

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

+

**A SZÖVETI TRANSZGLUTAMINÁZ SZEREPE A
MAKROFÁGOK APOPTOTIKUS
SEJTFELVÉTELÉBEN**

Tóth Beáta

Témavezető: Dr. Szondy Zsuzsa



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris sejt- és immunbiológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2009

BEVEZETŐ

Fagocitózis

A programozott sejthalál során keletkezett nagyszámú apoptotikus sejt bekebelezése szükségzerű, a másodlagos nekrosis, szöveti károsodás és gyulladáso immunválasz elkerülése érdekében. A hivatáso fagociták, a makrofágok vagy az elhaló sejtekkel szomszédos sejtek általában fagocitózissal végzik ezt az eltakarítási folyamatot. Fagocita receptorok speciális „egyél meg” jeleket ismernek fel az apoptotikus sejtek felszínén vagy közvetlen apoptotikus sejt- fagocita kapcsolatban, vagy a szérum opsonizáló fehérjéin keresztül, amelyek mintegy hidat képeznek a apoptikus sejt és a fagocita receptor között. A foszfadiliszerin (PS) receptor felszínre fordulása a legjellegzetesebb jele apoptotikus folyamatnak. Számos fagocita receptor kötődik a PS-hez közvetlenül vagy áthidaló molekulákon keresztül, mint például az MFG-E8 (milk fat globulin EGF factor 8), amelyet aktivált makrofágok választanak ki. Az $\alpha_v\beta_5$ és $\alpha_v\beta_3$ integrinek fagocita receptorok, amelyek a szolubilis MFG-E8 molekulának EGF-szerű doménjában lévő RGD motívumot kötik. Az áthidaló molekulákon kívül három PS kötő receptort azonosítottak, Tim4 (T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule), BAI1 (brain-specific angiogenesis inhibitor 1) és stabilin multifunkcionális receptort.

LRP1 (low-densitylipoprotein receptor-related protein 1), egy másik felismerő receptor a makrofágok felszínén. LRP1 a CRT-vel (calreticulin)

lép kapcsolatba, amely a nagy mennyiségben jelenik meg az apoptotikus sejtek felszínén. LRP1 receptor, a citoplazmatikus farokrész foszfortirozin-kötő doménján keresztül továbbítja a jelet a GULP-ra (engulfment adaptor protein).

Általános nézet, hogy a falósejteken lévő különböző receptorok két, fejlődéstanilag konzervált útvonalba tömörülnek, hogy végül a kis molekula tömegű GTP-áz, a Rac1-et aktiválják, amely nélkülözhetetlen az apoptotikus sejtek felvételéhez. Az első útvonalat vagy az LRP-1, vagy a stabilin és a GULP adaptor fehérje indítja és a Rac1 aktivációjához vezető további mechanizmus nem ismert még. A második útvonal a DOCK180 (180 kDa protein downstream of CrkII) és ELMO (engulfment and migration protein) komplexen keresztül zajlik, amely a Rac1 kéttagú guanin nukleotid cserélő faktora. A $\alpha_v\beta_3$ integrin receptorfüggő fagocitózis során CrkII (chicken tumor virus no. 10 regulator kinase II) /DOCK180/ Rac1 kaskád aktiválódik, ami a fagoszóma kialakulásához vezet.

Egy másik Rac fölötti útvonal lehet a RhoG és guanincserélő faktora, a TRIO. $\alpha_v\beta_3$ integrin által elindított apoptotikus sejt felvétel gátlható RhoG vagy Rac domináns negatív formájával, amely sugallhatja, hogy a RhoG és a Rac szintén része az integrin által szabályozott bekebelezési folyamatnak.

Szöveti transzglutamináz

A transzglutaminázok családja egy tiol- és Ca^{2+} -függő acil transzferáz, amely katalizálja a kovalens kötés kialakulását a peptidkötésben lévő glutamin γ -karboxamin csoportja és különböző elsődleges amin között,

beleértve a célfehérje lizinjének ϵ -amino csoportját. Ca^{2+} -mal történő aktiváció során a TG2 részt vesz a citoskeleton szervezésében, azáltal hogy keresztköt számos citoskeletonális fehérjét, pl. mikrotubulin fehérjét, tubulint, aktint, miozint. Az apoptózis befejeződésekor történő nagyfokú polimerizáció stabilizálja az elhaló sejt szerkezetét, megakadályozva ezzel a sejtalkotók kiszivárgását, amely gyulladáshoz vagy autoimmun válaszhoz vezethet.

TG2 a szignalizáció során szintén viselkedhet G fehérjeként. A TG2 G fehérje funkciója szerepet játszik a sejtadhézióban és a sejt vándorlásban és részt vesz a protein kináz C_α aktivációjában. A GDP/GTP kötött formában nem működik a transzglutaminázként. Ezt a gátlást a Ca^{2+} függészi fel, amely egyfajta kapcsoló a két funkció között. Mindezek mellett a TG2 adaptor fehérjeként képes extracellulárisan erősegíteni a fibronektin és integrin közötti kapcsolatot. A fibronektinkötés szerepet játszik a TG szöveti sérüléshez történő irányításában, ahol mint mátrixhoz társuló membránkötött fehérjeként működik.

TG2 szerkezete

TG2 enzimnek négy doménja van: egy N-terminális β -szendvics (fibronektin- és integrinkötő hellyel), katalitikus core (tartalmazza az acil-transzfer reakcióhoz a katalitikus triádot: Cys277, His 335 és Asp358 és az átmeneti állapotot stabilizáló Trp241) és két C-terminális β -hordó domén. Kimutatták, hogy a Tyr274 fontos aminosav az enzim sejtfelszínre jutásához. Tyr274 mutációjával, amely során a transz helyett cisz peptid kötésű konformáció jön létre, az enzim nem szekretálódik a sejtfelszínre. A TG2 GDP-kötő helye egy hidrofób zsebben van a core és

a β -hordó1 domén között, a glutamin szubsztrátkötő hellyel ellentétes felszínen. TG2 kötődhet a fibronektinhez az N-terminális részével. Az első doménon lévő $\beta 5/\beta 6$ hajcsat képviseli az enzim fibronektint felismerő helyét. A sejt felszínen a TG2 szintén kötődhet az integrin receptorhoz, eddig ismeretlen módon. Fontos megjegyezni, hogy a TG2 és az integrin közötti interakció független a keresztkötéstől.

