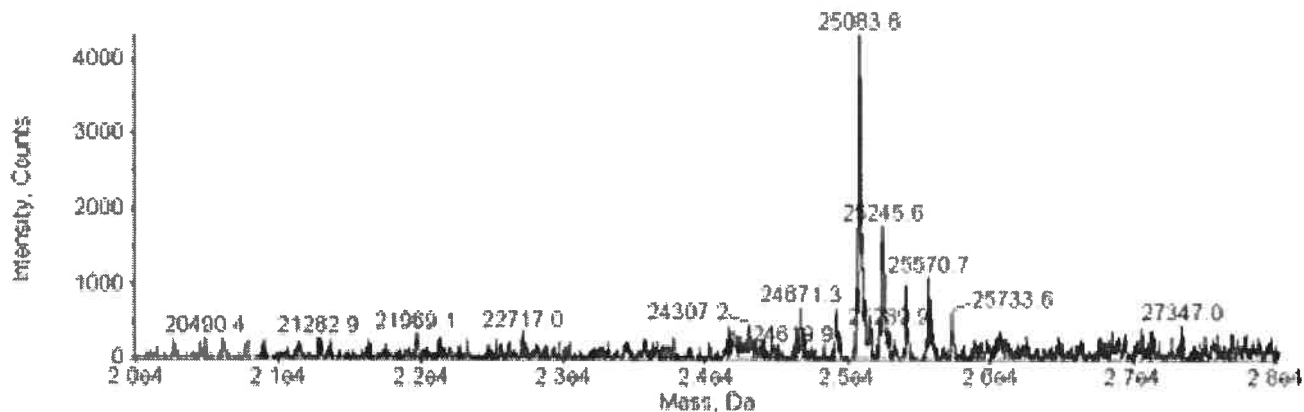
Par la suite, il s'agissait d'inhiber irréversiblement l'enzyme et de refaire des études de spectroscopie de masse afin de vérifier sur quelle sous-unité l'inhibiteur s'est lié. Pour ce faire, le Prof. J. Hiratake de l'Université de Kyoto a eu l'amabilité de nous envoyer un inhibiteur irréversible de la GGT, l'acide 2-amino-4-[mono(4-cyanophényl)phosphono]butanoïque (**figure 4.7**). Une fois réagi, l'inhibiteur ajoutera une masse de 165 Da à une des deux sous-unités de la hGGT.



**Figure 4.7** : Structure de l'inhibiteur irréversible utilisé avant et après réaction.

Pour effectuer l'inhibition, 25 µg de GGT est incubé dans une solution 100 mM Tris acétate pH 8.0 en présence de 2 mM d'inhibiteur pendant 20 minutes à 37 °C. L'échantillon est ensuite directement envoyé pour des études de LCMS.

La LCMS indique que la grande sous-unité n'a pas du tout été affectée par l'inhibition. Par contre, la masse de la petite sous-unité a augmenté d'exactly 165 Da (**figure 4.8**) par rapport au contrôle (**figure 4.6-A**). Cette augmentation correspond à l'addition d'un équivalent du groupement phosphoryle de l'inhibiteur sur un résidu spécifique de la petite sous-unité.



**Figure 4.8 :** Spectre de masse totale de la petite sous-unité de la GGT humaine recombinante inhibée par l'acide 2-amino-4-[mono(4-cyanophényl)phosphono]butanoïque.

À l'aide de la LCMS, nous pouvons conclure que l'inhibiteur se lie exclusivement à un résidu de la petite sous-unité. La prochaine étape est d'effectuer une digestion de la hGGT inhibée, suivi d'une étude par LCMS-MS. Ceci nous permettra de déterminer avec certitude le résidu sur lequel est lié l'inhibiteur, et donc, le nucléophile de l'enzyme.

#### **4.4 : Étude par LCMS-MS**

L'étude par LCMS-MS devait nous permettre de déterminer exactement le résidu nucléophile de la hGGT. Pour l'instant, nous avons la certitude que celui-ci est situé dans la petite sous-unité de la protéine.

Afin de déterminer l'acide aminé marqué par l'inhibiteur irréversible, 50 µg de hGGT purifié a d'abord été incubé dans 50 µL de tampon 200 mM Tris sulfate pH 7.2 pour 20 minutes à 37 °C en présence et en absence de 2 mM d'inhibiteur. Par la suite, la solution est incubée pendant une heure à 37 °C en présence de 8 M d'urée afin de dénaturer la protéine. Suite à une dilution à 4 M d'urée avec le tampon 50 mM d'ammonium bicarbonate, la solution est incubée pendant quatre heures à 37 °C en présence de l'endopeptidase Lys-C. Le produit digéré est par la suite dilué à 1 M d'urée toujours avec le tampon 50 mM d'ammonium bicarbonate pour une trypsinolyse subséquente durant toute la nuit à 37 °C.

La protéine entière a préalablement été dénaturée par l'urée afin de faciliter la digestion par les endopeptidases. En effet, les saccharides présents à la surface de la hGGT nuisent à l'activité endopeptidase puisque ces enzymes ne peuvent rejoindre efficacement la séquence peptidique de la protéine. Ainsi, la dénaturation permet une meilleure accessibilité aux enzymes de digestion. De plus, la hGGT a été digérée par deux endopeptidases différentes plutôt qu'une seule afin de réduire le plus possible la taille des peptides formés suite aux clivages, facilitant ainsi l'identification de l'acide aminé marqué.

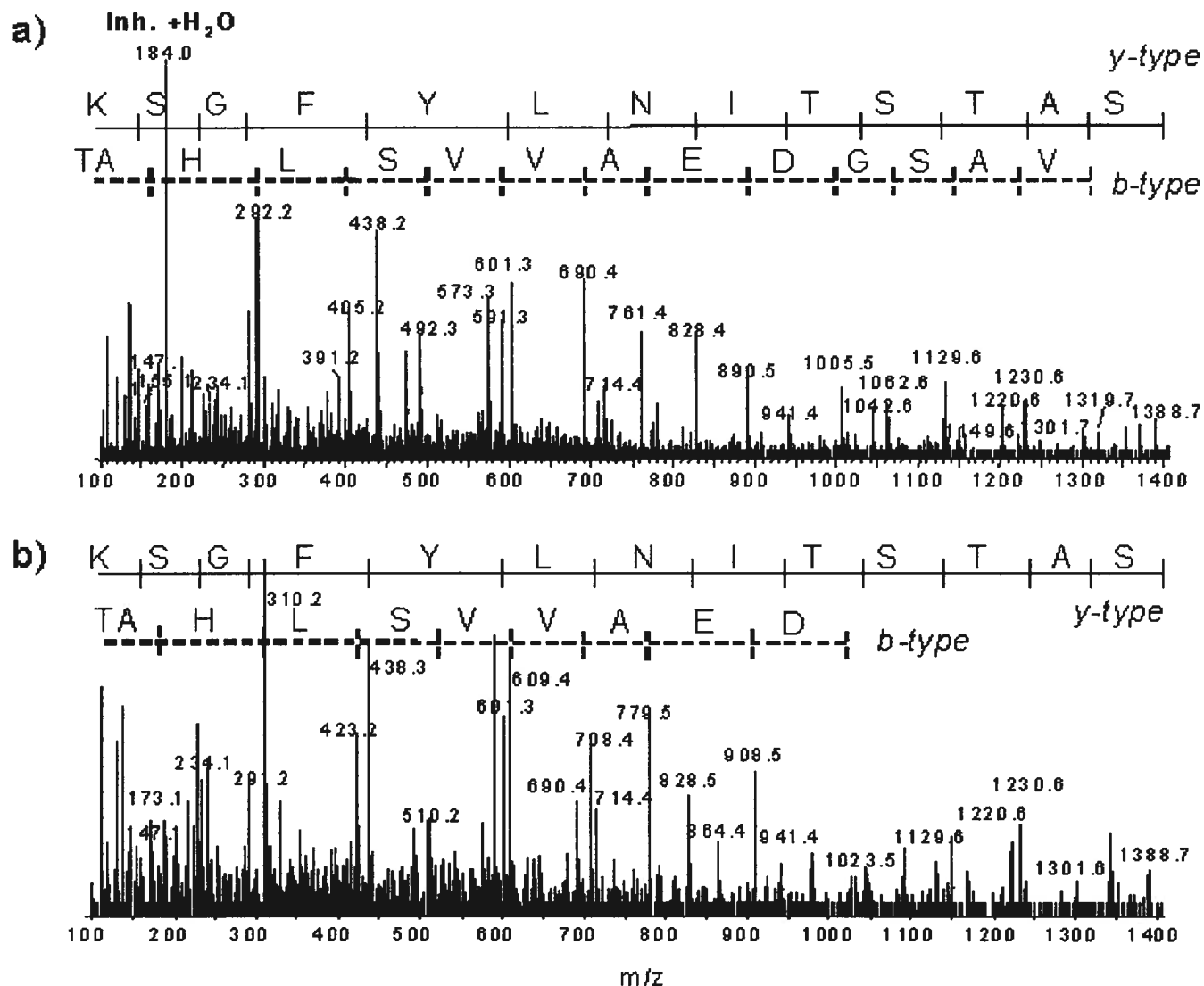
Par la suite, ces peptides digérés sont alors analysés par nanoLCMS-MS. Ces expériences ont permis de détecter un total de 53,7 et 73,6 % de la séquence peptidique de la petite et de la grande sous-unité respectivement. Un premier résultat indique qu'en présence d'inhibiteur, le segment tryptique *N*-terminale de la petite sous-unité a une masse supérieure d'exactly 165 Da par rapport au contrôle. De cette manière, nous pouvons conclure que l'inhibiteur s'est lié spécifiquement à un des résidus de ce fragment.

381  
TAHLSVVAEDGSAVSATSTINLYFGSKVR  
409

**Figure 4.9 :** Séquence du fragment tryptique *N*-terminale de la petite sous-unité de la hGGT, dont sa masse est augmentée de 165 Da en présence d'inhibiteur.

La comparaison des spectres MS-MS de ce fragment lié et non-lié à l'inhibiteur (**figure 4.10**) a permis d'identifier spécifiquement l'acide aminé lié à l'inhibiteur. Par convention, les peptides de type-b sont ceux qui sont clivés un acide aminé à la fois par une exopeptidase *C*-terminale. Inversement, les peptides de type-y sont ceux qui sont clivés un acide aminé à la fois par une exopeptidase *N*-terminale.

Le groupement inhibiteur lié aux différents segments de peptides a été clivé par ionisation dans le spectromètre. Ce clivage du groupement inhibiteur est caractérisé par la présence d'un fragment ionisé abondant d'une valeur  $m/z$  de 184, correspondant au clivage du lien phosphoester avec un groupement hydroxyle et un proton provenant d'un résidu thréonine. En d'autres termes, le clivage de l'inhibiteur a provoqué le clivage de la fonction hydroxyle de la thréonine. Cette perte de molécule d'eau provoque la diminution de 18  $m/z$  sur tous les fragments ionisés de type-b, et non ceux de type-y. Selon ce raisonnement, nous identifions avec certitude que la Thr381 (présente dans tous les peptides de type-b et non dans ceux de type-y) est l'acide aminé liant l'inhibiteur et, par le fait même, est le nucléophile de la hGGT.



**c)**

**Type-b :**           **TAHLSVVAED**

**Type-y :**           **KSGFYLNITSTAS**

**Figure 4.10 :** Analyse de la nanoLCMS-MS des peptides tryptiques de la hGGT. Spectres de masse du peptide tryptique *N*-terminale de la petite sous-unité, résidus 381-407, **A)** de la hGGT inactivée et **B)** du contrôle. Il y est présenté les ions fragmentés correspondant au clivage du lien amide avec rétention de charge sur les segments peptidiques *N*- et *C*-terminale, identifiés respectivement par le type-b et le type-y. **C)** Séquence peptidique du fragment total de type-b et de type-y, où la Thr liant l'inhibiteur, présente dans les fragments de type-b, est en rouge.

#### **4.5 : Conclusion**

Nous avons développé un protocole d'expression et de purification de la hGGT sécrétée ayant une bonne activité spécifique. Dans un système de *Pichia pastoris* de souche X33 où le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  a été transfecté, la hGGT fut effectivement exprimée et purifiée avec un rendement de 1 mg de hGGT par litre de culture et une activité spécifique de 280 U/mg.

Par la suite, des études de spectroscopie de masse ont permis, pour la première fois, la confirmation directe que le résidu *N*-terminale de la petite sous-unité, la Thr381, est le nucléophile de la hGGT.

À partir de cette nouvelle information et de ce nouveau système d'expression établi, il est maintenant possible de produire en quantité suffisante la hGGT pure pour des études ultérieures de cinétique et de structure du site actif et des acides aminés impliqués dans les réactions de transpeptidation et d'hydrolyse. Ces études mèneront à l'établissement prochain de nouveaux inhibiteurs et marqueurs de la hGGT, ce qui permettra d'avancer les études sur cette enzyme encore peu connue.

# CHAPITRE 5



## 5 : CONCLUSION

La première partie de mon projet fut de synthétiser deux séries d'inhibiteurs irréversibles de la transglutaminase tissulaire. La première et la deuxième série étaient de type Cbz-X-Gly-OMe et Cbz-X-OBn respectivement, où X est un acide aminé comprenant un groupement maléimide sur une chaîne latérale de 2 à 4 carbones. Ces composés ont été synthétisés avec succès et avec une grande pureté. Les rendements globaux furent environ de 10 % (**annexe 2**). Suite à leur synthèse, ces composés ont été testés afin de vérifier s'ils avaient la capacité d'inhiber la transglutaminase (**chapitre 2** et **annexe 2**). Cette étude de cinétique d'inhibition nous a permis de conclure que ces dérivés maléimides inhibaient effectivement l'enzyme, par contre avec une efficacité de  $10^3$ - $10^4$  plus faible que la majorité des inhibiteurs déjà rapportés. Cette baisse de spécificité est probablement due à l'encombrement stérique causé par le grand volume du groupement maléimide, l'empêchant de bien pénétrer à l'intérieur du site actif de l'enzyme. Ainsi, nous concluons que le groupement maléimide n'est pas un bon choix d'électrophile pour inhiber irréversiblement la transglutaminase. Il est important de noter que ces résultats de synthèse et de cinétique d'inhibition ont été publiés dans un « Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters ».<sup>99</sup>

La deuxième partie de mon projet fut d'exprimer la transglutaminase tissulaire humaine. Le défi de ce projet est d'obtenir la protéine sous forme soluble, car celle-ci contient majoritairement des résidus hydrophobes (**chapitre 3**). Les systèmes d'expression BL21(DE3)pET28a-HTG, BL21(DE3)pET30 Ek/LIC-HTG et XL1-pDnaKJ-pQE32-HTG ont été tentés. Suite à des variations des conditions d'expression afin de ralentir le plus possible la synthèse protéique et ainsi améliorer la solubilité protéique (densité optique du milieu de culture avant induction, concentration en IPTG ajouté, temps et température d'incubation et méthode de lyse cellulaire), il semble que la transglutaminase humaine précipite en formant des corps d'inclusion dès le moment où les conditions lui permettent de s'exprimer. Même la présence des chaperones DnaK et DnaJ n'ont pas permis d'améliorer la solubilité de l'enzyme.

Plusieurs solutions sont envisageables en tant que projets futurs afin de remédier à ce problème. Il serait possible de récupérer l'enzyme précipitée en ajoutant de l'urée ou un détergent afin de la resolubiliser et ainsi de l'extraire des corps d'inclusion. Il serait possible aussi d'utiliser un inducteur d'expression protéique permettant une expression plus lente, tel que « The Inducer ». L'expression lente de la transglutaminase pourrait permettre un bon repliement de la protéine et ainsi une meilleure solubilité. Enfin, il serait intéressant d'exprimer une protéine chimère de la transglutaminase. En greffant le gène d'une protéine très soluble telle que MBP au gène de la transglutaminase, on forme une protéine chimère MBP-HTG. Le bon repliement de MBP permet le bon repliement de la transglutaminase et ainsi permettrait de l'obtenir sous forme soluble.

