대한산업의학회지 제 15 권 제 2 호 (2003년 6월)
Korean J Occup Environ Med, 2003;15(2):173-180

# 면역조직화학법에 의한 규폐결절에서 혈장 응고인자 XIII, 트랜스글루타미네이스 3 및 $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine 교차결합의 증명

가톨릭대학교 의과대학 자연과학교실[1], 성형외과학교실[2]

**김유미[1] · 김영진[2] · 이수영[1]**

— **Abstract** —

## Identification of Plasma Coagulation Factor XIII, Transglutaminase 3 and $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) Lysine Cross-Link in the Silicotic Nodule by Immunohistochemistry

You Mie Kim[1], Young Jin Kim[2], Soo Young Lee[1]

*Department of Natural Sciences[1], Plastic Surgery[2], College of Medicine, The Catholic University of Korea*

**Objectives**: This study was performed to examine the immunohistochemical distribution of TGase 1, 2, 3, coagulation factor XIII and $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine cross-link in the silicotic nodules formed after an intratracheal instillation of the silica.

**Methods**: The immunohistochemical examinations used antibodies against TGase 1, 2, 3, coagulation factor XIII and $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine isopeptide in the silicotic nodules induced after an intratracheal instillation of 50 mg of size fractionated, crystalline silica.

**Results**: A high level of TGase 3 was related to the severity of fibrosis in silicotic nodules and extracellular coagulation factor XIII was detected around the nodules. Expressions of both membrane-bound TGase 1 and TGase 2 were barely detected in the nodules although high expressions were detected in the intact lung. Formation of $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine cross-links was increased in severe fibrotic nodules.

**Conclusions**: TGase 3 might contribute to the eventual stone-like fibrosis via formation of $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine cross-links. Futhermore, coagulation factor XIII plays a role in the formation of a provisional matrix which results in fibrogenesis during silicotic nodule formation.

**Key Words**: Transglutaminases(TGases), Plasma coagulation factor XIII (F-XIII), Silicotic nodule, $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine cross-link

<접수일: 2003년 3월 6일, 채택일: 2003년 4월 18일>

교신저자: 이 수 영 (Tel: 02-590-1263) E-mail: lsyng@catholic.ac.kr

## 서 론

트랜스글루타미네이스(transglutaminase: E.C. 2,3,2,13,TGase)는 단백질의 lysine 잔기의 $\varepsilon NH_2$ 가지 사슬(side chain)과 단백질의 glutamine 잔기의 γ-amide 가지사슬 사이의 isodipeptide 교차결합(cross-link) 형성을 촉매화 함으로써, 불용성의 거대분자 응집물(macromolecular aggregate)을 생성하며, 이 응집물들은 여러 가지의 세포기능에 이용된다. TGase들은 지혈, 정액의 응고 또는 keratinocyte의 각화 envelope 형성시에 단백질을 교차결합 시킴으로써 특수한 기능을 하기 위하여 진화되어온 단백질 군(family)을 이루고 있다(Folk & Chung, 1973; Folk, 1980). 즉 조직 TGase의 교차결합 활성은 표적 단백질들의 위치에 의존해 전혀 별개의 생물학적 현상을 도와줄 수 있다. 조직 TGase가 세포안에서 활성화되면 세포사(apoptosis)를 일으키는 세포에서 교차결합 단백질 envelope를 만드는 반면, 세포밖에서 활성화되면 세포밖의 마트릭스를 안정화시켜 세포와 기질사이의 상호반응을 증진시킨다. 조직 TGase의 합성과 활성화가 정상적으로 조직항상성(homeostasis)에 기여하는 방어성 세포반응의 부분인 반면, 이 효소가 섬유화, 동맥경화증, 신경변성질환, celiac병 및 암 전이와 같은 많은 병태생리학적 조건에 관여한다고 알려지고 있다(Aeschlimann & Thomazy, 2000).

