

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Humán transzglutaminázok extracelluláris
folyadékokban: a XIII-as véralvadási faktor
izopeptidáz aktivitásának és a transzglutamináz 4
biokémiai karakterizálása**

Csobán-Szabó Zsuzsa

Témavezető: Dr. Király Róbert



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2022

Humán transzglutaminázok extracelluláris folyadékokban: a XIII-as véralvadási faktor izopeptidáz aktivitásának és a transzglutamináz 4 biokémiai karakterizálása

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

Írta: Csobán-Szabó Zsuzsa, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai doktori iskolája keretében

Témavezető: Dr. Király Róbert, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Ambrus Attila, PhD

Dr. Törőcsik Dániel, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

tagok: Dr. Ambrus Attila, PhD
Dr. Törőcsik Dániel, PhD
Dr. Szilágyi László, PhD
Dr. Katona Éva, PhD

Az értekezés védésének (hibrid formában) időpontja: 2022. június 17. 13:00 óra.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a szabo.zsuzsa@med.unideb.hu email címre küldött üzenetben 2022. június 16. 16:00 óráig.

A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1. Bevezetés

1.1. A transzglutamináz enzimesaládtagok és aktivitásaik

A transzglutaminázok (TG-ok, EC 2.3.2.13), fehérjék poszt-transzlációs módosítását katalizáló enzimek, amelyek legismertebb sajátossága, hogy kalcium-függő aktivitásuk révén glutamin és lizin oldalláncok között, N- ϵ (γ -glutamil)lizin kovalens izopeptid kötéseket alakítanak ki. A transzglutaminázokra jellemző az aktív helyükön található, Cys-His-Asp aminosavakból álló katalitikus triád. A 9 humán transzglutamináz családtag közül a 4.2 sávfehérje esetén a Cys-Ala csere, a családtag inaktivitását eredményezi. A 8 katalitikusan aktív humán transzglutamináz közé tartozik a transzglutamináz 1-7 (hTG1-7), és a humán XIII-as véralvadási faktor A alegysége (hFXIII-A). Az enzimatis aktivitásuk mellett a TG-ok a sejtekben állványzati funkciókat is ellátnak, szerepük van a membrán integritásának fenntartásában, szabályozzák a sejtadhéziót és a jelátvitelben is részt vesznek. Az egyik legrégebben ismert és legjobban tanulmányozott családtag a hTG2, szerepet játszik a citoszkeleton szabályozásában, a sejt adhézióban és a körülményektől függően a sejtek túlélésében vagy apoptózisában. A hTG1, hTG3, és a hTG5 főként a bőrben vannak jelen, és fontos szerepük van a kornifikációban. A hFXIII-A legismertebb szerepét a véralvadásban tölti be, ahol a kemény alvadék kialakításában vesz főleg részt. A hTG6 és hTG7 enzimekről nagyon kevés információ áll rendelkezésre. A rágcsálókban a TG4 a kopulációs dugó kialakításában vesz részt, a hTG4 pedig prosztatadaganatok, és az 1-es típusú autoimmun poliendokrin szindróma (APS1) kialakulásával hozható összefüggésbe.

A transzglutamináz aktivitások igen változatosak lehetnek, többféle Gln módosítást eredményezhetnek. Leggyakrabban a Ca^{2+} -függő transzglutamináz aktivitásuk révén fehérjék glutamin és lizin oldalláncjai között izopeptid kötést alakítanak ki, de katalizálhatják mono- és poliaminok fehérjék glutamin oldalláncába történő beépülését is (transzamidálás, amin beépülés). Az eddig kevésbé tanulmányozott izopeptidáz aktivitás nem teljes megfordítása a transzamidálásnak, mivel az eredetileg szubsztrátként funkcionáló glutamin glutamáttá alakul a fehérjében, amely a későbbiekben már nem képes reagálni az enzimmel.

1.2. A humán FXIII-A

A hFXIII-A megtalálható a vérplazmában, valamint intra- és extracellulárisan is. A vérben heterotetramerként van jelen, amely két A és egy két B alegységből épül fel. Az A alegységen található aktivációs peptidet a trombin hasítja, ezáltal az enzim katalitikusan aktívvá válik. A B alegység részt vesz az A alegység szabályozásában, és állványozó funkciót is betölt.

A hFXIII-A összetett funkcióval rendelkezik, de a legjobban tanulmányozott funkcióját a hemosztázis fenntartásában tölti be. A véralvadási kaszkád utolsó tagjaként, az aktivált hFXIII-A izopeptid kötéseket alakít ki az addig csak másodlagos kötések által összetartott fibrinháló molekulái között, ezáltal biztosítja a vérrög mechanikai stabilitását. Emellett a hFXIII-A a fibrinolízis szabályozásában is részt vesz. Egyrészt a keresztkötések csökkentik az alvadék hozzáférhetőségét a fibrinolitikus enzimek számára, valamint csökkenti a fibrin szálak átmérőjét és sűrűségét. Több fibrinolízis inhibitor is beépít az alvadékba, azonban az antifibrinolitikus hatás főként az α 2-antiplazmin beépítésének köszönhető. Ugyanakkor, a hFXIII-A izopeptidáz aktivitása révén a korábban izopeptid kötések keresztül a fibrin molekulákhoz kapcsolt α 2-antiplazmint izopeptidáz aktivitásával képes ki is hasítani, ezáltal gyorsíthatja a fibrinolízist.

Emellett a hFXIII-nak szerepe van még a graviditás fenntartásában, a sebgyógyulásban, angiogenezisben, az adipociták, porc- és csontsejtek differenciációjában, és az immunrendszer szabályozásában is.

1.2.1. A hFXIII-A aktivitás mérések klinikai jelentősége

Régóta ismert, hogy a hFXIII-A nélkülözhetetlen szerepet tölt be a hemosztázisban, és a hFXIII-A rendellenességek súlyos vérzési problémákat okoznak. Ma Magyarországon évente több mint 2000 ember hal meg trombózis következtében. A trombózis megelőzésére véralvadásgátló szereket alkalmaznak, amelyek hátránya, hogy befolyásolják a hemosztázist, és ezáltal vérzékenységet okozhatnak. Nagy szükség van biztonságosabb terápiás lehetőségekre.

A hFXIII-A gátlása egy ki nem használt lehetőség az antikoaguláns szerek terén. A hFXIII-A az egyedüli véralvadási faktor, amely meghatározza az alvadék szilárdságát és félélet idejét. Egy német cég, a Zedira GmbH kifejlesztett egy kis molekulájú hFXIII-A inhibitor (ZED3197), amely nyúl modellben alkalmazva nem növelte meg a vérzés idejét, valamint nem befolyásolta sem a trombin szintet, sem pedig a vérlemezke aktivációt. Tehát, ennek az inhibitornak az alkalmazásával a vérzés, mint mellékhatás nem jelentene gondot, ezáltal ígéretes gyógyszer jelöltnek tűnik, azonban a klinikai kipróbálása még várat magára.

Egy másik, véralvadási rendellenességet, a hFXIII-A hiányt egy autoszómális recesszív rendellenesség okozza, amelyet élethosszig tartó vérzékenység és hibás sebgyógyulás jellemez. A betegség molekuláris hátterét nagy heterogenitás jellemzi, amely hozzájárul a betegség különböző súlyosságú megnyilvánulásaihoz. Több mint 60 hFXIII mutációt azonosítottak, valamint egyedi nukleotid polimorfizmusokat is leírtak, amelyek befolyásolhatják a hFXIII-A

aktivitását. Ezekben a betegekben a hFXIII-A szint és aktivitás meghatározása alapvető fontosságú.

