



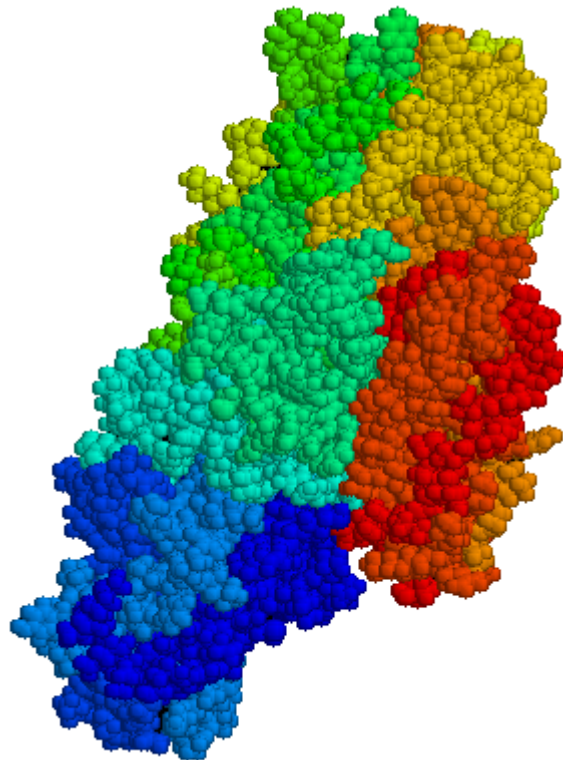
rijksuniversiteit
groningen



umcg

Interventie op transglutaminase-2 is van therapeutische relevantie in nierziekten

Bachelorscriptie in de researchcursus 'Pathofysiologie' afdeling Nefrologie



Naam: Willemien Alexandra Veele

Student nummer: 1648276

Datum: 23 december 2009

Eerste begeleider: Dr. Jaap van den Born

Tweede begeleider: Dr. Paul de Vos

Bron logo RUG: <http://www.rug.nl/huisstijl/logobank/corporatelogo/corporatelogorood/logoRoodRGB>

Bron logo UMCG:
<http://www.rug.nl/huisstijl/toepassingen/duobrandensamenwerkingsverband/duobrand>

Afbeelding voorpagina: Schematische moleculaire structuur van transglutaminase-2. Bron:
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/92/Tissue_transglutaminase.png

Inhoudsopgave

Samenvatting	4
Inleiding.....	5
Hoofdstuk 1: De fysiologie van de extracellulaire matrix	6
Hoofdstuk 2: Transglutaminases	10
Hoofdstuk 3: De rol van TG2 in fibrose vorming	12
Hoofdstuk 4: De rol van TG2 in nierfibrose	15
Hoofdstuk 5: De rol van HSPG's in de activatie van TG2	16
Hoofdstuk 6: Interventie strategieën op TG2 in nierziekten.....	19
Conclusie & Discussie	21
Referenties	22

Samenvatting

De extracellulaire matrix (ECM) is opgebouwd uit veel verschillende componenten. De twee hoofdklassen van extracellulaire matrix moleculen zijn proteoglycanen en vezelachtige eiwitten: fibronectine, collagenen, elastine, en laminines. Deze ECM componenten spelen een belangrijke rol in cel adhesie, migratie, proliferatie, overleving en weefselstabiliteit. In een gezonde situatie is er een balans tussen de productie, afbraak en de stabilisatie van de ECM. Tijdens ziekte raakt deze balans verstoord.

Transglutaminases zijn calcium afhankelijke enzymen die een belangrijke rol spelen in de stabilisatie van de ECM. Transglutaminases kunnen meerdere reacties katalyseren, waaronder verschillende crosslinkings reacties tussen de componenten van de ECM. Daarbij worden $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysine isopeptide bindingen gevormd tussen peptide gebonden lysine en peptide gebonden glutamine aminozuren. Deze crosslinks zijn resistent tegen proteolytische degradatie. Transglutaminase-2 (TG2) onderscheidt zich van andere transglutaminases doordat het naast zijn extracellulaire werking ook nog een functie heeft als G-eiwit in transmembraan signalering en het ook GTP en ATP kan binden en hydrolyseren. TG2 kan extracellulair verschillende ECM componenten irreversibel crosslinken en cel-matrix interacties tot stand brengen.

Het aantal patiënten met chronische nierziekten neemt wereldwijd toe en in meerdere onderzoeken naar verschillende nierziekten is aangetoond dat TG2 betrokken is bij fibrose vorming. Fibrose vorming is de overmatige accumulatie en afzetting van ECM componenten wat uiteindelijk leidt tot destructie van weefsels. TG2 wordt verhoogd tot expressie gebracht door onder andere cel stress, echter de secretieroute waarmee TG2 tot expressie wordt gebracht op het cel oppervlak is nog onbekend. TG2 heeft een hoge affiniteit voor fibronectine, intergrine $\alpha 5\beta 1$ en ook voor de HS ketens van heparan sulfaat proteoglycanen (HSPG's). Onderling kunnen de verschillende onderdelen ook goed binden via zowel RGD-afhankelijke als RGD-onafhankelijke interacties. De binding tussen TG2 en de HS ketens van HSPG's treedt mogelijk al intracellulair op. Vooral het HSPG syndecan-4 speelt een belangrijke rol in de expressie en extracellulaire activiteit van TG2 op het cel oppervlak. Binding van TG2 aan het HS ketens van syndecan-4 beschermt TG2 tegen inactivatie door proteolyse en hitte denaturatie. Hierdoor wordt TG2 stabiel en wordt de interactie met ECM componenten bevordert. TG2 wordt als een interessant therapeutisch target gezien in de bestrijding van nierfibrose.

Interventie op TG2, om de expressie en activiteit van TG2 te verminderen, in nierziekten kan door TG2 inhibitie, via onder andere transglutaminase inhibitoren of genetische manipulatie. Verder zouden er nog interventies kunnen optreden tussen de verschillende interacties van de componenten van de ECM met TG2. Een ander mogelijk mechanisme van interventie ligt wellicht op de binding tussen TG2 en de HS ketens van HSPG's om externalisatie van TG2 te remmen. Interventie op TG2 is mogelijk breder toepasbaar, aangezien fibrose vorming niet alleen in de nier voorkomt, maar ook in de longen, de lever, bij neurodegeneratieve ziekten, coeliakie en kanker.

Inleiding

Wereldwijd is er een toename te zien in het aantal patiënten met chronische nierziekten (Levey et al. 2007). Ongeacht de primaire oorzaak, eindigt de ziekte over het algemeen in de vorming van nierfibrose. Nierfibrose wordt gedefinieerd als een overmatige accumulatie van de afzetting van extracellulaire matrix (ECM) componenten, wat leidt tot complete destructie van het nierweefsel en uiteindelijk tot nierfalen (Cohen et al. 2005).

Onder normale omstandigheden is de productie, afbraak en stabilisatie van de ECM in balans. Tijdens ziekte wordt deze balans verstoort. Transglutaminases zijn calcium afhankelijke enzymen die een belangrijke rol spelen in de stabilisatie van de ECM, door het katalyseren van verschillende reacties waarbij $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysine isopeptide bindingen worden gevormd. Deze $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysine isopeptide bindingen zijn resistent tegen proteolytische degradatie. (El Nahas et al. 2003, Verderio et al. 2008, Collighan et al. 2008). Vooral het enzym transglutaminase-2 (TG2) speelt een belangrijke rol in de vorming van fibrose, doordat het interacties aan gaat en medieert tussen de verschillende matrix componenten. Zo bindt het met hoge affiniteit aan fibronectine, integrine $\alpha 5\beta 1$ en ook aan heparan sulfaat (HS) ketens op proteoglycanen (PG's) (Gaudry et al. 1999 a, b, Signorini et al. 1988, Akimov et al. 2001). Vooral het heparan sulfaat proteoglycaan (HSPG) syndecan-4 speelt een belangrijke rol in de expressie en extracellulaire activiteit van TG2 op het cel oppervlak (Woods et al. 2001, Scarpellini et al. 2009, Scarpellini ongepubliceerde data). De interactie van de HS keten van syndecan-4 met TG2 beschermt TG2 activiteit tegen thermische denaturatie en proteolytische degradatie. Het stabiliseert TG2 en bevordert de binding van TG2 met ECM componenten en de vorming van fibrose (Gambetti et al. 2005). Zou interventie op TG2 van therapeutisch belang zijn in de strijd tegen nierfibrose?

In deze scriptie zal eerst een introductie worden gegeven op de fysiologie van de extracellulaire matrix en de belangrijkste componenten daarvan. Vervolgens zal er ingegaan worden op transglutaminases om daarna verder in te zoomen op transglutaminase 2 en de rol daarvan in fibrose vorming in de nier. Daarna zal er worden gekeken naar de rol van HSPG's in de activatie van TG2. Ten slotte zal er worden afgesloten met huidige en mogelijke interventie strategieën op TG2 en de therapeutische relevantie daarvan in nierziekten.

Hoofdstuk 1: De fysiologie van de extracellulaire matrix

Om een beter begrip te krijgen van het onderwerp van deze scriptie is het van belang om eerst een goed overzicht te krijgen van de algemene fysiologie van de extracellulaire matrix (ECM). Eerst zullen de belangrijkste componenten van de ECM worden belicht en daarna zal in gegaan worden op de aanmaak en afbraak en stabilisatie van de ECM.

Componenten van de ECM

De extracellulaire matrix is een complex netwerk van polysacchariden (zoals *glycosaminoglycanen* (GAG's)) en eiwitten (zoals *collageen*) uitgescheiden door cellen. De ECM speelt een belangrijke rol in cel gedrag, overleving, communicatie, migratie, proliferatie, vorm en functie. Er zijn twee hoofdklassen van extracellulaire macromoleculen in de matrix, namelijk 1) de *glycosaminoglycanen* (GAG's), lineaire polysaccharide ketens, die grotendeels covalent gebonden zijn aan eiwitten in de vorm van *proteoglycanen* en 2) vezelachtige eiwitten zoals *collageen*, *elastine*, *fibronectine* en *laminine* die zowel structurele als adhesieve functies hebben. (Alberts 4^{de} editie)

Glycosaminoglycanen (GAG's) zijn lange lineaire polysacchariden opgebouwd uit repeterende disacchariden. De disacchariden bevatten altijd één amino suiker. GAG's binden covalent aan een kern eiwit van proteoglycanen. GAG's zijn zeer negatief geladen doordat er sulfaat en carboxylgroepen gebonden zijn aan de suikers. Door de zeer negatieve lading ontstaat er een osmotische activiteit. Hierdoor trekken de GAG's veel water de matrix in. Er ontstaat turgor, waardoor de matrix samendrukkende krachten beter kan weerstaan. Weefsel zoals kraakbeen in het knie gewricht kan zeer veel krachten aan. Er zijn vier hoofdgroepen van GAG's, namelijk *hyaluronan*, *chondroitin sulfaat* en *dermantan sulfaat*, *heparan sulfaat* en *keratan sulfaat* (Yoon et al. 2005). (Alberts 4^{de} editie, Goodman SR 2^{de} editie).