규폐증은 폐에 심한 섬유화가 특징이며, 분사기 작업자와 탄광 광부, 주물공장과 채석장 작업자 및 그 밖의 분진에 노출되는 공장 근로자에 흔히 발생한다(American Thoracic Society, 1997). 이 규폐증의 발생과정은 많이 알려져 있다. 즉 세포들의 증식, 세포 밖 마트릭스의 침착 및 염증세포들의 축적등이 원인이 된 결과 생긴 폐의 섬유화 결절의 생성이다(Davis, 1986).

본 연구실에서의 과거의 연구결과(Lee et al., 1993), 유리규산을 기도에 주입한지 6주째의 폐로부터 겔 크로마토그라피의 방법으로 확인한 TGase들은 분자량이 27, 50 및 95 KDa인 반면, 대조군의 폐에서는 95 KDa의 TGase만 확인할 수 있었다. 이 결과들로 보아 TGase들의 여러가지 isoenzyme 가운데 어느 효소들이 규폐증 형성에 관여하는지의 의문점이 생기게 된다.

따라서 규폐증 형성에 어느 형의 TGase들이 관여하고 또한 혈액 응고인자 XIII도 관여하는지와 이들 TGase들에 의해서 촉매화된 반응산물인 $N^{\varepsilon}$-(γ-glutamyl) lysine 교차결합이 생성되는지의 여부를 면역조직화학법으로 추구하기 위하여 이 연구를 행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 재료

면역조직화학법에 사용한 Tyramide Signal Amplification간접 면역조직화학법 kit, blocking 용액, streptavidin-peroxidase conjugate 및 biotinyl tyramide working 용액은 NEN (Boston, MA, U.S.A.)의 제품을, biotinylated 이차 항체 및 유리규산($SiO_2$)은 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을, $N^{\varepsilon}$-(γ-glutamyl) lysine 교차결합에 대한 단클론 항체 81Dic2는 CovalAb(Oullins Cedex, France) 제품을, 그리고 재조합 사람 TGase 1, guinea-pig TGase 2 및 TGase 3에 대한 항체는 아주대의 정수일 박사로부터 제공받았으며, 토끼 혈액 응고인자 XIII에 대한 항체는 가톨릭의대의 이수영 교수로부터 제공받아 각각 사용하였다.

### 2. 동물실험

실험동물은 체중 200 g 내외의 Sprague-Dawley 계의 숫 흰쥐를 사용하였다. 즉 규폐증을 유발하기위하여 500 μl의 무균 생리식염수에 50 mg의 유리규산($SiO_2$, 0.15~10 μm)을 부유시킨 부유물을 기도에 주입하였다. 대조 동물들은 동량의 생리식염수만을 기도에 주입하였다. 유리규산의 주입 후 2, 3, 4, 5 및 15주에 각각 동물들은 폐사시키고 나서 폐를 적출하였다. 각 실험군은 5마리의 흰쥐를 사용하였다.

### 3. 조직학적 및 조직화학적 검색

각각의 폐 조직으로부터 병변 부위를 세절하여 10% 중성 포르말린에 고정한 다음, 탈수과정을 거

쳐 파라핀 또는 왁스에 포매하고 나서 5 μm 두께로 자른 다음 탈-파라핀 또는 탈-왁스과정을 거쳐 hematoxylin-eosin(H&E) 염색 또는 Masson의 trichrome 염색을 하였다.

