

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Csobán-Szabó Zsuzsa

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

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**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

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1 A transzglutamináz enzimesalád.....	7
2.1.1. A humán transzglutamináz izoenzimek jellemzése.....	9
2.1.2. A transzglutamináz aktivitások változatossága.....	12
2.1.2.1. A transzglutaminázok izopeptidáz aktivitása.....	15
2.2. A humán FXIII-as véralvadási faktor.....	17
2.2.1. A humán FXIII-A biológiai funkciói.....	19
2.2.1.1. A humán FXIII-A klasszikus szerepe, a hemosztázis fenntartása.....	19
2.2.1.2. A hFXIII-A hemosztázison kívüli funkciói.....	20
2.2.2. A hFXIII-A mint potenciális antikoaguláns terápia célpont.....	22
2.3. A transzglutamináz 4.....	24
2.3.1. A transzglutamináz 4 a rágcslókban.....	24
2.3.1.1. A kopulációs dugó kialakítása.....	24
2.3.1.2. A rágcsló TG4 <i>in vitro</i> karakterizálása.....	25
2.3.2. A humán transzglutamináz 4 biológiai szerepe.....	27
2.3.2.1. A transzglutamináz 4 előfordulása az emberi szervezetben.....	27
2.3.2.2. A humán TG4 immunológiai szerepe.....	28
2.3.2.3. A kopulációs dugó kialakításában részt vevő fehérjék evolúciós változása.....	29
2.3.2.4. A hTG4 expressziója egészséges vagy malignus prosztata szövetekben.....	30
2.3.2.5. A hTG4 szerepe a prosztatadaganat sejtvonalakban.....	32
3. Célkitűzések.....	34
4. Anyagok és módszerek.....	35
4.1 Reagensok.....	35
4.2 Alkalmazott sejtvonalak.....	35
4.3 Western blot analízisek és az alkalmazott antitestek.....	35
4.4 Fehérje termelés és tisztítás.....	36
4.5 Transzglutamináz aktivitásmérések.....	37
4.5.1. A hFXIII-A és hTG2 aktivitásának kinetikus mérése anizotrópia változás alapján.....	37
4.5.2. A hTG4 és hTG2 transzamidáz aktivitásának végpontos mérése mikrotiter lemez módszerrel.....	39
4.6. A hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának tesztelése keresztkötött fibrin degradációs termékeken a DD-XLink-mab segítségével.....	39
4.7. Fibronektin kötés ellenőrzése.....	39
4.8. Guanozin-trifoszfát nukleotid kötő próbák.....	40
4.9. Differenciális Páztázó Fluorimetria.....	40
4.10. Diszpáz emésztés.....	40
4.11. A hTG2 és a hTG4 aminosav szekvenciájának összehasonlítása.....	41
4.12. Endogén és exogén hTG4 expresszió.....	41
4.12.1. ATRA hatása az endogén hTG4 expresszióra.....	41
4.12.2. Átmeneti hTG4 expresszió AD-293 sejtekben.....	41
4.12.3. A 3xFlag-TG4-et stabilan expresszáló AD-293 sejtvonal kialakítása.....	41
4.13. Nyálminták gyűjtése és a nyál extracelluláris vezikuláinak izolálása.....	42
4.14. Humán TG4 szubsztrát és interakciós partner keresés.....	43
4.14.1. Humán TG4 szubsztrát keresés AD-293 sejtextraktumban és nyálmintákban....	43
4.14.2. Humán TG4 interakciós partner keresés humán nyálmintában.....	44
4.15. Proteomikai adatbázisok elemzése.....	45

4.16. LC-MS/MS analízisek	45
4.17. Adatok kiértékelése.....	46
5. Eredmények.....	47
5.1 A humán FXIII-A izopeptidáz aktivitásának karakterizálása.....	47
5.1.1. FXIII-A izopeptidáz aktivitásnak kimutatása D-dimereken monoklonális antitest és Western blot segítségével.....	47
5.1.2. Fehérje-peptid alapú, kinetikus módszer a FXIII-A transzamidáz aktivitásának méréséhez.....	48
5.1.3. A fehérje-peptid alapú kinetikus izopeptidáz mérés adaptálása és alkalmazása a hFXIII-A esetében.....	50
5.1.4. A fehérje-peptid alapú kinetikus izopeptidáz hFXIII-A aktivitásmérés érzékenysége, linearitása és detektálási határa	51
5.2 A humán TG4 biokémiai karakterizálása	54
5.2.1. Proteomikai adatbázisok analízise az emberi szervezet hTG4 expressziójának feltérképezéséhez	54
5.2.2. A hTG4 aktivitása különösen alacsony a transzglutamináz enzimes családban	55
5.2.3. A pH, a redukáló/oxidáló környezet és a nátrium-dodecil-szulfát hatása a hTG4 transzamidáz aktivitására	57
5.2.4. A rekombináns hTG4 hőstabilitása	58
5.2.5. A hTG4 fibronektin és GTP kötő tulajdonságainak predikciója és kísérletes tesztelése.....	59
5.2.6. A trombin és a diszpáz nem képes a hTG4-et limitált proteolizissal aktiválni.....	62
5.2.7. Az all-transz retinsav nem indukálja a TG4 endogén expresszióját AD-293, Panc-1, PC-3 és RWPE-1 sejtekben.....	64
5.2.8. AD-293 sejtekben a hTG4 teljes méretben fejeződik ki	64
5.2.9. Humán TG4-et stabilan expresszáló sejtes modell kialakítása	65
5.2.10. A hTG4 jelenléte a nyálban.....	66
5.2.11. Humán TG4 szubsztrátok keresése a nyálban.....	67
5.2.12. A humán TG4 képes biotin-pentilamin beépítésére az AD-293 sejtexteraktum fehérjéibe.....	69
5.2.13. Interakciós partnerek keresése nyálban.....	73
6. Megbeszélés	78
6.1 A humán FXIII-A izopeptidáz aktivitásának követése a fehérje-peptid alapú anizotrópiás kinetikus mérési módszer adaptálásával.....	78
6.2 A humán TG4 biokémiai karakterizálása	81
7. Összefoglalás.....	87
7. Summary	88
8. Irodalomjegyzék.....	89
9. Publikációs Lista	106
10. Tárgyszavak/Keywords	107
11. Köszönetnyilvánítás	108
12. Függelék.....	109
Konferencia poszterek és előadások	116

Rövidítések jegyzéke

293FT: AD-293 sejtvonalból kialakított jól transzfektálható sejtvonala

AD-293: humán embrionális vese sejtvonala

aFlag: Flag taget felismerő antitest

AIRE: Aire fehérjét kódoló gén

APS1: 1-es típusú autoimmun poliendokrin szindróma

ATPáz: ATP hidroláz aktivitás

BPA: biotin-pentilamin

CA-HPV-10: prosztata adenokarcinóma sejtvonala

DD-XLink-mab: fibrin degradációs termékekben található izopeptid kötésekre egérben kifejlesztett monoklonális IgG antitest

E. coli: *Escherichia coli*

EGF: epidermális növekedési faktor

EMT: epitéliális-mezenchimális átmenet

EPB42: az eritrocita membrán 4.2-es sávfehérje gén neve

EV: extracelluláris vezikula

Ex/Em: gerjesztési/emittált hullámhossz (excitation/emission wavelength)

F13A1: a XIII-as véralvadási faktor gén neve

FBS: hőinaktivált magzati marha szérum

FDP: izopeptid kötések nem tartalmazó fibrin degradációs termék

FDR: False Discovery Rate

FLpepPI2: fluoreszcensen jelölt PI2 peptid (FAM- NQEQVSPLTLLK-OH)

FLpepT26: Fluoreszcensen jelölt T26 peptid (FAM- HQSYVDPWMLDH-OH)

FXIII-A: XIII-as véralvadási faktor A alegység

GPRP: Gly-Pro-Arg-Pro tetrapeptid

GSH/GSSG: redukált és oxidált glutation

hFXIII-A: humán XIII-as véralvadási faktor A alegység

hFXIII-B: humán XIII-as véralvadási faktor B alegység

HRP: tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)

hTG1-7: humán TG1-7

IA: jódcetamid

LC-MS/MS: folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria

mcTG4: monoklonális humán TG4 ellenes antitest

OD₆₀₀: optikai denzitás értéke 600 nm-en

Panc-1: duktális hasnyálmirigy karcinóma sejtvonala

PC-3: androgén független adenokarcinóma sejtvonala

PI2: az α 2-plazmin inhibitor N-terminális részletét tartalmazó peptid (FAM-NQEQVSPLTLLK-OH)

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid, protáz inhibitor

PSA: prosztata-specifikus antigén

Reaktív Q \pm 5 AA: a reaktív glutamint megelőző és követő 5-5- aminosav

rhTG4: rekombináns humán TG4

RWPE-1: immortalizált prosztata sejtvonala

S100A4(GST): GST fúziós rekombináns humán S100A4 fehérje

S100A4(GST)-FLpepPI2: GST fúziós rekombináns humán S100A4 fehérjével keresztkötött FLpepPI2

S100A4(GST)-FLpepT26: GST fúziós rekombináns humán S100A4 fehérjével keresztkötött FLpepT26

SN szűrt: szűrt szolúbilis fázis

SN UCF: ultracentrifugálást követő felülúszó

TB tápfolyadék: Terrific Broth tápfolyadék

TF-: nem transzfektált

TF+: transzfektált

TG: transzglutamináz

TG1-7: transzglutamináz 1-7

TGM1-7: transzglutamináz1-7 gének nevei (Ensembl)

TTBS: Tris-pufferolt sóoldat, 0,1 (v/v) % Tween-20-al kiegészítve

xFDP: izopeptid kötéseket tartalmazó fibrin degradációs termék

1. Bevezetés

A transzglutaminázok fehérjék poszttranszlációs módosításait végző enzimek, amelyek fiziológias és patológias folyamatokban vesznek részt és potenciális terápiás lehetőségeket kínálnak. A transzglutaminázok közül a XIII-as véralvadási faktor (FXIII-A) és a transzglutamináz 4 (hTG4) található meg az extracelluláris folyadékokban. A humán FXIII-A (hFXIII-A) legismertebb funkcióját, a véralvadási kaszkád utolsó tagjaként fejt ki, amely során aktivitásának eredményeként stabil alvadék keletkezik. Egy másik transzglutamináz családtag, a transzglutamináz 4 (TG4) pedig rágcsálók szemínális folyadékában alakít ki kemény, fehérje polimerekből álló kopulációs dugót. Mindkét enzim kovalens keresztkötések kialakításával, nagy fehérje aggregátumokat hoz létre.

A hFXIII-A a véralvadék kialakulásakor a fibrin monomerek kovalens keresztkötése mellett, szerepet játszik a fibrinolízis szabályozásában is. A keresztkötő aktivitása révén a fibrin háléhoz köti az α 2-plazmin inhibitor is, ezáltal gátolja a vérrög korai fibrinolitikus lebontását. A hFXIII-A, kevésbé ismert izopeptidáz aktivitása révén az α 2-plazmin inhibitor képes ki is hasítani az alvadékból, ezáltal gyorsítani a fibrinolízist. A hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának követése egyedülálló előnyöket nyújthat. A hFXIII-A gátlása potenciális terápiás célpont lehet trombózisos betegségek esetén, azonban az izopeptidáz aktivitás módosításával a fibrinolízist is befolyásolhatja. Ezért szükség lenne olyan aktivitás mérésekre, amelyekkel fehérje szubsztrátokon is tanulmányozható a hFXIII-A keresztkötő és izopeptidáz aktivitása.

A humán TG4 (hTG4) megtalálható a nyálban és bélnedvben is, amely az enzim gastroenterológiai szerepére utal. Az irodalomban főként a rágcsáló TG4-gyel végezett kíséretek eredményeit találhatjuk meg, a hTG4 esetében leginkább csak prosztatata sejtvonalakat vizsgáltak. Az enzim fiziológias szerepe az emberi szervezetben szinte egyáltalán nem ismert. Viszont a legtöbb 1-es típusú autoimmun poliendokrin szindrómában szenvedő felnőtt férfi szérumában detektáltak hTG4 ellenes autoantitestek, amelyek hozzájárulhatnak a betegek meddőségének kialakulásához. Továbbá a hTG4 magas expressziót mutat luminális epitél eredetű prostatadaganatok esetében, amelyeknél a hTG4 potenciális daganatellenes terápiás célpont lehet.

A hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának és a hTG4 fiziológias szerepének vizsgálata új antikoaguláns illetve kemoterápiás szerek fejlesztéséhez nyújthat segítséget.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A transzglutamináz enzimes család

A transzglutaminázok (TG-k, EC 2.3.2.13) szerkezetileg és funkcionálisan rokon fehérjék, amelyek Cys-His-Asp katalitikus triáddal rendelkeznek (Lorand és Graham, 2003). A legjelentősebb enzimikus aktivitásuk a Ca^{2+} -függő N^{ϵ} (γ -glutamil)lizin izopeptid kötés kialakítása fehérjék glutamin és lizin oldalláncai között vagy biogén aminok beépítése fehérjék glutamin oldalláncaiba (Ecker és mtsai, 2014). A transzglutamináz elnevezés először 1959-ben jelent meg az irodalomban, amikor a szerzők egy olyan enzimet azonosítottak a tengerimalac májában, amely transzamidáló tulajdonságokkal rendelkezett. Ma már ezt az enzimet transzglutamináz 2-nek (TG2) nevezzük. Az 1980-as évek végéig a legjelentősebb transzglutamináz forrás a tengerimalacok májából vagy más emlősök véréből izolált transzglutaminázok voltak (Sarkar és mtsai 1957). A TG2 felfedezése óta, más fehérjéket is azonosítottak egyszélű élőlényekben, puhatestűekben, halakban, emlősökben és növényekben is ezzel az aktivitással. A humán genom kilenc TG gént tartalmaz (1. táblázat), amelyek közül 8 enzimikusan aktív és egy inaktív (eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje) fehérjét kódol (Grenard és mtsai, 2001). Ezek a fehérjék állványzati funkciókat látnak el, szerepük van a membrán integritásának fenntartásában, szabályozzák a sejtadhéziót és a jelátvitelben is részt vesznek (Satchwell és mtsai, 2009). A TG-ok elsődleges aminosav szekvenciája különbözik, azonban az eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje kivételével az aktív helyükön egy jól konzervált aminosav szekvencia található (YGQCWVFA; hTG4: 265-272, hFXIII-A: 312-319 aminosavak). A TG4 esetében azonban ennek a motívumnak az első aminosava nem tirozin, mint a többi 8 transzglutamináz esetében, hanem fenilalanin. Ez a különbség nem okoz olyan változást, mint az eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje esetében megfigyelhető cisztein alanin aminosav csere. A fehérje keresztkötő és állványzati funkciók mellett, a TG-ok más fehérjék poszt transzlációs módosításait is katalizálják, izopeptid kötések kialakítása, dezamidáció és amin beépítés révén (Eckert és mtsai, 2014). A FXIII-A keresztkötő aktivitása nélkülözhetetlen szerepet játszik a véralvadásban (Muszbek és mtsai, 2011), a TG4 keresztkötő aktivitása pedig a rágcsálók ondófoládékának alvadásában, a kopulációs dugó kialakulásakor elengedhetetlen fontosságú (Williams-Ashman, 1984). A hFXIII-A az egyik legjobban karakterizált transzglutamináz, ezzel szemben a hTG4 az egyik legkevésbé ismert tagja a családnak.

1. táblázat A humán transzglutaminázok összefoglaló táblázata (Lorand és Graham, 2003, Candi és mtsai, 1998; Shan és mtsai, 2002; Gjersvik és Ronnevig, 2003; Landegren és mtsai, 2015; Cassidy és mtsai, 2005; Tripathy és mtsai, 2017; Satchwell és mtsai, 2009; Adány és mtsai, 2001; Zaba és mtsai, 2007; Supsriunjai és mtsai, 2020; Orosz és mtsai, 2011; Csapó és mtsai, 2009)

TG	Gén	Méret (kDa)	Szöveti kifejeződés	Sejt kompartment	Funkció	Kapcsolódó betegségek
hFXIII-A	F13A1	83	Vérlemezkék, asztrociták, makrofágok, kondriociták, placenta, vérplazma, synoviális folyadék, preadipociták, liquor, könny	Citoszol, extracelluláris, sejtmag	Véralvadás, csontnövekedés, sebgyógyulás, angiogenezis, graviditás fenntartása	FXIII hiány, dermatofibróma
hTG1	TGM1	90	Keratinociták, agy	Membrán, citoszol	Sejtburok képződés	Lamelláris ichthyosis
hTG2	TGM2	80	Mindenhol	Citoszol, sejtmag, membrán, sejtfelszín, extracelluláris	Összetett	Coeliakia, neurodegeneratív betegségek, szürke hályog, érelmeszesedés, fibrózis, diabétesz
hTG3	TGM3	77	Laphám, agy	Citoszol	Sejtburok képződés	Dermatitis herpetiformis
hTG4	TGM4	77	Prosztata, nyál, vizelet	Citoszol, membrán, extracelluláris	Ismeretlen	1-es típusú autoimmun poliendorkin szindróma
hTG5	TGM5	81	Mindenhol, kivéve a központi idegrendszert és a nyirokrendszert	Ismeretlen	Keratinocitákban sejtburok képzés	Akrális hámló bőr szindróma
hTG6	TGM6	78	Agy, herék, tüdő	Ismeretlen	Ismeretlen	Spinocerebelláris ataxia 35-ös típusú
hTG7	TGM7	81	Mindenhol	Ismeretlen	Ismeretlen	Ismeretlen
Humán eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje	EPB42	72	Vörösvértestek, csontvelő, magzati máj és lép	Membrán	Membrán komponens	Örökletes spherocytosis

2.1.1. A humán transzglutamináz izoenzimek jellemzése

A humán keratinocita transzglutamináz (hTG1) eddigi tanulmányok alapján a bőr rétegzett laphám rétegében, az emésztő rendszer felső szakaszában, valamint a női nemi traktus alsó szakaszában van jelen. A hTG1-et aktiválhatja proteolitikus hasítás, emelkedett Ca^{2+} szint, és a tazarotén-indukált gén 3-mal való interakció (**Eckert és mtsai, 2009; Jans és mtsai, 2008; Sturniolo és mtsai, 2003; Sturniolo és mtsai, 2005**). Forbol-észterek és a retinsav csökkentik a hTG1 mRNS és fehérje expresszióját (**Eckert és mtsai, 2005**). A hTG1 fehérje a NH_2 -terminális végen lévő cisztein aminosavhoz kapcsolódó zsírsav-acil részen keresztül a plazma membránhoz kapcsolódik, majd proteolízis hatásaként válik le 10, 33 és 66 kDa fragmentek formájában (**Kim és mtsai, 1995**). Az autoszómális recesszíven öröklődő lamelláris ichthyosis a hTG1-et kódoló gén mutációjának az eredménye (**Candi és mtsai, 1998; Cserhalmi-Friedman és mtsai, 2001; Huber és mtsai, 1995**). A lamelláris ichthyosis a bőr egy ritka keratinizációs rendellenessége, amelyet az epidermisz nem megfelelő kornifikációja jellemez. A betegek drasztikusan csökkent hTG1 aktivitással rendelkeznek (**Candi és mtsai, 1998**). A TG1 hiányos egér is lamelláris ichthyosis fenotípust mutat (**Matsuki és mtsai, 1998**).

A legtöbbet tanulmányozott családtag a humán transzglutamináz 2 (hTG2), vagy más néven szöveti transzglutamináz. Az emberi szervezet összes szövetében megtalálható, és szinte minden sejttípus termelheti. A hTG2 alapvetően citoszolikus enzim, de szinte minden sejtalkotóban megtalálható (**Lorand és Graham, 2003**). A TGM2 gén promótere retinsav válaszadó elemet, interleukin (IL)-6 specifikus cisz-szabályzó elemet, transzformáló növekedési faktor- β 1 (TGF- β 1) válaszadó elemet is tartalmaz. A retinsav, a D vitamin, a TGF- β 1, az IL-6, tumor nekrozis faktor (TNF), NF- κ B, epidermális növekedési faktor, forbor-észter, oxidatív stressz, és Hox-A7 is indukálhatja a hTG2 kifejeződését a sejtekben. A hTG2 több funkciós enzim, a transzamidáz aktivitáson kívül, GTPáz, ATPáz, protein kináz és protein diszulfid izomeráz (PDI) katalitikus aktivitással is rendelkezik. Ismert interakciós partnerei például a foszfolipáz $\text{C}\delta_1$, β -integrinek, fibronektin, oszteonektin, RhoA, retinoblasztóma fehérje, PTEN, és $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Coeliakiában, neurodegeneratív betegségekben (Alzheimer és Parkinson kór), valamint szürke hályog, érelmeszesedés, fibrózis, diabétesz, autoimmun betegségek és nagyon agresszív tumorok esetében megfigyelték, hogy a hTG2 expressziója és/vagy enzimikus aktivitása megemelkedett. (**Griffin és mtsai, 2002; Katt és mtsai, 2018; Lorand and Graham 2003**). A TG2 hiányos egereknek normál körülmények nincs jellemző fenotípusa (**De Laurenzi és Melino, 2001**), de késleltetett sebgyógyulást (**Tong és mtsai, 2013**), csökkent fagocitotikus kapacitást (**Sarang és mtsai, 2014**) és rosszabb glükóz által

stimulált inzulinszekréción mutatnak **(Bernassola és mtsai, 2002)**. A TG2 hiányos egerekből származó fibroblasztok megváltozott letapadási képességet és mozgékonytságot mutatnak **(Tong és mtsai, 2013)**.

A humán transzglutamináz 3 (hTG3) vagy epidermális TG jelen van a hajhagymákban, a felhamban, az agyban, a nyálkahártyában és a vékonybélben is. A trichohialin és a keratin intermedier filamentumok keresztkötését katalizálja a hajhagymák belső gyökérhüvelyének megerősítéséhez, amely kritikus a hajsálak morfogeneziséhez és a hTG3 részt vesz a sejtburrok kialakításában a differenciáció késői szakaszaiban **(Hitomi és mtsai, 1999; John és mtsai, 2012)**. A TGM3 gén promótere SP1 és ETS motívumokat tartalmaz, és a humán pro-transzglutamináz 3 mRNS expresszióját a Ca^{2+} növeli. A hTG3 a hTG2-höz hasonlóan szintén képes kötni és hidrolizálni a GTP-t **(Ahvazi és mtsai, 2004)**. A dermatitis herpetiformis egy erősen viszkető, krónikus, kiütésekkel járó bőrbetegség, amely esetén a hTG3 a fő autoantigén **(Gjersvik és Ronnevig, 2003)**. A TG3 hiányos egér rendellenes szőrfejlődést és a bőre csökkent határoló funkciót mutat **(Bognar és mtsai, 2014)**. Kutatások bizonyították, hogy a hTG3 gén leregulálása szorosan összefügg számos humán daganat típus kialakulásával, mint a nyelvcső és szájüregi laphámsejtes karcinóma.

A humán transzglutamináz 4 (hTG4), vagy prosztata transzglutamináz, jelen van a prosztatában, a prosztata folyadékokban és az ondófolyadékban **(Dubbink és mtsai, 1999)**. Egy Sp1-kötő hely található a transzkripció kezdő hely előtti -96 -87 bp között, amely fontos a hTG4 gén transzkripció szabályozásához. Humán prosztata tumor sejtekben az androgén kezelés növelte a hTG4 mRNS szintjét **(Dubbink és mtsai, 1996; Dubbink és mtsai 1999a)**. **Rivera-Gonzalez és munkatársai (2012)** kimutatták, hogy a TGM4 gén expressziós szabályozásáért főleg a retinsav felelős, azonban a vizsgált sejtípusokban fehérje szinten nem vizsgálták az enzim expresszióját. Patkányban, az enzim részt vesz a kopulációs dugó kialakításában, és a spermiumok antigenitásának maszkírozásában. A TG4 hiányos egér csökkent szaporodási képességet mutat a kopulációs dugó hibás kialakulása miatt **(Dean, 2013)**. A hTG4 pontos szerepe az emberi szervezetben nem ismert, de a hTG4 megnövekedett termelése összefüggésben van prosztatadaganatokkal **(Jiang és Ablin, 2011)**.

A humán transzglutamináz 5 (hTG5), vagy transzglutamináz X, mint transzglutamináz enzimsaládtag csak 1998-ban lett azonosítva, így az egyik legkevésbé ismert transzglutamináz. Hasonlóan a hTG1-hez és a hTG3-hoz a bőr felső rétegeinek rétegzett laphámjában termelődik, és hozzájárul a hyperkeratosishoz az ichthyosisban és

pikkelysömörben szenvedő betegeknél **(Candi és mtsai, 2001)**. A TGM5 gén promóter régiója TATA nélküli, de több transzkripció faktor (Myb, AP-1, NF- κ B, és NF-1) számára tartalmaz kötőhelyeket. A GTP és az ATP gátolja a hTG5 aktivitását, azonban a Ca²⁺ képes megszüntetni ezt a gátlást. A hTG5 keresztköti a loricitint, involucrint, és az SPR3-at az epidermiszben **(Candi és mtsai, 2002)**. Bakulovírus expressziós rendszerben és emlős epitel sejtekben a hTG5 fehérje proteolitikus hasítás eredményeként aktiválódik **(Pietroni és mtsai, 2008)**. Az enzimet inaktíváló mutációk eredménye egy ritka betegség, az Akrális hámló bőr szindróma (Acral Peeling Skin Syndrome, APSS), amely esetén a hámlás csak a kezek és a lábak hátulján figyelhető meg **(Cassidy és mtsai, 2005)**. TG5 hiányos egeret még nem készítettek.

A humán transzglutamináz 6 (hTG6), vagy más néven a transzglutamináz Y termelődése a herékben, a tüdőben és az agyban történik. Neuronális jellemzőkkel rendelkező humán karcinóma sejtek is termelnek hTG6-ot. A hTG6 katalitikus aktivitása a proenzim proteolitikus hasítását követően aktiválódik **(Thomas és mtsai, 2013)**. A TGM6 gén mutációi által okozott betegség a 35-ös típusú spinocerebelláris ataxia **(Tripathy és mtsai, 2017)**. TG6 hiányos egeret sem készítettek még.

A humán transzglutamináz 7 (hTG7), vagy transzglutamináz Z esetében csak kevés adatot ismerünk az enzim szabályozását és funkcióját illetően. A hTG6-hoz hasonlóan, a herékben, a tüdőben és az agyban termelődik. A hTG7 szubsztrát preferenciának tanulmányozásakor azonosítottak egy nagyon reaktív szubsztrát szekvenciát, amely izoenzim specifikus. A jövőben a hTG7 által keresztköttött szubsztrátok megismerése valószínűleg több információt fog szolgáltatni az enzim fiziológiás jelentőségéről, és hogy milyen betegségekkel van összefüggésben. Egy tanulmány kimutatta, hogy a hTG7 transzkripció szintje megnövekedett rossz prognózisú melldagados betegek esetében **(Jiang és mtsai, 2003)**. TG7 hiányos egér szintén nem érhető el.

A hFXIII-A, vagy más néven fibrin stabilizáló faktor vagy magyar felfedezőiről elnevezve Laki-Lóránd faktor, egy zimogén, amely a trombin általi hasítás eredményeként válik aktívvá. A véralvadás utolsó szakaszában hozzájárul az alvadék stabilizálásához. Jelen van vérlemezkékben, a plazmában, asztrócitákban, makrofágokban, a placentában, kondrocitákban, a szinoviális folyadékban, a szaruhártya sejtekben és az oszteoblasztokban **(Paragh és Törőcsik, 2017)**. A hFXIII-A gént (F13A1) mielőid transzkripció faktorok (MZF1-szerű fehérje, GATA-1 és Ets-1) és két mindenhol jelenlévő transzkripció faktor (NF1 és S1) szabályozza. A véralvadás mellett, a hFXIII-A szintén szerepet játszik a fibrinolízis

szabályozásában, a terhesség fenntartásában, a sebgyógyulásban, az angiogenezisben, valamint porcsejtek és csontsejtek differenciációjában, az adipogenezisben, és bizonyos immunfolyamatok modulálásában is **(Muszbek és mtsai, 2011; Schroeder és Kohler, 2016)**. A vérplazmában tetramerként cirkulál, két A (hFXIII-A) és két B (hFXIII-B) alegységből épül fel, az aktivációhoz kalciumra és trombinra van szüksége. 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 FXIII-A mutációt azonosítottak, valamint egyedi nukleotid polimorfizmusokat is leírtak, amelyek befolyásolhatják a FXIII-A aktivitását **(Hsieh és Nugent, 2008)**. A FXIII-A hiányos egér esetében véralvadási rendellenesség, megnövekedett esélyű vetelés, csökkent angiogenezis és szöveti átépülési hibák figyelhetők meg **(Dardik és mtsai, 2006; Koseki-Kuno és mtsai, 2003)**.

A humán eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje, egy egyedi TG, amely nem rendelkezik enzimatis aktivitással. A Cys-His-Asp katalitikus triádban lévő Cys-Ala csere felelős az eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje enzimatis aktivitásának hiányáért. Ez a fehérje főként vörösvértestekben, csontvelőben, magzati májban és a lépben van jelen. A humán eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje a vörösvértestek membránjának egyik fő komponense, amely fontos szerepet játszik a membrán integritásának fenntartásában és a sejt stabilitásának szabályozásában. A fehérje termelése részben vagy teljesen hiányzik japán recesszív szferocitászindrómában szenvedő betegeknél **(Satchwell és mtsai, 2009)**. Az eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje hiányos egér módosult vörösvérsejt funkciót, szferocitózist és megváltozott ion transzportot mutat **(Peters és mtsai, 1999)**.

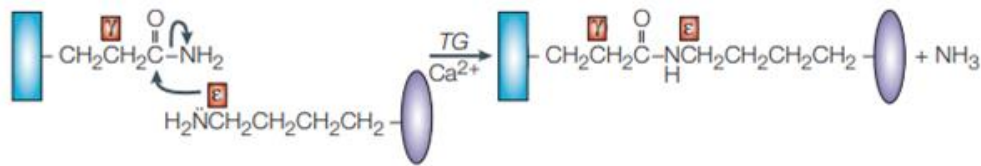
Munkánk során mi a hFXIII-A és a hTG4 enzimek vizsgálatával foglalkoztunk részletesebben.

2.1.2. A transzglutamináz aktivitások változatossága

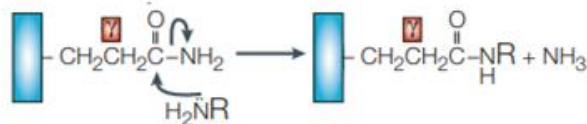
A transzglutaminázok változatos biológiai funkcióval rendelkeznek, amelyek általában a fehérje módosító aktivitásaik révén valósulnak meg, azonban néhány esetben a biológiai funkciójuk mögött nem katalitikus események állnak. A citoszkeleton állványzati funkcióinak biztosításában, a membrán integritás fenntartásában (pl.:humán eritrocita membrán 4.2 sáv fehérje), a sejt adhézióban és jelátviteli folyamatokban (pl.: TG2) is vesznek részt transzglutaminázok.

Transzamidálás

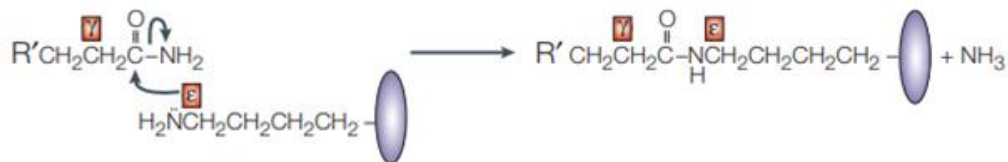
-Keresztkötés (izopeptidkötés) kialakítása



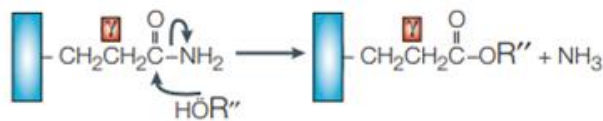
-Amin beépítése



-Acilezés

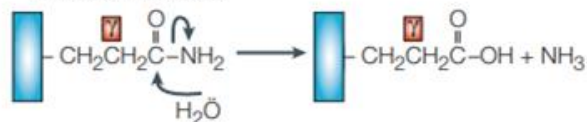


Észterifikáció

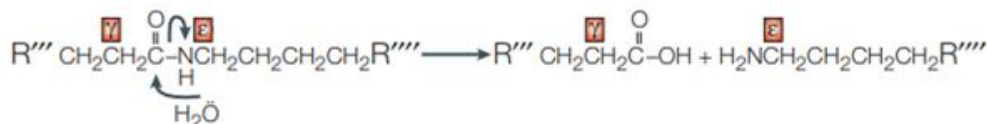


Hidrolízis

-Dezamidáció



-Izopeptidkötés hasítása



1. ábra Transzglutamináz reakciók típusai (Lorand és Graham, 2003)

A transzamidálási reakció mechanizmusa a tiol proteázok által katalizált proteolízis fordítottja és két fő lépésből áll (Makarova és mtsai, 1999). Az első lépésben a cisztein tiol csoportja, amely az enzim aktív helyén található megtámadja a fehérje szubsztrát (acil akceptor) glutamin oldalláncát, így kialakul az acil-enzim komplex intermedier, amelyet ammónia

felszabadulás kísér. A második lépésben különböző módon történhetnek meg a reakciók a rendelkezésre álló szubsztrátok szerint (**Lorand és Graham 2003**).

Transzamidáláskor a γ -glutamint tartalmazó fehérje szubsztrát és egy peptid lizin oldalláncának ϵ -amino csoportja között N- ϵ (γ -glutamil)lizin keresztkötés alakul ki. Amin beépüléskor a reakció egy γ -glutamint tartalmazó peptid és egy primer amin szubsztrát között zajlik, ahol az enzim katalizálja a primer amin beépülését amely γ -glutamil-amin kötést eredményez. A harmadik esetben acilezés történik, amikor egy donor fehérje deprotonált lizin oldalláncához egy amino és karboxil csoportot egyaránt tartalmazó szénlánc kapcsolódása mellett ammónia szabadul fel, ezáltal kialakul a keresztkötés (**Lorand és Graham, 2003**). A transzamidálási reakció egyik speciális esete, amikor az acil akceptor helyébe víz lép és hidrolízis történik, amely a glutamin oldallánc dezamidálásának következtében glutamin savat eredményez. Észterifikáció akkor történhet, hogyha a glutamin akceptor mellett, a második szubsztrát egy hidroxil csoportot tartalmazó szénhidrát molekula, amely ammónia felszabadulás mellett a hidroxil csoporton keresztül észtert képez az akceptor fehérje glutaminjával. Emellett a transzglutaminázok több tagja képes az izopeptidáz aktivitása révén a korábban kialakított izopeptid kötés hasítására, azonban ez nem teljesen felel meg a keresztkötés megfordításának, ugyanis a glutamin helyett a reakció eredményeként glutamin sav marad vissza (**Lorand és Graham, 2003**).

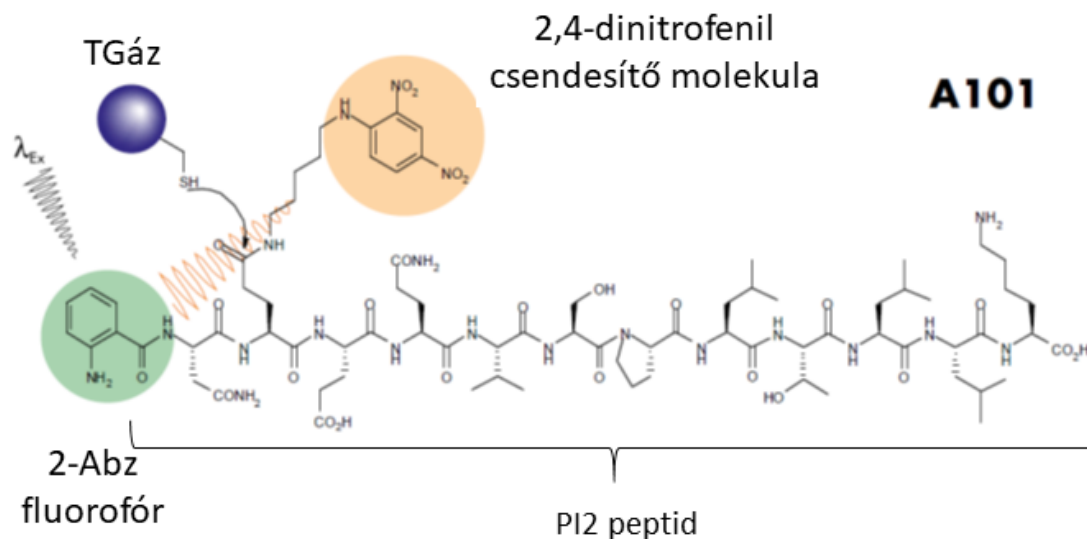
A transzglutaminázok által katalizált poszt transzlációs módosítások érdekessége, hogy a módosított fehérje lebontásakor a γ -glutamil- ϵ -lizin dipeptid ellenáll a proteázok általi lebontásnak (**Kornguht és mtsai, 1963; Matačić és Loewy, 1968**). Ezt a dipeptidet, és más transzglutamináz reakció termékeként képződött γ -glutamilamin molekulákat a γ -glutamin-ciklotranszferáz nevű enzim képes hasítani (**Fink és Folk, 1981**). **Raczyński és munkatársai (1975)** patkányokkal végzett kísérletekkel bizonyították, hogy a γ -glutamil- ϵ -lizin dipeptid lebontása főként a vesékben történik, és ehhez képest csak kis mennyiségben, a májban és a vékonybelekben.

A transzglutamináz reakciókat, amelyeket a TG-ok katalizálnak, pl.: fehérje keresztkötés, a lehetséges alkalmazásai miatt jelentős kutatási érdeklődés övezte az élelmiszer- és gyógyszeriparban. Az amin beépülés és dezamidáció szintén nagyon jól ismert aktivitások, a transzglutaminázok által végzett poszttranszlációs módosítások miatt (**Lorand és Graham, 2003**). Ezekon felül érdekes TG aktivitás a fehérje észterifikáció, amelyet a keratinociták végső differenciációja esetén figyeltek meg (**Nemes és mtsai, 1999**). A búza és más gabonafélék alkotóelemének, a gliadin A-nak a dezamidálását a hTG2 katalizálja, és a coeliákiában ezek a

dezamidált peptidek a domináns epitópjai a T sejtek aktivációjának **(Shan és mtsai, 2002)**. A TG katalizált dezamidáció esetén egyetlen egy semleges töltésű glutamin aminosav módosítása negatívan töltött glutamin savvá fontos biológiai következménnyel járhat. Ez a változás az oldallánc termodinamikai tulajdonságaihoz alig járul hozzá, mégis az egyensúlyi állapot olyan változását idézheti elő, amely megváltoztathatja az oldékonyságot, a konformációt, a stabilitást, az oligomer asszociációt/disszociációt vagy a célfehérje más makromolekulákkal vagy ligandokkal való interakcióit. Hasonló változásokat idézhet elő az az eset is, amikor egy semleges Gln aminosav oldalláncához egy pozitívan töltött diamin vagy poliamin TG katalizált beépülése történik **(Lorand és Graham, 2003)**.

2.1.2.1. A transzglutaminázok izopeptidáz aktivitása

A transzglutaminázok amin transzferáz aktivitásait széles körben kutatták, azonban az izopeptid kötés hasítását és az abban rejlő lehetőségeket kevésbé tanulmányozták. Ennek egyik oka lehetett a megfelelő szubsztrátok hiánya. László Lóránd és munkatársai több szintetikus, fluoreszcensen jelölt peptidet az izopeptid kötést utánozva kisméretű csendesítő molekulákhoz kötöttek, amelyek fluoreszcencia intenzitása az izopeptidáz aktivitás következtében megnövekedett. Ezáltal lehetővé vált a tengerimalac TG és a humán TG2 és a FXIII-A izopeptidáz aktivitásának kinetikus tesztelése, a fluoreszcens jel emelkedését nyomon követve **(Parameswaran és mtsai, 1997)**. Ma a TG1, TG2, TG3, TG6 és a FXIII-A izopeptidáz aktivitásának méréséhez egy német cég, a Zedira GmbH (Darmstadt, Németország). árusít egy érzékeny, az α 2-plazmin inhibitorból származó peptiden alapuló izopeptidáz szubsztrátot, az A101-et (2. ábra).



2. ábra. Az A101 szubsztrát szerkezete. A PI2 peptid, amely az α 2-plazmin inhibitor N-terminálisának első 12 aminosavát (NQEQVSPLTLK) és egy 2-Abz fluorofórt tartalmaz. A peptid reaktív glutaminjához kadaverinen keresztül a 2,4-dinitrofenil, egy csendesítő molekula kapcsolódik. A TG izopeptidáz aktivitásának következtében a csendesítő molekula leválik a peptid glutamil oldalláncáról, amely a fluoreszcens jel emelkedését vonja maga után. A növekvő fluoreszcens jel detektálásával a TG izopeptidáz aktivitása meghatározható (**Oertel és mtsai, 2007**).

A hFXIII-A aktivitásának mérése plazma mintákban, a hFXIII-A hiányos betegek számára alapvető fontosságú, azonban a hFXIII-A aktivitás mérése nagy kihívást jelent alacsony hFXIII-A koncentráció mellett (**Oertel és mtsai, 2007**). A hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának mérése jó lehetőség a hFXIII-A aktivitásának pontos, nagyon érzékeny meghatározására a plazmában. A FXIII-A izopeptidáz aktivitásának automatizált mérésére is alkalmas a Zedira GmbH által árusított A101-es szubsztrát, amely a hFXIII-A hiány diagnosztizálását nagyban elősegítheti (**Leitner és mtsai, 2021**). 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 enzimmel.

A transzglutaminázok gyakran fehérjéken fejtik ki hatásukat, amelyek különböző reakció kinetikát eredményeznek, amelyeket nem lehet megjósolni peptidek vagy kis molekulájú amin szubsztrátokat alkalmazva. Korábban kifejlesztettünk olyan hTG2 mutánsokat, amelyek emelkedett izopeptidáz aktivitást mutatnak peptid szubsztrátokkal, de a fehérje-peptid alapú szubsztrát esetében ennek ellenkezője volt megfigyelhető. Ez is azt mutatja, hogy szükség van

fehérje-peptid alapú kinetikus izopeptidáz aktivitásmérésekre a területen (Király és mtsai, 2016).