Hyaluronzuur is de meest eenvoudige en grootste GAG. Hyaluronzuur is een polymeer van van glucuronzuur en N-acetyl glycosamine disacchariden. In tegenstelling tot de andere GAG's, bevat hyaluronzuur geen gesulfateerde suikergroepen en zijn alle disaccharide units identiek. Hyaluronzuur bestaat uit meer dan 25.000 ongesulfateerde disaccharide eenheden en is dus een zeer grootte GAG. Verder is hyaluronzuur niet covalent gebonden aan een kern eiwit en wordt het niet in het Golgi gesynthetiseerd, maar aan de binnenzijde van het plasma membraan (Toole BP 2000). Hyaluron wordt in grootte hoeveelheden aangemaakt tijdens wond genezing en is een belangrijk bestandsdeel onder andere in gewrichten waar het dient als een glijmiddel. (Comper WD², Yoon et al. 2005).

Proteoglycanen (PG) zijn opgebouwd uit GAG ketens die covalent gebonden zijn aan een serine residu van het kern eiwit. De bindingsregio of *link tetrasaccharide* die bindt aan het serine residu, bestaat uit xylose-galactose-galactose-glucuronzuur en is hetzelfde voor de verschillende GAG's en dient als primer voor polysacchariden om aan te binden (Zie fig 1)(Comper WD³, Alberts 4^{de} editie). Doordat verschillende GAG's kunnen binden aan diverse kerneiwitten worden er veel verschillende PG's gevormd. Zo kan er een onderverdeling worden gemaakt in de zogenoemde *heparan sulfaat proteoglycanen* en de *chondroitin sulfaat proteoglycanen*, ookwel bekend als de HSPG's en de CSPG's. HSPG's worden voornamelijk op het cel oppervlak en in de matrix gevonden (Dreyfuss et al. 2009). Onder de HSPG's vallen onder andere de *syndecanen*, *betaglycan*, *perlecan*, *collageen XV* en *XVIII* en *agrine* (Dreyfuss et al. 2009). Onder de CSPG's vallen *decorin*, *biglycan*, *versican*, *bamacan* en *lumican* (Iozzo et al. 1998; Yoon et al. 2005).

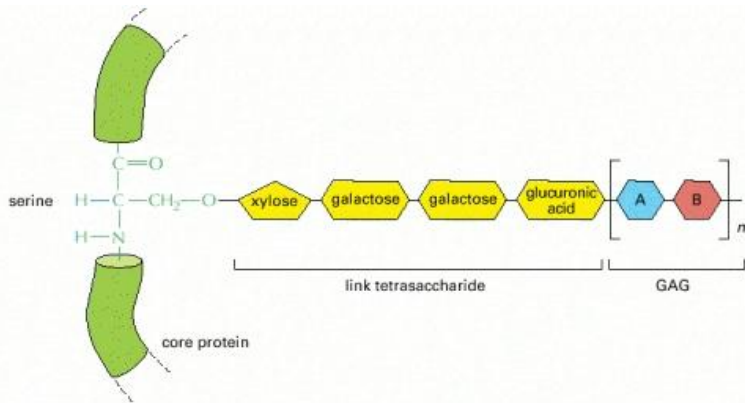


Fig 1: Bron: Alberts 4^{de} editie. De bindingsstructuur tussen een GAG met het kern eiwit in een proteoglycaan molecuul. De link tetrasaccharide bindt met het serine residu van het kern eiwit gevolgd door binding van de GAG.

De functie van proteoglycanen is divers. Zo vormen proteoglycanen een gel-achtige structuur die de vezelachtige eiwitten omgeven om samendrukkende krachten te weerstaan (Alberts 4^{de} editie). PG's functioneren als weefsel organisatoren in staat om cel groei en maturatie van gespecialiseerde weefsels te moduleren. Ook moduleren ze groeifactor activiteit, spelen ze een rol als cofactor (Iozzo et al. 1998) en reguleren ze collageen fibrillogenese (Yoon et al. 2005).

De meest veelvoorkomende eiwitten in de ECM zijn de *collagenen*. Deze dienen ter versterking van de matrix en zijn een hoofdcomponent van bindweefsel. Collageen eiwitten zijn rijk aan proline en glycine en de moleculen zijn opgebouwd uit een triplehelix van drie collageen polypeptide ketens, ook wel bekend als α -ketens. Ieder α -keten bevat een GLY-X-Y- regio, waardoor ieder derde aminozuur een glycine is en daardoor is de dichte binding van de drie α -ketens zo goed mogelijk. De meest voorkomende collageen soorten zijn type 1,2,3,5 en 6. Dit worden ook wel de *fibril vormende collagenen* genoemd. Collageen type 1 is het meest veel voorkomende eiwit en komt voor in de huid, pezen en in bot. Collageen type 2 komt voor in kraakbeen en type 4 komt veel voor in de basale lamina. (Prockop et al 1995; Goodman SR 2^{de} editie, Comper WD¹)

De biosynthese van collagenen gaat als volgt. Individuele collageen polypeptiden worden gesynthetiseerd door membraan gebonden ribosomen en deze worden in het endoplasmatisch reticulum (ER) geïnjecteerd als grote precursors, *pro- α -ketens* genoemd. Deze pro- α -ketens hebben propeptiden gebonden aan hun C- en N-terminus. In het lumen van het ER worden prolines en lysines gehydroxyleerd tot hydroxyproline en hydroxylysine. Sommige hydroxylysines worden geglycosyleerd. Iedere pro- α -keten vormt vervolgens samen met twee andere pro- α -ketens een triple-standed helix molecuul beter bekend als *procollagen*. Na secretie uit het ER, worden de propeptiden van het procollagen gesplitst door speciale proteolytische enzymen. Dit zet de procollagen moleculen om in *collageen* moleculen. Deze voegen zich in de extracellulaire ruimte samen tot *collageen fibrillen*. (Alberts 4^{de} editie)

Fibronectines (Fn) zijn grote glycoproteïnen die een belangrijke rol spelen in cellulaire interacties met de ECM, maar ook in cel adhesie, migratie, groei en differentiatie. De molecuul structuur van fibronectine is complex en bevat meerdere specifieke bindingsplaatsen. Het Fn molecuul is asymmetrisch en wordt opgebouwd uit twee even grote of verschillende subunits die bij elkaar gehouden worden door disulfide bindingen bij de C-termini. Ieder monomeer is opgebouwd uit drie verschillende modules en het type III fibronectine repeat komt het meest voor en bindt met de integrines. Ieder type bestaat weer uit verschillende delen. Een deel van de type III repeats bevat een RGD sequentie (*Arg-*

Gly-Asp) die een centraal element is van de bindingsplaats. Deze RGD sequentie wordt herkend door integrines en andere matrix receptoren om Fn te binden (Woods et al. 1993) Naast een bindingsplaats voor integrines bevat Fn ook bindingsplaats voor heparine, gelatine, collagenen, proteoglycanen, factor XIIIa transglutaminases en fibrine. Via integrine binding kan Fn ook een interactie aangaan met het intracellulaire cytoskelet en kan het met andere Fn's aggregaten vormen. Er zijn tenminste twee typen fibronectines, plasma fibronectine en cellulair fibronectine. Plasma Fn is betrokken bij bloedstolling en cellulair Fn is meer betrokken bij de interacties met de ECM in de vorm van fibrilair ECM. Fibroblasten en endotheel cellen produceren het meeste Fn. (Hynes et al. 1982; Alberts 4^{de} editie)

Laminines zijn glycoproteïnes die een belangrijke rol spelen in opbouw van de basaal membraan. Laminines worden opgebouwd uit een combinatie van α -, β - en γ - ketens en staan bekend om hun kruisvormig uiterlijk. Er zijn veel verschillende isovormen van de ketens en dus veel verschillende soorten laminines. Net als bij collageen kunnen deze ketens goed met elkaar aggregeren en ook met andere cellulaire receptoren zoals integrines (α -keten) en andere extracellulaire liganden (β - en γ -keten), zoals collagenen. Naast dat laminines een rol spelen in de ultrastructuur van het basaal membranen, kunnen laminines een interactie aan gaan met cellen om zo proliferatie, differentiatie, adhesie en migratie te beïnvloeden. (Tzu et al. 2008)

Matrix receptoren

De ECM gaat interacties aan met het cel oppervlak door aan specifieke matrix receptoren te binden. Een voorbeeld hiervan zijn de *integrines*, *syndecanen* en *dystroglycanen*. *Integrines* zijn matrix receptoren die zorgen voor de adhesie van de ECM aan het cytoskelet van de cel. Integrines zijn heteromere transmembraan eiwitten opgebouwd uit twee transmembraan eiwitten, namelijk een α - en een β -subunit. Er zijn veel verschillende soorten α - en β -subunits. Naast dat integrines extracellulaire matrix eiwitten binden, activeren ze ook intracellulaire signaal pathways voor cel-matrix interactie. Integrines kunnen extracellulaire eiwitten, zoals fibronectine goed binden. Fn bindt aan de $\alpha5\beta1$ integrine receptor. (Gullberg et al. 1995, Alberts 4^{de} editie)

Syndecanen zijn plasma membraan proteoglycanen waarvan het extracellulaire deel bestaat uit een kern eiwit met daaraan gebonden chondroitin sulfaat en heparan sulfaat GAG's en het intracellulaire deel kan binden met het actine cytoskelet. Ook kunnen syndecanen als co-receptor voor groei factoren functioneren en kunnen ze de activiteit van integrines in cel adhesie moduleren (Woods et al. 1986, Gullberg et al. 1995). *Dystroglycanen* spelen een belangrijke rol als matrix receptor in spierweefsel (Gullberg et al.1995).

Aanmaak en afbraak van de ECM

De aanmaak en afbraak van de ECM is in gezonde toestand in balans. Bij ziekte raakt en/of de aanmaak, en/of de afbraak en/of de stabilisatie van de ECM uit balans. De ECM wordt aangemaakt en ook weer afgebroken door veel verschillende cellen. Welke cellen de ECM aanmaken is verschillend per type weefsel. De meest bekende producenten van ECM moleculen zijn de fibroblasten (bindweefsel), osteoblasten (bot) en endotheel en epitheel cellen. (Alberts 4^{de} editie)

Proteases uitgescheiden door locale cellen, breken de verschillende matrix componenten weer af. *Matrix metalloproteases (MMP's)* zijn afhankelijk van zink voor hun activiteit en zijn onderverdeeld in verschillende groepen. MMP's zorgen samen met andere proteases voor de afbraak van matrix eiwitten zoals collagenen, laminine, gelatine en fibronectine. Echter is er nu ook bekend dat MMP's ook non-ECM eiwitten, zoals integrines en groei factoren en hun receptoren degraderen (Sommerville et al. 2003). Gecontroleerde degradatie van matrix componenten helpt cellen te migreren. De degradatie van matrix componenten wordt goed gecontroleerd onder andere door protease remmers, zogenoemde *TIMP's (tissue inhibitors*

of MMP's) en *serpines* (*serine protease inhibitor*). TIMP's binden aan het actieve centrum van de MMP's om zo de werking te blokkeren (Stetler-Stevenson 2008). (Catania et al. 2007, Tveita et al. 2008, Hayden et al. 2005, Alberts 4^{de} editie)

Stabilisatie van ECM

Met stabilisatie van de ECM wordt het crosslinken van de verschillende ECM componenten bedoeld. Dit wordt door verschillende enzymen gedaan. Zo zet *lysyl oxidase*, lysine en hydroxyllysine residuen om in aldehyde derivaten die complexe crosslinking series vormen (Prockop et al. 1995). Verder zorgen AGE's (*Advanced Glycosylation End Products*) er voor dat er een non-enzymatische reactie optreedt waarbij glucose een interactie aan gaat met eiwitten, vetten en aminozuren. AGE's werken direct op het induceren van crosslinking van eiwitten zoals collagenen en kunnen een interactie aan gaan met bepaalde receptoren, zoals de receptor voor AGE (RAGE) om intracellulaire signalering te induceren dat leidt tot verhoogde oxidatieve stress en de productie van pro-inflammatoire en pro-sclerotische cytokines (Goh et al. 2008).