TG2 szerepe az apoptózisban és a fagocitózisban

Az apoptózisban a TG2-nek lehet pro- és antiapoptotikus hatása, attól függően, hogy milyen sejtben, és milyen sejtalkotóban működik, milyen az apoptotikus szignál, és az enzim melyik funkciója van bekapcsolva.

A szöveti transzglutamináz aktiválódik az apoptózis során a májban és a tímuszban, nagymértékben keresztköti a fehérje polimereket és egy nehezen emészthető burkot képez. TG2 BH3 doménjával a Bax konformáció változását és mitokondriumba történő transzlokációját idézi elő, illetve a citokrom c kiáramlást és a neuroblastoma sejt halálát. Az apoptózis megkezdődését követően az enzim transamidálhatja az aktint és a Rb (retinoblastoma) fehérjét, másfelől viszont az Rb transzamidálásával a TG2 megóvhatja az Rb-t a kaspáz-aktivált degradációtól.

A sejt felszíni TG2 azzal, hogy köti a fibronektint és a sejt felszíni heparánszulfátot támogatja az adhéziófüggő túlélési szignált a Rho és a fokális adhéziós kináz aktiválásán keresztül.

TG2 szintén szerepet játszi az apoptotikus sejtek eltakarításában. Egyrészt TG2 támogatja a fagocitózist az apoptotikus sejt oldaláról azáltal, hogy segíti a PS kifordulást, vagy keresztköti a kemotaktikus faktorként viselkedő S19 ribonukleáris fehérjéket, de a nagyobb részben a makrofág

oldaláról segít. Egyrészt részt vesz az apoptotikus sejtlevételt segítő TGF β aktiválásában. A TG2 fő feladata *in vivo*, hogy biztosítsa az apoptózis gyulladás- és szövetkárosodás mentes lezajlását.

A TG2 hiányos makrofágok fagocitózisának hatékonysága alulmarad a vad típusúétól, hiába kezelték rekombináns TGF β -val (1 μ g/ml), ami azt sugallja, hogy más mechanizmusok is hozzájárulhatnak a csökkent fagocitózisért.

CÉLKITŰZÉSEK

Laboratóriumunkban folyó korábbi kutatások kimutatták, hogy a TG2 hiánya az egerekben zavart apoptotikus sejtek felvételhez vezet és a kóros eltérés a makrofág funkcióhoz kötött. A fő célja ennek a munkának az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon ez a kóros fagocitózis létezik-e *in vitro* körülmények között is, és hogy meghatározzuk azokat az eltéréseket, amelyek TG2 hiányában az eltakarítási folyamathoz társulnak.

Ennek érdekében célunk volt

1. Olyan fagocita modell és technikák létrehozása, melyek segítségével az apoptotikus sejtek felvétele tanulmányozható *in vitro*.
2. Time-lapse video segítségével az apoptotikus sejt fagocitózisának tanulmányozása vad típusú makrofágokban.
3. Time-lapse video segítségével az apoptotikus sejt fagocitózisának tanulmányozása a TG2^{-/-} típusú makrofágokban.
4. Adenovirális génszállító rendszer kifejlesztése annak érdekében, hogy meghatározzuk a TG2 melyik biológiai funkciója szükséges a fagocitózishoz.
5. Meghatározni azokat a fagocita receptorokat, melyek expresziójának változásával a TG2^{-/-} makrofágok kompenzálni próbálják a TG2 hiányát.
6. Meghatározni a fagocita jelátviteli útvonalban történt változásokat a TG2^{-/-} makrofágokban.

MÓDSZEREK

Sejtek

Vad típusú és TG2^{-/-} egerekből származó makrofágokat használtunk a fagocitózis kísérletekhez. Az egereket 2ml 4%-os tioglikoláttal oltottuk és négy nappal később, hasüregüket kimostuk. 5×10^5 peritonális makrofágot 24 órán keresztül festettünk 10 μ M vörös fluoreszcens CMTMR festékkel 37°C-on, 5% CO₂-ban. Négy hetes egerek timocitáit használtuk apoptotikus sejtként, melyeket 24 órá keresztül 6 μ M zöld fluoreszcens CFDA-val festettünk és 4 μ M ionomicinnel kezeltük 6 óráig. 40-50%-a a timocitáknak Annexin V pozitív volt (apoptotikus) és ebből kevesebb mint 5% volt propidium-jodid pozitív (nekrotikus). A timocitákat és a makrofágokat RPMI 1640 mediumban tartottuk fent 10% FCS, L-glutamin, penicilin és szteptamicin jelenlétében.

Fagocitózis vizsgálata

Makrofágokat 2 μ m-es karboxilált piros fluoreszcens gyöngyök vagy CFDA jelölt apoptotikus sejtekkel inkubáltuk 40:1 target/makrofág arányban. Kontrollként a makrofágokat és a targeteket 4°C-on inkubáltuk. A kompetíció kísérletnél használt nekrotikus sejteket előzőleg 55°C-on főztük 10-15 percig. Fagocitózis után a nem fagocitált timocitákat elmostuk, a makrofágokat tripszinnel felszedtük és 0,5%-os Na-azidos oldatban mértük áramlási citometriával.

