

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Csaholczi Biana

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

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	6
2. Bevezetés.....	8
3. Irodalmi áttekintés.....	9
3.1. Transzglutamináz enzimcsalád.....	9
3.1.1. A transzglutamináz aktivitás változatossága.....	12
3.1.2. A transzglutaminázok általános szerkezeti sajátosságai.....	13
3.2. Transzglutamináz 2 (TG2).....	13
3.2.1. A TG2 fehérje enzimatis és nem enzimatis reakciói.....	13
3.2.2. TG2 fehérje szerkezete.....	14
3.2.3. A TG2 interaktom.....	16
3.2.4. TG2 fiziológiás szerepe.....	17
3.2.4.1. ECM stabilitás és szövetregeneráció.....	17
3.2.4.2. Jelátvitel és sejttúlélés.....	18
3.2.4.3. Apoptózis és fagocitózis.....	19
3.2.5. TG2 patológias szerepe.....	20
3.2.5.1. Daganatos betegségek.....	20
3.2.5.2. Cöliákia.....	20
3.2.5.3. Fibrózis.....	21
3.2.5.4. Kardiovaszkuláris betegség.....	21
3.2.5.5. Neurológiai betegség.....	22
3.3. TG2 és HUVEC sejtek kapcsolata.....	22
3.4. RNS-kötő fehérjék és RNS-kötő domének.....	23
3.4.1. RNS-kötő fehérjék.....	23
3.4.2. RNS-kötő domének.....	24
3.4.2.1. RNS felismerő motívumok.....	24
3.4.2.2. Cink-ujj motívum.....	25
3.4.2.3. K-homológia domén.....	25
3.4.2.4. Kettős szálú RNS-kötő domén.....	26
3.4.2.5. Szerkezetileg rendezetlen régió (IDR).....	26
4. Célkitűzés.....	28
5. Anyagok és módszerek.....	29

5.1. Alkalmazott sejtvonalak.....	29
5.2. Sejtvonalak kialakítása.....	29
5.2.1. Az indukálható, endogén TG2 fehérjét csendesítő vektor és a TG2 knock-down HUVEC sejtvonal létrehozása.....	29
5.2.2. A transzgén 3F-TG2 fehérjét expresszáló vektor kialakítása.....	31
5.2.3. Az endogén TG2 csendesített, 3F-TG2 fehérjét kifejező sejtvonal kialakítása.....	32
5.2.4. A TG2 csendesítés, illetve transzgén termelés indukálása a TG2-KD+3F-TG2 HUVEC sejtvonalban.....	32
5.3. Fehérje extraktum készítése.....	33
5.4. Fehérjetermelés és tisztítás.....	33
5.4.1. Helyspecifikusan biotinilált humán rekombináns TG2 fehérje.....	33
5.4.2. Rekombináns TG2 fehérje.....	34
5.4.3. Expressziós vég-mentes TG2 fehérje.....	34
5.5. RNS izolálás és RT-qPCR (valós idejű-qPCR) mérés.....	35
5.6. Western blot és alkalmazott antitestek.....	35
5.7. Letapadási teszt.....	36
5.8. Áramlási citometriás mérés.....	36
5.9. TG2 interaktom meghatározása két különböző módszerrel.....	37
5.9.1. Helyspecifikusan biotinilált humán rekombináns TG2 fehérjével asszociált fehérjék izolálása High Capacity Neutravidin agaróz gyönggyel és azonosításuk tömegspektrometriával.....	37
5.9.2. Transzgén 3F-TG2 fehérjével a sejtekben asszociált fehérje komplexek izolálása anti-FLAG M2 agaróz gyöngy alkalmazásával és azonosításuk tömegspektrometriával.....	37
5.10. Ortogonális szerves fázis szeparáció.....	38
5.11. RNS-fehérje pull-down mérés.....	38
5.12. Transzglutamináz aktivitásmérések.....	39
5.12.1. TG2 transzamidáz aktivitásának mérése.....	39
5.12.2. TG2 izopeptidáz aktivitás fluoreszcens mérése.....	40
5.13. Az RNS-fehérje interakció detektálása bioréteg interferometriával (BLItz).....	40
5.14. LC-MS/MS analízis.....	40
5.15. Bioinformatikai analízis.....	41
6. Eredmények.....	42

6.1. TG2 interaktom vizsgálata.....	42
6.1.1. A TG2 interakciós partnereinek azonosítása HUVEC sejt kivonatban biotinizált, humán rekombináns TG2 fehérje segítségével.....	42
6.1.2. A Tet-indukálható, endogén TG2-csendesített és 3xFlag-jelölt transzgén TG2 fehérjét expresszáló HUVEC sejtvonal fejlesztése és karakterizálása.....	48
6.1.3. Sejtvonalak funkcionális jellemzése letapadási teszttel és apoptotikus sejtek arányának meghatározásával.....	50
6.1.4. A HUVEC sejtekben összeszerelődő 3F-TG2-asszociált fehérjekomplexek azonosítása.....	53
6.1.5. A 3F-TG2 fehérjéhez kapcsolódó fehérjék molekuláris funkciói és lokalizációja a sejtben.....	54
6.1.6. A konformációs változás hatása a 3F-TG2 fehérjéhez asszociált fehérjekomplexekben.....	58
6.2. A TG2 RNS-kötő képességének bizonyítása.....	67
6.2.1. A HUVEC sejtől származó RNS-ek és egy szintetikus 43-mer RNS kötődnek a TG2 fehérjéhez.....	73
6.2.2. A rekombináns TG2 RNS-kötő tulajdonságának jellemzése.....	73
6.2.3. Az RNS-TG2 interakció megerősítése bioréteg interferometriával.....	76
6.2.4. A 43-mer RNS hatása a transzglutamináz aktivitásra.....	77
6.2.5. A TG2 potenciális RNS-kötő helyének in silico predikciója és helyspecifikus mutagenézise.....	78
7. Megbeszélés.....	82
7.1. A TG2 interaktom feltárása HUVEC sejtekben.....	82
7.2. A TG2 fehérje rendelkezik RNS-kötő képességgel.....	85
8. Összefoglalás.....	89
9. Summary.....	90
10. Az értekezés új megállapításai.....	91
11. Irodalomjegyzék.....	92
12. Tárgyszavak.....	99
13. Keywords.....	99
14. Publikációs lista.....	100
15. Köszönetnyilvánítás.....	101

1. Rövidítések jegyzéke

aFlag: Flag taget felismerő antitest

ARE: AU-gazdag elem

BAP: biotin akceptor peptid

CVD: kardiovaszkuláris megbetegedés

dsRBM: duplaszálú RNS-kötő motívum

DTT: ditiotritol

ECM: extracelluláris mátrix

EGF/EGFR: epidermális növekedési faktor/receptor

EMT: epitheliális-mezenchimális tranzíció

FAK: fokális adhézíós kináz

FBS: borjú szérum

FDR: false discovery rate

FN: fibronectin

GPCR: G-fehérje kapcsolt receptor

HUVEC: humán köldökzsinór vénából izolált endotél sejt

IDR: szerkezetileg rendezetlen régió

LC-MS/MS: folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria

MMP: mátrix metalloproteináz

NFW: nukleáz mentes víz

NMR: mágneses rezonancia

OOPS: ortogonális szerves fázis szeparáció

PDGF/PDGFR: vérlemezke-eredetű növekedési faktor/receptor

PhoSTOP: phosphatase inhibitor cocktail tableta

PIC: protease inhibitor cocktail

PLC: foszfolipáz-C

RBP: RNS-kötő fehérje

rhTG2: rekombináns humán transzglutamináz 2

RPL: riboszómális fehérje

RRM: RNS felismerő motívum

TG: transzglutamináz

TG2: transzglutamináz 2

TG2-KD: endogén TG2 csendesítés shRNS alkalmazásával

TG2-KD+3F-TG2: endogén TG2 csendesítés, majd transzgén TG2 expresszió

UTR: nem transzlálódó régió

VEGFR:

ZnF: cinkujj

2. Bevezetés

A transzglutamináz enzimek fehérjék poszttranszlációs módosításait katalizálják, és ezáltal nagy jelentőségűek fiziológiás, valamint patológias folyamatokban.

Egyik legjobban tanulmányozott enzimesaládtag a transzglutamináz 2 (TG2), ami egy multifunkcionális fehérje. Különböző enzimatis és nem enzimatis aktivitásokkal rendelkezik. Enzimatis aktivitásai Ca^{2+} -függő transzglutamináz aktivitások, melyek a fehérjék keresztkötése, az aminos beépítése fehérjékbe, a dezamidáció és az izopeptidáz aktivitások. Nem enzimatis aktivitásai például a kináz, a GTPáz és az ATPáz aktivitások, melyek Ca^{2+} -függetlenek. A TG2 két fő, nyitott vagy zárt konformációját a Ca^{2+} illetve a nukleotidok egymáshoz viszonyított aránya határozza meg. A nukleotidok (GTP, ATP, GDP), melyek a fehérje zárt konformációját stabilizálják, a transzglutamináz aktivitás negatív szabályozói. A Ca^{2+} relaxálja a TG2 formát, és a kialakuló nyitott konformáció elősegíti a megfelelő szubsztát bekötődését az enzim katalitikus doménjébe.

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

A TG2 egy új funkcióját az RNS-kötő képességét is azonosítottuk vizsgálataink során. RNS-kötő fehérjeként részt vehet a génexpresszió szabályozásában, hiszen bizonyított, hogy a TG2 fehérje kiütése számos gén kifejeződésében okozhat változást. A TG2 RNS-hez való kötődése révén szerepet játszhat ezekben a folyamatokban, illetve állványozó fehérjeként kötődhet RNS-kötő fehérjékhez is, így befolyásolva az RNS molekula stabilitását, érési folyamatát, lokalizációját, valamint az mRNS transzlációját.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Transzglutamináz enzimcsalád

A transzglutaminázok (TG-k) egy olyan enzimcsalád, melyek Ca^{2+} -függő módon katalizálják a kovalens izopeptidkötések kialakulását a fehérjék glutamin és lizin oldalláncai között. Ez a poszttranszlációs, transzamidációs reakció ϵ -(γ -glutamil)lizin-kötéseket képezve keresztkötéseket hoz létre a fehérjékben, és eközben ammóniát szabadít fel (**Eckert és mtsai, 2014**). Az így kialakuló, keresztkötött fehérjepolimerek rendkívül stabilak és ellenállnak a proteolízisnek, ami miatt a transzglutaminázokat „a természet biológiai ragasztóinak” is nevezik (**Griffin M. és mtsai, 2002**). Elsődleges aminok jelenlétében a TG-k beépíthetik ezeket az aminokat is fehérjék glutamin oldalláncaiba, illetve megfelelő amin szubsztrátok hiányában katalizálhatják a glutamin dezamidációját glutamáttá (**Eckert és mtsai, 2014**). A transzglutamináz aktivitáshoz kalciumra van szükség aktiváló kofaktorként, de egyes mikrobiális transzglutaminázok Ca^{2+} -függetlenek (**Kashiwagi T., 2002**). Ma már kilenc TG családtagot azonosítottak az emberben (**Grenard P. és mtsai, 2001**). Nyolc enzimcsaládtag (13-as véralvadási faktor, FXIII-A és TG1–TG7) rendelkezik katalitikus aktivitással, melyek a transzláció utáni fehérjemódosításokat katalizálhatják. Az egyetlen humán enzimcsaládtag, amely nem rendelkezik enzimatis aktivitással a 4.2-es sáv fehérje, ami a humán eritrocita membránban található (Humán eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje). Az enzim aktivitását a katalitikus triádban a cisztein megváltozása inaktíválta (**Eckert és mtsai, 2014**). A TG enzimcsalád tagjait, azok tulajdonságait, a szervezetben való előfordulási helyüket az 1. táblázat foglalja össze (**Grenard P. és mtsai 2001; Lorand L, Iismaa SE. 2019**). A TG-k összességében sokféle szerepet játszanak a fiziológiás folyamatokban a fehérjék keresztkötésével, ezáltal módosítva azok szerkezeti és funkcionális tulajdonságait, és így befolyásolva és szabályozva a sejtek letapadását, túlélését és a sejtmembrán integritásának fennmaradását (**Eckert és mtsai, 2014**).

Az egyes transzglutaminázok mint például a 13-as véralvadási faktor (FXIII-A) keresztkötéseket képez a fibrinmolekulák között, így stabilizálva a trombus kialakulását (**Griffin M és mtsai, 2002**). A laphámban a TG1, TG3 és TG5 keresztköti a szerkezeti fehérjéket (például keratinok), így hozzájárulva a bőr szarurétegének kialakulásához, és a hámréteg barrier funkciójának fennmaradásához (**Lorand L, 2019**). A szöveti transzglutamináz (TG2), mely fehérjét mi is részletesebben tanulmányoztunk, szinte minden szövetben előfordul a szervezetben. Nemcsak az extracelluláris mátrix fehérjéit (pl. fibronectin, integrin) köti össze, hanem jelátviteli funkciókat is betölt a sejtekben. A TG2 kapcsolódhat a sejtfelszínhez és az

extracelluláris mátrixhoz, befolyásolva a sejtek adhézióját, a sebgyógyulás folyamatát és az extracelluláris mátrix (ECM) stabilizálódását, valamint intracelluláris folyamatokra (például apoptózis és a jelátvitel) is hatással lehet **(Eckert és mtsai, 2014)**. A TG4 a prosztatában, a TG6 az agyban (kisagyban) expresszáldik, és összefüggésbe hozták idegrendszeri funkciókkal, míg a TG7 fehérje kevésbé tanulmányozott. Összességében elmondható, hogy a TG-család hozzájárul a legfontosabb fiziológiai folyamatokhoz, ami jól mutatja multifunkcionális tulajdonságaikat **(Eckert és mtsai, 2014)**.

1. táblázat: A transzglutamináz enzimes család jellemzése (Eckert R.L. és mtsai, 2014 alapján).

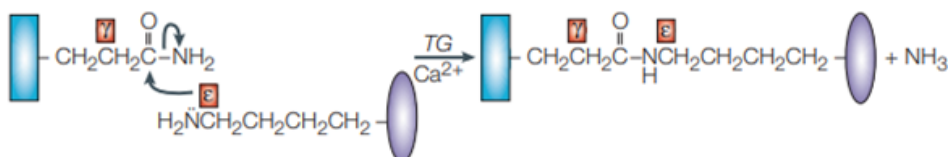
TG	Gén	Méret (kDa)	Szöveti kifejeződés	Sejt kompartment	Funkció	Kapcsolódó betegségek
FXIII-A	<i>F13A1</i>	83	Vérlemezkék, asztrociták, makrofágok, dendriociták, placenta, vérplazma, synoviális folyadék, preadipociták, liquor, könny	Citoszol, extracelluláris, sejtmag	Véralvadás, csontnövekedés, sebgyógyulás, angiogenezis, graviditás fenntartása	FXIII hiány, dermatofibróma
TG1	<i>TGM1</i>	90	Keratinociták, agy	Membrán, citoszol	Sejtburok képződés	Lamelláris ichthyosis
TG2	<i>TGM2</i>	80	Szinte minden szövetben	Citoszol, sejtmag, membrán, sejtfelszín, extracelluláris	Összetett	Coeliákia, neurodegeneratív betegségek, szürke hályog, érelmeszesedés, fibrózis, diabétesz
TG3	<i>TGM3</i>	77	Laphám, agy	Citoszol	Sejtburok képződés	Dermatitis, herpetiformis
TG4	<i>TGM4</i>	77	Prosztata, nyál, vizelet	Citoszol, membrán, extracelluláris	Ismeretlen	1-es típusú autoimmun poliendokrin szindróma
TG5	<i>TGM5</i>	81	Mindenhol, kivéve a központi idegrendszert és a nyirokrendszert	Ismeretlen	Keratinocitákban sejtburok képződés	Akrális hámló bőr szindróma
TG6	<i>TGM6</i>	78	Agy, herék, tüdő	Ismeretlen	Ismeretlen	Spinocerebelláris ataxia 35-ös típusú
TG7	<i>TGM7</i>	81	Szinte mindenhol	Ismeretlen	Ismeretlen	Ismeretlen
Eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje	<i>EPB42</i>	72	Vörösvértestek, csontvelő, magzati máj és lép	Membrán	Membrán komponens	Örökletes spherocytosis

3.1.1. A transzglutamináz aktivitás változatossága

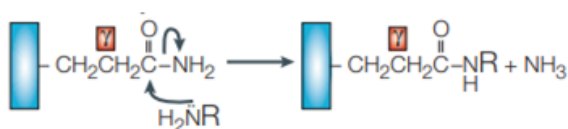
Minden aktív transzglutamináz közös, konzervált katalitikus doménnel rendelkezik, mely aktív helyén egy Cys-His-Asp katalitikus triádot tartalmaz, ami a fehérjék aktivitásáért felelős (Eckert és mtsai., 2014).

Transzamidálás

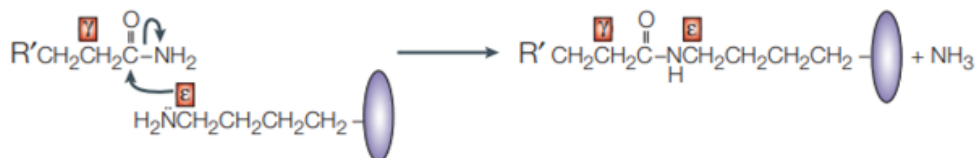
-Keresztkötés kialakítása



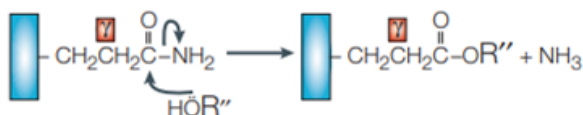
-Amin beépítése



-Acilezés

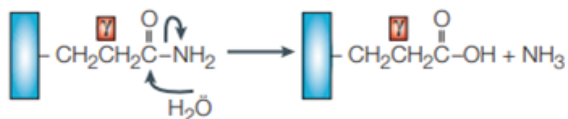


Észterifikáció

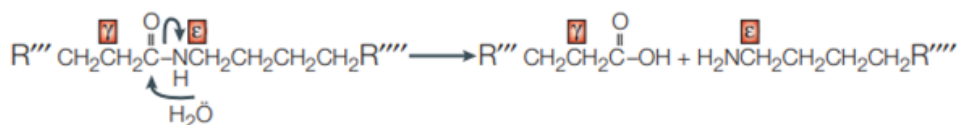


Hidrolízis

-Dezamidáció



-Izopeptid kötés hasítása



1. ábra: A különböző típusú transzglutamináz reakciók (Lorand és Graham, 2003).

Ez a katalitikus domén a papain-szerű proteáz enzimesaládhoz hasonló, és a transzamidáz reakciókat (amin beépítés, lizin oldalláncokon való keresztkötés és acilezés) a katalitikus doménben található cistein tiol csoportja segítségével hajtja végre, amely hasítja a glutamin szubsztrát γ -karboxamidját, tioészter köztiterméket képezve. Ezt követően a tioészter egy második szubsztrát lizin ε -aminocsoportja által bomlik, ε -(γ -glutamil)lizin izopeptid keresztkötést képezve, ami ellenáll a proteolízisnek. Ugyanebben a reakcióban víz jelenlétében és amin-donorok hiányában hidrolízis megy végbe és a glutamin dezamidációja történik glutamáttá **(Lorand és Graham, 2003; Klöck C és mtsai., 2012).**

Amin (H_2NR) beépítése esetében az amin szubsztrát az akceptor fehérje γ -glutamil csoportjával létesít kapcsolatot. Acilezési reakcióban a donor fehérje deprotonált lizin oldallánca vesz részt, amihez egy amino és karboxil csoportot is hordozó szénlánc kapcsolásával alakul ki a keresztkötés. Észterifikáció történik, ha az akceptor fehérje γ -glutamil csoportja mellett jelen lévő másik szubsztrát egy szénhidrát molekula, ami hidroxil csoportot tartalmaz. A kötés a hidroxil csoport és a fehérje γ -glutamil csoportja között alakul ki észterképződés mellett. Izopeptidáz aktivitás a szubsztrát molekulák között korábban kialakított izopeptid kötés hasítását szolgálja hidrolízis segítségével **(Lorand és Graham, 2003; Klöck C és mtsai., 2012).**

3.1.2. A transzglutaminázok általános szerkezeti sajátosságai

Az emlős transzglutamináz fehérjék jellemzően többdoménes szerkezetűek, tartalmaznak egy N-terminális β -szendvics domént, egy központi, katalitikus domént és két C-terminális β -hordó domént **(Griffin M és mtsai, 2002; Eckert és mtsai 2014)**. A legtöbb TG enzim „zárt” konformációt vesz fel, amely az enzimet inaktív állapotban tartja, és Ca^{2+} kötődés vagy inhibitor felszabadulás esetén „nyitott”, aktív konformációra vált, ahogyan azt részletesebben a TG2 példáján láthatjuk a továbbiakban **(Pinkas DM és mtsai, 2007)**. A kalciumkötés minden emlős TG esetében kulcsfontosságú aktivációs mechanizmus, mivel a Ca^{2+} indukálja a katalízishez szükséges konformációs változásokat **(Király és mtsai, 2009)**.

3.2. Transzglutamináz 2 (TG2)

3.2.1. A TG2 fehérje enzimatis és nem enzimatis reakciói

A transzglutamináz aktivitást elsőként máj extraktumban mutatták ki Waelsch és munkatársai, akik azonosították, hogy a primer aminok beépítése fém iont igényel. Ez a fehérje volt a szöveti transzglutamináz, más néven transzglutamináz 2 **(Mycek M. J. és mtsai, 1959)**. Ezt követően

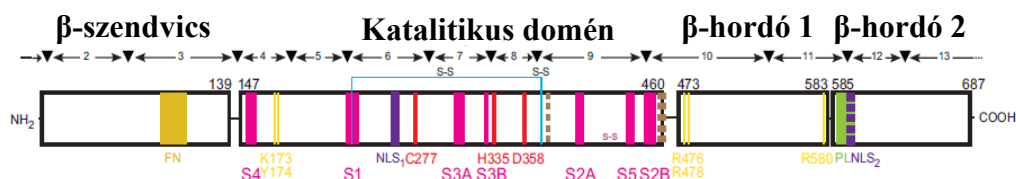
részletesen tanulmányozták, és leírták, hogy a Ca^{2+} ion az a fémion, ami a leghatékonyabban tudja aktiválni a transzamidáz aktivitását a TG2 enzimnek **(Folk, J. E. & Chung S., 1973)**.

A TG2 fehérje a már ismertetett transzglutamináz reakciókon (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, úgynevezett nem enzimatis funkciója is van. Enzimatis reakciói révén elősegíti például az extracelluláris matrix (ECM) fehérjék stabilizálását keresztkötések révén **(Belkin, A.M. és mtsai, 2011)**. 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 játszhat az NF- κ B, az EGF/EGFR, a FAK jelátviteli utakban is. Koreceptorként funkcionálhat az integrin molekula egyes alegységeinek kötésével, segítve a sejtadhéziót, és migrációt. Köti és aktiválja a foszfolipáz-C (PLC) molekulát, így emelve a Ca^{2+} , mint másodlagos hírvívő szintjét **(Nakaoka, H. és mtsai, 1994)**. A TG2 fehérjeinterakciókon keresztül számos biológiai folyamatot befolyásolhat, mely folyamatok alaposabb megismerésére irányult a TG2 interaktom tanulmányozása a munkám során.

3.2.2. A TG2 fehérje szerkezete

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 enzimatis aktivitásaiért, és Ca^{2+} -kötőhelyért és a két C-terminális β -hordó doménje közül a második tartalmazza a foszfolipáz C-kötő szekvenciát **(Murthy, S.N. és mtsai, 2002; Hwang, K. C. és mtsai, 1995)**. A katalitikus domén és az első C-terminális β -hordó domén közötti hasadéokban helyezkedik el az egyedi guanin nukleotid-kötőhely **(Liu, S. és mtsai, 2002)**.

A TG2-nek több szerkezetileg rendezetlen doménje (IDR) is van, amelyeket egy korábbi publikációban azonosítottak **(Thangaraju K. és mtsai 2017)**.

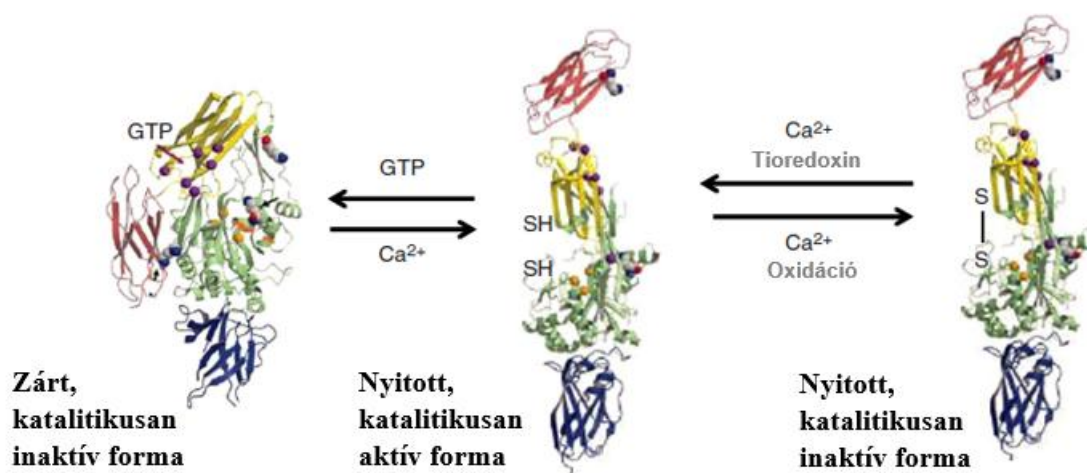


2. ábra: A transzglutamináz 2 doménszerkezete (Király és mtsai, 2011). N-terminális β -szendvics doménben elhelyezkedő fibronectin (FN) kötőhely narancssárga színnel, katalitikus doménben megtalálható katalitikus triád piros színnel, és Ca^{2+} -kötőhely rózsaszínnel, míg az N-terminális β -hordó doménekben található magi lokalizációs szignál lilával, PLC-kötőhely zölddel és nukleotid-kötőhely citromsárga színnel jelölve. A TG2 gén kódoló szekvenciáján belüli exonhatárokat (összesen 13 exon) a szalag ábra feletti nyílhegyek jelölik.

A Ca^{2+} és a fehérjék közötti interakció kialakulása elektrosztatikus kölcsönhatás alapján valósul meg, amihez szükséges a fehérjék negatív vagy részlegesen negatív felszíne. Ezeket a negatív felszíneket főleg az Asp és a Glu oldalláncok biztosítják a fehérjékben. A TG2 enzim hat Ca^{2+} -kötő helyet tartalmaz, melyek nem kanonikusak. Ezek közül öt a katalitikus domén felszínén helyezkedik el (S1, S2, S3, S4, S5). Az S1 lokalizációja Asn229-Gln234, ami erős Ca^{2+} -kötőhelynek tekinthető, magas Ca^{2+} -kötő aktivitással. Az S1 hely mutációja nem eredményezi a transzamináz aktivitás teljes megszűnését. Az S2 és S3 helyek két ellentétes hurkon lokalizálódnak. Az S2 alacsony, míg az S3 kötőhely kritikus jelentőségű a Ca^{2+} -aktiválta nyitott forma kialakulása és transzamidáz aktivitás kifejeződése szempontjából. Az S4 és S5 helyek szerepet játszanak a transzamidáz és GTPáz aktivitás reciprok szabályozásában. Mutációjuk a transzamidáz aktivitás csökkenése mellett a GTPáz aktivitás két vagy háromszoros emelkedését eredményezi a vad típusú enzimhez viszonyítva (Király és mtsai, 2011).

A TG2 fehérje két fő konformációs állapota ismert, melyek a Ca^{2+} és a nukleotidok egymáshoz viszonyított arányától függően alakulnak ki. A sejtben jelenlévő nukleotid, 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 doménben található aktív hely. A Ca^{2+} ion elektrosztatikus kölcsönhatás révén fejt ki hatását. Kötődik a katalitikus doménben található negatív felszínekhez, 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 (Achyuthan, K. E. és mtsai, 1987). Egy lehetséges harmadik konformáció úgy jöhet létre, hogy a Ca^{2+} -kötött nyitott, transzglutamináz aktív formában oxidáció hatására diszulfid-kötés alakul ki, így enzimatikusan inaktívulva az egyébként nyitott formát. Az oxidáció hatására bekövetkező aktivitáscsökkenés tioredoxin adagolásával gátolható meg (Fésüs és mtsai, 2002; Király és mtsai, 2011).



3. ábra: A transzglutamináz 2 három fő konformációja (Pinkas és mtsai, 2007; Eckert és mtsai, 2014).

3.2.3. A TG2 interaktom

1957-ben Sarkar és munkatársai kezdték vizsgálni a TG2 fehérjét, melynek vizsgálata azóta is tart, hiszen pontos fiziológiás jelentősége még nem teljesen tisztázott (Sarkar és mtsai., 1957).

Többdoménos 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 partnerfehérjékhez való kötődése révén. Ez a funkcionális sokoldalúság magyarázza, miért olyan fontos fehérje a TG2 az emberi szervezetben, és miért járulhat hozzá számos betegség kialakulásához (Kanchan és mtsai, 2015).

A TG2 szubsztrátjai hatással vannak a TG2 aktivitására, ami lehetővé teszi, hogy a TG2 különböző biológiai funkciókat töltsön be a sejtekben. A nem enzimatis interakciók jelentősége a TG2 aktivitás szabályozásában még nem teljesen tisztázott, de szerepet játszanak fiziológiai szabályozásokban és a diverz TG2 funkciók kialakításában környezet-specifikus módon **(Zemskov EA. és mtsai, 2007)**.

Amint már részben említettem a TG2 interakcióba kerülhet az integrin (ITGB1), a szindekán-4 molekulákkal, illetve növekedési faktor receptorokkal (PDGFR, VEGFR) a sejtadhézió, a migráció, valamint a stabilizáció szabályozásához. Mátrix metalloproteinázokkal (MMP) való kölcsönhatás révén hozzájárul az extracelluláris mátrix (ECM) degradációjához. Kis G-fehérjeként köti és hidrolizálja a GTP/ATP molekulákat, így jelátviteli útvonalakban is részt vehet **(Nakaoka H. és mtsai., 1994)**. Ezen különféle fehérjeinterakciókon keresztül a továbbiakban részletesebben bemutatom a TG2 fehérje lehetséges biológiai szerepeit.

3.2.4. A TG2 fiziológiás szerepe

3.2.4.1. ECM stabilizáció és szövetregeneráció

A TG2 fehérje kovalensen módosítja az ECM fehérjéket (fibronektin, kollagén) homo- és heteropolimereket formálva, növelve az ECM stabilitását. Ennek következtében fokozódnak a fibroblastok és az osteoblastok adhézis folyamatai, valamint a sejtek túlélési, növekedési, migrációs és differenciálódási mechanizmusai az integrinhez kapcsolódó mechanoreceptív útvonalakra gyakorolt hatása révén **(Lorand L és Graham RM, 2003; Eckert és mtsai, 2014)**. A TG2 interakcióba lép az extracelluláris mátrixszal a $\beta 1$, $\beta 3$ és $\beta 5$ integrineken keresztül, így aktiválja az integrin-mediált jelátviteli útvonalakat, tehát az integrinek ko-receptoraként működik a sejtfelszínen **(Zemskov EA és mtsai, 2009)**. Az ECM-ben található fibronektin és integrin kötődés gyenge interakció, míg a TG2 erősen kötődik mind a fibronektinhez, mind az integrinekhez, így emeli a két molekula közötti interakció kialakulását, elősegítve az integrineken keresztül induló jelátviteli folyamatok elindulását **(Belkin AM és mtsai, 2005)**. Ezek az útvonalak elősegítik a sejtek növekedését, túlélését azáltal, hogy stabilizálják az ECM-ot, ami elengedhetetlen a szövetregeneráció folyamatában.

A TG2 expressziója emelkedik a sebgyógyulás mechanizmusa során azáltal, hogy a TGF- β citokin indukálja a kifejeződését a fibroblasztokban. Ez a fibronektin és a kollagén lerakódásához vezet, amiket a TG2 keresztkötésekkel meg is erősít. Az enzim a látens TGF- β -kötő fehérjéket keresztkötésekkel köti az ECM-hoz, ami segít a TGF- β -t az ECM-ban rögzíteni

és aktiválni a sérülés helyén **(Verderio és mtsai, 1999)**. A TG2 ezen folyamatok segítségével hozzájárul a szövetregenerációhoz és mechanikai szilárdságot biztosít a sebgyógyulás folyamatában. Ezt bizonyítja, hogy a TG2-KO egerek sebgyógyulásának lefolyása nem megfelelő, hiszen a TG2-KO fibroblasztok in vitro körülmények között megváltozott adhéziót, késleltetett sebzáródást mutatnak **(Sarang és mtsai, 2009)**.