Enfin, mon dernier projet fut d'identifier le résidu catalytique de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase humaine (**chapitre 4**). Pour ce faire, l'enzyme recombinante a premièrement été inhibée irréversiblement par un composé synthétique, l'acide 2-amino-4-[mono(4-cyanophényl)phosphono]butanoïque. Ensuite, l'échantillon de la protéine inhibée a été soumis à des études de spectroscopie de masse. Ceci nous démontra avec certitude que la petite sous-unité de l'enzyme était celle marquée par l'inhibiteur, car sa masse avait augmenté d'exactly 165 Da, correspondant à la masse ajoutée à la protéine. Ensuite, des études de nanoLCMS-MS ont permis de découvrir que le résidu Thr381 de la petite sous-unité était celui qui était lié à l'inhibiteur. Le nucléophile identifié fut donc la Thr381. Ces résultats feront donc l'objet d'un article qui sera soumis sous peu.

# CHAPITRE 6

## **6 : PARTIE EXPÉRIMENTALE**

### **6.1 : Partie expérimentale de la synthèse organique**

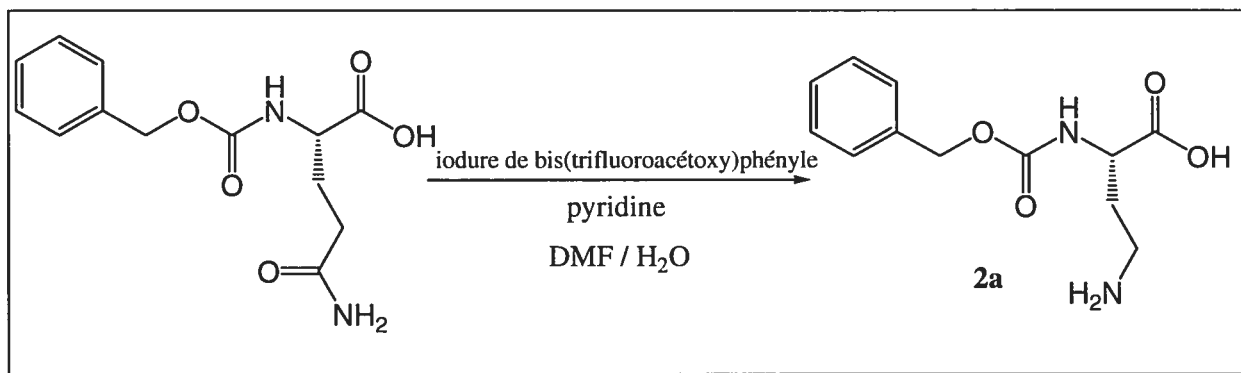
#### ***6.1.1: Matériels***

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  ont été obtenus sur des appareils Brüker de 300 MHz et les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  sur des Brüker de 75 MHz. Les solvants sont indiqués avec les données spectrales et les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, en référence au TMS. Tous les spectres de masse ont été effectués sur un instrument LC-MSD-Tof en mode electrospray positif. Les  $(\text{M}+\text{H})^+$  ou les  $(\text{M}+\text{Na})^+$  ont été utilisés comme confirmation de la valeur empirique des composés. La chromatographie flash a été effectuée sur des colonnes de gel de silice (mesh de 200-340), obtenu par Silicycle. Tous les composés chimiques ont été fournis par Sigma-Aldrich et les solvants par VWR.

### 6.1.2: Procédures générales de synthèse

#### Procédure 1 :

#### Réarrangement de Hofmann



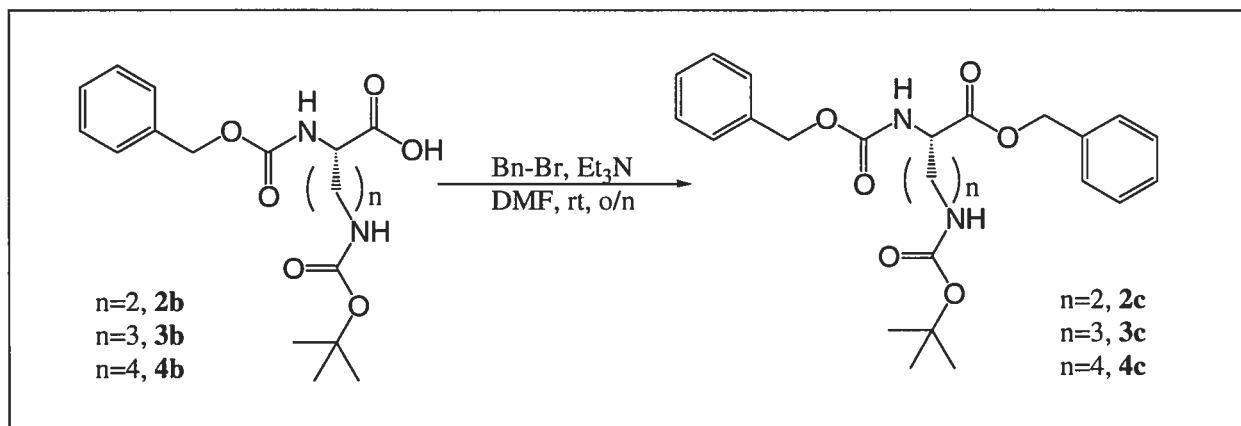
Le produit commercial CBz-Gln (3.16 mmol) est dissous dans 10 mL de DMF et traité avec 5.35 mmol d'iodure de bis(trifluoroacétoxy)phényle. Une fois que les réactifs sont bien dissous, 10 mL d'eau sont ajoutés goutte à goutte afin que la solution demeure homogène. Enfin, 7.15 mmol de pyridine sont ajoutés goutte à goutte. Le tout est agité pendant 24 heures à température pièce. Une libération de CO<sub>2</sub> et une précipitation graduelle de sel de pyridine sont observées.

Le mélange hétérogène est alors filtré sous vide. Le filtrat est ensuite évaporé sous vide, et l'huile obtenue est directement utilisée pour la prochaine étape de synthèse sans plus de purification.



### Procédure générale 3:

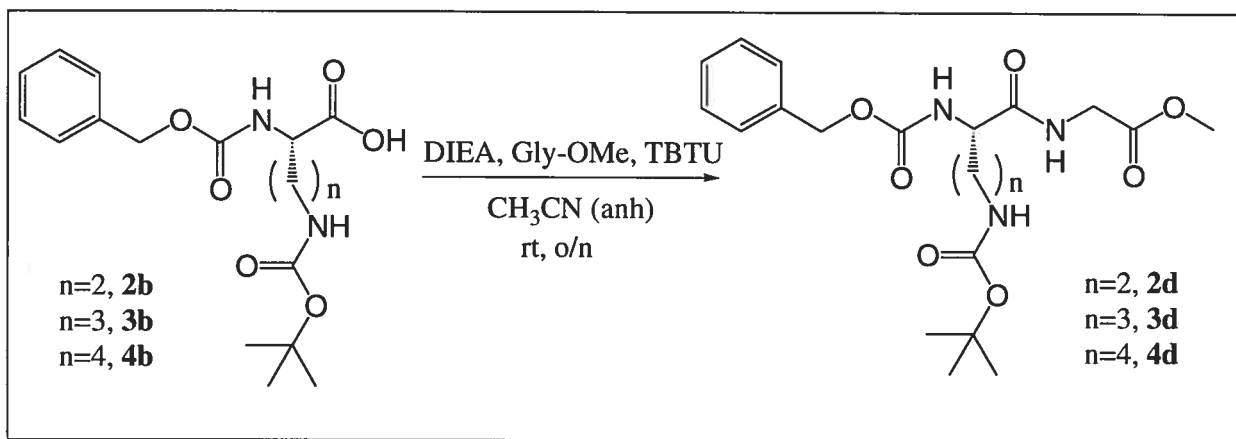
#### Protection d'un acide carboxylique par un groupement benzylester



Un ballon est d'abord enveloppé de papier aluminium pour laisser les réactifs dans le noir. Un des acides **2b-4b** (1.15 mmol) est dissous dans 10 mL de DMF, traité successivement avec 0.17 mL de bromure de benzyle (1.38 mmol) et 0.24 mL de triéthylamine (1.73 mmol). Le tout est agité à la température de la pièce toute la nuit. Le solvant est ensuite évaporé sous vide. Le produit benzylé final est purifié par chromatographie flash. Les solvants utilisés pour les produits **2c**, **3c** et **4c** sont décrits dans l'**annexe 1**.

## Procédure générale 4:

## Couplage peptidique

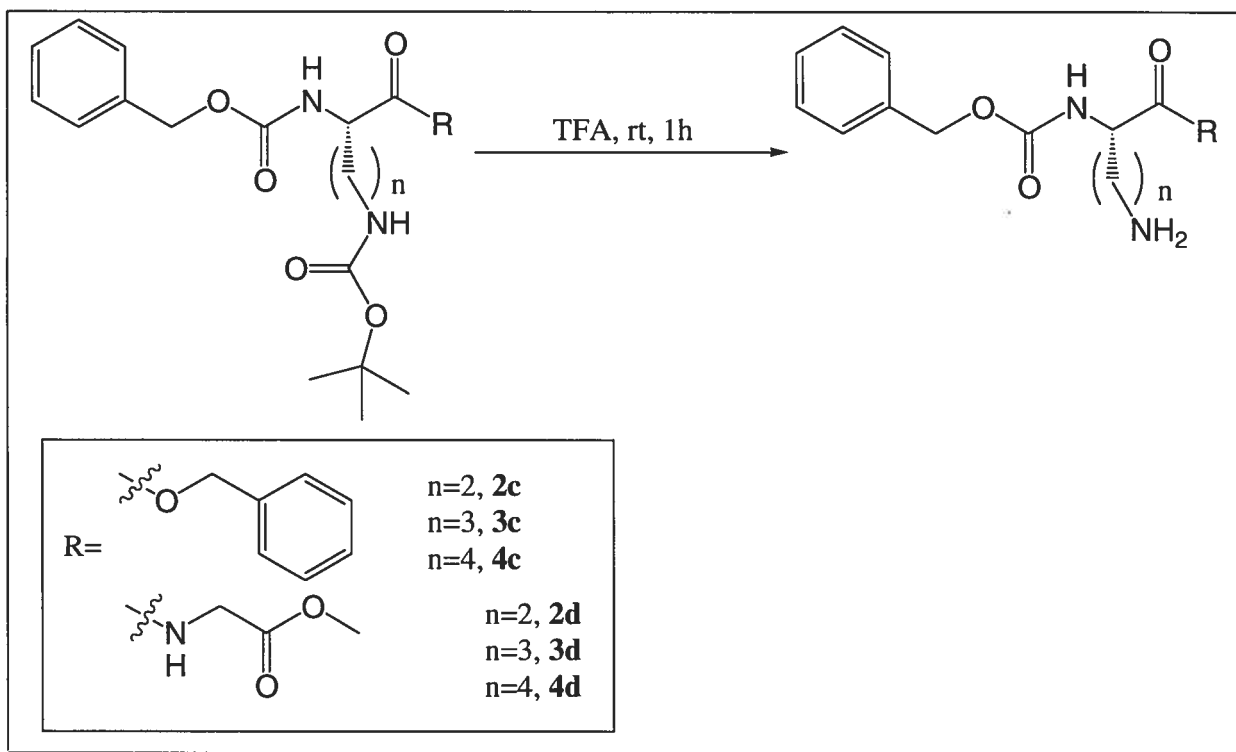


Sous atmosphère d'azote, un des acides **2b-4b** (3 mmol) est dissous dans 10 mL d'acétonitrile anhydre. Après l'addition de 2.59 mL de diisopropyléthylamine (15 mmol), 744 mg de glycine méthylester (6 mmol) sont ajoutés au mélange réactionnel. Finalement, la réaction est initiée par l'ajout de 2.39 g de TBTU (7.5 mmol). Le tout est agité à la température de la pièce toute la nuit. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu est purifié par chromatographie flash. Les solvants utilisés sont décrits dans l'**annexe 1**.



## Procédure générale 5:

## Déprotection d'un groupement BOC

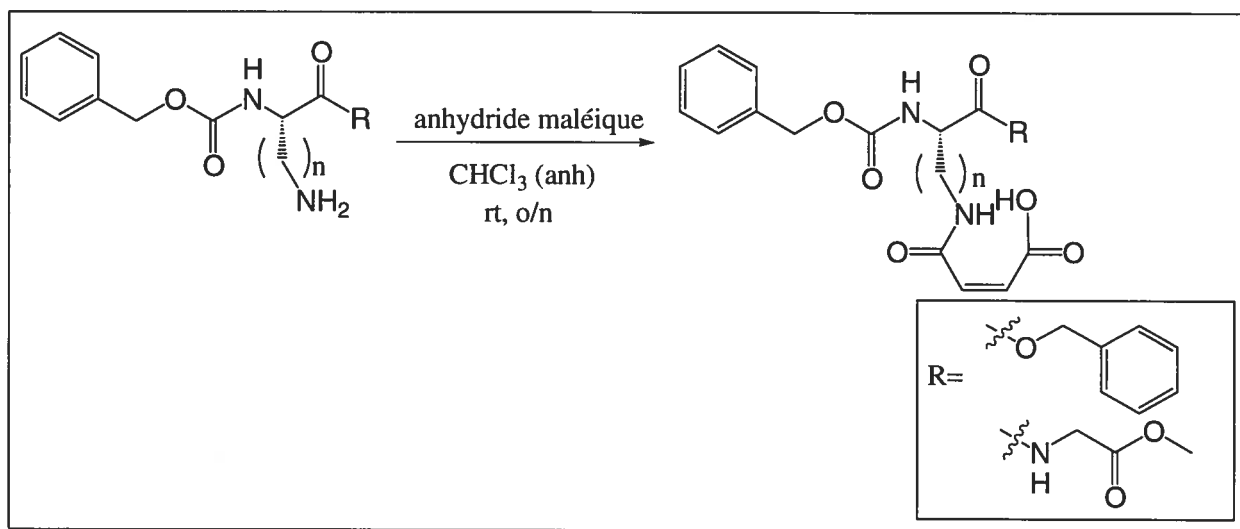


Une des amines protégées **2c-4c** et **2d-4d** (2 mmol) est dissous dans 8 mL d'acide trifluoroacétique (TFA). Après une heure de réaction, une proportion de 1:5 d'acétone / cyclohexane est ajoutée, permettant de former un azéotrope et ainsi faire évaporer sous vide le TFA. Cette étape est effectuée trois ou quatre fois, jusqu'à ce que le TFA soit complètement évaporé. Le résidu final contenant l'amine libre est finalement séché sous vide pour la nuit.

## Procédure générale 6:

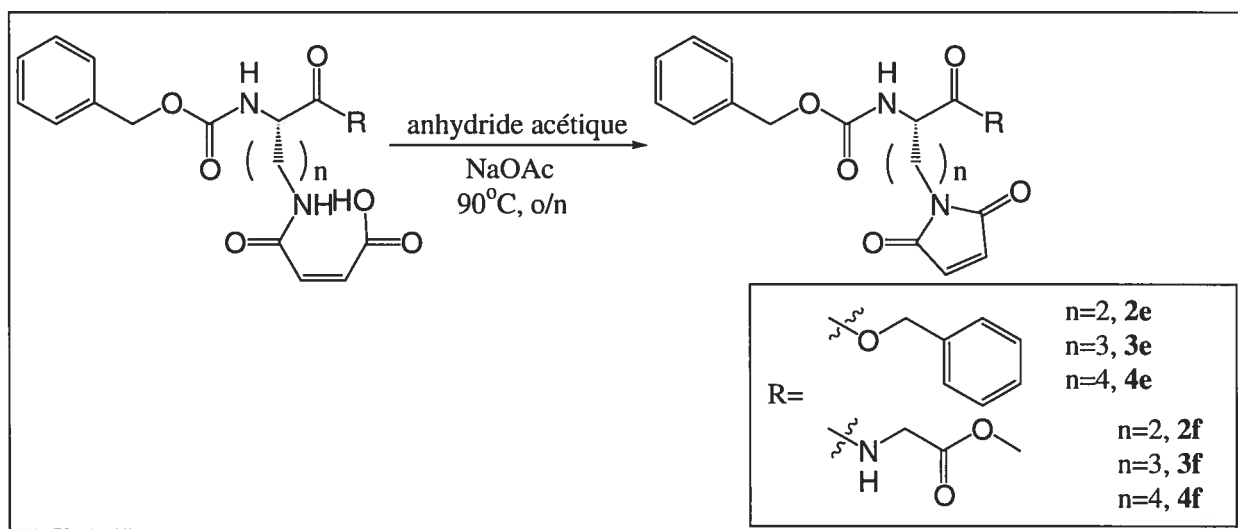
### Formation d'un groupement maléimide sur une amine aliphatique

- Première étape : Formation du maléamide.



