





Área Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química Unidad Asociada del Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias

# Estudios de la transglutaminasa tisular en la interfase materno-fetal

Tesis para acceder al título de Doctora en Ciencias Biológicas

Estudiante: MSc. Paula Arbildi

Directora: Dra. Ana Hernández

Co-directora: Dra. Cecilia Sóñora.

Montevideo, 12 de junio de 2023

# Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

### Programa de Desarrollo de las Ciencias

### **Básicas (PEDECIBA)**

Área Biología Sub-Área Biología Celular y Molecular.

#### Directora

Dra. Ana Hernández Profesora Adjunta Área Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química Unidad Asociada del Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias

#### **Co-directora**

Dra Cecilia Sóñora Profesora Agregada Inmunología, Escuela de Tecnología Médica Facultad de Medicina

#### **Tribuna**l

Dra Teresa Freire Dr. Esteban Grasso Dra. María Laura Ribeiro

#### **AGRADECIMIENTOS**

Se cierra una etapa, la cual fue posible gracias a muchas personas que me han acompañado, enseñado y apoyado tanto en lo académico como en tantos otros aspectos necesarios para que esta tesis se pudiera concretar.

En primer lugar, quisiera agradecerle a mis orientadoras Ana y Cecilia, por permitirme incorporar en esta línea de trabajo y aceptar guiarme en esta etapa de mi formación. No fue un camino fácil, pero el apoyo e impulso constante y el acompañamiento con énfasis en lo humano lo hicieron ameno y disfrutable.

En el desarrollo de este trabajo, también fue muy importante el respaldo de mis compañeros Gus y Clau, con quienes verdaderamente hemos formado equipo y siempre pude contar tanto desde lo técnico como en las discusiones de resultados e ideas y en el apoyo de las tareas docentes que compartimos. También gracias a Rodrigo, Fede y Victoria, quienes en esta etapa fueron mis pasantes y sufrieron cada experimento fallido o se alegraron con los resultados obtenidos.

Gracias también a todos los compañeros que han pasado por la "Casita de Adelante": Seba, Verito, Emi, Joaco, Javi, Clara, Ana Clara, Vero. Cada uno aporto algo importante para que esta tesis se concretara. Especialmente gracias a Nati, quien gestó esta idea de explorar las variantes de splicing de la TG2.

Además, quiero agradecer a todos los integrantes de la Cátedra de Inmunología (los que están y los que estuvieron). Todos han sido partícipes en alguna forma de este logro. Particularmente gracias a Mery que por mucho tiempo me acompaño y ayudó con las qPCR y Maite, Leti y Anabella que me dieron una mano con los ensayos de citometría y el cultivo celular.

En este trabajo fue fundamental el apoyo económico brindado por CSIC, PEDECIBA y ANII

Parte de este trabajo fue realizado gracias a que en otros laboratorios me abrieron sus puertas, prestaron sus equipos, reactivos y/o me apuntalaron con sus conocimientos. Por ello quisiera agradecerle al Dr. Alejandro Chabalgoity, al Dr. Juan Martín Marqués, la Dra. Lucía Yim y la Dra. Andrea Rossi (Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina – UdelaR); a la Dra. Mariela Bollati y la Msc. Karen Perelmuter (Unidad de Biología Celular, Instituto Pasteur de Montevideo), al Dr. Alvaro Pittini y la

Msc. Viviana Cardozo (Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral, Instituto Pasteur de Montevideo); la Dra Cecilia Varone (Laboratorio de Fisiología Molecular Placentaria, IQUIBICEN, UBA). Final y especialmente gracias a la Dra. Rosanna Ramhorst, la Dra Claudia Pérez Leirós y el Dr. Esteban Grasso (Laboratorio de Farmacología, IQUIBICEN, UBA) quienes han sido pilares fundamentales para que podamos desarrollar esta área de trabajo de este "lado del charco".

Gracias a ACELU por el apoyo en la convocatoria y a las y los donantes de las muestras sanguíneas.

Gracias a los amigos de la vida, a la barra de Ciencias (CDB) y la familia elegida. MUCHAS GRACIAS a mi familia, y en particular porque en estos años me han acompañado además en un desafío mayor, que fue la maternidad, brindándome el espacio y tiempo para el desarrollo profesional. Especialmente, gracias a Diego, Milo y Salva, que supieron entender, me dieron fuerzas cuando necesité y acompañaron la felicidad de cada logro.

#### RESUMEN

La transglutaminasa tisular (TG2) es una proteína de respuesta al estrés implicada en varios procesos fisiológicos y/o patológicos. Se expresa en el trofoblasto y células del sistema inmune presentes en la interfase materno-fetal pero su rol en la fisiología de dichas células, así como en la relación entre su desregulación y un funcionamiento anómalo de la placenta está pobremente estudiado.

Trabajos previos de nuestro grupo señalaron una vinculación entre la funcionalidad alterada (debida a la acción de autoanticuerpos específicos) de la TG2 expresada en el trofoblasto y macrófagos y la presencia de complicaciones del embarazo en mujeres celíacas. Consideramos que independientemente del efecto de los autoanticuerpos sobre la TG2 de superficie, la desregulación de la expresión y/o actividad de la TG2 en el compartimento materno-fetal podría representar un factor patogénico también en otros desórdenes con alta prevalencia. Proponemos que varios procesos que se dan en dicho compartimento pueden ser condicionados por el nivel de expresión de la TG2 y su funcionalidad en alguno de los tipos celulares claves y así podrían contribuir a la patogenia de algunas enfermedades que cursan con complicaciones del embarazo por una implantación o función placentaria anómala (abortos tempranos, detención del desarrollo intrauterino, bebes de bajo peso para la edad gestacional, partos prematuro y preeclampsia).

La hipótesis general de este trabajo plantea que la expresión aberrante y/o desregulación de la función de la TG2 en el trofoblasto y/o células inmunes deciduales puede condicionar los procesos de implantación y desarrollo de la placenta. En particular, nos focalizamos en los macrófagos por ser una célula inmune con un papel relevante en todas las etapas de la gestación en base a su gran plasticidad funcional. Planteamos que condiciones exacerbadas de inflamación o hipoxia podrían conducir a una expresión y/o funcionalidad aberrante de la TG2 en estos tipos celulares dando lugar a: i. cambios en la contribución relativa de la expresión de variantes de TG2 truncadas generadas por splicing alternativo, con alteración de la actividad enzimática canónica (TGasa) y/o sus otras funciones; lo que podría repercutir en procesos como la migración de las células trofoblásticas, la eferocitosis por los macrófagos y la producción de citoquinas por ambos tipos celulares ii. alteraciones en la vía de señalización del NF-κB mediante la interacción

de alguno de sus componentes con la TG2, que podría conducir a la perpetuación de la inflamación y alteraciones de la función del trofoblasto y iii. alteración del condicionamiento del fenotipo de los macrófagos, con efectos adversos sobre su rol en el control de la homeostasis.

En esta tesis nos centramos en la enfermedad celíaca (EC) y síndrome antifosfolipídico (SAF) como patologías con un componente inflamatorio el cual podría impactar sobre la expresión y función de la TG2.

Para probar nuestra hipótesis nuestro trabajo inicial consistió en estudiar la expresión de la TG2 y sus variantes de splicing en células inmunes sanguíneas en condiciones de salud y de enfermedad celíaca, sobre la base de nuestros antecedentes. Adicionalmente, se estudiaron los efectos del microambiente inflamatorio asociado al síndrome antifosfolipídico, sobre la expresión de TG2 en un modelo *in vitro* de macrófagos humanos. Globalmente, en esta parte del trabajo mostramos mayor expresión relativa de algunas de las variantes cortas de TG2 en células inmunes en contexto inflamatorio asociado a patologías vinculadas con trastornos de la gestación.

En una segunda etapa, profundizamos en el estudio de los macrófagos como célula central durante todo el embarazo. Como la TG2 está involucrada en funciones mediadas tanto por macrófagos tipo M1 como M2, nos propusimos modelizar la diferenciación hacia ambos perfiles con la línea premonocítica THP-1 y estudiar la expresión de la TG2 y variantes de splicing desde la etapa de diferenciación a macrófago, así como en el proceso de polarización con estímulos convencionales. En términos generales los resultados muestran que se da una regulación del splicing alternativo diferencial dependiendo de la condición de diferenciación, destacándose la mayor expresión de TG2 en presencia de IL-4 y mayor contribución de splicing alternativo asociado a macrófagos inflamatorios. En particular los ensayos realizados con estímulos inflamatorios estándar en el modelo de THP-1 en varias condiciones confirman que la variante TGM2\_v3 se ve favorecida por citoquinas inflamatorias y por las condiciones inflamatorias asociadas a EC y SAF. La estandarización de las condiciones experimentales y caracterización inicial de los fenotipos funcionales de los macrófagos diferenciados a partir de las células THP-1, (dTHP-1) constituyeron además la base para el estudio del posible efecto sobre dichos macrófagos de los mediadores producidos por las células trofoblásticas en condiciones basales, de inflamación e hipoxia, que se realizó en la última parte del trabajo.

En paralelo estudiamos la expresión de la TG2 y sus variantes de splicing en células trofoblásticas, en condiciones fisiológicas y patológicas y también propiedades funcionales de las células trofoblásticas en las condiciones mencionadas a los efectos de profundizar en su posible implicancia en los procesos de diferenciación y migración/invasión necesarios para la generación de la interfase materno-fetal y durante toda la gestación. En esta parte del trabajo mostramos que la hipoxia química y las condiciones inflamatorias tienen efectos diferenciales sobre las células trofoblásticas del primer trimestre en cuanto a los niveles de expresión de TG2, su localización y el perfil de expresión de sus variantes de splicing. Este último punto también fue observado en el caso de las células Swan-71 expuestas a sueros de pacientes con SAF, los cuales son también capaces de activar la vía inflamatoria de NF-kB llevando a un aumento en la secreción de IL-6. Además, mostramos que la TG2 está implicada en la regulación de la migración del trofoblasto. Planteamos que la expresión relativamente más alta de TGM2\_v2 y TGM2\_v3 en condiciones de hipoxia química podría ser responsable de la disminución de la migración observada en esta condición debido a la falta en estas variantes de los residuos involucrados en la regulación de la actividad TGasa y la migración celular a través de las uniones adhesivas.

Por último y en base a los resultados expuestos previamente nos planteamos, caracterizar la expresión de la TG2 y el fenotipo funcional de la línea celular THP-1 diferenciada a macrófago bajo la influencia de los factores solubles secretados por células trofoblásticas. Para ello utilizamos sobrenadantes condicionados obtenidos de células Swan-71 cultivadas en condiciones basales, de inflamación o hipoxia. Con este trabajo logramos una primera aproximación a un modelo de interacción del trofoblasto con macrófagos empleando dos líneas celulares: Swan-71 y dTHP-1 y fue posible reproducir el efecto de la polarización hacia un perfil M2 de macrófagos derivados de THP-1 por los medios condicionados de las células Swan-71. Por otra parte, observamos como esta polarización se ve alterada cuando las células trofoblásticas son previamente expuestas a condiciones de estrés. Adicionalmente, caracterizamos los perfiles de expresión de las variantes de splicing de TG2 en los macrófagos derivados de THP-1 tratados con los medios condicionados de Swan-71. Interesantemente, en concordancia a nuestras observaciones anteriores, vimos desfavorecida la expresión de la variante corta TGM2\_v3 en el tratamiento con medio condicionado proveniente del cultivo de Swan-71 en condiciones basales. Consideramos que los resultados obtenidos en esta etapa son promisorios y ameritan seguir explorando el modelo de trabajo con ambas líneas celulares para encontrar las mejores condiciones para los ensayos de condicionamiento de macrófagos.

En términos generales este trabajo respalda la hipótesis del rol de la TG2 en la regulación de componentes celulares claves de la interfase materno-fetal. Los resultados muestran que cuando se inducen cambios en su expresión y/o actividad TGasa, se ve alterada la funcionalidad de estas células y que el splicing alternativo es un mecanismo relevante en su regulación.

## ÍNDICE

Abreviaturas	. xiii

### Capítulo 01

Introducción	1
La transglutaminasa tisular	2
Distribución y actividad biológica de la TG2	2
Estructura molecular y regulación de la actividad TGasa	4
Regulación de la expresión de la TG2	7
Participación de la TG2 en procesos celulares fisiológicos	11
Participación de la TG2 en patologías	16
La interfase materno-fetal	18
Formación de la interfase materno-fetal	19
Papel de las células del sistema inmune en la interfase materno-fetal	21
Expresión y función de la TG2 en la interfase materno-fetal	25
Papel de TG2 de la interfase materno-fetal en patologías de la gestación	25
Hipótesis y objetivos	27
Hipótesis de Trabajo	27
Objetivo general	29
Objetivos específicos	29
Capítulo 02	
Materiales y métodos	31
Reactivos generales	32
Purificación de subpoblaciones leucocitarias de sangre periférica humana	32
Líneas celulares	32
Mantenimiento de la línea celular trofoblástica Swan-71	32
Mantenimiento de la línea celular pre-monocítica THP-1	33
Congelado de células	33
<i>0</i>	

Descongelado de Células	34
Generación de la línea reportera estable Swan-71NF-κB-hrGFP	34
Diferenciación de macrófagos a partir de células THP-1	35
Tratamientos de los cultivos celulares	35
Inducción de hipoxia química y condiciones inflamatorias en células Swan-71	35
Produción de medios condicionados de células Swan-71	36
Polarización de THP-1 diferenciadas a macrófagos	36
Tratamiento de las células THP-1 con sobrenadantes de cultivo condicionados Swan-71	por 36
Análisis de apoptosis	36
Preparación de extractos proteicos	37
Electroforesis en gel de poliacrilaminda	38
Western blot	38
Extracción de ARN	39
Síntesis de ADN copia (ADNc)	39
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real semicuantitativa (qRT-PCR)	. 40
Detección de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo	. 40
Inmunofluorescencia	41
Ensayos de cicatrización de herida	. 42
Ensayo de activación de NF-κB	. 42
Ensayo de actividad de transamidación (TGasa)	43
Ensayo de eferocitosis	43
Expresión de los resultados y estadística	43
Capítulo 03	

I.1 La expresión de la TG2 y variantes de <i>splicing</i> en la enfermedad celíaca
Resultados y discusión
Grupo de estudio y patrones serológicos asociados a la enfermedad celíaca en el grupo de estudio
Expresión de las variantes de <i>splicing</i> de la TG2 en leucocitos de personas sanas y con enfermedad celíaca51
Análisis de la expresión de las variantes de <i>splicing</i> de TG2 en función de la condición inflamatoria de pacientes con enfermedad celíaca
I.2 La expresión de TG2 y variantes de <i>splicing</i> de macrófagos expuestos a estímulos asociados al síndrome antifosfolipídico
Resultados y Discusión
Articulo I
Parte II: La TG2 en monocitos y macrófagos durante su diferenciación y en sus diferentes perfiles de activación
Estudio de los macrófagos en modelos <i>in vitro</i> 61
Posible rol de las variantes de <i>splicing</i> de TG2 en el proceso de diferenciación y en los diferentes perfiles de activación de los macrófagos
Resultados y discusión64
Análisis de la expresión de las variantes de <i>splicing</i> durante la diferenciación de macrófagos64
La expresión de TG2 y variantes de <i>splicing</i> en macrófagos tipo Ml y M266
Articulo II
Capítulo 04
Expresión de la TG2 y sus variantes de <i>splicing</i> en células trofoblásticas, en condiciones fisiológicas y patológicas
Respuesta celular fisiológica a las condiciones de hipoxia e inflamación
HIF-1 en respuesta adaptativa a la hipoxia76
La vía NF-κB y su interrelación con HIF-177
Papel de la hipoxia y la inflamación en el desarrollo normal de la placenta

Modelos experimentales de inducción de hipoxia en cultivos celulares81
Expresión de la TG2 en la interfase materno-fetal y su relación con la hipoxia e inflamación
Resultados y discusión83
Efectos del tratamiento con CoCl2 ("hipoxia química") o con citoquinas inflamatorias sobre la sobrevida de las Swan-71 la expresión de HIF-1α y la activación de Caspasa 3
Efectos de la hipoxia química y las citoquinas inflamatorias sobre la expresión de genes vinculados a la migración celular y la producción de mediadores inflamatorios
Efectos de la hipoxia química y condiciones inflamatorias sobre la actividad TGasa y la migración celular
Efectos de la hipoxia e inflamación sobre la expresión de la TG2 y su localización celular
Efectos de la hipoxia e inflamación sobre la activación de NF-κB88
Efectos de la hipoxia química y TNF- $\alpha$ sobre la actividad TGasa
Expresión de los ARNm de las diferentes variantes de <i>splicing</i> de TG2 en condiciones inflamatorias y de hipoxia química
Articulo III
Capítulo 05
Efectos del microambiente de la interfase materno-fetal sobre la funcionalidad y la expresión de la TG2 en los macrófagos
Los monocitos y macrófagos en la interfase materno-fetal
Resultados101
Caracterización de sobrenadantes de cultivo condicionados por Swan-71101
Efecto de los sobrenadantes condicionados por Swan-71 sobre la polarización de las células dTHP-1102
Efecto de los sobrenadantes condicionados por Swan-71 sobre la capacidad eferocítica de dTHP-1104

Liceto de los sobrenadantes condicionados por Swan-71 sobre la expresión de 102	2у
actividad TGasa en dTHPl	.06
Discusiónl	.09
Capítulo 06	
Discusión global y Conclusiones	113
Conclusiones	119
Perspectivasl	20

### **ABREVIATURAS**

(en algunos casos se mantiene la sigla del inglés por su uso extendido)

СТВ citotrofoblasto EC Enfermedad celiaca EVT Trofoblasto extravelloso FIH Factor inhibidor de la proteína HIF-la FITC isotiocianato de fluoresceína FN fibronectina GFP proteína verde fluorescente hGC gonadotrofina coriónica humana HIF-1 factor inducible por hipoxia 1 proteínas de alta movilidad del grupo 1 HMGB1 HRE Elemento de respuesta a hipoxia IP ioduro de propidio NF-ĸB factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas PE preeclampsia PHD proteína con dominio prolina hidroxilasa PMA forbol-12-miristato-13-acetato proteína von Hippel-Lindau pVHL SAF síndrome antifosfolipídico SEM Error estándar d medición STB Sincitiotrofoblato TG2 Transglutaminasa tisular

- TGasa Actividad transglutamimnasa
- dTHP-1 Células THP-1 diferennciadas a macrófagos
- DLG Dieta libre de gluten
- PMN polimorfonucleares



# **Introducción**

#### La transglutaminasa tisular

Las transglutaminasas (TGs) son una familia de enzimas relacionadas estructural y funcionalmente que catalizan modificaciones postraduccionales de proteínas y péptidos mediante la formación de enlaces isopeptídicos inter e intramoleculares entre los grupos  $\gamma$ -carboxamida de residuos de glutamina y los grupos  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina, lo que se conoce como actividad de entrecruzamiento o transamidación (TGasa). Esta acción representa la actividad enzimática más característica de estas enzimas.

El descubrimiento de la transglutaminasa tisular (tTG o TG2, EC 2.3.2.13) se le acredita a Heinrich Waelsch, quien en 1957 demostró que la incubación de extractos de hígado de cobayo con aminas marcadas radioactivamente resultaba en la incorporación de las aminas a las proteínas del extracto en forma Ca<sup>2+</sup> dependiente, la proteína fue luego identificada como TG2<sup>1-3</sup>.

De todas las TGs de mamíferos, la TG2 ha sido la más estudiada, principalmente debido a su distribución ubicua y sus funciones en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. La TG2 está involucrada en más procesos fisiológicos que cualquier otro miembro de la familia de transglutaminasas, Se la considera una proteína multifuncional, ya que además de la actividad TGasa exhibe las siguientes actividades enzimáticas, todas finamente reguladas <sup>4</sup>: i) une e hidroliza GTP y actúa como una proteína G <sup>5</sup>; ii) posee actividad disulfuro isomerasa <sup>6</sup> y iii) funciona como una proteína quinasa <sup>7</sup>.

Adicionalmente, la TG2 posee actividades no enzimáticas independientes de Ca<sup>2+</sup>. Gran parte de esas actividades suelen darse especialmente en el ambiente extracelular, al interactuar con una amplia gama de proteínas de superficie, participando en importantes procesos fisiológicos incluyendo la adhesión, migración, crecimiento y diferenciación celular, y la estabilización de la matriz extracelular (MEC)<sup>4</sup>.

#### Distribución y actividad biológica de la TG2

La TG2 es relativamente más abundante que los otros miembros de la familia de las transglutaminasas y la única que se expresa de manera ubicua en el organismo. Aunque inicialmente fue identificada como una proteína citosólica, fue posteriormente descrita como una enzima también localizada en otros compartimentos celulares, como el núcleo y la mitocondria, así como en la membrana plasmática y la matriz extracelular <sup>8</sup> (**Figura** 1-1). La translocación de la TG2 hacia distintos compartimentos celulares se encuentra asociada a funciones enzimáticas especializadas <sup>9</sup>.

En la mayoría de las células, la TG2 citosólica comprende la mayor parte de la reserva celular. Desde su descubrimiento, se ha identificado un gran número de sus sustratos enzimáticos, siendo la mayoría de ellos proteínas citosólicas. En el ambiente intracelular, los principales procesos en los cuales participa la TG2 están representados por la actividad TGasa y la actividad en la señalización, que predominan uno sobre el otro cuando la enzima se encuentra presente libre en el citosol o asociada a la superficie interna de la membrana plasmática respectivamente <sup>10</sup>.

La presencia de TG2 nuclear fue demostrada en varios tipos celulares, representando el 5 - 7% de la TG2 celular <sup>11,12</sup>.

Mientras que los roles de la TG2 en el citosol son principalmente relacionados a la actividad TGasa, las funciones adicionales relacionadas a la transducción de señales (actuando como proteína G) y de proteína adaptadora para el correcto ensamblaje de la matriz extracelular, son llevadas a cabo mayormente por TG2 ubicada al nivel de la membrana <sup>9</sup>.

La TG2 es externalizada constitutivamente en varios tipos celulares, incluidos fibroblastos, osteoblastos, monocitos/macrófagos, células endoteliales y de músculo liso <sup>8</sup>. El mecanismo de externalización de la TG2 para alcanzar la matriz extracelular es una vía no convencional que aún no se conoce en detalle. Sin embargo, se han propuesto diferentes teorías, incluida la carga de TG2 en endosomas de reciclaje, secreción de TG2 a través del desprendimiento de vesículas, y secreción a través de exosomas en respuesta a estímulos externos <sup>9,13</sup>. De esta manera la TG2 se encuentra asociada a la superficie celular interactuando con la membrana plasmática, y en la matriz extracelular. Se han identificado diversos sustratos enzimáticos de la TG2 en la matriz extracelular, incluyendo fibrina, fibrinógeno, fibronectina (FN), colágeno y osteopontina <sup>B</sup>. Además de las reacciones de entrecruzamiento de distintos sustratos y de otras reacciones enzimáticas llevadas a cabo por la TG2 en la matriz extracelular, en esta localización es capaz de interactuar no covalentemente con diversos receptores de membrana y proteínas de la matriz, exhibiendo una importante función de adaptador o proteína andamio ("scaffold"). La enzima ubicada en el ambiente extracelular tiene un importante rol en la adhesión y migración celular y en la organización de la matriz extracelular, contribuyendo a procesos como la reparación de heridas, la regeneración de tejidos y la inflamación<sup>8</sup>.



Figura 1-1 - Distribución de la TG2 en la célula. Tomada con modificaciones de "Tissue transglutaminase (TG2) - a wound response enzyme"<sup>14</sup>

#### Estructura molecular y regulación de la actividad TGasa

Estructuralmente, la TG2 es similar al resto de los miembros de la familia <sup>4,15</sup>. Es una proteína de 80 kDa compuesta por 687 aminoácidos (aa), que consta de cuatro dominios globulares: *i.* un dominio N-terminal en forma de sandwich- $\beta$  (aa 1-139) el cual contiene los sitios de unión a fibronectina e integrinas; *ii.* un dominio central (aa 140-460) clave para la actividad TGasa, ya que contiene la tríada catalítica junto con dos residuos de triptófano que actúan estabilizando el producto intermediario de la reacción; *iii.* dos dominios C-terminales en forma de barriles- $\beta$  (aa 469-584 y aa 585-687) <sup>13,16</sup> (**Figura 1-2**). La localización de los sitios de unión al Ca<sup>2+</sup> en la enzima aún es controversial, aunque el consenso actual es que la TG2 posee 6 sitios de unión a Ca<sup>2+</sup>, todos los cuales están ubicados en el dominio central <sup>17</sup> y algunos de ellos son distorsionados cuando la enzima une GTP/GDP <sup>18</sup>. En cambio, el sitio de unión a GTP está bien caracterizado ubicándose en la grieta entre el centro catalítico y el primer barril- $\beta$  <sup>15</sup>. Dicha secuencia es codificada por el exón 10 del gen de la TG2, que se caracteriza por poseer poca homología con el mismo exón en otras transglutaminasas <sup>4</sup>.



Figura 1-2. Representación esquemática de los cuatro dominios estructurales y las regiones funcionales de la TG2. Tomado con modificaciones de "The Outside-In Journey of Tissue Transglutaminase in Cancer"<sup>19</sup>

De todas las reacciones enzimáticas que la TG2 puede catalizar, el entrecruzamiento de proteínas es la más estudiada. La propia TG2 puede entrecruzarse mediante sus residuos de lisina a varios sustratos conteniendo residuos de glutamina, incluyendo a proteínas de la matriz extracelular como fibrina y fibrinógeno. Otro tipo de entrecruzamiento puede darse cuando la proteína sustrato presenta simultáneamente residuos activos de lisina y glutamina. En estos casos, la TG2 permite la generación de enlaces isopeptídicos intramoleculares, que pueden afectar la conformación y estabilidad de la molécula, así como su interacción con otras proteínas. Sin embargo, el tipo de entrecruzamiento más común catalizado por la TG2 involucra la formación de enlaces isopeptídicos intermoleculares entre varias proteínas sustrato. En estos casos, la TG2 permite generar heterocomplejos proteicos altamente estables <sup>8</sup>.

Para evitar que se den reacciones de entrecruzamiento o deamidación aleatorias sobre la amplia variedad de proteínas que contienen glutamina o lisina en su superficie, la actividad enzimática de la TG2 debe ser altamente regulada. Dicha regulación se lleva a cabo a través de distintos cofactores, los cuales son capaces de alterar la organización espacial de los cuatro dominios de la TG2. Los principales reguladores de la actividad enzimática de la TG2 son Ca<sup>2+</sup> y GTP. La actividad TGasa es controlada positivamente por Ca<sup>2+</sup> y negativamente por GTP <sup>15</sup>. Cuando la enzima une GTP/GDP, se favorecen interacciones entre el centro catalítico y los dominios C-terminales, lo que genera una estructura más cerrada y compacta. Esto reduce la accesibilidad y la actividad del sitio activo para la reacción de transamidación <sup>18</sup>. Por otro lado, la TG2 presenta una activación alostérica mediada por Ca<sup>2+</sup>. La unión de Ca<sup>2+</sup> altera la conformación de la proteína al separar aún más los dominios C-terminales, permitiéndole adquirir una conformación abierta o extendida, en donde el sitio activo queda expuesto. Esta

conformación abierta es la que se asocia con la reacción de entrecruzamiento de la enzima<sup>20</sup> (Figura 1-3).

En condiciones fisiológicas, la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre en el citosol de la célula (~10<sup>-7</sup> M) suele no ser suficiente para mantener a la TG2 en su estado activo para la reacción de entrecruzamiento. Adicionalmente, los niveles de GTP libre en el citosol (~100-150 μM) exceden a la concentración necesaria para mantener a la enzima inhibida y, por lo tanto, mantenerla en la conformación cerrada unida a GTP. Sin embargo, se han identificado múltiples sustratos de la TG2 para la reacción de transamidación en el interior celular. Esto sugiere que aumentos locales en los niveles citosólicos de calcio generados por su liberación desde compartimentos intracelulares o por ingreso desde el exterior celular durante situaciones de estrés (como daño celular o apoptosis), podrían facilitar la activación de TG2 promoviendo la transición a la estructura conformacional abierta, la cual expone el sitio activo para los sustratos <sup>8,21</sup>



**Figura 1-3.- Principales actividades de la TG2 y su regulación por Ca2+/nucleótidos.** Tomado con modificaciones de "Transglutaminase 2 has opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death"<sup>22</sup>.

El calcio y GTP/GDP no son los únicos reguladores de la actividad de la TG2. La enzima es también capaz de responder a las condiciones oxidativas en el ambiente extracelular. Bajo condiciones oxidativas, se afecta la accesibilidad de la cisteína perteneciente al sitio activo, lo que resulta en la inactivación de la actividad de transamidación. Por el contrario, la reducción de la TG2 resulta en una conformación abierta y activa para la

reacción de entrecruzamiento. Por lo tanto, las características del ambiente oxidativo extracelular explican por qué la TG2 localizada fuera de la célula suele encontrarse en un estado inactivo para la actividad de transamidación, a pesar de los bajos niveles de GTP y la alta concentración de Ca<sup>2+ 8,13</sup>. Esto sugiere que la TG2 puede adoptar tres conformaciones distintas. Una forma inactiva unida a GTP, una forma inactiva unida a Ca<sup>2+</sup> en el estado oxidado, y una forma reducida activada por unión a Ca<sup>2+</sup>.

#### Regulación de la expresión de la TG2

El gen que codifica para la transglutaminasa tisular en humanos (*TGM2*) se localiza en el cromosoma 20q11-12 y consiste en 40 kb, a los cuales se transcriben en un ARN primario de 5 kb que contiene 13 exones y 12 intrones <sup>9</sup>. La expresión de TG2 varía mucho entre diferentes tipos celulares, desde una expresión constitutiva alta a niveles casi indetectables de la enzima.

Su expresión se regula principalmente a nivel transcripcional. *TGM2* se encuentra bajo el control de un promotor, el cual es sensible a múltiples factores transcripcionales y una amplia variedad de moléculas. Es así como la TG2 puede ser inducida en respuesta a diversos factores de estrés celular que incluyen lesiones, inflamación, agentes oxidantes, hipoxia, citoquinas y factores de crecimiento (**Figura 1-4**).

*TGM2* contiene un sitio de unión a NF-κB, el cual estimula su activación, por lo tanto, cuando ocurre un proceso inflamatorio y la vía del factor NF-κB es activada, se favorece la transcripción del gen. Diversas citoquinas que son liberadas durante el transcurso de una inflamación son capaces de activar su transcripción como es el caso TNF- $\alpha$ <sup>23</sup>. Otras citoquinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6, también son capaces de estimular la expresión de TG2 <sup>24,25</sup>. *TGM2* también contiene un elemento de respuesta para HIF-1, por lo tanto, situaciones de hipoxia celular podrían estimular la expresión de TG2 también es favorecida por TGF- $\beta$ , vitamina D y por varios estímulos como luz UV, estrés oxidativo e infección viral <sup>21</sup>.

La regulación por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es muy compleja, ya que es capaz de alterar la transcripción de *TGM2* en forma dependiente del tejido. TGF- $\beta$  actúa como activador y aumentando los niveles de TG2 en fibroblastos y muchos otros tipos celulares o como inhibidor de su expresión a nivel epitelial <sup>27</sup>.



**Figura 1-4.- Principales elementos reguladores de la expresión de la TG2 en humanos.** Tomado con modificaciones de "Transglutaminase 2: A molecular Swiss army knife" <sup>28</sup>

#### Regulación de la expresión de la TG2 mediante splicing alternativo

Se ha demostrado que el gen que codifica para la TG2 es regulado también mediante *splicing* alternativo, generando formas más cortas del ARNm que codifican para distintas variantes de la proteína (**Figura 1-0-5**). Si bien se conocen los procesos de *splicing* alternativo que generan cada una de las variantes , no hay información respecto a los mecanismos que los regulan <sup>8,9</sup>.

De acuerdo con la sugerencia del HGNC (HUGO *Gene Nomenclature Committe*), las variantes de TG2 se denominan utilizando nombres idénticos (TGM2\_v) seguidos de un número que indica el orden cronológico de su identificación <sup>29</sup>. En humanos, se han reportado cuatro variantes de *splicing* de la TG2, las cuales son co-expresadas con la versión canónica de la enzima, denominada TGM2\_vl, de 687 aminoácidos. Por lo tanto, además de TGM2\_vl, se producen variantes de 675, 646, 548 y 349 aminoácidos, denominadas TGM2\_v4a, TGM2\_v4b, TGM2\_v2 y TGM2\_v3, respectivamente <sup>8</sup> (Tabla 1-1).



**Figura 1-0-5.- Variantes de splicing de la TG2.** Se representan los dominios proteicos de la TG2. Se indica la longitud en aminoácidos. Los cuadros blancos con patrón rayado representan las secuencias de aminoácidos alternativas <sup>9,30</sup>.

La principal diferencia entre la versión canónica (TGM2\_vl) y las distintas variantes, es su extremo C-terminal. Todas las variantes de *splicing* de la TG2 pierden su extremo C-terminal hasta cierto punto, lo que trae consecuencias en sus estructuras, mecanismos de regulación y funciones. Se cree que todas las variantes de TG2 mantienen la actividad de entrecruzamiento, aunque en diferente medida <sup>30</sup>. Al igual que la versión canónica de TG2, dichas variantes participan en reacciones dependientes de Ca<sup>2+</sup> como el entrecruzamiento de proteínas, la incorporación de aminas a proteínas y la deamidación, tanto dentro como fuera de la célula, participando en la estabilización de la matriz y en las interacciones celulares mediante integrinas y fibronectinas.

En 1992, la variante de *splicing* de TG2, TGM\_v2, se detectó en células de eritroleucemia<sup>31</sup>. Dicha variante consta de 548 aminoácidos, de los cuales 538 son idénticos a la versión canónica de la TG2, y pierde I38 aminoácidos del extremo C-terminal. TGM2\_v2 presenta una actividad de transamidación muy reducida <sup>32,33</sup> y su tasa de actividad de hidrólisis de GTP es mayor en comparación a la versión canónica, sin embargo, presenta una afinidad débil por GTP ya que la unión es casi indetectable <sup>33</sup>. La importancia biológica del alto nivel de hidrólisis de GTP que muestra TGM\_v2 permanece desconocido <sup>9,34</sup>. Posteriormente en 1996, también en células de eritroleucemia, se describió TGM2\_v3 <sup>35</sup>, siendo esta, la variante de *splicing* más corta. TGM2\_v3 consiste en solo 349 aminoácidos, de los cuales 286 son compartidos con el extremo N-terminal de la versión canónica. TGM2\_v3 no ha sido completamente caracterizada, y sus funciones permanecen desconocidas, aunque se especula que, en forma homóloga a TGM2\_v2, presentaría una actividad de transamidación y capacidad de unión a GTP disminuidas.

Finalmente, las variantes TGM2\_v4a y TGM2\_v4b fueron identificadas en células de músculo liso vascular, células endoteliales y leucocitos. Se describió que éstas eran idénticas a la versión canónica de la TG2 en sus 622 aminoácidos iniciales, pero presentaban diferentes extremos C-terminales de 52 y 23 aminoácidos, respectivamente<sup>36</sup>. Las variantes TGM2\_v4a y TGM2\_v4b son generadas mediante un evento de *splicing* alternativo no tradicional <sup>29</sup>. La pérdida de la secuencia C-terminal en cada variante TGM\_v4a y TGM\_v4b, resulta en una reducción de la actividad de transamidación dependiente de Ca<sup>2+</sup> de las enzimas, así como de su estabilidad *in situ*. Por otro lado, dichas variantes tienen disminuida su capacidad de unión a GTP y presentan un aumento en la actividad de hidrólisis de este, por lo que mantienen

actividad de transamidación en presencia de GTP. Adicionalmente, conservan la capacidad de unir fibronectina <sup>36</sup>.

Globalmente, dado que las variantes presentan extremos C-terminales incompletos y pierden el sitio de unión a GTP parcial o totalmente, no se espera que el GTP actúe como inhibidor de la actividad TGasa como en la TG2 canónica. Las variantes truncadas podrían escapar a la regulación fisiológica por GTP, aunque los niveles intracelulares del mismo sean altos. Esto trae como consecuencia que las variantes sean más sensibles a la activación por Ca<sup>2+</sup>, ya que aumentos transitorios de los niveles de este ión en el citosol podrían ser suficientes para activarlas.

Otras funciones que pueden alterarse en las variantes se deben a que el extremo Cterminal de la TG2 presenta un sitio de unión para proteínas como la fosfolipasa C $\delta$ l (PLC $\delta$ l), favoreciendo la señalización por el receptor adrenérgico  $\alpha$ l (**Figura 1-2**). Adicionalmente, se cree que una secuencia señal de exportación al núcleo se encuentra en dicho extremo. Por lo tanto, la pérdida de aminoácidos en el extremo C-terminal podría afectar las interacciones de las variantes de TG2 con dichas proteínas, así como modificar su patrón de localización celular <sup>34</sup>.

Variante	Otras	Tamaño	Tamaño de la
de TG2	nomenclaturas	del ARNm	proteína (KDa)
		(pb)	
TGM2_v1	Forma canónica	245	80
TGM2 v2	TGH Trase S TG2-S	153	62
10012_72	1011, 1gase 5, 102-5		02
TGM2_v3	TGH2	226	38
TGM2 v4a	tTGvl	214	75
TGM2_v4b	tTGv2	214	70

Tabla 1-1 – Variantes de splicing de TG2 identificadas en humanos.

Los estudios de la expresión de TG2 y de sus variantes de *splicing* en diversos tejidos normales demostraron que en general predomina la forma canónica seguida por TGM2\_v2, TGM2\_v4a, TGM2\_v4b y finalmente TGM2\_v3<sup>29</sup>. Debido a las alteraciones en los mecanismos de regulación y en sus actividades catalíticas, la expresión de diferentes variantes de TG2 podría ser útil para dictaminar las múltiples funciones biológicas de la enzima y sus alteraciones en situaciones patológicas.

#### Participación de la TG2 en procesos celulares fisiológicos

Como se mencionó anteriormente, debido a su expresión ubicua y la amplia gama de actividades enzimáticas y no enzimáticas que puede llevar a cabo, la TG2 participa en la regulación de diversas funciones celulares que incluyen: la adhesión y migración celular, el ciclo celular y apoptosis, la estabilización de la matriz extracelular, la fagocitosis, el crecimiento y diferenciación celular y la transducción de señales. Se describe a continuación el papel de la TG2 en estos procesos celulares.

#### Señalización celular

La transglutaminasa tisular es capaz de participar en diversas vías de señalización celular debido a que su capacidad de unir e hidrolizar GTP le permite funcionar como una proteína G, asociada a distintos tipos de receptores de membrana. El receptor asociado a proteína G (GPCR) más estudiado que interacciona con la TG2, es el receptor adrenérgico αl<sup>37</sup>. En ausencia de estímulo externo que active al GPCR (epinefrina para el caso del receptor adrenérgico al) la TG2 une GDP y forma un complejo con la proteína de unión a Ca<sup>2+</sup>, calreticulina; la cual regula las funciones de la TG2 suprimiendo tanto la actividad de GTPasa como la de transamidación, por lo tanto, mantiene a la TG2 en un estado inactivo para la señalización <sup>38</sup>. La interacción de la TG2 con el receptor adrenérgico αl en respuesta a la estimulación por epinefrina genera la disociación de TG2-GTP de la calreticulina, mediante el intercambio de GDP por GTP. La TG2 es luego capaz de interaccionar directamente con la fosfolipasa Côl (PLCôl) y activarla, estimulando la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y provocando un aumento de la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>. La desactivación ocurre cuando la TG2 hidroliza el GTP unido a GDP debido a su actividad intrínseca de GTPasa, y se asocia nuevamente con calreticulina <sup>38</sup>. Como se mencionó, la TG2 en su función de proteína G no actúa únicamente interaccionando con el receptor adrenérgico  $\alpha$ l. Se han descubierto diversos receptores de membrana que utilizan a la TG2 como proteína G, como el receptor de tromboxano A2<sup>39</sup> y el receptor de oxitocina <sup>40</sup>.

Se demostró que la actividad GTPasa y la capacidad asociada de señalización celular de la TG2 son independientes de su actividad de transamidación <sup>41</sup>. En el citosol y en condiciones fisiológicas, se considera altamente probable que la actividad GTPasa y de proteína G asociada a un GPCR de la TG2 se encuentren activas, debido a la alta concentración de GTP.

#### Adhesión y migración celular

Las beta integrinas son receptores de membrana que interaccionan con componentes de la matriz extracelular y participan en el anclaje de las células a la matriz y en la transducción de señales. La TG2 de la superficie celular puede interactuar directamente mediante enlaces no covalentes con los dominios extracelulares de al menos tres distintas subunidades  $\beta$  de la familia de integrinas ( $\beta$ 1,  $\beta$ 3 y  $\beta$ 5) colaborando en los procesos de adhesión celular. La formación de los complejos TG2-integrina se da independientemente de su actividad de transamidación, y no se ha encontrado evidencia de que estas moléculas pueden actuar como sustrato enzimático para TG2 u otras transglutaminasas <sup>42</sup>.

La fibronectina es una glicoproteína que está presente en la matriz extracelular y es uno de los sustratos de la TG2 más estudiado, además esta proteína se une con gran afinidad al sitio de unión ubicado en el dominio N-terminal de la TG2, con una estequiometria de 2:1 e independientemente del Ca<sup>2+</sup> y GTP <sup>43</sup>.

La TG2 es capaz de formar complejos estables con las integrinas y fibronectina. Como la afinidad de la unión integrina-fibronectina es relativamente baja, se ha sugerido que la interacción no covalente estable entre la TG2 de superficie con la integrina y la fibronectina aumenta la efectividad de la interacción de las células con MEC, actuando como una molécula "puente" o "adaptadora (**Figura 1-6**)<sup>42</sup>. Adicionalmente, al interactuar directamente con fibronectina, la TG2 también es capaz de formar complejos de adhesión mediante Sindecan-4 de la superficie celular <sup>14</sup>.

Globalmente, la capacidad de la TG2 de promover la adhesión de las células a la matriz extracelular y la migración celular, dependen de estas interacciones.



Figura 1-6 Representación esquemática del rol de la TG2 en la adhesion celular mediante su interacción con FN e integrinas. Tomado con modificaciones de "issue Transglutaminase Is an Integrinbinding Adhesion Coreceptor for Fibronectin y The Outside-In Journey of Tissue Transglutaminase in Cancer" <sup>19,42</sup>.

Aún en ausencia de fibronectina, la TG2 de la superficie celular interacciona con las integrinas favoreciendo su agrupamiento. Este proceso media la activación de diversas vías de comunicación intracelular que modulan la actividad de *quinasas de adhesión focal* (FAK), de la GTPasa RhoA y su molécula blanco en la cascada de señalización, la *proteína quinasa dependiente de RhoA* (ROCK), entre otras (**Figura 1-6**). Estas actividades contribuyen con el aumento de adhesiones focales y con la contractilidad del citoesqueleto de actina-miosina, eventos necesarios para la supervivencia y migración celular<sup>44</sup>. Por lo tanto, la TG2 de la superficie celular es muy importante para los procesos de señalización celular mediados por integrinas.

TG2 también cumple otras funciones en la matriz extracelular que sí son dependientes de su actividad de transamidación. El entrecruzamiento mediado por TG2 de proteínas de la matriz aumenta la rigidez de los sustratos necesarios para que se den los procesos de adhesión celular, y generar la formación de polímeros altamente estables y ordenados que promueven el agrupamiento de las integrinas de la superficie celular, amplificando la señalización dependiente de integrinas hacia el interior de la celula <sup>45</sup>. Adicionalmente, las modificaciones catalizadas por TG2 sobre proteínas de la matriz pueden provocar cambios en sus estructuras y llevar a la exposición de los sitios de unión a las células <sup>46</sup>. En conjunto, estos efectos de las reacciones de transamidación sobre las proteínas de la matriz incrementan la unión de las células a la matriz y promueven los procesos de señalización hacia el interior celular <sup>8</sup>.

#### Apoptosis

La apoptosis es un proceso de gran importancia biológica que desempeña un papel fundamental en la homeostasis de los tejidos, así como en la enfermedad. Con respecto a la muerte celular, el rol de la TG2 es complejo, ya que puede actuar como un facilitador o un atenuador del proceso de apoptosis dependiendo del tipo celular <sup>47</sup>. Se ha demostrado que células que entran en el proceso de apoptosis muestran un nivel aumentado de expresión de TG2. Por el contrario, su inhibición resulta en una disminución de la propensión de las células a morir por apoptosis<sup>48</sup>. Actualmente, se considera que la TG2 sensibiliza a las células para la apoptosis cuando se activa la transamidación; en cambio, tiene una acción protectora por inactivación de su actividad TGasa <sup>49</sup>. La activación de la TG2 intracelular, la cual es mayormente inactiva excepto en condiciones de estrés, puede depender del nivel de entrada de calcio. Cuando varios estímulos aumentan la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el citosol por encima de cierto umbral, la actividad TGasa ya no es inhibida por GTP y se facilitan los procesos de muerte celular. Agentes estresantes como la radiación ultravioleta pueden generar especies reactivas del oxígeno (ROS) y desencadenar la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplásmico o su ingreso desde el exterior. Como consecuencia de la activación de la TG2 hay entrecruzamiento de proteínas intracelulares, que provocan el inicio del proceso de apoptosis <sup>50</sup>.