3.2.4.2. Jelátvitel és sejttúlélés

A TG2 nem enzimatis funkciója révén szerepet játszik a jelátviteli folyamatokban mind sejten belül, mind a sejtek felszínén. A TG2 képes kötni a guanin nukleotidokat és GTPáz aktivitásával jelátvivő fehérjeként funkcionálni. GTP-hez kötött formájában a TG2 hasonlóan működik, mint egy G-fehérje, G_{α} fehérjének is nevezik. A TG2 GTPáz aktivitásával hidrolizálja a megkötött GTP-t a heteromer G-fehérje α -alegységéhez hasonlóan, majd lehetővé válik, hogy kapcsolódjon membránban elhelyezkedő hét transzmembrán receptorok (például az $\alpha 1$ -adrenerg és az oxitocin receptorok) citoplazmatikus végéhez, aktiválva a foszfolipáz-C- γ molekulát. Ennek eredményeképp növekszik az intracelluláris másodlagos hírvivők (inozitol-trifoszfát és diacilglicerol) szintje, ami emelkedett citoplazmatikus Ca^{2+} szintet eredményez, és aktiválja a protein kináz-C molekulát **(Kang S. K. és mtsai., 2002; Eckert és mtsai, 2014)**.

A sejtfelszínen a TG2 több jelátviteli komplexben koreceptorként és vázfehérjeként működik. A TG2 egyik oldalán integrinekhez (például $\beta 1$ és $\beta 3$ integrinekhez), másik oldalán extracelluláris fibronectinhez kötődik, hatékonyan összekötve a sejteket az ECM-al. Ezáltal a TG2 integrin-klasztereket hoz létre és felerősíti az integrinek által közvetített jelátviteli kaszkádokat. Ennek pozitív hatása van a sejtek túlélésére és migrációjára, hiszen a TG2 által előidézett integrin-klaszterek aktiválhatják a fokális adhéziós kináz (FAK) és a PI3K/Akt jelátviteli útvonalakat, így a sejtek túlélési jeleket kaphatnak, védelmet nyújtva az apoptózis ellen. A TG2 kötődhet a fibroblasztokon található vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptorral (PDGFR) is. A TG2 kapcsolódik a PDGFR-hez és az integrinekhez, és egy háromkomponensű komplexet alkot, amely fokozza a PDGF jelátvitelt **(Zemskov és mtsai, 2009 és 2012)**. Ezen interakció révén a TG2 elősegíti a PDGFR klaszterképződést és autofoszforylációját, valamint a PDGF ligandum bekötődését, és fokozza a PDGF által kiváltott mitogén és motilitási jeleket **(Heldin C. H. és mtsai., 1999; Eckert és mtsai, 2014)**. A TG2-t nem tartalmazó fibroblasztok PDGF-függő migrációja és proliferációja csökkent aktivitást mutat, ami arra utal, hogy a TG2 szükséges az integrin és a növekedési faktorok kölcsönhatásával elinduló jelátvitel útvonalak lezajlásához.

A TG2 kapcsolódhat az NF- κ B fehérjével jelátviteli utat indítva. Normál sejt környezet esetén az NF- κ B molekula inaktív formában van jelen a hozzá asszociálódó I κ B α molekula által. Amennyiben stresszhatásnak tesszük ki a sejtet, ubiquitinálódik a I κ B α molekula, és az NF- κ B felszabadul a gátlás alól. A TG2 keresztköti a I κ B α molekulát, segítve a proteasóma általi lebontását és az NF- κ B aktivációt. A felszabaduló NF- κ B számos target gén expresszióját indítja el a sejtmagba bejutva, köztük a HIF-1 α termelését, elősegítve a sejtek túlélését, osztódását (Eckert és mtsai, 2014).

3.2.4.3. Apoptózis és fagocitózis

A TG2 kettős szerepet játszik a programozott sejthalál (apoptózis) folyamatában és az apoptotikus sejtek utólagos eltávolításában, amelyek elengedhetetlenek a szöveti homeosztázis fenntartásához és az autoimmunitás megelőzéséhez. Az apoptózis során a TG2 aktivitása gyakran felülszabályozódik vagy aktiválódik az elhaló sejtben, ahol hozzájárul a sejthalál rendezett lezajlásához. Ahogy az apoptotikus sejtekben emelkedik az intracelluláris Ca²⁺ szint, a TG2 nyitott, aktív konformációba vált át, és megkezd a citoszolikus és nukleáris fehérjék keresztkötését. Ez a haldokló sejt normál körülmények közötti eltávolítását eredményezi, mivel a TG2 oldhatatlan keresztkötésű fehérje polimereket képez, amelyek biztosítják a szubcelluláris struktúrákat és megakadályozzák a gyulladást kiváltó intracelluláris tartalom kijutását (Fésüs & Szondy, 2005). Lényegében a TG2 segít a stabilizált apoptotikus részecskék kialakításában, amelyeket a fagociták biztonságosan felismernek és bekebeleznek. Az apoptotikus sejtekben a TG2 aktivitása keresztköteket képez és inaktiválja a kaszpázokat és más fehérjéket, ezáltal megakadályozva a másodlagos nekrozist és a károsodással kapcsolatos molekuláris mintázatok felszabadulását. A TG2 felgyorsíthatja a foszfatidilszerin sejt felszínre kerülését az apoptotikus sejtmembránon, ami elsődleges „egyél meg” jelnek számít a bekebelezéshez, így a TG2 elősegíti ennek a jelnek a megfelelő időben történő megjelenését (Sarang és mtsai, 2007). Ezenkívül a TG2 kiváltja egy „találj meg” jel generálását is azáltal, hogy keresztkötésekkel stabilizálja az elhaló sejtekből kikerülő komponenseket, ami a területre vonzza a makrofágokat (Nishiura H és mtsai, 1998). Ezek a folyamatok az apoptotikus sejtben belül elősegítik az apoptózis lezajlását és minimalizálja az elhaló sejtek gyulladáskeltő sajátságait.

3.2.5. A TG2 patológiás szerepe

3.2.5.1. Daganatos betegségek

A transzglutamináz 2 emelkedett szintjét mutatták ki számos tumoros megbetegedés esetében, de a pontos mechanizmus, hogyan is játszik szerepet a tumor kialakulásában a mai napig nem teljesen tisztázott. A TG2 elősegíti a tumor túlélését, fejlődését és terjedését, amihez elsőként az extracellulárisan elhelyezkedett TG2 járul hozzá. Normál körülmények között a TG2 keresztkötő fehérjeként funkcionál a szervezetben, stabilizálja az extracelluláris mátrix (ECM) szerkezetét, ami azonban támogathatja a tumoros sejtek kötődését és migrációját ezen a stabilizált ECM hálózaton keresztül (**Collighan & Griffin, 2009**). Az extracelluláris TG2 egy S100A4 nevű fehérjével is képes kapcsolatot kialakítani, ami szabályozza a sejtek migrációját, és overexpressziója hozzájárulhat a metasztázis fejlődéséhez, valamint ez a kölcsönhatás növelheti a TG2-mediálta sejtadhéziót A431 epiteliális tumorsejtekben (**Biri és mtsai, 2016**). A TG2 fehérje integrin koreceptorként a már említett útvonalak segítségével hozzájárul a sejtnövekedéshez (**Multhaupt és mtsai, 2016**), illetve részlegesen aktiválja mind az apoptózist (**Hemmings, 1997**), mind az autofágiás sejthalál folyamatokat (**Sridharan S., 2011**) gátló útvonalakat, elősegítve a tumorképződés folyamatát. Továbbá vese tumorokban elősegítheti a p53 molekula keresztkötését, így degradációját az autofagoszómás rendszer által (**Kang és mtsai, 2016**), ami szintén tumoros sejtburjánzáshoz vezethet.

Az epiteliális-mezenhimális tranzíció (EMT) olyan szabályozott folyamat, melyben az adherens epitel sejtek elveszítik epitel sejt karakterisztikájukat és mezenhimális tulajdonságokat, úgymint fibroid morfológiát, génexpressziós változásokat, és emelkedett invazivitást, valamint rezisztenciát nyernek a kemoterápiás kezeléssel szemben (**Kalluri&Weinberg, 2009**). Főként a TG2 GTP-kötött, zárt, de jelátviteli szempontból aktív konformációja segíti elő a tumoros sejtek túlélését és az EMT átalakulás létrejöttét különféle tumorokban (**Eckert R. L. és mtsai., 2019**).

3.2.5.2. Cöliákia

A cöliákia esetében a TG2 az exogén gabonapeptidek (pl. gliadin peptid) által kiváltott feltételes autoimmun mechanizmus specifikus célpontja. Genetikailag hajlamos egyéneknél a búza, a rozs és az árpa fogyasztása a vékonybél sejteinek károsodásához, felszívódási zavarokhoz és TG2 elleni antitestek termelődéséhez vezet. Ezekből a gabonafélékből származó gliadin peptidek gazdagok glutamin- és prolin oldalláncokban, és jó szubsztrátjai a TG2 fehérjének az

által katalizált transzamidáló enzimreakciókban (**Qiao és mtsai, 2009**). A TG2 fehérje általi módosítás következtében a gliadin peptidek immunogénebbé válnak a HLA peptidkötő zsebe számára (**Sollid és mtsai, 2011**). Csak a HLA-DQ2.5, 2.2 és DQ-8 változatok képesek a T-sejtek felé bemutatni a gliadin peptideket, és így kialakítani a glutén-ellenes T-sejt választ (**Jabri és mtsai, 2014**).

A gliadin-specifikus T-sejtek felelősek a gliadin-peptidek és a TG2 antitesteket termelő specifikus B-sejtcsoportok aktiválásáért (**Sollid és mtsai, 1997**).

3.2.5.3. Fibrózis

A TG2 fehérje hozzájárul a vesebetegségek és a tüdőfibrózis kialakulásához a TGF- β aktiválásán keresztül. A TGF- β látens formában szekretálódik, ami három komponensből áll, az érett TGF- β fehérjéből, egy hozzá kovalens kötéssel kapcsolódó hasított propeptidből és a hozzá diszulfidkötéssel kapcsolódó látens TGF- β kötő fehérjéből (LTBP), ami segíti a TGF- β fehérje foldingját, szekretálását és lokalizációját (**Miyazono K. és mtsai, 1992; Troilo H és mtsai, 2016**). Bebizonyosodott, hogy a kapcsolódó LTBP fehérjék N-terminális része a TG2 szubsztrátja, amely elősegíti azok kovalens beépítését az extracelluláris mátrixba (**Verderio E és mtsai, 1999**). Továbbá leírták, hogy a TG2 hozzájárul a makrofágokból származó TGF- β aktivációjához és elősegíti a TGF- β 1 transzkripcióját is (**Nunes I és mtsai, 1997; Yen JH és mtsai, 2015**). Nemcsak a TG2 szükséges a TGF- β megfelelő aktivációjához, hanem maga a TGF- β is elősegíti a TG2 transzkripcióját, mivel a TG2 mind a promóter, mind az enhancer régiókban tartalmaz TGF- β válaszadó elemeket (**Ritter SJ és mtsai, 1998; Sándor K és mtsai 2016**). Tehát ennek értelmében a TGF- β hozzájárul a TG2 expressziójához, továbbá a TG2 elősegíti a TGF- β transzkripcióját, szekrécióját és aktivációját, így még inkább felülszabályozódik a TGF- β fehérje pozitív visszacsatolással, ami súlyosbítja a fibrózis folyamatát, valamint daganatos megbetegedésben hozzájárul az EMT-hez .

3.2.5.4. Kardiovaszkuláris betegségek

A kardiovaszkuláris megbetegedések (CVD) vezető halálokok között szerepelnek világszerte. Ezen megbetegedések közé tartozik a koronáriás szívmebetegedés, a mélyvénás trombózis, az érlemezsedés, valamint az egyéb perifériás és cerebrovaszkuláris artériás megbetegedések.

Az érlemezsedés hozzájárul a miokardiális infarktusz és az ischémiás stroke kialakulásához. Ennek karakterizálásában az endotél sejtek gyulladásos folyamatai, a vaszkuláris

simaizomsejtek proliferációja, a túlzott koleszterol felhalmozódása, átalakult makrofágok jelenléte, valamint az artéria falában formálódó ateroszklerotikus plakkok felismerése nyújthatnak segítséget **(Munro&Cotran, 1988)**. Normál körülmények között a TG2 expresszáldhat makrofágokban, simaizomsejtekben és endotél sejtekben, így ez akkumulálódhat a plakkokban és több ateroszklerotikus folyamattal léphet interakcióba **(Haroon és mtsai, 2001)**.

3.2.5.5. Neurodegeneratív betegségek

Számos neurodegeneratív betegséghez kapcsolódik a TG2 által kialakított patológiás aggregátumok megjelenése az agyban. Emelkedett transzglutamináz aktivitást figyeltek meg Alzheimer, Parkinson és Huntington betegségekben. A kórképekben előforduló amiloid- β , Tau, α -szinuklein és huntingtin fehérjék a TG2 szubsztrátjai **(Yamada és mtsai, 1998)**. Ezáltal a TG2 képes ezen fehérjéket keresztkötni, így irreverzibilis, patológiás fehérjeaggregátumokat képezni. Az aggregátumok károsítják a szinaptikus funkciókat, és az idegek túlélését **(Eckert és mtsai, 2014; Szondy és mtsai, 2017)**.

Ezen betegségekben a TG2 szerepe még nem teljesen tisztázott, de az bizonyított, hogy a TG2 aktivitásának a gátlásával csökken a keresztkötött patológiás fehérjeaggregátumok mennyisége, így a TG2 gátlása terápiás célpont lehet ezen betegségek kezelésében **(Wilhelmus és mtsai, 2008)**.

3.3. TG2 és HUVEC sejtek kapcsolata

Az endotéliumot anatómiailag egyetlen mezenhimális sejtréteg alkotja. Az endotél sejtek egymáshoz való intracelluláris kapcsolódása heterogenitást mutat elektronmikroszkópos megfigyelések alapján. Elkülöníthetünk folyamatos, fenesztrált és nem folyamatos endotéliumot **(Benett HS és mtsai., 1959)**. Folyamatos endotélium található az agy, a bőr, a szív, a tüdő és az izmok legtöbb artériájában, vénájában és kapillárisában, ahol az endotéliális sejtek szorosan kapcsolódnak egymáshoz, és egy folyamatos bazális membránhoz rögzülve helyezkednek el. A fenesztrált endotélium szintén folyamatos bazális membránhoz kapcsolódik, azonban 50-60 nm nagyságú transzcelluláris pórusokat figyelhetünk meg az endotél sejtek között. Olyan szövetekben figyelhető meg a fenesztrált endotélium, melyek emelkedett szűrési szereppel rendelkeznek, vagy transzendotéliális transzportjuk fokozott, mint például az endokrin és exokrin mirigyekben, veseglomerulusokban, gyomor-bél traktus falában. A nem folyamatos endotélium esetén a bazális membrán gyengén strukturált

szerkezetű, amin 100-200 nm nagyságú membrán nélküli fenesztrációk figyelhetők meg, ami a lépben, májban fordul elő (Aird WC., 2007; Pries AR és mtsai, 2006).

Leírták, hogy a simaizom sejtek, az endotél sejtek, köztük az általunk is használt humán köldökzsínór véna eredetű endotél sejtek (HUVEC) is nagy mennyiségben expresszálják a TG2 fehérjét (Thomázy és mtsai, 1989).

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 (Santhaman L. és mtsai, 2010). A NO termelődése a kor előrehaladtával csökken (Cernadas MR. és mtsai, 1998), így a TG2 keresztkötő aktivitása emelkedik endotél sejtekben, ami hozzájárulhat az extracelluláris mátrix fehérjék keresztkötéséhez. Ez a folyamat az erek ridegségét eredményezve kardiovaszkuláris kórképek kialakulásához vezethet.

Továbbá vizsgálták, hogy a TG2 fehérje csendesítése milyen hatást fejt ki az endotél sejtek élettani funkcióira. 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 (Nadalutti és mtsai, 2011).

3.4. RNS-kötő fehérjék és RNS-kötő domének

3.4.1. 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, a szerkezetileg 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 (Hentze és mtsai 2018).

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 translációjának hatékonyságát is szabályozzák **(Brinegar & Cooper, 2016)**. A sejtmagban egyes RBP-k alternatív splicing-szabályozóként működnek, különösen a fejlődés során vagy szövet-specifikus folyamatokban. Ezenkívül az RBP-k közvetítik az mRNS-ek transzkripció utáni szabályozását, ami stabilizálja a génexpresszió hatékonyságát **(Kishore és mtsai 2010)**.

Az RNS-biológia területén különböző technikákat alkalmaznak az RNS-fehérje kölcsönhatások azonosítására. Gyakoriak a közvetlen RNS-fehérje kölcsönhatások vizsgálatában az affinitás tisztítást, a kémiai/sugárzás által indukált kovalens keresztkötést és az UV-keresztkötést használó technikák **(Völkers és mtsai 2024)**. Továbbá vannak olyan detektálási módszerek, mint például a röntgenkrisztallográfia és a magmágneses rezonancia (NMR) kísérletek, melyek lehetővé teszik a fehérje-RNS komplexekben kölcsönhatásba lépő aminosavak és nukleotidok pontos vizsgálatát **(Corley és mtsai 2020)**.

3.4.2. RNS-kötő domének

Az RNS-kötő domének (RBD-k) az RBP-k szerkezeti elemei, melyek segítségével az RNS és a fehérje közötti kölcsönhatás alakulhat. 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 **(Corley és mtsai 2020)**. A továbbiakban a legjelentősebb RNS-kötő doméneket fogom részletezni.

3.4.2.1. RNS felismerő motívumok

Az RRM (RNA recognition motif) a szerkezet és a biokémia szempontjából a legjobban jellemzett RNS-kötő domén. Az RRM becslések szerint az összes emberi fehérje 1%-ában jelen van, és kötődik a pre-mRNS-hez, mRNS-hez, pre-riboszómális RNS-hez és kis nukleáris RNS-ekhez is **(Burd és mtsai 1994)**. Ezenkívül állati, növényi, gombás és baktériumsejtekben is jelen van, ami arra enged következtetni, hogy ez egy ősi fehérjeszerkezet, amely jelentős funkcióval rendelkezik. Az RRM domén 90 aminosavból áll, amelyek két konzervált, nyolc és hat aminosavból álló szekvenciákat tartalmaznak, amelyek RNP1 és RNP2 néven ismertek **(Cléry és mtsai 2013)**. Az RRM tipikus $\beta 1 \alpha 1 \beta 2 \beta 3 \alpha 2 \beta 4$ topológiát vesz fel, amely két α -hélixet képez egy antiparallel β -lemezzel szemben, ami a konzervált RNP1 és RNP2 RNS-kötő motívumokat tartalmazza a központi $\beta 1$ és $\beta 2$ részekben **(Corley és mtsai, 2020)**.

Az RRM-ek több RNP-motívumokkal való hidrogénkötések révén lépnek kölcsönhatásba az egyláncú RNS-sel. Az RRM szerkezeti vizsgálatai azt mutatják, hogy az RRM és az RNS közötti kölcsönhatás nem korlátozódik a β -lemez felületére, és hogy a hurkok és a két végződés ugyanolyan alapvető fontosságúak a β -lemez számára, mint az RNS nagy affinitású és szekvenciaspecifikus kötődése (Cléry és mtsai 2013). A szekvencia preferenciát tekintve minden RRM-nek megvan a maga affinitása. Leginkább a GU-gazdag szakaszokat kedveli. Például a kanonikus β -lemez felülete előnyösen kölcsönhatásba lép a C/A-G szekvenciákkal. Az RRM-ek azonban bármilyen típusú szekvenciához kötődhetnek, mivel másodlagos szerkezetük egyedülálló plaszticitást mutat. A több RRM-mel rendelkező RBP-k általában nagyobb RNS-kötődési affinitással és szekvenciaspecifitással rendelkeznek, mint az egyetlen RRM-mel rendelkezők. Vizsgáltak több, RNS-hez kötődő tandem RRM-et, ami bizonyította az RRM-ek jelentőségét az RNS-ek és fehérjék közötti kölcsönhatás közvetítésében (Cléry és mtsai 2013).

3.4.2.2. Cink-ujj motívum

A cinkujj (ZnF) egy másik, az RBP-kre jellemző domén. Az RBP-kben ez a domén önmagában, ismétlődően vagy más RBD-kkel kombinálva is előfordulhat. A legtöbb ZnF DNS-hez kötődik. Ugyanakkor más biomolekulákhoz, például RNS-ekhez, fehérjékhez és lipidekhez is kötődhetnek. A ZnF-k 30 aminosavból állnak, amelyek $\beta\beta\alpha$ topológiát alkotnak, amelyben a β hajtókanyarban és az α hélixben található oldalláncokat Zn^{2+} -ionok koordinálják (Corley és mtsai 2020). Az RNS-sel kölcsönhatásba lépő ZnF altípusok a CCHC, CCCH, CCCC és CCHH. A C és H betűk a cinkatomot koordináló, szórványosan elhelyezkedő cisztein- és hisztidin-oldalláncokat jelölik. Ezek az altípusok a cinkujjak és az RNS közötti kölcsönhatások nagy változatosságát mutatják (Corley és mtsai, 2020). A TFIIA volt az első ZnF, amelyet RNS-sel komplexben mutattak ki. A TFIIA cinkujj kilenc CCHH-ből áll, és kötődhet DNS- vagy RNS-molekulákhoz (Pelham & Brown, 1980). Ezenkívül a CCCH és CCCC altípusok többnyire 3 nukleotid ismétlődéseket ismernek fel egy RBP-ben található több ZnF-en keresztül. Ezeket az interakciókat a bázisokkal kialakított hidrogénkötések és a bázisok között kialakuló aromás oldalláncok közvetítik.

3.4.2.3. K-homológia domén

A hnRNP K homológia (KH) domént először az emberi heterogén nukleáris ribonukleoprotein K-ban írták le (Valverde és mtsai 2008). Az RBP-kben jelen lévő KH domének mind az RNS-hez, mind az egyláncú DNS-hez kötődnek. A domén 70 aminosavból áll, és kötődési helye csak

négy párosítatlan bázist képes befogadni. Az eukariótákban a KH domének vagy I. típusú $\beta 1 \alpha 1 \alpha 2 \beta 2 \beta'$ topológiát, vagy fordított II. típusú $\alpha' \beta' \beta 1 \alpha 1 \alpha 2 \beta 2$ topológiát vesznek fel, konzervált „GXXG” RNS-kötő motívummal az $\alpha 1$ és $\alpha 2$ hélixek között (**Valverde és mtsai 2008**). A nukleinsav-kötődési affinitás a Van der Waals-erőknek, a hidrofób kölcsönhatásoknak és az elektrosztatikus kölcsönhatásoknak köszönhető. A RBP-kben található tandem és augmentált KH-domének nagyobb affinitást és specificitást érnek el a nukleinsav-kötődés terén. Például a KH felületének $\beta \alpha \alpha \beta \beta \alpha$ topológiával történő kiegészítése lehetővé teszi hat nukleotid kötődését az átlagos négy nukleotid kötődés helyett (**Cléry és mtsai 2013**). Másrészt a tandem KH domének függetlenül vagy szinergikusan is működhetnek. Például a MEX-3C két KH-doménje 5+4 nukleotidos, kétrészes motívumra növeli a kötődési helyét (**Corley és mtsai 2020**).

3.4.2.4. Kettős szálú RNS-kötő motívum

A kettős szálú RNS-kötő motívumokról (dsRBM-ek) úgy vélik, hogy az RNS alakját ismerik fel, és nem az RNS szekvenciáját. Ezek a domének körülbelül 65-70 aminosavból állnak, és konzervált $\alpha \beta \beta \beta \alpha$ topológiát tartalmaznak (**Masliak és mtsai 2013**). A dsRBM-ek számos funkcióban vesznek részt, mint például az RNS-interferencia, az RNP lokalizáció, az RNS-feldolgozás, az RNS-szerkesztés és a transzlációs folyamatok szabályozásában. Ezenkívül gyakran megtalálhatók olyan fehérjékben, amelyek kulcsszerepet játszanak a vírusok elleni védekezésben. A dsRBM-ek hatásukat tandem ismétlődések formájában vagy más funkcionális RBD-kkel kombinálódva fejtik ki. A dsRBM-ek kizárólag az A-formájú hélix szerkezetét ismerik fel, amely legfeljebb 16 bázispár hosszúságú, és hidrogénkötésekkel kapcsolódik a foszfodiészter gerinchez, valamint a 2'-OH csoporthoz (**Corley és mtsai 2020**). Egy tipikus interakcióban a dsRBM három régiója érintkezik a kettős szálú RNS-sel. Az 1. régió interakciója a dsRBM $\alpha 1$ hélixet, a 2. régió interakciója a 2. hurkot, a 3. régió interakciója pedig a 4. hurkot és az $\alpha 2$ hélixet érinti (**Tian és mtsai 2004**). Az 1. és 2. régiók nagy szerepet játszanak az RNS-sel való interakcióban, és magukba foglalják a ribóz cukor 2'-OH csoportját is. A 3. régió hat darab közvetlen interakciót létesít a foszfodiészter gerinc nem hídképző oxigén oldalláncaival (**Tian és mtsai 2004**).

3.4.2.5. Szerkezetileg rendezetlen régió (IDR)

Az szerkezetileg rendezetlen régiók (IDR-ek) a RBD-k egy másik formája. Nincs stabil, meghatározott 3D szerkezetük. Szerkezetileg heterogének, mindenütt jelen vannak, állatokban, növényekben, baktériumokban és gombákban egyaránt megtalálhatók (**Holehouse &**

Kragelund, 2024). Az IDR-ek különböző alapvető sejt folyamatokban vehetnek részt, mint például a transzkripció folyamatok kontrollálásában, a jelátvitelben és a sejten belüli szerveződésben. Szerkezetüket tekintve az IDR-ek arginin/szerin (RS ismétlődés), arginin/glicin (RGG box), arginin- vagy lizinben gazdag régiók (R/K részek) vagy rövid lineáris aminosavmotívumok **(Corley és mtsai 2020)** ismétlődéseiből állnak. Az IDR-ek ténylegesen elősegíthetik a sejten a fehérje-RNS interakciók többségét **(Hentze és mtsai 2018)**. Leírták, hogy az IDR-ek gyakran kombinálódnak RNS-kötő motívumokkal, így maguk is részt vesznek az RNS-kötésben **(Ottoz, D. S. M., & Berchowitz, L. E. 2020; Zeke A. és mtsai 2022)**.

A strukturált RNS-kötő motívumok gyakran tartalmazznak Arg, Lys és His aminosavakat, valamint Arg és Ser ismétlődéseket, aromás aminosavakat, Tyr és Phe aminosavakat, és YGG ismétlődéseket is, amelyek szintén gazdagon megtalálhatók az RNS-kötő IDR-ekben **(Ottoz, D. S. M., & Berchowitz, L. E. 2020)**.

4. 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.

5. Anyagok és módszerek

Kísérleteinkhez minden szükséges anyagot a Sigma-Aldrich-Merck-Millipore-tól (München, Németország) szereztünk be, kivéve, ahol ezt zárójelben feltüntetjük.

5.1. 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 (Biosera, Nuaille, Franciaország) használtunk a sejtek tenyésztésekor, amit kiegészítettünk 2% HEPES (SIGMA), 1% Penicillin-Streptomycin (Biosera), 1% Amphotericin-B (BIOSERA), 10% EGM-2 (Lonza, Basel, Switzerland) és 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) reagenssekkel. A sejttenyésztés 37 °C-os termosztátban, 5%-os CO₂ tartalom mellett történt, minden második vagy harmadik napon médiumcserét alkalmazva. A sejtek passzálásához Tripszin-EDTA reagenst használtunk.

5.2. Sejtvonalak kialakítása

5.2.1. Az indukálható, endogén TG2 fehérjét csendesítő vektor és a TG2 knock-down HUVEC sejtvonal létrehozása

Elsőként a pLKO Tet-On (Puro) üres vektort (Addgene #21915, Watertown, MA, USA) EcoRI-HF és AgeI-HF (New England Biolabs; NEB, MA, USA) restrikciós endonukleázok alkalmazásával felnyitottuk, majd 1 %-os agaróz gélelektroforézis (90V, 1 óra) segítségével megfuttattuk. A linearizált vektor DNS-t 10 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó TAE puffer alkalmazásával tettük láthatóvá, és kivágás után gélből tisztítottuk PCR Clean Up & Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel, Dueren, Németország) használatával. A vektor tisztaságát újabb agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, mely során a gélbe 0,5 µg/ml etidium-bromidot alkalmaztunk (90 V, 1 óra).

A csendesítő oligonukleotid szekvenciát a Sigma MISSION shRNA adatbázisából választottuk.

2. táblázat: Alkalmazott shRNA oligonukleotid szekvenciák.

Oligonukleotid neve	Oligonukleotid szekvenciája
TRCN0000272816For (shTG2-8For)	5'CCGGCCACCCACCATATTGTTTGATCTCGAGAT CAAACAATATGGTGGGTGGTTTTTG-3'
TRCN0000272816Rev (shTG2-8Rev)	5'AATTCAAAAACCAACCCACCATATTGTTTGATCTCG AGATCAAACAATATGGTGGGTGG-3'

A primerek liofolizáltan érkeztek, amiket nukleáz mentes vízben oldottunk be 0,1 nmol/μl végkoncentrációban.

A primerpárok hibridizációja, majd a felnyitott vektorba történő ligálása korábban már alkalmazott protokoll alapján történt (**Wiederschain és mtsai, 2009**). A primerpárokat 10X-es hibridizációs (annealing) pufferrel (1 M NaCl és 100 mM Tris-HCl, pH 7,4) kevertük össze, majd 95°C fölé melegített vízbe helyeztük az oligonukleotid keveréket tartalmazó csöveket, és megvártuk, hogy a víz magától 30°C-ra visszahűljön. Ez idő alatt a primerpárok hibridizáltak.

A hibridizációt követően összeállítottuk a ligálási reakciót, melyhez a hibridizált primereket és a felnyitott vektort használtuk fel (400x hígított hibridizált primerkeverékből 1 μl térfogathoz adtunk 0,5 μl felnyitott, gélből tisztított pLKO-Tet-On Puro vektort kiegészítve 1 μl 10X-es T4 DNS ligáz pufferrel (NEB) és 6,5 μl nukleáz mentes vízzel). A primerek ligálását a vektor DNS-be a T4 DNS ligáz biztosította (NEB), amit 1 μl mennyiségben alkalmaztunk. A ligálási reakciót 10 percig szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán át hűtőszekrényben inkubáltuk.

A ligálási reakció végtermékét kémiaailag kompetens DH5α baktérium sejtekhez adtuk, amit jégen inkubáltunk 40 percig. Ezt követően hősokkot alkalmaztunk 60 másodpercig 42°C-on, majd újra jégre tettük a reakcióelegyet 5 percig, ami után SOC médiumot adtunk hozzá és 1 órán keresztül 37°C-on ráztattuk. A transzformált sejtekből szobahőmérsékletű 100 μg/ml ampicillint tartalmazó LB-agar lemezre szélesztettünk, majd 1 éjszakán át, 37°C-on történő inkubálást követően a kinőtt telepeket átcsíkoztuk, és újabb éjszakai, 37°C-os inkubálás történt. A kinőtt telepeket tartalmazó LB-agar lemezt tároltuk a plazmid izolálásig.

Az izolálást az LB-agar lemezen kinőtt telepekből végeztük 100 μg/ml ampicillint tartalmazó LB tápfolyadék segítségével NucleoSpin® Plasmid Kit felhasználásával a gyártó által javasolt protokoll szerint. Egy éjszakán át 37°C-on növesztettük a kisselektált baktérium klónokból, amikből plazmidot izoláltunk.

Az izolálást követően elsőként XhoI (Thermo) restriktációs endonukleáz hasítással ellenőriztük a klónokat, amihez az enzimet és a plazmid DNS-t tartalmazó elegyet 1 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd ellenőriztük a hasítás eredményét 2%-os agaróz gélelektroforézis segítségével (90 V, 1 óra). A gél 0,5 μg/ml etidium-bromid festéket tartalmazott.

A klónokat szekvenálással is ellenőriztük Mix2Seq Kittel (Eurofins Genomics, Mainz, Németország). Az online formában kapott eredményt Serial Cloner 2.6.1 programmal értékeltük ki.

A vektor amplifikálását a NucleoBond Xtra Midi EF kittel (Macherey-Nagel) végeztük a gyártó által javasolt protokoll szerint. A DH5 α sejteket, amik a vektort tartalmazták, 200 ml 50 μ g/ml ampicillint tartalmazó LB táptalajon növesztettük körülbelül 20 órán keresztül.

A pszeudo-virion készítését a témavezetőm végezte a Didier Trono laboratórium weboldalán megtalálható Ca-precipitációs protokoll szerint pMD2.G és psPAX2 vektorokkal HEK 239FT sejtek alkalmazásával. A viriont tartalmazó felülúszó gyűjtése 24 óránként kétszer történt, majd a koncentrációja Amicon Ultra-15 100 kDa koncentrátor cső segítségével valósult meg.