### 4. TGase들의 발현

면역염색은 Tyramide Signal Amplification-간접 면역조직화학법 kit를 사용해서 행하였다. 즉 조직 절편을 재수화 시킨 후 endogenous peroxidase 활성을 메타놀에 용해된 3% 과산화수소를 사용해서 없앴다. 그 후 조직 절편을 blocking 용액으로 차단시키고 나서 조직 절편과 1차 항체를 4℃ humid chamber 속에서 밤새도록 반응시켰다. 1차 항체로는 goat anti-human recombinant TGase 1, goat anti-ginea pig TGase 2, rabbit anti-ginea pig TGase 3 (Kim et al., 1990) 및 goat anti-rabbit coagulation factor XIII (F-XIII)을 각각 사용하였다. 각각의 1차 항체와 반응한 조직 절편을 0.05% tween 20을 함유하고 있는 Tris완충 생리식염수(T-TBS)로 세척하고 나서, blocking 용액으로 희석시킨 biotinylate화 된 2차 항체로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 T-TBS로 세척하고 나서, 조직 절편을 streptavidin-peroxidase conjugate로 실온에서 30분 동안 반응시켰다. Biotinyl tyramide 용액에 담구어서 각각의 signal을 증폭시킨 후, 조직절편을 streptavidin-peroxidase conjugate 속에 다시 담구었다. 그 후 T-TBS로 조직 절편을 세척하고 나서, 조직에 결합된 peroxidase를 TBS에 용해시킨 0.2%의 3,3'-diaminobenzidine과 반응시켜 발색시켰다. 그 후 조직 절편을 hematoxylin으로 염색하였다.

이 연구에서 사용된 TGase 1, 2, 3 및 F-XIII에 대한 항체들은 해당되는 흰쥐의 항원들과 각각 면역학적 교차반응(cross-reactivity)을 보였다.

### 5. $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl)lysine 교차결합의 발현

규폐결절에서의 $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl)lysine 교차결합을 조사하기 위해 사용된 면역조직화학법은 1차 및 2차 항체를 제외하고 위의 TGase들의 분포(발현)를 확인하기 위하여 사용한 방법과 같았다. 즉 1차 항체는 $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl)lysine 교차결합에 대한 단클론 항체 81Dic2였고, 여기에 해당되는 biotinylate된 2차 항체를 사용하였다.

1차 항체 및 2차 항체와 반응시킨 후, 조직절편을 streptavidin-peroxidase conjugate와 반응시키고 나서, biotynyl tyramide로 signal을 증폭시킨 후, 3,3'-diaminobenzidine으로 발색시킨 후 hematoxylin 염색을 하였다.

## 결 과

### 1. 규폐결절의 형성 단계

유리규산의 기도 내 주입 후 2주째에 초기의 육아종이 관찰되었는데 이 육아종에는 대식세포와 소수의 소원형 세포들이 섬유화에 혼재되어 있었다. 주입 후 3주째에는 미성숙 육아종들이 관찰되었는데 이 육아종에는 그 중심부에 소량의 교원질이 침착되었고, 주변부에는 섬유모세포들의 증식을 보였다. 주입 후 4주째에는 성숙된 규폐결절들이 형성되었는데 이 규폐결절은 교원질이 현저하게 침착되어 있었다(Fig. 1). 5주 및 15주째의 규폐결절들은 섬유화가 더욱 심하였다(그림으로 발표하지 않았음.).

### 2. TGase들의 발현

규폐결절 내의 TGase들의 분포를 관찰하기 위하여 TGase 1, 2, 3 및 F-XIII에 대한 다클론 단일특이 항체들(polyclonal mono-specific antiboies)을 사용하여 검사하였다.

그 결과 TGase 1과 2는 규폐결절 속에서 거의 검출되지 않은 반면 정상 폐조직에서는 발현을 보였다(Fig. 2). 유리규산의 기도 내 주입 후 15주째에는 규폐결절들 속의 TGase 3의 발현은 5주째에 비하여 증가된 반면, 대조군들의 폐조직에서는 관찰되지 않았다. F-XIII은 유리규산 주입 후 4주째에, 규폐결절 주위에서 세포와 세포들 사이에서 발현되었다(Fig. 4).