2.2. A humán FXIII-as véralvadási faktor

A hFXIII-A egyike az elsőként leírt és legjobban ismert transzglutaminázoknak. Elsőként a fiziológiás szerepét, a vér alvadék stabilizációját fedezték fel (Laki és Lóránd, 1948), amelynek következtében a vérrög ureában oldhatatlanná válik. Majd később kiderült, hogy a transzamidáz aktivitás felelős a fibrin keresztkötések kialakításáért (Lorand és mtsai, 1962; Lorand és mtsai, 1966). A hFXIII-A a véralvadás során, trombin általi aktivációját követően γ -glutamil- ϵ -lizin keresztkötéseket alakít ki a fibrin alvadékban. Emellett, a fibrinolízis fő gátlószerét, az $\alpha 2$ -plazmin inhibitor is beépíti a fibrin alvadékba. Ezáltal a vérrög ellenálló lesz a túl korai fibrinolízissel szemben, amely a hFXIII-A szerepét mutatja a fibrin koaguláció és a fibrinolízis közötti hemosztatikus egyensúly szabályozásában (Sakata és Aoki, 1982). Ezek a tulajdonságok antikoaguláns terápiákban lehetséges terápiás célponttá teszik a hFXIII-A-t (Pasternack és mtsai, 2020).

A vérplazmában a hFXIII két A és két B alegységből felépülő heterotetramerként van jelen. Az A alegység a protranszglutamináz, amely katalitikusan aktív transzglutaminázzá aktiválható. A plazma hFXIII-A₂ az aktivációs peptid trombin általi proteolitikus hasítása révén, Ca²⁺ kötődésével, és a B alegységek disszociációjával válik aktívvá. Ezek az események az A alegység jelentős konformációs változását okozzák. A Ca²⁺ kötődése a hFXIII-A molekula magas affinitású Ca²⁺-kötő helyeire alapvető az aktív konformáció eléréséhez, és a katalitikus hely felfedéséhez (Komáromi és mtsai, 2011). Smith és munkatársai (2013), kimutatták, hogy az aktivációs peptid leválásával a hFXIII-A₂ szabaddá váló része felelős a fibrinogén α láncának felismeréséért. Ez az interakció az aktivált hFXIII-A dimer (FXIII-A₂) és a fibringén α C lánc között fontos a szubsztrát felismeréshez és a fibrin keresztkötés kialakításához, ezáltal pedig alapvető fontosságú a stabil vérrögek képződéséhez.

Az A alegység öt doménből áll: az N-terminális aktivációs peptid (1-37. aminosav), a β -szendvics (38-184. aminosav), katalitikus domén (185-515. aminosav), β -hordó 1 (516-628 aminosav) és β -hordó 2 (629-731. aminosav) (Yee és mtsai, 1994). A B alegység amellett, hogy részt vesz az A alegység szabályozásában, állványozó szerepet is betölt. A humán FXIII-B (hFXIII-B) egy glikoprotein, amely 641 aminosavból áll és 8,5 %-a szénhidrát, a molekula tömege kb. 80 kDa. Tipikus mozaik fehérje, 10 rövid tandem ismétlődésből áll, amely sushi

doméneknek vagy Gp-I struktúráknak neveznek, ezek mindegyike kb. 60 aminosavból áll és doméenként 2 belső diszulfid kötés tartja össze a fehérjét. Ugyanezt a struktúrát több mint 20 másik fehérje esetén is azonosították, (pl.: β_2 -glikoprotein 1), és közülük több fehérje is az 1. kromoszóma q32-es sávjában található génklaszterben van kódolva. Elektronmikroszkóppal a B alegység vékony, rugalmas, megtört szálnak tűnik **(Carrell és mtsai, 1989)**. A hFXIII-A a hFXIII-B nélkül homodimert alkot, a hFXIII-B alegységről ellentmondásos tanulmányok vannak, azt illetően, hogy önmagával formál-e komplexet **(Seelig és mtsai, 1980; Carrell és mtsai, 1989; Souri és mtsai, 2008)**. A legújabb két A és két B alegységből álló FXIII heterotetramer komplex kialakulását és disszociációját vizsgáló tanulmány szerint a FXIII-B dimer egyik B alegysége kötődik elsőként a FXIII-A dimerhez, amely elősegíti és pozicionálja a második B alegység kötődését, amely azonban kisebb affinitással kötődik a komplexhez. Az asszociációt a B alegységek flexibilitása és konformáció változása segíti elő, amely eredményeként a B alegységek az A alegységek köré tekerednek és hajonlanak. A FXIII-A és FXIII-B alegységek közötti erős interakció felveti a lehetőséget annak, hogy aktiváció során a két A alegység elszakad egymástól, és átmenetileg heterodimerek alakulnak ki. Ezt követően a FXIII-A és FXIII-B alegységek is elválnak egymástól, és az aktív FXIII-A monomer formájában van jelen a vérben **(Singh és mtsai, 2019)**. A B alegységek felszínén azonosítottak két-két pozitívan töltött elektrosztatikus zsebet, amelyek jól kiegészítik a fibrinogén felületén található negatív felületeket **(Singh és mtsai, 2019)**.

A humán transzglutaminázok között egyedül a hTG1 és a hFXIII-A tartalmaz aktivációs peptidet **(Komáromi és mtsai, 2011)**. A FXIII-A aktivációja során az aktivációs peptidet a trombin hasítja ki. Röntgen szerkezet alapján látszik, hogy a katalitikus cisztein teljesen el van fedve az aktivációs peptiddel, ezért az aktivációs peptid eltávolítása, vagy pozíciójának kiközlentése az aktiváció előfeltétele **(Weiss és mtsai, 1998)**. Amellett, hogy az aktivációs peptid elzárja az aktív helyet, más funkciót is betölt. A kihatott aktivációs peptid leválik a fehérjéről, és a plazmába kerülve **(Schroeder és mtsai, 2007; Ortner és mtsai, 2010)** képes redukálni a további hFXIII-A₂ aktivációt és fibrin keresztkötést, tehát negatív visszacsatolás révén képes szabályozni a hFXIII-A₂ aktivitását **(Schroeder és mtsai, 2015)**. Emellett az aktivációs peptid a hFXIII-A₂ stabilitásában is fontos szerepet játszik **(Handrkova és mtsai, 2015)**.

A hFXIII-A intracellulárisan is dimer formájában (hFXIII-A₂) van jelen, és megakariocitákban, vérlemezkékben, asztrocitákban, makrofágokban, a placentában, kondrocitákban, a szinoviális folyadékban, a szívben, szaruhártya sejtekben, szubkután preadipocitákban és az oszteoblasztokban is azonosították **(Paragh és Törőcsik, 2017)**. A

vérlemezekben és a monocitákban az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedése elegendő az enzim aktiválásához (**Muszbek és mtsai, 2011**), így a celluláris hFXIII-A szerepet játszhat számos intracelluláris folyamatban, mint például makrofágok általi fagocitózisban (**Töröcsik és mtsai, 2014**). Specifikus körülmények között a FXIII-A szintén megjelenhet a sejtek felszínén, ahol kifejtheti transzglutamináz aktivitását és részt vesz a sejt adhézió szabályozásában (**Töröcsik és mtsai, 2010**).

2.2.1. A humán FXIII-A biológiai funkciói

A hFXIII-A számos szubsztráttal rendelkezik, amely a hFXIII-A összetett funkcióját jelzi. **Nikolajsen és munkatársai (2014)** proteomikai eljárást transzglutamináz specifikus jelöléssel kombinálva azonosították a FXIII-A fehérje szubsztrátjait és azok keresztkötő helyeit. Ez a tanulmány 147 lehetséges hFXIII-A szubsztrátot azonosított, amelyek közül 132 korábban nem volt leírva. A szerzők bemutatták, hogy 48 lehetséges hFXIII-A szubsztrát valóban beépült a fibrin alvadékba. Az azonosított szubsztrátok részt vesznek a véralvadásban, a komplement rendszer aktiválásában, gyulladáshoz és immunreakciókban, és az extracelluláris mátrix kialakításában (**Nikolajsen és mtsai, 2014**). Koagulációs tesztek alapján azt találták, hogy 5% hFXIII-A elégséges a keresztkötő funkció megvalósulásához, viszont az enzim antifibrinolitikus funkciójának fenntartásához a normál szint kb. 50%-a szükséges (**Mutch és mtsai 2010; Fraser és mtsai, 2011**).

2.2.1.1. A humán FXIII-A klasszikus szerepe, a hemosztázis fenntartása

A véralvadási kaszkád a véredények sérülésekor fellépő védekező mechanizmusként alakult ki, a hemosztázis fenntartására. Ezt a folyamatot egy 13 koagulációs faktorból álló jelátviteli kaszkád irányítja. Két fő útvonal létezik, az intrinsic útvonalat a vaszkuláris rendszeren belüli trauma indítja be, és a vérlemezek, a sérült endotélium, vagy a kiszabadult kollagén aktiválják. Ebben az útvonalban a XII, a XI, a IX és a VIII faktorok vesznek részt. Ezzel szemben, az extrinsic útvonalat külső trauma aktiválja, amelyet az érrendszerből kilépő vérzés okoz. Ebben az esetben a VII faktor aktiválódik, majd a két útvonal végül összekapcsolódik. A közös útvonalban az I, a II, az V és a X faktor jól szabályozott egymást követő reakciói valósulnak meg. A kaszkád aktiválásának következtében trombin keletkezik, amely a kaszkád számos további tagját aktiválja. A trombin a fibrinogént fibrinné alakítja, amely a vérrög képződéséhez vezet. A hFXIII-A a folyamat végén kovalens kötéseket alakít ki a fibrin molekulák között (**Fonyó és Ligeti, 2008**).

A hFXIII-A a vérrög mechanikai stabilitását biztosítja az α - és a γ -fibrinláncok keresztkötése révén, és emellett védi azt a korai fibrinolitikus lebontástól, fibrinolitikus inhibitorok beépítése révén a fibrinhálóba (Valnickova és Enghild, 1998). A fibrin C-terminális doménjének több lizinje hFXIII-A szubsztrátként szolgál (Sobel és Gawinowicz, 1996) amelyek keresztkötése enyhíti a plazminogén és a szöveti plazminogén aktivátor kötődését a fibrin hálóhoz, ezáltal gátolja a fibrinolízist. A másik mechanizmus, amely által a hFXIII-A hozzájárul az alvadék fibrinolitikus lebontással szembeni ellenálláshoz a benne lévő fibrin szálak átmérőjének csökkentésével és sűrűségének növelésével (Hethershaw és mtsai, 2014). A FXIII-A képes a fibrinhálóhoz kötni az α 2-plazmin inhibitor, a trombin aktiválható fibrinolízis inhibitor (Valnickova és Enghild, 1998) és plazminogén aktivátor inhibitor-2-öt. Azonban a domináns antifibrinolitikus hatása a FXIII-A-nak kizárólag az α 2-plazmin inhibitor keresztkötésével valósul meg, a többi inhibitor hatása elhanyagolható (Fraser és mtsai, 2011).

Az α 2-plazmin inhibitor keresztkötése azonban egy reverzibilis reakció, amely egyensúlya a keresztkötött komplex disszociációjának irányába tolódik (Ichinose és Aoki, 1982). Később megfigyelték, hogy az α 2-plazmin inhibitor reverzibilis keresztkötése a fibrinhez nem véletlenszerű folyamat, hanem a hFXIII-A által katalizált enzimatis aktivitás eredménye. Ennek következményeként, az α 2-plazmin inhibitor hasítása a hFXIII-A izopeptidáz aktivitása révén felgyorsíthatja a fibrinolízist (Mimuro és mtsai, 1986).

A fibrinháló lebontásának eredményeként fibrin degradációs termékek, a hFXIII-A által kialakított izopeptid kötések tartalmazó D-dimerek és a keresztkötött fibrin molekulák D-doménjei között lévő molekulaszakasz, az E-fragment jelenik meg a vérben (Sakata és Aoki, 1980). A D-dimerek a véralvadás mértékének markereként szolgálnak. Kereskedelmi forgalomban kaphatóak monoklonális D-dimer antitestek, amelyeket az *in vitro* diagnosztika alkalmaz, a vérrögeképződéssel járó betegségek detektálására vagy kizárására (Devine és Greenberg, 1988). A hFXIII-A azonban nem csak a hemosztázis fenntartásában játszik szerepet.

2.2.1.2. A hFXIII-A hemosztázison kívüli funkciói

2.2.1.2.1. A hFXIII-A szerepe a graviditás fenntartásában

A megtermékenyítéshez nincs szükség hFXIII-A-ra, viszont a terhesség fenntartásához nélkülözhetetlen, mégis a hFXIII-A és ennek következtében a heterotetramer koncentrációja és a hFXIII-A aktivitás is csökken a terhesség 5-8. hetéig, amíg a fokozatos csökkenés eléri a normál érték 50%-át (Coopland és mtsai, 1969). A csökkenés oka azonban nem ismert. Súlyos

hFXIII-A hiányos betegek esetében, helyettesítő terápia nélkül visszatérő vetélések figyelhetők meg az első trimeszterben. Homozigóta FXIII-A hiányos egér esetén a terhesség megvalósulhat, azonban a legtöbb esetben az egerek elpusztultak erős hüvelyi vérzés következtében **(Koseki-Kuno és mtsai, 2003)**. A hFXIII pontos szerepe a terhesség fenntartásában és a hFXIII-A hiányos betegek vetéléseinek okai nem ismertek.

2.2.1.2.2. A humán FXIII-A szerepe a sebgyógyulásban és az angiogenezisben

A hFXIII-A a sebgyógyulásban való szerepének legerősebb bizonyítéka, hogy a hFXIII-A hiányos betegek 14-36%-ánál rendellenes sebgyógyulás és hegesedés figyelhető meg **(Muszbek és mtsai, 2011)**. Rendellenes sebgyógyulást figyeltek meg olyan transzgén egerekben is, amelyeknek az egér FXIII-A azon exonja deletált, amely az aktív hely ciszteinjét kódolja **(Inbal és mtsai, 2005)**.

A hFXIII-A hozzájárulása a sebgyógyuláshoz és a szövetek helyreállításához sokoldalú. Stabilizálja a fibrin mátrix kialakulását és hozzájárul a vérrög összehúzódsához, csökkenti az erek áteresztő képességét a seb körül és csapdába ejti a belépő patogéneket azáltal, hogy hozzáköti őket az ideiglenes mátrixhoz. Sejtes elemek aggregációját követően azok keresztkötésével segíti a helyreállítást és beindítja az angiogénikus jelátvitelt. A hFXIII-A szubsztrátok között sok adhéziós, extracelluláris mátrix fehérje található, például a fibronectin, vitronectin, trombospondin, kollagén és von Willebrand faktor, amelyeket az enzim keresztköt a vérröghöz **(Muszbek és mtsai, 2011)** és serkenti a sejtek migrációját és kapcsolódásait **(Lanir és mtsai, 1988)**. A fibronectin keresztkötése a fibrin háléhoz növeli a fibroblasztok tapadását és migrációját **(Grinnell és mtsai, 1980)**. A szövetek helyreállításának és a sebgyógyulásnak fontos része az angiogenezis **(Soendergaard és mtsai, 2013)**. A hFXIII-A-nak közvetlen proangiogénikus hatása van az endotél sejtekre, azok migrációjának és osztódásának elősegítésével, míg az apoptózist akadályozza **(Dardik és mtsai, 2003)**.

2.2.1.2.3. A hFXIII-A szerepe az adipogenezisben

Egy genom szintű asszociációs tanulmányban azonosították a hFXIII-A-t elhízásért felelős génként **(Naukkarinen és mtsai, 2010)**. Kimutatták, hogy az adipociták differenciációja során a FXIII-A főként a fibronectin extracelluláris mátrix kialakításában vesz részt **(Myneni és mtsai, 2014)**, míg a TG2 az intracelluláris jelátvitelben játszik szerepet **(Myneni és mtsai, 2015)**.

2.2.1.2.4. Az hFXIII-A szerepe az immunrendszerben

A hFXIII-A részt vesz az immunválaszok modulálásában, sejtes és humorális szinten egyaránt. A hFXIII-A-t képes aktiválni a humán neutrofil elasztáz **(Bagoly és mtsai, 2007)**, amely jelentős lehet az érrendszeren kívüli gyulladás helyén **(Bagoly és mtsai, 2012)**. A fibrinhálóban granulocita proteázok lebontják a hFXIII-A-t ezáltal szabályozva annak hatását **(Bagoly és mtsai, 2007)**. Ezzel szemben, a hFXIII-A növeli a monociták proliferációját és migrációját és csökkenti a monociták apoptózisát **(Dardik és mtsai, 2007)**. A celluláris hFXIII-A funkciója a monocitákban és makrofágokban nem teljesen ismert, de szerepet játszhat a sejtek differenciációjában, mozgásában és fagocitózisában **(Bagoly és mtsai, 2012)**.

A fibrin háló maga is a veleszületett immunrendszer része, amely részt vesz a fertőzésekkel szembeni védelemben. Állványzatul szolgál a sejtek migrációjához, csapdába ejti és elpusztítja a baktériumokat, amelyeket a hFXIII-A keresztüköt a fibrin szálakhoz **(Loof és mtsai, 2011)**. Számos interakciót írtak le a hFXIII-A és a komplement rendszer tagjai között. Kimutatták, hogy a komplement C3-at a hFXIII-A beépíti a fibrin hálóba **(Howes és mtsai, 2012; Nikolajsen és mtsai, 2014; Richardson és mtsai, 2013)** ezáltal a fibrin szerkezete megváltozik, és ez meghosszabbítja a fibrinolízist **(Howes és mtsai, 2012; Richardson és mtsai, 2013)**.

2.2.1.2.5. A hFXIII-A szerepe a porcsejtek és csontsejtek differenciációjában

A transzglutaminázok szerepe a mineralizált szövetekben régóta ismert. Kondrocitákban és oszteoblasztokban a hFXIII-A mellett jelen van a hTG2 is. A transzglutamináz aktivitás fontos szerepet játszik az extracelluláris mátrix kialakításában, amely befolyásolja a további mátrix képződését és a sejtek differenciációját és mineralizációját. A celluláris hFXIII-A aktivációjának részletei és mechanizmusa nem ismert ezekben a sejtekben **(Al-Jallad és mtsai, 2006)**.

2.2.2. A hFXIII-A mint potenciális antikoaguláns terápia célpont

A hemosztázis folyamatában bekövetkező zavar, amely a véralvadás alul működésével jár vérzékenységet okozhat, míg a véralvadási folyamatok túlműködése trombózishoz vezethet. A hFXIII-A nélkülözhetetlen szerepet tölt be a hemosztázisban, és a hFXIII-A rendellenességek súlyos vérzési problémákat okozhatnak. Biokémiai kutatások kimutatták, hogy a véralvadásban betöltött szerepe mellett a hFXIII-A kulcs szabályzó molekulája a fibrinolízisnek, és az artériás és vénás trombózisok patológiájában is kimutatták a részvételét **(Muszbek és mtsai, 2008)**. A trombózis egy kritikus esemény az artériás betegségek esetében, amely miokardiális infarktust

és sztrókot valamint vénás thromboemoliás rendellenességeket okozhat. Daganatos betegek esetében a halál oka gyakran a mélyvénás trombózis **(Furie és Furie, 2008)**.

A nem kívánt vérrögök kialakulásának megelőzése céljából antikoaguláns gyógyszereket alkalmaznak. Ezeknek a terápiáknak célja, hogy megakadályozza a trombozist, a hemosztázis befolyásolása nélkül. Jelentős kutatások folytak olyan gyógyszer kifejlesztésének érdekében, amelyek a véralvadási faktorokat vagy a vérlemezke aktivációt célozzák, a trombozis, tüdőembólia és az akut koszorúér-szindrómák megelőzésének érdekében. Évtizedekig az egyedüli orálisan alkalmazható véralvadás gátló szerek a K-vitamin antagonisták voltak **(Stieler és mtsai, 2013)**. Csak nemrégiben váltak elérhetővé az új generációs közvetlen hatású orális antikoagulánsok, amelyek közvetlenül vagy indirekt módon, a FXa-on keresztül gátolják a trombin. Az új antikoaguláns szerek nagyobb kényelmet, biztonságot és azonos vagy jobb hatékonyságot ígérnek **(Garcia és mtsai, 2010)**. Ugyanakkor a trombin, aktivációs állapotától függően, elősegítheti vagy megakadályozhatja a véralvadást. A trombin aktivitására ható jelenleg elérhető antikoaguláns szerek azonban a trombozis gátlása mellett befolyásolják a hemosztázist és vérzést okozhatnak, ezáltal sok beteg esetében nem alkalmazhatóak **(Griffin, 1995)**. Még ma is nagy orvosi szükség van biztonságosabb terápiás lehetőségre. Jelenleg FXI-es és FXII-es véralvadási faktorokat célzó új antikoaguláns szerek fejlesztése van folyamatban, mivel ezek a faktorok a trombin aktiválása után hatnak, ezáltal kevésbé befolyásolják a hemosztázist. A hFXIII-A-t célzó kismolekulájú inhibitorokkal viszont idáig csak nagyon kevés in vivo farmakológiai tanulmányt végeztek **(Leidy és mtsai, 1990; Shebuski és mtsai, 1990)**. Ez meglepő, ugyanis a véralvadási faktorokon közvetlenül ható inhibitorok klinikai és kereskedelmi szempontból is nagyon vonzóak. Ezt talán az magyarázhatja, hogy a transzglutaminázok ellen a családtagok hasonlósága és szerteágazó biológiai funkciója miatt nehéz biztonságos gyógyszerként alkalmazható inhibitort fejleszteni, így a hFXIII-A egy elhanyagolt és nagy kihívást jelentő gyógyszer célpont jelölt **(Schroeder és Kohler, 2013)**. A hFXIII-A gátlása esetén nem áll fent vérzékenység, ugyanis sem a trombin szintet, sem a vérlemezke aktivációt nem befolyásolja. Nyúl modellben kimutatták, hogy a hFXIII-A gátlása nem hosszabbítja meg a vérzés idejét sem. A nem kívánt véralvadás gátlására ezáltal a hFXIII-A inhibitorok használata potenciális terápiás lehetőséget jelent. A Zedira GmbH kifejlesztett egy hFXIII-A gátlószert (ZED3197), amely potenciális gyógyszer molekula, de a klinikai tesztelése még nem kezdődött meg **(Pasternak és mtsai, 2020)**.

2.3. A transzglutamináz 4

2.3.1. A transzglutamináz 4 a rágcsálókban

2.3.1.1. A kopulációs dugó kialakítása

A kopulációs dugó képződését a rágcsálókban már 1847-ben leírták (**Leuckart, 1847**). A szemínális folyadék gyors koagulációjának eredménye a kopulációs dugó képződése a vaginában a közösülést követően. Néhány állatban, mint a szavasmarhákban, kutyákban, macskákban és más húsevőkben az ejakulált szemén szoba- vagy testhőmérsékleten tartva *in vitro* vagy a vaginában véglegesen folyékony állapotban marad. Sok rágcsálóban, vakondok, sündisznók, erszényes állatok és főemlősök esetében azonban az ondó megalvad, és kemény, rugalmas csomót képez, amely elzárja a hüvelyt a méhnyak közelében és több órán keresztül vagy akár napokig is ott marad. A rágcsálók szemínális plazmájának alvadása az ondóhólyagból származó bizonyos fehérjéknek a koaguláló mirigy által szekretált enzimek által katalizált koagulációjának ez eredménye. A koagulációt katalizáló enzimek a transzglutaminázok, és a kopulációs dugó extrém oldhatatlanságának oka a transzglutaminázok által kialakított N- ϵ (γ -glutamil)lizin keresztkötések a fehérjék oldalláncai között. Korábban a kopulációs dugó képzéséért felelős enzimet vezikuláznak nevezték el, majd később kiderült, hogy ez a patkány koaguláló mirigye által szekretált transzglutamináz, amelyet korábban az expresszió helye alapján prosztata transzglutamináznak neveztek, majd napjainkban a számozott nevezéktan elterjedésekor a transzglutamináz 4 nevet kapta (**Williams-Ashman, 1984; Williams-Ashman és mtsai, 1972**).

Az ondóhólyag és a koaguláló mirigy eltávolítása a rágcsálókban megakadályozza a kopulációs dugó formálódását, de ezzel együtt az alom mérete is csökken (**Pang és mtsai, 1979**). A TG4 szerepének fontosságát mutatja a rágcsálók szaporodásában, hogy a TG4 KO egerek nem képesek kopulációs dugó kialakítására. Ezek az egerek normális sperma számot, sperma motilitást és reprodukív morfológiát mutattak, viszont az ejakulátumnak csak nagyon kicsi része jut el a női reprodukív traktusba, amely arra enged következtetni, hogy a kopulációs dugó hiánya miatt az ejakulátum kifolyik. A spermiumok rossz migrációja a megtermékenyített oociták számának csökkenését vonja maga után. A TG4 hiányos hím egerek 28,5%-kal kevesebb oocitát termékenyítenek meg, mint a vad típusú egerek, azonban ez még ugyanúgy elegendő lehetne egy normál méretű alomhoz. Viszont a TG4 knockout hímekkel párosodott nőtény egerek jelentősen kisebb valószínűséggel szültek utódokat. Ez a megfigyelés arra utal,

hogy a kopulációs dugó a megtermékenyítés utáni eseményeket, mint a beágyazódást és a terhességet is befolyásolhatja (Dean, 2013).

A TG4 szerepének mértéke a kopulációs dugó kialakításában kérdéses. Az egér kopulációs dugó kialakításában főként az SVS I-III fehérjék vesznek részt, amelyek diszulfid hidakon keresztül képesek polimerizálódni. Ez magában is elegendő lehet a kopulációs dugó kialakításához, azonban a TG4 aktivitása révén sokkal rigidebb és tartósabb kopulációs dugó alakul ki, amely nagy előnyt jelenthet a spermiumok versengésében (Tseng és mtsai, 2012). Hart és Greenstein (1968) kimutatták, hogy a patkány, az egér és a hörcsög Cowper-féle mirigyének szekrétuma enyhén savas pH-n elegendő volt az ondófoladék koagulációjához, amely azt sugallja, hogy a TG4-től eltérő enzimek is részt vehetnek a kopulációs dugó kialakításában. Az is felmerült, hogy nőtények nemi traktusában jelenlévő fehérjék jelenléte is szükséges a kopulációs dugó kialakításához (Hartman, 1924).

2.3.1.2. A rágcsáló TG4 *in vitro* karakterizálása

A kopulációs dugó kapcsán, mivel a rágcsálók jó kísérleti állatnak bizonyultak az emlősök szaporodásának vizsgálatához, sokan tanulmányozták a rágcsáló TG4-et. A legnagyobb előrelépést az a felismerés jelentette, hogy a korábban vezikuláznak, vagy dorzális protein 1-nek nevezett enzim, amely a kopulációs dugó kialakításában vesz részt, egy transzglutamináz családtag. Az enzim részletes karakterizálását a patkány TG4 klónozása tette lehetővé.

Ho és munkatársai 1992-ben izolálták elsőként a TG4 cDNS-ét egy λ gt11 bakteriofág patkány koaguláló mirigy expressziós könyvtárból affinitás tisztított poliklonális antitesttel. A szekvenciák összehasonlítása során kiderült, hogy a patkány prosztata dorzális protein 1 szekvencia azonosságot mutat az akkor már ismert FXIII-A-val és a TG2-vel, valamint az aktív centrumban található aminosavak (GQCWVF) is megegyeznek a három transzglutamináz esetén. Emellett azt is felismerték, hogy a patkány dorzális protein 1 expressziója androgén függő volt, ugyanis 7 nappal a kasztrálást követően kb. 80%-kal csökkent az expressziója mRNS szinten (Ho és mtsai, 1992).

Seitz és munkatársai (1991) a patkány koaguláló mirigyének szekrétumából izolálták a TG4-et. Az izolált patkány enzim nem mutatott keresztreakciót a már ismert transzglutaminázokkal, így arra következtettek, hogy új izoformát azonosítottak. Megállapították, hogy a fehérje egy polipeptid láncból áll és a molekula tömege 65 kDa, valamint közel azonos számú glutamin és lizin aminosavak találhatóak benne. Az enzim poszttranszlációs módosításait is azonosították, leírták, hogy mannozil csoportokkal glikozilált,

emellett acil módosításokat és foszfinozitol horgonyt is azonosítottak. Az acil és a glikozil módosítások vagy a foszfatidil-inozitol horgony eltávolítása autoaggregációt és csökkent enzim aktivitást eredményezett (**Seitz és mtsai, 1991**).

A patkány koaguláló mirigyéből tisztított TG4 strukturális és biokémiai karakterizálását 1996-ban **Esposito és munkatársai** írták le. Fehérje alapon megerősítették, hogy a TG4 és a dorzális protein 1 aminosav szekvenciája megegyezik. A patkány TG4 N-terminális végén számos posztranszlációs módosítást azonosítottak. Tömegspektrometriai analízis segítségével kimutatták, hogy a 408. és a 488. Asn aminosavak az N-glikozilációs helyek, a magas mannóz tartalmú és a komplex típusú glikánok esetében is. Mioinozitol, és glicerinhoz kötött zsírsavakat is azonosítottak, amelyek megerősítik a korábban megfigyelt lipid horgony jelenlétét. A TG4 kalcium kötését is vizsgálták, és két erősen kötődő kalcium iont detektáltak molekulánként, amely tisztításkor is az enzimmel marad. Emellett a cink-ion hatását is vizsgálták, és azt találták, hogy koncentráció függő módon gátolja a TG4 transzamidáz aktivitását. Azt is megfigyelték, hogy a TG4 aktivitása alacsonyabb a már ismert transzglutaminázok esetében megfigyelt aktivitástól, viszont kb. 1,5 mM SDS jelenléte a reakcióban 11-szer magasabb TG4 aktivitást eredményez. Már 0,1 mM SDS koncentráció is növelte az aktivitást, amely 1,5 mM SDS koncentrációnál maximálódott, ettől magasabb koncentrációban már gátló hatás volt megfigyelhető. A tengerimalac TG2 esetében pedig a legkisebb SDS koncentráció is gátolta az enzim aktivitását. Fiziológias SDS analógok hatását is tesztelték a TG4 aktivitására, azonban sem a nátrium-laurát, sem a mirisztát esetében nem volt megfigyelhető ez a hatás. Ez alapján a kutatócsoport arra következtetett, hogy az SDS molekulának a poláris része lehet a felelős a TG4 aktivitásának serkentésért. Elsőként tojás sárgából kivont foszfatidil-kolinból foszfolipáz D-vel hidrolizált foszfatidsavval próbálkoztak, amely szintén növelte a TG4 aktivitását, viszont a TG2-öt gátolta. Ezt követően többféle foszfatidsavat kipróbáltak, laurinsavat, mirisztinsavat, palmitinsavat, sztearinsavat, vagy olajsavakat, de a leghatásosabbnak a dilauril-foszfatidsav bizonyult. A glicerolfoszfát, a glicerín, és az ortofoszfát alkalmazásakor nem volt megfigyelhető a TG4 aktivitásának emelkedése. Viszont a foszfatidsavhoz kapcsolt etanolamin, kolin és szerin gátolta az enzim aktivitását (**Esposito és mtsai, 1996**). Ezt követően kimutatták, hogy a TG4 aktivációja az SDS által a fehérjéhez kapcsolódó lipid részek révén valósul meg, amely felületaktív anyaggal közösen micellát képez. Ezáltal feltételezhető, hogy a TG4 egy membránfehérje, amelynek lipid horgonyra van szüksége a működéshez (**Esposito és mtsai, 1999**).

A TG2 esetében ismert, hogy GTP-kötő és hidrolizáló aktivitással bír, emellett a GTP gátolja a TG2 keresztköti aktivitását. **Spina és munkatársai (1999)** GTP-agaróz segítségével tisztították a TG4-et a patkány koaguláló mirigyének szekrétumából. Amellett, hogy a patkány TG4 kötődik a GTP-hez, a GTP gátolja is az enzim kalcium-függő transzamidáz aktivitását. Később ez a kutatócsoport MDCK sejtekben (Madin-Darby kutya vese sejtek), megtermelte a patkány TG4-et teljes méretben és deléciós mutáns formájában is. Az MDCK sejtekben nem detektálható TG2, és nem rendelkeznek klasszikus szekretórikus útvonallal. A deléciós mutáns esetében a TG4 N-terminális részének 103 aminosava hiányzott. GTP-affinitás kromatográfiával kimutatták, hogy az enzim N-terminális vége felelős a GTP kötésért. Az MDCK sejtekben termelt TG4 nem szekretálódott a sejtek médiumába, emellett MDCK sejtextraktum jelenléte a reakcióban gátolta a TG4 aktivitását. Feltételezték, hogy a különbségek oka a poszttranszlációs különbségekben kereshető. A patkány enzim esetében korábban azonosított lipid horgony, a terminális mannózok és a galaktozil- $\beta(1,4)$ N-acetilglükozamin a sejtek által termelt fehérje esetén nem volt detektálható (**Mariniello és mtsai, 2003**).

2.3.2. A humán transzglutamináz 4 biológiai szerepe

2.3.2.1. A transzglutamináz 4 előfordulása az emberi szervezetben

A hTG4-et elsőként **Grant és munkatársai (1994)** fedezték fel a humán prosztata cDNS könyvtárból. 679 aminosav hosszúságú, nyílt olvasási keretben 2037 nukleotid kódolja. 42% szekvencia homológiát mutat a TG2-vel és a FXIII-A-val, és kb. 50 %-os hasonlóságot mutat a patkány TG4 enzimmel, amelyet két évvel korábban azonosítottak (**Ho és mtsai, 1992**). A TGM4 gén a 3p21.33-p22-es kromoszómán található, egyedüli transzglutaminázként ezen a kromoszómán. A gén 35 kb hosszúságú és 13 exon és 12 intron alkotja (**Gentile és mtsai 1995**).

A rágcsáló TG4-gyel szemben a hTG4 fiziológiás funkciója kevésbé ismert. Jelentős mennyiségben csak a prosztatában expresszálódik, amelyet **Dubbink és munkatársai** figyeltek meg elsőként 1998-ben. Humán TG4 ellenes szérummal vizsgáltak prosztata folyadékokat és szöveteket. Ezekben egy kb. 77 kDa méretű fehérjét detektáltak Western blottal, és azt is megfigyelték, hogy az egyének között nagy eltérés mutatkozott a fehérje mennyiségében. Ma már azonban a prosztatán kívül több helyen is azonosították a hTG4-et a humán szervezetben. **Hogan és munkatársai (2014)** az emberi vizelet glomeruláris membrán vezikuláinak tömegspektrometriás analízise során detektálták, **Perez Alea és munkatársai (2013)** pedig nyálban található transzglutaminázok között Western blot analízissel azonosították a hTG4-et.

A hTG4 a nyálban nem csak teljes méretben, de egy kb. 55 kDa méretű fragment formájában is detektálható. Emellett a hTG4 előfordul még hasnyálmirigy sejtekben is (Protein Atlas). Patkány és egér aorta és véna cava szövet homogenizátumokat Western blottal vizsgáltak, és a TG2 mellett TG1-et és TG4-et detektáltak (**Johnson és mtsai, 2012**). Az irodalomban azonban eddig nincs arra vonatkozó adat, hogy a TG4 humán aorta és véna cava szövetekben is jelen lenne.

Nem prosztatata eredetű, húgyhólyag, tüdő és kolorektális daganat sejtek esetén is hTG4 pozitivitás figyelhető meg (**Davies és mtsai, 2007**). Melldaganat szövetek szintén expresszálják bizonyos mennyiségű hTG4-et mRNA szinten (**Jiang és Ablin, 2011**). Több prosztatata sejtvonalat vizsgálva, különböző TG4 transzkriptek expressziója figyelhető meg normáltól a malignus sejtvonalakon keresztül, a malignus sejtvonalakon belül pedig az agresszív és nem agresszív sejtvonalakban egyaránt (**Davies és mtsai, 2007**).

2.3.2.2. A humán TG4 immunológiai szerepe

A férfi ivarsejt antigén sajátja jól ismert. Az emlős spermiumok immunogenitásának oka a felszínükön található sokféle allo- és autoantigén, mint például a fő hisztonkompatibilitási rendszer fehérjéi. A női reprodukciós szakasról is ismert, hogy sejtközvetített és humorális immunválaszra egyaránt képes (**Metafora és mtsai, 1989**). A női nemi traktusban a spermiumok alloantigénjeinek immunreakciót kellene kiváltania a nőkben, amely a spermiumok súlyos immunológiai károsodását okozná. Azonban a természet kifejlesztett mechanizmusokat, amelyek megakadályozzák az immunreakciót a sperma antigénnel szemben, így a spermiumok túlélhetnek a megtermékenyítésig. Feltételezhetően a spermaplazmában és a méhben található faktorok fontos szerepet játszanak a spermiumok immunvédelmében a női nemi traktusban. Ezt alátámasztják a spermaplazmában található faktorok immunszuppresszív tulajdonságai, amelyek minimalizálhatják az immunválaszokat és lehetővé tehetik a spermiumok túlélését a női nemi traktusban. Ezek a faktorok gátolhatják az immunválaszt a spermiumok antigénjeinek maszkírozásával vagy közvetlenül akadályozhatják az immun kompetens sejteket (**Peluso és mtsai, 1994**). Az uteroglobin (nyúl) és a SV-IV (patkány) (ondóhólyag fehérje 4) fehérjék nagy mennyiségben vannak jelen a méhben és a nyulak és patkányok ondófolyadékában, erős, nem specifikus immunszuppresszív és antiinflammatorikus, antikemotaktikus és antifagocita hatásuk van. Az uteroglobin és az SV-IV foszfolipáz A₂ gátló hatása megmagyarázhatja azok antiinflammatorikus hatását. A makrofágok és T limfociták a lehetséges célpontjai e fehérjék immunszuppresszív hatásának

(Peluso és mtsai, 1994). Kimutatták, hogy az uteroglobulin transzglutamináz (hFXIII-A) jelenlétében nagymértékben csökkenti a nyúl blasztociták és a spermiumok immunogenitását *in vitro*. Az uteroglobulin egy nyúl fehérje, viszont az emberben akár egy másik fehérje is elláthatja ezt a feladatot. Mukherjee és munkatársai (1983) a béta-2-mikroglobulint említik, amely jelen van mind a női és a férfi reproduktív szervekben, és transzglutamináz szubsztrátként elláthatja ezt a feladatot. Kísérleti eredmények azt mutatják, hogy az SV-IV fehérje képes kötődni a patkány epididimális spermiumok membránjához monomer vagy transzglutamináz indukált polimer formában. Paonessa és munkatársai (1984) kimutatták, hogy a tengerimalac transzglutamináz képes patkány hímivarsejtek felszínén található fehérjék oldalláncaiba beépíteni a spermidint. Peluso és munkatársai (1994) az SV-IV patkány spermiumok immunogenitására gyakorolt hatását vizsgálták transzglutamináz nélkül és annak jelenlétében *in vivo* és *in vitro*. Az SV-IV a transzglutamináz jelenlétében csökkenti a spermiumok immunogenitását és akadályozza a spermiumok fagocitózist. Ezeknél a kísérleteknél tengerimalac transzglutaminázt alkalmaztak (Peluso és mtsai, 1994).

Az 1-es típusú autoimmun poliendokrin szindróma (APS1), egy monogénes rendellenesség, amelyet az AIRE gén mutációi okoznak (Ahonen és mtsai, 1990). Az APS1-ben szenvedő nők és férfiak körében gyakori a meddség. A nők esetében az autoimmun petefészek elégtelenség magyarázat a meddségre, azonban a férfiak meddségét okozó mechanizmus nem igazán volt ismert. Proteom szintű autoantitest szűrést végeztek az APS1-es férfiak és nők szérumában, a férfi reproduktív szervek elleni autoimmun válasz feltárásához. A nemek közötti autoimmun antitestek jeleiben mutatkozó különbségek alapján a férfiakban antigénként azonosították a TG4-et. A legtöbb felnőtt férfi beteg esetében detektálták a TG4 ellenes autoantitesteket, azonban fiatal férfiak esetében nem. Megállapították, hogy az első TG4 ellenes antitestek a pubertás korban jelentek meg, a prosztatata érésével egy időben. Az Aire fehérje hiányos hím egerekben a TG4 ellenes immunitás destruktív prostatagyulladásal és károsodott TG4 szekréciójával járt (Landegren és mtsai, 2015).

2.3.2.3. A kopulációs dugó kialakításában részt vevő fehérjék evolúciós változása

Több anatómiai tulajdonság is összefüggésben van a főemlősök párzási szokásaival. A szemén koaguláció foka és a kopulációs dugó képződése szintén összefüggésben van a főemlősök promiszkuításával (Dixson és Anderson, 2002).

A fő ondóhólyag által az emberi spermába szekretált fehérjék a szeménogelin I és II, nem kovalens kölcsönhatásokat alakítanak ki diszulfid hidak révén, az ejakuláció során alvadék

képzéséhez. Az emberek esetében is jelen van a hTG4 a prosztatában (**Dubbink és mtsai, 1996**), és a humán sperma rendelkezik transzglutamináz aktivitással (**Porta és mtsai, 1986**). Azonban a koagulátum pár perc után elfolyósodik a prosztata szerin proteáz, prosztata-specifikus antigén (PSA) hatására. A szemogelin I-ről és II-ről kimutatták, hogy a hFXIII-A szubsztrátjai. A szemogelin PSA-val történő emésztését követően a hFXIII-A képes volt a fragmentekből keresztkötött komplexeket képezni, viszont a hFXIII-A által keresztkötött szemogelint a PSA nem volt képes hasítani (**Peter és mtsai, 1998**). Az egér TG4-ről kimutatták, hogy az SVS I fehérje F2 fragmentjét (79-259 aminosav) képes glutamin donorként használni, azonban a TG2 nem preferálja ezt a szekvenciát. Viszont az SVS I reaktív glutaminjai (Q232, Q254) a fehérje humán ortológjai esetében Arg-re és His-re változtak, tehát már nincsenek jelen (**Tseng és mtsai, 2009**).

Elképzelhető, hogy az emberek párzási stratégiájából kifolyólag, a spermaversengés hiányában a kopulációs dugóban részt vevő fehérjék olyan evolúciós változáson mentek keresztül, amely révén elvesztették a kopulációs dugó kialakításához köthető funkciójukat. Az a megfigyelés, hogy a hFXIII-A által keresztkötött szemogelin I-et és II-öt a PSA nem képes hasítani, arra enged következtetni, hogy a TG4 általi SVS fehérjék keresztkötése esetén a humán sperma nem tudna elfolyósodni. *In vivo* a szemogelinek keresztkötése nem figyelhető meg úgy, mint a rágcsálók esetében. A kopulációs dugó kialakításában részt vevő géneknek az adaptív evolúciójában a spermiumversengés volt az irányító tényező. Az emberek esetében valószínűleg nem gyakran fordul elő spermiumversengés, mivel a legtöbb humán társadalomban monogámia vagy poligámia a jellemző (**Carnahan és Jensen-Seaman, 2008**). A humán TGM4 és a F13A1 a transzglutamináz enzimcsaládon belül és más génekhez viszonyítva is magas mutációs rátával rendelkezik, és a leggyakoribb nem szinonim egyedi nukleotid variációk allél frekvenciája a TG4 esetében a legmagasabb (**Thangaraju és mtsai, 2017**). Ez arra utal, hogy a TG4 evolúciós nyomása a többi transzglutaminázhoz képest alacsonyabb.