5.2.2. A transzgén 3F-TG2 fehérjét expresszáló vektor kialakítása

A korábban témavezetőm által inzerciós mutagenézissel kialakított pENTR-4-3Flag vektort EcoRI (NEB) restrikciós endonukleáz segítségével nyitottuk fel. Az 5' végen lévő foszfátot eltávolítottuk alkalikus foszfátáz kezeléssel (CIP, NEB) annak érdekében, hogy megakadályozzuk az ön-, illetve visszaligálódás esélyét. A felnyitott vektort 1 %-os agaróz gélelektroforézist (90 V, 1 óra) követően a gélből kivágtuk és PCR Clean Up & Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel) használatával tisztítottuk. A vektor tisztaságát újabb agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, mely során a gélbe 0,5 μ g/ml etidium-bromidot alkalmaztunk (90 V, 1 óra).

A TG2 cDNS szekvenciáját egy korábban, a munkacsoport által kialakított pET30ek/LIC-hTG2 vektorból vágtuk ki EcoRI restrikciós endonukleáz segítségével. Ezután 1 %-os agaróz gélelektroforézis (90V, 1 óra) segítségével választottuk el a TG2 fehérjét kódoló cDNS szekvenciát. A TG2 inzertet 10 μ g/ml etidium-bromidot tartalmazó TAE puffer segítségével láthatóvá tettük, és kivágás után gélből tisztítottuk PCR Clean Up & Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel) segítségével. A vektor tisztaságát újabb agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A felnyitott pENTR4-3Flag vektorból 2,5 μ l (50 ng) mennyiséget és a TG2 cDNS szekvenciát kódoló inzertből 3,1 μ l (50 ng) mennyiséget felhasználva állítottuk össze a ligálási reakciót kiegészítve 1 μ l 10X-es T4 DNS ligáz pufferrel (NEB) és 2,5 μ l nukleáz mentes vízzel. A TG2 kódoló szekvenciát a vektor EcoRI hasítóhelyére illesztettük be 0,9 μ l T4 DNS ligáz (NEB) segítségével. A ligálási reakciót 10 percig szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán át hűtőszekrényben inkubáltuk.

A transzformálás folyamata, majd a plazmid izolálása az endogén TG2 csendesítő vektorhoz hasonlóan történt.

Az izolálást követően elsőként XbaI (Thermo Fisher Scientific) restrikciós endonukleáz hasítással ellenőriztük a TG2 cDNS-t tartalmazó klónokat, amihez az enzimet és a plazmid DNS-t tartalmazó elegyet 1 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd ellenőriztük a hasítás eredményét 2%-os agaróz gélelektroforézis segítségével (90 V, 1 óra). A gél 0,5 µg/ml etidium-bromid festéket tartalmazott.

A klónokat szekvenálással is ellenőriztük Mix2Seq Kittel (Eurofins Genomics). Az online formában kapott eredményt Serial Cloner 2.6.1 programmal értékeltük ki.

A kialakított pENTR4-3F-TG2 és a pCW57.1 vektorokat inkubáltuk Gateway LR Enzyme Mix II. (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mellett 2 órán át 37°C-on gyártói utasítás szerint. A pCW57.1 vektor tartalmazza a szükséges genetikai elemeket a doxiciklin-indukálható transzgén expresszió számára. Ezt követően Proteináz K hozzáadásával további 10 percig inkubáltuk a reakcióelegyet, majd Stbl3 baktérium sejtekbe transzformáltuk az inkubálást követően a már korábban leírt módon.

Az izolálás, valamint a klónok ellenőrzése XbaI restrikciós endonukleáz hasítással, majd szekvenálással az előzőekben leírtak alapján történt.

A vektor amplifikálása és a pszeudo-virion készítése a csendesítő vektorhoz hasonlóan történt.

5.2.3. Az endogén TG2 csendesített, 3F-TG2 fehérjét kifejező sejtvonal kialakítása

Az immortalizált HUVEC 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 TG2-KD sejtek benőtték a vályút a szelekció után, átraktuk őket 6 vályús lemezre, majd T25 és T75 flasksba. A transzgén TG2 fehérjét expresszáló vektor esetében, miután meggyőződünk a TG2 csendesítés hatékonyságáról (TG2-KD sejtvonal kialakítása), a sejtek fertőzése hasonlóan történt, mint a csendesítő vektor esetén, viszont a szelekció során 6 µg/ml puromicint tartalmazó tápfolyadékot használtunk (TG2-KD+3F-TG2 HUVEC).

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

Az endogén TG2 fehérje csendesítése, illetve a transzgén 3F-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 szükséges volt.

5.3. Fehérje extraktum készítése

A kísérletekben használt sejteket T75-ös flaskákban (TPP) tenyésztettük, majd tripszin-EDTA kezeléssel választottuk fel őket (5 perc, 37 °C). Ezután a sejteket kétszer mostuk jéghideg PBS-sel és centrifugálással (1000 g 10 perc, 4 °C). 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-t (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma) 100-szoros hígításban és PhosSTOP-ot (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) 1-szeres hígításban. A sejtszuspenziókat ultrahangos szonikátorral is kezeltük (5 impulzus), majd a centrifugálás után (a sejttörmelék eltávolítása érdekében) a tiszta felülúszót használtuk sejtkivonatként a további kísérletekhez. A fehérjekoncentrációt Bio-Rad Protein Assay Dye reagens (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével mértük meg.

5.4. Fehérjetermelés és tisztítás

5.4.1. Helyspecifikusan biotinilált humán rekombináns TG2 fehérje

A helyspecifikusan, N-terminálisan biotinilált humán rekombináns TG2 fehérje (N-BAP-rhTG2) termeléséhez a humán TG2 cDNS szekvenciáját kódoló pET-30ek/LIC-TG2 bakteriális expressziós vektort alkalmaztuk (3. táblázat), amibe szubklónoztuk a biotin akceptor peptid (BAP, GLNDIFEAQKIEWHE) szekvenciáját az N-terminálison található trombin hasítási helyre Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB) protokoll segítségével.

3. táblázat: A pET-30 ek/LIC BAP rhTG2 vektor kódoló szekvenciája

```
ATGCACCATCATCATCATCA TcttctGGTCTGaacgacatcttcagggtcagAAAatcgaatggcacgaaggtatgaaagaaaccgtgctgctaaatcg  
aacgccagcacatggacagcccagatctgggtaccgatgacgacgacaagatgagaattcagaccATGgccaggagctggtcttagagaggtgtgatctggagctggagaccaat  
ggccgagaccaccacacggccgacgtgtccgggagaagctgggtgtgcagggggccagccctctgctgaccctgcactttgaggcccaactacgaggccagtgtagacag  
tctcaccttcagtgctgtgacggggccagcccctagccaggagggccggaccaaggccggtttccactaagagatgctgtggaggaggggtgactggacagccaccgtggtggaccag  
caagactgcaccctctcgtgagctcaccacccggccaacgccccatcgccctgtatgcctcagcctggaggcctccactggctaccaggatccagctttgtctggggcacttc  
attttgtcttcaacgctgtgtgcccagcggtgtgtgtacctggactcgggaaggagcggcaggagtagtctcaccagcagggtttatctaccagggtcggccaagttcatca  
agaacataccttggaaatttggcagtttgaagatgggatcctagacatctgcctgatccttctagatgtcaacccaagtctgaagaacggccggcgtgactgtccccggcagcagc  
cccgtctacgtggggcgggtggttagtggtgcatggtcaactgcaacgatgaccagggtgtgctgctgggacgctgggacaacaactacggggacggcgtcagccccatgctcggatcg  
gcagcgtggacatcctgcggcgtggaagaaccagggtgcagcgctcaagtagtgcctggtggtcttcggccgtggcctgcacagtgtgaggtgcctagggcatccctac  
ccgctgtgtagcaactacaactcggcccatgaccagaacgcaacaccttctcatcgagtacttccgaatgagtttggggagatccagggtgacaagagcgagatgatctggaacttcca  
ctgctgggtgagctgtggtgacaggccggacctgcagccgggtacaggggtgagggccctggacccaacgccccaggagaagagcggaaggagctactgctgtggccc  
agttccagttcgtccatcaaggaggggcagctgagcaccagtagcgtgcctcttctgttgcggaggtcaatccgacgtggttagactggatccagcaggacagtaggggtctgtgca  
caaatccatcaacgttccctgatcgttgggtggaagatcagcactaagagcgtggggccgagacgagcgggaggtatcacccacactacaataccagagggtctctcagaggag  
agggaggccttcacaaggcgcaaccacctgaacaaactggccgagaaggagagacagggatggcctgctggccagagcatgaacatgggcagtgactttgacgt  
ctttgccacatcaccaacaaccgctgaggagtagctgtgcccctcctgctgtgcccgcaccgtcagctacaatgggatcttggggcccgagtggtggcaccagttacgtctcaa  
ctcaacctggagcctttctctgagaagcgttctcttgcacctctatgagaataacctgactgcttaccggagtcacacatcaaggtgcgggcccctcctcgtggagccagttatc  
aacagctacctgtggtgtagagggacctctacctggagaatccagaaatcaagatccggatccttggggagcccaagcagaaacgcaagctggtgctgaggtgtccctgcagaacc  
cgctccctgtggccctggaaggctgcacctcactgtggagggggccggcctgactgaggagcagaagacgggtggagatccagaccccgtggaggcaggggaggaagtaaggt  
gagaatggacctgtgccgtccacatgggcctccacaagctgggtggaattcgagagcgacaagctgaagggtgtgaagggtccggaatgtcatattggccccccTAA
```

A BAP megfelelő inzercióját restrikciós emésztéssel és szekvenálással (Eurofins Genomics) ellenőriztük. Ezt követően az N-terminálisan biotinilált rhTG2 fehérjét *E. coli* Rosetta 2 (DE3) baktériumsejtekben expresszáltuk Terrific Broth (TB) táptalajon. A rekombináns fehérje expresszióját 0,1 mM izopropil β -d-1-thiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk. A fehérje tisztításához His GraviTrap oszlopot (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország) alkalmaztunk.

5.4.2. Rekombináns TG2 fehérje

A rekombináns humán TG2 fehérje termelése egy már korábban leírt módszer alapján történt (Király R. és mtsai, 2015).

5.4.3. Expressziós vég-mentes TG2 fehérje

Az expressziós vég lehasított TG2 fehérje termelése egy korábbi leírás szerint készült (Biri B. és mtsai., 2016).

A TG2 kódoló régiója pBH4 expressziós vektorba, ami tartalmazta a His₆-tag jelölést, és Tobacco etch vírus (TEV) proteáz hasítási helyét, lett szubklónozva a leolvasási keretnek megfelelően NdeI és XhoI restrikciós helyekre. A konstrukciókat *E. coli* Rosetta 2 (DE3) sejtekbe (Novagen) transzformáltuk. Az OD₆₀₀=0,6 denzitást elért kultúrát, 0,1 mM IPTG

(izopropil- β -D-1-thiogalaktopiranozid) hozzáadásával indukáltuk és 18 °C-on 16 órán át tenyésztettük. A fehérjéket His GraviTrap affinitás oszlopokon (Bio-Rad Laboratories) tisztítottuk 4 °C-on. A His₆-tag jelölés TEV proteáz által történő hasítását 4 °C-on végeztük 16 órán át. A hasítatlan TG2-t és a His₆-taggel ellátott TEV proteázt egy második Ni²⁺-affinitásos tisztítással választottuk el az ekkor már His₆-tag nélküli TG2-től.

5.5. RNS izolálás és RT-qPCR (valós idejű-qPCR) mérés

Az RNS izolálásához a sejteket felválasztottuk tripszin-EDTA kezeléssel (5 perc, 37 °C), majd a sejteket kétszer mostuk jéghideg PBS-sel és centrifugálással (1000 g 10 perc, 4 °C). A sejtpelletet TRI reagens (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) segítségével szuszpendáltuk, 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. Centrifugát követően (15 perc, max fordulatszám) a pelletet -20°C-ra hűtött, 70%-os etanollal mostuk, majd az RNS pelletet újabb centrifugálás után megszáritottuk (vákuum centrifugával). A megszáritott RNS pellethez arányosan nukleáz mentes vizet (NFW) adtunk, majd Nanodrop2000 készülékkel ellenőriztük a tisztaságát. A reverz transzkriptáz-PCR méréshez az RNS mintákat 200 ng/μl koncentrációra hígítottuk, majd az mRNS-t cDNS-sé írtuk át High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) használatával gyártói utasítás szerint. A reverz transzkriptáz-PCR cDNS termékét használtuk fel az RT-qPCR méréshez (Roche LightCycler® 480 II készülék), amihez TaqMan próbákat alkalmaztunk. A transzkripció szinteket az B aktin szintjére normalizáltuk és C_T módszer segítségével határoztuk meg a gének expresszióját.

5.6. Western blot és alkalmazott antitestek

A fehérjék elválasztása 10%-os SDS-PAGE gélelektroforézis segítségével történt általános protokoll alapján Bio-Rad Mini Protean® Tetra Cell készülékkel. Ezt követően a gélből PVDF membránra (Millipore Immobilon-P membrán; 0,45 μm) transzferáltuk a fehérjéket félszáraz blottolás (Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell készülék) segítségével. Blokkoláshoz 5 (m/v) %-os alacsony zsírtartalmú tejporos 1x TTBS oldatot használtunk 30 percig szobahőn, vagy egy éjszakán át 4 °C-on. Az elsődleges és másodlagos antitestek (4. táblázat) hígításához 0,5 (m/v) %-os alacsony zsírtartalmú tejporos 1x TTBS oldatot alkalmaztunk. A jeleket WesternBright ECL HRP oldat (Advansta, CA, USA) segítségével hívtuk elő.

4. táblázat: A tanulmány során használt elsődleges és másodlagos antitestek.

	Antitest neve	Gazda Faj	Hígítás	Gyártó	Katalógusszám
Elsődleges antitest	Transzglutaminase-2 (CUB7402)	egér	1/10.000	Thermo Fisher Scientific	#MA5-12736
	Aktin	nyúl	1/3.000	Sigma	#A2066
	anti-FLAG M2	egér	1/2.000	Sigma	#F1804
Másodlagos antitest	anti-egér IgG/HRP	kecske	1/10.000	Advansta	# R-05071-500
	anti-nyúl IgG/HRP	kecske	1/10.000	Advansta	#R-05072-500

5.7. Letapadási teszt

A mérést megelőző napon a sejteken a tápfolyadékot éhezési médiumra cseréltük, ami csak 1% FBS-t tartalmazott 10% helyett. Első lépésben F16 Black Maxisorp platet fibronektinnel (0,125 µg/vályú) fedtünk (1 óra, 37 °C), majd KOWA lemez segítségével megszámoltuk a sejteket, és úgy állítottuk be a sejtszámot, hogy minden vályú 1000 db sejtet tartalmazzon. A plate vályúit 200 µl PBS oldattal mostuk, majd 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk az éhezési médiumban hígított sejteket a letapadás érdekében. Majd 200 µl PBS oldattal történő mosást követően Cell-Titer Blue reagenst (Promega, Madison, WI, USA) tartalmazó éhezési médiumot mértünk a vályúkba a letapadt sejtekhez, majd a fluoreszcens intenzitás értékeit 2 óránként lemértük BioTek Synergy HT készülékkel (Ex:530 nm/Em:590 nm) és meghatároztuk az intenzitásváltozást (meredekség). Minden minta esetében a csak tápfolyadékot tartalmazó vályúban meghatározott meredekség érték levonásával korrigáltuk az értékeket, majd átlagoltuk azokat. A kontroll sejt-ként használt HUVEC sejteket tartalmazó vályúk meredekség értékét 100%-nak vettük, és ezekhez viszonyítva adtuk meg a sejtek letapadási képességét a többi sejtvonal esetében.

5.8. Áramlási citometriás mérés

A sejteket tripszin-EDTA kezeléssel történő felválasztás után centrifugáltuk (3 perc, 4 °C, 700 rpm), majd a pelletet PBS oldattal mostuk, majd újra centrifugáltuk (3 perc, 4 °C, 700 rpm). A sejteket jelöltük Annexin-V és propidium jodid reagenssel (BioLegend, San Diego, CA, USA) 15 percen keresztül sötétben. A kontroll esetben csak Annexin-V kötő puffert alkalmaztunk. A sejteket ezt követően FACS Aria™ III áramlási citométer segítségével analizáltuk.

5.9. TG2 interaktom meghatározása két különböző módszerrel

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

Első lépésként 250 µl Pierce High Capacity Neutravidin agaróz gyönggyöt (Thermo Scientific) ekvilibráltunk MQ vízzel, majd háromszor R pufferrel (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM imidazol pH 7,8-8). A mosások közötti centrifugálási lépések egységesen 2 percig, 2500 g fordulatszámon, 4 °C-on zajlottak. Az agaróz gyönggyre 100 µg helyspecifikusan biotinilált rekombináns humán TG2 fehérjét (rhTG2) immobilizáltunk, aminek teljes térfogata 500 µl volt lízispufferben (2 óra inkubálás 4 °C-on). Ezt követően az agaróz gyönggyöt blokkoltuk 333 µg/ml biotinnal, R pufferben oldva (inkubálás 1 óra, 4 °C). Az affinitás tisztítást 2,5-3 mg/ml HUVEC sejtkivonat hozzáadásával végeztük egy éjszakán át, folyamatos rotáció mellett 4 °C-on. Másnap háromszor mostuk a gyönggyöt CoIP pufferrel (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 % glicin, pH 7,4), majd a potenciális 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 tripszin hasítás hatékonyságának fokozása érdekében mindkét eluált frakciót SDS poliakrilamid gélbe futtattuk a szeparáló gél határáig, és még a fehérje sávok szeparálása előtt Coomassie-kék festést követően az összes fehérjét tartalmazó sávot kivágtuk és LC-MS/MS analízisre küldtük.

5.9.2. Transzgén 3F-TG2 fehérjével a sejtekben asszociált fehérje komplexek izolálása anti-FLAG M2 agaróz gyönggy alkalmazásával és azonosításuk tömegspektrometriával

Elsőként 300 µl monoklonális anti-FLAG M2 agaróz gyönggyöt ekvilibráltunk CoIP pufferrel, aminek összetevői az előző módszer esetében vannak részletezve. Majd 3,3-3,5 mg fehérjét tartalmazó sejt extraktumot inkubáltunk egy éjszakán át az ekvilibrált anti-FLAG M2 agaróz gyönggyel. A nem specifikus háttér fehérjék meghatározásához egér IgG agaróz gyönggyöt használtunk kontrollként. Három mosási lépés után a lehetséges interakciós fehérjéket eluáltuk a Neutravidin agaróz gyönggyhöz hasonlóan 2 lépésben. Az eluált fehérjéket 10 %-os SDS poliakrilamid gélbe futtattuk a szeparáló gél határáig, majd Coomassie festést követően a sávokat a szeparálódás előtt kivágtuk és LC-MS/MS analízisre küldtük.

A konformáció függő interakciós partnerek feltárása érdekében különböző modulátorokat alkalmaztunk. A TG2 nyitott állapotban való stabilizálásához 15 µM NC9 modulátorral

kezeltük elő a sejteket a sejtkivonat készítését megelőző 24 órával. A TG2 zárt konformációs állapotának megőrzése érdekében 1 mM GTP γ S inhibitort adtunk a sejtkivonathoz, mivel a GTP γ S nem penetrál az élő sejtekbe az NC9 modulátortól eltérően.

5.10. Ortogonális szerves fázis szeparáció

A RNS-kötő fehérjéket ortogonális szerves fázis szeparációval (OOPS) izoláltuk egy korábban alkalmazott protokoll alapján (**Queiroz és mtsai, 2019, Nature**). A kísérlethez az immortalizált HUVEC alap sejtvonalat használtuk, és a sejteket 10 cm-es Petri csészében növesztettük. Feldolgozás előtt kétszer mostuk PBS oldattal a letapadt sejtréteget, majd 400 mJ/cm² UV fény alkalmazásával kovalensen keresztkötöttük az RNS-fehérje komplexeket a sejtekben GS Gene Linker UV Chamber készülékkel (Bio-Rad). A kontroll sejtek esetében nem alkalmaztunk UV fény kezelést. 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 óvatosan átmértük új csőbe és háromszor mostuk: TRI reagenssel, és kloroform hozzáadásával újra elválasztottuk a fázisokat a fent leírtak alapján háromszor. Végeredményképp olyan interfázist kaptunk, ami tartalmazta az UV fény által keresztkötött RNS-fehérje komplexeket. A komplexeket tartalmazó fázist 9:1 (methanol:minta) arányban hozzáadott metanollal precipitáltuk. Az ezután kapott pelletet 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5; kiegészítve 1% SDS reagenssel) oldatban szuszpendáltunk fel. Az elegyet szonikáltuk 15 percen keresztül 30 másodperc szonikálás/pihentetési ciklusokkal vízes fürdős ultrahangos készülék alkalmazásával (BD ProbeTec ET, 2510E-DTH, Becton Dickinson). Majd a mintákat kezeltük 5 μ g RNáz A reagenssel (Thermo Scientific) 37 °C-on 4 órán keresztül. Szeparálni a komplexekből felszabadított RNS-kötő fehérjéket újabb TRI reagens, majd kloroform kezelést használtunk. Ez esetben a szerves, alsó fázist használtuk a továbbiakban, és metanollal precipitáltuk a mintákban lévő fehérjéket. 80% etanollal történő mosást követően a pelletet 0,1 M Tris-HCl pufferben (pH 8,5; tartalmaz 1% SDS reagenst) oldottuk vissza. Western blot esetén a mintákhoz 6x Denaturációs puffert adtunk, ami 50 mM ditiotreitollal (DTT) volt kiegészítve. A minták fehérjetartalmát tömegspektrometriával azonosítottuk.

5.11. Mágneses RNS-fehérje pull-down kísérlet

Az RNS-fehérje interakciók kimutatásához használtunk Pierce RNA 3' Desthiobiotinylation Kit-et és Pierce Magnetic RNA-Protein Pull-Down Kit-et (Thermo Scientific) a gyártói utasítás alapján. 493 μ g immortalizált HUVEC sejtekből izolált totál RNS-t, illetve 50 pmol 43-mer RNS molekulát (5'- CCU GGU UUU UAA GGA GUG UCG CCA GAG UGC CGC GAA

A jelölt RNS mintákat streptavidin mágneses gyöngyök szuszpenziójára kötöttük a fent említett Kit segítségével. A mágneses gyöngy 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) oldattal történő mosása után az immobilizált RNS-t tartalmazó mágneses gyöngyökhöz adtuk a humán (His)₆-jelölt rekombináns TG2 fehérjét az ajánlott master mix felhasználásával és inkubáltuk 1 órán át szobahőn. Ezt követően a gyöngyöket háromszor mostuk és az RNS-kötött fehérjéket eluáltuk 6x Denaturációs puffer segítségével (hődenaturálás 5 perc, 100°C). Az eluált fehérjéket 10% SDS poliakrilamid gélelektroforézis és Western blot segítségével analizáltuk.

A TG2 RNS kötésének konformáció függését vizsgálni a rekombináns TG2 fehérjét előinkubáltuk 0,1 mM NC9 modulátorral a nyitott konformáció eléréséhez 15-20 percig szobahőn, majd újabb 15-20 percig 5 mM CaCl_2 jelenlétében. A zárt konformáció vizsgálatához 0,5 mM GTP γ S inhibitor jelenlétében inkubáltuk az RNS töltött mágneses gyöngyöt.

5.12.2. TG2 izopeptidáz aktivitásának fluoreszcens mérése

A TG2 izopeptidáz aktivitásának meghatározásához A102 fluoreszcens szubsztrátot használtunk (Zedira), amit szintén egy korábban leírt protokoll alapján végeztünk el (Tangaraju és mtsa, 2016). A módszer lényege, hogy a transzglutaminázok képesek hasítani az izopeptid kötést a szintetizált szubsztrátokban, miközben egy quencher molekula (2,4-dinitrofenil) szabadul fel. A reakcióelegy 50 mM MOPS puffert (pH 6,8), 10 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl oldatot, 0,1% (w/v) PEG8000 reagenst, 50 μM A102 és 3 mM DTT-t tartalmazott. A vak ez esetben is 10 mM EDTA oldatot tartalmazott a 10 mM CaCl_2 helyett. A reakciót a TG2 fehérje hozzáadásával indítottuk, aminek koncentrációja 150 nM volt 200 μl reakcióelegyben. A mérést 37°C-on végeztük BIOTEK Synergy HT készülékkel (Ex/Em: 318/413 nm).

5.13. RNS-fehérje interakció detektálása bioréteg interferometriával (BLItz)

A módszer egy optikai technika, ami a molekulák közötti interakciók kinetikáját és erősségét képes vizsgálni valós időben. A molekulák közötti kötés kinetikáját BLItz műszerrel határoztuk meg (PALL FortéBio). A méréshez a gyártó által ajánlott sztreptavidin bioszenzort használtuk, aminek cső mintatartóját kötőpufferrel (0,05 M NaCl-t, 2 mM MgCl_2 -t és 0,1% Tween 20-at tartalmazó 0,02 M Tris-HCl (pH 7,5) puffer) töltöttük fel az alapvonal felvételéhez. Ezt követően 10 $\mu\text{g/ml}$ biotinizált 43-mer RNS molekulát immobilizáltunk a lapka mintatartóval. Újabb alapvonal felvétel után (cső mintatartó) a tisztított, rekombináns TG2 fehérjét vittük fel (lapka mintatartó). A két különböző mintatartó közötti váltás egy elcsúszást okozott a görbében a kísérleti lépések között, de a lapka mintatartó lehetővé tette a szükséges térfogatok csökkentését 5 μl -re. 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. Kontrollkísérletekként mértük az RNS kötődés jelét magában, a pufferhez képest, illetve a fehérje nem specifikus kötődését a szenzorhoz, az immobilizált RNS hiányában.

5.14. LC-MS/MS analízis

Az RNS-kötő fehérjék azonosításához az ortogonális fázis szeparációt követően, illetve a TG2 interaktom azonosításához a mintákat 10% 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 Intézet Proteomika Szolgáltató Laboratóriumába.

A peptidszekvenciák (MS/MS spektrumok) alapján történő fehérjeazonosítást a MaxQuant 1.6.2.10 keresőmotorral végezte a szolgáltató labor a SwissProt/UniProt adatbázis felhasználásával. A géldarabokat egy éjszakán át emésztették 37°C-on tripszines kezeléssel, majd a mintákat 10 µl térfogatra szárították be. A fehérjemintákat MS analízishez Easy nLC1200 (Thermo Scientific) nanouplc-Orbitrap Fusion (Thermo Scientific) MS/MS rendszerrel készítették elő. Az eredményeket a Scaffold 5.0 programmal megnyitható (Proteome Software) formában 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) (Csobán-Szabó Zs. és mtsai, 2021).

5.15. 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.

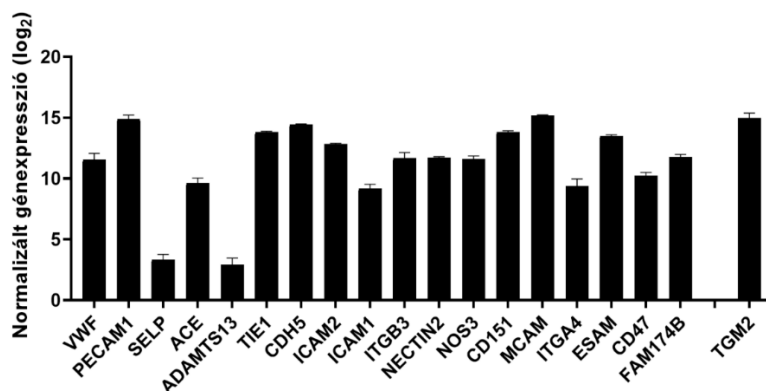
Az általunk HUVEC sejtekben azonosított RNS-kötő fehérjéket megvizsgáltuk az RBP2GO adatbázissal, és 20 újonnan azonosított RNS-kötő fehérjét találtunk, amiket STRING adatbázis segítségével analizáltunk, majd a legjobban dúsuló GO *Biológiai funkciókat* az FDR (false discovery rate) érték alapján listáztuk. 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.

6. Eredmények

6.1. TG2 interakom vizsgálata

Munkám során elsőként a HUVEC sejtekben megtalálható TG2-asszociált fehérjék azonosítását és így a TG2 sejtekben betöltött fiziológiai szerepének pontosabb feltárását tűztük ki célul.

A kísérletekben használt immortalizált humán köldökzsínór véna eredetű endotél sejtek (HUVEC) jelentős mennyiségben expresszálják a TG2 fehérjét. A kísérletek megkezdése előtt mRNS szekvenálással ellenőriztük (Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium), hogy az immortalizálás ellenére az alkalmazott sejtvonal kifejezi a klasszikus endotél sejtekre jellemző markergéneket (4. ábra).



4. ábra: Az endotéliális markerek és a TG2 génexpressziós analízise immortalizált HUVEC sejtvonalban RNS szekvenálással. A kialakított immortalizált HUVEC sejtvonal expresszál számos endotéliális markergént is a TG2 mellett (pl. vWF, PECAM-1, ICAM1).

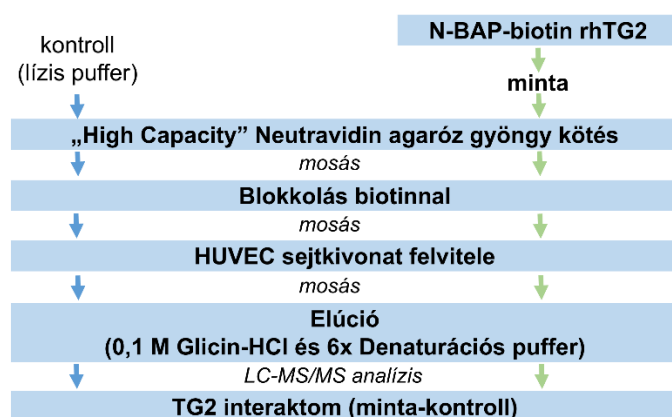
6.1.1. A TG2 interakciós partnereinek azonosítása HUVEC sejtkivonatban biotinilált, humán rekombináns TG2 fehérje segítségével

Elsőként egy már ismert, hagyományosnak mondható technikát, biotin-neutravidin agaróz alapú affinitás kromatográfiát alkalmaztunk. A TG2 fehérje véletlenszerű biotinilációjának és az interakomra gyakorolt lehetséges hatásainak a megelőzése érdekében egy biotin-akceptor peptidet (BAP) klónoztunk a rekombináns TG2 fehérjét kódoló vektor N-terminális régiójába. A felhasznált biotinilált, Ni-NTA affinitással tisztított rekombináns humán TG2 fehérjét (N-BAP-biotin rhTG2) *E. coli* Rosetta 2 (DE3) baktériumsejtekben expresszáltuk. Későbbiekben

ezt az N-BAP-biotin rhTG2 fehérjét használtuk a HUVEC sejtkivonatban található TG2 interakciós partnerek izolálásához. Az affinitás tisztítás során a biotinilált fehérjét High Capacity Neutravidin agaróz gyöngyhöz kötöttük, majd a szabad kötőhelyek biotinnal történő blokkolása után hozzáadtuk a HUVEC sejtkivonatot, amiből kikötődtek a TG2 potenciális partnerei az immobilizált, rekombináns TG2 fehérjéhez. A sejtek lizálásához NP-40-tartalmú puffert használtunk, ami lehetővé tette az alacsony kötődési affinitású fehérjekomplexek képződését is. A partnerfehérjéket ezután eluáltuk, és a potenciális interakciós partnereket LC-MS/MS analízissel azonosítottuk.

A kontroll esetében nem immobilizáltuk a High Capacity Neutravidin agaróz gyöngy felszínéhez a rekombináns TG2 fehérjét, hiszen arra voltunk kíváncsiak, kötődnek-e fehérjék a gyöngy felszínéhez a HUVEC sejtkivonattól. Az azonosítás további lépései megegyeztek a minta esetében alkalmazott lépésekkel. A kontroll esetén az LC-MS/MS analízissel azonosított fehérjék az alkalmazott agaróz gyöngy interaktomját jelentették, tehát az aspecifikusan kötődő fehérjetalálatokat (5. táblázat). Ezen találatokat az analízis során kivontuk a mintában azonosított potenciális interakciós fehérjetalálatokból, így csak a lehetséges TG2-asszociált fehérjék maradtak a találati listánkban. A kontroll fehérjék között volt már korábban azonosított TG2 interakciós partner is (pl. CALM1, CALR, TLN1, TUBA/B; 5. táblázat), ami erősíti a módszerünk hitelességét.

A High Capacity Neutravidin agaróz gyöngy segítségével kialakított affinitás tisztítás lépéseit az 5. ábra szemlélteti.



