

Zárójelentés

„A szöveti transzglutamináz szerepeinek tanulmányozása gyulladásban és differenciációban” című OTKA pályázat keretében 2011. február és 2013. december között végzett kutatómunka eredményeiről.

Célkitűzés

A szöveti transzglutamináz (TG2) indukálódik és a megnövekedett citoszólikus Ca^{2+} szint következtében aktiválódik apoptózis során és N-epszilon-(gamma-glutamil)-lizin kötések hoz létre fehérjék között. Mivel az apoptózis során nem oldható formában keresztköti a citoskeletonális, intermedier és magi fehérjéket megakadályozza a sejttartalom kijutását, fontos szerepet játszik a gyulladásos folyamatok kialakulásának megelőzésében. Kutatócsoportunkban korábban kimutattuk, hogy TG2 szerepet játszik számos sejttípus elhalásában: vörösvértestekben a kalpain proteáz keresztkötésével segíti elő sejthalált (1) valamint, hogy az enzim indukálódik és aktiválódik elhaló timocitákban (2) de a pontos szerepe a timocita elhalásban még nem ismert. Ezek alapján meg kívántuk vizsgálni a TG2 szerepét a T sejtek elhalásában.

Ismert, hogy míg testidegen mikroorganizmusok fagocitózisa gyulladásos citokinek termelődésével jár együtt, az apoptotikus sejtek eltakarítását nem kíséri gyulladás. Az apoptotikus sejtek gátolják a bakteriális eredetű lipopoliszachariddal (LPS) kiváltott gyulladásos citokin termelést is. A gyulladás gátlásában a foszfatidilszerin receptorok játszanak szerepet és az aktív TGF β termelődése is hozzájárulhat. TG2 hiányában az apoptotikus gyulladásos sejtek megjelenése kíséri *in vivo*, valamint az egerekben autoimmun betegség alakul ki (3). Kimutattuk azt is, hogy a TG2 hiányában a makrofágokban fokozódik az LPS-re adott gyulladásos citokintermelés (4). A TG2 által keresztköttött fehérjék bomlási végterméke, az epszilon-(gamma-glutamil)-lizin izopeptid megtalálható a szervezetben és mennyisége arányos a szervezeten belül zajló apoptózis mértékével, ugyanakkor eddig nem vizsgálták az esetleges gyulladáscsökkentő aktivitását. Kísérleteinkben célul tűztük ki az izodipeptidnek a makrofágok LPS-re adott gyulladásos válaszában lehetséges szerepének a vizsgálatát.

Korábban a kutatócsoportunk volt az első, aki kimutatta, hogy a TG2 szükséges a makrofágokban az apoptotikus sejtek hatékony felvételéhez (3, 5). Ennek háttérében az állhat, hogy a TG2 részt vesz az aktív TGF β termelésben, amely megemeli a makrofágok fagocitotikus hatékonyságát. A TG2 emellett a makrofágok felszínén, az integrin $\beta 3$ receptor

ko-receptoraként köti az apoptotikus sejten foszfatidilszerinhez kötődő MFG-E8 hídképző molekulát is. Ezek alapján meg kívántuk vizsgálni hogyan befolyásolja a TG2 szint megemelése a makrofágok apoptotikus sejt felvevő képességét.

Az extracelluláris mátrixban lévő GTP kötött TG2-ről kimutatták, hogy integrin $\beta 1$ -en keresztül elősegíti a kondrociták növekedését és kalcifikálódását. GTP nélkül, mint fehérjekeresztkötő enzim szerepet játszik az extracelluláris mátrix stabilizálásában, a kemény szövetek kialakulásában és a mineralizációban. Mivel a fogban is számos fehérjéről kimutatták, hogy a TG2 szubsztrátja és a TG2 kimutatható a fogképző szervben megvizsgáltuk a TG2 szerepét az embrionális fogfejlődésben vad típusú és TG2 knockout egerekben.