### 3. $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine isopeptide 교차결합물의 발현

규폐결절 속에서 $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine

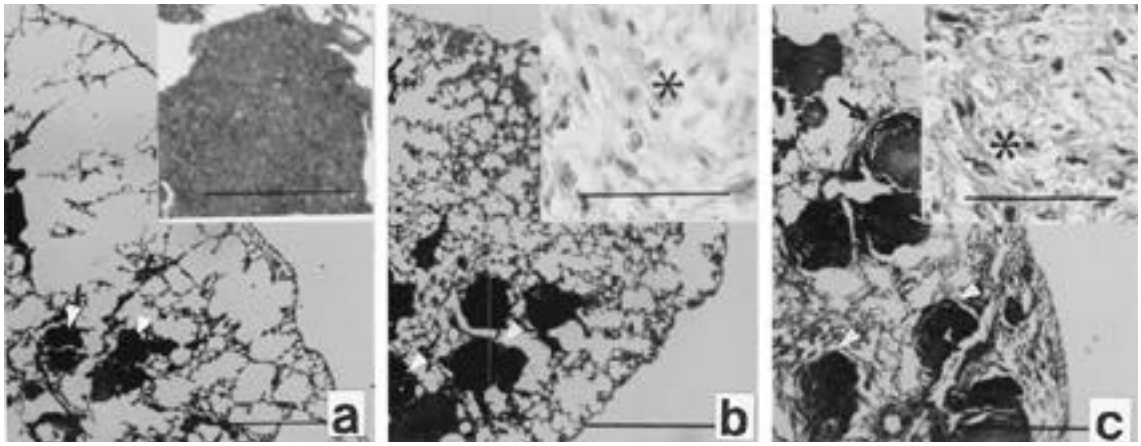


**Fig. 1.** Photomicrographs in a portion of the lungs 2, 3 and 4 weeks following instillation of silica suspension. Sprague-Dawley rats (200 g) received an intratracheal instillation of 50 mg silica suspended in 0.3 ml saline. **a**: 2 weeks old lung, showing early granulomas as indicated by arrows (H&E, ×170), a-inset: high-power view of a portion of the early granuloma, showing macrophages and a few lymphocytes (Masson's trichrome, ×340). **b**: 3 weeks old lung, showing immature silicotic nodules by arrows (H&E, ×170), b-inset: high-power view of a portion of the immature silicotic nodule, showing proliferation of fibroblasts and moderate deposition of collagen (Masson'trichrome, ×680). **c**: 4 weeks old lung, showing mature silicotic nodule by arrows (H&E, ×340), c-inset: high-power view of a portion of the mature silicotic nodule, showing massive deposition of collagen (Masson'trichrome, ×680).

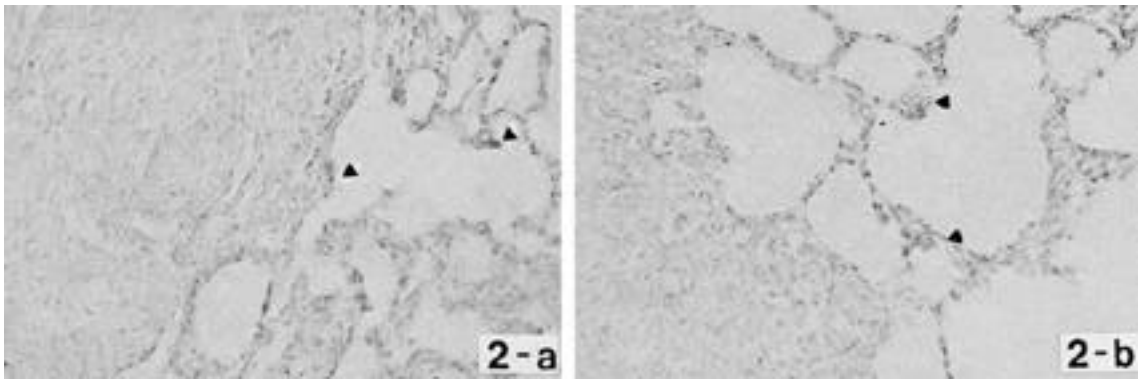


**Fig. 2.** Immunohistochemicographs of TGase 1- and 2-distribution, showing negative immuno- reactivity in silicotic nodule and positive immuno-reactivity in intact lung tissue. **a**: TGase 1- lung 4 weeks after silica instillation(×340). **b**: TGase 2- lung 4 weeks after silica instillation (×340).

isopeptide 교차결합물들의 발현을 관찰하기 위하여 $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine isopeptide 교차결합물에 대한 단클론항체를 사용하여 면역조직화학법으로 검사하였다(Alaoui et al., 1991).