A hFXIII-A aktivitásának pontos, érzékeny mérése főként hFXIII-A hiányos betegek esetében nagy kihívást jelent az enzim alacsony aktivitásából kifolyólag. A hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának mérése jó lehetőséget kínál a hFXIII-A aktivitásának pontos, nagyon érzékeny meghatározására a plazmában. Több mérést is kifejlesztettek már a hFXIII-A aktivitásának mérésére, de az enzim izopeptidáz aktivitásának mérését csak egy fluorimetriás módszer teszi lehetővé, amelyben a Zedira GmbH A101-es terméke a szubsztrát. A hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának automatizálható mérése nagyban elősegítheti a hFXIII-A hiány diagnosztizálását. Az izopeptidáz aktivitás detektálásának egyedülálló előnye, hogy nincs alternatív, párhuzamos reakció és a szubsztrát átalakítása mindig egy irányban történik, mivel a kialakult glutamát már nem képes reagálni az enzimmal. Azonban a transzglutaminázok gyakran fehérjéken fejtik ki hatásukat, így a reakciók kinetikáját nem lehet megjósolni peptidek vagy kis molekulájú amin szubsztrátokat alkalmazva. Ezt bizonyítja, hogy korábban kifejlesztettünk olyan hTG2 mutánsokat, amelyek emelkedett izopeptidáz aktivitást mutatnak peptid szubsztrátokkal, de a fehérje-peptid alapú szubsztrát esetében ennek ellenkezője volt megfigyelhető. A véralvadást a hFXIII-A aktivitásának módosításán keresztül befolyásoló hatóanyagok teszteléséhez, szükség lenne fehérje-peptid alapú hFXIII-A aktivitás mérési módszerekre.

1.3. A humán transzglutamináz 4

A TG4 egyetlen igazán jól ismert biológiai funkciója a rágcsálók kopulációs dugójának kialakítása, kalcium-függő transzamidáz aktivitása révén. Az ejakulációt követően a rágcsálók ondófoládékában lévő fehérjék a nőstények hüvelyében, a hím koaguláló mirigye által szekretált enzim, a TG4 keresztkötő aktivitása következtében megvalvad és kemény dugót képez, amely akár napokig is a méhszáj közelében marad. Az ondóhólyag és a koaguláló mirigy eltávolítása a rágcsálókban megakadályozza a kopulációs dugó formálódását, és az alom méretét is csökkenti. Valószínűleg a kopulációs dugó a megtermékenyítés utáni eseményeket is befolyásolja (beágyazódás, terhesség).

A rágcsálók jó kísérleti állatok az emlősök szaporodásának vizsgálatához, így a rágcsáló TG4-et intenzíven tanulmányozták. A legnagyobb előrelépést az jelentette, amikor felismerték, hogy a patkányok kopulációs dugójának kialakításában résztvevő vezikuláz, vagy dorzális protein-1 egy transzglutamináz családtag. Karakterizálták a patkány TG4 transzamidáz

aktivitását és a poszttranszlációs módosításait is azonosították. Felismerték, hogy már 0,1 mM SDS is növeli az enzim aktivitását, amely alapján azt a következtetést vonták le, hogy a TG4 lipid felülethez kötődve fejt ki aktivitását. Kimutatták, hogy a patkány TG4 expressziója androgén függő, ugyanis a patkány kasztrálását követően az enzim mRNS expressziója 80%-kal csökkent. A patkány TG4 GTP kötő sajátságát is felismerték, illetve azt is bebizonyították, hogy az enzim N-terminális része felelős a GTP kötéséért. Kimutatták, hogy a GTP gátolja az enzim kalcium-függő transzamidáz aktivitását. MDCK (Madin-Darby kutya vese) sejtekben termelt TG4 nem szekretálódott a sejtek médiumába, feltételezhetően a poszttranszlációs különbségeknek köszönhetően.

A rágcsáló TG4-gyel szemben a humán TG4 (hTG4) fiziológiás funkciója kevésbé ismert. Legnagyobb mennyiségben a prosztata lumenális epitél sejtjeiben expresszálódik. A prosztatán kívül azonban kisebb mennyiségben jelen van a vizelet glomeruláris membrán vezikuláiban, hasnyálmirigy sejtekben, valamint a nyálban is detektálható teljes méretben és egy kb. 55 kDa nagyságú fragment formájában. Patkány és egér aorta és vena cava szövetekben szintén kimutatták a TG4 jelenlétét, azonban az irodalomban nincs arra vonatkozó adat, hogy a humán aorta és vena cava szövetek is tartalmaznak hTG4-et. Patológias körülmények között, mell, húgyhólyag, tüdő és kolorektális daganat sejtek is tartalmaznak hTG4-et.

A hímivarsejtek antigén sajátságai jól ismertek, amelyből kifolyólag a női nemi traktusba jutva, idegen anyagként immun választ kellene kiváltaniuk. Ez olyan mértékben károsítaná a hímivarsejteket, hogy a megtermékenyítés nem valósulhatna meg. Azonban mégsem ez történik, részben a TG4-nek köszönhetően. Patkányokban és egerekben kimutatták, hogy a TG4 olyan immunszuppresszív anyagokat kapcsol a spermiumok felszínére, amelyek meggátolják a nőstények immunreakcióit.

Egy humán autoimmun betegség, az 1-es típusú autoimmun poliendokrin szindróma (APS1) esetén a legtöbb felnőtt férfi beteg esetében hTG4 ellenes autoantitesteket detektáltak. A betegséget modellező hím egerekben a TG4 ellenes immunitás destruktív prosztatagyulladásal és károsodott TG4 szekréciójával járt.

A főemlősök párzási szokásaival több anatómiai tulajdonság is összefüggésben van. Több sperma fehérje, köztük a TG4 is adaptívan fejlődik a főemlősökben, és ez különösen szembetűnő az ember és a csimpánz összehasonlítása során. A rágcsálók kopulációs dugójában részt vevő gének funkciójának látszólagos elvesztését több tanulmány is kimutatta, azokban a fajokban, ahol alacsony vagy egyáltalán nincs jelen spermiumverseny. Az emberek esetében valószínűleg nem gyakran fordul elő spermiumverseny, mivel a legtöbb humán társadalomban monogámia vagy poligámia jellemző. A humán sperma az ejakulációt követően csak pár percre

gélesedik el, azt követően pedig újra elfolyósodik. A humán szemínális folyadék fő összetevői a szemínogelin I és II fehérjék. A humán ondófoladékban is jelen van a hTG4, és transzamidáz aktivitás is megfigyelhető, azonban a szemínogelinek keresztükötése in vitro nem figyelhető meg. Ezeknek a géneknek az adaptív evolúciójában a spermiumverseny volt az irányító tényező. Mivel kopulációs dugó nem képződik az emberekben, így a rácsálókban a kopulációs dugó képzésében részt vevő fehérjék humán ortológjai jelentős evolúciós változáson mehettek át.

A humán TGM4 és a F13A1 a transzglutamináz enzimesaládon belül és más génekhez viszonyítva is magas mutációs rátával rendelkeznek és a leggyakoribb nem szinonim egyedi nukleotid variációk allél frekvenciája a TG4 esetében a legmagasabb. Ez arra utal, hogy a TG4 evolúciós nyomása a többi transzglutaminázhoz képest alacsonyabb. Elképzelhető, hogy a spermaverseny hiányában a kopulációs dugóban részt vevő fehérjék ortológjai olyan evolúciós változáson mentek keresztül, amely révén emberben már elvesztették a kopulációs dugó kialakításához köthető funkciójukat.

A hTG4 magas szintje összefüggésben van a prosztatadaganat sejtek emelkedett invazivitásával. A hTG4-nek szerepe van a sejtek migrációjában, membrán mikromozgásokban és a sejt mátrix adhézióban. Rekombináns hTG4 kezelés vagy a hTG4 túltermelése prosztatadaganat sejtekben az E-kadherin csökkentését eredményezte és a mesenchimális jellemzők kerültek előtérbe az epitéliális jellemzőkkel szemben. Valamint a sejtek motilitása is növekedett. PC-3 sejtekben a hTG4 túltermelése elősegítette a sejtek adhézióját az endotél sejtekhez, amely arra utal, hogy a hTG4 fontos szerepet játszhat a daganat sejtek és az endotél közti interakcióban. A hTG4 képes antagonizálni az IL-24 sejt növekedésre és migrációra való hatását prosztatadaganat sejtekben, valamint a RON-nal együttműködve növeli a prosztatadaganatos sejtek migrációját.

A Cancer Genom Atlas alapján a hTG4 expressziója a primer prosztatadaganatok esetében volt a legmagasabb, más humán daganattípusokkal összehasonlítva. A hTG4 expressziója primer tumorok esetében összefüggést mutat a betegség progressziójával. Azoknak a betegeknek, akiknek a primer daganatában magas hTG4 expresszió van jelen, jelentősen csökken a túlélési idejük. Ezért ezekben a daganatokban a hTG4 potenciális kemoterápiás célpont lehet. Prostata tumorral rendelkező betegek spermaplazmáiban, amely legalább 50 éves betegektől származtak, és a szérum prostata specifikus antigén szintjük legalább 4 ng/ml volt, a hTG4 szintje magasabbnak bizonyult, mint az egészséges egyénektől származó minták esetében, így a hTG4 a prostatatumor biológiai markerként is szolgálhat.