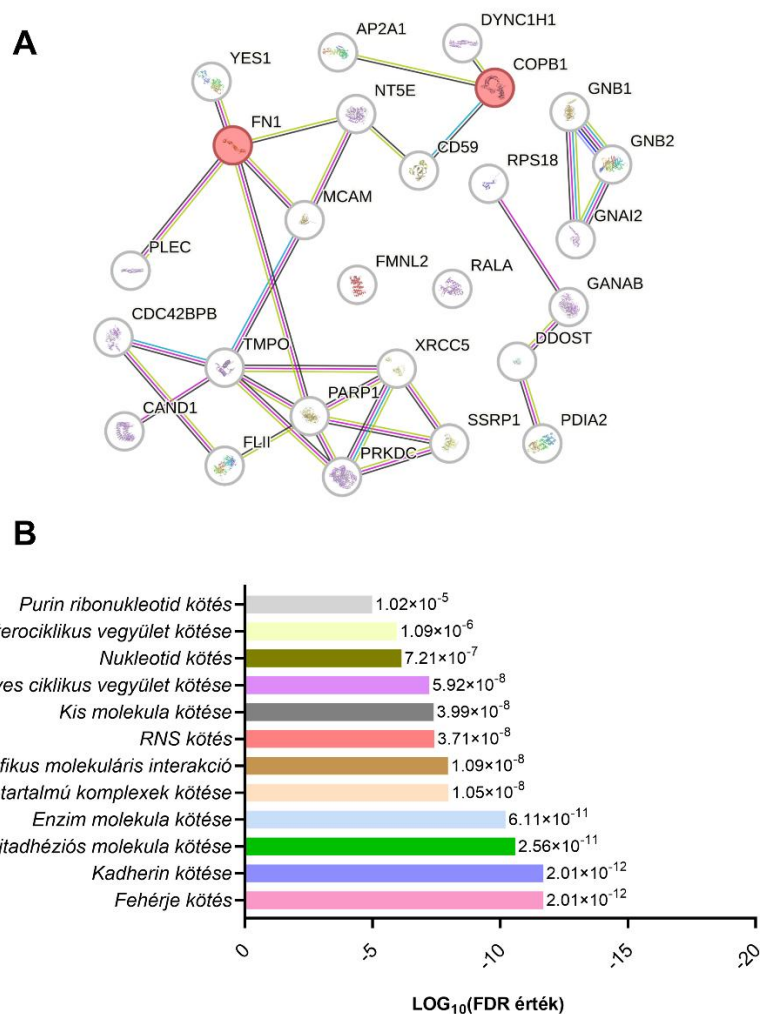
5. ábra: A bakteriálisan termeltetett, helyspecifikusan biotinilált rekombináns humán TG2 (N-BAP-biotin rhTG2) interaktom azonosításának kísérleti sémája HUVEC sejtkivonatból.

5. táblázat: High Capacity Neutravidin agaróz gyöngyhöz nem specifikusan kötődő fehérjék HUVEC sejtkivonatban (kontrollok, amik levonásra kerültek a mintákból). A rövidítések fehérjeneveket jelölnek STRING analízis alapján.

ACTB	CPT1A	H1-2	HSP90AB1	LMO7	PFN1	RPN2	SPTBN1
ACTG1	CRIP2	H1-3	HSP90B1	LMO7B	PGK1	RPS11	SRP14
ACTN1	CTNNA1	H1-4	HSPA1L	MACROH2A1	PHB1	RPS12	SUPT16H
ACTN4	CSE1L	H1-5	HSPA5	MAPK3	PKM	RPS16	SVIL
AHNAK	DBN1	H2AC11	HSPA8	MATR3	PLEC	RPS17	SYNCRIP
ALB	DDX17	H2AC4	HSPB1	MSN	PPIA	RPS19	SYNE2
ALDOA	DDX3X	H2AC6	HSPD1	MTDH	PPP1R12A	RPS2	SYNPO
ANPEP	DHX15	H2AJ	IGF2BP3	MTHFD1	PTBP1	RPS25	TAGLN2
ANXA1	DHX9	H2BC12	IGKV2D-24	MVP	RASIP1	RPS27A	TALDO1
ANXA2	EEF1A1	H2BC18	IGKV2D-26	MYH10	RBBP4	RPS3	TARDBP
ANXA5	EEF1D	H2BC4	ILF3	MYH14	RBM14	RPS3A	TGM2
ANXA6	EEF1E1	H2BC9	IQGAP1	MYH9	RBMX	RPS4X	THBS1
ATP1A1	EEF1G	H3C1	ITGB1	MYL12B	RPL10A	RPS5	THRAP3
ATP2A2	EEF2	H4C1	KPNB1	MYL6	RPL11	RPS6	TLN1
ATP5F1A	EFHD2	HIGD1A	KRT1	MYO1C	RPL12	RPS7	TPM3
ATP5F1B	EHD1	HMGA1	KRT10	MYO1D	RPL13	RPS8	TPP1
ATP5PO	EHD2	HMGA2	KRT14	MYO1E	RPL13A	RPS9	TUBA1A
CAD	EHD4	HNRNPA1	KRT18	MYO5A	RPL14	RPSA	TUBA1B
CALM1	EIF3M	HNRNPA2B1	KRT2	MYO6	RPL15	RRBP1	TUBB
CALR	EIF4A1	HNRNPA3	KRT5	MYOF	RPL17	RSL1D1	TUBB4B
CANX	ELAVL1	HNRNPC	KRT6A	NAP1L1	RPL18	S100A11	TUBB6
CAP1	ENG	HNRNPD	KRT6B	NCL	RPL18A	SEC22B	TXNDC5
CAVIN1	ENO1	HNRNPDL	KRT7	NES	RPL19	SEC23A	UBA1
CFL1	EWSR1	HNRNPF	KRT77	NONO	RPL23	SERPINH1	UBB
CKAP4	FARSA	HNRNPH1	KRT8	NPM1	RPL23A	SFPQ	UBC
CLIC1	FERMT3	HNRNPK	KRT9	PA2G4	RPL24	SLC25A11	VAT1
CLTC	FLNA	HNRNPL	KTN1	PABPC1	RPL3	SLC25A3	VCP
CNN2	FLNB	HNRNPM	LDHA	PABPN1	RPL4	SLC25A5	VDAC2
COLGALT1	FLNC	HNRNPR	LETM1	PCBP1	RPL6	SLC25A6	VIM
COPG1	GAPDH	HNRNPU	LGALS1	PCMT1	RPL7	SND1	XRCC6
CORO1B	GBE1	HNRNPUL2	LIMA1	PDIA3	RPL7A	SNX2	YBX1
CORO1C	GLIPR2	HP1BP3	LMNA	PDIA6	RPL8	SPCS2	ZNF185
CPS1	GLRX3	HRNR	LMNB1	PDLIM7	RPLP0	SPECC1L	
CPT1A	GSTP1	HSP90AA1	LMNB2	PFKP	RPN1	SPTAN1	

A kontroll levonása után 169 TG2-asszociált fehérjét azonosítottunk (6. táblázat). Ezek közül 11 már ismert TG2-interakciós fehérje volt a TRANSDAB adatbázis alapján (az összes találat 6,5 %-a; COPA, COPB1, CYB5R3, DNAJA1, FN1, MMP1, PRDX1, TUBB3, TUBB4A, ZYX, VCL), ami alátámasztja módszerünk megbízhatóságát. A TG2 fehérjével kapcsolatba lépő fehérjetalálatok hálózatát STRING adatbázis segítségével vizualizáltuk úgy, hogy a leggyakrabban előforduló fehérjetalálatokat a legalább ötször detektált egyedi peptid száma alapján szűrtük ki, ami így egy 26 fehérjéből álló hálózatot eredményezett (az összes találat 15,4 %-a; 6A. ábra). A STRING-elemzés több kapcsolatot is tartalmazó fehérjehálózatot mutatott, ami arra utal, hogy ezek a fehérjék ténylegesen képesek kötődni egymáshoz, és komplexeket alakítva különféle biológiai folyamatokban játszhatnak szerepet. Az analízis nem eredményezett dúsuló GO *Molekuláris funkciókat*, de a leginkább dúsuló GO *Sejtkompartmentumok* a *Fokális adhézió*, az *Extracelluláris exoszóma*, a *Vezikula*, a *Membránfelület* és az *Extracelluláris tér* voltak (7. táblázat), melyek alátámasztják az exoszomális vezikulák segítségével történő TG2 externalizáció lehetőségét HUVEC sejtekből. A TG2-asszociált fehérjék sejtmembránokhoz való kötöttsége összefügg a TG2 jelátviteli, illetve transzportfolyamatokban betöltött szerepével, például az MCAM fehérje hozzájárul az endotéliális monoréteg kohéziójához. Számos interakciós fehérje szerepet játszik a sejtek közötti interakciók kialakulásában, a sejtek és az extracelluláris mátrix közötti kapcsolatokban, valamint a citoszkeleton átrendeződésében (FLII, CDC42BPS, DYNC1H1, PLEC, FN1, FMNL2). A fehérjetalálatok között szerepelnek membrán, illetve vezikuláris fehérjék is (CD59, NT5E, COPB1, AP2A1). Ezen túlmenően, ezek közül a TG2-asszociált fehérjék közül néhány transzmembrán transzportot szabályozó fehérje (GNB1, GNB2, GNAI2), mások részt vesznek a sejtciklus szabályozásában és a DNS-javításban (TMPO, PARP1, SSRP1, XRCC5, RALA).

Az N-BAP-biotin rhTG2-asszociált fehérjék teljes listájának (nem csak a legalább ötször, hanem a kevesebbszer detektált egyedi peptidet tartalmazó fehérjék is) elemzése hasonló eredményekhez vezetett és a legjobban dúsuló GO *Molekuláris funkciók* (8. táblázat; 6B. ábra) között szerepel a *Kadherin kötődés* és a *Sejtadhéziós molekula kötés*, amelyek a TG2 sejtadhézióban és migrációban betöltött szerepét erősítik. Az *RNS-kötés*, mint GO *Molekuláris funkció* dúsulása, azonban egy új jelenség a TG2 interakciós partnerek kontextusában.



6. ábra: A detektált egyedi peptidszámok alapján a leggyakrabban előforduló TG2-asszociált fehérjék interakciós hálózata és a biotinilált rekombináns TG2 fehérje azonosított interakciós partnereinek GO Molekuláris Funkciói. (A) Az egyedi peptidek száma alapján leggyakrabban előforduló TG2 fehérjéhez asszociált partnerek fehérje-interakciós hálózatát a String v12.0 segítségével térképeztük a Homo sapiens referencia-adatbázishoz viszonyítva, amely mind az ismert, mind a feltételezett interakciókat mutatja. Az alapértelmezett küszöbérték értéke 0,4-re volt beállítva (<https://string-db.org/>, 2025. június 6-án letöltve). Azok a TG2 interakciós partnerek tekinthetők a leggyakrabban előfordulóknak, melyeket legalább ötször detektált egyedi peptiddel azonosítottunk a kísérlet során. A piros csomópontok a már ismert TG2 interakciós partnereket jelölik. (B) Az oszlopdiaagram a TG2-asszociált fehérjék leggyakoribb GO Molekuláris Funkcióit mutatja be, a STRING adatbázis által számolt FDR érték alapján.

6. táblázat: A HUVEC sejtkivonatból azonosított N-BAP-biotin rhTG2-asszociált fehérjék listája High Capacity Neutravidin agaróz gyönggyel izolálva. A rövidítések fehérjeneveket jelölnek STRING analízis alapján.

PLEC1	CDC42BPB	COPA	HK1	UBA52	DNAJA1	NUP93	STING1
DYNC1H1	GANAB	CTNND1	IGF2R	UNCA45A	DST	OCIAD2	STOM
GNAI2	MCAM	CTSB	IPO5	VPS35	EFEMP1	PAPSS2	SUN2
GNB1	YES1	GNG12	KIF5B	ZYX	FBL	PHGDH	SURF4
NT5E	ATAD3A	GSN	LARS1	ACIN1	FHL2	PLAG1	TCIRG1
PARP1	EIF3A	HDLBP	LRPPRC	AHNAK2	FKBP1A	PLOD2	TGFB1I1
SSRP1	EIF3CL	HYOU1	MCM7	AKAP2	G3BP1	PPP1CC	TIMM50
RPS18	EMD	PCBP2	MMP1	AP2B1	GALK1	PRDX1	TJP2
XRCC5	H2BC17	PDCD6IP	MYADM	ARHGAP32	GARS1	PRDX6	TMED10
CD59	IFI16	PFKL	MYO1B	ATP5F1C	GLG1	PSMD2	TMED9
FMNL2	MBOAT7	RPS26	NOP56	BRCA1	H2AC14	RAB11B	TOP2B
FN1	PHB2	UQCRC2	NOP58	CAPN1	H2AZ1	RAB7A	TPM1
PRKDC	QARS1	VDAC1	PDLIM5	CAPZA2	HEXA	RAC2	UBAP2L
COPB1	RACK1	ATP6V1B2	RAB10	CCDC175	HNRNPAB	RAP1A	UNC45A
DDOST	TTN	CAPZB	RAN	CCT3	HSPA4	RHOC	VCL
FLII	UQCRC1	CAV1	RPL5	CDC42	ITGA3	SEC62	VDAC3
GNB2	YWHAZ	DLD	SFXN1	CDCP1	ITGA5	SFXN3	
PDI	ACAT1	ERLIN1	SPRED2	CLEC19A	KHSRP	SLTM	
RALA	ACLY	ESYT1	TNPO1	CNTRL	LMAN1	SMC1A	
TMPO	ANXA	ESYT2	TRPV2	COL5A2	MAP1B	SRSF1	
AP2A1	ARHGDIA	FASN	TUBB3	CYB5R3	MARS1	SRSF3	
CAND1	CAPZA1	H1-0	TUBB4A	DLST	MGST3	SSR4	

7. táblázat: Az N-BAP-biotin-rhTG2-asszociált fehérjék legjobban dúsuló GO *Sejtkompartmentumok* a STRING adatbázis alapján (Eredeti név a bal oldalon, a jobb oldalon a magyar nyelvű megfelelő kifejezés; GO ID, úgymint gén ontológiai kifejezés azonosítója).

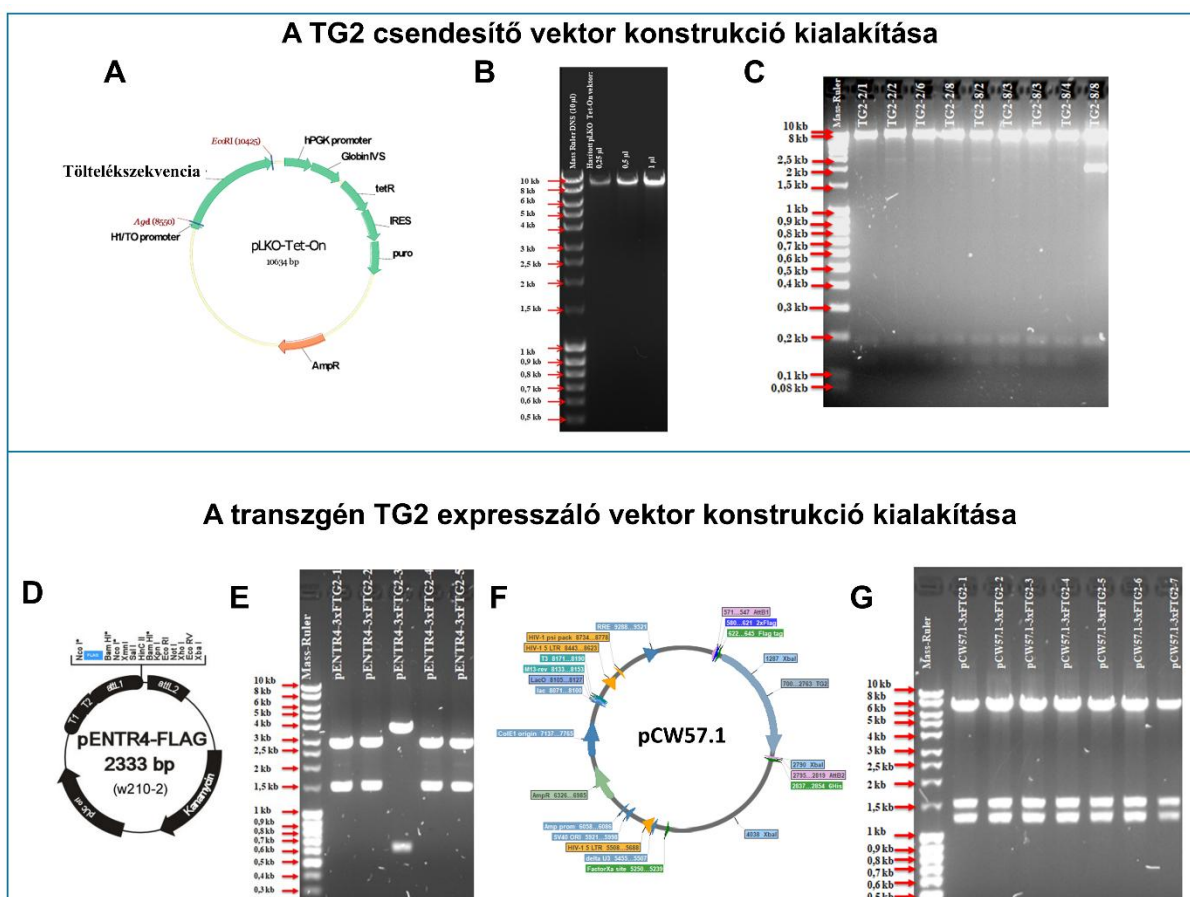
#GO ID	GO kifejezés megnevezése	
GO:0005925	Focal adhesion	Fokális adhézió
GO:0031982	Vesicle	Vezikula
GO:0070062	Extracellular exosome	Extracelluláris exoszóma
GO:0098552	Side of membrane	Membránfelület
GO:0005615	Extracellular space	Extracelluláris tér

8. táblázat: Az N-BAP-biotin-rhTG2-asszociált fehérjék legjobban dúsuló GO Molekuláris funkciók a STRING adatbázis alapján (Eredeti név a bal oldalon, a jobb oldalon a magyar nyelvű megfelelő kifejezés).

#GO ID	GO kifejezés megnevezése	
GO:0005515	Protein binding	Fehérje kötés
GO:0045296	Cadherin binding	Kadherin kötés
GO:0050839	Cell adhesion molecule binding	Sejtadhéziós molekula kötése
GO:0019899	Enzyme binding	Enzim molekula kötése
GO:0044877	Protein-containing complex binding	Fehérje-tartalmú komplexek kötése
GO:0005488	Binding	Specifikus molekuláris interakció
GO:0003723	RNA binding	RNS kötés
GO:0036094	Small molecule binding	Kis molekula kötése
GO:0097159	Organic cyclic compound binding	Szerves ciklikus vegyület kötése
GO:0000166	Nucleotide binding	Nukleotid kötés
GO:1901363	Heterocyclic compound binding	Heterociklikus vegyület kötése
GO:0032555	Purine ribonucleotide binding	Purin ribonukleotid kötés

6.1.2. 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. Ez esetben a TG2 fehérjét tartalmazó fehérjekomplexeket élő sejtekben történő összeszerelődésüket követően izoláltuk. A TG2 fehérjét az N-terminálisan túlnyúló 3xFlag jelöléssel láttuk el annak érdekében, hogy az interakciós partnerekkel fedett TG2 fehérje nagyobb hatékonysággal legyen izolálható, elkerülve azt, hogy a TG2 specifikus antitestek az epitópokhoz kötődésükkel megváltoztassák a TG2-asszociált fehérjekomplexek összetételét. Kifejlesztettünk két új HUVEC sejtvonalat, amely közül az egyikben az endogén TG2 fehérjét egy shRNS (TG2-KD) segítségével lecsendesítettük, míg a másikban egy hármas Flag-címkével ellátott transzgén TG2 fehérjét (3F-TG2) expresszáltunk a kialakított TG2-KD sejtvonalban a már leírt módszer segítségével. A konstrukciók kialakítását, ellenőrzését a 7. ábra mutatja be. A transzgén expresszáló vektor kialakítás során a restriktációs endonukleáz és szekvenálás eredménye alapján pENTR4-3FTG2-2 klónt választottuk, majd a sikeres rekombinációt követően újabb endonukleáz hasítás és szekvenálás után a pCW57.1-3xFTG-2, 3 és 4 klónokkal dolgoztunk.



7. ábra: A csendesítő, illetve a transzgén expresszáló vektor konstrukciók kialakításának, ellenőrzésének lépései. (A) A kísérlet során alkalmazott pLKO-Tet-On csendesítő vektor térképe a töltelék szekvenciával. (B) A felnyitott pLKO-Tet-On csendesítő vektor méretének és tisztaságának az ellenőrzése 1 % agaróz gélelektroforézis alkalmazásával etidium-bromid festés után. 8800 bp a vektor várt mérete. (C) A csendesítő szekvenciát tartalmazó pLKO-Tet-On vektor hasítási eredménye XhoI restriktós endonukleáz kezelés után, 2 % agaróz gélelektroforézissel etidium-bromid festés után. Jó konstrukciók esetében a fragmentek méretei 8447, 190 és 136 bp voltak. (D) A pENTR4-3Flag vektor térképe. (E) A pENTR4-3Flag vektor XbaI restriktós endonukleázzal való hasítás utáni ellenőrzése, 1% agaróz gélelektroforézis alkalmazásával etidium-bromid festés után. Megfelelő fragmentek a 2907 és 1503 bp méretűek. (F) A pCW57.1-3F-TG2 transzfer vektor térképe. (G) A létrehozott transzfer vektor XbaI restriktós endonukleáz kezeléssel kapott hasítási eredménye. Várt fragmentméretek a 7171, 1503 és 1248 bp.

A Flag-címke segíti a TG2 fehérjét tartalmazó, natív körülmények között kialakuló fehérjekomplexek izolálását és későbbi kimutatását. A csendesítő rövid szekvencia kifejezetten az endogén TG2 mRNS nem transzlált régióját (UTR) célozta meg, és a csendesítés nem befolyásolta az ettől különböző UTR régiókkal rendelkező transzgénnek az expresszióját, ami lehetővé tette a TG2-KD sejtvonalban a TG2 transzgén kifejeződését. A HUVEC sejtekben a TG2 fehérje hiányának vagy alacsony szintjének potenciális negatív következményeit indukálható csendesítéssel próbáltuk kiküszöbölni. Az egyidejű doxiciklin-függő TG2 csendesítéshez és transzgén expressziójához (DOX-ON) lentivirális vektorok használatával transzdukáltuk a sejteket a megfelelő hatékonyság elérése érdekében (8A. ábra, séma).

Először, az endogén TG2 expresszió csengesítéséhez az immortalizált HUVEC sejtvonalba a Tet-On puro shTG2 vektort (amely a TG2 mRNS 3'UTR-t célozza meg) juttattuk be lentivirális transzdukcióval. Puromicin szelekció után három hetes doxiciklin indukcióval a TG2 szint csökkenését mind RNS, mind fehérje szinten megerősítettük TG2-knockdown HUVEC sejtvonalban (8B, C. ábra). A doxiciklin indukció nem változtatta meg a TG2 fehérje szintjét a kontroll sejtekben és a scramble szekvenciát tartalmazó HUVEC sejtekben (HUVEC SCR), míg az shTG2 szekvencia jelentősen csökkentette a TG2 fehérje mennyiségét a TG2-KD HUVEC sejtekben.

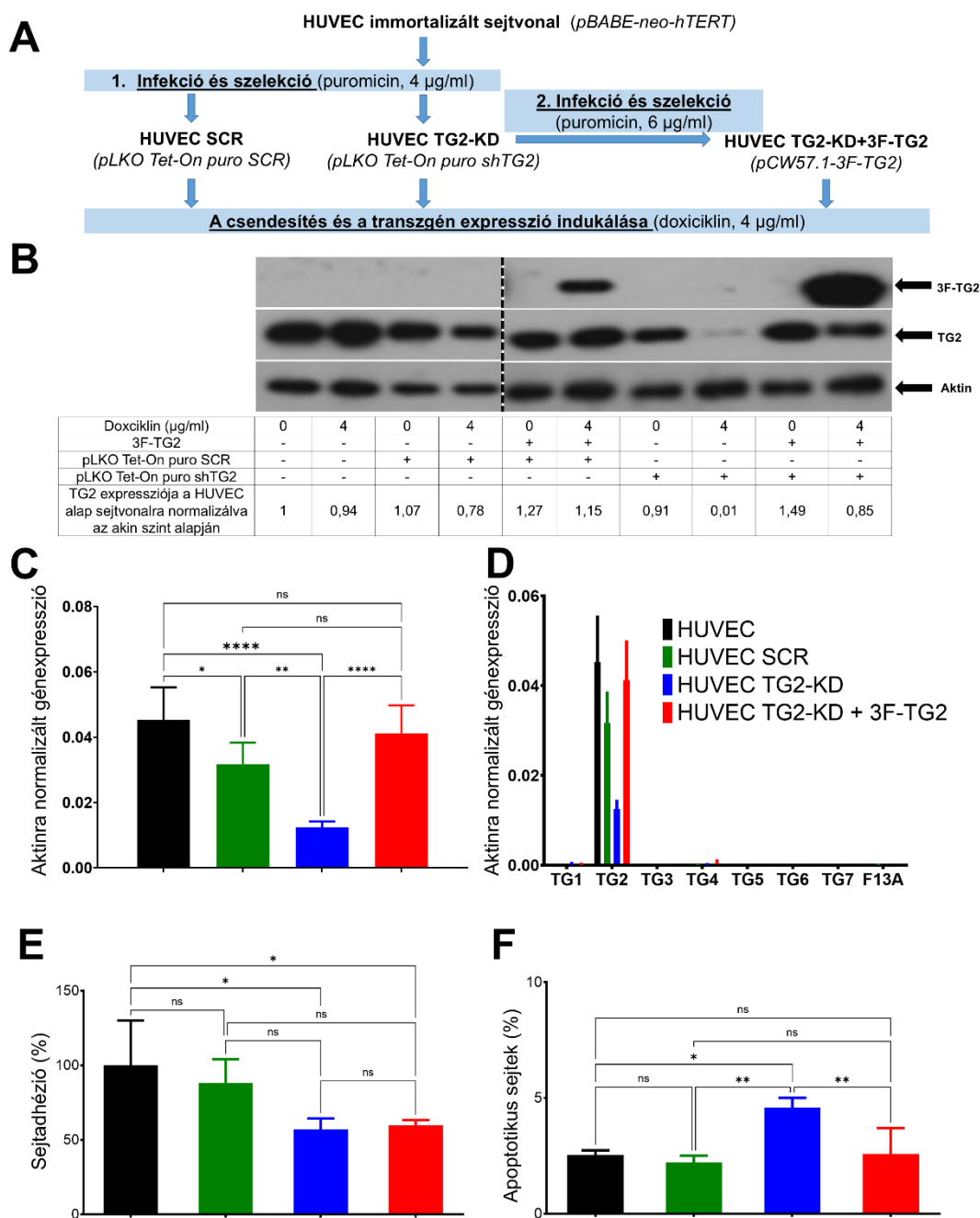
Ezután a 3F-TG2 fehérjét kódoló szekvenciát tartalmazó Tet-indukálható vektort egy második lentivirális géntranszfer útján juttattuk be a TG2-KD HUVEC sejtvonalba (HUVEC TG2-KD+3F-TG2). Mindkét Tet-indukálható konstrukció puromicin-rezisztenciát tartalmazott, így a második transzdukciót követően a szelekció érdekében magasabb puromicin-szintet alkalmaztunk. A szelekció, majd a háromhetes doxiciklin-indukció után az RT-qPCR és a Western blot eredmények kimutatták, hogy a transzgén 3F-TG2 bejuttatása helyreállította a TG2 szintjét mind RNS, mind fehérje szinten a létrehozott HUVEC TG2-KD+3F-TG2 sejtvonalban (8B, C. ábra). Ellenőriztük, vajon a TG2 fehérje csökkenését próbálja-e kompenzálni a sejt más transzglutamináz családtag emelkedett expressziójával, de a többi családtag expressziós szintjeit sem a csengesítés, sem a transzgén TG2 jelenléte nem befolyásolta (8D. ábra).

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

A kifejlesztett sejtvonalak funkcionális jellemzése érdekében először egy TG2-függő endotéliális tulajdonságot, a letapadási képességet vizsgáltuk fibronektinnel fedett felületen.

Bizonyított, hogy a TG2 csendesítése vagy a TG2 aktivitásának gátlása negatívan befolyásolja a sejtek adhézióját a fibronektinnel fedett felszínen **(Nadalutti és mtsai, 2011)**. Esetünkben a TG2-KD HUVEC sejtek alacsonyabb sejtadhéziós tulajdonságokat mutattak, mint a nem módosított HUVEC és HUVEC SCR sejtek (8E. ábra), bár ez a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. A 3F-TG2 bejuttatása nem tudta kompenzálni a megfigyelt csökkenést a sejtadhéziós folyamatokban, aminek az oka talán a transzgén fehérje viszonylag nagy, hidrofób 3xFlag jelölése lehet.

Ismert továbbá, hogy a TG2 csendesítése növeli az apoptotikus HUVEC sejtek arányát **(Nadalutti és mtsai, 2011)**. Eredményeink összhangban vannak ezzel a korábbi megfigyeléssel, hiszen a TG2-KD HUVEC sejtekben az apoptotikus sejtek aránya magasabb, mint a kontroll és a 3F-TG2-kompenzált sejtvonalakban (8F. ábra), ami arra utal, hogy a transzgén TG2 kompenzálhatja az endogén TG2 csendesítés hatását. Valószínűleg ez esetben nem befolyásolja a molekuláris folyamatokat az N-terminálison lévő jelentősen hidrofil szakasz jelenléte.



8. ábra: A Tet-indukálható 3xFlag-TG2 (3F-TG2) fehérjét expresszáló és az endogén TG2 fehérjét csendesített HUVEC sejtvonal kialakítása és karakterizálása. (A) A sejtvonalak kialakításának sematikus ábrája. A HUVEC TG2-KD sejtvonal létrehozása érdekében az immortalizált HUVEC sejtvonalba lentivirális géntranszfer alkalmazásával juttattuk be a pLKO Tet-On puro shTG2 vektort. A sikeres csendesítés igazolása után, egy másik infekció segítségével juttattuk be a transzgén 3F-TG2 fehérjét kódoló pCW57.1-3F-TG2 vektort, a HUVEC TG2-KD+3F-TG2 sejtvonal kialakításához. (B) Az endogén TG2 csendesítés és a 3F-TG2 transzgén expresszió monitorozása Western blottal. A doxiciklin indukció alatt a TG2 fehérje mennyiségét

vagy anti-TG2 vagy anti-Flag antitest alkalmazásával ellenőriztük. A TG2 expresszió szintjét beta-aktin fehérjére normalizáltuk. Reprezentatív kép (n=2). (C) A kialakított sejtvonalakban a TG2 mRNS szintet valós idejű qPCR technikával mértük. Kontrollként beta-aktin fehérjét használtunk. (D) A TG2 csendesítés hatása a transzglutamináz enzimcsalád tagjainak expressziós szintjeire. (E) Az endogén TG2 csendesítés és a transzgen expresszió hatása a HUVEC sejtek adhéziós képességére. (F) A TG2 csendesítés és annak kompenzálásának hatása az apoptotikus sejtek arányára. A sejteket Annexin-V és propidium-jodid festéssel jelöltük. A statisztikai szignifikanciákat egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg Tukey post hoc teszttel (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

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

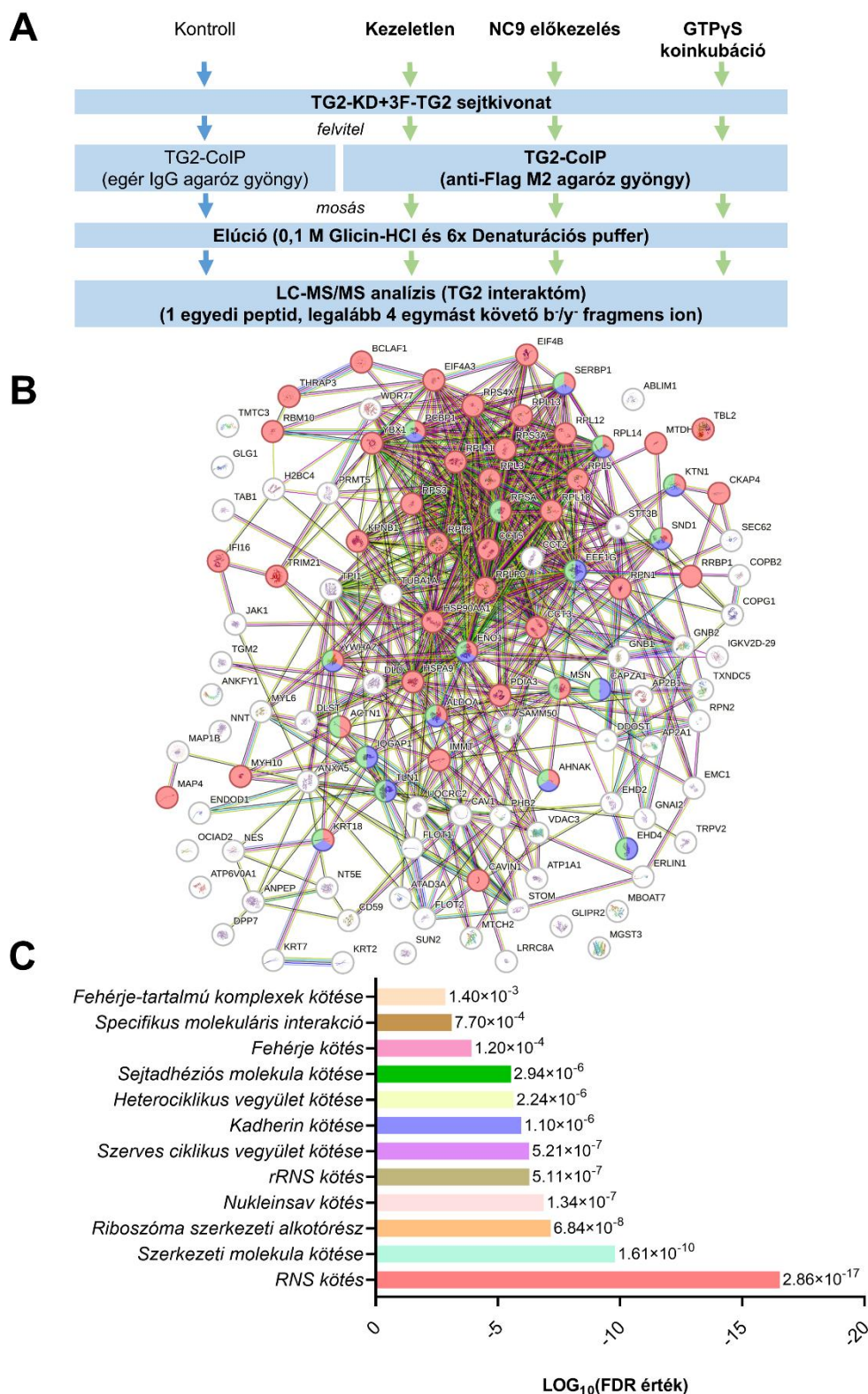
A sejtekben összeszerelődő TG2 tartalmú komplexek feltárása érdekében endogén TG2-csendesített és 3F-TG2 fehérjét expresszáló HUVEC sejt extraktumát használtuk (9A. ábra, séma). Anti-FLAG M2 agaróz gyöngy alkalmazásával izoláltuk a TG2-t tartalmazó fehérjekomplexeket a 3xFlag-jelölés segítségével. Az anti-FLAG M2 antitest sokkal nagyobb affinitással kötődik a TG2 fehérjén található hármassal Flag-jelöléshez, összehasonlítva egy egyszeres Flag-jelöléssel vagy egy tipikus antitest-antigén kölcsönhatással (**Ranawakage és mtsai, 2019**). Kontrollként eger IgG-agaróz gyöngyöt alkalmaztunk, hogy megismerjük a HUVEC sejt extraktumból az anti-FLAG M2 agaróz gyöngyhez nem specifikusan kötődő fehérjéket. LC-MS/MS elemzést követően a kontroll fehérjéket (9. táblázat) ez esetben is levontuk az anti-FLAG M2 agaróz gyöngy segítségével azonosított találati listából, bár számuk kevesebb volt, mint a neutravidin-agaróz esetében azonosított kontroll fehérjék száma. A kontroll kivonása után 356 TG2-asszociált fehérjét azonosítottunk (10. táblázat), amelyek közül 86-ot mind a Neutravidin agarózzal végrehajtott affinitás kromatográfiával, mind pedig az anti-FLAG M2 agaróz gyönggyel is azonosítottunk (11. táblázat). Összesen 114 fehérje (a találatok 32%-a) volt kimutatható legalább ötször detektált egyedi peptiddel, amelyeket a megközelítésünk alapján a gyakrabban detektált interakciós partnerek közé sorolhatunk (9B. ábra). A teljes fehérjetalálati lista 19 (5,3%) már ismert TG2-asszociált partnert tartalmaz: TLN1, TUBA1A, H2BC4, COPG1, YWHAZ, COPB2, CALR, CD44, OSBPL3, ITGA2, ITGA6, ITGB1, MYOF, TUBA1C, UGGT1, YWHAK, APMAP, CANX, TUBB4A (**TRANSDAB, és Kanchan és mtsai, 2015 alapján**).