2.3.2.4. A hTG4 expressziója egészséges vagy malignus prosztata szövetekben

Prosztatadaganat sejtekben a hTG4 expressziójának változása kapcsán számos ellentmondásos adat található az irodalomban. 1999-ben két tanulmány is megjelent a TG4 expressziójának csökkenéséről prosztatadaganat sejtekben. **Dubbink és munkatársai (1999)** humán TG4 ellenes szérummal vizsgáltak prosztata folyadékokat és szöveteket. Ezekben egy 77 kDa méretű fehérjét detektáltak Western blottal, és az egyének között nagy eltérés mutatkozott. A TG4 expresszió alkalmanként megfigyelhető volt magas fokú prosztata

intraepitéliális neopláziában, amely a prosztatadaganatok legkezdetlegesebb formája, de nem volt kimutatható prosztata karcinóma sejtekben **(Dubbink és mtsai, 1999)**.

An és munkatársai (1999) szintén kimutatták, hogy a normál prosztata szövetek TG4 pozitivitást mutatnak. Azonban prosztata tumor szövetekben a pozitivitás mértéke csökkent, és szövet esetében minél nagyobb Gleason-pontszámú (minél magasabb, annál nagyobb valószínűséggel lesz invazív a tumor) szöveteket vizsgáltak, annál kisebb TG4 expressziót figyeltek meg. Ez a tanulmány továbbá kimutatta, hogy a prosztatadaganatból származó metasztatikus tumorok alacsony mértékű TG4 expressziót mutatnak.

Majd a hTG4 mRNS expressziójának vizsgálatakor kimutatták, hogy az enzim expressziója humán prosztatadaganatokban magasabb, mint az egészséges prosztata szövetekben, és emellett szintén emelkedett magas Gleason pontszámú tumorok esetén is (>7) **(Jiang és Ablin, 2011)**.

Később alternatív TG4 splicing variánsokat is azonosítottak. RT-PCR és nukleotid szekvencia analízist alkalmazva 4 alternatív splicing variánst találtak: TG4-L, -M1, M2 és S. 80 jó indulatú és 48 malignus prosztata szövet vizsgálatakor, az S és az M variánsokat minden tesztelt prosztata szövetben megtalálták. Az L variánst azonban a jóindulatú minták 56%-a expresszálta, míg a malignus mintáknak csak a 15%-a. Ez arra utalhat, hogy a TG4 alternatív splicingjának eltolódása összefüggésben lehet a prosztatadaganat kialakulásával **(Cho és mtsai, 2010)**.

Ezt követően **Shaikhibrahim és munkatársai (2011)** RT-PCR analízissel hasonlították össze mérsékelt vagy rosszul differenciált prosztata karcinóma mirigyek és normál mirigyek TG4 génexpresszióját. Ők azt találták, hogy a normál mirigyekhez képest a TG4 expressziója lecsökkent a mérsékelt vagy rosszul differenciált prosztata karcinóma mirigyekben.

Lopez-Bujanda és munkatársai (2021) ezzel szemben leírták, hogy a „The Cancer Genom Atlas” alapján a TG4 expressziója a primer prosztatadaganatok esetében volt a legmagasabb, más humán daganattípusokkal összehasonlítva. A TG4 expressziója primer tumorok esetében összefüggést mutat a betegség progressziójával. Azok a betegeknek, akiknek a primer daganatában magas TG4 expresszió van jelen, jelentősen csökken a túlélési idejük. A TG4 expresszió olyan prosztata tumorok esetén magas, amelyek a prosztata lumenális epitél sejtjeiből indul. Ezekben a daganatokban a TG4 potenciális kemoterápiás célpont lehet **(Lopez-Bujanda és mtsai, 2021)**.

A TG4 expresszióját prosztatadaganatok esetében nem csak szövetek vizsgálatával, de a szeminális plazma és a vizelet vezikuláinak analízisével is vizsgálták. 67 egészséges és 152 prosztatadaganatos beteg biopsziával rendelkező egyének spermaplazmájának a vizsgálatokor azonosították a TG4-et, amellyel megjósolták a biopsziák eredményeit a betegek korával és a szérumban prosztata specifikus antigénnel összefüggésben. A TG4 fehérje mennyisége 3,7-szer volt magasabb azokban a prosztatadaganatos biopsziákban, amelyek legalább 50 éves betegektől származtak, és a szérumban PSA szintjük legalább 4 ng/ml volt. A vérszérumban nagyon alacsony mennyiségű TG4 (120 pg/ml) volt detektálható **(Drabovich és mtsai, 2019)**. Ugyanakkor, prosztatadaganatokból származó vizelet vezikulákban a TG4 expressziója 1,7-szer alacsonyabb volt **(Sequeiros és mtsai, 2017)**.

2.3.2.5. A hTG4 szerepe a prosztatadaganat sejtvonalakban

TG4 pozitív humán prosztatadaganat sejtvonalon, a CA-HPV-10 sejtekben csendesítették a hTG4 expresszióját **(Davies és mtsai, 2007)**. Ezt a sejtmodellt használva, kimutatták, hogy a TG4 hiánya az *in vitro* invazivitást nagymértékben csökkentette. Ezzel ellentétben, egy hTG4 negatív sejtvonalon, a PC-3-ban a hTG4 túltermelése jelentős emelkedést okozott a sejtek invazivitásában *in vitro* **(Jiang és mtsai, 2010)**. Összességében ezek a tanulmányok kimutatták, hogy a hTG4 magas szintje a prosztatadaganat sejtek emelkedett invazivitásával van összefüggésben. Más tanulmányok azt is kimutatták, hogy a hTG4-nek szerepe van a sejtek migrációjában, a sejtmembránok mikromozgásaiban és a sejtek adhéziójában **(Jiang és mtsai, 2007; Jiang és Ablin, 2011)**.

Az epitéliális-mezenchimális átmenet (EMT) egy fontos biológiai folyamat a daganatok kialakulása és fejlődése esetén is **(Iwatsuki és mtsai, 2010)**. Petefészek rák esetében kimutatták, hogy a hTG2 magas szintje EMT-et indukál, amelyet kadherin váltás jellemzett és az invazivitás jellemzői is megjelentek **(Shao és mtsai, 2009)**. A hTG4-nek szintén van hatása az EMT-re prosztatadaganat esetén **(Ablin és Jiang, 2011)**. Rekombináns hTG4 hozzáadása vagy a hTG4 túltermelése prosztatadaganat sejtekben az E-kadherin csökkenéséhez vezetett és a mesenchimális jellemzők kerültek előtérbe az epitéliális jellemzőkkel szemben. Valamit a sejtek motilitása is növekedett **(Ablin és mtsai, 2017)**.

A keringő daganatsejtek és az érrendszer interakciója kritikus esemény a daganatsejtek terjedésében **(Nicolson és mtsai, 1976)**. Ez az esemény teremti meg a lehetőséget a metastatikus daganat sejteknek a túlélésre **(Iizumi és mtsai, 2007)**. A PC-3 prosztatadaganat sejtekben a hTG4 túltermelése növelte az adhéziós képességüket mind a nyugalmi állapotban

lévő és az aktivált endotél sejtekhez. Ezzel szemben, a CA-HPV-10 prosztata daganat sejtek esetében, ahol magas a hTG4 expressziója, a sejtek adhéziója az endotél sejtekhez lecsökkent miután a hTG4 termelést kiütötték. Kimutatták, hogy a hTG4 túltermelése a PC-3 sejtek migrációját is megnövelte. A tanulmány azt is kimutatta, hogy a hTG4 expressziója az sejtek endotéliális interakcióit a ROCK útvonal kikerülése mellett változtatta meg. A hTG4 fontos szerepet játszhat az endotél és prosztata daganat sejtek közötti interakcióban, és ez a hatás a ROCK útvonaltól független **(Jiang és mtsai, 2009)**.

Kimutatták, hogy a hTG4 a prosztata daganat sejtekben interakcióba lép az IL-24-gyel. Az IL-24 eredetileg daganatsejtekben volt azonosítva, és melanóma sejtekben felszabályozódik **(Emdad és mtsai, 2009)**. Az IL-24 túltermelése daganat sejtekben növekedés gátlónak bizonyult. IL-24 egy differenciáció, növekedés és apoptózis asszociált gén, különböző humán daganatok esetében lehetséges terápiás szer. Az IL-24 a sejtekben receptora, és receptor komplexei révén hat. Limitált információ áll rendelkezésre az IL-24 prosztata daganatos sejtekre kifejtett hatásáról. Az IL-24 adenovirális vektor indukált expressziója prosztata daganat sejtekben a növekedés kis fokú gátlását és apoptózis indukálását eredményezte, amely valószínűleg a sejt ciklusban bekövetkező változásokhoz köthető **(Saito és mtsai, 2005)**. A hTG4 azonban képes antagonizálni az IL-24 hatását prosztata daganat sejtekben. Ez alapján úgy tűnik a hTG4 hatással van az IL-24 indukált sejt növekedésre és migrációra a prosztata daganat sejtekben **(Ablin és mtsai, 2011)**.

A RON fehérje a receptor-típusú protein tirozin kináz családba tartozik **(Ronsin és mtsai, 1993)**. Aktivációja esetén különböző szignál útvonalak aktiválódnak, amelyek specifikus sejtes eseményekhez vezetnek (pl.: PI3-K/AKT növekedés és túlélés) **(Welm és mtsai, 2007)**. A RON túltermelődik mell, kolorektális, tüdő és vese daganatokban, valamint pontmutációi és túltermelődése metasztázis kialakulásához vezethet. Ezt a fehérjét a hTG4 kötődési partnerként is azonosították és azt találták, hogy a hTG4 együttműködik a RON-nal prosztata daganatos sejtek migrációjának növelésében, amikor a sejtek a hTG4-et és a RON-t egyszerre expresszálják **(Jiang és mtsai, 2010)**.

3. Célkitűzések

A hFXIII-A aktivitásának mérése alapvető fontosságú, valamint az enzim gátlása potenciális trombózis terápiás célpont lehet. Az enzim izopeptidáz aktivitásának mérése és különböző inhibitorok, vagy mutánsok biológiailag releváns tanulmányozásához fehérje szubsztrátok használata lenne célszerű.

Így az alábbi célokat tűztük ki a hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának vizsgálatokor:

- a hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának tesztelése izopeptid kötéseket tartalmazó fibrin degradációs termékeken, az izopeptid kötésekre specifikus antitest használatával.
- hFXIII-A szubsztrátok, inhibitorok és mutánsok tesztelésére alkalmas fehérje-peptid alapú kinetikus módszer fejlesztése.

Az egyik legkevésbé tanulmányozott humán transzglutamináz izoforma, a hTG4. A hTG4 emberi szervezetben betöltött fiziológiás szerepére csak a rágcsáló TG4 kapcsán közölt adatokból következtethetünk. A hTG4 megtalálható a nyálban is, azonban az itt betöltött biológiai szerepét nem ismerjük. A humán TG4 enzimológiai és biokémiai sajátosságairól is alig áll rendelkezésére információ.

Ezért célul tűztük ki a humán TG4 biokémiai karakterizálását:

- a hTG4 transzamidáz aktivitásának és szabályozásának vizsgálatát.
- a hTG4 nyálban betöltött biológiai szerepének feltárásához a hTG4 szubsztrátjainak és interakciós partnereinek azonosítását.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Reagensek

Kísérleteinkhez szükséges vegyszereket az esetek többségében a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, Mo, USA) szereztük be. Ettől eltérő esetekben zárójelben tüntettük fel a gyártó vagy a forgalmazó nevét.

4.2 Alkalmazott sejtvonalak

Kísérleteinkhez AD-293 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) , FT293 (Thermo Fisher Scientific, Walltham, MA, USA), Panc-1 és RWPE-1 (CRL-11609, ATCC) sejteket használtunk. A sejteket 37°C-os inkubátorban, 5% CO₂ taralom mellett tenyésztettük. Az AD-293, 293FT és Panc-1 (ATCC, CRL-1469) sejteket Dulbecco's modified Eagle's médiumban tartottuk fent, amelyet 1 unit/ml penicillinnel és 0,1 mg/ml sztreptomicinnel, 1 mM piruváttal, 4 mM glutaminnal és 10 (v/v) % hőinaktivált magzati marha szérummal (FBS, Thermo Fisher Scientific, Walltham, MA, USA) egészítettünk ki. A PC-3 (CRL-1435, ATCC,) sejteket Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham médiumban növesztettük, amelyet 1 unit/ml penicillinnel és 0,1 mg/ml sztreptomicinnel, 2 mM glutaminnal és 10 (v/v) % FBS-sel (Thermo Fisher Scientific) egészítettünk ki. Az RWPE-1 sejteket szérum-mentes keratinocita médiumban (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) tartottuk fent és 0,05 mg/ml marha agyalapi mirigy kivonattal és 5 ng/ml humán rekombináns EGF fehérjével egészítettük ki.

4.3 Western blot analízisek és az alkalmazott antitestek

A Western blot analíziseket általános protokoll alapján végeztük. A nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) 10%-os Tris-glicin gélben végeztük, amelyet blottolás követett, Bio-Rad Trans-blot SD Semi-dry Transfer Cell készülékkel. A membrán blokkolásához 5 (m/v) % alacsony zsírtartalmú tejjel kiegészített TTBS puffert (0,1 (v/v) % Tween-20 TBS pufferben) használtunk 60 percig szobahőn, vagy egy éjszakán át 4°C-on. Az antitesteket 0,5 (m/v) %-os alacsony zsírtartalmú tejporthoz tartalmazó TTBS pufferben hígítottuk. Végül, a jel előhívásához WesternBright ECL HRP szubsztrátot (Advansta) használtunk.

2. táblázat A Western blot analízisekhez alkalmazott elsődleges antitestek

Név	Típus	Faj	Hígítás	Forgalmazó	Katalógus szám
DD-XLink-mab	monoklonális	egér	1/7500	Zedira GmbH	A076
anti-hTG3	poliklonális	nyúl	1/2000	Zedira GmbH	A015
anti-His ₆ /HRP	monoklonális	egér	1/20000	Sigma	A7058
anti-hTG4	monoklonális	egér	1/2500	Covalab	mab0113
anti-Flag M2	monoklonális	egér	1/2000	Sigma	F1804
Streptavidin/HRP	-	marha	1/2500	BioLegend	405210

4.4 Fehérje termelés és tisztítás

Az S100A4(GST) és a rekombináns humán TG2 termelése és tisztítása a korábban leírt módon történt (Thangaraju és mtsai, 2016).

A rekombináns humán TG4 enzim termeléséhez a TG4-et kódoló cDNS-t (Uniprot kód: P49221) pBH4 bakteriális expressziós vektorba szubklónoztuk, a pDNR-LIB vektor N terminális His₆-tagével megegyező leolvasási keretbe, NdeI és XhoI restrikciós helyeket használva (IMAGE klón: 3950865). A megfelelő inzerciót restrikciós analízissel és szekvenálással (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Németország) ellenőriztük. A humán rekombináns TG4-et *E. coli* BL21 (DE3) pLysS baktériumsejtekben expresszáltuk, Terrific Broth (TB) táptalajban. Az *E. coli* BL21 (DE3) pLysS használatával egy szigorúan szabályozott expressziót érhetünk el, mivel a pLysS törzsek T7 lizozimot termelnek, amely gátolja a T7 RNS polimeráz expresszióját az indukciót megelőzően. Nagy mennyiségű termeléshez húszszoros hígításban oltottunk le éjszakai kultúrával 4,8 liter TB tápfolyadékot és a sejteket 30°C-on növesztettük, OD₆₀₀=0.6 érték eléréséig. A fehérje expressziót 18°C-on indukáltuk, 0,2 mM izopropil-β-D-thiogalaktopiranozid jelenlétében 16-20 órán keresztül. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (6000 g, 10 min, 4°C) majd a pelletet Talon lízis pufferben (Talon kötő puffer: 50 mM foszfát puffer pH 7,6; 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, kiegészítve 1 mM PMSF-fel és 10% glicerinnel) szuszpendáltuk fel. Szonikálást és centrifugálást követően (25000 g, 1 óra, 4°C) Talon Metal Affinity Resin-t (Takara Bio, USA, Inc., San Jose, CA, USA) adtunk a felülúszóhoz. 1 órás, 4 °C-os inkubálást követően a gélt Talon pufferrel mostuk. A fehérjék eluálásához 150 mM imidazol tartalmú Talon puffert használtunk, majd a puffert A pufferre (50 mM Tris, pH 7,6, 0,5 mM EDTA, 15% (v/v) glicerin) cseréltük, Amicon Ultra 50 kDa centrifugális koncentratorszűrő (Merck, Darmstadt,

Németország) segítségével. Ioncserélő kromatográfiához HiTrapQ HP oszlopot használtunk (GE Amersham, Buckinghamshire, UK), a fehérjék eluálásához A pufferből és B pufferből (1 M NaCl-ot tartalmazó A puffer) előállított gradiens segítségével növekvő sókoncentrációt alkalmaztunk. A fehérje koncentrációkat Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate-tal (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) határoztuk meg. A rekombináns hTG4 tisztaságát (>90%) Coomassie festéssel és Western blottal ellenőriztük.

A biotinizálható hTG4 expressziójához a hTG4 cDNS-ét (Uniprot kód: P49221) KpnI és XhoI restrikciós helyeket használva (IMAGE klón: 3950865) pET30-Navi bakteriális expressziós vektorba szubklónoztuk, ebben az esetben is a pDNR-LIB vektor N terminális His6-tagével megegyező leolvasási keretben. A megfelelő inzerciót restrikciós analízissel és szekvenálással (Eurofins Genomics) ellenőriztük. A biotinizálható hTG4 (Navi hTG4) termelése és tisztítása a hTG4 esetén leírt módon történt, egyetlen különbséggel. Ebben az esetben bakteriális expresszióhoz a *Rosetta 2 DE3 pLysS* törzset használtuk, amely a *BL21 DE3 pLysS* törzstől annyiban tér el, hogy kódol 7 bakteriális sejtekben ritka eukarióta tRNS-t. A biotinizálást BirA ligázzal végeztük, majd a be nem épült biotint dialízissel távolítottuk el, amelyhez Spectra/Por 1 Dialysis Membrane Standard RC Tuning-ot (MWCO 6-8 kDa) (Spectrum Laboratories, Inc. Rancho Dominguez, CA, USA) használtunk.

4.5 Transzglutamináz aktivitásmérések

4.5.1. A hFXIII-A és hTG2 aktivitásának kinetikus mérése anizotrópia változás alapján

A transzglutaminázok keresztkötő aktivitásának méréséhez egy **Kenniston és mtsai (2013)** által leírt módszer elvét használtuk, de a szubsztrátok lecserélésével javítottuk a módszer érzékenységét (**Thangaraju és mtsai, 2016**). 5 nM hTG2 vagy hFXIII-A és 100 nM FLpepT26 (5FAM-HQSYVDPWMLDH-NH₂) vagy FLpepPI2 (5FAM-NQEQVSPLTLLK-NH₂) volt inkubálva 5 μM S100A4(GST) fehérjével HEPES transzamidáz pufferben (20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM dithiothreitol (DTT), 0,01 (v/v) % Tween-20). Az izopeptidáz reakciók esetében 380 nM FLpepT26-S100A4(GST) vagy 259,5 nM FLpepPI2-S100A4(GST) keresztkötött szubsztrátot alkalmaztunk MOPS izopeptidáz pufferben (20 mM MOPS pH 6,8, 100 mM NaCl, 6 mM glicin metil észter, 3 mM DTT, 0,1% polietilén-glikol 8000) különböző koncentrációjú hTG2 vagy hFXIII-A (Zedira GmbH, T027) jelenlétében. A negatív kontroll reakciók 10 mM EDTA-t és 2 mM jódetamidot (IA), a mérési reakciók pedig 5 mM Ca²⁺-t tartalmaztak. Normál humán plazma minták 10-szeres hígításban voltak alkalmazva, 2 mM GPRP peptid (Cayman Europe; Tallin, Estonia) és 5 mg/ml polibrén jelenlétében. A ZED1301

helyspecifikus FXIII-A inhibitort a Zedira GmbH cégtől rendeltük. A teljes reakció elegyek térfogata 35 μ l volt és a méréshez Untreated Polystyrene Black Microplate-eket (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Denmark, catalog # 262260) használtunk. A FXIII-A reakciói esetén a reakció elegy 500 mU trombint is tartalmazott. A reakciók indítása az enzimek hozzáadásával történt és 37°C-on zajlott, a fluoreszcencia polarizáció változást a Synergy H1 microplate olvasóval (zöld fluoreszcencia polarizációs filter egység, Ex: 485 nm, Em: 528 nm, erősítés a transzamidáz mérések esetében: 75, az izopeptidáz mérések esetében 63; BioTek, Winooski, VT USA) detektáltuk. A reakció sebességek a percenkénti anizotrópia változás alapján lettek meghatározva, amelyet a hTG2 esetén a kinetikus görbe kezdeti, közel lineáris szakaszának meredekségéből számoltunk, míg a hFXIII-A esetén a kinetikus görbe késleltető fázisát (kb. a reakció 4. percéig) követő, közel lineáris szakaszának meredekségéből.

A reakciókat a fluoreszcencia polarizáció változás mérését követően hatszoros denaturáló (6xdenaturáló) pufferrel (300 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,43 M β -merkaptoetanol, 12 (m/v)% SDS, 20 (v/v)% glicerin, 0,06 (m/v)% brómfenolkék) állítottuk le, majd ezt követően 10 percig 100°C-on inkubáltuk. 5%-os SDS-PAGE-et követően a fluoreszcenciát PharosFX Plus Molecular Imager (Ex/Em: 488/530 nm, Bio-Rad) készülék segítségével detektáltuk. A FLpepT26 peptid molekula tömege 1885 Da, míg a FLpepPI2 peptidé 1727 Da, azonban 15%-os poliakrilamid gélben az előbbi 14, az utóbbi 12 kDa méretnél jelenik meg.

Az izopeptidáz mérésekhez a keresztkötött FLpepT26-S100A4(GST) és FLpepPI2-S100A4(GST) szubsztrátok nagy mennyiségű előállításához 5 μ M FLpepT26 illetve FLpepPI2 peptidet 12,8 μ M S100A4(GST)-vel 90 percig 37 °C-on inkubáltuk 5 nM hTG2, és 5 mM Ca^{2+} jelenlétében, HEPES transzamidáz reakció pufferben. Mivel a hFXIII-A jobban használja a FLpepPI2 peptid szubsztrátot beépítéshez, mint a hTG2, később a maradék hFXIII-A esetleges nemkívánt hatásai miatt, az S100A4(GST) és az FLpepPI2 keresztkötéséhez is hTG2-öt használtunk, az optimális végső szubsztrát elkészítésének érdekében. A reakciót 10 mM EDTA hozzáadásával állítottuk le, majd a képződött FLpepT26-S100A4(GST) vagy FLpepPI2-S100A4(GST) keresztkötött fehérjéket centrifugális koncentrátorszűrő (Amikon ultra, 10 kDa, Millipore, Billerica, MA, USA) használatával választottuk el a be nem épült FLpepT26 vagy FLpepPI2 peptidektől. Ebben a lépésben izopeptidáz aktivitás enyhén savas pH preferenciája miatt a HEPES reakció puffert MOPS pufferre cseréltük (Thangaraju, és mtsai, 2016). Mivel az izopeptidáz kötést tartalmazó keresztkötött termékek és a módosíthatatlan S100A4(GST) nem lettek elválasztva, az arányukat a teljes fehérje koncentráció és a FLpepPI2-S100A4(GST) fluoreszcein tartalma alapján, a fluoreszcein moláris extinkciós koefficiensét (79600 M⁻¹ cm-

1) felhasználva számoltuk ki. Optimális körülmények között az FLpepPI2-S100A4(GST) tartalom körülbelül 7% volt a reakció termékben. Ez azt jelenti, hogy 5 µg keresztkötött termék (FLpepPI2-S100A4(GST) és S100A4(GST)) 259,5 nM FLpepPI2-S100A4(GST)-nek felel meg a 35 µl izopeptidáz reakció elegyben.

4.5.2. A hTG4 és hTG2 transzamidáz aktivitásának végpontos mérése mikrotiter lemez módszerrel

A hTG4 transzamidáz aktivitásának mérésére a klasszikus mikrotiter lemez mérést **(Slaughter és mtsai, 1992)** használtuk, kisebb módosításokkal. Az enzim koncentráció függés alapján a mérésekhez 2,5 µg hTG4 enzim mennyiséget választottunk. A transzglutamináz reakció általában 0,5 mM biotin-pentilamin (BPA) szubsztrát (B002, Zedira GmbH), 10 mM DTT és 5 mM Ca²⁺ jelenlétében zajlott, 37 °C-on, 45 percen keresztül. Az extravidin alkalikus foszfatázt 1/2500 hígításban használtuk. A foszfatáz reakció színváltozását 405 nm-en követtük Synergy H1 készülék (BioTek) segítségével. A transzglutamináz reakció sebességét a foszfatáz reakció percenkénti mAbs változásával határoztuk meg. 8,5-ös és 7,5-ös pH értékek esetén a reakció puffer 0,1 M Tris-HCl volt, míg a 7-es, 6,5-ös, 6-os és az 5,5-ös pH értékű reakció elegyekhez 50 mM-os MOPS puffert használtunk. Különböző redukáló vagy oxidáló körülmények beállításához a reakció elegyeket 2,4 mM oxidált glutationnal (GSSG) és 0, 0,24 0,45, 1,25 vagy 2,4 mM redukált glutationnal (GSH) egészítettük ki (Steamnaes és mtsai, 2010). A [GSH]² aránya a [GSSG]-hoz a végső moláris koncentrációjukból lett kiszámolva.

4.6. A hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának tesztelése keresztkötött fibrin degradációs termékeken a DD-XLink-mab segítségével

FXIII-A aktvitas következtében keresztkötéseket tartalmazó (D-dimer, xFDP, Zedira GmbH) és nem tartalmazó fibrin degradációs termékeket (FDP, Zedira GmbH) rekombináns humán FXIII-A jelenlétében, vagy a kontroll minták esetében enzim nélkül inkubáltuk 20 mM MOPS pufferben, amely 500 mU trombint tartalmazott. A reakció 2 órán keresztül, 37°C-on zajlott. A reakció leállításához 6xdenaturáló puffert használtunk, és a mintákat 10 percig 100°C-on inkubáltuk. A mintákat Western blot analízissel vizsgáltuk.

4.7. Fibronektin kötés ellenőrzése

NuncTM maxisorp platet 0,3 µg fibronektinnel fedtük 9,6-os pH értékű bikarbonát pufferben. Ezt követően 0,5 µg hTG2-öt, 0,5 vagy 1 µg hTG4-et adtunk a lyukakhoz Ca-TTBS pufferben (0,05 M Tris-HCl pH 7,4, 0,15 NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,1 % Tween-20). A kikötődött

rekombináns enzimeket anti-His₆/HRP antitesttel (1/6000) és 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinnel detektáltuk. Az abszorbancia értékeket 450 nm-en Synergy H1 készüléssel mértük.

4.8. Guanozin-trifoszfát nukleotid kötő próbák

A hTG4 nukleotid kötésének teszteléséhez korábbi publikációk alapján BODIPY-FL-GTP γ S-t (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Biri és mtsai, 2016) és GTP-agarózt (Ruan és mtsai, 2008) használtunk. A fehérjéhez kötődő BODIPY-FL-GTP γ S magasabb fluoreszcencia intenzitást mutat, amelyet a Synergy H1 készüléssel (Ex/Em: 485/520) mértünk. A kísérletet kétszer hajtottuk végre, 3 párhuzamossal, Nunc 96 lyukú fekete microplate-eken. Pozitív kontrollként 100 nM rekombináns hTG2 fehérjét használtunk. A GTP-agaróz „pull-down” méréshez 5 μ g rekombináns hTG4-et vagy hTG2-öt használtunk. A GTP-agaróz gyantához kötődött transzglutaminázokat kétszeres denaturáló puffer hozzáadását követően 10 percig 100°C-on történő inkubálással eluáltuk. Western blot során anti-His₆/HRP antitestet használtunk, 1/15000-es hígításban.

4.9. 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, triptofán és tirozin aminosavakhoz köthető fluoreszcencia változása alapján, miközben a hőmérséklet 20-ról 95°C-ra melegszik. A hTG4 fehérjét 20 mM Tris-HCl pufferben hígítottuk, amelynek pH értéke 7,2 volt és 150 mM NaCl-ot, 1 mM EDTA-t és 1 mM DTT-t tartalmazott. A mérés során a készüléket dr. Bécsi Bálint kezelte.

4.10. Diszpáz emésztés

A proteolitikus stabilitás teszteléséhez a reakció elegy 1 μ g hTG4-et vagy hTG3-at (Zedira, GmbH), 1 μ g diszpáz I-et vagy II-öt, 5 mM Ca²⁺-ot tartalmazott, a megfelelő reakció körülményeket 0,1 M-os Tris-HCl puffer (pH 8,5) biztosította. 1 órás, 37°C-on történő inkubálást követően a reakció 6xdenaturáló puffer hozzáadásával lett leállítva. A reakció elegyet Western blottal ellenőriztük, poliklonális anti-hTG3 (A015, Zedira GmbH, 1/2000), monoklonális anti-hTG4 (Covalab, 1/2500) és monoklonális anti-His₆/HRP (1/20000) antitestek felhasználásával.

4.11. A hTG2 és a hTG4 aminosav szekvenciájának összehasonlítása

Az Uniprot adatbázisban található hTG2 és hTG4 aminosav szekvenciákat összehasonlítottuk az NCBI ProteinBlast online eszköz segítségével (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Thangaraju és munkatársai (2017a) által közölt hTG2 szekvencia részleteit felhasználva ellenőriztük a hTG2 esetén ismert funkciós helyek meglétét a TG4 szekvenciájában.

4.12. Endogén és exogén hTG4 expresszió

4.12.1. ATRA hatása az endogén hTG4 expresszióra

A retinsav receptorokat expresszáló AD-293, Panc-1, PC-3 és a RWPE-1 sejteket (Guo és mtsai, 2006; Long és mtsai, 2019; Makkonen és mtsai, 2009) az 50-60 %-os konfluencia elérésekor 0, 0,5 vagy 1 μ M (DMSO-ban beoldott) all-transz retinsavval kezeltük 48 órán át. A kezelés leteltével a sejteket begyűjtöttük, majd lízis puffert (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 (v/v)% NP-40, 10 (v/v)% glicerin, 1 mM PMSF és 1 mM Proteinase Inhibitor Cocktail) alkalmazva sejt lizátumot készítettünk, amelyek TG4 expresszióját Western blottal ellenőriztük.

4.12.2. Átmeneti hTG4 expresszió AD-293 sejtekben

AD-293 sejteket 6 lyukú sejtenyésző lemezen növesztettük, amíg elérték a 70%-os konfluencia szintet, majd az FBS-t 2 (v/v) %-ra csökkentettük, az antibiotikumokat pedig megvontuk a tápfolyadékból. A pTriEX-4 Ek/LIC hTG4 vektort a pTriEXTM-4 Ek/LIC Vector Kit-Novagen (Merck) használatával készítettük, a gyártó utasításai szerint. A hTG4 cDNS-t tartalmazó pBH4 vektort használtuk templátként az általunk tervezett gacgacgacaagatgagaattcagaccgaaaacctgtacttcc és gaggagaagcccgggtccaactcagttccttc oligonukleotidokkal. A transzfekcióhoz Lipofectamine 2000-et (Thermo Fisher Scientific) használtunk, a gyártó utasításai szerint. 3 óra után a transzfekciós médiumot növesztő médiumra cseréltük. A sejteket 48 órával a transzfekció után begyűjtöttük, lízis puffert használva.

4.12.3. A 3xFlag-TG4-et stabilan expresszáló AD-293 sejtvonal kialakítása

A pBH4 vektort templátként használva, gatccgggtaccgaatgatggatgcatcaaaag és gaggagaagcccgggtccaactcagttccttc oligonukleotidok segítségével a hTG4 cDNS-ét

felszaporítottuk majd tisztítás után KpnI/XhoI emésztéssel tapadó végeket alakítottunk ki az inzerten, amelyet a pENTR4-3xFlag (pENTR4-FLAG (w210-2) módosított vektor, Addgene, Watertown, MA, USA) vektorba ligáltunk (KpnI/XhoI helyekre). A pLENTI CMV BLAST (706-1; Addgene) üres vektort szintén felsokszoroztuk, majd KpnI restriktions hasítással ellenőriztük. Az LR klonáz reakcióhoz 90 ng/μl pENTR4-3xFlagTG4 és 150 ng/μl pLENTI CMV BLAST vektort, 2 μl NFW, és 1 μl LR klonáz enzimet használtunk (2 óra, RT). Ezután 10 perc proteináz K kezelést alkalmaztunk, 37°C-on, majd a reakció elegy felét Stb13 baktériumba transzformáltuk. A pLenti CMV Blast-3xFlagTG4 vektorból MIDI preparátum készítéséhez Endotoxin-free plasmid DNA purification Kit-et (Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Düren, Németország) használtunk, majd a kész vektort KpnI és EcoRI restriktions enzimekkel és szekvenálással ellenőriztük.

A vírus partikulumok készítéséhez 293FT sejteket használtunk. A sejteket 70% konfluenciáig növesztettük, majd 7 órával a transzfekció előtt a médiumot 9,5 ml friss médiumra cseréltük, amely 1,5 ml kondicionált médiumot is tartalmazott. A transzfekciós elegy 6,723 μg pLentiCMV Blast-3xFlagTG4 plazmidot, 2,24 μg „envelop” plazmidot, 4,35 μg csomagoló plazmidot, 0,2 ml TE puffert (1 mM Tris, 0,1 mM EDTA pH8,8), 0,104 ml MQ vizet, 34 μl CaCl₂-ot (2,5 mM) és 0,34 ml kétszeres HBS puffert (280 mM NaCl, 100 mM Hepes, 1,5 mM Na₂HPO₄ pH 7,11 ≤pH≤7.13) tartalmazott. 5 perccel a transzfekció előtt a sejteket 25 μM klorokinnal kezeltük. A transzfekciós médiumot 16 órával a transzfekciót követően 1 l ml friss médiumra cseréltük. Ezt követően a médiumot 24 és 48 óra után gyűjtöttük be és Amicon Ultra 100 kDa centrifugális koncentrátor cső segítségével kb. tízszeres töménységűre koncentráltuk.

AD-293 sejteket 12 lyukú sejtenyésző lemezen tartottuk, majd 60%-os konfluenciánál a sejtek médiumát 20% víruskoncentrátummal egészítettük ki. 48 órával az infekciót követően a sejteket 2 μg/ml blaszticidint alkalmazva szelektáltuk. A szelekciót követően a sejteket 90 %-os konfluenciánál begyűjtöttük, és lízis pufferben felvettük. A transzfervektort és a vírus partikulumokat dr. Király Róbert készítette.

4.13. Nyálminták gyűjtése és a nyál extracelluláris vezikuláinak izolálása

A nyálmintákat standardizált protokoll alapján gyűjtöttük (Golatoski és mtsai, 2013). Röviden, a mintavételt megelőző két órában a donorok nem étkeztek, a gyűjtés előtti félóraban 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) izolálásához általános protokoll alapján jártunk el (Witwer és mtsai, 2013). A nyálgyűjtést követően 25 ml mintához 3:1 arányban desztillált vizet adtunk, majd alacsony fordulatszámot (1800 g, 20 min) alkalmazva a sejttörmelékeket eltávolítottuk a mintából, és a felülúszó eredményezte „teljes nyál“ mintát, a pelletből pedig a „törmelék” minta készült. Egy következő centrifugálási lépéssel (17000 g, 20 perc, 4°C) a szolubilis (SN) és a pellet frakciók elválasztása történt. A felülúszó szűrését 0,22 µm-es szűrővel végeztük, majd a filtrátumot ultracentrifugáltuk (80 min, 100000 g, 4°C). A centrifugálási lépéseket követően a pelleteket lízis pufferben oldottuk vissza, majd a szonikálás után centrifugálással (18000 g, 5 perc, 4°C) nyert felülúszót használtuk analízisre.

4.14. Humán TG4 szubsztrát és interakciós partner keresés

4.14.1. Humán TG4 szubsztrát keresés AD-293 sejtextraktumban és nyálmintákban

Az AD-293 sejtextraktum nem tartalmaz transzglutaminázt, azonban a nyálban több transzglutamináz is jelen van, így elsőként a nyálban lévő endogén transzglutaminázokat kellett gátolni. A gátláshoz 20 mM IA-ot és 1 µM TG2 specifikus Z-DON inhibitor alkalmaztunk, 0,1 M Tris-HCl pH 8 pufferben, 5 % glicerin, 1 mM PMSF és 1 mM PIC jelenlétében 2 órán át, szobahőmérsékleten majd 0,2 mM Ca²⁺ hozzáadása után újabb 2 órás inkubáció következett. Ezt követően 50 mM Tris-HCl pH 8-as, 50 mM NaCl-ot és 5 % glicerint tartalmazó pufferben dializáltuk a gátolt nyálmintákat, amíg a IA koncentrációja 2 µM alá, a Z-DON koncentrációja pedig 0,02 µM alá csökkent. A gátlás sikerességét ellenőriztük, 10 µg gátolt és dializált nyálfehérjét 5 mM Ca²⁺, 0,2 mM BPA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF jelenlétében 0,1 M Tris pH 8-as pufferben inkubáltuk 60 percig, 37°C-on, majd 6xdenaturáló puffer hozzáadásával a reakciót leállítottuk és a mintákat 10 percig 100°C-on inkubáltuk. A nyál mintákban lévő transzglutaminázok gátlásának és a gátlószerek dialízisének sikerességét Western blot analízissel, Streptavidin/HRP (BioLegend, 1/2500) alkalmazásával ellenőriztük.

A sejtextraktumban a hTG4 függő BPA beépülés vizsgálatához 10 µg AD-293 sejtextraktumot 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk 0,2 mM BPA-val, 4,2 µg rekombináns hTG4-gyel 100 mM-os Tris- HCl pH 8,5 pufferben, amely 10 mM DTT-t, 5 mM CaCl₂-ot, 1 mM PMSF-et, és 1 mM Proteinase Inhibitor Cocktail-t tartalmazott. A kontroll minták esetén a reakció elegyhez kalcium helyett 10 mM EDTA-t adtunk és nem volt jelen hTG4 enzim. A reakciót 6xdenaturáló puffer hozzáadásával állítottuk le. A BPA beépülést Western blottal,

Streptavidin/HRP (BioLegend, San Diego, CA, USA 1/2500) alkalmazásával ellenőriztük. A BPA jelölt hTG4 szubsztrátok azonosításához a beépülési reakciót háromszor ismételtük meg AD-293 sejtek elválasztott citoplazmatikus (Cp) és magi (M) frakcióin, és kétszer a nyálminták esetében. Az AD-293 sejtextraktum Cp és M frakcióinak elválasztáshoz Nuclei Isolation Kit: Nuclei EZ Prep-et (Sigma #26149) használtunk, a gyártó utasításai szerint. Ezt követően 100 µg citoplazmatikus vagy magi frakciót inkubáltunk 0,1 mM-os Tris-HCl pufferben (pH 8,5), amely 5 mM CaCl₂-ot, 10 mM DTT-t, 200 µM BPA-t és 3 µg rekombináns hTG4-et tartalmazott. A nyálban lévő TG4 szubsztrátok azonosításához a reakció elegy térfogata 5,5 ml volt, amely 0,1 M Tris pH 8-as pufferben 5 mM Ca²⁺-ot, 0,2 mM BPA-t, 5 mM DTT-t, 1 mM PMSF-et tartalmazott. A reakciókban a nyálfehérjék és a rekombináns hTG4 tömeg aránya kb. 90:1 volt (pl. 2,14 mg nyálfehérje és 24 µg hTG4) egy korábbi előkísérlet alapján. A reakciók ideje 2 óra volt és 37°C-on zajlott. A be nem épült BPA dialízissal lett eltávolítva, amelyhez 0,1 M-os Tris-HCl puffert (pH 8,5) és Spectra/Por 1 Dialysis Membrane Standard RC Tuning-ot (MWCO 6-8 kDa) alkalmaztunk. A BPA módosításokat tartalmazó fehérjéket High Capacity Neutravidin Agarose Resin (Thermo Fisher Scientific) segítségével választottuk el a többi fehérjétől és dúsítottuk fel a mintában. Ekvilibrálást (0,1 M Tris-HCl pufferrel, pH 8,5) követően, a gyantát a dializált reakcióeleggyel inkubáltuk 1 óráig, 4°C-on, folytonos kevertetés mellett. A gélt háromszor mostuk, majd a BPA jelölt fehérjéket hatszoros puffer hozzáadását követően 15 perces 100°C-on történő inkubálással eluáltuk. A felülúszót további analíziseknek vetettük alá. A sejtextraktumban való szubsztrát kereséshez a kontroll minták esetében 100 µg AD-293 sejtextraktumot alkalmaztunk a beépüléshez, hTG4 jelenléte nélkül, amelyet a többi mintához hasonlóan kezeltünk. A nyálban való szubsztrát kereséshez a kontroll minták elkészítéséhez pedig a gélt kezeletlen nyállal kevertük össze, minden más lépés az előzőekben leírt módon történt.

4.14.2. Humán TG4 interakciós partner keresés humán nyálmintában

150 µl High Capacity NeutrAvidin Agarose Resin (Thermo Fisher Scientific) gélhez ekvilibrálást követően (0,1 M Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA) 25 µg rekombináns biotinilált hTG4-et kötöttünk (1 h, 4 °C, folyamatos forgatás mellett). Ezt követően a NeutrAvidin gél blokkolásához 100 µg biotint használtunk, (1 h, 4°C, folyamatos forgatás mellett) majd 6 mg teljes nyálmintával kevertük a biotinilált hTG4-et kötött és biotinnal blokkolt gélt, és 1 órán keresztül 4°C-on inkubáltuk, folytonos keverés mellett. A gélt ezt követően háromszor mostuk, majd 120 µl 6xdenaturáló puffer hozzáadását követően 100 °C-on 10 percig inkubáltuk. A felülúszót 10%-os Tris-glicin gélbe futtattuk SDS-PAGE segítségével, majd a géldarabokat

Coomassie festést követően kivágtuk, és LC-MS/MS analízisre küldtük. A kontroll minták elkészítésekor nem adtunk biotinilált hTG4-et a gélhez, a mintakészítés egyből a blokkolási lépéssel kezdődött, a többi lépésben nem volt eltérés. Az azonosított fehérjéket String online eszköz (<http://stringdb.org/> Megtekintés: 2022. 01. 20.) (Szkłarczyk és mtsai, 2021) Funkcionális dúsítási analízisének segítségével csoportosítottuk.