Eredmények

1. TG2 szerepe a T sejtek elhalásában.

Előzetesen mások és mi is kimutattuk, hogy a TG2 megjelenik és aktiválódik számos apoptózissal elhaló sejt típusban többek között timocitában is. Kísérleteinket Jurkat T sejt vonalban végeztük. Az találtuk, hogy a vad típusú (wtTG2) vagy keresztkötő funkció hiányos TG2-t (TG2X) overexpresszáva a sejtekben a vad típusú TG2-t tartalmazó sejtek nagyobb százalékban haltak el apoptózissal. wtTG2 és TG2X overexpresszió során mindkét enzim transzlokálódott a mitokondriumba de a mitokondriális Ca^{2+} koncentráció jobban megnőtt a wtTG2 esetében. Keresztkötő aktivitás csak a wtTG2 esetében volt detektálható a mitokondriumban. Thapsigargin kezelést követően, amely gátolja a Ca^{2+} visszavételt az endoplazmás retikulumba (ER), azt találtuk, hogy a mitokondriális Ca^{2+} koncentráció a wtTG2-t tartalmazó sejtekben nő meg a legnagyobb mértékben, amelynek hátterében Ins_3P és ryanodine érzékeny receptorokon történő fokozott Ca^{2+} leadás áll az ER-ből. Kétdimenziós gélelektroforézissel és tömegspektrometriával azonosítottuk a RAP1GDS1 guanozin cserélő faktort mint TG2 szubsztrát, amely a RAP1 és RAP2 fehérjéken keresztül szabályozza az ER Ca^{2+} homeosztázisát. A TG2 általi keresztkötést western blottal is megerősítettük. A RAP1GDS1 csendesítése shRNS technikával gátolta a wtTG2 expresszálo sejtekben mind a thapsigargin indukált Ca^{2+} kiáramlást az ER-ből mind pedig a mitokondriális Ca^{2+} emelkedést. Eredményeink szerint a TG2 a RAP1GDC1 fehérje keresztkötésén keresztül elősegíti a Ca^{2+} kiáramlást az ER-ből, a kiáramló Ca^{2+} a mitokondriumba kerülve érzékenyíti

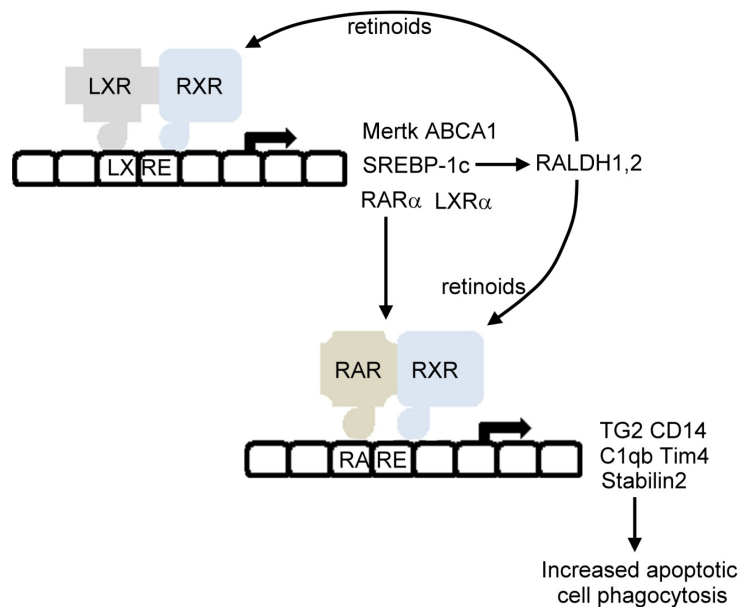
az a pro-apoptotikus szignálokra ezzel elősegítve a sejtek elhalását. Eredményeinket „Transglutaminase 2 Contributes to Apoptosis Induction in Jurkat T Cells by Modulating Ca(2+) Homeostasis via Cross-Linking RAP1GDS1., címmel a PLOS One folyóiratban jelentettük meg (6).