그 결과 $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine dipeptide의 발현은 유리규산의 기도 내 주입 후 5주째의 규폐결절에서의 발현 정도에 비해 15주째의 규폐결절에서 현저하게 증가된 반면, 대조군의 폐조직에서는 전혀 관찰할 수 없었다(Fig. 5).

## 고 찰

이 연구결과 세포 내의 TGase 3과 $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine isopeptide 교차결합물의 발현이 규폐결절 형성과 관련되어 있으며, 세포밖의 F-XIII의 발현은 규폐결절 주변부에서 현저히 증가되었다. 그

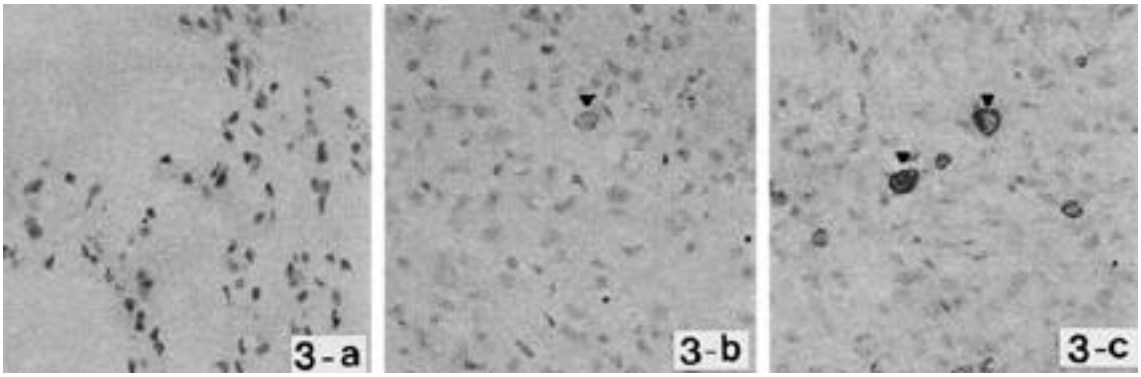


**Fig. 3.** Immunohistochemicographs of TGase 3 in silicotic nodules. **a**: lung 5 weeks after saline instillation, showing negative immuno-reactivity(×680). **b**: a portion of silicotic nodule 5 weeks after silica instillation, showing mild immuno-reactivity(×680). **c**: a portion of silicotic nodule 15 weeks after silica instillation, showing strong immuno-reactivity(×680).

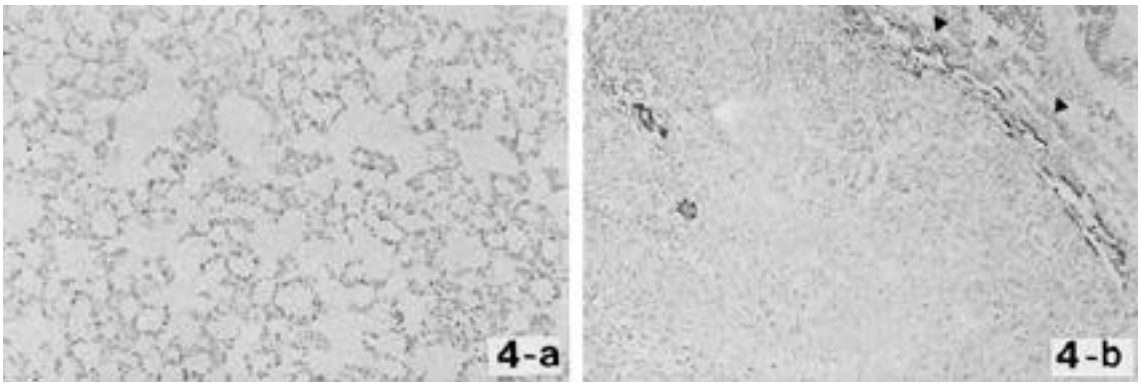


**Fig. 4.** Immunohistochemicographs of F-XIII distribution in silicotic nodules. **a**: lung 4 weeks after saline instillation, showing negative immuno-reactivity(×340). **b**: lung 4 weeks after silica instillation, showing high immuno-reactivity around the silicotic nodule(×340).