2. Célkitűzések

- A hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának kimutatása fehérje szubsztráton
- Fehérje-peptid alapú kinetikus anizotrópiás mérés kifejlesztése a hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának teszteléséhez.
- A hTG4 transzamidáz aktivitásának és szabályozásának vizsgálata.
- A hTG4 nyálban betöltött biológiai szerepének feltárásához a hTG4 szubsztrátjainak és interakciós partnereinek azonosítása.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Western blot analízisek

SDS-PAGE analízist 10%-os Tris-glicin géllal végeztük, amelyet felszár az blottolás követett. A membrán blokkolásához 5 (m/v)% tejjorral kiegészített TTBS puffert használtunk majd az antitesteket 0,5 (m/v) %-os tejpört tartalmazó TTBS pufferben hígítottuk. Előhíváshoz WesternBright ECL HRP szubsztrátot és Agfa filmet használtunk.

3.2. Fehérje termelés és tisztítás

Az S100A4(GST) és a rekombináns humán TG2 termelése és tisztítása a kutatócsoportunk által korábban közölt módon *Rosetta 2 (DE3)* sejtekből affinitáskromatográfiával történt. A rekombináns humán TG4 enzimet *E. coli BL21 (DE3) pLysS* bakteriális sejtekben IPTG indukcióval, egy éjszakán át, alacsony hőmérsékleten expresszáltuk. A sejteket centrifugálás után felszuszpendáltuk. Szonikálást és centrifugálást követően a felülúszóból Talon affinitás kromatográfiával, majd ioncserélő kromatográfiával tisztítottuk a rekombináns hTG4-et. A rekombináns hTG4 tisztaságát (>90%) Coomassie festéssel és Western blottal ellenőriztük. A biotinizálható hTG4 expressziójához *E. coli Rosetta 2 (DE3) pLysS* sejteket használtunk. A biotinizálást BirA ligázzal végeztük, majd a be nem épült biotint dialízissel távolítottuk el.

3.3. A hFXIII-A és hTG2 aktivitásának kinetikus mérése

5 nM hTG2 vagy hFXIII-A jelenlétében 100 nM FLpepT26 vagy FlpepPI2 jelölt peptideket inkubáltunk 5 μ M S100A4(GST) fehérjével HEPES (pH 7,5) transzamidáz pufferben. Az izopeptidáz reakciók esetében 380 nM FLpepT26-S100A4(GST) vagy 259,5 nM FLpepPI2-S100A4(GST) keresztkötött szubsztrátot alkalmaztunk MOPS (pH 6,8) izopeptidáz pufferben különböző koncentrációjú hTG2 vagy hFXIII-A jelenlétében. A negatív kontroll reakciók 10 mM EDTA-t és 2 mM jódacetamidot (IA), a mérési reakciók pedig 5 mM Ca^{2+} -t tartalmaztak. A normál humán plazma minták 10-szeres hígításban voltak alkalmazva, 2 mM GPRP peptid és 5 mg/ml polibrén jelenlétében. A hFXIII-A reakciói esetén a reakció elegy 500 mU trombint is tartalmazott. A fluoreszcencia polarizáció változását a Synergy H1 microplate olvasóval detektáltuk. A reakció sebességek a percenkénti anizotrópia változás alapján lettek meghatározva. A reakció elegyeket SDS-PAGE segítségével elválasztottuk, majd a beépülést mutató fluoreszcens sávokat PharosFX Plus Molecular Imager készülék segítségével is detektáltuk.

3.4. A hTG4 és hTG2 transzamidáz aktivitásának végpontos mérése

A hTG4 transzamidáz aktivitásának mérésére a klasszikus mikrotiter lemez mérést használtuk, kisebb módosításokkal. A transzglutamináz reakció általában 2,5 µg hTG4 enzim, 0,5 mM biotin-pentilamin (BPA) szubsztrát, 10 mM DTT és 5 mM Ca²⁺ jelenlétében zajlott. Az extravidin alkalikus foszfatáz (1/2500) katalizált reakció színváltozását 405 nm-en követtük Synergy H1 készülék segítségével. A transzglutamináz reakció sebességét a foszfatáz reakció percenkénti mAbs változásával határoztuk meg. Különböző redukáló vagy oxidáló körülmények beállításához a reakció elegyeket 2,4 mM GSSG-vel és 0, 0,24 0,45, 1,25 vagy 2,4 mM GSH-val egészítettük ki. A [GSH]²/[GSSG] aránya végső moláris koncentrációkból lett kiszámolva.

3.5. A hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának tesztelése keresztkötött fibrin degradációs termékeken

Keresztkötött fibrin degradációs termékeket (xFDP, D-dimer) és fibrin degradációs termékeket (FDP) rekombináns humán FXIII-A jelenlétében, vagy a kontroll minták esetében enzim nélkül inkubáltuk 20 mM MOPS (pH 6,8) pufferben. A reakció 2 órán keresztül, 37°C-on zajlott, majd a reakció elegyet SDS-PAGE segítségével elválasztottuk és Western blot analízissel vizsgáltuk.

3.6. Fibronektin kötés ellenőrzése

Fibronektin kötés ellenőrzéséhez NuncTM maxisorp plate-et 0,3 µg fibronektinnel fedtük 9,6-os pH értékű bikarbonát pufferben, majd hTG2-t, vagy hTG4-et adtunk a lyukakhoz és a kikötődött rekombináns enzimeket anti-His₆/HRP antitesttel és 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinnel detektáltuk. Az abszorbancia értékeket 450 nm-en Synergy H1 készülékkel mértük.

3.7. Guanozin-trifoszfát nukleotid kötő próbák

A hTG4 nukleotid kötésének teszteléséhez korábbi publikációk alapján BODIPY-FL-GTPγS-t és GTP-agarózt használtunk, kisebb módosításokkal. A fehérjéhez kötődő BODIPY-FL-GTPγS magasabb fluoreszcencia értéket mutat, amelyet a Synergy H1 készülékkel mértünk. A kísérlethez Nunc fekete mikroplatet, pozitív kontrollként 100 nM rekombináns hTG2-t használtunk. A GTP-agaróz „pull-down” méréshez 5 µg rekombináns hTG4-et vagy hTG2-t használtunk. A GTP-agaróz gyantához kötődött transzglutaminázokat kétszeres denaturáló

puffer hozzáadását követően 10 percig 100°C-on történő inkubálással eluáltuk. A Western blot analízis során anti-His₆/HRP antitestet használtunk.

3.8. Differenciális Pásztázó Fluorimetria

A humán TG4 hőstabilitását Differenciális Pásztázó Fluorimetriával teszteltük. A Prometheus NT.48 műszer lehetővé teszi a fehérjék hő hatására történő kitekeredésének jelölés mentes detektálását, a fehérjék belső fluoreszcencia változása alapján, miközben a hőmérséklet 20-ról 95°C-ra melegszik. A hTG4 fehérjét ehhez 20 mM Tris-HCl pufferben (pH 7,2) hígítottuk.

3.9. Diszpáz emésztés

A proteolitikus stabilitás tesztelésekor hTG4-et vagy hTG3-at, diszpáz I vagy II proteázzal, Ca²⁺ jelenlétében 0,1 M-os Tris-HCl pufferben (pH 8,5) inkubáltuk (1 óra, 37°C). Majd az elegyet Western blottal vizsgáltuk.

3.10. A hTG2 és a hTG4 aminosav szekvenciájának összehasonlítása

Az Uniprot adatbázisban található hTG2 és hTG4 aminosav szekvenciákat összehasonlítottuk az NCBI Protein BLAST online eszköz segítségével. A hTG2 ismert szekvencia részleteit felhasználva megvizsgáltuk, vajon a hTG2 esetén ismert funkciós helyek jelen lehetnek-e a hTG4 szekvenciájában.