2. A TG2 és fagocitózis kapcsolatának vizsgálata.

Korábban leírtuk, hogy a TG2 hiánya a fagocitózis zavarához vezet makrofágokban. Nem ismert viszont, hogy a TG2 szint emelése milyen hatással van a fagocitózisra. A makrofágokat interferon-gammával (IFN γ) klasszikusan aktivált, interleukin 4 (IL-4) kezeléssel alternatíván aktivált makrofággá lehet polarizálni. Az interferon gammáról leírták, hogy humán monocitákban megemeli a TG2 szintjét. Az IL-4 szerepe kérdéses a TG2 szabályozásában: egyes irodalmi adatok szerint megemeli TG2 szintjét, más adatok szerint nem. A transz-retinsavról (ATRA) ismert, hogy megnöveli a TG2 mennyiségét a makrofágokban, így azt kontroll kezelésként használtuk. Azt találtuk, hogy az *in vitro* IL-4 nem befolyásolja a sejtek TG2 szintjét, ugyanakkor az IFN γ és ATRA kezelés megemelte azt. Egér makrofágokban azonban csak az ATRA kezelés eredményezett fagocitózis növekedést. Ugyanakkor ez függetlennek tűnik a TG2-től, mivel ez a hatása megtalálható volt TG2 hiányos makrofágokban is. Kísérleteinkből arra következtünk, hogy míg a TG2 teljes hiánya negatívan befolyásolja a fagocitózist (korábbi adataink), addig a már meglévő TG2 szint emelése IFN γ -val nem jár további fagocitózis emelkedéssel. Az ATRA kezelés a feltételezhetően elősegíti a csontvelői progenitorok differenciálódását, viszont eddig nem mutatták ki, hogy elősegíti az apoptotikus sejtek fagocitózisát, ezért kvantitatív PCR-ral meghatároztuk számos fagocitózisban szerepet játszó molekula expresszióját kontroll és ATRA kezelt makrofágokban. Eredményeink az mutatják, hogy ATRA kezelés hatására számos integrin receptor expressziója csökkent, míg a foszfatidilszerin receptor Mertk, Tim4 Stabilin2, C1qb opszonin, ABCA1 transzporter, valamint a CD14 receptor expressziója megnőtt. Az ATRA fagocitózis emelő hatása jelen volt CD14 knockout makrofágokban is, ami arra utal, hogy az egyes gének kiesése nem befolyásolja jelentősen a retinsav indukált, összetett génexpressziós változást és a hatékonyabb fagocitotikus fenotípust. Mivel az ATRA RAR receptor agonista de kis mértékben átalakulhat RXR agonista 9 cisz-retinsavvá is ezért megvizsgáltuk AM580 szintetikus RAR α agonista, LG268 szintetikus RXR agonista és 9