De meest bekende crosslinkers van de ECM zijn de *transglutaminases* (*Tgases*). Transglutaminases zijn calcium afhankelijke enzymen die in staat zijn om polypeptide ketens te crosslinken door de vorming van covalente $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysine isopeptide bindingen tussen peptide gebonden lysine en glutamine aminozuren. Deze binding is resistent voor proteolytische degradatie, chemische, enzymatische en mechanische verstoring. Ze zorgen ook voor mechanische stabiliteit in weefsels (El Nahas et al. 2003, Verderio et al. 2008, Collighan et al. 2008). Aangezien transglutaminases een groot deel van het onderwerp zijn van deze scriptie zal er in het volgende hoofdstuk verder worden ingegaan op de functie van de verschillende transglutaminases.

Hoofdstuk 2: Transglutaminases

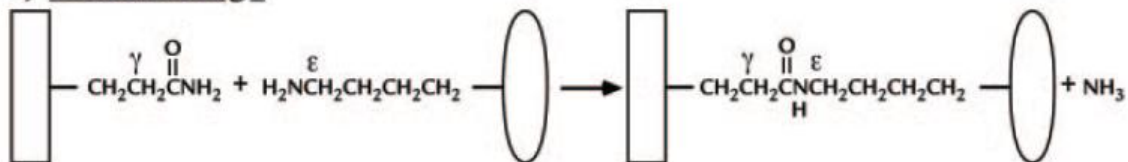
De term transglutaminases (Tgases) werd voor het eerst geïntroduceerd door Clark et al. in 1959. Transglutaminases spelen een belangrijke rol in het crosslinken van ECM componenten, maar ze staan ook bekend om hun biologische lijm functie in de commerciële-, medische- en voedingssector (Kuraishi et al. 1997, Jurgensen et al. 1997). Tot nu toe zijn er in zoogdieren acht soorten transglutaminases ontdekt (Grenard et al. 2001). In dit hoofdstuk zal eerst ingegaan worden op het werkingsmechanisme van crosslinking om vervolgens een overzicht te geven van de verschillende transglutaminases.

Werkingsmechanisme van crosslinking

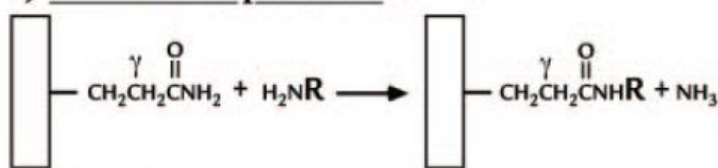
Enzymen die de acyl-transfer reactie katalyseren waarin de γ -carboxamide groepen van peptide gebonden glutamine residuen als acyl-donoren dienen, worden transglutaminases genoemd (Folk 1980). Tgases zijn afhankelijk van Ca^{2+} voor hun transamidatie activiteit. Als ze geactiveerd raken dan functioneren ze als katalysator van meerdere reacties wat uiteindelijk leidt tot post-translationele modificatie van eiwitten door een acyl-transfer reactie, waarbij het peptide gebonden glutamine als acyl-donor functioneert en de peptide gebonden lysine als acyl-acceptor. Hierdoor worden protease resistente $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysine isopeptide bindingen gevormd tussen peptide gebonden lysine en peptide gebonden glutamine aminozuren. (Griffin et al. 2002)

Tgases katalyseren meerdere reacties. Ze kunnen door middel van amine incorporatie (Clark et al. 1959) en acylatie verschillende crosslinks vormen. Verder kunnen ze ook nog hydrolytische reacties katalyseren, waarbij onder andere glutaminezuur gevormd wordt, maar geen directe crosslinks worden gevormd. In figuur 2 zijn de verschillende crosslinkings reacties weergegeven, de hydrolyse reacties zijn achterwege gelaten. (Lorand 1996, Griffin et al. 2002, Lorand 2007)

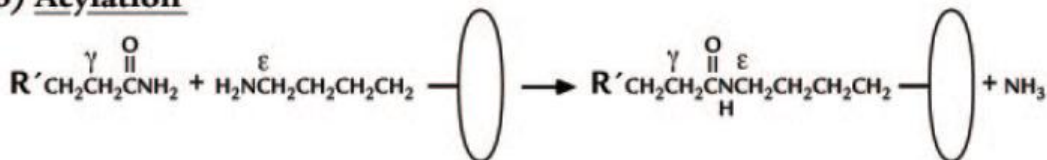
1) Crosslinking



2) Amine Incorporation



3) Acylation



Figuur 2: Bron: Lorand 2007. Tgase gekatalyseerde reacties. Glutamine residuen zijn weergegeven als rechthoek, lysine residuen zijn weergegeven als ovaal. Reactie 1 is de crosslink reactie, waarbij een $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lysine isopeptide binding gevormd wordt tussen peptide gebonden lysine en peptide gebonden glutamine. Reactie 2 is de amine incorporatie reactie, hierbij wordt een amine groep aan een glutamine residu gebonden, onder afsplitsing van ammonia. Reactie 3 is de acylatie reactie, waarbij een acylgroep gebonden wordt aan een lysine residu, ook onder afsplitsing van ammonia.

Overzicht van de verschillende transglutaminases

Er zijn in zoogdieren 8 verschillende transglutaminases gevonden (Gernard et al. 2001). In tabel 1 is een overzicht te zien van de acht verschillende Tgases en hun functie, moleculaire massa, gen en gen locus en synoniemen. Uit deze tabel is goed af te leiden dat Tgases niet alleen in de matrix voorkomen, maar ook in plasma (Factor XIIIa) en in veel verschillende soorten weefsels. Gezien de focus van deze scriptie zal er in het volgende hoofdstuk worden ingegaan op de functie, chemische structuur en rol in fibrose vorming van transglutaminase 2 (TG2).

Tabel 1: Bron: Griffin et al. 2002. De acht verschillende Tgases met synoniemen, moleculaire massa, gen en gen locus en functie.

Identified forms of Tgase	Synonyms	Residues (molecular mass in kDa)	Gene	Gene map locus	Prevalent function
Factor XIII A	Catalytic A subunit of Factor XIII found associated with B subunit in plasma as A2B2 heterotetramer. Fibrin stabilizing factor	732 (83)	F13A1	6p24-25	Blood clotting and wound healing
Type 1 Tgase	Keratinocyte Tgase	814 (90)	TGM1	14q11.2	Cell envelope formation in the differentiation of keratinocytes
Type 2 Tgase	Tissue Tgase	686 (80)	TGM2	20q11-12	Cell death and cell differentiation, matrix stabilization, adhesion protein
Type 3 Tgase	Epidermal Tgase	692 (77)	TGM3	20q11-12	Cell envelope formation during terminal differentiation of keratinocytes
Type 4 Tgase	Prostate Tgase	683 (77)	TGM4	3q21-22	Reproductive function involving semen coagulation particularly in rodents
Type 5 Tgase	Tgase X	719 (81)	TGM5	15q15.2	Epidermal differentiation
Type 6 Tgase	Tgase Y		TGM6	20q11 15	Not characterized
Type 7 Tgase	Tgase Z	710 (80)	TGM7	15q15.2	Not characterized

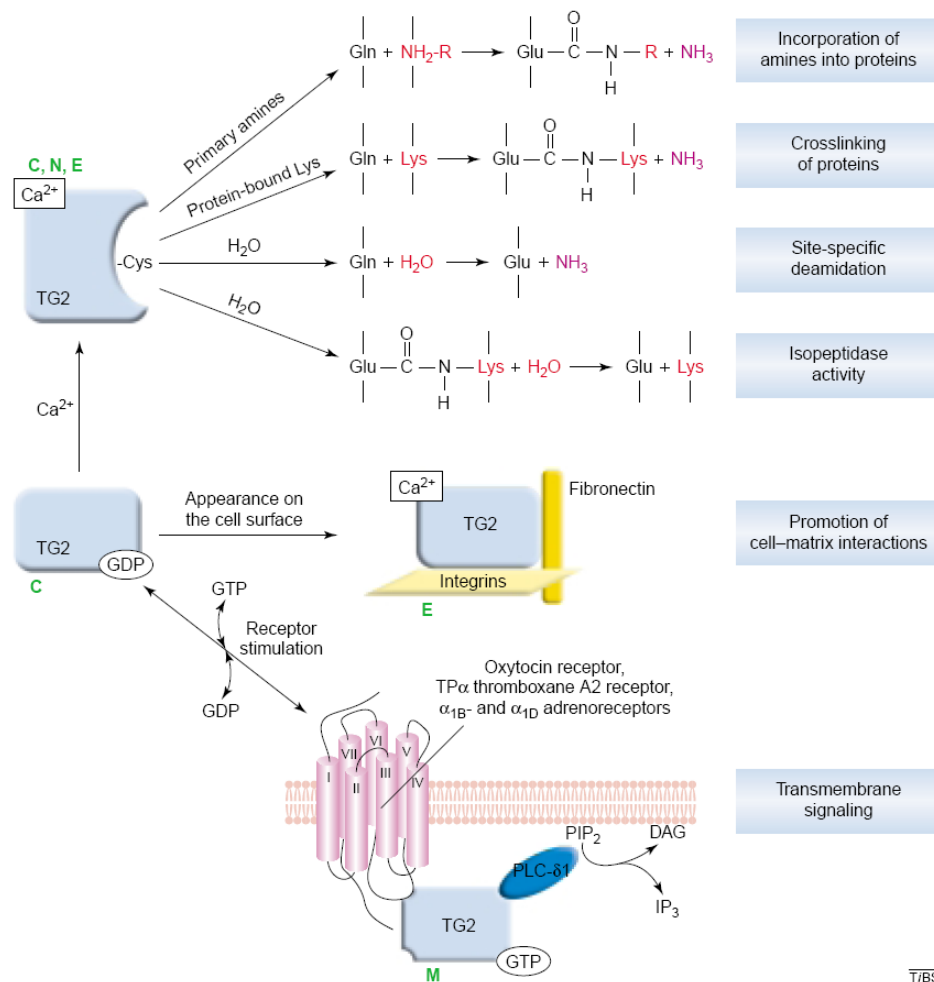
Hoofdstuk 3: De rol van TG2 in fibrose vorming

In dit hoofdstuk zullen de verschillende intra- en extracellulaire functies van TG2 worden behandeld, de biochemische structuur en werking van de verschillende onderdelen. Ten slotte zal er in worden gegaan op de rol van TG2 in fibrose vorming.