러나 TGase 1과 TGase 2는 대조군의 폐조직에서는 그 발현이 증가되었으나 규폐결절에서는 발현되지 않았다.

규폐증의 발생기전은 많이 밝혀졌다. 즉 유리규산의 흡입 후 유리규산 입자들이 폐포의 상피세포들 및 대식세포들과 반응하여 그 결과 폐조직의 손상을 일으키고 섬유화가 시작된다. 결절형 유리규산에 의한 폐조직 및 세포 손상을 일으키는 기전은 유리규산 입자 표면의 화학반응성에 근거를 두고 있다고 생각된다. 즉 유리규산 입자 표면의 SiOH group이 세포막 단백질 및 인지질과 결합하여 그 결과 세포막 단백질의 변성과 지질막의 손상을 일으킨다(Nash et al., 1996). TGase가 교차결합을 통하여 육아조직의 재모델링에 관여하며 염증의 초기단계에서 활성화된 F-XIII에 의해서 형성된 isopeptide인 교차결합된 fibrin이 일시적으로 마트릭스를 형성함으로써 기계적인 안정을 유지해 준다고 보고되고 있다(Lorand and Conrad, 1984).

TGase 1은 막(membrane) 또는 입자 분획(particulate fraction)에 존재하며 상피세포들에서 광범위하게 발현되고, 그 효소의 비활성도(specific activity)는 매우 낮지만 종말 분화(terminal differentiation)에 단백질 분해효소들에 의해서 분자량이 106 KDa이던 것이 67/33/10-KD로 잘려지고 활성이 매우 높아지면서 세포질내로 유출되어 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 1995; Steinert et al., 1996). TGase 2는 세포질에 광범위하게 발현되며 분자량은 80 KDa이다

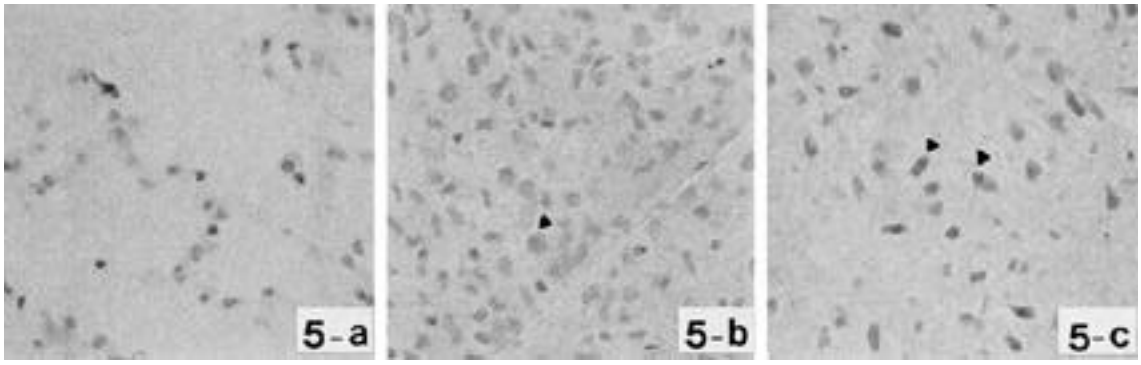


**Fig. 5.** Immunohistochemicographs of $N^{\varepsilon}$-(γ-glutamyl) lysine dipeptide in silicotic nodules. **a**: lung 5 weeks after saline instillation, showing negative immuno-reactivity(×680). **b**: a portion of a silicotic nodule 5 weeks after silica instillation, showing weak immuno-reactivity(×680). **c**: a portion of silicotic nodule 15 weeks after silica instillation, showing strong immuno-reactivity(×680).