Por otra parte, se ha sugerido que los enlaces isopeptídicos formados por la actividad de transamidación de la TG2 son funcionalmente importantes en el proceso de apoptosis, al limitar la liberación al entorno extracelular de moléculas potencialmente proinflamatorias que son modificadas por el entrecruzamiento <sup>51</sup>. Además, la TG2 es capaz de promover la producción de moléculas quimioatrayentes y la exposición de fosfatidilserina para estimular la migración de macrófagos al sitio de apoptosis y facilitar el reconocimiento de las células apoptóticas, respectivamente <sup>47</sup>.

La TG2 ubicada en el núcleo protege a las células de la muerte al interaccionar con diversas proteínas que regulan la transcripción de importantes genes antiapoptóticos, en un proceso que es independiente de su actividad TGasa <sup>52</sup>. Además, la TG2 ubicada en el espacio extracelular asociada con complejos de integrinas en la superficie de la célula, podría participar en diversas vías de señalización antiapoptóticas hacia el interior celular, estimulando la supervivencia de la célula. Por lo tanto, se cree que los efectos pro- y antiapoptóticos de la TG2 dependen de las vías de señalización que son activadas y la localización de la proteína, con la TG2 nuclear y extracelular actuando como atenuadora de la apoptosis o anti apoptótica, y la TG2 citosólica como facilitadora o proapoptótica <sup>48</sup>.

#### Eferocitosis

A través de la interacción con las integrinas, la TG2 interviene también en el proceso de eferocitosis de células apoptóticas por los macrófagos, al mediar una señalización eficiente vía integrina β3 para la formación de la copa fagocítica.

La TG2 de superficie de los macrófagos proporciona una señalización eficiente de la integrina β3 alrededor de las células apoptóticas ya sea promoviendo el clustering de la misma o potenciando la afinidad del receptor por su ligando MFG-E8/fosfatidilserina <sup>53</sup>. La estabilización del complejo integrina β3-MFGE8 mediada por la enzima mejora la captación de las células apoptóticas.

Como se mencionó previamente la TG2 también activa blancos moleculares de la cascada de señalización iniciada por la activación de la integrina  $\beta$ 3 que incluyen a RhoG y Racl los cuáles son necesarios para que se dé una eferocitosis eficiente.

Las principales evidencias de esto surgen de trabajos desarrollados en el modelo de animales *knockout* para la TG2 <sup>54,55</sup>. Los ratones TG2<sup>-/-</sup> desarrollan autoinmunidad con glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos <sup>56,57</sup>. Los macrófagos TG2<sup>-/-</sup> presentan problemas en la eferocitosis debido a la acumulación alterada de integrina  $\beta$ 3 en los portales fagocíticos <sup>53</sup>. De hecho, la sobreexpresión de la integrina  $\beta$ 3 en los macrófagos TG2<sup>-/-</sup> restaura parcialmente la eferocitosis <sup>58</sup>.

En relación a los fenómenos de *clearence* de cuerpos apoptóticos, la TG2 también está involucrada en la señalización de otros receptores *scavenger* como los de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad ( LRPI y LDRR)<sup>59</sup>.

#### Participación de la TG2 en patologías

La expresión y/o función aberrante de la TG2 es una característica de patologías neurodegenerativas <sup>60,61</sup>, enfermedades con fibrosis e inflamación crónica <sup>12</sup> y algunos tipos de cáncer en los que ejerce un papel promotor de tumores <sup>19</sup>.

En el contexto de enfermedades autoinmunes la TG2 es reconocida como una molécula central en la patogenia de la enfermedad celíaca (EC). La TG2 es el principal autoantígeno <sup>62</sup> y la detección de los autoanticuerpos específicos generados por los pacientes en el curso de la enfermedad activa se utiliza ampliamente como marcador diagnóstico <sup>63–65</sup>.

En esta introducción general nos focalizamos en la TG2 en el contexto de la EC por la clara asociación que tiene esta patología con complicaciones del embarazo.

La EC es una intolerancia total y permanente a proteínas del gluten de los cereales trigo, cebada, centeno y avena en menor grado. Se caracteriza por atrofia vellositaria a nivel del intestino delgado con gran infiltración de linfocitos T en el epitelio e hiperplasia de las criptas. La EC ocurre en individuos que expresan ciertos alelos del sistema del antígeno leucocitario humano (HLA DQ2 y DQ8). Se acepta que tiene origen multifactorial, aunque no se conocen completamente los factores determinantes del desenlace de la enfermedad <sup>66–68</sup>.

La TG2 induce la deamidación de los péptidos de gliadina, generando neoantígenos que se unen con gran avidez a las moléculas de HLA DQ2 /Q8 expresadas por la gran

mayoría de los pacientes celíacos, lo cual potencia la generación de linfocitos Th efectores y memoria, centrales en la perpetuación de la enfermedad <sup>69</sup>.

La presentación clínica de la enfermedad es compleja, variable y tanto la enfermedad como sus síntomas pueden aparecer en cualquier etapa de la vida. Las manifestaciones gastrointestinales clásicas de la EC son más comunes en la infancia, mientras que en la vida adulta suele tener una presentación paucisintomática <sup>70</sup>.

La EC clásica se presenta con síntomas gastrointestinales (diarrea, desnutrición, pérdida de peso, esteatorrea y edema secundario a hipoalbuminemia) <sup>71</sup>. Sin embargo, las formas no clásicas y/o atípicas, en las cuáles los síntomas gastrointestinales pueden estar ausentes o ser mucho menos severos, son cada vez más frecuentes. Entre las manifestaciones extradigestivas más comunes se encuentran: anemia, osteoporosis, alteraciones cutáneas y dentales, problemas neurológicos y trastornos reproductivos en la mujer <sup>72-74</sup>. Por estas características actualmente se considera a la EC una patología multisistémica <sup>75,76</sup>.

Las EC es más frecuente en mujeres <sup>66,77</sup> y la salud reproductiva puede verse alterada. Las complicaciones gineco-obstétricas pueden ser la única manifestación de la enfermedad, incluyendo trastornos del ciclo menstrual, baja fertilidad, abortos espontáneos tempranos, parto prematuro, restricción del crecimiento intrauterino y bajo peso al nacer <sup>78,79</sup>.

Los principales avances en el conocimiento de las bases de la enfermedad están focalizados en los mecanismos que ocurren a nivel de la lesión intestinal, pero existe escasa información sobre los mecanismos patogénicos subyacentes a las manifestaciones extradigestivas.

#### La interfase materno-fetal

En 1937, Mossman HW describió a la placenta como "*la aposición o fusión de las membranas fetales a la mucosa uterina para el intercambio fisiológico*" <sup>80</sup>. La placenta es el principal sitio de interacción entre las estructuras maternas y fetales. Dentro del grupo de los mamíferos existen múltiples formas de placentación<sup>81</sup>. Desde el punto de vista anatómico e histológico, la placenta humana se clasifica como discoidal y hemocorial lo que describe el intimo contacto que tienen los tejidos fetales con la sangre materna a través del trofoblasto.

El paso inicial en el establecimiento de la gestación es la implantación de un embrión en el estadio de blastocisto en el endometrio receptivo (decidua), y a continuación la invasión de éste por las diferentes subpoblaciones de células trofoblásticas que derivan de la capa más externa del blastocisto, el trofoectodermo.

Aproximadamente a la semana de la concepción, y concomitante a la etapa de implantación embrionaria, aparecen los primeros linajes de trofoblasto con roles específicos en el proceso de placentación y en las funciones placentarias. El citotrofoblasto (CTB) es la célula precursora; son células mononucleadas con alta tasa proliferativa, que pueden fusionarse en un macizo celular multinucleado, el sincitio trofoblasto (STB) o adquirir un fenotipo migratorio para transformarse en el trofoblasto extravelloso (EVT) <sup>82</sup>.

Las interacciones entre el trofoblasto fetal y las células maternas se dan esencialmente en dos sitios: el lecho placentario y el sincitiotrofoblasto. La formación del lecho placentario comienza en el sitio de implantación; el citotrofoblasto migra profundamente en el intersticio de la decidua materna, donde se encuentra con células deciduales estromales, incluyendo células del sistema inmune materno. El citotrofoblasto invasivo, también remodela las arterias espiraladas uterinas transformándolas en vasos de gran diámetro y de baja resistencia. La mayor área de contacto entre células maternas y fetales es el sincitiotrofoblasto que recubre la superficie de la placenta que es bañada por la sangre materna (Figura 1-7). Estos espacios de interacción son dinámicos, complejos y se adaptan a cada etapa de la gestación para asegurar el adecuado intercambio y crecimiento del feto en formación <sup>83</sup>.


**Figura 1-7. Rol del trofoblasto en el mantenimiento de la gestación**. Se esquematizan los principales procesos biológicos y mediadores solubles implicados en la etapa de implantación temprana (apróx. 14 días post-concepción). Tomado de "Implantation and the survival of early pregnancy"<sup>84</sup>.

#### Formación de la interfase materno-fetal

Desde las primeras etapas de la implantación del embrión se establecen diálogos moleculares altamente coordinados y regulados que implican estructuras maternas y fetales. Para recibir al blastocisto el endometrio sufre alteraciones estructurales y funcionales bajo la influencia de las hormonas reproductivas <sup>84</sup>.

Las células del trofoblasto fetal que están en contacto directo con las células de la madre juegan un rol central en los mecanismos de tolerancia desarrollados en la interfase y aseguran el buen progreso del embarazo. Por otra parte, la decidua es infiltrada por una gran cantidad de leucocitos de la madre que median los mecanismos de tolerancia inmunológica asociados (**Figura 1-8**) En esta interfase hay secreción de una gran variedad de sustancias inmunomoduladores, incluyendo hormonas y citoquinas. Por lo tanto, los eventos de migración y adhesión celular en la interfase materno-fetal son muy importantes desde las etapas tempranas del embarazo. Además, la remodelación de la matriz extracelular (MEC), la angiogénesis, la apoptosis controlada y la remoción (*clearance*) de los cuerpos apoptóticos representan otros procesos centrales en dicha interfase <sup>84</sup>.

Las vellosidades placentarias pasan por distintos estadios durante el desarrollo. En primer lugar, se forman las vellosidades primarias, constituidas sólo por CTB y STB, que luego se expanden dando lugar a las vellosidades secundarias, las cuales se caracterizan por tener una zona central mesenquimal. Finalmente, las vellosidades secundarias se convierten en vellosidades terciarias, que están ramificadas y poseen su zona mesenquimal atravesada por vasos sanguíneos fetales. El mesénquima contiene células de Hofbauer dispersas, que actúan como macrófagos fetales <sup>85</sup>.

En la etapa de implantación el trofoblasto embrionario, más precisamente el macizo STB invade el endometrio materno, hasta alcanzar los capilares maternos, erosionando y reemplazando el tejido endometrial, dando lugar a la formación de lagunas donde se vuelca la sangre materna. En la tercera semana de gestación las vellosidades placentarias ya están presentes. El STB cubre la totalidad de la superficie de la vellosidad y está en contacto directo con la sangre materna en el espacio intervelloso. Estas células, debido a su localización específica, son claves en el intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el embrión. Una población sustancial de EVT escapa de las incipientes vellosidades placentarias abandonando la membrana basal de la vellosidad, proliferando y agregándose a la columna de anclaje de esta en la pared uterina <sup>86</sup>. Este tejido trofoblástico extravellositario invasor, comprende una población heterogénea de células trofoblásticas, gigantes, multinucleadas, placentarias, que invaden las arterias espirales uterinas donde se agregan, tapando la boca de las arteriolas y su efecto es bloquear el flujo sanguíneo, de modo que las etapas iniciales de desarrollo embrionario se dan a una baja concentración de oxígeno. Una hipótesis ampliamente aceptada es que la baja presión parcial de oxígeno ambiental es un estímulo para inducir la proliferación del CTB en las primeras etapas post-implantación, permitiendo el acceso del trofoblasto a tejidos más profundos. Los EVT reemplazan el endotelio de las arterias espiraladas, adoptando

un fenotipo vascular con expresión de marcadores de superficie endoteliales, con concomitante perdida del musculo liso de estas. De este modo, se disminuye la resistencia al fujo sanguíneo facilitando que las vellosidades placentarias se bañen con la sangre materna con un volumen aumentado, pero a baja velocidad. Sobre las 12 semanas de gestación, se pierden los tapones de las arterias espiraladas uterinas ya remodeladas dándose el comienzo de la circulación útero-placentaria <sup>82,87</sup>.



Figura 1-8. Células inmunes en la interfase materno-fetal Tomado de "The unique immunological and microbial aspects of pregnancy"<sup>88</sup>.

#### Papel de las células del sistema inmune en la interfase materno-fetal.

Las células del sistema inmune materno presentes en la decidua (**Figura 1-8**), son actores clave en el proceso de placentación y para el correcto funcionamiento de la placenta a lo largo de la gestación. La población de leucocitos residentes del útero sufre cambios significativos luego de la implantación y durante el desarrollo de la decidua. Los agregados de células T y B que se observan en el útero durante el ciclo menstrual desaparecen. Grandes cantidades de leucocitos (macrófagos, células NK, células T y células dendríticas) infiltran la decidua, conformando el 40% del total de células en la decidua durante el primer trimestre <sup>89</sup>. Las células uNK y macrófagos dominan durante la gestación temprana <sup>90</sup> siendo poblaciones particularmente importantes en el proceso de angiogénesis y remodelación vascular.

La respuesta inflamatoria que caracteriza el periodo peri-implantación será fisiológicamente limitada por mecanismos regulatorios y tolerogénicos que involucran respuestas de la inmunidad innata y adaptativa <sup>91–93</sup>. De esta manera las distintas poblaciones leucocitarias presentes junto con mediadores proinflamatorios llamados en conjunto BIEFs (blastocyst implantation essential factors) contribuyen a la regulación de esta red <sup>91–96</sup>.

Las células uNK son la población linfocitaria más abundante en la interfase materno-fetal en el primer trimestre (50-90% del total de leucocitos). Se distinguen de las células NK canónicas por cumplir una función inmunosupresora <sup>97–99</sup> y secretan factores angiogénicos siendo fundamentales en la regulación de la invasividad del EVT y el desarrollo de las arterias espiraladas <sup>100</sup>. En particular la población de uNK se caracteriza por presentar disminuida la actividad citotóxica y la secreción de citoquinas proinflamatorias; y secretar factores angiogénicos, de crecimiento y adhesión que favorecen el proceso de remodelación de las arterias uterinas.

Los macrófagos se presentan en niveles relativamente altos y estables durante toda la gestación, oscilando entre el 10 – 25% del total de los leucocitos en la interfase maternofetal <sup>101–104</sup>. Los macrófagos son una población con gran plasticidad para adaptar sus funciones en respuesta al microambiente. Presentan un espectro funcional cuyos extremos son: *i*. los macrófagos clásicamente activados (M1), de naturaleza proinflamatoria, asociados a la respuesta a patógenos y daño tisular; *ii*. los macrófagos alternativamente activados (M2), con secreción de mediadores antiinflamatorios y asociados a la reparación de tejido y procesos de tolerización <sup>105–107</sup>.

En la interfase fetal se da un verdadero diálogo entre las células trofoblásticas y los monocitos/macrófagos que asegura la correcta función de ambos tipos celulares (**Figura 1-9**).



**Figura 1-9** Espectro funcional de los macrófagos deciduales: Tomado de "Mantenimiento de la homeostasis inmunológica desde la decidualización a la implantación: relevancia del sistema VIP/VPAC" <sup>108</sup>.

Durante el periodo de ventana implantatoria, los macrófagos deciduales adquieren un fenotipo M1<sup>88</sup>, en tanto se van dando las primeras etapas de la implantación y la invasión del endometrio por parte del trofoblasto. Posteriormente los macrófagos pasan a exhibir un fenotipo mixto M1/M2<sup>102,109</sup>, promoviendo la tolerancia hacia el feto semialogénico, la regulación de la invasión del trofoblasto y la remodelación vascular <sup>110–114</sup>.

Durante el segundo trimestre, los macrófagos se encuentran polarizados a un perfil M2, que contribuye al mantenimiento de la tolerancia al feto que sostiene su crecimiento <sup>112,115</sup>. Finalmente, al momento que se desencadenan el parto se observan nuevamente macrófagos con un perfil M1 <sup>116</sup>. En el proceso de regulación de los perfiles de los macrófagos deciduales, las células trofoblásticas cumplen un rol central mediante moléculas expresadas en su superficie y la secreción de componentes solubles como citoquinas y otros reguladores <sup>117-120</sup>. De hecho, las células apoptóticas de músculo liso, endoteliales y trofoblásticas son removidas eficientemente por los macrófagos deciduales para prevenir una respuesta inflamatoria deletérea. La inmediata remoción de células

apoptóticas induce el fenotipo de macrófagos deciduales inmuno-reguladores que producen IL-10 y TGF-β1 <sup>117,121,122</sup>.

Por lo tanto, una producción exagerada de cuerpos apoptóticos y/o un ineficiente *clearance* de estos puede contribuir a la desregulación de la respuesta inflamatoria durante la implantación y puede ser una causa subyacente de complicaciones de la gestación <sup>123</sup>.

#### Expresión y función de la TG2 en la interfase materno-fetal

Como se expuso previamente la TG2 es una enzima ubicua y multifuncional que juega un rol crítico en múltiples funciones celulares <sup>124</sup>. A nivel de la placenta la TG2, presenta una regulación espacio temporal en cuanto a sus niveles de expresión <sup>125</sup>. En la placenta madura se expresa en el trofoblasto y en la decidua bajo el control de la progesterona <sup>126,127</sup>.

Respecto a las estructuras fetales, se describió la expresión superficial de TG2 en cultivos primarios de trofoblastos extravellositario y en líneas celulares derivadas de placenta como la línea de coriocarcinoma JEG-3 considerada como modelo de sincitiotrofoblasto y la línea primaria no tumoral Swan-71<sup>128-130</sup>.

TG2 participa en la decidualización<sup>126</sup> y concentra su expresión endometrial en los pinópodos (sitio preferencial de interacción endometrio-embrión) donde media funciones adhesivas <sup>131</sup>.

La enzima asociada a la membrana del sincitiotrofoblasto está involucrada en el entrecruzamiento de la FN, en la adhesión celular <sup>132</sup> y en la estabilización del material particulado que se produce desde la superficie del sincitiotrofoblasto hacia la circulación materna, que interactúan con el sistema inmunitario materno <sup>133</sup>. Algunas de las proteínas contenidas en estas partículas son polimerizadas por actividad TGasa contribuyendo a su estabilización <sup>129</sup> en forma análoga a la estabilización del contenido de cuerpos apoptóticos mediada por TG2 intracelular <sup>134</sup>.

Por lo tanto, y de acuerdo con los antecedentes descritos anteriormente respecto a las funciones biológicas de la TG2 y a su localización ubicua, es altamente probable que esté involucrada en el proceso de implantación embrionaria y en la regulación del funcionamiento de la placenta al mediar varios procesos celulares a este nivel.

#### Papel de TG2 de la interfase materno-fetal en patologías de la gestación

La TG2 es el blanco de los autoanticuerpos de la enfermedad celíaca. Los antecedentes de nuestro grupo apoyan el papel patogénico de los anticuerpos anti-TG2 a nivel de la interfase materno-fetal mediante la inhibición de varios procesos clave. Estos anticuerpos pueden contribuir directamente al daño tisular trofoblástico e interferir con el microambiente regulador necesario para el desarrollo normal del embarazo <sup>128,135,136</sup>.

Por otra parte, en los últimos tiempos se han reportado algunos estudios que describen cambios en la expresión y/o función de TG2 en placentas patológicas de mujeres que tuvieron un embarazo con algún tipo de complicación o cuyo desarrollo fetal no fue óptimo. Se han reportado signos de inflamación en placentas a término de mujeres celíacas no tratadas con un aumento concomitante en la expresión de TG2 y de la apoptosis a través de Fas-FasL en el trofoblasto estas observaciones se correlacionaron con el nacimiento de bebés pequeños para la edad gestacional <sup>137</sup>.

En mujeres con síndrome de preeclampsia, existe evidencia de aumento de la expresión y actividad de TGasa en la placenta. Estudios de colocalización permitieron demostrar que el sustrato principal de la TG2 es el dominio de señalización del receptor para la antiogensina I expresado en el trofoblasto, el cual al ser modificado por la enzima se inhibe su recambio y por ende se perpetúa la señalización <sup>138</sup>; aunque no se conoce con exactitud el papel del receptor de angiotensina en el trofoblasto, se cree que participa en la migración y proliferación celular.

Como se mencionó anteriormente el promotor de *TGM2* tiene elementos de respuesta a citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) y a NF- $\kappa$ B <sup>139-141</sup>. En algunas condiciones patológicas a nivel de la interfase, la TG2 podría promover la inflamación sostenida a través de NF- $\kappa$ B por degradación del factor inhibidor de entrecruzamiento I- $\kappa$ B <sup>142,143</sup> u otros mecanismos <sup>144</sup> y perpetuar la patología inflamatoria a través de este bucle de amplificación.

#### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### Hipótesis de Trabajo

La hipótesis general de esta propuesta plantea que la expresión aberrante y/o la desregulación de la función de la TG2 en el trofoblasto y/o células inmunes deciduales puede condicionar los procesos de implantación y desarrollo de la placenta. En particular, nos focalizamos en los macrófagos por ser una célula inmune con un papel relevante en todas las etapas de la gestación en base a su gran plasticidad funcional.

Planteamos que condiciones exacerbadas de inflamación o hipoxia podrían conducir a cambios en la regulación de la expresión y/o funcionalidad de la TG2 en estos tipos celulares, con consecuencias como ser:

i. cambios en la contribución relativa de las variantes de TG2 truncadas generadas por *splicing* alternativo, con alteración de la actividad enzimática canónica (TGasa) y/o sus otras funciones. Como resultado se podrían ver alteradas funciones celulares tales como la migración de las células trofoblásticas, la eferocitosis por los macrófagos y la producción de citoquinas por ambos tipos celulares.

ii. alteraciones en la vía de señalización del NF-κB mediante la interacción con la TG2 con componentes de la cascada, lo cual podría conducir a la perpetuación de la inflamación y alteraciones de la función del trofoblasto.

iii. alteración del condicionamiento del fenotipo de los macrófagos, con efectos adversos sobre su rol en el control de la homeostasis.

Proponemos que estos procesos condicionados por el nivel de expresión de la TG2 y su funcionalidad en alguno de los compartimentos celulares podrían contribuir a la patogenia de algunas enfermedades que cursan con complicaciones del embarazo por una implantación o función placentaria anómala (abortos tempranos, detención del desarrollo intrauterino, bebes de bajo peso para la edad gestacional, partos prematuros y preeclampsia).

En esta tesis nos centramos en la enfermedad celíaca y el síndrome antifosfolipídico como patologías con un componente inflamatorio el cual podría impactar sobre la expresión y función de la TG2.

La TG2 es central en la inmunopatogenia de las manifestaciones sistémicas de la EC; los antecedentes respecto a la interferencia de la función de la TG2 extracelular por anticuerpos evidencian un rol de esta enzima en la interfase materno-fetal. Consideramos que independientemente de la presencia de autoanticuerpos, la desregulación de la expresión y/o actividad de la TG2 en células inmunes maternas o trofoblásticas en la interfase materno-fetal, podría representar un evento que contribuye a la patogenia.

En particular planteamos la hipótesis de que la expresión de la TG2 y las variantes de *splicing* en células inmunes periféricas con potencialidad de colonizar la interfase materno-fetal pueda estar alterada por las condiciones inflamatorias de esta patología. Esta hipótesis se basa en antecedentes en otras patologías como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas, que muestran que la inflamación puede impactar sobre la expresión de la TG2 y de algunas variantes truncas de la misma.

Por otra parte, el potencial proinflamatorio de los anticuerpos anti-fosfolípidos podría condicionar la expresión aberrante de la TG2 y sus variantes de *splicing*, tanto en células trofoblásticas como de macrófagos y contribuir con la patogenia.

Es sabido que la hipoxia fisiológica es un proceso central en la funcionalidad del trofoblasto en las primeras etapas de la gestación. Una desregulación sostenida de esta condición puede conducir a complicaciones de la gestación por mal desarrollo de la placenta, como puede ocurrir en el síndrome de preeclampsia-eclampsia. Interesantemente hay evidencias que sugieren la implicancia de la TG2 en la patogenia de este síndrome, aunque no hay estudios sobre el efecto de la hipoxia sobre el *splicing* alternativo de la TG2.

Finalmente, en base al diálogo molecular que se establece entre las células trofoblásticas y células del sistema inmune, es posible que la expresión o función aberrante de la TG2 en estas células impacte sobre el condicionamiento funcional mutuo que se requiere para la adecuada función placentaria. En particular, planteamos la hipótesis de que las condiciones de inflamación e hipoxia sostenida modifiquen la capacidad de las células trofoblástica de generar el condicionamiento funcional adecuado de los macrófagos a través de factores solubles.

#### **Objetivo general**

Avanzar en la comprensión del rol de la TG2 materna y fetal en condiciones fisiológicas y patológicas del embarazo.

#### **Objetivos específicos**

1. Estudiar la expresión de la TG2 y sus variantes de *splicing* alternativo en células inmunes sanguíneas que tienen la potencialidad de colonizar la interfase materno-fetal y en un modelo *in vitro* de macrófagos, en condiciones normales y de inflamación asociada a patologías con alteraciones de la gestación.

2. Estudiar en un modelo *in vitro* la expresión de la TG2 y sus variantes de *splicing* alternativo en un modelo de monocito/macrófago. En particular, analizar la TG2 en los procesos de diferenciación de monocito a macrófago y de polarización del macrófago en sus fenotipos funcionales mediante estímulos convencionales.

3. Estudiar la funcionalidad de las células trofoblásticas en las condiciones basales y asociadas a hipoxia e inflamación.

4. Estudiar la expresión de la TG<sub>2</sub> y sus variantes de *splicing* en un modelo *in vitro* de células trofoblásticas de primer trimestre, en condiciones basales y asociadas a inflamación o hipoxia.

5. Estudiar los efectos de factores solubles de células trofoblásticas en condiciones fisiológicas o patológicas (inflamación e hipoxia), sobre la expresión de la TG2 y sus variantes de *splicing* en macrófagos y la funcionalidad celular de estos, como aproximación a los procesos que ocurrirían en la interfase materno-fetal en estas situaciones.

# Capítulo



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

En esta sección se describe la metodología general utilizada en todos los ensayos. La información específica complementaria se detalla en los artículos científicos o en el capítulo de resultados correspondiente.

#### **Reactivos generales**

Los reactivos generales fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, USA a menos que sean indicados en el texto.

# Purificación de subpoblaciones leucocitarias de sangre periférica humana.

Se colectaron muestras de sangre venosa (15-20 mL) de donantes voluntarios (aprobado por el Comité de Ética de la Faultad de Química, UdelaR; № 101900-000371-12) en tubos conteniendo EDTA y fueron procesadas inmediatamente después de la extracción. Las fracciones celulares fueron obtenidas por centrifugado en gradientes de densidad siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, las muestras de sangre se diluyeron 1:1 en PBS y se sembraron sobre Hystopaque 1077 y se centrifugaron a 400 g durante 30 min a temperatura ambiente. Los granulocitos se recogieron del sedimento junto con los glóbulos rojos. Estos últimos fueron lisados con la solución EL del kit de extracción de ARN QIAamp RNA blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania), para la posterior extracción del ARN de la población de neutrófilos. Para la purificación de las poblaciones de monocitos y linfocitos, los PBMC recuperados de la interfase fueron sembrados en placas de cultivo (Greiner Bio-One) de 24 pozos en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Capricorn Scientific) suplementados con SFB (Capricorn Scientific) al 10% (v/v) y antibióticos (penicilina 6 mg/mL y estreptomicina 10 mg/mL), a 37°C y CO<sub>2</sub> 5% en incubador humidificado (Esco Lifesciences). A las 24 h se recuperó sobrenadante del cultivo enriquecido en la población de linfocitos y los monocitos que estaban adheridos a la placa para posterior extracción de ARN.

#### Líneas celulares

#### Mantenimiento de la línea celular trofoblástica Swan-71

La línea celular Swan-71, derivada de trofoblasto humano de primer trimestre <sup>145</sup> fue gentilmente cedida por el Dr, Gil Mor, Universidad de Wayne (EE.UU).

Los cultivos se mantuvieron en botellas de 25 o 75 mm<sup>2</sup> hasta un 80% de confluencia, en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12, Capricorn Scientific) suplementados con suero fetal bovino (SFB, Capricorn Scientific) al 10% (v/v) y antibióticos (penicilina 6 mg/mL y estreptomicina 10 mg/mL), a 37°C y CO<sub>2</sub> 5% en incubador humidificado (Esco Lifesciences). Para la realización de los ensayos, las células se despegaron con tripsina 2% (m/v), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 µM en amortiguador fosfato salino (PBS). Se contaron las células con cámara de Neubauer y la concentración se ajustó para el trabajo en placa de pozos según se indica en cada experimento.

Las células fueron mantenidas en cultivo hasta llegar a 10-15 pasajes (según comportamiento de cultivo).

#### Mantenimiento de la línea celular pre-monocítica THP-1

La línea celular pre-monocitica THP-1, derivada de células de leucemia monocítica humana (ATCC, USA) fue gentilmente cedida por la Dra Ana Ferreira del Laboratorio de Inmunología, IQB, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Los cultivos se mantuvieron en botellas de cultivo (Greiner Bio-One) de 25 o 75 mm<sup>2</sup> entre 0.2 a l x  $10^6$  células/mL, en medio RPMI (Capricorn Scientific) suplementados con SFB (Capricorn Scientific) al 10% (v/v) y antibióticos (penicilina 6 mg/mL y estreptomicina 10 mg/mL), a  $37^{\circ}$ C y CO<sub>2</sub> 5% en incubador humidificado (Esco Lifesciences).

Para la realización de los ensayos, las células se contaron en cámara de Neubauer y la concentración se ajustó para la diferenciación a macrófagos en placas de cultivo (Greiner Bio-One) según se indica en cada protocolo experimental.

Las células fueron mantenidas en cultivo sin superar un máximo de 25 pasajes para los ensayos.

#### Congelado de células

Para la preservación de los cultivos celulares se generaron bancos de células de las líneas empleadas. Se prepararon criotubos con suspensiones celulares en dimetilsulfóxido (DMSO) 10% en SFB para su preservación en tanques de nitrógeno. Las concentraciones de las suspensiones celulares fueron  $2x10^6$  cel/ml para las líneas de Swan-71 (nativa y transfectada) y 2 x  $10^5$  cel/ml. Las alícuotas se enfriaron lentamente en un recipiente de

congelado Nalgene<sup>®</sup> Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific) hasta una temperatura final de -80°C y se los transfirió a nitrógeno líquido.

#### Descongelado de Células

El descongelado de las alícuotas se realizó por pasaje directo del tanque de nitrógeno líquido a baño de agua a 37ºC hasta observar que quedara un pequeño remanente aún congelado. Rápidamente se lavó la suspensión con medio de cultivo a 37ºC y las células se resuspendieron en el medio correspondiente, siguiendo los requerimientos de lavado y volúmenes recomendados para cada línea celular.

Una vez descongelada la alícuota de la suspensión de Swan-71 en el criotubo se resuspendió en 12 mL de DMEM-F12 a 37°C. Se centrifugó 5 min a 350 g a temperatura ambiente. Las células Swan-71 se dejaron en botellas de 75 mm<sup>2</sup> con 12 mL de DMEM-F12 con SFB 20% y antibióticos, a las 24 h renovó el medio para eliminar células muertas o que no se hayan adherido. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia se despegaron con tripsina 2% (m/v) EDTA 1 µM y se dejó el 10% de las células del cultivo en DMEM-F12 con SFB 10% y antibióticos. Una vez que alcanzaron nuevamente el 80% de confluencia se las comenzó a emplear para ensayos.

Una vez descongelada la alícuota de la suspensión de THP-1 en el criotubo se resuspendió en 40 mL de RPMI con SFB 20% y antibióticos a 37°C. Se centrifugó 10 min a 350 g a temperatura ambiente. Posteriormente las células se resuspendieron en 40 mL de RPMI con antibióticos y se centrifugó 10 min a 350 g a temperatura ambiente. Finalmente, las células se transfirieron a una botella de 25 mm<sup>2</sup> en 7.5 mL de RPMI con SFB 20% y antibióticos, renovando el medio cada 48 h hasta que alcanzaron una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL. Posteriormente se ajustó la concentración del cultivo a 0.2 x 10<sup>6</sup> células/mL en 7.5 mL de RPMI con SFB 10% y antibióticos y se esperó hasta que alcanzaron nuevamente una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL para comenzar a emplearlas en ensayos.

#### Generación de la línea reportera estable Swan-71NF-kB-hrGFP

En colaboración con la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur-Montevideo se generó la línea celular reportera Swan-71-NF-κB-hrGFP por transfección estable con el plásmido pNF-κB-hrGFP como fue descripto previamente <sup>146</sup>. Brevemente, las células fueron transfectadas por nucleofección (Amaxa Nucleofactor 96-well Shuttle System) con 10 μg del plásmido pNF-κB-hrGFP (Agilent Technologies, USA). Se seleccionaron y expandieron las células transfectadas en medio conteniendo higromicina B 50 μg/mL. Las células resistentes fueron estimuladas con TNF-α 50 ng/mL y se seleccionaron por citometría de fujo (BD FACSAria<sup>™</sup> Fusion, BD Biosciences) aquellas células que expresaron la proteína verde fluorescente (GFP). La activación por estímulo del factor de transcripción NF-κB se analizó por inmunofluorescencia (traslocación al núcleo de la subunidad p65) y por citometría de flujo (como se describe más adelante).

#### Diferenciación de macrófagos a partir de células THP-1

Se utilizaron dos protocolos para la diferenciación a macrófagos de las células THP-1, que varían en la dosis del agente de diferenciación y el tiempo de incubación con el mismo, referidos en esta tesis como condición I y condición II.

En la condición I las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos por incubación durante 72 h con 500 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) seguido de 48 h de incubación en medio RPMI con SFB 10% (**Figura 1. Art III**). Las células THP-1 fueron sembradas a una concentración de 0.1 x 10<sup>6</sup> células/mL en placas de cultivo 24 o 12 pozos en 0.5 o 0.8 mL/pozo respectivamente.

En la condición II las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos por incubación durante 24 h con 100 ng/mL de PMA seguido de 6 días de incubación en medio RPMI con SFB 10%, haciendo cambios de medio cada 48 h (**Figura 1, Art III**). Las células THP-1 fueron sembradas a una concentración de 0.1 x 10<sup>6</sup> células/mL en placas de cultivo de 24 o 12 pozos en 0.5 o 0.8 mL/pozo respectivamente.

#### Tratamientos de los cultivos celulares

Inducción de hipoxia química y condiciones inflamatorias en células Swan-71

Las células Swan-71 fueron sembradas en placas de 6, 12, 24 o 48 pozos (dependiendo del ensayo a realizar) a una concentración de 1 x  $10^5$  células/mL por pozo, en medio DMEM-F12 con SFB 10% y antibióticos permitiendo que se adhieran por 16 - 24h. Posteriormente, se indujo la hipoxia química con CoCl<sub>2</sub> en un rango de concentración de 50 – 200 µM durante 24h. Para simular condiciones inflamatorias se incorporó TNF- $\alpha$  o IL-1β (PeproTech<sup>®</sup>, Inc, USA) 10 ng/mL durante 24h. En todos los casos cada condición se ensayó al menos por triplicado en medio DMEM-F12 con SFB 1% y antibióticos.

#### Produción de medios condicionados de células Swan-71

Las células Swan-71 fueron sembradas en botellas T75 a una concentración de 1 x  $10^5$  en 12 mL de medio DMEM-F12 con SBF 10% y antibióticos permitiendo que se adhieran por 16 – 24 h. Posteriormente se expuso las células a condiciones inflamatorias o se indujo la hipoxia química con TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  10 ng/mL o CoCl<sub>2</sub> 200 mM respectivamente en DMEM-F12 1% SBF. A las 24 h los medios condicionados se recuperaron, alicuotaron y almacenaron a -80 hasta su uso.

#### Polarización de THP-1 diferenciadas a macrófagos

Las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos siguiendo la condición II (según se describió anteriormente) en placas de 12 o 24 pozos. Al día 6, fueron tratadas con IFN-γ (PeproTech®, Inc, USA) 20 ng/mL o IL-4 (PeproTech®, Inc, USA) 30 ng/mL durante 24 h como estímulos de diferenciación a macrófagos tipo M1 o M2 respectivamente. En todos los casos cada condición se ensayó al menos por triplicado en medio RPMI con SFB 10% y antibióticos.

## Tratamiento de las células THP-1 con sobrenadantes de cultivo condicionados por Swan-71

Las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos siguiendo la condición II en placas de 12 o 24 pozos. Al día 6, fueron incubadas por 24 h con sobrenadantes de cultivo de células Swan-71 tratadas con CoCl<sub>2</sub> o citoquinas proinflamatorias (según se describió anteriormente) los cuales fueron almacenados a -80°C hasta su uso. Se incorporaron en una relación de volúmenes 1:1 en RPMI con SFB 10% y antibióticos. En paralelo se realizaron controles para cada tratamiento con medio de cultivo incubado en ausencia de células Swan-71. En todos los casos cada condición se ensayó al menos por triplicado.

#### Análisis de apoptosis

Para determinar la muerte por apoptosis en las células se recurrió a una tinción doble con anexina V conjugada al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC, BD Pharmigen, USA) e ioduro de propidio (IP). Las células Swan-71 fueron tratadas con CoCl<sub>2</sub> o citoquinas inflamatorias por 24 h. Como control positivo de apoptosis se incubaron células Swan-71 con campotecina 3  $\mu$ M por 16 h. Tras la incubación, se cosecharon las células del sobrenadante y las adherentes y se lavaron con PBS. Posteriormente se resuspendieron en 100 μl de buffer de unión a anexina V (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, pH 7.4) y se adicionó 2 μl de anexina V-FITC a cada suspensión celular. Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente en oscuridad, las células se lavaron con el buffer antes mencionado y se resuspendieron en 300 μl del mismo con 2 μl de IP 250 μg/mL por suspensión. Para el análisis por citometría de flujo se colectaron 5000 eventos en un citómetro BD FACSCallibur con el programa Cell Quest (BD Biosciences, USA). El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa de licencia libre Flowing 2.5.1 (Turku Bioscience). Cada condición se ensayó al menos por triplicado.

#### Preparación de extractos proteicos

Se prepararon extractos proteicos a partir de lisados de 1 x 10<sup>6</sup> células Swan-71, cultivadas previamente en botellas de 75 mm<sup>2</sup>. Una vez finalizado el tratamiento se descartó el medio y se lavó con PBS 3 veces. Las células fueron despegadas mecánicamente utilizando un rastrillo de goma y 1 ml de PBS. Las células en suspensión fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos a 4ºC, se descartó el sobrenadante, y el sedimento se lavó con PBS. Posteriormente, las células se incubaron en hielo por 15 minutos en 100 µL de buffer de lisis (Tris 5 mM, pH 6.8, EDTA 20 mM, dodecilsulfato sódico, SDS 0.1%, nonil fenoxipolietoxiletanol, NP40 1%) con 14 µL de cóctel inhibidor de proteasas Complete<sup>™</sup> 7X (Roche). Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Los extractos obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su análisis (por un tiempo no mayor a un mes) en buffer de carga (se adicionó 20 μL de solución 6X: Tris-HCl 75 mM pH 7,1; SDS 3 %; βmercaptoetanol 3 %; glicerol 15 %; EDTA 0,15 M; azulbromofenol 0,15 %). Se reservaron 5 µl de las muestras obtenidas, para determinar la concentración proteica por método colorimétrico de Bradford (Coomasie blue G 0,1 mg/ml; etanol 5%; ácido ortofosfórico 10%). La medida se realizó en placas de 96 pozos de fondo plano no adherentes, con 5  $\mu$ l de extracto celular en 200 µL de reactivo de Bradford. La concentración proteica de cada muestra se determinó realizando una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA). La lectura de absorbancia se realizó a 595 nm en un lector de placas Labsystem multiscan MS.

#### Electroforesis en gel de poliacrilaminda

Para realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), se prepararon geles al 8% de acrilamida <sup>147</sup>. Las muestras en buffer de carga se hirvieron por 5 minutos y se sembró igual cantidad de proteínas de cada muestra (30 µg de proteínas/carril). En carriles paralelos se sembraron 5 µL del marcador de peso molecular (Low Molecular Weight SDS Calibration Kit for SDS electrophoresis, (Amersham) y 5 µg/carril de TG2 de cobayo (como control positivo). La electroforesis se realizó en buffer de corrida (Tris 11 mM, glicina 100 mM, SDS 1%).

#### Western blot

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno)<sup>147</sup>. Brevemente, se hidrató la membrana en metanol y luego se equilibraron la membrana y el gel de acrilamida en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 15%). La transferencia se realizó durante toda la noche a un voltaje constante de 56 V a 4ºC. Para comprobar la eficiencia de la transferencia, se realizó una tinción de la membrana con Rojo de Ponceau y se cortaron las membranas a la altura de la banda de 60 kDa según el marcador de peso molecular de manera de poder detectar la proteína de interés y la normalizadora en el mismo carril. Las membranas se bloquearon en PBS con BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, las membranas se incubaron a 4°C, en agitación, toda la noche, con el anticuerpo primario correspondiente: anti-HIFlα (1/500, policional de conejo, sc-8711, Santa Cruz), anti-TG2 (1/1000, IgG monocional de ratón TG100, MS-279, Thermo-Fisher Sci), anti-tubuina (1/500, IgM monoconal de ratón TU-02, sc-8035, Santa Cruz), en PBS-BSA 1% Tween 20 0,05%. Se realizaron varios lavados de las membranas con PBS-Tween 0,05% y luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa (PO) durante una hora en agitación suave (anticuerpo monoclonal anti-IgG y anti-IgM de ratón, 1/5000 y 1/3000 respectivamente, Invitrogen). Luego se repitieron los lavados y se reveló por con sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). Las bandas se visualizaron con el equipo GBOX Chemi System (SYNGENE) empleando el programa GeneSys y se cuantificaron con el programa ImageJ. Las señales detectadas se relativizaron respecto al control de carga correspondiente.

#### Extracción de ARN

Se purificó el ARN total de 0.5 x 106 células/condición Swan-71 o THP-1 con Trizol® (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Luego de cada tratamiento, las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en 500 µl de Trizol® y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Una vez descongeladas, se dejó reposar a temperatura ambiente 5 min y se centrifugó durante 5 min a 7500 g y 4ºC para descartar el sedimento de restos celulares. El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo nuevo, se le adicionó 100 μl de cloroformo y se mezcló en vortex durante 15 s. Posteriormente, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó por 5 min a 12000 g a 4ºC. A la fase acuosa resultante se le adicionó 250 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min. Seguidamente, se centrifugó por 15 min a 12000 g y 4ºC. El sedimento resultante se lavó con etanol 75% y se centrifugó 5 min a 7500 g y 4ºC. Luego de descartar el sobrenadante, se dejó evaporar el etanol remanente 15 min a temperatura ambiente; el sedimento se resuspendió en H<sub>2</sub>O libe de nucleasas (Qiagen) y se incubó 10 min a 65ºC. Se analizó la integridad de ARN purificado mediante geles de agarosa y se determinó su concentración con la medida de la absorbancia a 260 nm (A260) en un espectrofotómetro Nanodrop (Termo Fisher Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer) la concentración de cada muestra se calculó asumiendo que 40 µg/mL de ARN simple hebra presenta una A<sub>260</sub> de 1. Adicionalmente se analizó las relaciones A260/A280 y A260/A230 para analizar la contaminación por proteínas o componentes orgánicos 147. Las muestras de ARN fueron almacenadas a -80 ºC hasta su uso (por un plazo no mayor a l mes).

#### Síntesis de ADN copia (ADNc)

Para eliminar posible contaminación por ADN genómico, se incubó 1 µg de ARN con DNAsa I (Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos a 37°C, seguido de una incubación por 10 minutos a 65°C en presencia de EDTA 2.5 mM para inactivar la DNAsa I, en termociclador (LifeECO, Bioer Technology). La retrotranscripción de las muestras se realizó incubando 1 µg de ARN en buffer de reacción con 10 pmol de hexámeros al azar como cebadores (Macrogen), 0.5 mM de deoxinucleosidos trifosfato, dNTPS (Thermo Fisher Scientific), ditiotreitol, DTT 0.5 mM (Invitrogen) y 10 U de transcriptasa reversa H-minus M-MLV (Invitrogen), en un volumen final de 20  $\mu$ L. Se utilizaron las siguientes condiciones de ciclado: 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 37 °C y 15 minutos a 70 °C. Finalmente, las muestras de ADNc fueron diluidas a la cuarta parte con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Qiagen) y almacenadas a -20 °C.

# Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real semicuantitativa (qRT-PCR)

Se realizó qRT-PCR utilizando QuantiNova SYBR Green PCR kit (Qiagen) o SensiFAST SYBR Green No-ROX PCR kit (Bioline) siguiendo las especificaciones de los fabricantes en un equipo Rotor-Gene Q real-time PCR cycler (Quiagen). Se realizó las reacciones en un volumen final de 10  $\mu$ L conteniendo 5  $\mu$ L de PCR mix, 0.9  $\mu$ L de cada cebador específico 10  $\mu$ M, 1.2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y 2  $\mu$ L de ADNc. En todas las corridas se incluyeron al menos tres réplicas de cada condición y un blanco (sin molde, NTC). El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturalizar y 60 segundos a 60°C de hibridación/extensión para la reacción en QuantiNova y una desnaturalizar y 30 segundos a 60°C de hibridación/extensión para la reacción para la reacción en SensiFAST. Las cantidades relativas de los ARNm en cada muestra se calcularon utilizando el método del 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>, donde  $\Delta$ Ct=Ct gen interes – Ct gen normalizador,  $\Delta\Delta$ Ct=  $\Delta$ Ct tratamiento –  $\Delta$ Ct control <sup>148</sup>.

#### Detección de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo.

Se analizó la producción de distintos mediadores solubles utilizando ELISA de captura, en los sobrenadantes de cultivo de los macrófagos derivados de THP-1 o células trofoblásticas Swan-71 luego de 24 h de tratamiento. Para la cuantificación de las citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CCL22 y TNF- $\alpha$ ) se utilizaron los kits de ELISA comerciales DUOSET (R&D Systems) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. En todos los casos se emplearon las diluciones de anticuerpo indicadas en el kit correspondiente. Se utilizaron placas de 96 pocillos de alta adherencia (Nunc) que fueron sensibilizadas con 100  $\mu$ L/pocillo del anticuerpo de captura en PBS por 16 h a temperatura ambiente. Luego de realizar tres lavados con PBS-Tween 20 0.05%, se bloqueó con 200 µL/pocillo de PBS-BSA 1% durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se repitieron los lavados y se agregó 100 µL/pocillo de las muestras a dilución adecuada o las soluciones estándar de citoquinas en PBS-BSA 1%, durante 2 h a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y se incubó con 100 µL/pocillo del anticuerpo de detección diluido en PBS-BSA 1% durante 2 h a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y se incubó con 100 µL/pocillo del anticuerpo de detección diluido en PBS-BSA 1% durante 2 h a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y se agregó 100 µL de estreptavidina conjugada a peroxidasa en PBS-BSA% y se incubó por 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se realizaron los lavados con PBS-Tween 20 0.05% y se incubaron las placas con 100 µL de la solución de revelado (buffer acetato de sodio 0.1 M pH 5.5; tetrametilbecinidina 6 mg/mL en DMSO; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%) durante 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. Por último, la reacción se detuvo agregando 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Labsystem multiscan MS.

#### Inmunofluorescencia

Los niveles de expresión y localización de la TG2 y la subunidad p65 de NF-KB se determinaron por microscopía confocal. Brevemente las células Swan-71 se sembraron en portaobjetos a una concentración de 50 células/mL en gotas de 50 uL, en medio DMEM-F12 con SFB 10% y antibióticos permitiendo que se adhieran por 16 - 24h. Posteriormente las células se trataron con CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M o TNF- $\alpha$  10 ng/mL durante 24h. En todos los casos cada condición se ensayó al menos por triplicado en medio DMEM-F12 con SFB 1% y antibióticos. Las células fueron luego lavadas con PBS dos veces y fijadas con PFA 2% durante 15 min a 4º C. Posteriormente las células fueron lavadas con una solución de PIPES 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 10 mM MgCl<sub>2</sub> 2 mM (PHEM) pH 7.4 durante 5 min a temperatura ambiente tres veces seguido de la permeabilización incubando con una solución de Triton X-100 al 1% en PHEM a 37ºC durante 10 min encámara húmeda. Se repitieron los lavados con PHEM y se incubó con solución de bloqueo: glicina 75 mM, BSA 0.1%, suero normal de cabra 5% en PHEM durante 30 min a 37 ºC en cámara húmeda. Posteriorente se incubaron los anticuerpos específicos (monoclonal TG100, MS-279, Thermo Fisher Scientific 1:1000 y policlonal de conejo anti p65, ab16502, Abcam 1:750) en solución de incubación: glicina 75 mM, BSA 0.1%, en PHEM durante 60 min a 37º C en cámara húmeda. Se repitieron los lavados con PHEM y se incubó con anticuerpos conjugados a fluororomo (anti-ratón producido en cabra conjugado a AlexaFluor 488 All029, Thermo Fisher Scientific, 1:100, y anti-conejo producido en cabra conjugados Alexa Fluor 594 ab150080, Abcam 1:1500) en solución de incubación con DAPI 0.1 µg/mL durante 45 min a 37<sup>o</sup> C en oscuridad. Luego se realizaron 3 lavados con solución de incubación y 3 lavados con PHEM. Los preparados se montaron con medio ProLong<sup>™</sup> Gold Antifade y se preservaron en oscuridad a -20<sup>o</sup> C hasta su observación en un microcopio confocal LSM800 (Zeiss, Germany). Las imágenes fueron adquiridas con los objetivos 20 x oil AN:.8 and 63 x oilAN: 1.4 y el software Zen blue edition versión 2.3 (Zeiss, Germany). Las imágenes se procesaron con el programa Fiji/ImageJ, (programa de fuente abierta, OSS). Todos los ajustes se realizaron con las muestras reales y se mantuvieron para todas las imágenes. El área de los núcleos celulares y de las células completas se delimitaron según la señal de la tinción de DAPI y p65 respectivamente. Se obtuvieron los datos de la cuantificación de la densidad integrada (DI) de los núcleos celulares y células completas con al menos 30 células por condición. La distribución de la TG2 y p65 se analizó determinando la relación entre la señal determinada para el núcleo y el citoplasma, calculada cono DI núcleo/(DI total-DI núcleo).

#### Ensayos de cicatrización de herida

Se realizaron cultivos de células Swan-71 hasta alcanzar el 90% de confluencia en placas de 48 pozos. Se generó la herida raspando la monocapa con una punta de micropipeta de 200 µL. El cierre de la herida se monitoreo a as 4, 8 y 24h en un microscopio invertido (AxioCam ERc 55 microscope, Zeiss) con cámara acoplada y se calculó el cierre del área de la herida a las 8 h e relación al área inicial de la herida. Para el análisis de las imágenes se empleó el programa Fiji/ImageJ (programa de fuente abierta, OSS).

#### Ensayo de activación de NF-κB

Las células Swan-71-NF- $\kappa$ B-hrGFP fueron incubadas por 24h con TNF- $\alpha$  10 ng/mL, IL-1 $\beta$  10 ng/mL o CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M en placas adherentes de 24 pozos. Posteriormente las células fueron cosechadas mediante tratamiento con tripsina 2% (m/v), EDTA 1  $\mu$ M en PBS y se analizaron por citometría de flujo en un equipo FACS calibur (BD Biosciences, USA) equipado con un láser 488 nm. La emisión de fuorescencia fue detectada usando filtros de paso de banda de 530/30 para la emisión de GFP y 650 para la emisión de IP. Para cada muestra se recolectaron datos de 10000 eventos. El análisis de datos se realizó empleando el programa FloJo<sup>TM</sup> v7.6 (www.flowjo.com), considerando solo las células negativas para IP. La activación de NF- $\kappa$ B se determinó como el porcentaje de células GFP positivas (%GFP+).

#### Ensayo de actividad de transamidación (TGasa)

Las células Swan-71 fueron incubadas por 24h con TNF- $\alpha$  10 ng/mL, IL-1 $\beta$  10 ng/mL o CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M en placas adherentes de 24 pozos como se describió anteriormente. Luego se adiciónó 5-(biotinamido)-pentilamina (BP) 1 mM por 2 h. Posteriormente, las células fueron cosechadas por tratamiento con tripsina 2% (m/v), EDTA 1  $\mu$ M en PBS, fijadas y permeabilizadas con FCM Permeabilization System (Santa Cruz Biotechnology) según especificación del fabricante. Posteriormente se incubaron con estrepatavidina-PE-Cy5 por 30 min en hielo. Las células se lavaron 3 veces con EDTA 2mM, BSA 0.1% en PBS (solución FACS) y se resuspendieron en un volumen final de 300  $\mu$ M de solución FACS para su posterior análisis por citometría de flujo. Se registró lº intensidad media de fluorescencia para cada uestra y la actividad TGasa se expresó como el incremento relativo a la condición control. Como inhibidor específico de la actividad TGasa en este y otros ensayos se utilizó dihidrocloruro de cistamina (CTA) a una concentración de 1 mM.

#### Ensayo de eferocitosis

Las células dTHP-1 obtenidas por tratamiento con PMA (con la condición II descrita anteriormente) se incubaron con células Swan-71 apoptóticas generadas mediante incubación con Camptotecina 3 mM e incubadas con el compuesto fluorescente éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE)  $0.25 \ \mu M^{136,149}$ . En paralelo se realizó la incubación de ambas células en una relación 1:1 durante 2 h a 37°C y en condiciones control (4°C). Posteriormente, se descartó el sobrenadante y las células adheridas fueron lavadas exhaustivamente con PBS. A continuación, se cosecharon las células con solución accutase (BD Bioscience). Posteriormente se bloquearon los receptores para Fc incubando con una solución de suero humano normal al 10% (v-v) por 30 min en hielo, seguido de dos lavados con solución FACS y finalmente el marcado con el anticuerpo anti-CD45-APC 1:50 (IM2473U, Beckman Coulter). Se repitieron los lavados y las células se resuspendieron en un volumen final de 100  $\mu$ L de solución FACS para su posterior análisis por citometría de flujo en un equipo FACS Canto (BD Biosciences, USA). Se definió el % de eferocitosis como el porcentaje de células doble positivas CD45+CFSE+.

#### Expresión de los resultados y estadística

Como criterio general adoptado, los ensayos *in vitro* se realizaron al menos en tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como promedio y error

estándar de la media (SEM). Las réplicas para cada determinación varían según el estudio y se especifican en la sección correspondiente de resultados, al igual que la prueba estadística realizada para la comparación entre grupos experimentales o el análisis de correlación. En todos los casos se utilizó el programa Graph Pad Prism 8 para el análisis.

## Capítulo



## LA EXPRESIÓN DE LA TG2 Y SUS

### **VARIANTES DE SPLICING EN**

### **CÉLULAS INMUNES**

### **REPRESENTATIVAS DE LA INTERFASE**

**MATERNO-FETAL** 

En este capítulo se describen los resultados obtenidos con relación a los objetivos específicos 1 y 2 del trabajo.

Como se expresó anteriormente, TG2 tiene expresión ubicua y se localiza en varias células que integran y participan en la generación de la interfase materno-fetal como es el caso de las células del sistema inmune y del endometrio.

La mayoría de las células inmunes en el endometrio derivan de sangre y una vez que trasvasan cambian su estado funcional o se diferencian a otro tipo celular por influencia del microambiente local. Tal es el caso de los monocitos que tienen la potencialidad de diferenciarse a macrófagos o células dendríticas<sup>116</sup>.

En base a estas consideraciones, nuestro trabajo inicial consistió en estudiar la expresión de la TG2 y sus variantes de *splicing* en células inmunes sanguíneas en condiciones de salud y de enfermedad celíaca, sobre la base de nuestros antecedentes sobre el rol de la TG2 en las complicaciones gineco-obstétricas asociadas a esta patología.

Adicionalmente, se estudiaron los efectos del microambiente inflamatorio asociado al síndrome antifosfolipídico sobre la expresión de TG2 en un modelo *in vitro* de macrófagos humanos, sobre la base del efecto proinflamatorio de los anticuerpos anti-β2 glicoproteína I asociados a esta patología.

Los principales resultados de esta parte I del capítulo están contenidos en la publicación adjunta (Art. I).

Arbildi P, Sóñora C, Del Río N, Marqués JM, Hernández A. Alternative RNA splicing of leucocyte tissue transglutaminase in coeliac disease. Scand J Immunol. 2018 May;87(5):el2659. doi: 10.1111/sji.12659. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29543397.

En una segunda etapa, profundizamos en el estudio de los macrófagos como tipo celular central durante todo el embarazo. Los macrófagos en el sitio de implantación presentan un perfil característico tipo MI, que contribuye al microambiente proinflamatorio necesario en esta etapa. A medida que el embarazo progresa hasta el punto en que el trofoblasto invade el endometrio y entra en contacto con la decidua, las células trofoblásticas contribuyen al cambio del microambiente de forma de favorecer un fenotipo M2. Como la TG2 está involucrada en funciones mediadas tanto por macrófagos

tipo MI como M2, nos propusimos modelizar la diferenciación hacia ambos perfiles con la línea premonocítica THP-1 y estudiar la expresión de la TG2 y variantes de *splicing* desde la etapa de diferenciación a macrófago, así como en el proceso de polarización con estímulos convencionales.

La estandarización de las condiciones experimentales y la caracterización inicial de los fenotipos funcionales de los macrófagos diferenciados a partir de las células THP-1, constituyen la base para el estudio del posible efecto sobre estos macrófagos de los mediadores producidos por las células trofoblásticas en condiciones basales, de inflamación e hipoxia, que se desarrollarán en el capítulo 3.

Los principales resultados de la parte II de este capítulo están contenidos en el manuscrito:

Arbildi P, Calvo F, Macías V, Rodríguez-Camejo C, Hernández A, Sóñora C Study of tissue transglutaminase spliced variants expressed in THP-1 derived macrophages with different functional phenotypes. Sometido a evaluación en Immunobiology, Online ISSN: 1878-3279 (enviado 17/05/2023).

A continuación, se desarrolla el marco teórico, principales resultados y discusión.

## PARTE I: LA TG2 EN CÉLULAS INMUNES EN CONDICIONES NORMALES Y EN PATOLOGÍAS CON COMPONENTE INFLAMATORIO ASOCIADAS A COMPLICACIONES DE LA GESTACIÓN.

# I.1 La expresión de la TG2 y variantes de *splicing* en la enfermedad celíaca

Existen evidencias sobre la expresión de la TG2 en células inmunes de sangre periférica y su rol regulador en la función inmunológica contribuyendo principalmente con la regulación de la diferenciación de monocitos, neutrófilos y linfocitos T<sup>150-153</sup>. A su vez, se ha observado que retrasos en la diferenciación se asociaron con defectos en la funcionalidad celular, como es el caso de los neutrófilos murinos deficientes en TG2 que exhibieron menor capacidad de extravasación y poder microbicida mediado por la producción de superóxido <sup>154</sup>.

Por otro lado, la inflamación induce la expresión de la TG2 y/o de su actividad TGasa en distintos tipos celulares. Una localización tisular paradigmática de esta situación es la lesión del intestino delgado de individuos con EC activa <sup>155</sup>, una patología asociada a complicaciones del embarazo tal como se describió en la introducción general.

La EC es reconocida actualmente como una enfermedad con afectación sistémica. Si bien los mecanismos implicados en las manifestaciones extradigestivas de la EC están pobremente comprendidos, existen evidencias de que estos trastornos estarían mediados al menos en parte por los anticuerpos autorreactivos dirigidos contra la TG2, expuesta en diversos tejidos y tipos celulares <sup>135,136,156,157</sup>.

En particular las células inmunes residentes en el endometrio o en la interfase maternofetal que expresan TG2 podrían estar involucradas en las alteraciones gineco obstétricas de la EC. Nuestro grupo demostró que macrófagos en presencia de anticuerpos anti-TG2 del suero de mujeres celíacas ven alterado el proceso de eferocitosis de células trofoblásticas humanas <sup>128</sup>. Además, este fenómeno se reprodujo en un modelo murino de autoinmunidad como son los ratones de la cepa NOD que presentan problemas de gestación <sup>158,159</sup> y producción natural de anticuerpos anti TG2 <sup>160</sup>, ya que observamos la inhibición de la eferocitosis de células apoptóticas ejercida por los anticuerpos anti-TG2 sobre los macrófagos de hembras NOD preñadas <sup>136</sup>.

Es también posible plantear que las células inmunes activadas en el intestino tengan acciones efectoras o reguladoras a distancia y alteradas en forma independiente de los anticuerpos <sup>161</sup>. Los linfocitos efectores y otros leucocitos de la lesión podrían trasvasar en órganos distantes como el útero en gestación y mediar efectos patogénicos directos o a través de mediadores solubles.

Sin embargo, no se ha estudiado el rol de la TG2 en las complicaciones ginecoobstétricas en forma independiente de la presencia de los anticuerpos. Es posible plantear en base a las características de la EC y los efectos de la inflamación sobre la expresión de la TG2, que las células inmunes de los pacientes celíacos difieran en la capacidad de expresión y actividad de la enzima. Estas células con la potencialidad de trasvasar en los tejidos distantes podrían ejercer efectos adversos por tener una funcionalidad alterada en los procesos biológicos regulados por la TG2.

Como se describió en la introducción general la TG2 es una proteína polifuncional en base a sus múltiples dominios; sumado a estas características estructurales complejas y los variados mecanismos de regulación <sup>162</sup> su funcionalidad está condicionada por la expresión de variantes de *splicing* alternativo. Las proteínas generadas por estas variantes son más pequeñas porque carecen de fragmentos de la región C-terminal (variantes truncadas). Los antecedentes sobre la expresión de las variantes en células y tejidos primarios humanos se limitan a enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple y Alzheimer <sup>32,163</sup> y neoplasias <sup>29,164</sup>.

En particular, hay escasa información sobre la expresión de las variantes en células inmunes humanas. Las variantes TGM2\_v4a y TGM2\_v4b se han reportado en células mononucleares periféricas de individuos sanos, en las que hay una predominancia de la variante canónica en 4-5 veces. En contraste los autores de dicho trabajo encuentran que la variante TGM2\_v4a se expresa en mayor proporción que la TGM2\_v1 en la fracción de polimorfonucleares <sup>36</sup>.

En pacientes con esclerosis múltiple primaria progresiva (una enfermedad que cursa con una infiltración importante de leucocitos en el sistema nervioso central), se encontró que la relación de expresión de las variantes TGM2\_v4a y TGM2\_v4b respecto a TGM2\_v1 fue superior en la fracción de células mononucleares en contraste con los individuos sanos, en los que predomina la variante canónica <sup>163</sup>.

Estos estudios sugieren una implicancia del *splicing* alternativo en la patofisiología de enfermedades con un componente inflamatorio. Sin embargo, el impacto de la expresión diferencial de las variantes truncadas en el contexto de patologías vinculadas a trastornos reproductivos aún no se ha estudiado.

En base a los antecedentes que muestran que la inflamación asociada a ciertas patologías puede impactar sobre la expresión de algunas variantes truncadas de la TG2, planteamos como parte de nuestra hipótesis que la expresión de la TG2 y sus variantes de *splicing* en células inmunes periféricas que tienen la potencialidad de colonizar la interfase materno- fetal, pueda estar alterada por las condiciones inflamatorias. En este contexto y como primera aproximación nos propusimos estudiar la expresión de la TG2 en poblaciones de leucocitos periféricos en condiciones de salud y en pacientes con EC, para analizar la relación entre la expresión de sus variantes de *splicing* con los parámetros inflamatorios que caracterizan a esta patología.

#### Resultados y discusión

Grupo de estudio y patrones serológicos asociados a la enfermedad celíaca en el grupo de estudio.

El estudio se llevó a cabo sobre un grupo de 17 individuos (16 mujeres y un hombre) con diagnóstico confirmado de EC utilizando como grupo control un grupo de 9 voluntarios sanos (6 mujeres y un hombre).

Todas las personas que conformaron el panel de pacientes con EC confirmada en este trabajo declararon estar en dieta libre de gluten (DLG) desde el diagnóstico. Con el fin de categorizar a los pacientes con EC de acuerdo con la etapa clínica de su enfermedad, tomamos en cuenta el período de adhesión a la DLG y el patrón de reactividad serológica. Esta clasificación se basa en el hecho de que se estima que se necesita una adhesión a la DLG de al menos 6 meses para restaurar la mucosa intestinal y negativizar la serología específica<sup>71</sup>.

Los patrones serológicos de nuestro grupo de estudio se analizaron con kits comerciales usados habitualmente en diagnóstico clínico. Se analizó la presencia en suero de anticuerpos IgA y/o IgG específicos contra TG2 y péptidos de gliadina deamidados (DGP).

Al evaluar el perfil de anticuerpos específicos presentes en las muestras encontramos que nueve de diez pacientes con diagnóstico confirmado y menos de seis meses en DLG (grupo I) presentaron niveles significativos de anticuerpos específicos contra TG2 y/o DGP. Como se esperaba, los pacientes con EC de larga data, con más de 2 años de diagnóstico (grupo II) no presentaron niveles detectables de anticuerpos específicos en suero (Tabla 1, Art I). Tampoco encontramos niveles detectables de estos anticuerpos en las muestras de los voluntarios sanos.

Expresión de las variantes de *splicing* de la TG2 en leucocitos de personas sanas y con enfermedad celíaca.

Son varios los autores que proponen un papel de las variantes de *splicing* de la TG2 en procesos biológicos, ya sea en contexto fisiológico o patológico, pero su papel *in vivo* aún se desconoce <sup>34</sup>. En el trabajo de Phatak et al.<sup>29</sup> se realizó un estudio sistemático de la expresión de todas las variantes de *splicing* en tejidos normales sólidos, sin embargo, aún resta por caracterizar la expresión basal de las variantes de *splicing* en células sanguíneas.

Es por esto por lo que nuestro primer objetivo fue contribuir a este conocimiento caracterizando la expresión de las variantes de *splicing* de TG2 mediante RT-qPCR en poblaciones sanguíneas leucocitarias.

Como resultado de este estudio detectamos en dichas poblaciones celulares la expresión de la TG2 canónica y las cuatro variantes de *splicing* conocidas, siendo TGM2\_vl y TGM2\_v2 las que presentaron expresión predominante. Globalmente estos resultados están en línea con el trabajo de Lai, T.-S. et al. <sup>36</sup> en el que se reportó por primera vez las variantes TGM2\_v4a y 4b, ya que ellos también encontraron que la TGM2\_v1 presenta una expresión predominante por sobre las variantes TGM2\_v4a y 4b en la fracción mononuclear.

El estudio de la asociación entre el *splicing* alternativo de TGM2 y condiciones patológicas se limita a condiciones neoplásicas o neurodegenerativas <sup>29,34,163,164</sup>. Como fue desarrollado en la introducción de esta tesis, la TG2 es central en la cascada patogénica intestinal de la EC <sup>165</sup>. Por otro lado, los leucocitos colonizan los tejidos periféricos desempeñando variadas funciones en las que TG2 participa como la reparación, homeostasis e inflamación.

Considerando este marco de información, hipotetizamos que la desregulación de la funcionalidad de TG2, a través del desbalance de la expresión de las variantes de *splicing* de *TGM2* podría contribuir a los desórdenes intestinales o extradigestivos observados en la EC. Con el objetivo de explorar si la regulación de TG2 y sus variantes de *splicing* podría estar alterada en el contexto de esta patología infamatoria evaluamos la expresión relativa de los ARNm de las variantes en leucocitos periféricos de personas con EC confirmada dado que estas células pueden migrar a los tejidos inflamados y contribuir a la perpetuación del daño.

Como se observa en la **Figura 2 A** (**Art. I**), el patrón de expresión de las variantes de TG2 en pacientes con EC fue similar al observado en individuos sanos pero interesantemente, dentro del grupo de pacientes con EC la expresión de TGM2\_v1 se correlacionó positivamente con la de TGM2\_v2 y TGM2\_v3, lo que no sucedió dentro del grupo control. Considerando la etapa clínica de la enfermedad, observamos que la expresión de TGM2\_v1 fue similar entre ambos grupos de pacientes con EC pero significativamente mayor que en el grupo de individuos sanos (**Figura 2B, Art. I**) Interesantemente la expresión de TGM2\_v3 en el grupo con EC recientemente diagnosticada (grupo I) y no en el de pacientes con más de 2 años de diagnóstico (grupo II) fue mayor que en el grupo control (**Figura 2C, Art. I**).

La TG2 cumple diferentes funciones en las poblaciones celulares que migran a los tejidos periféricos inflamados (incluyendo los extraintestinales) y que contribuyen a la perpetuación del daño en diferentes compartimentos. En este sentido, se destaca particularmente el rol de la TG2 presente en los monocitos/macrófagos en el mantenimiento de la homeostasis y también en la respuesta inflamatoria <sup>166</sup>. Además, como se mencionó previamente una importante infiltración linfocitaria es característica de la lesión celiaca.

En este contexto, y como siguiente paso purificamos de sangre subpoblaciones leucocitarias y evaluamos la expresión de las variantes de TG2. Concretamente comparamos la expresión de las variantes de TG2 en muestras purificadas de monocitos, polimorfonucleares (PMN) y linfocitos de los pacientes con EC y voluntarios sanos.

Como se muestra en la **Figura 3** (Art I) todas las variantes de TG2 fueron detectadas, aunque con niveles variables de expresión en las tres subpoblaciones de leucocitos de ambos grupos de estudio. Interesantemente la expresión de todas las variantes, tanto en monocitos de pacientes con EC como de individuos sanos mostró un rango de valores más amplio que en las otras subpoblaciones. En forma global, el patrón de expresión es similar en pacientes y en individuos sanos, siendo la variante TGM2\_vl la que muestra una expresión predominante en todas las subpoblaciones de leucocitos y significativamente mayor que la expresión de TGM2\_v3, v4a y v4b. En todos los casos los niveles de expresión de TGM2\_vl y v2 fueron similares, con excepción de la subpoblación de linfocitos, donde se observa una expresión mayor de TGM2\_vl.

En suma, encontramos diferencias significativas en la contribución relativa de las variantes en leucocitos totales de individuos con enfermedad celíaca respecto a los sanos que no se reflejaron en ninguna subpoblación leucocitaria particular.

#### Análisis de la expresión de las variantes de *splicing* de TG2 en función de la condición inflamatoria de pacientes con enfermedad celíaca.

La inflamación asociada a la EC en pacientes no tratados remite luego de un largo período de tiempo de adhesión a la DLG en la mayoría de los casos. La etapa de enfermedad activa puede verse reflejada tanto en los niveles de anticuerpos específicos como en varios parámetros inflamatorios. Para analizar este aspecto en este estudio, medimos los niveles séricos de IL-lβ mediante la técnica de ELISA empleando kits comerciales.

A pesar de que en nuestro estudio no se incluyeron pacientes no tratados, se observaron diferencias significativas entre los individuos con EC dependiendo del tiempo de adhesión a la DLG. Observamos que los niveles de IL-1β séricos medidos mediante ELISA fueron significativamente mayores respecto al grupo control en el grupo I de pacientes con diagnóstico más reciente de EC. En contraste los pacientes del grupo II presentaron valores similares a los encontrados en el grupo control (Tabla 1, Art 1).

Complementariamente analizamos la expresión de los ARNm de IL-1β e IL-6 en leucocitos totales mediane RT-qPCR. y encontramos que los pacientes con diagnóstico más reciente de EC presentaron una tendencia a una mayor expresión de ambos marcadores inflamatorios (**Figura 4, Art I**).

En los antecedentes expuestos en la introducción se muestra que la sobreexpresión de la TG2 puede asociarse a un ambiente inflamatorio. En particular la asociación entre TG2 e inflamación es estrecha dado que la expresión de TG2 es regulada por citoquinas proinflamatorias y NF- $\kappa$ B<sup>139-141</sup>. A su vez, en algunos tipos celulares se ha demostrado que la TG2 regula la activación de NF- $\kappa$ B a través de su inhibidor I- $\kappa$ B<sup>142,143</sup> contribuyendo a la patología inflamatoria perpetuada a través de este bucle de amplificación.

Con este contexto y habiendo observado un aumento de marcadores inflamatorios en individuos con EC, analizamos si la expresión de los transcriptos de TGM2 presentaba correlación con la expresión de los ARNm de IL-1β o IL-6 en las muestras de leucocitos.



*Figura 3-1.* Correlación de Pearson de la expresión del mensajero del ARN mensajero de IL-1β con (A) TGM2\_v1 y (B) TGM2\_v2 en leucocitos de paientes del Grupo I (pacientes con enfermedad celíaca de diagnóstico reciente)
Si bien no encontramos correlación entre la expresión de ninguna de las variantes y la de los marcadores inflamatorios en individuos sanos, observamos una correlación positiva entre la expresión del mensajero de la TG2 canónica y la variante TGM2\_v2 con el ARNm de IL-6 solamente en leucocitos de pacientes con EC. Además, en el grupo de pacientes con un perfil serológico más inflamatorio (grupo I), se correlacionaron positivamente los niveles de TGM2\_v1 y la variante TGM2\_v3 con la expresión de IL-1β (**Figura 3-1**). Esta observación resultó de interés ya que TGM2\_v3 es la variante con menor peso molecular (**Figura 1, Art. I**). Si bien las propiedades funcionales de TGM2\_v3 no han sido exploradas, es posible plantear que su actividad TGasa esté afectada, ya que en un estudio sobre la relación de la conformación espacial y la actividad enzimática de TGM2\_v2 <sup>33</sup> se muestra que la perdida de la porción C-terminal resulta en una conformación abierta, con pérdida de la regulación por GTP que regula negativamente la actividad TGasa (**Figura 1-3**). Como consecuencia, la actividad TGasa podría verse potenciada en esta variante, estimulando su actividad inflamatoria a través de la activación de NF-κB<sup>167,168</sup>.

## I.2 La expresión de TG2 y variantes de *splicing* de macrófagos expuestos a estímulos asociados al síndrome antifosfolipídico.

Nos propusimos explorar si los resultados obtenidos en relación con la expresión de la TG2 y sus variantes de *splicing* podrían reproducirse en el microambiente tisular generado en una patología con un claro componente inflamatorio y asociada a complicaciones del embarazo como es el síndrome antifosfolipídico (SAF).

Esta patología está definida por la ocurrencia de trombosis venosa y arterial y/o trastornos en la gestación (abortos, óbitos, nacimientos prematuros, restricción del crecimiento intrauterino y preeclampsia precoz o severa) en presencia de anticuerpos anti-fosfolípidos. Estos anticuerpos integran un grupo complejo, siendo los anticuerpos anti- $\beta$ 2 glicoproteína I (anti- $\beta$ 2GPI) los que se han asociado más claramente con problemas de la gestación <sup>169,170</sup>.

Las células endoteliales, los monocitos/macrófagos y el trofoblasto son los principales blancos de estos anticuerpos y las consecuencias de la interacción pueden mediar algunas de las alteraciones observadas como la trombosis <sup>171,172</sup>.

En particular, los anti- $\beta$ 2GPI son capaces de inducir inflamación en monocitos, disparando cascadas de señalización mediadas por TLR-4 en forma similar al LPS, con fosforilación de IRAK y activación de NF- $\kappa$ B, conduciendo a producción de factor tisular y TNF- $\alpha$  que contribuyen a la patogenia con trombosis y complicaciones asociadas<sup>171,173</sup>.

En base a la relación de la TG2 con la inflamación, estudiamos los efectos de un suero de referencia comercial con IgG anti- $\beta$ 2GPI y sueros de un pequeño grupo de mujeres con SAF (n=6) sobre la expresión de TG2 y sus variantes de *splicing* en las células dTHP-1 representativas de monocitos/macrófagos<sup>174</sup>.

### **Resultados y Discusión**

Los sueros de los pacientes con SAF contenían anticuerpos séricos IgG anti- $\beta$ 2GPI (mediana: 20.6 U; rango: 9.6-53.6, n=6) e IgM anti- $\beta$ 2GPI (mediana:7.5 U; rango: 1-200 U, n=5).

El suero estándar indujo la secreción de IL-6 por las células dTHP-1 en forma dosis dependiente a partir de 20 U. Los sueros de las pacientes a una dilución 1:50 mostraron la misma tendencia a aumentar la producción de IL-6 (mediana: 540 pg/mL; rango: 90-1170 pg/mL, n=5) versus los sueros control (mediana: 300; rango: 280-360 pg/mL, n=3). Resultó interesante observar una variación en la expresión de las variantes de *splicing* en presencia de estos sueros capaces de inducir una respuesta inflamatoria en los macrófagos, ya que se observó un aumento relativo de las variantes truncas TGM2\_v3 y TGM2\_v4a (2.5 y 2.6 veces, p = 0.1 y 0,036 respectivamente en ambos casos, con un n=5).

En términos generales, en esta parte del trabajo mostramos mayor expresión relativa de algunas de las variantes cortas en células inmunes en contexto inflamatorio asociado a patologías vinculadas con trastornos de la gestación.

En línea con estos resultados, se ha reportado una conexión entre la desregulación del *splicing* alternativo de las variantes de TG2 en astrocitos de rata tratados con citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ )<sup>176</sup>. Por otra parte, se ha observado sobreexpresión de la variante TGM2\_v2 en el cerebro de pacientes con Alzheimer, concomitante a un aumento de la actividad TGasa, formación de agregados proteicos insolubles y muerte neuronal <sup>177,178</sup>. Sin embargo, no hay reportes de la expresión de las variantes de *splicing* 

en leucocitos y células derivadas como los macrófagos, en condiciones patológicas asociadas a inflamación.

En base a estos resultados realizamos posteriormente un estudio más sistemático en un modelo *in vitro* de células THP-1 para comprender mejor las condiciones que conducen a la expresión de la TG2 y sus variantes de *splicing*, desde su etapa de diferenciación a partir de monocitos. Debido a la plasticidad funcional y papel de los macrófagos tanto al inicio como en la resolución de la inflamación, estudiamos la TG2 y variantes de *splicing* en macrófagos con un perfil inflamatorio y alternativo.

### **ARTICULO**

Arbildi P, Sóñora C, Del Río N, Marqués JM, Hernández A. Alternative RNA splicing of leucocyte tissue transglutaminase in coeliac disease. Scand J Immunol. 2018 May; 87(5):e12659. doi: 10.1111/sji.12659. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29543397.

\_

DOI: 10.1111/sji.12659

### HUMAN IMMUNOLOGY

### WILEY Immunology

# Alternative RNA splicing of leucocyte tissue transglutaminase in coeliac disease

P. Arbildi<sup>1</sup> | C. Sóñora<sup>1,2</sup> | N. Del Río<sup>1</sup> | J. M. Marqués<sup>3</sup> | A. Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Inmunología, Facultad de Química y Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, Escuela Universitaria de Tecnología Médica, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup>Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, Instituto de Higiene, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

#### Correspondence

A. Hernández, Cátedra de Inmunología, Facultad de Química y Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Email: aherna@fq.edu.uy

#### **Funding information**

Agencia Nacional de Innovación e Investigación; Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, Universidad de la República, Uruguay; Consejo Sectorial de Investigación Científica, Universidad de la República

### Abstract

Tissue transglutaminase is a ubiquitous and multifunctional protein that contributes to several processes such as apoptosis/survival, efferocytosis, inflammation and tissue repairing under physiological and pathological conditions. Several activities can be associated with well-established functional domains; in addition, four RNA alternative splice variants have been described, characterized by sequence divergences and residues deletion at the C-terminal domains. Tissue transglutaminase is recognized as the central player in the physiopathology of coeliac disease (CD) mainly through calcium-dependent enzymatic activities. It can be hypothesized that differential regulation of tissue transglutaminase splice variants expression in persons with CD contributes to pathology by altering the protein functionality. We characterized the expression pattern of RNA alternative splice variants by RT-PCR in peripheral cells from patients with CD under free gluten diet adhesion; we considered inflammatory parameters and specific antibodies as markers of the stage of disease. We found significant higher expression of both the full length and the shortest C-truncated splice variants in leucocytes from patients with CD in comparison with healthy individuals. As tissue transglutaminase expression and canonical enzymatic activity are linked to inflammation, we studied the RNA expression of inflammatory cytokines in peripheral leucocytes of persons with CD in relation with splice variants expression; interestingly, we found that recently diagnosed patients showed significant correlation between both the full length and the shortest alternative spliced variants with IL-1 expression. Our results points that regulation of alternative splicing of tissue transglutaminase could account for the complex physiopathology of CD.

### **1** | **INTRODUCTION**

Transglutaminase type 2 (TG2) is a multifunctional and ubiquitous protein primarily involved in calcium-dependent post-translational modification of proteins. TG2 catalyses the cross-linking of proteins by the formation of isopeptide bonds between  $\gamma$ -carboxamide group of glutamine and  $\epsilon$ -amino group of lysine (TGase activity).<sup>1</sup> TG2 also contributes to the protein aminylation<sup>2</sup> and deamidation of glutamine residues.<sup>3</sup> Independently of this calcium-dependent canonical activity, TG2 acts as a G-protein, participate in signal transduction and has adhesive functions. Through these complex activities, TG2 contributes to several physiological processes such apoptosis/survival, efferocytosis, inflammation and tissue repairing.<sup>4</sup>

These multiple functions can be associated with the structure of TG2 (687aa) which comprise four domains (Figure 1): N-terminal  $\beta$ -sandwich (1-139 aa) that contain integrin and fibronectin-binding sites; the central domain (147-460aa) containing the catalytic core for TGase activity and two C-terminal  $\beta$ -barrels that include a phospholipase C-binding sequence.<sup>5</sup> Residues of the core and  $\beta$ -barrels

WILEY-Immunology

are involved in GTP/GDP binding.<sup>6</sup> Crystallographic data show that an open conformation is associated with a calcium-dependent TGase activity while a closed conformation binds GTP and inhibits transamidating activity.<sup>6-8</sup> In addition, the TG2 homotypic associations through C-terminal residues would be involved in different inter- and intra-cross-linking regulatory activities.<sup>9</sup>

The expression of different TG2 splice variants could contribute to the complex picture of this protein biology; in addition to the constitutively spliced full-length TG2 transcript,<sup>10</sup> four alternative spliced forms of human TG2 have been reported. They are characterized by C-terminal truncated sequences at different extent and divergences in comparison with full-length TG2 transcript (Figure 1). For simplicity, we adopt the nomenclature proposed by Phatak et al<sup>11</sup> according to HUGO Gene Nomenclature Committee: full-length TGM2 v1,<sup>10</sup> TGM2 v2,<sup>12</sup> TGM2 v3,<sup>13</sup> TGM2 v4a and TGM2 v4b.14 The role of TG2 variants in normal cellular function and pathological conditions has been suggested.<sup>15</sup> It is considered that modifications at the C-terminal region might display altered catalytic and signal transduction properties according to structure-function correlation.

The increased TG2 expression and TGase activity dysregulation is a common feature of several diseases;<sup>16,17</sup> particularly, it is recognized as the central player molecule in the pathogenesis of coeliac disease (CD).<sup>18</sup> TG2 expression and activity is increased in the small intestine of patients with active disease;<sup>19</sup> in addition, extradigestive TG2 dysfunction can contribute to extradigestive disorders.<sup>20,21</sup> The inflammatory status of CD can be systemically reflected by the increase in various serological parameters; after



**FIGURE 1** Schematic diagram for TGM2 splicing variants. Shaded grey boxes represent TGM2 protein domains including N-terminal  $\beta$ -sandwich, catalytic core,  $\beta$ -barrel 1 and  $\beta$ -barrel 2. Open box and pattern boxes represent alternate amino acid sequences due to change in reading frames. The numbers represent the amino acid length of each domain and total protein. The TGase catalytic triad: cysteine (C), histidine (H) and aspartic acid (D) are represented at the core domain as well as the position of GTP-binding amino acids (indicated by arrows)

long-term adhesion to gluten-free diet (GFD), these inflammatory parameters and specific serology declines in line with gradual gut mucosal recovery indicating that gluten triggers the disease.<sup>22,23</sup>

TG2 is expressed in mononuclear cells that persist in chronically inflamed tissues such as monocytes/macrophages and polymorphonuclear cells characteristic of acute inflammation. Macrophages are main players in inflammation and tissue damage; both inflammatory and regulatory cytokines could induce TG2 expression and activity in these cells with different outcomes; both classic and alternative macrophage phenotypes have been associated with TG2 upregulation.<sup>24–26</sup>

Up to now, TG2 variants expression in human leucocyte populations has not been explored; it remains possible that expression pattern of alternative TG2 molecules in persons with CD contribute to its dysregulation as this protein is key in inflammation and autoimmune response elicited by patients. To explore this issue, in this work, we characterize TG2 mRNA variants profile in leucocyte populations in health condition and in different stages of CD.

### 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Study group

We studied a group of 17 individuals (16 F and 1 M), median age 40 (range 21-70) with confirmed CD and a control group integrated by 9 healthy individuals (6 F and 4 M), median age 30 years (range 22-55). All patients had small bowel biopsy-proven CD and were adhered to a GFD since diagnosis. For analysis purpose, individuals with CD were grouped according to time since diagnosis confirmation and concomitant adhesion to GFD. Recently CD-diagnosed patients (group I) included those under GFD up to 5 months ago (n = 10 F; median age 48 years, range 27-70) and individuals with long-term GFD compliance since diagnosis integrate group II (6 F and 1 M, median age 33 (range 21-57).

Persons with CD were recruited from the Uruguayan Coeliac Association (ACELU); the participation of voluntary donors was in accordance with the ethical standards of the local human investigation ethical committee (Faculty of Chemistry, Universidad de la República; N° 101900-000371-12).

### **2.2** | Blood samples

Venous blood samples (15-20 mL) were collected from voluntary donors with confirmed diagnoses of CD and healthy individuals in tubes containing EDTA. Samples were immediately used for fractions obtention: total white blood cells (WBC), mononuclear cells (PBMC) and polymorphonuclear cells (PMN). Additionally, 3 mL of blood was collected to separate serum, and conserved at  $-20^{\circ}$ until use. Informed consent for blood sampling was previously obtained from all donors according to Ethical Committee.

### 2.3 | Serological profile

Levels of tissue transglutaminase-specific IgA and IgG antibodies were determined by ELISA using Quanta Lite\_ h-tTG IgA and Quanta Lite\_ h-tTG IgG ELISA; the antigliadin IgG/IgA-specific reactivity was analysed with deamidated gliadin synthetic peptides (Quanta Lite DGP screen; Inova). In all cases, we proceeded according to the manufacturer's instructions (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA, USA). The presence of IL-1 and IL-6 in serum samples was analysed by Standard ABTS ELISA Development Kits (PeproTech, Rocky Hill, USA), with quantification detections being 6 and 8 pg/ mL, respectively.

### 2.4 | Leucocyte fractions purification

PBMC and granulocytes were obtained by density gradient centrifugation onto Hystopaque 1077 (Sigma, St. Louis, USA) by standard method. Blood samples were processed immediately after extraction. Briefly, 20 mL of blood half diluted in isotonic phosphate buffered saline solution was layered and centrifuged at 400 g for 30 minutes at room temperature. Granulocytes were recovered from the pellet and erythrocytes lysed with EL buffer, QIAamp RNA blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). PBMC were recovered from the interface. Freshly isolated PBMC were immediately used for monocytes separation by plastic adherence as previously described.<sup>27</sup>

### 2.5 | RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA from whole blood or leucocytes fractions was isolated using QIAamp RNA blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of RNA was assessed spectrophotometrically by NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) (typical range 0.1-0.8  $\mu$ g/ $\mu$ L RNA). Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse transcribed with random primers (SBS Genetech Co, Beijing, China) using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), at 37°C for 60 minutes according to the manufacturer's instructions.

We tested amplification of sequences of interest from random samples with and without DNAsaI (Fermentas, Burlington, Canada), and with and without M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), discarding the possibility of amplification from gDNA.