Les composés contenant l'amine libre (voir la **procédure générale 5**) sont mis directement sous atmosphère d'azote pour garder le ballon le plus anhydre possible. Le résidu solide est dissous dans 10 mL de chloroforme, puis 217 mg d'anhydride maléique (2.2 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée pendant 20 heures à la température de la pièce, puis le solvant est évaporé sous vide. À ce point, le maléamide pourrait être purifié par une chromatographie flash. Par contre, il est possible (et plus simple) de passer directement à l'étape de la cyclisation du maléamide en maléimide.

- Deuxième étape : Cyclisation en maléimide.



Sous atmosphère d'azote, 10 mL d'anhydride acétique et 42 mg d'acétate de sodium (0.6 mmol) sont ajoutés au maléamide. La solution est agitée à 95 °C toute la nuit, puis le solvant est évaporé sous vide. Le maléimide final est purifié par chromatographie flash. Les solvants utilisés sont décrits dans l'**annexe 1**.

## **6.2 : Partie expérimentale de l'étude enzymologique sur la TGase**

### ***6.2.1 : Matériel***

Les études cinétiques ont été effectuées sur un spectrophotomètre U.V.-visible Cary Varian 100 Bio. Les cuvettes de polystyrène utilisées proviennent de Sarstedt, ont un volume total de 1.5 mL et un trajet optique de 1 cm. Les pH des solutions tampons ont été ajustés à l'aide d'un pH-mètre « Accumet » constituée d'une électrode de référence au calomel et d'une électrode de mesure de verre. L'eau est purifiée par le système « Millipore BioCell », formant de l'eau mQ. Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau mQ. Le DMF utilisé pour dissoudre le substrat et les inhibiteurs synthétiques provient d'American Chemicals LTD. Le MOPS et les sels proviennent de Sigma-Aldrich.

### ***6.2.2 : Test AL-5***

#### *Préparation des solutions mères :*

- Tampon MOPS 200 mM pH 7.0

20.93 g de MOPS est dissous dans 400 mL d'eau mQ. Le pH de la solution est ajusté à 7.00 en y ajoutant goutte à goutte une solution de NaOH 5 N. Ensuite, le volume final de la solution est ajusté à 500 mL par l'ajout d'eau mQ.

- CaCl<sub>2</sub> 0.1 M

1.47 g de CaCl<sub>2</sub> solide est dissous dans 90 mL d'eau mQ. Ensuite, le volume de la solution est complété à 100 mL en ajoutant de l'eau mQ.

- EDTA 20 mM

58 mg de EDTA solide est dissous dans 90 mL d'eau mQ. Ensuite, le volume de la solution est complété à 100 mL en ajoutant de l'eau mQ.

- Tampon pour le test AL-5

À 28 mL de MOPS 200 mM pH 7.0 sont ajoutés successivement 1.666 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M, 0.125 mL d'EDTA 20 mM et 20 mL d'eau mQ.

- Substrat AL-5 (2.18 mM)

Il est préférable de préparer une solution fraîche de substrat tôt le matin avant le début des tests cinétiques de la journée. Dans un tube Eppendorf de 1.5 mL, 1.00 mg d'AL-5 est judicieusement pesé. Le résidu est dissous dans 1 ml de DMF.

#### *Détection de l'activité enzymatique par AL-5 :*

La solution tampon est laissée à la température de la pièce, tandis que la TGase et AL-5 sont conservés dans un bac de glace.

La longueur d'onde du spectrophotomètre doit être fixée à 400 nm et sa température à 37 °C. Dans une cuvette, 900  $\mu\text{L}$  de tampon 200 mM pH 7.0 sont d'abord ajoutés. Ensuite, 25  $\mu\text{L}$  de AL-5 (1 mg/mL) suivi de 25  $\mu\text{L}$  d'eau mQ y sont additionnés. Cette solution est incubée à 37 °C pour 5 minutes. Ensuite, la réaction enzymatique est initiée par l'ajout de 50  $\mu\text{L}$  de TGase (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Pour le blanc, le 50  $\mu\text{L}$  de TGase est remplacé par 50  $\mu\text{L}$  l'eau. L'hydrolyse du substrat est alors suivie par la libération du *p*-nitrophénolate.

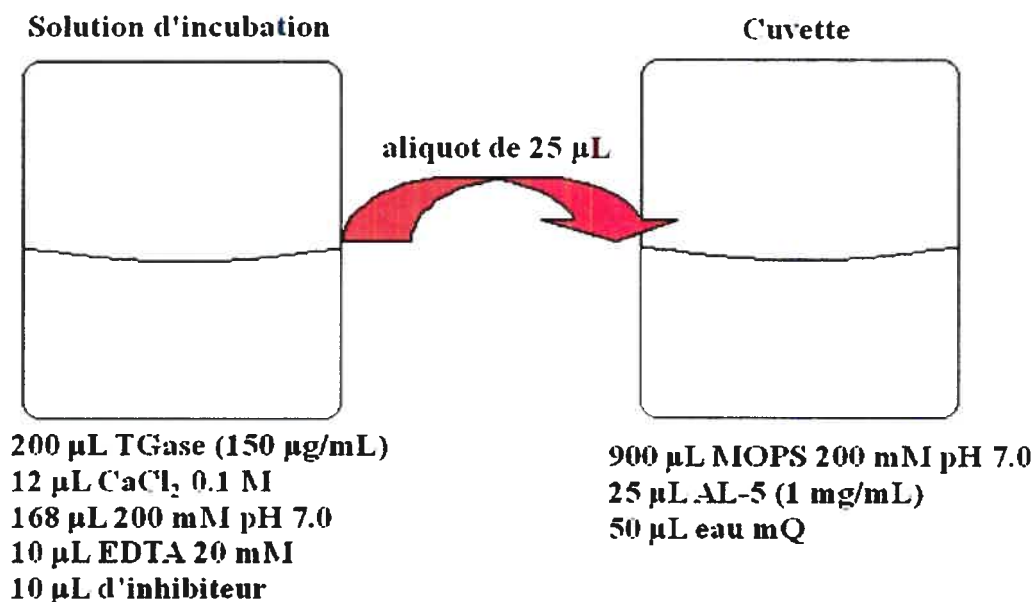
#### **6.2.3 : Test d'inhibition**

Avant d'amorcer l'inactivation, la solution testant l'activité enzymatique résiduelle est d'abord préparée. Pour ce faire, il faut ajouter successivement 900  $\mu\text{L}$  de tampon MOPS 200 mM pH 7.0, 25  $\mu\text{L}$  d'AL-5 (1 mg/mL) et 50  $\mu\text{L}$  d'eau mQ dans 6 cuvettes de plastique. Ces cuvettes sont insérées dans le spectrophotomètre, où la longueur d'onde est ajustée à 400 nm et la température à 37 °C.

Ensuite, la solution d'incubation est préparée dans un tube Eppendorf de la manière suivante. Successivement, on ajoute 200  $\mu\text{L}$  TGase (150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 12  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$

(0,1 M), 168  $\mu\text{L}$  MOPS (200 mM pH 7.0), 10  $\mu\text{L}$  EDTA (20 mM). L'inactivation est alors amorcée par l'ajout de 10  $\mu\text{L}$  d'une solution d'inhibiteur (à une concentration désirée). Cette incubation se fait à température pièce.

Après 6 différents temps d'incubation (0 à 25 minutes), un aliquot de 25  $\mu\text{L}$  est prélevé de la solution d'incubation et ajouté à une des 6 cuvettes contenant la solution testant l'activité résiduelle. La pente initiale mesurée représente l'activité résiduelle de la TGase après pour les différents temps d'incubation.



**Figure 6.1** : Préparation des solutions d'incubation et de test d'activité résiduelle lors des tests d'inhibition.

#### **6.2.4 : Détermination des paramètres cinétiques d'inhibition**

Les courbes expérimentales observant la libération du *p*-nitrophénolate ont été directement observées à l'aide du logiciel « Cary WinUV – Kinetics ». Pour chacun des temps d'incubation, la pente initiale de ces courbes a été mesurée. Cette expérience a été répétée pour 7 concentrations différentes d'inhibiteurs.

Les valeurs de la pente en fonction du temps d'incubation pour chacune des concentrations d'inhibiteur ont été transférées dans le logiciel « Origin ». À partir de ces valeurs, une courbe suivant une équation exponentielle de premier ordre suivant

l'équation  $y = Ae^{-k_{\text{obs}}t}$  est tracée, où « y » est l'activité enzymatique résiduelle et « t » est le temps d'incubation. Ce graphique permet de calculer le  $k_{\text{obs}}$  d'inactivation pour chacune des concentrations d'inhibiteur.

La droite obtenue par la relation du  $k_{\text{obs}}$  en fonction de la concentration d'inhibiteur est ensuite tracée. La pente linéaire de cette droite a été déterminée, cette valeur correspondant au  $k_{\text{inact}} / K_I$ . C'est ainsi que la spécificité enzymatique a été calculée pour chacun des inhibiteurs.

### **6.2.5 : Détermination de l'importance de l'EDTA lors d'un test d'activité de la TGase recombinante**

Il s'agit d'un test AL-5 typique (section 6.2.2), mais dont la concentration en EDTA présent dans le tampon AL-5 a été variée entre 0 et 1 mM. La préparation de ces différentes solutions tampon AL-5 est présentée dans le **tableau IX**.

**Tableau IX :** Volume de chacun des constituants de la solution tampon AL-5 pour les différentes concentrations en EDTA.

[EDTA] (mM)	MOPS 200 mM pH 7.0 (mL)	CaCl <sub>2</sub> 0.1 M (mL)	EDTA 20 mM (mL)	Eau mQ (mL)
0	28	1.666	0	20
0.05	28	1.666	0.125	20
0.50	28	1.666	0.250	20
1.00	28	1.666	0.500	20

Ainsi, l'activité de la TGase est vérifiée par spectrophotométrie, en observant la libération du *p*-nitrophénolate à 400 nm. Les pentes initiales sont calculées et comparées directement à partir des courbes expérimentales.

### 6.2.6 : Vérification de la liaison des inhibiteurs de type maléimide au site actif de la TGase

Tout d'abord, deux solutions permettant de calculer l'activité résiduelle de l'enzyme sont préparées dans deux cuvettes, selon le protocole décrit à la **section 6.2.2**.

Une solution d'incubation est d'abord préparée, où la TGase est en présence de 12 mM de substrat donneur ZQG ( $4 K_M$ ) et 100  $\mu$ M du composé **2e**. Pour le blanc, le ZQG est remplacé par de l'eau mQ. Le **tableau X** montre les volumes de chacun des constituants des solutions d'incubation sans et avec 12 mM de ZQG.

**Tableau X** : Volume de chacun des constituants de la solution d'incubation avec ou sans substrat donneur ZQG.

[ZQG] (mM)	0	12
MOPS 200 mM pH 7.0 ( $\mu$ L)	30	30
CaCl <sub>2</sub> 0.1 M ( $\mu$ L)	3.0	3.0
ZQG 37.5 mM ( $\mu$ L)	0	32
Composé <b>2e</b> 10 mM ( $\mu$ L)	5.0	5.0
Eau mQ ( $\mu$ L)	32	0
TGase 1 mg/mL ( $\mu$ L)	30	30
TOTAL ( $\mu$ L)	100	100

L'incubation est donc amorcée par l'ajout de la TGase (pour le 0 et  $4 K_M$  de ZQG) et se fait à la température de la pièce. Après 20 minutes d'incubation, un aliquot de 25  $\mu$ L de chacune des solutions est prélevé et transféré dans une cuvette de test d'activité. Ainsi, l'activité résiduelle de la TGase est vérifiée par spectrophotométrie, en observant la libération du *p*-nitrophénolate à 400 nm. Les pentes initiales sont calculées et comparées directement à partir des courbes expérimentales.



### **6.3: Partie expérimentale de la biologie moléculaire et de l'expression de la TGase**

#### ***6.3.1 : Matériel***

Toutes les troussees utilisées pour la biologie moléculaire ainsi que la résine Ni-NTA proviennent de QIAGEN. Les enzymes de restriction, leur tampon respectif proviennent de New England Biolabs. La ligase T4 provient de Fermentas. Le marqueur de fragments d'ADN ayant différents nombres de paires de base est le Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

#### ***6.3.2 : Biologie moléculaire; Sous-clonage***

##### **6.3.2.1 : Mini-préparation d'ADN plasmidique (mini-prep)**

L'isolation d'un plasmide contenu dans une bactérie se fait à partir du protocole standard décrit par QIAGEN.

##### **6.3.2.2 : Amplification par PCR (avec gradient de température d'hybridation)**

Quatre solutions identiques sont préparées dans des tubes à PCR de 200  $\mu\text{L}$ . On utilise 2  $\mu\text{L}$  d'ADN (contenant le gène à amplifier) provenant d'une mini-prep à laquelle on additionne successivement 1  $\mu\text{L}$  de chaque amorce (100 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de tampon Thermopol 10X, 5  $\mu\text{L}$  de DMSO, 2  $\mu\text{L}$  de dNTP (10 mM) et 0.5  $\mu\text{L}$  de polymérase Vent d'ADN. Le volume total est complété à 100  $\mu\text{L}$  avec l'ajout de 78.5  $\mu\text{L}$  d'eau mQ. Les tubes sont placés dans l'appareil à PCR à la position de la température d'hybridation désirée. Le gène est alors amplifié selon le programme « GRADPCR », variant la température comme suit : 1- 96 °C pour 2 minutes, 2- 92 °C pour 1 minute, 3- 55 °C - 65 °C pour 1 minute, 4- 72 °C pour 1.5 minutes, 5- GO TO #2 pour 30 fois, 6- 72 °C pour 10 minutes, 7- 4 °C FOREVER. La vérification du succès de l'amplification se fait par gel d'agarose.

### 6.3.2.3 : Précipitation d'ADN au *n*-butanol

La purification du gène amplifié se fait par précipitation au *n*-butanol. À 40 µL de la solution de PCR s'ajoute 10 µL d'eau mQ et 450 µL de *n*-butanol. La solution est bien resuspendue puis vortexée pour 30 secondes. Ensuite, la solution est centrifugée à 14 000 rpm pour 30 minutes à la température de la pièce. Délicatement, le surnageant est retiré et le culot est séché à 37 °C pour 45 minutes. Enfin, le culot est resuspendu dans 30 µL d'eau mQ.

### 6.3.2.4 : Digestion par enzymes de restriction (exemple avec *EcoRI* et *SalI*)

À 30 µL d'ADN (gène amplifié et purifié et/ou plasmide provenant d'une mini-prep) sont additionnés successivement 4 µL de Buffer 3, 0.5 µL de *SalI* et 5 µL d'eau mQ. La digestion est amorcée à 37 °C pour une durée de 2 heures. 0.5 µL de *SalI* est ajouté puis le tube est placé à nouveau à 37 °C pour une troisième heure. Un dernier 0.5 µL de *SalI* est alors ajouté et la digestion à 37 °C se poursuit toute la nuit. Le lendemain matin, la solution est centrifugée 5 secondes pour faire redescendre tous les réactifs. Ensuite, 1 µL de *EcoRI* est ajouté pour une digestion d'une heure à 37 °C. Enfin, un dernier 0.5 µL d'*EcoRI* est additionné pour une dernière heure d'incubation à 37 °C. La totalité du volume de la solution est chargée et séparée par migration sur gel d'agarose (séparé en deux ou trois puits) pour la purification des bandes d'ADN par QIAEX.