Helyspecifikus mutagenézis

Helyspecifikus mutagenézist TG2 gént tartalmazó pSP73 plazmidon végeztük. The Quik-Change Site-Directed Mutagenesis Kitet használtunk a mutációk létrehozásához. A következő primereket használtuk a kersztkötő mutációhoz: TG2-X sense: 5'-GTGAAGTACGGGCAGAGTTGGGTGTTTG-3' és TG2-X antisense: 5'-CAAACACCCAACCTCTGCCCGTACTTCAC-3'; guanine nukleotid kötőhely mutációhoz: TG2-G1 sense: 5'-CTACCAAGGCTCTGTCAACGACATCAAGAGT GTGCC-3' és TG2-G1 antisense: 5'-GGCACACTCTTGATGTGCTTGACAGAGCCTTGGTAG-3'; TG2-G2 sense: 5'-CAGCTACCTGCTGGCTCAAGAAGATCTCTACCTGGAG-3' és TG2-G2 antisense: 5'-CTCCAGGTAGAGATCTTCTTGAGCCAGCAGGTAGCTG-3'; a fibronectin kötőhely mutációjához: TG2-FN sense: 5'-CAGTGCTGGCCCAACAGGCCAATGTCCTCTC-3' és TG-FN antisense: 5'-GAGAGGACATTGGCCGTGTGGGCCAGCACTG-3'; szekréció hiányos mutációhoz: TG2-S sense: 5'-CACCCAGCACTGCCCGGACTTCACTTGCTG-3' és TG2-S antisense: 5'-CAGCAAGTGAAGTCCGGGCAGTGCTGGGTG-3'.

Adenovirális génszállító rendszer

AdEasyXL rendszert használva rekombináns, replikálódni nem képes adenovírus vektorokat hoztunk létre, amelyek vagy LacZ vagy TG2 gént vagy annak különböző mutációit ill. vad típusú vagy konstitutív aktív Rac-ot tartalmaztak. A génátvitelnél 10^6 makrofágot fertőztünk 2×10^9 PFU/ml vírussal 48 óráig. LacZ kifejeződését X-gal festéssel határoztuk meg, míg a TG2 és Rac expressióját Western blott analízissel.

Biotiniláció és a sejt felszíni fehérjék elválasztása

4×10^6 sejtmonolayeret jéghideg PBS-sel előinkubáltuk 45 percig PBS-ben, majd tovább inkubáltuk Biotin-XX SSE (0,5mg/ml) jelenlétében 20 percig. Sejteket lizis pufferrel (20mM Tris-HCl, pH 7,4, 5mM EDTA, 1mM EGTA) felkapartuk és szonikáltuk. A lizátumot 5 percig forraltuk, majd centrifugáltuk (13 000 rpm, 20 perc) szobahőmérsékleten, és NeutrAvidin agarózzal inkubáltuk. A proteinkötött NeutrAvidin-agarózt 10% gélelektroforézissel választottuk el és Western blott analízissel határoztuk meg TG2 elleni antitesttel.

Fagocita receptorok kifejeződésének vizsgálata Q-PCR módszerrel

ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemet használtunk a relatív génextpresszió meghatározásához. 18S riboszómális RNS-t használtuk, mint belső kontroll, a cDNS minta mennyiségének normalizálásához. A 18S primereket VIC-kel jelöltük, míg a minták primereit FAM-mal. Három párhuzamossal dolgoztunk.

Immunfluoreszcens festés és konfokális mikroszkópia

Vad típusú és TG2^{-/-} egerekből 5×10^5 peritoneális makrofágokat hagyunk letapadni és 48 órával a festés előtt. 30 perces fagocitózis után a sejteket 1:1 arányú etanol/aceton oldatban fixáltuk 10 percig 20°C-on. F-aktint phalloxin-Alexa488 festékkel jelöltük 20 percig szobahőmérsékleten. A mintákat Leica TCS SP konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Integrin β_3 és LRP jelölésnél a makrofágokat 50%-os FBS-sel blokkoltuk 30 percig 37°C-on, aztán HEPES pufferrel mostuk és fikoeritrinnel jelölt hősög

anti-integrin β_3 és anti-LRP antitesttel jelöltük 15 percig. A sejteket 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk 20 percig. A Rac jelöléshez tisztított anti-Rac1 antitestet használtunk 30 percig szobahőmérsékleten. A mintákat Zeiss LSM 410 vagy Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Az integrin β_3 és Rac térbeli elrendeződésének vizsgálatához a makrofágokat 1 μ m-es léptékben a Z tengely mentén felszeleteltük. A 3D rekonstrukcióhoz LSM 4.0 szoftvert használtunk.

Aktív Rac 1 és RhoG vizsgálata

2 μ m-es karboxilált latex gyöngyöket adtunk a letapadt makrofágokhoz 40 percig. Kontrollként kezeletlen makrofágokat használtunk. Aktív Rac1 meghatározása EZ-Detect Rac1 Activation Kit-tel történt. Aktív RhoG kimutatásához ELMO-GST fehérjét használtuk. Aktív RhoG-t Western blottal mutattuk ki.

Biacore assay

Felszíni plazmon rezonancia kísérleteket Biacore 3000 készüléken végeztük, CM5-ös szenzor chippel. Anti-GST felszint 25°C -on állítottuk elő, aminkapcsolt módszerrel. 2,5 μ M GST-TG2 és GST fehérjét vittünk fel erre a felszínre. Az asszociáció kimutatásához rekombináns MFG-E8 vagy fibronektint áramoltattunk át 10 μ l/perc sebességgel 7 percen keresztül és az RU (response unit) változást követtük nyomon. A komplex disszociációját 6 percig vizsgáltuk. A GST borított felszínre kapott RU értéket kivontuk a GST-TG2 felszínhez tartozó RU értékből. A kinetikus (k_a és k_d) és egyensúlyi értékeket BIAevaluation 3.1.

szoftverű szenzogrammal kaptuk meg, 1:1 Langmuir interakációs modellre illesztve az adatainkat.

TG2 kötődésének vizsgálata lipidekhez

Membrán lipid lemezt sötétben, 1 órán keresztül TBS-T-ben oldott 3%-os zsírsavmentes BSA-val, majd 4°C-on 1µg/ml GST-, GST-PX- (foszfinozítid-kötő domén, pozitív kontroll) vagy GST-TG2 fehérjével inkubáltuk. A membránt háromszor mostuk TBS-T pufferben majd 1 órás anti-GST antitesttel történő inkubációt követően immunoblottot végeztünk.