4.15. Proteomikai adatbázisok elemzése

Első lépésként a „MassIVE” adatbázis (Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment; <https://massive.ucsd.edu>, Megtekintve: 2021. július 1.) (Deutsch és mtsai, 2017) hTG4-re vonatkozó „PSM Provenance” táblázatát exportáltuk. A „MassIVE” felülete lehetővé teszi, hogy a peptideket egyediségük alapján szűrjük, a „Matched Genes” tulajdonságuk alapján. Ez alapján az egyedi és más fehérjékkel közös peptideket két táblázatra osztottuk. Az azonosított peptideket tartalmazó minták eredetét, hogy milyen szövetből származtak a minták, azok neveiből vagy az adatsor azonosítója alapján kerestük ki. A detektált TG4 peptideket tartalmazó minták eredete az összesen 3499 peptidnél 76 esetben nem volt elérhető. A „PeptideAtlas”-ban (<https://www.peptideatlas.org>, Megtekintve: 2021. július 1.) (Desiere és mtsai, 2006) 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 (<https://www.proteomicsdb.org/>, Megtekintés: 2021. július 1.) (Wilhelm és mtsai, 2014) 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, (Microsoft, Redmond, WA, USA). 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.

4.16. LC-MS/MS analízisek

Az LC-MS/MS analízisre szánt mintákat 10%-os poliakrilamid gélbe töltöttük, de csak a szeparáló gél első centiméterébe futtattuk be azokat. Coomassie festés után a fehérje sávokat kivágtuk a gélből, és a festéket nanotiszta vízzel mostuk ki. DTT-vel történő redukciós és

jódacetamidós alkilációt követően a fehérjéket egy éjszakán át tripszinnel emésztettük, 37°C-on. Az extrahált peptideket Speed-Vac készülékben szárítottuk, majd 10 µl 1%-os hangyasavban oldottuk vissza. Az analízisekhez a minták fele lett felhasználva. Elsőként, a só és a jelenlévő puffer összetevők eltávolítása történt, majd a minták ACQUITY UPLC Symmetry C18 (Waters Milford, MA, USA) só eltávolító oszloppal lettek dúsítva. Ezután a minták analízise Easy nLC1200 (Thermo Fisher Scientific) nanoUPCL-Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific) MS/MS rendszerrel, az adatok gyűjtése pedig adat függő módon történt. Az Orbitrap analizátor 6000 tömeg felbontással 350-1600 m/z skálán belül pásztázta a mintákat és a 14 legintenzívebb csúcsot tovább fragmentálta, amelyhez CID-et (35%) alkalmazott, a termék ionokat az ion csapda detektálta (MS/MS). 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 **(Cox és Mann, 2008)** azonosította a SwissProt/Uniprot adatbázisokat felhasználva. Az eredmények Scaffold 4.8.9. programba (Proteome Software, Inc., Portland, OR, USA) 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 meghatározásához nem-FDR alapú szűrési módot használtunk, és fehérjénként 1 azonosított peptid kritériumot használtunk. Azonban minden azonosított peptid MS/MS spektrumát ellenőriztük, amely során legalább négy egymást követő y vagy b ionsorozat megléte volt a kritérium. Az AD-293 sejtextraktumban történő hTG4 szubsztrát keresés adatait a ProteomeXchange Consortium-on **(Deutsch és mtsai, 2017)** keresztül a „MassIVE” adatbázisba töltöttük fel, a PXD028174-es azonosító számmal (<http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=PX028174>; Feltöltés dátuma: 2021. augusztus 28.)

4.17. Adatok kiértékelése

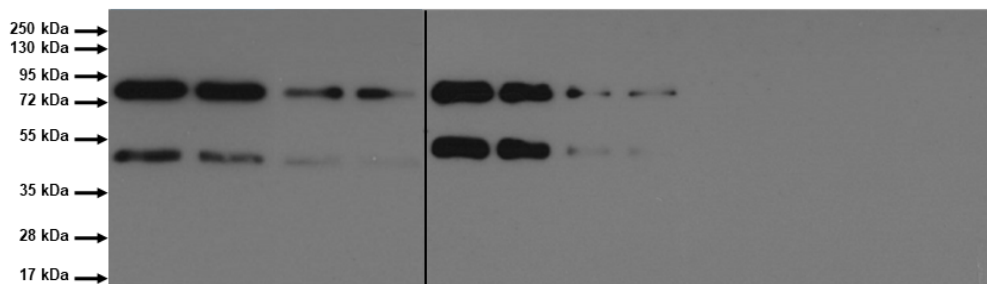
Az adatok kiértékeléséhez, az egyenesek illesztéséhez, a kinetikus számításokhoz a GraphPad Prism 6 és 8 szoftvereket (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA) használtuk a megfelelő beépített egyenleteket és eszközöket szükség esetén jelöltük a szövegben.

5. Eredmények

5.1 A humán FXIII-A izopeptidáz aktivitásának karakterizálása

5.1.1. FXIII-A izopeptidáz aktivitásnak kimutatása D-dimereken monoklonális antitest és Western blot segítségével

A fibrin degradáció során keletkező D-dimerek, amelyek aktív hFXIII-A esetén képződő fibrin degradációs termékek, a véralvadás mértékének markereként szolgálnak. A korábbi monoklonális D-dimer antitestek, amelyeket a diagnosztika alkalmaz a vérrögképződéssel járó betegségek detektálására csak a vérrög plazmin hasítását követően keletkezett fragmentjeit képes felismerni. A Zedira GmbH azonban kifejlesztette a DD-XLink-mab monoklonális antitestet, amely a FXIII-A által kialakított keresztkötésekre specifikus, ezáltal lehetővé vált a trombolitikus folyamatok még pontosabb monitorozása (**Devine és Greenberg, 1988; http://zedira.com/Content/DD-XLink-mab_42**). Úgy gondoltuk, hogy ez a monoklonális antitest alkalmas lehet a hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának a detektálására fibrin degradációs termékeken. A keresztkötött fibrin degradációs termékeket, (xFDP, és D-dimer) aktivált rekombináns hFXIII-A jelenlétében inkubáltuk, és az izopeptidáz aktivitás elősegítéséhez 6,8-as pH értéket és glicin metil észtert alkalmaztunk. Két órás inkubációt követően az integrált pixel intenzitást a filmen ImageJ program segítségével értékeltük ki, és az antitest által felismert D-dimer sáv mennyiségében egy 10-20% csökkenést figyeltünk meg (a 3. ábrán lévő felső sávot analizáltuk). A csökkenés az xFDP esetében nagyobb mértékű volt (~25 és 40%), azonban a különböző mennyiségű fibrin degradációs termékek esetén vizsgálva, a csökkenés mértéke nem volt azonos. A kísérletet többször megismételve, néha megnövelt inkubációs idővel, azt a következtetést vontuk le, hogy ez az antitest nem alkalmas a fibrin alegységek közötti izopeptidáz kötés mennyiségének pontos monitorozására.



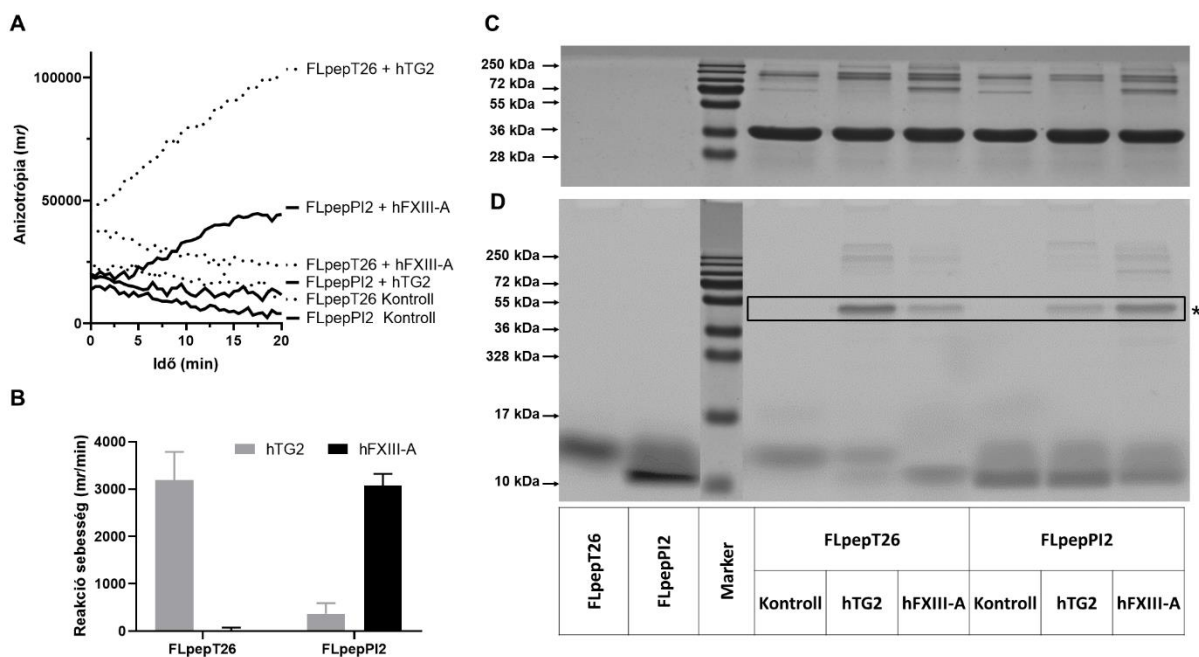
Fibrin degradáció termék	D-Dimer				xFDP				FDP			
Feltöltött mennyiség (μg)	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
hFXIII-A (μg)	-	0.1	-	0.05	-	0.1	-	0.05	-	0.1	-	0.05
Integrált optikai denzitás (A kezeletlen %-ában)	100	91.4	100	88.2	100	74.3	100	59.6				

3. ábra A hFXIII-A által létrehozott fibrin keresztkötések reverzibilitásának tesztelése fehérje szinten a keresztkötött fibrin degradációs termékekre specifikus monoklonális antitesttel. DD-XLink-mab (Zedira GmbH) felismeri az izopeptidáz kötéseket tartalmazó fibrin degradációs termékeket. A gyártó weboldala alapján a 72 kDa méretű sávokat a γ - γ vagy a γ' - γ fibrin dimereket adják, azonban a 40 kDa méretű sávról nincs információnk. 2 órás inkubációt követően az izopeptidáz kötéseken az aktivált hFXIII-A hatását reprezentatív Western blot képeken szemléltetjük. A felső sávok intenzitásai az ImageJ-vel voltak kiszámolva, az értékek a kezeletlen kontrollok százalékaként vannak megadva. Reprezentatív Western blot képek három független kísérlet eredménye alapján.

5.1.2. Fehérje-peptid alapú, kinetikus módszer a FXIII-A transzamidáz aktivitásának méréséhez

Ezt követően a hFXIII-A transzamidáz és izopeptidáz aktivitásának mérésére alkalmas kinetikus, fehérje-peptid alapú anizotrópiás módszer kialakítását tűztük ki célul. Ezt a munkacsoportunk által korábban a hTG2 transzamidáz és izopeptidáz aktivitásának mérésére kifejlesztett fehérje-peptid alapú, kinetikus anizotrópiás mérés (Thangaraju és mtsai, 2016) adaptálásával próbáltuk megvalósítani. A T26 peptid (HQSYPDPWMLDH) egy fág display által szelektált, mesterséges, TG2 specifikus, csak egy reaktív glutamint tartalmazó szubsztrát peptid. A PI2 peptid (NQEVSPLTLLK) szintén egy dodekapeptid, de az α 2-plazmin inhibitor N-terminális szekvenciájából származik, és kitűnő szubsztrát mind a hFXIII-A és a hTG2 számára (Kárpáti és mtsai, 2000). A hFXIII-A aktivitásainak karakterizálása céljából egy valós idejű mérési módszer fejlesztéséhez megvizsgáltuk, hogy a hFXIII-A elfogadja-e szubsztrátként az S100A4(GST) rekombináns fehérjét és a FLpepT26 vagy FlpepPI2 fluoreszcensen jelölt dodekapeptideket. A keresztkötő aktivitást az exponenciálisan emelkedő fluoreszcencia anizotrópia mérésén keresztül követtük (4. A ábra). Az aktivitás értékeket ezt

követően a növekvő fluoreszcencia polarizáció első fázisának lineáris regressziója alapján számoltuk (az R^2 értékek 1-hez közeliak voltak, 4. B ábra). FLpepT26 és S100A4(GST) jelenlétében a hFXIII-A nem generált detektálható anizotrópia változást, azonban a reakció után a reakcióelegyek SDS-PAGE analízisével láttuk egy halvány fluoreszcens sáv megjelenését kb. 42 kDa méretnél, mindkét enzim esetében. Ez megerősítette a FLpepT26 peptid mindkét enzim által történő beépülését az S100A4(GST)-be, azonban a hFXIII-A esetén ez nagyon kis mértékű (4. D ábra, feltöltési kontroll 4. C ábra). Ezt követően a FLpepT26-ot FLpepPI2-re cseréltük, és az aktív hFXIII-A esetén növekvő fluoreszcencia polarizációt detektáltunk, amely alacsonyabb volt a hTG2 esetén (4. A ábra). Az SDS-PAGE analízis (4. D ábra) megerősítette, hogy a FLpepPI2-öt a hTG2 is elfogadja szubsztrátként (Kárpáti és mtsai, 2000; Király és mtsai, 2006), és beépíti az S100A4(GST) fehérjébe, viszont kisebb mértékben, mint a hFXIII-A.

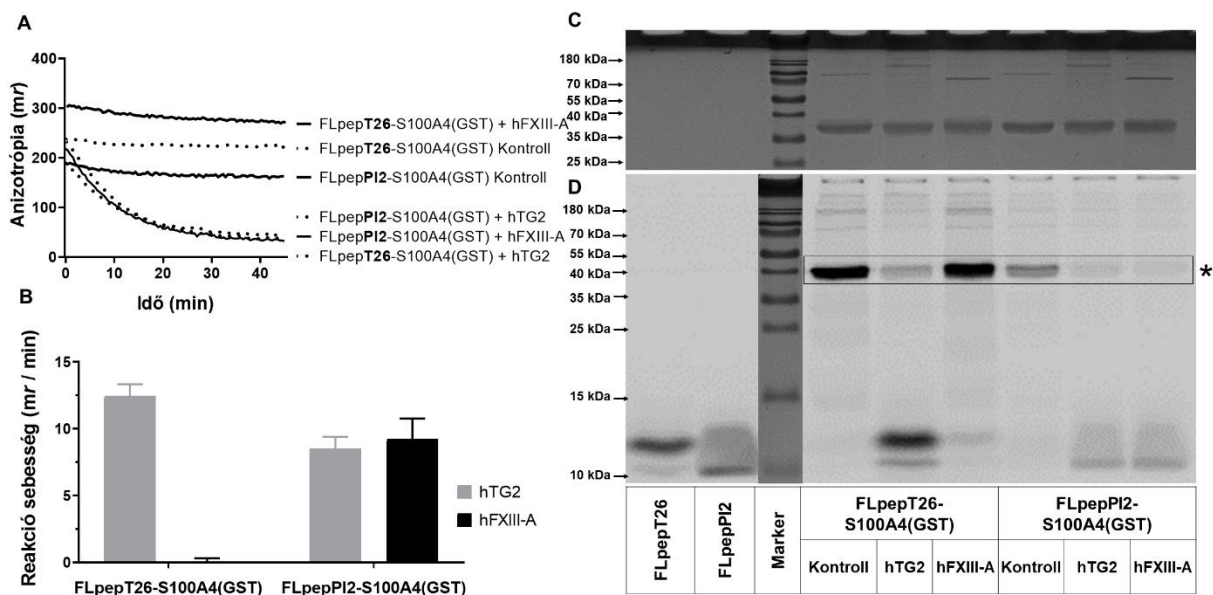


4. ábra A hFXIII-A transzamidáz aktivitásának kinetikus detektálására fehérje-peptid szinten alkalmazható a FLpepPI2 peptid beépítése S100A4(GST) fehérjébe. (A, reprezentatív kép) 5 nM hTG2 vagy hFXIII-A katalizálta transzamidáz reakciót 100 nM FLpepT26, vagy FLpepPI2 és 5 μ M S100A4(GST) szubsztrátok jelenlétében a fluoreszcencia változást a BioTek Synergy H1 (zöld fluoreszcencia polarizációs filter egység, Ex/Em: 485/525, tükör: 510 nm) készülékkel követtük nyomon. (B) A reakció sebességeket a kinetikus görbék első közel lineáris szakasza alapján számoltuk, a hFXIII-A esetén egy rövid késleltetési szakaszt követően. Az adatokat a kontrollok kivonását követően átlag \pm SD formában ábrázoltuk, két független kísérlet alapján, amelyeket három párhuzamossal végeztünk. (D, reprezentatív gélkép) A keresztkötött termékek szemléltetéséhez a reakció elegyeket

denaturálást követően 15%-os SDS-PAGE segítségével elválasztottuk, és PharosFX Plus Molecular Imager készülékkel detektáltuk. A csillag a keresztkötött fehérje-peptid termékeket jelöli. (C, reprezentatív gélkép) Végül a gélen Coomassie festést alkalmaztunk, a feltöltött minták azonos S100A4(GST) mennyiségének bemutatásához (reprezentatív gélképek).

5.1.3. A fehérje-peptid alapú kinetikus izopeptidáz mérés adaptálása és alkalmazása a hFXIII-A esetében

A hFXIII-A transzamidáz aktivitásának mérése mellett a fő célunk az enzim izopeptidáz aktivitásának karakterizálására alkalmas aktivitás mérési módszer kialakítása volt. Korábban leírtunk egy fehérje-peptid alapú izopeptidáz aktivitásmérést a hTG2 izopeptidáz aktivitásának karakterizálására (Thangaraju és mtsai, 2016). Feltételeztük, hogyha egy fehérje és egy jelölt peptid keresztkötése detektálható az azt követő fluoreszcencia anizotrópia változással, akkor az izopeptidáz kötés hasítása szintén detektálható lehet ugyanezen a módon, csak ebben az esetben fluoreszcencia anizotrópia csökkenéssel. Mivel nincs részletes tanulmány a hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának specificitásáról, elsőként a FLpepT26-S100A4(GST)-t teszteltük lehetséges izopeptidáz szubsztrátként (5. A ábra). Elvárásainknak megfelelően a hFXIII-A nem hasította a FLpepT26-S100A4(GST) szubsztrátban lévő izopeptid kötetést, amelyet SDS-PAGE analízis is megerősített, mivel mind a hFXIII-A-t tartalmazó, és a nem tartalmazó kontroll mintákban is hasonló fluoreszcens sáv látszódott kb. 42 kDa méretnél a vizsgált reakció elegyekben (5. B ábra, minta feltöltési kontroll). Következő lépésként a keresztkötött fehérje-peptid szubsztrát peptid komponensét. FLpepT26-ról FLpepPI2-re cseréltük. Egy rövid késleltetési fázist követően (hFXIII-A aktiváció) az anizotrópia változás exponenciális csökkenést mutatott. A reakció sebességet lineáris regressziót alkalmazva számoltuk ki, a csökkenés közel lineáris szakasza alapján (4 és 14 perc között) és az 5. ábrán ábrázoltuk, a kontrollok levonását követően. FLpepPI2-S100A4(GST) szubsztrát valóban elegendő jelet szolgáltatott a hFXIII-A aktivitás kinetikus méréséhez fehérje-peptid szinten (5. A és B ábra). Az izopeptid kötés hasítását az SDS-PAGE is alátámasztotta, csökkent mennyiségű fluoreszcensen jelölt keresztkötött termék látszott 42 kDa méretnél, és erősebb peptid jel a kontrollhoz képest (12 kDa körül, 3. D ábra)



5. ábra A FLpepPI2-S100A4(GST) fehérje-peptid alapú szubsztrát hasítása lehetővé teszi a hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának kinetikus követését (A) 150 nM hTG2 vagy FXIII-A és 380 nM FLpepT26-S100A4(GST) vagy 259,9 nM FLpepPI2-S100A4(GST) szubsztrát jelenlétében a fluoreszcencia változást a BioTek Synergy H1 zöld fluoreszcencia polarizációs filter egység (Ex/Em: 485/525, tükör: 510 nm) készüléssel követtük nyomon. (B) A reakció sebességeket a kinetikus görbék első közel lineáris szakasza alapján határoztuk meg. Három párhuzamossal végzett két független mérés eredményeit a mért értékek átlagaként ábrázoltunk, a hozzá tartozó \pm SD értékekkel. (D) A hasítás vizualizálásának érdekében denaturálást követően a reakció elegyeket 15%-os SDS-PAGE segítségével elválasztottuk, és PharosFX Plus Molecular Imager készülékkel detektáltuk. A csillag a keresztkötött fehérje-peptid szubsztrátokat jelöli. (C) Végül a gélen Coomassie festést alkalmaztunk, a feltöltött S100A4(GST) azonos mennyiségének bemutatásához (reprezentatív gélképek).

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

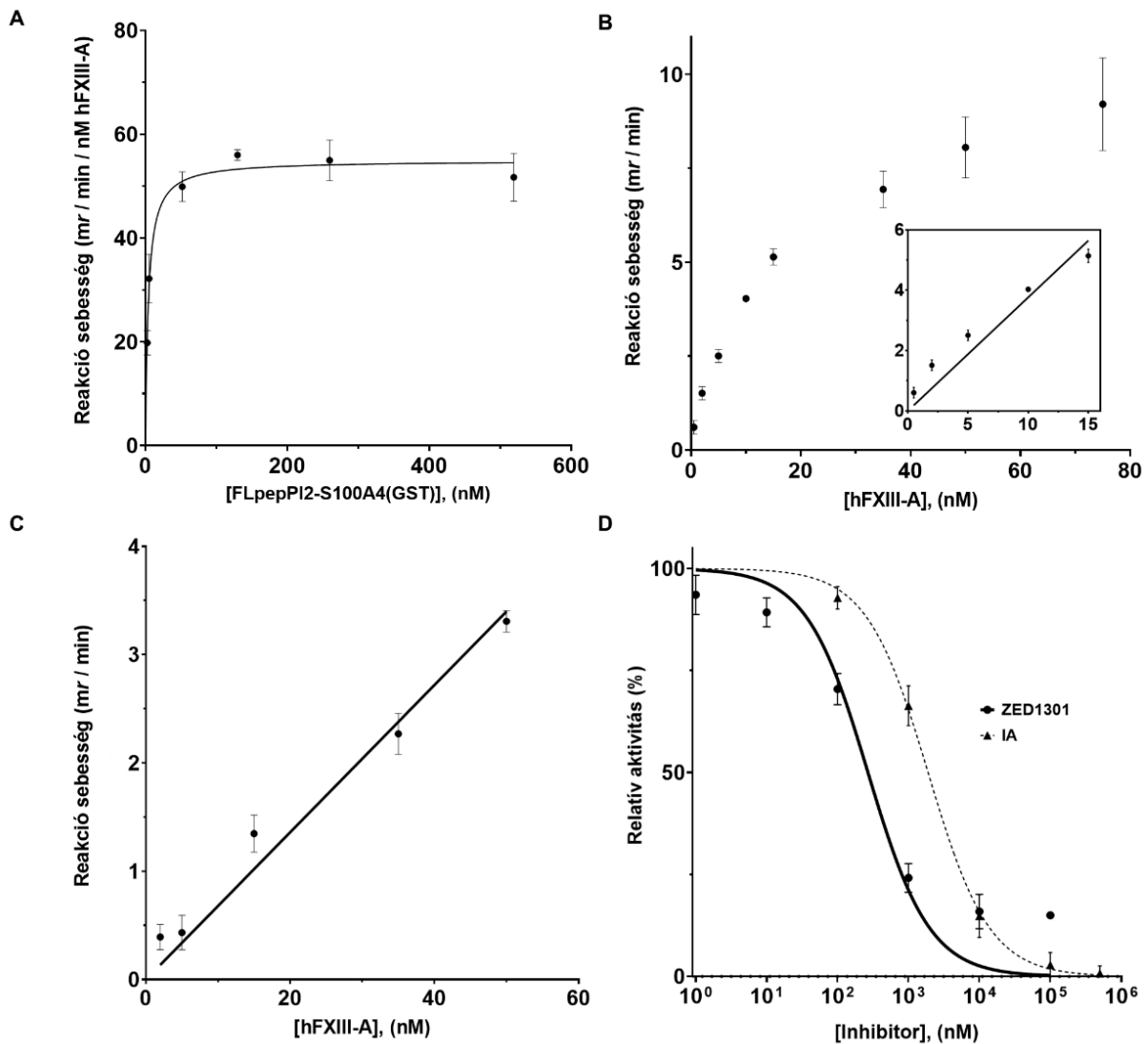
A fehérje-peptid alapú kinetikus hFXIII-A izopeptidáz aktivitás mérés lehetséges alkalmazásainak a teszteléséhez elsőként növekvő koncentrációjú FLpepPI2-S100A4(GST) szubsztrát hatását vizsgáltuk a reakció sebességen 150 nM FXIII-A jelenlétében. Az aktivitás értékek telítési kinetikát mutattak, Michaelis-Menten egyenletet használva illesztettünk görbét (6. A ábra, koeficiens meghatározás: $R^2=0,928$). Az aktivitás plató fázist ért el és a Graph Pad 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.

Következő lépésként a mérési módszer érzékenységét és linearitását vizsgáltuk, 259,5 nM FLpepPI2-S100A4(GST) szubsztrát jelenlétében megmértük a hFXIII-A mennyisége és

aktivitása közötti korrelációt (6. B ábra). Az aktivitás mérésekor 150 nM hFXIII-A koncentrációig a Pearson korrelációs koefficiens 0,9387 volt 0,8811 R² 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 vizsgáltuk egy alacsonyabb, maximum 15 nM hFXIII-A koncentráció tartományban (6. B ábra részlet), a korrelációs koefficiens 0,9907 volt 0,9816 R² értékkel.

A teszt alkalmazhatóságát tovább vizsgáltuk és tízszeres hígításban normál humán plazmát adtunk a reakció elegyhez, amely különböző mennyiségű rekombináns hFXIII-A enzimet tartalmazott. Annak érdekében, hogy megfelelő negatív kontrollt alkalmazzunk plazma jelenlétében, az endogén hFXIII-A transzglutamináz aktivitását egy Ca²⁺ kelátor (10 mM EDTA) és IA alkalmazásával gátoltuk (6. C ábra). A normál plazmában rekombináns hFXIII-A hozzáadása nélkül mért reakció sebesség 1,22 ± 0,18 m^r/min volt, amelyet ábrázolás előtt kivontunk az aktivitás értékekből. 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 R² értékkel és az illesztett görbére meghatározott koefficiens 0,9422 volt. A legkisebb, egyértelműen mérhető hFXIII-A mennyiség 5 nM hFXIII-A volt. Ettől alacsonyabb koncentráció esetén mért érték nem volt elkülöníthető a vak reakcióban mérhető anizotrópia változásától.

Mivel a hFXIII-A gátlása terápiás lehetőség a nemkívánt vérrög stabilizáció megelőzésében, hasznos lehet egy fehérje-peptid alapú mérés különböző gyógyszerek tesztelésére, mivel a hFXIII-A *in vivo* fehérje szubsztrátokat használ. Teszteltük a IA, egy általános transzglutamináz inhibitor és a ZED1301, egy specifikus hFXIII-A peptidomimetikum inhibitor hatását az anizotrópiás mérési módszerrel (6. D ábra). Mindkét esetben dóziszfüggő gátlást figyeltünk meg, a IA esetében 1,89 ± 0,29 μM, míg a ZED1301 esetén 268 ± 56 nM IC₅₀ értékekkel.



6. ábra A FLpepPI2-S100A4(GST) fehérje-peptid alapú szubsztrát kinetikai paramétereit és az újonnan kifejlesztett hFXIII-A izopeptidáz aktivitás mérés érzékenysége, linearitása és lehetséges alkalmazásait. **(A)** A Michaelis konstans meghatározása 150 nM hFXIII-A jelenlétében és a hFXIII-A koncentráció és aktivitás korrelációja plazma nélkül **(B)** és plazma jelenlétében **(C)**. Az bekeretezett részlet kiemeli a korrelációt a fiziológiás hFXIII-A koncentráció körül. **(D)** A jóacetamid (IA, folyamos vonal) és a specifikus hFXIII-A inhibitor, a ZED1301 (szaggatott vonal) dózis függő gátló hatása 50 nM hFXIII-A izopeptidáz aktivitására. A reakció sebességét a kinetikus görbe közel lineáris szakaszából számoltuk. Három párhuzamossal végzett két független mérés eredményeit a mért értékek átlagaként ábrázoltunk, a hozzá tartozó \pm SD értékekkel.

5.2 A humán TG4 biokémiai karakterizálása

5.2.1. Proteomikai adatbázisok analízise az emberi szervezet hTG4 expressziójának feltérképezéséhez

Korábban a hTG4 expressziója csak a prosztata lumenális epitél sejtjeiben volt ismert, azonban ma már a modern biológiai módszerek segítségével újabb szövetekben válik detektálhatóvá a hTG4 expressziója. A „Human Protein Atlas”-t immunhisztokémiai eredmények alapján hozták létre, az alkalmazott antitesteket a különböző RNS expressziós adatokból összevetve validálták (Uhlén és mtsai, 2015). Az adatbázis szerint, fiziológias körülmények között a hTG4 a prosztatában és a vázizmokban expresszálódik. Ezen kívül hTG4 szintén jelen volt emlődaganat mintákban, ahol erős festődést és citoplazmatikus vagy membrán lokalizációt mutatott. A hTG4 jelenléte több alkalommal is volt detektálva prosztatadaganatokban különböző festődési intenzitásokkal, többnyire citoplazmatikus és membrán lokalizációval, de a hTG4-et nem tekintik ezeknek a tumorok esetén prognosztikus markernek. A nagy érzékenységű tömegspektrométerek megjelenése és elterjedése lehetővé tett egy másik módszert a fehérjék expressziójának vizsgálatára.

A hTG4 szöveti expressziójának összegyűjtéséhez három proteomikai adatbázist vizsgáltunk át. Az Uniprot adatbázisban, a hTG4 számos proteomikai adatbázishoz van hozzárendelve, amelyek közül a „MassIVE” (Deutsch és mtsai, 2017), a „PeptideAtlas” (Desiere és mtsai, 2006) és a „ProteomicsDB” (Wilhelm és mtsai, 2014) nyújt lehetőséget arra, hogy elérjük a részletes kísérleti beállításokat és a meta adatokat a különböző projektekben megfigyelt hTG4 peptidekről. 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 (Kiegészítő táblázat S1 és S2; A kiegészítő táblázatok terjedelmük és formátumuk miatt nem illeszthetőek a függelékbe, de megtalálhatóak a közlemény kiegészítő file-ok között: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8619550/#app1-ijms-22-12448>).

Számos fehérje közötti szekvencia hasonlóság miatt, főként a transzglutamináz enzim családon belül, vannak detektált peptidek, amelyek több fehérje szekvenciájában is megtalálhatóak. Az YPEGSSEER peptid, vagy a poszt transzlációsan módosított formái nagyon gyakran detektálva lettek a különböző mintákban, de ez a peptid nem csak a hTG4-ben megtalálható úgynevezett „egyedi” peptid, ugyanis jelen van a hTG2-ben is. A legtöbb szövet esetében a hTG4 csak ezzel a peptiddel volt detektálva. Miután kizártuk a nem egyedi peptideket, 9 szövet maradt (3.

táblázat), ahol a hTG4 jelenlétét egyedi peptid detektálása erősítette meg. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a férfi genitális traktus mellett a hTG4 fiziológiásan jelen van a szívben, a lépben, a nyálmirigyekben, a vastagbélben és a húgyhólyagban is.

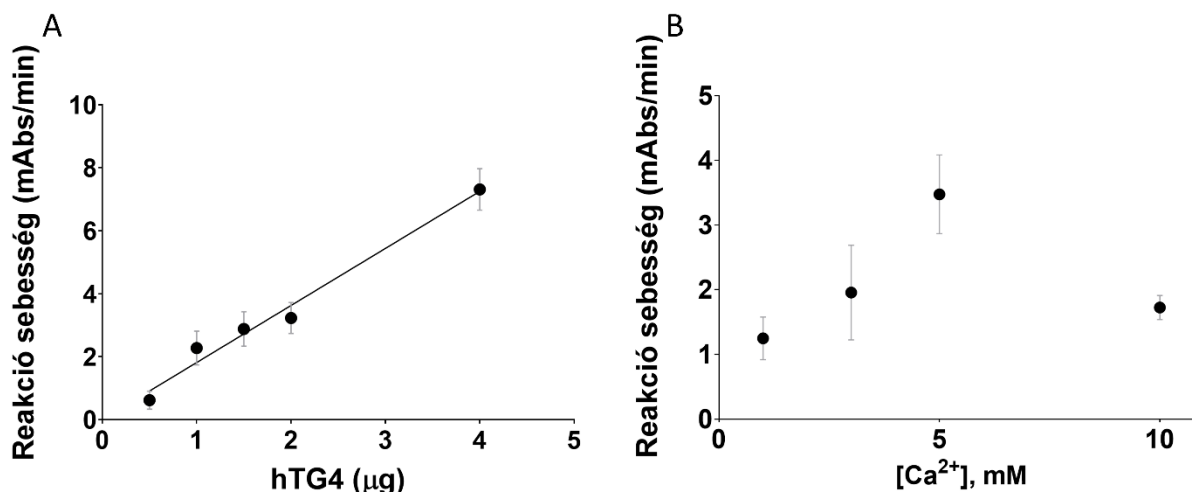
3. táblázat A human TG4-et expresszáló szövetek, egyedi peptidekkel való detektálás alapján a „MassIVE”, „PeptideAtlas” vagy „ProteomicsDB” adatbázisokban

Szövet	„MassIVE”	„PeptideAtlas”	„ProteomicsDB”
Húgyhólyag	++	++	++
Lép	–	+	++
Nyál mirigy	–	–	++
Prostata	++	++	++
Sperma	++	++	–
Spermaplazma	++	++	++
Ondóhólyag	++	++	++
Szív	+	++	++
Vastagbél	++	++	+

–: nem detektált +: nem egyedi peptiddel detektált ++: egyedi peptiddel detektált

5.2.2. A hTG4 aktivitása különösen alacsony a transzglutamináz enzimesaládban

Annak érdekében, hogy kísérleti úton is tanulmányozhassuk a hTG4-et, rekombináns fehérjét termeltünk, és teszteltük a transzamidáz aktivitását. Mivel nincs az irodalomban arra vonatkozólag adat, hogy a hTG4 milyen szubsztrátokat preferál, egy széles körben használt mikrotiter lemez módszerrel a biotin-pentilamin (BPA) beépítést vizsgáltuk. 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. Az emelkedő enzimkoncentráció és a rekombináns hTG4 transzamidáz aktivitása között jó lineáris korrelációt (7. A ábra) figyeltünk meg, 4 µg enzim esetén $7,31 \pm 0,33$ mAbs/min értéket elérve. A transzamidáz aktivitás mérés validitásának további vizsgálatához a Ca^{2+} függést is megvizsgáltuk (7. B ábra). A hTG4 aktivitás esetén az optimális $[Ca^{2+}]$ 5 mM volt. Magasabb Ca^{2+} szint (10 mM) már gátló hatással volt az aktivitásra, valószínűleg a fehérje kis mértékű aggregációja miatt, amely szemmel látható zavarosodást nem okozott a reakcióelegyben.



7. ábra A humán TG4 transzamidáz aktivitása. (A) Emelkedő hTG4 enzim mennyiség hatása a transzamidáz aktivitásra 0,5, 1, 1,5, 2 és 4 μg hTG4 és 5 mM Ca²⁺ jelenlétében pH 8,5 esetén. (B) A hTG4 transzamidáz aktivitásának kalcium függését teszteltük 1-10 mM Ca²⁺ koncentráció tartományban 2,5 μg enzim jelenlétében, 8,5-ös pH-n. Két párhuzamossal végzett három független mérés eredményeit a mért értékek átlagaként ábrázoltunk, a hozzá tartozó ±SD értékekkel.

A Zedira GmbH árul humán rekombináns transzglutaminázokat, és egy kinetikus danzil kadaverin beépülési méréssel meghatározott aktivitás értéküket feltünteti a termékek adatlapján (4. táblázat). Ezek az aktivitás értékek alátámasztják és megerősítik a mi megfigyelésünket, hogy a hTG4 nagyon alacsony transzamidáz aktivitással rendelkezik a többi transzglutaminázhoz viszonyítva.

4. táblázat. A humán rekombináns transzglutaminázok transzamidáz aktivitásának összehasonlítása. A TG1, TG2, TG3, TG4 és TG7 transzamidáz aktivitását a Zedira GmbH weboldaláról (www.zedira.com, Megtekintve: 2021. július 1.) gyűjtöttük össze a termékek adatlapjáról. Az aktivitás értékek egységesen a danzil kadaverin N,N-dimetilált kazeinbe való beépülésének mérésével lettek meghatározva.

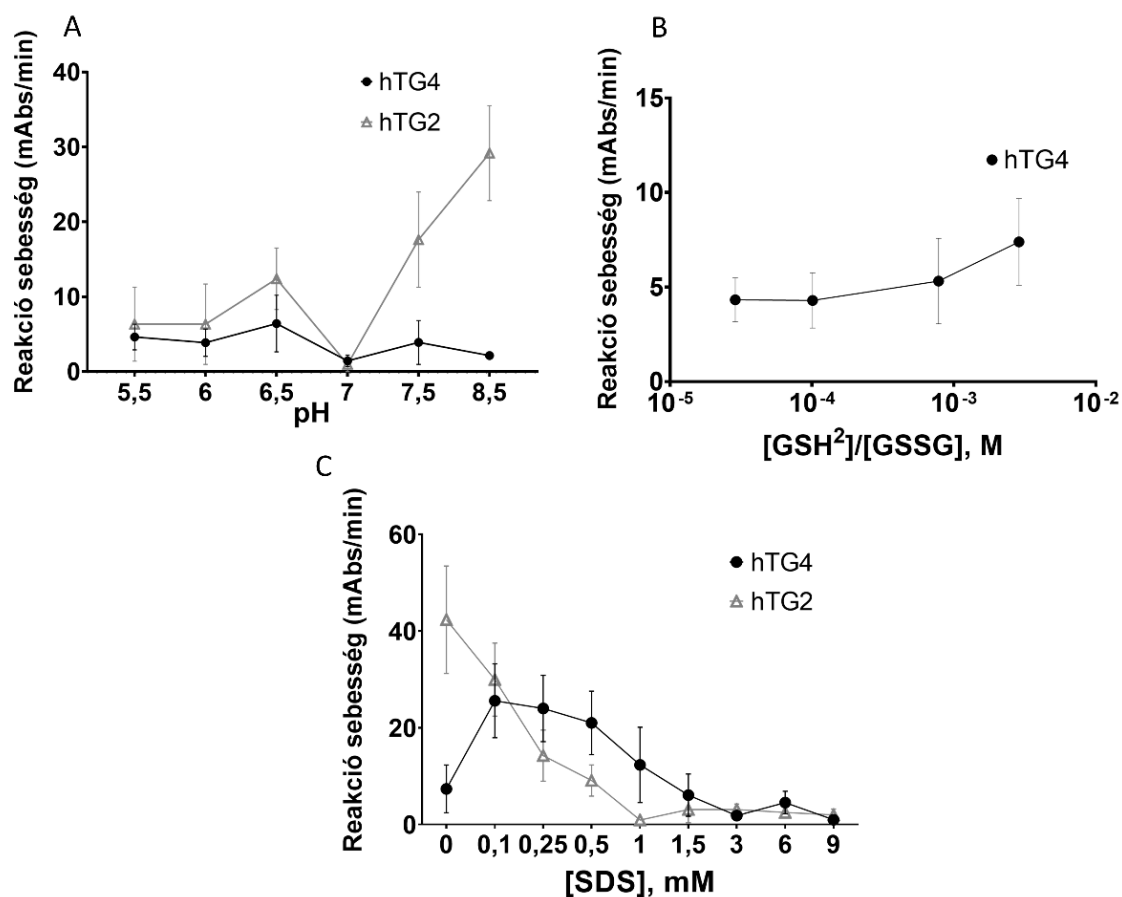
Humán Transzglutamináz	Katalógus szám	Transzamidáz aktivitás (U/mg)	Expressziós rendszer
TG1	T009	~2500	E. coli
TG2	T001	~750	E. coli
TG3	T024	~1000	Rovar sejtek
TG4	T042	~30	E. coli
TG7	T011	~1000	E. coli

5.2.3. A pH, a redukáló/oxidáló környezet és a nátrium-dodecil-szulfát hatása a hTG4 transzamidáz aktivitására

Következő lépésként tovább karakterizáltuk a hTG4 transzamidáz aktivitását több különböző körülmény esetén, olyan szabályzó mechanizmust keresve, amely aktiválhatja a hTG4-et, magasabb enzimatis aktivitást eredményezve. A pH befolyásolja az enzimek aktivitását a katalitikus mechanizmus elősegítésével vagy a fehérjék oldékonyságának változtatásával. A hTG4 valamivel magasabb aktivitást mutatott alacsonyabb pH érték (pH 7 alatt) esetén (8. A ábra). A pH függési görbe alapján a hTG4 izoelektromos pontja (pI) 7,0 körül lehet.

A transzglutaminázokról tudjuk, hogy érzékenyek a redukáló/oxidáló körülményekre, amelyek megváltoztatják a vicinális tiol csoportok állapotát a fehérjékben. A hTG4 transzamidáz aktivitását megmértük különböző redukált és oxidált (GSH/GSSG) glutation arányok esetében (8. B ábra). Az eredmények azt mutatják, hogy a hTG4 magasabb transzamidáz aktivitás eléréshez a redukáló körülményeket preferálja.

Mivel alacsony mennyiségű SDS megemeli a patkány TG4 aktivitást, megvizsgáltuk az emelkedő SDS koncentráció hatását a hTG4 transzamidáz aktivitására (8. C ábra). 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. A hTG2 esetében a növekvő SDS koncentráció az enzim inaktiválásához vezetett. Kis koncentrációjú SDS növelte ugyan a hTG4 aktivitását, de még mindig jóval kisebb aktivitást értékeket mértünk, mint a hTG2 által katalizált reakciókban.