3.11. Átmeneti hTG4 expresszió AD-293 sejtekben

AD-293 sejteket 70%-os konfluencia szint eléréséig növesztettük 6 lyukú sejttenyésztő lemezen. A transzfekciós médiumban az FBS-t 2 (%/v) %-ra csökkentettük és megvontuk az antibiotikumokat. A pTriEXTM-4 Ek/LIC Vector Kit-Novagen használatával készített pTriEX-4 Ek/LIC hTG4 vektort és Lipofectamine 2000-et használtunk transzfekcióhoz, a gyártók utasításai szerint. 3 óra után a transzfekciós médiumot növesztő médiumra cseréltük. A sejteket 48 órával a transzfekció után lízis pufferben begyűjtöttük.

3.12. Nyálminták gyűjtése és extracelluláris vezikuláinak izolálása

A nyálmintákat standardizált protokoll alapján gyűjtöttük, a mintavételt megelőző két órában a donorok nem étkeztek, a gyűjtés előtti félóránban folyadékot sem fogyasztottak és a mintavétel megkezdését megelőzőleg a szájukat tiszta vízzel kiöblítették. A nyálgyűjtést követően 1 mM

PMSF-et és 1 mM Proteinase Inhibitor Cocktail-t adtunk a mintákhoz. A nyál extracelluláris vezikuláinak (EV) izolálását ultracentrifugálással végeztük.

3.13. Humán TG4 szubsztrátok keresése AD-293 sejtextraktumban és nyálmintákban

A nyálban lévő endogén transzglutaminázokat jódcetamiddal és Z-DON irreverzibilis inhibitorral gátoltuk, majd a felesleges inhibitorokat dialízissel eltávolítottuk a nyálmintából. A dialízis és a gátlás sikerességét Western blot analízissel ellenőriztük.

Az AD-293 sejtextraktum celluláris és magi frakcióinak elválasztásához Nuclei Isolation Kit: Nuclei EZ Prep-et használtunk, a gyártó utasításai szerint. Ezt követően az AD-293 sejtextraktum citoplazmatikus vagy magi frakcióját, vagy teljes nyál mintát inkubáltunk rekombináns hTG4, BPA és Ca^{2+} jelenlétében (2 óra, 37°C). A be nem épült BPA dialízissel lett eltávolítva. A BPA módosításokat tartalmazó fehérjéket NeutrAvidin-agaróz affinitás kromatográfia segítségével választottuk el a többi fehérjétől és dúsítottuk fel a mintában. A BPA módosításokat tartalmazó fehérjék azonosítása céljából a mintát tömegspektrometriás analízisre küldtük. A sejtextraktumban való szubsztrát kereséshez a kontroll minták esetében csak AD-293 sejtextraktumot alkalmaztunk, hTG4 jelenléte nélkül, amelyet a többi mintához hasonlóan kezeltünk. A nyálban való szubsztrát kereséshez a kontroll minták elkészítéséhez pedig a NeutrAvidin-agaróz gélt kezeletlen nyállal kevertük össze, minden más lépés az előzőekben leírt módon történt.

3.14. Humán TG4 interakciós partnereinek keresése humán nyálban

150 µl High Capacity NeutrAvidin Agarose Resin gélhez ekvilibrálást követően 25 µg biotinizált hTG4-et kötöttünk (1 h, 4°C, folyamatos forgatás mellett). Ezt követően a NeutrAvidin gélt biotinnal blokkoltuk, majd 6 mg fehérje tartalmú teljes nyálmintával inkubáltuk (1 óra, 4°C, folytonos keverés mellett). A gélt ezt követően háromszor mostuk és 120 µl hatszoros denaturáló puffer hozzáadását követően 100°C-on 10 percig inkubáltuk. Centrifugálást követően a felülúszót 10%-os Tris-glicin gélbe futtattuk SDS-PAGE segítségével és a fehérjéket Coomassie festést követően a gélből kivágva LC-MS/MS analízisre küldtük. A kontroll minták elkészítésekor nem adtunk biotinizált hTG4-et a gélhez, a mintakészítés a blokkolási lépéssel kezdődött, a többi lépésben nem volt eltérés. Az azonosított fehérjéket String online fehérje hálózati adatbázis Funkcionális dúsítási analízisének segítségével csoportosítottuk.

3.15. Proteomikai adatbázisok elemzése

A MassIVE adatbázis hTG4-re vonatkozó „PSM Provenance” táblázatát exportáltuk. A MassIVE felülete lehetővé teszi, hogy a peptideket a „Matched Genes” tulajdonságuk alapján egyediségük alapján szűrjük. Az egyedi és más fehérjékkel közös peptideket két táblázatra osztottuk. Az azonosított peptideket tartalmazó minták eredetét, hogy milyen szövetből származtak a minták elnevezéséből vagy az adatsor azonosítója alapján kerestük ki. A detektált hTG4 peptideket tartalmazó minták eredete az összesen 3499 peptidnél 76 esetben nem volt elérhető. A PeptideAtlas-ban a „Sequence Motifs” rész alatt található detektált peptidekre való kattintást követően megnyílt ablakokból „Observed in Experiments” részek adatait kigyűjtöttük. A detektált peptidek egyediségét az NCBI Standard Protein BLAST online eszközzel ellenőriztük. A kísérletek neveiből minden esetben össze tudtuk gyűjteni a szöveteket, ahonnan a detektált peptidet tartalmazó minták származtak. A ProteomicsDB adatbázisban a „Peptides/MSMS” fül alatt 49 egyedi és 1 közös detektált hTG4 peptidet találunk, amelyek a ProteomicsDB adatbázis alapján korábbi MS analízisek során többször is azonosítva lettek. A peptidek szekvenciájára kattintva megjelenik a „Peptide Details” nevű ablak, amelyet mind az 50 peptid esetében egy Excel file-ba exportáltunk. A projekt, a kísérletek vagy a fájlok neve alapján azonosítottuk, hogy melyik szövetből származtak a minták. Nyilvánosan elérhető adatsorok esetén a kísérlet nevére kattintva a minták elnevezésének kódolása is elérhető volt.

3.16. LC-MS/MS analízisek

Az LC-MS/MS analízisre szánt mintákat 10%-os poliakrilamid géltre töltöttük, de csak a szeparáló gél első centiméterébe futtattuk be azokat. Commassie festés után a fehérje sávokat kivágtuk a gélből, és a festéket nanotiszta vízzel mostuk ki. Majd a tömegspektrometriás analízist a Proteomika Szolgáltató Laboratórium (Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debreceni Egyetem) végezte. A fehérje azonosításokat a peptid szekvenciák alapján a MaxQuant 1.6.2.10. kereső program azonosította a SwissProt/Uniprot adatbázisokat felhasználva. Az eredmények Scaffold 4.8.9. programba lettek exportálva. A fehérjék azonosításához a következő beállításokat használtuk: 1,0% False Discovery Rate (FDR), minimum 3 azonosított peptid fehérjénként, és a peptid küszöb 0,1% FDR volt. A BPA jelölt fehérjék meghatározásánál nem használtuk az FDR alapú szűrési módot, hanem minden azonosított peptid MS/MS spektrumát ellenőriztük, és azt fogadtuk el szubsztrátnak, amely esetében legalább négy egymást követő y vagy b ionsorozat jelen volt a spektrumban.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1. A hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának karakterizálása

4.1.1. A hFXIII-A izopeptidáz aktivitásnak kimutatása keresztkötött fibrin degradációs termékeken

A hFXIII-A faktor izopeptidáz aktivitásának fehérje szubsztrátokon való követéséhez elsőként az izopeptid kötéseket tartalmazó fibrin degradációs termékekre specifikus antitest alkalmazásával teszteltük az enzim izopeptidáz aktivitását. A keresztkötött fibrin degradációs termékeket (xFDP, D-Dimer) aktivált hFXIII-A jelenlétében inkubáltuk. A reakció elegy Western blot analízise azt mutatta, hogy egy kb. 10-20 % csökkenés figyelhető meg az antitest által felismert xFDP sávjában, azonban ez a csökkenés nem volt konzekvens. A kísérletet többször megismételve, néha megnövelt inkubációs idővel, azt a következtetést vontuk le, hogy ez az antitest nem alkalmas a fibrin alegységek közötti izopeptid kötés mennyiségének pontos monitorozására. Viszont a keresztkötött fibrin degradációs termékek antitest alapú detektálása jó kvalitatív markere lehet a hFXIII-A transzamidáz aktivitásának a véralvadás során.