Videó

Videókhöz CMTMR festékkel jelölt makrofágokat nem jelölt apoptotikus sejtekkel inkubáltunk 6 target:1makrofág arányban. Videók készítéséhez egyaránt használtunk fluoreszcens emissziós és zöld transzmissziós fényt és a felvételeket Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal készítettük 40x/1.2NA immerziós objektívvel. 10 másodpercenként 140 nm/1024 pixeles felbontással 1024x1024 pixeles felvételeket készítettünk.

Statisztikus analízis

Mindegyik adat három párhuzamos független kísérletet mutat. Az értékek az átlagot mutatják \pm S.D.

EREDMÉNYEK

Az apoptotikus sejtek és a karboxilált latex gyöngyök felvételének hatékonysága kisebb TG2 hiányos egerekben, mint a vad típusúakban

TG2^{-/-} és vad típusú egerekből származó makrofágokhoz apoptotikus timocitákat adva a fagocitózis hatékonyságát vizsgáltuk. A fagocitózis pontos meghatározásához a sejteket fluoreszcensen jelöltük és vagy a bekebelezett apoptotikus sejtek számát számoltuk konfokális mikroszkóp alatt vagy különböző időpontokban a fagocitáló makrofágok százalékat határoztuk meg áramlásos citometriával. Egy óras időtartam alatt a 85%-a a vad típusú makrofágoknak legalább egy apoptotikus sejtet felvett, míg a TG2^{-/-}-nak csak 50%-a fagocitált, és a bekebelezett sejtek száma is jóval alacsonyabb volt a vad típusúakhoz képest.

2µm-es karboxilált latex gyöngyöket a jelátvitel tanulmányozásakor korábban már alkalmaztak apoptotikus sejtek helyettesítésére. Ezeknek a gyöngyöknek az eltakarítása szintén kóros a TG2^{-/-} makrofágokban.

A sejtfelszíni TG2 érintetlen guanin nukleotidkötő zsebbel segíti az apoptotikus sejtek felvételét

A vad típusú makrofágok fagocitózisát jelentősen nem befolyásolta a TG2 kompetitív gátlószere (monodanzil kadaverin 15µM), amely azt jelzi, hogy a TG2 keresztkötő funkciója nem vesz részt a fagocitózisban. Különböző TG2 mutánsokat készítettünk, hogy meghatározzuk az enzim melyik funkciója vesz részt a fagocitózisban. Adenovírust használtunk, hogy a vad típusú, keresztkötő-, fibronektinkötő-, GDP/GTP kötő- és

szekreció mutánsokat TG2^{-/-} makrofágokba szállítsuk. A különböző vírusokkal fertőzött makrofágok fagocitózisának vizsgálata kimutatta, hogy nem a keresztkötő funkció, hanem a GDP/GTP kötött konformáció szükséges a helyes fagocitózis folyamatához és azt, hogy az enzimnek a sejtfelszínen kell lenni. Ráadásul, a TG2^{-/-} makrofágokhoz kívülről adott humán rekombináns TG2 (2µg/ml) szintén segítette az apoptotikus sejtek felvételét (36,8±4,7%-ról 77,6±11,9%-ra n=3 p>0,002), ami szintén bizonyítja, hogy a sejtfelszíni TG2 szükséges a bekebelezéshez.

Bioti-XX SSE jelölést használtunk sejtfelszíni fehérjék jelölésére. A teljes TG2 fehérjének a 10%-a fejeződik ki a sejtfelszínen. Biotin jelölést használtunk a TG2 sejtfelszíni megjelenésének vizsgálatához. Mind a vad típus, mind pedig a guanin nukleotidkötő mutáns megjelent a felszínen, azonban a szekreció mutáns nem, ami azt jelzi, hogy a guanin nukleotidkötés nem a sejtfelszínre történő kijutáshoz kell. Összesítve, az adataink azt jelzik, hogy a sejtfelszíni TG2 guanin nukleotidkötött konformációban segíti a fagocitózist.

TG2 szükséges a helyes integrin β_3 jelátvitelhez

A fagocitózisban résztvevő különböző receptorok mRNS kifejeződését vizsgálva TaqMan assay-vel azt találtuk, hogy az integrin β_3 mRNS kifejeződése magasabb volt a TG2^{-/-} sejtekben. Mivel a sejtfelszíni TG2 koreceptora lehet az integrin β_3 -nak és az integrin β_3 központi szerepet játszik az apoptotikus sejtek felvételében, arra gondoltunk, hogy a TG2^{-/-} hiányos sejtek felszabályozhatják az integrin β_3 -at, hogy kivédjék a TG2 hiányát. Ebből a megfontolásból vizsgáltuk az integrin β_3 jelátviteli útvonalát TG2^{-/-} sejtekben, meghatározva a RhoG és Rac1 aktivitását. A

TG2 hiány nem befolyásolja a teljes Rac1 mennyiséget, míg a RhoG szint enyhén emelkedett. Fagocitózis során vad típusú makrofágokban mind a RhoG, mind a Rac1 aktiválódott, míg a TG2^{-/-} sejtekben nem. Ezek az adatok jelzik, hogy a integrin β_3 útvonal megrongálódott a TG2^{-/-} makrofágokban.

A bekebelezés mechanizmusának vizsgálata

Rac köröz a citoplazma és a membrán között. Inaktív formában a Rac a citoplazmában marad, mikor sejtinger következtében aktiválódik, a membránhoz mozog, ahol kapcsolatba lép a jelátvitelben alatta lévő effektorfehérjéivel.

Nem fagocitáló, vad típusú makrofágokban a Rac1 a mag körüli régióban található, míg a fagocitáló sejtekben a makrofág egyik pólusához koncentrálódik. Ezt a pólust jól szervezett F-aktin filamentek veszik körül. Konfokális mikroszkóp alatt vizsgálva a sejteket úgy találtuk, hogy az apoptotikus sejt felvételéig mindig egy vagy két Rac1 gazdag póluson keresztül történik, amely mint egy hatékony felvevő kapu működik a makrofágokban. Azok az apoptotikus sejtek, amelyeket a makrofág egy kapun keresztül vett fel, elkülönülve maradnak egy másik kapun keresztül felvettektől.