(Folk and Finlayson, 1977). TGase 3은 주로 상피세포들에 발현되며, 세포질 내에도 존재하고 칼슘이온에 의해서 유발되는 종말 분화 시에 단백질 분해효소(dispase 등)들에 의해서 분자량이 77 KDa이던 것이 50/27-KDa 복합체를 형성하면서 기능을 하는 것으로 이해되고 있다(Kim et al., 1990; Kim et al., 1993). 이들 TGase들은 단백질내의 lysine 잔기의 $^{\varepsilon}NH_2$ 곁가지와 같은 단백질 또는 다른 단백질내의 glutamine 잔기의 γ-amide 곁가지 사이의 $N^{\varepsilon}$-(γ-glutamyl) lysine 교차결합, 즉 isopeptide의 형성반응을 촉매화한다(Folk and Finlayson, 1977). 또한 F-XIII은 세포내(혈소판 또는 활성단핵구) 이합체(dimeric $A_2$) 또는 혈장4합체($A_2B_2$) 전효소(zymogen)형으로 존재하며, 이것들이 혈액응고 시에 트롬빈에 의하여 활성화되면, 활성형($A_2$ 'B$_2$)이 혈액응고의 마지막 단계에서 fibrin의 교차결합 형성을 촉매화한다고 알려져 있다(Curtis and Lorand, 1976). 다른 육아종성 염증과 마찬가지로 규폐증은 명확한 일련의 병적과정이기 보다는 복잡한 병적과정으로 이해되고 있다. 따라서 이 연구에서 규폐결절 주변부에서 F-XIII이 발현된 것은 규폐증의 초기에 일시적 마트릭스 형성에 이 F-XIII이 관여한 것 같다.

대부분의 2형 폐상피세포(pneumocyte)가 surfactant를 분비할 때와 아마도 폐세포가 1형과 2형의 폐상피세포 사이의 중간단계의 세포로 활발히 분화할 때 TGase의 활성이 최고치에 달하며(Hind et al., 1988; Richards et al., 1991), TGase 3은 피부의 keratinocyte에서 종말분화 시에 발현된다고 보고 되었다(Steinert and Marekov, 1977).

따라서 이 연구에서 규폐결절 내에서의 TGase 3과 $N^{\varepsilon}$-(γ-glutamyl) lysine 교차결합물의 발현은 종말분화 폐상피세포인 분화중인 2형의 폐상피세포들이 TGase 3을 생산하여 이 TGase 3이 isopeptide 형성에 기여한 것 같다. 또한 여기서 언급하고자 하는 것은 본 연구실에서 50 KDa 및 27 KDa의 TGase들을 유리규산 주입 후 6주째의 폐조직에서 증명한 것이다(Lee et al., 1993).

이 연구에서 TGase 3의 양과 함께 $N^{\varepsilon}$-(γ-glutamyl) lysine isopeptide 교차결합물의 양이 규폐결절 내의 섬유화의 정도와 관련이 있었다. 또한 규폐결절의 세포핵에 국한해서 isopeptide가 존재하는 것은 TGase에 의해 glutamine이 단백질 내 lysine의 $^{\varepsilon}NH_2$와 결합하기 보다는 오히려 1차 아민들(polyamines)과의 반응에 의해서 세포질 내의 isopeptide가 감소되었기 때문인 것 같다(Roch et al., 1991).

이상의 소견들로 보아 TGase 3은 $N^{\varepsilon}$-(γ-glutamyl) lysine 교차결합의 형성을 통해 섬유화를 일으키는데 기여하고, F-XIII은 일시적 마트릭스의 형성에 역할을 하는 것임을 말해 주고 있다.

## 요 약

**목적**: 유리규산을 기도내로 주입한 후 형성된 규폐결절내의 TGase 1, 2, 3, 혈액 응고인자 XIII 및

$N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine 교차결합의 발현 분포를 조사하기 위하여 이 연구를 행하였다.

**방법**: 유리규산 50 mg을 흰쥐의 기도내에 주입한 후 형성된 규폐결절 조직내의 TGase 1, 2, 3, 혈액 응고인자 XIII 및 $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine의 분포를 검사하기 위하여 이들의 항체들을 각각 사용하여 면역조직화학법으로 조사하였다.