### 2.6 | Real-time PCR

Real-time PCR was used to relative quantitation of TG2 variants and proinflammatory cytokines IL-1ß and IL-6, respect to β-actin as housekeeping gene employing Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA). Oligonucleotide primers for TGM2\_v1, \_v2, IL-1 $\beta$ , IL-6 and  $\beta$ -actin were designed using Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA): TGM2\_v1Fw 5'-GCCAGTGCCTGGTCACTAACCA-3', TGM2\_v1Rv 5'-GGCCTTAGCCCTGCAAAGA-3', TGM2 v2Fw 5'-ACCGCTGAGGAGTACGTCTG-3', TGM2\_v2Rv 5'-AATGCTCCAGGAACACAGGGCT-3', IL-18Fw 5'-TTGGTGATGTCTGGTCCATATGA-3', IL-1βRv 5'- GG ACATGGAGAACACCACTTGTT-3', IL-6Fw 5'-TTGGT GATGTCTGGTCCATATGA-3', IL-6Rv 5'- CCGGGAA CGAAAGAGAAGCT -3', β-actinFw 5'-CTCTTCCAGC CTTCCTTCCT-3', β-actinRv 5'- GCGCTTGTGGAGAAG-GAGTT -3'. The sequence of primers for TGM2 v3, v4a and v4b was taken from Phatak et al:11 TGM2 v3Fw 5'-GGTGAGTGGCATGGTCAACT-3' TGM2\_v3Rv 5'AGG GCTCATGACCCACATC-3') TGM2 v4Fw 5'-CCTTAC GGAGTCCAACCTCA-3', and TGM2 v4aRv 5'-CTGG GATGTGGAGGTGCA-3' TGM2\_v4bRv 5'CCTTACGG AGTCCAACCTCA-3'. Using an in silico PCR Geneious Software 11.0.2 (http://www.geneious.com),28 we tested the primer sequences against each transcript sequence, ruling out cross-amplification of different variants. Real-time PCR reactions were performed in a Corbett Rotor-GeneTM 6000 rotary analyzer (initial denaturation: 95°C, 5 minutes; followed by 40 cycles: 95°C, 15 seconds; 60°C, 60 seconds). For all transcripts studied, a ramp temperature from 95 to 60°C was used to generate the melting curves, which were used to check the homogeneity of the amplified transcripts. A no-template control was included to rule out contamination. Relative quantifications were conducted by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (fold increase =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , where  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  sample –  $\Delta Ct$  reference, and  $\Delta Ct = Ct$  of gene of interest – Ct of houskeeping gene);<sup>29</sup> or comparison of  $\Delta$ Ct. All primers showed PCR efficiency >98%.

### 2.7 | Statistics

Mann-Whitney test was applied to compare data from different study groups. Friedman and Dunn's multiple comparison test were used for comparison of paired samples. The Pearson's test was used to analyse the correlation of data. Significance was indicated as:  $*P \le .05$ ,  $**P \le .01$ ,  $***P \le .001$ ,  $****P \le .0001$ ). GraphPadPrism 6 was used for analysis.

### 3 | RESULTS

# **3.1** | TG2 variants mRNA expression in total leucocytes from persons with CD and healthy individuals

In an attempt to evaluate whether the regulation of variant splicing could be modified during the course of CD, we studied the pattern of TG2 isoform mRNA expression in peripheral leucocytes from the whole group of patients with CD in comparison with healthy individuals. As it is depicted in Figure 2A, the pattern of TG2 variants expression in CD patients parallels that observed with leucocytes obtained from healthy individuals, as TGM2 v1 and TGM2 v2 were the most prominently variants expressed in both groups; TGM2 v1 was significantly higher expressed than TGM2\_v3, TGM2\_v4a and TGM2\_v4b (P < .0001). Interestingly, the expression of TGM2 v1 significantly correlated with the expression of TGM2 v2 and TGM2 v3 in the whole group of patients (P = .0014, Pearson r = .7264and P = .006. Pearson r = .6542 respectively) but not in the control group.

Coeliac disease is a chronic disease characterized by an inflammatory lesion in the small intestine; it is considered that no less than 6 months of gluten avoidance is required to heal the intestinal damage.<sup>30</sup> All persons with CD in this

work claimed to be adhered to a GFD since time of diagnosis; to categorize patients according to disease stage, we considered GFD period and different patterns of serological reactivity were observed accordingly (Table 1). Nine of ten patients recently diagnosed, with less than 6 months under GFD (group I) exhibited significant levels of specific antibodies against TG2 and/or gliadin. As it is expected, patients with long-term disease, with more than 2 years since diagnosis (group II) had no detectable levels of specific serum antibodies.

Taking into account the clinical stage of disease, the mRNA expression of the full-length variant TGM2\_v1 and the shortest transcript TGM2\_v3 were similar between these groups and significantly higher (P < .01) in comparison with healthy individuals (Figure 2B and C, respectively).

# **3.2** | TG2 variants mRNA expression in leucocyte subsets from persons with CD and healthy individuals

To further study the expression of TGM2 variants in leucocyte subsets with different contribution to CD pathology, we compared the TGM2 variants expression in purified monocytes, PMN cells and lymphocytes from persons with CD and healthy donors.



**FIGURE 2** TGM2 variants in whole blood leucocytes. A, Relative expression of transcripts for TGM2 variants determined by RT-PCR in whole blood leucocytes isolated from healthy individuals (open bars) and patients with coeliac disease (grey bars). The arrows indicate significant differences in each isoform expression with respect to the full-length TGM2\_v1 variant in the corresponding study group ( $P \le .0001$ ). The differences between the expression level of TGM2 variants between groups are indicated by horizontal bars. The relative expression of TGM2\_v1 (B) and TGM2\_v3 (C) is shown in patients with recently diagnosed disease (group I), patients with long-term disease (group II) and healthy individuals (control group). The box plots show the medians (horizontal lines), range (whiskers) and individual values (points). The differences with respect to the full-length variant TGM2\_v1 are indicated with asterisks

**TABLE 1** Immunological parameters in serum of patients with coeliac disease

	Time	Specific antibody markers (AU)			
Patients	from diagnosis	DGP IgG/IgA	TG2 IgA	TG2 IgG	IL-1 (pg/mL)
Group I	(weeks)				
1	4	166	87	nd	nd
2	4	48	nd	nd	141
3	4	39	28	70	nd
4	1	37	23	nd	nd
5	3	nd	21	nd	39
6	20	42	nd	nd	nd
7	16	nd	nd	nd	0.7
8	16	55	76	nd	191
9	5	66	nd	nd	31.7
10	12	78	23	nd	-
Group II	(years)				
11	11	nd	nd	nd	nd
12	3	nd	nd	nd	nd
13	13	nd	nd	nd	nd
14	9	nd	nd	nd	nd
15	11	nd	nd	nd	127
16	11	nd	nd	nd	5.2
17	2	nd	nd	nd	nd

All persons with CD adhered GFD since diagnosis confirmation. nd, non-detected; AU, Arbitrary Units; DGP, deamidated gliadin peptides.

We found substantial expression of mRNA coding for all TGM2 isoforms at variable levels according to the studied cell population. Remarkably, we show a wider range of expression among healthy and individuals with CD for TG2 variants in monocytes. Globally, the results show a similar pattern in patients and healthy individuals; as it is described in Figure 3, the full-length variant TGM2\_v1 showed the most prominent expression in all leucocyte populations, with significant higher expression than TGM2\_v3, TGM2\_v4a and TGM2\_v4b. The expression level of TGM2\_v1 and TGM2\_v2 was similar in all cases, except for lymphocytes from patients with CD, which expressed significant higher expression of TGM2\_v1. Nevertheless, no significant differences were observed regarding the expression of each TGM2 variant, between healthy and individuals with CD among all cell subsets.

## 3.3 | TG2 variants mRNA expression and inflammatory condition in persons with CD

The immune-mediated inflammation associated with untreated CD normalizes after long-term GFD in most

-Immunology-WILEY

patients. The stage of the disease can be reflected by specific serology and several inflammatory markers.<sup>22</sup> Although untreated patients are not included in our study, significant differences were observed among treated patients with CD, according to the time of GFD adherence. The level of serum IL-1 was significantly higher in the group of patients diagnosed compared with control recently group (P = .029); in contrast, the group of patients with longterm disease and control group exhibited similar levels of serum IL-1 (Table 1). Then, we studied whether the inflammatory condition was also reflected in the mRNA expression of IL-1 and IL-6 in leucocytes. Our results show that patients with recently diagnosed CD had higher expression of IL-1 and IL-6 mRNA in comparison with control group, although the differences were not statistically significant (Figure 4).

As TG2 overexpression can be associated with inflammatory conditions, we next analysed if the expression of the full-length transcript TGM2\_v1 correlated with any IL-1 or IL-6 mRNA in the WBC obtained from persons with CD as these peripheral leucocytes can migrate into tissues and contribute to local inflammation. Our results show significant correlation between the expression of full-length TGM2\_v1 as well as truncated TMG2\_v2 variants with IL-6 mRNA expression in leucocytes from patients with CD (Pearson r = .5446; P < .0292 and r = .5507; P < .027respectively; n = 10).

In addition, only the group of patients with recently diagnosed CD showed significant correlation between IL-1 mRNA expression with canonical TGM2\_v1 and alternative spliced TGM2\_v3 in peripheral WBC (Pearson r = .8091 and P < .015 and r = .7282 and P < .0405, respectively; n = 8). In line with these results, the group of patients with recently diagnosed CD exhibited significant higher levels of IL-1 in serum (Table 1), although the source of this cytokine was not determined. In contrast, no significant correlation of the expression of inflammatory cytokines with any TGM2 splice variants was observed in cells from healthy individuals.

### 4 | DISCUSSION

The role of several TG2 spliced variants in biological processes in healthy and pathological conditions has been proposed by several authors, but their role in vivo is still unknown.<sup>15</sup> A systematical study about the expression of all TGM2 spliced variants in normal solid tissues was described;<sup>11</sup> in this work, the authors found variable contributions of all variants depending on tissue, with an overall predominance of the full-length TGM2\_v1 and significant correlation among their expression. Nevertheless, a comprehensive study of the basal expression TGM2 variants in



### TGM2\_variants

**FIGURE 3** TGM2 variants in leucocytes populations. Relative expression of transcripts for TGM2 variants determined by RT-PCR in purified fractions of blood leucocytes obtained from healthy individuals (white bars, left panel) and patients with coeliac disease (grey bars, right panel). The box plots show the medians (horizontal lines), range (whiskers) and individual values (points). The differences with respect to the full-length variant TGM2\_v1 are indicated with asterisks



**FIGURE 4** Inflammatory cytokines in whole blood leucocytes. Relative expression of RNA transcript for IL-1 (A) and IL-6 (B) in whole blood leucocytes isolated from patients with recently diagnosed CD (group I), patients with long-term CD (group II) and healthy individuals (control group). The box plots show the medians (horizontal lines), range (whiskers) and individual values (points). The differences with respect to control group are indicated with asterisks

white blood cells was lacking. Thus, our first aim was to contribute to this knowledge by studying all TGM2 variants expression in leucocyte populations isolated from blood of healthy individuals.

We found detectable mRNA expression of all TGM2 variants in samples from most individuals; in leucocyte fractions, TGM2\_v1 was significantly more expressed than TGM2\_v3, TGM2\_v4a and TGM2\_v4b while TGM2\_v2 was expressed in similar levels than full-length transcript.

Globally, these results are in line with the original report that characterized TGM2\_v4a and TGM2\_v4b as the authors found about 4-5-fold expression of the full-length mRNA transcript in the mononuclear cell fraction.<sup>14</sup> In present work, we further dissect the analysis of mononuclear cells by purifying monocytes and lymphocytes. Differences between expression pattern of TGM2\_v4a and TGM2\_v4b in both populations merit further study on the basis of TG2 relevance in monocytes/macrophage functions.<sup>31</sup>

Regarding expression of TGM2\_variants in PMN cells, Lai et al<sup>14</sup> also found higher levels of TGM2\_v1 in comparison with TGM2\_v4b; in contrast to our data, they reported double level of TGM2\_4a in PMN cells in comparison with TGM2\_v1.

The study of the association between TGM2 alternative splicing and pathological conditions is limited to neoplasic and neurodegenerative conditions.<sup>11,15</sup> In particular, the link between TG2 and inflammation is widely known because the TG2 promoter has response elements for proinflammatory cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) and NF- $\kappa$ B.<sup>32-34</sup> Besides, TG2 can promote sustained inflammation through NF- $\kappa$ B pathway by cross-linking the inhibitor factor I- $\kappa$ B<sup>35,36</sup> and TG2 might contribute to inflammatory pathology perpetuation through this amplificatory loop.

TG2 plays a central role in the pathogenesis of CD through the generation by TGase activity of neoepitopes of gluten that are efficiently presented by APC in the gut compartment. This is the main step in the inflammatory pathogenic cascade that leads to the gut lesion.<sup>23</sup> In

addition, the extradigestive disorders are frequently observed in patients with CD and the aberrant expression and/or function of TG2 can also be implicated.<sup>21</sup>

The white blood immune cells colonize peripheral tissues and play several functions that are regulated by TG2, such as repairing, inflammation and homeostasis. Taken together, we hypothesize that the dysregulation of TG2 activity through the regulation of alternative processing of the TGM2 transcript could contribute to intestinal and extradigestive disorders in CD.

As a first approach to explore this issue, we analysed the expression of mRNA TGM2 transcription variants in peripheral leucocytes of treated patients with CD because these cells can ultimately migrate to inflamed tissues and contribute to damage perpetuation in different compartments. In particular, the role of TG2 in monocyte/macrophage function in homeostasis and inflammatory conditions is remarkable.<sup>31</sup> In addition to classical inflammatory cells, increased lymphocytic infiltration is a hallmark of coeliac lesion;<sup>37</sup> thus, we aimed to study its expression in different leucocyte populations.

Our results show that treated patients with CD have enhanced expression of TGM2\_v1 and TGM2\_v3 independently of the stage of disease; nevertheless, the significant correlation observed between the expression of both splice variants with the inflammatory status of the patients suggests an involvement of the TGM2 alternative splicing regulation in this pathology. In line with these results, we recently reported the upregulation of alternative spliced variants in another autoimmune and inflammatory condition; TGM2\_v3 was induced by anti- $\beta$ 2 glycoprotein antibodies in macrophage-like differentiated THP-1 cells in parallel with an increased IL-1 and IL-6 production. These results are in accordance with the regulatory loop between TG2 and inflammation, but the consequences on cell function are still unknown.<sup>38</sup>

The link between expression of an alternative spliced variant and dysregulation of TGase activity was reported in proinflammatory cytokines treated rat astrocytes.<sup>39</sup> In

WILEY- Immunology

addition, elevated expression and higher cross-linking activity of the most widely studied short variant (TGM2\_v2) was reported in the brain of patients with Alzheimer disease, concomitantly with the formation of characteristic insoluble aggregates and neuronal death.<sup>40,41</sup>

Nevertheless, no information is available about functional properties of the shortest isoform TGM2\_v3, initially described in an erythroleukemic cell line.<sup>13</sup> The lack of 338 residues and divergent sequence in the C-terminal region could considerably affect enzymatic and signal transduction functions.

According to a recent study about spatial conformation of TGM2\_v2,<sup>42</sup> C-terminal truncation would result in a protein with an open conformation, lacking GTP-binding sites and proapoptotic properties in NIH3T3 transfected cells; thus, an open conformation could also be speculated for TGM3\_v3 although this issue warrants further investigation.

Unfortunately, the evidence of TG2 C-truncated variants in primary cells at the protein level and the impact on cell function is still poorly studied. In relation with human leucocytes, the presence of the protein corresponding to the short variant TGM2\_v4a was detected by immunoblot in peripheral mononuclear cells.<sup>14</sup> Besides, after retinoic acid treatment, short TG2 molecules were detected in erythroleukemia cells.<sup>43</sup> These data argue in favour of the expression of truncated TG2 molecules in white blood cells.

Our results point that TG2 alternative splicing could account for the complex CD physiopathology in patients with CD. The functional consequences of the increased expression of the C-terminal truncated TGM2\_v3 variant is under investigation in cells that contribute to aberrant control of inflammation and homeostatic mechanisms in other peripheral tissues often affected in CD.

### ACKNOWLEDGMENT

Authors thank patients and ACELU (Asociación Celíaca del Uruguay) for cooperation.and Lic. Ana Combol for assistance for blood sample obtaining. This work was supported by PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas), CSIC (Consejo Sectorial de Investigación Científica) and ANII (Agencia Nacional de Innovación e Investigación).

### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors report no conflicts of interest.

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

P.A., C.S. and N.D.R. performed the research; J.M. contributed to discussion of technical aspects; A.H. and P.A. designed the research study and analysed the data.

### ARBILDI ET AL.

### ORCID

- P. Arbildi D http://orcid.org/0000-0001-9206-8667
- C. Sóñora D http://orcid.org/0000-0002-2993-7513
- A. Hernández D http://orcid.org/0000-0001-5189-0208

### REFERENCES

- Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:140-156.
- Lai TS, Lin CJ, Greenberg CS. Role of tissue transglutaminase-2 (TG2)-mediated aminylation in biological processes. *Amino Acids*. 2017;49:501-515.
- Stamnaes J, Fleckenstein B, Sollid LM. The propensity for deamidation and transamidation of peptides by transglutaminase 2 is dependent on substrate affinity and reaction conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1784:1804-1811.
- Eckert RL, Kaartinen MT, Nurminskaya M, et al. Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol Rev.* 2014;94:383-417.
- Fesus L, Piacentini M. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci.* 2002;27:534-539.
- Liu S, Cerione RA, Clardy J. Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:2743-2747.
- Pinkas DM, Strop P, Brunger AT, Khosla C. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLoS Biol.* 2007;5:e327.
- Han B-G, Cho J-W, Cho YD, Jeong K-C, Kim S-Y, Lee BI. Crystal structure of human transglutaminase 2 in complex with adenosine triphosphate. *Int J Biol Macromol.* 2010;47:190-195.
- Kim N, Lee WK, Lee SH, et al. Inter-molecular crosslinking activity is engendered by the dimeric form of transglutaminase 2. *Amino Acids*. 2017;49:461-471.
- Gentile V, Saydak M, Chiocca EA, et al. Isolation and characterization of cDNA clones to mouse macrophage and human endothelial cell tissue transglutaminases. *J Biol Chem.* 1991;266:478-483.
- Phatak VM, Croft SM, Rameshaiah Setty SG, et al. Expression of transglutaminase-2 isoforms in normal human tissues and cancer cell lines: dysregulation of alternative splicing in cancer. Amino Acids. 2013;44:33-44.
- Fraij BM, Birckbichler PJ, Patterson MK, Lee KN, Gonzales RA. A retinoic acid-inducible mRNA from human erythroleukemia cells encodes a novel tissue transglutaminase homologue. J Biol Chem. 1992;267:22616-22623.
- Fraij BM, Gonzales RA. A third human tissue transglutaminase homologue as a result of alternative gene transcripts. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1306:63-74.
- Lai T-S, Liu Y, Li W, Greenberg CS. Identification of two GTPindependent alternatively spliced forms of tissue transglutaminase in human leukocytes, vascular smooth muscle, and endothelial cells. *FASEB J.* 2007;21:4131-4143.
- Lai T-S, Greenberg CS. TGM2 and implications for human disease: role of alternative splicing. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013;18:504-519.
- Beninati S, Piacentini M, Bergamini CM. Transglutaminase 2, a double face enzyme. *Amino Acids*. 2017;49:415-423.

Immunology-WILEY

- Di Sabatino A, Vanoli A, Giuffrida P, Luinetti O, Solcia E, Corazza GR. The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun Rev.* 2012;11:746-753.
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 1997;3:797-801.
- Meresse B, Ripoche J, Heyman M, Cerf-Bensussan N. Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol.* 2009;2:8-23.
- Leffler DA, Green PHR, Fasano A. Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12:561-571.
- Sóñora C, Muñoz F, Del Río N, et al. Celiac disease and gyneco-obstetrics complications: can serum antibodies modulate tissue transglutaminase functions and contribute to clinical pattern? *Am J Reprod Immunol.* 2011;66:476-487.
- Tack GJ, van Wanrooij RLJ, Von Blomberg BME, et al. Serum parameters in the spectrum of coeliac disease: beyond standard antibody testing – a cohort study. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:159.
- 23. Sollid LM, Jabri B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:294-302.
- Frisdal E, Lesnik P, Olivier M, et al. Interleukin-6 protects human macrophages from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. *J Biol Chem.* 2011;286:30926-30936.
- Yamaguchi M, Zacharia J, Laidlaw TM, Balestrieri B. PLA2G5 regulates transglutaminase activity of human IL-4-activated M2 macrophages through PGE2 generation. *J Leukoc Biol.* 2016;100:131-141.
- Mehta K, Lopez-Berestein G, Moore WT, Davies PJ. Interferongamma requires serum retinoids to promote the expression of tissue transglutaminase in cultured human blood monocytes. *J Immunol.* 1985;134:2053-2056.
- Tiscornia I, Sánchez-Martins V, Hernández A, Bollati-Fogolín M. Human monocyte-derived dendritic cells from leukoreduction system chambers after plateletpheresis are functional in an in vitro co-culture assay with intestinal epithelial cells. *J Immunol Meth*ods. 2012;384:164-170.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28:1647-1649.
- 29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- Fasano A, Catassi C. Celiac disease. N Engl J Med. 2012;367:2419-2426.
- Chrobok NL, Sestito C, Wilhelmus MMM, Drukarch B, van Dam AM. Is monocyte- and macrophage-derived tissue transglutaminase involved in inflammatory processes? *Amino Acids*. 2017;49:441-452.

- Kuncio GS, Tsyganskaya M, Zhu J, et al. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. *Am J Physiol.* 1998;274:G240-G245.
- Lu S, Saydak M, Gentile V, Stein JP, Davies PJ. Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem.* 1995;270:9748-9756.
- Johnson K, Hashimoto S, Lotz M, Pritzker K, Terkeltaub R. Interleukin-1 induces pro-mineralizing activity of cartilage tissue transglutaminase and factor XIIIa. *Am J Pathol.* 2001;159:149-163.
- Lee J, Kim Y-S, Choi D-H, et al. Transglutaminase 2 induces nuclear factor-κB activation via a novel pathway in BV-2 microglia. J Biol Chem. 2004;279:53725-53735.
- Mann AP, Verma A, Sethi G, et al. Overexpression of tissue transglutaminase leads to constitutive activation of nuclear factorκB in cancer cells: delineation of a novel pathway. *Cancer Res.* 2006;66:8788-8795.
- Jabri B, Sollid LM. T cells in celiac disease. J Immunol. 2017;198:3005-3014.
- Arbildi P, Grasso E, Rodríguez-Camejo C, et al. β2GPI-specific antibodies induce pro-inflammatory mediators and tissue transglutaminase differential variant expression on trophoblast cells and monocytes-macrophages. *Placenta*. 2017;51:111.
- Monsonego A, Shani Y, Friedmann I, Paas Y, Eizenberg O, Schwartz M. Expression of GTP-dependent and GTP-independent tissue-type transglutaminase in cytokine-treated rat brain astrocytes. J Biol Chem. 1997;272:3724-3732.
- Citron BA, SantaCruz KS, Davies PJA, Festoff BW. Intronexon swapping of transglutaminase mRNA and neuronal Tau aggregation in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 2001;276: 3295-3301.
- Citron BA, Suo Z, SantaCruz K, Davies PJA, Qin F, Festoff BW. Protein crosslinking, tissue transglutaminase, alternative splicing and neurodegeneration. *Neurochem Int.* 2002;40:69-78.
- Singh G, Zhang J, Ma Y, Cerione RA, Antonyak MA. The different conformational states of tissue transglutaminase have opposing affects on cell viability. *J Biol Chem.* 2016;291:9119-9132.
- Fraij BM. Induction and translocation of tissue transglutaminase isoforms increased phosphorylation in retinoic acid treated erythroleukemia cells. *Protein J.* 2013;32:426-434.

How to cite this article: Arbildi P, Sóñora C, Del Río N, Marques JM, Hernández A. Alternative RNA splicing of leucocyte tissue transglutaminase in coeliac disease. *Scand J Immunol.* 2018;87:e12659. https://doi.org/10.1111/sji.12659

## PARTE II: LA TG2 EN MONOCITOS Y MACRÓFAGOS DURANTE SU DIFERENCIACIÓN Y EN SUS DIFERENTES PERFILES DE ACTIVACIÓN.

Los macrófagos representan una de las poblaciones celulares más pleiotrópicas del sistema inmune. Están presentes en todos los tejidos del cuerpo con un rol indispensable en la activación, instrucción y finalización de la respuesta inmune. Estas células tienen un origen embrionario o son derivados de monocitos circulantes, que ingresan en condiciones de homeostasis e inflamación y se diferencian a células efectoras por señales del microambiente tisular <sup>179</sup>. A pesar de su diversidad se pueden definir algunas funciones generales como la fagocitosis de patógenos y restos celulares (eferocitosis), el procesamiento y presentación de antígenos iniciando el desarrollo de respuestas inmunes y la secreción de citoquinas <sup>180,181</sup>.

La polarización de los macrófagos implica un proceso en el que estos, en respuesta a señales de su entorno adquieren un fenotipo y funcionalidad particular <sup>182</sup>. Existen dos subpoblaciones como extremos del espectro de polarización con funciones diferentes que incluyen los macrófagos clásicamente activados o inflamatorios (M1) y los alternativamente activados o antiinflamatorios (M2) <sup>106</sup>. Si bien ambos fenotipos extremos pueden identificarse *in vivo*, la mayoría de los macrófagos M1 se requiere predominantemente durante las primeras etapas de la inflamación, donde actúa liberando mediadores inflamatorios, atrayendo leucocitos y proporcionando defensa contra microorganismos <sup>182</sup>. En etapas tardías del proceso de inflamación, el fenotipo de macrófagos tipo M2 exhibe funciones vinculadas a la remodelación y reparación de tejidos contribuyendo a resolver el proceso inflamatorio <sup>183</sup>. Para proteger los tejidos del daño, la inflamación crónica es inhibida por mecanismos regulatorios dirigidos por la función antiinflamatoria de los macrófagos M2.

### Estudio de los macrófagos en modelos in vitro.

Los estudios de monocitos y macrófagos frecuentemente se ven obstaculizados por las cantidades limitadas de monocitos humanos disponibles y la variabilidad interindividual que afecta a los macrófagos derivados de estos. Por lo tanto, las líneas celulares monocíticas se utilizan con frecuencia en diferentes áreas de investigación para estudiar

las funciones inmunológicas de dichas células <sup>184</sup>. La línea celular THP-1 fue aislada por Tsuchiya et al. de la sangre periférica de un paciente con leucemia monocítica aguda <sup>185</sup> y comparte características con el monocito humano tales como la morfología, los productos de secreción, la expresión de oncogenes, antígenos de membrana y de genes implicados en el metabolismo de los lípidos <sup>186</sup>. El trabajo con una línea celular como THP-1 ofrece la ventaja de representar una población homogénea, eliminando los problemas de variabilidad dependiente del donante, facilitando notablemente el análisis experimental. Además, puede expandirse fácilmente *in vitro* y almacenarse en nitrógeno líquido en su estado no diferenciado <sup>187</sup>.

Las células THP-1 en el estado de premonocítico se pueden diferenciar en un fenotipo similar a los macrófagos utilizando distintos agentes como forbol-12- miristato-13-acetato (PMA), 1α,25-dihidroxivitamina D (vD3) o el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Se considera que el PMA es el agente de diferenciación más eficaz para obtener macrófagos derivados de monocitos THP-1 (dTHP-1) <sup>187</sup>. Bajo la influencia del PMA u otros estímulos, las células THP-1 dejan de proliferar y adquieren una mayor adherencia a las placas de cultivo <sup>186</sup>. Luego de la diferenciación, adquieren un fenotipo similar a los macrófagos, que reproduce las características de estas células en varios aspectos <sup>188</sup>.

Las propiedades de los macrófagos con perfiles tipo M1 o M2 también se pueden reproducir en modelos *in vitro*, mediante la incubación con distintos agentes polarizantes. Esta metodología experimental está diseñada para aproximarse a la situación *in vivo* en la cual los macrófagos se exponen a distintas combinaciones de citoquinas, por ejemplo, IFN-γ para respuestas del tipo 1<sup>106</sup> e IL-4, IL-13 o TGF-β para respuestas de tipo 2<sup>189</sup>. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la población de macrófagos que se obtiene *in vitro* no es estrictamente representativa de la situación *in vivo*. Las condiciones experimentales no alcanzan la complejidad de las señales del microambiente en diversos tejidos, en los que pueden contribuir otros mediadores solubles e interacciones con otros tipos celulares, como se describió anteriormente para el contexto de la interfase materno-fetal.

## Posible rol de las variantes de *splicing* de TG2 en el proceso de diferenciación y en los diferentes perfiles de activación de los macrófagos

La TG2 está involucrada en varios de los procesos fisiológicos mediados por monocitos y macrófagos, tanto en condiciones inflamatorias como en el mantenimiento de la homeostasis e inmunoregulación <sup>166,190</sup>.

La diferenciación de monocito a macrófago es un proceso que está asociado al incremento de expresión de la TG2 y la actividad TGasa, en paralelo con los cambios funcionales y morfológicos característicos. Si bien no se conoce el papel de la TG2 en la diferenciación, se considera que tanto las funciones enzimáticas como las adhesivas podrían estar implicadas, este conocimiento ha surgido tanto de protocolos de diferenciación de monocitos humanos periféricos o de la línea THP-1<sup>50,150,151,191–193</sup>.

A su vez, la expresión de la TG2 en monocitos y macrófagos es inducida por estímulos inflamatorios en base a la presencia de los elementos de respuesta a NF- $\kappa$ B e IL-6 ubicados en el promotor de la TG2 <sup>140,194</sup> (**Figura 1-4**). En monocitos y macrófagos humanos se observó el aumento de la expresión de TG2 con mediadores inflamatorios potentes como el IFN- $\gamma$  o LPS <sup>23,50,195-197</sup>.

Por otra parte, se ha propuesto a la TG2 como un marcador del perfil M2 de los macrófagos y varios trabajos *in vitro* con macrófagos diferenciados de monocitos periféricos o THP-1 han mostrado que su expresión es inducida por la IL-4<sup>198-201</sup>.

En relación con el perfil M2 la TG2 está involucrada en las etapas de resolución de la inflamación, contribuyendo a la reparación tisular y homeostasis mediada por macrófagos con un perfil alternativo o regulador <sup>202</sup>. Es así como la TG2 participa en el proceso de eferocitosis por los macrófagos como se describió en la introducción general.

Como se mencionó anteriormente, un trabajo previo de nuestro grupo puso en evidencia el rol de la TG2 de superficie en la esferocitosis, observándose que la fagocitosis de células trofoblásticas apoptóticas resultó limitada en presencia de autoanticuerpos específicos contra la enzima <sup>136</sup>. Es posible que la enzima intracelular también participe en cascadas de señalización involucradas en la eferocitosis <sup>190</sup>.

Por otra parte, el *splicing* alternativo es un proceso que puede afectar la funcionalidad de las proteínas <sup>203</sup> y por lo tanto podría impactar sobre la función de la TG2 en la eferocitosis entre otras funciones.

En base a la función dual de los macrófagos de la interfase materno-fetal, tanto en un microambiente inflamatorio como en la homeostasis y reparación tisular, nos propusimos extender el estudio de las variantes de *splicing* de la TG2 a este tipo celular. Esta parte del trabajo se centra en el estudio de la expresión de la TG2 y variantes de *splicing* con el proceso de diferenciación desde monocito a macrófago y en los estados de polarización M1 o M2 en el modelo de células THP-1.

### Resultados y discusión

# Análisis de la expresión de las variantes de *splicing* durante la diferenciación de macrófagos

Las dificultades asociadas a la purificación de monocitos en cantidad suficiente a partir de sangre periférica y la variabilidad interindividual nos orientó a realizar los estudios en la línea celular THP-1 ampliamente utilizada como modelo de monocito y macrófago. Para la diferenciación de las células a macrófagos (dTHP) usamos el agente de diferenciación PMA, extensamente empleado en estudios previos <sup>187,204</sup>. A pesar de las ventajas de disponibilidad y reproducibilidad asociadas al uso de línea celular, en este caso particular hay una gran diversidad de protocolos que difieren en la concentración de PMA, densidad celular, tiempo de estimulación y de posterior reposo celular que dificultan la comparación de resultados obtenidos en distintos trabajos <sup>204,205</sup>. Chanput et al <sup>187</sup> establecieron que el tratamiento con 100 ng/mL por al menos 48h, seguido de 24 h de reposo garantiza una diferenciación completa de las células THP-1 a macrófagos. Adicionalmente, el uso de 100 ng/mL PMA durante un período más breve (24h) seguido de período de reposo de seis días, se ha propuesto como un protocolo más compatible con un fenotipo MO como punto de partida para la polarización a M2 <sup>206</sup>.

En primera instancia estudiamos la expresión del ARN mensajero de la TG2 canónica y las variantes de *splicing* en la línea premonocítica THP-1 y los cambios inducidos por PMA durante la diferenciación a macrófagos. Tomando en consideración las variaciones reportadas en cuanto al fenotipo adquirido bajo diferentes condiciones de diferenciación, optamos por ensayar dos protocolos experimentales de los previamente reportados: 500 ng/mL PMA durante 72 h seguido de un reposo de 48 h (condición I) y 100 ng/mL PMA durante 24 h seguido de un reposo de 6 días (condición II). En cada una de las condiciones estudiadas se verificaron los cambios en la adhesión y morfología celular caractarísticos mediante microscopía óptica (**Figura 1, Art II**). En ambas condiciones realizamos el seguimiento de la expresión de TG2 y variantes de *splicing* por RT-PCR. Observamos un aumento en la expresión del mensajero de la TG2 canónica y las variantes cortas inmediatamente luego de la incubación con PMA, encontrando un incremento 10 veces mayor (en promedio) en la condición I en comparación a la condición II (**Tabla 1, Art. II**). Los niveles aumentados de todas las variantes de TG2 se sostienen durante 48 h en ambas condiciones (**Figura 2, Tabla 1, Art II**). En términos generales, nuestros resultados están en concordancia a los reportes previos que muestran un aumento de la expresión de la TG2 canónica en repuesta a PMA <sup>193</sup>. Sin embargo, observamos diferencias en cuanto a la magnitud de los incrementos en relación con las condiciones experimentales ensayadas, lo que hace énfasis en la necesidad de considerar los protocolos empleados al hacer comparaciones con la bibliografía reportada.

Como se mencionó anteriormente, el agente PMA induce la expresión de mediadores inflamatorios<sup>188</sup>; este efecto se evidencia en nuestros resultados, en la Figura 3C (Art II) donde se muestra que las dTHP-1 obtenidas en la condición I producen niveles mayores de IL-1β y TNF-α que las THP-1 diferenciadas en la condición II luego del período de descanso. Algunos mediadores inflamatorios se asocian a la regulación de la expresión de TG2 a nivel transcripcional <sup>193,207</sup> a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa B^{140,194}$ . De modo que, en parte, las variaciones observadas en la expresión de TG2 podrían deberse a un efecto indirecto del estímulo de vías inflamatorias por PMA. En particular, nuestros resultados con relación a la alta expresión relativa de las variantes cortas de TG2 en la diferenciación a macrófagos en la condición I (Figura 2A, Art II) podrían también relacionarse al contexto más inflamatorio de este protocolo asociado a la mayor dosis de PMA. En línea con estos resultados, como se mencionó en la primera parte de resultados de este capítulo la expresión de variantes cortas de la TG2 asociada a condiciones inflamatorias se describió en astrocitos de rata y patologías neurodegenerativas <sup>176-178</sup> aunque no hay reportes de este fenómeno en la diferenciación de monocitos en condiciones inflamatorias.

En cuanto a las funciones enzimáticas, hay trabajos previos que describen un aumento de la actividad TGasa en la diferenciación de células THP-1 con TPA, un análogo del PMA <sup>191</sup>. Por otro lado, debido a la falta del sitio de unión a GTP ubicado en los dominios C-terminales la regulación de la actividad TGasa puede verse alterada en las variantes cortas que se vuelven insensibles a la inhibición mediada por GTP, mostrando una actividad aumentada en respuesta a incrementos transitorios en los niveles de calcio intracelular <sup>32,36,176,208</sup>. Por lo que no puede descartarse que un incremento en la

expresión de las variantes cortas tenga un impacto en la actividad TGasa y en última instancia en la función celular.

La expresión de TG2 y variantes de *splicing* en macrófagos tipo M1 y M2 Como siguiente etapa en nuestro trabajo estudiamos la expresión de las variantes de *splicing* de TG2 en respuesta a un estímulo inflamatorio fuerte. Con este objetivo, las células THP-1 diferenciadas tanto con la condición I como con la II fueron tratadas con 20 ng/mL de IFN- $\gamma$ . Como se muestra en la **Figura 3** (Art II), independientemente del protocolo ensayado, observamos inducción de la expresión de los mensajeros de la TG2 canónica (TGM2\_vl). Este resultado está de acuerdo con reportes previos que muestran que tanto la incubación con citoquinas proinflamatorias como con LPS regulan al alza la expresión de TG2 en dTHP-1<sup>196</sup>. Sin embargo, no existen estudios previos sobre la regulación de las variantes de *splicing* por la inflamación en macrófagos.

En este estudio analizamos las contribuciones relativas de las variantes de *splicing* de TG2 en relación con la de TGM2\_vl en cada condición de diferenciación. Observamos inducción de la expresión de todas las variantes truncas con ambos protocolos (**Figura 3A y 3B, Art II**). Se destaca la tendencia a una mayor contribución de TGM2\_v3 en la condición I (**Figura 3A, Art II**), asociada a un contexto más inflamatorio (**Figura 3C, Art II**). En contraste, en la condición 2 se observa una contribución relativa similar de todas las variantes truncadas (**Figura 3B, Art II**).

En la siguiente etapa del trabajo, y fundamentándonos en el papel de TG2 en la homeostasis y reparación tisular, nos enfocamos en comparar la expresión de las variantes de *splicing* de TG2 asociadas a los perfiles de polarización tipo M1 y M2, inducidos por IFN-γ e IL-4 respectivamente. Basándonos en los niveles de citoquinas proinflamatorias elevados observados en las dTHP-1 en la condición I (**Figura 3C, Art II**), sumado a los reportes en los que se muestra aumento de expresión de genes inflamatorios con concentraciones elevadas de PMA <sup>188</sup>; podemos plantear que las células diferenciadas en la condición I son más propensas a adquirir un fenotipo tipo M1. Adicionalmente son varios los reportes que muestran que un reposo de al menos 5 días luego del tratamiento con PMA, favorecería la diferenciación a un estado M0, con la capacidad funcional de adaptarse al estímulo prevalente <sup>184,204,206</sup>. Por esos motivos, los ensayos de polarización se realizaron sobre las dTHP diferenciadas en la condición II.

Para iniciar la caracterización analizamos la expresión de un panel de genes típico de los perfiles M1 y M2 para confirmar la polarización de las células dTHP-1 luego del

tratamiento con estímulos de polarización clásicos IL-4 o IFN-y<sup>206,209</sup>. Encontramos que luego del tratamiento con IFN-γ se observa una expresión relativa mayor del mensajero de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ), CXCLII e indoleamina 2,3-dioxigenasa (INDO). En contraste, en las células tratadas con IL-4 encontramos un aumento de los mensajeros de CCLI3, MRC1 e IL-10 (Figura 4A, Art II). En paralelo analizamos la producción de citoquinas medidas en sobrenadante con la técnica de ELISA. Como se muestra en la **Figura 4B** (Art. II), observamos un aumento significativo de TNF-α junto con una tendencia a mayor producción de IL-1β luego del tratamiento con IFN-γ con relación al tratamiento con IL-4. En contraste, no encontramos variación significativa en la producción de IL-10 o CCL22 en respuesta a la IL-4, aunque se observó una tendencia a una mayor producción de esta última. Mientras que hay un gran consenso respecto a los marcadores para caracterizar el estado de polarización de macrófagos derivado de monocitos humanos <sup>210-213</sup>, los datos en la literatura son muy variables respecto a la expresión de marcadores fenotípicos para caracterizar las dTHP-1 polarizadas a perfiles tipo M2. Nuestros resultados confirman lo observado en trabajos previos, mostrando que varios marcadores de macrófagos tipo M1/M2 no se expresan según el patrón esperado en dTHP-1<sup>184,206,209,214</sup>. A pesar de estas limitaciones, nuestro trabajo confirma que las THP-1 poseen la capacidad funcional de responder de acuerdo con el estímulo prevalente.

Considerando que la expresión de las variantes de *splicing* puede influir en la función celular en forma específica <sup>34</sup> e impactar en el desarrollo de enfermedades en las que la TG2 está implicada en el mecanismo patogénico <sup>163,215</sup>, decidimos explorar la expresión de los mensajeros de las variantes de *splicing* en macrófagos con perfiles tipo M1 o M2. Encontramos que tanto en las dTHP-1 diferenciadas al perfil tipo M1 o tipo M2, todas las variantes de TG2 son inducidas (**Figura 3B y Figura 5, Art II**) con predominio de la TGM2\_v1. De acuerdo con nuestros resultados el *splicing* alternativo de TG2 se vería más favorecido en macrófagos diferenciados en un contexto más inflamatorio ya que encontramos una inducción de TGM2\_v1 similar a la de las variantes cortas (**Figura 3A**, **Art II**). Sin embargo, las consecuencias funcionales de los perfiles diferenciales entre macrófagos M1 y M2 no se conocen.

Al analizar los perfiles relativos a TGM2\_vl de las variantes cortas entre macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  e IL-4 se observan diferencias cualitativas. Globalmente nuestros resultados muestran una mayor expresión de TG2 con el tratamiento con IL-4 en comparación al tratamiento con IFN- $\gamma$ . Aunque cabe destacar que en contraste al perfil

observado con el contexto más inflamatorio (**Figura 3A**, **Art II**) en el que predomina la TGM2\_v3, en el perfil tipo M2 se observa una mayor contribución relativa de la TGM2\_v4b (**Figuras 5 y 6, ArtII**).

Interesantemente, la TG2 es propuesta como un marcador de macrófagos de tipo M2, en tanto que su expresión se ve aumentada bajo el estímulo de IL-4 en comparación con citoquinas proinflamatorias en macrófagos derivados de monocitos <sup>198,201,216,217</sup> o THP-1 diferenciadas a macrófagos con PMA <sup>199,218,219</sup>. Adicionalmente el aumento en la expresión del ARNm de TG2 fue asociado con el estado antiinflamatorio de pacientes con esclerosis múltiple y IL-4 podría estar implicada en dicha regulación <sup>199</sup>. Respecto al papel funcional de TG2 en esta patología, los autores plantean que la TG2 expresada en los macrófagos de tipo M2 contribuye a la fagocitosis de la mielina en un mecanismo que es dependiente de IL-4 <sup>218</sup>. De acuerdo con nuestros resultados el *splicing* alternativo de TG2 se vería más favorecido en macrófagos inflamatorios, en tanto que encontramos una inducción de TGM2\_v1 similar a la de las variantes cortas (**Figura 3A, Art. II**) Sin embargo, las consecuencias funcionales de los perfiles con diferente expresión de variantes cortas de *splicing* entre los fenotipos de los macrófagos no se conoce.

En resumen, en esta parte del trabajo se realizó un estudio sistemático de la expresión de las variantes de *splicing* de TG2 en una línea celular derivada de monocitos humanos explorando diversas condiciones experimentales. En términos generales los resultados muestran que el protocolo con menor concentración de PMA y mayor período de reposo es más favorable para ensayar diferentes estímulos de polarización. Adicionalmente podemos plantear que se da una regulación del *splicing* alternativo diferencial dependiendo de la condición de diferenciación, destacándose la mayor expresión de TG2 en presencia de IL-4 y mayor contribución de *splicing* alternativo asociado a macrófagos inflamatorios.

Los resultados de la segunda parte de este capítulo están en línea con los observados en la primera parte en relación con los leucocitos periféricos de los pacientes celíacos y en las dTHP-1 expuestas a sueros de pacientes con SAF. En forma global, observamos que las condiciones inflamatorias se asocian con el aumento relativo de la expresión de las variantes truncadas. En particular los ensayos realizados con estímulos inflamatorios estándar en el modelo de THP-1 en varias condiciones confirman que la variante TGM2\_v3 se ve favorecida por condiciones inflamatorias como habíamos descrito en las condiciones de EC y SAF analizados en la primera parte del capítulo.

Consideramos que el trabajo de estandarización del modelo *in vitro* y la información obtenida descrita en este capítulo acerca de las diferencias en la expresión relativa de las variantes de TGM2 en relación con las distintas condiciones de cultivo, representan la base experimental para analizar el condicionamiento de estas células por señales derivadas de las células trofoblásticas en condiciones de salud y patológicas.

## **ARTICULO II**

Arbildi P, Calvo F, Macías V, Rodríguez-Camejo C, Hernández A, Sóñora C. Study of tissue transglutaminase spliced variants expressed in THP-1 derived macrophages with different functional phenotypes. Manuscrito actualmente en evaluación en Immunobiology.