### 6.3.2.5 : Purification par QIAEX

La purification des bandes d'ADN sur gel d'agarose se fait à partir du protocole standard décrit par QIAGEN.

### 6.3.2.6 : Ligaturation

Pour l'étape de la ligaturation entre le plasmide et le gène, on doit utiliser une proportion d'ADN suivant un rapport 2 :1 ou 3 :1 pour le nombre de moles d'insert par rapport au nombre de moles du vecteur.<sup>114</sup>

À partir de ceci, la ligation se fait de la manière suivante. Aux volumes d'insert et de plasmide combinés, on ajoute 3  $\mu\text{L}$  de tampon ligase T4 10X puis 1.5  $\mu\text{L}$  de ligase T4. La solution est complétée à 35  $\mu\text{L}$  avec de l'eau mQ. La réaction se fait à la température de la pièce pour 1.5 heures (ou pour toute la nuit), puis la solution est conservée à 4 °C.

#### **6.3.2.7 : Préparation de cellules compétentes**

Une préculture de 3 mL est préparée et incubée à 37 °C, avec une agitation de 250 rpm pour la nuit. 1 mL de cette préculture est ensuite prélevé et ajouté à 50 mL de milieu de culture frais. Les bactéries sont à nouveau incubées à 37 °C, avec une agitation de 250 rpm, jusqu'à une absorbance à 600 nm soit de 0.4. Les bactéries sont alors centrifugées à 3000 g, 4 °C, pour 20 minutes. Le surnageant est retiré et le culot de bactéries est resuspendu sur glace avec 25 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M stérile. La suspension est incubée sur glace pour 30 minutes, puis les bactéries sont centrifugées à nouveau. Après avoir retiré le surnageant, le culot bactérien est resuspendu avec 2.5 mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M stérile puis incubé sur glace pour un dernier 30 minutes. Suite à cette incubation, 441  $\mu\text{L}$  d'une solution stérile de 50 % glycérol / 1 % NaCl est ajoutée et mélangée délicatement. Les cellules sont alors aliquotées dans des tubes Eppendorfs stériles par volume de 200  $\mu\text{L}$  et conservées à -80 °C.

#### **6.3.2.8 : Transformation chimique**

À 200  $\mu\text{L}$  de cellules compétentes sont ajoutés 10  $\mu\text{L}$  du plasmide désiré (produit de la ligation). Le tout est incubé sur glace pendant 45 minutes. Le choc thermique est alors amorcé lorsque la solution est mise à 37 °C pour 2 minutes, puis remise directement sur glace pour 5 minutes. 1 mL de LB frais est ajouté dans le tube Eppendorf, puis celui-ci est placé dans un incubateur à 37 °C, avec une agitation de 250 rpm pour 45 minutes. Les bactéries nouvellement transformées sont alors étalées sur pétris contenant l'antibiotique nécessaire. Ces pétris sont enfin laissés dans un incubateur à 37 °C pour la nuit... en espérant voir de belles colonies le lendemain matin!

### ***6.3.3 : Expression de la transglutaminase tissulaire de foie de cobaye***

L'expression de la TGase de foie de cobaye a été effectuée selon le protocole établi dans le groupe.<sup>42</sup>

### ***6.3.4 : Expression de la TGase humaine***

L'expression de la TGase humaine est basée sur le protocole de l'expression de la TGase de foie de cobaye.<sup>42</sup> Par contre, les paramètres suivants ont été variés : la densité optique de la culture bactérienne avant l'induction (0.6 – 1.1), la concentration en IPTG (1  $\mu$ M – 1 mM), la température (13 °C – 28 °C), le temps d'incubation (0.5 h – 20 h) et la méthode de lyse cellulaire (sonication ou French Press).

## **6.4 : Partie expérimentale de l'étude sur la hGGT**

### **6.4.1 : Matériel**

Les composés entrant dans la composition des milieux de culture LB, YPD, BMGY et BMMY proviennent principalement de la compagnie Bioshop Canada. Les solutions pour les gels d'électrophorèse proviennent aussi de la compagnie BioRad. Le marqueur de poids moléculaire protéique provient de Sigma Aldrich. Les mesures d'absorbance ont été prises avec un spectrophotomètre Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 (Pharmacia).

### **6.4.2 : Expression et purification de la hGGT**

#### **1<sup>ère</sup> semaine**

##### **LUNDI : Inoculation sur pétris (si nécessaire)**

Les pétris de YPD + agar sont préparés de la manière suivante. 10 g de « yeast extract », 20 g de peptone et 20 g d'agar sont dissous dans 900 mL d'eau mQ (l'agar ne se dissoudra pas). La solution est stérilisée à l'autoclave. Une fois qu'elle se refroidit considérablement, 100 mL de dextrose 20 % (200 g de D-glucose dans 1 L d'eau) y est ajouté et la solution finale est coulée dans des pétris. Lorsque ces pétris ont bien refroidi, les *Pichia pastoris* de souche X33 congelés y sont inoculés. Ces pétris sont alors incubés à 37 °C pendant trois jours. Enfin, ils peuvent être conservés pendant un mois à 4 °C.

##### **MERCREDI : Préparation des solutions stocks et milieux de culture**

- Tampon phosphate 1 M pH 7.00.

On mélange 500 ml de  $K_2HPO_4$  1 M (174 g pour 1 L d'eau mQ) avec 500 mL de  $KH_2PO_4$  1 M (136 g pour 1 L d'eau mQ).

- « Buffered methanol-complex Medium » et « Buffered glycerol-complex Medium » (BMGY et BMMY)

Une portion de 10 g de « yeast extract » et 20 g de peptone sont dissous dans 700 mL d'eau mQ. Ces solutions sont autoclavées.

- YNB 10X

Une portion de 34 g de « Yeast Nitrogen Base » et 100 g de sulfate d'ammonium sont dissous dans 1 L d'eau mQ. La solution est ensuite stérilisée par filtration à l'aide d'un filtre de 0.22  $\mu\text{m}$ .

- Biotine 500X

Une portion de 10 mg de biotine est diluée dans 50 mL d'eau mQ. La solution est alors stérilisée par filtration à l'aide d'un filtre de 0.22  $\mu\text{m}$ .

- Glycérol 10X

100 mL de glycérol est dilué dans 900 mL d'eau mQ. Cette solution est stérilisée par filtration à l'aide d'un filtre de 0.22  $\mu\text{m}$ .

- Méthanol 10X

10 mL de méthanol pur est dilué dans 90 mL d'eau mQ. Cette solution est stérilisée par filtration à l'aide d'un filtre de 0.22  $\mu\text{m}$ .

- Méthanol 100%

Le méthanol pur est stérilisé par filtration à l'aide d'un filtre de 0.22  $\mu\text{m}$ .

**JEUDI : Préculture**

La solution de BMGY est complétée en y ajoutant 100 mL de tampon phosphate 1 M pH 7, 100 mL de YNB 10X, 2 mL de biotine 500X et 100 mL de glycérol 10 %. Pour effectuer la préculture, 4 mL de cette solution est prélevé et introduit dans une éprouvette stérile. Ensuite, une des colonies du pétri est piquée puis déposée dans ces 4 mL de BMGY. L'éprouvette est laissée dans l'incubateur à 30 °C, agité à 250 rpm jusqu'à vendredi.

**VENDREDI : Culture**

Les 4 mL de préculture sont transférés dans 1 L de BMGY frais (le reste de la solution préalablement préparée). La culture est laissée dans l'incubateur à 30 °C, agité à 250 rpm, pour toute la fin de semaine.

**2<sup>e</sup> semaine****LUNDI : Induction**

Lorsque la densité optique du milieu de culture atteint une valeur de 10 à 600 nm, les levures sont centrifugées de manière stérile à 1500 g pour 30 min à la température de la pièce. Pendant ce temps, le milieu de BMMY est complété de la manière suivante. À la solution de BMMY déjà stérilisée, 100 mL de tampon phosphate 1M pH 7, 100 mL de YNB 10X, 2 mL de biotine 500X et 100 mL de méthanol 10X sont ajoutés. Ensuite, 1 % de volume d'une solution de « casamino acids » 20 % m/m y est ajouté (10 mL pour 1L de BMMY).

Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est retiré. Les culots de levures sont resuspendus avec la solution fraîchement préparée de BMMY + 1 % de « casamino acids » dans un volume total pour avoir une DO de 15 (souvent environ 700 mL). Cette solution est laissée dans l'incubateur pour 96 heures (jusqu'à vendredi). Pendant cette semaine, 1 % de méthanol 100 % stérile est ajouté à la solution, et ce, à tous les jours (par exemple: 7 mL pour 700 mL de culture).

**VENDREDI : Arrêt de l'induction**

Une fois que les 96 heures d'incubation sont terminées, le milieu de culture est centrifugé à 1500 g pour 30 min à 4 °C. Le surnageant est divisé en trois bouteilles de Nalgène et est conservé à -80 °C.

**3<sup>e</sup> semaine****LUNDI : décongélation du surnageant**

Une bouteille de Nalgène contenant le surnageant est dégelée pour toute la nuit à 4 °C.

**MARDI : Purification**

Dans la chambre froide, le surnageant est filtré grossièrement avec un filtre de 0.22 µm de marque Whatman. Ensuite, le filtrat est concentré par ultrafiltration à l'aide d'une membrane ayant un « molecular weight cut off » de 10 000 Da. Le débit doit être environ de 100 mL/h, et ce en ajustant la pression d'azote à 40 000 psi. Pendant cette filtration, le tampon de lyse (47 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M, 3 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M, 8.75 g de NaCl dans un volume total de 500 mL d'eau mQ) est préparé.

Un aliquot de 100 mL de tampon de lyse est ajouté au surnageant concentré lorsqu'il reste environ 50-60 mL, puis la solution est refiltrée. Cette opération est répétée deux autres fois. Pendant ce temps, 2 mL de résine Ni-NTA est conditionné avec le tampon de lyse. Finalement, le surnageant est concentré jusqu'à 25 mL. Ce 25 mL de surnageant est alors transféré dans un tube Falcon de 50 mL et l'aliquot de 2 mL de Ni-NTA préalablement conditionnée y est ajouté. Le mélange est agité pendant une heure dans la chambre froide.

Pendant cette heure d'attente, les solutions de lavage L5 (50 µL d'imidazole 1 M, 9.95 mL de tampon de lyse) et L10 (100 µl d'imidazole 1M, 9.90 mL de tampon de



lyse) sont préparées ainsi que la solution d'éluion E250 (800  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 M, 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M, 2.50 mL d'imidazole 1M, 6.50 mL d'eau mQ).

Une fois que le surnageant a été mélangé pour au moins une heure avec le Ni-NTA, le contenu a été versé sur colonne à Ni-NTA. Le « flow through » est d'abord récolté, suivi d'un lavage avec 8 mL de lavage au tampon de lyse (L0), d'un lavage avec 6 mL de L5 et d'un lavage avec 6 mL de L10. La hGGT a enfin été éluée avec 4 mL de E250.

Toujours dans la chambre froide, l'aliquot de 4 mL d'éluion a été transféré dans deux colonnes de désalinisation PD10 (2 mL par colonne). Le « flow through » d'abord recueilli a été jeté. Ensuite, la hGGT a été éluée en ajoutant 4 mL de tampon Tris acétate 100 mM pH 8 dans chaque colonne. Cette fraction constitue la hGGT purifiée.

#### ***6.4.3 : Spectroscopie de masse par LCMS***

Un échantillon de 25  $\mu\text{g}$  de GGT humaine a été incubé en présence de 2 mM d'acide 2-amino-4-[mono(4-cyanophenyl)phosphono]butanoïque (**figure 4.7**) à 37 °C pendant 20 minutes, dans 25  $\mu\text{L}$  de tampon 100 mM Tris acétate pH 8.0. Pour le contrôle, l'incubation s'est effectuée sans inhibiteur. Par la suite, la protéine est diluée à 0.5 mg/mL dans une solution de 50 % acétonitrile et 1 % d'acide formique pour les études de LCMS.

La masse totale de la GGT humaine a été déterminée par LCMS, utilisant un système 1100 LC, couplé à un spectromètre de masse ESI-MSD-TOF (Agilent Technologies). La colonne chromatographique était un Poroshell 300SB-C8, chauffé à 45 °C et opéré à 0.2 mL/min. Un gradient linéaire de 25-75 % (0.1 % d'acide formique dans de l'acétonitrile) pendant 10 minutes, pour un total de 15 minutes, ce qui a permis l'éluion. Le spectromètre de masse a été opéré en mode electrospray avec un montage « double spray » permettant une calibration interne et ainsi offrant une bonne précision de masse. Les spectres de masse ont été obtenus dans des valeurs de m/z entre 110 et

2000, avec un cycle d'acquisition de 0.89 seconde. Le programme Bioconfirm (Agilent Technologies) a été utilisé pour la déconvolution du patron de distributions charge-état des spectres de protéine electrospray.

#### **6.4.4 : Spectroscopie de masse LCMS-MS**

50 µg de la GGT humaine purifiée a été incubé dans 50 µL de tampon 200 mM Tris sulfate pH 7.2 pendant 20 minutes à 37 °C avec 2 mM d'acide 2-amino-4-[mono(4-cyanophenyl)phosphono]butanoïque. Pour le contrôle, l'incubation s'est effectuée sans inhibiteur.

Un aliquot de 24 mg d'urée (8 M) a alors été ajouté puis la solution a été incubée à 37 °C pendant une heure. La solution a ensuite été diluée à 4 M d'urée par l'ajout d'un volume de tampon 50 mM bicarbonate d'ammonium pour ensuite en faire une digestion par l'endopeptidase LysC (Wako Chemicals, Richmond, VA) pendant 4 heures à 37 °C. Par la suite, cette solution a été diluée à 1 M d'urée par l'ajout de 4 volumes de tampon 50 mM bicarbonate d'ammonium pour effectuer une digestion à la trypsine (Promega, Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) toute la nuit à 37 °C.

Tous les fragments de peptides ont été analysés par nanoLCMS-MS, utilisant un système NanoAcquity couplé à un spectromètre de masse Q-ToF Premier (Waters Corporation). Le système de chromatographie comprenait une pré-colonne Jupiter C<sub>18</sub> 5 µm, 5 mm x 300 µm et une colonne analytique Jupiter C<sub>18</sub> 3 µm, 10 cm x 150 µm (Phenomenex, Torrance, CA).

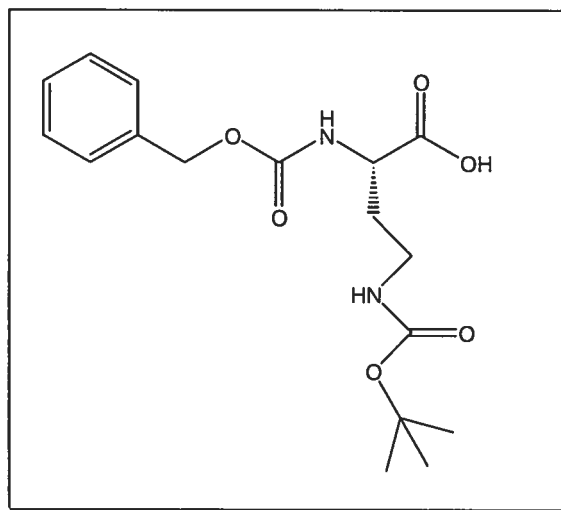
Les échantillons digérés ont initialement été transférés dans une solution aqueuse contenant 0.1 % d'acide formique, puis chargés sur la précolonne avec un débit de 4 µL/min pour 5 minutes. L'élution des peptides est effectuée à un débit de 600 nL/min avec un gradient linéaire de 10-60 % (0.2 % d'acide formique dans de l'acétonitrile) pendant 63 minutes. Le spectromètre de masse a été opéré en mode ion positif avec une force de résolution typique d'au moins 10,000 FWHM. L'analyseur du temps-de-vol a été calibré de manière externe avec la glufibrinopeptide B de valeurs m/z entre 50 et 1600. Les spectres de masse ont été acquis pour des valeurs m/z entre 400 et 1600, avec

un temps d'acquisition de cycle de 2.3 secondes. Les spectres MS-MS ont été collectés en utilisant une acquisition dépendante des données pour des ions à charge multiple de 15 coups. Une rampe d'énergie de collision programmable et typique de 30-80 eV a été utilisée comme précurseur des différents états de charge afin d'optimiser l'observation des fragments d'ions. Une dissociation induite par collision a été effectuée en utilisant de l'argon comme gaz de collision.

