

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A humán transzglutamináz 2 RNS-kötő
sajátságának felismerése és megerősítése**

Csaholczi Bianka

Témavezető: Dr. Király Róbert



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2026

A HUMÁN TRANSZGLUTAMINÁZ 2 RNS-KÖTŐ SAJÁTSÁGÁNAK FELISMERÉSE ÉS MEGERŐSÍTÉSE

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Csaholczi Bianka
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt-, és Immunbiológia doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Király Róbert, PhD

Az értekezés bírálói: Dr. Töröcsik Dániel, az MTA doktora
Dr. Csuka Nagy Bálint, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balogh István, az MTA doktora
tagok: Dr. Töröcsik Dániel, az MTA doktora
Dr. Csuka Nagy Bálint, PhD
Dr. Kókai Endre, PhD
Dr. Tantos Ágnes, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület
2026. november 11. 13:00

1. Bevezetés

A transzglutaminázok fehérjék poszttranszlációs módosításait katalizálják, és ezáltal nagy jelentőségűek mind fiziológiás, mind patológiás körülmények között.

Az egyik legjobban tanulmányozott családtag a szöveti transzglutamináz (transzglutamináz 2, TG2), ami egy multifunkcionális fehérje. Különbőféle enzimatis és nem enzimatis aktivitásokkal rendelkezik. Enzimatis aktivitásai egyik fő csoportja a Ca^{2+} -függő transzglutamináz aktivitások, mely típusai a fehérjék keresztkötése, az aminos beépítése fehérjékbe, a dezamidáció és az izopeptidáz aktivitások. Ezen kívül rendelkezik fehérje kináz, protein diszulfid izomeráz, GTPáz és ATPáz aktivitásokkal is. A TG2 két fő konformációja ismert, a nyitott vagy zárt konformáció, amelyek arányát az őket stabilizáló Ca^{2+} illetve a nukleotidok egymáshoz viszonyított aránya határozza meg. A nukleotidok a fehérje zárt konformációját stabilizálva, a transzglutamináz aktivitás negatív szabályozói. Míg a Ca^{2+} relaxálja a TG2 szerkezetet, és a kialakuló nyitott konformáció elősegíti a megfelelő transzglutamináz szubsztát bekötődését az enzim katalitikus helyére.

Az endotélialis sejtek, így a kísérleteinkben alkalmazott emberi köldökszinór-véna eredetű endotélialis sejtek (HUVEC), különösen fontosak a vaszkuláris homeosztázisban és nagy mennyiségben expresszálják a TG2 fehérjét. A TG2 különböző fehérjékkel való interakcióval szerepet játszhat az endotél sejtek adhéziójában, az angiogenezisben, a gyulladásos válaszreakciókban, illetve a vérnyomás szabályozásában, az erek merevségének befolyásolása révén. Mindezek mellett hozzájárulhat számos más biológiai folyamathoz (pl. jelátvitel, fagocitózis, apoptózis), illetve immunológiai, tumoros és neurodegeneratív betegségekkel is összefüggésbe hozták.

A TG2 biológiai szerepének mechanisztikus megértéséhez TG2-asszociált fehérjéket azonosítottunk, ami felvetette a lehetőséget, hogy a TG2 hatással lehet a poszttranszkripciós szabályozásra. Már korábban ismert volt, hogy a TG2 fehérje kiütése számos gén kifejeződésében okozhat változást, de ennek mechanizmusa nem volt világos. Azt is feltártuk, hogy a TG2 képes RNS-kötésre. Így mind az RNS-hez való kötődése révén, illetve állványozó fehérjeként RNS-kötő fehérjékhez kötődve szabályozhatja az RNS metabolizmusát.

1.1. Transzglutamináz enzimesalád

A transzglutaminázok (TG-k) egy olyan enzimesalád tagjai, melyek közös sajátossága, hogy Ca^{2+} -függő módon katalizálják a kovalens izopeptidkötések kialakulását a fehérjék glutamin és lizin oldalláncai között. Ez a transzamidációs reakció ϵ -(γ -glutamil)lizin izopeptid kötéseket hoz létre a fehérjék között, és eközben ammóniát szabadít fel. Az így kialakuló, keresztkötött fehérjepolimerek rendkívül stabilak és ellenállnak a proteolízisnek, ami miatt a transzglutaminázokat „a természet biológiai ragasztóinak” is nevezik. Elsődleges aminosav jelenlétében a TG-k beépíthetik ezeket az aminosavakat is fehérjék glutamin oldalláncaiba, illetve megfelelő aminosav szubsztrátok hiányában katalizálhatják a glutamin dezamidációját glutamáttá. A transzglutamináz aktivitáshoz kalciumra van szükség aktiváló kofaktorként, de egyes mikrobiális transzglutaminázok Ca^{2+} -függetlenek. Kilenc TG családtagot azonosítottak az emberben, amelyek közül nyolc (13-as véralvadási faktor (FXIII-A) és TG1–TG7) rendelkezik katalitikus aktivitással. Az egyetlen humán enzimesaládtag, amely nem rendelkezik enzimatisma aktivitással a 4.2-es sáv fehérje, ami a humán eritrocita membránban található (Humán eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje). Az enzimaktivitását a katalitikus triádban a cisztein megváltozása inaktíválta. A TG-k összességében sokféle szerepet játszanak a fiziológiai folyamatokban a fehérjék keresztkötésével, ezáltal módosítva azok szerkezeti és funkcionális tulajdonságait, és így befolyásolva és szabályozva például a sejtek letapadását, túlélését és a sejtmembrán integritásának fennmaradását, vagy akár a vörösvértest oxigénkötését.

1.2. A transzglutamináz 2

A transzglutamináz aktivitást elsőként máj extraktumban mutatták ki Waelsch és munkatársai, akik azonosították, hogy a primer aminosav beépítése fém iont igényel. Ez a fehérje volt a szöveti transzglutamináz. Ezt követően részletesen tanulmányozták, és leírták, hogy a Ca^{2+} ion az a fémion, ami a leghatékonyabban tudja aktiválni a transzamidáz aktivitását a TG2 fehérjének. A TG2 hasonlóan a többi TG családtaghoz 4 doménnel rendelkezik. Az N-terminális β -szendvics doménjében helyezkedik el a fibronectin és integrin kötőhelye, a központi katalitikus doménje felelős az enzimatisma aktivitásaiért, és Ca^{2+} -kötőhelyért és a két C-terminális β -hordó doménje közül a második tartalmazza a foszfolipáz C-kötőhelyet. A katalitikus domén és az első C-terminális β -hordó domén közötti hasadéokban helyezkedik el az egyedi purin nukleotid kötőhely.

1.2.1. TG2 fehérje enzimatis és nem enzimatis aktivitásai

A TG2 fehérje a transzglutamináz (aminok beépítése fehérjékbe, fehérjék keresztkötése, dezamidáció és izopeptidáz aktivitás), illetve a kináz, a GTPáz és az ATPáz aktivitásokon túl, melyek enzimatis, Ca^{2+} -függő aktivitások, rendelkezik nem enzimatis funkciókkal is. Enzimatis reakciói révén elősegíti például az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjék stabilizálását keresztkötések révén. Nem enzimatis reakcióival olyan funkciókat lát el, amik a szubsztrátokkal való fizikai kötődésen alapulnak, és nem a szubsztrátok kémiai módosításait jelentik. Ezáltal a sejtekben G-fehérjeként a GTP hidrolizálásával G-fehérje kapcsolt receptor (GPCR) jelátviteli útvonalakat befolyásolhat, továbbá szerepet játszik az NF- κ B, az EGF/EGFR, a FAK jelátviteli utakban is. Koreceptorként funkcionálhat az integrin molekula egyes alegységeihez kötődése által, segítve a sejtadhéziót, és migrációt. Kötö és aktiválja a foszfolipáz-C (PLC) molekulát, így emelve a Ca^{2+} , mint másodlagos hírvívó szintjét. A TG2 fehérjeinterakciókon keresztül is számos biológiai folyamatot befolyásolhat, mely folyamatok alaposabb vizsgálatára irányult a TG2 interaktom tanulmányozása a kutatásaim során.