cisz-retinsav hatását is a fagocitózisra és a fent említett gének expressziójára. Eredményeink szerint minden agonista emelte a fagocitózis kapacitást és a fagocita gének expresszióját. Továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a makrofágokban zajlik-e endogén retinsav termelés. Korábbi eredményeink alapján tudtuk, hogy a makrofágok tartalmaznak retinsav termelő enzimeket (RALDH 1 és 2). Azt találtuk, hogy az enzimek indukálhatóak LXR receptor stimulálással. Irodalomból ismert, hogy apoptotikus sejt fagocitózis során az elhalt sejtek lipid tartalma a bejut a makrofágokba és aktiválja az LXR receptorokat, amely megemeli a makrofágok fagocita képességét, de a mechanizmust eddig nem írták le. Feltételezésünk szerint makrofágokban endogén úton termelődő retinsavak fontos szerepet játszanak ebben a folyamatban, ezért célul tűztük ki az LXR jelátviteli útvonal vizsgálatát. Szintetikus LXR agonista GW3965 kezelést követően megemelkedett apopto-fagocitózist tapasztaltunk egér hasüregi makrofágokban, RAW264 sejtvonalonban és csontvelői eredetű makrofágokban is. Génexpressziós vizsgálatokkal kimutattuk, hogy LXR stimulálást követően megnövekedett RAR α és LXR α receptor, a foszfatidil-szerin receptor Mertk, TIM4 és Stabilin2, a CD14 receptor, TG2 integrin ko-receptor, C1qb opszonin, ABCA1 transzporter valamint SREBP-1c transzkripciós faktor és az általa szabályozott RALDH1 és 2 gének expressziója. Retinsav szintézis gátlásával csökkent az LXR indukált fagocitózis növekedés és elmaradt a TIM4, Stabilin2, CD14, TG2 és C1qb gének indukciója arra utalva, hogy LXR szignálútban jelentős szerepet játszik a retinsav szignálút valamint az említett gének retinsav függőek. Eredményeink endogén retinsav termelődésre utalnak makrofágokban ezért RARE lacZ transzgen egereket, amelyekben retinsav válaszadó elem szabályozás alatt megtalálható a bakteriális galaktozidáz enzim génje, oltottunk be i.p. LXR agonistával. Ezt követően hasüregi makrofágokat izoláltunk és bennük megnövekedett RALDH1 és galaktozidáz expressziót detektáltunk, amely retinsav jelenlétét bizonyítja. HPLC és tömegspektrometriás technikával számos, eddig ismeretlen retinoid származékot mutattunk ki LXR agonista kezelt csontvelői eredetű makrofágokban. A termelődő retinsavakat fiziológiai körülmények között, apoptotizáló tímuszban is kimutattuk. Az egyik retinoidot dihidroretinsav-származékként sikerült azonosítani. A dihidroretinsavak termelésének első lépését a retinol szaturáz (RetSat) enzim végzi. Kimutattunk, hogy *in vivo*, elhaló tímuszban és *in vitro* LXR agonista kezelt makrofágokban az enzim szintje megnövekszik. Az enzim szerepének tanulmányozásához beszereztük a RetSat knock out egértörzset. Az elhaló tímusz karakterizálása során nem tapasztaltunk különbséget a vad és a knock out törzs között a tímusz tömegében, CD4+/CD8+ sejtek arányaiban illetve a sejtek annexin-V pozitivitásban, amely arra utal, hogy az apoptózis

programot és elhalt sejtek felvételét nem befolyásolja az enzim hiánya a tímuszban. *In vitro*, makrofágokban csökkent mértékű TIM4 indukciót tapasztaltunk knock out makrofágokban LXR stimulálást követően, amelyből arra következtetünk, hogy a dihidroretinsavak szerepet játszhatnak a gén szabályozásában. A makrofágok által termelt retinsavnak a tímuszban betöltött szerepéről egy cikket közöltünk az Immunobiology folyóiratban „Macrophages engulfing apoptotic thymocytes produce retinoids to promote selection, differentiation, removal and replacement of double positive thymocytes.” (7) címmel. Az LXR és retinsav jelátviteli utak kapcsolatát az alábbi ábrában foglaltuk össze, amely az elkészült kéziratban (Macrophages Engulfing Apoptotic Cells Produce Non-classical Retinoids to Enhance Their Phagocytic Capacity, beküldve a Journal of Immunology-hoz) is megtalálható:



3. N-y-(gamma-glutamil)-lizin izodipeptid lehetséges biológiai hatásának vizsgálata

Az apoptotikus sejtekben a TG2 fehérje keresztkötés által létrehozott N-y-(gamma-glutamil)-lizin izodipeptid ellenáll a makrofágok fagolizoszómális enzimjeinek proteolítikus emésztésének. Korábban az intézetünkben kimutatták, hogy kísérleti állatok vérében apoptózis indukciót követően illetve agy-gerincvelői folyadékban neurodegeneratív betegségek esetében megnövekszik az izodipeptid mennyisége. Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a molekula rendelkezik-e biológiai hatással és visszahathat-e az őt kibocsátó makrofágokra. Scratch migrációs assay-ben nem volt eltérés a kontroll és kezelt primer