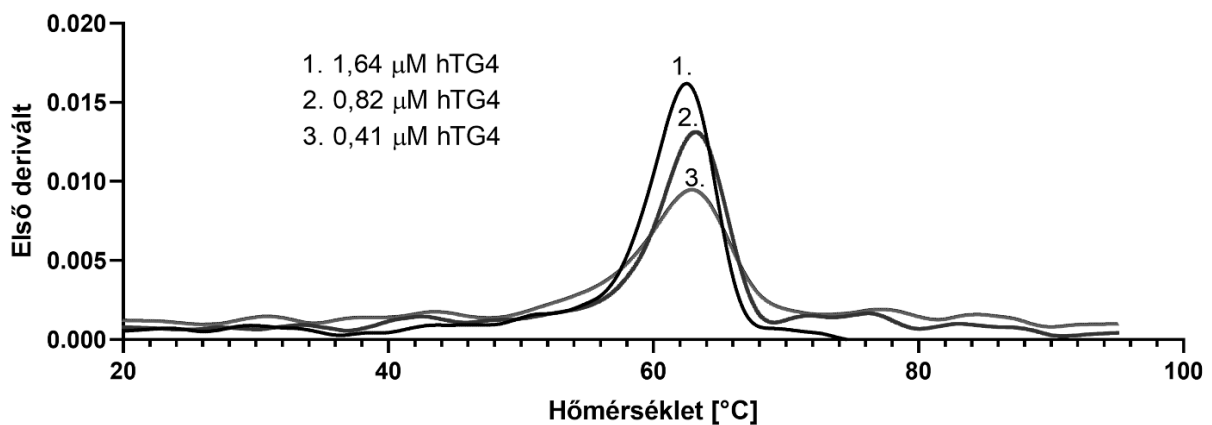


8. ábra. A pH, redukáló/oxidáló környezet és a nátrium-dodecil-szulfát hatása a hTG4 transzamidáz aktivitására. (A) A hTG4 és a hTG2 transzamidáz aktivitásának pH függése 5,5 és 8,5 pH értékek között. (B) A redox körülmények hatása a hTG4 transzamidáz aktivitására. A redukáló körülmények hatásának megfigyeléséhez 2,4 mM GSSG-t kombináltunk 0, 0,24, 0,45, 1,25, vagy 2,4 mM GSH-val a mikrotiter lemez reakció elegyekben (Stamnaes és mtsai, 2010). A $[GSH]^2$ aránya a $[GSSG]$ -hoz képest a moláris koncentrációjukból lettek kiszámolva. A humán TG4 $8,1 \pm 1,65$ mAbs/min aktivitást mutatott 2,4 mM GSH és 0 mM of GSSG jelenlétében, ez az érték az ábrán nem jeleníthető meg. (C) A hTG4 és a hTG2 transzamidáz aktivitását különböző SDS koncentrációk mellett teszteltük. A kísérletekben 2,5 μ g volt a hTG4 mennyisége és 0,5 μ g a hTG2-é. Három párhuzamossal végzett három független mérés eredményeit a mért értékek átlagaként ábrázoltunk, a hozzá tartozó \pm SD értékekkel.

5.2.4. A rekombináns hTG4 hőstabilitása

Az alacsony aktivitás érték miatt, azt gyanítottuk, hogy a hTG4 stabilitása alacsony. A fehérje hőstabilitásának karakterizálásához nano differenciális pásztázó fluorimetriát (nanoDSF) alkalmaztunk. A NanoTemper Prometheus készülék fehérjék jelölése nélkül képes meghatározni a termikus kitekerődést a fehérjékben lévő triptofán aminosavak

fluoreszcenciájának mérésével a hőmérséklet emelkedése mellett, natív körülmények között. A magasabb olvadásponttal (T_m , ahol a fehérjék 50%-a denaturálódott) rendelkező fehérjék nagyobb stabilitással is bírnak. Hígítási sort alkalmazva a T_m értékek átlaga a hTG4 esetén $62,6 \pm 0,23$ °C volt (9. ábra). Az a hőmérséklet, ahol a fehérje elkezdett denaturálódni $56,1 \pm 1,34$ °C volt. Az alkalmazott fehérje koncentráció tartományban más szerkezeti (pl.: disszociáció) átalakulás nem mutatkozott. Az emberi szervezet általános hőmérsékletét figyelembe véve a hTG4 magas termikus stabilitást mutat, amely egy stabil natív szerkezetet mutat fiziológias körülmények között. Ez a megfigyelés felveti a lehetőségét egy még ismeretlen a hTG4 állványzati funkciójának.



9. ábra A rekombináns hTG4 fehérje hőstabilitása. A T_m értékek meghatározásához nano differenciális pásztázó fluorimetriát alkalmaztunk, az első származék függvényében ábrázoltuk a hőmérsékletet, amely az olvadási görbét eredményezte 1,64, 0,82 és 0,41 μM hTG4 fehérje esetén. A mérést dr. Rehó Bálint végezte.

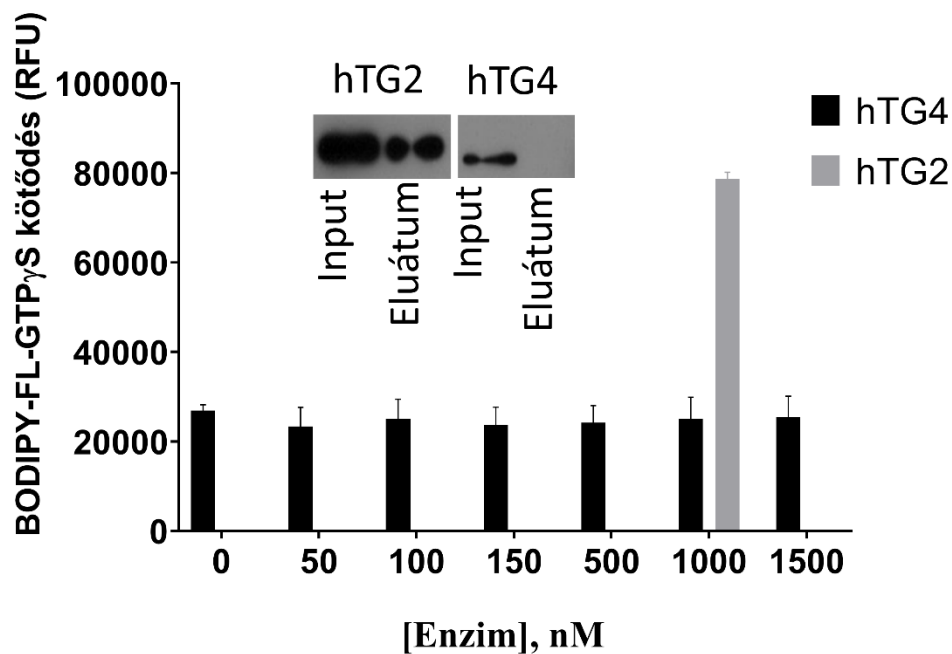
5.2.5. A hTG4 fibronectin és GTP kötő tulajdonságainak predikciója és kísérletes tesztelése

A hTG2 aminosav szekvenciájában jól annotált, ismerjük a GTP és a fibronectin kötő helyeket, a kalcium kötő helyeket, és a domén határokat (Thangaraju és mtsai, 2017a). A ProteinBlast online eszköz segítségével a hTG2 és a hTG4 szekvenciáit illesztettük (10. ábra), majd ez alapján megjósoltuk a fibronectin és a GTP kötőhelyek meglétét a hTG4 szekvenciájában. Az összehasonlítás alapján jól látszik a katalitikus triád konzerváltsága. A szekvencia hasonlóság alapján azonban a hTG2 esetében ismert fibronectin és GTP kötésért felelős aminosavak sem találhatóak meg a hTG4 aminosav szekvenciájában.

TG4	5	SKEIQVLHIDFLNQDNAVSHHTWEFQTSSPVFRRGQVFHLRLVLNQPLQSYHQLKLEFS-	63
TG2	2	AEELVLERCDLELETNGRDHHTADLCREKLVVRRGQPFWLT ^{FN} LHFEGRNYEASVDSLTF ^{FN} SV	61
FN			
TG4	64	-TGNPNSIAKHTLVVLDPRTPSDHYNQATLQNESGKEVTVAVTSSPNAIIGKYQLNVKT	122
TG2	62	VTGPAPSQEAGTKARFPLRDAVEEGDWTATVVDQDCTL ^{FN} SLQLTTPANAPIGLYRLSLEA	121
β szendvics FN			
TG4	123	GNHILKSEENI--LYLLEFNPWCKEDMVFMPDEDERKEYILNDTGCHYVGAARS ^{FN} IKCKPWN	180
TG2	122	STGYQSSFVLGHFILLFNAWCPADAVYLDSEEE ^{FN} ROEYVLTQQGFYQGS ^{Ca²⁺} AKFIKNI ^{Ca²⁺} PWN	119
Ca ²⁺			
TG4	181	FGQFEKNVLDCCISLL-----TESSLKPTDRRDPVLVCRAMCAMMSFEKGQGVLI ^{Ca²⁺} GNW	233
TG2	120	FGQFEDGILDICLILLDVNPKFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVVS ^{Ca²⁺} GMVNCNDDQGVLLGRW	241
Ca ²⁺ W241			
TG4	234	TGDYEGGTAPYKWTGSAPILQQYYNTK-QAVCFGQCWVFAGILTTVLRALGIPARSVTGF	292
TG2	242	DNNYGDGVS ^{C277} PMSWIGSVDILRRWKNHGCRVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTNY	301
Katalitikus domén C277			
TG4	293	DSAHDTERNLTVDTYVNEGEKITSMT ^{Ca²⁺} HDSVWNFHVWTD ^{Ca²⁺} AWMKRPDL ^{H335} PKGYDGWQAVDAT	351
TG2	302	NSAHDQNSNLLIEYFRNEFGE-IQGDKSEMIWN ^{H335} FCWVESWMT ^{Ca²⁺} RPDLQPGYEGWQALDPT	359
Ca ²⁺ Ca ²⁺ H335			
TG4	352	PQERSQGVFCCGPSPLTAIRKGDIFIVYDTRFVFSEVNGDRLIWLVKM ^{Ca²⁺} VNGQEELHVISM	411
TG2	360	PQEKSEGT ^{Ca²⁺} YCCGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDW-IQDDGS--VHKSIN	416
Ca ²⁺			
TG4	412	ETTSIGKNISTKAVGQDRRRDITYEYKYPEGSSEERQVMDHAFLL--LSSEREHRRPVK-	469
TG2	417	RS ^{Ca²⁺} LIVGLKISTKSVGRDEREDITH ^{Ca²⁺} TYKYPEGSSEEREAF ^{Ca²⁺} TRANHLNKLA ^{Ca²⁺} EKEETGMAMRI	477
Ca ²⁺ Ca ²⁺ Ca ²⁺			
TG4	470	-----ENFLHMSVQSD-----VLLGNSVNETVILKRK--TAALQNVN ^{Ca²⁺} ILGS	509
TG2	478	RVGQSMNMGSDFDVFAHITNNTAEEYVCRLLLCARTVSYNGILGPEC ^{Ca²⁺} GTKYLLNLN----	533
β hordó 1			
TG4	510	FELQLYTGKKMAKLCDLNKTSQIQGVSEVTLTLD ^{Ca²⁺} SKTYINSLAILDDEPVIRGFIIAEI	569
TG2	534	--LEPFS-EKSVPLCILEKYRD-----CLTESNLIKVRALLV--EPVINSYLLAE-	579
Ca ²⁺			
TG4	570	VESKEIMASEVFTSFQYPEFSIELPNTGRIGQLLVCNCFKNTLAIPLTDVKFSLES ^{Ca²⁺} SLGI	629
TG2	580	-----RDL ^{Ca²⁺} Y--LENPEIKIRILGEPKQKRKLVAEVS ^{Ca²⁺} LQNPLPVALEGCTFTVEGAGL	629
β hordó 2			
TG4	630	SSLQTS ^{Ca²⁺} SDH-GTVQPGETIQS ^{Ca²⁺} QIKCTPIKTGPKKFIVKLSSKQVKEINAQKIVLI----	682
TG2	630	TEEQKTVEIPDPVEAGEEVKVRMDLLPLHMGHLKLVVNFESDKLKAVK ^{Ca²⁺} GFRNVIIGPA	687

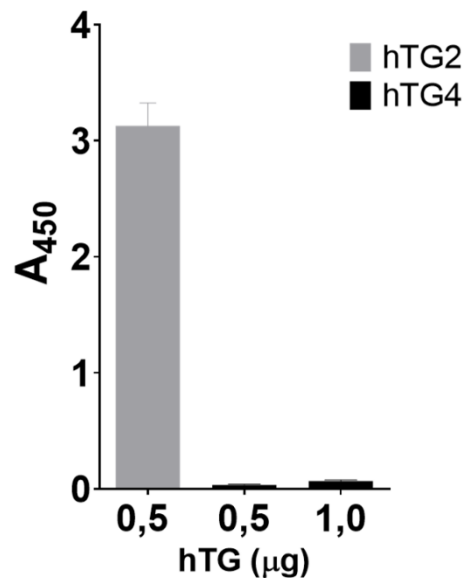
10. ábra. A hTG2 és hTG4 aminosav szekvenciájának illesztése. A fibronectin (FN) kötőhelyek (zöld) K30, R116 és H134, a GDP/GTP kötő helyek(narancssárga) S171, K173, R476, R478, V479, R580, Y583, a katalitikus triád (rózsaszín) és a nem kanonikus Ca²⁺ kötő helyek: S4: 149-159, S3A: 305-311, S3B: 326-333, S2A: 395-401, S5: 432-583, és S2B445-455 (aláhúzott) jelölve vannak a hTG2 szekvenciájában. A hTG2 domének és határai: β-szendvics: 1-139, katalitikus domén: 147-460, β hordó 1: 472-583, β hordó 2: 584-687.

Más transzglutaminázok, köztük a hTG2 is, gyakran vannak szabályozva a guanin nukleotid kötődése révén. Az enzim GTP kötő tulajdonságát a fluoreszcens BODIPY-FL-GTP γ S reagens alkalmazásával teszteltük (11. A ábra). Kötődés esetén a fehérje koncentráció függő fluoreszcencia intenzitás emelkedést vártunk. A változás hiánya miatt pozitív kontrollként 1000 nM hTG2 fehérjét használtunk, amely kb. négyszer nagyobb relatív fluoreszcencia értéket eredményezett a hTG4 esetén mért értékekhez képest, amely a kísérleti körülmények megfelelő beállítását igazolja. A hTG4 GTP-kötő képességének vizsgálatához egy másik megközelítést, GTP-agaróz gélt és azt követő Western blot analízist is használtunk (11. A ábra részlet). Az eredmények azt mutatják, hogy a GTP-agaróz nem képes kötni a hTG4 fehérjét, míg a pozitív kontroll, a hTG2 esetében ennek ellenkezőjét tapasztaltuk. A két független módszerrel kapott eredmény bizonyítja, hogy a hTG4 nem rendelkezik guanin nukleotid kötőhellyel, ezáltal a GTP nem lehet hatással a hTG4 szabályozására.



11. ábra. A humán TG4 nem köti a GTP-t. Növekvő koncentrációjú hTG4-et (50, 100, 150, 500, 1000 vagy 1500 nM) inkubáltunk 500 nM BODIPY-FL-GTP γ S reagenssel, 5 percig, majd megmértük a fluoreszcencia intenzitást (Ex/Em: 485/520 nm). Az adatokat átlagértékek formájában, \pm SD-vel ábrázoltuk két független kísérlet eredményei alapján, amelyeket három párhuzamossal végeztünk. Pozitív kontrollként 1000 nM hTG2-öt alkalmaztunk, amely 78629 \pm 153,160 RFU értéket eredményezett. Az ábra részlet a hTG2 és hTG4 GTP-agaróz gélhez való kötődését mutatja. Reprezentatív kép két független Western blot analízis eredményéről a monoklonális anti-His₆/HRP antitestet alkalmazva.

A hTG2 adhézio által közvetített sejt jelátviteli folyamatokban többek között a fibronektinnel való interakciója révén vesz részt. A szekvencia összehasonlítás követően a hTG4 esetében kísérletesen is teszteltük a fibronektin kötődést, amely megerősítette a szekvencia illesztés alapján kapott eredményünket (12. ábra).

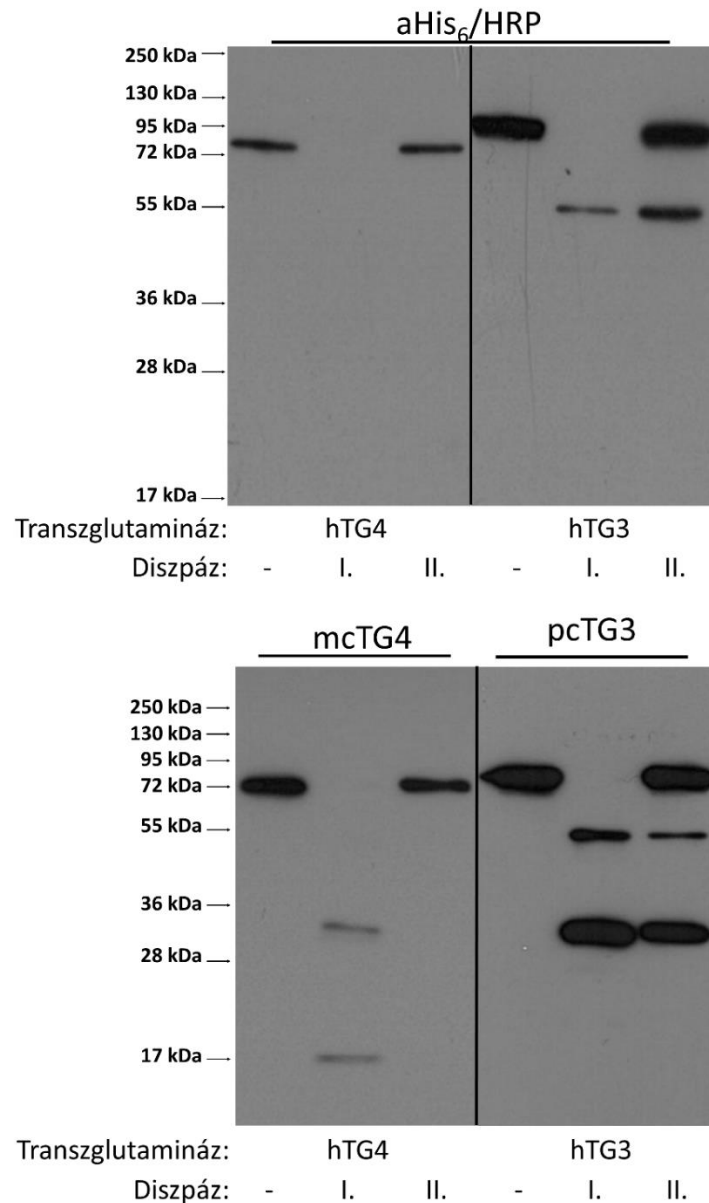


12. ábra. A humán TG4 nem kötődik a fibronektinhez. ELISA mérés a hTG4 fibronektin kötésének teszteléséhez. Az adatokat két független mérés átlagaként és a hozzátartozó \pm SD értékekkel ábrázoltuk. Mérésenként 3 párhuzamossal dolgoztunk. Pozitív kontrollként 0,5 μ g hTG2-öt használtunk.

5.2.6. A trombin és a diszpáz nem képes a hTG4-et limitált proteolizissal aktiválni

A transzglutamináz enzimes család több tagjánál is megfigyelhető, hogy limitált proteolízis révén vannak szabályozva, ezért teszteltük a hTG4 potenciális aktiválását a trombin vagy a diszpáz által. Elsőként *in silico* analízissel, az „ExPASy Peptid Cutter” online eszköz segítségével ellenőriztük a hTG4 fehérje szekvenciáját, hogy tartalmaz-e diszpáz vagy trombin hasítási helyeket (https://web.expasy.org/peptide_cutter/; Megtekintve: 2021. július 01.) Az ExPASy Peptid Cutter alapján a hTG4 szekvenciája nem tartalmaz trombin hasító helyeket, és kísérleti eredményeink is ezt erősítették meg. Diszpáz hasító helyek keresésére az „ExPASy Peptid Cutter” nem alkalmazható, így rekombináns His₆-tages hTG4-en és hTG3-on teszteltünk kísérletesen a limitált proteolízist diszpáz I-el és diszpáz II-vel (13. ábra). A diszpáz I magasabb proteolitikus aktivitással bír, mint a diszpáz II. Western blot analízis, anti-His₆/HRP és monoklonális anti-TG4 antitesteket alkalmazva 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-at pozitív kontrollként teszteltük, ebben az esetben az anti-TG3 és anti-His₆/HRP antitestekkel detektálhatóak voltak az irodalom szerinti stabil, proteolitikus hTG3 fragmentek.

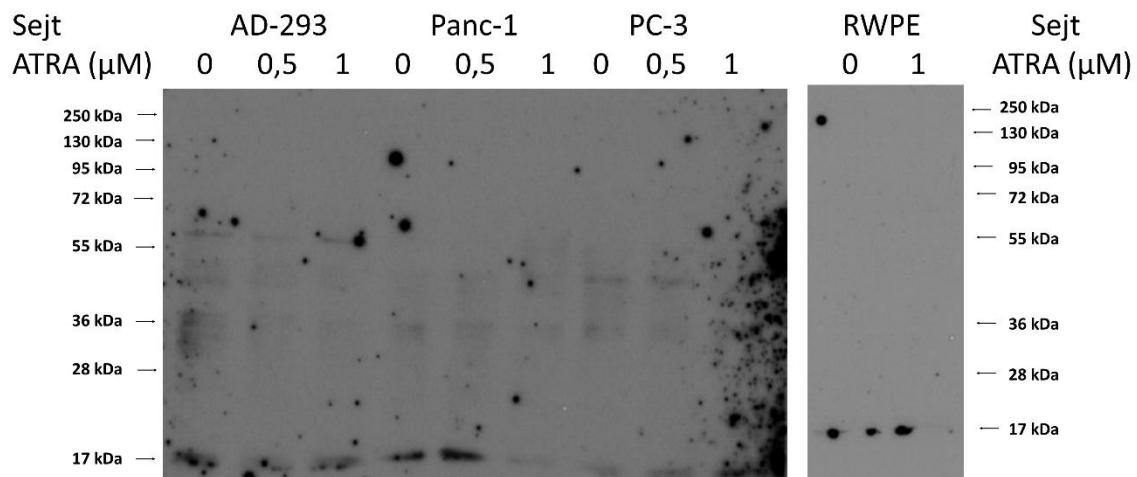


13. ábra. Nem történik limitált hTG4 proteolízis diszpáz emésztés hatására. Western blot analízissel vizsgáltuk a diszpáz I és diszpáz II hatását a hTG4 fehérje stabilitásán. 5 mM Ca²⁺ jelenlétében magában, vagy azonos mennyiségű diszpáz I-el vagy diszpáz II-vel inkubáltuk a rekombináns hTG3-at vagy hTG4-et 60 percig, 37°C-on. volt. Minden reakció esetén 0,3 µg transzglutamináz fehérjét tartalmazó reakció elegyet teszteltünk Western blottal, anti-His₆/HRP-vel (aHis₆/HRP, **felső rész**) vagy monoklonális anti-TG4 (mcTG4) és poliklonális anti-TG3 (pcTG3) antitestekkel (**alsó rész**). Két független kísérletből származó reprezentatív képek kerültek bemutatásra.

Reprezentatív képek három független kísérlet alapján.. A függőleges vonalak a membrán vágások helyét jelölik.

5.2.7. Az all-transz retinsav nem indukálja a TG4 endogén expresszióját AD-293, Panc-1, PC-3 és RWPE-1 sejtekben

PC346C és LNCaP sejtekben ATRA kezelés hatására szignifikánsan megnőtt a hTG4 mRNS expressziója (**Rivera-Gonzales és mtsai, 2012**). Ebből kiindulva, AD-293, Panc-1, PC-3 és RWPE-1, hTG4-et fehérje szinten eredetileg nem kifejező sejteket 48 órán keresztül 0,5 vagy 1 μ M ATRA-val kiegészített médiumban növesztettünk. A sejt extraktumokat Western blot analízissel, monoklonális anti-TG4 (mcTG4) antitesttel vizsgáltuk, és azt találtuk, hogy az ATRA kezelés fehérje szinten nem indukálta a hTG4 expresszióját egyik sejt esetén sem (14. ábra).

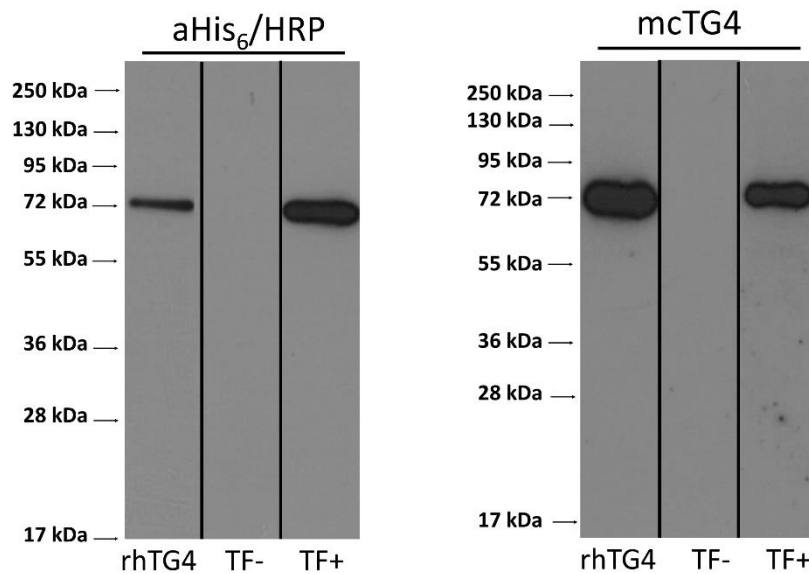


14. ábra. All-transz retinsavval (ATRA) kezelt sejtek hTG4 fehérje expressziójának ellenőrzése. Western blot analízis alapján az AD-293, a Panc-1, a PC-3 és az RWPE-1 sejtekben az ATRA kezelés nem képes hTG4 fehérje termelését indukálni. Reprezentatív Western blot képek, két független kísérlet alapján.

5.2.8. AD-293 sejtekben a hTG4 teljes méretben fejeződik ki

AD-293 sejtvonalban, egy ismeretlen intracelluláris proteáz limitált proteolízissel aktiválja az exogénean expresszált TG5-öt (**Pietroni és mtsai, 2008**). ez alapján ellenőriztük, hogy esetleg a hTG4 esetében is történhet-e hasonló aktiváció. AD-293 sejteket transzfektáltunk hTG4-et expresszáló pTriEx-4 Ek/LIC eukarióta vektorral. A transzfekció után 48 órával a fehérje kivonat csak teljes méretű hTG4-et tartalmazott, amely azt jelzi, hogy a sejtekben nem volt jelen aktív proteáz, amely módosítaná a fehérjét limitált proteolízissel (15. ábra). Mivel nem

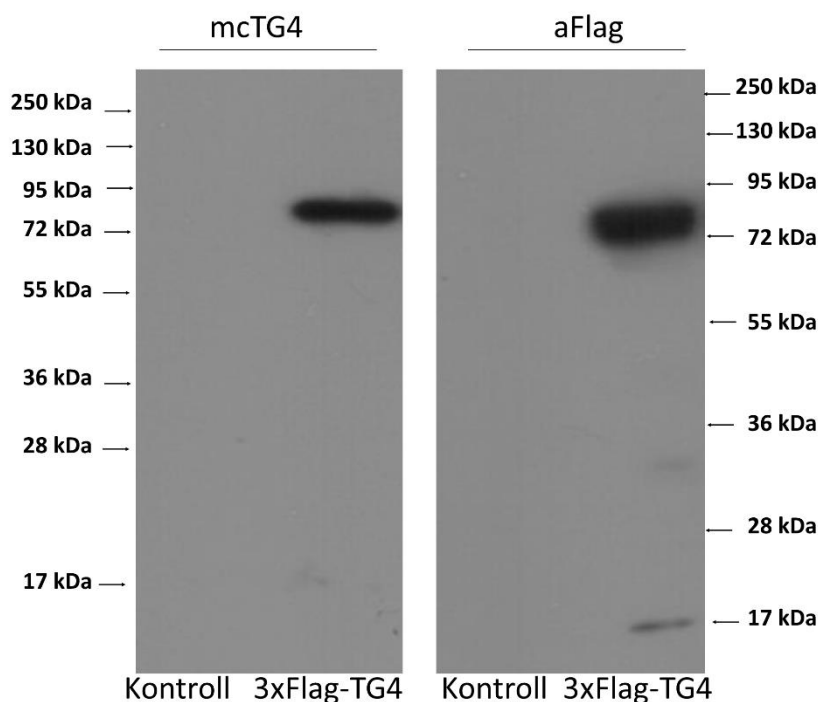
sikerült aktiváló mechanizmust találunk, a további kísérletekben próbáltunk magas affinitású szubsztrátokat keresni, a hTG4 szignifikáns aktivitásának bemutatásához.



15. ábra A hTG4 teljes méretben expresszálódik AD-293 sejtekben. Western blot alapján AD-293 sejtek teljes méretben expresszálják a hTG4-et, szignifikáns limitált proteolízis nem detektálható. A kontroll 0,3 μ g rekombináns hTG4 (rhTG4) volt. A nem transzfektált (TF-) és a transzfektált AD-293 (TF+) sejtextaktumokból 10 μ g fehérjét vizsgáltunk. Reprezentatív Western blot képek, három független kísérlet alapján. A függőleges vonalak a membrán vágások helyét jelölik.

5.2.9. Humán TG4-et stabilan expresszáló sejtes modell kialakítása

Mivel a pTriEx-4 Ek/LIC eukarióta vektor nem szelektálható, nem teszi lehetővé a hTG4-et stabilan expresszáló sejtvonala kialakítását. Ezért szubklónozással, és vírus infekcióval 3xFlag-TG4-et kifejező AD-293 sejtvonala alakítottunk ki (16. ábra), hogy a későbbiekben az enzim szekréciójának, interakciós partnereinek, esetleges poszttranszlációs módosításainak vizsgálata is lehetővé váljon.



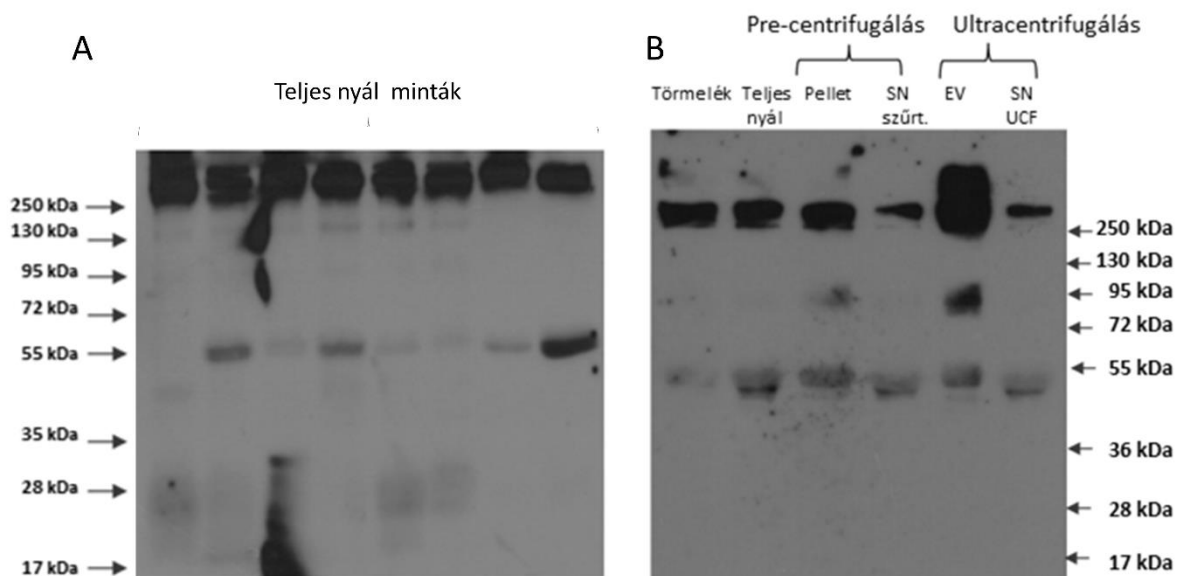
16. ábra. A 3xFlag-TG4-et expresszáló AD-293 sejtek vizsgáta Western blot analízissel. A monoklonális anti-hTG4 (mcTG4) és az anti-Flag M2 antitest (aFlag) is teljes méretben detektálja a 3xFlag-TG4-et az AD-293 vírus fertőzött sejtekben.

5.2.10. A hTG4 jelenléte a nyálban

Perez Alea és munkatársai (2013) publikálták, hogy a nyálban detektálható a hTG1, a hTG2, a hTG3 és a hTG4 fehérje Western blot analízissel, amely összhangban van a proteomikai adatbázisokban található adatokkal, a hTG4 expressziót mutató nyálmirigyekről. A cikkben azonban egy poliklonális hTG4 ellenes antitestet használtak, amely képes lehet más transzglutaminázok felismerésére is. A hTG4 jelenlétének megerősítéséhez 8 egészséges önkéntes egyéntől nyálmintát gyűjtöttünk, majd a teljes nyálat Western blot analízissel vizsgáltuk, egy hTG4 specifikus, monoklonális anti-hTG4 antitest alkalmazásával. A monoklonális antitesttel is detektálható a hTG4 a nyálmintákban egy kb. 55 kDa fragment formájában és nagy molekulásúlyú, valószínűleg keresztkötések, vagy más kovalens kötések által összetartott fehérjekomplexekben is (17. A ábra). A minták hTG4 tartalma azonban egyénekenként eltérő. A hTG4 mennyiségének egyéni eltérése prosztata mintákban is megfigyelhető (**Dubbink és mtsai, 1999**).

A nyál teljes, szolubilis (SN), oldhatatlan (pellet), és extracelluláris vezikula (EV) frakcióit különböző centrifugálási lépéseket, szűrést, majd ultracentrifugálást alkalmazva elkülönítettük,

hogy azok hTG4 tartalmát Western blot analízissel vizsgálhassuk (17. B ábra). A monoklonális anti-hTG4 antitesttel detektálva látható, hogy a hTG4 feldúsult a EV 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, illetve annak vezikuláris frakciójában.



17. ábra. A hTG4 detektálása nyálban monoklonális Western blot és anti-hTG4 ellenes antitest alkalmazásával. (A) 8 különböző egyéntől származó teljes nyálminta analízise, 40 µg nyál fehérje/sáv. **(B)** A hTG4 jelenlétének vizsgálata az extracelluláris vezikula izolálásánál keletkező frakciókban. 40 µg nyál törmelék, Teljes nyál, oldhatatlan frakció (Pellet), szűrt szolubilis fázis, extracelluláris vezikula (EV), valamint az ultracentrifugálást követő felülúszó (SN UCF) frakciók Western blot analízise. Reprezentatív ábra két független kísérlet eredményei alapján.

5.2.11. Humán TG4 szubsztrátok keresése a nyálban

A TG4 eddig ismert funkciói a reprodukcióhoz köthetőek, a nyálban való jelenléte egy ismeretlen, új funkciót sugall. A rágcsálók kopulációs dugójának kialakításához létfontosságú a TG4 aktivitása, azonban az emberek esetében ez a folyamat hiányzik, így lehetséges, hogy a hTG4 az evolúció során új funkciót nyert, amely esetleg éppen a nyálban, vagy az emésztő rendszerben fontos. Mivel a hTG4 transzamidáz aktivitása nagyon alacsonynak bizonyult, felveti a lehetőségét, hogy talán nem a megfelelő szubsztrátokat alkalmaztuk, esetleg a TG4 szubsztrát specificitása nagyban eltér a többi transzglutaminázétól. Hogy ezt kiderítsük, hTG4

szubsztrát keresést végeztünk humán nyálmintában. 5 mg nyál fehérjét, amelyben az endogén transzglutaminázokat előzetesen gátoltuk, rekombináns hTG4-gyel kezeltünk, 5 mM Ca^{2+} és 0,2 μM BPA jelenlétében. A hTG4 által módosított, BPA tartalmú fehérjéket NeutrAvidin-agaróz affinitás kromatográfia segítségével dúsítottuk a mintában. Az elúciót követően a mintát 10%-os poliakrilamid gélbe futtattuk, majd Coomassie festés után a mintát kivágtuk, és tömegspektrometriai analízisre (LC-MS/MS) küldtük a szubsztrát fehérjék azonosítása céljából. A kontroll mintákban szereplő fehérjék levonását követően az LC-MS/MS analízis 43 lehetséges hTG4 szubsztrát fehérjét azonosított (5. táblázat). Az azonosított szubsztrát fehérjék között a rekombináns hTG4 is megtalálható. Valószínűleg az enzim nem csak a BPA beépítését katalizálta, de a transzglutaminázokra jellemző módon lehetséges, hogy keresztkötésen keresztül szubsztrát molekulájához kapcsoltsa egy másik, a mintában jelen lévő rekombináns hTG4-et.

A BPA módosítás detektálása a fehérjékben megerősíti, hogy az azonosított fehérje valóban hTG4 szubsztrát-e. A 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, egy BPA módosítással rendelkező peptiddel lett azonosítva az Immunglobulin alfa-1 nehézlánc fehérje. 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, így ez a fehérje is szerepel az 5. táblázatban.

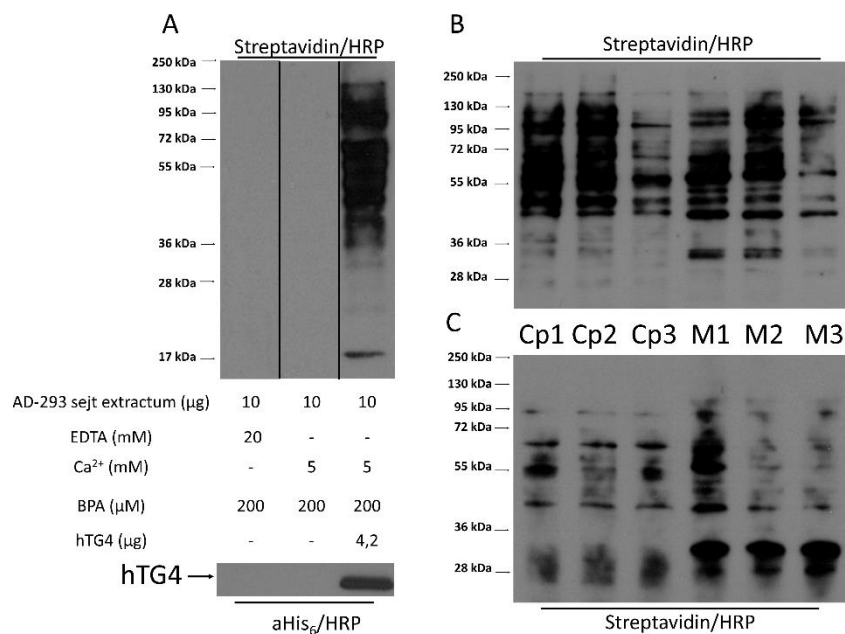
5. táblázat Nyálban azonosított potenciális hTG4 szubsztrát fehérjék.

Kód	Azonosított fehérje	Kód	Azonosított fehérje
1433T	14-3-3 fehérje théta	H12	Hiszton H1.2
1433Z	14-3-3 fehérje zéta/delta	H2AFJ	Hiszton H2A
RPS11	40S riboszómális fehérje S11	H3-3A	Hiszton H3
APMAP	Adipocita plazmamembránhoz kapcsolódó fehérje	FCGBP	IgGfc-kötő fehérje
A2M	Alfa-2-makroglobulin	IGHA2	Immunglobulin alfa-2 nehéz lánc
ACTN1	Alfa-aktinin-1	IGHA1	Immunglobulin alfa-1nehéz lánc
SLPI	Antileukoproteináz	IGLL5	Immunglobulin lambda-szerű polipeptid 5
BPIFA2	„BPI-fold-ot” tartalmazó A családtag 2	KRT14	I-es típusú keratin 14, citoskeletális
CA6	Szénsav-anhidráz 6	KRT2	II-es típusú keratin 2, citoskeletális
B4E112	Közepesen hasonló fehérje a cofilin-1-hez	SERPINB1	Leukocita elasztáz inhibitor
C3	Komplement C3	MMP9	Mátrix metalloproteináz-9
CFB	B komplement faktor	MUC5B	Mucin-5B
CST5	Cisztatin-D	MYH9	Miozin-9
CST4	Cisztatin-S	NUCB2	Nukleobindin-2
CYTN	Cisztatin-SN	PRDX1	Peroxiredoxin-1
CRISP3	Ciszteinben gazdag szekréciós fehérje 3	TGM4	Transzglutamináz 4
FGB	Fibrinogén béta lánc	SRSF3	Szerinben/argininben gazdag splicing faktor 3
FGG	Fibrinogén gamma lánc	TRFE	Szerotranszferrin
LGALS3BP	Galektin-3-kötő fehérje	TCN1	Transzkobalamin-1
GAPDH	Gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz	B4DUI5	Triózfoszfát izomeráz
HSPA1A	Hősokk 70 kDa fehérje 1A	VINC	Vinculin
HNRNPA2B1	Heterogén nukleáris ribonukleoprotein A2/B1	ZG16B	Zimogén granulum protein 16 homológ B

5.2.12. A humán TG4 képes biotin-pentilamin beépítésére az AD-293 sejtexteraktum fehérjéibe

Mivel a nyálban való hTG4 szubsztrát keresés csupán 1 BPA módosított fehérjét azonosított, mint lehetséges hTG4 szubsztrát, így AD-293 sejtexteraktumban is teszteltük glutamin-donor fehérje szubsztrátok létezését és jelenlétét. Az AD-293 sejtek nem expresszálnak egyetlen transzglutamináz izoformát sem, és nem mutatnak transzamidáz aktivitást (18. A ábra). AD-293 sejtexteraktumot 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 rekombináns hTG4 beépítette a BPA-t mindkét frakció számos fehérjéjébe, mind a három biológiai párhuzamos esetén (18. B ábra). Hogy a BPA jelölt fehérjék arányát megnöveljük a mintában, NeutrAvidin-agaróz affinitás kromatográfiát alkalmaztunk (18. C ábra), és ezt követően a mintákat fehérjék azonosítása céljából tömegspektrometriai (LC-MS/MS) analízisre küldtük. A NeutrAvidin-agarózhoz aspecifikusan kötődhetnek celluláris fehérjék, így ennek kiszűrésére kontroll mintákat készítettünk. Kezeletlen AD-293 sejtek fehérje kivonatával inkubáltuk a NeutrAvidin-agarózt, majd eluáltuk az aspecifikusan kötődött fehérjéket és ezeket is LC-MS/MS azonosításra küldtük.