TG2 functies

TG2 komt zowel intracellulair als extracellulair voor. TG2 onderscheidt zich van de andere transglutaminases, doordat het ook een functie heeft als een G-eiwit in transmembraan signalering en betrokken is bij cel adhesie, naast dat het verschillende crosslinkings reacties katalyseert (Nakaoka et al. 1994). Daarnaast kan TG2 ook GTP en ATP binden en hydrolyseren (Lee et al. 1993). Verder heeft TG2 intracellulair ook nog eiwit disulfide isomerase activiteit (Hasegawa et al. 2003) en kan het als eiwit kinase functioneren (Mishra et al. 2004). Verder kan GTP gebonden TG2 intracellulaire signaal transductie pathways en transmembraan signalering activeren door middel van de activatie van fosfolipase C (PKC) (Murthy et al 1999). Extracellulair TG2 kan op het cel oppervlak cel-matrix interacties bevorderen door onder andere interacties aan te gaan met fibronectine en integrine $\alpha 5\beta 1$ (Gaudry et al. 1999 a, b, Akimov et al. 2001). In deze scriptie zal de nadruk liggen op de extracellulaire functies van TG2 en zal er niet verder worden ingegaan op de intracellulaire functies van TG2. Figuur 3 visualiseert de verschillende intra- en extracellulaire functies van TG2.

Figuur 3. Bron: Fesus et al. 2002. Biochemische activiteiten van TG2. TG2 katalyseert verschillende reacties oiv. Ca^{2+} . TG2 kan ook tot expressie worden gebracht op het celmembraan waar het interacties aan kan gaan met de ECM (fibronectines en integrines). GDP/GTP gebonden TG2 activeert PLC, gevolgd door stimulatie van verschillende cel oppervlak receptoren. De endogene GTPase activiteit zorgt voor de regulatie van transmembraan signalering via deze cel oppervlak receptoren. Functies van TG2 komen voor in het cytosol (C), de nucleus (N), op het cel membraan (M) en in de extracellulaire ruimte (E).



T/BS

Biochemische opbouw, functie en werking

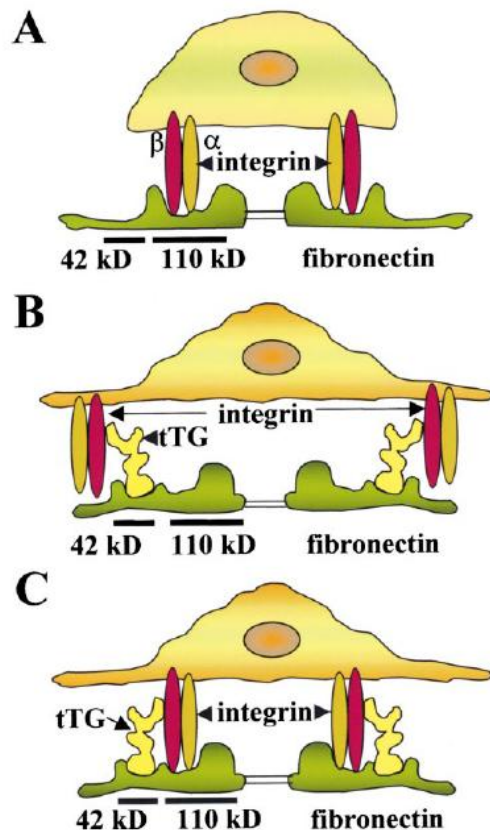
TG2 heeft twee conformaties en is opgebouwd uit vier specifieke domeinen: een N-terminal β -sandwich, een katalytische kern en twee C-terminal β -barrel domeinen (zie figuur 4). De N-terminal β -sandwich bevat fibronectine en integrine bindingsites (Gaudry et al. 1999a). De katalytische kern bevat een katalytische drie-eenheid (Cys, His en Asp) voor de acyl-transfer reactie en het bevat geconserveerd tryptofaan wat essentieel is voor de katalytische activiteit van de transglutaminase (Murthy et al. 2002). Van de twee C-terminal β -barrel domeinen bevat de tweede een fosfolipase C bindingssequentie (Hwang et al. 1995) en beiden zijn belangrijk bij het reguleren van de transamidatie activiteit en GTPase (en ATPase) activiteit (Lai et al. 1996). Als TG2 in zijn GDP/GTP gebonden vorm aanwezig is dan is TG2 inactief en kan het niet functioneren als transglutaminase. Dit wordt veroorzaakt doordat de toegang tot de transamidatie actieve site geblokkeerd wordt door twee loops en de actieve cysteine site wordt gebonden aan een tyrosine residu door middel van een waterstofbrug (Liu S et al. 2002). Binding van Ca^{2+} zorgt voor een conformatie verandering, waardoor TG2 weer enzymatisch actief wordt (Folk et al. 1967, Achyuthan et al. 1987).



Figuur 4: Bron: Griffin et al. 2002. Schematische structuur TG2. een N-terminal β -sandwich (roze), katalytische kern (oranje), C-terminal β -barrel domeinen (groen en blauw).

Extracellulaire functie van TG2

Extracellulair TG2 kan matrix moleculen zoals Fn, collageen, laminine en PG's irreversibel crosslinken (Aeschlimann et al. 2000). TG2 kan binden aan Fn via de N-terminus van Fn, of via het gelatine-bindende domein van Fn, omdat deze een bindingssite voor TG2 bevat (Radek et al. 1993, LeMosy et al. 1992, Akimov et al. 2001). De binding van Fn is belangrijk voor de extracellulaire lokalisatie en stabilisatie van TG2 (Gaudry et al. 1999). Fn bindt aan matrix receptoren op het cel oppervlak vooral via $\alpha 5 \beta 1$ integrines en via integrines van de $\beta 1$ en $\beta 3$ subfamilies, door middel van de RGD-bindingssite (Gullberg et al. 1995, Woods et al. 1993, Akimov et al. 2000). De interactie tussen integrines en fibronectines wordt gestuurd door TG2, waardoor TG2 als een integrine geassocieerde coreceptor op treedt om cel adhesie en afplatting te stimuleren (Akimov et al. 2000). Deze interactie is onafhankelijke van TG2 crosslinking (Akimov et al. 2001). TG2 kan samen met Fn en integrine een drievoudig complex vormen, waardoor cel adhesie en migratie wordt gestimuleerd. (Zie figuur 5)



Figuur 5. Bron: Akimov et al. 2000. De rol van TG2 in celadhesie. De samenwerking tussen integrines en TG2 stimuleert cel adhesie en cel afplatting, dankzij de vorming van een drievoudig adhesie complex met Fn. (A) Integrine gemedieerde adhesie aan Fn in afwezigheid van TG2. (B) TG2 versterkt adhesie doordat het als een brug fungeert tussen integrine en Fn. (C) TG2 versterkt adhesie door het sturen van de vorming van een drievoudig complex, waar alle drie de eiwitten met elkaar interacties aangaan.

Verder speelt TG2 een rol in de activatie van *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1). TGF-β1 wordt door verschillende cellen uitgescheiden als een onderdeel van een groot latent complex. Dit latente complex is opgebouwd uit drie delen: TGF-β1, het TGF-β1 propeptide en het latente TGF-β1 bindingseiwit (LTBP-1). TG2 draagt bij aan de activatie van TGF-β1, doordat het de binding van het LTBP-1 aan de ECM bevordert. Deze binding is een vereiste stap voor de vrijgave van TGF-β1. (Nunes et al. 1997)

Akimov et al. 2001 toonde aan dat TGF-β de expressie van TG2 op het cel oppervlak verhoogt. De manier waarop dit gebeurt is nog onbekend. Verder verhoogt TGF-β de binding van Fn aan het cel oppervlak via β1-integrines (Shweke et al. 2008, Akimov et al. 2001). Ook gaat TGF-β ECM degradatie tegen doordat het de transcriptie van TIMP's activeert (Eddy et al. 2000). TGF-β wordt gezien als een belangrijke factor in de activatie en vorming van nierfibrose (Border et al. 1997).

TG2 in fibrose vorming

TG2 speelt een belangrijke rol tijdens normale en abnormale wondgenezing (Verderio et al. 2005). Tijdens normale wondgenezing zorgt TG2 voor stabilisatie van de ECM door de vorming van crosslinks, hierdoor wordt ook de afzetting van collagenen verhoogt, waardoor de ECM resistenter wordt voor proteolytisch afbraak door MMP's (Fisher et al. 2005). Verder heeft TG2 invloed op de adhesie en migratie van onder andere fibroblast cellen (Verderio et al. 2005). Ongecontroleerde crosslinking als gevolg van herhaaldelijke celschade, cellulair stress en weefsel herstel, zorgt voor een verhoogde expressie van TG2 op het cel oppervlak (Johnson et al. 1999, Lorand et al. 2003). Dit leidt uiteindelijk tot pathologieën als fibrose vorming in de verschillende organen, zoals leverfibrose (Grenard et al. 2001), longfibrose (Richards et al. 1991), maar ook nierfibrose. Met betrekking tot het onderwerp van deze scriptie zal er in het volgende hoofdstuk verder worden ingegaan op de verschillende onderzoeken naar nierfibrose en de rol van TG2 hierin.

Hoofdstuk 4: De rol van TG2 in nierfibrose

Wereldwijd is er een toename in het aantal patiënten met chronische nierziekten (Levey et al. 2007). In veel van deze chronische nierziekten ontstaat er uiteindelijk nierfibrose, onafhankelijk van de oorzaak van de onderliggende nierziekte. Nierfibrose wordt gedefinieerd als een overmatige accumulatie van de afzetting van ECM componenten, wat leidt tot complete destructie van het nierweefsel en uiteindelijk tot nierfalen (Cohen et al. 2005).

In verschillende onderzoeken, op zowel dierlijk als humaan nierweefsel, is een correlatie gevonden tussen TG2 en fibrose vorming in nierziekten. Zo zijn er in humane nier biopten aanwijzingen gevonden voor de correlatie tussen TG2 en het functie verlies van de nier in IgA nefropathie (Ikee et al. 2007). El Nahas et al. 2003 toont aan dat er een duidelijke link is tussen veranderingen in TG2 expressie en diabetische nefropathie en bevestigt dat er een correlatie is tussen de progressie van nierfibrose en TG2. Verder toont Johnson et al. 2003 en 2004 aan dat TG2 een rol speelt in de pathogenese van fibrose in patiënten met chronische nierziekten en samen met ϵ -(γ -glutamyl)lysine isopeptide bindingen een goede indicator kan zijn voor de ontwikkeling van zowel chronische nierziekten en *chronic allograft nephropathy (CAN)*.