Ezzel ellentétbe a TG2^{-/-} sejtekben a Rac1 nagy része a mag körül található mind a nem fagocitáló és a fagocitáló makrofágokban, ami utal arra, hogy a TG2 hiányában a Rac1 nem tud teljes mértékben aktiválódni és koncentrálódni az apoptotikus sejtek köré, nem tud kialakulni egy Rac1 gazdag kapu. Az elromlott integrin β_3 jelátvitel miatt abnormalis F aktin polimerizációt tapasztaltunk a TG2^{-/-} makrofágban az apoptotikus

sejtet kötő részén. Mivel a TG2 hiányában nem épül fel egy hatékony kapu, a TG2^{-/-} makrofágok különböző helyeken veszik fel az apoptotikus sejteket.

Az mRNS szinthez hasonlóan az integrin β_3 fehérjeszint is emelkedett a TG2^{-/-} makrofágokban. Hiába emelkedett meg a fehérjeszint, nem tapasztaltunk jelentős változást az integrin β_3 receptor sejt felszíni eloszlásában a nem fagocitáló TG2^{-/-} makrofágokban, a vad típushoz képest. Fagocitózis alatt bár a vad típusú sejtek koncentrálnak az integrin β_3 -t a sejt egyik pólusán, ahol az apoptotikus sejt felvétel történik, a TG2^{-/-} makrofágok nem tudják.

TG2^{-/-} makrofágokban az integrin β_3 felhalmozódásának a hiánya az apoptotikus sejtek körül úgy tűnik specifikus az integrin β_3 receptorra, mivel egy másik, a TG2-vel kapcsolatba lépő, a fagocitózisban résztvevő receptor, az LRP-1 akkumulációja változatlan marad. Ezek az adatok jelzik, hogy a TG2 szükséges az apoptotikus sejtek felismeréséhez, amely a MFG-E8/ integrin β_3 ligand /receptor komplexen keresztül történik és szükséges a komplex apoptotikus sejt körüli gyűléséhez. Az integrin β_3 jelátvitel hiányával a hatékony felvevő kapu nem tud létrejönni.

TG2 és MFG-E8 közötti kapcsolat vizsgálata

Megvizsgáltunk más, integrin β_3 receptoron kívüli, lehetséges molekula és TG2 közötti kapcsolatot. MFG-E8 molekuláról ismert, hogy összeköti az integrin β_3 receptort és az apoptotikus sejt felszínén megjelenő PS. Membránlemezre előre felcseppentett különböző foszfolipidekkel megvizsgáltuk, hogy a TG2 felismeri-e a PS. TG2 nem kötődött a PS-

hez, ami azt jelzi, hogy a míg az MFG-E8 áthidaló molekulaként működik a PS és az integrin β_3 között, a TG2 nem.

Mivel a sejt adhéziókor a TG2 elősegíti az integrin β_3 jelátvitelt azzal hogy egy hármas komplexet képez az integrin β_3 receptorral és annak ligandjával a fibronectinnel azáltal, hogy köti mind a kettőt, megvizsgáltuk felszíni plazmon rezonancia technikával, hogy a TG2 kapcsolatba lép-e a MFG-E8. Öt különböző koncentrációban (5-200nM között) adott MFG-E8 interakciót mutatott a TG2. A kapott szenzogramokat 1:1-es modellel illetetve megkaptuk az asszociációs állandót ($K_a=1,86 \times 10^8$). Összehasonlításként meghatároztuk a TG2 és a fibronectin közötti asszociációs állandót is ($K_a=1,00 \times 10^7$). Ezek az adatok jelzik, hogy a MFG-E8/TG2 komplex stabil és fiziológias körülmények között is létrejöhet.

TG2^{-/-} altörzsének fagocita képességének és morfológiájának tanulmányozása

Annak érdekében, hogy elegendő számú egér álljon rendelkezésünkre a fagocitózis vizsgálatához TG2^{-/-} egereket kereszteztünk egymással egy évig és azt tapasztaltuk, hogy ezekből az egerekből származó makrofágok alacsonyabb fagocita képességekkel rendelkeztek, mint a heterozigóta formában fenntartott TG2^{-/-} egerek makrofágjai. Míg egyórás fagocitózis után a TG2^{-/-} makrofágok 45±12%-a volt képes legalább egy apoptotikus sejtet felvenni, addig TG2^{-/-} altörzsből származó makrofágoknak csak 25±8%-a ($p < 0,05$). Konfokális mikroszkóp alatt megnézve az új altörzs makrofágjai által felvett apoptotikus sejtek számát azt tapasztaltuk, hogy általában csak egy apoptotikus sejtet vettek fel.

Ezeknek a makrofágoknak nem csak a fagocitáló képessége, de a sejtek megjelenése is jelentősen eltért. Míg a nem fagocitáló TG2^{+/+} és TG2^{-/-} fibroblaszt jellegűek voltak és a Rac1 a citoplazmában, a sejttag körül helyezkedett el addig a TG2^{-/-} altörzsből származó, nem fagocitáló makrofágokban a Rac1 a plazmamembrán köré gyűlik.

Az integrin β_3 jelátvitel tanulmányozása a TG2^{-/-} altörzsben

Az abszolút Rac1 szint nem emelkedett a TG2^{-/-} altörzs makrofágjaiban a vad típusú- vagy az átlagos TG2^{-/-} macrofágokhoz képest, bár az aktív Rac1 mennyiség emelkedett. Az integrin β_3 útvonal aktiválja a Rac1-et, a RhoG aktiváción keresztül. TG2^{-/-} macrofágokban bár a RhoG-GTP szint nem emelkedik, a TG2^{-/-} új altörzsében emelkedett RhoG-GTP szint volt mérhető.

Miután a TG2^{-/-} altörzséből származó makrofágokat karboxilált latex gyöngyökkel együtt inkubáltuk az aktív RhoG szint tovább emelkedett, de a már alapállapotban is magas Rac1 szint nem. Ezzel párhuzamosan ezekben a makrofágokban a Rac1 a sejtmembrán mentén található a fagocitózis alatt és nem gyűlik az apoptotikus sejt köré.