# **ANNEXE 1**

**ANNEXE 1 :****Caractérisation des produits chimiques synthétiques**

**2b** : Acide *N*<sup>α</sup>-carbobenzyloxy-2,4-diamino-*N*<sup>γ</sup>-*tert*-butoxycarbonyl-L-butyrique

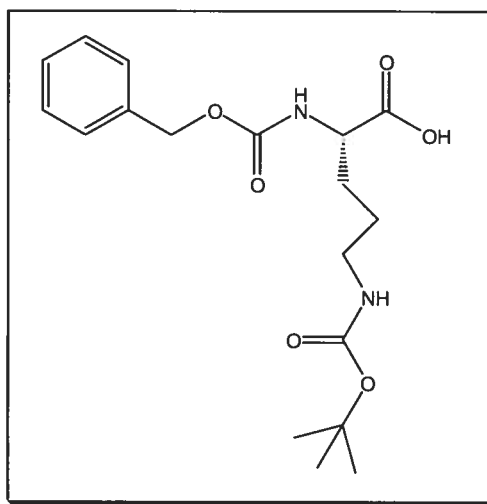


L'amine protégée **2b** est obtenue à partir de l'amine **2a** en suivant la **procédure générale 2**. Suite à une chromatographie flash (70 % éther / 20 % dichlorométhane / 8 % hexanes / 2 % acide acétique), les fractions contenant le produit **2b** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile jaunâtre avec un rendement de 37 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.38 (m, 5H), 6.60 (s, 1H), 5.75 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.45 (q, 1H, *J* = 5.8 Hz), 3.19 (m, 2H), 2.06 (m, 1H), 1.94 (m, 1H), 1.47 (s, 9H).

**Rf:** 0.61 (75 % AcOEt / 24 % hexanes / 1 % AcOH)

**3b** : *N*<sup>α</sup>-carbobenzyloxy-2,5-diamino-*N*<sup>δ</sup>-*tert*-butoxycarbonyl-L-ornithine

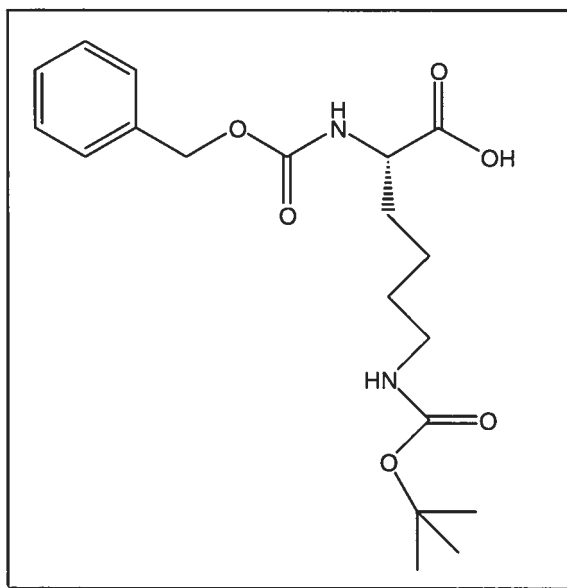


L'amine protégée **3b** est obtenue à partir de l'amine **3a** en suivant la **procédure générale 2**. Le produit pur est obtenu sous forme d'une huile jaunâtre avec un rendement de 76 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.30 (m, 5H), 5.66 (s, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.77 (s, 1H), 4.36 (m, 1H), 3.08 (m, 2H), 1.83 (m, 1H), 1.56 (m, 1H), 1.50 (qn, 2H, *J* = 5.9 Hz), 1.40 (s, 9H).

**Rf:** 0.50 (70 % AcOEt / 29 % hexanes / 1 % AcOH)

**4b:** *N*<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy-2,6-diamino-*N*<sup>ε</sup>-*tert*-butoxycarbonyl-L-lysine

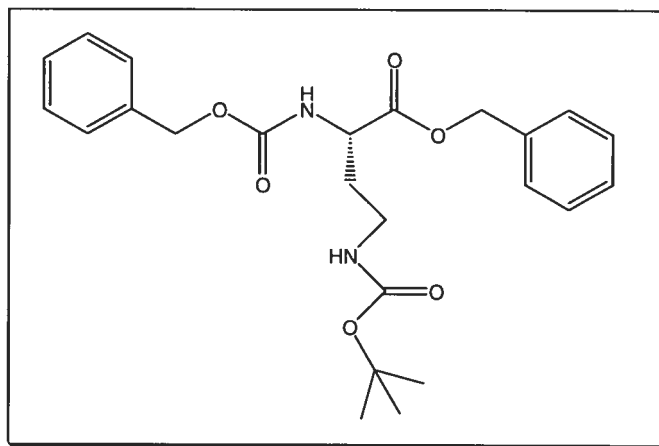


L'amine protégée **4b** est obtenue à partir de l'amine **4a** en suivant la **procédure générale 2**. Le produit pur est obtenu sous forme d'une huile transparente avec un rendement de 81 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.35 (m, 5H), 5.72 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.75 (s, 1H), 4.40 (m, 1H), 1.86 (m, 1H), 1.77 (m, 1H), 1.60 (b, 13H).

**Rf:** 0.65 (99 % AcOEt / 1 % AcOH)

**2c** : *N*<sup>α</sup>-carbobenzyloxy-2,4-diamino-*N*<sup>γ</sup>-*tert*-butoxycarbonyl-L-butyrate de benzyle



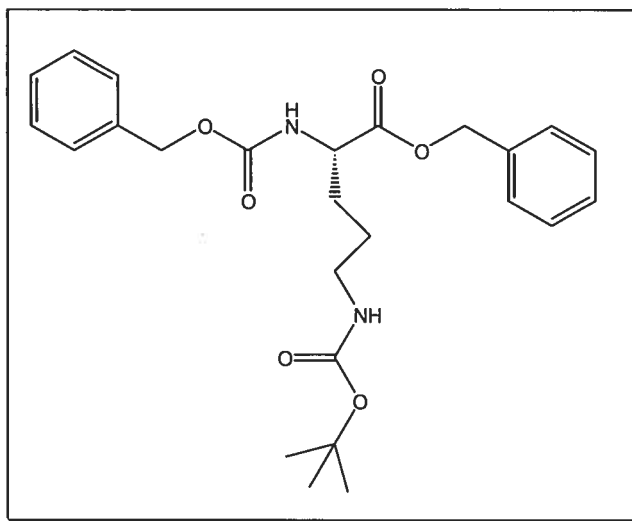
L'ester de benzyle **2c** est obtenu à partir de l'acide **2b** en suivant la **procédure générale 3**. Suite à une chromatographie flash (50 % chloroforme / 25 % acétate d'éthyle / 25 % hexanes), les fractions contenant le produit **2c** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 92 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.31 (b, 10H), 5.70 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 5.13 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 5.06 (s, 1H), 4.44 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 2.99 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.40 (s, 9H).

**Rf:** 0.54 (50 % CHCl<sub>3</sub> / 25 % AcOEt / 25 % hexanes)



**3c** : *N*<sup>α</sup>-carbobenzyloxy-2,5-diamino-*N*<sup>δ</sup>-*tert*-butoxycarbonyl-L-ornithinate de benzyle

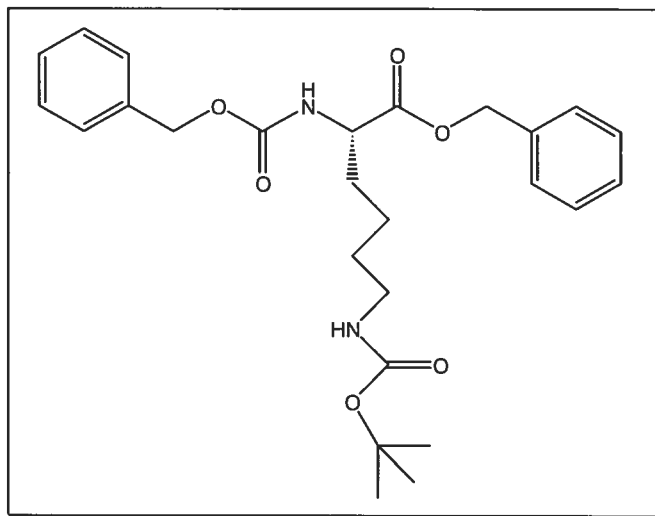


L'ester de benzyle **3c** est obtenu à partir de l'acide **3b** en suivant la **procédure générale 3**. Suite à une chromatographie flash (50 % chloroforme / 30 % hexanes / 20 % acétate d'éthyle), les fractions contenant le produit **3c** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 69 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.32 (b, 10H), 5.48 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.52 (s, 1H), 4.37 (m, 1H), 3.04 (m, 2H), 1.81 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.40 (b, 11H).

**Rf:** 0.42 (50 % CHCl<sub>3</sub> / 10 % AcOEt / 40 % hexanes)

**4c** : *N*<sup>α</sup>-carbobenzyloxy-2,6-diamino-*N*<sup>ε</sup>-*tert*-butoxycarbonyl-L-lysinate de benzyle

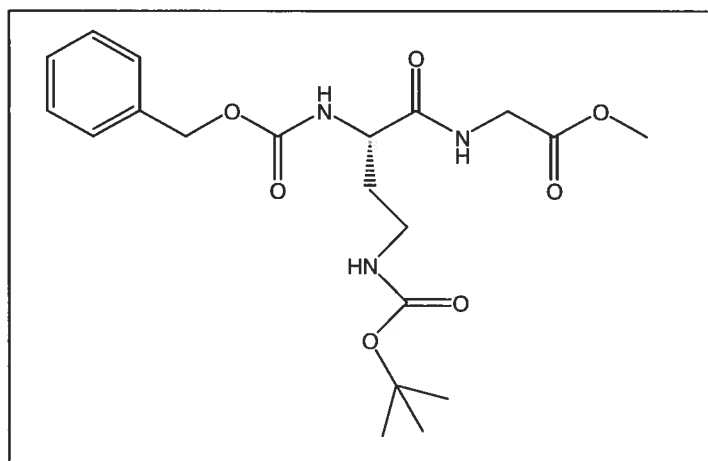


L'ester de benzyle **4c** est obtenu à partir de l'acide **4b** en suivant la **procédure générale 3**. Suite à une chromatographie flash (40 % acétate d'éthyle / 60 % hexanes, induction directe), les fractions contenant le produit **4c** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 84 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.38 (b, 10H), 5.70 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.72 (m, 1H), 3.08 (m, 2H), 1.87 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.44 (b, 13H).

**Rf:** 0.74 (40 % AcOEt / 60 % hexanes)

**2d** : *N*<sup>1</sup>-carbobenzyloxy-2,4-diamino-*N*<sup>1</sup>-*tert*-butoxycarbonyl-L-butryl-glycinate de méthyle

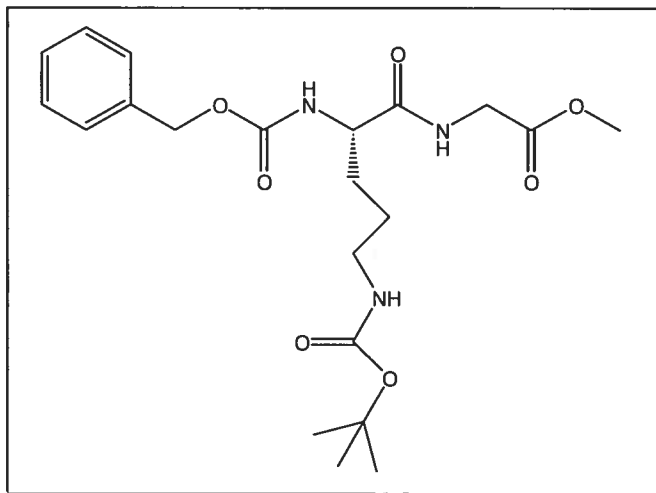


Le dipeptide **2d** est obtenu à partir de l'acide **2b** en suivant la **procédure générale 4**. Suite à une chromatographie flash (85 % acétate d'éthyle / 15 % hexanes), les fractions contenant le produit **2d** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 63 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.81 (m, 1H), 7.24 (m, 5H), 6.06 (d, 1H, *J* = 7.84 Hz), 5.36 (t, 1H, *J* = 6.12 Hz), 5.04 (s, 2H), 4.27 (m, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.61 (s, 3H), 3.35 (m, 1H), 3.00 (m, 1H), 1.85 (m, 2H), 1.34 (s, 9H).

**Rf:** 0.49 (85 % AcOEt / 15 % hexanes)

**3d** : *N*<sup>α</sup>-carbobenzyloxy-2,5-diamino-*N*<sup>δ</sup>-*tert*-butoxycarbonyl-L-ornithinylglycinate de méthyle

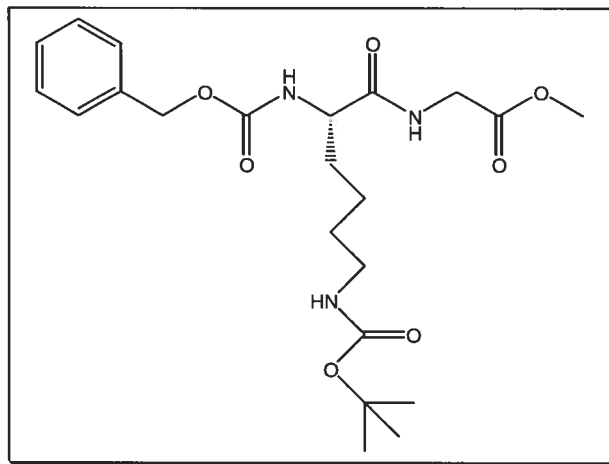


Le dipeptide **3d** est obtenu à partir de l'acide **3b** en suivant la **procédure générale 4**. Suite à une chromatographie flash (70 % acétate d'éthyle / 30 % hexanes, induction directe), les fractions contenant le produit **3d** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 69 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.33 (m, 5H), 5.85 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.92 (s, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.00 (qd, 2H, *J* = 5.4 Hz and 14.1 Hz), 3.72 (s, 3H), 3.28 (s, 1H), 3.09 (m, 2H), 1.86 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.55 (m, 2H), 1.42 (s, 9H).

**Rf:** 0.46 (70 % AcOEt / 30 % hexanes)

**4d**: *N*<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy-2,6-diamino-*N*<sup>ε</sup>-*tert*-butoxycarbonyl-L-lysinyglycinate de méthyle

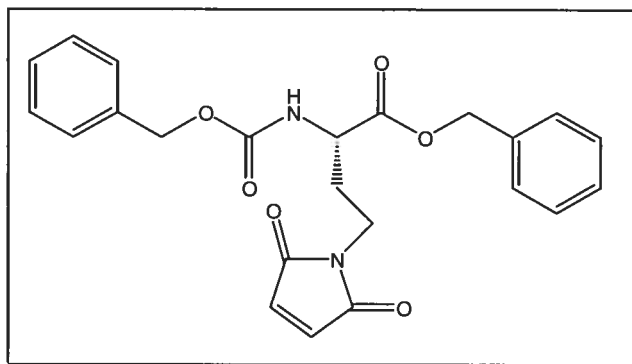


Le dipeptide **4d** est obtenu à partir de l'acide **4b** en suivant la **procédure générale 4**. Suite à une chromatographie flash (100 % acétate d'éthyle), les fractions contenant le produit **4d** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 70 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.37 (m, 5H), 6.65 (s, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.67 (s, 1H), 4.23 (m, 1H), 4.06 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.07 (m, 2H), 1.94 (m, 1H), 1.75 (m, 1H), 1.50 (b, 13H).