1.2.2. A TG2 konformációs állapotai

A TG2 fehérjének ismert két fő konformációs állapota, melyek a Ca^{2+} és a nukleotidok egymáshoz viszonyított arányától függően alakulnak ki, illetve stabilizálódnak. A sejtben jelenlévő nukleotidok, mint az GTP, a GDP és az ATP negatívan szabályozzák a transzglutamináz aktivitását a fehérjének, míg a Ca^{2+} pozitívan befolyásolja azt. A nukleotidok kötése zárt konformációban stabilizálja a TG2 szerkezetét, aminek következtében fedésben található a katalitikus hely. A Ca^{2+} ionok elektrosztatikus kölcsönhatások révén fejtik ki hatásukat. Kötődik a katalitikus doménben található negatív felszínnekhez, aminek hatására eltávolodnak az N-terminális β -szendvics és a C-terminális hordó domének, így relaxálva, kinyitva a fehérje szerkezetét. A nyitott konformáció kialakulásának következtében elérhetővé válik a szubsztrát molekula számára az aktív hely, elősegítve a szubsztrát bekötődését. Elmondható, hogy a TG2 enzimnek van egy GTP-kötött, katalitikusan inaktív, egy Ca^{2+} -kötött nyitott, katalitikusan aktív formája. A GTP-kötött állapot Ca^{2+} adagolásával felfüggeszthető, ami ismét nyitott konformációjú, transzglutamináz aktivitással rendelkező enzimet eredményez. Egy harmadik konformáció is kialakulhat úgy, hogy a Ca^{2+} -kötött nyitott, transzglutamináz aktív formában oxidáció hatására diszulfid-kötés alakul ki, így inaktíválva az egyébként nyitott formát. Az oxidáció hatására bekövetkező aktivitáscsökkenés tioredoxin adagolásával gátolható meg.

1.2.3. A TG2 interaktom

Többszörös szerkezete, a szerkezetileg rendezetlen régiói (IDR), rövid lineáris motívumai, valamint az enzimatis és nem enzimatis funkcióinak váltakozása teszi lehetővé a TG2 számára, hogy sokoldalú molekuláris keresztkötőként és jelátviteli modulátorként működjön a sejtekben a partnerfehérjéhez való kötődése révén. Ez a funkcionális sokoldalúság magyarázza, miért olyan fontos fehérje a TG2 az emberi szervezetben, és miért járulhat hozzá számos betegség kialakulásához, például daganatos betegségek, fibrózisos kórképek, kardiovaszkuláris és neurodegeneratív betegségek kialakulásához.

A TG2 interakcióba kerülhet az integrin (ITGB1), a szindekán-4 molekulákkal, illetve növekedési faktor receptorokkal (PDGFR, VEGFR) a sejtadhézió, a migráció, valamint az ECM stabilizáció szabályozásához. Mátix metalloproteinázokkal (MMP) való kölcsönhatás révén hozzájárul az ECM degradációjához. Ezen különféle fehérjeinterakciókon keresztül szabályozza a szervezet fiziológiás folyamatait, például ECM stabilizációját (pl. integrin, fibronectin), a szövetregenerációt (pl. szindekán-4, PDGFR), az apoptózist (pl. BAX, BAK), a fagocitózist (pl. MFG-E8), a sejtélét (pl. HSP27, HSP20).

1.2.4. TG2 szerepe HUVEC sejtekben

A kardiovaszkuláris rendszer szinte minden sejtje, a simaizom sejtek, az endotél sejtek, köztük az általunk is használt humán köldökvéná eredetű endotél sejtek (HUVEC) is nagy mennyiségben expresszálják a TG2 fehérjét.

A TG2 fehérje szerepet játszhat a vérnyomás szabályozásában az endotél- és simaizomsejtek közreműködése segítségével. Vizsgálták, hogy a TG2 keresztkötő aktivitása gátolható endotél sejtekben endotéliális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS) által katalizált reakcióban termelődő NO hatására, a kialakuló *S*-nitrozilációs módosítás révén. A NO termelődése a kor előrehaladtával csökken, így a TG2 keresztkötő aktivitása emelkedik endotél sejtekben, ami hozzájárulhat az extracelluláris mátix fehérjék keresztkötéséhez. Ez a folyamat az erek ridegségét eredményezve kardiovaszkuláris kórképek kialakulásához vezethet.

A TG2 nagy mennyiségben jelen van HUVEC sejtekben, amely így jó modell az endotéliális TG2 funkciók vizsgálatához. Kimutatták, hogy a TG2 fehérje csendesítése a fokális adhézis kináz (FAK) mennyiségét csökkentette, így csökkentve a sejtek adhézis, letapadó képességét. Áramlási citometriás mérések elvégzését követően azt figyelték meg, hogy a TG2 csendesítés hatására az endotél sejteknek sérült az osztódóképessége, így nőtt az apoptotikus sejtek aránya. A TG2 endotélsejtekben játszott biológiai szerepének megértéséhez azonban további kísérletek szükségesek, hogy ezen feladatokat mechanisztikusan alaposabban meg tudjuk érteni.

1.2.5. RNS-kötő fehérjék

Az RNS-kötő fehérjék (RBP-k) olyan fehérjék, amelyek RNS-hez kötődnek és modulálják a kötődött RNS-ek sorsát vagy funkcióját. Az RBP-k az RNS-kötő domének, például az RNS-felismerő motívumok, a K-homológia, a cinkujj, az intrinszikusan rendezetlen régiók (IDR-ek) és a DEAD box helikáz domén segítségével kötődnek az RNS-en belüli szekvenciákhoz vagy szerkezeti motívumokhoz. Az RNS-kötő fehérjék (RBP) részt vehetnek a ribonukleoprotein (RNP) komplexek kialakulásában, amelyek alapvető fontosságúak a génexpresszióban.

Az RNS-ek és a fehérjék között létrejövő interakciók komplex szabályozó mechanizmusokat indítanak be a sejtekben. Az RBP-k a sejtek differenciálódásának és a szervek fejlődésének kulcsfontosságú szabályozói, és központi szerepet játszanak számos patofiziológiai folyamatban. A citoplazmában az RBP-k az mRNS megfelelő lokalizációját és stabilitásának szabályozását, valamint az mRNS-ek transzlációjának hatékonyságát is szabályozzák. A sejtmagban egyes RBP-k alternatív splicing-szabályozóként működnek, különösen az idegrendszeri fejlődés során vagy szövet-specifikus folyamatokban. Ezenkívül az RBP-k közvetítik az mRNS-ek transzkripció utáni szabályozását, ami stabilizálja a génexpresszió hatékonyságát.

Az RNS-kötő domének (RBD-k) az RBP-k szerkezeti elemei, melyek segítségével az RNS és a fehérje közötti kölcsönhatás képes létrejönni. A domének kevesebb mint 100 aminosavból állnak, és csak nagyon kevés aminosav vesz részt az RNS-sel való közvetlen kapcsolódás során. A specifikus kötődés érdekében az RBP-k több RNS-kötő régióhoz is kötődhetnek, hidrogénkötésekkel, illetve gyengébb kölcsönhatásokkal. Azonban a TG2-ben sem kanonikus kalcium, nukleotid kötő domének nincsenek és bioinformatikai megközelítéssel RNS kötő domén sem prediktálható.

2. Célkitűzés

A transzglutamináz 2 fehérje számos biológiai folyamatban szerepet játszó, konzervált fehérje. Nagy mennyiségben expresszálódik endotél sejtekben, azonban fiziológias szerepeinek mechanizmusa nem teljesen tisztázott.

A TG2 fehérje biológiai és potenciális terápiás jelentőségének alaposabb megismerése érdekében kutatásunk a következő vizsgálatokat tűzte ki célul:

- a TG2 interaktom feltárását HUVEC sejtkivonatból kétféle módszer felhasználásával:
 - helyspecifikusan biotinilált humán rekombináns TG2 fehérje és neutravidin agaróz felhasználásával, illetve
 - a fejlesztett endogén TG2 csendesített és transzgén 3xFlag-TG2 fehérjét expresszáló HUVEC sejtkivonatból a sejtekben összeszerelődött TG2 asszociált komplexek koimmunoprecipitációs izolálásával anti-Flag agarózzal és tömegspektrometriás azonosításával.
- a TG2 RNS-kötő képességének megerősítését, karakterizálását.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Alkalmazott sejtvonalak

A kísérleteink során a már korábban kialakított, a telomeráz gén overexpressziójával immortalizált humán köldökszinór véna eredetű endotél sejteket (HUVEC) használtuk.

A sejtvonalak esetében M199 alapú médiumot használtunk a sejtek tenyésztésekor, amit kiegészítettünk 2 % HEPES, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % Amphotericin B, 10 % EGM-2 és 10 % FBS reagenssekkel. A sejtenyésztés 37 °C-os termosztátban, 5 %-os CO₂ tartalom mellett történt.