18. ábra. Biotin-pentilamin (BPA) módosított fehérjék ellenőrzése AD-293 sejtextraktumokban. (A) A hTG4 transzamidáz aktivitása által AD-293 sejtextraktumba beépített BPA vizsgálatát Western blottal, a Streptavidin/HRP-t használva végeztük. A Western blot kép alsó része a hTG4 jelenlétét mutatja a mintában, anti-His₆/HRP-vel detektálva. A függőleges vonalak a membrán vágások helyét jelölik. Két független kísérlet reprezentatív képét mutatja az ábra. A reakció körülmények a képen táblázatban vannak megjelenítve és összefoglalva. BPA beépülés AD-293 citoplazmatikus (Cp) és magi (M) frakcióiba az enzimreakciót követően (B) és a BPA tartalmú szubsztrátok NeutrAvidin-agarózzal való elválasztása után (C). A Western blot analízis során a detektáláshoz Streptavidin/HRP-t használtunk.

Miután a kontroll mintákban detektált, nem specifikusan kötődött 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 (Kiegészítő táblázat S3, A kiegészítő táblázatok terjedelmük és formátumuk miatt nem illeszthetőek a függelékbe, de megtalálhatóak a közlemény kiegészítő file-ok között: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22212448/s1>). Az analízis 3-3 egymástól függetlenül készített citoplazmatikus és magi frakcióval lett elvégezve. BPA módosított peptid fragmentek bizonyították 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 tanulmányokra lenne szükség, hogy megerősítsük és meghatározzuk a többi fehérje reaktív glutaminját. A hTG4 szintén detektálva lett a háromból két citoplazmatikus és mind a három magi mintában.

A proteomikai adatok kiértékelésekor a fehérje azonosítási kritériumok alapján csak három szubsztrát fehérje volt BPA beépüléssel megerősítve. Viszont egy másik megközelítés alkalmazásával, a BPA-módosított peptidre fókuszálva szintén találhatunk szubsztrátokat és meghatározhatjuk a reaktív glutaminjukat. Így az adatokat a peptid fragmentek BPA módosításának jelenléte alapján szűrtük, az előzőleg alkalmazott fehérje meghatározás esetén érvényes szűrési feltételeket elhagytuk. 105 BPA tartalmú peptidet találtunk. Minden peptid esetén ellenőriztük a fragmentációs táblázatot, és azok a találatok, amelyekben legalább egymást követően 4 y vagy b fragment ion volt detektálva, a 6. Táblázatban vannak listázva (a 20 peptid 18 fehérjéből származik, mivel két fehérje esetén 2 módosított BPA fragment is jelen volt).

6. táblázat. A legalább négy egymást követő fragment ion sorozattal detektált BPA módosított peptideket tartalmazó lehetséges hTG4 szubsztrát fehérjék. A reaktív glutaminok aláhúzott és félkövér betűkkel vannak jelölve.

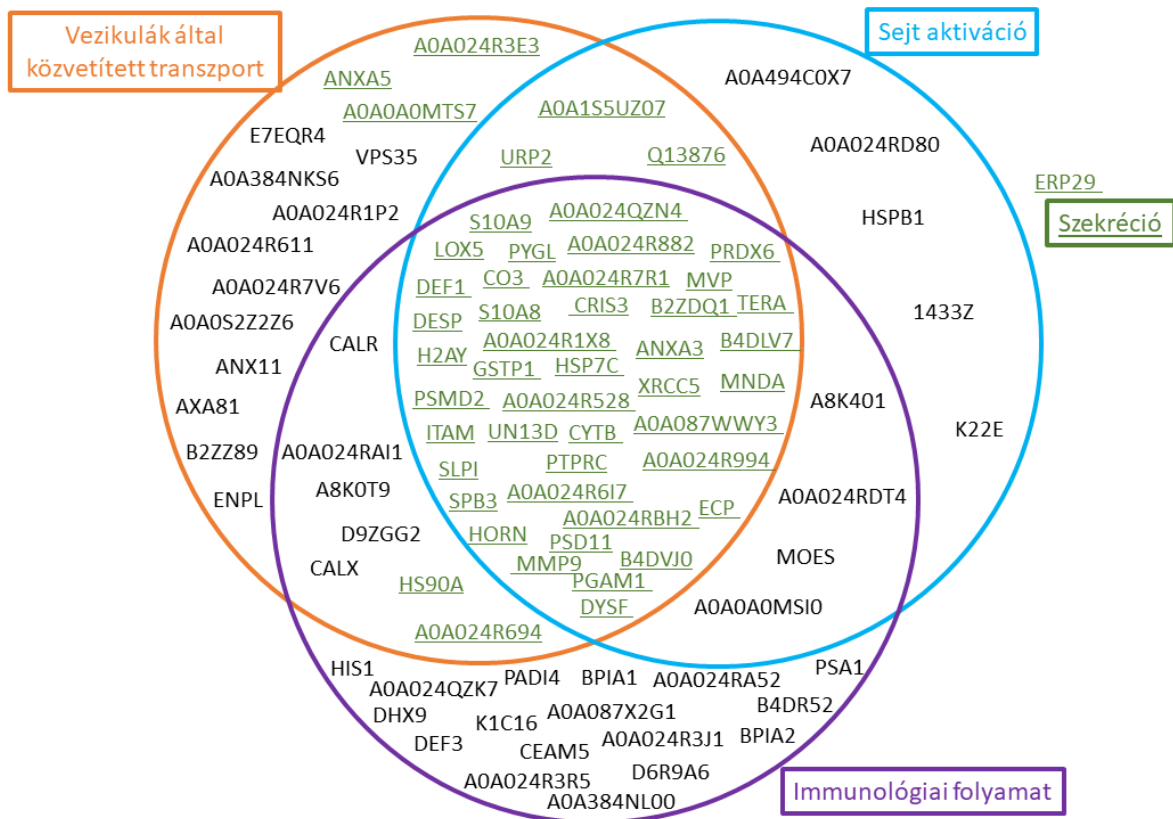
Kód	Azonosított fehérje	Celluláris lokalizáció	Összes spektrum találat	Reaktív Q ± 5 AA
1. B4GT5	Béta-1,4-galaktoziltranszferáz 5	Golgi készülék	13	AQVYE <u>Q</u> VLRSA
2. AGR13	Adhéziós G fehérjéhez kapcsolt receptor L3	Sejt membrán	2	HGSTI <u>Q</u> LSANT
3. ENO4	Enoláz 4	Citoszól	4	SKRG <u>Q</u> QITGK
4. CMYA5	Kardiomiopátiával összefüggő fehérje 5	Citoplazma, Sejtmag	4	SDLGR <u>Q</u> SGSIG
5. CHD1	Kromodomén-helikáz-DNS-kötő fehérje 1	Citoplazma, Sejtmag	1	LEHTR <u>Q</u> CLIKI
6. SAM15	Steril alfa-motívum domént tartalmazó fehérje 15	Nem elérhető	1	VPEEM <u>Q</u> RKATE
7. GRIN3	A G-fehérje által szabályozott neuritkinövés induktora	Plazma membrán	2	LPAQR <u>Q</u> MSRFK
8. K2C79	II-es típusú keratin 79, citoszkéletális	Citoszkeleton, Citoszól, Extracelluláris exoszóma	1	AEAWY <u>Q</u> TKYEE
9. PCDH17	Protokadherin-17	Sejt membrán	1	HNAKC <u>Q</u> LSLEV
10. F10A5	Feltételezett fehérje FAM 10A5	Citoplazma	1	PNAAI <u>Q</u> DCDRA
11. PCDB3	Protokadherin béta-3	Sejt membrán	1	NKQHF <u>Q</u> LSHQT
12. STAB2	Stabilin-2	Citoplazma, Sejt membrán	1	VARCS <u>Q</u> KGTKV
13. PLXA2	Plexin-A2	Sejt membrán	1	AVDGG <u>Q</u> DYFPT
14. F155A	Transzmembrán fehérje FAM155A	Membrán	1	<u>DKEHQ</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>Q</u>
15. ALKB8	Alkilezett DNS-javító fehérje alkB homológ 8	Sejtmag, Citoplazma	1	GCDRS <u>Q</u> NLVDI
16. IL6RA	Interleukin-6 receptor alegység alfa	Sejt membrán, Szekretált	1	PAEDF <u>Q</u> EPCQY
17. ZN363	RING-ujj és CHY cink-ujj domént tartalmazó fehérje 1	Citoplazma, Sejtmag	1	LAMNL <u>Q</u> GRHKC
18. FAM18A	FAM184A fehérje	ECM	1	<u>LCAEA</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>EAQ</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>M</u>

A 20 kiválasztott hTG4 által módosított peptid alapján megvizsgáltuk a reaktív glutaminok lineáris környezetét (19. ábra). Sajnos ez alapján a hTG4 által preferált konszenzus szubsztrát felismerő szekvencia egyértelmű megállapítása nem lehetséges. Azonban azt elmondhatjuk, hogy a reaktív Gln aminosavak közelében a hTG4 preferálja a poli-glutamin szakaszokat. Leu,

antigenitásának maszkírozásában is lehet szerepe, így főként az ehhez kapcsolódó Biológiai Folyamatokra fókuszáltunk. Az egyes GO Biológiai Folyamatokban található azonosított fehérjék nagy átfedést mutatnak. A Szekréciónhoz tartozó 58 azonosított fehérje tartalmazza a Szabályozott exocitózishoz és az Exocitózishoz csoportosított fehérteket is. A Vezikulák által közvetített transzport több olyan azonosított fehérjét is magába foglal, amelyek részt vesznek a szekréciónban, de ezen felül olyan azonosított fehérjéket is tartalmaz, amelyek más, a sejten belüli transzport folyamatokban működnek közre. Az Immunológiai folyamatokhoz köthető 75 azonosított fehérje mindegyike megtalálható a következő GO Biológiai Folyamatok közül legalább egyben: Neutrofil degranuláció, Az immunválaszban részt vevő mieloid sejtaktiváció, Mieloid leukocita aktiváció, Az immunválaszban szerepet játszó leukocita aktiváció, Leukociták által közvetített immunitás, Immun effektor folyamat, Leukociták aktiválása és Immunválasz folyamatok. A Sejtaktivációhoz tartozó fehérjék nagy része szintén átfed az Immunológiai folyamatokban található azonosított fehérjékkel. A Szekréciónhoz, a Vezikulák által közvetített transzporthoz, a Sejtaktivációhoz és az Immunológiai folyamathoz a 211 fehérjéből összesen 98 köthető (20. ábra). A teljes nyálban potenciális interakciós partnerként azonosított fehérjék jelentős része jelen van az Extracelluláris exoszóma és a Vezikula Sejt alkotókban (8. táblázat). Ez nyálfehérjék esetében nem meglepő, azonban még jobban megerősíti a hTG4 membránhoz, lipidekhez való kötődésének lehetőségét.

7. táblázat. A potenciális hTG4 interakciós partnerekhez tartozó első 20 legalacsonyabb FDR-ral rendelkező feldúsult GO Biológiai Folyamat a String online eszköz analízise alapján. A megfigyelt génszám a mintában azonosított adott GO Biológiai folyamathoz tartozó fehérjék számát, a háttér génszám pedig az adott a GO Biológiai Folyamathoz tartozó összes gén számát jelöli az adatbázisban a 2022. 01. 20-i adatok alapján.

	GO Biológiai Folyamat	Megfigyelt génszám	Háttér génszám	FDR
1.	Szabályozott exocitózis	53	697	1.06e-24
2.	Exocitózis	54	789	1.84e-23
3.	Neutrofil degranuláció	44	484	3.96e-23
4.	Az immunválaszban részt vevő mieloid sejtaktiváció	45	522	4.54e-23
5.	Szekréció	58	979	4.65e-23
6.	Mieloid leukocita aktiváció	46	585	1.81e-22
7.	Lokalizáció kialakítása a sejtben	86	2375	2.36e-22
8.	Sejtes lokalizáció	95	2967	1.20e-21
9.	Sejtaktiváció	58	1075	1.86e-21
10.	Az immunválaszban szerepet játszó leukocita aktiváció	46	626	1.86e-21
11.	Leukociták által közvetített immunitás	46	641	4.10e-21
12.	Immun effektor folyamat	54	969	1.89e-20
13.	Vezikulák által közvetített transzport	71	1805	1.36e-19
14.	Leukociták aktiválása	50	929	4.22e-18
15.	Immunválasz	64	1588	9.04e-18
16.	Kornifikáció	22	113	2.64e-17
17.	Lokalizáció	123	5591	1.88e-16
18.	Lokalizáció kialakítása	108	4479	3.11e-16
19.	Transzport	106	4353	4.18e-16
20.	Immunológiai folyamat	75	2481	1.34e-14



20. ábra A Vezikulák által közvetített transzport, a Sejt aktiváció, az Immunológiai folyamat és a Szekréció GO Biológiai Folyamat csoportokhoz tartozó potenciális hTG4 interakciós partner fehérjék csoportosítása. Az aláhúzással és zöld színnel jelölt Uniprot kódok a Szekréció GO Biológiai Folyamathoz tartozó fehérjéket jelöli. A fehérjék Uniprot kóddal szerepelnek az ábrán. A Uniprot kódok által jelölt fehérjék listáját a Függelék tartalmazza.

8. táblázat. A potenciális hTG4 interakciós partnerekhez tartozó első 10 legalacsonyabb FDR-ral rendelkező feldúsult GO Sejtalkotó a String online eszköz analízise alapján. A megfigyelt génszám a mintában azonosított adott GO Biológiai folyamathoz tartozó fehérjék számát, a háttér génszám pedig az adott a GO Biológiai Folyamathoz tartozó összes gén számát jelöli az adatbázisban a 2022. 01. 20-i adatok alapján.

	GO Sejtalkotó	Megfigyelt génszám	Háttér génszám	FDR
1.	Extracelluláris exoszóma	141	2099	4.95e-79
2.	Extracelluláris tér	152	3195	4.60e-68
3.	Vezikula	159	3879	5.71e-64
4.	Extracelluláris régió	162	4166	8.68e-63
5.	Szekrécións granulum lumen	41	324	1.17e-27
6.	Membránnal határolt organellum	201	12427	1.17e-25
7.	Szekrécións granulum	56	845	1.81e-25
8.	Organellum	204	13515	3.44e-22
9.	Citoszol	123	5193	6.57e-20
10.	Citoplazmatikus vezikula	81	2386	7.79e-20

6. Megbeszélés

6.1 A humán FXIII-A izopeptidáz aktivitásának követése a fehérje-peptid alapú anizotrópiás kinetikus mérési módszer adaptálásával

A hFXIII-A szerepe a véralvadásban és a fibrinolízisben jó példa arra, hogy a transzglutaminázok esszenciális biológiai folyamatokban vesznek részt fehérjék közötti keresztkötések kialakításával, majd később a korábban kialakított izopeptid kötések hasításával. Az α 2-plazmin inhibitor beépülése majd kihatása az alvadékból már korábbról ismert, azonban nincs bizonyíték arra, hogy a hFXIII-A képes elhasítani a korábban kialakított keresztkötéseket a fibrin alegységek között. Egy nemrégiben, a Zedira GmbH által kifejlesztett DD-XLink-mab monoklonális antitest képes felismerni a fibrin vagy fibrinogén γ - γ alegységei között a hFXIII-A által kialakított kovalens keresztkötéseket. Ez az antitest lehetővé teszi a fibrin degradációs termékek megkülönböztetését aszerint, hogy tartalmazzak-e izopeptid kötést vagy sem (3. ábra). A fibrin alegységek között kovalens keresztkötéseket tartalmazó, vérkeringésben cirkuláló D-dimer a véralvadás jelző molekulája és a megfelelő hFXIII-A aktivitás és mennyiség indikátora is.

Vizsgáltuk, hogy a DD-XLink-mab antitest alkalmazható-e az izopeptid kötés monitorozására. A kísérletet többször megismételtük, néhány esetben hosszabb inkubációs idővel és azt a következtetést vontuk le, hogy ez az antitest nem alkalmas a fibrin alegységek közötti izopeptid kötés mennyiségének pontos monitorozására. Ezt okozhatják technikai nehézségek a minták feltöltésével, az elektroforézissel vagy a blotolási módszerrel kapcsolatban. Valamint az is elképzelhető, hogy az inkubáció során újabb keresztkötések alakulnak ki, amelyek olyan eltérést okozhatnak a D-dimerek méretében, amely Western blottal nem detektálható, de az izopeptidáz kötés pontos detektálását befolyásolja. Viszont a keresztkötött fibrin degradációs termékek antitest alapú detektálása jó kvalitatív markere lehet a hFXIII-A transzamidáz aktivitásának a véralvadás során.

Véralvadási rendellenességek esetén a véralvadási faktorok pontos szintjének meghatározása esszenciális a betegség diagnosztizálásában és az adott véralvadási faktort helyettesítő vagy kiegészítő kezelés hatékonyságának ellenőrzéséhez. A hFXIII-A aktivitásának mérése kiváló eszközt biztosít a hFXIII-A rendellenességek azonosítására (Katona és mtsai, 2012). Érzékeny módszereket fejlesztettek ki a hFXIII-A transzamidáz aktivitásának mérésére fluoreszcensen, izotóposan vagy biotinnal jelölt aminosavakat használva, de

alkalmazásuk bonyolult és idő igényes. A mikrotiter lemez alapú módszerek jól reprodukálhatóak, számos szubsztrát használható a lemez lefedéséhez és számos biotin jelölt szubsztrát a beépülés detektálásához, azonban ezek a módszerek nagyon időigényesek és sok laboratóriumi munkát igényelnek (Slaughter és mtsai, 1992; Song és mtsai, 1994). 1971-ben **Lorand és munkatársai (1971)** közöltek egy fluoreszcens módszert, amely a danzil kadaverin beépülésén alapul dimetilált kazeinbe és képes a hFXIII-A automatizált detektálására a plazmában (Lorand és mtsai, 1971). Manapság két, széles körben használt kereskedelmi forgalomban kapható teszt létezik a hFXIII-A szint mérésére (Berichrom és Technochrom) és mindkettő a transzamidáz aktivitás első katalitikus lépésétől függ, amelyet ammónia felszabadulás követ (Durda és mtsai, 2018; Muszbek és mtsai, 1985). Ez a tulajdonság lehetővé teszi a reakció sebességnek valódi kinetikus monitorozását rövid idő alatt. A teszt előnye, hogy olyan változást detektál, amely lényegében független a második szubsztráttól és a lehetséges párhuzamosan történő hFXIII-A dezamidáz aktivitását is méri (Sivadó és mtsai, 2019; Katona és mtsai, 2012).

Korábban Yamada és Meguro (1977) publikáltak egy fluoreszcens anizotrópián alapuló hFXIII-A aktivitásmérési módszert, amelyben kazeint és mono-danzil kadaverint használtak szubsztrátként. Később Hauser és munkatársai (2017) részletesen megvizsgálták a fluoreszcencia anizotrópia változás monitorozásának lehetőségeit, előnyeit és hátrányait. A fluoreszcens anizotrópiát a transzglutamináz aktivitás következményeként, a fluoreszcensen jelölt szubsztrátok méretének és rotációs paramétereinek változásai okozzák. Arra a következtetésre jutottak, hogy a fluoreszcencia anizotrópia változás könnyű és kényelmes módja a transzglutamináz aktivitás követésére, amely az enzim mennyiséggel korrelál.

Kutatócsoportunk is kifejlesztett korábban egy anizotrópia mérést, amely ugyanazon szubsztrátok kombinálásával alkalmas a hTG2 transzamidáz és izopeptidáz aktivitásának kinetikus mérésére (Thangaraju és mtsai, 2016). Ezt a mérést a hFXIII-A transzamidáz és izopeptidáz aktivitásának tesztelésére próbáltuk adaptálni. A T26 peptid a hTG2 által preferált, specifikus peptid szubsztrátnak lett kifejlesztve, és csak igen alacsony reaktivitása van a hFXIII-A-ral (Sugimura és mtsai, 2006). Viszont a PI2 peptid az α 2-plazmin inhibitor N-terminálisának első 12 aminosavát tartalmazza, amely kitűnő hFXIII-A szubsztrát. Az alkalmazott fluoreszcensen jelölt peptidek keresztkötése az S100A4(GST)-hez egy jól detektálható anizotrópia változást generál (4. A ábra). 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. Viszont a FLpepT26 peptid FLpepPI2-re való cseréje a keresztkötés kialakítása, és az így keletkezett keresztkötött termék elhasítása esetén is megfelelő szubsztrátnak bizonyult a FXIII-A transzamidáz és izopeptidáz aktivitásának mérésére és kinetikusan detektálható jelet is eredményezett. A későbbiekben az izopeptidáz mérés előnyei miatt a z izopeptidáz mérés alkalmazhatóságára fókuszáltunk.

Az izopeptidáz aktivitás mérésünk esetén a K_m $4,10 \pm 0,76$ nM-nak, a v_{max} $54,92 \pm 1$, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{nM}$ hFXIII-A-nak adódott. Ez a K_m érték rendkívül alacsonynak számít más humán FXIII-A szubsztrátok esetén korábban publikált értékekhez képest. Például, **Oertel és munkatársai (2007)** által leírt fluorimetriás módszer esetén, amelyet szintén a hFXIII-A izopeptidáz aktivitásának mérésére fejlesztettek ki, a K_m érték a módosított peptid szubsztrát esetén $19,8 \pm 2,8$ μM volt. A széles körben használt transzglutamináz mérés esetében, amelyben a PI2 peptidből felszabaduló ammónia mennyiséget követik, a K_m érték 530 μM volt. A legegyszerűbb magyarázat erre az 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.

A plazma jelenlétében is teszteltük a hFXIII-A izopeptidáz aktivitását az anizotrópiás módszerrel, ahol a plazma mintát 1:10-es arányban adtuk a reakció elegyekhez. A fiziológiás hFXIII-A koncentráció átlagosan 68 nM (**Yorifuji és mtsai, 1998**) a referencia érték 69-143% között van (**Kárpáti és mtsai, 2000**), amely, ha figyelembe vesszük, a 10-szeres hígítást átfed a fehérje-peptid alapú mérési módszerünk lineáris tartományával. Ez azt mutatja, hogy ez az anizotrópiás izopeptidáz mérés alkalmas lehet a fiziológiás hFXIII-A szint mérésére humán vérplazmában. Ez a hFXIII-A koncentráció tartomány kisebb, mint a **Hauser és munkatársai (2017)** által közölt fluoreszcens anizotrópiás hTG2 aktivitás mérés esetén, ahol az optimális enzim koncentráció tartomány 0,5-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ volt, amely a mi módszerünk esetén körülbelül 5-63 nM hFXIII-A mennyiségnek felel meg. A diagnosztikus teszt reakciók általában 1/10 arányban tartalmazzak plazmát, ez a mérésünk esetében fiziológiás plazma hFXIII-A szinttel számolva 6,8 nM hFXIII-A koncentrációnak felel meg. Sajnos a mi módszerünkkel nem lehetséges a leg súlyosabb hFXIII-A rendellenesség a detektálása és megkülönböztetése, azokban az esetekben, ahol az enzim szintje kevesebb, mint a normál érték 5%-a, és súlyos vérzékenységgel jár.

Mivel *in vivo* a hFXIII-A fehérje szubsztrátokat használ, fehérje-peptid alapú mérés gyógyszerek teszteléséhez nagyon hasznos lenne, hiszen a hFXIII-A gátlása terápiás célpont a

nemkívánatos véralvadék stabilizálásának megelőzésében. Mérésünkben a IA és a ZED1301 inhibitor dózis-függő gátlást mutatott. Az IC₅₀ értékek nem hasonlíthatók össze különböző mérési körülmények között, de a jódacetamid koncentráció meglehetősen magas 50 nM hFXIII-A koncentráció esetén. Talán ez a magasabb jódacetamid koncentráció összefügghet a fehérje-peptid szubsztrátoknak a kis szubsztrát molekulákhoz képest potenciálisan nagyobb affinitásával. Lehetséges, hogy *in vivo* eltérő lehet a hFXIII-A inhibitorok hatékonysága, mint amilyen értékeket a kis szubsztrátokat használó mérések esetén mutatnak. Egy kinetikus fluoreszcencia anizotrópia alapú módszer inhibitorok tesztelésére is alkalmas lenne, mivel hatékony inhibitorok gyakran rendelkeznek fluoreszcens tulajdonságokkal, azonban ez nem befolyásolja szignifikánsan a detektált anizotrópia változást.

A mérésünk optimalizálása egy egyszerű microfluidikus felületre egy következő tanulmány tárgya lehet. Az izopeptidáz aktivitás méréséhez használt keresztkötött szubsztrát további tisztítása tovább fejleszthetné ezt a módszert. Emellett olyan szubsztrát molekulák szelektálása, amelyek csak egy reaktív aminosavat tartalmaznak jól hozzáférhető pozícióban és hasonló méretűek, mint az S100A4(GST) a transzglutamináz enzimsaládtagok kinetikus aktivitásának mérésére széles körben alkalmazható tesztek fejlesztését tenné lehetővé. Kísérleteink felvetik a lehetőségét izoenzim specifikus fehérje-peptid alapú mérések fejlesztésnek, több együtt kifejeződő transzglutamináz enzim aktivitásának mérésére biológiai mintákban.

6.2 A humán TG4 biokémiai karakterizálása

A humán transzglutaminázok egyre nagyobb figyelmet kapnak, a biológiai funkciójuk és a potenciális orvosi relevanciájuk miatt, de a tudásunkban van egy apró fekete folt, a humán TG7 és TG4 biokémiai tulajdonságait, szöveti eloszlását, szubsztrátjait és interakciós partnereit illetően. Korábban már kimutatták, hogy a hTG4-et számos szövet kifejezi mRNS szinten, de kb. 200-szor kisebb mértékben, mint a prosztata (**Rivera-Gonzalez és mtsai, 2012**). Nemrégiben más tanulmányok hasonló következtetésre jutottak mind mRNS, mind fehérje szinten, hogy a hTG4 kifejeződik, azonban prosztatától eltérő szövetekben csak kismértékben (Lopez-Bujanda és mtsai, 2021). Annak érdekében, hogy megerősítsük a hTG4 jelenlétét a prosztatán kívüli szövetekben is, proteomikai adatbázisokat vizsgáltunk át, egyedi peptidek detektálására fókuszálva. Ezekben a valós kísérletekből származó adatsorokban a vizsgálataink alapján a hTG4 megtalálható a magzati szívben, a vastagbélben és a nyálmirigyekben, amely forrása lehet a nyál TG4-nek (**Perez és mtsai, 2013**). Szendvics ELISA mérés kimutatta, hogy

a hTG4 szintén előfordul vérszérumban, ennek forrása azonban máig ismeretlen, hasonlóan a PSA antigénhez, amely szintén minimális mennyiségben, de kimutattak nők szérumában is **(Drabovich és mtsai, 2019)**. A TGM4 génre vonatkozó transzkripció adatok alapján lehetséges, hogy egy nagyobb érzékenységgű tömegspektrometriás műszer és technika alkalmazása lehetővé teszi majd az alacsony szintű hTG4 fehérje detektálását a bélben és annak szekretórikus epitéliális szerkezeteiben, a nyálmirigyekben és a nyálban **(Perez és mtsai, 2013)**.

A hTG4 katalitikus tulajdonságait teszteltük rögzített N,N dimetilált-kazeint és szolubilis BPA-t használva, amelyek általánosan elfogadott szubsztrátok a transzglutamináz enzimcsalád számára. Ez az egyik legérzékenyebb transzglutamináz mérés, de a megfigyelt hTG4 aktivitás értékek alacsonyak voltak, még emelkedő mennyiségű enzimek esetén is. Pozitív kontrollként a hTG2-t használtuk, hogy bizonyítsuk a kísérletek beállításai megfelelőek voltak. Vizsgáltuk a pH és SDS koncentrációk, redukáló és oxidáló reakció körülmények hatását, azonban csak az alacsony SDS koncentrációk esetén volt megfigyelhető a hTG4 emelkedett transzamidáz aktivitása. Hasonló jelenség volt megfigyelhető a patkány TG4 esetén, amely magasabb aktivitást mutatott, körülbelül 1,5 mM SDS jelenlétében **(Esposito és mtsai, 1996)**. Ez nem egyedi, azonban ritka enzimikus tulajdonság, amelyet például a polifenol oxidáz esetében is ismerünk **(Moore és Flurkey, 1990)**. Általában az SDS a fehérjék denaturációját és inaktivációját okozza, azonban szubmicelláris koncentrációban (<1,5 mM) az SDS képes elősegíteni egy egyensúlyi köztitermék képződését **(Bhuyan, 2010)**, amely valószínűleg egy szabadabb, lazább szerkezetet eredményez, amely hozzájárul az aktív konformációhoz. Az SDS koncentrációjának további növelése a fehérje teljes denaturációjához vezet. A hTG4 esetén megfigyelt magas hőstabilitás tovább erősíti ezt az elméletet. Az SDS kötődhet a hTG4-hez hidrofób és elektrosztatikus interakciókkal **(Esposito és mtsai, 1996)**, növelve annak oldékonyságát vagy lazítva az inaktív konformációt. Másik lehetőség az, hogy más transzglutaminázokkal való alacsony hasonlóság alapján a hTG4-nek lehet, hogy kevesebb Ca²⁺-kötő helye van. *In vitro* az izolált patkány TG4 aktív hozzáadott kalcium-ion nélkül két magas affinitású kalcium kötőhellyel rendelkezik **(Esposito és mtsai, 1996)**. Talán a transzglutamináz családtagok kalciumkötő tulajdonságai közötti különbség lehet a felelős az eredetileg megfigyelt alacsony hTG4 transzamidáz aktivitásáért. Az SDS aktiváció utánoszhatja más amfipatikus biomolekulák kötődését, szabályozva a hTG4 aktivitását.

Eredményeink alapján a hTG4 az enyhén savas pH értéket preferálja, amely megfelelő a humán vaginális kondícióknak az egér TG4-gyel ellentétben, amely a bázikus spermában aktív,

a párzási dugó formálásakor. A hTG4-nek ez a tulajdonsága összefügg a humán szexuális stratégia változásával, amely a spermiumok versenyének megszűnésével járt **(Carnahan és Jensen-Seaman, 2008)**. A hTG4, ha jelen van a bélben, ahol a pH 7 alá is csökkenhet, az enyhén emelheti a transzglutamináz aktivitást. A bázikus pH preferenciájának hiánya szintén segíthet csillapítani a lehetséges hTG4 aktivitást a vérkeringésben. Az egér TG4 magasabb aktivitást mutatott oxidáló körülmények között, amely összefügg a redukáló ágensek hiányával a spermában. A hTG4 a redukáló körülményeket preferálja, amely azt sugallja, hogy a transzglutamináz aktivitása szerepet játszhat intracelluláris folyamatokban. Teszteltük a lehetséges szabályzó szerepét a GTP-nek a hTG4 enzimen, azonban a patkány ortológjával ellentétben (a szekvencia hasonlóság 53,3%) a humán enzim nem képes kötni a guanin-trifoszfát nukleotidot **(Mariniello és mtsai, 2003)**. A hTG2 GTP-kötő tulajdonsága jól dokumentált és a kötésben részt vevő aminosavakat is meghatározták a GDP kötött hTG2 röntgen szerkezete alapján **(Liu és mtsai, 2002)**. A hTG4 és a hTG2 szekvenciájának illesztésekor a hasonlóság alacsonynak bizonyult a két transzglutamináz között (42%) **(Jiang és Ablin, 2011)** és a GTP kötő aminosavak is hiányoznak a hTG4 esetén. A fibronectin kötőhelyek hiányát is megfigyeltük ellentétben a hTG2-vel. A hTG4 GTP általi negatív szabályozásának hiánya elősegíti az enzim hatását a tumorok invazivitásának növeléséhez. prosztatadaganat sejtekben a hTG4 jelenléte negatív prognosztikus marker **(Lopez-Bujanda és mtsai, 2021)**.

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. A fiziológias trombin hasítás esszenciális a hFXIII-A aktivitásához **(Muszbek és mtsai, 2011)**. A hTG1, a hTG3 és a hTG5 esetében is szükség van proteolitikus hasításra. A hTG1-et aktiválhatja az m-kalpain, μ -kalpain és a diszpáz, a hTG3-at pedig a katepszin-L vagy a diszpáz **(Kim és mtsai, 1995; Hitomi és mtsai, 2000; Cheng és mtsai, 2006; Hitomi és mtsai 1999)**. A hTG5 esetében az aktiváló proteázt még nem azonosították de AD-293 sejtekben az exogéne kifejezett hTG5 egy inaktív teljes és egy aktív proteolitikusan processzált rövidebb formában volt jelen. Eredményeink azt sugallják, hogy a limitált proteolízis hasonló körülmények között nagy valószínűséggel nem vesz részt a hTG4 enzim processzáálásában és aktiválásában.

A humán TG4-et stabilan expresszáló sejtvonal kialakítása hasznos eszköz az enzim biológiai funkciójának vizsgálataihoz. A hTG4 gén expressziójának szabályozásában a retinsav és az androgének vesznek részt. Retinsav receptorokat expresszáló sejtekben, a TG4

expresszióját vizsgáltuk ATRA kezelés hatására. LNCap és PC346C prosztataadaganat sejtekben ez a kezelés a hTG4 mRNS expressziójának növelését indukálta (**Rivera-Gonzales és mtsai, 2012**), azonban az általunk vizsgált sejtekben fehérje szinten nem volt kimutatható a hTG4 expresszió. Ezt követően vírus infekcióval 3xFlag-TG4-et stabilan expresszáló AD-293 sejtvonalat alakítottunk ki. Ez a sejtvonal alkalmas lehet a proteolitikus aktiválás, a hTG4 szekréciónak és biológiai funkcióinak a vizsgálatához.

A monoklonális anti-TG4 antitesttel detektáltuk egy kb. 55 kDa méretű hTG4 fragmentet humán nyálmintákban. Feltételeztük, hogy talán a nyál vezikuláris frakciójában is jelen lehet a hTG4, ezért ultracentrifugálással izoláltuk a nyál vezikuláris frakcióját. Ebben a frakcióban már nem csak a fragment, de a teljes méretű hTG4 enzim is megjelent, feldúsult. A hTG4 nyálban való jelenlétét a proteomikai adatbázisok újra elemzése is alátámasztja.

Annak érdekében, hogy a hTG4 szubsztrát preferenciájáról információt nyerjünk elsőként a nyálban próbáltuk azonosítani az enzim szubsztrátjait, biotin-pentilamin beépülés proteomikai azonosításával. Neutravidin agaróz affinitás kromatográfia és tömegspektrometria segítségével. 44 lehetséges hTG4 szubsztrátot azonosítottunk a nyálban, azonban egyedül az immunglobulin alfa-1 nehézlánc fehérje esetén lett a fehérje reaktív glutaminját felfedő BPA módosított peptid azonosítva. Más immunfolyamatokban részt vevő nyál fehérjét is azonosítottunk, mint potenciális hTG4 szubsztrát. Ilyen fehérje az alfa-2-makroglobulin, a „BPI-fold”-ot tartalmazó A családtag 2, a ciszteinben gazdag szekréciónak fehérje 3 és a galektin-3-kötő fehérje. Emellett a lehetséges hTG4 szubsztrátok között proteáz gátló aktivitással bíró fehérjéket is azonosítottunk. Ilyen fehérjék az alfa-2-makroglobulin, az antileukoproteináz, Cisztatin-D, -SN, és -S izoformák. A száj nyálkahártya kialakításában részt vevő IgGFC-kötő fehérje és a Mucin-5B is a potenciális hTG4 szubsztrátként lett azonosítva a nyálban.

Hogy egy esetleges konszenzus hTG4 szubsztrát szekvenciát kapjunk, azonosítottuk az enzim celluláris szubsztrátjait is AD-293 sejtekben, LC-MS/MS alapú módszert alkalmazva. A hTG2-höz hasonlóan (**Kanchan és mtsai, 2013**) a hTG4 számos fehérjét képes glutamin donor szubsztrátként használni az AD-293 sejtekben. Miután kiválasztottuk a legmegbízhatóbb találatokat az eredményekből konszenzus szekvencia nem volt meghatározható. Referenciaként a TRANSDAB transzglutamináz szubsztrát adatbázist ellenőriztük (http://genomics.dote.hu/mediawiki/index.php/Main_Page, megtekintve 2021.július.01.) (**Csoz és mtsai, 2009**) és azt találtuk, hogy néhány újonnan azonosított hTG4 szubsztrát más transzglutaminázoknak is szubsztrátja, például a II-es típusú citoskeletális keratin 1 a hFXIII-

A-nak, a filaggrin a hTG1-nek és a hTG3-nak is szubsztrátjai. Van néhány hasonlóság, például 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 **(Tseng és mtsai, 2009)**. 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 szubsztrát fehérjéknek. A membrán kötött fehérjékre fókuszáltunk, mivel a hTG4 túlzott kifejezése hozzájárul a prosztatadaganatos sejtek invazivitásához, megnövelve azok adhézióját és migrációját **(Jiang és Ablin, 2011)**. A „Human Protein Atlas” alapján, az Adhéziós G protein kapcsolt receptor L3 gyakran jelen van mell, prostata, és kolorektális daganatokban. A protokadherinek, a kadherin enzimesaládtagjai esszenciálisak a normál sejt-sejt interakciók fenntartásához, és részt vesznek az epithelialis-mezenhimális átalakulásban (EMT) **(Yu és mtsai, 2019)**. A Plexin-A2 szemaforin koreceptorként részt vesz az invazív sejt növekedésben és migrációban. 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 **(Eckert és mtsai, 2014)**. 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 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.

A TG4 szubsztrátok keresése mellett az enzim interakciós partnereit is megkíséreltük felderíteni a nyálban. 280 potenciális hTG4 interakciós partnert azonosítottunk, amelyek közül 211 fehérjét a String interakciós adatbázis segítségével GO Biológiai Funkcióhoz köthetünk. Ezeknek a fehérjéknek a nagy része a Vezikulák által közvetített transzport, a Sejt aktiváció, az Immunológiai folyamat és a Szekréció GO Biológiai Folyamatokhoz kapcsolódik. A nyál

feladata nagyon összetett, egyrészt nedvesen tartja a szájüreget, és védi annak nyálkahártyáját a kiszáradástól, illetve folyamatos öblítés révén tisztítja is a szájüreget. Megkönnyíti a rágást és a nyelést is, valamint részt vesz az emésztésben. A fogakat ásványi anyag szükségletét is biztosítja, és képes a savak semlegesítésére is. Mindemellett pedig védelmi vonalaként is szolgál a baktériumok, vírusok és gombák ellen (**Carpenter, 2013**). Mivel a hTG4 jelen van a nyál vezikuláiban, és sok potenciális interakciós partnere köthető a szekréciónak, immunológiai és vezikulák által közvetített transzport folyamatokhoz, elképzelhető, hogy a hTG4-nek szerepe van a nyálban a mikrobiális védelemben, az emésztésben vagy akár az ásványi anyagok transzportjában is. A nyálban azonosított interakciós partnerek között 16 olyan fehérje van, amely lehetséges hTG4 szubsztrátként is azonosítva volt a nyálban. Ilyen fehérje például a 14-3-3 fehérje zéta/delta izofoma, az antileukoproteináz, a „BPI-fold”-ot tartalmazó A családtag 2, a cisztatin-SN és a vinculin is. A 14-3-3 fehérje zéta/delta fehérjének sok kötődési partnere van, amelyekhez általában azok foszfoszerin vagy foszfozionin motívumán keresztül kötődik és általában a kötődési partner aktivitását befolyásolja (**Angrand és mtsai, 2006**). Az antileukoproteináz fehérje egy saválló proteináz inhibitor, amely többek között a tripszin, elasztáz és a katepszin G aktivitását képes gátolni. Emellett a gyulladáscsökkentés- és az immunválaszok szabályozásában is részt vesz bakteriális fertőzések esetén (**Klimenkova és mtsai, 2014**). A „BPI-fold”-ot tartalmazó A családtag 2 fehérjének erős antibakteriális hatása van (**Prokopovic és mtsai, 2014**). A cisztatin-SN egy nyálban található cisztein proteináz inhibitor, a papain inhibitora (**Saitoh és mtsai, 1987**). A vinculin 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 (**Le Clainche és mtsai, 2010**). A hTG4 prosztataadaganat sejtekben csökkentette az E-kadherin szintjét (**Ablin és Jiang, 2011**), elképzelhető, hogy a vinculinvaló kölcsönhatás révén. Az interakciós partnerek megerősítése a munkacsoportunk jövőbeli feladata, amelyhez a fent felsorolt fehérjék ellenőrzése jó kiindulási pont lehet.

7. 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 prosztatadaganatok 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 mikrotiter 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.

7. Summary

The importance of research on transglutaminases is confirmed by their many industrial and translational medicinal applications. Inhibition of human FXIII-A (hFXIII-A) transamidase activity shows increasing potential in treating thrombosis and preventing unwanted blood coagulation. However, hFXIII-A can also destabilize the clot by its poorly known isopeptidase activity. We have developed a peptide-protein-based anisotropic activity assay that allows studying both directions of reactions catalyzed by hFXIII-A, using the same substrate molecules, as two substrate molecules for measurement of transamidase activity (FLpepPI2 and S100A4(GST)) and as a previously crosslinked substrate for monitoring isopeptidase activity (FLpepPI2-S100A4(GST)). Peptide-protein substrates can mimic the *in vivo* substrates of hFXIII-A during clot modification to study the opposite activities of mutant hFXIII-A enzymes and the effect of regulatory molecules that regulate hFXIII-A activities.

Another secreted family member, the human TG4 (hTG4) is involved in the development of APS1 autoimmune disease and prostate tumours. Rodent TG4 enzymes are well characterized compared to the human orthologue. Characterisation of hTG4 biochemical properties could help to understand its function and role in humans. Reanalysis of proteomic databases revealed that hTG4 is also expressed outside the prostate. The activity and regulation of hTG4 transamidase activity were studied *in vitro* using the classical microtiter plate method. The hTG4 has low transamidase activity, and it prefers a slightly acidic pH and reducing environment. The activating effect of SDS in submicellar concentration was observed, suggesting that the enzyme exerts its activity in membrane-bound form. In contrast to rat TG4, hTG4 can not bind GTP. Proteolytic activities, which are known to activate other transglutaminases were not observed upon the incubation of hTG4 with dispase or expressing hTG4 exogenously in AD-293 cells. In saliva, we identified 280 potential hTG4 interaction partners, mostly involved in secretion, immune processes, and vesicular transport correlating with the enrichment of hTG4 in the vesicular fraction of saliva. Several hTG4 glutamine donor substrates were identified in saliva and AD-293 cell extract. Some of these substrates are involved in cell-cell interactions, adhesion, and proliferation, suggesting that hTG4 could become an anti-cancer therapeutic target.