**Rf:** 0.86 (100 % AcOEt)

**2e** : *N*<sup>α</sup>-carbobenzyloxy-2,4-diamino-*N*<sup>γ</sup>-maléimido-L-butyrate de benzyle



Le maléimide **2e** est obtenu à partir du composé **2c** en suivant les **procédures générales 5 et 6**. Suite à une chromatographie flash (50 % acétate d'éthyle / 50 % hexanes), les fractions contenant le produit **2e** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 11 %.

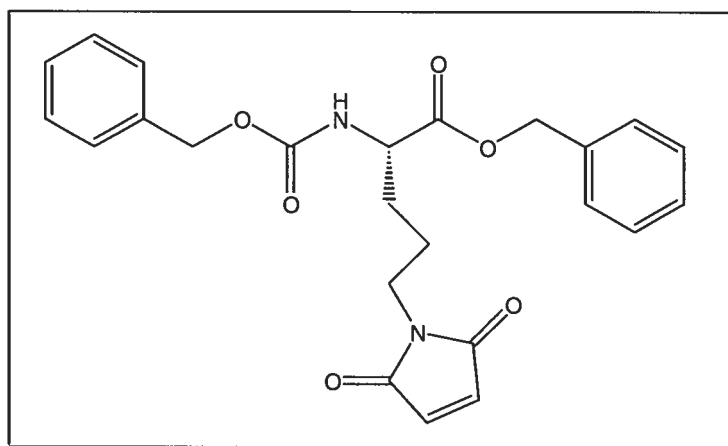
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.32 (b, 10H), 6.60 (s, 2H), 5.52 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 5.15 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 4.43 (q, 1H, *J* = 6.3 Hz), 3.59 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.13 (m, 1H), 2.06 (m, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>; 75 MHz):** 171.6, 170.3, 155.0, 135.9, 135.0, 133.9, 128.5, 128.5, 128.4, 128.4, 128.2, 128.0, 127.9, 67.4, 67.3, 52.0, 34.1, 25.2.

**(M+H)<sup>+</sup>** = 423.15506.

**Rf:** 0.47 (50 % AcOEt / 50 % hexanes)

**3e**: *N*<sup>a</sup>-carbobenzyloxy-2,5-diamino-*N*<sup>δ</sup>-maléimido-L-ornithinate de benzyle



Le maléimide **3e** est obtenu à partir du composé **3c** en suivant les **procédures générales 5 et 6**. Suite à une chromatographie flash (50 % acétate d'éthyle / 50 % hexanes), les fractions contenant le produit **3e** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 54 %.

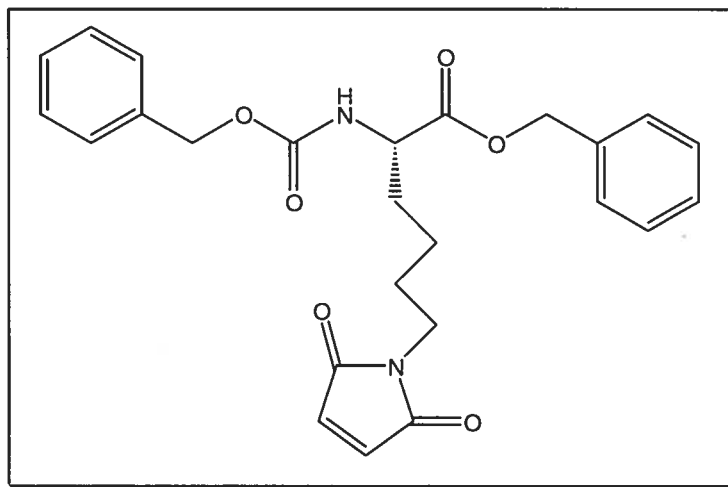
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.31 (b, 10H), 6.62 (s, 2H), 5.38 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.13 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.41 (q, 1H, *J* = 5.6 Hz), 3.46 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz), 1.80 (m, 1H), 1.60 (b, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>; 75 MHz):** 171.7, 170.4, 156.0, 136.0, 135.0, 133.9, 128.5, 127.9, 67.1, 67.0, 53.0, 37.0, 29.7, 24.3.

**(M+Na)<sup>+</sup>** = 459.2

**Rf:** 0.59 (50 % AcOEt / 50 % hexanes)

**4e** : *N*<sup>α</sup>-carbobenzyloxy-2,6-diamino-*N*<sup>ε</sup>-maléimido-L-lysinate de benzyle



Le maléimide **4e** est obtenu à partir du composé **4c** en suivant les **procédures générales 5 et 6**. Suite à une chromatographie flash (40 % acétate d'éthyle / 60 % hexanes), les fractions contenant le produit **4e** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 31 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.29 (b, 10H), 6.62 (s, 2H), 5.29 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.28 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.37 (q, 1H, *J* = 5.4 Hz), 3.42 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 1.80 (m, 1H), 1.60 (b, 3H), 1.25 (m, 2H).

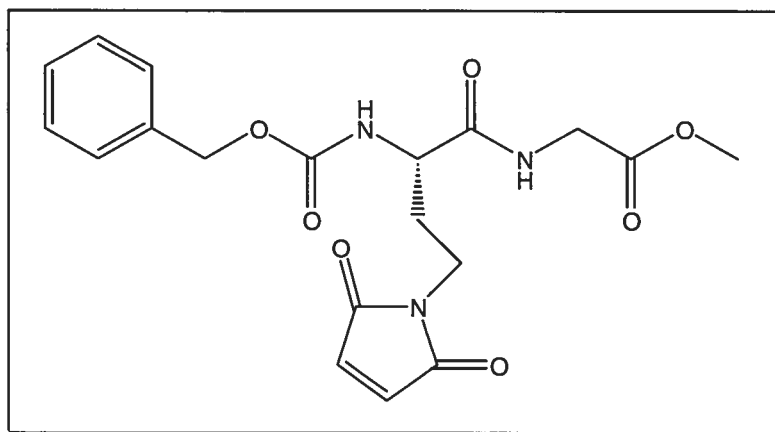
**RMN <sup>13</sup>C(CDCl<sub>3</sub>; 75 MHz):** 171.2, 156.3, 136.6, 135.6, 134.4, 128.7, 67.6, 67.4, 54.1, 37.7, 32.4, 28.4, 22.6.

**(M+Na)<sup>+</sup>** = 474.2

**R<sub>f</sub>**: 0.43 (40 % AcOEt / 60 % hexanes)



**2f** : *N*<sup>c</sup>-carbobenzyloxy-2,4-diamino-*N*<sup>r</sup>-maléimido-L-butyryl-glycinate de méthyle



Le maléimide **2f** est obtenu à partir du composé **2d** en suivant les **procédures générales 5 et 6**. Suite à une chromatographie flash (100 % acétate d'éthyle), les fractions contenant le produit **2f** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 39 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.36 (s, 1H), 7.35 (m, 5H), 6.70 (s, 2H), 5.60 (d, 1H, *J* = 7.86 Hz), 5.06 (s, 2H), 4.10 (b, 3H), 3.69 (b, 5H), 2.00 (m, 2H).

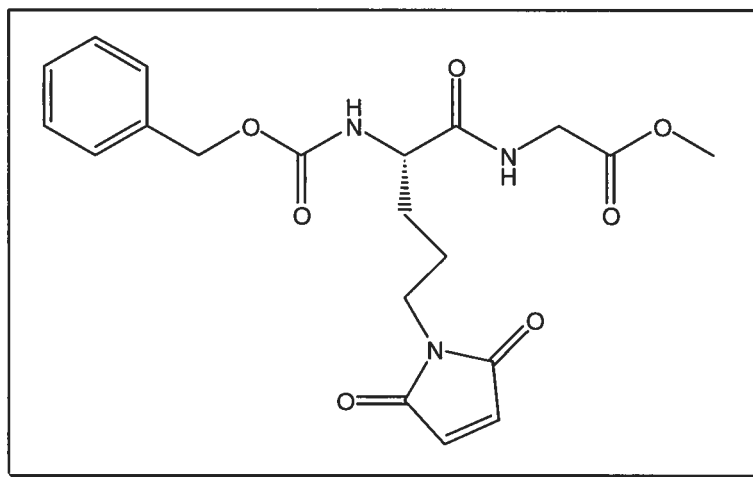
**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>; 75 MHz):** 171.0, 169.9, 155.0, 135.9, 134.1, 128.4, 128.0, 127.9, 66.9, 52.2, 52.0, 41.0, 34.1, 32.0.

**(M+H)<sup>+</sup> = 404.0**

**(M+Na)<sup>+</sup> = 426.1**

**R<sub>f</sub>: 0.5 (100 % AcOEt)**

**3f**: *N*<sup>α</sup>-carbobenzyloxy-2,5-diamino-*N*<sup>δ</sup>-maléimido-L-ornithinylglycinate de méthyle



Le maléimide **3f** est obtenu à partir du composé **3d** en suivant les **procédures générales 5 et 6**. Suite à une chromatographie flash (100 % acétate d'éthyle), les fractions contenant le produit **3f** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 46 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD ; 300 MHz):** δ 7.30 (m, 5H), 6.80 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 4.15 (m, 1H), 3.93 (q, 2H, *J* = 12.9 Hz), 3.71 (s, 3H), 3.51 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 1.68 (b, 4H).

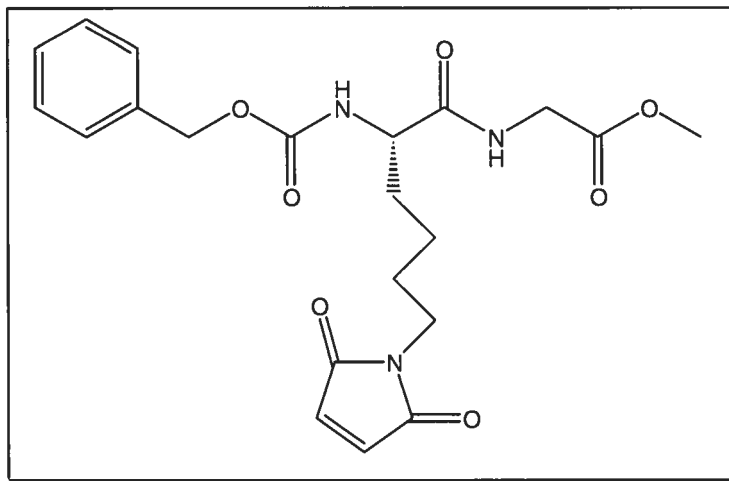
**RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD; 75 MHz):** 134.3, 128.4, 128.0, 127.8, 66.7, 54.8, 51.6, 40.8, 37.0, 29.5, 25.0.

**(M+H)<sup>+</sup> = 418.2**

**(M+Na)<sup>+</sup> = 440.1**

**Rf: 0.61 (100 % AcOEt)**

**4f** : *N*<sup>α</sup>-carbobenzyloxy-2,6-diamino-*N*<sup>ε</sup>-maléimido-L-lysinyglycinate de méthyle



Le maléimide **4f** est obtenu à partir du composé **4d** en suivant les **procédures générales 5 et 6**. Suite à une chromatographie flash (90 % acétate d'éthyle / 10 % hexanes), les fractions contenant le produit **4f** désiré sont récoltées et rassemblées. Le solvant est évaporé sous vide, pour obtenir une huile transparente avec un rendement de 13 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz):** δ 7.36 (m, 5H), 6.69 (s, 2H), 6.56 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.78 (s, 3H). 3.54 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz), 1.90 (m, 1H), 1.75 (m, 1H), 1.70 (m, 2H), 1.40 (m, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>; 75 MHz):** 171.6, 170.7, 169.8, 135.9, 133.9, 128.4, 128.0, 127.9, 66.9, 54.5, 52.2, 41.0, 36.9, 31.5, 27.8, 22.1.

**(M+H)<sup>+</sup> = 432.2**

**(M+Na)<sup>+</sup> = 454.2**

**Rf:** 0.30 (90 % AcOEt / 10 % hexanes)

# **ANNEXE 2**

## Synthesis and evaluation of peptidic maleimides as transglutaminase inhibitors

Dany Halim, Karine Caron and Jeffrey W. Keillor\*

Département de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale centre-ville, Montréal, Que., Canada H3C 3J7

Received 6 September 2006; revised 11 October 2006; accepted 23 October 2006

Available online 25 October 2006

**Abstract**—A series of novel transglutaminase inhibitors was prepared, based on the scaffold of a commonly used peptide substrate and bearing an electrophilic maleimide group. These compounds were evaluated *in vitro* and shown to lead to irreversible inactivation of tissue transglutaminase. Comparison with inhibitors studied previously provides insight into the steric environment of the enzyme active site.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Transglutaminases (TGases, EC 2.3.2.13) are  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent enzymes that catalyze the formation of isopeptide cross-links between the  $\gamma$ -carboxamide group of a protein- or peptide-bound glutamine residue and a primary amino group, such as the  $\epsilon$ -amino group of protein- or peptide-bound lysine residues (Scheme 1).<sup>1–3</sup> Tissue TGase (tTG) has been identified as a contributor to the formation of cataracts and to Celiac disease, and a growing body of evidence suggests that it may be involved in atherosclerosis, inflammation, fibrosis, diabetes, cancer metastases, autoimmune diseases, lamellar ichthyosis, and psoriasis (for a review, see 4). TGase has also been implicated in neurodegenerative diseases associated with an increase in polyglutamine-containing peptides in the brain such as Huntington's disease, Alzheimer disease, Parkinson disease, and supranuclear palsy.<sup>5–7</sup>

A number of potential TGase inactivators have been developed in order to regulate excess TGase activity. These include dihydroisoxazole derivatives,<sup>8</sup> gluten peptide analogs,<sup>9</sup> and dipeptide-bound  $\alpha,\beta$ -unsaturated amides, epoxides, and 1,2,4-thiadiazoles.<sup>10–12</sup> The design of the latter inhibitors was based on the structure of carbobenzyloxy-L-glutamylglycine (Cbz-Gln-Gly), a commonly used dipeptide acyl-donor substrate.<sup>13</sup> Herein we report the synthesis of a series of novel maleimides

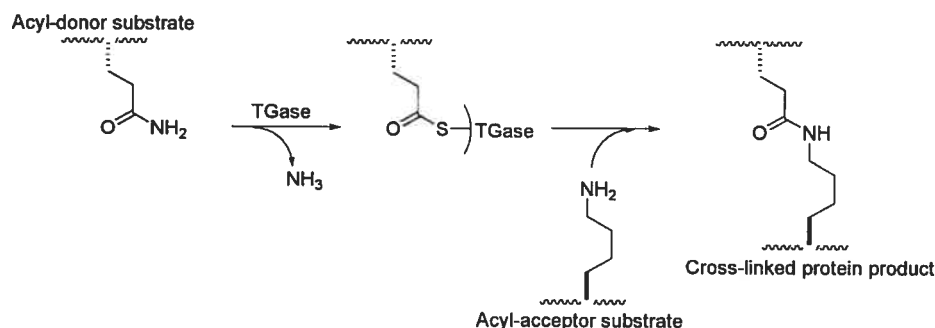
based on the same peptidic scaffold, and their *in vitro* evaluation as irreversible tTG inhibitors (Scheme 2).