4.1.2. Fehérje-peptid alapú, kinetikus módszer a FXIII-A transzamidáz és izopeptidáz aktivitásának méréséhez

Véralvadási rendellenességek esetén a véralvadási faktorok pontos szintjének meghatározása esszenciális a betegség diagnosztizálásában és a faktor helyettesítő kezelés hatékonyságának ellenőrzéséhez. A hFXIII-A aktivitásainak mérése kiváló eszközt biztosít a hFXIII-A rendellenességek azonosítására. A fluoreszcencia anizotrópia változás detektálása egy még megfelelőbb módja lehet a transzglutamináz aktivitás követésének.

Egy érzékeny, fehérje-peptid alapú a hFXIII-A transzamidáz és izopeptidáz aktivitásának mérésére alkalmas kinetikus, anizotrópia változáson alapuló módszert próbáltunk adaptálni. Ezt a munkacsoportunk által korábban a hTG2 transzamidáz és izopeptidáz aktivitásának mérésére kifejlesztett fehérje-peptid alapú, kinetikus anizotrópiás mérés szubsztrátjainak kicserélésével próbáltuk megvalósítani. Ebben a tesztben a FLpepT26 peptid nem volt megfelelő szubsztrát a hFXIII-A transzamidáz aktivitásának kinetikus detektálására, valamint az S100A4(GST)-FLpepT26 keresztkötött szubsztrát sem generált elegendő jelet a hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának kinetikus detektálásához. A Western blot sem mutatott jelentős termék képződést a reakciókban. Viszont a FLpepT26 FLpepPI2 peptidre való cseréje esetén a Western blot jelentős keresztkötött termék képzését mutatta ki, valamint azt is, hogy tisztítás után az enzim ezt képes el is hasítani. Ráadásul ezek a szubsztrátok a FXIII-A transzamidáz és izopeptidáz

aktivitásának mérésére kinetikusan is detektálható jelet is eredményezetek. A későbbiekben az izopeptidáz mérés előnyei miatt a z izopeptidáz mérés alkalmazhatóságára fókuszáltunk.

4.1.3. A fehérje-peptid alapú kinetikus izopeptidáz hFXIII-A aktivitásmérés érzékenysége, linearitása és detektálási határa

Elsőként a mérés kinetikai paramétereit határoztuk meg növekvő koncentrációjú FLpepPI2-S100A4(GST) szubsztrát mennyiség és 150 nM hFXIII-A jelenlétében. Az aktivitás értékek telítési kinetikát mutattak, így Michaelis-Menten egyenletet használva illesztettünk görbét (koefficiens meghatározás: $R^2=0,928$). Az aktivitás plató fázist ért el és a GraphPad Prism program alapján a K_m $4,10\pm 0,76$ nM-nak, a v_{max} $54,92\pm 1$, $mr/min/nM$ hFXIII-A-nak adódott. Ez a K_m érték rendkívül alacsonynak számít, más módszerekhez viszonyítva, amelyekkel a K_m érték $19,8\pm 2,8$ μM -nak vagy 530 μM -nak adódott. A legegyszerűbb magyarázat a mi mérésünkben mért alacsony K_m értékre az lehet, hogy a fehérje-peptid alapú szubsztrátok esetében a FXIII-A nagyobb affinitással bír, mint a kis peptid vagy aminoszubsztrátoknál, a nagyobb interakciós felület miatt.

Következő lépésként a mérési módszer érzékenységét és linearitását vizsgáltuk. Az aktivitás mérésekor 150 nM hFXIII-A koncentrációig a Pearson korrelációs koefficiens $0,9387$ volt $0,8811$ R^2 értékkel, amely erős, de nem pontosan lineáris összefüggést mutat a hFXIII-A koncentrációja és aktivitása között a teljes vizsgált koncentráció intervallumban. A legkisebb mérhető hFXIII-A koncentráció $1,0$ nM volt. Amikor az adatokat újra elemeztük egy alacsonyabb, maximum 15 nM hFXIII-A koncentráció tartományban, a korrelációs koefficiens $0,9907$ volt $0,9816$ R^2 értékkel.

A teszt alkalmazhatóságát tízszeres hígításban normál humán plazma és különböző mennyiségű rekombináns hFXIII-A enzim jelenlétében vizsgáltuk tovább. Megfelelő negatív kontroll alkalmazásához plazma jelenlétében, az endogén hFXIII-A transzglutamináz aktivitását egy Ca^{2+} kelátor (10 mM EDTA) és jódacetamid alkalmazásával gátoltuk. Normál humán plazma jelenlétében a korrigált aktivitás értékek alacsonyabbak voltak, de jobb korrelációs paramétereket mutattak. 50 nM rekombináns hFXIII-A koncentrációig a Pearson korrelációs koefficiens $0,9950$ volt, $0,9901$ R^2 értékkel és az illesztett görbére meghatározott koefficiens $0,9422$ volt. A legkisebb, egyértelműen mérhető hFXIII-A mennyiség 5 nM volt. Ettől alacsonyabb koncentráció esetén mért érték nem volt elkülöníthető a vak reakcióban mérhető anizotropia változásától. A hFXIII-A fiziológiai koncentrációjának átlaga körülbelül 68 nM és a referencia tartomány ennek a koncentrációnak a 69 és 143 %-a között van. Ha figyelembe vesszük a tízszeres plazma hígítást, akkor ez a normál érték átfed a mérésünk lineáris tartományával. Ez azt sugallja, hogy a módszer alkalmas lehet a fiziológiai hFXIII-A

szint meghatározására a humán plazmában, azonban súlyos hFXIII-A hiány esetén már nem képes az enzim aktivitás mérésére.

Mivel a hFXIII-A in vivo fehérje szubsztrátokat használ, egy fehérje-peptid alapú mérés nagyon hasznos lenne potenciális gyógyszer molekulák teszteléséhez, hiszen a hFXIII-A gátlása terápiás cél a nemkívánatos véralvadék stabilizálásának megelőzésében. Ennek érdekében teszteltük a IA, egy általános transzglutamináz inhibitor és a ZED1301, egy specifikus hFXIII-A szubsztrát peptidomimetikum inhibitor hatását az anizotrópiás mérési módszerrel. Mindkét esetben dózisfüggő gátlást figyeltünk meg, a IA esetében $1,89 \pm 0,29 \mu\text{M}$, míg a ZED1301 esetén $268 \pm 56 \text{ nM}$ IC50 értékekkel. Egy kinetikus fluoreszcencia anizotrópia alapú módszer alkalmazása inhibitorok tesztelésére azért is célszerű, mivel hatékony inhibitorok gyakran rendelkeznek fluoreszcens tulajdonságokkal és ez nem befolyásolja szignifikánsan az anizotrópia változását.

Módszerünk az izopeptidáz aktivitás mérésekben alkalmazott szubsztrát további tisztításával vagy a mérés mikrofluidikus alapra való optimalizálásával tovább fejleszhető. Valamint az S100A4-hez hasonló szubsztrát molekulák szelektálásával a transzglutamináz enzimsaládtagok kinetikus aktivitásának mérésére széles körben alkalmazható tesztek fejlesztését tennék lehetővé. Izoenzim specifikus fehérje-peptid alapú mérések fejlesztésével, több együtt kifejeződő transzglutamináz aktivitásának mérése válhat lehetővé biológiai mintákban.

4.2. A humán transzglutamináz 4 transzamidáz aktivitásának karakterizálása és az enzim nyálban való szerepének vizsgálata

4.2.1. Proteomikai adatbázisok analízise a hTG4 expressziójának feltérképezéséhez

A humán transzglutaminázok egyre nagyobb figyelmet kapnak, a biológiai funkciójuk és a potenciális orvosi relevanciájuk miatt, de a tudásunkban van egy jelentős folt, a humán TG4 biokémiai tulajdonságait és a szöveti eloszlását, szubsztrátjait és interakciós partnereit illetően. A hTG4 szöveti expressziójának összegyűjtéséhez a MassIVE, a PeptideAtlas és a ProteomicsDB adatbázist vizsgáltuk át. Ezeknek az adatbázisoknak az áttekintésével, a minták szöveti eredetének és minden egyes detektált peptid meta adatainak az analízisével 41 szövetet gyűjtöttünk össze, ahol a hTG4 peptid fragmentek detektálva voltak. A nem egyedi peptidek kizárása után 9 szövet maradt, ahol a hTG4 jelenlétét egyedi peptid detektálása erősítette meg. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a férfi genitális traktuson kívül a hTG4 fiziológiásan jelen van a szívben, a lépben, a nyálmirigyekben, a vastagbélben és a húgyhólyagban is.