Mindezek mellett magas integrin β_3 receptorszint található ezeknek a makrofágoknak a sejt felszínén. Amikor ezeket a makrofágokat szolubilis vitronektinnel kezeltük, amely versenyez a lekötött integrin β_3 ligandokkal, az aktív Rac1 szint csökkent, ami azt bizonyítja, hogy a megemelkedett Rac1-GTP szintért a megemelkedett integrin β_3 szint és jelátvitel a felelős.

Az integrin β_3 szint bár megemelkedett a sejt teljes felszínén, de a TG2^{-/-} altörzséből származó makrofágok mégsem képesek az integrin β_3

receptort az apoptotikus sejt köré gyűjteni. A megemelkedett integrin β_3 szint magas aktivált RhoG szinthez vezet, amellyel ez a TG2 altörzs kivédeni próbálja a TG2 hiányát a fagocitózis jelátvitelben, legalább a RhoG aktivációjának szintjéig.

A TG2^{-/-} altörzs makrofágjainak kóros fagocitózisa vad típusú Rac1 sejtbe transzfektálásával kivédhető

A TG2^{-/-} altörzséből származó makrofágokat vad típusú és állandó aktív állapotban lévő Rac1-gyel transzfektáltunk adenovirális génszállító rendszer segítségével, hogy megvizsgáljuk, hogy a Rac1 molekula adásával kivédhető-e az integrin β_3 jelátviteli eltérés. Az állandóan aktív állapotban lévő Rac1 az apoptotikus sejt felvételt teljesen mértékben gátolta, ami azt jelzi, hogy a Rac1 ki/be kapcsolása szükséges az apoptotikus sejtek helyes fagocitózisához. Ha ezeket a sejteket vad típusú Rac1-gyel transzfektáltuk, a Rac1 az apoptotikus sejtek köré tudott gyűlni és hatékony fagocitáló kaput tudott képezni. Következésképpen a vad típusú Rac1-gyel transzfektált makrofágok fagocitózis mértéke (75±12%) elérte a TG2^{+/+} makrofágok fagocitózisának mértékét (82±7%). Nem csak a TG2^{-/-} altörzs fagocitáló makrofágjainak aránya nőtt vad típusú Rac1 transzfekció követően, hanem a sejt mozgékonysága is.

Az apoptotikus sejt indukálta 3-foszfoinozítid képződés eltér a TG2^{-/-} makrofágokban

Foszfoinozitol-3-OH kináz (PI-3kinase) aktiváció szükséges a megfelelő fagocitózishoz, a DOCK180 és az ELMO is tartalmaz 3-

foszfoinozítid felismerő helyet, ami szerepet játszik a membrán kikötődésükben és így a Rac aktiválásában. A vad típusú és TG2^{-/-} makrofágok apoptotikus sejt felvétele során képződött 3-foszfoinozítid nyomon követéséhez PLCδ-PHD-GFP plazmidot transzfektáltunk a makrofágokba. Az apoptotikus sejt felismerése 3-foszfoinozítid képződését idézte elő az apoptotikus sejt körül a vad típusú makrofágokban, míg ez nem következett be a TG2^{-/-} makrofágokban, ami azt jelzi, hogy nem csak a helyes RhoG aktiváció, de a foszfoinozitol-3-OH kináz aktiváció is a TG2 kontrollja alatt áll.

MEGBESZÉLÉS

Az apoptotikus sejtek peritoneális makrofágok által történő felvételét vizsgáltuk *in vitro* körülmények között, hogy megértsük, a TG2 hogyan vesz részt a helyes fagocitózisban a TGF- β aktivációján kívül. A TG2 szerepének tisztázásához vad típusú és TG2 hiányos egerek peritoneális makrofágjait használtuk.

Az apoptotikus sejtek fagocitózisát receptorok, áthidaló molekulák és „egyél meg” jelek bőséges rendszere szabályozza. A rendszer összetettségét mutatja a ”bekebelező szinapszis” kifejezés, amelyet a fagocita sejt és a célsejt közötti kapcsolat leírására használnak. Az integrin receptor apoptotikus sejt köré történő toborzásával részt vesz egy felvevő kapu képződésében, ami azt sugallja, hogy az integrin a ”bekebelező szinapszis” egyik alkotója.

Munkánk során először írtuk le, hogy az apoptotikus sejtek fagocitózisa egy vagy két felvevő kapun keresztül történik. Úgy gondoljuk, hogy az apoptotikus sejt és a makrofág egyik pólusa közötti kapcsolódást követően, a hatékony felvevő centrumokat a fagocita receptorok és a Rac1 koncentrációja jellemzi, de ezeknek a centrumoknak a helyét és a számát valószínűleg eddig ismeretlen molekulák határozzák meg. Az integrin β_3 összecsoportosulása és az aktivációja az apoptotikus sejt körül az ilyen centrum kialakulásának kezdeti lépése, és a TG2 közreműködésével történik. A TG2 hiányában a fagocitáló kapuk képződése kevésbé hatékony és azok a kapuk, amelyek létrejöttek, jóval lassabban veszik fel az apoptotikus sejteket. Ennek következtében az apoptotikus sejt felvétel lassúvá és véletlenszerűvé válik.

A lassabb fagocitózisra magyarázatként a megváltozott integrin jelátvitelt találtuk a TG2^{-/-} makrofágokban. Sem a RhoG, sem pedig a Rac1 aktiválása nem megfelelő a TG2^{-/-} makrofágokban. Eredményeink szerint a TG2 kötési affinitása az MFG-E8-hoz magasabb volt, mint a fibronectinhez (Fn), amely egy áthidaló molekula az integrin β_3 és az extracelluláris mátrix (ECM) között. Integrinek viszonylag kis affinitással köti az ECM fehérjéit, a Fn-t is beleértve. Ezzel ellentétben a TG2 nagy affinitással köti a Fn és stabil komplexet alkot vele és az integrinnel. Ennek eredményeként, TG2 segíti az integrin β_3 jelátvitelt a sejtadhézió során, azáltal hogy stabilizálja az integrin-Fn kapcsolatot. Azt találtuk, hogy mivel az MFG-E8 szintén kötődik az integrin β_3 -hoz, a TG2-nek hasonló szerepe van a fagocitózban, mint az adhézióban vagy a migrációban, csak az apoptotikus sejtlevétel során az integrin β_3 mellett nem a Fn-nel hanem az MFG-E8 alkot komplexet.