The starting points of our syntheses of the peptidic maleimides were the Cbz-protected diamino acids **2a–4a**, numbered according to side-chain length. Compounds **3a** and **4a** were commercially available,<sup>14</sup> whereas compound **2a** was obtained from the Hoffmann rearrangement of the corresponding amide, as previously reported.<sup>10</sup> Ensuing protection of the pendant amino group,<sup>15</sup> esterification<sup>16</sup> or peptide coupling<sup>17</sup> and deprotection of the side-chain amine<sup>18</sup> were accomplished by straightforward synthetic routes, affording amines **2c–4c** and **2d–4d**. Hydrophobic ester groups were incorporated into the inhibitor design both for synthetic simplicity and in consideration of their effect on enzyme affinity as observed previously.<sup>8,11,12</sup> These amines were then transformed into the final maleimide inhibitors by the typical two-step condensation reaction with maleic anhydride.<sup>18,19</sup> Reaction conditions and yields were not optimized, but ample quantities of the final products were obtained for subsequent kinetic analyses.

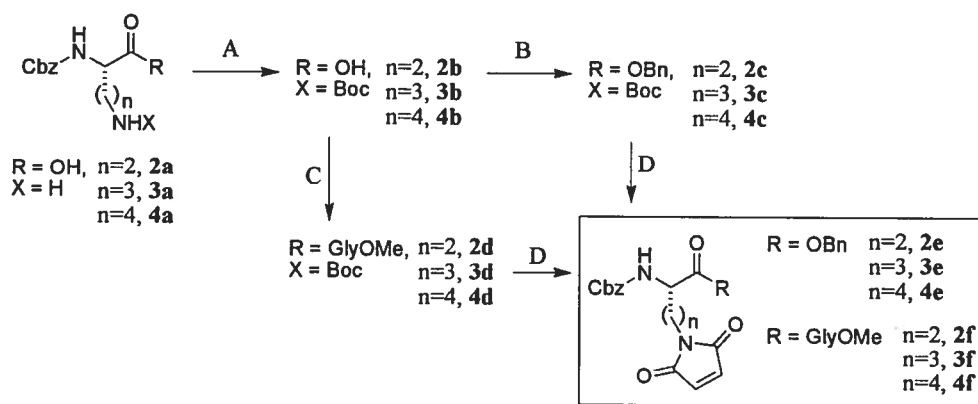
Recombinant guinea pig liver TGase was expressed in *Escherichia coli* and subsequently purified according to a procedure developed in our laboratories.<sup>20,21</sup> Guinea pig liver tTG was chosen for this study because it can be obtained easily in excellent yield and solubility, and shows high homology with human tTG,<sup>22</sup> thereby validating its use as a model for the evaluation of inhibitors of potential therapeutic utility.

**Keywords:** Transglutaminase; Maleimide; Inhibition kinetics.

\* Corresponding author. Tel.: +1 514 343 6219; fax: +1 514 343 7586; [jeffrey.keillor@umontreal.ca](mailto:jeffrey.keillor@umontreal.ca)



Scheme 1. Cross-linking reaction catalyzed by TGase.

Scheme 2. Synthesis of inhibitors studied herein. Reagents and conditions: (A) 7 (Boc)<sub>2</sub>O/Et<sub>3</sub>N/MeOH/24 h, rt; (B) Bn-Br/Et<sub>3</sub>N/DMF/24 h, rt; (C) Gly-OMe/DIEA/TBTU/DMF/24 h, rt; (D) i—TFA/1 h, rt; ii—maleic anhydride/CHCl<sub>3</sub>/24 h, rt; iii—acetic anhydride/NaOAc/24 h, 95 °C.

All peptidic maleimides demonstrated time-dependent inhibition. Kinetic parameters were determined by incubating TGase with inhibitor and measuring residual TGase activity in the absence of excess inhibitor (upon 40-fold dilution) as a function of time.<sup>23</sup> First-order rate constants of inactivation ( $k_{\text{obs}}$ ) were thus measured with respect to inhibitor concentration. However, saturating concentrations could not be attained, owing to the relatively low solubility of the inhibitors with respect to their apparent affinity constants. Therefore, the apparent second-order rate constants for inactivation ( $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ , Table 1) were determined from the initial slopes of the plots of  $k_{\text{obs}}$  versus inhibitor concentration.<sup>23</sup>

Table 1. Kinetic parameters determined for inhibition of tTG

Compound	$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ (mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$k_{\text{inact}}$ (min <sup>-1</sup> )	$K_{\text{I}}$ (μM)
2e	0.67 ± 0.08	—	—
3e	6.26 ± 1.69	—	—
4e	17.08 ± 0.12	—	—
2f	0.28 ± 0.03	—	—
3f	0.43 ± 0.05	—	—
4f	0.83 ± 0.01	—	—
2g <sup>b</sup>	1180	0.60	0.51
3g <sup>b</sup>	890	0.75	0.85
4g <sup>b</sup>	2200	0.49	0.23

<sup>a</sup> Std. error from fitting of data.

<sup>b</sup> Kinetic parameters given as ' $k_{\text{inact}}$ ', ' $k_{\text{cat}}$ ' and  $K_{\text{I}}$ , respectively, in Ref. 11.

Despite the lack of saturation kinetics, two lines of evidence suggest that inactivation is taking place through reaction at the active site. First, although homology modeling<sup>24</sup> of guinea pig tTG suggests that Cys229 may be solvent exposed, and therefore theoretically capable of reacting with a maleimide in a second-order fashion, its distance from the substrate binding site (>15 Å) makes its putative reaction with even the longest inhibitor unlikely to inactivate the enzyme. Second, incubation with inhibitor in the presence of substrate afforded temporary protection, slowing inactivation appreciably. For example, in the presence of 12 mM Cbz-Gln-Gly (four times its  $K_{\text{m}}$  value) inactivation by 100 μM 2e was roughly 2-fold slower than in the absence of substrate.

Comparison of the relative efficiencies of benzyl esters 2e–4e and dipeptides 2f–4f reveals the latter series to be ~2- to 20-fold less efficient. Previous docking studies from our group<sup>25</sup> have suggested the peptide backbone of acyl-donor substrates are bound in a shallow, rather hydrophobic groove on the surface of the enzyme. The specificity of tTG with respect to the peptide sequence of its Gln substrates is consistent with the nature of this putative binding site, as noted previously.<sup>26</sup> The greater efficiency of the benzyl esters, compared to the glycine methyl esters, may reflect higher affinity for, or better positioning in, this binding site.

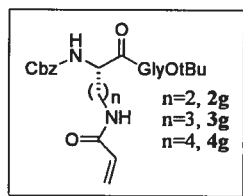


Figure 1. Acrylamide inhibitors studied previously.<sup>10,11</sup>

Within each series it can be noted that efficiency increases with chain length. This trend has also been observed for three other series of inhibitors based on the same peptide scaffold.<sup>10,12</sup> Since TGases are designed to exclude asparagine residues as acyl-donor substrates, reacting only with glutamine residues, they are capable of discriminating against substrate analogs having short side chains. However, tTG cannot exclude longer acyl-donor substrates (or irreversible inhibitors) having the conformational flexibility necessary to properly position their pendant reactive groups near the active site thiol.

It is also instructive to draw a comparison with a series of acrylamide inhibitors studied previously. As shown in Figure 1, acrylamides **2g–4g** also comprise a dipeptide scaffold having a comparable C-terminal ester, and their pharmacophore differs from maleimide by only one carbonyl completing the heterocycle. Compounds **2g–4g** were determined<sup>11</sup> to have  $K_i$  values in the range of 0.23–0.85  $\mu\text{M}$ , and their efficiency constants are shown in Table 1. From this comparison it is evident that the maleimides are  $\sim 10^3$ - to  $10^4$ -fold less efficient inhibitors. Although direct comparison of reactivity and affinity constants is not possible, one may presume that the maleimides possess inherently greater reactivity (larger  $k_{\text{inact}}$  values), given the activation of the double bond toward nucleophilic addition by two conjugated carbonyl groups. By this reasoning, it would appear that the affinity constants of the maleimides are well above those measured for the acrylamides (even larger  $K_i$  values). This is consistent with the lack of complete saturation that was observed for the maleimides, for concentrations up to 750  $\mu\text{M}$ . Our modeling of the glutamine substrate binding tunnel of tTG<sup>25</sup> suggests that it is a sterically constrained environment that may not easily accommodate the greater volume of the cyclic maleimide group. Furthermore, this hypothesis is supported by our observation that any substitution for example, by methyl or phenyl, on the  $\gamma$ -carboxamide nitrogen of glutamine results in the complete loss of donor substrate activity.<sup>27</sup>

In summary, the series of novel maleimide inhibitors presented herein confirm the validity of the peptidic scaffold, bearing an electrophilic ‘warhead’ on a long side-chain, for the design of small molecule inhibitors that target the active site of tTG. The maleimide group itself, although well known for inactivation of thiol-dependent enzymes, appears to be just large enough to decrease the ease of its insertion and productive orientation in the narrow donor substrate binding tunnel of tTG.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). K.C. is also grateful to NSERC for a Undergraduate Student Research Award (USRA).

## Supplementary data

Chromatography procedures and spectral data of all synthetic intermediates are available. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmcl.2006.10.061.

## References and notes

- Folk, J. E.; Cole, P. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *22*, 244.
- Achyuthan, K. E.; Slaughter, T. F.; Santiago, M. A.; Enghild, J. J.; Greenberg, C. A. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21284.
- Greenberg, C. S.; Birkbichler, P. J.; Rice, R. H. *FASEB J.* **1991**, *5*, 3071.
- Kim, S.-Y.; Jeitner, T. M.; Steinert, P. M. *Neurochem. Int.* **2002**, *40*, 85.
- Cooper, A. J. L.; Jeitner, T. M.; Gentile, V.; Blass, J. P. *Neurochem. Int.* **2002**, *40*, 53.
- Singer, S. M.; Zainelli, G. M.; Norlund, M. A.; Lee, J. M.; Muma, N. A. *Neurochem. Int.* **2002**, *40*, 17.
- Karpuj, M. V.; Becker, M. W.; Steinman, L. *Neurochem. Int.* **2002**, *40*, 31.
- Choi, K.; Siegel, M.; Piper, J. L.; Yuan, L.; Cho, E.; Strnad, P.; Omary, B.; Rich, K. M.; Khosla, C. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 469.
- Hausch, F.; Halttunen, T.; Mäki, M.; Khosla, C. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 225.
- de Macêdo, P.; Marrano, C.; Keillor, J. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 355.
- Marrano, C.; de Macêdo, P.; Keillor, J. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1923.
- Marrano, C.; de Macêdo, P.; Gagnon, P.; Lapierre, D.; Gravel, C.; Keillor, J. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 3231.
- Folk, J. E.; Chung, S. I. *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 358.
- Starting materials were obtained from Sigma–Aldrich.
- Procedure A: Boc protection.* Compounds **2a**, **3a**, and **4a** (1.75 mmol) were dissolved in 10 mL of methanol. After the addition of 1.45 mL of triethylamine (10.5 mmol), 460 mg of (Boc)<sub>2</sub>O (2.10 mmol) and a few drops of 1 M NaOH were added. The mixture was stirred overnight at room temperature and then evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in 20 mL of 1 N NaOH. The aqueous phase was washed with 3  $\times$  20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and acidified to pH  $\sim$ 1.5 by the addition of 6 N HCl. The product was extracted with 3  $\times$  25 mL EtOAc and the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the final product (36–81% yield).
- Procedure B: Benzyl ester formation.* In the dark, compounds **2b**, **3b**, and **4b** (1.15 mmol) were dissolved in 10 mL DMF. After the addition of 0.17 mL of benzyl bromide (1.38 mmol), 0.24 mL of triethylamine (1.73 mmol) was added. The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was then

- evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (66–92% yield).
- Procedure C: Peptide coupling.** Under nitrogen atmosphere, compounds **2b**, **3b**, and **4b** (3 mmol) were dissolved in 10 mL of anhydrous acetonitrile. After the addition of 2.59 mL DIEA (15 mmol), 744 mg of Gly-OMe (6 mmol) was added. Finally, the reaction was initiated by the addition of 2.39 g TBTU (7.5 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was then evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (59–70% yield).
  - Procedure D: BOC deprotection and maleimide formation.** Compounds **2c**, **3c**, **4c**, **2d**, **3d**, and **4d** (2 mmol) were dissolved in 8 mL TFA. After 1 h of reaction, acetone and cyclohexane were added in 1:5 proportion to make an azeotrope solution. This solution was then evaporated three or four times under reduced pressure. The residue containing the free amine was finally dried under vacuum overnight. Then, under nitrogen atmosphere, it was dissolved in 10 mL of chloroform. Finally, 217 mg of maleic anhydride (2.2 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 20 h at room temperature. The solution was then evaporated under reduced pressure. At this point, the product maleimide can be isolated by flash chromatography, or used without further purification in the ring closure step: Still under nitrogen atmosphere, 10 mL of acetic anhydride and 0.6 mmol of sodium acetate were added to the residue. The mixture was stirred at 95 °C overnight. The final product was purified by flash chromatography (11–46% yield for three steps).
  - Girouard, S.; Houle, M.-H.; Grandbois, A.; Keillor, J. W.; Michnick, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 559.
  - Gillet, S. M. F. G.; Chica, R. A.; Keillor, J. W.; Pelletier, J. N. *Protein Expr. Purif.* **2004**, *33*, 256.
  - Enzyme preparation.** Recombinant guinea pig liver tTG was expressed and purified according to the protocol established in our group.<sup>20</sup> One unit of TGase was defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1.0  $\mu\text{mol}$  of hydroxamate per min (based on the hydroxamate activity assay, where Cbz-Gln-Gly is used as a  $\gamma$ -glutamyl donor substrate and hydroxylamine is used as an acyl acceptor substrate<sup>20</sup>). All materials were of reagent grade purity and obtained from Sigma–Aldrich Chemical Company. Water was purified using a Millipore BioCell water purification system.
  - Leblanc, A.; Gravel, C.; Labelle, J.; Keillor, J. W. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8335.
  - Assay procedure.** The progress of the inhibition reactions studied was determined by following the loss of activity as a function of time of incubation with inhibitor. Incubation solutions were composed of 10  $\mu\text{L}$  inhibitor (50–750  $\mu\text{M}$  final concentration), 200  $\mu\text{L}$  TGase (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 12  $\mu\text{L}$  of 100 mM  $\text{CaCl}_2$ , 168  $\mu\text{L}$  of 200 mM Mops (pH 7), and 10  $\mu\text{L}$  of 20 mM EDTA (total volume 400  $\mu\text{L}$ ). At various incubation times a 25- $\mu\text{L}$  aliquot was removed and added to a solution composed of 25  $\mu\text{L}$  stock substrate solution<sup>22</sup> (2.18 mM *N*-Cbz-Glu( $\gamma$ -*p*-nitrophenyl ester)Gly in DMF), 50  $\mu\text{L}$  water, and 900  $\mu\text{L}$  of buffer (100 mM Mops (pH 7), 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 0.05 mM EDTA final concentrations). Residual TGase activity was measured at 37 °C as an increase of absorbance at 410 nm. The rate constant for the loss of residual activity as a function of time ( $k_{\text{obs}}$ ) was determined from fitting the data to a single exponential equation, for each concentration of inhibitor. Plots of  $k_{\text{obs}}$  against inhibitor concentration did not show saturation kinetics and were subsequently fitted to a linear equation, the slopes giving the ratios ( $k_{\text{inact}}/K_I$ ).
  - Chica, R. A. ; Keillor, J. W.; Pelletier, J. N. unpublished observations.
  - Chica, R. A.; Gagnon, P.; Keillor, J. W.; Pelletier, J. N. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 979.
  - Keillor, J. W. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 410.
  - Day, N. M.Sc. Thesis, Université de Montréal, 1999.