3.1.1. Az indukálható, endogén TG2 fehérjét csendesítő vektor kialakítása, klónozása

Elsőként a pLKO Tet-On (Puro) üres vektort EcoRI-HF és AgeI-HF restrikciós endonukleázokkal felnyitottuk, majd 1 %-os agaróz gélelektroforézissel elválasztottuk, és a linearizált vektort gélből tisztítottuk. A csendesítő oligonukleotid szekvenciát kódoló primerpárokat hibridizáltuk, majd a felnyitott vektorba ligáltuk T4 DNS ligázzal. A ligálási reakció végtermékét kémiaileg kompetens DH5 α baktérium sejtekbe transzformáltuk. Az izolált vektorokat XhoI restrikciós endonukleáz hasítással, valamint szekvenálással is ellenőriztük.

3.1.2. A transzgén TG2 fehérjét expresszáló vektor kialakítása, klónozása

A korábban inzerciós mutagenézissel kialakított pENTR-4-3Flag vektort EcoRI restrikciós endonukleáz segítségével nyitottuk fel. Az 5' végen lévő foszfátot alkalikus foszfáttal eltávolítottuk. A felnyitott vektort 1 %-os agaróz gélelektroforézist követően a gélből tisztítottuk.

A TG2 cDNS szekvenciáját egy korábban, a munkacsoport által kialakított pET30ek/LIC-hTG2 vektorból vágtuk ki EcoRI restrikciós endonukleázzal. Ezután 1 %-os agaróz gélelektroforézissel választottuk el a TG2 fehérjét kódoló cDNS szekvenciáját. A TG2 inzertet gélből tisztítottuk. A felnyitott pENTR-4-3Flag vektorba T4 DNS ligázzal kapcsoltuk a TG2 cDNS szekvenciáját. A transzformálás folyamata, a plazmid izolálása, illetve ellenőrzése az endogén TG2 csendesítő vektorhoz hasonlóan történt.

A kialakított pENTR4-3xFlag-TG2 és a pCW57.1 vektorokat rekomináltuk Gateway LR Enzyme Mix II. segítségével. A pCW57.1 vektor tartalmazza a szükséges genetikai elemeket a doxiciklin-indukálható transzgén expresszió számára. Az elegyet Stbl3 baktérium sejtekbe transzformáltuk. Az plazmid izolálás után a klónok ellenőrzése XbaI restrikciós endonukleáz hasítással, majd szekvenálással történt.

3.1.3. A TG2 csendesített és a transzgén TG2 expresszálo HUVEC sejtvonal kialakítása, szelekciója

A sejtek fertőzése az endogén TG2 fehérjét csendesítő vektorral 12 vályús lemezen történt a 70% konfluenciát elérő sejteken tápfolyadék cserét követően. A sejtek szelekcióját 1,5 µg/ml puromicint tartalmazó M199 alapú médiumcserével végeztük 48 órát követően. Újabb 48 óra múlva 4 µg/ml puromicin tartalmú tápfolyadékcserét alkalmaztunk, amit addig folytattunk, míg a kontroll sejtek, amiken csak alapmédiumot cseréltünk, el nem pusztultak. Miután a sejtek benőtték a vályút a szelekció után, átraktuk őket 6 vályús lemezre, majd T25 és T75 flaskákba. A transzgén TG2 fehérjét expresszálo vektor esetében a korábban TG2 csendesítésre ellenőrzött sejtek (TG2-KD) fertőzése hasonlóan történt, mint a csendesítő vektor alkalmazásával, viszont a szelekció során 6 µg/ml puromicint tartalmazó tápfolyadékot használtunk. Az így kialakított sejtvonalat neveztük TG2-KD+3F-TG2 HUVEC sejtnak.

3.1.4. A TG2 csendesítés, illetve transzgén termelés indukálása a TG2-KD+3F-TG2 HUVEC sejtvonalban

Az endogén TG2 fehérje csendesítése, illetve a transzgén TG2 fehérje expressziója a duplán fertőzött sejtekben is 4 µg/ml doxiciklin hozzáadásával történt. A kialakított sejtvonalakon a doxiciklint tartalmazó tápfolyadékot két naponta cseréltük. A csendesítés megfelelő indukálásához legalább 3 hét volt szükséges.

3.1.5. Rekombináns fehérjetermelés és tisztítás

A helyspecifikusan, N-terminálisan biotinilált humán rekombináns TG2 fehérje (N-BAP-rhTG2) termeléséhez a humán TG2 cDNS szekvenciáját kódoló pET-30ek/LIC-hTG2 bakteriális expressziós vektort alkalmaztuk, majd az N-terminálisan biotinilált rhTG2 fehérjét IPTG hozzáadásával *E. coli* Rosetta 2 (DE3) baktériumsejtekben expresszáltuk. A fehérje tisztításához His GraviTrap oszlopot alkalmaztunk.

A rekombináns, His₆-jelölt humán TG2 fehérje és az expressziós vég lehasított (TEV proteáz) TG2 fehérje termelése korábban kialakított, és leírt módszer alapján történt *E. coli* Rosetta 2 (DE3) sejtekben IPTG indukcióval, majd a tisztításra His GraviTrap oszlopot használtunk.

A C-terminális β-hordó domén trunkált TG2 (TG2 1-584) fehérje a pET-30ek/LIC-hTG2 vektorból lett klónozva, és a mutánsok QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit alkalmazásával lettek kialakítva ugyanebben a vektorban.

3.1.6. RNS izolálás és RT-qPCR mérés

Az RNS izolálásához a sejteket tripszin-EDTA kezeléssel (5 perc, 37 °C) felválasztottuk, majd kétszer mostuk jéghideg PBS-sel. A sejtpelletet TRI reagensben felszuszpendáltuk, majd szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk. Kloroform hozzáadása után az RNS molekulákat tartalmazó felső, szintelen fázishoz arányosan izopropanolt adtunk, majd szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk az elegyet. Centrifugálást követően az RNS pelletet -20°C-ra hűtött, 70%-os etanollal mostuk, majd újabb centrifugálás után megszáritottuk. A reverz transzkriptáz-PCR-hez 200 ng/μl RNS-t cDNS-sé írtuk át. A qPCR méréshez TaqMan próbákat használtunk. A transzkripció szinteket az B aktin szintjére normalizáltuk és C_T módszer segítségével határoztuk meg a gének expresszióját.

3.1.7. Western blot

A fehérjék elválasztását 10%-os nátrium dodecil szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével végeztük, majd félszáraz blottolást alkalmaztunk. Blokkoláshoz 5 (m/v) %-os alacsony zsírtartalmú tejporos 1x TTBS oldatot használtunk. Az elsődleges és másodlagos antitestek hígításához 0,5 (m/v) %-os alacsony zsírtartalmú tejporos 1x TTBS oldatot alkalmaztunk.

3.1.8. Letapadási teszt

A mérést megelőző napon a sejteken a tápfolyadékot éhezési médiumra cseréltük, ami csak 1% FBS-t tartalmazott 10% helyett. A F16 Black Maxisorp platet fibronektinnel fedtük, majd 1000 db/200 μl HUVEC sejtszuspenziót mértünk a lyukakba, majd 1 órás inkubálás következett. A le nem tapadt sejteket PBS mosással távolítottuk el, majd Cell-Titer Blue reagenst tartalmazó médium hozzáadása után, mértük a letapadt sejtek számával arányos fluoreszcens intenzitás emelkedést BioTek Synergy HT készülékkel (Ex:530 nm/Em:590 nm) és meghatároztuk az intenzitásváltozást.

3.1.9. Áramlási citometriás mérés

A sejteket tripszin-EDTA kezeléssel történő felválasztás után PBS oldattal mostuk. A sejteket jelöltük Annexin-V és propidium jodid reagenssel 15 percen keresztül sötétben. A kontroll esetben csak Annexin-V kötő puffert alkalmaztunk. A sejteket ezt követően FACSria™ III áramlási citométer segítségével analizáltuk.

3.1.10. Helyspecifikusan biotinilált humán rekombináns TG2 fehérjével asszociált fehérjék izolálása High Capacity Neutravidin agaróz gyönggyel és azonosításuk tömegspektrometriával

250 µl ekvilibrált Pierce High Capacity Neutravidin agaróz gyöngyre 100 µg helyspecifikusan biotinilált rekombináns humán TG2 fehérjét (rhTG2) immobilizáltunk. Biotinos blokkolást követően az affinitás tisztítást 2,5-3 mg HUVEC sejt extraktum hozzáadásával végeztük egy éjszakán át, folyamatos rotáció mellett 4 °C-on. A sejtpelletet lízis pufferben szuszpendáltuk (25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerin, 0,5% NP-40, 1 mM PMSF), ami tartalmazott PIC-et (Protease Inhibitor Cocktail) 100-szoros hígításban és PhosSTOP-ot (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) 1-szeres hígításban a sejtkivonat elkészítéséhez. Másnap háromszor mostuk a gyöngyöt CoIP pufferrel (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 % glicin, pH 7,4), majd a potenciálisan interakciós fehérjéket eluáltuk 0,1 M glicin-HCl pufferrel (pH 3,5). Az erősen kötődő partnerek eluálása végett 6x Denaturációs puffert (300 mM Tris-HCl, pH 6,8; 12 (m/v)% SDS, 20 (v/v)% glycerol és 0,43 M β-merkaptoetanol) is alkalmaztunk hődenaturálás mellett (10 perc, 100 °C). A mintákat SDS poliakrilamid gélbe futtattuk, a szeparáló gélig és Coomassie-kék festést követően az összes fehérjét tartalmazó még nem szeparálódott sávot kivágtuk és LC-MS/MS analízisre küldtük.