Azt találtuk, hogy a TG2 érintetlen guanin nukleotidkötő hellyel segíti a fagocitózist. Eredményeink szerint guanin nukleotidkötés az enzim sejt felszínre történő kijutásához nem kell, de a Tyr274 aminosavnak jelentős szerepe van ebben. Így azt gondoljuk, hogy a guanin nukleotidkötés szükséges ahhoz, hogy a sejt felszínén a TG2 betöltse szerepét fagocitózisban. Ez a megfigyelés összhangban van azzal, hogy a GTP kötés befolyásolja a TG2 hatását az integrin jelátvitelre. Guanin nukleotidkötött konformáció lehetővé teszi, hogy a TG2 komplexet alkosson egy vagy több ECM fehérjével, áthidaló molekulával, vagy sejt felszíni receptorok küldő doménjaival és így gyors jelátviteli eseményeket indukál, amelyek az actin átrendeződéséhez és hatékony fagocitózishoz vezetnek. Úgy gondoltuk, hogy a TG2 guanin

nukleotidkötése a fagocitózis során szintén szükséges egy megfelelő konformáció kialakulásához, amely interakcióba léphet az MFG-E8 és integrin β_3 fehérjével. Mivel a bekebelezés folyamata független az enzim keresztkötő funkciójától, igen valószínű, hogy a TG2 és MFG-E8/integrin β_3 közötti kapcsolat egy inaktív konformációs állapotban történik.

TG2^{-/-} egerek tanulmányozása során egy olyan altörzset találtunk, melyben a makrofágok egy sokkal magasabb integrin β_3 kifejeződéssel védik ki a TG2 hiányát. Az integrin β_3 és RhoG jelátvitel részt vesz az apoptotikus sejtek fagocitózisában és a sejtek mozgásában is. Ennek eredményeként ezekben a sejtekben a megemelkedett integrin β_3 expresszió egy intenzívebb sejtmozgást eredményezett, magasabb alap RhoG és Rac1 szinttel. A TG2^{-/-}/magas integrin β_3 makrofágokban a megemelkedett alap Rac1 szinttel párhuzamosan a Rac1 sejtmembránhoz kötötten helyezkedett el, míg a vad típusú és a normál TG2^{-/-}, nem fagocitáló makrofágokban a Rac1 molekula a sejt plazmában volt. A fagocitózis alatt az integrin β_3 egyenletesen szétszórva marad ezeken a makrofágokon és csak a megemelkedett expresszióknak köszönhető a magas receptor denzitás az apoptotikus sejtek körül. Ezekben a makrofágokban, eltérően a normális TG2^{-/-} makrofágoktól, karboxilált latex gyöngyök adásával a RhoG aktiválható, ami azt jelzi, hogy a magas integrin β_3 szinttel kivédhető az integrin β_3 jelátvitel károsodása a kezdeti szakaszon. A Rac1 aktivációja azonban nem következett be és a PI-3 kináz aktivációja is kóros. Ezzel párhuzamosan nem tapasztaltunk jelentős Rac1 csoportosulást az apoptotikus sejt körül és az apoptotikus sejtek felvétele súlyosabban károsodott.

Az integrin β_3 és RhoG bár szerepet játszik mind a fagocitózisban mind, pedig a sejtmozgásban, a TG2 nem egyenlő mértékben vesz részt mindkét folyamatban. Míg az apoptotikus sejtek fagocitózisát a TG2 segíti, az integrin-függő migrációt lamininon gátolja. Így a TG2 hiánya nem azonos mértékben befolyásolja a fagocitózis- és sejtmozgás jelátvitelét, és főleg nem a PI-3 kináz aktivációját, amely úgy tűnik a fagocitózisban független az integrin jelátviteltől. Az integrin β_3 kis mértékű emelkedése a TG2^{-/-} makrofágokban növelte megromlott fagocitózist és sejtmozgást, míg az integrin β_3 további emelkedésével a két útvonal versenyezhet egymással, míg végül a sejtmozgás jelátvitele használja fel a szabad Rac1 molekulákat. Ez az oka, hogy a teljes RhoG szint alkalmazkodott az emelkedett integrin β_3 kifejeződéshez és erősítette az integrin β_3 jelátvitelt, míg a Rac szint már nem változott. A szabad Rac szint emelésével javítani tudtuk a fagocitózist, de állandóan aktív formában lévő Rac transzfektálása teljes mértékben meggátolta az apoptotikus sejtek felvételét. Ez a megfigyelés megerősíti azt a nézetet, miszerint a Rac1 ki/be kapcsolása szükséges a fagocitózishoz. Vad típusú Rac1 molekula makrofágokba történő transzfektálásával a Rac1 képes volt az apoptotikus sejt körül csoportosulni a vad típusú makrofágokban tapasztal módon.

Ezek az adatok további bizonyítékai annak a hipotézisnek, miszerint a TG2 szerepe a fagocitózisban az, hogy hatékonyan segítse az integrin β_3 jelátvitelt az apoptotikus sejt körül (vagy a fagocitáló kapunál az integrin β_3 klaszterbe rendezésével vagy a receptor MFG-E8/PS ligandjához történő affinitásának növelésével). Adataink továbbá azt is jelezhetik, hogy TG2 más jelátviteli útvonalban is részt vesznek, amely tartalmazza

a PI-3kináz aktivációt. Adatainkra alapozva az integrin jelátvitel nem befolyásolja a képződött fagocitáló kapuk számát, de mások adatai szerint kritikus szerepe van a sejtpólus kialakulásában.