makrofágok migrációjában valamint a molekula nem befolyásolta makrofágok apoptotikus sejtfevéletét. Ugyanakkor mind RAW264.2 sejtvonalban mind pedig primer hasüregi makrofágokban a molekula szignifikánsan csökkentette a bakteriális lipopoliszacharid indukált TNF- α , interleukin-6 (IL-6), Makrofág Inflammatory Protein-2 (MIP-2) és indukálható nitrogén oxid szintáz (iNOS) gének expresszióját a vizsgált 1-50 μ M-os tartományban. Szintén nem találtunk különöAz ezt követő kísérletek során viszont a molekula nem mutatott eltérő hatást, mint a normál glutamil-lizil peptidkötést tartalmazó, kontroll dipeptid. Új batch rendelést követően újabb kísérleteket végeztünk. Kvantitatív PCR-rel meghatározva újra tapasztaltuk a gyulladáscsökkentő hatást (kisebb mértékű TNF-a, IL-6, iNOS és MIP-2 expressziót LPS kezelés után) ezért globális génexpressziós vizsgálatot végeztünk RNS szekvenálás technikával csontvelői eredetű makrofágokban. 91 olyan gént találtunk, amely LPS hatására legalább 1,5-szörös emelkedést mutat a kontrollhoz viszonyítva és izodipeptid hatására legalább 1,5-szörös csökkenést mutat az LPS kezelt mintához képest. Ezek között megtalálható volt a PCR-rel már kimutatott TNF- α és MIP-2 (CXCL-2). A szabályozott gének között megtalálható a gyulladásban szerepet játszó CCL17, CXCL1 és osteopontin kemokinek, interferon gamma receptor 1, GM-CSF (granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktor) és myc transzkripció faktor. Ugyanakkor nem szerepelt a szabályozott gének között az IL-6 és iNOS génye. Az adatok elemzése folyamatban van. Továbbiakban tervezzük a talált géneket kvantitatív PCR-rel validálni és egerekben, *in vivo* körülmények között is megvizsgálni a molekula hatását.

4. Szöveti transzglutamináz szerepe a fogak kialakulásában

Irodalmi adatokból ismert, hogy a szöveti transzglutamináz (TG2) szerepet játszik a kondrociták kalcifikálódásában és az enzim keresztkötő aktivitása hozzájárul a kötőszövet mineralizációjához. Ugyanakkor TG2 hiányos egerekben nem volt megfigyelhető eltérés a vázrendszer fejlődésében, amit a hasonló fehérje keresztkötő aktivitással XIII-as faktor kompenzatórikus túltermelődésével magyaráztak. Mivel patkány fogképző szervében kimutatták az enzim jelenlétét és keresztkötő aktivitását valamint számos fogban jelen lévő, apatit kristályok létrejöttében szerepet játszó fehérjéről (dentin mátrix protein 1, dentin-foszfoprotein, csont-szialogprotein) kimutatták, hogy szubsztrátja a TG2-nek, jelen kísérleteinkben vad típusú és TG2 hiányos egerek felhasználásával vizsgáltuk a TG2 fogfejlődésben betöltött szerepét.