In dierlijk nierweefsel heeft Skill et al. 2004 aangetoond dat verhoogde glucose concentraties de productie van TG2 stimuleren in proximale tubulus epitheel cellen, wat gepaard gaat met een verhoogde expressie en afzetting van ECM moleculen, zoals Fn en collagenen III en IV, en een verhoging in het aantal ϵ -(γ -glutamyl)lysine bindingen. De verhoogde glucose concentraties zorgden ook voor een verhoging van de afzetting van ECM moleculen, maar bij TG inhibitie bij hoge glucose concentraties werd aangetoond dat de hoeveelheid ECM moleculen daalde. Hieruit valt af te leiden dat in dit onderzoek de verhoogde expressie van ECM moleculen gemedieerd werd door TG2 en niet specifiek door de glucose concentraties.

Shweke et al. 2008 toonde aan dat TG2 bij draagt aan interstitiële nierfibrose door accumulatie van fibrilair collageen door activatie van TGF- β 1 en cel infiltratie. TG2 knock-out muizen waren beschermd voor de ontwikkeling van interstitiële fibrose, wat geassocieerd werd met een verminderde activatie van TGF- β 1 en verminderde interstitiële ontstekingen. Verder toonde Johnson et al. 2007 aan dat transglutaminase inhibitie, toegepast vanaf het begin van de ziekte, effectief is bij het voorkomen van verbindweefseling en bij het behoud van de nierfunctie door de directe interferentie in de vorming van crosslinks.

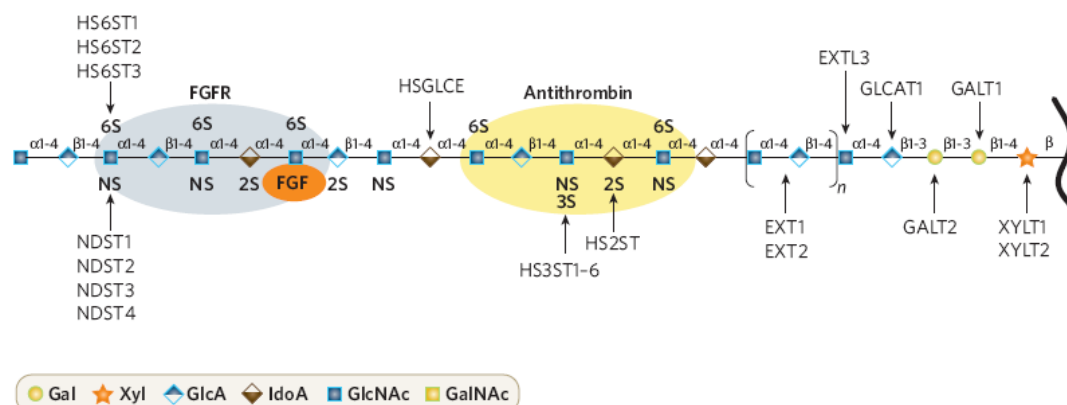
Uit zowel de dierlijke als humane onderzoeken blijkt dat TG2 een zeer geschikt therapeutisch target is ter preventie van nierfibrose. Echter nu is er gevonden dat heparansulfaat proteoglycanen (HSPG's) ook een belangrijke rol spelen in de activatie, expressie en de werking van TG2 op het cel oppervlak (Scarpellini et al. 2009, Scarpellini ongepubliceerde data). Hier zal verder op worden ingegaan in het volgende hoofdstuk.

Hoofdstuk 5: De rol van HSPG's in de activatie van TG2

Voordat er ingegaan zal worden op de rol van HSPG's in de activatie van TG2, zal er eerst worden toegelicht hoe de synthese van heparan sulfaat GAG's plaats vindt. Dan zal er ingegaan worden op de rol van HSPG's in fibrose vorming om vervolgens af te sluiten met de rol van HSPG's in de expressie van TG2 op het cel oppervlak.

De synthese van heparan sulfaten

HSPG's zijn opgebouwd uit een kerneiwit met één of meerdere heparan sulfaat (HS) GAG's er aan gebonden. GAG's zijn lineaire polysaccharide ketens opgebouwd uit alternerende N-gaacetylerde of N-gesulfateerde glucosamine eenheden en urinezuur (glucuronzuur (GlcA) of iduronzuur (IdoA)). In het geval van HS ketens bestaan de glucosamine eenheden uit N-acetylglucosamine (GlcNAc) of N-sulfoglucosamine (GlcNS). Het kern eiwit van HSPG wordt glycosyleerd op het serine residu. De linktetrasaccharide dient als primer waar de HS ketens aan het kern eiwit gekoppeld worden door enzymen in het Golgi. Tijdens de koppeling ondergaan de ketens verschillende reacties zoals N-deacetylratie en N-sulfatering van GlcNAc, epimerizatie van GlcA naar IdoA en ten slotte O-sulfatering wat leidt tot een patroon van gemodificeerde en ongemodificeerde suikers. Er is veel heterogeniteit in keten lengte, mate van sulfatering en epimerisatie in de gemodificeerde segmenten. Buiten de cel vindt verdere bewerking plaats door middel van plasma membraan gebonden endosulfatasen, die specifieke sulfaatgroepen verwijderen van de HS ketens. Hierdoor ontstaat een patroon van negatief geladen sulfaat- en carboxylgroepen wat bindingsites creëert voor verschillende eiwit liganden, groeifactoren, receptoren en protease remmers en vele andere eiwitten. In figuur 6 wordt gevisualiseerd waar de verschillende modificaties plaats kunnen vinden. (Bishop et al. 2007)



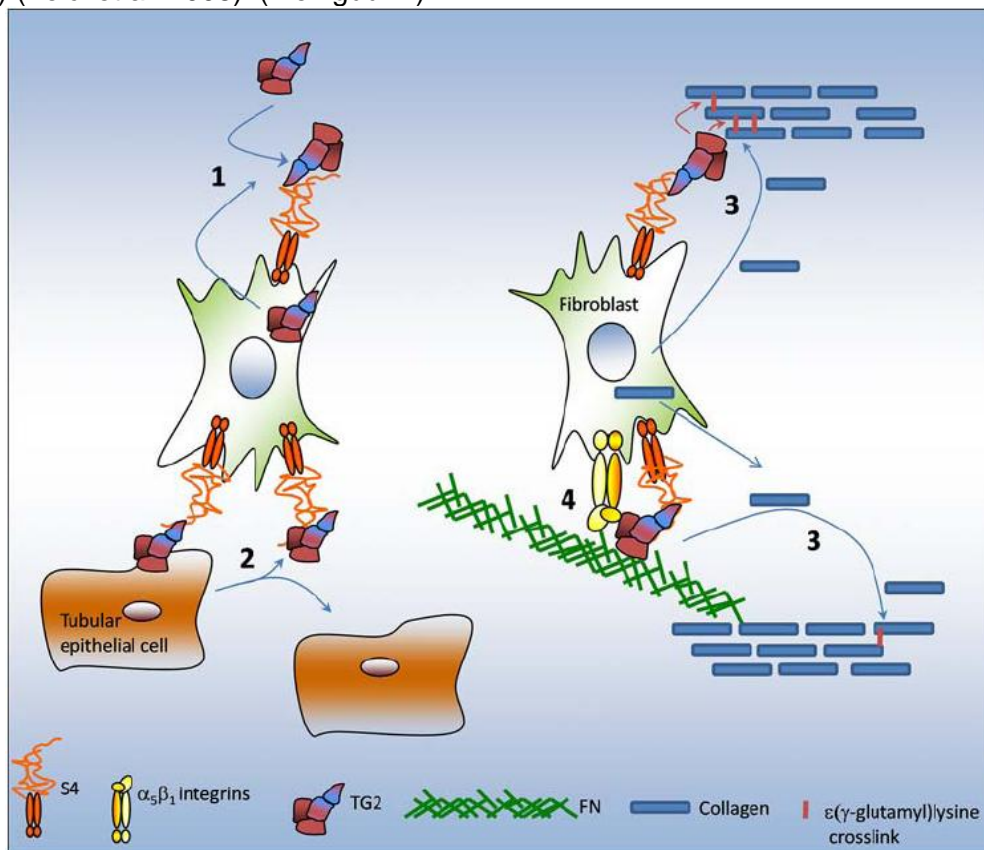
Figuur 6: Bron: Bishop et al. 2007. De vorming van heparan sulfaat en de vorming van bindingsites voor liganden. NS en NDST1-4 tonen aan waar N-deacetylratie en N-sulfatatie optreedt van GlcNAc. HSLGCE toont aan waar C5 epimerisatie van GlcA naar IdoA plaats vindt. 2S en HS2ST tonen aan waar O-sulfatering op C2 van urinezuur plaats vindt. 6S en HS6ST1-3 tonen aan waar O-sulfatering op C6 plaats vindt van glucosamine residuen. Ten slotte tonen 3S en HSDST1-6 aan waar O-sulfatering optreedt op plaats C3 van glucosamine residuen.

De rol van HSPG's in fibrose vorming

TG2 bindt aan Fn via of de gelatine-bindingssite van Fn of via de N-terminus van Fn (Radek et al. 1993, LeMosy et al. 1992, Akimov et al. 2001). Dit leidt tot de vorming van een TG2-Fn complex. Uit onderzoek van Verderio et al. 2003 en Telci et al. 2008 blijkt dat dit TG2-Fn complex onafhankelijk van de RGD sequentie kan binden aan de cel. Deze cel adhesie is onafhankelijk van integrine, maar afhankelijk van HSPG's, zoals syndecan-4. Zowel TG2 als Fn kunnen een binding aangaan met de HS ketens van syndecan-4. Fn bevat namelijk een HepII domein op de C-terminus waaraan HS kan binden (Kim et al. 2001). Hierdoor kan Fn zowel interacties aangaan met integrines, als met HS ketens. Deze

interacties zijn essentieel voor optimale cel adhesie, migratie en overleving van de cel (Jeong et al. 2001, Woods et al. 2001). Ook TG2 heeft een zeer hoge affiniteit voor HS ketens en heparine (een zeer gesulfateerde versie van de HS keten) (Signorini et al. 1988). TG2 bevat namelijk een specifieke bindingssite waaraan heparine kan binden, in welk domein van TG2 deze bindingssite zich bevindt is nog onbekend. Doordat de HS ketens een zeer negatieve lading hebben, kunnen ze goed binden aan basische aminozuren (Cardin et al. 1989). Door de hoge affiniteit van TG2 voor HS en Fn ontstaat ook hier een drievoudig complex van TG2, HS en Fn, wat leidt tot betere cel adhesie (Scarpellini et al. 2009).

Het TG2-Fn complex kan RGD-onafhankelijke cel adhesie induceren door de verhoogde HSPG gemedieerde adhesie, aangezien zowel TG2 als Fn goed kunnen binden met de HS ketens van de HSPG's (Verderio et al. 2003). De binding van TG2-Fn complex aan de HS ketens van syndecan-4 induceren veel intracellulaire signaaltransductie pathways (Telci et al. 2008), maar daar zal niet verder op worden ingegaan. Het verschil tussen de RGD-onafhankelijke en de RGD afhankelijke cel adhesie is dat bij de RGD-afhankelijke cel adhesie de vorming van actine stress vezels geïnitieerd wordt door de directe interactie van Fn met integrines. Bij de RGD-onafhankelijke cel adhesie gaat de interactie niet direct via de binding van Fn met integrines, maar via de activatie van integrines door de binding van Fn gebonden TG2 met syndecan-4. Verder bindt syndecan-4 direct aan Fn en werkt het samen met integrine $\alpha_5\beta_1$ tot de vorming van focale adhesies (binding tussen actine cytoskelet met ECM) (Telci et al. 2008). (Zie figuur 7).