3.1.11. Transzgén 3F-TG2 fehérjével asszociált fehérje komplexek tanulmányozása anti-Flag M2 agaróz gyöngy alkalmazásával

300 µl monoklonális anti-FLAG M2 agaróz gyöngyöt equilibráltunk, amire 3-3,5 mg fehérjét tartalmazó sejt extraktumot mértünk és egy éjszakán át inkubáltuk az agaróz gyönggyel. A nem specifikus háttér fehérjék meghatározásához egér IgG agaróz gyöngyöt használtunk kontrollként. Három mosási lépés után a lehetséges interakciós fehérjéket savas majd denaturáló pufferrel eluáltuk. Az eluált fehérjéket 10 %-os SDS poliakrilamid gélbe futtatuk, majd Coomassie-kék festést követően a még nem szeparálódott fehérjéket tartalmazó sávot kivágtuk és LC-MS/MS analízisre küldtük.

A konformációfüggő interakciós partnerek feltárása érdekében a TG2 fehérjét különböző modulátorokkal kezeltük. A TG2 nyitott állapotban való stabilizálásához 15 µM NC9 modulátorral kezeltük elő a sejteket a sejt extraktum készítését megelőző 24 órával. A TG2 zárt konformációs állapotának megőrzése érdekében 1 mM GTPγS inhibitort adtunk a sejt extraktumhoz, mivel a GTPγS nem penetrál az élő sejtekbe az NC9 modulátortól eltérően.

3.1.12. Ortogonális szerves fázis szeparáció

A RNS-kötő fehérjét ortogonális szerves fázis szeparációval (OOPS) izoláltuk. Az RNS-fehérje komplexeket a sejtekben 400 mJ/cm^2 UV fény alkalmazásával kovalensen keresztkötöttük GS Gene Linker UV Chamber készülékkel. Ezt követően a sejteket TRI reagenssel lizáltuk, majd végrehajtottuk a fázis szeparációt 1:5 arányban hozzáadott kloroformmal. A felső és az alsó fázis közötti interfázist háromszor mostuk (először TRI reagenssel, majd kloroform hozzáadásával újra elválasztottuk a fázisokat háromszor ismételve). Az interfázist, ami tartalmazta az UV fény által keresztkötött RNS-fehérje komplexeket metanollal (9:1) precipitáltuk, majd szonikáltuk, és $5 \mu\text{g}$ RNáz A reagenssel kezeltük. A felszabadított RNS-kötő fehérjét újabb TRI reagenssel szeparáltuk, majd kloroform kezelést használtunk. A továbbiakban a szerves, alsó fázist használtuk, és metanollal precipitáltuk. Western blot esetén a mintákhoz 6x denaturáló puffert adtunk, ami 50 mM ditiotreitollal (DTT) volt kiegészítve. A minták fehérjetartalmát tömegspektrometriával is azonosítottuk.

3.1.13. Mágneses RNS-fehérje pull-down kísérlet

Az RNS-fehérje interakciók kimutatásához Pierce RNA 3' Desthiobiotinylation Kit-et és Pierce Magnetic RNA-Protein Pull-Down Kit-et használtunk. A 43-mer RNS molekulát (Kit tartozék), illetve a HUVEC-ből izolált total RNS 3' végét desthiobiotiniláltuk a Kit segítségével, majd a jelölt RNS mintákat streptavidin mágneses gyöngyök szuszpenziójára kötöttük. Az immobilizált RNS-t tartalmazó mágneses gyöngyökhöz adtuk a humán (His)₆-jelölt rekombináns TG2 fehérjét. Mosás után az RNS-kötött fehérjét eluáltuk 6x Denaturáló puffer segítségével, majd 10% SDS poliakrilamid gélelektroforézis és Western blot segítségével analizáltuk.

A TG2 RNS kötésének konformáció függését vizsgálni a rekombináns fehérjét előinkubáltuk 0,1 mM NC9 modulátorral a nyitott konformáció stabilizálásához 5 mM CaCl_2 jelenlétében. A zárt konformációhoz 0,5 mM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ inhibitor jelenlétében inkubáltuk a jelölt RNS-t kötött mágneses gyöngyöt.

3.1.14. TG2 transzamidáz aktivitásának mérése

A módszer a danzil-kadaverin beépülését vizsgálja az N, N'-dimetilezett kazeinbe a TG2 fehérje által. A reakcióelegy tartalmazott 0,2 mM danzil-kadaverint, 2 mg/ml N, N'-dimetilezett kazeint, 3 mM DTT-t és 10 mM CaCl_2 oldatot. Az aktivitásmérést a TG2 fehérje hozzáadásával indítottuk, aminek koncentrációja 200 nM volt 100 μl reakcióelegyben. Az aktivitást a növekvő fluoreszcencia intenzitás közel lineáris szakasza alapján számítottuk ki (Ex/Em: 360/530 nm).

3.1.15. TG2 izopeptidáz aktivitásának fluoreszcens mérése

A TG2 izopeptidáz aktivitásának meghatározásához Zedira A102 fluoreszcens szubsztrátot használtunk. A módszer lényege, hogy a transzglutaminázok képesek hasítani az izopeptid kötést a szintetizált szubsztrátokban, miközben egy quencher molekula (2,4-dinitrofenil) szabadul fel, a fluoreszcencia intenzitás növekedését eredményezve. A reakciót a TG2 fehérje hozzáadásával indítottuk, aminek koncentrációja 150 nM volt a 200 µl teljes reakcióelegyben. A mérést BIOTEK Synergy 4 készülékkel végeztük (Ex/Em: 318/413 nm).

3.1.16. RNS-fehérje interakció detektálása bioréteg interferometriával

A módszer egy optikai technika, ami a molekulák közötti interakciók kinetikáját és erősségét képes vizsgálni valós időben. A méréshez Blitz készüléket és a gyártó által ajánlott sztreptavidin bioszenzort használtuk, aminek mintatartóját kötőpufferrel töltöttük fel, amiben 10 µg/ml biotinilált 43-mer RNS molekula volt. A tisztított, rekombináns TG2 fehérjét ezt követően vittük fel a cseppmintatartóba. A többi lépéshez csőmintatartót használtunk. A két különböző mintatartó közötti váltás egy elcsúszást okozott a görbében a kísérleti lépések között. Lépéskorrekciót alkalmaztunk azért, hogy kiküszöböljük ezeket az eltolódásokat a későbbi kísérleti lépések között. A molekulák közötti kötések disszociációs konstansának (K_D) meghatározásához a BLItz Pro 1.2.1.5. szoftvert használtuk.

3.1.17. LC-MS/MS analízis

Az RNS-kötő fehérjék azonosításához az ortogonális fázis szeparációt követően, illetve a TG2 interaktom azonosításához a mintákat 5 %-os gyűjtő és 10 %-os szeparáló gélt tartalmazó poliakrilamid gélbe futtatuk, amíg éppen beérkeznek a szeparáló gélbe, majd Coomassie festést követően a még nem szeparált fehérje sávokat kivágtuk, a festéket kimostuk és tömegspektrometriás analízisre küldtük a Debreceni Egyetem, ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Proteomika Szolgáltató Laboratóriumába. Az eredményeket a Scaffold 5.0 programba (Proteome Software) tölthető módon kaptuk meg.

A TG2 interaktom vizsgálata során a Scaffold szoftverben 1,0%-os FDR értéket, míg a potenciális RNS-kötő fehérjék (RBP) azonosítása esetében a fehérjék elvesztésének elkerülése érdekében nem FDR szűrési módot alkalmaztunk. Fehérjénként egy egyedi peptid kritériumot állítottunk be minden esetben, illetve minden peptid MS/MS spektrumának valódiságát legalább négy egymást követő b vagy y fragmentek jelenlétével igazoltuk (azaz ezen kritérium alapján fogadtuk el a fehérjét valós találatnak).