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

A legalább ötször detektált egyedi peptidet tartalmazó TG2-asszociált fehérjék STRING adatbázissal történő interakciós elemzése (12. táblázat; 9C. ábra) alapján a leggyakrabban dúsuló GO *Molekuláris funkciók* között volt a *Szerkezeti molekula aktivitás*, a *Kadherin kötés* és a *Sejtdhéziós molekula kötés*, alátámasztva a TG2 hozzájárulását a sejtdhézióhoz, migrációhoz, proliferációhoz, kadherin kötődéshez és citoszkeleton átrendeződéshez. Ezek a folyamatok olyan endotéliális, fiziológiai funkcióknak a fenntartásához elengedhetetlenek, mint például az adhézió, a sejt-sejt kapcsolatok és az angiogenezis.

Újszerű megközelítésünkkel, a kialakított transzgen TG2 fehérjét expresszáló HUVEC sejtvonal segítségével egy átfogóbb listát állítottunk össze a TG2 fehérjéhez kapcsolódó fehérjéről, amelyek a TG2 fehérjével együttműködhetnek az endotéliális funkciók végrehajtásában. Meglepő módon a legjobban dúsuló GO *Molekuláris funkció* mind a teljes lista, mind a gyakrabban, legalább 5 detektált, egyedi peptidet tartalmazó interakciós fehérjék esetében az *RNS-kötés* volt. A TG2 interaktom elemzését elvégeztük a keratinok (KRT-k) és a riboszómális fehérjék (RPL-ek és RPS-ek) kizárásával is, amelyek általában a sejtekben a leggyakrabban előforduló fehérjék, és nem specifikus interakciós fehérjeként azonosíthatóak, azonban az eredmény változatlan maradt.

A 3F-TG2 fehérjéhez asszociált fehérjetalálatokból nyert adatok szintén alátámasztják a TG2 részvételét a HUVEC sejtek vezikuláris transzportjában, ami mind a sejtfelszín apikális, mind bazális oldalán elengedhetetlen az endotéliális fiziológiai funkciók fenntartásához. A legjobban dúsuló 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 (Shinde A. és mtsai., 2020).



9. ábra: A koimmunprecipitáció munkafolyamata, valamint a legnagyobb számban detektált 3F-TG2-asszociált fehérjék legjobban dúsuló GO Molekuláris funkciói és interakciós hálózata anti-FLAG M2 agaróz gyöngy alapú koimmunprecipitáció

után. (A) A nyitott és zárt állapotú 3F-TG2 fehérje interakomjának azonosítása érdekében a sejtek feldolgozását megelőző 24 órában NC9 inhibitoros előkezelést alkalmaztunk, vagy a sejtizátumot inkubáltuk GTP γ S modulátorral, mert az nem penetrál a sejtbe. Eluálást követően a mintákat LC-MS/MS analízisre küldtük. (B) A fehérjék interakciós hálózatát a Homo Sapiens referencia adatbázis segítségével elemeztük a STRING V12.0 bioinformatikai adatbázis alkalmazásával. A hálózat tartalmaz ismert és prediktált fehérjeinterakciókat is az LC-MS/MS analízis során, legalább ötször detektált egyedi peptidet tartalmazó fehérjetalálatok között (színekódok: piros=RNS kötés; lila=Kadherin kötés; zöld=Sejtadhéziós molekula kötés). (C) Az oszlop diagramm a legjobban dúsuló GO Molekuláris funkciókat mutatja a STRING adatbázisból származó FDR érték alapján.

9. táblázat: Az azonosított nem specifikusan kötődő fehérjék listája egér IgG agaróz gyöngy alkalmazásával HUVEC sejt kivonatból. A rövidítések fehérjeneveket jelölnek STRING analízis alapján.

ACTB	CTNNA1	G3BP1	HNRNPDL	KHSRP	PABPN1	RPL7	SRSF10
ACTBL2	CTTN	GAPDH	HNRNPF	KRT1	PDIA6	RPL7A	STK31
ACTG1	DBN1	GSTP1	HNRNPH1	KRT10	PDLIM7	RPS11	SYNCRIP
ACTN4	DDX1	H1-2	HNRNPH3	KRT9	PFN1	RPS12	TAF15
ANXA1	DDX17	H1-3	HNRNPK	LDHA	PGK1	RPS18	TARDBP
ANXA2	DDX3X	H1-4	HNRNPL	LETM1	PHB1	RPS20	TFG
ARHGDIA	DDX5	H1-5	HNRNPM	LGALS1	PLEC	RPS27A	TKT
ATP5F1A	DERPC	H2AC11	HNRNPR	LMNA	PLS3	RPS5	TPM1
ATP5F1B	DHX9	H2AC20	HNRNPU	LMO7	PPIA	RPS6	TUBA1B
BRCA2	EEF1A1	H2AC4	HNRNPUL1	MACROH2A1	PRDX1	RPS8	TUBB
CALM1	EEF2	H2AJ	HNRNPUL2	MATR3	PRDX6	RPS9	TUBB4B
CAPRIN1	EIF4A1	H2BC12	HSD17B4	MRPL28	PSPC1	RTCB	TUBB6
CAPZA2	EIF4A2	H2BC17	HSP90AB1	MVP	PTBP1	SAFB	UBA1
CARM1	EIF4G1	H2BC18	HSP90B1	MYH9	RASIP1	SEC23A	UBAP2L
CCAR2	ELAVL1	H2BC9	HSPA5	MYL12B	RBM14	SFPQ	UBB
CFL1	EMD	H3C1	HSPA8	MYO1C	RBMS1	SH3GLB2	VCP
CLIC1	EWSR1	H4C1	HSPB1	MYO1D	RBMS2	SLC25A3	VIM
CLTC	FAM120A	HMGA1	HSPD1	MYO6	RBMX	SLC25A5	XRCC6
CNGA1	FARSA	HNRNPA1	HSPG2	NCL	RPL15	SLC25A6	XRN2
CNN2	FLNA	HNRNPA2B1	IGF2BP2	NONO	RPL18A	SNX9	ZNF185
COLGALT1	FLNB	HNRNPA3	IGF2BP3	NPM1	RPL19	SPCS2	ZYX
CORO1C	FLNC	HNRNPAB	IGKV2D-26	NUDT21	RPL24	SPECC1L	
CPSF7	FN1	HNRNPC	ILF3	PABPC1	RPL4	SPTAN1	
CRIP2	FUS	HNRNPD	KHDRBS1	PABPC4	RPL6	SPTBN1	

10. táblázat: A koimmunprecipitációval azonosított 3F-TG2-asszociált fehérjék HUVEC sejtekben anti-FLAG M2 agaróz gyöngy alkalmazásával (a háttér levonása után). A rövidítések fehérjeneveket jelölnek STRING analízis alapján.

ABCD1	CAPZB	EIF3A	ILF2	NAP1L1	RACK1	RPS7	TCIRG1
ABCD3	CAV1	EIF3B	IMMT	NAPA	RALA	RPSA	TCP1
ABLM1	CAVIN1	EIF3I	IQGAP1	NES	RALY	RRBP1	TGM2
ACAP2	CCAR1	EIF3L	ITGA2	NNT	RAN	RSL1D1	THBS1
ACIN1	CCT2	EIF3M	ITGA6	NOP2	RB1CC1	S100A11	THRAP3
ACTN1	CCT3	EIF4A3	ITGB1	NOP56	RBM10	SAMM50	TICAM2
ACTR1A	CCT4	EIF4B	ITPR3	NOP58	RER1	SART1	TLN1
ACTR3	CCT5	EMC1	JAK1	NT5E	RHOC	SEC11A	TMED10
ADRM1	CCT8	EMC2	KCTD12	OCIAD2	RNH1	SEC22B	TMED9
AHNAK	CD44	ENDOD1	KCTD5	OSBPL3	ROCK1	SEC62	TMEM43
AKAP2	CD55	ENO1	KIF11	PA2G4	RPL10	SERBP1	TMOD3
ALB	CD59	ERLIN1	KIF5B	PARP1	RPL10A	SERPINE1	TMPO
ALDOA	CDC25C	ERLIN2	KIF5C	PCBP1	RPL11	SERPINH1	TMTC3
ALYREF	CDC42	ERMP1	KPNB1	PCBP2	RPL12	SF3B1	TP11
ANKFY1	CDC42BPB	ESYT1	KRT16	PDIA3	RPL13	SF3B3	TPM4
ANO10	CDC5L	FERMT3	KRT18	PFKP	RPL13A	SFXN1	TPP1
ANPEP	CHTOP	FLII	KRT2	PHB2	RPL14	SFXN3	TRA2B
ANXA5	CKAP4	FLOT1	KRT6A	PHGDH	RPL17	SLC12A4	TRIM21
ANXA6	CMAS	FLOT2	KRT7	PHLDB1	RPL18	SLC25A11	TRIM28
AP2A1	COL5A2	FMNL2	KTN1	PHOX2B	RPL21	SLC25A24	TRPV2
AP2A2	COPB2	FSCN1	LBR	PICALM	RPL23	SLC2A1	TUBA1A
AP2B1	COPG1	FXR1	LDHB	PIGR	RPL23A	SMCHD1	TUBA1C
APMAP	COPS3	GANAB	LIMA1	PIK3C2A	RPL26	SND1	TUBB4A
APOA1	CPT1A	GDI2	LMAN1	PKM	RPL27A	SNRNP200	TXNDC5
ARCNI	CTNND1	GLG1	LMNB1	PLAT	RPL29	SRP14	UBA52
ATAD3A	CTSB	GLIPR2	LMNB2	PLOD2	RPL3	SRRT	UGGT1
ATP13A1	CSRP1	GNAI2	LRPPRC	PLOD3	RPL31	SRSF1	UQCRC1
ATP1A1	DCTN1	GNB1	LRRC8A	PPM1B	RPL34	SRSF3	UQCRC2
ATP2A2	DDOST	GNB2	LRRC8C	PPP1CA	RPL35	SRSF6	VAPA
ATP5F1C	DDX23	GNG12	MAGT1	PPP1CB	RPL36A	SRSF7	VARS1
ATP6AP1	DHCR7	GOLGA3	MAP1B	PPP1R12A	RPL5	SSRP1	VAT1
ATP6V0A1	DHX15	H1-0	MAP4	PPP1R18	RPL8	STING1	VDAC3
ATP6V0A2	DLD	H2AC6	MBOAT7	PRMT5	RPL9	STK38	WARS1
ATP6V0D1	DLST	H2BC4	MCAM	PRPF31	RPLP0	STOM	WDR77
ATP6V1B2	DNAJC11	HCLS1	MCM3	PRPF8	RPN1	STT3A	XRCC5
ATP6V1E1	DNHD1	HDLBP	MGST3	PRPS1	RPN2	STT3B	YBX1
BCLAF1	DPP7	HP1BP3	MLEC	PRPSAP1	RPS14	SUN2	YBX3
BST1	DYNC1H1	HSP90AA1	MSN	PTDSS1	RPS16	SUPT16H	YES1
C3	EEF1D	HSPA1L	MTCH2	QARS1	RPS19	SURF4	YWHAQ
CALD1	EEF1G	HSPA9	MTDH	RAB10	RPS2	SVIL	YWHAZ
CALR	EFHD2	IARS1	MYADM	RAB11B	RPS25	SYNE1	ZC3HAV1
CALU	EFTUD2	IFI16	MYH10	RAB14	RPS26	TAB1	ZMPSTE24
CANX	EHD2	IGF2BP1	MYH14	RAB5C	RPS3	TAF4	
CAP1	EHD4	IGKV2D-24	MYL6	RAB7A	RPS3A	TALDO1	
CAPZA1	EIF2S1	IGKV2D-29	MYOF	RAC2	RPS4X	TBL2	

11. táblázat: Mindkét módszerrel azonosított TG2-asszociált fehérjék (N-BAP-biotin-rhTG2 és 3F-TG2). A rövidítések fehérjeneveket jelölnek STRING analízis alapján.

ACIN1	CD59	ERLIN1	HDLBP	NOP58	RAB7A	SRSF1	TRPV2
AKAP2	CDC42	ESYT1	IFI16	NT5E	RAC2	SRSF3	TUBB4A
AP2A1	CDC42BPB	FLII	KIF5B	OCIAD2	RACK1	SSRP1	UBA52
AP2B1	COL5A2	FMNL2	LMAN1	PARP1	RALA	STING1	UQCRC1
ATAD3A	CTNND1	GANAB	LRPPRC	PCBP2	RAN	STOM	UQCRC2
ATP5F1C	CTSB	GLG1	MAP1B	PHB2	RHOC	SUN2	VDAC3
ATP6V1B2	DDOST	GNAI2	MBOAT7	PHGDH	RPL5	SURF4	XRCC5
CAPZA1	DLD	GNB1	MCAM	PLOD2	RPS26	TCIRG1	YES1
CAPZB	DLST	GNB2	MGST3	QARS1	SEC62	TMED10	YWHAZ
CAV1	DYNC1H1	GNG12	MYADM	RAB10	SFXN1	TMED9	
CCT3	EIF3A	H1-0	NOP56	RAB11B	SFXN3	TMPO	

12. táblázat: A kezeletlen mintában legjobban dúsuló GO Molekuláris funkciók az anti-FLAG M2 agaróz gyöngy esetében a STRING adatbázis alapján (Eredeti név a bal oldalon, a jobb oldalon a magyar nyelvű megfelelő kifejezés).

#GO ID	GO kifejezés megnevezése	
GO:0003723	RNA binding	RNS kötés
GO:0005198	Structural molecule activity	Szerkezeti molekula kötése
GO:0003735	Structural constituent of ribosome	Riboszóma szerkezeti alkotórész
GO:0003676	Nucleic acid binding	Nukleinsav kötés
GO:0019843	rRNA binding	rRNS kötés
GO:0097159	Organic cyclic compound binding	Szerves ciklikus vegyület kötése
GO:0045296	Cadherin binding	Kadherin kötés
GO:1901363	Heterocyclic compound binding	Heterociklikus vegyület kötése
GO:0050839	Cell adhesion molecule binding	Sejtadhéziós molekula kötése
GO:0005515	Protein binding	Fehérje kötés
GO:0005488	Binding	Specifikus molekuláris interakció
GO:0044877	Protein-containing complex binding	Fehérje-tartalmú komplexek kötése

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

A TG2 röntgenkristallográfiás kísérletek alapján fiziológiásan legalább két különböző konformációban fordulhat elő (Pinkas és mtsai, 2007), így nyitott vagy zárt állapotában

különböző kölcsönhatásokat képes kialakítani (Iismaa SE. és mtsai., 1997). A TG2 konformációváltozásának interakciós partnereire gyakorolt hatását vizsgálni modulátoros kezeléseket alkalmaztunk a koimmunoprecipitáció előtt vagy alatt (9A. ábra, séma). A TG2 nyitott konformációját a sejtek NC9 (Akbar és mtsai, 2017) 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 295, illetve 161 fehérjét azonosítottunk (13. és 14. táblázat). A találatok számának a csökkenése jelezte számunkra, hogy a modulátorok stabilizálják, és limitálják a kialakuló konformációs formák számát. GTP γ S jelenlétében az interakciós partnerek száma körülbelül 55%-os csökkenést (160 találat a kezeletlen esetben mért 356-hoz képest) mutatott, míg NC9 esetében ez a csökkenés 17%-os volt (294 találat a 356-hoz képest, ami körülbelül 17%-os csökkenést jelent), ami arra utal, hogy a zárt forma stabilizálása erőteljesebben befolyásolja a TG2-asszociált fehérjék számát. Ennek oka valószínűleg a csökkent felület és a kevésbé rugalmas szerkezeti dinamika lehet.

A 10A. ábra és a 15. táblázatsorozat bemutatja a TG2 interakciós partnereinek csoportosítását és számát az alkalmazott kísérleti beállítésekben (kezeletlen, NC9 kezelt, GTP γ S kezelt minták). A fehérje találatok nagy részét (a 396 detektált 3F-TG2-asszociált fehérje közül 138, azaz 34,8%) mindhárom kísérleti beállításban detektáltuk, ami arra utal, hogy az interakciós felületek többsége független a nyitott vagy zárt konformációtól, és mind a zárt, mind a nyitott formában jelen lévő felületi pozíciókhoz képes kötődni. 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 második legnagyobb csoport (122 találat) az interakciós fehérjék közül mind a kezeletlen, mind az NC9-kezelt TG2 fehérjéhez képes volt kötődni, valószínűleg azért, mert a TG2 nyitott konformációban lehet és így nagyobb felülettel rendelkezik. Ezek között a fehérjék között számos membrán transzporttal kapcsolatos találatot azonosítottunk a legjobban dúsuló GO *Molekuláris funkció* kategóriában, úgymint *Transzporter aktivitás*, *Ion transzmembrán transzporter aktivitás*, *ATPáz-kapcsolt kation transzmembrán transzporter aktivitás*, *Transzmembrán transzporter aktivitás*, *ATPáz-kapcsolt transzmembrán transzporter aktivitás*, *Elsődleges aktív transzmembrán transzporter aktivitás*, *Szervetlen molekuláris transzmembrán transzporter aktivitás*, *Kation transzmembrán transzporter aktivitás* résztvevő fehérjéket (16. táblázat; példa fehérjék: ATP13A1, ATP1A1/2A2, ATP5F1C, ATP6V0A1/2, ATP6V0D1, ATP6V1B2, ANO10, LRRC8A/C,

MGT1, SFXN1/3, SLC12A4, SLC25A11, SLC2A1, TRPV2, VDAC3). 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 interakciónban megfigyelt különbségek megerősítése érdekében elvégeztük az adatelemzést a PANTHER adatbázis segítségével is (10B-D. ábra). 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 (4 találat, 1,36%; ATP5F1A, CLIC1, PLS3, VAT1) a kezeletlen és NC9-kezelt mintákhoz képest (24 találat, 4,26% [APOA1, SFXN3, TRPV2, OSBPL3, SLC12A4, ATP5F1A, ATP1A1, ABCD3, CLIC1, SLC2A1, ATP6V1B2, ABCD1, ATP13A1, ATP5F1C, ITPR3, VDAC3, ANO10, VAT1, ATP2A2, SFXN1, SLC25A11, FLOT1, SLC25A24, ATP6V1E1] és 26 találat, 5,35% [pl. ATP6V1B2, VDAC1, VDAC2, PLS3, SLC35B2]), ami megerősíti korábbi megfigyelésünket.

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.

13. táblázat: Azonosított 3F-TG2-asszociált fehérjék NC9 kezelés során HUVEC sejtekben anti-FLAG M2 agaróz gyönggyel koimmunprecipitálva. A rövidítések fehérjeneveket jelölnék STRING analízis alapján.

ABCD1	CCT2	EIF4A3	HSPA9	MYADM	RAC2	RRAS	TCIRG1
ABCD3	CCT3	EIF4B	IFI16	MYH10	RACK1	RRBP1	TCP1
ABLIM1	CCT5	EMC1	IGKV2D-24	MYH14	RAI14	RSL1D1	TGM2
ACAP2	CCT7	EMC2	IGKV2D-29	MYL6	RALA	SAMM50	THRAP3
ACIN1	CCT8	ENDOD1	ILF2	MYOF	RALY	SEC11A	TICAM2
ACTN1	CD44	ENG	IMMT	NACA	RAN	SEC22B	TLN1
ACTR1A	CD55	ENO1	IQGAP1	NES	RAP1A	SEC62	TMED10
ADRM1	CD59	ERLIN1	ITGA6	NNT	RBBP4	SERPINE1	TMED9
AHNAK	CDC42	ERLIN2	ITGB1	NOP2	RBM10	SF3B1	TMEM43
ALDOA	CHCHD3	ERMP1	ITGB4	NOP56	RER1	SF3B2	TMPO
ANKFY1	CKAP4	FBL	ITPR3	NOP58	RHOC	SFXN1	TMTC3
ANO10	COPB2	FERMT3	JAK1	NT5E	RNH1	SFXN3	TPI1
ANPEP	COPG1	FLII	KCTD5	OCIAD2	ROCK1	SLC12A4	TRA2B
ANXA5	CPT1A	FLOT1	KIF11	OSBPL3	RPL10A	SLC25A11	TRIM21
ANXA6	CTNND1	FLOT2	KIF5B	PA2G4	RPL11	SLC2A1	TRPV2
AP2A1	CSE1L	FMNL2	KPNB1	PCBP1	RPL12	SLC35B2	TUBA1A
AP2B1	DCTN1	FSCN1	KRT14	PCBP2	RPL13	SLTM	TUBB4A
APOA1	DDOST	FUT8	KRT18	PDCD6IP	RPL13A	SND1	TXNDC5
ARCN1	DDX23	FXR1	KRT2	PDIA3	RPL14	SNRNP200	UBA52
ATAD3A	DDX39B	GANAB	KRT7	PFKP	RPL17	SNRPD1	UQCRC1
ATP13A1	DHX15	GDI2	KTN1	PGAM5	RPL18	SRSF1	UQCRC2
ATP1A1	DKC1	GLG1	LBR	PHB2	RPL23	SRSF6	VAPA
ATP2A2	DLD	GLIPR2	LCP1	PKM	RPL29	SRSF7	VAT1
ATP5F1C	DLST	GNAI2	LDHB	PLAT	RPL3	SSRP1	VDAC1
ATP6V0A1	DPP7	GNB1	LMAN1	PLOD2	RPL5	STING1	VDAC2
ATP6V0A2	DPY19L1	GNB2	LMNB2	PPM1B	RPL8	STK38	VDAC3
ATP6V0D1	DYNC1H1	GNG12	LRPPRC	PRMT5	RPLP0	STOM	VPS35
ATP6V1B2	EEF1D	GORASP2	LRRC8A	PRPF31	RPN1	STT3A	WARS1
BCLAF1	EEF1G	H1-0	LRRC8C	PRPF6	RPN2	STT3B	WDR1
C3	EFTUD2	H2AC6	MAGT1	PRPF8	RPS19	SUN2	WDR77
CALR	EHD4	H2AX	MAP1B	PRPS1	RPS25	SUPT16H	XRCC5
CAP1	EIF3A	H2BC4	MBOAT7	PRPSAP1	RPS26	SVIL	YBX1
CAPZA1	EIF3B	HCLS1	MCAM	PTDSS1	RPS3	TAB1	YES1
CAPZB	EIF3CL	HDLBP	MGST3	RAB10	RPS3A	TAF4	YWHAZ
CAV1	EIF3E	HMGA2	MLEC	RAB11B	RPS4X	TAGLN2	ZDHHC13
CAVIN1	EIF3I	HP1BP3	MSN	RAB5C	RPS7	TALDO1	ZMPSTE24
CCAR1	EIF3L	HSP90AA1	MTDH	RAB7A	RPSA	TBL2	

14. táblázat: HUVEC sejtekből azonosított 3F-TG2-asszociált fehérjék GTP γ S kezelést követően anti-FLAG M2 agaróz gyönggyel koimmunprecipitálva. A rövidítések fehérjeneveket jelölnék STRING analízis alapján.

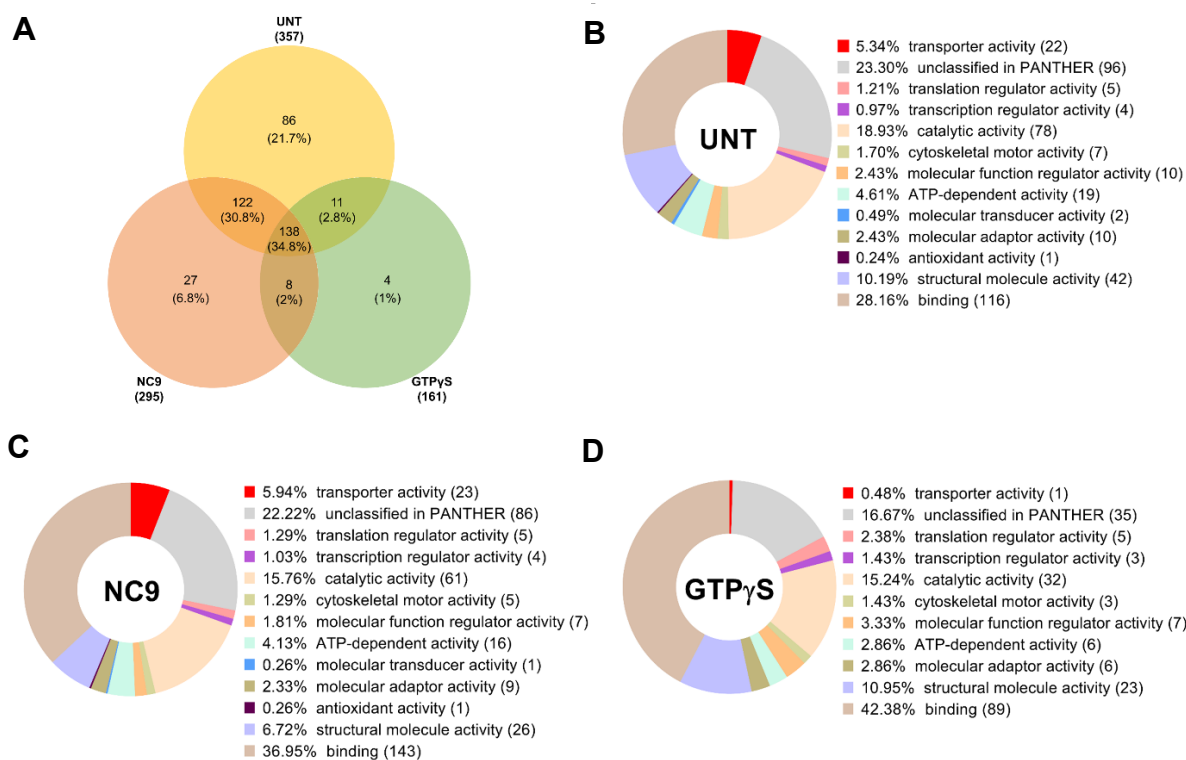
ABLIM1	CCT5	EIF3CL	HSPA9	MTDH	ROCK1	RRBP1	TPI1
ACAP2	CCT6A	EIF3E	IFI16	MYH14	RPL10A	SERBP1	TPP1
ACIN1	CCT7	EIF3I	IGKV2D-24	MYL6	RPL11	SERPINE1	TRA2B
ACTN1	CCT8	EIF3L	IGKV2D-29	MYOF	RPL13	SERPINH1	TRIM21
ACTR1A	CD59	EIF4A3	IQGAP1	NT5E	RPL14	SND1	TUBA1A
ADRM1	CDC42	EIF4B	ITGB1	PA2G4	RPL17	SNRNP200	TUBB4A
AHNAK	CKAP4	ENO1	JAK1	PCBP1	RPL23	SRSF1	TXNDC5
ALB	COPG1	ERLIN1	KCTD5	PCBP2	RPL29	SRSF3	UBA52
ALDOA	CPT1A	ESYT1	KIF11	PDIA3	RPL3	SRSF6	VAT1
ALYREF	CTSB	FERMT3	KPNB1	PGD	RPL5	SRSF7	WARS1
ANKFY1	DDX39B	FLII	KRT18	PKM	RPL8	STK38	WDR1
ANPEP	DPP7	FSCN1	KRT2	PLOD2	RPN1	SUN2	WDR77
ANXA5	DPYSL2	GDI2	KRT7	PPM1B	RPS16	SUPT16H	WDR93
ANXA6	DYNC1H1	GLG1	KTN1	PRMT5	RPS19	TAB1	YWHAZ
BCLAF1	EEF1D	GNB1	LCP1	PRPF31	RPS2	TAF4	
CALR	EEF1G	GNB2	LDHB	PRPF8	RPS26	TAGLN2	
CAP1	EFTUD2	H2AX	LMAN1	RAB7A	RPS3	TALDO1	
CAPZA1	EHD2	H2BC4	LMNB2	RALY	RPS3A	TCP1	
CAVIN1	EHD4	HDLBP	LRPPRC	RAN	RPS4X	TGM2	
CCT2	EIF3A	HP1BP3	MAP1B	RHOC	RPS7	THRAP3	
CCT3	EIF3B	HSP90AA1	MSN	RNH1	RPSA	TLN1	

15. táblázatcsoport: A HUVEC sejtekben inhibitorok (NC9 vagy GTP γ S) hiányában (kezelés nélkül) vagy jelenlétében azonosított 3F-TG2-höz kapcsolódó fehérjék csoportosítása. A rövidítések fehérjeneveket jelölnek STRING analízis alapján.