Our results contribute to a better understanding of the properties of hTG4 and hFXIII-A and confirm that these proteins are real targets in the therapy of common diseases.

8. Irodalomjegyzék

Ablin, R. J., Kynaston, H. G., Mason, M. D., & Jiang, W. G. (2011). Prostate transglutaminase (TGase-4) antagonizes the anti-tumour action of MDA-7/IL-24 in prostate cancer. *Journal of translational medicine*, 9, 49. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-49>

Ablin, R. J., Owen, S., & Jiang, W. G. (2017). Prostate Transglutaminase (TGase-4) Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Cells. *Anticancer research*, 37(2), 481–487. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11340>

Adány R, Bárdos H, Antal M, Módis L, Sárváry A, Szücs S, Balogh I. Factor XIII of blood coagulation as a nuclear crosslinking enzyme. *Thromb Haemost*. 2001 May;85(5):845-51. PMID: 11372678.

Ahonen, P., Myllärniemi, S., Sipilä, I., & Perheentupa, J. (1990). Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *The New England journal of medicine*, 322(26), 1829–1836. <https://doi.org/10.1056/NEJM199006283222601>

Ahvazi, B., Boeshans, K. M., Idler, W., Baxa, U., Steinert, P. M., & Rastinejad, F. (2004). Structural basis for the coordinated regulation of transglutaminase 3 by guanine nucleotides and calcium/magnesium. *The Journal of biological chemistry*, 279(8), 7180–7192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312310200>

Al-Jallad HF, Nakano Y, Chen JL, McMillan E, Lefebvre C, Kaartinen MT. (2006) Transglutaminase activity regulates osteoblast differentiation and matrix mineralization in MC3T3–E1 osteoblast cultures. *Matrix Biol* 25:135–148

An, G., Meka, C. S., Bright, S. P., & Veltri, R. W. (1999). Human prostate-specific transglutaminase gene: promoter cloning, tissue-specific expression, and down-regulation in metastatic prostate cancer. *Urology*, 54(6), 1105–1111. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(99\)00298-8](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(99)00298-8)

Angrand, P. O., Segura, I., Völkel, P., Ghidelli, S., Terry, R., Brajenovic, M., Vintersten, K., Klein, R., Superti-Furga, G., Drewes, G., Kuster, B., Bouwmeester, T., & Acker-Palmer, A. (2006). Transgenic mouse proteomics identifies new 14-3-3-associated proteins involved in cytoskeletal rearrangements and cell signaling. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5(12), 2211–2227. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600147-MCP200>

Bagoly, Z., Haramura, G., & Muszbek, L. (2007). Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot. *Thrombosis and haemostasis*, 98(2), 359–367.

Bagoly, Z., Katona, E., & Muszbek, L. (2012). Factor XIII and inflammatory cells. *Thrombosis research*, 129 Suppl 2, S77–S81. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.02.040>

Bernassola, F., Federici, M., Corazzari, M., Terrinoni, A., Hribal, M. L., De Laurenzi, V., Ranalli, M., Massa, O., Sesti, G., McLean, W. H., Citro, G., Barbetti, F., & Melino, G. (2002). Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(11), 1371–1378. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0689com>

Bhuyan A. K. (2010). On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. *Biopolymers*, 93(2), 186–199. <https://doi.org/10.1002/bip.21318>

Biri, B., Kiss, B., Király, R., Schlosser, G., Láng, O., Kőhidai, 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>

- Bognar, P., Nemeth, I., Mayer, B., Haluszka, D., Wikonkal, N., Ostorhazi, E., John, S., Paulsson, M., Smyth, N., Pasztoi, M., Buzas, E. I., Szipocs, R., Kolonics, A., Temesvari, E., & Karpati, S. (2014). Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice. *The Journal of investigative dermatology*, 134(1), 105–111. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.307>
- Candi, E., Melino, G., Lahm, A., Ceci, R., Rossi, A., Kim, I. G., Ciani, B., & Steinert, P. M. (1998). Transglutaminase 1 mutations in lamellar ichthyosis. Loss of activity due to failure of activation by proteolytic processing. *The Journal of biological chemistry*, 273(22), 13693–13702. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13693>
- Candi, E., Oddi, S., Paradisi, A., Terrinoni, A., Ranalli, M., Teofoli, P., Citro, G., Scarpatò, S., Puddu, P., & Melino, G. (2002). Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis. *The Journal of investigative dermatology*, 119(3), 670–677. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01853.x>
- Candi, E., Oddi, S., Terrinoni, A., Paradisi, A., Ranalli, M., Finazzi-Agró, A., & Melino, G. (2001). Transglutaminase 5 cross-links loricrin, involucrin, and small proline-rich proteins in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 276(37), 35014–35023. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010157200>
- Carnahan, S. J., & Jensen-Seaman, M. I. (2008). Hominoid seminal protein evolution and ancestral mating behavior. *American journal of primatology*, 70(10), 939–948. <https://doi.org/10.1002/ajp.20585>
- Carpenter G. H. (2013). The secretion, components, and properties of saliva. *Annual review of food science and technology*, 4, 267–276. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182700>
- Carrell, N. A., Erickson, H. P., & McDonagh, J. (1989). Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits. *The Journal of biological chemistry*, 264(1), 551–556.
- Cassidy, A. J., van Steensel, M. A., Steijlen, P. M., van Geel, M., van der Velden, J., Morley, S. M., Terrinoni, A., Melino, G., Candi, E., & McLean, W. H. (2005). A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *American journal of human genetics*, 77(6), 909–917. <https://doi.org/10.1086/497707>
- Cheng, T., Hitomi, K., van Vlijmen-Willems, I. M., de Jongh, G. J., Yamamoto, K., Nishi, K., Watts, C., Reinheckel, T., Schalkwijk, J., & Zeeuwen, P. L. (2006). Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site. A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. *The Journal of biological chemistry*, 281(23), 15893–15899. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600694200>
- Cho, S. Y., Choi, K., Jeon, J. H., Kim, C. W., Shin, D. M., Lee, J. B., Lee, S. E., Kim, C. S., Park, J. S., Jeong, E. M., Jang, G. Y., Song, K. Y., & Kim, I. G. (2010). Differential alternative splicing of human transglutaminase 4 in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Experimental & molecular medicine*, 42(4), 310–318. <https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.4.031>
- Coopland, A., Alkjaersig, N., & Fletcher, A. P. (1969). Reduction in plasma factor 13 (fibrin stabilizing factor) concentration during pregnancy. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 73(1), 144–153.
- Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology*, 26(12), 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- Csapó A, Katona É, Szücs G, Haramura G, Muszbek L (2009) Factor XIII in cerebrospinal fluid. *J Thromb. Haemost*, 7 (Suppl 2), p. 386

- Cserhalmi-Friedman, P. B., Milstone, L. M., & Christiano, A. M. (2001). Diagnosis of autosomal recessive lamellar ichthyosis with mutations in the TGM1 gene. *The British journal of dermatology*, 144(4), 726–730. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2001.04126.x>
- Csosz, E., Meskó, B., & Fésüs, L. (2009). Transdab wiki: the interactive transglutaminase substrate database on web 2.0 surface. *Amino acids*, 36(4), 615–617. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0121-y>
- Dardik, R., Krapp, T., Rosenthal, E., Loscalzo, J., & Inbal, A. (2007). Effect of FXIII on monocyte and fibroblast function. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 19(1-4), 113–120. <https://doi.org/10.1159/000099199>
- Dardik, R., Leor, J., Skutelsky, E., Castel, D., Holbova, R., Schiby, G., Shaish, A., Dickneite, G., Loscalzo, J., & Inbal, A. (2006). Evaluation of the pro-angiogenic effect of factor XIII in heterotopic mouse heart allografts and FXIII-deficient mice. *Thrombosis and haemostasis*, 95(3), 546–550. <https://doi.org/10.1160/TH05-06-0409>
- Dardik, R., Solomon, A., Loscalzo, J., Eskaraev, R., Bialik, A., Goldberg, I., Schiby, G., & Inbal, A. (2003). Novel proangiogenic effect of factor XIII associated with suppression of thrombospondin 1 expression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(8), 1472–1477. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000081636.25235.C6>
- Davies, G., Ablin, R. J., Mason, M. D., & Jiang, W. G. (2007). Expression of the prostate transglutaminase (TGase-4) in prostate cancer cells and its impact on the invasiveness of prostate cancer. *Journal of experimental therapeutics & oncology*, 6(3), 257–264.
- De Laurenzi, V., & Melino, G. (2001). Gene disruption of tissue transglutaminase. *Molecular and cellular biology*, 21(1), 148–155. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.1.148-155.2001>
- Dean M. D. (2013). Genetic disruption of the copulatory plug in mice leads to severely reduced fertility. *PLoS genetics*, 9(1), e1003185. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003185>
- Desiere, F., Deutsch, E. W., King, N. L., Nesvizhskii, A. I., Mallick, P., Eng, J., Chen, S., Eddes, J., Loevenich, S. N., & Aebersold, R. (2006). The PeptideAtlas project. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D655–D658. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj040>
- Deutsch, E. W., Csordas, A., Sun, Z., Jarnuczak, A., Perez-Riverol, Y., Ternent, T., Campbell, D. S., Bernal-Llinares, M., Okuda, S., Kawano, S., Moritz, R. L., Carver, J. J., Wang, M., Ishihama, Y., Bandeira, N., Hermjakob, H., & Vizcaíno, J. A. (2017). The ProteomeXchange consortium in 2017: supporting the cultural change in proteomics public data deposition. *Nucleic acids research*, 45(D1), D1100–D1106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw936>
- Devine, D. V., & Greenberg, C. S. (1988). Monoclonal antibody to fibrin D-dimer (DD-3B6) recognizes an epitope on the gamma-chain of fragment D. *American journal of clinical pathology*, 89(5), 663–666. <https://doi.org/10.1093/ajcp/89.5.663>
- Dixson, A. L., & Anderson, M. J. (2002). Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in primates. *Folia primatologica; international journal of primatology*, 73(2-3), 63–69. <https://doi.org/10.1159/000064784>
- Drabovich, A. P., Saraon, P., Drabovich, M., Karakosta, T. D., Dimitromanolakis, A., Hyndman, M. E., Jarvi, K., & Diamandis, E. P. (2019). Multi-omics Biomarker Pipeline Reveals Elevated Levels of Protein-glutamine Gamma-glutamyltransferase 4 in Seminal Plasma of Prostate Cancer Patients. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 18(9), 1807–1823. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001612>

Dubbink, H. J., Cleutjens, K. B., van der Korput, H. A., Trapman, J., & Romijn, J. C. (1999a). An Sp1 binding site is essential for basal activity of the human prostate-specific transglutaminase gene (TGM4) promoter. *Gene*, 240(2), 261–267. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00454-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00454-0)

Dubbink, H. J., de Waal, L., van Haperen, R., Verkaik, N. S., Trapman, J., & Romijn, J. C. (1998). The human prostate-specific transglutaminase gene (TGM4): genomic organization, tissue-specific expression, and promoter characterization. *Genomics*, 51(3), 434–444. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5393>

Dubbink, H. J., Hoedemaeker, R. F., van der Kwast, T. H., Schröder, F. H., & Romijn, J. C. (1999). Human prostate-specific transglutaminase: a new prostatic marker with a unique distribution pattern. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 79(2), 141–150.

Dubbink, H. J., Verkaik, N. S., Faber, P. W., Trapman, J., Schröder, F. H., & Romijn, J. C. (1996). Tissue specific and androgen-regulated expression of human prostate-specific transglutaminase. *The Biochemical journal*, 315 (Pt 3)(Pt 3), 901–908. <https://doi.org/10.1042/bj3150901>

Durda, M. A., Wolberg, A. S., & Kerlin, B. A. (2018). State of the art in factor XIII laboratory assessment. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, 57(6), 700–704. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2018.07.006>

Eckert, R. L., Kaartinen, M. T., Nurminskaya, M., Belkin, A. M., Colak, G., Johnson, G. V., & Mehta, K. (2014). Transglutaminase regulation of cell function. *Physiological reviews*, 94(2), 383–417. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2013>

Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A. M., Ruse, M., & Rorke, E. A. (2005). Transglutaminase function in epidermis. *The Journal of investigative dermatology*, 124(3), 481–492. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23627.x>

Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Jans, R., Kraft, C. A., Jiang, H., & Rorke, E. A. (2009). TIG3: a regulator of type I transglutaminase activity in epidermis. *Amino acids*, 36(4), 739–746. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0123-9>

Emdad, L., Lebedeva, I. V., Su, Z. Z., Gupta, P., Sauane, M., Dash, R., Grant, S., Dent, P., Curiel, D. T., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2009). Historical perspective and recent insights into our understanding of the molecular and biochemical basis of the antitumor properties of mda-7/IL-24. *Cancer biology & therapy*, 8(5), 391–400. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.5.7581>

Esposito, C., Caputo, I., Colicchio, P., Porta, R., & Ragone, R. (1999). Overlapping between fluorescence modifications and activation of prostate transglutaminase induced by sodium dodecyl sulfate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 366(1), 47–54. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1187>

Esposito, C., Pucci, P., Amoresano, A., Marino, G., Cozzolino, A., & Porta, R. (1996). Transglutaminase from rat coagulating gland secretion. Post-translational modifications and activation by phosphatidic acids. *The Journal of biological chemistry*, 271(44), 27416–27423. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27416>

Fink, M. L., & Folk, J. E. (1981). gamma-Glutamylamine cyclotransferase. An enzyme involved in the catabolism of epsilon-(gamma-glutamyl)lysine and other gamma-glutamylamines. *Molecular and cellular biochemistry*, 38 Spec No(Pt 1), 59–67. <https://doi.org/10.1007/BF00235688>

Fonyó A, Ligeti E,(2008) Az orvosi élettan tankönyve, ISBN: 9789632261263.

- Fraser, S. R., Booth, N. A., & Mutch, N. J. (2011). The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through α_2 -antiplasmin cross-linking. *Blood*, 117(23), 6371–6374. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-333203>
- Furie, B., & Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine*, 359(9), 938–949. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082>
- Garcia, D., Libby, E., & Crowther, M. A. (2010). The new oral anticoagulants. *Blood*, 115(1), 15–20. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-241851>
- Gentile, V., Grant, F. J., Porta, R., & Baldini, A. (1995). Localization of the human prostate transglutaminase (type IV) gene (TGM4) to chromosome 3p21.33-p22 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 27(1), 219–220. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1032>
- Gjersvik, P. J., & Rønnevig, J. R. (2003). Dermatitis herpetiformis [Dermatitis herpetiformis]. *Tidsskrift for den Norske lægeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*, 123(22), 3234–3236.
- Golatoski, C., Salazar, M. G., Dhople, V. M., Hammer, E., Kocher, T., Jehmlich, N., & Völker, U. (2013). Comparative evaluation of saliva collection methods for proteome analysis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 419, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.01.013>
- Grant, F. J., Taylor, D. A., Sheppard, P. O., Mathewes, S. L., Lint, W., Vanaja, E., Bishop, P. D., & O'Hara, P. J. (1994). Molecular cloning and characterization of a novel transglutaminase cDNA from a human prostate cDNA library. *Biochemical and biophysical research communications*, 203(2), 1117–1123. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2298>
- Grenard, P., Bates, M. K., & Aeschlimann, D. (2001). 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. *The Journal of biological chemistry*, 276(35), 33066–33078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102553200>
- Griffin J. H. (1995). Blood coagulation. The thrombin paradox. *Nature*, 378(6555), 337–338. <https://doi.org/10.1038/378337a0>
- Griffin, M., Casadio, R., & Bergamini, C. M. (2002). Transglutaminases: nature's biological glues. *The Biochemical journal*, 368(Pt 2), 377–396. <https://doi.org/10.1042/BJ20021234>
- Grinnell, F., Feld, M., & Minter, D. (1980). Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell*, 19(2), 517–525. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90526-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90526-7)
- Guo, J., Xiao, B., Lou, Y., Yan, C., Zhan, L., Wang, D., & Zhao, W. (2006). Antitumor effects of all-trans-retinoic acid on cultured human pancreatic cancer cells. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21(2), 443–448. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04180.x>
- Handrkova, H., Schroeder, V., & Kohler, H. P. (2015). The activation peptide of coagulation factor XIII is vital for its expression and stability. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 13(8), 1449–1458. <https://doi.org/10.1111/jth.13035>
- Hart, R. G., & Greenstein, J. S. (1968). A newly discovered role for Cowper's gland secretion in rodent semen coagulation. *Journal of reproduction and fertility*, 17(1), 87–94. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170087>
- Hartman C.G. (1924) Observations on the motility of the opossum genital tract and the vaginal plug. *Anat Rec.* 27(5), 293–303.

Hauser, C., Wodtke, R., Löser, R., & Pietsch, M. (2017). A fluorescence anisotropy-based assay for determining the activity of tissue transglutaminase. *Amino acids*, 49(3), 567–583. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2192-5>

Hethershaw, E. L., Cilia La Corte, A. L., Duval, C., Ali, M., Grant, P. J., Ariëns, R. A., & Philippou, H. (2014). The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 12(2), 197–205. <https://doi.org/10.1111/jth.12455>

Hitomi, K., Kanehiro, S., Ikura, K., & Maki, M. (1999). Characterization of recombinant mouse epidermal-type transglutaminase (TGase 3): regulation of its activity by proteolysis and guanine nucleotides. *Journal of biochemistry*, 125(6), 1048–1054. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022385>

Hitomi, K., Yamagiwa, Y., Ikura, K., Yamanishi, K., & Maki, M. (2000). Characterization of human recombinant transglutaminase 1 purified from baculovirus-infected insect cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(10), 2128–2137. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.2128>

Ho, K. C., Quarmby, V. E., French, F. S., & Wilson, E. M. (1992). Molecular cloning of rat prostate transglutaminase complementary DNA. The major androgen-regulated protein DP1 of rat dorsal prostate and coagulating gland. *The Journal of biological chemistry*, 267(18), 12660–12667.

Hogan, M. C., Johnson, K. L., Zenka, R. M., Charlesworth, M. C., Madden, B. J., Mahoney, D. W., Oberg, A. L., Huang, B. Q., Leontovich, A. A., Nesbitt, L. L., Bakeberg, J. L., McCormick, D. J., Bergen, H. R., & Ward, C. J. (2014). Subfractionation, characterization, and in-depth proteomic analysis of glomerular membrane vesicles in human urine. *Kidney international*, 85(5), 1225–1237. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.422>

Howes, J. M., Richardson, V. R., Smith, K. A., Schroeder, V., Somani, R., Shore, A., Hess, K., Ajjan, R., Pease, R. J., Keen, J. N., Standeven, K. F., & Carter, A. M. (2012). Complement C3 is a novel plasma clot component with anti-fibrinolytic properties. *Diabetes & vascular disease research*, 9(3), 216–225. <https://doi.org/10.1177/1479164111432788>

Hsieh, L., & Nugent, D. (2008). Factor XIII deficiency. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia*, 14(6), 1190–1200. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01857.x>

http://genomics.dote.hu/mediawiki/index.php/Main_Page

<http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=PXD028174>

<http://weblogo.threeplusone.com/>

http://zedira.com/Content/DD-XLink-mab_42

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blast_home

<https://massive.ucsd.edu>

https://web.expasy.org/peptide_cutter/

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222212448/s1>

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222212448/s1>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8619550/#app1-ijms-22-12448>

<https://www.peptideatlas.org>

<https://www.proteomicsdb.org/>

- Huber, M., Rettler, I., Bernasconi, K., Frenk, E., Lavrijsen, S. P., Ponec, M., Bon, A., Lautenschlager, S., Schorderet, D. F., & Hohl, D. (1995). Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* (New York, N.Y.), 267(5197), 525–528. <https://doi.org/10.1126/science.7824952>
- Ichinose, A., & Aoki, N. (1982). Reversible cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrinogen by fibrin-stabilizing factor. *Biochimica et biophysica acta*, 706(2), 158–164. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(82\)90482-4](https://doi.org/10.1016/0167-4838(82)90482-4)
- Iizumi, M., Mohinta, S., Bandyopadhyay, S., & Watabe, K. (2007). Tumor-endothelial cell interactions: therapeutic potential. *Microvascular research*, 74(2-3), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.04.002>
- Inbal, A., Lubetsky, A., Krapp, T., Castel, D., Shaish, A., Dickneite, G., Modis, L., Muszbek, L., & Inbal, A. (2005). Impaired wound healing in factor XIII deficient mice. *Thrombosis and haemostasis*, 94(2), 432–437. <https://doi.org/10.1160/TH05-04-0291>
- Iwatsuki, M., Mimori, K., Yokobori, T., Ishi, H., Beppu, T., Nakamori, S., Baba, H., & Mori, M. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer science*, 101(2), 293–299. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01419.x>
- Jans, R., Sturniolo, M. T., & Eckert, R. L. (2008). Localization of the TIG3 transglutaminase interaction domain and demonstration that the amino-terminal region is required for TIG3 function as a keratinocyte differentiation regulator. *The Journal of investigative dermatology*, 128(3), 517–529. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701035>
- Jiang, W. G., & Ablin, R. J. (2011). Prostate transglutaminase: a unique transglutaminase and its role in prostate cancer. *Biomarkers in medicine*, 5(3), 285–291. <https://doi.org/10.2217/bmm.11.36>
- Jiang, W. G., Ablin, R. J., Kynaston, H. G., & Mason, M. D. (2009). The prostate transglutaminase (TGase-4, TGaseP) regulates the interaction of prostate cancer and vascular endothelial cells, a potential role for the ROCK pathway. *Microvascular research*, 77(2), 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2008.09.010>
- Jiang, W. G., Ablin, R., Douglas-Jones, A., & Mansel, R. E. (2003). Expression of transglutaminases in human breast cancer and their possible clinical significance. *Oncology reports*, 10(6), 2039–2044.
- Jiang, W. G., Ye, L., Ablin, R. J., Kynaston, H. G., & Mason, M. D. (2010). The prostate transglutaminase, TGase-4, coordinates with the HGFL/MSP-RON system in stimulating the migration of prostate cancer cells. *International journal of oncology*, 37(2), 413–418. https://doi.org/10.3892/ijo_00000689
- John, S., Thiebach, L., Frie, C., Mokkapat, S., Bechtel, M., Nischt, R., Rosser-Davies, S., Paulsson, M., & Smyth, N. (2012). Epidermal transglutaminase (TGase 3) is required for proper hair development, but not the formation of the epidermal barrier. *PloS one*, 7(4), e34252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034252>
- Johnson, K. B., Petersen-Jones, H., Thompson, J. M., Hitomi, K., Itoh, M., Bakker, E. N., Johnson, G. V., Colak, G., & Watts, S. W. (2012). Vena cava and aortic smooth muscle cells express transglutaminases 1 and 4 in addition to transglutaminase 2. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 302(7), H1355–H1366. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00918.2011>
- Kanchan, K., Ergülen, E., Király, R., Simon-Vecsei, Z., Fuxreiter, M., & Fésüs, L. (2013). Identification of a specific one amino acid change in recombinant human transglutaminase 2 that regulates its activity and calcium sensitivity. *The Biochemical journal*, 455(3), 261–272. <https://doi.org/10.1042/BJ20130696>

Kárpáti, L., Penke, B., Katona, E., Balogh, I., Vámosi, G., & Muszbek, L. (2000). A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clinical chemistry*, 46(12), 1946–1955.

Katona, É., Péntzes, K., Molnár, É., & Muszbek, L. (2012). Measurement of factor XIII activity in plasma. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 50(7), 1191–1202. <https://doi.org/10.1515/cclm-2011-0730>

Katt, W. P., Antonyak, M. A., & Cerione, R. A. (2018). The diamond anniversary of tissue transglutaminase: a protein of many talents. *Drug discovery today*, 23(3), 575–591. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.037>

Kenniston, J. A., Conley, G. P., Sexton, D. J., & Nixon, A. E. (2013). A homogeneous fluorescence anisotropy assay for measuring transglutaminase 2 activity. *Analytical biochemistry*, 436(1), 13–15. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.01.016>

Kim, S. Y., Chung, S. I., & Steinert, P. M. (1995). Highly active soluble processed forms of the transglutaminase 1 enzyme in epidermal keratinocytes. *The Journal of biological chemistry*, 270(30), 18026–18035. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.30.18026>

Király, R., Thangaraju, K., Nagy, Z., Collighan, R., Nemes, Z., Griffin, M., & Fésüs, L. (2016). Isopeptidase activity of human transglutaminase 2: disconnection from transamidation and characterization by kinetic parameters. *Amino acids*, 48(1), 31–40. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2063-5>

Király, R., Vecsei, Z., Deményi, T., Korponay-Szabó, I. R., & Fésüs, L. (2006). Coeliac autoantibodies can enhance transamidating and inhibit GTPase activity of tissue transglutaminase: dependence on reaction environment and enzyme fitness. *Journal of autoimmunity*, 26(4), 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2006.03.002>

Klimenkova, O., Ellerbeck, W., Klimiankou, M., Ünalán, M., Kandabarau, S., Gigina, A., Hussein, K., Zeidler, C., Welte, K., & Skokowa, J. (2014). A lack of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) causes defects in granulocytic differentiation. *Blood*, 123(8), 1239–1249. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-508887>

Komáromi, I., Bagoly, Z., & Muszbek, L. (2011). Factor XIII: novel structural and functional aspects. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 9(1), 9–20. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04070.x>

KORNGUTH, M. L., NEIDLE, A., & WAELSCH, H. (1963). THE STABILITY AND REARRANGEMENT OF EPSILON-N-GLUTAMYL-LYSINES. *Biochemistry*, 2, 740–745. <https://doi.org/10.1021/bi00904a020>

Koseki-Kuno, S., Yamakawa, M., Dickneite, G., & Ichinose, A. (2003). Factor XIII A subunit-deficient mice developed severe uterine bleeding events and subsequent spontaneous miscarriages. *Blood*, 102(13), 4410–4412. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1467>

Laki, K., & Lóránd, L. (1948). On the Solubility of Fibrin Clots. *Science (New York, N.Y.)*, 108(2802), 280. <https://doi.org/10.1126/science.108.2802.280>

Landegren, N., Sharon, D., Shum, A. K., Khan, I. S., Fasano, K. J., Hallgren, Å., Kampf, C., Freyhult, E., Ardesjö-Lundgren, B., Alimohammadi, M., Rathsmán, S., Ludvigsson, J. F., Lundh, D., Motrich, R., Rivero, V., Fong, L., Giwercman, A., Gustafsson, J., Perheentupa, J., Husebye, E. S., ... Kämpe, O. (2015). Transglutaminase 4 as a prostate autoantigen in male subfertility. *Science translational medicine*, 7(292), 292ra101. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa9186>

Lanir, N., Ciano, P. S., Van de Water, L., McDonagh, J., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (1988). Macrophage migration in fibrin gel matrices. II. Effects of clotting factor XIII, fibronectin, and glycosaminoglycan content on cell migration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 140(7), 2340–2349.

Le Clainche, C., Dwivedi, S. P., Didry, D., & Carlier, M. F. (2010). Vinculin is a dually regulated actin filament barbed end-capping and side-binding protein. *The Journal of biological chemistry*, 285(30), 23420–23432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102830>

Leidy, E. M., Stern, A. M., Friedman, P. A., & Bush, L. R. (1990). Enhanced thrombolysis by a factor XIIIa inhibitor in a rabbit model of femoral artery thrombosis. *Thrombosis research*, 59(1), 15–26. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(90\)90267-g](https://doi.org/10.1016/0049-3848(90)90267-g)

Leitner, M., Büchold, C., Pasternack, R., & Binder, N. B. (2020). Feasibility of an automated coagulation factor XIIIa test using its isopeptidase activity. *Analytical biochemistry*, 600, 113757. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113757> Weiss MS, Metzner HJ, Hilgenfeld R. Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII function. *FEBS Lett* 423:291–296, 1998.

Leuckart, R. (1847) *Zur morphologie und anatomie der geschlechtsorgane*. Göttingen: Vandenhoeck und Ruprecht. 130 p.

Liu, S., Cerione, R. A., & Clardy, J. (2002). Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 2743–2747. <https://doi.org/10.1073/pnas.042454899>

Long, M. D., Singh, P. K., Russell, J. R., Llimos, G., Rosario, S., Rizvi, A., van den Berg, P. R., Kirk, J., Sucheston-Campbell, L. E., Smiraglia, D. J., & Campbell, M. J. (2019). The miR-96 and RAR γ signaling axis governs androgen signaling and prostate cancer progression. *Oncogene*, 38(3), 421–444. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0450-6>

Loof, T. G., Mörgelin, M., Johansson, L., Oehmecke, S., Olin, A. I., Dickneite, G., Norrby-Teglund, A., Theopold, U., & Herwald, H. (2011). Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense. *Blood*, 118(9), 2589–2598. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-337568>

Lopez-Bujanda, Z. A., Obradovic, A., Nirschl, T. R., Crowley, L., Macedo, R., Papachristodoulou, A., O'Donnell, T., Laserson, U., Zarif, J. C., Reshef, R., Yuan, T., Soni, M. K., Antonarakis, E. S., Haffner, M. C., Larman, H. B., Shen, M. M., Muranski, P., & Drake, C. G. (2021). TGM4: an immunogenic prostate-restricted antigen. *Journal for immunotherapy of cancer*, 9(6), e001649. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001649>

Lorand, J. B., Urayama, T., & Lorand, L. (1966). Transglutaminase as a blood clotting enzyme. *Biochemical and biophysical research communications*, 23(6), 828–834. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(66\)90562-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(66)90562-6)

Lorand, L., & Graham, R. M. (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(2), 140–156. <https://doi.org/10.1038/nrm1014>

Lorand, L., Konishi, K., & Jacobsen, A. (1962). Transpeptidation mechanism in blood clotting. *Nature*, 194, 1148–1149. <https://doi.org/10.1038/1941148a0>

Lorand, L., Lockridge, O. M., Campbell, L. K., Myhrman, R., & Bruner-Lorand, J. (1971). Transamidating enzymes. II. A continuous fluorescent method suited for automating measurements of factor XIII in plasma. *Analytical biochemistry*, 44(1), 221–231. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90363-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90363-0)

Makarova, K. S., Aravind, L., & Koonin, E. V. (1999). A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 8(8), 1714–1719. <https://doi.org/10.1110/ps.8.8.1714>

- Makkonen, K. M., Malinen, M., Ropponen, A., Väisänen, S., & Carlberg, C. (2009). Cell cycle regulatory effects of retinoic Acid and forskolin are mediated by the cyclin C gene. *Journal of molecular biology*, 393(2), 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.08.024>
- Mariniello, L., Esposito, C., Caputo, I., Sorrentino, A., & Porta, R. (2003). N-terminus end of rat prostate transglutaminase is responsible for its catalytic activity and GTP binding. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35(7), 1098–1108. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00358-8](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00358-8)
- Matacić, S., & Loewy, A. G. (1968). The identification of isopeptide crosslinks in insoluble fibrin. *Biochemical and biophysical research communications*, 30(4), 356–362. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(68\)90750-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(68)90750-x)
- Matsuki, M., Yamashita, F., Ishida-Yamamoto, A., Yamada, K., Kinoshita, C., Fushiki, S., Ueda, E., Morishima, Y., Tabata, K., Yasuno, H., Hashida, M., Iizuka, H., Ikawa, M., Okabe, M., Kondoh, G., Kinoshita, T., Takeda, J., & Yamanishi, K. (1998). Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), 1044–1049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1044>
- Metafora, S., Peluso, G., Persico, P., Ravagnan, G., Esposito, C., & Porta, R. (1989). Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. *Biochemical pharmacology*, 38(1), 121–131. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90158-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90158-5)
- Mimuro, J., Kimura, S., & Aoki, N. (1986). Release of alpha 2-plasmin inhibitor from plasma fibrin clots by activated coagulation factor XIII. Its effect on fibrinolysis. *The Journal of clinical investigation*, 77(3), 1006–1013. <https://doi.org/10.1172/JCI112352>
- Moore, B. M., & Flurkey, W. H. (1990). Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *The Journal of biological chemistry*, 265(9), 4982–4988.
- Mukherjee, D. C., Agrawal, A. K., Manjunath, R., & Mukherjee, A. B. (1983). Suppression of epididymal sperm antigenicity in the rabbit by uteroglobin and transglutaminase in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4587), 989–991. <https://doi.org/10.1126/science.6130601>
- Muszbeek, L., Bagoly, Z., Bereczky, Z., & Katona, E. (2008). The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*, 6(3), 190–205. <https://doi.org/10.2174/187152508784871990>
- Muszbeek, L., Bereczky, Z., Bagoly, Z., Komáromi, I., & Katona, É. (2011). Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiological reviews*, 91(3), 931–972. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2010>
- Muszbeek, L., Polgár, J., & Fésüs, L. (1985). Kinetic determination of blood coagulation Factor XIII in plasma. *Clinical chemistry*, 31(1), 35–40.
- Mutch, N. J., Engel, R., Uitte de Willige, S., Philippou, H., & Ariëns, R. A. (2010). Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. *Blood*, 115(19), 3980–3988. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-254029>
- Myneni, V. D., Hitomi, K., & Kaartinen, M. T. (2014). Factor XIII-A transglutaminase acts as a switch between preadipocyte proliferation and differentiation. *Blood*, 124(8), 1344–1353. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-543223>

Myneni, V. D., Melino, G., & Kaartinen, M. T. (2015). Transglutaminase 2--a novel inhibitor of adipogenesis. *Cell death & disease*, 6(8), e1868. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.238>

Naukkarinen, J., Surakka, I., Pietiläinen, K. H., Rissanen, A., Salomaa, V., Ripatti, S., Yki-Järvinen, H., van Duijn, C. M., Wichmann, H. E., Kaprio, J., Taskinen, M. R., Peltonen, L., & ENGAGE Consortium (2010). Use of genome-wide expression data to mine the "Gray Zone" of GWA studies leads to novel candidate obesity genes. *PLoS genetics*, 6(6), e1000976. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000976>

Nemes, Z., Marekov, L. N., Fésüs, L., & Steinert, P. M. (1999). A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), 8402–8407. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8402>

Nicolson, G. L., Birdwell, C. R., Brunson, K. W., & Robbins, J. C. (1976). Cellular interactions in the metastatic process. *Progress in clinical and biological research*, 9, 237–244.

Nikolajsen, C. L., Dyrlund, T. F., Poulsen, E. T., Enghild, J. J., & Scavenius, C. (2014). Coagulation factor XIIIa substrates in human plasma: identification and incorporation into the clot. *The Journal of biological chemistry*, 289(10), 6526–6534. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.517904>

Oertel, K., Hunfeld, A., Specker, E., Reiff, C., Seitz, R., Pasternack, R., & Dodt, J. (2007). A highly sensitive fluorometric assay for determination of human coagulation factor XIII in plasma. *Analytical biochemistry*, 367(2), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.05.011>

Orosz, Z. Z., Katona, É., Facsó, A., Módis, L., Muszbek, L., & Berta, A. (2011). Factor XIII subunits in human tears; their highly elevated levels following penetrating keratoplasty. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 412(3-4), 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.10.017>

Ortner, E., Schroeder, V., Walser, R., Zerbe, O., & Kohler, H. P. (2010). Sensitive and selective detection of free FXIII activation peptide: a potential marker of acute thrombotic events. *Blood*, 115(24), 5089–5096. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-253062>

Pang, S. F., Chow, P. H., & Wong, T. M. (1979). The role of the seminal vesicles, coagulating glands and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. *Journal of reproduction and fertility*, 56(1), 129–132. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560129>

Paonessa, G., Metafora, S., Tajana, G., Abrescia, P., De Santis, A., Gentile, V., & Porta, R. (1984). Transglutaminase-mediated modifications of the rat sperm surface in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 226(4676), 852–855. <https://doi.org/10.1126/science.6149619>

Paragh, L., & Töröcsik, D. (2017). Factor XIII Subunit A in the Skin: Applications in Diagnosis and Treatment. *BioMed research international*, 2017, 3571861. <https://doi.org/10.1155/2017/3571861>

Parameswaran, K. N., Cheng, X. F., Chen, E. C., Velasco, P. T., Wilson, J. H., & Lorand, L. (1997). Hydrolysis of gamma:epsilon isopeptides by cytosolic transglutaminases and by coagulation factor XIIIa. *The Journal of biological chemistry*, 272(15), 10311–10317. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.15.10311>

Pasternack, R., Büchold, C., Jähnig, R., Pelzer, C., Sommer, M., Heil, A., Florian, P., Nowak, G., Gerlach, U., & Hils, M. (2020). Novel inhibitor ZED3197 as potential drug candidate in anticoagulation targeting coagulation FXIIIa (F13a). *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 18(1), 191–200. <https://doi.org/10.1111/jth.14646>

Peluso, G., Porta, R., Esposito, C., Tufano, M. A., Toraldo, R., Vuotto, M. L., Ravagnan, G., & Metafora, S. (1994). Suppression of rat epididymal sperm immunogenicity by a seminal vesicle secretory protein and

transglutaminase both in vivo and in vitro. *Biology of reproduction*, 50(3), 593–602. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.3.593>

Perez Alea, M., Thomas, V., Martin, G., & El Alaoui, S. (2013). Identification of human salivary transglutaminases. *Amino acids*, 44(1), 245–250. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1142-5>

Peter, A., Lilja, H., Lundwall, A., & Malm, J. (1998). Semenogelin I and semenogelin II, the major gel-forming proteins in human semen, are substrates for transglutaminase. *European journal of biochemistry*, 252(2), 216–221. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2520216.x>

Peters, L. L., Jindel, H. K., Gwynn, B., Korsgren, C., John, K. M., Lux, S. E., Mohandas, N., Cohen, C. M., Cho, M. R., Golan, D. E., & Brugnara, C. (1999). Mild spherocytosis and altered red cell ion transport in protein 4.2-null mice. *The Journal of clinical investigation*, 103(11), 1527–1537. <https://doi.org/10.1172/JCI5766>

Pietroni, V., Di Giorgi, S., Paradisi, A., Ahvazi, B., Candi, E., & Melino, G. (2008). Inactive and highly active, proteolytically processed transglutaminase-5 in epithelial cells. *The Journal of investigative dermatology*, 128(12), 2760–2766. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.146>

Porta, R., Esposito, C., De Santis, A., Fusco, A., Iannone, M., & Metafora, S. (1986). Sperm maturation in human semen: role of transglutaminase-mediated reactions. *Biology of reproduction*, 35(4), 965–970. <https://doi.org/10.1095/biolreprod35.4.965>

Prokopovic, V., Popovic, M., Andjelkovic, U., Marsavelski, A., Raskovic, B., Gavrovic-Jankulovic, M., & Polovic, N. (2014). Isolation, biochemical characterization and anti-bacterial activity of BPIFA2 protein. *Archives of oral biology*, 59(3), 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.12.005>

Raczyński, G., Snochowski, M., & Buraczewski, S. (1975). Metabolism of epsilon-(gamma-L-glutamyl)-L-lysine in the rat. *The British journal of nutrition*, 34(2), 291–296. <https://doi.org/10.1017/s0007114575000335>

Richardson, V. R., Schroeder, V., Grant, P. J., Standeven, K. F., & Carter, A. M. (2013). Complement C3 is a substrate for activated factor XIII that is cross-linked to fibrin during clot formation. *British journal of haematology*, 160(1), 116–119. <https://doi.org/10.1111/bjh.12096>

Rivera-Gonzalez, G. C., Droop, A. P., Rippon, H. J., Tiemann, K., Pellacani, D., Georgopoulos, L. J., & Maitland, N. J. (2012). Retinoic acid and androgen receptors combine to achieve tissue specific control of human prostatic transglutaminase expression: a novel regulatory network with broader significance. *Nucleic acids research*, 40(11), 4825–4840. <https://doi.org/10.1093/nar/gks143>

Ronsin, C., Muscatelli, F., Mattei, M. G., & Breathnach, R. (1993). A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family. *Oncogene*, 8(5), 1195–1202.

Ruan, Q., Tucholski, J., Gundemir, S., & Johnson Voll, G. V. (2008). The Differential Effects of R580A Mutation on Transamidation and GTP Binding Activity of Rat and Human Type 2 Transglutaminase. *International journal of clinical and experimental medicine*, 1(3), 248–259.