## RÉFÉRENCES

- <sup>1</sup> Skogerson, L., Moldave, K., *J. Biol. Chem.*, **243**, 5361 (1968).
- <sup>2</sup> Ehlert, K., Schroïder, W., Labischinski, H., *J. Bacteriol.*, **179**, 7573 (1997).
- <sup>3</sup> Ling, B. D., Berger-Baïchi, B., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 936 (1998).
- <sup>4</sup> Hegde, S.S., Shrader, T.E., *J. Biol. Chem.*, **276**, 6998 (2001).
- <sup>5</sup> Filipe, S.R., Tomasz, A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 4891 (2000).
- <sup>6</sup> Folk, J.E., Mullooly, J.P., Cole, P.W., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1838 (1967).
- <sup>7</sup> Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H., Motoki, M. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2613 (1989).
- <sup>8</sup> Folk, J.E., Cole, P.W., *J. Biol. Chem.*, **240**, 2951 (1965).
- <sup>9</sup> Mycek M.J., Clarke, D.D., Neidle, A., Waelsch, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 528 (1959).
- <sup>10</sup> Neidle, A., Clarke, D.D., Mycek, M.J., Waelsch, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **77**, 227 (1958).
- <sup>11</sup> Mycek, M.J., Waelsch, H., *J. Biol. Chem.*, **235**, 3513 (1960).
- <sup>12</sup> Folk, J.E., *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 517 (1980).
- <sup>13</sup> Greenburg, C.S., Birckbichler, P.J., Rice, R.H., *FASEB J.*, **5**, 3071 (1991).
- <sup>14</sup> Green, H., *Harvey Lect.*, **74**, 101 (1979).
- <sup>15</sup> Thomazy, V., Fesus, L., *Cell Tissue Res.*, **255**, 215 (1989).
- <sup>16</sup> Achyuthan, K.E., Greenburg, C.S., *J. Biol. Chem.*, **262**, 1901 (1987).
- <sup>17</sup> Goldsmith, L.A., The epidermal cell periphery. Dans *Biochemistry and Physiology of the skin*, Édition Goldsmith L.A., Oxford University Press, New York (1983).
- <sup>18</sup> Ho, K.C., Quarmby, F.E., French, F.S., Wilson, E.M., *J. Biol. Chem.*, **267**, 12660 (1992).
- <sup>19</sup> Lorand, L., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **285**, 144 (1986).
- <sup>20</sup> Sung, L.A., Chien, S., Fan, Y.S., Lin, C.C., Lambert, K., Zhu, L., Lam, J.S., Chang, L.S., *Blood*, **79**, 2763 (1992).
- <sup>21</sup> Ikura, K., Nasu, T., Yokota, H., Tsuchiya, Y., Sasaki, R., Chiba, H., *Biochemistry*, **27**, 2898 (1988).
- <sup>22</sup> Gentile, V., Saydak, M., Chiocca, E.A., Akande, O., Birckbichler, P.J., Lee, K.N., Stein, J.P., Davies, P.J.A., *J. Biol. Chem.*, **266**, 478 (1991).
- <sup>23</sup> Nakanishi, K., Nara, K., Hagiwara, H., Aoyama, Y., Ueno, H., Hirose, S., *Eur. J. Biochem/FEBS*, **264**, 19308 (1989).
- <sup>24</sup> Weraarchakul-Boonmark, K., Jeong, J.M., Murthy, S.N.P., Engel, J.D., Lorand, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9804 (1992).
- <sup>25</sup> Yee, V.C., Pedersen, L.C., Le Trong, I., Bishop, P.D., Stenkamp, R.E., Teller, D.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7296 (1994).
- <sup>26</sup> Levitzki, A., Willingham, M., Pastan, I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2706 (1980).
- <sup>27</sup> Melino, G., Piacentini, M., *FEBS Lett.*, **430**, 59 (1998).
- <sup>28</sup> Slife, C.W., Dorsett, M.D., Bouquett, G.T., Register, A., Taylor, E., Conroy, S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**, 329 (1985).
- <sup>29</sup> Bargjian, C., Fellin, F.M., Jain, A., Martinez, J., *J. Biol. Chem.*, **263**, 14015 (1988).
- <sup>30</sup> Upchurch, H.F., Conway, E., Patterson, M.K., Jr., Birckbichler, P.J., Maxwell, M.D., *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **23**, 795 (1987).
- <sup>31</sup> Achyuthan, K.E., Mary, A., Greenberg, C.S., *J. Biol. Chem.*, **263**, 14296 (1988).
- <sup>32</sup> Juprelle-Soret, M., Wattiaux-DeConnick, S., Wattiaux, R., *Biochem.*, **250**, 421 (1988).
- <sup>33</sup> Lesort, M., Chun, W., Johnson, G.V.W., Ferrante, R.J., *J. Neurochem.*, **73**, 2018 (1999).
- <sup>34</sup> Andringa, G., Lam, K.Y., Chegary, M., Wang, X., Chase, T.N., Bennett, M.C., *FASEB J.*, **18**, 932 (2004).
- <sup>35</sup> Junn, E., Ronchetti, R.D., Quazado, M.M., Kim, S.-Y., Mouradian, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2047 (2003).
- <sup>36</sup> Selkoe, D.J., Abraham, C., Ihara, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6070 (1982).
- <sup>37</sup> Folk, J.E., *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 517 (1980).
- <sup>38</sup> Schuppan, D., Hahn, E.G., *Science*, **297**, 2218 (2002).
- <sup>39</sup> Folk, J.E., *J. Biol. Chem.*, **244**, 3707 (1969).
- <sup>40</sup> Chica, R.A., Gagnon, P., Keillor, J.W., Pelletier, J.N., *Protein. Sci.*, **13**, 979 (2004).
- <sup>41</sup> Folk, J.E., Cole, P.W., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5518 (1966).
- <sup>42</sup> Gillet, S.M., Chica, R.A., Keillor, J.W., Pelletier, J.N., *Protein Exp. Purif.*, **33**, 256 (2004).

- <sup>43</sup> Sblattero, D., Berti, I., Trevisiol, C., Marzari, R., Tommasini, A., Bradbury, A., Fasano, A., Ventura, A., Not, T., *Am. J. Gastroenterol.*, **95**, 1253 (2000).
- <sup>44</sup> Hanes, C.S., Hird, F. J. R., Isherwood, F. A., *Nature (Lond)*, **166**, 288 (1950).
- <sup>45</sup> Hanes, C.S., Hird, F. J. R., Isherwood, F. A., *Biochem. J.*, **51**, 25 (1952).
- <sup>46</sup> Dakin, H. D., Dudley, H. W., *J. Biol. Chem.*, **15**, 463 (1913).
- <sup>47</sup> Albert, Z., Orłowski, M., Szewczyk, A., *Nature (Lond)*, **191**, 767 (1961).
- <sup>48</sup> Glenner, G. G., Folk, J. E., McMillan, P. J. J., *Histochem. Cytochem.*, **10**, 481 (1962).
- <sup>49</sup> Meister, A., Larson, A. : Glutathione synthetase deficiency and other disorders : the  $\gamma$ -glutamyl cycle. *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, ed. 6. Edited by CR Scriver, AL Baudet, WS Sly and D. Valle, New York, McGraw-Hill, 1989, pp. 855-868.
- <sup>50</sup> Curthoys N.P. : Renal handling of glutathione. *Glutathione : Metabolism and Physiological Functions*. Edited by J. Vina. Boston, CRC Press, 1990, pp. 217-225.
- <sup>51</sup> Voet, D., Voet, J.G., *Biochimie. Édition DeBoeck Université*, 1998.
- <sup>52</sup> Meister, A., *Science*, **180**, 33 (1973).
- <sup>53</sup> Meister, A., *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 1905 (1992).
- <sup>54</sup> Godwin, A. K., Meister, A., O'Dwyer, P. J., Huang, C. S., Hamilton, T. C., Anderson, M. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 3070 (1992).
- <sup>55</sup> Hochwald, S.N., Harrison, L.E., Rose, D.M., Anderson, M., Burt, M.E., *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, (1996).
- <sup>56</sup> Orning, L., Hammarström, S., Samuelsson, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 2014 (1980).
- <sup>57</sup> Bernström, K., Orning, L., Hammarström, S., *Methods Enzymol.*, **86**, 38 (1982).
- <sup>58</sup> Taniguchi, N., Ikeda, Y., *Adv. Enz. Rel. Areas Mol. Biol.*, **72**, 239 (1998).
- <sup>59</sup> Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Jenner, P., Marsden, C.D., *Ann. Neurol.*, **36**, 356 (1994).
- <sup>60</sup> Chinta, S.J., Kumar, J.M., Zhang, H., Forman, H.J., Andersen, J.K., *Free Radical Biology & Medicine*, **40**, 1557 (2006).
- <sup>61</sup> Djavaheri-Mergny, M., Accaoui, M.-J., Rouillard, D., Wietzerbin, J., *Mol. Cell. Biochem.*, **232**, 103 (2002).
- <sup>62</sup> Del Bello, B., Paolicchi, A., Comporti, M., Pompella, A., Maellaro, E., *FASEB J.*, **13**, 69 (1999).
- <sup>63</sup> Lee, D.-H., Jacobs, Jr. D.R., Gross, M., Kiefe, C.I., Roseman, J., Lewis, C.E., Steffes, M., *Clin. Chem.*, **49**, 1358 (2003).
- <sup>64</sup> Meister, A., Tate, S.S., Griffith, O.W., *Methods Enzymol.*, **77**, 237 (1981).
- <sup>65</sup> Arai, K., Yoshida, K.-I., Komada, T., Kobayashi, N., Saitoh, H., Sakagishi, Y., *Clin. Chim. Acta.*, **184**, 75 (1989).
- <sup>66</sup> Sakamuro, D., Yamazoe, M., Matsuda, Y., Kangawa, K., Taniguchi, N., Matsuo, H., Yoshikawa, H., Ogasawara, N., *Gene*, **73**, 1 (1988).
- <sup>67</sup> Meister, A., Anderson, M. E., *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 711 (1983).
- <sup>68</sup> Okada, T., Suzuki, H., Wada, K., Kumagai, H., Fukuyama, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 6471 (2006).
- <sup>69</sup> Oinonen, C., Tikkanen, R., Rouvinen, J., Peltonen, L., *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 1102 (1995).
- <sup>70</sup> Duggleby, H.J., Tolley, S.P., Hill, C.P., Dodson, E.J., Dodson, G., Moody, P.C.E., *Nature*, **373**, 264 (1995).
- <sup>71</sup> Elce, J.S., *Biochem. J.*, **185**, 473 (1980).
- <sup>72</sup> Kozak, E.M., Tate, S.S., *FEBS Lett.*, **122**, 175 (1980).
- <sup>73</sup> Stole, E., Seddon, A.P., Wellner, D., Meister, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 1706 (1990).
- <sup>74</sup> Inoue, M., Horiuchi, S., Morino, Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **82**, 1183 (1978).
- <sup>75</sup> Szewczuk, A., Baranowski, I., *Biochem. Z.*, **338**, 317 (1963).
- <sup>76</sup> Orłowski, M., Meister, A., *J. Biol. Chem.*, **240**, 338 (1965).
- <sup>77</sup> Taniguchi, N., *J. Biochem (Tokyo)*, **75**, 473 (1974).
- <sup>78</sup> Elce, J. S., Bryon, J., McGirr, L. G., *Can. J. Biochem.*, **52**, 33 (1974).
- <sup>79</sup> Suzuki, H., Kumagai, H., Tochikura, T., *J. Bacteriol.*, **169**, 3926 (1987).
- <sup>80</sup> Chevalier, C., Thiberge, J.-M., Ferrero, R.L., Labigne, A., *Mol. Microbiol.*, **31**, 1359 (1999).
- <sup>81</sup> Angele, C., Wellman, M., Thioudellet, C., Guellaen, G., Siest, G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **160** 1040 (1989).
- <sup>82</sup> Angele, C., Oster, T., Visvikis, A., Michels, J.-M., Wellman, M., Siest, G., *Clin. Chem.*, **37**, 662 (1991).

- <sup>83</sup> Visvikis, A., Thioudellet, C., Oster, T., Fournel-Gigleux, S., Wellman, M., Siest, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 7361 (1991).
- <sup>84</sup> Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N., *J. Biol. Chem.*, **268**, 3980 (1993).
- <sup>85</sup> Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N., Meister, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 126 (1995).
- <sup>86</sup> Castonguay, R., Morin, M., Halim, D., Bonneil, E., Furtos, A., Thibault, P., Keillor, J.W., (article en rédaction).
- <sup>87</sup> Panda, K., Chawla-Sarkar, M., Santos, C., Koeck, T., Erzurum, S.C., Parkinson, J.F., Stuehr, D.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10117 (2005).
- <sup>88</sup> McCarter, J.D., Withers, S.G., *J. Biol. Chem.*, **271**, 6889 (1996).
- <sup>89</sup> Erlichman, C., Hidalgo, M., Boni, J.P., Martins, P., Quinn, S.E., Zacharchuk, C., Amorusi, P., Adjei, A.A., Rowinski, E.K., *J. Clin. Oncol.*, **24**, 2252 (2006).
- <sup>90</sup> Choi, K., Siegel, M., Piper, J. L., Yuan, L., Cho, E., Strnad, P., Omary, B., Rich, K. M., Khosla, C., *Chem. Biol.*, **12**, 469 (2005).
- <sup>91</sup> Marrano, C., de Macédo, P., Keillor, J. W., *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 1923 (2001).
- <sup>92</sup> Marrano, C., de Macédo, P., Gagnon, P., Lapierre, D., Gravel, C., Keillor, J. W., *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 3231 (2001).
- <sup>93</sup> de Macédo, P., Marrano, C., Keillor, J. W., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 355 (2002).
- <sup>94</sup> Folk, J.E., Cole, P.W., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5518 (1966).
- <sup>95</sup> Folk, J.E., Cole, P.W., *Biochem. Biophys. Acta.*, **122**, 244 (1966).
- <sup>96</sup> de Macedo, P., Marrano, C., Keillor, J.W., *Anal. Biochem.*, **285**, 16 (2000).
- <sup>97</sup> Day, N., Keillor, J.W., *Anal. Biochem.*, **274**, 141 (1999).
- <sup>98</sup> Leblanc, A., Gravel, C., Labelle, J., Keillor, J.W., *Biochemistry*, **40**, 8335 (2001).
- <sup>99</sup> Halim, D., Caron, K., Keillor, J.K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, in press (2006).
- <sup>100</sup> Muir, T. W., Kent, S. B. H., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **4**, 420 (1993).
- <sup>101</sup> Piper, J.L., Gray, G.M., Khosla, C., *Biochemistry*, **41**, 386 (2002).
- <sup>102</sup> Shi, Q., Kim, S.-Y., Blass, J.P., Cooper, A.J.L., *Protein Expr. Purif.*, **24**, 366 (2002).
- <sup>103</sup> Liu, S., Cerione, R.A., Clardy, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 2743 (2002).
- <sup>104</sup> Jacob, F., Monod, J., *J. Mol. Biol.*, **3**, 318 (1961).
- <sup>105</sup> Kolter, R., *ASM News*, **58**, 75 (1992).
- <sup>106</sup> Kolter, R., Siegele, D. A., *J. Bacteriol.*, **174**, 345 (1992).
- <sup>107</sup> <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BGbioch/POLY.Chp.9.10.html> (décembre 2006).
- <sup>108</sup> Lin, Z., Lei, H., Cao, P., *Protein Expr. Purif.*, **51**, 276 (2007).
- <sup>109</sup> Kenny, J., Bao, Y., Hamm, B., Taylor, L., Toth, A., Wagers, B., Curthoys, N.P., *Protein Expr. Purif.*, **31**, 140 (2003).
- <sup>110</sup> Nallamsetty, S., Austin, B.P., Penrose, K.J., Waugh, D.S., *Protein Sci.*, **14**, 2964 (2005).
- <sup>111</sup> Orłowski, M., Meister, A., *Biochim. Biophys Acta.*, **73**, 679 (1963).
- <sup>112</sup> Kornfeld, R., Kornfeld, S., *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 640 (1985).
- <sup>113</sup> Kornfeld, R., Kornfeld, S., *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 633 (1985).
- <sup>114</sup> Dugaiczuk, A., Boyer, H. W., Goodman, H. M., *J. Mol. Biol.*, **96**, 171 (1975).