Kezeletlen (UNT)					NC9 kezelt		GTP γ S jelenlétében
ACTR3	CSRP1	MAP4	RAB14	SRP14	CHCHD3	RRAS	CCT6A
AKAP2	DHCR7	MCM3	RB1CC1	SRRT	CSE1L	SF3B2	DPYSL2
AP2A2	DNAJC11	MTCH2	RPL10	SURF4	DKC1	SLC35B2	PGD
APMAP	DNHD1	NAP1L1	RPL21	SYNE1	DPY19L1	SLTM	WDR93
ATP6AP1	EFHD2	NAPA	RPL23A	THBS1	ENG	SNRPD1	
ATP6V1E1	EIF2S1	PARP1	RPL26	TMOD3	FBL	VDAC1	
BST1	EIF3M	PHGDH	RPL27A	TPM4	FUT8	VDAC2	
CALD1	GOLGA3	PHLDB1	RPL31	TRIM28	GORASP2	VPS35	
CALU	HSPA1L	PHOX2B	RPL34	TUBA1C	HMGA2	ZDHHC13	
CANX	IARS1	PICALM	RPL35	UGGT1	ITGB4		
CCT4	IGF2BP1	PIGR	RPL36A	VAR1	KRT14		
CDC25C	ITGA2	PIK3C2A	RPL9	YBX3	NACA		
CDC42BPB	KCTD12	PLOD3	RPS14	YWHAQ	PDCD6IP		
CDC5L	KIF5C	PPP1CA	S100A11	ZC3HAV1	PGAM5		
CHTOP	KRT16	PPP1CB	SART1		PRPF6		
CMAS	KRT6A	PPP1R12A	SF3B3		RAI14		
COL5A2	LIMA1	PPP1R18	SLC25A24		RAP1A		
COPS3	LMNB1	QARS1	SMCHD1		RBBP4		

Kezeletlen & NC9 kezelt						Kezeletlen & GTP γ S jelenlétében	GTP γ S & NC9 dupla kezelés
ABCD1	CD55	GNG12	NOP2	RPL18	TBL2	ALB	CCT7
ABCD3	COPB2	H1-0	NOP56	RPLP0	TCIRG1	ALYREF	DDX39B
ANO10	CTNND1	H2AC6	NOP58	RPN2	TICAM2	CTSB	EIF3CL
AP2A1	DCTN1	HCLS1	OCIAD2	RPS25	TMED10	EHD2	EIF3E
AP2B1	DDOST	ILF2	OSBPL3	RSL1D1	TMED9	ESYT1	H2AX
APOA1	DDX23	IMMT	PFKP	SAMM50	TMEM43	RPS16	LCP1
ARCN1	DHX15	ITGA6	PHB2	SEC11A	TMPO	RPS2	TAGLN2
ATAD3A	DLD	ITPR3	PLAT	SEC22B	TMTC3	SERBP1	WDR1
ATP13A1	DLST	KIF5B	PRPS1	SEC62	TRPV2	SERPINH1	
ATP1A1	EMC1	LBR	PRPSAP1	SF3B1	UQCRC1	SRSF3	
ATP2A2	EMC2	LRRC8A	PTDSS1	SFXN1	UQCRC2	TPP1	
ATP5F1C	ENDOD1	LRRC8C	RAB10	SFXN3	VAPA		
ATP6V0A1	ERLIN2	MAGT1	RAB11B	SLC12A4	VDAC3		
ATP6V0A2	ERMP1	MBOAT7	RAB5C	SLC25A11	XRCC5		
ATP6V0D1	FLOT1	MCAM	RAC2	SLC2A1	YBX1		
ATP6V1B2	FLOT2	MGST3	RACK1	SSRP1	YES1		
C3	FMNL2	MLEC	RALA	STING1	ZMPSTE24		
CAPZB	FXR1	MYADM	RBM10	STOM			
CAV1	GANAB	MYH10	RER1	STT3A			
CCAR1	GLIPR2	NES	RPL12	STT3B			
CD44	GNAI2	NNT	RPL13A	SVIL			

Kezeletlen & GTP γ S & NC9 kezelt					
ABLIM1	COPG1	HDLBP	MYH14	RPL17	TAB1
ACAP2	CPT1A	HP1BP3	MYL6	RPL23	TAF4
ACIN1	DPP7	HSP90AA1	MYOF	RPL29	TALDO1
ACTN1	DYNC1H1	HSPA9	NT5E	RPL3	TCP1
ACTR1A	EEF1D	IFI16	PA2G4	RPL5	TGM2
ADRM1	EEF1G	IGKV2D-24	PCBP1	RPL8	THRAP3
AHNAK	EFTUD2	IGKV2D-29	PCBP2	RPN1	TLN1
ALDOA	EHD4	IQGAP1	PDIA3	RPS19	TPI1
ANKFY1	EIF3A	ITGB1	PKM	RPS26	TRA2B
ANPEP	EIF3B	JAK1	PLOD2	RPS3	TRIM21
ANXA5	EIF3I	KCTD5	PPM1B	RPS3A	TUBA1A
ANXA6	EIF3L	KIF11	PRMT5	RPS4X	TUBB4A
BCLAF1	EIF4A3	KPNB1	PRPF31	RPS7	TXNDC5
CALR	EIF4B	KRT18	PRPF8	RPSA	UBA52
CAP1	ENO1	KRT2	RAB7A	RRBP1	VAT1
CAPZA1	ERLIN1	KRT7	RALY	SERPINE1	WARS1
CAVIN1	FERMT3	KTN1	RAN	SND1	WDR77
CCT2	FLII	LDHB	RHOC	SNRNP200	YWHAZ
CCT3	FSCN1	LMAN1	RNH1	SRSF1	
CCT5	GDI2	LMNB2	ROCK1	SRSF6	
CCT8	GLG1	LRPPRC	RPL10A	SRSF7	
CD59	GNB1	MAP1B	RPL11	STK38	
CDC42	GNB2	MSN	RPL13	SUN2	
CKAP4	H2BC4	MTDH	RPL14	SUPT16H	



10. ábra: A HUVEC sejtekben 3F-TG2 fehérjéhez konformáció függő módon kapcsolódó találatok száma és GO-Slim Molekuláris funkciói a PANTHER adatbázis alapján. (A) Konformációfüggő interakciót mutató 3F-TG2-höz kapcsolódó fehérjék száma és csoportjai (Venny 2.1). A kezeletlen (B), NC9-kezelt nyitott (C) és GTP γ S-sel együtt inkubált zárt (D) TG2-hez kapcsolódó fehérjék legjobban dúsuló GO-Slim Molekuláris funkcióinak (eredeti angol megnevezéssel) aránya a PANTHER adatbázis segítségével. Az azonosított fehérjetalálatok száma a kategória után zárójelben szerepel (a vizualizáláshoz GraphPad 8.1. szoftvert használtunk).

16. táblázat: A HUVEC sejtekben azonosított 3F-TG2-asszociált fehérjék legjobban dúsuló GO Molekuláris funkciói inhibitorok (NC9 vagy GTP γ S) hiányában (kezelés nélkül) vagy jelenlétében (eredeti név a bal oldalon, a jobb oldalon a magyar nyelvű megfelelő kifejezés).

Kezeletlen (UNT)		
#GO ID	GO kifejezés megnevezése	
GO:0003723	RNA binding	RNS kötés
GO:0005198	Structural molecule activity	Szerkezeti molekula kötése
GO:0003735	Structural constituent of ribosome	Riboszóma szerkezeti alkotórész
GO:0045296	Cadherin binding	Kadherin kötés
GO:0097159	Organic cyclic compound binding	Szerves ciklikus vegyület kötése
GO:1901363	Heterocyclic compound binding	Heterociklikus vegyület kötése
GO:0050839	Cell adhesion molecule binding	Sejtdhéziós molekula kötése
GO:0003676	Nucleic acid binding	Nukleinsav kötés
GO:0005488	Binding	Specifikus molekuláris interakció
GO:0098641	Cadherin binding involved in cell-cell adhesion	Sejtdhézióhoz kapcsolódó kadherin kötés

UNT+NC9+GTP γ S		
#GO ID	GO kifejezés megnevezése	
GO:0003723	RNA binding	RNS kötés
GO:0097159	Organic cyclic compound binding	Szerves ciklikus vegyület kötése
GO:1901363	Heterocyclic compound binding	Heterociklikus vegyület kötése
GO:0003676	Nucleic acid binding	Nukleinsav kötés
GO:0005198	Structural molecule activity	Szerkezeti molekula kötése
GO:0005488	Binding	Specifikus molekuláris interakció
GO:0045296	Cadherin binding	Kadherin kötés
GO:0050839	Cell adhesion molecule binding	Sejtdhéziós molekula kötése
GO:0003735	Structural constituent of ribosome	Riboszóma szerkezeti alkotórész
GO:0005515	Protein binding	Fehérje kötés
GO:0003729	mRNA binding	mRNS kötés
GO:0019899	Enzyme binding	Enzim molekula kötése
GO:0031625	Ubiquitin protein ligase binding	Ubiquitin fehérje ligáz kötődés
GO:0044877	Protein-containing complex binding	Fehérje-tartalmú komplexek kötése
GO:0044183	Protein folding chaperone	Fehérje hajtogató (feltekerő) chaperone
GO:0019843	rRNA binding	rRNS kötés
GO:0051082	Unfolded protein binding	Nem feltekeredett fehérje kötődés
GO:0140662	ATP-dependent protein folding chaperone	ATP-függő fehérjefeltekerő chaperon
GO:0008092	Cytoskeletal protein binding	Citoszkeletális fehérje kötés
GO:1990948	Ubiquitin ligase inhibitor activity	Ubiquitin-ligáz inhibitor aktivitás

NC9		
#GO ID	GO kifejezés megnevezése	
GO:0044877	Protein-containing complex binding	Fehérje-tartalmú komplexek kötése

UNT+NC9		
#GO ID	GO kifejezés megnevezése	
GO:0005215	Transporter activity	Transzporter aktivitás
GO:0015075	Ion transmembrane transporter activity	Ion transzmembrán transzporter aktivitás
GO:0019829	ATPase-coupled cation transmembrane transporter activity	ATPáz-kapcsolt kation transzmembrán transzporter aktivitás
GO:0022857	Transmembrane transporter activity	Transzmembrán transzporter aktivitás
GO:0042626	ATPase-coupled transmembrane transporter activity	ATPáz-kapcsolt kation transzmembrán transzporter aktivitás
GO:0015399	Primary active transmembrane transporter activity	Elsődlegesen aktív transzmembrán transzporter aktivitás
GO:0015318	Inorganic molecular entity transmembrane transporter activity	Szervetlen molekula transzmembrán transzporter aktivitás
GO:0008324	Cation transmembrane transporter activity	Kation transzmembrán transzporter aktivitás
GO:0045296	Cadherin binding	Kadherin kötés
GO:0003723	RNA binding	RNS kötés
GO:0140657	ATP-dependent activity	ATP-függő aktivitás
GO:0046961	Proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	Proton-transzportáló ATPáz aktivitás, rotációs mechanizmus
GO:0022890	Inorganic cation transmembrane transporter activity	Szervetlen kation transzmembrán transzporter aktivitás
GO:0022853	Active ion transmembrane transporter activity	Aktív ion transzmembrán transzporter aktivitás
GO:0015078	Proton transmembrane transporter activity	Proton transzmembrán transzporter aktivitás
GO:0022804	Active transmembrane transporter activity	Aktív transzmembrán transzporter aktivitás
GO:0017111	Nucleoside-triphosphatase activity	Nukleozid-trifoszfát aktivitás
GO:0051117	ATPase binding	ATPáz kötés
GO:0019899	Enzyme binding	Enzim molekula kötése
GO:0044877	Protein-containing complex binding	Fehérje-tartalmú komplexek kötése

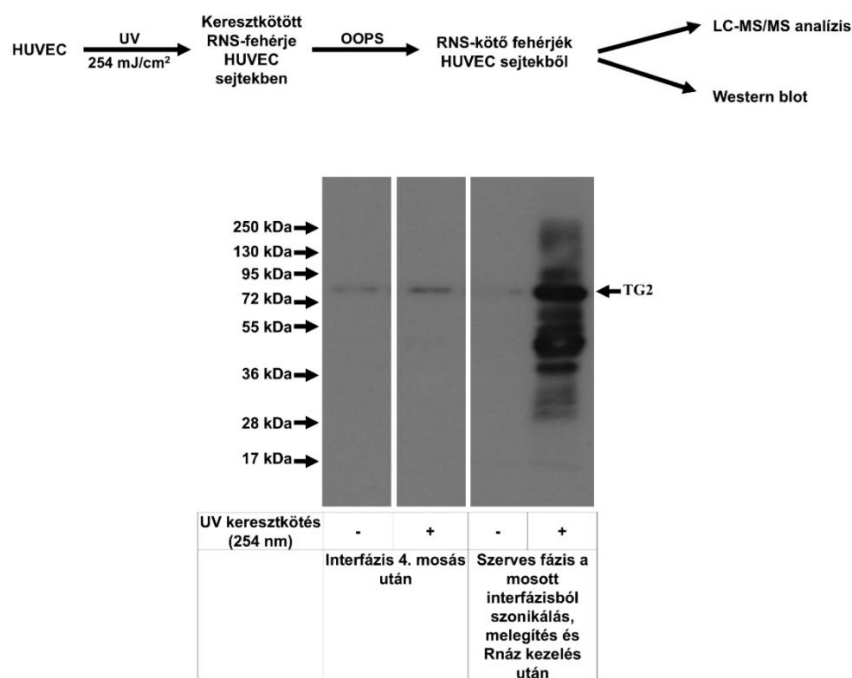
6.2. A TG2 RNS-kötő képességének bizonyítása

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 zavarai, felmerült, hogy esetleg képes lehet maga is az RNS-kötésre.

Annak érdekében, hogy kiderítsük, vajon a TG2 képes-e RNS-kötésre, legegyszerűbb megoldásnak a HUVEC RNS-kötő fehérjéinek izolálása és abban a TG2 kimutatása bizonyult proteomikai módszerekkel vagy Western blottal. Ortogonális szerves fázis szeparációs (OOPS)

módszert alkalmaztunk immortalizált HUVEC sejtvonal felhasználásával, ami egy gazdaságos és egyszerű módszer az RNS-kötő fehérjék (RBP) különböző sejtekből történő izolálására.

Az RBP-k izolálása során az UV-keresztkött RNS-fehérje komplexeket tartalmazó interfázist háromszor mostuk, amíg az utolsó szerves fázisú mosás csak elenyésző mennyiségű TG2 fehérjét tartalmazott. Az egyes mosások utáni frakciók TG2 tartalmát Western blottal ellenőriztük (11. ábra). Az UV-kezelt sejtek esetében, az RNS-degradáló kezeléseket (szonikálás, denaturálás, RNáz A emésztés) követően, az elválasztott szerves fázis erős TG2 jelet mutatott Western bloton sugallva, hogy a TG2 is egy RNS-kötő fehérje (az elválasztási lépések során azonos oldószer mennyiségeket alkalmazva). A Western bloton megjelenő további sávok a mintakezelés folyamán bekövetkező TG2 degradációjának következményei lehetnek.



11. ábra: A TG2 fehérje azonosítása HUVEC sejtekből izolált RNS-kötő fehérjék között ortogonális szerves fázis szeparációval. Az ábra felső része a HUVEC sejtvonalból történő RNS-kötő fehérjék azonosításának kísérleti sémája. Az ábra alsó része reprezentatív Western blot ($n=2$), ami mutatja, hogy az interfázist négyszer mosva sikerült a szabad TG2 fehérje mennyiségét minimálisra csökkenteni. A TG2 fehérje megjelent az UV-kezelt szerves fázis frakcióban RNS degradáció mellett. A szerves fázis egységes térfogatait precipitáltuk és oldottuk vissza, amelyekből ugyanolyan térfogatokat használtunk a Western blot elemzéshez.

A HUVEC sejtekből izolált RBP frakciók TG2 mennyiségének vizsgálatához a mintákat LC-MS/MS analízisre küldtük. A nyers tömegspektrometriás adatok értékelése során minden olyan fehérjét találatnak tekintettünk, amely legalább egy egyedi peptidet tartalmazott négy egymást követő fragment ion sorozattal. Az MS-adatok elemzése során a TG2 fehérjét mind a három mintában azonosítottuk. Összesen 413 RNS-kötő fehérjét sikerült azonosítani, melyek közül a TG2 fehérje a 25. leggyakoribb találat volt (17. táblázat) a detektált egyedi peptidek száma alapján. Mindezek arra utalnak, hogy a TG2 a HUVEC sejtekben, mint RNS-kötő fehérje is működik.

Mivel a TG2-asszociált fehérjék között sok RBP található, megvizsgáltuk, hogy a korábbi fejezetben HUVEC sejtekben koimmunprecipitációs technikákkal azonosított TG2-asszociált fehérjék, és az itt azonosított HUVEC RNS-kötő fehérjék között van-e átfedés. A TG2 interaktom vizsgálata során bemutatott két módszerrel azonosított interakciós partner találatból 150 fehérjét RNS-kötő fehérjeként is detektáltunk (17. táblázatban kék színnel jelölt fehérjék), ami alátámasztja, hogy a TG2 fehérje, mint „állványozó”, vagy szabályozó fehérje részt vehet az RNS-fehérje komplexek összeszerelésében és valószínűleg maga is köti az RNS-t.

Az RBP2GO adatbázissal összehasonlítva az általunk azonosított RBP közül csak 20 fehérje volt újonnan azonosított RBP, ami megerősíti az alkalmazott kísérleti megközelítésünk megbízhatóságát (18. táblázat). Érdeemes megjegyezni, hogy az RBP2GO adatbázisban a legtöbb RBP korlátlan proliferációjú, de kevésbé szövet-specifikus tumorsejtek felhasználásával azonosították.

Az általunk újonnan azonosított RBP-k STRING-elemzés alapján összekapcsolhatók olyan endotéliális funkciókkal, mint az angiogenezis, a tubulusképződés, a vérereket felépítő endotéliális sejtek vándorlásának szabályozása és a szövetfejlődés, ami alátámasztja eredményeink relevanciáját (19. táblázat).

17. táblázat: Az immortalizált HUVEC sejtekben azonosított RNS-kötő fehérjék 3 párhuzamos mérésből (azonosított peptidszám szerint rendezve oszloponként fentről lefelé, majd balról jobbra haladva).

MYH9	PFKP	PLS3	SHANK3	PFKL	CSRP1	GNB2	TRIOBP
PLEC	TXNDC5	COPA	EHD1	RAC1	RNF213	YBX1	NPLOC4
VIM	DDX17	TRIM28	ARAP1	PPP1R12A	DKC1	RTCB	PLEC
FLNA	CLIC1	KPNB1	RPL5	MAPK1	CEP170	EXOSC3	HSPA1A
FLNB	HSPA9	TPM3	ZYX	PPFIBP1	SH3GL1	CAPNS1	PARP1
ANXA2	ANXA5	TALDO1	XRCC5	MAPK3	PABPN1	PSMC2	GLRX3
AHNAK	LMNB1	MATR3	DPYSL2	PALLD	TARS1	RBM14	UGGT1
LMNA	HSP90B1	MTHFD1	DDX5	GLUD1	TUFM	CAP1	DNMBP
TLN1	WDR1	HSPB1	ATP6V1A	CAPZB	RAN	RPL7A	EDC4
ACTG1	HNRNPK	MAP1B	TCP1	UTRN	YWHAH	CPT1A	AGPS
ACTN1	KHSRP	RPL6	HNRNPL	AARS1	TARDBP	STMN1	GBE1
TUBB	PPIA	ZNF185	FAM120A	EIF3M	SUPT16H	IMPDH2	RPS18
ENO1	PDIA6	CAPZA2	EEF1G	YWHAG	HLA-A	YWHAE	PRKAR2A
DYNC1H1	DHX9	TAGLN2	CCT5	RBM14	STIP1	SRP68	VPS52
PKM	ATP5F1A	HNRNPM	GALK1	NID1	SNTB2	CAPG	HSPA4
HSPA5	RPL4	HNRNPC	CPNE1	PRPF8	MYO5A	CDC37	RBM39
FLNC	CCT2	CTNND1	HARS1	EIF4G1	IPO7	MACROH2A1	ACTR3
EEF2	CTTN	SFPQ	ACTB	SARS1	ZC3HAV1	DNAAF5	COPB1
CLTC	XRCC6	RPL8	WARS1	NPEPPS	ARPC1B	DLAT	SEC31A
TUBA1A	CCT4	PDLIM1	NONO	AHCY	KTN1	RPS3	HP1BP3
HSP90AB1	KIF5B	COPG1	LDHB	RANBP2	ABI1	H2BC17	NOP58
HSPA8	IQGAP1	HSP90AA1	SEPTIN9	PABPC1	ATL3	LMO7	SRSF7
GAPDH	GNAI2	DDX3X	RBMX	SERPINH1	APRT	CCDC22	FBLIM1
ANXA1	KCTD12	GDI2	DBNL	HNRNPD	ATXN2	GIGYF2	NUP153
TGM2 (25.)	HDLBP	CAD	RPL24	PA2G4	SF3B3	GLUL	INF2
TKT	CAPN2	TUBB4B	SQSTM1	UNC45A	PCBP1	KRT9	RNPEP
HNRNPU	TUBB6	AHNAK2	FSCN1	CCT7	SNRNP200	RARS1	ALDH2
VCP	PTBP1	MYO6	RPL13	CSE1L	LRPPRC	HK1	POLR2A
UBA1	G6PD	CYFIP1	GAPVD1	KHDRBS1	VPS35	ADSS2	HSPH1
SPTBN1	LDHA	HNRNPA1	YWHAQ	FUBP3	PRCP	PPP2R1A	SET
ACTN4	CORO1B	CARS1	LRRC47	XRN2	CAND1	PDLIM5	TPR
PDIA3	GANAB	ITPR3	NPM3	HYOU1	GNB1	CAPN1	GLG1
EEF1A1	GSTP1	ATP1A1	ANPEP	SF3A3	PML	SEPTIN2	RPL10A
FN1	CCT8	NUMA1	RNH1	RUVBL2	MMRN2	PRKCSH	PCBP2
HNRNPA2B1	RPSA	EHD4	CTNNA1	EZR	EIF4G2	GNS	UQCRC1
MYOF	EPRS1	EIF3CL	COL18A1	FUBP1	TXNRD1	MYH10	HNRNPD
UBB	RPN1	VAR1	MACF1	FUS	DNM2	SYNCRIP	RPL14
HSPG2	ELAVL1	GARS1	AKAP2	NARS1	HNRNPA3	ENG	RPS5
NCL	KRT1	CCT3	LARS1	GSN	DDB1	HNRNPUL1	AP2A2
ALDOA	MCAM	PDCD6IP	H3C1	QARS1	TPM4	MPST	ANP32A
MSN	PGK1	ACLY	PDLIM7	PLCB3	IPO5	TPP1	PTPN12
SPTAN1	FASN	ITGB1	RPS3A	RPS11	TNKS1BP1	UPF1	PLXND1
CFL1	NES	CORO1C	PDIA4	FARSA	TOLLIP	KRT2	CPSF6
MYO1C	MYL6	EIF4A1	HNRNPUL2	ANXA7	XPNPEP1	YARS1	CD44
VCL	VAT1	PGAM1	ESYT1	DOCK6	ILK	GART	EIF2S1
PRDX1	KRT7	LGALS1	ITGB4	SRM	CALD1	CLTA	CNBP
HNRNPR	HNRNPF	LASP1	CRIP2	FXR1	RHOC	PLOD3	CTSB
MVP	PAICS	FERMT3	IGF2BP3	TJP2	SRSF6	SERBP1	
ANXA6	RASIP1	PFN1	TP11	RANGAP1	ABCE1	RPS6	
SND1	PHGDH	EFHD2	DBN1	APEH	LUZP1	HUWE1	
THBS1	FLII	CCT6A	DPYSL3	CAVIN1	RP1BL	SRRM2	
CKAP4	RRBP1	PKN1	MAT2A	COLGALT1	TWF1	NOS3	
HNRNPH1	HSPD1	USP5	CNN2	EEF1E1	PSMD12	CAST	
MAP4	P4HB	YWHAZ	TNPO1	RPL3	PRPF19	PRKCA	
PRKDC	EHD2	RPS8	PPM1F	ARHGDI	ILF3	DHX15	

18. táblázat: Az RBP2GO adatbázisban még nem szereplő, újonnan azonosított, RNS-kötő fehérjék HUVEC sejtekben

Fehérje angol megnevezése	Gén jele
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	HSPG2
Integrin beta-4	ITGB4
N-acetylglucosamine-6-sulfatase	GNS
Thrombospondin-1	THBS1
Nidogen-1	NID1
Endoglin	ENG
Nitric oxide synthase, endothelial	NOS3
Abl interactor 1	ABI1
Ras-interacting protein 1	RASIP1
EH domain-containing protein 2	EHD2
Multimerin-2	MMRN2
Protein kinase C alpha type	PRKCA
Fermitin family homolog 3	FERMT3
Toll-interacting protein	TOLLIP
TRIO and F-actin-binding protein	TRIOBP
SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3	SHANK3
Rho-related GTP-binding protein RhoC	RHOC
Vacuolar protein sorting-associated protein 52 homolog	VPS52
Filamin-binding LIM protein 1	FBLIM1
Aminopeptidase N	ANPEP

19. táblázat: A HUVEC sejtekben újonnan azonosított, RNS-kötő fehérjék GO Molekuláris funkciói a STRING adatbázis alapján.

#GO ID	GO kifejezés megnevezése	
GO:0009653	Anatomical structure morphogenesis	Anatómiai szerkezet morfogenezis
GO:0048646	Anatomical structure formation involved in morphogenesis	A morfogenezisben részt vevő anatómiai szerkezetek kialakulása
GO:0001525	Angiogenesis	Angiogenezis
GO:0035295	Tube development	Tubulusformálódás
GO:0022603	Regulation of anatomical structure morphogenesis	Az anatómiai szerkezet morfogenezisének szabályozása
GO:0035239	Tube morphogenesis	Tubulusmorfogenezis
GO:0048856	Anatomical structure development	Anatómiai szerkezet fejlődése
GO:0009888	Tissue development	Szövetfejlődés
GO:0050793	Regulation of developmental process	A fejlődési folyamat szabályozása
GO:0048729	Tissue morphogenesis	Szövetmorfogenezis
GO:0048731	System development	Rendszerfejlődés
GO:0043535	Regulation of blood vessel endothelial cell migration	Az érendotél sejtek migrációjának szabályozása
GO:0007155	Cell adhesion	Sejtadhézió
GO:0051094	Positive regulation of developmental process	A fejlődési folyamat pozitív szabályozása
GO:0045765	Regulation of angiogenesis	Az angiogenezis szabályozása
GO:0001936	Regulation of endothelial cell proliferation	Az endotéliális sejtprolifерáció szabályozása
GO:0001937	Negative regulation of endothelial cell proliferation	Az endotéliális sejtprolifерáció negatív szabályozása
GO:0030334	Regulation of cell migration	Sejtmigráció szabályozása
GO:0043536	Positive regulation of blood vessel endothelial cell migration	Az érendotél sejtek migrációjának pozitív szabályozása
GO:0045766	Positive regulation of angiogenesis	Az angiogenezis pozitív szabályozása
GO:0044087	Regulation of cellular component biogenesis	A sejtkeponensek biogenezisének szabályozása
GO:1903588	Negative regulation of blood vessel endothelial cell proliferation involved in sprouting	A csíráképződésben részt vevő érendotél sejtek proliferációjának negatív szabályozása
GO:0009790	Embryo development	Embriófejlődés
GO:0060429	Epithelium development	Epitélium fejlődése
GO:0030155	Regulation of cell adhesion	Sejtadhézió szabályozása

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

Mivel a TG2 által felismert RNS-szekvenciák nem voltak ismertek a kísérleteink kezdetén, a HUVEC sejtekből izolált teljes RNS frakciót használtuk „csaliként” a mágneses RNS-fehérje pull-down kísérletben. Először az RNS-ek 3'-terminális végét desthiobiotinnal konjugált citidinnel jelöltük a T4 DNS-ligáz tartalmú Pierce RNA 3'-End Desthiobiotinylation Kit segítségével. Rekombináns TG2 fehérjét használva a jelölt, teljes RNS frakció megkötötte azt, és Western blottal detektálható jelet adott (12A. ábra). A gyártó által, a jelölési reakció pozitív kontrolljaként biztosított 43-mer RNS-molekula, amely jó szubsztrát a T4 DNS-ligáz számára, szintén kölcsönhatásba lépett a rekombináns TG2 fehérjével, míg immobilizált 43-mer RNS hiányában nem észleltünk nem specifikus fehérjekötődést a mágneses gyöngyökhöz. Ez a 43-mer RNS stabil másodlagos szerkezettel rendelkezik, amit az RNAstructure v6.4 programmal prediktáltunk (12B. ábra), valamint nagyon hasonlít az AU-gazdag szekvenciákra, amelyek fontos szerepet játszanak a 3' UTR szakaszokban az mRNS stabilitásának szabályozásában.

A későbbi kísérletekben ezt a 43-mer RNS-t kereskedelmi forgalomban kapható, 3'-végén biotinnal jelölt formában használtuk, és „csaliként” alkalmaztuk az endogén TG2 megkötésére a HUVEC fehérje extraktumból.

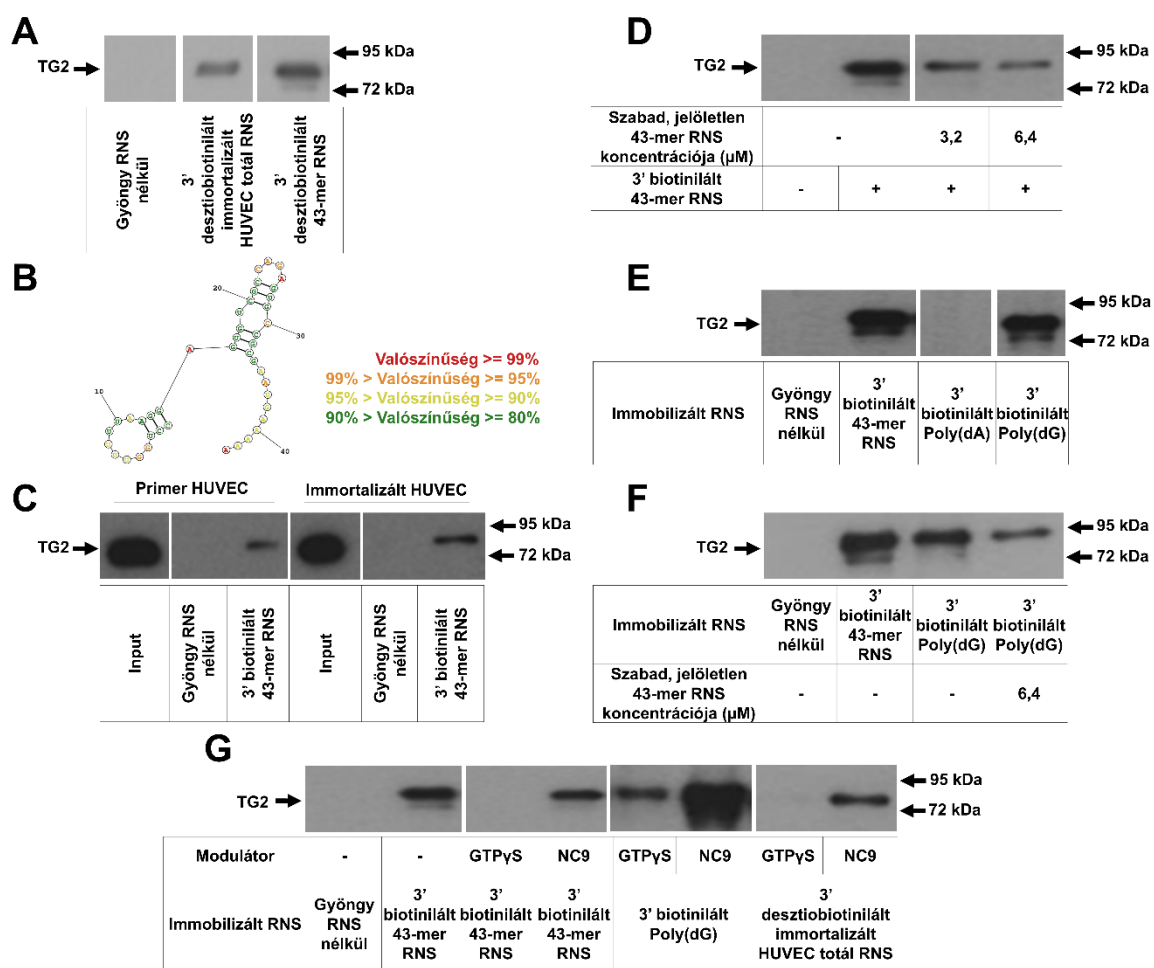
Az endogén TG2, amely primer és immortalizált HUVEC sejtekben egyaránt jelen van kötődött az alkalmazott 43-mer RNS-molekulához a mágneses pull-down kísérletekben. Ez arra utal, hogy a TG2-RNS komplexek HUVEC sejtekben jelen lehetnek (12C. ábra).

6.2.2. A rekombináns TG2 RNS-kötő tulajdonságának jellemzése

A TG2 RNS-kötő sajátosságának jellemzése érdekében pull-down alapú kompetíciós kísérletet végeztünk. Rekombináns TG2 fehérjét inkubáltuk jelöletlen 43-mer RNS-sel, majd hozzáadtuk immobilizált, jelölt 43-mer RNS molekulát tartalmazó mágneses gyöngyökhöz (12D. ábra). A jelöletlen 43-mer RNS koncentrációjának növekedésével a kötődő rekombináns TG2 mennyisége csökkent. Ez arra utal, hogy az immobilizált ribonukleinsav felelős a TG2 kötődéséért.