4.2.2. A hTG4 biokémiai karakterizálása

Annak érdekében, hogy kísérleti úton is tanulmányozhassuk a hTG4-et, rekombináns formában állítottuk elő és teszteltük a transzamidáz aktivitását microtiter lemezes biotin-pentilamin (BPA) beépülési mérést alkalmazva. 0,5 µg hTG4 transzamidáz aktivitása $0,62 \pm 0,29$ mAbs/min volt, amely rendkívül alacsony a pozitív kontrollal, a rekombináns humán TG2-vel összehasonlítva ($29,25 \pm 5,93$ mAbs/min, 5 mM Ca^{2+} jelenlétében). A kereskedelmi forgalomban kapható rekombináns hTG4 (Zedira GmbH) aktivitása hasonló volt, mint a mi laboratóriumunkban termelt enzimé. A Zedira GmbH által árult humán rekombináns transzglutaminázok esetén elérhető aktivitás értékek alátámasztják és megerősítik a mi megfigyelésünket, hogy a hTG4 nagyon alacsony transzamidáz aktivitással rendelkezik a többi transzglutaminázhoz viszonyítva. Az enzim mennyiségének a transzamidáz aktivitás emelkedésével jó lineáris korrelációt mutatott, 4 µg enzim esetén $7,31 \pm 0,33$ mAbs/min értéket elérve. A hTG4 aktivitás esetén az optimális $[\text{Ca}^{2+}]$ 5 mM volt. Magasabb Ca^{2+} szint (10 mM) már gátló hatással volt az aktivitásra, valószínűleg a fehérje aggregáció elősegítése miatt.

Következő lépésben tovább karakterizáltuk a hTG4 transzamidáz aktivitását több különböző körülmény esetén, olyan szabályzó mechanizmust keresve, amely aktiválhatja a hTG4-et, magasabb enzimatis aktivitást eredményezve. A hTG4 magasabb aktivitást mutatott alacsonyabb pH érték (pH 7 alatt) esetén, amely megfelelő a humán vaginális kondícióknak az eger TG4-gyel ellentétben, amely a bázikus spermában aktív, a párzási dugó formálásakor. A hTG4-nek ez a tulajdonsága összefügghet a humán szexuális stratégia változásával, amely a spermiumokverseny jelentőségének megszűnéséhez vezetett.

A hTG4 transzamidáz aktivitását megmértük különböző redukált és oxidált glutation arányok (GSH/GSSG) esetében, és azt találtuk, hogy a hTG4 magasabb transzamidáz aktivitást mutat redukáló körülmények között. Az, hogy a hTG4 a redukáló körülményeket preferálja, azt sugallja, hogy a transzglutamináz aktivitása szerepet játszhat intracelluláris folyamatokban.

Emelkedő SDS koncentráció hatásának vizsgálatok azt tapasztaltuk, hogy 0,1-0,5 mM SDS koncentráció hozzávetőlegesen 3-4-szeres hTG4 transzamidáz aktivitás emelkedést eredményezett, míg ennél magasabb SDS koncentrációk inkább gátló hatást mutattak. Ez az emelkedett aktivitás, még mindig jóval kisebb, mint a hTG2 által katalizált reakciókban. Az SDS koncentrációjának további növelése a hTG4 teljes denaturációjához vezet. Az SDS aktiváció utánoszhatja más amfipatikus biomolekulák kötődését, szabályozva a hTG4 aktivitását.

Az alacsony aktivitás miatt, azt gyanítottuk, hogy a hTG4 stabilitása alacsony. A fehérje hőstabilitásának karakterizálásához nano differenciális pásztázó fluorimetriát használtunk.

Hígítási sort alkalmazva a T_m értékek átlaga a hTG4 esetén $62,6 \pm 0,23$ °C volt. Az a hőmérséklet, ahol a fehérje elkezdett letekeredni $56,1 \pm 1,34$ °C volt. Az alkalmazott fehérje koncentráció tartományban más szerkezeti (pl.: oligomerizáció, disszociáció) átalakulás nem mutatkozott. Az emberi szervezet általános hőmérsékletéhez képest a hTG4 termikus stabilitása magas, amely stabil natív szerkezetre utal fiziológias körülmények között.

A Protein BLAST online eszköz segítségével a hTG2 és a hTG4 szekvenciáit illesztettük majd ez alapján megbecsültük a fibronectin és a GTP kötőhelyek meglétét a hTG4 szekvenciájában. Az összehasonlítás alapján látszik a katalitikus triád konzerváltsága, azonban a hTG2 esetében ismert fibronectin és GTP kötésért felelős aminosavak sem találhatóak meg a hTG4 aminosav szekvenciájában. A szekvencia összehasonlítást követően a hTG4 esetében kísérletesen is teszteltük a fibronectin kötődést, amely megerősítette a szekvencia illesztés alapján kapott eredményünket. Majd az enzim GTP kötő tulajdonságát GTP analógok, a fluoreszcens BODIPY-FL-GTP γ S reagens és GTP-agaróz gél alkalmazásával teszteltük. A két független módszerrel kapott eredmény bizonyította, hogy a hTG4 nem rendelkezik guanin nukleotid kötőhellyel, ezáltal a GTP nincs hatással a hTG4 szabályozására, a patkány ortológjával ellentétben (a szekvencia hasonlóság 53,3%). A hTG4 GTP általi negatív szabályozásának hiánya elősegíti az enzim hatását a tumorok invazivitásának növeléséhez. Prostatadaganat sejtekben a hTG4 jelenléte negatív prognosztikus marker.

Lehetséges, hogy a megfigyelt alacsony hTG4 katalitikus aktivitás egy megfelelő aktiváció hiányának eredménye. A transzglutamináz család több tagja esetén is limitált proteolízis szükséges az aktivációhoz. Ebből kifolyólag teszteltük a hTG4 potenciális aktiválását a trombin vagy a diszpáz által. In silico analízis alapján a hTG4 szekvenciája nem tartalmaz trombin hasító helyeket, amelyet kísérleti módon is megerősítettünk. Diszpáz hasító helyek keresésére rekombináns His₆-tages hTG4-en és hTG3-on teszteltünk kísérletesen a limitált proteolízist diszpáz I-el és diszpáz II-vel. Western blot analízis azt mutatta, hogy a diszpáz I teljesen lebontja a hTG4-et, a diszpáz II pedig csak csökkentette a fehérje mennyiséget a kontrollhoz képest, amely azt sugallja, hogy a diszpázok képesek hasítani a hTG4-et, de nem generálnak detektálható, stabil fragmenteket. Rekombináns hTG3 diszpáz hasítását pozitív kontrollként teszteltük, ebben az esetben detektálhatóak voltak a stabil, proteolitikus hTG3 fragmentek.

AD-293 sejtekben tranziens exogén hTG4 expresszió során teszteltük a lehetséges aktiváló proteázok általi stabil fragment megjelenését. Azonban a sejtek fehérje kivonata csak teljes méretű hTG4-et tartalmazott, amely azt jelzi, hogy a sejtekben nem volt jelen, vagy nem volt aktív az a specifikus proteáz, amely módosítaná a fehérjét limitált proteolízissel. Eredményeink

arra utalnak, hogy a limitált proteolízis nagy valószínűséggel nem vesz részt a hTG4 enzim processzáálásában és aktiválásában.

4.2.3. A hTG4 jelenlétének és biológiai szerepének vizsgálata a nyálban

A hTG4 nyálban való jelenlétének megerősítéséhez 8 egészséges egyéntől gyűjtött teljes nyálat Western blot analízissel vizsgáltuk. A hTG4 a nyálmintákban egy kb. 55 kDa fragment formájában és nagy molekulásúlyú, valószínűleg keresztkötések, vagy más kovalens kötések által összetartott fehérjekomplexekben is detektálható. A minták hTG4 tartalma azonban egyénenként eltérő, amely a prosztata mintákban szintén megfigyelhető. Ezt követően a nyál különböző frakcióiban vizsgáltuk a hTG4 jelenlétét. Western blot analízis felfedte, hogy a hTG4 feldúsult az extracelluláris vezikula frakcióban, valamint az 55 kDa méretű fragment és a nagyméretű fehérje komplexek mellett a teljes méretű kb. 80 kDa nagyságú hTG4 is detektálható. Ez megerősíti a hTG4 jelenlétét a nyálban, és annak vezikuláris frakciójában. A proteomikai adatbázisok újra elemzése arra utal, hogy a hTG4 a nyálmirigyekből kerül a nyálba.