3.1.18. Bioinformatikai analízis

Az azonosított TG2-asszociált fehérjék analízisét PANTHER 19.0 és STRING v12 adatbázisokkal elemeztük. A legjobban dúsuló GO Molekuláris funkciókat az FDR (false discovery rate) érték alapján rendeztük és az eredményeket GrapPad Prism 8.0.1 szoftverrel jelenítettük meg.

Az általunk HUVEC sejtekben azonosított RNS-kötő fehérjéket megvizsgáltuk az RBP2GO adatbázissal, és 20 újonnan azonosított RNS-kötő fehérjét találtunk, amiket STRING adatbázis segítségével analizáltunk, majd a legjobban dúsuló GO Biológiai funkciókat az FDR (false discovery rate) érték alapján listáztuk. A használt 43-mer RNS másodlagos szerkezetét az RNAstructure v6.4 szoftver használatával prediktáltuk. A TG2 potenciális RNS-kötő képességét a catRAPID online elérhető szoftverrel becsültük meg. A TG2 vizuális ábrázolását a Visual Molecular Dynamics Software (VMD) segítségével készítettük.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1. TG2 interaktom vizsgálata

A kísérletekhez használt immortalizált humán köldökzsínór véna eredetű endotélsejtek (HUVEC) megőrizték a morfológiai sajátosságaikat és a primer sejtekhez hasonlóan jelentős mennyiségben expresszálják a TG2 fehérjét. A kísérletek megkezdése előtt mRNS szekvenálással is ellenőriztünk, hogy az immortalizált sejtvonal megőrizte a klasszikus endotéliális markerfehérjék expresszióját.

4.1.1. A TG2 interakciós partnereinek azonosítása HUVEC sejtkivonatból biotinilált, humán rekombináns TG2 fehérje segítségével

Elsőként egy már ismert, hagyományosnak mondható technikát, biotin-neutravidin agaróz alapú affinitás kromatográfiát alkalmaztunk. A TG2 fehérje véletlenszerű biotinilációjának és az interaktomra gyakorolt kiszámíthatatlan szterikus hatásainak a megelőzése érdekében egy biotin-akceptor peptidet (BAP) klónoztunk a rekombináns TG2 fehérjét kódoló vektor N-terminális régiójába. Az affinitás tisztítás során a biotinilált rekombináns fehérjét High Capacity Neutravidin agaróz gyöngyhez kötöttük, majd a szabad kötőhelyek biotinnal történő blokkolása után hozzáadtuk a HUVEC sejtkivonatot, amiből kikötöttek a TG2 interakciós partnerei. A partnerfehérjéket ezután eluáltuk, és a potenciális interakciós partnereket LC-MS/MS analízissel azonosítottuk.

A kontroll (aspecifikusan kötődő fehérjék) levonása után 170 TG2-asszociált fehérjét azonosítottunk. Ezek között volt már korábban azonosított TG2 interakciós partner, ami alátámasztja módszerünk megbízhatóságát. A találatok STRING bioinformatikai analízise alapján a leginkább dúsuló GO *Sejtkompartmentumok* a *Fokális adhézió*, az *Extracelluláris exoszóma*, a *Vezikula*, a *Membránfelület* és az *Extracelluláris tér* voltak, melyek alátámasztják a TG2 jelenlétét az exoszómális vezikulákban, így támogatva a TG2 externalizáció egyik potenciális mechanizmusát HUVEC sejtekből. Az N-BAP-biotin rhTG2-asszociált fehérjék elemzésekor a legjobban dúsuló GO *Molekuláris funkciók* között szerepel a *Kadherin kötődés* és a *Sejtadhéziós molekula kötés*, amelyek a TG2 sejtadhézióban és migrációban betöltött szerepét erősítik. Az *RNS-kötés* megjelenése, mint GO *Molekuláris funkció*, azonban egy új megfigyelés a TG2 interakciós partnerek kontextusában.

4.1.2. A Tet-indukálható, endogén TG2-csendesített és 3xFlag-jelölt transzgén TG2 fehérjét expresszáló HUVEC sejtvonal fejlesztése és karakterizálása

A baktériumokban expresszált, rekombináns fehérjével végzett affinitás kromatográfia hátrányait kiküszöbölni, illetve a TG2 fehérje HUVEC sejtekben való magas expressziójának előnyeit kihasználni úgy döntöttünk, hogy egy új modellrendszert fejlesztünk ki a TG2-asszociált fehérjék azonosítására. Ehhez a munkám során kialakított HUVEC sejtvonalat (TG2-KD+3F-TG2) alkalmaztuk, melyben a TG2 fehérjén található Flag-címke segítette a TG2 fehérjét tartalmazó, natív körülmények között kialakuló fehérjekomplexek izolálását és későbbi kimutatását. Élő sejtekben a funkcionális fehérjekomplexek kialakulása egy szabályozott, chaperonok által segített folyamat. Az összeszerelő chaperonok, az átmeneti ko-transzlációs interakciók és az azt követő konformációs változások könnyítik a fehérjekomplexek kialakulását és az azokat alkotó egyes fehérjék beépülését meghatározott sorrendben. Az összeszerelő chaperonokkal való interakció segíti a szükséges konformációs változások kialakulását, ami nélkülözhetetlen lehet más fehérjékhez való kötődéshez.

Először, az endogén TG2 expressziót lentivirális transzdukcióval csendesítettük az immortalizált HUVEC sejtvonalba a Tet-On puro shTG2 vektor bejuttatásával. Három hetes doxiciklin-indukció után a puromicin-szelekcióval kiválasztott TG2-knockdown HUVEC sejtvonalban (HUVEC TG2-KD) a TG2 szint csökkenését mind RNS, mind fehérje szinten megerősítettük. Ezután a 3F-TG2 fehérjét kódoló szekvenciát tartalmazó Tet-indukálható vektort egy második lentivirális géntranszfer útján juttattuk be a TG2-KD HUVEC sejtvonalba (HUVEC TG2-KD+3F-TG2). A szelekció, majd három hetes doxiciklin-indukció után az RT-qPCR eredmények és a Western blotok kimutatták, hogy a transzgén 3F-TG2 bejuttatása helyreállította a TG2 szintjét mind RNS, mind fehérje szinten a létrehozott HUVEC TG2-KD+3F-TG2 sejtvonalban. A kísérleteinkben a többi transzglutamináz családtag expressziós szintjeit a csendesítés és a transzgén TG2 expressziója nem befolyásolta.

4.1.3. Sejtvonalak funkcionális jellemzése letapadási teszttel és apoptotikus sejtek arányának meghatározásával

A kifejlesztett sejtvonalak letapadási képességét vizsgáltuk fibronektinnel fedett felületen. A TG2-KD HUVEC sejtek alacsonyabb sejtadhéziós tulajdonságokat mutattak. A 3F-TG2 bejuttatása nem tudta kompenzálni a megfigyelt csökkenést a sejtadhéziós folyamatokban, ami talán a fehérje viszonylag nagy, hidrofób 3xFlag jelölésének köszönhető.

Vizsgáltuk az apoptotikus sejtek arányát, ami a TG2-KD HUVEC sejtekben magasabb volt, mint a kontroll és a 3F-TG2-kompenzált sejtvonalakban, ami arra utal, hogy a transzgén TG2 kompenzálhatja az endogén TG2 csendesítés hatását.

4.1.4. A HUVEC sejtekben összeszerelődő 3F-TG2-asszociált fehérjekomplexek azonosítása

Anti-FLAG M2 agaróz gyöngy alkalmazásával izoláltuk a TG2-t tartalmazó fehérjekomplexeket a 3xFlag-jelölés segítségével a HUVEC TG2-KD+3F-TG2 sejtkivonatot használva. LC-MS/MS elemzést követően a kontroll fehérjéket (aspecifikusan kötődő fehérjék) ez esetben is levontuk az anti-FLAG M2 agaróz gyöngy segítségével azonosított találati listából. A kontroll kivonása után 356 TG2-asszociált fehérjét azonosítottunk, amelyek közül 86-ot mind a Neutravidin agarózzal végrehajtott affinitás kromatográfiával, mind pedig az anti-FLAG M2 agaróz gyönggyel is azonosítottunk. Összesen 114 fehérje volt kimutatható minimum öt egyedi peptiddel, amik a leggyakrabban előforduló interakciós partnereknek tekinthetők.

4.1.5. A 3F-TG2 fehérjéhez kapcsolódó fehérjék molekuláris funkciói és lokalizációjuk a sejtben

Meglepő módon a legjobban dúsuló GO *Molekuláris funkció* mind a teljes lista, mind a minimum 5 egyedi peptiddel detektált interakciós fehérjék esetében az *RNS-kötés* volt.