A TG2 képes GTP/GDP és ATP/ADP nukleotidok kötésére. Annak érdekében, hogy ezen kötőhelyei közötti potenciális átfedést meghatározzuk, valamint az alkalmazott nukleinsav potenciális szekvencia- és szerkezeti követelményeit vizsgáljuk egyláncú poli(dG) és poli(dA) homo-oligomer dezoxiribonukleinsavat használtunk a pull-down kísérletekben. A poli(dA) esetében nem detektáltunk kölcsönhatást, míg a poli(dG) kölcsönhatásba lépett a TG2-vel (12E. ábra). Elvégezve a kísérletet szabad 43-mer RNS molekulával az immobilizált poli(dG) mellett versengés lépett fel a két molekula között, csökkentve a TG2 poli(dG) molekulához való kötődését (12F. ábra). Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy a guanin bázis és annak a kötődési helye a TG2 fehérjében részben részt vehet az RNS-TG2 közötti kölcsönhatás kialakulásában. Mivel a negatív töltések nem elegendőek az interakcióhoz, a poli(dA) homo-oligomer esetén nem detektáltunk interakciót, az eredmények azt sugallják, hogy mind a nukleinsavak szekvenciája, mind a másodlagos szerkezeti motívumai fontosak lehetnek a TG2 fehérjéhez való kötődés szempontjából.

Annak vizsgálatára, hogy a TG2 konformációja befolyásolja-e annak RNS-kötődését vagy sem, újabb RNS-fehérje mágneses pull-down kísérleteket végeztünk 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 a TG2-t zárt konformációban, míg az NC9 az enzimet nyitott szerkezetben stabilizálja. Az eredmények alapján a GTP γ S megakadályozta a TG2 és a nukleinsavak kölcsönhatását, míg az NC9 kezelés nem befolyásolta az RNS-kötődést (12G. ábra). Ez arra utal, hogy a TG2 fehérje RNS-kötő felülete csak nyitott konformációjában elérhető, zárt, nukleotidhoz kötött formájában pedig el van fedve.



12. ábra: A mágneses RNS-fehérje pull-down kísérletek igazolták az interakciót a nukleinsavak és a TG2 fehérje között. (A) Mind az immortalizált HUVEC sejtekből izolált 3' desztiobiotinilált totál RNS, mind a 43-mer RNS képes kötődni a humán rekombináns TG2 fehérjéhez ($n=3$). (B) A 43-mer RNS prediktált másodlagos szerkezete az RNAstructure v6.4 program segítségével (Mathews lab). (C) A 3' biotinilált 43-mer RNS képes kötődni mind primer, mind immortalizált HUVEC fehérjeextraktumban lévő endogén TG2 fehérjéhez (200 μg fehérje). Az input sejtkivonat 0,5 μg fehérjét tartalmazott ($n=2$). (D) A jelöletlen 43-mer RNS verseng az immobilizált 3' biotinilált 43-mer RNS molekulával a rekombináns TG2 fehérjéhez való kötésért. (E) Humán rekombináns TG2 a 3' biotinilált homo-oligomer poly(dG) molekulával interakcióba lép, míg a poly(dA) molekulával nem ($n=2$). (F) A jelöletlen 43-mer RNS verseng az immobilizált 3' biotinilált poly(dG) molekulával a TG2 kötésért. (G) A GTPγS által stabilizált zárt állapotú TG2 fehérje nem, míg az NC9 inhibitorral stabilizált nyitott konformációjú TG2 fehérje képes kötődni a nukleinsavakhoz (rekombináns TG2 és 43-mer RNS esetében $n=4$, más kísérletekben $n=2$).

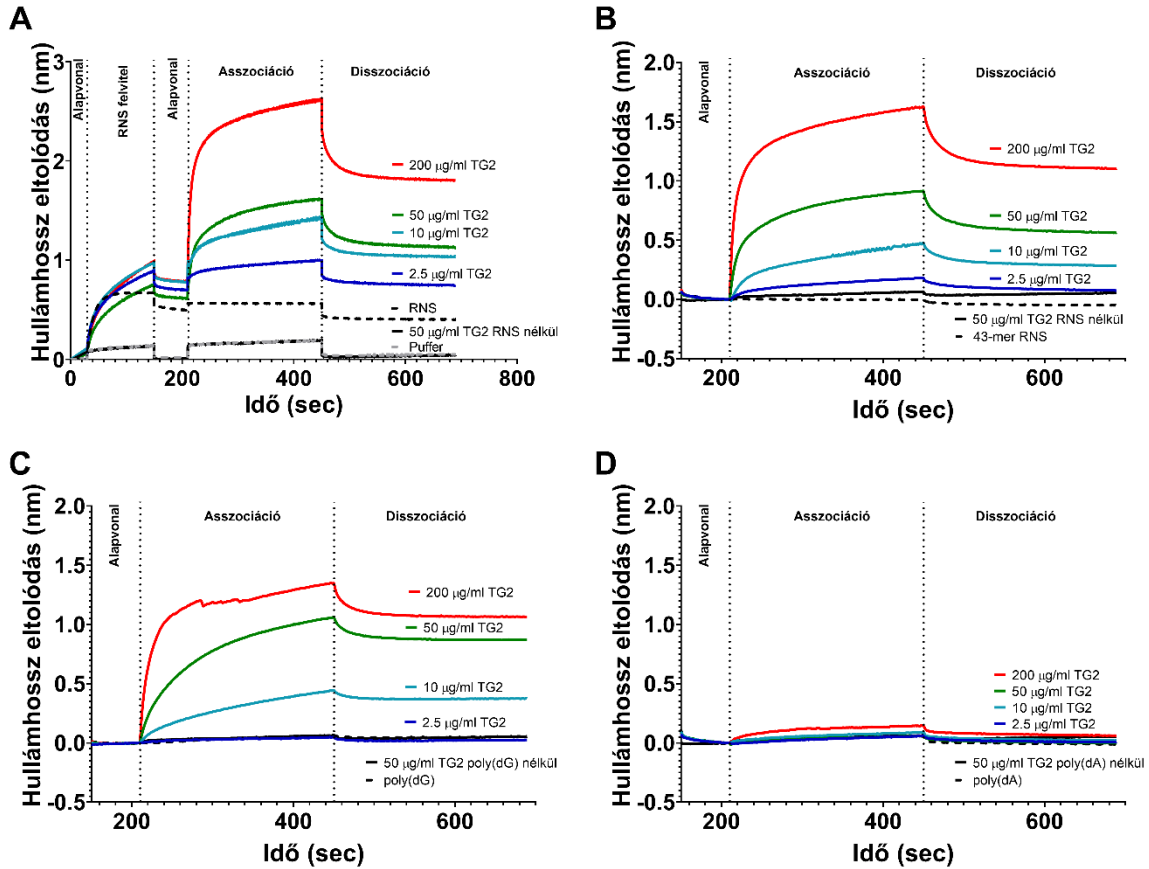
6.2.3. Az RNS-TG2 interakció megerősítése bioréteg interferometriával

A bioréteg interferometria egy jelölésmentes 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. Lapka és cső mintatartóval rendelkezik a készülék, ami a mintatartók cseréje miatt eltolódást eredményez a mérés egyes lépései között a hullámhossz eltolódásban.

A TG2 és a 43-mer RNS közötti valós idejű kötődési görbék és a kötődés affinitásának a meghatározásához növekvő koncentrációjú rekombináns, jelölés nélküli, expressziós vég lehasított TG2 fehérjét alkalmaztunk 2,5–200 $\mu\text{g/ml}$ tartományban, miután a sztreptavidin bioszenzorokat hasonló mennyiségű biotinilált 43-mer RNS-sel töltöttük fel (13A. ábra). A nyers kötési görbéket lépésenként korrigáltuk és igazítottuk az asszociációs és disszociációs fázisokhoz (13B. ábra).

A TG2 koncentrációjának növekedése a kötődési görbék telítési értékének 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 (13C. ábra). A bioréteg interferometria is megerősítette az RNS-fehérje mágneses pull-down kísérlet eredményét, miszerint nincs kölcsönhatás a poli(dA) és a TG2 fehérje között (13D. ábra).

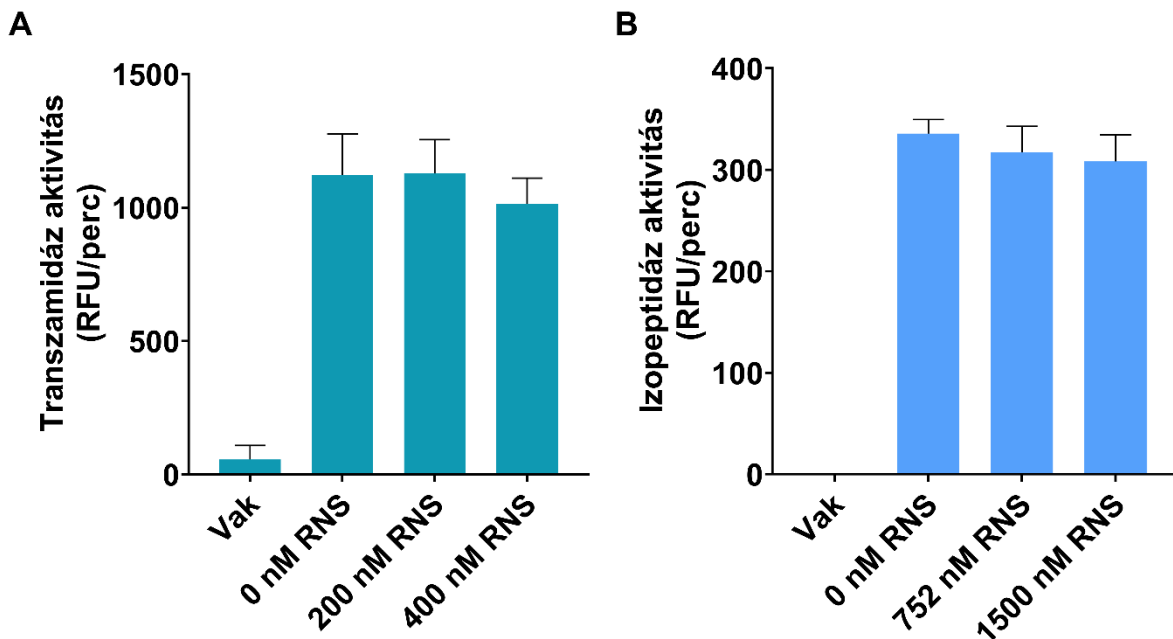


13. ábra: A TG2-RNS interakciók valós idejű detektálása bioréteg interferometriával.

(A) A 43-mer RNS és a rekombináns, expressziós vég-mentes humán TG2 nyers kötési görbéi. (Reprezentatív görbék, $n=2$). (B) A TG2 és az immobilizált 43-mer RNS asszociációs és disszociációs fázis illesztett kötési görbéi ($n=2$). (C, D) A TG2 és a poly(dG) és poly(dA) homooligomer dezoxiribonukleinsavak asszociációs és disszociációs fázis illesztett kötési görbéi.

6.2.4. 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 transzglutamináz aktivitására. Az RNS-kötődés még magas RNS-koncentrációk esetén sem befolyásolta sem a transzamidáz, sem az izopeptidáz aktivitását a TG2 fehérjének (14. ábra).



14. ábra: A 43-mer RNS megkötésének hatása a TG2 fehérje transzamidáz és izopeptidáz aktivitására. A transzamidáz aktivitás mérésénél 200 nM, míg az izopeptidáz aktivitás mérésénél 150 nM végkoncentrációban alkalmaztuk a rekombináns His6-tag TG2-t. A vakpróba kalcium helyett 10 mM EDTA-t tartalmazott (két független mérés, $n=3$).

6.2.5. A TG2 potenciális RNS-kötő helyének in silico predikciója és helyspecifikus mutagenézise

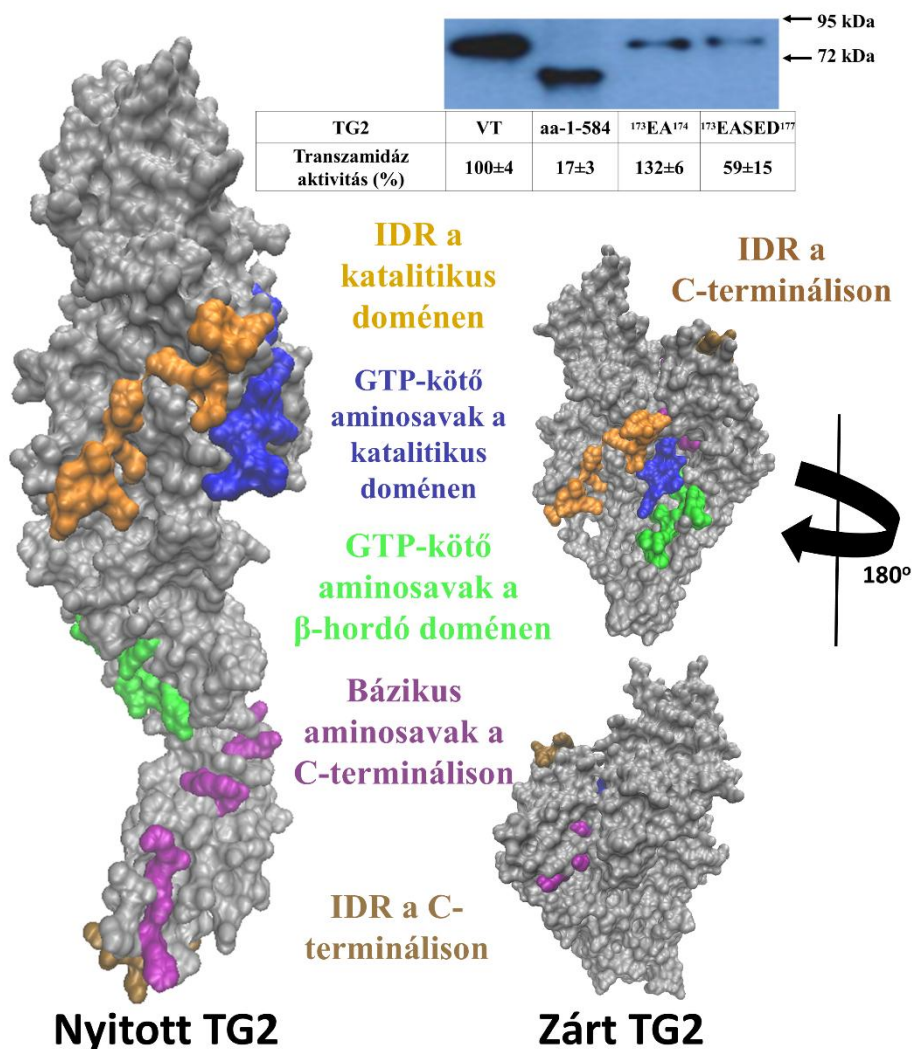
In silico elemzéseket végeztünk a TG2 felületén található RNS-kötő hely azonosítása érdekében. A catRAPID algoritmus (Agostini F. és mtsai, 2013) kiszámítja egy fehérje RNS-kötő hajlandóságát, milyen valószínűséggel köti az RNS-t. Az algoritmussal számított értékek alapján a humán TG2 szekvencia nem képes kötni az RNS molekulát. Az elméleti áttekintésben számos specifikus domént ismertettem, mint például az RNS-felismerő domének (RRM), a K-homológia domének és a különböző cinkujj domének, amelyek speciális szekvenciákkal (pl. RGG ismétlődés) kombinálva felelősek lehetnek a fehérjék nagy affinitású RNS-kötéséért. A TG2 nem rendelkezik ilyen tipikus doménnel, nukleotid- és kalcium-kötő helyei sem kanonikusak, azonban a szerkezetileg rendezetlen régiói (IDR-ek) gyakran kombinálódnak RNS-kötő motívumokkal, és ezáltal részt vehetnek az RNS-kötésben is az elméleti bevezetőben leírtaknak megfelelően.

A VMD vizualizációs szoftver segítségével elemeztük a TG2 szerkezetét a potenciális RNS-kötő helyek, motívumok szemszögéből (15. ábra). Először kiválasztottuk azokat a szakaszokat a szerkezetben, amelyekben gyakoriak a pozitív töltésű aminosavak (hasonlóan az ismert RNS-kötő motívumokhoz), mert ezek átfedésben lehetnek az esetleges IDR régiókkal. Ezeket a felületi részeket különféle színekkel jelöltük a TG2 nyitott és zárt konformációjának vizuális modelljein (15. ábra). Mivel az eredményeink alapján a poli(dG) képes kötődni a TG2 fehérjéhez, és az ismert GTP-kötő oldalláncok a nyitott formában elérhetőek (el vannak fordulva a felületen), a zárt formában viszont ezek az oldalláncok részben el vannak rejtve és közel vannak egymáshoz (nem kötődhetnek RNS-hez), így ezekben a régiókban található oldalláncok funkcionálhatnak potenciális RNS-kötő helyként és vehetnek részt az RNS-kötésben. A 15. ábrán a kék színű oldalláncok (K173, F174, I175, K176, N177, I178, P179, N181 és Q186) vagy a GTP-hez való kötődésért felelősek (K173), vagy a katalitikus domén nukleinsavhoz való kötődéséhez járulhatnak hozzá. A GTP/GDP kötőhely C-terminális része és a környező potenciális RNS-kötő oldalláncok zöld színnel vannak jelölve (R580, Y583, R476, R478, Q481, S482, M483, H494 és V479). Van néhány RNS-kötésben gyakran részt vevő oldalláncot tartalmazó IDR, amik narancssárgával (R433, D434, E435, R436, E437, H441, K444, P446, E447, G448, S449 és R453) és barna színnel (K598, Q599, K600, R601 és K602) vannak jelölve. Végül a lila szín jelöli a magi export szignál régiója környékén található bázikus aminosavakat, mivel ez a régió több tipikus RNS-kötő aminosavat is tartalmaz (H658, H662, K663, N667, 672K, K674 és K677). A zárt konformáció akadályozza az RNS-kötődését, ami arra utal, hogy az RNS kötődésért felelős interakciós felületek a TG2 azon részein található, amely a zárt konformációban rejtve van. Ezek alapján a barna és a narancssárga színekkel jelölt régiók kizárhatók, mivel ezek mindkét konformációban felületi pozícióban találhatóak.

A nyitott és zárt TG2 struktúrák összehasonlítása alapján úgy gondoljuk, hogy részben a katalitikus domén GTP-kötő helye (15. ábra, kék) valamint a C-terminális hordó domén pozitív töltésű oldalláncai (15. ábra, lila) felelősek az RNS-kötődésért, mivel ezek az oldalláncok a zárt konformációban nem teljesen hozzáférhetőek, részben el vannak rejtve.

Az RNS-fehérje mágneses pull-down kísérlet kimutatta, hogy az utolsó C-terminális β -hordó domén eltávolítása nem befolyásolta a trunkált TG2 (1-584) fehérje és az RNS kölcsönhatását, míg a pozitív töltésű és aromás aminosavak eltávolítása 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 (15. ábra, western blot kép). Ez arra utal, hogy ezek az oldalláncok döntő szerepet játszanak az RNS-kötés kialakításában. A mutáns TG2 fehérjék

transzglutamináz aktivitása megmaradt, ami bizonyítja, hogy a mutációk nem a fehérje denaturálásával eredményezték az RNS-kötésben létrejövő csökkenést. További szerkezeti vizsgálatok és proteomikai elemzések szükségesek a TG2 pontos RNS-kötő oldalláncainak a megismeréséhez.



15. ábra: A potenciális RNS-kötő régiók szerkezeti megjelenítése a TG2 fehérjében. A bal oldali kép a nyitott TG2 konformációt (PDB 2q3z) mutatja, míg a jobb felső és alsó képek a zárt TG2 konformációt ábrázolják 180°-os elfordításban (PDB 1kv3) a Visual Molecular Dynamics Software (VMD) segítségével ábrázolva. Aminosavak színjelzései: zöld (a GTP kötésben résztvevő aminosavak és környezetük a C-terminális β -hordó doménen a): R580, Y583, R476, R478, Q481, S482, M483, H494 és V479; kék (a GTP kötőhely katalitikus doménen lévő része és környéke): K173, F174, I175, K176, N177, I178, P179, N181 és Q186; narancssárga (IDR, alkalikus oldalláncokkal a katalitikus doménben): R433, D434, E435, R436, E437, H441, K444, P446, E447, G448, S449 és

R453; lila (zárt formában elhelyezkedő, felszínen lokalizált alkalikus oldalláncok): H658, H662, K663, N667, K672, K674 és K677; barna (C-terminálisához közeli IDR): K598, Q599, K600, R601 és K602. A kis ábra (jobb oldalon, felső rész) RNS-fehérje pull-down kísérlet eredményét mutatja a TG2 C-terminális domén trunkált mutánsa (TG2 1-584) és a potenciális RNS-kötőhely mutánsok (K173E/F174A – 173EA174 és K173E/F174A/I175S/K176E/N177D – 173EASED177) esetén. A transzamidáz aktivitást a vad típusú TG2 aktivitásának százalékos arányában fejeztük ki (két független kísérlet átlaga, 3 párhuzamossal).

7. Megbeszélés

7.1. TG2 interaktom feltárása HUVEC sejtekben

A TG2-asszociált fehérjék azonosításához két módszert alkalmaztunk: az elsőben rekombináns, helyspecifikusan biotinilált TG2 fehérjét adtunk HUVEC sejt kivonathoz, a másik, új megközelítés esetén az endogén TG2 fehérjét csendesítettük, majd lecseréltük egy háromszoros Flag-jelölt transzgén TG2 fehérjére. A második módszer növelte az azonosított interakciós partnerek számát és csökkentette a fehérjék nem specifikus kötődését a komplexek izolálására használt agaróz gél esetén. Jelentős előnye a technikának, hogy így élő sejt környezetben kialakuló TG2 fehérjéhez kapcsolódó fehérjekomplexeket azonosíthatunk, vizsgálhatunk. 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 teszik lehetővé a fehérjekomplexek kialakulását és az azokat alkotó egyes fehérjék meghatározott sorrendben történő beépülését. Az összeszerelő chaperonokkal való interakció segíti a szükséges konformációs változások kialakulását, ami nélkülözhetetlen lehet más fehérjékhez való kötődéshez. Továbbá a GTP hidrolízis szintén kiválthat konformációs változásokat, amelyek fokozzák az affinitást bizonyos fehérjékhez, azonban ez a folyamat *in situ* kevésbé ismert **(Brown MT. és mtsai., 2025)**. A TG2 kölcsönhatása konformációt stabilizáló modulátorokkal, transzglutamináz vagy GTPáz szubsztrátokkal még érdekesebbé teheti ezen interakciókat, mivel ezek befolyásolhatják a fehérjék TG2-vel való asszociációját konformációfüggő módon.

Azt érdemes megemlíteni, hogy a munkám során alkalmazott kísérleti megközelítéseknek vannak limitációi. Habár az újonnan létrehozott sejt vonalban (TG2-KD+3F-TG2) a 3F-TG2 expressziós szintje hasonló mind a kontroll, mind a nem módosított sejtekben található endogén TG2 szintjével, és hatékonyan ellensúlyozta a TG2-KD állapotban megnövekedett apoptotikus sejtek számát, de a sejtek adhéziós tulajdonságait nem tudta helyreállítani (8. ábra). A magyarázat az lehet, hogy minden expressziós tag egyedi tulajdonságokkal rendelkezik, így például a Flag-tag hidrofíl tulajdonsággal bír. Ez befolyásolhatja a TG2 N-terminális helyén a hidrofób, ideális esetben membránhoz kapcsolódó molekulákkal (fehérjék vagy lipidek) való interakciókat. Egy másik lehetséges korlátozó tényező a konformációs modulátorok hatékony, de még tolerálható koncentrációjának kiválasztása. Hosszabb kezelés során nem mondható teljes biztonsággal, hogy a 15 μM NC9 koncentráció fenntartja a teljes telítettségi szintet a

kísérlet során. Azonban rövid ideig már 10 μ M NC9 is gátolhatja a TG2 aktivitását in situ **(Gundemir S. és mtsai., 2017)**.

Korábbi publikációk körülbelül 80 darab TG2-vel kölcsönhatásba lépő fehérjét írtak le, amelyeket a TRANSDAB adatbázisban gyűjtöttek össze **(Csosz E. és mtsai., 2009)**. Ezen kölcsönhatások nagy részét koimmunoprecipitációs, kolokalizációs, ELISA, illetve más a fehérje kölcsönhatásokat közvetlenül kimutató kísérletekkel igazoltak. Egy másik részét Kim és munkatársai egy sejtvonalból koimmunoprecipitációs vizsgálatokkal és tömegspektrográfias meghatározás alapján írtak le **(Kim SJ. és mtsai., 2013)**. A kísérleteinkben számos átfedést mutattunk ki a már azonosított TG2 interakciós fehérjékkel, ami tovább erősíti a TG2 sejtheadhézióban, migrációban és sejt-sejt interakciókban betöltött, már ismert funkcióit. Néhány jól ismert interakciós partner azonban kiesett a találataink közül, mert jelen voltak a tisztításhoz használt gélhez aspecifikusan kötődő kontroll fehérjék között (pl. FN1, CALM1, GSTP1, PRDX1).

Az elmúlt évtizedben néhány proteomikai tanulmány jelentősen hozzájárult a TG2 interaktom feltárásához és biológiai jelentőségének megértéséhez, nagyban előmozdították a TG2-hez kapcsolódó és interakcióba lépő fehérjékről szóló ismereteket, azonban ezek a tanulmányok többnyire egérmodelleket használtak **(Furini G. és mtsai., 2018; Wilhelmus MMM. és mtsai., 2022)**. Az egér UUO modellben az exoszomális fehérjék (pl. ALIX, FLOT2, PRDX2, RAB1A, SDC4) kapcsolódnak a TG2-höz, elősegítve annak extrernalizációját **(Furini G. és mtsai., 2018)**. Az APP23 Alzheimer-kór egérmodellben a TG2 interakciós partnerek számának növekedését figyelték meg, és a partnerek között nagy számban a szinapszisok felépítésében, a szinaptikus transzmisszióban és a sejtek adhéziójában részt vevő fehérjék voltak jelen **(Wilhelmus MMM. és mtsai., 2022)**. Piacentini professzor laboratóriumában tandem affinitástisztítás módszerrel alkalmaztak HA- és Flag-jelölt, túltermelt TG2-t különböző stresszhatások mellett, hogy feltárják a TG2 interaktomot és a proteosztázisban részt vevő kulcsfontosságú interakciós partnereket egér- és emberi sejtekben egyaránt **(Kim SJ. és mtsai., 2013; Altuntas S. és mtsai., 2015)**. Ezen interaktomelemzések alapján azonosítottak a TG2-vel interakcióba lépő chaperonokat (HSP70, HSP90, HSP20, HSPHSP27, HSPA6, BAG2/3, DNAJ A1/B1/C7) és autofágiában szerepet játszó receptorokat (p62, NBR1). Ezen eredmények jelzik a TG2 szerepét a stresszreakciókban és a feleslegessé vált fehérjék megfelelő eltávolításában. Proteaszomális aktivitás hiányában a BAG3-mal komplexben jelen lévő TG2 az ubikvitinált fehérjéket összegyűjtheti és a multivezikuláris testekbe irányíthatja, ahol azok vagy lizoszomális lebontásra, vagy exoszomálisan eltávolításra kerülnek **(Altuntas S. és**

mtsai., 2015). A mi kísérleti modellünk egy stresszmentes HUVEC sejt, amiben nem figyeltük meg ezeket a stresszel kapcsolatos interakciós molekulákat, azonban a TG2 hiánya stresszmentes körülmények között lévő TG2-KO MEF sejtekben az exoszómák kibocsátásának csökkenéséhez vezetett (**Diaz-Hidalgo L. és mtsai., 2016).**

Az extracelluláris exoszómák a legjobban dúsuló GO Sejtkomponensek az azonosított TG2-asszociált fehérjék között, ami arra utal, hogy fiziológias körülmények között a TG2 szerepet játszik az endotél sejtek exoszómális kommunikációjában. Ez elősegítheti az extracelluláris vezikulák (EV) képződésének szabályozását, vagy stabilizálhatja azok szerkezetét azáltal, hogy katalizálja a fehérjék kovalens keresztkötését ezekben a vezikulákban (**Shinde A. és mtsai., 2020).** Ezeknek az exoszómáknak a képződése az endotél sejtekben hozzájárulhat más sejtekkel mind bazális, mind apikális irányban történő kommunikációhoz. Az exoszómák különösen apikális irányban kerülnek a keringésbe, de a TG2 a HUVEC és a HCAEC sejtek mindkét irányú szekrétumában jelen van (**Wei H. és mtsai., 2019).** Ezenkívül a TG2-asszociált fehérjék jelentős átfedést mutatnak a HUVEC sejtekből, vezikuláris transzporton keresztül felszabaduló szekretált fehérjékkel (ACTN1, AHNAK, CALR, CAVIN1, ENO1, FSCN1, SERPIN1, TALDO1, TCP1, TLN1, TPO1, VAT1, RACK1, VAPA stb., **Wei H. és mtsai., 2019).** Egészséges endotél sejtekben az exoszómákban található fehérjék védelmet nyújthatnak a szív- és érrendszeri betegségek kialakulása ellen, azonban további vizsgálatokra van szükség a TG2 és annak konformációs állapotainak hatását vizsgálni a felszabadult exoszómák fehérje- és nukleinsav-tartalmára (**Davidson SM. és mtsai., 2018).**

A TG2 egy egyedülálló fehérje, amely képes különböző konformációs állapotokat felvenni. Eredményeink szerint a legtöbb kapcsolódó fehérje nem mutatott jelentős TG2 konformáció függést, de a nyitott forma stabilizálása növelte a transzporterek arányát a TG2 asszociált fehérjék között. Ez a nyitott konformáció biztosíthatja a különböző membrán transzporterekkel való interakciót. A TG2 képes a Ca^{2+} -szelektív TRPV5-öt szubsztrátként elfogadni, és kovalens módosítás révén gátolni azt (**Boros S. és mtsai., 2012).** Ez magyarázatot adhat a megváltozott mitokondriális funkciókra TG2-KO egerekben, és hozzájárulhat a sejten belüli energiatermelés szabályozásához (**Rossin F. és mtsai., 2015).**

Számos RNS-kötő fehérjét is azonosítottunk a TG2 interaktom vizsgálata során. Ezek közül néhány fehérje RNS vagy nukleinsav kötésért felel (pl. NOP56, RPs, RALY, SART1, SRSF1, SUPT16H), így azok érésére, stabilitására, lokalizációjára is hatással van. Az azonosított TG2-asszociált fehérje közül többnek is már ismert a biológiai szerepe (pl. PKM, ENO1, ALDOA, MAP4, ATP5F1C, PDIA3, CALR, DYNC1H1), illetve az is, hogy kötődhetnek az RNS-hez.

Befolyásolhatják az RNS működését, de fordítva, a fehérje is modulálható az RNS-hez való kötődéssel. Az RNS-hez kötődő fehérjék részt vesznek a membrán nélküli folyadék-folyadék fázis szeparációban és átalakulásokban is. Ezeknek a folyamatoknak a károsodása hozzájárul a neurodegeneratív betegségekhez vagy a tumorok kialakulásához, amelyekről kimutatták, hogy összefüggésben állnak a TG2 diszfunkcióival **(Eckert RL. és mtsai., 2014; Hughes MP. és mtsai., 2025)**.

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 fehérjékkel való komplexek kialakításával. Ez egy eddig nem közölt TG2 funkció, ami még annak a feltételezését vetette fel bennünk, hogy a TG2 maga is képes lehet RNS molekula kötésére.

7.2. A TG2 fehérje rendelkezik RNS-kötő képességgel

Az RBP-k heterogén fehérjék, amelyek az RNS-molekulákkal kölcsönhatásba lépve szabályozzák a génexpressziót és a transzkripció utáni folyamatokat, mint például az RNS-splicing, a transzport és az mRNS-transzláció szabályozása. Az RBP-k azonosítására különféle módszerek léteznek, de mindegyikük az UV-fény segítségével kialakított kovalens keresztkötések kialakításával indul, annak érdekében, hogy stabilizálják a sejtekben található RNS-RBP komplexeket. Ezután ezeket a kovalens komplexeket fázisszeparációs protokoll segítségével dúsítás nélkül, vagy dúsítással (oligo-dT gyanta) izolálják. Az RNS emésztése után tömegspektrometriát vagy specifikus antitesteket használnak a felszabadult fehérjék azonosítására **(Castello A. és mtsai., 2012)**.

Az RBP2GO adatbázis alapján **(Caudron-Herger M. és mtsai., 2021)** a transzglutaminázok megtalálhatóak az RNS-fehérje komplexekben. Az OOPS módszerrel U2OS sejtekből izolált, potenciális RBP-k között azonosították a humán TG2 fehérjét **(Queiroz RML. és mtsai., 2019)**, míg HEK293, Jurkat és HuH-7 sejtvonalakban a humán TG1 és TG3 fehérjéket írták le RBP-vel kapcsolatos tanulmányokban. Más humán transzglutaminázokat, mint például a TG4-7 és F13A, eddig még nem azonosítottak RNS-kötő fehérjeként. Egy másik tanulmányban vizsgálták a pre/pri-miRNS-ekben található hajtű kanyarokhoz kötődő RBP-eket pull-down alapú kísérlet alkalmazásával. A TG2-t azonosították, mint RBP **(Treiber T. és mtsai., 2017)**. Ezen tanulmányokkal ellentétben, amikben tumoros sejtvonalakat alkalmaztak a nagy mennyiségű mintát igénylő proteomikai elemzés, mi a kísérleteink során az RBP-k izolálásához egy immortalizált HUVEC sejtvonal alkalmazásával értük el a szükséges mintamennyiséget.