2	Title page.
3	Title
4	Study of tissue transglutaminase spliced variants expressed in THP-1 derived macrophages
5 6	with different functional phenotypes
7	Short running title
8	Tissue transglutaminase spliced variants in THP-1
9	
10	The full name of the authors and affiliations.
11	
12	Paula Arbildi <sup>a, b, c</sup>
13	parbildi@higiene.edu.uy
14	
15	Federico Calvo <sup>a, b, c</sup>
16	fede.calvo06@gmail.com
17	
18	
19	victoriamaciasU3@gmail.com
20	Claudia Badríguaz Camaia <sup>a, b, c</sup>
21	cradriguez-Camejo
22	crounguez@mgrene.euu.uy
24	Cecilia Sóñora <sup>a,b,c,d,*</sup>
25	csonora@fmed.edu.uv
26	
27	Ana Hernández <sup>a, b, c,*</sup>
28	ahernap@fq.edu.uy
29	
30	a. Unidad Asociada de Inmunología, Instituto de Química Biológica (IQB), Facultad de Ciencias,
31	Universidad de la República. Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay.
32	b. Area Inmunología, Departamento de Biociencias (DEPBIO), Facultad de Química, Universidad
33	de la República. General Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay.
34	c. Laboratorio de Inmunología, Instituto de Higiene "Prof. Arnoldo Berta", Universidad de la República.
35	Alfredo Navarro 3051, 11600 Montevideo, Uruguay.
36	d. Escuela Universitaria de Tecnología Médica (EUTM), Facultad de Medicina, Universidad de la
37	República. Alfredo Navarro S/N. 11600 Montevideo, Uruguay.
38	* contributed equally to this work
39	
40	Corresponding author's full name, address, email address.
41	Ana Hernández
42	aherna@fg.edu.uv
43	
44	Cecilia Sóñora
45	csonora@fmed.edu.uy
46	
47	Address: Instituto de Higiene "Prof. Arnoldo Berta". Avda. Alfredo Navarro 3051. 11600.
10	Montovideo Hruguov

48 Montevideo. Uruguay.

49

- 50 51 *List of abbreviations*
- 52 TG2: tissue transglutaminase
- 53 TGase: transamidating acyltransferase activity of TG2
- 54 dTHP-1: differentiated THP-1 cells (macrophage-like THP-1 cells)
- 55 PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate
- 56 *Word count:* 3307 words
- 57 Experimental Immunology
- 58

### 59 Abstract and keywords

- 60 Tissue transglutaminase (TG2) expressed in monocytes and macrophage is known to
- 61 participate in processes during either early and the resolution stages of inflammation. The
- 62 alternative splicing of tissue transglutaminase is a mechanism that increases its functional
- diversity. Four spliced variants are known with truncated C-terminal domains (TGM2\_v2,
- 64 TGM2\_v3, TGM2\_v4a, TGM2\_v4b) but little information is available about its expression in
- 65 human monocyte and macrophages.
- 66 We studied the expression of canonical TG2 (TGM2\_v1) and its short spliced variants by RT-
- 67 PCR during differentiation of TPH-1 derived macrophages (dTHP-1) using two protocols
- 68 (condition I and II) that differ in Phorbol-12-myristate-13-acetate PMA dose and time schedule.
- 69 The production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in supernatants measured by ELISA in supernatants showed
- a higher inflammatory milieu in condition I.
- 71 We found that the expression of all mRNA TG2 spliced variants were up-regulated during
- 72 macrophage differentiation and after IFN-γ treatment of dTHP-1 cells in both conditions.
- 73 Nevertheless, the relative fold increase or TGM2\_v3 in relation with TGM2\_v1 was higher only
- 74 with the condition I. M1/M2-like THP-1 macrophages obtained with IFN-γ /IL-4 treatments
- showed that the up-regulation of TGM2\_v1 induced by IL-4 was higher in relation with any
- other short spliced variants. The qualitative profile of relative contribution of spliced variants
- in M1/ M2-like THP-1 cells showed a trend to higher expression of TGM2\_v3 in the
- 78 inflammatory functional phenotype.

2

79	Our results contribute to the knowledge of the TG2 spliced variants in the biology of
80	monocyte/macrophage cells and show how the differentiation conditions can alter their
81	expression and cell function.
82	
83 84	Keywords: Tissue transglutaminase, spliced variants, THP-1
84 85	Acknowledgments.
86	
87	Funding information. This work obtained continous support by Programa de Desarrollo de las Ciencias
88	Básicas (PEDECIBA, Uruguay) and Sistema Nacional de Investigadores (SNI-ANII, Uruguay). Authors
89	thank Natalia Rosano for proofreading the manuscript.
90	Conflict of interest statement
91	The authors declare that there is no conflict of interest.
92	
93	
94	
95	
96	
97	
98	
99	
100	
101	
102	
103	
104	
105	
106	
107	

3

108 Main text

### 109 **1. Introduction.**

110

111 Macrophages are cells with high plasticity that play different roles in immune surveillance,

resolution of the inflammation, tissue repair and homeostasis<sup>1</sup>. Depending on how the

113 microenvironment responds with the differentiation programs that lead to several functional

114 phenotypes, ranging from classically inflammatory macrophages (M1) to alternative activated

macrophages involved in the modulation of inflammation, tissue repair and homeostasis (M2)
 <sup>2,3,4,5</sup>.

117 Tissue transglutaminase (TG2) is a ubiquitous multifunctional enzyme that participates in early

118 inflammation and its resolution through its expression in monocytes and macrophage. TG2

119 contributes to cell adhesion, extravasation, extracellular matrix generation and phagocytosis of

apoptotic cells. The adhesive properties of TG2 at cell surface and/or the transamidation

activity (TGasa) that catalyzes the crosslinking of glutamine to lysine residues can be involved
 in those processes<sup>6,7</sup>.

123 Blood monocytes represent a main infiltrating cell type in inflamed tissues that can then

124 differentiate to macrophages<sup>8</sup>. This process is accompanied by an increase in TG2 expression

and TGase activity in parallel with morphological and functional changes <sup>6,9,10,11,12</sup>. Nevertheless

126 the role of TG2 upregulation in macrophage differentiation is not known.

127 The expression of spliced variants of the TG2 gene (TGM2) has been reported in a wide variety

128 of tissues and cell types<sup>13</sup> which would contribute to TG2 functionality. The four spliced

variants (TGM2\_v2, v3, v4a, v4b) lack terminal residues of the C-terminal region compared to

130 TGM2\_v1<sup>14</sup>. Most information concerned these spliced variants is related to the

131 neuroinflammation processes<sup>15,16,17,18</sup> but only scarce information is available about the effect

of the inflammatory microenvironment on the TG2 alternative splicing process in monocytesand macrophages.

134 Our group and others<sup>19,20</sup> reported all short variants in blood human leukocytes from healthy

135 individuals and showed that TGM2\_v2 was the predominant short variant. This pattern was

different in celiac patients, as the relative expression of mRNA TGM2\_v3 spliced variant was

- higher in blood leukocytes, in correlation with the inflammatory status<sup>19</sup>. In line with these
- 138 results, we reported that macrophagesTHP-1 cells in presence of sera from patients with

antiphospholipid syndrome showed higher increase of TGM2\_v3 spliced variant in parallel with

- 140 proinflammatory cytokine production<sup>21</sup>. The expression of TG2 spliced variants can also be
- 141 associated with the pathophysiology of multiple sclerosis, as TGM2\_v4b was significantly

142 higher expressed in leukocytes of patients with progressive primary disease<sup>20</sup>. All together,

143 these observations suggest a role of spliced variants in health conditions and in the

144 pathophysiology of diseases. Deciphering the regulatory mechanisms involved is relevant in

145 terms of clinical implications and/or pharmacological modulation. To further gain insight in the

role of TG2 spliced variants in cell biology of monocyte/macrophage, we studied their basal
expression in monocyte and macrophage like Thp-1 cells and the changes induced by M1/M2
differentiation. The results are discussed with focus on the relevance of the variability of the

- 149 150
- 151 **2. Materials and Methods**

152

153 *2.1. Cell culture and treatments.* 

experimental conditions used.

THP-1 cells (ATCC, Manassas VA, USA) were cultured using RPMI 1640 growth medium
(Capricorn Scientific GmbH, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS)
(Capricorn Scientific), 100 U/mL Penicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and 100 μg/mL
Streptomycin (Sigma-Aldrich), at 37°C in a controlled atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. THP-1 density
was 1.0 x10<sup>6</sup> cells/mL. Only cell passages lower than 25 were used.

159 To obtain THP-1 derived macrophages (dTHP-1) two protocols were used (Figure 1). In

160 Condition I the cultures were treated with 500 ng/mL Phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA

161 (Sigma-Aldrich) for 72h. Then the supernatants were replaced with fresh medium and the cells

rested for 48 h. In Condition II the cells were treated with 100 ng/mL PMA for 24 h and then

the medium was replaced every 48 h during 6 days. The changes of morphological

164 characteristics, adhesion and spreading of THP-1 cells during PMA treatment were assessed by

165 microscopy at a magnification of x400 (Primovert, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

Differentiated cells were treated with corresponding stimuli for 24 h. dTHP-1 cells obtained in Condition I were incubated 24 h with either 20 ng/mL IFN-γ (R&D Systems, Minneapolis, USA) or medium alone at day 2. dTHP-1 obtained in Condition II were untreated or incubated either with 20 ng/mL IFN-γ or 30 ng/mL IL-4 (R&D Systems) at day 6. When corresponding (as indicated in Figure 1) the supernatants were conserved at -80°C until analysis and the cells

171 harvested for RNA extraction with Trizol<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

172 For each assay three independent experiments were performed in triplicate wells.

173

174 *2.2. Cytokine determination in supernatants.* 

5

- 175 The levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and CCL22 in supernatants from dTHP-1 cultures were
- 176 measured by ELISA with the corresponding specific Human Duoset ELISA kit (R&D Systems)
- according to the manufacturer's instructions. Each sample was analyzed in duplicate.
- 178
- 179 2.3. Real-time reverse transcription RT- PCR.

180 Total RNA from dTHP-1 cells was isolated using Trizol® (Thermo Fisher Scientific) and then 181 treated with RNase free DNase (Thermo Fisher Scientific). 1µg RNA was reverse transcribed 182 with random primers (Macrogen, Seoul, South Korea) and M-MLV reverse transcriptase 183 (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Template DNA was 184 amplified by quantitative real-time PCR using QuantiNova Probe PCR kit (Qiagen, Hilden, 185 Germany) in a Rotor-Gene Q real-time PCR cycler (Qiagen), according to the following 186 protocol: 15min at 95°C, followed by 40 cycles at 94°C for 15s, at 50°C for 30s and at 72°C for 187 30s.

188 The primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Waltham, MA, 189 USA) or obtained from previous bibliography<sup>13,19,22</sup> (Supporting information). The expression of 190 genes of interest was normalized using Peptidylprolyl Isomerase A (*PPIA*) as a housekeeping 191 gene. The relative mRNA expression was estimated using the 2– $\Delta\Delta$ Ct method<sup>23</sup>.

192

193 *2.4. Statistics.* 

194 Data is reported as the mean ± standard error of the mean (SEM) as specified in the figure

195 legends. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 8 using a two-tailed

196 unpaired t-test. P values less than 0.05 were considered significant. Specific significance values

197 are denoted with asterisks in figures (\*P≤0.05, \*\*P <0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < .0001).

198

### 199 **3. Results.**

200 3.1. The expression of all mRNA TG2 spliced variants are upregulated during macrophage

- 201 differentiation.
- 202 We started studying the expression of *TGM2* of full-length and short spliced in pre-monocytic
- 203 THP-1 cells and changes induced by PMA during macrophage differentiation in two
- 204 experimental protocols (condition I and II) that differ in the PMA dose and time of exposure
- 205 (Figure 1A). We first verified that the macrophage hallmarks of cell adherence and spreading
- 206 were similar between both conditions after two or six days after PMA removal in condition I
- 207 and II respectively (Figure 1B).

6

In both conditions, we observed PMA- induced upregulation of mRNA corresponding to the full
length molecule of TG2 and short spliced variants, with an average 10 fold increase in
condition I in comparison to condition II after PMA incubation (Table 1). The increased level of
TGM2\_v1 was sustained stable during 48 hs of resting without stimuli in condition I (Figure 2A,
Table 1). In contrast, with lower dose and duration of PMA incubation (condition II) a
decreasing trend over time of mRNA expression for all variants was observed (Table 1, Figure 2B).

215

216 3.2. The expression of all mRNA TG2 spliced variants are upregulated by inflammatory stimuli. 217 The PMA-differentiated THP-1 cells under experimental conditions I and II were exposed to 218 IFN- $\gamma$  to study TG2 spliced variants expression in response to a strong inflammatory stimulus. 219 The incubation with 20 ng/mL IFN- $\gamma$  for 24 h, increased the expression of mRNA for complete 220 molecules and all short spliced variants independently of the protocol used (Figure 3). The 221 relative upregulation of TGM2 v1 was lower with condition I in comparison to condition II 222 (average fold increased 2.9 vs 11.4 respectively, p=0.013). In contrast, the average 223 upregulation of short variants was similar among protocols (average fold increase 2.9 vs 4.6 224 respectively). The IFN- $\gamma$  stimuli induced upregulation of all short spliced variants and full 225 length TGM2 in condition I with a trend toward a higher relative contribution of TGM2 v3 in 226 relation to TGM2\_v1 (Figure 3A). In contrast, a significant\_higher fold increase of TGM2\_v1 227 expression over short spliced variants was observed in condition II in response to IFN-γ. Similar 228 relative contribution of all short variants is shown (Figure 3B). 229 The production of proinflammatory cytokines by dTHP-1 was significantly higher in Condition I 230 in comparison to Condition II either before or after incubation with IFN- $\gamma$  (p=0.0001). In basal 231 conditions, the average basal production of IL-1 $\beta$  was 1088 ±40 vs 23 ± 6 pg/mL for condition I 232 and II respectively; TNF- $\alpha$  production was 5463±975 vs 258±64 pg/mL respectively. In response 233 to IFN- $\gamma$  incubation, the IL-1 $\beta$  production was 31786±4587 and 65 ±10 pg/mL respectively and 234 the TNF- $\alpha$  production was 71811±8187 and 642±145 pg/mL. (Figure 3C). 235 236 3.3. The M2-like macrophage polarization is associated with a higher fold increase of TGM2 v1

and short spliced variants in comparison to inflammatory stimuli.

Given the role of TG2 in tissue homeostasis and repair, we aimed to compare the expression of TGM2 spliced variants in macrophages with M2- and M1-like phenotypes. We confirmed the

TGM2 spliced variants in macrophages with M2- and M1-like phenotypes. We confirmed the

240 macrophage differentiation into M1/ M2 like phenotypes by comparing the expression level of

a range of genes after 24 hs of incubation of dTHP-1 obtained in condition II with the classical

242 polarizing stimuli (30 ng/mL IL-4 or 20 ng/mL IFN-γ). We observed relatively higher

243	upregulation of mRNA of inflammatory interleukins, CXCL11 and indoleamine 2,3-
244	dioxygenase/INDO after IFN- $\gamma$ incubation in comparison with IL-4 treatment. In contrast, the
245	expression of CCL13, MRC1 and IL-10 were preferentially induced by IL-4 treatment in line with
246	M2-like phenotype (Figure 4A).
247	At the protein level, significant increase of TNF- $lpha$ production was observed after IFN- $\gamma$
248	treatment in comparison with IL-4 incubation (average fold: 3.9±0.9 versus 1.5±0.1
249	respectively, for three independent experiments). In parallel a trend of higher IL-1 $\beta$ production
250	after inflammatory stimuli was observed (average fold: 2.7±0.9 versus 0.7±0.1 respectively). A
251	trend of higher CCL22 and IL-10 production after IL-4 incubation in comparison with IFN- $\gamma$
252	treatment was observed (fold increase: 2.0±0.7 versus 1.0±0.1for CCL22 and 0.8±0.1 versus
253	0.5±0.1 respectiveley, p=0.07). Similar levels of IL-10 detection were observed with both
254	stimuli ((Figure 4 B).
255	TGM2 mRNA expression was significantly increased in response to IL-4 for TGM2_v1 and all
256	short-spliced variants. Nevertheless the upregulation of TGM2_v1 was significantly higher than
257	the observed for every spliced variant (Figure 5). The canonical variant TGM2_v1 predominates
258	over the truncated ones in both M1 and M2 like macrophages (Figure 3B and Figure 5A).
259	Nevertheless, the profile of relative upregulation of truncated spliced variants was

260 qualitatively different in response to both stimuli (Figure 6).

261

### 262 4. Discussion

263

TG2 basal expression in human monocytes is very low, but increases in response to

265 physiological stimuli such as cytokines and growth factors<sup>9,10</sup>. Monocytes represent a main

266 infiltrating cell type in inflamed tissues and the inflammation induced TG2 can play a role in

267 physiological processes and the pathogenesis of several diseases<sup>24,25</sup>.

268 The upregulation of TG2 and TGase activity by inflammatory stimuli was described in several in

269 vitro models. In human monocytes IFN- $\gamma$  increased the TG2 expression<sup>26</sup> and inflammatory

270 microenvironment upregulated TG2 expression inTHP-1 monocyte-like\_cells<sup>27,28</sup>. Besides, TG2

271 increased detection was reported after THP-1 cells differentiation to macrophages with

272 phorbol esters such as PMA or TPA<sup>12,29</sup>.

273 To further contribute to the knowledge of this issue, we first studied TG2 mRNA expression

and its spliced variants during macrophage THP-1 differentiation. This cell line is considered

275 the best alternative available as a surrogate of human blood derived monocyte/macrophages

276 because it can overcome ethical constraints, and the high variability among donors <sup>30</sup>. PMA

8
- 277 and TPA are nonspecific PKC activators widely used to macrophage differentiation of THP-1
- 278 cells<sup>11, 31, 32, 33</sup>. Though, no standard protocols have been defined<sup>34,35,36</sup>. The use of-variable
- 279 doses of PMA, stimulus duration, and cell rest periods can account for inconsistent data
- 280 reported about phenotype and functional properties of differentiated THP-1 cells.
- 281 As the first objective we compared the TG2 expression during THP-1 differentiation to
- 282 macrophage under two differentiation conditions concerning PMA concentration (500 and 100
- 283 ng/mL), length of incubation (72 and 24 h respectively) and resting time after PMA incubation
- 284 (48 h or 6 d respectively). We selected these experimental conditions according to previous
- work showing that 100 ng/mL PMA guarantees the complete differentiation of THP-1
   macrophages<sup>30</sup>.
- 287 Globally our results are in line with a previous report that described the increased gene
- 288 expression of canonical TG2 (TGM2\_v1) in response to PMA <sup>11</sup>. Nevertheless we observed
- 289 differences in TG2 upregulation magnitude and we found differences according to the
- 290 experimental conditions used. These results emphasize the previous considerations about the
- 291 need of careful analysis when comparing results between works that used different
- 292 experimental conditions.
- 293 The phosphorylation of serine residues of TG2 is a regulatory mechanism of TG2 which 294 modifies its binding to regulatory proteins<sup>37,38</sup>. PMA and TPA are PKC activators that could 295 modify TG2ase activity in a cell dependent way, as was reported with cardiomyocyte-like cells 296 <sup>39</sup>. In addition, PMA is an activating factor that can induce the expression of inflammatory 297 mediators associated with the regulation of TG2 expression at the transcription level<sup>11,33</sup>. TG2 298 expression is linked to NF- $\kappa$ B activation because a response element is located on the TG2 299 promoter<sup>40,41</sup>. Thereby, an indirect effect of PMA could account for the variations observed in 300 TG2 expression and the up-regulation of the enzyme expression observed with higher PMA 301 doses could be potentiated by these inflammatory pathways.
- 302 We deepen into the expression of TG2 during THP-1 cells differentiation by the analysis of the 303 mRNA expression of all spliced variants. Our results about relatively higher expression of short 304 variants in the condition I during macrophage differentiation could be linked with the more 305 inflammatory context associated with PMA effects. In line with these results, the expression of 306 TG2 short spliced variants in association with inflammatory conditions was described in rat 307 astrocytes<sup>15</sup> and brains of patients with Alzheimer's disease<sup>17,18</sup>. Nevertheless, previous 308 reports are not available about the TG2 alternative splicing during monocyte differentiation in 309 inflammatory conditions.
- 310 Earlier studies reported 9-fold upregulation of integrin associated TG2 in cell surface of TPA-
- 311 treated THP-1, which is linked to adhesive functions involved in cell spreading and

migration<sup>12</sup>.Information is still lacking concerning the involvement of TG2 spliced variants as the protein detection was done with antibodies that recognize shared epitopes located at the N-terminal domains of variants<sup>12,42</sup>. As far as we know, no commercial antibodies are available that recognize motifs differentially expressed in the C-terminal domain of each human TG2 spliced variant.

In relation with enzymatic functions, an increase of TGase activity was observed during THP-1
differentiation with TPA<sup>29</sup>. TGase activity could be altered in short variants because they are
insensitive to GTP-mediated inhibition of TGase activity and are expected to be active inside
the cells even under physiological conditions<sup>43</sup>. So, it can't be ruled out that the expression
profile of short variants during macrophage differentiation can impact on TGase activity and
ultimately in cell functionality.

323 As a second objective we proposed to study the expression of TG2 spliced variants in 324 macrophages under inflammatory stimuli. We show that IFN-y induced comparable fold 325 increases of mRNA expression of full-length and all truncated TGM2 variants independently of 326 the basal expression (Figure 3). In accordance, previous reports showed that proinflammatory cytokines and LPS upregulated the expression of TG2 in dTHP-1<sup>44</sup>. Nevertheless, no previous 327 328 studies about the regulation of spliced variants by inflammation in macrophages have been 329 reported. The trend of higher relative contribution of TGM2\_v3 under inflammatory conditions 330 is in line with previous work done by our organization<sup>19,21</sup>. Further work is warranted to add 331 knowledge about the involvement of this shortest spliced variant on the activation of different 332 inflammatory pathways.

333 In addition to its recognized role of TG2 in early stages of inflammation, TG2 is involved in 334 tissue repair, phagocytosis of tissue debris and immunoregulation occurring during inflammation resolution<sup>24,45</sup>. In a simplistic picture these processes are orchestrated by 335 alternatively activated macrophages<sup>46</sup>. TG2 was proposed as a marker of M2 type macrophage 336 as its expression was upregulated by IL-4 in human monocyte derived macrophages 4,47,48,49,50 337 338 Interestingly, the increased expression of mRNA TG2 in monocytes was associated with the 339 anti-inflammatory status of patients with multiple sclerosis and IL-4 would be involved in the 340 TG2 up-regulation<sup>25</sup>. In relation to functional implications, the authors show that TG2 341 expressed in M2 like macrophages contributes to myelin phagocytosis through an IL-4 342 dependent mechanism<sup>51</sup>. As the expression of TG2 spliced variants can modify cell functions in a cell specific manner<sup>14</sup>, 343

344 and impact on the outcome of diseases in which TG2 is involved in pathogenic mechanisms

<sup>19,20</sup> we then analyzed the differential expression of spliced variants in macrophages with

346 M1/M2 like profiles obtained with condition II after 24h of incubation with classical

differentiation stimuli (IFN-γ and IL-4). We consider that dTHP-1 obtained with condition I
would be more prone to acquire a M1-like phenotype in comparison to condition II, according
to the basal proinflammatory cytokines production observed (Figure 2C). This observation is in
accordance with previous work showing a relationship between the PMA concentration and
the up-regulation of inflammatory gene expression<sup>36</sup>. Moreover, a resting time of at least 5
days after PMA stimulus would favor the differentiation of THP-1 to macrophages committed
to M0 with the functional capacity to adapt to the prevailing stimulus<sup>31,32,52</sup>.

- 354 While there is largely an accordance about the best markers to characterize the macrophage polarization in monocyte-derived macrophages<sup>2,5,53,54,</sup> data from literature are widely variable 355 356 concerning the marker expression that characterizes M2 like THP-1 cells. We showed that 357 MRC1 and CCL13 are the most prominent M2-like THP-1 markers. In contrast, the secretion of 358 CCL22 and IL-10 were not significantly different between cells treated with both polarizing 359 stimuli (Figure 4A). Our results confirm previous work, showing that several marker 360 characteristics of M1/M2 like macrophages are not expressed in the expected way in THP-361  $1^{32,52,55,56}$ . In spite of these limitations, our results confirm that THP-1 has the functional
- 362 capacity to shift their response\_according to the prevailing stimulus.
- Our results are in agreement with other reports showing higher expression of TG2 under IL-4
   stimuli in comparison with pro-inflammatory cytokines in monocyte derived macrophages
   <sup>47,49,57,58</sup> or PMA-dTHP-1<sup>25,51,59</sup>. These results indicate that TG2 would be involved in the tuning
   to the M2-like anti-inflammatory phenotype. We questioned if the expression of spliced
   variants would be associated with this process.
- 368 According to our results the alternative splicing would be more favored in classical
- 369 inflammatory macrophages, as similar upregulation of TGM2-V1 and short variants are
- 370 observed. Nevertheless, the functional consequences of the different profile of TG2 variants
- among M1 and M2 macrophages are not known. It is notable that TGM2\_v4b variant show a
- trend to be preferentially expressed in M2 macrophages, this result is in accordance with
- previous report showing that TGM2\_v4a and TGM2\_v4b variants were relatively more
- 374 expressed in relation with TGM2\_v1 in monocytes of patients with primary progressive
- 375 multiple sclerosis<sup>20</sup>. Yet these previous studies didn't study the expression of TG2 spliced
- variants in macrophages in relation with functional profile. To our knowledge, this is the first
- 377 comprehensive study of the expression of TG2 spliced variants in human
- 378 monocytes/macrophages under diverse differentiation conditions and stimuli. Further work is
- 379 necessary at the protein level to confirm the involvement of increased expression of short
- 380 variants in this process and its association with cell functionality.
- 381

### 382 Author Contributions

- 383 PA conducted most research activities and contributed to the drafting. FC, CM and CRC contribute to
- 384 experimental work. AH and CS: contributed to the conception, discussion and drafting. All authors
- 385 contributed to the manuscript revision.
- 386

### 387 5. References

- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*.
   2005;5(12):953-964. doi:10.1038/NRI1733
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human
   Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and
   Patterns of Gene Expression. *J Immunol*. 2006;177(10):7303-7311.
   doi:10.4049/jimmunol.177.10.7303
- Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: An
   immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:451-483.
   doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132532
- Martinez FO, Helming L, Milde R, et al. Genetic programs expressed in resting and IL-4
   alternatively activated mouse and human macrophages: Similarities and differences.
   *Blood*. 2013;121(9):57-70. doi:10.1182/blood-2012-06-436212
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage Activation and Polarization:
  Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20.
  doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008
- 4036.Eckert RL, Kaartinen MT, Nurminskaya M, et al. Transglutaminase regulation of cell404function. *Physiol Rev.* 2014;94(2):383-417. doi:10.1152/physrev.00019.2013
- 405 7. Gundemir S, Colak G, Tucholski J, Johnson GVW. Transglutaminase 2: A molecular Swiss
  406 army knife. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2012;1823(2):406-419.
  407 doi:10.1016/j.bbamcr.2011.09.012
- 4088.Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of409Monocytes. Immunity. 2018;49(4):595-613. doi:10.1016/j.immuni.2018.10.005
- 410 9. Hodrea J, Demény MÁ, Majai G, Sarang Z, Korponay-Szabó IR, Fésüs L.
  411 Transglutaminase 2 is expressed and active on the surface of human monocyte-derived
  412 dendritic cells and macrophages. *Immunol Lett*. 2010;130(1-2):74-81.
  413 doi:10.1016/j.imlet.2009.12.010
- 414 10. Murtaugh MP, Arend WP, Davies PJA. Induction of tissue transglutaminase in human
  415 peripheral blood monocytes. *J Exp Med*. 1984;159(1):114-125.
  416 doi:10.1084/JEM.159.1.114
- 417 11. Kohro T, Tanaka T, Murakami T, et al. A comparison of differences in the gene
  418 expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and
  419 human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb*. 2004;11(2):88-97.
  420 doi:10.5551/jat.11.88

- 421 12. Akimov SS, Belkin AM. Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and
  422 migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood*. 2001;98(5):1567-1576.
  423 doi:10.1182/blood.V98.5.1567
- Phatak VM, Croft SM, Rameshaiah Setty SG, et al. Expression of transglutaminase-2
  isoforms in normal human tissues and cancer cell lines: Dysregulation of alternative
  splicing in cancer. *Amino Acids*. 2013;44(1):33-44. doi:10.1007/s00726-011-1127-4
- 427 14. Lai T-S, Greenberg CS. TGM2 and implications for human disease: role of alternative
  428 splicing. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013;18:504-519.
- 429 15. Monsonego A, Shani Y, Friedmann I, Paas Y, Eizenberg O, Schwartz M. Expression of
  430 GTP-dependent and GTP-independent tissue-type transglutaminase in cytokine-treated
  431 rat brain astrocytes. *J Biol Chem*. 1997;272(6):3724-3732.
- 435 17. Citron BA, Suo Z, SantaCruz K, Davies PJAA, Qin F, Festoff BW. Protein crosslinking,
  436 tissue transglutaminase, alternative splicing and neurodegeneration. *Neurochem Int.*437 2002;40(1):69-78. doi:10.1016/S0197-0186(01)00062-6
- 438 18. Citron BA, SantaCruz KS, Davies PJA, Festoff BW. Intron-Exon Swapping of
  439 Transglutaminase mRNA and Neuronal Tau Aggregation in Alzheimer's Disease. *J Biol*440 *Chem*. 2001;276(5):3295-3301. doi:10.1074/jbc.M004776200
- 441 19. Arbildi P, Sóñora C, Del Río N, Marqués JM, Hernández A. Alternative RNA splicing of
  442 leucocyte tissue transglutaminase in coeliac disease. *Scand J Immunol*. 2018;87(5).
  443 doi:10.1111/sji.12659
- Sestito C, Brevé JJP, Killestein J, et al. Differential Expression of Tissue Transglutaminase
  Splice Variants in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Primary Progressive Multiple
  Sclerosis Patients. *Med Sci.* 2018;6(4):108. doi:10.3390/medsci6040108
- 447 21. Arbildi P, Grasso E, Rodríguez-Camejo C, et al. β2GPI-specific antibodies induce pro448 inflammatory mediators and tissue transglutaminase differential variant expression on
  449 trophoblast cells and monocytes-macrophages. *Placenta*. 2017;51(2017):111.
  450 doi:10.1016/j.placenta.2017.01.050
- 451 22. Lamas Bervejillo M, Bonanata J, Franchini GR, et al. A FABP4-PPARγ signaling axis
  452 regulates human monocyte responses to electrophilic fatty acid nitroalkenes. *Redox*453 *Biol.* 2020;29. doi:10.1016/j.redox.2019.101376
- 454 23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time
  455 Quantitative PCR and the 2-ΔΔCT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
  456 doi:10.1006/meth.2001.1262
- 457 24. Chrobok NL, Sestito C, Wilhelmus MMM, Drukarch B, van Dam AM. Is monocyte- and
  458 macrophage-derived tissue transglutaminase involved in inflammatory processes?
  459 Amino Acids. 2017;49(3):441-452. doi:10.1007/s00726-016-2334-9
- Sestito C, Brevé JJP, van Eggermond MCJA, et al. Monocyte-derived tissue
  transglutaminase in multiple sclerosis patients: Reflecting an anti-inflammatory status
  and function of the cells? *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):1-12. doi:10.1186/s12974-

- 463 017-1035-y
- 464 26. Mehta K, Lopez-Berestein G, Moore WT, Davies PJ. Interferon-gamma requires serum
  465 retinoids to promote the expression of tissue transglutaminase in cultured human
  466 blood monocytes. *J Immunol*. 1985;134(4):2053-2056.
- 467 27. Currò M, Gangemi C, Giunta ML, et al. Transglutaminase 2 is involved in amyloid-beta1–
  468 42-induced pro-inflammatory activation via AP1/JNK signalling pathways in THP-1
  469 monocytes. Amino Acids. 2017;49(3):659-669. doi:10.1007/s00726-016-2366-1
- 470 28. Bayardo M, Punzi F, Bondar C, Chopita N, Chirdo F. Transglutaminase 2 expression is
  471 enhanced synergistically by interferon-γ and tumour necrosis factor-α in human small
  472 intestine. *Clin Exp Immunol*. 2012;168(1):95-104. doi:10.1111/J.1365473 2249.2011.04545.X
- 474 29. Mehta K, Lopez-Berestein G. Expression of Tissue Transglutaminase in Cultured
  475 Monocytic Leukemia (THP-1) Cells during Differentiation. *Cancer Res.* 1986;46(3):1388476 1394.
- 477 30. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune
  478 modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):37-45.
  479 doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002
- 480 31. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The identification of
  481 markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte482 derived macrophages. *PLoS One*. 2010;5(1). doi:10.1371/journal.pone.0008668
- Tedesco S, De Majo F, Kim J, et al. Convenience versus biological significance: Are PMAdifferentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when
  studying in vitro polarization? *Front Pharmacol*. 2018;9(FEB):1-13.
  doi:10.3389/fphar.2018.00071
- 487 33. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is
  488 required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res.* 2007;56(1):45-50.
  489 doi:10.1007/S00011-007-6115-5
- 490 34. Forrester MA, Wassall HJ, Hall LS, et al. Similarities and differences in surface receptor
  491 expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven
  492 different conditioning regimens. *Cell Immunol*. 2018;332:58-76.
  493 doi:10.1016/J.CELLIMM.2018.07.008
- 494 35. Aldo PB, Craveiro V, Guller S, Mor G. Effect of culture conditions on the phenotype of
  495 THP-1 monocyte cell line. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70(1):80-86.
  496 doi:10.1111/AJI.12129
- 497 36. Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate
  498 differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro499 inflammatory stimulus. *J Immunol Methods*. 2016;430:64-70.
  500 doi:10.1016/J.JIM.2016.01.012
- 37. Mishra S, Melino G, Murphy LJ. Transglutaminase 2 kinase activity facilitates protein
  kinase A-induced phosphorylation of retinoblastoma protein. *J Biol Chem*.
  2007;282(25):18108-18115. doi:10.1074/jbc.M607413200
- 504 38. Mishra S, Murphy LJ. Phosphorylation of transglutaminase 2 by PKA at Ser216 creates

505 14-3-3 binding sites. Biochem Biophys Res Commun. 2006;347(4):1166-1170. 506 doi:10.1016/J.BBRC.2006.07.041 507 39. Almami I, Dickenson JM, Hargreaves AJ, Bonner PLR. Modulation of transglutaminase 2 508 activity in H9c2 cells by PKC and PKA signalling: a role for transglutaminase 2 in 509 cytoprotection. Br J Pharmacol. 2014;171(16):3946-3960. doi:10.1111/BPH.12756 510 40. Mirza A, Liu SL, Frizell E, et al. A role for tissue transglutaminase in hepatic injury and 511 fibrogenesis, and its regulation by NF-kappaB. Am J Physiol. 1997;272(2 Pt 1). 512 doi:10.1152/AJPGI.1997.272.2.G281 513 41. Lu S, Saydak M, Gentile V, Stein JP, Davies PJA. Isolation and characterization of the 514 human tissue transglutaminase gene promoter. J Biol Chem. 1995;270(17):9748-9756. 515 doi:10.1074/JBC.270.17.9748 516 42. Di Niro R, Ferrara F, Not T, et al. Characterizing monoclonal antibody epitopes by 517 filtered gene fragment phage display. Biochem J. 2005;388(3):889-894. 518 doi:10.1042/BJ20041983 519 43. Király R, Demény MÁ, Fésüs L. Protein transamidation by transglutaminase 2 in cells: A 520 disputed Ca 2+-dependent action of a multifunctional protein. FEBS J. 521 2011;278(24):4717-4739. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08345.x 522 44. Currò M, Ferlazzo N, Risitano R, et al. Transglutaminase 2 and phospholipase A2 523 interactions in the inflammatory response in human Thp-1 monocytes. Amino Acids. 524 2014;46(3):759-766. doi:10.1007/s00726-013-1569-y 525 45. Rose DM, Sydlaske AD, Agha-Babakhani A, Johnson K, Terkeltaub R. Transglutaminase 2 limits murine peritoneal acute gout-like inflammation by regulating macrophage 526 527 clearance of apoptotic neutrophils. Arthritis Rheum. 2006;54(10):3363-3371. 528 doi:10.1002/ART.22137 529 46. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. 2008. 530 doi:10.1038/nri2448 531 47. Purcu DU, Korkmaz A, Gunalp S, et al. Effect of stimulation time on the expression of 532 human macrophage polarization markers. PLoS One. 2022;17(3 March):1-14. 533 doi:10.1371/journal.pone.0265196 534 48. Good M, Sodhi CP, Yamaguchi Y, et al. The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose 535 attenuates the severity of experimental necrotising enterocolitis by enhancing 536 mesenteric perfusion in the neonatal intestine. Br J Nutr. 2016;116(7):1175-1187. 537 doi:10.1017/S0007114516002944 538 49. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Utikal J, Goerdt S. Interleukin-4 and Dexamethasone 539 Counterregulate Extracellular Matrix Remodelling and Phagocytosis in Type-2 540 Macrophages. 541 50. Eligini S, Brioschi M, Fiorelli S, Tremoli E, Banfi C, Colli S. Human monocyte-derived 542 macrophages are heterogenous: Proteomic profile of different phenotypes. J 543 Proteomics. 2015;124:112-123. doi:10.1016/j.jprot.2015.03.026 544 51. Sestito C, Brevé JJP, Bol JGJM, Wilhelmus MMM, Drukarch B, van Dam AM. Tissue 545 Transglutaminase contributes to myelin phagocytosis in interleukin-4-treated human 546 monocyte-derived macrophages. Cytokine. 2020;128:155024.

### 547 doi:10.1016/J.CYTO.2020.155024

- 548 52. Stossi F, Madak-Erdoğan Z, Katzenellenbogen BS. Macrophage-elicited loss of estrogen
  549 receptor-α in breast cancer cells via involvement of MAPK and c-Jun at the ESR1
  550 genomic locus. *Oncogene*. 2012;31(14):1825-1834. doi:10.1038/ONC.2011.370
- 55153.Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers552and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/816460
- 55354.Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for554reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6. doi:10.12703/P6-13
- 55. Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, et al. THP-1 and human peripheral blood
  556 mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol*557 *Immunol.* 2017;88(May):58-68. doi:10.1016/j.molimm.2017.05.027
- 558 56. Xue J, Schmidt S V., Sander J, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a
  spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*. 2014;40(2):274-288.
  doi:10.1016/J.IMMUNI.2014.01.006
- 561 57. Martinez FO, Helming L, Milde R, et al. Genetic programs expressed in resting and IL-4
  562 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences.
  563 Blood. 2013;121(9). doi:10.1182/BLOOD-2012-06-436212
- 58. Yamaguchi M, Zacharia J, Laidlaw TM, Balestrieri B. PLA2G5 regulates transglutaminase
  activity of human IL-4-activated M2 macrophages through PGE2 generation. *J Leukoc Biol.* 2016;100(1):131-141. doi:10.1189/jlb.3A0815-372R
- 567 59. Li P, Ma C, Li J, et al. Proteomic characterization of four subtypes of M2 macrophages
  568 derived from human THP-1 cells. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2022;23(5):407-422.
  569 doi:10.1631/JZUS.B2100930
- 570

### 572 Figure legends.



Condition I THP-1 10 ng/mL IFN-7 (1.0 x10<sup>6</sup> cells/mL) 500 ng/mL PMA fresh medium 3 days mRNA extraction (RT-PCR) supernatant (ELISA) Condition II THP-1 10 ng/mL IFN-y or (1.0 x10<sup>6</sup> cells/mL) 30 ng/mL IL-4 PMA \* 4 fresh medium 100 ng/ml **)** 7 days mRNA extraction (RT-PCR) supernatant (ELISA)

574

Figure 1. Schematic representation of the experimental design for Condition I and Condition II.
The experimental protocols corresponding to Condition I and Condition II are schematized.
Representative images of temporal changes of THP-1 cells morphology in experimental

578 conditions I and II are shown below each temporal line. Magnification: X400.



579

580 **Figure 2**. Expression of TGM2 spliced variants in THP-1 during macrophage differentiation.

581 Relative expression of transcripts for *TGM2* variants determined by RT-PCR is shown for

582 condition I (A) and condition II (B). Data is expressed as mean ± SEM for triplicate assays

583 corresponding to one representative experiment. Open bars correspond to undifferentiated

- 584 THP-1 cells. Grey bars correspond to dTHP-1 cells immediately after PMA removal (day 0) and
- during resting (days 2 and 6, see Figure 1). The asterisks on the bars denote significant
  differences with respect to undifferentiated THP-1. Unpaired t-test.



**Figure 3.** *Expression of TGM2 spliced variants in dTHP-1 in response to IFN-γ treatment.* 

- 589 Relative expressions of transcripts for TGM2 variants determined by RT-PCR are shown for
- 590 dTHP-1 obtained with condition I (A) and condition II (B) after incubation with 20 ng/ml IFN-γ
- 591 or medium alone (open bars).

- 592 Data normalized to basal conditions are expressed as mean ± SEM for triplicate assays
- 593 corresponding to one representative experiment. The asterisks denote significant differences
- with respect to TGM2\_v1 expression. Unpaired t test.
- 595 The relative up-regulation of each short spliced variant in relation with TGM2\_v1 is illustrated 596 as ratios within the right panels for each experimental condition.
- 597 (C) Levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the supernatants of dTHP-1 cells incubated with medium alone
- 598 (open bars) or 20 ng/ml IFN- $\gamma$  for 24hs. Data is expressed as mean ± SEM of triplicate assays of
- a representative experiment. Asterisks on the top of grey bars indicate significant differences
- 600 with the corresponding basal condition. Unpaired t test.



- 602 **Figure 4.** Polarization of dTHP-1 cells into M1- or M2-like macrophages.
- 603 (A) For each selected gene, qPCR data is expressed as the log ratio of mRNA (Fold Change)
- 604 obtained for IFN-γ versus IL-4 stimuli (log M1/M2).
- 605 (B) The level of each cytokine or chemokine measured in culture supernatant by ELISA in
- 606 response to IFN-γ versus IL-4 are expressed as Fold Change in relation to basal condition
- 607 (medium alone).
- Data is expressed as the average ± SEM of three independent experiments. Asterisks indicate
- 609 significant differences between polarizing conditions. Unpaired t test.



- **Figure 5.** *Expression of TGM2 spliced variants in differentiated THP-1 in response to IL-4.*
- 612 Relative expression of transcripts for TGM2 variants determined by RT-PCR are shown for
- 613 dTHP-1 obtained with condition II after incubation with 30 ng/ml IL-4 or medium alone (open

- bars). Data normalized to basal conditions are expressed as mean ± SEM for triplicate assays
- 615 corresponding to one representative experiment. The asterisks denote significant differences
- 616 with respect to TGM2\_v1 expression. Unpaired t test.
- 617 The relative up-regulation of each short spliced variant in relation with TGM2\_v1 is illustrated
- 618 within the right panel.



- 620 **Figure 6**. *Profile of TGM2\_variants in relation with M1 and M2 phenotypes.*
- 621 The ratio between the fold change expressions of TGM2 mRNA for each spliced variant in
- 622 response to IFN- $\gamma$  and IL-4 is illustrated as ratio (Fold M1/M2). Data is expressed as mean ±
- 623 SEM

		time (days)		
TGM2 variant	Condition	0	2	6
TGM2 v1	1	557 + 167 <sup>*</sup>	1109 + 444 *	
10112_11	II	5.3 ± 0.8 **	15.7 ± 6.1	7.3 ± 4.3
TGM2 v2	I	40.6 ± 5.1 **	71.6 ± 4.1 **	
_	П	4.9 ± 3.1	10.6 ± 2.2	6.8 ± 1.5 $^{*}$
TGM2 v3	I	44.6 ± 13.8	40.6 ± 10.5 *	
_	П	3.1 ± 0.7	9.8 ± 0.9 **	$2.8 \pm 0.5$ *
TGM2 v4a	I	29.1 ± 5.2 **	48.4 ± 15.7 *	
_	П	3.7 ± 0.5 **	4.3 ± 1.5	$3.4 \pm 0.5$ **
TGM2 v4b	I.	46.5 ± 19.3 <sup>*</sup>	83.6 ± 40.1	
	II	2.4 ± 0.1 ***	9.0 ± 1.4 **	1.5 ± 0.3

**Table 1.** *TGM2 spliced variants expressed during THP-1 macrophage differentiation.* 

Data are expressed as mean±SEM values of the fold increase of each TGM2 variant for three

629 independent experiments. Time correspond to resting time after PMA removal (see Figure 1).

630 Asteriks denote significant differences with respect to the basal expression (before PMA

631 treatment). Unpaired t test.

# Capítulo

# EXPRESIÓN DE LA TG2 Y SUS VARIANTES DE SPLICING EN CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS, EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS.

En este capítulo se describen los resultados obtenidos en relación con los objetivos específicos 3 y 4 del trabajo, vinculados al análisis de la expresión de la TG2 y sus variantes de *splicing* en un modelo *in vitro* de células trofoblásticas de primer trimestre. Para el estudio de expresión de la TG2 y las variantes de *splicing* se consideraron condiciones basales y asociadas a hipoxia o inflamación. Adicionalmente se estudiaron propiedades funcionales de las células trofoblásticas en las condiciones mencionadas a los efectos de profundizar en su posible implicancia en los procesos de diferenciación y migración/invasión necesarios para la generación de la interfase materno-fetal y durante toda la gestación. La mayor parte de los resultados están contenidos en la publicación adjunta a este capítulo (Art 3):

Arbildi, P., Rodríguez-Camejo, C., Perelmuter, K., Bollati-Fogolín, M., Sóñora, C., & Hernández, A. (2022). Hypoxia and inflammation conditions differentially affect the expression of tissue transglutaminase spliced variants and functional properties of extravillous trophoblast cells. American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989), 87(6), e13534. https://doi.org/10.1111/aji.13534

A continuación, se desarrolla el marco teórico, seguido de los antecedentes específicos y principales resultados.