4.2.4. Humán TG4 szubsztrátok keresése a nyálban

A TG4 eddig ismert funkciói a reprodukcióhoz köthetőek, a nyálban való jelenléte egy ismeretlen, új funkciót sugall. Ennek felderítése érdekében, hTG4 szubsztrátokat kerestünk humán nyálmintában. A nyálban jelenlévő endogén transzglutaminázokat előzetesen gátoltuk, majd rekombináns hTG4-gyel kezeltünk, Ca²⁺ és BPA jelenlétében. A hTG4 által módosított, BPA tartalmú fehérjéket NeutrAvidin-agaróz affinitás kromatográfia segítségével dúsítottuk a mintában. Elúciót követően a mintát tömegspektrometriai analízisre (LC-MS/MS) küldtük a szubsztrát fehérjék azonosítása céljából. A proteomikai eredményeket fehérjékre szűrve a kontroll mintákban jelen lévő fehérjék levonását követően 43 lehetséges hTG4 szubsztrát fehérje maradt. Ezek között a rekombináns hTG4 is megtalálható. A BPA módosított peptidok detektálása a fehérjékben megerősíti, hogy az azonosított fehérje valóban hTG4 szubsztrát-e. Az így potenciális hTG4 szubsztrátként azonosított 43 fehérje esetében nem volt BPA módosítást tartalmazó peptid detektálva, így ezen fehérjék esetében további analízisek szükségesek a reaktív glutamin meghatározásához. Viszont a teljes találati listában, amely a kontroll mintában azonosított fehérjéket is tartalmazza, az Immunglobulin alfa-1 nehézlánc fehérjében egy BPA módosítással rendelkező peptid is azonosítva lett. Ez a fehérje aspecifikusan is kötődhet a NeutrAvidin-agarózhoz, mivel detektálva lett a kontroll mintákban is, viszont szubsztrátja a hTG4-nek, amelyet az azonosított BPA módosítást tartalmazó peptid erősít meg ebben az esetben. A nyálban azonosított potenciális hTG4 szubsztrátok megerősítése a munkacsoportunk jövőbeli feladata.

4.2.5. A humán TG4 képes biotin-pentilamin beépítésére az AD-293 sejtextraktum fehérjéibe

Több BPA módosított szubsztrát szekvencia azonosítása céljából a transzglutaminázt nem expresszáló AD-293 sejtextraktumban is teszteltük glutamin-donor fehérje szubsztrátok jelenlétét. AD-293 sejtextraktumot Ca^{2+} jelenlétében rekombináns hTG4 enzimmel inkubálva, számos BPA módosítást tartalmazó fehérje volt detektálható a reakció elegy Western blot analízisekor. A hTG4 függő BPA jelölés előtt az AD-293 sejtek magi és citoplazmatikus frakcióit elválasztottuk, hogy a fehérje azonosítás hatékonyságát növeljük. A BPA jelölt fehérjék arányának növeléséhez NeutrAvidin-agaróz affinitás kromatográfiát alkalmaztunk, majd a mintákat fehérjék azonosítása céljából tömegspektrometriai (LC-MS/MS) analízisre küldtük. Miután a kontroll mintákban detektált, aspecifikus fehérjéket kiszűrtük, a hTG4 kezelt minták tömegspektrometriai analízise 8 fehérjét tárt fel a citoplazmatikus és 230 fehérjét a magi frakciókból. Ezek a fehérjék lehetnek a hTG4 szubsztrátjai, vagy a szubsztrátok interakciós partnerei. A fehérjék BPA módosított peptid fragmentjei bebizonyították a reaktív glutaminok jelenlétét a következő fehérjékben: a citoplazmatikus frakciókban a II-es típusú citoskeletális keratin 1, és az I-es típusú citoskeletális keratin 9 fehérjék tartalmaztak BPA módosítást, de ezeknek a fehérjéknek a módosulatlan formája a kontroll mintákban is azonosítva lett. A BPA módosításuk azt mutatja, hogy a hTG4 szubsztrátként használja ezeket a fehérjéket. A magi frakciókban az Inzulinszerű növekedési faktor 2 mRNS-kötő fehérje 1 esetében lett BPA módosítás detektálva. További vizsgálatokra lenne szükség a többi fehérje reaktív glutaminjának meghatározásához.

A proteomikai adatok kiértékelésekor a fehérje azonosításra fókuszálva és szűrve csak három szubsztrát fehérje volt BPA beépüléssel megerősítve. Majd egy másik megközelítést alkalmaztunk az adatok analízisére, amely során a peptid fragmentek BPA módosításának jelenléte szerint szűrtük a találatokat és így 105 BPA tartalmú peptidet találtunk. Minden peptid esetén ellenőriztük a fragmentációs táblázatot, egymást követő 4 y vagy b fragment ion megléte szerint, amely alapján 20 peptid szekvenciát azonosítottunk. A 20 kiválasztott hTG4 által módosított peptid alapján megvizsgáltuk a reaktív glutaminok lineáris környezetét. Sajnos ez alapján a hTG4 által preferált konszenzus szubsztrát szekvencia egyértelmű megállapítása nem lehetséges. Azonban azt elmondhatjuk, hogy a reaktív Gln aminosavak közelében a hTG4 preferálja a poli-glutamin szakaszokat. Leu, Arg, Ser és Val aminosavak szintén gyakran fordulnak elő a reaktív glutaminok lineáris környezetében. Referenciaként a TRANSDAB transzglutamináz szubsztrát adatbázist ellenőriztük, és azt találtuk, hogy néhány újonnan azonosított hTG4 szubsztrát más transzglutaminázoknak is szubsztrátja, például a II-es típusú

citoszkeletális keratin 1 a hFXIII-A-nak, a filaggrin a hTG1-nek és a hTG3-nak is. Van néhány hasonlóság, minthogy az NF-kappa-B-inhibitor alfa, az „F-box only” fehérje 2 és a miozin-9 fehérjék a hTG2-nek, a „Coiled-coil” domént tartalmazó fehérje 126 pedig a hFXIII-A-nak a szubsztrátja. Az előbbi fehérjéknek csak az izoformái szubsztrátjai a hTG4-nek, amely arra utal, hogy hTG4-nek egyedi szubsztrát felismerése van. Ez nem teljesen váratlan, mivel az egér TG4 képes használni az ondóhólyag szekréciós I (SVS I) fehérjének az F2 (79-259 aminosavak) szakaszát, mint glutamin donort, míg a TG2 nem preferálja azt. Az SVS I fehérje egy amin oxidáz két reaktív glutaminnal (Q232, Q254) és a humán ortológjai esetén a reaktív glutaminok Arg vagy His aminosavakra cserélődtek.

Ezt követően megvizsgáltuk a patológiás és fiziológiás szerepét az azonosított celluláris szubsztrát fehérjéknek. A membrán kötött fehérjékre fókuszáltunk, mivel a hTG4 túlzott kifejezése hozzájárul a prosztata daganatos sejtek invazivitásához, megnövelve azok adhézióját és migrációját. A „Human Protein Atlas” alapján, az Adhéziós G protein kapcsolt receptor L3 gyakran jelen van mell, prosztatata, és kolorektális daganatokban. A protokadherineket, a kadherin enzimes család tagjai esszenciálisak a normál sejt-sejt interakciók fenntartásához, és részt vesznek az epithelialis-mezenchimális átalakulásban. A Plexin-A2 szemaforin koreceptorként részt vesz az invazív sejtek növekedésben és migrációjában. Az NF-kappa-B inhibitor transzglutamináz függő módosítása elősegítheti annak degradációját és az NF-kappa-B aktivációját hozzájárulva a sejt túléléshez, a hTG2-höz hasonlóan. A humán TG4 elősegíti a daganat és az endotél sejtek interakcióját, valószínűleg a ROCK útvonal kikerülésével (**Jiang és mtsai, 2009**). Ezt alátámasztja, hogy sem ROCK1, sem ROCK2 interakciós partnert nem találtunk az azonosított hTG4 szubsztrátok között. Viszont, a 105 azonosított hTG4 szubsztrát között megtalálható a Rho guanin nukleotid faktor 28, egy onkogén fehérje, amely számos jelátviteli útvonal elindításában játszik szerepet. Ezeknek az azonosított szubsztrátoknak a szerepe a daganatok esetén talán újabb tanulmányok kiindulási alapja lehet annak érdekében, hogy felfedjék a pontos szerepüket a daganat biológiában, ezáltal új lehetséges daganat terápiás célpontok azonosításához vezethetnek.