Saito, Y., Miyahara, R., Gopalan, B., Litvak, A., Inoue, S., Shanker, M., Branch, C. D., Mhashilkar, A. M., Roth, J. A., Chada, S., & Ramesh, R. (2005). Selective induction of cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells through adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated -7 (mda-7)/interleukin-24 (IL-24) gene. *Cancer gene therapy*, 12(3), 238–247. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700780>

Saitoh, E., Kim, H. S., Smithies, O., & Maeda, N. (1987). Human cysteine-proteinase inhibitors: nucleotide sequence analysis of three members of the cystatin gene family. *Gene*, 61(3), 329–338. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90196-x](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90196-x)

- Sakata, Y., & Aoki, N. (1980). Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *The Journal of clinical investigation*, 65(2), 290–297. <https://doi.org/10.1172/JCI109671>
- Sakata, Y., & Aoki, N. (1982). Significance of cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *The Journal of clinical investigation*, 69(3), 536–542. <https://doi.org/10.1172/jci110479>
- Sarang, Z., Joós, G., Garabuczi, É., Rühl, R., Gregory, C. D., & Szondy, Z. (2014). Macrophages engulfing apoptotic cells produce nonclassical retinoids to enhance their phagocytic capacity. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 192(12), 5730–5738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400284>
- Sarkar, N. K., Clarke, D. D., & Waelsch, H. (1957). An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 25(2), 451–452. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90512-7](https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90512-7)
- Satchwell, T. J., Shoemark, D. K., Sessions, R. B., & Toye, A. M. (2009). Protein 4.2: a complex linker. *Blood cells, molecules & diseases*, 42(3), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.01.005>
- Schroeder, V., & Kohler, H. P. (2013). New developments in the area of factor XIII. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 11(2), 234–244. <https://doi.org/10.1111/jth.12074>
- Schroeder, V., & Kohler, H. P. (2016). Factor XIII: Structure and Function. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 42(4), 422–428. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571341>
- Schroeder, V., Handrková, H., Dodt, J., & Kohler, H. P. (2015). Free factor XIII activation peptide affects factor XIII function. *British journal of haematology*, 168(5), 757–759. <https://doi.org/10.1111/bjh.13144>
- Schroeder, V., Vuissoz, J. M., Caflisch, A., & Kohler, H. P. (2007). Factor XIII activation peptide is released into plasma upon cleavage by thrombin and shows a different structure compared to its bound form. *Thrombosis and haemostasis*, 97(6), 890–898.
- Seelig, G. F., & Folk, J. E. (1980). Noncatalytic subunits of human blood plasma coagulation factor XIII. Preparation and partial characterization of modified forms. *The Journal of biological chemistry*, 255(18), 8881–8886.
- Seitz, J., Keppler, C., Hüntemann, S., Rausch, U., & Aumüller, G. (1991). Purification and molecular characterization of a secretory transglutaminase from coagulating gland of the rat. *Biochimica et biophysica acta*, 1078(2), 139–146. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(91\)99002-a](https://doi.org/10.1016/0167-4838(91)99002-a)
- Sequeiros, T., Rigau, M., Chiva, C., Montes, M., Garcia-Grau, I., Garcia, M., Diaz, S., Celma, A., Bijnsdorp, I., Campos, A., Di Mauro, P., Borrós, S., Reventós, J., Doll, A., Paciucci, R., Pegtel, M., de Torres, I., Sabidó, E., Morote, J., & Oliván, M. (2017). Targeted proteomics in urinary extracellular vesicles identifies biomarkers for diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Oncotarget*, 8(3), 4960–4976. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13634>
- Shaikhibrahim, Z., Lindstrot, A., Buettner, R., & Wernert, N. (2011). Analysis of laser-microdissected prostate cancer tissues reveals potential tumor markers. *International journal of molecular medicine*, 28(4), 605–611. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.746>
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M., & Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5590), 2275–2279. <https://doi.org/10.1126/science.1074129>

- Shao, M., Cao, L., Shen, C., Satpathy, M., Chelladurai, B., Bigsby, R. M., Nakshatri, H., & Matei, D. (2009). Epithelial-to-mesenchymal transition and ovarian tumor progression induced by tissue transglutaminase. *Cancer research*, 69(24), 9192–9201. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1257>
- Shebuski, R. J., Sitko, G. R., Claremon, D. A., Baldwin, J. J., Remy, D. C., & Stern, A. M. (1990). Inhibition of factor XIIIa in a canine model of coronary thrombosis: effect on reperfusion and acute reocclusion after recombinant tissue-type plasminogen activator. *Blood*, 75(7), 1455–1459.
- Singh S et al. The Plasma Factor XIII Heterotetrameric Complex Structure: Unexpected Unequal Pairing within a Symmetric Complex. *Biomolecules* 2019, 9(12), 765; <https://doi.org/10.3390/biom9120765>
- Sivadó, É., El Alaoui, M., Kiraly, R., Fesüs, L., Delolme, F., Page, A., & El Alaoui, S. (2019). Optimised methods (SDS/PAGE and LC-MS) reveal deamidation in all examined transglutaminase-mediated reactions. *FEBS open bio*, 9(2), 396–404. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12575>
- Slaughter, T. F., Achyuthan, K. E., Lai, T. S., & Greenberg, C. S. (1992). A microtiter plate transglutaminase assay utilizing 5-(biotinamido)pentylamine as substrate. *Analytical biochemistry*, 205(1), 166–171. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90594-w](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90594-w)
- Smith, K. A., Pease, R. J., Avery, C. A., Brown, J. M., Adamson, P. J., Cooke, E. J., Neergaard-Petersen, S., Cordell, P. A., Ariëns, R. A., Fishwick, C. W., Philippou, H., & Grant, P. J. (2013). The activation peptide cleft exposed by thrombin cleavage of FXIII-A(2) contains a recognition site for the fibrinogen α chain. *Blood*, 121(11), 2117–2126. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-446393>
- Sobel, J. H., & Gawinowicz, M. A. (1996). Identification of the alpha chain lysine donor sites involved in factor XIIIa fibrin cross-linking. *The Journal of biological chemistry*, 271(32), 19288–19297. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.32.19288>
- Soendergaard, C., Kvist, P. H., Seidelin, J. B., & Nielsen, O. H. (2013). Tissue-regenerating functions of coagulation factor XIII. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 11(5), 806–816. <https://doi.org/10.1111/jth.12169>
- Song, Y. C., Sheng, D., Taubenfeld, S. M., & Matsueda, G. R. (1994). A microtiter assay for factor XIII using fibrinogen and biotinylcadaverine as substrates. *Analytical biochemistry*, 223(1), 88–92. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1551>
- Souri, M., Kaetsu, H., & Ichinose, A. (2008). Sushi domains in the B subunit of factor XIII responsible for oligomer assembly. *Biochemistry*, 47(33), 8656–8664. <https://doi.org/10.1021/bi8006143>
- Spina, A. M., Esposito, C., Pagano, M., Chiosi, E., Mariniello, L., Cozzolino, A., Porta, R., & Illiano, G. (1999). GTPase and transglutaminase are associated in the secretion of the rat anterior prostate. *Biochemical and biophysical research communications*, 260(2), 351–356. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0914>
- Stamnaes, J., Pinkas, D. M., Fleckenstein, B., Khosla, C., & Sollid, L. M. (2010). Redox regulation of transglutaminase 2 activity. *The Journal of biological chemistry*, 285(33), 25402–25409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.097162>
- Stieler, M., Weber, J., Hils, M., Kolb, P., Heine, A., Büchold, C., Pasternack, R., & Klebe, G. (2013). Structure of active coagulation factor XIII triggered by calcium binding: basis for the design of next-generation anticoagulants. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 52(45), 11930–11934. <https://doi.org/10.1002/anie.201305133>

Sturniolo, M. T., Chandraratna, R. A., & Eckert, R. L. (2005). A novel transglutaminase activator forms a complex with type 1 transglutaminase. *Oncogene*, 24(18), 2963–2972. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208392>

Sturniolo, M. T., Dashti, S. R., Deucher, A., Rorke, E. A., Broome, A. M., Chandraratna, R. A., Keepers, T., & Eckert, R. L. (2003). A novel tumor suppressor protein promotes keratinocyte terminal differentiation via activation of type I transglutaminase. *The Journal of biological chemistry*, 278(48), 48066–48073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307215200>

Sugimura, Y., Hosono, M., Wada, F., Yoshimura, T., Maki, M., & Hitomi, K. (2006). Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library: identification of peptide substrates for TGASE 2 and Factor XIIIa. *The Journal of biological chemistry*, 281(26), 17699–17706. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513538200>

Suprisunjai C, Hsu CK, Michael M, Duval C, Lee JYW, Yang HS, Huang HY, Chaikul T, Onoufriadis A, Steiner RA, Ariëns RAS, Sarig O, Sprecher E, Eskin-Schwartz M, Samlaska C, Simpson MA, Calonje E, Parsons M, McGrath JA. Coagulation Factor XIII-A Subunit Missense Mutation in the Pathobiology of Autosomal Dominant Multiple Dermatofibromas. *J Invest Dermatol*. 2020 Mar;140(3):624-635.e7. doi: 10.1016/j.jid.2019.08.441. Epub 2019 Sep 4. PMID: 31493396.

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic acids research*, 49(D1), D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>

Thangaraju, K., Biri, B., Schlosser, G., Kiss, B., Nyitray, L., Fésüs, L., & Király, R. (2016). Real-time kinetic method to monitor isopeptidase activity of transglutaminase 2 on protein substrate. *Analytical biochemistry*, 505, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.04.012>

Thangaraju, K., Király, R., Demény, M. A., András Mótýán, J., Fuxreiter, M., & Fésüs, L. (2017). Genomic variants reveal differential evolutionary constraints on human transglutaminases and point towards unrecognized significance of transglutaminase 2. *PloS one*, 12(3), e0172189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172189>

Thangaraju, K., Király, R., Mótýán, J. A., Ambrus, V. A., Fuxreiter, M., & Fésüs, L. (2017a). Computational analyses of the effect of novel amino acid clusters of human transglutaminase 2 on its structure and function. *Amino acids*, 49(3), 605–614. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2330-0>

Thomas, H., Beck, K., Adamczyk, M., Aeschlimann, P., Langley, M., Oita, R. C., Thiebach, L., Hils, M., & Aeschlimann, D. (2013). Transglutaminase 6: a protein associated with central nervous system development and motor function. *Amino acids*, 44(1), 161–177. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1091-z>

Tong, L., Png, E., Aihua, H., Yong, S. S., Yeo, H. L., Riau, A., Mendoz, E., Chaurasia, S. S., Lim, C. T., Yiu, T. W., & Iismaa, S. E. (2013). Molecular mechanism of transglutaminase-2 in corneal epithelial migration and adhesion. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(6), 1304–1315. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.030>

Töröcsik, D., Bárdos, H., Hatalyák, Z., Dezső, B., Losonczy, G., Paragh, L., Péter, Z., Balázs, M., Remenyik, E., & Adány, R. (2014). Detection of factor XIII-A is a valuable tool for distinguishing dendritic cells and tissue macrophages in granuloma annulare and necrobiosis lipoidica. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 28(8), 1087–1096. <https://doi.org/10.1111/jdv.12290>

- Töröcsik, D., Szeles, L., Paragh, G., Jr, Rakosy, Z., Bardos, H., Nagy, L., Balazs, M., Inbal, A., & Adány, R. (2010). Factor XIII-A is involved in the regulation of gene expression in alternatively activated human macrophages. *Thrombosis and haemostasis*, 104(4), 709–717. <https://doi.org/10.1160/TH09-11-0805>
- Tripathy, D., Vignoli, B., Ramesh, N., Polanco, M. J., Coutelier, M., Stephen, C. D., Canossa, M., Monin, M. L., Aeschlimann, P., Turberville, S., Aeschlimann, D., Schmahmann, J. D., Hadjivassiliou, M., Durr, A., Pandey, U. B., Pennuto, M., & Basso, M. (2017). Mutations in TGM6 induce the unfolded protein response in SCA35. *Human molecular genetics*, 26(19), 3749–3762. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx259>
- Tseng, H. C., Lin, H. J., Tang, J. B., Gandhi, P. S., Chang, W. C., & Chen, Y. H. (2009). Identification of the major TG4 cross-linking sites in the androgen-dependent SVS I exclusively expressed in mouse seminal vesicle. *Journal of cellular biochemistry*, 107(5), 899–907. <https://doi.org/10.1002/jcb.22190>
- Tseng, H. C., Tang, J. B., Gandhi, P. S., Luo, C. W., Ou, C. M., Tseng, C. J., Lin, H. J., & Chen, Y. H. (2012). Mutual adaptation between mouse transglutaminase 4 and its native substrates in the formation of copulatory plug. *Amino acids*, 42(2-3), 951–960. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1009-9>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szgyarto, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., ... Pontén, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6220), 1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Valnickova, Z., & Enghild, J. J. (1998). Human procarboxypeptidase U, or thrombin-activable fibrinolysis inhibitor, is a substrate for transglutaminases. Evidence for transglutaminase-catalyzed cross-linking to fibrin. *The Journal of biological chemistry*, 273(42), 27220–27224. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27220>
- Weiss, M. S., Metzner, H. J., & Hilgenfeld, R. (1998). Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII function. *FEBS letters*, 423(3), 291–296. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00098-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00098-2)
- Welm, A. L., Sneddon, J. B., Taylor, C., Nuyten, D. S., van de Vijver, M. J., Hasegawa, B. H., & Bishop, J. M. (2007). The macrophage-stimulating protein pathway promotes metastasis in a mouse model for breast cancer and predicts poor prognosis in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), 7570–7575. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707095104>
- Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., Gholami, A. M., Lieberenz, M., Savitski, M. M., Ziegler, E., Butzmann, L., Gessulat, S., Marx, H., Mathieson, T., Lemeer, S., Schnatbaum, K., Reimer, U., Wenschuh, H., Mollenhauer, M., Slotta-Huspenina, J., Boese, J. H., Bantscheff, M., Gerstmair, A., Faerber, F., Kuster, B. (2014). Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*, 509(7502), 582–587. <https://doi.org/10.1038/nature13319>
- Williams-Ashman H. G. (1984). Transglutaminases and the clotting of mammalian seminal fluids. *Molecular and cellular biochemistry*, 58(1-2), 51–61. <https://doi.org/10.1007/BF00240604>
- Williams-Ashman, H. G., Notides, A. C., Pabalan, S. S., & Lorand, L. (1972). Transamidase reactions involved in the enzymic coagulation of semen: isolation of -glutamyl- -lysine dipeptide from clotted secretion protein of guinea pig seminal vesicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2322–2325. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.8.2322>
- Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötval, J., Nolte-'t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H., & Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection,

isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of extracellular vesicles*, 2, 10.3402/jev.v2i0.20360. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>

Yamada, K., & Meguro, T. (1977). A new assay method for factor XIII using a fluorescence polarization analyzer, based on change in the rotary brownian motion. *Thrombosis research*, 11(5), 557–566. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(77\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0049-3848(77)90015-9)

Yee, V. C., Pedersen, L. C., Le Trong, I., Bishop, P. D., Stenkamp, R. E., & Teller, D. C. (1994). Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), 7296–7300. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7296>

Yorifuji H et al. B protein of Factor XIII: Differentiation between free B and complexed B. *Blood*. 1988;72:1645–1650. doi: 10.1182/blood.V72.5.1645.1645

Yu, W., Yang, L., Li, T., & Zhang, Y. (2019). Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Frontiers in oncology*, 9, 989. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00989>

Zaba, L. C., Fuentes-Duculan, J., Steinman, R. M., Krueger, J. G., & Lowes, M. A. (2007). Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *The Journal of clinical investigation*, 117(9), 2517–2525. <https://doi.org/10.1172/JCI32282>

9. 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.



10. Tárgyszavak/Keywords

Humán transzglutamináz 4	Human transglutaminase 4
Humán XIII-as véralvadási faktor	Human blood coagulation factor XIII
Izopeptidáz aktivitás	Isopeptidase activity
Transzamidáz aktivitás	Transamidase activity
Fehérje-peptid alapú aktivitásmérés	Protein-peptide-based isopeptidase assay
Fluoreszcencia anizotrópia	Fluorescence anisotropy
S100A4	S100A4
Proteomikai analízis	Proteomic analysis
Szubsztrát keresés	Substrate search
Interakciós partner keresés	Interaction partner search
Trombózis	Thrombosis
Tumor	Cancer

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Király Róbertnek, aki Msc-s éveimtől kezdve lehetőséget és iránymutatást adott munkám elvégzéséhez és az értekezésem elkészítéséhez. Hálával tartozom a tanácsaiért, segítőkészségért, türelméért és támogatásáért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Fésüs Lászlónak, hogy biztosította és segítette munkámat a Sejtbiokémiai Kutató Laboratóriumban az Msc-s és Ph.D-s tanulmányaim alatt. Valamint köszönettel tartozom Prof. Dr. Tózsér József intézetigazgatónak, hogy lehetővé tette munkámat a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben.

Szeretném megköszönni a segítséget a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet minden dolgozójának.

Köszönettel tartozom Gyermekgyógyászati Intézetből Prof. dr. Korponay-Szabó Ilma Ritának együttműködésért és támogatásáért, valamint munkacsoportja dolgozóinak, Elek Ritának, Diós Ádámnak és Szabó Ildikónak.

Köszönet illeti Nagy Jennifert és Nagy Anikót, hogy asszisztensi munkájukkal segítették kísérletes munkáimat.

Hálával és köszönettel tartozom Fedor-Lénárt Kingának, Rini Ariantinak, Dr. Jambrovics Károlynak és a laborunk minden munkatársának, hogy Ph.D-s éveim alatt mindenben segítettek és kellemessé tették a mindennapokat.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom családomnak és férjemnek, akik végig támogattak és bíztattak.

A disszertációhoz kapcsolódó kutatásokat az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-3-II-DE-29 Új Nemzeti Kiválóság Programja, az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 "Az orvos-, egészségtudományi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése" elnevezésű projekt és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFI K129139 és K120392) támogatta.

12. Függelék

A nyálban azonosított potenciális hTG4 interakciós partnerek

	Uniprot Kód	Azonosított fehérje		Uniprot Kód	Azonosított fehérje
1.	1433B	14-3-3 fehérje béta/alfa	141.	GNAI2	Guanin nukleotid-kötő protein G(i) alfa-2 alegység
2.	1433E	14-3-3 fehérje epsilon	142.	A0A024R3J1	Háromrészes motívumot tartalmazó 29
3.	1433G	14-3-3 fehérje gamma	143.	A0A024R5X2	HCG2001986
4.	1433S	14-3-3 fehérje szigma	144.	A0A0S2Z428	HCG2039812
5.	1433Z	14-3-3 fehérje zéta/delta	145.	H3BQZ7	HCG2044799
6.	PSD11	26S proteaszóma nem ATPáz szabályozó alegység 11	146.	HMCN1	Hemicentin-1
7.	PSMD2	26S proteaszóma nem ATPáz szabályozó alegység 2	147.	A0A024R228	Heterogén nukleáris ribonukleoprotein K
8.	B2R491	40S riboszomális fehérje S4	148.	HNRPU	Heterogén nukleáris ribonukleoprotein U
9.	PADI4	4-es típusú protein-arginin deimináz	149.	HP1B3	Heterokromatin fehérje 1-kötő fehérje 3
10.	AL9A1	4-trimetil-amino-butiraldehid-dehidrogenáz	150.	A0A024QZK7	Hexokináz 1
11.	RL4	60S riboszomális fehérje L4	151.	A0A024R7R1	Hexokináz 3
12.	A0A024RBK3	60S riboszomális fehérje L6	152.	HIS1	Hisztatin-1
13.	Q5T8U3	60S riboszomális fehérje L7a	153.	A3R0T8	Hisztin 1, H1e
14.	6PGD	6-foszfoglükonát-dehidrogenáz	154.	H10	Hisztin H1.0
15.	A0A024R1A3	A hereszkréciós fehérje Li 63	155.	H12	Hisztin H1.2
16.	A0A140VJI7	A hereszövet fehérje Li 61	156.	H13	Hisztin H1.3
17.	A0A140VJJ6	A hereszövet fehérje Li 70	157.	H15	Hisztin H1.5
18.	POTEJ	POTE J, ankyrin domain családtagja	158.	H1X	Hisztin H1x
19.	A0A024RA52	A proteaszóma alfa-alegység	159.	A0A0U1RR32	Hisztin H2A
20.	A0A0S2Z3G9	Actinin alfa 4	160.	H2A1J	Hisztin H2A típusú 1-J
21.	A0A024R694	Actinin alfa 1	161.	B4DR52	Hisztin H2B
22.	B2RDY9	Adenilil-ciklázal asszociált fehérje	162.	A0A590UJJ6	Hisztin H3
23.	APMAP	Adipocita plazmamembránhoz kapcsolódó fehérje	163.	H31	Hisztin H3.1
24.	ADT3	ADP/ATP transzlokáz 3	164.	HORN	Hornerin
25.	A0A0K0K1H7	Akonitát hidratáz, mitokondriális	165.	A0A0G2JIW1	Hősokk 70 kDa fehérje 1B
26.	A0A384NPN7	Aldehid-dehidrogenáz 2 család	166.	HS90A	Hősokk fehérje HSP 90-alfa
27.	Q6PKA6	ALDH3A1 fehérje	167.	HSP7C	Hősokk rokon 71 kDa fehérje

	Uniprot Kód	Azonosított fehérje		Uniprot Kód	Azonosított fehérje
28.	AK1BA	Aldo-keto reduktáz család 1 tag B10	168.	A0A024RD80	Hősokk-fehérje 90 kDa alfa (citoszol), B osztály 1. tag
29.	A0A024R6I7	Alfa-1-antitripszin	169.	HSPB1	Hősokk-fehérje béta-1
30.	A2ML1	Alfa-2-makroglobulinszerű fehérje 1	170.	A0A5C2GQV5	IG c1283_heavy_IGHV3- 48_IGHD3-10_IGHJ4
31.	CRYAB	Alfa-kristály B lánc	171.	IGHM	Immunglobulin nehéz állandó mu
32.	B7Z4B2	Aminopeptidáz	172.	Q0KKI6	Immunoglobulin könnyű lánc
33.	A0A0S2Z2Z6	Annexin	173.	ITAM	Integrin alfa-M
34.	ANX11	Annexin A11	174.	A0A494C0X7	Integrin béta
35.	ANXA3	Annexin A3	175.	A0A024R528	Interleukin-1
36.	ANXA4	Annexin A4	176.	INVO	Involucrin
37.	ANXA5	Annexin A5	177.	Q6MZV7	Jellemzetlen fehérje DKFZp686C11235
38.	AXA81	Annexin A8-szerű fehérje 1	178.	Q5HYL6	Jellemzetlen fehérje DKFZp686E1899
39.	SLPI	Antileukoproteináz	179.	Q6N093	Jellemzetlen fehérje DKFZp686I04196
40.	A0A024R3E3	Apolipoprotein A-I	180.	Q6MZW0	Jellemzetlen fehérje DKFZp686J11235
41.	LOX12	Arachidonát 12-lipoxigenáz, 12S-típus	181.	A0A024R1X8	Junction plakoglobin
42.	LOX5	Arachidonát 5-lipoxigenáz	182.	CLCA4	Kalcium-aktivált klorid csatorna szabályozó 4
43.	A0A024RAI1	ARP3 aktinnal rokon protein 3 homológ	183.	A8K9K1	Kalciumot szállító ATPáz
44.	TERA	Átmeneti endoplazmatikus retikulum ATPáz	184.	A0A024R4N7	Kallikrein 10
45.	ATPO	ATP szintáz O alegység, mitokondriális	185.	CEAM5	Karcinoembrionális antigénnel kapcsolatos sejtdhéziós molekula 5
46.	DHX9	ATP-függő RNS-helikáz A	186.	A1A4E9	Keratin 13
47.	A0A087X2G1	ATP-függő RNS-helikáz DDX1	187.	K1C10	I. típusú keratin10, citoszkeletális
48.	BPIA1	„BPI-fold”-ot tartalmazó A családtag 1	188.	K1C14	I. típusú keratin 14, citoszkeletális
49.	BPIA2	„BPI-fold”-ot tartalmazó A családtag 2	189.	K1C16	I. típusú keratin 16, citoszkeletális
50.	CALX	Kalnexin	190.	K1C19	I. típusú keratin 19, citoszkeletális
51.	A0A024R580	Kalpain 1, (Mu/I) nagy alegység	191.	K22E	II-es típusú keratin 2, citoszkeletális

	Uniprot Kód	Azonosított fehérje		Uniprot Kód	Azonosított fehérje
52.	A0A0C4DGQ5	Kalpain kis alegység 1	192.	K2C3	II-es típusú keratin 3, citoskeletális
53.	CALR	Kalretikulin	193.	K2C4	II-es típusú keratin 4, citoskeletális
54.	A0A384MDY0	Catenin alfa 1	194.	K2C5	II-es típusú keratin 5, citoskeletális
55.	B3KTV0	Nagyon hasonló a HEAT SHOCK COGNATE 71 kDa PROTEIN-hez	195.	K2C6B	II-es típusú keratin 6B, citoskeletális
56.	B3KVV6	Nagyon hasonló az alfa-2-makroglobulinszerű 1-hez	196.	K2C6C	II-es típusú keratin 6C, citoskeletális
57.	B3KW21	Nagyon hasonló a Coatomer gamma alegységéhez	197.	K2C78	II-es típusú keratin 78, citoskeletális
58.	B7Z507	Nagyon hasonló a Matrix metalloproteinase-9-hez	198.	B1AN48	Kis prolinban gazdag fehérje 3
59.	B4DQ54	Közepesen hasonló a Rhesus vércsoportjához, C glikoprotein	199.	A0A384NKS6	Klatrin nehéz lánc
60.	B4E112	Közepesen hasonló a Cofilin-1-hez	200.	A0A024RB75	Klorid intracelluláris csatorna fehérje
61.	B4DKL5	Nagyon hasonló a foszfoglicerát mutáz 1-hez	201.	A0A024R994	Komplement C3
62.	B4DJI1	Nagyon hasonló az L-laktát-dehidrogenáz A lánchoz	202.	KCRU	Kreatin-kináz U-típusú, mitokondriális
63.	B4E209	Nagyon hasonló a Baktericid/permeabilitást növelő fehérjeszerű 1-hez	203.	A2NUT2	Lambda-lánc
64.	B7Z992	Nagyon hasonló a Desmoplakinhoz	204.	A0A024R3R5	Lamin B receptor
65.	B4E1D3	Nagyon hasonló a Gelsolinhoz	205.	LMNB1	Lamin-B1
66.	B4E3A8	Nagyon hasonló a fibrinogén béta-lánchoz	206.	A0A0S2Z3Y1	Lektin-galaktózid-kötő oldható 3-kötő fehérje
67.	B4DNS6	Nagyon hasonló a Leukocyte elasztáz inhibitorhoz	207.	A0A024RDT4	Limfocita citoszol fehérje 1
68.	B4DRW1	Nagyon hasonló a SPARC-szerű fehérjéhez 1	208.	LDHA	L-laktát-dehidrogenáz A lánc
69.	B4E0W2	Nagyon hasonló a nagyon hosszú láncú specifikus acil-CoAdehidrogenázhoz	209.	A0A024R4K3	Malát-dehidrogenáz
70.	B4DRX0	Nagyon hasonló az Fc receptor-szerű fehérjéhez 2	210.	MMP9	Mátrix metalloproteináz-9
71.	B4DF70	Nagyon hasonló a guanilátkötő fehérje családhoz	211.	MNDA	Mieloid sejt nukleáris differenciálódási antigén

	Uniprot Kód	Azonosított fehérje		Uniprot Kód	Azonosított fehérje
72.	B4DIU3	Nagyon hasonló a peroxiredoxin-2-hez	212.	A0A024R1N1	Miozin, nehéz polipeptid 9, nem izom
73.	A8K9A4	Nagyon hasonló a 2-es típusú protein-arginin deiminázhoz	213.	MOES	Moesin
74.	A8K9E4	Nagyon hasonló a heterogén nukleáris ribonukleoprotein C-hez	214.	B0I1T1	MYO1F variáns fehérje
75.	A8K9T3	Nagyon hasonló a mátrix metallopeptidáz 8-hoz	215.	D6R9A6	Nagy mobilitású fehérje B2
76.	A8K5N5	Nagyon hasonló az acil-CoA szintetáz hosszú láncú családtagjához	216.	A0A2R8YDP4	Nátriumcsatorna fehérje
77.	A8K7F6	Nagyon hasonló a transzglutamináz 1-hez	217.	SYNE2	Nesprin-2
78.	B7ZAY2	Nagyon hasonló az eukarióta transzlációs iniciációs faktorhoz 4A	218.	DEF1	Neutrofil defenzin 1
79.	B2R7W4	Nagyon hasonló a Ras-rokon Rap-1b fehérjéhez	219.	DEF3	Neutrofil defenzin 3
80.	B2R9S4	Nagyon hasonló a heterogén nukleáris ribonukleoprotein R-hez	220.	B2ZDQ1	Neutrofil zselatinázzal asszociált lipocalin
81.	B2RBF9	Nagyon hasonló az aktin sapka fehérjéhez	221.	B3KM80	Nukleolin
82.	B2RBR9	Nagyon hasonló a peptidil-arginin-deiminázhoz, I-es típusú	222.	A0A140VJN8	Perilipin
83.	B2RCM3	Nagyon hasonló a karioferin (importin) béta 1-hez	223.	K7EKI8	Periplakin
84.	B2RDX5	Nagyon hasonló a kalpain 2-höz, (m/II) nagy alegység	224.	A0A0A0MSI0	Peroxiredoxin-1
85.	Q08ES8	Nagyon hasonló a treonil-tRNS szintetázhoz	225.	PRDX6	Peroxiredoxin-6
86.	ZN442	Cink-ujj fehérje 442	226.	PLST	Plastin-3
87.	CYTB	Cisztatin-B	227.	PLEC	Plektin
88.	CYTN	Cisztatin-SN	228.	PCBP1	Poli(rC)-kötő fehérje 1
89.	CRIS3	Ciszteinben gazdag szekréciós fehérje 3	229.	A0A024R9C1	Poliadenilát-kötő fehérje
90.	A0A0S2Z3S6	Citokróm b-245 béta polipeptid 1. izoforma	230.	PDC6I	Programozott sejthalál 6-kölcsönhatású fehérje
91.	H3BRG4	Citokróm b-c1 komplex 2. alegység, mitokondriális	231.	A8K401	Prohibitin
92.	A0A024R7I2	Citokróm P450, 4. család, F alcsalád, 3. polipeptid	232.	PRSS8	Prosztasin

	Uniprot Kód	Azonosított fehérje		Uniprot Kód	Azonosított fehérje
93.	DYHC1	Citoplazmatikus dynein 1 nehéz lánc 1	233.	PSA1	Proteaszóma alegység alfa-1
94.	A0A024RBH2	Citoszkeletonhoz kapcsolódó fehérje 4	234.	H0YN18	Proteaszóma endopeptidáz komplex
95.	A0A087WVQ6	Citrát szintáz	235.	LEG1H	Protein LEG1 homológ
96.	CO3	Kluszterin	236.	B2R4M6	Protein S100
97.	H2AY	Copine III	237.	S10A8	Protein S100-A8
98.	CRNN	Cornulin	238.	S10A9	Protein S100-A9
99.	A0A024R611	Koronin	239.	UN13D	Protein unc-13 homológ D
100.	Q13876	Csont eredetű növekedési faktor	240.	D6CHE9	Proteináz 3
101.	A0A024RC30	Desmoglein 3	241.	B4DLV7	Rab GDP disszociáció gátló
102.	DESP	Dezmoplakin	242.	A0A024R5Z8	RAB11A
103.	Q53EP4	Dolicil-difoszfooligoszacharid – fehérje glikoziltranszferáz 1. alegység	243.	A0A024R7V6	RAB2
104.	B2RWN9	DOPEY1 fehérje	244.	A0A024R1P2	Ras-rokon C3 botulinum toxin szubsztrát 2
105.	DYSF	Diszferlin	245.	PTPRC	Receptor típusú tirozin-protein foszf
106.	A0A075B6G3	Disztrofin	246.	ASPM	Rendellenes orsó szerű mikrokefáliával kapcsolatos fehérje
107.	EF1G	Elongációs faktor 1-gamma	247.	GDIR1	Rho GDP-disszociáció gátló 1
108.	ERP29	Endoplazmatikus retikulum rezidens fehérje 29	248.	A0A024R2Q4	Riboszomális fehérje L15
109.	ENPL	Endoplazmin	249.	A0A024R814	Riboszomális fehérje L7,
110.	A0A024R8L8	Envoplakin	250.	A0A024R1N4	Röntgen-javító fehérje
111.	ECP	Eozinofil kationos fehérje	251.	XRCC5	Röntgen-javító kereszt-komplementáló fehérje 5
112.	B2RDW1	Epididymis luminális fehérje 112	252.	Q5K634	SCCA2/SCCA1 fúziós fehérje
113.	V9HWE1	Epididymis luminális fehérje 113	253.	SCEL	Sciellin
114.	D9IAI1	Epididymis szekréciós fehérje Li 34	254.	A0A1U9X8Y4	Sejtnövekedést gátló fehérje 34
115.	ERO1A	ERO1-szerű fehérje alfa	255.	A0A0A0MQW3	Serpin B13
116.	E7EQR4	Ezrin	256.	SPB3	Serpin B3
117.	A8K0T9	F-aktin sapka fehérje alfa alegység	257.	A0A024R2B6	Serpin peptidáz inhibitor, B klade (ovalbumin), 5. tag
118.	FBX50	„F-box only” protein 50	258.	B2ZZ89	Spectrin béta lánc
119.	B3KQT9	Fehérje-diszulfid-izomeráz	259.	A0A024R889	Spectrin, alfa, nem eritrocita 1
120.	URP2	Fermitin család homológja 3	260.	A0A1L1UHR1	Spermakötő fehérje 1a
121.	A0A024QZN9	Feszültségfüggő anioncsatorna 2	261.	A0A024R882	Sztomatin
122.	FILA	Filaggrin	262.	A0A1S5UZ07	Talin-1

	Uniprot Kód	Azonosított fehérje		Uniprot Kód	Azonosított fehérje
123.	A0A087WWY3	Filamin-A	263.	A0A2R8Y478	Tetraspanin
124.	B4DEA8	Nagyon hasonló a keratinhoz, II-es típusú citoskeletális 4	264.	A0A494C0J7	TGc domént tartalmazó fehérje
125.	FMNL1	Forminszerű fehérje 1	265.	A0A0A0MTS7	Titin
126.	PGAM1	Foszfoglicerát mutáz 1	266.	F5GWF6	T-komplex fehérje 1 alegység béta
127.	PLBL1	Foszfolipáz B-szerű 1	267.	Q53HV2	T-komplex fehérje 1 alegység eta
128.	B3KUE5	Foszfolipid transzfer fehérje	268.	A0A140VK56	Transzaldoláz
129.	MVP	Fő boltozati fehérje	269.	Q53EM5	Transzketoláz változat
130.	A0A024R693	Galectin	270.	A0A0G2JN10	Transzmembrán proteáz szerin
131.	A0A140VJK2	Glicerín-3-foszfát-dehidrogenáz	271.	TM11B	Transzmembrán proteáz szerin 11B
132.	PYGL	Glikogén-foszforiláz, májforma	272.	TM11D	Transzmembrán proteáz szerin 11D
133.	B3KT18	Glutamát dehidrogenáz	273.	Q53HE2	Triózfoszfát izomeráz
134.	A0A2R8YDT1	Glutamin szintetáz	274.	A0A087WWU8	Tropomiozin alfa-3 lánc
135.	GSTP1	Glutation S-transzferáz P	275.	TACD2	Tumorhoz kapcsolódó kalcium jelátalakító 2
136.	B4DVJ0	Glükóz-6-foszfát izomeráz	276.	A0A024R1P7	Unc-84 B homológ
137.	A0A384NL00	Glükóz-6-foszfát-1-dehidrogenáz	277.	VPS35	Vacuoláris fehérjeválogatással kapcsolatos fehérje 35
138.	A0A024R592	Glükózidáz, alfa-semleges AB	278.	VINC	Vinculin
139.	GRAN	Grancalcin	279.	D9ZGG2	Vitronectin
140.	GBB2	Guanin nukleotid-kötő fehérje G(I)/G(S)/G(T) alegység béta-2	280.	VATA	V-típusú proton ATPáz katalitikus alegység A

A 20. ábrán szereplő Uniprot kódokhoz tartozó fehérjék neve:

1433Z: 14-3-3 fehérje zéta/delta; **A0A024QZK7:** Hexokináz 1; **A0A024QZN4:** Vinkulin; **A0A024R1P2:** Ras-rokon C3 botulinum toxin szubsztrát 2; **A0A024R1X8:** Junction plakoglobulin; **A0A024R3E3:** Apolipoprotein A-I; **A0A024R3J1:** Háromrészes motívumot tartalmazó 29; **A0A024R3R5:** Lamin B receptor; **A0A024R528:** Interleukin-1; **A0A024R611:** Koronin; **A0A024R694:** Alfa 1 aktinin; **A0A024R6I7:** Alfa-1-antitripszin; **A0A024R7R1:** Hexokináz 3; **A0A024R7V6:** RAB2; **A0A024R882:** Sztomatin; **A0A024R994:** Komplement C3; **A0A024RA52:** Proteaszóma alfa alegység; **A0A024RAI1:** Aktin-szerű fehérje 3; **A0A024RBH2:** Citoszkeletonhoz kapcsolódó fehérje 4; **A0A024RD80:** Hősokk-fehérje 90 kDa alfa; **A0A024RDT4:** Limfocita citoszol fehérje 1; **A0A087WWY3:** Filamin-A; **A0A087X2G1:** ATP-függő RNS-helikáz DDX1; **A0A0A0MSI0:** Peroxiredoxin-1; **A0A0A0MTS7:** Titin; **A0A0S2Z2Z6:** Annexin; **A0A1S5UZ07:** Talin-1; **A0A384NKS6:** Klatrin nehéz lánc; **A0A384NL00:** Glükóz-6-foszfát-1-dehidrogenáz; **A0A494C0X7:** Integrin béta; **A8K0T9:** F-aktin sapka fehérje alfa alegység; **A8K401:** Prohibitin; **ANX11:** Annexin A11; **ANXA3:** Annexin A3; **ANXA5:** Annexin A5; **AXA81:** Annexin A8-szerű fehérje 1; **B2ZDQ1:** Neutrofil zselatinázzal asszociált lipokalin; **B2ZZ89:** Spektrin béta lánc; **B4DLV7:** Rab GDP disszociációt gátló fehérje; **B4DR52:** Hiszton H2B; **B4DVJ0:** Glükóz-6-foszfát izomeráz; **B7Z4B2:** Aminopeptidáz; **BPIA:** "BPI-fold"-ot tartalmazó A családtag 1; **BPIA2:** „BPI-fold”-ot tartalmazó A családtag 2; **CALR:** Kalretikulin; **CALX:** Kalnexin; **CEAM5:** Karcinoembrionális antigénnel kapcsolatos sejtdhéziós molekula 5; **CO3:** Kluszterin; **CRIS3:** Ciszteinben gazdag szekréciós fehérje 3; **CYTB:** Cisztatin-B; **D6CHE9:** Proteináz 3; **D6R9A6:** Nagy mobilitású fehérje B2; **D9ZGG2:** Vitronektin; **DEF1:** Neutrofil defenzin 1; **DEF3:** Neutrofil defenzin 3; **DESP:** Dezmoplakin; **DHX9:** ATP-függő RNS-helikáz A; **DYHC1:** Citoplazmatikus dynein 1 nehéz lánc 1; **DYSF:** Diszferlin; **E7EQR4:** Ezrin; **ECP:** Eozinofil kationos fehérje; **ENPL:** Endoplazmin; **ERP29:** Endoplazmatikus retikulum rezidens fehérje 29; **F5GWF6:** T-komplex fehérje 1 béta alegység; **GRAN:** Grancalcin; **GSTP1:** Glutation S-transzferáz P; **H2AY:** Copine III; **HIS1:** Hisztatin-1; **HORN:** Hornerin; **HS90A:** Hősokk fehérje HSP 90-alfa; **HSP7C:** Hősokk rokon 71 kDa fehérje; **HSPB1:** Hősokk-fehérje béta-1; **ITAM:** Integrin alfa-M; **K1C16:** I-es típusú keratin 16, citoszkeletális; **1K22E:** II-es típusú keratin 2, citoszkeletális; **LOX5:** Arachidonát 5-lipoxigenáz; **MMP9:** Mátrix metalloproteináz-9; **MNDA:** Mieloid sejt nukleáris differenciálódási antigén; **MOES:** Moesin; **MVP:** Fő boltozati fehérje; **PADI4:** 4-es típusú protein-arginin deimináz; **PGAM1:** Foszfoglicerát mutáz 1; **PRDX6:** Peroxiredoxin-6; **PSA1:** Proteaszóma alegység alfa-1; **PSD11:** 26S proteaszóma nem ATPáz szabályozó alegység 11; **PSMD2:** 26S proteaszóma nem ATPáz szabályozó alegység 2; **PTPRC:** Receptor típusú tirozin-protein foszfatáz C; **PYGL:** Glikogén-foszforiláz, májforma; **Q13876:** Csont eredetű növekedési faktor; **S10A8:** Protein S100-A8; **S10A9:** Protein S100-A9; **SLPI:** Antileukoproteináz; **SPB3:** Serpin B3; **TERA:** Átmeneti endoplazmatikus retikulum ATPáz; **UN13D:** Protein unc-13 homológ D; **URP2:** Fermitin család homológ 3; **VPS35:** Vacuoláris fehérjeválogatással kapcsolatos fehérje 35; **XRCC5:** Röntgen-javító kereszt-komplementáló fehérje 5.

Konferencia poszterek és előadások

Szabó Zsuzsa, Fésüs László and Király Róbert: Characterisation of the isopeptidase activity of human blood coagulation factor XIII-A. *"Transglutaminases in human Medicine" Debrecen University Symposium*. Debrecen, Magyarország, 2017. 08. 03. (poszter)

Szabó Zsuzsa and Király Róbert: Characterisation of the isopeptidase activity of human blood coagulation factor. *10th Molecular, Cellular and Immune Biology Winter Symposium*. Debrecen, Magyarország, 2017. 01. 07. (poszter)

Tolvaj Beatrix, **Szabó Zsuzsa**, Fésüs László, Korponay-Szabó Ilma Rita, Király Róbert: Characterisation of exogenous transglutaminase 4 expression in AD-293 and PC-3 cells. *11th Molecular, Cellular and Immune Biology Winter Symposium*. Debrecen, Magyarország, 2018. 01. 10. (poszter)

Zsuzsa Szabó: Characterisation of the isopeptidase activity of human blood coagulation factor. *11th Molecular, Cellular and Immune Biology Winter Symposium. Debrecen, Magyarország*, 2018. 01. 10. (előadás)

Szabó Zsuzsa, Szabó András, Fésüs László, Korponay-Szabó Ilma Rita, and Király Róbert: Characterisation of the recombinant human prostate transglutaminase. *Gordon Research Conference on Transglutaminases in Human Disease Processes*. Svájc, Les Diablerets, 2018. 06. 16-22. (poszter)

Szabó Zsuzsa: *In vitro* characterisation of human transglutaminase 4 activity and biological stability. *12th Molecular, Cellular and Immune Biology Winter Symposium*. Debrecen, Magyarország, 2019. 01. 10. (poszter)

Tolvaj Beatrix, **Szabó Zsuzsa**, Fésüs László, Korponay-Szabó Ilma R, Király Róbert: Characterisation of exogenous transglutaminase 4 expression in AD-293 and PC-3 cells. *Hungarian molecular life sciences sciences*. Eger, Magyarország, 2019. 03. 29-31. (poszter)

Szabó Zsuzsa, Szabó András, Fésüs László, Korponay-Szabó Ilma Rita, Király Róbert: *In vitro* characterisation of human transglutaminase 4 activity and biological stability. *Hungarian molecular life sciences sciences*. Eger, Magyarország, 2019. 03. 29-31. (poszter)

Csobán-Szabó Zsuzsa: Protein-peptide based assay for the characterisation of human blood coagulation XIII-A isopeptidase activity. *13th Molecular, Cellular and Immune Biology Winter Symposium*. Debrecen, Magyarország, 2020. 01. 09. (előadás)

Csobán-Szabó Zsuzsa: An attempt to reveal the biological function of human transglutaminase 4 in the human saliva. *14th Molecular, Cellular and Immune Biology Winter Symposium.* Debrecen, Magyarország, 2021. 01. 06. (előadás)

Csobán-Szabó Zsuzsa, Diós Ádám, Fésüs László, Korponay-Szabó Ilma Rita, Róbert Király: An attempt to reveal the biological function of human transglutaminase 4 in the intestinal tract *Hungarian molecular life sciences sciences.* Eger, Magyarország, 2021. 11. 05. (poszter)

Csobán-Szabó Zsuzsa: An attempt to reveal the biological function of human transglutaminase 4 in the intestinal tract. *15th Molecular, Cellular and Immune Biology Winter Symposium.* Debrecen, Magyarország, 2022. 01. 06. (előadás)