Az alkalmazott sejtvonal megőrizte az endotél sejtekre jellemző tulajdonságokat, expresszáta az endotélre jellemző markergéneket (4. ábra), és citokinkezelés után a HUVEC sejtek funkcionális tulajdonságait mutatta (**Shaw A. és mtsai., 2021**).

Eredményeink alátámasztják a TG2-RNS interakció lehetőségét HUVEC sejtekben. Ezt HUVEC sejtekből izolált totál RNS, illetve egy 43-mer RNS és baktériumokban termelt rekombináns TG2, valamint a 43-mer RNS és HUVEC-ből izolált endogén TG2 között igazoltuk mágneses pull-down kísérlet segítségével. Ez a TG2-RNS interakció valószínűleg adott RNS-szekvenciát vagy másodlagos szerkezetet igényel, mivel a TG2 ATP/ADP-kötő tulajdonsága ellenére a poli(dA) nem lépett kölcsönhatásba a TG2-vel. Ezen interakció biológiai relevanciájának meghatározása érdekében BLAST keresést végeztünk az Ensemble adatbázisban (<https://www.ensembl.org>) a teljes 43-mer RNS-szekvenciájára, azonban eredménytelenül. A 43-mer RNS másodlagos szerkezete (12B. ábra) tartalmaz egy AU-gazdag elemhez (ARE) hasonló hurkot és egy másik, kiemelkedőbb hurkot, amelyek potenciális szerkezeti elemeket biztosítanak az RBP-vel való kölcsönhatáshoz.

Továbbá a TG2 és a 43-mer RNS közötti kölcsönhatás erősségének meghatározása érdekében bioréteg interferometriás méréseket végeztünk. Immobilizálva a biotinilált 43-mer RNS-t a sztreptavidin bioszenzor felületén, koncentrációfüggő kötődési görbéket tapasztaltunk. A meghatározott K_D érték 88 nM volt. Nithin és munkatársai (**Nithin C. és mtsai., 2019**) 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 nanomólos tartományban lévő K_D értéket határoztunk meg, ami feltételezhetően még kisebb is lehet, ha természetes sejtekben vizsgáljuk az interakciót.

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. Vizsgáltuk a 43-mer RNS kötődésének hatását a TG2 ellentétes transzamidáz és izopeptidáz aktivitására, azonban nem tapasztaltunk jelentős hatást. Bár a 43-mer RNS nem volt hatással a transzglutamináz aktivitásokra a kísérleti körülményeink között, de nem zárható ki a TG2 in vivo riboregulációja akkor, 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 érzékenységet. Az RNS-kötődés befolyásolhatja a fehérjék lokalizációját, és így azok kölcsönhatásait a transzportfehérjékkel (**Hentze MW. és mtsai., 2018**). A TG2 aránya a sejtmagban és a citoplazmában függ egy nem kanonikus sejtmagi export szignáltól (**Kojima S. és mtsai., 2012**), ami átfed a leírt potenciális RNS-kötődési felületekkel. Ez felveti annak lehetőségét, hogy az RNS-ek részt vehetnek a TG2 transzportjában a sejtmag és a citoplazma között.

Az RBP-k az RNS metabolizmus szabályozásának minden lépésében részt vehetnek, és mivel a TG2 a citoplazmában és a sejtmagban is jelen van, a transzkripció utáni génkifejeződést bármely lépésben szabályozhatja, mint RBP, hozzájárulva ezzel különböző folyamatokhoz. Az emlősök mRNS-eiben, valamint az alkalmazott 43-mer RNS-ben is megtalálható AU-gazdag elemek (ARE) az mRNS-t gyors lebomlás felé irányítják a nem stimulált sejtekben, így biztosítva, hogy az ezekből az mRNS-ekből létrejövő fehérjék nagyon alacsony szinten expresszálódjanak (**Lourou N. és mtsai., 2019**). A poli-U régiókkal rendelkező mRNS-ek a gyulladásához és a sejtproliferációhoz nélkülözhetetlen fehérjéket kódolnak, melyek expressziós szintje szükség esetén, általában rövid időre, megemelkedik. Például az aktivált T-sejtekben a TIA-1 fehérje kötődik a Fas-receptort kódoló mRNS ARE-jéhez, elősegítve annak proapoptotikus formájának a szintézisét (**Lourou N. és mtsai., 2019**). Ez az eredmény azt is bizonyítja, hogy az RBP-k elengedhetetlenek a gyulladás és az apoptózis megfelelő lefolyásához, ezáltal megakadályozva az autoimmunitást vagy a daganatos megbetegedéseket, mely folyamatokban a TG2 szerepét már bizonyították (**Eckert RL. és mtsai., 2014; Lourou N. és mtsai., 2019**). Bár a TG2-nek számos ismert hatása van a specifikus gének expressziójára ható transzkripciós faktorok modulálására (**Tanabe Y. és mtsai., 2019**), újonnan megerősített RNS-kötő képessége arra utal, hogy ezekben a szabályozásokat különféle szinteken befolyásolhatja. Például az SHMT1 kötődése az SHMT2 mRNS-hez csendesíti az adott mRNS-ből történő transzlációt (**Guiducci G. és mtsai., 2019**).

Treiber és munkatársai néhány sejtvonalban összegyűjtötték a mikroRNS-ek érését és képződését befolyásoló RBP-eket (**Treiber T. és mtsai., 2017**). E tanulmány szerint a TG2 fehérje 17 mikroRNS-sel képes kölcsönhatásba lépni, és potenciálisan befolyásolni azok termelődését. A GeneCards adatbázis alapján ezen TG2-höz kötődő mikroRNS-ek közül több is szerepet játszik az endotél sejtek működésében. Például a miR-21 negatívan szabályozza az endotél sejtek proliferációját, a miR-29c, miR-106b és miR-214 negatívan szabályozza az angiogenezist, míg a miR-31, miR-200a és miR-214 hatással lehet az endotél sejtek

migrációjára. Ezek arra utalnak, hogy a TG2 képes befolyásolni az endotél sejtek funkcióit, mint egy RNS-kötő fehérje.

Megemlítendő, hogy a TG2 extracelluláris vezikulákon keresztül is externalizálódhat **(Zemskov EA. és mtsai., 2011)**. Tehát más extracelluláris és szortírozó fehérjékhez hasonlóan a TG2 is részt vehet különböző RNS-molekulák szállításában **(Shinde A. és mtsai., 2020)**. A vezikulákkal szállított RNS-ek számos fiziológias folyamatban részt vehetnek, és hozzájárulhatnak patológiás állapotok kialakulásához is.

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 a TG2 fehérje szerkezetének alaposabb tanulmányozása, a kötött RNS molekulák azonosítása szükséges, amely kísérletek folyamatban vannak a laboratóriumunkban.

8. 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 *Sejtdhézió* és az *RNS-kötés*. A TG2 szerepe a sejtdhéziós 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.

9. Summary

The most studied member of the transglutaminase enzyme family is tissue transglutaminase (TG2), which is a multifunctional protein. It has multiple enzymatic activities and may be involved in numerous biological processes (e.g., signal transduction, cell adhesion, apoptosis). To determine the precise physiological role of TG2 in endothelial cells, we used the human immortalized HUVEC cell line, which expresses the TG2 protein in large amounts under natural conditions.

Two approaches were used to explore the TG2 interactome. In one approach, a site-specifically biotinylated recombinant TG2 immobilized on Neutravidin agarose resin was used to capture TG2 interaction partners from HUVEC cell extracts. In the other method, we developed a HUVEC cell line in which the TG2 protein was silenced and then restored by introducing a vector expressing a transgenic TG2 protein (TG2-KD+3F-TG2). Using the Flag tag, we bound TG2 together with its associated proteins to anti-FLAG M2 agarose resin. Following LC-MS/MS analysis, a total of 356 proteins were identified using the two methods, which were then analyzed using databases (STRING, PANTHER). Based on the number of unique peptides detected, the most enriched GO *Molecular Functions* were *Cell Adhesion* and *RNA Binding*. The role of TG2 in cell adhesion processes has already been proven, but its involvement in RNA-dependent processes has not yet been investigated.

The OOPS technique was used to identify RNA-binding proteins in HUVEC cells. Following LC-MS/MS analysis, 413 RNA-binding proteins were identified based on the number of detected unique peptides, including the TG2 protein. Compared to the proteins identified in the interactome study, 150 protein hits (42%) were detected in both cases, confirming the role of the TG2 protein in the functioning of RNA-protein complexes. We used a magnetic pull-down method to demonstrate the RNA-binding ability of TG2. Based on the results, the TG2 protein is able to bind to the RNA molecule when TG2 is stabilized in an open conformation. It is likely that in a closed conformation, the RNA-binding surfaces are hidden within the TG2 structure. In a bio-layer interferometry experiment, we determined the affinity of TG2-RNA binding to be 88 nM. This value may be even higher in a cellular environment with biologically relevant RNA molecules.

To gain a more accurate understanding of the RNA-binding properties of the TG2 protein, it is necessary to study the structure of the TG2 protein in more detail, map the RNA-binding sites, and identify biologically relevant RNA targets.

10. Az értekezés új megállapításai

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.

11. Irodalomjegyzék

Achyuthan KE, Greenberg CS. Identification of a guanosine triphosphate-binding site on guinea pig liver transglutaminase. Role of GTP and calcium ions in modulating activity. *J Biol Chem*. 1987;262(4):1901-1906.

Agostini, F., Zanzoni, A., Klus, P., Marchese, D., Cirillo, D., & Tartaglia, G. G. (2013). catRAPID omics: a web server for large-scale prediction of protein-RNA interactions. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(22), 2928–2930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt495>

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007;100(2):158-173. doi:10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a

Akbar A, McNeil NMR, Albert MR, et al. Structure-Activity Relationships of Potent, Targeted Covalent Inhibitors That Abolish Both the Transamidation and GTP Binding Activities of Human Tissue Transglutaminase. *J Med Chem*. 2017;60(18):7910-7927. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01070

Altuntas S, Rossin F, Marsella C, et al. The transglutaminase type 2 and pyruvate kinase isoenzyme M2 interplay in autophagy regulation. *Oncotarget*. 2015;6(42):44941-44954. doi:10.18632/oncotarget.6759

Belkin AM, Tsurupa G, Zemskov E, Veklich Y, Weisel JW, Medved L. Transglutaminase-mediated oligomerization of the fibrin(ogen) alphaC domains promotes integrin-dependent cell adhesion and signaling. *Blood*. 2005;105(9):3561-3568. doi:10.1182/blood-2004-10-4089

Belkin AM. Extracellular TG2: emerging functions and regulation. *FEBS J*. 2011;278(24):4704-4716. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08346.x

BENNETT HS, LUFT JH, HAMPTON JC. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol*. 1959;196(2):381-390. doi:10.1152/ajplegacy.1959.196.2.381

Biri, B., Kiss, B., Király, R., Schlosser, G., Láng, O., Köhidai, L., Fésüs, L., & Nyitray, L. (2016). Metastasis-associated S100A4 is a specific amine donor and an activity-independent binding partner of transglutaminase-2. *The Biochemical journal*, 473(1), 31–42. <https://doi.org/10.1042/BJ20150843>

Boros S, Xi Q, Dimke H, et al. Tissue transglutaminase inhibits the TRPV5-dependent calcium transport in an N-glycosylation-dependent manner. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(6):981-992. doi:10.1007/s00018-011-0818-z

Brinegar AE, Cooper TA. Roles for RNA-binding proteins in development and disease. *Brain Res*. 2016;1647:1-8. doi:10.1016/j.brainres.2016.02.050

Brown MT, McMurray MA. Stepwise order in protein complex assembly: approaches and emerging themes. *Open Biol*. 2025;15(1):240283. doi:10.1098/rsob.240283

Burd CG, Dreyfuss G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*. 1994;265(5172):615-621. doi:10.1126/science.8036511

Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B. M., Strein, C., Davey, N. E., Humphreys, D. T., Preiss, T., Steinmetz, L. M., Krijgsveld, J., & Hentze, M. W. (2012). Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell*, 149(6), 1393–1406. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.031>

Caudron-Herger, M., Jansen, R. E., Wassmer, E., & Diederichs, S. (2021). RBP2GO: a comprehensive pan-species database on RNA-binding proteins, their interactions and functions. *Nucleic acids research*, 49(D1), D425–D436. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1040>

- Cernadas MR, Sánchez de Miguel L, García-Durán M, et al. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res*. 1998;83(3):279-286. doi:10.1161/01.res.83.3.279
- Cléry A, Sinha R, Anczuków O, et al. Isolated pseudo-RNA-recognition motifs of SR proteins can regulate splicing using a noncanonical mode of RNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(30):E2802-E2811. doi:10.1073/pnas.1303445110
- Collighan RJ, Griffin M. Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications. *Amino Acids*. 2009;36(4):659-670. doi:10.1007/s00726-008-0190-y
- Corley, M., Burns, M. C., & Yeo, G. W. (2020). How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms. *Molecular cell*, 78(1), 9–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.011>
- Csobán-Szabó Z, Bécsi B, El Alaoui S, Fésüs L, Korponay-Szabó IR, Király R. Biochemical Characterisation of Human Transglutaminase 4. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(22):12448. <https://doi.org/10.3390/ijms222212448>
- Csosz E, Bagossi P, Nagy Z, Dosztanyi Z, Simon I, Fesus L. Substrate preference of transglutaminase 2 revealed by logistic regression analysis and intrinsic disorder examination. *J Mol Biol*. 2008;383(2):390-402. doi:10.1016/j.jmb.2008.08.026
- Csosz E, Meskó B, Fésüs L. Transdab wiki: the interactive transglutaminase substrate database on web 2.0 surface. *Amino Acids*. 2009;36(4):615-617. doi:10.1007/s00726-008-0121-y
- Davidson SM, Riquelme JA, Zheng Y, Vicencio JM, Lavandero S, Yellon DM. Endothelial cells release cardioprotective exosomes that may contribute to ischaemic preconditioning. *Sci Rep*. 2018;8(1):15885. Published 2018 Oct 26. doi:10.1038/s41598-018-34357-z
- Diaz-Hidalgo L, Altuntas S, Rossin F, et al. Transglutaminase type 2-dependent selective recruitment of proteins into exosomes under stressful cellular conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(8):2084-2092. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.05.005
- Eckert RL, Kaartinen MT, Nurminskaya M, et al. Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol Rev*. 2014;94(2):383-417. doi:10.1152/physrev.00019.2013
- Eckert RL. Transglutaminase 2 takes center stage as a cancer cell survival factor and therapy target. *Mol Carcinog*. 2019;58(6):837-853. doi:10.1002/mc.22986
- Fesus, L., & Piacentini, M. (2002). Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends in biochemical sciences*, 27(10), 534–539. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02182-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02182-5) (Fesus és mtsai, 2002)
- Fésüs L, Szondy Z. Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival. *FEBS Lett*. 2005;579(15):3297-3302. doi:10.1016/j.febslet.2005.03.063
- Folk JE, Chung SI. Molecular and catalytic properties of transglutaminases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1973;38:109-191. doi:10.1002/9780470122839.ch3
- Furini G, Schroeder N, Huang L, et al. Proteomic Profiling Reveals the Transglutaminase-2 Externalization Pathway in Kidneys after Unilateral Ureteric Obstruction. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(3):880-905. doi:10.1681/ASN.2017050479
- Grenard P, Bates MK, Aeschlimann D. Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X

and a novel gene family member, transglutaminase *Z. J Biol Chem.* 2001;276(35):33066-33078. doi:10.1074/jbc.M102553200

Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J.* 2002;368(Pt 2):377-396. doi:10.1042/BJ20021234

Guiducci, G., Paone, A., Tramonti, A., Giardina, G., Rinaldo, S., Bouzidi, A., Magnifico, M. C., Marani, M., Menendez, J. A., Fatica, A., Macone, A., Armaos, A., Tartaglia, G. G., Contestabile, R., Paiardini, A., & Cutruzzolà, F. (2019). The moonlighting RNA-binding activity of cytosolic serine hydroxymethyltransferase contributes to control compartmentalization of serine metabolism. *Nucleic acids research*, 47(8), 4240–4254. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz129>

Gundemir S, Monteagudo A, Akbar A, Keillor JW, Johnson GVW. The complex role of transglutaminase 2 in glioblastoma proliferation. *Neuro Oncol.* 2017;19(2):208-218. doi:10.1093/neuonc/now157

Haroon ZA, Wannenburg T, Gupta M, Greenberg CS, Wallin R, Sane DC. Localization of tissue transglutaminase in human carotid and coronary artery atherosclerosis: implications for plaque stability and progression. *Lab Invest.* 2001;81(1):83-93. doi:10.1038/labinvest.3780214

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1283-1316. doi:10.1152/physrev.1999.79.4.1283

Hemmings BA. Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science.* 1997;275(5300):628-630. doi:10.1126/science.275.5300.628

Hentze, M. W., Castello, A., Schwarzl, T., & Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(5), 327–341. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.130>

Holehouse AS, Kragelund BB. The molecular basis for cellular function of intrinsically disordered protein regions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024;25(3):187-211. doi:10.1038/s41580-023-00673-0

Hughes MP. Rethinking Cellular Organization: Phase Separation as a Unifying Principle in Molecular Biology. *J Mol Biol.* Published online July 31, 2025. doi:10.1016/j.jmb.2025.169367

Hwang KC, Gray CD, Sivasubramanian N, Im MJ. Interaction site of GTP binding Gh (transglutaminase II) with phospholipase C. *J Biol Chem.* 1995;270(45):27058-27062. doi:10.1074/jbc.270.45.27058

Iismaa SE, Chung L, Wu MJ, Teller DC, Yee VC, Graham RM. The core domain of the tissue transglutaminase Gh hydrolyzes GTP and ATP. *Biochemistry.* 1997;36(39):11655-11664. doi:10.1021/bi970545e

Jabri B, Terhorst C. Editorial overview: Autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2014;31:v-vii. doi:10.1016/j.coi.2014.10.010

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-1428. doi:10.1172/JCI39104

Kanchan K, Fuxreiter M, Fésüs L. Physiological, pathological, and structural implications of non-enzymatic protein-protein interactions of the multifunctional human transglutaminase 2. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(16):3009-3035. doi:10.1007/s00018-015-1909-z

Kang JH, Lee JS, Hong D, et al. Renal cell carcinoma escapes death by p53 depletion through transglutaminase 2-chaperoned autophagy. *Cell Death Dis.* 2016;7(3):e2163. Published 2016 Mar 31. doi:10.1038/cddis.2016.14

- Kang SK, Kim DK, Damron DS, Baek KJ, Im MJ. Modulation of intracellular Ca(2+) via alpha(1B)-adrenoreceptor signaling molecules, G alpha(h) (transglutaminase II) and phospholipase C-delta 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;293(1):383-390. doi:10.1016/S0006-291X(02)00197-3
- Kashiwagi T, Yokoyama K, Ishikawa K, et al. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *J Biol Chem*. 2002;277(46):44252-44260. doi:10.1074/jbc.M203933200
- Kim SJ, Kim KH, Ahn ER, Yoo BC, Kim SY. Depletion of cathepsin D by transglutaminase 2 through protein cross-linking promotes cell survival. *Amino Acids*. 2013;44(1):73-80. doi:10.1007/s00726-011-1089-6
- Király R, Csosz E, Kurtán T, et al. Functional significance of five noncanonical Ca2+-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. *FEBS J*. 2009;276(23):7083-7096. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07420.x
- Király, R., Demény, M., & Fésüs, L. (2011). Protein transamidation by transglutaminase 2 in cells: a disputed Ca2+-dependent action of a multifunctional protein. *The FEBS journal*, 278(24), 4717–4739. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08345.x>
- Kishore S, Lubner S, Zavolan M. Deciphering the role of RNA-binding proteins in the post-transcriptional control of gene expression. *Brief Funct Genomics*. 2010;9(5-6):391-404. doi:10.1093/bfpg/elq028
- Klöck C, Diraimondo TR, Khosla C. Role of transglutaminase 2 in celiac disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*. 2012;34(4):513-522. doi:10.1007/s00281-012-0305-0
- Kojima, S., Kuo, T. F., & Tatsukawa, H. (2012). Regulation of transglutaminase-mediated hepatic cell death in alcoholic steatohepatitis and non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 27 Suppl 2, 52–57. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.07009.x>
- Liu S, Cerione RA, Clardy J. Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):2743-2747. doi:10.1073/pnas.042454899
- Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(2):140-156. doi:10.1038/nrm1014
- Lorand L, Iismaa SE. Transglutaminase diseases: from biochemistry to the bedside. *FASEB J*. 2019;33(1):3-12. doi:10.1096/fj.201801544R
- Lourou, N., Gavriilidis, M., & Kontoyiannis, D. L. (2019). Lessons from studying the AU-rich elements in chronic inflammation and autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, 104, 102334. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102334>
- Masliah G, Barraud P, Allain FH. RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(11):1875-1895. doi:10.1007/s00018-012-1119-x
- Miyazono K, Thyberg J, Heldin CH. Retention of the transforming growth factor-beta 1 precursor in the Golgi complex in a latent endoglycosidase H-sensitive form. *J Biol Chem*. 1992;267(8):5668-5675.
- Multhaupt HA, Leitinger B, Gullberg D, Couchman JR. Extracellular matrix component signaling in cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;97:28-40. doi:10.1016/j.addr.2015.10.013
- Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest*. 1988;58(3):249-261.

- Murthy SN, Iismaa S, Begg G, Freymann DM, Graham RM, Lorand L. Conserved tryptophan in the core domain of transglutaminase is essential for catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):2738-2742. doi:10.1073/pnas.052715799
- MYCEK MJ, CLARKE DD, NEIDLE A, WAELSCH H. Amine incorporation into insulin as catalyzed by transglutaminase. *Arch Biochem Biophys*. 1959;84:528-540. doi:10.1016/0003-9861(59)90613-7
- Nadalutti C, Viiri KM, Kaukinen K, Mäki M, Lindfors K. Extracellular transglutaminase 2 has a role in cell adhesion, whereas intracellular transglutaminase 2 is involved in regulation of endothelial cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif*. 2011;44(1):49-58. doi:10.1111/j.1365-2184.2010.00716.x
- Nakaoka H, Perez DM, Baek KJ, et al. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science*. 1994;264(5165):1593-1596. doi:10.1126/science.7911253
- Nishiura H, Shibuya Y, Yamamoto T. S19 ribosomal protein cross-linked dimer causes monocyte-predominant infiltration by means of molecular mimicry to complement C5a. *Lab Invest*. 1998;78(12):1615-1623.
- Nithin, C., Mukherjee, S., & Bahadur, R. P. (2019). A structure-based model for the prediction of protein-RNA binding affinity. *RNA (New York, N.Y.)*, 25(12), 1628–1645. <https://doi.org/10.1261/rna.071779.119>
- Nunes I, Gleizes PE, Metz CN, Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta. *J Cell Biol*. 1997;136(5):1151-1163. doi:10.1083/jcb.136.5.1151
- Ottoz, D. S. M., & Berchowitz, L. E. (2020). The role of disorder in RNA binding affinity and specificity. *Open biology*, 10(12), 200328. <https://doi.org/10.1098/rsob.200328>
- Pelham HR, Brown DD. A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(7):4170-4174. doi:10.1073/pnas.77.7.4170
- Pinkas DM, Strop P, Brunger AT, Khosla C. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLoS Biol*. 2007;5(12):e327. doi:10.1371/journal.pbio.0050327
- Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(176 Pt 1):1-40. doi:10.1007/3-540-32967-6_1
- Qiao SW, Sollid LM, Blumberg RS. Antigen presentation in celiac disease. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(1):111-117. doi:10.1016/j.coi.2009.03.004
- Queiroz, R. M. L., Smith, T., Villanueva, E., Marti-Solano, M., Monti, M., Pizzinga, M., Mirea, D. M., Ramakrishna, M., Harvey, R. F., Dezi, V., Thomas, G. H., Willis, A. E., & Lilley, K. S. (2019). Comprehensive identification of RNA-protein interactions in any organism using orthogonal organic phase separation (OOPS). *Nature biotechnology*, 37(2), 169–178. <https://doi.org/10.1038/s41587-018-0001-2>
- Ranawakage DC, Takada T, Kamachi Y. HiBiT-qIP, HiBiT-based quantitative immunoprecipitation, facilitates the determination of antibody affinity under immunoprecipitation conditions. *Sci Rep*. 2019;9(1):6895. Published 2019 May 3. doi:10.1038/s41598-019-43319-y
- Ritter SJ, Davies PJ. Identification of a transforming growth factor-beta1/bone morphogenetic protein 4 (TGF-beta1/BMP4) response element within the mouse tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem*. 1998;273(21):12798-12806. doi:10.1074/jbc.273.21.12798
- Rossin F, D'Eletto M, Falasca L, et al. Transglutaminase 2 ablation leads to mitophagy impairment associated with a metabolic shift towards aerobic glycolysis. *Cell Death Differ*. 2015;22(3):408-418. doi:10.1038/cdd.2014.106

Sándor K, Daniel B, Kiss B, Kovács F, Szondy Z. Transcriptional control of transglutaminase 2 expression in mouse apoptotic thymocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(8):964-974. doi:10.1016/j.bbtagrm.2016.05.011

Santhanam L, Tuday EC, Webb AK, et al. Decreased S-nitrosylation of tissue transglutaminase contributes to age-related increases in vascular stiffness. *Circ Res*. 2010;107(1):117-125. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.215228

Sarang Z, Mádi A, Koy C, et al. Tissue transglutaminase (TG2) facilitates phosphatidylserine exposure and calpain activity in calcium-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ*. 2007;14(10):1842-1844. doi:10.1038/sj.cdd.4402193

Sarang Z, Tóth B, Balajthy Z, et al. Some lessons from the tissue transglutaminase knockout mouse. *Amino Acids*. 2009;36(4):625-631. doi:10.1007/s00726-008-0130-x

SARKAR NK, CLARKE DD, WAELSCH H. An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1957;25(2):451-452. doi:10.1016/0006-3002(57)90512-7

Shaw A, Tóth BB, Király R, et al. Irisin Stimulates the Release of CXCL1 From Differentiating Human Subcutaneous and Deep-Neck Derived Adipocytes via Upregulation of NFκB Pathway. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:737872. Published 2021 Oct 11. doi:10.3389/fcell.2021.737872

Shinde A, Paez JS, Libring S, Hopkins K, Solorio L, Wendt MK. Transglutaminase-2 facilitates extracellular vesicle-mediated establishment of the metastatic niche. *Oncogenesis*. 2020;9(2):16. Published 2020 Feb 13. doi:10.1038/s41389-020-0204-5

Sollid LM, Khosla C. Novel therapies for coeliac disease. *J Intern Med*. 2011;269(6):604-613. doi:10.1111/j.1365-2796.2011.02376.x

Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase--guilt by association?. *Gut*. 1997;41(6):851-852. doi:10.1136/gut.41.6.851

Sridharan S, Jain K, Basu A. Regulation of autophagy by kinases. *Cancers (Basel)*. 2011;3(2):2630-2654. Published 2011 Jun 9. doi:10.3390/cancers3022630

Szondy Z, Korponay-Szabó I, Király R, Sarang Z, Tsay GJ. Transglutaminase 2 in human diseases. *Biomedicine (Taipei)*. 2017;7(3):15. doi:10.1051/bmdcn/2017070315

Tanabe Y, Yamane M, Kato M, et al. Studies on differentiation-dependent expression and activity of distinct transglutaminases by specific substrate peptides using three-dimensional reconstituted epidermis. *FEBS J*. 2019;286(13):2536-2548. doi:10.1111/febs.14832

Thangaraju K, Király R, Demény MA, András Mótyán J, Fuxreiter M, Fésüs L. Genomic variants reveal differential evolutionary constraints on human transglutaminases and point towards unrecognized significance of transglutaminase 2. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172189. Published 2017 Mar 1. doi:10.1371/journal.pone.0172189

Thomázy V, Fésüs L. Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*. 1989;255(1):215-224. doi:10.1007/BF00229084

Tian B, Bevilacqua PC, Diegelman-Parente A, Mathews MB. The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(12):1013-1023. doi:10.1038/nrm1528

Treiber, T., Treiber, N., Plessmann, U., Harlander, S., Daiß, J. L., Eichner, N., Lehmann, G., Schall, K., Urlaub, H., & Meister, G. (2017). A Compendium of RNA-Binding Proteins that Regulate MicroRNA Biogenesis. *Molecular cell*, 66(2), 270–284.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.014>

- Troilo H, Steer R, Collins RF, Kielty CM, Baldock C. Independent multimerization of Latent TGF β Binding Protein-1 stabilized by cross-linking and enhanced by heparan sulfate. *Sci Rep*. 2016;6:34347. Published 2016 Sep 28. doi:10.1038/srep34347
- Valverde R, Edwards L, Regan L. Structure and function of KH domains. *FEBS J*. 2008;275(11):2712-2726. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06411.x
- Verderio E, Gaudry C, Gross S, Smith C, Downes S, Griffin M. Regulation of cell surface tissue transglutaminase: effects on matrix storage of latent transforming growth factor-beta binding protein-1. *J Histochem Cytochem*. 1999;47(11):1417-1432. doi:10.1177/002215549904701108
- Völkens M, Preiss T, Hentze MW. RNA-binding proteins in cardiovascular biology and disease: the beat goes on. *Nat Rev Cardiol*. 2024;21(6):361-378. doi:10.1038/s41569-023-00958-z
- Wei H, Sundararaman A, Dickson E, et al. Characterization of the polarized endothelial secretome. *FASEB J*. 2019;33(11):12277-12287. doi:10.1096/fj.201900262R
- Wilhelmus MM, van Dam AM, Drukarch B. Tissue transglutaminase: a novel pharmacological target in preventing toxic protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Eur J Pharmacol*. 2008;585(2-3):464-472. doi:10.1016/j.ejphar.2008.01.059
- Wilhelmus MMM, Tonoli E, Coveney C, et al. The Transglutaminase-2 Interactome in the APP23 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Cells*. 2022;11(3):389. Published 2022 Jan 24. doi:10.3390/cells11030389
- Yamada T, Yoshiyama Y, Kawaguchi N, et al. Possible roles of transglutaminases in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1998;9(2):103-110. doi:10.1159/000017031
- Yen JH, Lin LC, Chen MC, et al. The metastatic tumor antigen 1-transglutaminase-2 pathway is involved in self-limitation of monosodium urate crystal-induced inflammation by upregulating TGF- β 1. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):65. Published 2015 Mar 19. doi:10.1186/s13075-015-0592-7
- Zeke, A., Schád, É., Horváth, T., Abukhairan, R., Szabó, B., & Tantos, A. (2022). Deep structural insights into RNA-binding disordered protein regions. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 13(5), e1714. <https://doi.org/10.1002/wrna.1714>
- Zemskov EA, Loukinova E, Mikhailenko I, Coleman RA, Strickland DK, Belkin AM. Regulation of platelet-derived growth factor receptor function by integrin-associated cell surface transglutaminase. *J Biol Chem*. 2009;284(24):16693-16703. doi:10.1074/jbc.M109.010769
- Zemskov EA, Mikhailenko I, Smith EP, Belkin AM. Tissue transglutaminase promotes PDGF/PDGFR-mediated signaling and responses in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 2012;227(5):2089-2096. doi:10.1002/jcp.22938
- Zemskov EA, Mikhailenko I, Strickland DK, Belkin AM. Cell-surface transglutaminase undergoes internalization and lysosomal degradation: an essential role for LRP1. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 18):3188-3199. doi:10.1242/jcs.010397
- Zemskov, E. A., Mikhailenko, I., Hsia, R. C., Zaritskaya, L., & Belkin, A. M. (2011). Unconventional secretion of tissue transglutaminase involves phospholipid-dependent delivery into recycling endosomes. *PLoS one*, 6(4), e19414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019414>

12. Tárgyszavak

humán köldökszinór véna eredetű endotél sejtek (HUVEC), transzglutamináz 2, RNS-kötő fehérje, RNS-kötés, ortogonális fázis szeparáció (OOPS), mágneses RNS-fehérje pull-down, coimmunprecipitáció, interaktom, endotél sejtek

13. Keywords

human umbilical cord vein derived endothelial cells (HUVEC), transglutaminase 2, RNA-binding protein, RNA-binding, orthogonal organic phase separation (OOPS), magnetic RNA-protein pull-down, coimmunoprecipitation, interactome, endothelial cells

14. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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.



15. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt tisztelettel szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Király Róbertnek, aki minden segítséget megadva támogatott munkám során. Hálával tartozom tanácsaiért, türelméért, segítőkészségéért.

Köszönetem fejezem ki Prof. Dr. Fésüs Lászlónak, amiért lehetővé tette számomra a Kutatócsoportban való munkát.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Tőzsér Józsefnek, aki lehetőséget adott, hogy a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetnél végezzem a kutatómunkám.

Szeretnék köszönetet mondani a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet valamennyi dolgozójának, akik valamilyen formában hozzájárultak a sikeres laboratóriumi munkámhoz.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Csobán-Szabó Zsuzsának, Dr. Jambrovics Károlynak, akik segítettek, és megtanították az eredmények megfelelő kiértékelésének menetét.

Külön köszönöm az önzetlen segítséget Nagy Jennifer laborasszisztensnek.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak, barátaimnak, akik végig támogattak és mellettem álltak.