Kísérleteink során mikro-CT felvételeket készítettünk vad típusú és TG2 KO felnőtt egerek koponyájáról és állkapcsáról, amely azon kívül, hogy TG2 KO egerek metszőfoga kis mértékben hosszabb és a zománc réteg kis mértékben vastagabb, mint a WT törzs esetében, nem mutatott eltérést a két törzs között. Megmértük az alsó metszőfogak kalcium tartalmát, de itt sem találtunk különbséget. Különböző embrionális fejlődési szakaszokban lévő egerek gyökérszövetét összehasonlítva nem találtunk eltérést a BrdU inkorporációval mért sejtproliferációjában és TUNEL assay-jel vizsgált apoptózisban. A fogkeménységét mikro-indentációs technikával vizsgálva viszont azt találtuk, hogy a TG2 hiányában fogzománc keménysége szignifikánsan nagyobb, mint a vad törzs esetében. Ezt követően pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk a dentin és a zománc ultrastruktúráját és kisebb eltérést találtunk a zománcprizmák szerkezetében. Az embrionális fejlődés 18. napjában lévő fogkezdeményeket preparáltunk WT embrióból és azokat szervkultúrában fenntartva, alizarin red festéssel vizsgálva a zománc mátrixállomány mineralizációt fokozott kalcium lerakódást figyeltünk meg Z-DON transzglutamináz jelenlétében. A kapott eredmények alapján „LOSS OF TRANSGLUTAMINASE 2 (TG2) ALTERS ENAMEL FORMATION IN MICE” elkészült egy kézirat, amit a European Journal of Oral Sciences folyóiratban kívánunk publikálni. Mivel a XIII-as faktor és aTG2 hasonló keresztkötő funkcióval rendelkezik, ezért beszereztünk kollaborációs partnereinktől FXIII KO egérből származó fogakat. Ezekből a mintákból még folyamatban van a keménységmérés. Eredményeinket eddig egy konferencián mutattuk be „Loss of Transglutaminase-2 results in accelerated enamel mineralization in mouse” címmel (International Association for Dental Research, 2011).

Hivatkozások

1. Sarang Z, Mádi A, Koy C, Varga S, Glocker MO, Ucker DS, Kuchay S, Chishti A, Melino G, Fésüs L, Szondy Z. 2007. Tissue transglutaminase (TG2) facilitates phosphatidylserine exposure and calpain activity in calcium-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ.* 14: 1842-1844.
2. Szondy Z, Reichert U, Bernardon JM, Michel S, Tóth R, Ancian P, Ajzner E, Fesus L. (1997) Induction of apoptosis by retinoids and retinoic acid receptor gamma-selective compounds in mouse thymocytes through a novel apoptosis pathway. *Mol Pharmacol.* 51(6):972-82.

3. Z. Szondy, **Z. Sarang**, P. Molnár, T. Németh, M. Piacentini, P.G. Mastroberardino, L. Falasca, D Aeschlimann, E. Szegezdi, G. Lakos, J. Kovács, E. Rajnavölgyi, P. J. Birckbichler, G. Melino, L. Fésüs (2003) TGASE2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:7812-7
4. **Sarang Z**, Köröskényi K, Pallai A, Duró E, Melino G, Griffin M, Fésüs L, Szondy Z. (2011) Transglutaminase 2 null macrophages respond to lipopolysaccharide stimulation by elevated proinflammatory cytokine production due to an enhanced $\alpha\beta3$ integrin-induced Src tyrosine kinase signaling. Immunol Lett. 138(1):71-8.
5. Tóth B, **Sarang Z**, Vereb G, Zhang A, Tanaka S, Melino G, Fésüs L, Szondy Z. (2009) Over-expression of integrin beta3 can partially overcome the defect of integrin beta3 signaling in transglutaminase 2 null macrophages Immunol Lett. 126(1-2):22-8.
6. Hsieh YF, Liu GY, Lee YJ, Yang JJ, Sándor K, **Sarang Z**, Bononi A, Pinton P, Tretter L, Szondy Z, Tsay GJ. (2013) Transglutaminase 2 Contributes to Apoptosis Induction in Jurkat T Cells by Modulating Ca(2+) Homeostasis via Cross-Linking RAP1GDS1. PLoS One. 8(12):e81516
7. **Sarang Z**, Garabuczi É, Joós G, Kiss B, Tóth K, Rühl R, Szondy Z. (2013) Macrophages engulfing apoptotic thymocytes produce retinoids to promote selection, differentiation, removal and replacement of double positive thymocytes. Immunobiology. 218(11):1354-60.