### **RESPUESTA CELULAR FISIOLÓGICA A LAS CONDICIONES DE**

### HIPOXIA E INFLAMACIÓN

En base a la importancia del control de la hipoxia e inflamación en el microambiente uterino para el desarrollo normal de la placenta, se desarrollan a continuación algunos conceptos básicos sobre los mecanismos de regulación de estas condiciones.

La hipoxia tisular se define como el estado en el cual el oxígeno no está disponible en cantidades suficientes ( $\leq 1\%$ ) para mantener la homeostasis en forma adecuada. Esta situación puede derivar de un suministro de oxígeno inadecuado, o incapacidad de las células para usarlo <sup>220</sup>. La respuesta de los tejidos es variable; mientras que algunos tejidos pueden tolerar algunas formas de hipoxia por largo períodos de tiempo, otros son más sensibles a estas condiciones, pudiendo resultar seriamente dañados.

En los tejidos sometidos a condiciones de hipoxia suele observarse dos efectos: 1necrosis de las células en la región más distante a los vasos del tejido, 2- adaptación de las células en la región en la que se genera un gradiente hipóxico en la cercanía a los vasos.

La necrosis se caracteriza por una pérdida de la capacidad de síntesis de ATP (por la deprivación de O<sub>2</sub>) <sup>220</sup>, que conduce finalmente a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática <sup>221,222</sup>. En este proceso se liberan moléculas al medio extracelular, muchas de ellas denominadas alarminas por su capacidad de alertar sobre el daño celular, mediante activación de receptores específicos, a células adyacentes <sup>223</sup>. Las alarminas liberadas por las células necróticas (por ejemplo: HMGBI, ATP/ADP, restos de membrana plasmática y ácidos nucleicos) se unen a sus receptores y activan la vía transcripcional gobernada por NF-κB, con la consecuente activación de cientos de genes de la respuesta inflamatoria y de reparación tisular <sup>224</sup>. Esta vía puede activarse también en células no leucocitarias del ambiente hipóxico, de modo que el factor de transcripción NF-κB también afecta múltiples procesos celulares, que colaboran a la adaptación del tejido.

La capacidad de las células de adaptarse al ambiente hipóxico está relacionada a la activación de la vía transcripcional gobernada por el factor de transcripción HIF. A través de esta vía las células regulan procesos como la angiogénesis, vasodilatación y

metabolismo <sup>225-228</sup> incrementando la perfusión del tejido y el metabolismo anaeróbico, de modo de mantener los niveles de ATP permitiendo la adaptación a bajas  $P_{O_2}$ .

### HIF-1 en respuesta adaptativa a la hipoxia

HIF-1 es un regulador transcripcional ubicuo en el organismo, que controla la transcripción de más de 1000 proteínas por unión a elementos de respuesta a hipoxia de sus respectivos genes coordinando procesos (HRE) en la región reguladora, complejos como la respuesta metabólica, angiogénesis y eritropoyesis <sup>229</sup>. Es un factor de transcripción heterodimérico que consiste en una subunidad  $\beta$  y otra  $\alpha$ . Mientras la subunidad  $\beta$  es constitutiva e insensible a la  $P_{O_{2,}}$  la expresión de la subunidad  $\alpha$  es inducible y en condiciones de normoxia es rápidamente degradada vía el complejo proteosoma. Los principales mecanismos que subyacen a la regulación de la actividad de HIF-1 fueron elucidados a principios de la década del 2000 y se resumen en la Figura 4-1. La expresión de HIF-lα es regulada por varias proteínas que funcionan como sensores de la disponibilidad de oxígeno, siendo estabilizada en condiciones de baja tensión de oxígeno. De estos sensores los más destacados son las proteínas con dominio prolina hidroxilasa (PHDs) y el inhibidor de la proteína HIF-1a. (FIH). Las PDHs son dioxigenasas dependientes de 2 oxaglutarato y requieren O<sub>2</sub>, así como Fe<sup>2+</sup> y ascorbato como cofactores <sup>230</sup>. En presencia de O<sub>2</sub> las PHDs son activas e hidroxilan las prolinas Pro402 y Pro564 de HIF-lα, estableciendo una señal de reconocimiento para la proteína von Hippel-Lindau (pVHL), junto a otras proteínas formando el complejo multiproteico E3 <sup>231,232</sup> con la subsiguiente ubiquitinación, seguida de la degradación de HIF-la <sup>231,233</sup>. Las PDHs tienen baja afinidad por el O2 234, por lo que en condiciones de hipoxia, son inactivas, resultando en la estabilización y acumulación de HIF-la. HIF-la estabilizada, transloca al núcleo celular, dimeriza y regula varios genes relacionados con la adaptación a las condiciones de hipoxia.



**Figura 4-1.- Regulación de HIF-Iα dependiente de Oxígeno**. Modificado de "The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model" <sup>235</sup>. Creado con BioRender.com

### La vía NF-kB y su interrelación con HIF-1.

El factor de transcripción NF-κB, es parte de una vía de regulación transcripcional ubicua, que regula un gran número de genes en casi todos los tejidos <sup>236</sup>. Probablemente la función más conocida de NF-κB es su papel como mediador central en vías de la respuesta inmunológica <sup>237</sup> Pero la evidencia acumulada demuestra que NF-κB tiene un papel fundamental en múltiples procesos que le permiten a las células adaptarse y responder a cambios en su ambiente. Estos procesos incluyen proliferación <sup>237</sup> y diferenciación celular <sup>238</sup>, apoptosis <sup>239</sup>, angiogénesis <sup>240</sup>, transición epitelio-mesenquimal <sup>241</sup>, estés oxidativo <sup>242</sup> e incluso es modulador de la expresión génica en condiciones de hipoxia <sup>243</sup>.

NF-κB, está integrado por una familia de proteínas denominadas Rel, que se asocian para conformar diferentes homo y heterodímeros transcripcionalmente activos. En la mayoría de las células no estimuladas, los dímeros de NF-κB son retenidos en su forma inactiva en el citosol a través de interacciones con las proteínas inhibidoras de NF-κB (IκB). La degradación de dichos inhibidores a través de su fosforilación por el complejo quinasa de IkB (IKK) permite la translocación del dímero de NF-κB al núcleo y la inducción de sus

genes blancos. El dímero de NF-κB p50/p65 conformado por las proteínas de NF-κB-1 (p50) y Rel-A (p65), representa el más abundante de los dímeros Rel y conforma el último eslabón de la vía de activación canónica de NF-κB, que es clásicamente activada por receptores de citoquinas como TNF-α e IL1-β, así como por estimulación por PAMPS como el LPS y DAMPS <sup>236,244</sup> La activación de NF-κB, inicia la producción y secreción de tanto citoquinas proinflamatorias como antiinflamatorias<sup>245</sup>, así como otros procesos celulares previamente mencionados (**Figura 4-2**).



**Figura 4-2 Via canónica de señalización de NFκ–B.** Tomado y modificado de "The NF-κB Family of Transcription Factors and Its Regulation" <sup>236</sup>. Creado con Biorender.com

Existe una interrelación entre las vías de HIF y NF-κB, ya que comparten algunos estímulos activadores, blancos de acción y reguladores, entre ellos TG2<sup>144</sup>.

Además de su rol primario en la respuesta adaptativa a la hipoxia, HIF-l cumple un importante papel en el control del proceso inflamatorio, por ejemplo, controla la expresión de genes inflamatorios como IL-8, IL-6, receptor 2B de adenosina <sup>246,247</sup> y a su vez la expresión de HIF-l se encuentra bajo el control de varios mediadores inflamatorios como las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  <sup>248</sup>. Además de su rol primario en la respuesta adaptativa a la hipoxia, HIF-l cumple un importante papel en el control del

proceso inflamatorio. Por ejemplo, HIF-1 controla la expresión de genes inflamatorios como IL-8, IL-6, receptor 2B de adenosina <sup>246,247</sup>. Por otro lado, la expresión de HIF-1 se encuentra bajo el control de varios mediadores inflamatorios como las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  <sup>248</sup>.

Por otra parte, en algunos tipos celulares, la hipoxia resulta en un estímulo moderado aunque robusto para la activación de NF-κB por la vía canónica <sup>242,249</sup>. Las enzimas PHDs y FIH también cumplirían un papel en la activación de la vía de NF-κB, principalmente en exposiciones prolongadas al ambiente hipóxico <sup>250,251</sup>.

La conexión entre las vías está bien establecida, aunque aún quedan mecanismos regulatorios por elucidar tanto en procesos fisiológicos como patológicos. El resultado de la activación por esta vía es célula/tejido dependiente, pudiendo encontrarse resultados antagónicos dependiendo del contexto.

### Papel de la hipoxia y la inflamación en el desarrollo normal de la placenta

Como se mencionó anteriormente el desarrollo normal de la placenta se inicia y es regulado por un ambiente uterino hipóxico y proinflamatorio. El bajo nivel de oxígeno además de ser fisiológico y protector para la organogénesis es un regulador fundamental de una variedad de eventos celulares que ocurren durante la diferenciación temprana del trofoblasto <sup>252</sup>. Mediante la activación del heterodímero HIF-1 y la vía NF-κB se regulan múltiples procesos celulares (angiogénesis, migración/invasión, eritropoyesis, y metabolismo celular) fundamentales en el proceso de placentación <sup>253,254</sup> De hecho, la disrupción de los componentes de ambas vías resulta en defectos en el desarrollo de la placenta tanto a nivel celular como estructural, llegando a ser incompatibles con la vida en algunos casos <sup>238,255</sup>.

Durante el proceso de remodelación del árbol vascular materno se observa que la expresión de HIF-l $\alpha$  es acompañada por la expresión de TGF- $\beta$ 3 en el trofoblasto. Ambos factores presentan una expresión alta al inicio del primer trimestre (5 semanas) cuando los niveles de O<sub>2</sub> son de aproximadamente un 2-3% y luego decaen hacia el inicio del segundo trimestre (12 semanas) cuando los niveles de O<sub>2</sub> alcanzan el 10% <sup>256,257</sup>. La activación de NF- $\kappa$ B en la interfase materno-fetal acompaña esta dinámica, siendo alta desde el período pre-implantatorio, ayudando a mantener un balance fisiológico de

citoquinas pro- y anti-inflamatorias; luego cae hacia el segundo trimestre (regulada principiante por factores hormonales) para volver a aumentar en el tercer trimestre colaborando con los mecanismos que desencadenan el parto <sup>258</sup>. Estos cambios en la tensión de oxígeno y la expresión de HIF-l $\alpha$  y TGF- $\beta$ 3 así como de NF- $\kappa$ B han mostrado ser fundamentales en la regulación de la diferenciación del CTB; en este proceso se van afectados los procesos de proliferación, metabolismo, fusión celular y capacidad de invasión del trofoblasto en la decidua materna, y eventualmente de remodelación de las arterias uterinas <sup>253,259</sup>. Los diferentes linajes del trofoblasto se ven afectados en distinta forma por la tensión de oxígeno presente.

La diferenciación de CTB a ETV, se da en el primer trimestre e implica una transición epitelio-mesenquimal, en el que las células pierden capacidad proliferativa y adquieren propiedades invasivas. Para que esta diferenciación sea efectiva, se requiere de Po, bajas, y es dependiente de la expresión de HIF-l $\alpha$ <sup>260</sup> y regulado por la activación de NF- $\kappa$ B <sup>261,262</sup> a través de la inducción de enzimas como las metaloproteasas (MMP) <sup>263</sup>. Las células de trofoblasto invasivo sufren cambios rápidos en sus funciones celulares y son reguladas temporal y espacialmente en su camino de invasión <sup>259,264</sup>. La formación de las vellosidades de anclaje se acompaña por la síntesis y degradación de proteínas de la matriz celular, así como cambios en la expresión de moléculas de adhesión. En ausencia de HIF-la este proceso se ve comprometido y el CTB se diferencia exclusivamente a trofoblasto velloso con formación de estructuras sincitiales 254,265 comprometiendo el proceso de remodelación arterial en el útero. Si existen fallas en el cambio en la perfusión del tejido y por tanto del aumento de la tensión del oxígeno, o un defecto en el trofoblasto en responder a este cambio, esto podría resultar en una expresión sostenida de HIF-1a y TGF-B3 lo cual derivaría en un detenimiento de las células en un fenotipo inmaduro intermedio. Chang et al <sup>259</sup> proponen un modelo en la diferenciación del EVT en el que la baja tensión de oxígeno promueve la formación de un EVT inmaduro, que luego madura a EVT con potencial invasivo bajo condiciones de aumento de O2.

La diferenciación del STB, también es dependiente de la tensión de oxígeno y en parte está regulada por la expresión de HIF-1 <sup>254</sup>. En estudios con trofoblasto humano *in vitro* bajo diferentes niveles de  $O_2$ , se observó que a 21%  $O_2$  el CTB se fusiona espontáneamente, y que este efecto es drásticamente reducido a niveles de oxígeno menores al 11%, así como la secreción de hormonas típicas del STB como la hGC <sup>254,265,266</sup>.

Por otro lado, la hipoxia es clave para regular la función de los componentes del sistema inmune materno y la inflamación. Los niveles bajos de oxígeno pueden afectar la función de las células efectoras, suprimiendo las respuestas inflamatorias, regulando la proliferación celular, el desarrollo y los mecanismos efectores de las células inmunes <sup>97,99</sup>.

Las alteraciones de la hipoxia fisiológica al inicio de la gestación han sido asociadas a desórdenes del embarazo como preeclampsia, restricción de crecimiento uterino y abortos espontáneos recurrentes<sup>267</sup>.

### Modelos experimentales de inducción de hipoxia en cultivos celulares.

El uso de modelos de hipoxia en cultivo celular ha permitido caracterizar la respuesta a la hipoxia tanto a nivel celular, molecular y bioquímico, así como estudiar los efectos de esta sobre los procesos celulares. El modelo de hipoxia óptimo implica el trabajo en atmósfera controlada, donde se pueden establecer P<sub>O2</sub> bajas a nivel del espacio pericelular -hipoxia física- <sup>268</sup> mediante las cámaras e incubadores de hipoxia los cuáles no son accesibles en muchos laboratorios. Como alternativa se han desarrollado agentes miméticos de hipoxia a través de la estabilización del factor HIF-1 por distintos mecanismos <sup>269-271</sup>. El CoCl<sub>2</sub> es uno de los agentes miméticos de hipoxia más comúnmente usados, que genera una robusta estabilización de HIF-1α en forma tiempo y dosis dependiente.

El mecanismo de acción de estos compuestos puede variar, pero muchos de ellos inhiben la acción de las PHD, enzimas clave en el proceso de degradación de HIF-l $\alpha^{235}$ . Un mecanismo de acción sugerido para el CoCl<sub>2</sub> consiste en la sustitución del Fe<sup>2+</sup> por el Co<sup>2+</sup> en las PDH <sup>272,273</sup> aunque no existe evidencia experimental directa que apoye dicha teoría. Por otro lado, el ascorbato es un cofactor esencial para el mantenimiento de Fe<sup>2+</sup> en su estado reducido en las enzimas PHD. El Co<sup>2+</sup>, oxida en forma directa el ascorbato, y además podría interferir con su transporte hacia dentro de la célula. Se observó que la actividad de las PDH *in vivo* es limitada por los niveles de ascorbato y no los de Fe<sup>2+</sup> en presencia de Ni<sup>2+</sup> o Co<sup>2+ 274</sup>. La actividad transcripcional de HIF-1 es además regulada por la enzima FIH, que también depende del ascorbato reducido como cofactor para su ciclo catalítico y ha mostrado ser incluso más sensible a la inhibición por CoCl<sub>2</sub> <sup>234,275</sup>. El tercer mecanismo por el cual Co<sup>2+</sup> llevaría la estabilización de HIF-I $\alpha$  es por interferencia con su degradación vía ubiquitinación, ya sea por interferencia en la interacción con pVHL <sup>276</sup> o por interferencia en la interacción con culina-2 (componente del complejo ubiquitina-ligasa pVHL-E3) <sup>277</sup>. A su vez, el CoCl<sub>2</sub> podría intervenir en los mecanismos de regulación de la transcripción como de la traducción de HIF-l $\alpha$  <sup>235</sup>.

Con el objetivo de comprender el efecto de la hipoxia en el contexto de la interfase materno-fetal y más concretamente en la fisiología o procesos patológicos de la placenta como la preeclampsia, el CoCl<sub>2</sub> representa un modelo extensamente usado en estudios *in vitro* tanto con explantos <sup>278–280</sup>, células trofoblásticas aisladas <sup>281–284</sup> como con líneas celulares representativas: HTR8/SVneo <sup>285,286</sup>, Bewo <sup>287–289</sup>, o Swan-71 <sup>290</sup>.

# Expresión de la TG2 en la interfase materno-fetal y su relación con la hipoxia e inflamación.

Como se expuso en la introducción general de este trabajo en la placenta la TG2 se expresa en células del estroma y el trofoblasto durante el embarazo desde el primer trimestre bajo el control de la progesterona <sup>125,126,132</sup>. La TG2 participa en la decidualización <sup>126</sup> y la fisiología del trofoblasto tanto por la actividad TGasa como por sus funciones adhesivas.

Algunos estudios mostraron cambios en la expresión y/o función de TG2 en placenta de mujeres con complicaciones del embarazo, específicamente se observó actividad transglutaminasa aumentada en la placenta de mujeres con preeclampsia <sup>138</sup>. Otros autores encontraron signos de inflamación con concomitante aumento en la expresión de TG2 en placentas a término de mujeres celíacas no tratadas con complicaciones del embarazo <sup>137</sup>.

Basándonos en la asociación demostrada entre la condición de hipoxia, la inflamación y la TG2 (desarrollada en la Introducción, Capítulo 1), nos planteamos como hipótesis general que la expresión o función aberrante de TG2 en células trofoblásticas podría ser un factor en la patogenia de la preeclampsia o disfunción placentaria relacionada. Con esto en mente, en esta parte del trabajo nos propusimos ampliar el conocimiento actual de la respuesta a hipoxia y estímulos inflamatorios de la línea celular de primer trimestre Swan-71 e investigar la expresión y actividad de TGasa en esta célula trofoblástica no maligna.

### Resultados y discusión

Efectos del tratamiento con CoCl<sub>2</sub> ("hipoxia química") o con citoquinas inflamatorias sobre la sobrevida de las Swan-71 la expresión de HIF-1α y la activación de Caspasa 3

Si bien el CoCl<sub>2</sub> ha sido ampliamente usado como agente químico para el establecimiento del modelo de hipoxia y se ha empleado tanto en cultivos primarios de trofoblasto y líneas celulares trofoblásticas, es limitada la bibliografía que documenta el uso de este agente con la línea trofoblástica Swan-71. La contracara del uso de estos agentes químicos para la inducción de la hipoxia es su citotoxicidad. En el caso del CoCl<sub>2</sub>, se ha observado, dependiendo del tipo celular, que por encima de 200-300  $\mu$ M presenta efectos tóxicos que llevan a la muerte celular <sup>291,292</sup>. Por este motivo, para iniciar nuestro abordaje debimos realizar una estandarización de las condiciones del cultivo, contemplando la viabilidad celular en concomitancia con la estabilización del factor de transcipción HIF-Iα. En primer lugar, testeamos la viabilidad por citometría de flujo, mediante el método de tinción con anexina V- Ioduro de propidio (AV-IP) en un rango de concentraciones de CoCl<sub>2</sub> de 50-200  $\mu$ M y durante el tratamiento con las citoquinas proinfamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . No se observaron cambios significativos en la viabilidad de las células tratadas respecto a la condición basal (**Figura IA, Art III**).

Considerando que el CoCl<sub>2</sub> a través de sus efectos tóxicos sobre las células puede activar la vía de las caspasas <sup>293</sup>, evaluamos mediante citometría de flujo la activación de caspasa 3 para la mayor concentración de CoCl<sub>2</sub> testeada. Si bien se observó activación de caspasa 3, esta fue significativamente menor que en el control positivo con camptotecina (**Figura 4-33**), en concordancia con el resultado de la tinción con AV-IP (**Figura 1A, Art** III).

Si bien en trabajos anteriores <sup>145</sup> se reportó sensibilidad de la línea Swan-71 al tratamiento con TNF- $\alpha$  en cuanto a la apoptosis y activación de caspasas, bajo nuestras condiciones de estudio (10 ng/mL, 24h) no se observó una afectación significativa de la sobrevida del cultivo (**Figura 1A, Art III**), ni activación de caspasas en respuesta a esta citoquina (**Figura 4-33**).



**Figura 4-3.-** Activación de caspasa 3 en células Swan-71 cultivadas durante 24 h en presencia de CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M o TNF- $\alpha$  10 ng/mL en comparación con la condición basal y 3  $\mu$ M camptotecina como control positivo. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM. Los asteriscos sobre las barras indican diferencia significativa respecto a la condición basal. Test t no pareado. El porcentaje de células caspasa 3<sup>+</sup> se determinó por citometría de flujo. Se muestra histograma representativo de las condiciones ensayadas.

Posteriormente evaluamos la estabilización del factor HIF-l $\alpha$  inducida por CoCl<sub>2</sub> mediante inmunoblot de extractos de células Swan-71 luego del tratamiento con CoCl<sub>2</sub> 50-200  $\mu$ M por 24h. Observamos la mayor expresión de la proteína HIF-l $\alpha$  con CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M (**Figura 1B, Art. III**). En línea con este resultado, la expresión del mensajero de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), un conocido gen blanco de HIF-1, aumentó 25 veces respecto a la condición basal (**Figura 4-44**).



**Figura 4-4 Determinación de la expresión de GAPDH en condiciones de hipoxia**. Las células Swan-71 fueron tratadas por 24 h con CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M. Se determinó la expresión relativa del ARN mensajero de GAPDH por qRT-PCR empleando el gen PPIA como gen de referencia. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de ensayos triplicados. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto a la condición basal. Test-t no pareado.

De esta manera confirmamos que en nuestras condiciones de ensayo no se afecta en forma importante la sobrevida del cultivo y que HIF-l $\alpha$  es estabilizado y sería capaz de inducir la expresión de genes blanco.

Efectos de la hipoxia química y las citoquinas inflamatorias sobre la expresión de genes vinculados a la migración celular y la producción de mediadores inflamatorios

Las células trofoblásticas expresan una variedad de citoquinas y factores de crecimiento *in vivo* <sup>294–296</sup> e *in vitro* <sup>294,297,298</sup> y estos pueden influenciar tanto su sobrevida, crecimiento y diferenciación como la de las células y tejidos que las rodean <sup>299–301</sup>. Como se mencionó anteriormente el ambiente hipóxico en la placenta temprana es una condición fisiológica importante que condiciona la expresión de esos factores y las funciones que regulan como la migración y la invasión del trofoblasto <sup>299,302,303</sup>. En particular nos focalizamos en las interleuquinas IL-6 e IL-8 que se expresan en la interfase materno-fetal a lo largo de la gestación y están implicadas en múltiples procesos fisiológicos. Por otro lado, se ha asociado una alta expresión de estas citoquinas al desarrollo de condiciones patológicas del embarazo como la preeclampsia <sup>304,305</sup>.

En este contexto analizamos la producción de estas citoquinas multifuncionales por parte de las células Swan-71 incubadas en condiciones de hipoxia química. La producción basal de IL-6 e IL-8 se vio alterada de diferentes maneras. El tratamiento con CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M aumentó la producción basal de IL-8 (1.5 veces) mientras que dosis más bajas del agente mimético no tuvieron efectos. Por otro lado, la producción de IL-6 en las células Swan-71 disminuyó a aproximadamente la mitad de los niveles basales en todo el rango estudiado (CoCl<sub>2</sub> 50-200  $\mu$ M) (**Figura 2A, Art III**). En línea con este resultado observamos una disminución de tres veces la expresión del ARNm de IL-6 en células Swan-71 sometidas a hipoxia química (CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M) (**Figura 4-55**). Estos resultados son consistentes con trabajos previos que emplean la línea trofoblástica Swan-71 o explantos de vellosidades placentarias mantenidos en atmósfera con bajo oxígeno<sup>290,306</sup>.

En el desarrollo de la preeclampsia, se da una isquemia de placenta acompañada por aumento de ROS y citoquinas proinflamatorias en circulación y disfunción endotelial <sup>307</sup>. Teniendo en cuanta el aumento de IL-8 observado en condiciones de hipoxia química, y siendo que esta quimioquina está involucrada en el reclutamiento de leucocitos en contextos patológicos <sup>308</sup>, nos enfocamos en explorar los efectos del ambiente inflamatorio, empleando TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  como estímulos sobre las células Swan-71.



**Figura 4-5 Determinación de la expresión de IL-6 en condiciones de hipoxia**. Las células Swan-71 fueron tratadas por 24 h con CoCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M. Se determinó la expresión relativa del ARN mensajero de IL-6 por qRT-PCR empleando el gen PPIA como gen de referencia. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de ensayos triplicados. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto a la condición basal. Test-t no pareado.

Los resultados mostraron que en presencia de TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  los niveles de IL-6 e IL-8 en el sobrenadante del cultivo aumentan significativamente, siendo el incremento por sobre el basal más pronunciado para IL-6 que para IL-8 luego de la incubación con ambos estímulos inflamatorios. (**Figura 2B, Art III**). La evidencia previa muestra que tanto niveles insuficientes como excesivos de estos mediadores pueden alterar la función del trofoblasto y la homeostasis inmunológica y en consecuencia las funciones generales de la placeta comprometiendo la gestación <sup>303</sup>. En particular los niveles bajos de IL-6 pueden alterar la migración, dado que esta citoquina pleiotrópica regula la expresión de integrinas y la activación de metaloproteinasas de matriz <sup>302,309</sup>. Teniendo en cuenta estos resultados y basadas en el papel de las metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y MMP-9) y del TGF- $\beta$ 3 en la migración y el fenotipo invasor de trofoblasto durante la gestación temprana <sup>257</sup>, estudiamos el efecto de las condiciones inflamatorias y de la hipoxia química sobre las células Swan-71 respecto a la expresión de los ARNm de estos mediadores.

Los niveles de ARNm de MMP-9 aumentaron tanto en condiciones inflamatorias como con el tratamiento con CoCl<sub>2</sub>, aunque el efecto fue más prominente cuando las células Swan-71 fueron incubadas con IL-1 $\beta$  en comparación con TNF- $\alpha$  o CoCl<sub>2</sub>. En contraste, la expresión de MMP-2 se afectó en forma diferencial por los estímulos, observándose un moderado incremento con el tratamiento con IL-1 $\beta$  y con TNF- $\alpha$  y una disminución con la hipoxia química (**Figura 3, Art. III**). Este resultado es consistente con trabajos previos que muestran una disminución de la capacidad de invasión del EVT por disminución de la activación de MMP-2 en gestación temprana <sup>310</sup>. En línea con trabajo previos <sup>311</sup>, la expresión de TGF-β3 solo se vio modificada en condiciones de hipoxia química, observándose un aumento de 3 ± 1.5 veces (**Figura 3, Art. III**). Mas aun, en el contexto de preeclampsia, la hipoxia crónica se asocia a un aumento de TGF-β3 y resulta en una migración deficiente del trofoblasto <sup>312</sup>.

Efectos de la hipoxia química y condiciones inflamatorias sobre la actividad TGasa y la migración celular.

Existe una interacción regulatoria compleja entre IL-6, MMP-2, MMP-9 y TG2 <sup>162,313-315</sup>. Asímismo, como se planteó en la introducción de este trabajo la TG2 está implicada en la adhesión y migración celular y nuestro grupo previamente describió el papel de la TG2 de superficie en la migración de las células Swan-71 <sup>128</sup>. Teniendo en cuenta esta evidencia, continuamos nuestro trabajo examinando el efecto de la hipoxia química y las citoquinas inflamatorias sobre la migración de las células trofoblásticas mediante ensayos de cerrado de herida sobre la monocapa celular e investigamos la implicancia de la actividad TGasa en este proceso mediante su inhibición específica. En ensayos preliminares determinamos un tiempo de incubación de 8 h como el óptimo para obtener una medida razonable de la migración en el área de la herida sin contribución de la proliferación celular.

Nuestros resultados muestran que el cerrado de la herida disminuyó en aproximadamente un 40% por efecto de la hipoxia química, pero no fue alterado en las condiciones inflamatorias ensayadas. Como se muestra en a **Figura 4** (**Art. III**) la adición de CTA (un inhibidor específico de la actividad TGasa) también disminuyó el cerrado de la herida. Estos resultados sugieren que TG2 co-regula la migración del trofoblasto y son consistentes con trabajo previos que muestran la atenuación de los signos asociados a preeclampsia en un modelo de ratón tratados con CTA <sup>138</sup>.

El papel de la TG2 en la migración es complejo e implica su función como proteína adaptadora ("*scalffold*") y la actividad TGasa <sup>162,316</sup>. A nivel de la superficie celular la TG2 se asocia a las β-integrinas y componentes de la MEC potenciando la señalización mediada a través de las integrinas <sup>42,44</sup>. Adicionalmente, la TG2 puede ser liberada a espacio extracelular en condiciones de estrés <sup>317</sup> y allí a través de la actividad TGasa alterar componentes de la MEC, afectando la migración <sup>318,319</sup>. La inhibición parcial de la migración observada en células Swan-71 en presencia de CTA es consistente con un papel de la actividad TGasa en el medio extracelular, aunque la función de la TG2 como proteína adaptadora probablemente esté también implicada.

### Efectos de la hipoxia e inflamación sobre la expresión de la TG2 y su localización celular

Para comenzar a explorar la hipótesis planteada estudiamos la expresión de la TG2 en el contexto de la hipoxia e inflamación en la línea Swan-71 (dos condiciones implicadas en la regulación génica de TGM2 en diversos tipos celulares, cómo se detalla en la Introducción). Como primera aproximación evaluamos la expresión de la enzima a nivel proteico por inmunoblot y su localización intracelular mediante microscopía confocal, en condiciones basales y luego del tratamiento con CoCl<sub>2</sub>, o citoquinas inflamatorias. Para la detección de la TG2 usamos un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítope entre los residuos 447 y 538 en la TG2 de largo total (canónica, TGM2\_vl) y en la mayoría de las variantes cortas de *splicing* (TGM2\_v2, v4a y v4b). Solo se detectó la TG2 canónica (80kDa) (**Figura 7A, Art. III**), observamos que su expresión disminuyó significativamente en el tratamiento con CoCl<sub>2</sub> en paralelo al aumento de HIF-1.

En cuanto a los estímulos inflamatorios, la incubación con TNF- $\alpha$  también produjo la disminución de TG2, mientras que IL-1 $\beta$  no generó cambios en su expresión (**Figura 7B**, **Art. III**). Este resultado fue confirmado al evaluar la señal de la TG2 mediante microscopía confocal, donde observamos que tanto el tratamiento con TNF- $\alpha$  como CoCl<sub>2</sub> resultó en una disminución en la expresión global de la TG2 (**Figura 6A y B, Art. III**). Por otro lado, respecto a la localización subcelular de la proteína encontramos que en condiciones basales la TG2 se localizó principalmente en el citoplasma, mostrando una relación DI núcleo/(DI total – DI Núcleo) < 0.5 (ver Materiales y métodos). Adicionalmente, el tratamiento con TNF $\alpha$ , resultó en un aumento relativo de la señal de TG2 en el núcleo celular. La localización de TG2 en el núcleo celular se ha descripto en algunos tipos celulares <sup>320</sup>, pero hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer reporte que muestra a TG2 en el núcleo de células trofoblásticas.

### Efectos de la hipoxia e inflamación sobre la activación de NF-ĸB

Como se mencionó en el marco teórico desarrollado en esta sección, existe amplia evidencia que documenta la interrelación de las vías inflamatorias y la consecuente activación de NF- $\kappa$ B y de la respuesta a la hipoxia con la activación de HIF-1. A su vez la activación de estas vías está implicada en los mecanismos de regulación génica de TG2. En este contexto, exploramos la localización de la proteína p65 de NF- $\kappa$ B cuando las células Swan-71 son estimuladas con TNF- $\alpha$  o CoCl<sub>2</sub>. Observamos que p65 rápidamente migra al núcleo y permanece allí luego de 24 h de estimulación con TNF- $\alpha$  (**Figura 6A y** 

**B**, **Art. III**). En el contexto de este trabajo y en colaboración con la Unidad de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo, se generó una línea trofoblástica reportera estable para la activación de NF-κB, Swan-7I-NF-κB-hrGFP. La activación de NF-κB por el estímulo inflamatorio fue observada en esta línea en presencia de TNF-α o IL-lβ (**Figura 6E, Art III**), sin embargo, bajo condiciones de hipoxia química no se observaron cambios en la traslocación al núcleo de p65 (**Figura 6A y D, Art. III**) ni activación de la línea reportera (**Figura 6E, Art. III**).

Si bien en nuestro trabajo empleando las células Swan-71 como modelo en condiciones de hipoxia química, no se observó activación de la vía NF- $\kappa$ B por microscopía confocal (siguiendo la localización de p65) ni con la línea reportera Swan-71-NF- $\kappa$ B-hrGFP; no podemos descartar la posibilidad de que se pueda dar la activación en células trofoblásticas en el contexto de P<sub>O2</sub> bajas a través de otros mecanismos <sup>249</sup>. El uso de CoCl<sub>2</sub> para la inducción de la hipoxia química ha sido validado como modelo de trabajo en condiciones hipóxicas. Aunque existen algunas diferencias reportadas en los resultados obtenidos en comparación a la hipoxia física en varias líneas celulares, presenta como ventaja una logística de trabajo más simple y económica, indudablemente estabiliza el factor HIF-1 en forma robusta y reproduce varios efectos observados a bajas P<sub>O2</sub> <sup>235</sup>.

### Efectos de la hipoxia química y TNF-α sobre la actividad TGasa

Para avanzar en el estudio del papel de la TG2 y su actividad en la funcionalidad del trofoblasto, pusimos a punto un ensayo para evaluar la actividad TGasa en el compartimento intracelular mediante citometría de flujo. Utilizamos 5-(biotinamido)-pentilamina como sustrato de la TG2 para luego detectar su incorporación a las proteínas endógenas (por entrecruzamiento) mediante estreptavidina conjugada a un fluoróforo. Usamos esta metodología para evaluar los efectos de la hipoxia química o las condiciones inflamatorias en la actividad TGasa. Interesantemente, observamos que tanto la hipoxia química como el estímulo con TNF- $\alpha$  incrementaron dicha actividad (**Figura 5, Art. III**), en paralelo a la diminución de la expresión global de la proteína.

## Expresión de los ARNm de las diferentes variantes de *splicing* de TG2 en condiciones inflamatorias y de hipoxia química

Las propiedades funcionales de la TG2 dependen de sus dominios moleculares y de su conformación espacial <sup>33,316</sup>. Por este motivo, la expresión de las variantes de splicing

truncas pueden alterar drásticamente las propiedades de la TG2 e incidir sobre los resultados observados a nivel de la migración o actividad TGasa. Interesantemente, observamos que tanto la hipoxia química como el estímulo con TNF- $\alpha$  incrementaron dicha actividad (**Figura 5, Art.III**), en paralelo a la diminución de la expresión global de la proteína.

En un trabajo paralelo al desarrollo de los objetivos centrales de esta tesis, analizamos los efectos de los anticuerpos anti-β2 glicoproteína I (anti-β2GPI) presentes en sueros de pacientes con síndrome antifosfolipídico (SAF) sobre las células trofoblásticas (Swan-71) en la expresión de TG2 y sus variantes de *splicing* alternativo en paralelo a la activación de NF-kB y la producción de citoquinas proinflamatorias <sup>175</sup>. El panel de sueros empleados es el mismo que se utilizó en la Sección I.2 del Capítulo 3. El SAF se asocia a una respuesta inflamatoria robusta en la placenta. Los anticuerpos específicos contra la β2GPI, expresada en el trofoblasto, participan en el proceso inflamatorio mediante la activación de la vía de NF-ĸB. La TG2 expresada en el trofoblasto estaría involucrada en la regulación de esta vía, por lo que nos planteamos que también puede tener un papel en el proceso inflamatorio inducido por anti- $\beta$ 2GPI en la interfase materno-fetal. Los resultados de ese trabajo mostraron que los anti-β2GPI indujeron una moderada activación de NF-κB en la línea reportera mencionada anteriormente Swan-71-NF-κBhrGFP en comparación al tratamiento con TNF-α (Figura 4-66 A.1), siendo un efecto dependiente de la concentración (Figura 4-66 A.2). Por otra parte, estos anticuerpos aumentaron significativamente y en forma dosis dependiente la producción de IL-6 (**Figura 4-66 B.I**). Adicionalmente, los sueros de pacientes con SAF con anti- $\beta$ 2GPI también mostraron una tendencia a aumentar la producción de IL-6 por las células Swan-71 en comparación con los sueros del grupo de control (Figura 4-6 B.2). En relación con la producción de IL-8, no se observó aumento en respuesta a diferentes concentraciones de anti- $\beta$ 2GPI (Figura 4-6 B.3) ni diferencias en la respuesta a los sueros de los diferentes grupos de pacientes (Figura 4-6 B.4)

Dentro de este contexto, nos planteamos la interrogante de si la regulación de la expresión de la TG2 canónica (TGM2\_vl) y sus variantes de *splicing* podría modificarse si los anti- $\beta$ 2GPI se unieran a las células trofoblásticas en la interfase materno-fetal. Para ello estudiamos el patrón de expresión de ARNm de las variantes de TG2 en células Swan-71 expuestas a los sueros de pacientes con SAF en comparación con sueros de mujeres sanas. Como se representa en la **Figura 4-6 C**, todas las variantes se expresaron

en ambos grupos, pero los anti-β2GPI presentes en el suero de las pacientes parecen promover sobre todo la expresión de la TGM2\_v3 en estas células.



**Figura 4-6**. **A.1**) Activación de NF- $\kappa$ B en la línea celular reportera estable Swan-71 en respuesta a anticuerpos específicos contra  $\beta$ 2GPI y TNF-a como control. **A.2**) Activación de NF- $\kappa$ B en la línea celular reportera en respuesta a diferentes concentraciones de anti- $\beta$ 2GPI. En ambos casos la activación de NF- $\kappa$ B se analizó por citometría de flujo (medido como el porcentaje de células GFP+. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto a la condición de referencia. Test One-way ANOVA **B1**) Producción de IL-6 en respuesta a diferentes concentraciones de anti- $\beta$ 2GPI **B2**) Producción de IL-6 en respuesta a sueros de pacientes con anti- $\beta$ 2GPI y de controles **B3**) Producción de IL-8 en respuesta a diferentes concentraciones de anti- $\beta$ 2GPI **B4**) Producción de IL-8 en respuesta a sueros de pacientes con anti- $\beta$ 2GPI y de controles. En todos los casos las citoquinas fueron

analizadas mediante ELISA .C) Expresión de las diferentes variantes de TGM2 en respuesta a las muestras de los dos grupos de pacientes medida por qRT-PCR. En todos los gráficos se representa el promedio ± SEM.

Con el antecedente de la regulación diferencial de las variantes de TG2 asociada al estado inflamatorio inducido por los anti-β2GPI, y habiendo observado una discordancia entre el perfil de expresión de la TG2 canónica y el perfil de actividad en condiciones de hipoxia química y en respuesta a citoquinas inflamatorias nos enfocamos en analizar la expresión de los ARN mensajeros de la TG2 canónica y sus variantes de splicing en estas condiciones. Tanto con el tratamiento con CoCl<sub>2</sub> como con citoquinas proinflamatorias se detectaron las cuatro variantes cortas (Figura 8, Art. III). Los resultados obtenidos en tres experimentos independientes muestran que la adición de 200 µM CoCl<sub>2</sub> generaron una disminución de la variante canónica TGM\_vl, en paralelo se observa un incremento de las variantes cortas TGM2\_v2 y TGM2\_v3 (Figura 8A, Art. III). En contraste, se observa un aumento del ARNm de la TG2 canónica TGM2\_vl en el tratamiento con TNFα, mientras que su expresión no fue alterada con IL-1β (Figura 8B, Art. III). En cuanto a las variantes cortas, TGM2\_v2 aumentó su expresión con ambos estímulos inflamatorios, mientras que TGM2\_v3 solo aumento en presencia de TNF- $\alpha$  (Figura 8B, Art. III). La expresión de las variantes TGM2\_v4a y TGM2\_v4b no se alteró significativamente bajo ninguno de las condiciones ensayadas (Figura 8A, Art. III).

Interesantemente y en forma consistente, tanto en la condición de hipoxia química como con los estímulos infamatorios las variantes cortas presentan una mayor expresión en comparación a la condición basal; obteniéndose la mayor relación por sobre la variante canónica para las variantes cortas (v2 y v3) en el tratamiento con CoCl<sub>2</sub>.

Las variantes cortas TGM2\_v2 y v3 carecen de los residuos implicados en la transducción de señales y pierden el control de la actividad TGasa <sup>178,208</sup> pero sus efectos en la migración celular son aún desconocidos. La interacción de la TG2 con la fibronectina se atribuye principalmente a ciertos residuos del dominio N-terminal <sup>321</sup> los cuales se conservan en todas las variantes de *splicing*, sin embargo, más recientemente se ha reportado que algunos aminoácidos del extremo C-terminal también están implicados en esta función <sup>42,322</sup> y por otro lado, el sitio de unión de TG2 a la superficie celular a través de las β-integrinas implica el segundo y cuarto dominio de TG2 <sup>42</sup>. Tomando en cuenta estos datos estructurales, podemos inferir que las variantes cortas de TG2 v2 y v3 no están implicadas en la migración celular a través de las funciones adhesivas atribuibles a la TG2 canónica. Por lo tanto, su expresión relativamente más alta en las células Swan-71 expuestas a CoCl<sub>2</sub>, podría ser responsable de la disminución de la migración observada

en esa situación. La falta de disponibilidad de anticuerpos monoclonales que reconozcan en forma diferencial las diferentes variantes de *splicing* es una limitante lamentablemente para la investigación futura de la compleja regulación de la expresión de TG2 en estas circunstancias.

Los principales resultados de este capítulo se muestran en su conjunto en la Figura 4-7.

En suma, en esta parte del trabajo mostramos que la hipoxia química y las condiciones inflamatorias tienen efectos diferenciales sobre las células trofoblásticas del primer trimestre en cuanto a los niveles de expresión de TG2, su localización y perfil de expresión de sus variantes de *splicing*. Este último punto también fue observado en el caso de las células Swan-71 expuestas a sueros de pacientes con SAF, los cuales son también capaces de activar la vía inflamatoria de NF-κB, llevando a un aumento en la secreción de IL-6.

Además, mostramos que la TG2 está implicada en la regulación de la migración del trofoblasto y que la expresión relativamente más alta de TGM2\_v2 y TGM2\_v3 en condiciones de hipoxia química podría ser responsable de la disminución de la migración observada en esta condición debido a la falta de los residuos involucrados en la regulación de la actividad TGasa y la migración celular a través de las uniones adhesivas. Por otro lado, y a través de la colaboración con la Unidad de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo, pudimos generar una línea trofoblástica reportera estable para la activación de NF-κB, que no solo fue de gran utilidad para el desarrollo de este trabajo, sino que quedará disponible para futuros trabajos.



Figura 4-7. Principales efectos de la hipoxia química y la inflamación sobre las células trofoblásticas Swan-71.
### **ARTICULO III**

Arbildi, P., Rodríguez-Camejo, C., Perelmuter, K., Bollati-Fogolín, M., Sóñora, C., & Hernández, A. (2022). Hypoxia and inflammation conditions differentially affect the expression of tissue transglutaminase spliced variants and functional properties of extravillous trophoblast cells. American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989), 87(6), e13534. https://doi.org/10.1111/aji.13534

### ORIGINAL ARTICLE

### WILEY

# Hypoxia and inflammation conditions differentially affect the expression of tissue transglutaminase spliced variants and functional properties of extravillous trophoblast cells

AIRI

### Paula Arbildi<sup>1</sup> | Claudio Rodríguez-Camejo<sup>1</sup> | Karen Perelmuter<sup>2</sup> | Mariela Bollati-Fogolín<sup>2</sup> | Cecilia Sóñora<sup>1,3</sup> | Ana Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias/Facultad de Química, Universidad de la República, Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay <sup>2</sup>Cell Biology Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup>Escuela Universitaria de Tecnología Médica (EUTM)-Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

#### Correspondence

Ana Hernández, 3051 Alfredo Navarro Av. CP 11600. Laboratorio de Inmunología Instituto de Higiene. Montevideo, Uruguay. Email: aherna@fq.edu.uy; ahernap@gmail.com

Cecilia Sóñora and Ana Hernández contributed equally to this work.

#### **Funding information**

Comision Sectorial de Investigacion Cientifica (CSIC, Uruguay), Grant/Award Number: 362/2018; Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA, Uruguay); Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay)

### Abstract

**Problem:** Persistent hypoxia and inflammation beyond early pregnancy are involved in a bad outcome because of defective trophoblast invasiveness. Tissue transglutaminase (TG2) coregulates several cell functions. An aberrant expression and/or transamidation activity could contribute to placental dysfunction.