Figuur 7: Bron Verderio et al. 2008. Interacties tussen TG2 en HSPG, syndecan-4 (S4) in het extracellulaire milieu. (1) De lange HS ketens met hoge affiniteit voor TG2 wekken de suggestie dat HSPG's kunnen binden met vrij TG2, of ze kunnen de export van TG2 door de cel zelf stimuleren. (2) HSPG's zouden TG2 op nabij gelegen cellen kunnen binden of zelfs kunnen opnemen. (3) TG2 gebonden op het cel oppervlak kan ECM stabiliseren door intramoleculaire crosslinking, of door ECM afzetting. (4) TG2 op het cel oppervlak kan zowel een interactie aangaan met integrines als met HSPG's, zoals S4, en kan de cel verspreiding, signalering en adhesie beïnvloeden.

Syndecan-4 heeft overeenkomstige eigenschappen met TG2 in wondgenezing en fibrose (Verderio 2008). Net als TG2 komt syndecan-4 ook verhoogt tot expressie op plekken waar weefsel schade geeft opgetreden (Woods et al. 2001). Gambetti et al. 2005 toonde in vitro aan dat de interactie van TG2 met heparine TG2 beschermt tegen inactivatie door verwarming en proteolyse. Ook aggregatie van TG2 enzymen wordt door de binding met heparine belemmerd. De interactie van TG2 met heparine verhoogt de stabiliteit van het enzym. De verhoogde stabiliteit zal waarschijnlijk de crosslinking met Fn en andere ECM eiwitten en PG's bevorderen (Gambetti et al. 2005). Kortom de binding van TG2 met HSPG's, zoals syndecan-4, zal de stabilisatie van de ECM bevorderen en TG2 zal minder gevoelig zijn voor proteolytische en chemische degradatie.

De rol van HSPG's in de expressie van TG2

In hoofdstuk 3 werd aangeduid dat TG2 een belangrijke rol speelt bij de vorming van fibrose en dat de expressie van TG2 op het cel oppervlak wordt verhoogt tijdens herhaaldelijke celschade en cel stress (Johnson et al. 1999, Lorand et al. 2003). Echter het mechanisme van externalisatie van TG2 naar het cel oppervlak en richting de ECM is nog grotendeels onbekend (Collighan et al. 2008). De externalisatie van TG2 gaat niet via een klassieke route, want TG2 bevat geen signaalpeptide waardoor er geen glycosylatie kan optreden in het Golgi of endoplasmatisch reticulum (ER) (Lorand et al. 2003). Wel is bekend dat het mechanisme dat betrokken is bij de externalisatie afhankelijk is van de actieve conformatie van TG2 (Balklava et al. 2002) en dat de Fn-bindingssite in de N-terminal β -sandwich intact moet zijn (Gaudry et al. 1999a). Eenmaal op het cel oppervlak, blijft TG2 sterk verbonden met het cel oppervlak en de ECM (Verderio et al. 2008, Akimov et al. 2000)

Het onderzoek van Scarpellini et al. 2009 ondersteunt de hypothese dat HSPG's een rol spelen in het transport van TG2 naar het cel oppervlak en daarmee ook de biologische activiteit van TG2 kunnen beïnvloeden. Scarpellini et al. 2009 toonde aan dat de binding van TG2 aan de HS ketens van syndecan-4 op het cel oppervlak plaats vindt los van Fn. Door fibroblasten van hun syndecan-4 te ontdoen, toonde Scarpellini et al. 2009 aan dat deze fibroblasten niet in staat waren om TG2 te externaliseren, wat leidde tot opeenhoping van TG2 in het cytosol. Dit duidt aan dat er wellicht al in het Golgi een binding plaats vindt van TG2 met de HS keten en dat deze gekoppeld tot expressie worden gebracht. Verder toont Scarpellini (ongepubliceerde data) aan dat syndecan-4 nodig is voor de extracellulaire activiteit van TG2. HSPG's spelen dus een mogelijke rol in de expressie en activatie van TG2 op het cel oppervlak. Doordat HSPG's een mogelijke rol spelen in de expressie van TG2, kunnen ze dus de biologische activiteit en de dus ook de mate van Ca^{2+} afhankelijke crosslinking beïnvloeden. MacArthur et al. 2007 stelt zelfs dat HSPG's zowel de secretie als de internalisatie van TG2 kunnen beïnvloeden, omdat ze zowel een rol in secretie als endocytose hebben. Begrip van TG2 expressie en transport naar het cel oppervlak is van belang om de cellulaire secretie en extracellulaire werking te kunnen beperken bij bijvoorbeeld fibrose vorming. In het volgende hoofdstuk zal er worden ingegaan op de mogelijke therapeutische interventies om fibrose vorming te verminderen.

Hoofdstuk 6: Interventie strategieën op TG2 in nierziekten

Er zijn al veel onderzoeken uitgevoerd die TG2 als therapeutisch target zien in de behandeling tegen nierfibrose. Voorbeelden hiervan zijn Johnson et al. 1999, Fesus et al. 2002, Johnson et al. 2003, El Nahas et al. 2003, Johnson et al. 2004 en Fisher et al. 2009. In dit hoofdstuk zal eerst ingegaan worden op de recentelijk gebruikte interventie methoden. Daarna zal er in worden gegaan op mogelijke andere interventie methoden op TG2.

Huidige onderzochte interventie methoden

Tot nu toe zijn er verschillende onderzoeken geweest die gebruik hebben gemaakt van het remmen van de TG2 activiteit en expressie om fibrose vorming te verminderen. Dit kan onder andere door middel van irreversibele site specifieke transglutaminase (TG) inhibitoren of door het genetisch uitschakelen van TG2.

Skill et al. 2004, Johnson et al. 2007 en Huang et al. 2009 hebben gekeken naar het effect van irreversibele TG inhibitoren (NTU281 en NTU283) in diabetische nefropathie en in chronische nierziekten. Skill et al. 2004 gebruikte een celkweek model, Johnson et al. 2007 en Huang et al. 2009 gebruikten een diermodel. In het onderzoek van Johnson et al. 2007 werd gebruik gemaakt van een canule waaraan een minipomp was bevestigd. Daardoor werd een continue hoeveelheid van de TG inhibitoren aan het nier parenchym toegediend. In het onderzoek van Skill et al. 2004 werden verschillende concentraties van de TG inhibitoren aan de gekweekte proximale tubulaire epitheel cellen toegevoegd. Uit deze onderzoeken kwam naar voren dat irreversibele TG inhibitie het crosslinken van de ECM verstoort en dat de activatie van TG2 afneemt. TGF- β 1 activiteit en expressie werd niet beïnvloed, dus de werking van TG inhibitie is onafhankelijk van TGF- β 1. De TG inhibitie leidde tot verminderde ontwikkeling van glomerulosclerose en tubulo interstitiële fibrose en zou therapeutisch toegepast kunnen worden in de behandeling van nierfibrose.

Shweke et al. 2008 onderzocht het effect van TG2 inhibitie door middel van TG2 knock-out muizen. Uit dit onderzoek kwam naar voren dat genetische inhibitie van TG2 beschermde tegen de ontwikkeling van interstitiële fibrose in obstructieve nierziekten. Verder werd collageen I sterk verminderd en TGF- β 1 ook. Dit zijn belangrijke componenten in fibrose vorming. Doelgericht de activatie en expressie van TG2 aanpakken kan nieuwe en belangrijke behandelingen geven voor de strijd tegen nierfibrose.

Een andere manier van TG2 inhibitie is het gebruik van een cysteamine. Dit werd gebruikt door Yang et al. 2008. Cysteamine reduceerde de expressie van TG2 en TGF- β 1. Echter wat nog interessanter is aan dit onderzoek is dat Yang et al. 2008 heeft aangetoond dat uteroglobine een beschermende rol heeft in experimentele glomerulonephritis door de modulatie van de expressie van zowel TG2 als TGF- β 1. De glomerulaire schade werd vermindert en de nierfunctie werd beter behouden. Uteroglobine zou gebruikt kunnen worden als interventie op TG2 in nierziekten om fibrose te verminderen.

Mogelijke interventie methoden

TG2 kan verschillende interacties aangaan met meerdere componenten van de ECM. Het kan zelfs drievoudige complexen vormen (Akimov et al. 2000, Scarpellini et al. 2009). Door meerdere interacties te verstoren zouden de bindingen van de verschillende ECM componenten met elkaar verzwakt kunnen worden, waardoor gevormde crosslinks ook beter toegankelijk zijn voor proteolytische, chemische en mechanische degradatie. Daarvoor zouden meerdere specifieke peptiden, oligosacchariden en antilichamen gebruikt kunnen worden. Zo zijn er al RGD-specifieke peptiden die de RGD-sequentie van integrines blokkeren waardoor integrine niet meer kan binden met Fn (Verderio et al. 2003). Het HepII domein van Fn zou gemodificeerd of bezet kunnen worden, waardoor Fn niet meer kan binden met de HS ketens van HSPG's. Verder zouden de gelatine-bindingssite en de N-terminus van Fn bezet of verstoord kunnen worden, waardoor de binding van TG2 aan Fn

verstoord zou worden. Een andere optie is dat TGF- β wordt gedeactiveerd, waardoor onder andere de expressie van TG2 op het cel oppervlak wordt verminderd.

Door de N-terminal β -sandwich van TG2 te bezetten zou TG2 niet meer kunnen binden aan fibronectine en integrine. De katalytische kern bevat een katalytische drie-eenheid (Cys, His en Asp) voor de acyl-transfer reactie en het bevat geconserveerd tryptofaan wat essentieel is voor de katalytische activiteit van de transglutaminase (Murthy et al. 2002). Door deze katalytische site te bezetten zou de katalytische activiteit van TG2 geremd worden en dan kunnen er dus geen crosslinkings reacties meer worden gekatalyseerd. Ook door de binding van Ca^{2+} aan de GDP gebonden vorm van TG2 te belemmeren zou TG2 in een inactieve conformatie blijven en zou het geen crosslinkings reactie meer katalyseren en cel-matrix interacties ondergaan.

Scarpellini et al. 2009 duidt de mogelijkheid aan dat de binding van TG2 aan de HS keten van syndecan-4 intracellulair optreedt en dat TG2 als complex samen met de HS keten naar het cel oppervlak worden getransporteerd. Een eventuele interventie zou kunnen zijn dat een molecuul de binding tussen de HS keten en de TG2 belemmerd via competitie. Een andere manier is dat de specifieke bindingssite voor heparine van TG2 genetisch gemodificeerd wordt, waardoor deze bindingssite verandert en TG2 niet meer kan binden aan de HS keten. Verder zou de synthese van de HS ketens geblokkeerd kunnen worden of een enzym wat betrokken is bij de synthese van de HS ketens. Bijvoorbeeld de enzymen die betrokken zijn bij de sulfatering van HS ketens. Hierdoor zou TG2 ook niet meer goed kunnen binden aan de HS ketens. Extracellulair zou de bindingssite van TG2 voor de HS keten door middel van een peptide, een antilichaam of een heparine oligosaccharide bezet kunnen worden, waardoor daar ook geen binding meer mogelijk zou zijn tussen TG2 en de HS ketens. Een heparine oligosaccharide zou ook kunnen binden aan het HepII domein van Fn, waardoor ook deze interactie verstoord zou worden. Hierdoor zou TG2-Fn complex binding aan de cel ook verminderd worden.