**결과**: TGase 3의 발현이 규폐결절의 섬유화의 심한 정도와 관련이 있었고, 세포밖의 혈액 응고인자 XIII이 결절 주위에서 검출되었다. 대조군의 폐조직에서 막결합 TGase 1과 TGase 2가 높은 발현을 보인 반면, 규폐결절에서는 거의 검출되지 않았다. 규폐결절내에 섬유화가 심한 장소에서는 $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine 교차결합의 형성이 증가되었다.

**결론**: TGase 3이 $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine 교차결합을 촉매화한 결과 규폐결절의 섬유화에 기여하며, 혈액 응고인자 XIII은 규폐결절 형성과정에서 섬유화를 일으키는 일시적인 마트릭스의 형성에 역할을 할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 연구는 1997년 보건의료기술연구개발사업(HMP-97-M-2-0043)과 2003년 성의기초과학 연구비에 의하여 수행되었음.

## 참고문헌

Aeschlimann D, Thomazy V. Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. Connect Tissue Res 2000;41:1-27.

Alaoui SE, Legastelois S, Roch AM, Chantepie J, Quash G. Transglutaminase activity and $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine isopeptides levels in cells during growth in culture. Int J Cancer 1991;48:221-6.

American Thoracic Society. Adverse effects of crystalline silica exposure(ATS statement). Am J Respir Crit Care Med 1997;155:761-5.

Curtis CG, Lorand L. Fibrinstabilizing factor (Factor XIII). Methods Enzymol 1976;177-91.

Davis GS. Pathogenesis of silicosis: current concepts and hypotheses. Lung 1986;164:139-54.

Folk JE. Transglutaminase. Ann Rev Biochem 1980;49:517-31.

Folk JE, Chung SI. Molecular and catalytic properties of transglutaminases. Advances in Enzymol 1973;38:109-91.

Folk JE, Finlayson, JS. The $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine cross link and the catalytic role of transglutaminases. Adv Prot Chem 1977;31:1-133.

Haroon ZA, Hettasch JM, Lai TS, Dewhirst MW, Greenberg CS. Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. FASEB J 1999;13:1787-95.

Hind AL, Curtis CG, Atkins J, Powell GM, Richards RJ. Localization of transglutaminase activity in type II epithelial cell cultures and elevation of enzyme activity in lungs of rats instilled with quartz. Lung 1988;166:339-46.

Kim HC, Lewis MS, Gorman JJ, Park SC, Girard JE, Folk JE, Chung SI. Protransglutaminase E from guinea pig skin; isolation and partial characterization. J Biol Chem 1990;265: 21971-8.

Kim IG, Gorman JJ, Park SC, Chung SI, Steinert PM. The deduced sequence of the novel protransglutaminase E(TGase 3) of human and mouse. J Biol Chem 1993;268:12682-90.

Kim SY, Chung SI, Steinert PM. Highly active soluble processed forms of the transglutaminase 1 enzyme in the epidermal keratinocytes. J Biol Chem 1995;270: 18026-35.

Lee SY, Ghim GJ, Lim JW, Song YW, Kim JH. Interrelationship between transglutaminases and silicotic nocule formation in rats. Korean Biochem J 1993;26:473-8.

Lorand L, Conrad SM. Transglutaminases. Mol Cell Biochem 1984;58:9-35.

Nash T, Allison AC, Harington JS. Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity. Nature 1996;210:259-61.

Richards RJ, Masek LC, Brown RF. Biochemical and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. Toxicol Pathol 1991;19:526-39.

Roch AM, Noel P, Alaoui SE, Charlot C, Quash G. Differential expression of isopeptide bonds $N^{\varepsilon}$-(γglutamyl) lysine in benign and malignant human breast lesions: an immuno- histochemical study. Int J Cancer 1991;48:215-20.

Steinert PM, Chung SI, Kim SY. Inactive zymogen and highly active proteolytically processed membrane-boundforms of the transglutaminase

1 enzyme in human epidermal keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun 1996;221:101-6.
Steinert PM, Marekov LN. Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. J Biol Chem 1997;272: 2021-30.