**Method of study:** The first-trimester trophoblast cell line (Swan-71) was used to study TG2 expression and cell functions in the absence or presence of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) or chemical hypoxia (CoCl<sub>2</sub>). We analyzed The concentration of cytokines in the supernatant by ELISA; Cell migration by scratch assay; NF- $\kappa$ B activation by detection of nuclear p65 by immunofluorescence or flow cytometry using a Swan-71 NF- $\kappa$ B-hrGFP reporter cell line. Tissue transglutaminase expression was analyzed by immunoblot and confocal microscopy. Expression of spliced mRNA variants of tissue transglutaminase was analyzed by RT-PCR. Transamidation activity was assessed by flow cytometry using 5-(biotinamido)-pentylamine substrate.

**Results:** Chemical hypoxia and TGase inhibition, but not inflammatory stimuli, decreased Swan-71 migration. IL-6 production was also decreased by chemical hypoxia, but increased by inflammation. Intracellular TGase activity was increased by all stimuli, but NF- $\kappa$ B activation was observed only in the presence of proinflammatory cytokines. TG2 expression was decreased by CoCl<sub>2</sub> and TNF- $\alpha$ . Translocation of TG2 and p65 to nuclei was observed only with TNF- $\alpha$ , without colocalization. Differential relative expression of spliced variants of mRNA was observed between CoCl<sub>2</sub> and inflammatory stimuli.

**Conclusion:** The observed decrease in total TG2 expression and relative increase in short variants under hypoxia conditions could contribute to impaired trophoblast invasion and impact on pregnancy outcome.

© 2022 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

#### KEYWORDS

hypoxia, inflammation, tissue transglutaminase, trophoblast

### 1 | INTRODUCTION

Human pregnancy is characterized by deep placentation, which requires proper invasion of the uterus by the extravillous trophoblast (EVT). The invasive trophoblast is responsible for the physiological transformation of the spiral arteries and the development of the placenta during the first trimester, which occurs under low oxygen tension until the intervillous space opens to maternal blood.<sup>1</sup> Oxygen levels, oxidative stress, and inflammatory mediators regulate EVT function and the acquisition of an invasive phenotype. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is a heterodimeric transcription factor consisting of constitutive HIF-1 $\beta$  and inducible HIF-1 $\alpha$ . Under low oxygen tension, the degradation of HIF-1 $\alpha$  is delayed and the HIF complex regulates several signaling pathways related to EVT cell functions.<sup>2</sup> In addition to oxygen availability, inflammatory mediators and growth factors also play a central role in regulating EVT functions.<sup>3-5</sup>

Long-term hypoxia and inflammation could lead to inappropriate trophoblast function, and these abnormalities have been associated with preeclampsia (PE) and intrauterine growth restriction (IUGR).<sup>6</sup> Nevertheless, it remains unclear how these conditions regulate human extravillous trophoblast cell invasion.

PE is a pregnancy-specific syndrome that affects 3–8% of women and is a leading cause of perinatal morbidity and mortality.<sup>7</sup> Poor invasion and migration of trophoblast into the interstitial uterine compartment is thought to be responsible for placental dysfunction.<sup>8</sup> The preeclamptic placenta is characterized by excessive apoptosis, inflammation, and hypoxia.<sup>9–11</sup> Up-regulated expression of HIF-1 $\alpha$  has been observed in the preeclamptic placenta as a result of hypoperfusion and ischemia.<sup>3,12</sup> Local inflammation is exacerbated by prolonged hypoxia, and the placenta of preeclamptic women exhibits high NF- $\kappa$ B activation.<sup>13</sup>

In this work, we focus on the role of tissue transglutaminase (TG2) in trophoblast biology. TG2 is a ubiquitous, multifunctional protein that coregulates important biological processes such as apoptosis/survival, inflammation, migration, extracellular matrix formation, stabilization, and clearance of apoptotic cells.<sup>11,14-16</sup> Some functions are mediated by calcium-dependent modification of proteins through the formation of  $\varepsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-lysine isopeptide bonds (transamidation activity or TGase).<sup>17</sup> In addition, TG2 has other enzymatic activities (e.g. GTPase) and can also function as a scaffolding protein.<sup>16,18</sup>

The expression of different spliced variants of the TG2 gene (TGM2) has been reported in various tissues and cell lines.<sup>19</sup> Four variants (TGM2\_v2, v3, v4a, v4b) lack the terminal residues of the C-terminal region compared to TGM2\_v1.<sup>20</sup> The regulation of TGase activity is modified in the shortest variants (TGM2\_v2 and TGM2\_v3) due to the absence of the GTP-binding regulatory domain.<sup>21</sup>

Response elements for stress-induced factors, including NF- $\kappa$ B and HIF, are located on the TG2 promoter. Inflammatory cytokines are also

TG2 inducers<sup>22</sup> and can affect isoform expression depending on cell type.<sup>23,24</sup>

Current knowledge on the expression and functions of TG2 mainly relates to pathological conditions such as cancer and neurodegenerative diseases associated with abnormal expression or altered function of this enzyme.<sup>25</sup>

Overexpression of TG2 has been observed in many tumors associated with different cell fates.<sup>26</sup> In some tumor cells, TG2 expression and TGase activity were upregulated by cytokines and a hypoxic environment, which was associated with resistance to apoptosis and invasion.<sup>20,27,28</sup> In addition, upregulation of certain spliced variants correlated with central nervous system pathologies<sup>27</sup> and autoimmune diseases.<sup>29,30</sup>

In placenta TG2 is expressed in stromal cells and trophoblast during first trimester and term pregnancy, under progesterone control.<sup>31-33</sup> TG2 participates in decidualization<sup>31</sup> and trophoblast physiology by both TGase activity and adhesive functions. Surface TG2 coregulates signaling pathways through integrins and contributes to the assembly of focal junctions.<sup>34,35</sup> TGase activity is also involved in the stabilization of the content of exosomes and microparticles released from the syncytiotrophoblast into the maternal circulation.<sup>36</sup>

Some studies showed changes in the expression and/or function of TG2 in placenta of women with bad pregnancy outcome. Increased TGase activity was observed in the placenta of preclamptic women.<sup>37</sup>

TG2 is the main autoantigen in Celiac disease that is associated with poor pregnancy outcome.<sup>38,39</sup> Anti-TG2 antibodies are found in several tissues included placenta.<sup>40,41</sup> Previous studies by our group support the pathogenic role of anti-TG2 antibodies at the level of the maternal-fetal interface by inhibiting several key processes in which TG2 is involved.<sup>14,42,43</sup>

Other authors showed signs of inflammation with concomitant increase in TG2 expression have been reported in term placentas of untreated celiac women with bad pregnancy outcome.<sup>44</sup>

Based on the association between hypoxia, inflammation, and TG2, aberrant expression or function of TG2 in trophoblastic cells may be involved in the pathogenesis of PE or related placental dysfunction.<sup>37</sup> With this in mind, we aimed to expand the current knowledge of the response to hypoxia and inflammatory stimuli of the first trimester Swan-71 cell line and to investigate the expression and activity of TG2 in this nonmalignant trophoblastic cell.

### 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Cell lines and reagents

The trophoblast cell line Swan-71<sup>45</sup> was cultured in complete DMEM-F12 medium (Capricorn Scientific, Germany) supplemented with 10% AIRI

(v/v) fetal bovine serum. Cells were routinely propagated in 25 or 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator until they reached approximately 80% confluence. The cells were then trypsinized, and the concentration was adjusted and used for different experimental setups. Cells were cultured for no longer than 10–15 passages.

The stable reporter cell line Swan-71-NF- $\kappa$ B-hrGFP was generated by stable transfection with the pNF- $\kappa$ B-hrGFP plasmid as described previously with modifications.<sup>46,47</sup> Briefly, cells were transfected by nucleoinfection (Amaxa Nucleofector 96-well Shuttle System) with 10 µg of the pNF- $\kappa$ B-hrGFP plasmid (Agilent Technologies, USA). Nucleoinfected cells were selected and expanded in a medium containing 50 µg/mL hygromycin B. Resistant cells were stimulated with 50 ng/mL TNF- $\alpha$  and those expressing green fluorescent protein (GFP) were sorted. NF- $\kappa$ B activation by stimuli was assessed by immunofluorescence (translocation of the p65 subunit) and flow cytometry as described below.

All reagents had analytical quality and were purchased from Sigma-Adrich, USA, unless otherwise indicated.

### 2.2 Chemical hypoxia and inflammatory conditions

Swan-71 cells were seeded in 6-,12-,24-, or 48-well plates (depending on the experiment in progress) at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL per well and allowed to adhere overnight. Cells were then exposed to chemical hypoxia or inflammatory cytokines, at least in triplicates per condition studied. Cobalt chloride (50 – 200 µM CoCl<sub>2</sub>, 24 h) was used as a HIF-1 $\alpha$  activator.<sup>48</sup> TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  (10 ng/mL, 24 h) were used as inflammatory stimuli (R&D Systems, USA).

### 2.3 | Apoptosis determination

Apoptosis/necrosis rate was assessed with FITC-labeled Annexin-V and Propidium iodide (PI) staining (Immunotech, France). After 24 h exposure to CoCl<sub>2</sub> or inflammatory stimuli, cells were collected (from supernatant and adherent cells) and subjected to analysis.

Swan-71 cells were treated for 16 hours with 3µM camptothecin and used as control for apoptosis.<sup>49</sup> For flow cytometric analysis, 5000 cells were collected in a BD FACSCalibur with Cell Quest software (BD Biosciences). Flowing 2.5.1. software (Turku Bioscience) was used for data analysis.

### 2.4 | Western blotting

After a 24 h exposure to  $CoCl_2$  or inflammatory stimuli, lysates of Swan-71 were prepared using NP40 buffer with Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, USA), and Western blot analyzes were performed as described previously.<sup>50</sup> Expression of TG2 and HIF-1 $\alpha$  was analyzed using TG100 monoclonal antibody (1:1000, MS-

279, Thermo Fisher Scientific, USA) and anti-HIF-1 $\alpha$  polyclonal antibody (1:500, sc-1090, Santa Cruz Biotechnology, USA), respectively.  $\beta$ -Tubulin was detected with a specific monoclonal antibody (1:500, sc-8035, Santa Cruz Biotechnology USA). Super Signal Chemiluminescence System (Pierce, USA) was used for detection with GBOX Chemi System (Syngene, USA). Fiji/ImageJ (Open Source Software, OSS) was used for densitometric analysis.

### 2.5 | Cytokine detection

Levels of IL-6 and IL-8 in supernatants from Swan-71 cells treated with  $CoCl_2$  or inflammatory stimuli were analyzed with Human IL-6 Duoset ELISA and Human IL-8 Duoset ELISA (R&D Systems, USA) according to the manufacturer's instructions. Intra-assay precision, expressed by the intra-assay coefficient of variation of the standard curve, was 7% for IL-6 and 6% for IL-8, and interassay precision was 8% for IL-6 and 7% for IL-8.

### 2.6 | Immunofluorescence staining

To examine the expression and localization of TG2 and the NF $\kappa$ B p65 subunit by confocal microscopy, we proceeded as previously described.<sup>51</sup> Cells grown on glass coverslips were treated with/without 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> or 10 ng/mL TNF- $\alpha$  for 24 h. Cells were then fixed, permeabilized, and nonspecific sites blocked as previously described. TG100 (1:1000) and rabbit polyclonal antip65 (1:750, ab16502, Abcam, UK) were used as primary antibodies. Goat antimouse Alexa Fluor 488 (1:100, A11029, Thermo Fisher Scientific, USA) and goat antirabbit Alexa Fluor 594 (1:1500, ab150080, Abcam, UK) were used for detection and 0.1 µg/mL DAPI was used for staining the nuclei. Swan-71 cells without primary antibodies and with irrelevant primary antibodies<sup>52,53</sup> were used as negative controls. LSM 800 confocal laser scanning microscope (Zeiss, Germany) was used to acquire fluorescence images. Images were acquired with 20 x oil AN:.8 and 63 x oil AN: 1.4 objectives 160 using Zen blue edition version 2.3 software (Zeiss, Germany) and processed using Fiji/ImageJ (open source software, OSS). All adjustments were made using the real sample and maintained for all images. Quantification of integrated density (ID) of cell nuclei and whole cells was performed with at least 30 cells per condition. The nucleus and whole-cell were delineated based on DAPI and p65 staining, respectively, and the integrated density was measured for each cell compartment. The distribution of TG2 and p65 was analyzed as previously described<sup>54</sup> by determining the ratio between nucleus and cytoplasm, calculated as nucleus ID /(total ID - nucleus ID).

### 2.7 | Real-time reverse transcription RT-PCR

Total RNA from Swan-71 cells incubated with different stimuli was isolated with Trizol<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, USA) and then treated with RNase-free DNase (Thermo Fisher Scientific, USA). One  $\mu$ g RNA was reverse transcribed using random primers (Macrogen, South Korea) and M-MLV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions. Template DNA was amplified by quantitative real-time PCR using the QuantiNova Probe PCR kit (Qiagen, Hilden-Germany) in a Rotor-Gene Q real-time PCR cycler (Qiagen) according to the following protocol: 15 min at 95°C, followed by 40 cycles at 94°C for 15s, at 50°C for 30s, and at 72°C for 30s. The primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, USA), or obtained from previous bibliography (listed in Table 1, see Supplementary information). The expression of genes of interest was normalized using PPIA (Peptidylprolyl Isomerase A) as a housekeeping gene. PPIA was selected according to previous experiments showing that this gene was not modulated by hypoxic conditions. The relative mRNA expression was estimated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.<sup>55</sup>

AIRI

### 2.8 | Wound healing assay

In 90% confluent Swan-71 cultures, injury was produced by scratching the monolayer with a sterile 200- $\mu$ L tip and wound healing was assessed microscopically.<sup>14,56</sup> Wound closure was calculated as the relative wound area at the last culture time (8 h) compared to the original wound area and expressed as a percentage of the healing area. Fiji/ImageJ (open source software, OSS) was used for the analysis.

### 2.9 | NF- $\kappa$ B activation assay

Swan-71-NF- $\kappa$ B-hrGFP cells were incubated with 10 ng/mL TNF- $\alpha$ , IL -1 $\beta$ , or 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> for 24 h. Trypsinized cells were analyzed for flow cytometric analysis using a FACS Calibur (BD Biosciences, USA) equipped with a 488 nm laser. Fluorescence emissions were detected using bandpass filters 530/30 for GFP emission and 650 for PI emission. For each sample, 10000 counts were recorded based on a dot plot of forward scattering (FSC) and side scattering (SSC). NF- $\kappa$ B activation was determined as the percentage of GFP-positive cells (%GFP+). Only PI negative cells were considered for analysis using FlowJo<sup>TM</sup> Software v7.6 (www.flowjo.com).

### 2.10 | Transamidation activity (TGase)

Swan-71 was cultured in absence or presence of 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, 10 ng/mL IL-1 $\beta$ , or 10 ng/mL TNF- $\alpha$  for 24 h. Then, 1 mM 5-(biotinamido)-pentylamine (BP) (Thermo Scientific, USA) was added for 2 h. Harvested cells were fixed and permeabilized with FCM Permeabilization System (Santa Cruz Biotechnology, USA). PE/Cy7 Streptavidin (BioLegend, USA) was used for detection. 1 mM Cystamin dihydrochloride (CTA) was included in parallel assays as a TGase inhibitor. The analysis was performed by flow cytometry as described above. Mean fluorescence Intensity (MFI) was registered and TGase activity was expressed as fold increase with respect to the control cells.

### 2.11 | Statistical analysis

All studies were conducted in independent experiments and data from assays are reported with mean and standard deviation (SD) as denoted in each figure. Comparisons were made using the Student's t-test and the one-way ANOVA for two and more experimental groups, respectively. The Dunnett post-test was used to compare all treatments with the control group, and the Holm–Sidak post-test was used to compare all treatments with each other. The significance level was defined as 95% (P < .05).

### 3 | RESULTS

### 3.1 Chemical hypoxia and inflammatory cytokines have different effects on Swan-71 gene expression and functional properties

In this work, we used CoCl<sub>2</sub> to mimic HIF-mediated effects induced by low oxygen tension on trophoblast cells. We first tested the viability of cells treated with 50–200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> and observed a range of 69.8–85.6 (%) viable cells for all conditions (PI and Annexin V negative cells). At the highest CoCl<sub>2</sub> concentration, we achieved 78.0±2.4 (%) viability at 24 hours with no significant differences in viable, necrotic, or apoptotic cells compared with untreated cells (Figure 1A). We observed the highest expression of HIF-1 $\alpha$  protein after 24 h of incubation with 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, *P* = .006 (Figure 1B). A 25±7-fold increase (*P* = .005) in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA expression—a known HIF-1-target <sup>57</sup>gene—was confirmed in agreement with the HIF-1 $\alpha$  upregulation observed with 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> treatment (data not shown).

In parallel, we examined the effect of inflammatory conditions on Swan-71 cells by adding 10 ng/mL TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$ , the major proinflammatory mediators produced by immune cells at the maternal-fetal interface. We obtained 85±2% of viable cells after incubation with TNF- $\alpha$  and 73±8% of viable cells after treatment with IL1- $\beta$ . Cell viability was not significantly altered compared with basal conditions (Figure 1A).

We next examined the production of multifunctional cytokines that contribute to the recruitment and functional profile of immune cells at the maternal-fetal interface under these experimental conditions. Basal production of IL-6 and IL-8 by Swan-71 cells was altered in different ways by chemical hypoxia. Incubation with 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> increased basal production of IL-8 by 1.5±.3-fold (*P* < .0001), whereas lower doses had no significant effect. On the other hand, the detection of IL-6 in the supernatant decreased by half the basal levels (.6±.2-fold) in the presence of 50-200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, *P* = .002 (Figure 2A). Accordingly, mRNA IL-6 expression was also decreased 3-fold by chemical hypoxia (*P* = .004) (data not shown).

The inflammatory environment induced by the addition of 10 ng/mL TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  increased the levels of IL-6 and IL-8 in the supernatant (P = .0002 and P = .0001, respectively). The average increase in IL-8 concentration was 13 $\pm$ 7-fold for TNF- $\alpha$  (P = .002) and 15 $\pm$ 10 -fold



**FIGURE 1** (A) Viability of Swan-71 cells cultured during 24 h in the presence of 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> or inflammatory cytokines (10 ng/mL TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$ ) was compared with basal condition and 3  $\mu$ M Camptothecin as positive control. The percentage of viable (PI- negative/Annexin-V negative), total apoptotic (Annexin-V positive) and necrotic (PI- positive/Annexin-V negative) cells were measured by flow cytometry. Representative dot plots are shown. (B) Illustrative western blot for HIF-1 $\alpha$  detection in cell lysates of Swan-71 cultured under basal conditions or incubated with 50–200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> for 24 h.  $\beta$ -tubulin was used as a loading control. Data obtained from the densitometry analysis of the fold increase expression of HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -tubulin normalized with untreated cells (basal conditions) is shown. Data is expressed as means±SD for a representative experiment of three independently performed. Statistical significance is shown by asterisks when compared with basal conditions \*\**P* < .001

for IL-1 $\beta$  incubation (*P* = .0001). A pronounced increase was observed in the production of IL-6 after incubation with TNF- $\alpha$  (459±363 fold, *P* = .002) or IL -1 $\beta$  (246±190 fold, *P* = .04) (Figure 2B).

Next, and based on the role of matrix metalloproteases (MMP-2, MMP-9) and TGF- $\beta_3$  in migration and the invasive phenotype of the trophoblast during early gestation,<sup>3</sup> we examined the effect of inflammatory conditions and chemical hypoxia on the expression of these mediators in Swan-71 cells.

MMP-9 mRNA levels were increased in comparison to basal conditions (fold increase) by both chemical hypoxia and the cytokine stimulus (P < .05) (Figure 3).

Considering independent experiments, a more prominent effect was observed with the addition of IL-1 $\beta$  (89±45 -fold increase) compared to the effect of TNF- $\alpha$  (7.2±5.2 -fold increase) or CoCl<sub>2</sub> (9.0±5.4 - fold increase). In contrast, MMP-2 expression was differentially altered by the stimulus (P < .05). A moderate increase in MMP-2 mRNA was observed by IL-1 $\beta$  (1.6±.8 -fold increase, P = .02) and TNF- $\alpha$  (3.8±.1 -

fold increase, P = .0001). Nevertheless, mRNA expression of MMP-2 decreased by chemical hypoxia (.4 $\pm$ .1-fold change, P < .05). The mRNA expression of TGF- $\beta_3$  was only changed by 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> (3.0 $\pm$ 1.5-fold increase, P < .004) (Figure 3).

### 3.2 Cell migration is decreased by chemical hypoxia and inhibition of TGase activity

Next, we performed a functional assay to examine the effects of chemical hypoxia and inflammation on cell migration. Since TG2 is involved in cell adhesion and migration, we performed parallel assays in the presence of 1 mM CTA to investigate the contribution of TGase activity to cell migration. We initially defined 8 h as the optimal incubation time to provide a reasonable measure of the area of open migration gaps.

The results show that wound healing was decreased by chemical hypoxia (P < .0001) but was not altered by the addition of inflammatory



**FIGURE 2** (A) Level of cytokines produced by Swan-71 cells was measured in supernatants after 24 h by ELISA. The left graphic shows the dose effect of CoCl<sub>2</sub> on the levels of IL-6 and IL-8. The right histogram shows the effect of 200 $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> on IL-6 and IL-8 levels. (B) Effect of 10 ng/mL of TNF- $\alpha$  or 10 ng/mL of IL-1 $\beta$  on the production of IL-6 and IL-8 by Swan-71 after 24 h is shown. Values in histograms are normalized with respect to the levels of each cytokine in basal conditions (fold change). Data are expressed as means±SD of four independently performed. Statistical significance is indicated by asterisks compared to untreated cells (basal). \*P $\leq$ .05, \*\*P < .01, \*\*\*P < .0001 \*\*\*\*P < .0001



**FIGURE 3** Gene expression of MMP-9, MMP-2, and TGF- $\beta_3$  in Swan-71 cells cultured in the absence or presence of 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, 10 ng/mL TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  10 ng/mL for 24 h is shown. PPIA was used as a housekeeping gene. Values are means±SD of normalized values against untreated cells (basal) for one representative experiment of three performed independently. Statistical significance is shown by asterisks \*P < .05; \*\*P < 0.01; \*\*\*\*P < .001; \*\*\*\*P < .001

cytokines. As shown in Figure 4, the addition of CTA also decreased wound healing (P = .002).

### 3.3 | Intracellular TGase activity in Swan-71 is increased by chemical hypoxia and TNF- $\alpha$

To evaluate the effects of chemical hypoxia or inflammatory conditions on TGase activity in the intracellular compartment, we used 5-(biotinamido)-pentylamine as a TG2 substrate and performed a flow cytometry assay for detection. As shown in Figure 5, we observed that chemical hypoxia and an 10 ng/mL TNF- $\alpha$  stimulus increased TGase activity (P = .0001), whereas no changes were observed with the addition of 10 ng/mL IL -1 $\beta$ .

# 3.4 | Inflammatory stimuli but not chemical hypoxia induces NF- $\kappa$ B activation and TG2 nuclear translocation

TG2 expression and its intracellular localization in Swan-71 were analyzed by confocal microscopy under basal conditions and after 200

**Reproductive Immunology** American Journal of

7 of 13



AIRI

FIGURE 4 (A) Illustrative photographs (10X) showing the wounds (time = 0) introduced on monolayers of Swan-71 cultures and the gaps after 8 h of incubation under basal conditions (culture medium containing 1% FCS), 200 µM CoCl<sub>2</sub>, 1 mM CTA, 200 µCoCl<sub>2</sub> + 1 mM CTA, 10 ng/mL TNF- $\alpha$  and 10 ng/mL IL-1 $\beta$ . Dotted lines show the bare area at time 0 h and after 8h. (B) Wound healing (%) was calculated as (A0-A8)\*100/A0 where AO = initial bare area and AB = bare area after 8 h. Data are represented as means ± SD obtained from 4 – 8 replicates for a representative experiment of three independently performed. Statistical significance is shown by asterisks when compared basal conditions, \*\*P < .01; \*\*\*\*P < .001; \*\*\*\*P < .0001



FIGURE 5 TGase activity was determined by adding 5-(biotinamido)-pentylamine to Swan-71 cells previously incubated for 24 h with 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, 10 ng/mL TNF- $\alpha$  or 10 ng/mL IL-1 $\beta$  or culture medium only (basal conditions). CTA was used as specific TGase inhibitor in a parallel assay. Values represent means±SD of normalized values against baseline conditions for a representative experiment of three independently performed. Statistical significance is shown by asterisks,  $*P \le .05$ ; \*\*\*P < .001 when compared with basal conditions

 $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> or 10 ng/mL TNF- $\alpha$  stimuli. Detection of TG2 was mainly restricted to the cytoplasm under basal conditions, showing an N/(T-N) ratio < of .5. Incubation of cells with 10 ng/mL TNF- $\alpha$  or 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> resulted in a decrease in TG2 expression overall (Figure 6A and 6B). Relatively higher TG2 localization in the nucleus was observed after 24 h of incubation with 10 ng/mL TNF- $\alpha$  (P = .0006) (Figure 6C).

The effect of stimulation with 10 ng/mL TNF- $\alpha$  or CoCl<sub>2</sub> on p65 protein localization was examined after 30 min or 24 h. The p65 protein rapidly migrated to the nucleus (P = .0001) and remained there (P = .004) after 24 h of stimulation with TNF- $\alpha$  (Figure 6A and 6D).

NF-*k*B activation by inflammatory stimuli was also observed in the Swan-71-NF-xB-hrGFP line in the presence of 10 ng/mL TNF- $\alpha$  (mean:18±4 -fold increase) or IL-1 $\beta$  (mean:5±2 -fold increase), P < .004 (Figure 6E). Under hypoxic conditions, there were no significant changes in p65 transport (Figure 6A and 6D) and no activation of Swan-71-NF- $\kappa$ B-hrGFP by 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> was observed (Figure 6E).

#### The expression of TG2 protein and mRNA 3.5 spliced variants in Swan-71 is differently affected by chemical hypoxia and inflammatory cytokines

Expression of TG2 protein under chemical hypoxia or inflammatory stimuli was analyzed by Western blot. For detection, we used a monoclonal antibody that recognizes an epitope between residues 447 and 538 in full-length TG2 and most short variants (v2, v4a, v4b). Only the full length of TG2 (80 kDa) was detected under all conditions (Figure 7A). In parallel with HIF-1 $\alpha$  upregulation, the expression of full-length TG2 protein was decreased in the presence of 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> or 10 ng/mL TNF- $\alpha$ , although no changes were observed in IL-1 $\beta$  treatment (Figure 7B).

Expression of mRNA corresponding to canonical TG2 and short variants was analyzed under basal conditions and with the addition of 200



**FIGURE 6** (A) Illustrative photographs of confocal microscopy analysis (63X) of Swan-71 cells after incubation with 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  or culture medium alone (basal) for 30 min or 24 h. Alexa-Fluor 488 (green) signal corresponds with TG2 expression and Alexa-Fluor 594 (red) signal shows p65 expression. The cell nuclei were stained with DAPI (blue). Right graphs show integrated density (ID) in arbitrary units (a.u) for at least 30 cells per treatment in one of two independent experiments. (B) shows the total expression of TG2. The ratio of nuclear to cytoplasm expression of TG2 and p65 is shown in (C) and (D), respectively. ID ratio: N/(T-N), where N:nuclear and T:total. (E) Swan-71 NF- $\kappa$ B-hrGFP were incubated for 24 h with 200 $\mu$  CoCl<sub>2</sub>, 10 ng/mL TNF- $\alpha$  or 10 ng/mL IL-1 $\beta$ . NF- $\kappa$ B activation was analyzed by flow cytometry (measured by the percentage of GFP+ cells). Data were normalized against untreated cells (basal) and presented as the mean $\pm$  SD of triplicates from a representative experiment of three independent experiments. Statistical significance is shown by asterisks when compared with untreated cells, \*P < .05, \*\*P < .01, \*\*\*P < .0001, and \*\*\*\*P < .00001

 $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, 10 ng/mL IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  to the growth media. The four short spliced variants were detected under all experimental conditions (Figure 8).The results obtained in three independent experiments show that the addition of 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> caused a decrease of mRNA expression of the full length variant TGM2\_v1 (mean:.6±1 -fold change). In

parallel, an increase in the shortest isoforms TGM2\_v2 (mean:  $1.9\pm.6$  - fold increase) and TGM2\_v3 (mean:  $3.3\pm1.6$  -fold increase), P < .05, was observed (Figure 8A). In contrast, when 10 ng/mL TNF- $\alpha$  was added, upregulation of canonical TGM2\_v1 expression was observed (mean:  $3.4\pm.5$ -fold increase, P < .004). TGM2\_v1 expression was not altered

AJRI American Journal of Reproductive Immunology

9 of 13



**FIGURE 7** (A). Illustrative western blot for detection of TG2 in cell lysates obtained from Swan-71 cultures under basal conditions or after incubation with 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, 10 ng/mL TNF- $\alpha$  or 10 ng/ml of IL-1 $\beta$  for 24 h.  $\beta$ -tubulin was used as a loading control. (B). Graphs show data from densitometry analysis expressed as fold change expression of TG2/ $\beta$ -tubulin and normalized with untreated control. Values are expressed as means±SD for three independent experiments. Statistical significance is indicated by asterisks compared with control, \**P* < .05,\*\*\* *P* < .001



**FIGURE 8** Expression of mRNA for TGM2 variants in Swan-71 cells incubated with 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> (A), 10 ng/mL IL-1 $\beta$  or 10 ng/mL TNF-  $\alpha$  (B) for 24 h. TGM2 variants are designated v1 for full-length and v2, v3, v4a and v4b for C-shortened variants. PPIA was used as the housekeeping gene. Data are expressed as means±SD of normalized values against untreated cells (basal) for a representative experiment (three replicates) of three independently performed. Statistical significance is shown by asterisks when compared with untreated cells for each TGM2 variant, \**P* < .05, \*\*\**P* < .001

by treatment with 10 ng/mL IL-1 $\beta$  (Figure 8B). As for mRNA expression of the shortest TGM2 variants, TGM2\_v2 was increased by both treatment with IL-1 $\beta$  (mean: 3.0±1.1-fold) and TNF- $\alpha$  (2.2±.3-fold) in independent experiments, P < .03. However, TGM2\_v3 expression was increased only by the addition of TNF- $\alpha$  (mean: 2.6±1.1-fold, P < .05).

Overall, a similar pattern was observed with respect to the expression of the shortest TGM2 variants when Swan-71 was treated with chemical hypoxia or 10 ng/mL TNF- $\alpha$ , as the expression of both TGM2\_v2 and TGM2\_v3 was upregulated. In contrast, the addition of IL-1 $\beta$  only had a significant effect on increasing the expression of the TGM2\_v2 variant. The expressions of TGM2\_v4a and TGM2\_v4b were not affected by any treatment.

### 4 DISCUSSION

During the first 8-10 weeks of gestation, the microenvironment at the fetal-maternal interface is characterized by a low-oxygen environment.<sup>58</sup> The persistence of hypoxia and inflammation beyond this period has been associated with pregnancy complications such as preeclampsia and IUGR.<sup>10,59</sup> To gain insight into the biology of the trophoblast in a no-tumor cell line, we first examined the functionality of Swan-71 under these conditions. We added CoCl<sub>2</sub> to stabilize HIF-1 $\alpha$  and mimic the consequences of oxygen deprivation in Swan-71, as previous work suggested HIF-1 $\alpha$  was upregulated in EVT during the early first trimester.<sup>3,60</sup> Because inflammatory cytokines have been observed in the early placenta in response to hypoxia.<sup>61,62</sup> we first examined the production of inflammatory cytokines in response to CoCl<sub>2</sub>. The high production of IL-8 (CXCL8) prompted us to investigate the effect of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  as important inflammatory cytokines produced by immune cells. The secretion of both IL-6 and IL-8 was increased by inflammatory stimuli. In contrast, we observed decreased detection of IL-6 in the supernatant and decreased mRNA expression under chemical hypoxia. These results are consistent with previous work using Swan-71 and villous explants maintained in a lowoxygen atmosphere.<sup>48,63</sup> Low levels of IL-6 could affect trophoblast migration, as this pleiotropic cytokine regulates the expression of integrins and the activation of matrix metalloproteinases.<sup>61,64</sup> Accordingly, we observed a decrease in mRNA MMP-2 expression in the presence of CoCl<sub>2</sub>, consistent with a previous work showing that hypoxia downregulates EVT invasion by decreasing MMP-2 activation in early pregnancy.65

Our results regarding increased TGF- $\beta_3$  expression after CoCl<sub>2</sub> treatment are consistent with previous work showing higher TGF- $\beta_3$  secretion from EVT cells exposed to hypoxia in association with inhibited invasion.<sup>66</sup> Moreover, chronic hypoxia in PE was associated with TGF- $\beta_3$  upregulation, which was associated with an impaired trophoblast migration phenotype.<sup>67</sup>

There is a complex regulatory interplay between TG2, MMP-2, MMP-9, and IL-6.<sup>16,68–70</sup> Since we had previously described a role for TG2 on the surface in Swan-71 migration,<sup>14</sup> we next examined the effect of CoCl<sub>2</sub> and inflammatory cytokines on wound healing and investigated the involvement of TGase activity through its specific inhibition. We found that the migration of Swan-71 was reduced by approximately 40% when treated with both CoCl<sub>2</sub> and CTA. These results confirm that TG2 coregulates trophoblast migration and are also consistent with previous work showing attenuation of PE-like signs in pregnant mice treated with CTA.<sup>37</sup>

The role of TG2 in cell migration is complex and may involve both scaffold and TGase activity.<sup>16,25</sup> At the cell surface, TG2 associates with  $\beta$ -integrins and extracellular matrix (ECM) components and enhances integrin-mediated signaling.<sup>71,72</sup> In addition, under stress conditions, some TG2 may be released into the extracellular space.<sup>51</sup> There, TGase activity may affect cell migration by altering ECM targets.<sup>73,74</sup> The partial inhibition of migration observed in the presence of CTA is consistent with a role for extracellular TGase activity in Swan-71, although scaffold functions likely play a role.

The TG2 promoter has elements response to proinflammatory cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) and NF- $\kappa$ B.<sup>28,75,76</sup> We next examined the expression of TG2 in Swan-71 under chemical hypoxia and inflammatory conditions. We observed a decrease in TG2 expression after CoCl<sub>2</sub> and TNF- $\alpha$  treatment by both immunoblot and immunofluorescence methods. Translocation of TG2 to the extracellular compartment after stress stimuli could be the cause of the lower intracellular TG2 detection.<sup>77</sup>

Interestingly, lower TG2 expression was induced in parallel with higher intracellular TGase activity. The link between TGase activity and NF- $\kappa$ B pathway was described in some pathological conditions. Some components of the NF- $\kappa$ B pathway were described as TG2 targets in some tumor cells. TG2 can promote sustained inflammation through noncanonical regulation of NF- $\kappa$ B pathway by crosslinking of inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  polymerization or by formation of p65-TG2 complexes.<sup>78,79</sup> However, the lack of colocalization of p65 and TG2 suggests that the NF- $\kappa$ B regulatory mechanism described in tumor cells is not involved in Swan-71.

The localization of TG2 in the nucleus has been described previously in various cells,<sup>80</sup> but as far as we know, this is the first report showing localization of TG2 in the nucleus of trophoblast cells. Further studies to uncover the subcellular localization of TGase activity would provide important information.

In our present work, the absence of NF- $\kappa$ B activation by CoCl<sub>2</sub> was consistently observed in the Swan-71 NF- $\kappa$ B-hrGFP cell line or by the detection of nuclear p65 in Swan-71. However, activation under low oxygen tension in trophoblast cells can't be ruled out, as the NF- $\kappa$ B pathway can be activated by hypoxia through an uncertain mechanism.<sup>81</sup>

The functional properties of TG2 depend on the molecular domains and spatial conformation.<sup>25,82</sup> Therefore, the expression of truncated spliced variants can drastically alter the properties of TG2. Inflammatory or hypoxic conditions have been shown to induce TGM2-v2 splice variant expression in cells of the nervous system.<sup>23,24,83</sup> Relatively high expression of short variants has been reported in normal placental cells,<sup>19</sup> but no information is available on the effects of an inflammatory or hypoxic environment. We have previously reported a relative increase in the mRNA ratio of TGM2\_v3:TGM2\_v1 when Swan-71 cells were treated with antiphospholipid antibodies from women with antiphospholipid syndrome.<sup>84</sup> Consistent with these results associated with an inflammatory state, in the present work we observed increased expression of TGM2 v3 and/or TGM2 v2 in response to both chemical hypoxia and inflammatory stimuli compared with baseline. Interestingly, the profile of expression of the isoforms is different and could be responsible for the differences observed in the functional assays, with a higher ratio of short variants over TGM2\_v1 in the cells treated with CoCl<sub>2</sub>.

The TGM2\_v2 and TGM2\_v3 short variants lack residues involved in signal transduction and lose control of TGase activity<sup>83,85</sup> but the effects on cell migration are still unknown. The interaction of TG2 with fibronectin is mainly attributed to residues in the N-terminal domain<sup>86</sup> that are conserved in all splice variants. However, it has recently been reported that residues in the C-terminal domain are also involved.<sup>71,87</sup> In addition, the binding site of TG2 at the surface with  $\beta$ -integrins involves the first and fourth domains of TG2.<sup>71</sup> Taking all these structural data together, it can be suggested that the shortest variants v2 and v3 are not involved in cell migration through adhesive functions. Therefore, their relatively higher contribution in Swan-71 exposed to CoCl<sub>2</sub> might be responsible for the reduced migration. The unavailability of TG2-specific monoclonal antibodies that differentially recognize the splice variants is a limitation for further investigation of the complex regulatory role of TG2.

In summary, we show that chemical hypoxia and inflammatory conditions have differential effects onTG2 levels, localization, and profile of spliced variants in Swan-71. We also show that TG2 coregulates AIRI

trophoblast migration and that the relatively higher contribution of TGM2\_v2 and TGM2\_v3 short variants in Swan-71 exposed to CoCl2 might be responsible for the reduced migration observed in this condition since these variants lack residues involved in control of TGase activity and in cell migration through adhesive unions. Further work is needed to understand the underlying mechanism of TG2 dysregulation and its role in poor pregnancy outcomes.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank PhD. Alejandra Kun and MSc. Marcela Díaz for their technical assistance with the immunofluorescence staining and confocal studies. Authors also thank MSc. Ana Zambrano and Natalia Rosano for proofreading the manuscript.

The present work was supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, Uruguay, grant 362/2018 AH and PA.). Continuous support was obtained by the Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA, Uruguay) and the Sistema Nacional de Investigadores (SNI-ANII, Uruguay).

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### ORCID

Ana Hernández https://orcid.org/0000-0001-5189-0208

### REFERENCES

- Burton GJ, Jauniaux E, DS Charnock-Jones. The influence of the intrauterine environment on human placental development. *Int J Dev Biol.* 2010;54(2-3):303-311. https://doi.org/10.1387/ijdb.082764gb.
- 2. Wakeland AK, Soncin F, Moretto-Zita M, et al. Hypoxia Directs Human Extravillous Trophoblast Differentiation in a Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Manner. *Am J Pathol.* 2017;187(4):767-780. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.11.018.
- Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*. 2000;21(SUPPL.1):25-30. https://doi.org/10. 1053/plac.1999.0522.
- Patel J, Landers K, Mortimer RH, Richard K. Regulation of Hypoxia Inducible Factors (HIF) in Hypoxia and Normoxia during Placental Development. *Placenta*. 2010;31(11):951-957. https://doi.org/10. 1016/j.placenta.2010.08.008.
- Zhou J, Schmid T, Brüne B. Tumor necrosis factor-α causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1α through a nuclear factor-xB-dependent pathway. *Mol Biol Cell*. 2003;14(6):2216-2225. https://doi.org/10.1091/mbc.E02-09-0598.
- Chaiworapongsa T, Chaemsaithong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(8):466-480. https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.102.
- Mol BWJ, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, De Groot CJM, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2016;387:999-1011. https://doi. org/10.1016/S0140-6736(15)00070-7.
- Roberts JM, Escudero C. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2012;2(2):72-83. https://doi.org/10.1016/j.preghy.2012. 01.001.

- Michalczyk M, Celewicz A, Celewicz M, Wozniakowska-Gondek P, Rzepka R. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Mediators Inflamm*. 2020;2020. https://doi.org/10.1155/2020/ 3864941.
- Rajakumar A, Brandon HM, Daftary A, Ness R, Conrad KP. Evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta*. 2004;25(10):763-769. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.02.011.
- 11. Stanek J. Hypoxic patterns of placental injury: a review. Arch Pathol Lab Med. 2013;137(5):706-720. https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0645-RA.
- Zhang Z, Huang C, Wang P, et al. HIF-1α affects trophoblastic apoptosis involved in the onset of preeclampsia by regulating FOXO3a under hypoxic conditions. *Mol Med Rep.* 2020;21(6):2484-2492. https://doi. org/10.3892/mmr.2020.11050.
- Vaughan JE, Walsh SW. Activation of NF-*κ*B in placentas of women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2012;31(2):243-251. https: //doi.org/10.3109/10641955.2011.642436.
- Sóñora C, Calo G, Fraccaroli L, Pérez-Leirós C, Hernández A, Ramhorst R. Tissue Transglutaminase on Trophoblast Cells as a Possible Target of Autoantibodies Contributing to Pregnancy Complications in Celiac Patients. Am J Reprod Immunol. 2014;72(5):485-495. https://doi.org/ 10.1111/aji.12290.
- 15. Fesus L, Transglutaminase PiacentiniM. 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(10):534-539.
- Eckert RL, Kaartinen MT, Nurminskaya M, et al. Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol Rev.* 2014;94(2):383-417. https://doi. org/10.1152/physrev.00019.2013.
- 17. Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(2):140-156. https://doi.org/10.1038/nrm1014.
- Liu S, Cerione RA, Clardy J. Structural basis for the guanine nucleotidebinding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(5):2743-2747. https://doi.org/10.1073/pnas.042454899.
- Phatak VM, Croft SM, Rameshaiah Setty SG, et al. Expression of transglutaminase-2 isoforms in normal human tissues and cancer cell lines: dysregulation of alternative splicing in cancer. *Amino Acids*. 2013;44(1):33-44. https://doi.org/10.1007/s00726-011-1127-4.
- Király R, Demény MÁ, Fésüs L. Protein transamidation by transglutaminase 2 in cells: a disputed Ca 2+-dependent action of a multifunctional protein. FEBS J. 2011;278(24):4717-4739. https://doi.org/10.1111/j. 1742-4658.2011.08345.x.
- 21. Lai T-S, Greenberg CS. TGM2 and implications for human disease: role of alternative splicing. *Front Biosci (Landmark Ed.* 2013;18:504-519.
- Gundemir S, Colak G, Tucholski J, Transglutaminase JohnsonGVW.
  a molecular Swiss army knife. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2012;1823(2):406-419. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011. 09.012.
- Monsonego A, Shani Y, Friedmann I, Paas Y, Eizenberg O, Schwartz M. Expression of GTP-dependent and GTP-independent tissue-type transglutaminase in cytokine-treated rat brain astrocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(6):3724-3732.
- Currò M, Ferlazzo N, Giunta ML, et al. Hypoxia-dependent expression of TG2 isoforms in neuroblastoma cells as consequence of different MYCN amplification status. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1-13. https://doi.org/10.3390/ijms21041364.
- Beninati S, Piacentini M, Bergamini CM. Transglutaminase 2, a double face enzyme. *Amino Acids*. 2017;49(3):415-423. https://doi.org/10.1007/s00726-017-2394-5.
- Tabolacci C, De Martino A, Mischiati C, Feriotto G, Beninati S. The Role of Tissue Transglutaminase in Cancer Cell Initiation, Survival and Progression. *Med Sci.* 2019;7(2):19. https://doi.org/10.3390/ medsci7020019.

ı nerican Journal of Reproductive Immunology

 Jang G-YY, Jeon J-HH, Cho S-YY, et al. Transglutaminase 2 suppresses apoptosis by modulating caspase 3 and NF-κB activity in hypoxic tumor cells. Oncogene. 2010;29(3):356-367. https://doi.org/10.1038/ onc.2009.342.