Schuksz et al. 2008 toont aan dat surfen (een moleculair antagonist van heparine) bindt aan heparine, heparines met een klein molecuul gewicht en aan HS ketens en andere GAG's. De binding van surfen zou de activiteit van TG2 kunnen remmen, omdat het HS-keten afhankelijke activatie blokkeert. Verder blokkeert het ook de sulfatering en degradatie van GAG ketens in vitro en beïnvloed het cellulaire responses die afhankelijk zijn van HS ketens, zoals de binding en activatie van groei factoren en cel adhesie. Het onderzoek van Schuksz et al. 2008 toont aan dat een klein molecuul zoals surfen, direct belangrijke biologische processen verstoord, waarbij HS ketens betrokken zijn. Surfen zou eventueel als interventie middel toegepast kunnen worden in nierfibrose. Echter daar moet nog verder onderzoek naar worden gedaan. Er zou ook meer onderzoek gedaan moeten worden naar het ontwerpen van selectieve middelen specifiek gericht op interacties tussen HS ketens met TG2.

Kortom er zijn veel eventuele mogelijkheden als interventie op TG2 activatie en expressie. Er is nog veel verder onderzoek nodig naar de functie, activiteit, interacties met ECM componenten en expressie van TG2 in fibrose vorming, voordat er echt aan mogelijke therapeutische middelen gewerkt kan worden. Echter interventie op TG2 is zeker van therapeutische relevantie, want de betrokkenheid ervan bij fibrose vorming is inmiddels wel duidelijk aangetoond in de verschillende onderzoeken.

Conclusie en Discussie

In deze scriptie is er gekeken naar het effect van TG2 op fibrose vorming in nierziekten en wat eventuele interventie mogelijkheden zijn op TG2 om nierfibrose tegen te gaan. Uit verschillende onderzoeken is naar voren gekomen dat TG2 wel degelijk een rol speelt in fibrose vorming in verschillende nierziekten. Echter verder onderzoek is altijd van belang om een beter begrip te krijgen van de specifieke werking en interacties die TG2 aangaat en medieert tussen de verschillende ECM componenten. Dit is nodig om een stap dichterbij de interventie mogelijkheden te komen en de therapeutische toepassing daarvan in de praktijk.

Er moet nog veel onderzoek gedaan worden naar mogelijke interventies op TG2 in fibrose vorming. Zo zouden er meer specifieke TG2 inhibitoren ontwikkeld kunnen worden die specifiek gericht zijn op TG2 in de zieke nier. Er moet dus verder onderzoek gedaan naar worden naar manieren van targeting. TG2 heeft namelijk ook een gezonde biologische functie in het herstellen van weefsel schade. Als deze functie totaal in het gehele lichaam uitgeschakeld of geremd zou worden, dan zou dat veel problemen opleveren. Cellen zijn immers afhankelijk van cel contacten, cel adhesie en migratie voor overleving en daar speelt TG2 ook een grote rol in.

Een manier van targeting is het gebruik van conditionele knock-out muizen. Hierbij zou je bijvoorbeeld de HS keten synthese in tubulaire epitheel cellen kunnen blokkeren, waardoor er gericht op de nier en op nierfibrose interventie plaats vindt. Verder zou er ook gebruik gemaakt kunnen worden van renale adenovirus targeting. Door middel van dit virus kunnen er specifiek gericht op nier fibroblast cellen, peptides, heparine oligosaccharides of surfen, naar de fibroblast cellen in de nier getransporteerd worden, waar deze peptides en oligosacchariden TG2 kunnen binden en bijvoorbeeld de interactie tussen TG2 en de HS ketens kunnen verstoren. Surfen zou de synthese van de HS ketens kunnen belemmeren, en dus ook de externalisatie en activiteit van TG2. Een dergelijk model, waarbij gebruik gemaakt wordt van het adenovirus om doelgericht te werk te gaan, is al eerder gebruikt door Sandovici et al. in 2006.

Naast dat TG2 zelf als therapeutisch target gebruikt kan worden, worden Tgases zelf zowel therapeutisch, als diagnostisch als industrieel toegepast (Griffin et al. 2002). Verder onderzoek naar TG2 kan dus ook leiden tot verdere ontwikkeling en het gebruik van Tgases in de verschillende therapeutische en industriële toepassingen.

TG2 speelt niet alleen een rol in nierfibrose, maar ook in andere fibrotische ziekten, zoals lever- en longfibrose. Verder speelt TG2 ook een rol in coeliakie (Molberg et al. 2000), neurodegeneratieve ziekten (Hoffner et al. 2005) en verschillende soorten kanker (Mangala et al. 2005). Manieren van interventie op TG2 zijn dus niet alleen van belang in ziekten als nierfibrose. Er zouden bijvoorbeeld ook therapeutische toepassingen kunnen zijn in brandwonden, waarbij zeer veel verbindweefseling optreedt van de huid of andere huidziekten met excessieve verbindweefseling. Kortom interventie op TG2 is zeker van therapeutisch belang. Niet alleen voor nierfibrose, maar ook voor vele andere ziekten waarbij TG2 betrokken is.

Referenties:

- Achyuthan KE, Greenberg CS. 1987. Identification of a guanosine triphosphate-binding site on guinea pig liver transglutaminase – role of GTP and calcium ions in modulating activity. *The Journal of Biological Chemistry* 262(4): 1901-1906.
- Aeschlimann D, Thromazy V. 2000. Protein crosslinking in assembly and remodeling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect tissue* 41:1-27.
- Akimov SS, Belkin AM. 2001. Cell-surface transglutaminase promotes fibronectin assembly via interaction with the gelatin-binding domain of fibronectin: a role in TGF- β -dependent matrix deposition. *Journal of Cell Science* 114: 2989-3000.
- Akimov SS, Krylov D, Fleischman LF, Belkin AM. 2000. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion co-receptor for fibronectin. *The Journal of Cell Biology* 148(4): 825-838.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: *Molecular Biology of the Cell* fourth edition. New York, NY: Garland Science, 2002; 1066-1125. ISBN 0-8153-4072-9.
- Balklava Z, Verderio E, Collighan R, Gross S, Adam J, Griffin M. 2002. Analysis of tissue transglutaminase function in the migration of Swiss 3T3 fibroblasts- The active-state conformation of the enzyme does not affect cell motility but is important for its secretion. *The Journal of Biological Chemistry* 277(19): 16567–16575
- Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446: 1030-1037.
- Border W, Noble N. 1997. TGF- β in kidney disease: A target for gene therapy. *Kidney Int* 52:1388-1396.
- Cardin AD, Weintraub HJ. 1989. Molecular modeling of proteoglycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9: 21-32.
- Catania JM, Chen G, Parrish AR. 2007. Role of matrix metalloproteinases in renal pathologies. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: 905-911.
- Clark DD, Mycek MJ, Neidle A, Waelsch H. 1959. The incorporation of amines into protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 79: 338-354.
- Cohen JJ, Harrington JT, Madias N, Zusman CJ. 2005. The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney International* 68: 2918–2929.
- Collighan RJ, Griffin M. 2008. Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications. *Amino Acids* 36: 659-670.
- ¹Comper WD, Bateman JF, Lamandé SR, Ramshaw JAM. Collagen Superfamily. In: *Extracellular Matrix Vol.2. Molecular components and interactions*. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic publishers, 1996: 22-67. ISBN 3-7186-5916-6.
- ²Comper WD, Fraser JRE, Laurent TC. Hyaluron. In: *Extracellular Matrix Vol.2. Molecular components and interactions*. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic publishers, 1996: 141-199. ISBN 3-7186-5916-6.
- ³Comper WD, Fodsang AJ, Hardingham TE. Matrix proteoglycans. In: *Extracellular Matrix Vol.2. Molecular components and interactions*. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic publishers, 1996: 200-229. ISBN 3-7186-5916-6.

- Dreyfuss JL, Regatieri CV, Jarrouge TR, Cavalheiro RP, Sampaio LO, Nader HB. 2009. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signalling. *An Acad Bras Cienc* 81(3): 409-429.
- Eddy AA. 2000. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 15:290–301.
- El Nahas AM, Abo-Zenah H, Skill NJ, Bex S, Wild G, Griffin M, Johnson TS. 2003. Elevated ϵ (γ -glutamyl) lysine in human diabetic nephropathy results from increased expression and cellular release of tissue transglutaminase. *Nephron Clin Pract* 97:108-117.
- El Nahas AM, Bello AK. 2005. Chronic kidney disease: The global challenge. *Lancet* 365: 331-340.
- Fesus L, Piacentini M. 2002. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *TRENDS in Biochemical Sciences* 27(10): 534-539.
- Fisher M, Huang L, Hau Z, Griffin M, El Nahas AM, Johnson TS. 2005. Over expression of tissue transglutaminase in proximal tubular epithelial cells affects ECM accumulation in vitro. Proceedings of the 3rd World Congress in Nephrology, Singapore.: W-P020031.
- Fisher M, Jones RA, Huang L, Haylor JL, El Nahas M, Griffin M, Johnson TS. 2009. Modulation of tissue transglutaminase in tubular epithelial cells alters extracellular matrix levels: A potential mechanism of tissue scarring. *Matrix Biology* 28: 20-31.
- Folk JE, Cole PW, Mullooly JP. 1967. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. IV. The trimethylacyl enzyme. *J Biol Chem.* 242(19):4329-33.
- Folk JE. 1980. Transglutaminases. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 517-531.
- Gambetti S, Dondi A, Cervellati C, Squerzanti M, Pansini F, Bergamini CM. 2005. Interactions with heparin protects tissue transglutaminase against inactivation by heating and by proteolysis. *Biochimie* 87: 551-555.
- Gaudry CA, Verderio E, Aeschlimann D, Cox A, Smith C, Griffin M. 1999a. Cell surface localization of tissue transglutaminase is dependent on a fibronectin-binding site in its N-terminal b-sandwich domain. *The Journal of Biological Biochemistry*, 274(43): 30707–30714.
- Gaudry CA, Verderio E, Jones RA, Smith C, Griffin M. 1999b. Tissue transglutaminase is an important player at the cell surface of human endothelial cells: evidence for its externalization and its colocalization with the beta(1) integrin. *Exp. Cell. Res.* 251 (1): 104-113.
- Goh SY, Cooper ME. 2008. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93(4):1143–1152.
- Goodman SR, Balczon R, Gard AL, Kayes SG, Zimmer WE, Pace BS. Cell adhesion and the extracellular matrix. In: *Medical cell biology 2nd edition*. Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins, 1998: 202-210. ISBN 0-397-58427-x.
- Grenard P, Bates MK, Aeschlimann D. 2001. Evolution of transglutaminase genes: Identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (35): 33066–33078.
- Grenard P, Bresson-Hadni S, El Alaoui S, Chevallier M, Vuitton DA, Ricard-Blum S. 2001. Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. *J. Hepatol.* 35: 367-375.
- Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. 2002. Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochem. J.* 368: 377-396.