4.2.6. A hTG4 interakciós partnereinek keresése a nyálban

A hTG4 nyálban betöltött szerepének megismeréséhez teljes nyál mintákban próbálkoztunk az enzim interakciós partnereinek meghatározásával. A biotinilált hTG4-et NeutrAvidin-agaróz gélhez kötöttük, majd blokkolást követően nyálfehérjékkel inkubáltuk. A hTG4-hez kötődött fehérjéket azonosítás céljából LC-MS/MS analízisre küldtük. Az adatokat fehérjékre szűrve a kontrollokban azonosított fehérjéket, eltávolítottuk a mintában azonosított fehérjék listájából, így összesen 280 potenciális hTG4 interakciós partnert azonosítottunk. A potenciális

interakciós partnerként azonosított fehérjéket funkciójuk alapján való csoportosításához, String online eszköz segítségével Funkcionális dúsítási analízist végeztünk. A 280 fehérjéből a String analízis 211 fehérjét volt képes csoportosítani, a 69 fehérje esetén azok annotációinak hiányosságai miatt az analízis nem volt kivitelezhető. Az azonosított fehérjék között 330 Gén Ontológia (GO) Biológiai Folyamat dúsult fel szignifikánsan ($FDR < 0,05$).

Mivel a hTG4 jelen van a nyál extracelluláris vezikuláiban, illetve a spermiumok antigenitásának maszkírozásában is lehet szerepe, így főként az ezekhez kapcsolódó Biológiai Folyamatokra fókuszáltunk. A Szekrécióhoz, a Vezikulák által közvetített transzportozáshoz, a Sejtaktivációhoz és az Immunológiai folyamatokhoz a 211 csoportosított fehérjéből összesen 98 köthető. A teljes nyálban azonosított fehérjék jelentős része az Extracelluláris vezikulák és a Vezikula Sejtalkotókhoz sorolható. Ez nyálfehérjék esetében nem meglepő, azonban még jobban megerősíti a hTG4 membránhoz való kötődésének lehetőségét. Az azonosított interakciós partnerek között 16 olyan fehérje van, amely lehetséges hTG4 szubsztrátként is azonosítva lett a nyálban. Ilyen fehérje például a 14-3-3- fehérje zéta/delta izoforma, az antileukoproteináz, a „BPI-fold”-ot tartalmazó A családtag 2, a cisztatin-SN és a vinkulin is. A 14-3-3 fehérje zéta/delta-nak sok kötődési partnere van, amelyekhez általában azok foszfoszerin vagy foszfortreonin motívumán keresztül kötődik és általában a kötődési partner aktivitását befolyásolja. Az antileukoproteináz fehérje egy saválló proteináz inhibitor, amely többek között a tripszin, elasztáz és a katepszin G aktivitását képes gátolni. Emellett a gyulladásozó- és az immunválaszok szabályozásában is részt vesz bakteriális fertőzések esetén. A „BPI-fold-ot” tartalmazó A családtag 2 fehérjének erős antibakteriális hatása van. A cisztatin-SN egy nyálban található cisztein proteináz inhibitor, a papain inhibitora. A vinkulin az aktin filamentumokhoz kötődik, és a sejt-mátrix és sejt-sejt adhézióban vesz részt. A sejt felszíni E-kadherin expresszióját szabályozza, emellett a sejtek morfológiájában és mikromozgásokban is fontos szerepe lehet. A hTG4 prosztata daganat sejtekben csökkentette az E-kadherin szintjét, elképzelhető, hogy a vinkulinnal való kölcsönhatás révén. Az interakciós partnerek és a hTG4 új funkcióinak megerősítése a munkacsoportunk jövőbeli feladata, amelyhez a kiemelt fehérjék és a hTG4 kapcsolatának vizsgálata kiindulási pontot biztosítanak.

5. Összefoglalás

A transzglutaminázok kutatásának jelentőségét számos ipari és transzlációs medicinában való alkalmazhatóságuk igazolja. Az egyik legismertebb transzglutamináz a hFXIII-A transzamidáz aktivitásának gátlása új terápiás lehetőséget kínál a trombózis gyógyításában. Azonban a hFXIII-A kevésbé ismert izopeptidáz aktivitásával is képes az alvadék destabilizálására. Olyan fehérje-peptid alapú anizotrópiás aktivitásmérési módszert fejlesztettünk, amely lehetővé teszi a hFXIII-A által katalizált ellentétes irányú reakciók vizsgálatát ugyanazon szubsztrát molekulákat alkalmazva, transzamidáz aktivitásmérés esetén két szubsztrát molekulaként (FLpepPI2 és S100A4(GST)), izopeptidáz aktivitás követésénél pedig előre keresztkötött szubsztrát formájában (FLpepPI2-S100A4(GST)). A fehérje-peptid szubsztrátok alkalmazása jobban modellezi a hFXIII-A *in vivo* szubsztrátjait az alvadék módosításai során és lehetséges mutáns hFXIII-A enzimek ellentétes aktivitásainak, illetve a hFXIII-A aktivitásait szabályozó regulátor molekulák hatásának komplex tanulmányozása.

Egy másik szekretálódó családtag, a humán TG4 (hTG4) szerepet játszik a prosztata daganatok kialakulásában és az APS1 autoimmun betegség esetén hozzájárul a férfiak meddőségének kialakulásához. A TG4 rágcsálókban jól karakterizált, azonban a hTG4 biokémiai tulajdonságai, amelyek segíthetnének az enzim funkciójának megértésében nem ismertek. Proteomikai adatbázisokat vizsgálva azt találtuk, hogy a hTG4 a prosztatán kívül is jelen van. A microtiter lemez módszer segítségével a hTG4 transzamidáz aktivitását és szabályozását *in vitro* tanulmányoztuk. A hTG4 alacsony transzamidáz aktivitással rendelkezik, amely enyhén alacsony pH-t és redukáló környezetet preferál. Szubmicelláris SDS koncentráció aktiváló hatása figyelhető meg, amely azt sugallja, hogy az enzim membránhoz kötődve fejt ki aktivitását. A patkány TG4-gyel szemben, a hTG4 nem köti a GTP-t. Más transzglutaminázok esetén ismert proteolitikus aktiválás nem figyelhető meg a hTG4 esetében, amelyet diszpázzal inkubálva illetve AD-293 sejtekben expresszált hTG4 esetén vizsgáltunk. Nyálban 280 potenciális hTG4 interakciós partnert azonosítottunk, amelyek nagy része a szekrécióhoz, immunfolyamatokhoz és vezikuláris transzportozhoz köthető. Nyálban és AD-293 sejtextraktumban számos hTG4 glutamin donor szubsztrátot azonosítottunk. Néhány szubsztrát sejt-sejt interakciókban, adhézióban és proliferációban vesz részt, amely azt sugallja, hogy a hTG4 daganatellenes terápia célpontjává válhat.

Eredményeink hozzájárulnak a hTG4 és a hFXIII-A sajátosságainak teljesebb megismeréséhez és megerősítik, hogy ezek a fehérjék valós célpontok lehetnek gyakori betegségek terápiájában

6. 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/100/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csobán-Szabó Zsuzsa

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csobán-Szabó, Z.**, Bécsi, B., El Alaoui, S., Fésüs, L., Korponay-Szabó, I., Király, R.: Biochemical Characterisation of Human Transglutaminase 4.
Int. J. Mol. Sci. 22 (22), 1-18, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222212448>
IF: 5.923 (2020)
2. **Csobán-Szabó, Z.**, Fésüs, L., Király, R.: Protein-peptide based assay for the characterization of human blood coagulation factor XIII-A isopeptidase activity.
Anal. Biochem. 600, 1-8, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2020.113699>
IF: 3.365

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,288

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,288

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

Debrecen, 2022.02.25.