A 3F-TG2 fehérjéhez asszociált fehérjetalálatokból nyert adatok szintén alátámasztják a TG2 részvételét a HUVEC sejtek vezikuláris transzportjában. A leggazdagabb GO *Sejtkompartmentumok* az *Extracelluláris exoszóma*, a *Vezikula* és az *Extracelluláris tér* voltak, amik arra utalnak, hogy a TG2 valószínűleg a HUVEC sejtekből vezikuláris transzporttal szekretálódik, és befolyásolhatja a vezikulák mennyiségét és összetételét is.

4.1.6. A konformációs változás hatása a 3F-TG2 fehérjéhez asszociált fehérjekomplexekben

A TG2 konformációs változásának interakciós partnereire gyakorolt hatását vizsgálni modulátoros kezeléseket alkalmaztunk a koimmunoprecipitáció előtt vagy alatt, anti-Flag M2 agaróz gyanta felhasználásával. A TG2 nyitott konformációját a sejtek NC9 előkezelésével stabilizáltuk, míg a zárt konformációt GTP γ S-sel történő inkubálással idéztük elő a sejtek lízise és a koimmunoprecipitáció alatt, mivel a nukleotidok nem képesek behatolni a sejtekbe.

NC9 vagy GTP γ S jelenlétében a kontroll levonása után 294, illetve 160 fehérjét azonosítottunk, ami jelezte számunkra, hogy a modulátorok stabilizálják, és limitálják a kialakuló konformációs formák számát.

A fehérje találatok nagy részét mindhárom kísérleti beállításban (kezeletlen, NC9 kezelt, GTP γ S kezelt minták) detektáltuk, ami arra utal, hogy az interakciós felületek többsége független a nyitott vagy zárt konformációtól. Ezek között a fehérjék között találunk nagy számban a transzlációban részt vevő fehérjéket (ribonukleoproteinek, transzlációs faktorok), a citoszkeleton és a fokális adhézis komplex komponenseit, valamint az anyagcsere és a jelátviteli folyamatokhoz kapcsolódó fehérjéket is. A kezeletlen, és az NC9-kezelt TG2 fehérjéhez is kötődő találatok között számos membrán transzporttal kapcsolatos találatot azonosítottunk legjobban dúsuló GO *Molekuláris funkció* kategóriában. A *Kadherin kötődés*, *RNS-kötődés* kevésbé dúsuló GO *Molekuláris funkciók* voltak. Ez az eredmény felveti annak lehetőségét, hogy a nyitott, illetve transzglutamináz aktivitással rendelkező TG2 fehérje közvetlenül befolyásolhatja a membrán transzport folyamatokat és hatással lehet ezen transzporter molekulákra.

A konformációfüggő TG2 interaktomban megfigyelt különbségek megerősítése érdekében elvégeztük az adatelemzést a PANTHER rendszer segítségével is. A GTP γ S kezelés után változást tapasztaltunk a GO-Slim Molekuláris funkciók arányában. A zárt konformáció stabilizálódása csökkentette a Transzporter aktivitás kategóriához kapcsolódó interakciós fehérjék arányát a kezeletlen és NC9-kezelt mintákhoz képest, tehát a nyitott konformáció biztosíthatja a különböző membrán transzporterekkel való interakciót.

A kezeletlen TG2 fehérjével kölcsönhatásba lépő partnerek nagy száma (93 találat) arra utal, hogy alapesetben a fehérje rugalmas, ami segíti a dinamikus szerkezeti mozgásokat, szerepet játszva a különféle kölcsönhatások kialakulásában. Ezek között a fehérjék között a legjobban dúsuló GO *Molekuláris funkciók* az RNS-kötődéshez, a szerkezeti, sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix molekulákhoz kötődő fehérjékhez kapcsolódnak.

Az RNS-kötő fehérjék számának dúsulása a TG2-asszociált fehérjék között arra utal, hogy a TG2 eddig nem ismert módon szerepet játszhat a poszttranszkripció szabályozásban, RNS-kötő fehérjék komplexeinek kialakításával

4.2. A TG2 RNS-kötő képességének megerősítése

A TG2 interaktom vizsgálata során a TG2-asszociált fehérjék STRING analízisét követően több esetben is GO Molekuláris funkció kategóriában az RNS-kötés funkció dúsult a legjobban. Mivel a TG2 összefüggésbe hozható a génexpresszió zavaraiival, felmerült, hogy esetleg képes lehet maga is az RNS-kötésre.

Annak érdekében, hogy kiderítsük, vajon a TG2 képes-e RNS-kötésre, legegyszerűbb megoldás volt a HUVEC RNS-kötő fehérjéinek izolálása és abban a TG2 kimutatása. Az izoláláshoz ortogonális szerves fázis szeparációs (OOPS) módszert alkalmaztunk.

Az RBP-k izolálásához az RNS-fehérje komplexeket UV-fény segítségével keresztkötöttük, kimostuk a nem keresztkötött fehérjéket és nukleinsav molekulákat, majd RNS-degradáló kezeléseket (szonikálás, denaturálás, RNáz A emésztés) alkalmaztunk. Végül Western blot segítségével kimutattuk a TG2 jelenlétét az izolált RNS-kötő fehérjék között.

A HUVEC sejtekből izolált RBP-k azonosításához a mintákat LC-MS/MS analízisre is elküldtük. Összesen 413 RNS-kötő fehérjét detektáltunk, melyek közül a TG2 fehérje a 25. leggyakoribb találat volt a detektált egyedi peptidek száma alapján.

A korábban koimmunprecipitációs technikákkal azonosított TG2-asszociált fehérjék (356), és az RNS-kötő fehérjék (413) között 150 fehérje átfed, ami alátámasztja, hogy a TG2 fehérje, mint „állványozó”, vagy szabályozó fehérje részt vehet az RNS-fehérje komplexek összeszerelésében.

Az azonosított HUVEC RBP-t ellenőriztük az RBP2GO adatbázisban, ahol a transzglutaminázok megtalálhatóak az RNS-fehérje komplexekben. Az összehasonlítás alapján a találataink között 20, eddig nem leírt endotél RBP-t azonosítottunk, melyek STRING-elemzése alapján összekapcsolhatók olyan endoteliális funkciókkal, mint az angiogenezis, a tubusképződés, a vérereket felépítő endoteliális sejtek vándorlásának szabályozása és a szövetfejlődés, alátámasztva eredményeink relevanciáját.

4.2.1. A HUVEC sejtéből származó RNS-ek és egy szintetikus 43-mer RNS kötődnek a TG2 fehérjéhez

Annak érdekében, hogy megtudjuk, van-e olyan RNS a HUVEC sejtekben, amely kötődik a TG2 fehérjéhez, a HUVEC sejtekből izolált teljes RNS frakciót használtuk „csaliként” a mágneses RNS-fehérje pull-down kísérletben. Először a HUVEC totál RNS preparátum 3'-terminális végét desthiobiotinnal konjugált citidinnel jelöltük és ezt immobilizáltuk a streptavidin mágneses gyöngyön (Pierce RNA 3'-End Desthiobiotinylation Kit). A rekombináns TG2 fehérje megkötődött az RNS fedett mágneses gyöngyön, és Western blottal detektálható jelet adott. A gyártó által, a jelölési reakció egyik pozitív kontrolljaként biztosított 43-mer RNS-molekula, szintén kölcsönhatásba lépett a rekombináns TG2 fehérjével, míg immobilizált RNS hiányában nem észleltünk nem specifikus fehérjekötődést a mágneses gyöngyökhöz.

A későbbi kísérletekben ezt a 43-mer RNS-t megszingetizáltatva, 3'-végén biotinnal jelölt formában használtuk, és „csaliként” alkalmaztuk az endogén TG2 megkötésére a HUVEC fehérje extraktumból. Az endogén TG2, amely primer és immortalizált HUVEC sejtekben egyaránt jelen van köti az alkalmazott 43-mer RNS-molekulát, tehát a TG2-RNS komplexek HUVEC sejtekben jelen vannak. A 43-mer RNS másodlagos szerkezete tartalmaz egy AU-gazdag elemhez (ARE) hasonló hurkot és egy másik, kiemelkedőbb hurkot, amelyek potenciális szerkezeti elemeket biztosítanak az RBP-vel való kölcsönhatáshoz.

Az RNS fehérjéhez való kötődésének egyik biológiai jelentősége lehet a riboreguláció, amikor az RNS kötődése szabályozza a fehérje biológiai aktivitását és funkcióit. Így a TG2 fehérjéhez kötődött RNS molekula átjárást, kapcsolatot biztosíthat a TG2 különféle aktivitásai között.