Gullberg D, Ekblom P. 1995. Extracellular matrix and its receptors during development. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 845-854.

Hasegawa G, Suwa M, Ichikawa Y, Ohtsuka T, Kumagai S, Kikuchi M, Sato Y, Saito Y. 2003. A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase. *Biochem. J.* 373: 793–803

Hayden MR, Sowers JR, Tyagi SC. 2005. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. *Cardiovascular Diabetology* 4:9.

Hoffner G, Dijan P. 2005. Transglutaminase and disease of the central nervous system. *Front Biosci* 10:3078-3092.

Huang LH, Haylor JL, Hau Z, Jones RA, Vickers ME, Wagner B, Griffin M, Siant RE, Coutts IGC, El Nahas AM, Johnson TS. 2009. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. *Kidney International* 76(4): 383-394.

Hwang KC, Gray CD, Sivasubramanian N, Im MJ. 1995. Interaction site of GTP binding Gh (transglutaminase II) with phospholipase C. *J Biol Chem* 270(45):27058-62.

Hynes RO, Yamada KM. 1982. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *The Journal of Cell Biology* 95: 369-377.

Ikee R, Kobayashi S, Hemmi N, Saigusa T, Namikoshi T, Yamada M, Imakiire T, Kikuchi Y, Suzuki S, Miura S. 2007. Involvement of transglutaminase-2 in pathological changes in renal disease. *Nephron Clin Pract* 105: 139-146.

Iozzo RV. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem* 67: 609-652.

Jeong J, Han I, Lim Y, Kim J, Park I, Woods A, Couchman JR, Oh ES. Rat embryo fibroblasts require both the cell-binding and the heparin-binding domains of fibronectin for survival. *Biochem J.* 2001 Jun 1;356(Pt 2):531–537.

Johnson TS, Abo-Zenah H, Skill NJ, Bex S, Wild G, Brown CB, Griffin M, El Nahas AM. 2004. Tissue transglutaminase: a mediator and predictor of chronic allograft nephropathy? *Transplantation* 77(11):1667-1675.

Johnson TS, El-Koraie A, Skill NJ, Baddour NM, El Nahas AM, Njloma M, Adam AG, Griffin M. 2003. Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring. *J Am Soc Nephrol* 14: 2052–2062.

Johnson TS, Fisher M, Haylor JL, Hau Z, Skill NJ, Jones R, Saint R, Coutts I, Vickers ME, El Nahas AM, Griffin M. 2007. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18: 3078-3088.

Johnson TS, Skill NJ, El Nahas M, Oldroyd SD, Thomas GL, Douthwaite JA, Haylor JL, Griffin M. 1999. Transglutaminase transcription and antigen translocation in experimental renal scarring. *J Am Soc Nephrol* 10: 2146-2157.

Jurgensen K, Aeschlimann D, Cavin V, Genge M, Hunziker EB. 1997. A new biological glue for cartilage-cartilage interfaces: tissue transglutaminase. *J. Bone Joint Surg AM* 79: 185-193.

Kim J, Han I, Kim Y, Kim S and Es OH. 2001. C-terminal heparin-binding domain of fibronectin regulates integrin-mediated cell spreading but not the activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem. J* 360: 239-245

Kuraishi C, Sakamoto J, Yamazaki K, Susa Y, Kuhara C, Soeda T. 1997. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J. Food Sci.* 62 (3): 488-515.

- Lai TS, Slaughter TF, Koropchak CM, Haroon ZA, Greenberg CS. 1996. C-terminal Deletion of Human Tissue Transglutaminase enhances magnesium-dependent GTP/ATPase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 271(49):31191-5.
- Lee KN, Arnold SA, Birckbichler PJ, Patterson MK, Fraij BM, Takeuchi Y, Carter HA. 1993. Site-directed mutagenesis of human tissue transglutaminase: Cys-277 is essential for transglutaminase activity but not for GTPase activity. *Biochem. Biophys Acta* 1202 (1): 1-6.
- LeMosy EK, Erickson HP, Beyer WF, Radek JT, Jeong JM, Murthy SN, Lorand L. 1992. Visualization of purified fibronectin-transglutaminase complexes. *J Biol Chem.* 267(11):7880–7885.
- Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collings AJ, Eckardt K-U, Nahas ME, Jaber BL, Jadoul M, Levin A, Powe NR, Rossert J, Wheeler DC, Lameire N, Eknoyan G. 2007. Chronic kidney disease as a global public health problem: Approaches and initiatives – a position statement from kidney disease improving global outcomes. *Kidney International* 72: 247–259.
- Liu SP, Cerione RA, Clardy J. 2002. Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (5): 2743-2747.
- Lorand L. 1996. Commentary: Neurodegenerative diseases and transglutaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14310–14313.
- Lorand L, Graham RM. 2003. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 140-156.
- Lorand L. 2007. Crosslinks in blood: transglutaminase and beyond. *The FASEB journal* 21: 1627-1632.
- MacArthur JM, Bishop JR, Stanford KI, Wang L, Bendadoun A, Witztum JL, Esko JD. 2007. Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *The Journal of Clinical Investigation* 117 (1): 153- 164
- Mangala LS, Mehta K. 2005. Tissue transglutaminase (TG2) in cancer biology. *Prog Exp Tumor Res* 38: 125-138.
- Mishra S, Murphy LJ. 2004. Tissue transglutaminase had intrinsic kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (23): 23863-23868.
- Molberg O, McAdam SN, Sollid LM. 2000. Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr* 30(3): 232-240.
- Murthy SNP, Lismaa S, Begg G, Freymann DM, Graham RM, Lorand L. 2002. Conserved tryptophan in the core domain of transglutaminase is essential for catalytic activity. *Proc Natl acad Sci USA* 99(5): 2738-2742.
- Murthy SNP, Lomasney JW, Mak EC, Lorand L. 1999. Interactions of G_T/transglutaminase with phospholipase C δ 1 and with GTP. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 91(21): 11815-11819.
- Nakaoka H, Perez DM, Baek KJ, Das T, Husain A, Misono K, Im MJ, Graham RM. 1994. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science* 264(5165): 1593 – 1596.
- Nunes I, Gleizes PE, Metz CN, Rifkin DB. 1997. Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 136: 1151-1163.

- Prockop DJ, Kivirikko KI. 1995. Collagens: Molecular biology, disease and potential for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 403-434.
- Radek JT, Jeong JM, Murthy SN, Ingham KC, Lorand L. 1993. Affinity of human erythrocyte transglutaminase for a 42-kDa gelatin-binding fragment of human plasma fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(8): 3152–3156.
- Richards RJ, Masek LC, Brown RF. 1991. Biochemical and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Toxicol Pathol* 19: 526-539.
- Sandovici M, Deelman LE, Smit-van Oosten A, van Goor H, Rots MG, de Zeeuw D, Henning RH. 2006. Enhanced transduction of fibroblasts in transplanted kidney with an adenovirus having an RGD motif in the HI loop. *Kidney International* 69: 45-52.
- Scarpellini A, Germack R, Lortat-Jacob H, Muramatsu T, Billnet E, Johnson TS, Verderio EAM. 2009. Heparan sulfate proteoglycans are receptors for the cell-surface trafficking and biological activity of transglutaminase-2. *Journal of Biological Chemistry* 284(27): 18411-18423.
- Scarpellini A, Lortat-Jacob H, Johnson TS, Verderio EA. 2009. Syndecan-4 is required for the cell-surface trafficking of pro-fibrotic action of transglutaminase-2. Unpublished data. Abstract at the 6th International Conference on Proteoglycan. Aix les Bains France 2009.
- Schuksz M, Fuster MM, Brown JR, Crawford BE, Ditto DP, Lawrence R, Glass CA, Wang L, Tor Y, Esko JD. 2008. Surfen, a small molecule antagonist of heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 105 (35): 13075–13080.
- Shweke N, Boulos N, Jouanneau C, Vandermeersch S, Melino G, Dussaule JC, Chatziantoniou C, Ronco P, Boffa JJ. 2008. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF- β activation and cell infiltration. *The American Journal of Pathology* 173(3): 631-642.
- Signorini M, Bortolotti F, Poltronieri L, Bergamini Sm. 1988. Human erythrocyte transglutaminase: purification and preliminary characterisation. *Biol Chem Hoppe Seyler* 369: 275-281.
- Skill NJ, Johnson TS, Coutts IGC, Saint RE, Fisher M, Huang L, El Nahas AM, Collighan RJ, Griffin M. 2004. Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. *The Journal of Biological Biochemistry* 279(40): 47754-47762.
- Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. 2003. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 4: 216.
- Stetler-Stevenson WG. 2008. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 1(27): re6
- Telci D, Wang Z, Li X, Verderio EAM, Humphries M, Baccarini M, Basaga H, Griffin M. 2008. Fibronectin-tissue transglutaminase matrix rescues RGD-impaired cell adhesion through syndecan-4 and β 1 integrin co-signaling. *Journal of Biological Chemistry* 282(30): 20937-20947.
- Toole BP. 2000. Hyaluronan is not just a goo! *The Journal of Clinical Investigations* 106 (3): 335-336.
- Tveita A, Rekvig OP, Zykova SN. 2008. Glomerular matrix metalloproteinases and their regulators in the pathogenesis of lupus nephritis. *Arthritis Research & Therapy* 10: 229.
- Tzu J, Marinkovich MP. 2008. Bridging structure with function: Structural, regulatory, and developmental role of laminins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40: 199-214.
- Verderio EAM, Johnson TS, Griffin M. 2005. Transglutaminases in wound healing and inflammation. *Prog Exp Tumor Res* 38: 89-114.

Verderio EAM, Scarpellini A Johnson TS. 2008. Novel interactions of TG2 with heparan sulfate proteoglycans: reflection on physiological implications. *Amino Acids* 36: 671-677.

Verderio EAM, Telci D, Okoye A, Melino G, Griffin M. 2003. A novel RGD-independent cell adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(43):42604-42614.

Woods A, Couchman JR. 2001. Syndecan-4 and focal adhesion function. *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 13(5): 578-583.

Woods A, Couchman JR, Johansson S, Hook M. 1986. Adhesion and cytoskeletal organization of fibroblasts in response to fibronectin fragments. *Embo J* 5: 665-670.

Woods A, McCarthy JB, Furcht LT and Couchman JR. 1993. A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*. 4(6):605-613.

Yang SH, Shin SJ, Oh JE, Jin JZ, Chung NH, Lim CS, Kim S, Kim YS. 2008. The protective role of uteroglobin through the modulation of tissue transglutaminase in the experimental crescentic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 23: 3437-3445.

Yoon JH, Halper J. 2005. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5(1);22-34.