ÖSSZEFOGLALÁS

A makrofágok által történő apoptotikus sejtek eltakarítása nélkülözhetetlen a szövetek helyrehozásához, a gyulladásos folyamatok elkerüléséhez és az immunválasz szabályozásához. TG2 fehérjéket keresztkötő enzim, számos más biológiai funkcióval. Ezek közül az egyik, hogy az integrin β_3 koreceptora. Korábban kimutattuk, hogy a TG2^{-/-} egerekben *in vivo* az apoptotikus sejtek fagocitózisa zavart, amely SLE-szerű autoimmunitáshoz vezet. Ez részben összefüggött a hiányos TGF- β aktivációval, mivel az apoptotikus sejteket emésztő makrofágok által kibocsájtott TGF- β segíti a további apoptotikus sejtek fagocitózist és gátolja gyulladást immunválaszt.

Ebben a munkában a TG2 szerepét vizsgáltuk részleteiben a fagocitáló makrofágok oldaláról. Kimutattuk, hogy a TG2 a makrofág sejtfelszínén, guanin nukleotidkötött formában segíti az apoptotikus sejtek felvételét. Amellett, hogy kötődik az integrin β_3 receptorhoz, amelyről ismert, hogy részt vesz az apoptotikus sejtek felvételében, a Rac aktivációján keresztül, kimutattuk, hogy a TG2 köti a MFG-E8, amely egy áthidaló molekula az integrin β_3 és a PS között. Kimutattuk továbbá, hogy az apoptotikus sejtek fagocitózisa során a vad típusú makrofágok egy vagy két fagocitáló kaput képeznek, amelyeket integrin β_3 és Rac1 felhalmozódásával jellemezhetünk. A TG2 hiányában, bár az integrin β_3 szint emelkedik, de az integrin β_3 és ennek következtében a Rac1 nem tud a makrofág egy pólushoz koncentrálni. Az integrin $\alpha_v\beta_3$ jelátviteli zavar abnormális citoskeletáris szerkezethez vezet és nem alakul ki egy hatásos fagocitáló kapu. Adataink együttesen jelzik, hogy a TG2 egy új fehérjéje a fagocitáló kapunak, amely az MFG-E8 fehérjével együtt

szükséges a helyes apoptotikus sejt felismeréshez és integrin β_3 jelátvitelhez.

Jelen munkánkban szintén bemutattuk a TG2^{-/-} egerek egy altörzsét, melyben az integrin β_3 kifejeződése emelkedett, és a teljes sejtfelszínen tapasztalt magas receptor koncentráció magas receptor szintet eredményezett az apoptotikus sejt körül is, azonban a Rac1 molekula felhalmozódása nem történt az apoptotikus sejt körül, ami még súlyosabb fagocitózis zavart eredményezett. A Rac1 csoportosulásának hiánya részben összefügg a PI-3 kináz aktivációjának zavarával. Adataink bizonyítják, hogy a TG2 feladata az integrin β_3 felhalmozódásának stabilizálása a fagocitáló kapuban.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Tóth, B., Garabuczi, E., Sarang, Z., Vereb, G., Vámosi, G., Aeschlimann, D., Blaskó, B., Bécsi, B., Erdődi, F., Lacy-Hulbert, A., Zhang, A., Falasca, L., Birge, R.B., Balajthy, Z., Melino, G., Fésüs, L., Szondy, Z. (2009) Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. *J. Immunol.* **182**, 2084-92. IF:6.068

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.* 2009 Jul 28. [Epub ahead of print]. IF: 2.858

Sarang, Z., **Tóth, B.**, Balajthy, Z., Köröskényi, K., Garabuczi, E., Fésüs, L., Szondy, Z. (2009) Some lessons from the tissue transglutaminase knockout mouse. *Amino Acids* **36**, 625-31. IF: 4.132

Egyéb közlemények:

Tóth B, Ludányi K, Kiss I, Reichert U, Michel S, Fésüs L, Szondy Z. (2004) Retinoids induce Fas(CD95) ligand cell surface expression via RARgamma and nur77 in T cells. Eur. J. Immunol. **34**, 827-36. IF: 4.772

Kiss I, Rühl R, Szegezdi E, Fritzsche B, **Tóth B**, Pongrácz J, Perlmann T, Fésüs L, Szondy Z. (2008) Retinoid receptor-activating ligands are produced within the mouse thymus during postnatal development. Eur. J. Immunol. **38**, 147-55. IF: 4.865

Nemzetközi konferenciákon bemutatott első szerzős poszterek:

Tóth, B., Kis-Tóth, K., Szondy, Z.: Role of Fas ligand and nur77 in T cell apoptosis induced by retinoids .From transcription to physiology:Regulation of gene expression and protein. FEBS Summer School. Spetses, Greece, 2003

Tóth, B., Kis-Tóth, K., Szondy, Z.: Role of Fas ligand and nur77 in T cell apoptosis induced by retinoids. 12th Euroconference on Apoptosis, Chania, Greece, 2004

Tóth, B., Sawatzky, D.A., Fésüs, L., Szondy, Z: Role of tissue transglutaminase in process of phagocytosis. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, 2005

Tóth, B., Sarang, Z., Fésüs, L., Szondy, Z: Phagocytosis and proinflammatory cytokine production of TG2^{-/-} macrophages. 8th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases (PCL8), Lübeck, Germany, 2005

Tóth, B., Sawatzky, D.A., Fésüs, L., Szondy, Z: Role of tissue transglutaminase in the phagocytosis. 13th Euroconference on Apoptosis, Budapest, 2005

Tóth B., Aeschlimann D., Fésüs L., Szondy Z.: Role of tissue transglutaminase in the process of phagocytosis of apoptotic cells; 14th Euroconference on Apoptosis, Chia, Sardinia, Italy, 2006

Tóth, B., Garabuczi, É., Vereb, G., Falasca, L., Fésüs, L., Szondy, Z.: Role of tissue transglutaminase in apoptophagocytosis program I: The macrophage side. 9th International Conference On Transglutaminases And Protein Crosslinking (PLC9), Marrakech, Morocco, 2007

Előadás:

Tóth B., Aeschlimann D., Fésüs L., Szondy Z.: Role of tissue transglutaminase (TG2) in the phagocytosis of apoptotic cells; IADR PEF congress, Dublin, Ireland, 2006