4.2.2. A rekombináns TG2 RNS-kötő tulajdonságának jellemzése

A TG2 és az RNS közötti kölcsönhatás jellemzése érdekében kompetíciós kísérletet végeztünk. Az RNS-fehérje pull-down mérésben rekombináns TG2 fehérjét inkubáltunk szabad, jelöletlen 43-mer RNS, és mágneses gyöngyre immobilizált, jelölt 43-mer RNS molekula jelenlétében. A jelöletlen 43-mer RNS koncentrációjának növekedésével a kötődő rekombináns TG2 mennyisége csökkent. Ez szintén arra utal, hogy az immobilizált ribonukleinsav felelős a TG2 kötődéséért a gyöngyhez.

A TG2 RNS- és GTP/GDP vagy ATP/ADP nukleotid kötőhelyek közötti átfedés meghatározása, valamint a nukleinsav szekvencia- és szerkezet követelményeinek vizsgálata érdekében egyláncú poli(dG) és poli(dA) homo-oligomer dezoxiribonukleinsavakat használtunk a pull-down kísérletekben. A poli(dA) esetében nem detektáltunk kölcsönhatást, míg a poli(dG) kölcsönhatásba lépett a TG2-vel. Elvégezve a kísérletet szabad 43-mer RNS és immobilizált poli(dG) molekulával versengést tapasztaltunk a két molekula között, ami csökkentette a TG2 poli(dG) molekulához való kötődését. Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy a guanin bázis kötődési helye a TG2 fehérjében részt vehet az RNS-TG2 közötti kölcsönhatás kialakulásában.

Annak vizsgálatára, hogy a TG2 konformációja befolyásolja-e az RNS-hez való kötődését vagy sem, újabb RNS-fehérje mágneses pull-down kísérleteket végeztünk vagy immobilizált 43-mer RNS-sel, vagy poli(dG)-vel, vagy HUVEC sejtekből izolált teljes RNS-sel GTP γ S jelenlétében, valamint NC9 inhibitor kezelés mellett. A GTP γ S zárt konformációban, míg az NC9 nyitott szerkezetben stabilizálja a TG2-t. Az eredmények alapján a GTP γ S megakadályozta a TG2 és a nukleinsavak kölcsönhatását, míg az NC9 kezelés nem befolyásolta az RNS-kötődést. Ez arra

utal, hogy a TG2 fehérje RNS-kötő felülete csak nyitott konformációjában elérhető, zárt formájában el van fedve.

4.2.3. Az RNS-TG2 interakció megerősítése bioréteg interferometriával

A bioréteg interferometria egy optikai technika, amely a molekuláris interakciók valós idejű kimutatására szolgál. A kölcsönhatás erősségére az immobilizálás és komplexképződés során az érzékelő felületén bekövetkező visszaverődés változása alapján következtetünk. Méréseinkhez a Blitz műszert használtuk, amely egyszerre csak egy mintát tud mérni.

A kötődés affinitásának a meghatározásához növekvő koncentrációjú rekombináns, jelölés nélküli, expressziós vég lehasított TG2 fehérjét alkalmaztunk 2,5–200 µg/ml tartományban, miután a sztreptavidin bioszenzorokat azonos mennyiségű biotinilált 43-mer RNS-sel fedtük. A TG2 koncentrációjának növekedése a detektált telítettségi jelek növekedését eredményezte. A BLItz Pro 1.2.1.5 szoftverrel számított K_D érték 88 nM volt, 1:1 kötődési modellt alkalmazva. Amikor a poli(dG) molekulát immobilizáltuk az érzékelő felületén, a kötési görbék és a K_D értékek hasonlóak voltak a 43-mer RNS alkalmazásával kapott értékekhez. A bioréteg interferometria is megerősítette a Western blottal kapott eredményünket, miszerint nincs kölcsönhatás a poli(dA) és a TG2 fehérje között.

Egy tanulmányban összehasonlították több fehérje RNS kötési affinitásait, és viszonylag széles kötődési tartományt azonosítottak. Például a vas-szabályozó fehérje 1 és a ferritin H IRE RNS között a K_D 45 pM, míg a nukleáris RNS-export faktor 1 fehérje és a CTE RNS között a K_D 90 nM. A kísérleteinkben a TG2 és egy biológiailag irreleváns RNS-molekula között nanomól tartományban lévő K_D értéket határoztuk meg, ami feltételezhetően még nagyobb is lehet, ha természetes sejtekben vizsgáljuk az interakciót.

4.2.4. A 43-mer RNS hatása a transzglutamináz aktivitásra

Bár az RBP-k kötődésük vagy felszabadulásuk során modulálhatják az RNS sorsát és funkcióját, az interakció hatással lehet az RNS-kötő fehérje biológiai aktivitására is. Megvizsgáltuk a TG2 fehérjéhez kötődő 43-mer RNS potenciális hatását két különböző típusú transzglutamináz aktivitására. Az RNS-kötődés még magas RNS-koncentrációk esetén sem befolyásolta sem a transzamidáz, sem az izopeptidáz aktivitását a TG2 fehérjének. Azonban nem zárható ki a TG2 in vivo riboregulációja az esetben, ha a sejtekben, természetes környezetben megtalálható RNS-ek, és szubsztrátok vannak jelen. Az RNS kötődése felelhet a TG2 finom szabályozásáért, befolyásolva annak Ca^{2+} -érzékenységét, GTP/GDP-kötődését és a redukáló/oxidáló hatásokkal szembeni érzékenységét. Az RNS-kötődés befolyásolhatja a fehérjék lokalizációját, és így azok kölcsönhatásait a transzportfehérjékkel.

4.2.5. A TG2 potenciális RNS-kötő helyének in silico predikciója és bizonyítása helyspecifikus mutagenézissel

In silico elemzéseket végeztünk a TG2 felületén található RNS-kötő hely azonosítása érdekében. A catRAPID algoritmus kiszámítja egy fehérje mekkora valószínűséggel köti az RNS-t. Az algoritmussal számított értékek alapján a humán TG2 szekvencia nem képes kötni az RNS molekulát. A TG2 valószínűleg nem rendelkezik tipikus RNS-kötő doménekkel, ahogy nukleotid- és kalcium-kötő helyei sem kanonikusak, azonban rendezetlen régiói (IDR-ek) gyakran kombinálódnak RNS-kötő motívumokkal, és ezáltal akár részt vehetnek az RNS-kötésben is.

A VMD vizualizációs szoftver segítségével elemeztük a TG2 szerkezetét a potenciális RNS-kötő helyek, motívumok szemszögéből. Először a pozitív töltésű aminosavakat tartalmazó szakaszokat (hasonlóan az ismert RNS-kötő motívumokhoz) választottuk ki. Mivel az eredményeink alapján a poli(dG) is képes kötődni a TG2 fehérjéhez, az is felmerült, hogy a nukleotid kötő aminosavak is szerepet játszhatnak az RNS-kötésben. Az ismert GTP-kötő oldalláncok a nyitott formában válnak elérhetővé, a zárt formában részben el vannak rejtve és közel vannak egymáshoz (nem kötődhetnek RNS-hez), így ezekben a régiókban található oldalláncok akár funkcionálhatnak potenciális RNS-kötő helyként is és résztvehetnek az RNS-kötésben a kísérleteink alapján. A katalitikus doménben található K173, F174, I175, K176, N177, I178, P179, N181 és Q186 GTP-kötő aminosavoldalláncok, a zárt konformációban nem teljesen hozzáférhetők, részben fedettek, így szerepelhetnek RNS-kötő helyként. A szekvencia analízis során találtunk a C-terminálison több bázikus aminosavat, melyek hasonlítanak tipikus RNS-kötő motívumokra (H658, H662, K663, N667, 672K, K674 és K677), bár ezek a zárt konformációban is felületi pozícióban vannak. Ezek mellett található a szerkezetben néhány RNS-kötésben gyakran részt vevő oldalláncot tartalmazó IDR a katalitikus doménen és a C-terminálison (R433, D434, E435, R436, E437, H441, K444, P446, E447, G448, S449, K598, Q599, K600, R601 és K602), melyek szintén mindkét konformációban felületi pozícióban vannak, így ezek is nagy valószínűséggel kizárhatóak az RNS-kötésből. Mindezek alapján egy C-terminális domén trunkált és a nukleotid helyen egyre több cserét tartalmazó nukleotid-kötő mutáns TG2 fehérjét készítettünk.

Az RNS-fehérje mágneses pull-down kísérlet kimutatta, hogy az utolsó C-terminális domén eltávolítása nem befolyásolta a trunkált TG2 (1-584) fehérje és az RNS kölcsönhatását, míg a nukleotid-kötőhely mutánsok esetében a pozitív töltésű aminosavak eltávolításával (a $^{173}\text{KF}^{174}$ aminosavak $^{173}\text{EA}^{174}$ -re vagy a $^{173}\text{KFIKN}^{177}$ aminosavak $^{173}\text{EASED}^{177}$ -re történő mutációjával) a TG2 és az RNS egymáshoz való kötődése lecsökkent. Ez arra utal, hogy ezek az oldalláncok

döntő szerepet játszhatnak az RNS-kötés kialakításában. A mutáns TG2 fehérjék megmaradt transzglutamináz aktivitásabizonyítja, hogy a mutációk nem a fehérje natív szerkezetének megváltoztatásával eredményezték az RNS-kötésben létrejövő csökkenést.

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a TG2 fehérje rendelkezik egy korábban ismeretlen tulajdonsággal, képes RNS molekulák kötésére konformáció-függő módon. A TG2 RNS kötési affinitása relatív magas, ami még erősebb lehet természetes ligandumokkal és sejtkörnyezetben. A TG2 fehérje RNS-kötő sajátosságainak pontosabb megismeréséhez és a biológiai jelentőségének feltárásához a TG2 fehérje szerkezetének alaposabb tanulmányozása, az RNS-kötőhelyek feltérképezése, a valóban kötődő sejtekben jelenlévő RNS molekulák azonosítása szükséges, amely kísérletek a laboratóriumunkban folyamatban vannak.

5. Összefoglalás

A transzglutamináz enzimesalád leginkább tanulmányozott tagja, a szöveti transzglutamináz (TG2), ami egy multifunkcionális fehérje. Többféle enzimaktivitással rendelkezik, illetve számos biológiai folyamatban (pl. jelátvitel, sejtek adhéziója, apoptózis) szerepelhet. A TG2 pontosabb fiziológiás szerepének megállapításához a humán, immortalizált HUVEC sejtvonalat alkalmaztuk, ami természetes körülmények között nagy mennyiségben expresszálja a vizsgálni kívánt fehérjét.

A TG2 interaktomot feltárni kétféle megközelítést alkalmaztunk. Az egyikben egy helyspecifikusan biotinilált rekombináns TG2-t használtunk Neutravidin agaróz gyöngyhöz immobilizálva, aminek segítségével a HUVEC sejtkivonatból kifoghattuk a TG2 interakciós partnereit. A másik módszerben olyan HUVEC sejtvonalat fejlesztettünk ki, amiben a TG2 fehérjét csendesítettük, majd egy transzgén TG2 fehérjét expresszáló vektor bevitelével helyreállítottuk (TG2-KD+3F-TG2). A Flag-tag segítségével anti-FLAG M2 agaróz gyöngyhöz kötöttük a TG2-t a vele asszociált fehérjékkel együtt. LC-MS/MS analízist követően a két módszerrel összesen 356 fehérjét sikerült azonosítani, melyeket informatikai adatbázis (STRING) segítségével elemeztünk. A detektált egyedi peptidek száma alapján a legjobban dúsuló GO Molekuláris funkciók között volt a Sejtadhézió és az RNS-kötés. A TG2 szerepe a sejtadhéziós folyamatokban már bizonyított, azonban RNS-függő folyamatokban való részvételét még nem vizsgálták.

A HUVEC sejtekben meghatározni az RNS-kötő fehérjéket OOPS technikát alkalmaztunk. LC-MS/MS analízist követően 413 RNS-kötő fehérjét sikerült azonosítani a detektált, egyedi peptidek száma alapján, melyek között a TG2 fehérje is szerepelt. Az interaktom vizsgálat során azonosított fehérjékkel összehasonlítva, 150 db fehérjetalálat (42 %) volt mindkét esetben detektálva, ami megerősítette a TG2 fehérje szerepét az RNS-fehérje komplexek működésében. A TG2 RNS-kötő képességének bizonyítására mágneses pull-down módszert alkalmaztunk. Az eredmények alapján a TG2 fehérje képes kötődni az RNS molekulához, a TG2 nyitott konformációban történő stabilizálásakor. Valószínűleg zárt konformációs állapotban az RNS-kötő felszínek rejtve vannak a TG2 szerkezetében. Bioréteg interferometriás kísérletben meghatároztuk a TG2-RNS kötés affinitását, ami 88 nM volt. Ez az érték sejtes környezetben valószínűleg még magasabb is lehet biológiailag releváns RNS molekulákkal.

A TG2 fehérje RNS-kötő sajátosságainak pontosabb megismeréséhez a TG2 fehérje szerkezetének alaposabb tanulmányozása, az RNS-kötőhelyek feltérképezése, biológiailag releváns RNS célpontok azonosítása szükséges.

6. Új tudományos eredmények

1. Új immortalizált HUVEC sejtvonalat alakítottunk ki lentivirális géntranszfer segítségével, melyben indukálható módon az endogén TG2 expressziót csendesítettük, és 3xFlag jelölt transzgén TG2 fehérjére cseréltük. Bizonyítottuk, hogy a sejtvonal az adhéziónak sajátságok kivételével megbízhatóan alkalmazható a TG2 celluláris funkcióinak vizsgálatára.
2. A fejlesztett HUVEC sejtvonalból 495 db eddig nem ismert TG2-asszociált fehérjét azonosítottunk kétféle módszertani megközelítés alkalmazásával. A TG2 interaktom STRING analízise alapján a TG2 a HUVEC sejtekben is szerepet játszhat a *Szerkezeti molekula aktivitás*, a *Kadherin kötés*, a *Sejtdhéziós molekula kötés*, és a *Vezikuláris transzport folyamatában*.
3. Feltártuk, hogy a TG2-asszociált fehérjék leginkább dúsuló GO *Molekuláris funkciója* az *RNS-kötés*, ami arra utal, hogy a TG2 befolyásolhatja az RNS-függő folyamatokat.
4. Kimutattuk, hogy inhibitorok alkalmazása, valószínűleg a TG2 konformációs állapotok limitálásán keresztül, csökkenti a potenciális interakciós partnerek számát. GTP γ S jelenlétében, ami a zárt TG2 formát stabilizálja, az interakciós partnerek száma nagyobb mértékű csökkenést mutatott, mint a nyitott formát stabilizáló NC9 mellett.
5. Az NC9 inhibitor esetén jelentősen megemelkedett a transzportfolyamatokban résztvevő fehérjék aránya a TG2-asszociált fehérjék között, ami arra utal, hogy a nyitott konformációjú fehérje közvetlenül hatással lehet ezen transzporterekre és befolyásolhatja a membrán transzportfolyamatokat.
6. Meghatároztuk az immortalizált HUVEC sejtekben az RNS-kötő fehérjéket OOPS módszerrel. Az eredmény alapján maga a TG2 is rendelkezik RNS-kötő sajátsággal.
7. A TG2 RNS-kötő tulajdonságát RNS-fehérje pull-down és bioréteg interferometriával is megerősítettük.
8. Az RNS-kötő képesség karakterizálásával felismertük, hogy a nyílt konformáció képes kötni az RNS molekulákat, és valószínűleg az RNS szekvenciája és szerkezete is befolyásolhatja a kötődést.
9. Modellezés és mutagenézis tanulmány segítségével bizonyítottuk, hogy a katalitikus domén GTP-kötő helye jelentősen befolyásolja a TG2 RNS-kötő képességét. Valószínűleg a két kötőhely között átfedés van.
10. A HUVEC RNS-kötő fehérjei és a TG2-asszociált fehérjék közötti nagy mértékű átfedés alapján a TG2 központi szereplő lehet az RNS-metabolizmus szabályozásában.



Nyilvántartási szám: DEENK/52/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csaholczi Bianka
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10083113

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csaholczi, B.**, Csobán-Szabó, Z., Jambrovics, K., Korponay-Szabó, I., Fésüs, L., Király, R.: The transglutaminase 2 interactome in HUVECs suggests its participation in an RNA-binding protein network.
FEBS Lett. [Epub ahead of print], 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/1873-3468.70266>
IF: 3 (2024)
2. **Csaholczi, B.**, Csuth, A. R., Korponay-Szabó, I., Fésüs, L., Király, R.: Transglutaminase 2 is an RNA-binding protein: experimental verification and characterisation of a novel transglutaminase feature.
FEBS J. 292 (4), 915-928, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/febs.17373>
IF: 4.2 (2024)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7,2

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,2**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2026.02.12.