AIRI

- Kuncio GS, Tsyganskaya M, Zhu J, et al. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. *Am J Physiol.* 1998;274(2 Pt 1):G240-G245.
- 29. Arbildi P, Sóñora C, Del Río N, Marqués JM, Hernández A. Alternative RNA splicing of leucocyte tissue transglutaminase in coeliac disease. *Scand J Immunol.* 2018;87(5). https://doi.org/10.1111/sji.12659.
- Sestito C, Brevé JJP, Killestein J, et al. Differential Expression of Tissue Transglutaminase Splice Variants in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Primary Progressive Multiple Sclerosis Patients. *Med Sci.* 2018;6(4):108. https://doi.org/10.3390/medsci6040108.
- Fujimoto M, Kanzaki H, Nakayama H, et al. Requirement for transglutaminase in progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology*. 1996;137(3):1096-1101. https://doi. org/10.1210/ENDO.137.3.8603579.
- Robinson NJ, Glazier JD, Greenwood SL, Baker PN, Aplin JD. Tissue transglutaminase expression and activity in placenta. *Placenta*. 2006;27(2-3):148-157. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.01.008.
- Hager H, Gliemann J, Hamilton-Dltoit S, Ebbesen P, Koppelhus U, Jensen PH. Developmental regulation of tissue transglutaminase during human placentation and expression in neoplastic trophoblast. *J Pathol.* 1997;181(1):106-110. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199701)181:1<106::AID-PATH725>3.0.CO;2-K.
- Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Sakai K, Iwashita M. Tissue transglutaminase at embryo-maternal interface. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(8):4694-4702. https://doi.org/10.1210/JC. 2005-0240.
- Nurminskaya MV, Belkin AM. Cellular functions of tissue transglutaminase. Int Rev Cell Mol Biol. 2012;294:1-97. https://doi.org/10.1016/ B978-0-12-394305-7.00001-X.
- Robinson NJ, Baker PN, Jones CJP, Aplin JD. A role for tissue transglutaminase in stabilization of membrane-cytoskeletal particles shed from the human placenta. *Biol Reprod*. 2007;77(4):648-657. https:// doi.org/10.1095/BIOLREPROD.107.061747.
- Liu C, Wang W, Parchim N, et al. Tissue transglutaminase contributes to the pathogenesis of preeclampsia and stabilizes placental angiotensin receptor type 1 by ubiquitination-preventing isopeptide modification. *Hypertension*. 2014;63(2):353-361. https://doi.org/ 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02361.
- Saccone G, Berghella V, Sarno L, et al. Celiac disease and obstetric complications: a systematic review and metaanalysis. Am J Obstet Gynecol. 2016;214(2):225-234. https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2015.09.080.
- 39. Soni S, Badawy SZA. Celiac disease and its effect on human reproduction: a review. J Reprod Med. 2010;55(1-2):3-8.
- Di Sabatino A, Vanoli A, Giuffrida P, Luinetti O, Solcia E, Corazza GR. The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun Rev.* 2012;11(10):746-753. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.01. 007.
- Anjum N, Baker PN, Robinson NJ, Aplin JD. Maternal celiac disease autoantibodies bind directly to syncytiotrophoblast and inhibit placental tissue transglutaminase activity. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7. https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-16.
- Sóñora C, Muñoz F, Del Río N, et al. Celiac Disease and Gynecoobstetrics Complications: can Serum Antibodies Modulate Tissue Transglutaminase Functions and Contribute to Clinical Pattern?. *Am J Reprod Immunol.* 2011;66(6):476-487. https://doi.org/10.1111/j. 1600-0897.2011.01020.x.
- Sóñora C, Mourglia-Ettlin G, Calo G, et al. Anti-tissue transglutaminase antibody inhibits apoptotic cell clearance by macrophages in pregnant NOD mice. J Reprod Immunol. 2014;103(1):59-66. https://doi.org/10. 1016/J.JRI.2013.11.001.

- Hadziselimovic F, Geneto R, Buser M. Celiac disease, pregnancy, small for gestational age: role of extravillous trophoblast. *Fetal Pediatr Pathol.* 2007;26(3):125-134. https://doi.org/10.1080/15513810701563637.
- Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Alvero AB, et al. The Isolation and Characterization of a Novel Telomerase Immortalized First Trimester Trophoblast Cell Line, Swan 71. *Placenta*. 2009;30(11):939-948. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.08.007.
- Daghero H, Pagotto R, Vallespí MG, Bollati-Fogolín M. Generation of stable reporter breast and lung cancer cell lines for NF-κB activation studies. J Biotechnol. 2019;301:79-87. https://doi.org/10.1016/j. jbiotec.2019.05.014.
- Mastropietro G, Tiscornia I, Perelmuter K, Astrada S, Bollati-Fogolín M. HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation. *Mediators Inflamm*. 2015;2015. https://doi.org/10.1155/2015/860534.
- Shirasuna K, Shimamura N, Seno K, et al. Moderate hypoxia downregulates interleukin-6 secretion and TLR4 expression in human Sw.71 placental cells. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(6):2149-2160. https:// doi.org/10.1159/000430181.
- Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(11):953-957. https://doi.org/10.1101/PDB. PROT087288.
- Muñoz F, Del Río N, Sóñora C, Tiscornia I, Marco A, Hernández A. Enamel defects associated with coeliac disease: putative role of antibodies against gliadin in pathogenesis. *Eur J Oral Sci*. 2012;120(2):104-112. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2012.00949.x.
- Adamczyk M, Griffiths R, Dewitt S, Knäuper V, Aeschlimann D. P2X7 receptor activation regulates rapid unconventional export of transglutaminase-2. J Cell Sci. 2015;128(24):4615-4628. https://doi. org/10.1242/jcs.175968.
- Morel N, Lassabe G, Elola S, et al. A Monoclonal Antibody-Based Copro-ELISA Kit for Canine Echinococcosis to Support the PAHO Effort for Hydatid Disease Control in South America. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001967.
- Carlomagno M, Lassabe G, Rossotti M, González-Techera A, Vanrell L, González-Sapienza G. Recombinant streptavidin nanopeptamer antiimmunocomplex assay for noncompetitive detection of small analytes. *Anal Chem.* 2014;86(20):10467-10473. https://doi.org/10.1021/ AC503130V.
- Lamas Bervejillo M, Bonanata J, Franchini GR, et al. A FABP4-PPARγ signaling axis regulates human monocyte responses to electrophilic fatty acid nitroalkenes. *Redox Biol.* 2020;29. https://doi.org/10.1016/ j.redox.2019.101376.
- 55. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2–ΔΔCT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.
- Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-333. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30.
- Graven KK, Yu Q, Pan D, Roncarati JS, Farber HW. Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1447(2-3):208-218. https://doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00118-9.
- Jauniaux E, Watson A, Ozturk O, Quick D, Burton G. In-vivo measurement of intrauterine gases and acid-base values early in human pregnancy. *Hum Reprod.* 1999;14(11):2901-2904. https://doi.org/10.1093/humrep/14.11.2901.
- Brosens I, Pijnenborg R, Vercruysse L, Romero R. The "great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204:193-201. https://doi.org/10.1016/j.ajog. 2010.08.009.
- 60. Zhang Z, Li P, Wang Y, Yan H. Hypoxia-induced expression of CXCR4 favors trophoblast cell migration and invasion via the activation of

HIF-1α. Int J Mol Med. 2018;42(3):1508-1516. https://doi.org/10. 3892/ijmm.2018.3701.

- Dubinsky V, Poehlmann TG, Suman P, Gentile T, Markert UR, Gutierrez G. Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells. Am J Reprod Immunol. 2010;63(3):193-199. https:// doi.org/10.1111/j.1600-0897.2009.00778.x.
- Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana A, Bischof P. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod.* 1999;5(11):1055-1058. https://doi.org/10.1093/molehr/5.11.1055.
- Benyo DF, Miles TM, Conrad KP. Hypoxia Stimulates Cytokine Production by Villous Explants from the Human Placenta 1. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(5):1582-1588. https://doi.org/10.1210/ jcem.82.5.3916.
- Jovanović M, Vićovac L. Interleukin-6 Stimulates Cell Migration, Invasion and Integrin Expression in HTR-8/SVneo Cell Line. *Placenta*. 2009;30(4):320-328. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009. 01.013.
- Onogi A, Naruse K, Sado T, et al. Hypoxia inhibits invasion of extravillous trophoblast cells through reduction of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation in the early first trimester of human pregnancy. *Placenta*. 2011;32(9):665-670. https://doi.org/10.1016/j. placenta.2011.06.023.
- Zhao H, Jiang Y, Cao Q, Hou Y, Wang C. Role of integrin switch and transforming growth factor beta 3 in hypoxia-induced invasion inhibition of human extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod.* 2012;87(2):1-7. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099937.
- 67. Farrell A, Post M, Caniggia I, et al. Faulty oxygen sensing disrupts angiomotin function in trophoblast cell migration and predisposes to preeclampsia Graphical abstract Find the latest version : faulty oxygen sensing disrupts angiomotin function in trophoblast cell migration and predisposes. *JCl insight*. 2019;4(8):e127009.
- Ahn JS, Kim MK, Hahn JH, et al. Tissue transglutaminase-induced down-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376(4):743-747. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008. 09.048.
- Belkin AM, Zemskov EA, Hang J, Akimov SS, Sikora S, Strongin AY. Cellsurface-associated tissue transglutaminase is a target of MMP-2 proteolysis. *Biochemistry*. 2004;43(37):11760-11769. https://doi.org/10. 1021/bi049266z.
- Satpathy M, Shao M, Emerson R, Donner DB, Matei D. Tissue transglutaminase regulates matrix metalloproteinase-2 in ovarian cancer by modulating cAMP-response element-binding protein activity. J Biol Chem. 2009;284(23):15390-15399. https://doi.org/10.1074/jbc. M808331200.
- Akimov SS, Krylov D, Fleischmana LF, Belkin AM. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. J Cell Biol. 2000;148(4):825-838. https://doi.org/10.1083/jcb.148.4.825.
- Janiak A, Zemskov EA, Belkin AM. Cell surface transglutaminase promotes RhoA activation via integrin clustering and suppression of the Src-p190RhoGAP signaling pathway. *Mol Biol Cell*. 2006;17(4):1606-1619. https://doi.org/10.1091/mbc.E05-06-0549.
- Upchurch HF, Conway E, Patterson MK, Maxwell MD. Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: characteristics of the matrix bound enzyme. J Cell Physiol. 1991;149(3):375-382. https://doi.org/10.1002/jcp.1041490304.
- Martinez J, Chalupowicz DG, Roush RK, Sheth A, Barsigian C. Transglutaminase-mediated processing of fibronectin by endothelial cell monolayers. *Biochemistry*. 1994;33(9):2538-2545. https://doi.org/ 10.1021/BI00175A024.
- Lu S, Saydak M, Gentile V, Stein JP, Davies PJ. Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem.* 1995;270(17):9748-9756.
- 76. Johnson K, Hashimoto S, Lotz M, Pritzker K, Terkeltaub R. Interleukin-1 induces pro-mineralizing activity of cartilage tissue transglutami-

nase and factor XIIIa. Am J Pathol. 2001;159(1):149-163. https://doi. org/10.1016/S0002-9440(10)61682-3.

- Zemskov EA, Mikhailenko I, Hsia RC, Zaritskaya L, Belkin AM. Unconventional secretion of tissue transglutaminase involves phospholipiddependent delivery into recycling endosomes. *PLoS One.* 2011;6(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019414.
- Mann AP, Verma A, Sethi G, et al. Overexpression of Tissue Transglutaminase Leads to Constitutive Activation of Nuclear FactorκB in Cancer Cells: delineation of a Novel Pathway. *Cancer Res.* 2006;66(17):8788-8795. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1457.
- Lee J, Kim Y-S, Choi D-H, et al. Transglutaminase 2 Induces Nuclear Factor-κB Activation via a Novel Pathway in BV-2 Microglia. J Biol Chem. 2004;279(51):53725-53735. https://doi.org/10.1074/jbc. M407627200.
- Kuo TF, Tatsukawa H, Kojima S. New insights into the functions and localization of nuclear transglutaminase 2. FEBS J. 2011;278(24):4756-4767. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08409.x.
- D'Ignazio L, Rocha S. Hypoxia Induced NF-xB. Cells. 2016;5(1):10. https://doi.org/10.3390/cells5010010.
- Singh G, Zhang J, Ma Y, Cerione RA, Antonyak MA. The different conformational states of tissue transglutaminase have opposing affects on cell viability. *J Biol Chem*. 2016;291(17):9119-9132. https://doi.org/10. 1074/jbc.M115.699108.
- Festoff BW, SantaCruz K, Arnold PM, Sebastian CT, Davies PJA, Citron BA. Injury-induced "switch" from GTP-regulated to novel GTPindependent isoform of tissue transglutaminase in the rat spinal cord. J Neurochem. 2002;81(4):708-718.
- Arbildi P, Grasso E, Rodríguez-Camejo C, et al. β2GPI-specific antibodies induce pro-inflammatory mediators and tissue transglutaminase differential variant expression on trophoblast cells and monocytesmacrophages. *Placenta*. 2017;51(2017):111. https://doi.org/10.1016/ j.placenta.2017.01.050.
- Citron BA, Suo Z, SantaCruz K, Davies PJA, Qin F, Festoff BW. Protein crosslinking, tissue transglutaminase, alternative splicing and neurodegeneration. *Neurochem Int.* 2002;40(1):69-78. https://doi.org/10. 1016/S0197-0186(01)00062-6.
- Hang J, Zemskov EA, Lorand L, Belkin AM. Identification of a novel recognition sequence for fibronectin within the NH2terminal β-sandwich domain of tissue transglutaminase. J Biol Chem. 2005;280(25):23675-23683. https://doi.org/10.1074/jbc. M503323200.
- Cardoso I, Østerlund EC, Stamnaes J, et al. Dissecting the interaction between transglutaminase 2 and fibronectin. *Amino Acids*. 2017;49(3):489-500. https://doi.org/10.1007/s00726-016-2296-y.

### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Arbildi P, Rodríguez-Camejo C, Perelmuter K, Bollati-Fogolín M, Sóñora C, Hernández A. Hypoxia and inflammation conditions differentially affect the expression of tissue transglutaminase spliced variants and functional properties of extravillous trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol.* 2022;1-13. https://doi.org/10.1111/ajji.13534

## Capítulo



# EFECTOS DEL MICROAMBIENTE DE LA INTERFASE MATERNO-FETAL SOBRE LA FUNCIONALIDAD Y LA EXPRESIÓN DE LA TG2 EN LOS MACRÓFAGOS

En este capítulo se describen los resultados obtenidos con relación al objetivo específico 5.

El diálogo que se establece entre el trofoblasto y los monocitos/macrófagos en la interfase materno-fetal es crucial en el desarrollo y mantenimiento de esta para asegurar una gestación saludable. Como se expuso anteriormente, la TG2, a través de su expresión ubicua y múltiples funciones participa de la fisiología del trofoblasto en procesos como la adhesión y migración celular, formación del sincitio y la estabilización de material particulado. A su vez, la TG2 está implicada en casi todos los procesos mediados por los monocitos/macrófagos contribuyendo al proceso inflamatorio sostenido por estas células <sup>166</sup>. En etapas tardías de la inflamación participa en el proceso de eferocitosis mediado por los macrófagos y posiblemente en su polarización hacia perfiles alternativos con función reparadora e inmunoreguladora <sup>136,218</sup>.

En este contexto y con base en los resultados expuestos en los Capítulos 3 y 4 nos planteamos, caracterizar la expresión de la TG2 y el fenotipo funcional de la línea celular THP-1 diferenciada a macrófago, bajo la influencia de los factores solubles secretados por células trofoblásticas. Pare ello utilizamos sobrenadantes condicionados obtenidos por cultivo de células Swan-71 en condiciones basales, de inflamación e hipoxia. Los macrófagos fueron obtenidos con la condición II de diferenciación descrita en la parte II del capítulo 3, para obtener un perfil más próximo al tipo-MO que presenta mayor plasticidad para diferenciarse a M2.

A continuación, se desarrolla el marco teórico y se exponen los resultados obtenidos en esta línea de trabajo y su discusión en base a los antecedentes de la literatura.

### Los monocitos y macrófagos en la interfase materno-fetal

Los macrófagos están implicados en múltiples procesos a lo largo de la gestación como la regulación de la invasión del trofoblasto, la remodelación tisular y vascular, el mantenimiento de la tolerancia, el crecimiento del embrión y el inicio del parto. Estos se ubican en la proximidad de las arterias espiraladas y cercanos al trofoblasto extravelloso <sup>123,131</sup>.

La plasticidad y heterogeneidad funcional asociada a este linaje celular, se ve reflejada en las diferentes etapas de la gestación, siendo su cambio fenotípico una característica de vital importancia para el éxito de la gestación <sup>123,205,323,324</sup>.

No existe consenso en cuanto a la clasificación fenotípica de los macrófagos deciduales, aunque es claro que la clasificación convencional M1/M2 no es del todo adecuada, existiendo incluso distintos subtipos con diferentes funciones locales. Sin embargo, globalmente se puede establecer que en el útero en gestación los macrófagos deciduales exhiben un fenotipo cercano al inflamatorio clásico M1 durante el período preimplantatorio que evoluciona a un perfil mixto M1/M2, con fenotipos del tipo regulador y reparador durante la invasión del trofoblasto extravelloso. Una vez que se ha establecido la circulación fetal hay predominio de un fenotipo M2, que está involucrado en la tolerancia al feto, la remodelación tisular, la angiogénesis, la proliferación celular y el metabolismo. Finalmente, los macrófagos retoman un fenotipo predominante M1 en la etapa de periparto <sup>325</sup>.

Tanto las hormonas implicadas en la gestación como las células trofoblásticas cumplen un rol central en el establecimiento del ambiente tolerogénico en la interfase maternofetal <sup>117,119</sup>. Particularmente el trofoblasto, mediante moléculas expresadas en su superficie y la secreción de componentes solubles como citoquinas y otros factores, interviene en el reclutamiento y la inmunoregulación de leucocitos de la interfase materno-fetal durante toda la gestación <sup>117,123,326</sup>. En cuanto a los monocitos/macrófagos deciduales, se ha observado que el trofoblasto puede influenciar su reclutamiento, migración, así como su fenotipo característico <sup>118</sup>. En particular se ha demostrado que la secreción por parte de trofoblasto de TGF- $\beta$  <sup>120</sup> y PDL-1 soluble (en respuesta a IFN- $\beta$  producido por los macrófagos deciduales) <sup>327</sup> condiciona el fenotipo funcional de los macrófagos hacia un perfil M2 inmunosupresor/reparador. Incluso, la interacción del trofoblasto con los monocitos/macrófagos deciduales puede alterar la respuesta inflamatoria frente a estímulos con PAMPs, modulándola a la baja; lo que podría representar un mecanismo protector frene al eventual daño producido por macrófagos deciduales activados en un perfil inflamatorio <sup>118</sup>.

En condiciones patológicas como el síndrome de preeclampsia, en el que perduran estados de hipoxia e inflamatorios, el diálogo entre el trofoblasto y los macrófagos deciduales se ve afectado; esto se debe, entre otros factores, a que en esta situación los macrófagos activados producen citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que estimulan la expresión de FAS en el trofoblasto potenciando la inducción de la apoptosis de las células del EVT por los propios macrófagos, los cuáles muestran además una aumentada expresión de FAS-L. Esto termina limitando en consecuencia la adecuada invasión endovascular de las células trofoblásticas que se observa en la preeclampsia <sup>116</sup>.

### Resultados

Caracterización de sobrenadantes de cultivo condicionados por Swan-71. Las células Swan-71 fueron expuestas a condiciones de hipoxia o inflamatorias siguiendo los protocolos previamente ensayados <sup>328</sup> y se recolectó el sobrenadante luego de 24 h de tratamiento (SC\_Swan-71). En forma concomitante se generaron los medios control incubando medio de cultivo fresco con o sin agregado de los estímulos. Para el análisis de los ensayos presentados a continuación, los datos fueron normalizados en relación con su respectivo medio control.

Con el objetivo de evaluar la concentración de citoquinas remanentes luego del tratamiento realizado a las células Swan-71, se realizaron ELISAS de captura para medir los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  tanto en los SC\_Swan-71 como en los medios control. De la concentración inicial de 10 ng/ml de cada citoquina incorporada, se detectaron 5 ng/mL de TNF- $\alpha$  y 2 ng/mL de IL-1 $\beta$  a las 24 h de incubación con las células Swan-71 en comparación a los 10 ng/mL TNF- $\alpha$  y 8 ng/mL de IL-1 $\beta$  detectados en los medios control, lo que reflejaría el consumo de dichos mediadores por las Swan-71. Adicionalmente se analizó la secreción de IL-6 e IL-8 en los sobrenadantes condicionados. En concordancia con nuestras observaciones previas<sup>328</sup> (**Capítulo 4**) ambas condiciones inflamatorias, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  indujeron un importante aumento en la producción de IL-8 e IL-6 por las Swan-71, y en condiciones de hipoxia química se produjo una disminución de IL-6 concomitante al incremento de IL-8 (Figura 5-1).



Figura 5-1. Determinación de citoquinas en los sobrenadantes condicionados de células trofoblásticas. Las células Swan-71 fueron incubadas por 24h con TNF- $\alpha$  10 ng/mL, IL-1 $\beta$  10 ng/mL, CoCl2 200  $\mu$ M o sin estímulo (condición basal). Se muestra la concentración de IL-8 e IL-6 determinadas por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos.

# Efecto de los sobrenadantes condicionados por Swan-71 sobre la polarización de las células dTHP-1

En primera instancia verificamos si en nuestras condiciones de ensayo existían cambios en la expresión de los marcadores de polarización en las células dTHP-1 tratadas con SC\_Swan-71. Las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos siguiendo el protocolo descripto en el Articulo II (**Capítulo 3**), dado que mostró ser adecuado para evaluar diferentes estímulos de polarización en células THP-1.

En base a la bibliografía y a nuestros resultados descritos en el capítulo 3, se seleccionaron algunos marcadores fenotípicos característicos de perfiles M1/M2 para evaluar su expresión por qRT-PCR con los cebadores disponibles en el laboratorio. Se analizó la expresión de MRC-1 y CCLI3 como marcadores tipo M2 y se consideraron MCP-1 y CXCLI1 por su expresión característica del perfil tipo M1.

Observamos que el tratamiento de 24h con SC\_Swan-7l (Basal) indujo un aumento significativo de los marcadores MRC-1 y CCLI3, así como una disminución de MCP-1. En cambio, el tratamiento de las células dTHP-1 con SC\_Swan-7l (TNF- $\alpha$ ) o SC\_Swan-7l (IL-1 $\beta$ ) indujo un aumento de MCP-1 no observándose variación en la expresión de los otros marcadores estudiados en comparación a la condición de referencia. Sin embargo, al comparar entre los efectos de los sobrenadantes condicionados observamos que la expresión de MRC-1 fue significativamente mayor cuando las células dTHP-1 son tratadas con SC\_Swan-7l (Basal) respecto a los SC\_Swan-7l obtenidos en condiciones inflamatorias o de hipoxia; a su vez, las dTHP-1 tratadas con sC\_Swan-7l (Basal). (**Figura 5-2**).



**Figura 5-2.** Polarización de células dTHP-1 por SC\_Swan-71. Las células dTHP -1 fueron incubadas por 24 h con sobrenadante condicionado (SC\_Swan-71), medio control o RPMI fresco (condición de referencia). Se muestra la expresión normalizada (al medio control respectivo) de genes marcadores del estado de polarización determinada por qRT-PCR. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM de ensayos por triplicado. La línea punteada y el área gris representan el promedio  $\pm$  SEM de la condición de referencia respectivamente. Los asteriscos sobre las barras indican diferencia significativa respecto a la condición de referencia, y sobre las líneas respecto a la condición basal. Test-t no pareado.

Para continuar con nuestra caracterización, analizamos la producción de mediadores solubles por parte de las células dTHP-1 tratadas con sobrenadantes condicionados de células Swan-71. Encontramos que los sobrenadantes de células dTHP-1 incubadas por 24 h con SC\_Swan-71 (Basal) presentaron niveles menores de TNF- $\alpha$  relativos a su medio control. En cuanto al efecto de los sobrenadantes condicionados provenientes de células Swan-71 tratadas con citoquinas proinflamatorias, se observó un aumento en la producción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de las células dTHP-1 tratadas con SC\_Swan-71 (IL-1 $\beta$ ) y un discreto aumento de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes de las células dTHP-1 tratadas con SC\_Swan-71 (TNF- $\alpha$ ). En el caso de las dTHP-1 incubadas con SC\_Swan-71 (CoCl<sub>2</sub>) se observó una disminución significativa en los niveles de IL-1 $\beta$  respecto a la condición de referencia (RPMI) (**Figura 5-0-3**). Adicionalmente los sobrenadantes de células dTHP-1 tratadas con SC\_Swan-71 provenientes de las condiciones inflamatorias o hipoxia presentaron niveles significativamente mayores de TNF- $\alpha$  que las células tratadas

con SC\_Swan-71 (Basal); y el tratamiento con SC\_Swan-71 (IL-1 $\beta$ ) o (TNF- $\alpha$ ) indujo niveles mayores de IL-1 $\beta$  en el sobrenadante de la dTHP-1 en comparación al sobrenadante condicionado basal.

Por otra parte, se analizaron los niveles de IL-6, IL-8, IL-10 y CCL22 en los sobrenadantes de las células dTHP-1 para todos los tratamientos, no encontrándose variaciones significativas por influencia de los SC\_Swan-71 con ninguno de los tratamientos ni los provenientes de las células basales.



SC\_Swan-71

Figura 5-0-3. Cuantificación relativa de la producción de citoquinas proinflamatorias por dTHP-1 condicionadas por células trofoblásticas. Las células dTHP -1 fueron incubadas por 24h con sobrenadante condicionado (SC\_Swan-71), medio control o RPMI fresco (condición de referencia). Se muestra los niveles relativos (al medio control respectivo) de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  determinadas por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de ensayos por triplicado. La línea punteada y el área gris representan el promedio  $\pm$  SEM de la condición de referencia. Los asteriscos sobre las barras indican diferencia significativa respecto a la condición de referencia y sobre las líneas respecto a la condición basal. Test-t no pareado.

En conjunto, nuestros resultados muestran que, siguiendo este protocolo de condicionamiento, las células dTHP-1 tienden a acercarse a un fenotipo M2 cuando son tratadas con los SC\_Swan-71 (Basales), sin embargo, el fenotipo se aproxima más a un perfil M1 cuando los macrófagos son incubados con sobrenadantes de células trofoblásticas que fueron sometidas a hipoxia química o condiciones inflamatorias.

## Efecto de los sobrenadantes condicionados por Swan-71 sobre la capacidad eferocítica de dTHP-1

En primera instancia, para estudiar el efecto de los SC\_Swan-71 en el proceso de eferocitosis fue necesario poner a punto el ensayo basándonos en nuestros antecedentes <sup>136</sup>. Los ensayos se realizaron a 37°C utilizando THP-1 diferenciadas con la condición II (**Capítulo 3**) y Swan-71 apoptóticas marcadas con CFSE en relación 1:1 en presencia o

ausencia de SC\_Swan-71. El porcentaje de dTHP-1 que incorporaron células apoptóticas se determinó por citometría de flujo analizando el porcentaje de células CD45<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>. Los resultados mostraron que la incubación con los sobrenadantes condicionados SC\_Swan-71 no afectó significativamente el porcentaje de eferocitosis en relación con la condición de referencia. Al comparar los tratamientos con los sobrenadantes condicionados se evidenció una disminución significativa en el porcentaje de eferocitosis de las células tratadas con SC\_Swan-71 (IL-1 $\beta$ ) respecto a las tratadas con SC\_Swan-71 (Basal) (Figura 5-4).



Figura 5-4. Determinación de la capacidad de eferocitosis por dTHP-1 condicionadas por células trofoblásticas. Las células dTH-1 preincubadas por 24h con sobrenadante condicionado (SC\_Swan-71), medio control o RPMI fresco (condición de referencia) fueron posteriormente co-cultivadas con cuerpos apoptóticos de Swan-71, previamente marcados con CFSE. El porcentaje de células dTHP-1 que fagocitaron Swan-71 apoptóticas se determinó por análisis de citometría de flujo contando la frecuencia de las células CD45-APC+CFSE+. En el panel superior se representan gráficos de dispersión ilustrativos de la estrategia de análisis. En el panel inferior se muestra el % de fagocitosis para cada condición analizada. Los datos se expresan como el promedio ±SEM de ensayos por triplicado. La línea punteada y el área gris representan el promedio ±SEM de la condición relativo a la condición de referencia respectivamente. Se aplicó test-t no pareado para cada condición relativo a la condición de referencia y a la condición SC\_Swan-71 (Basal).

# Efecto de los sobrenadantes condicionados por Swan-71 sobre la expresión de TG2 y actividad TGasa en dTHP-1

Basadas en nuestras evidencias de la modificación de la expresión de TG2 en el proceso de diferenciación a macrófagos y polarización en ensayos con células THP-1 (**Capítulo 3**), sumado a reportes donde se muestra que la actividad TGasa también puede ser modificada en estos procesos; a continuación, nos enfocamos en el análisis comparativo de la actividad TGasa y expresión de la TG2 en el contexto de la interacción de los dTHP-1 con los sobrenadantes condicionados de células trofoblásticas basales y previamente tratadas con condiciones de hipoxia e inflamatorias.

En primera instancia analizamos la expresión de la TG2 total y expuesta en la superficie celular mediante citometría de flujo, en células permeabilizadas y sin permeabilizar respectivamente. Como se muestra en la **Figura 5-5** no se observó variación en la expresión de la TG2 a nivel total en las condiciones analizadas. En cuanto a la TG2 extracelular se observó una tendencia a la disminución de su expresión con SC\_Swan-71 (CoCl<sub>2</sub>) y una tendencia al aumento con sobrenadantes condicionados de Swan-71 expuestas a un ambiente proinflamatorio.



Figura 5-5. Determinación de la expresión de TG2 en dTHP-1 condicionadas por células trofoblásticas. Las células dTHP-1 fueron incubadas por 24h con sobrenadante condicionado (SC\_Swan-71), medio control o RPMI fresco (condición de referencia). La expresión de TG2 se determinó por análisis de citometría de flujo como la intensidad de fluorescencia media (IFM) de las células dTHP-1 incubadas con los medios condicionados normalizado por el IFM de las incubadas con el respectivo medio control. En el panel de

la izquierda se muestran histogramas representativos de cada condición En el panel a la derecha se muestra el nivel de expresión de TG2 a nivel extracelular (arriba) o en células permeabilizadas (abajo) para cada condición analizada. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de ensayos por triplicado. La línea punteada y el área gris representan el promedio  $\pm$  SEM de la condición de referencia respectivamente. Se aplicó Test-t no pareado para cada condición relativo a la condición de referencia a la condición SC\_Swan-71 (Basal).

Adicionalmente estudiamos la actividad de la enzima mediante citometría de flujo empleando una amina biotinilada como sustrato para la TG2. No se observaron cambios en la actividad transglutaminasa de los macrófagos derivados de THP-1 expuestos a los SC\_Swan-71 respecto a las células incubadas en RPMI (condición de referencia). Sin embargo, el nivel de actividad observado en las dTHP-1 tratadas con SC\_Swan-71 (CoCl<sub>2</sub>) fue significativamente menor al observado para las células tratadas con SC\_Swan-71 (Basal) (**Figura 5-0-6**).



Figura 5-0-6. Determinación de la actividad TGasa en dTHP-1 condicionadas por células trofoblásticas. Las células dTHP-1 fueron incubadas por 24h con sobrenadante condicionado (SC\_Swan-71), medio control o RPMI fresco (condición de referencia) y en presencia del inhibidor de la actividad TGasa cistamina (CTA). La actividad TGasa se determinó por análisis de citometría de flujo de la incorporación de la amina biotinialda: 5-(biotinamido)-pentilamina. La actividad TGasa se expresa como la intensidad de fluorescencia media (IFM) de las dTHP-1 incubadas con los sobrenadantes condicionados normalizado por la IFM de las tratadas con el medio control respectivo. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$ SEM de ensayos por triplicado. La línea punteada y el área gris representan el promedio  $\pm$ SEM de la condición de referencia respectivamente. Los asteriscos sobre las barras indican diferencia significativa respecto a la condición de referencia, y sobre las líneas respecto a las THP-1 tratadas con SC\_Swan-71 (Basal). Se aplicó Test-t no pareado.

Nuestros resultados del **Capítulo 3** mostraron que las variantes de *splicing* de TG2 en macrófagos derivados de THP-1 modifican su expresión diferencialmente dependiendo de los estímulos de polarización. Nos interesó estudiar si los factores solubles derivados de los sobrenadantes condicionados producían efectos en este sentido. Interesantemente, encontramos variaciones en la expresión de los mensajeros de las variantes de *splicing* de TG2. Particularmente, la incubación de las células dTHP-1 con sobrenadantes de células Swan-71 basales, indujo un aumento de la expresión de

TGM2\_vl y una disminución de las variantes cortas TGM2\_v3 y v4a. Por otro lado, los SC\_Swan-71 proveniente de los tratamientos con IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  indujeron la expresión de TGM2\_vl y v2 respectivamente, mientras que el obtenido del tratamiento de hipoxia indujo un aumento de la variante TGM2\_v4a (**Figura 5-0-7**). Adicionalmente comparamos la variación en la expresión de las TGM2\_v en las dTHP-1 tratadas con SC\_Swan-71 expuestas a citoquinas proinflamatorias o condiciones de hipoxia respecto al SC\_Swan-71 (Basal). Encontramos que el SC\_Swan-71 (TNF- $\alpha$ ) favorece la expresión de TGM2\_v2 y v4a, al tiempo que disminuye la expresión de TGM2\_v4a.



Figura 5-0-7. Expresión de las variantes de splicing de TGM2 en células dTHP-1 condicionadas por células trofoblásticas. Las células dTHP-1 fueron incubadas por 24h con sobrenadantes condicionados (SC\_Swan-71), medio control o RPMI fresco (condición de referencia). Se representa la expresión relativa (al rrespectivomedio control) de las variantes de splicing para TGM2 determinada por qRT-PCR. Las barras representan el promedio  $\pm$  SEM de ensayos por triplicado. La línea punteada y el área gris representan el promedio de la condición de referencia. Los asteriscos sobre las barras indican diferencia significativa respecto a la condición de referencia, y sobre las líneas respecto a las dTHP-1 tratadas con SC\_Swan-71 (Basal) Test-t no pareado.

### Discusión

La mayoría de los estudios previos publicados sobre el condicionamiento de monocitos/macrófagos *in vitro* por factores secretados por el trofoblasto, fueron realizados con monocitos obtenidos de muestras de sangre de mujeres fértiles <sup>118-120,329,330</sup> Estos trabajos han sido la base para establecer que una de las consecuencias del dialogo entre estas poblaciones celulares es la polarización de los macrófagos hacia un perfil alternativo/reparador (tipo M2). En este trabajo de tesis debido a las dificultades para la obtención de estas muestras, y apoyándonos en nuestra experiencia previa en el trabajo con la línea THP-1 en ensayos de diferenciación y polarización (ver **Capítulo 3**) nos enfocamos en estudiar el condicionamiento por sobrenadantes de células trofoblásticas Swan-71 de células dTHP-1 obtenidas con un protocolo que limita el sesgo hacia un perfil M1 inducido por la PMA.

Nuestros resultados muestran que el sobrenadante de las células Swan-71 incubadas en condiciones basales también puede favorecer la polarización de los macrófagos derivados de THP-1 hacia un perfil M2, como lo evidencia la expresión de genes típicos de este perfil (MRC-1 y CCLI3) (**Figura 5-2**) y una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  (**Figura 5-0-3**). Por otro lado, observamos que cuando los sobrenadantes provienen de células Swan-71 previamente tratadas con citoquinas proinflamatorias o sometidas a hipoxia química este perfil fenotípico se pierde, observándose un perfil más inflamatorio, con aumento de producción de citoquinas proinflamatorias y aumento de la expresión del gen *MCP-1* (**Figura 5-2**). Dado que el fenotipo de los macrófagos deciduales no se ajusta a la clasificación convención al M1/M2<sup>325</sup> sería interesante profundizar nuestro trabajo evaluando la expresión de otras proteínas previamente reportadas en macrófagos deciduales y asociadas a la función inmunosupresora/reparadora <sup>120,329</sup>.

Los macrófagos deciduales cumplen múltiples funciones en la interfase materno-fetal regulando la invasión del trofoblasto <sup>113,331</sup>, inhibiendo la activación de linfocitos T hacia perfiles efectores inflamatorios y favoreciendo la diferenciación a células T reguladoras <sup>332–334</sup>. Adicionalmente son actores centrales en los procesos de remodelación tisular promoviendo la apoptosis de tejido no deseado <sup>335</sup> así como en la depuración de los cuerpos apoptóticos <sup>123,333</sup> protegiendo a las células adyacentes del daño potencial de un proceso inflamatorio.

TG2 cumple una importante función en el proceso de eferocitosis 190; y en trabajos previos de nuestro grupo se puso en manifiesto la asociación de complicaciones ginecoobstétricas con este papel a través de la inhibición de su función con anticuerpos anti-TG2 128,136. Estudios previos habían demostrado que monocitos incubados con sobrenadantes condicionados de células trofoblásticas aumentaban su capacidad de eferocitosis 120. En este trabajo, ensayamos la esferocitosis de células Swan-71 apoptóticas por parte de dTHP-1 incubadas previamente con sobrenadantes condicionados de Swan-71 (basales o sometidas a condiciones de hipoxia o inflamatorias). Adicionalmente medimos la expresión de la enzima TG2 mediante citometría de flujo en las células dTHP-1 incubadas con los sobrenadantes condicionados. Desafortunadamente, con estas condiciones de ensayo no observamos grandes cambios en el porcentaje de eferocitosis ni en los niveles de expresión de la enzima TG2 (Figura 5-4 y Figura 5-5). Sería interesante profundizar en el estudio de los marcadores fenotípicos expresados por las dTHP-1 condicionadas. En particular la expresión de CD14, es característico de una subpoblación de macrófagos deciduales implicados en la función homeostática durante el desarrollo de la placenta <sup>116</sup>, posiblemente a través del proceso de eferocitosis <sup>336</sup>. Por otra parte, la expresión de CD14 en las células THP-1 es dependiente de las condiciones de diferenciación, como ser la concentración de PMA <sup>120,207</sup>. Eventualmente, siguiendo este u otros marcadores se podrían optimizar las condiciones de diferenciación y tener un modelo más cercano a los macrófagos deciduales, para luego estudiar la interacción con los sobrenadantes de las células trofoblásticas Swan-71.

Finalmente, basadas en los resultados obtenidos en nuestro estudio de la expresión de las variantes de *splicing* de TG2 en la polarización de macrófagos derivado de THP-1; nos pareció importante explorar la expresión de las variantes de *splicing* en las células dTHP-1 incubadas con los sobrenadantes condicionados de Swan-71. Interesantemente observamos que asociado al condicionamiento de las células Swan-71 basales, que mostró un aumento en la expresión de marcadores asociados a un fenotipo M2, se ve un aumento de TGM2\_v1 y una disminución de la variante corta TGM2\_v3 (**Figura 5-0-6**). Este resultado está en línea con nuestras observaciones previas donde reportamos un aumento de TGM2\_ v3 asociada a patologías inflamatorias como la enfermedad celíaca o el síndrome antifosfolipídico así como frente al estímulo de IFN-γ en células dTHP-1. Por otro lado, esta variante fue proporcionalmente menos representada en células dTHP-1 estimuladas con IL-4.

Adicionalmente en el contexto de la esclerosis múltiple, una patología en la cual hay una importante contribución de macrófagos con un perfil antiinflamatorio la TGM2\_v3 tiende a ser indetectable en muestras de PBMC de personas afectadas por esta enfermedad <sup>163</sup>.

La relación de expresión de las variantes de *splicing* de TG2 en células dTHP-1 se ve alterada frente a la incubación con los sobrenadantes condicionados provenientes de células Swan-71 previamente tratadas con citoquinas proinflamatorias o hipoxia química. Evidentemente son necesarios futuros estudios para profundizar en las potenciales implicancias funcionales de estas observaciones.

Globalmente, en esta parte del trabajo logramos una primera aproximación a un modelo de interacción del trofoblasto con macrófagos empleando dos líneas celulares: Swan-71 y dTHP-1. Fuimos capaces de reproducir el efecto de la polarización hacia un perfil M2 inducido por IL-4 de macrófagos derivados de THP-1 por los sobrenadantes condicionados de las células Swan-71 y observamos como esta polarización se ve alterada cuando las células trofoblásticas son previamente expuestas a condiciones de estrés. Adicionalmente, caracterizamos los perfiles de expresión de las variantes de *splicing* de TG2 en los macrófagos derivados de THP-1 tratados con los sobrenadantes condicionados de Swan-71. Interesantemente, en concordancia a nuestras observaciones anteriores, vimos desfavorecida la expresión de la variante corta TGM2\_v3 en el tratamiento con sobrenadante condicionado proveniente del cultivo de Swan-71 en condiciones basales.

# Capítulo



### **DISCUSIÓN GLOBAL Y**

### **CONCLUSIONES**

El objetivo general de esta tesis es aportar a la comprensión del rol de la TG2 materna y fetal en condiciones fisiológicas y patológicas del embarazo. En este capítulo se plantea una discusión global del trabajo con una mirada integradora de los resultados obtenidos con las distintas estrategias experimentales utilizadas y en el contexto de la principal bibliografía específica disponible.

Dado al escaso conocimiento disponible del rol de la TG2 en las principales células que integran el compartimento materno-fetal, nos propusimos como estrategia inicial su estudio en células inmunes maternas que tienen la potencialidad de colonizar dicho compartimento y en paralelo, centrarnos en el trofoblasto como estructura de la placenta con la cual se establece el contacto más directo.

Por otra parte, un aspecto aún menos explorado es la regulación de expresión de la TG2 mediante *splicing* alternativo en estos tipos celulares. En general se sabe que la regulación post-transcripcional de los genes es igualmente importante que la transcripcional, de hecho, durante la respuesta inmune entre un 20 a un 50% de los genes presentan *splicing* alternativo, dependiendo del tipo celular <sup>337</sup>.Por otra parte, un aspecto aún menos explorado es la regulación de expresión de la TG2 mediante splicing alternativo en estos tipos celulares.

En base a la relevancia que tiene este mecanismo para modificar la funcionalidad de las proteínas y su dependencia con el tipo celular y señales del microambiente analizamos la expresión de las variantes de *splicing* conocidas en condiciones basales y vinculadas a procesos inflamatorios o de hipoxia que podrían condicionar el curso de la gestación.

Tomamos como punto de partida los antecedentes de nuestro grupo en el estudio indirecto del rol de la TG2 en el embarazo, a través del efecto de los autoanticuerpos específicos contra ella generados en mujeres celíacas, sobre cambios de la actividad TGasa y de algunas funciones del trofoblasto y macrófagos.

Como continuación de esta línea de trabajo estudiamos en primera instancia la expresión de la TG2 y sus variantes de *splicing* en leucocitos periféricos de personas con EC en comparación con individuos sanos. Por otra parte, siendo el macrófago un leucocito central en el proceso de placentación y mantenimiento de la gestación, adicionalmente trabajamos con un modelo *in vitro* representativo del contexto inflamatorio asociado al síndrome antifosfolípidos (SAF).

En conjunto nuestros resultados sugieren que existe un aumento en la expresión relativa de algunas de las variantes cortas de TG2 en células inmunes en un contexto inflamatorio asociado a patologías vinculadas con trastornos de la gestación como son la EC y el SAF. Un hallazgo significativo fue el aumento relativo de TGM2\_v3 por sobre las otras variantes en estas condiciones.

Consideramos que estos resultados son novedosos ya que exceptuando el cáncer y enfermedades neurodegenerativas <sup>29,177,178</sup>, no hay información sobre la regulación de la expresión de la TG2 por *splicing* alternativo y las consecuencias de la variación de la contribución relativa de proteínas con estructura truncas sobre las funciones celulares.

Una limitante de nuestro estudio fue la disponibilidad insuficiente de células en las muestras humanas como para estudiar la expresión de TG2 a nivel proteico en los leucocitos. Por otra parte, si bien la presencia de la enzima y las variantes TGM2\_v4a y v4b fue reportada anteriormente en leucocitos <sup>36,151,338</sup> no existen anticuerpos comerciales que discriminen entre las variantes de *splicing* de la TG2, limitando así el conjunto de técnicas disponibles para su análisis. En cuanto a la TG2 canónica, su presencia fue demostrada en las THP-1 por Mehta et al 1986, detectada en la superficie celular por Bayardo 2011 y posteriormente verificado por nuestro grupo <sup>136</sup>.

En base a los antecedentes y a la función dual de los macrófagos de la interfase maternofetal, tanto en un microambiente inflamatorio como en la homeostasis y reparación tisular, nos propusimos extender el estudio de las variantes de *splicing* de la TG2 a este tipo celular durante el proceso de diferenciación desde monocito y en los estados de polarización MI o M2 en el modelo de células THP-1.

Consistentemente, nuestros resultados del modelo *in vitro* con células dTHP-1 están en línea con los observados con los leucocitos periféricos de los pacientes celíacos y en las dTHP-1 expuestas a sueros de pacientes con SAF los cuáles inducen cascadas inflamatorias en estas células. En forma global, observamos que las condiciones inflamatorias se asocian con el aumento relativo de la expresión de las variantes truncadas. En particular los ensayos realizados con estímulos inflamatorios estándar en el modelo de THP-1 en varias condiciones confirman que la expresión de la variante TGM2\_v3 se ve favorecida por condiciones inflamatorias como habíamos descrito en las condiciones de EC y SAF. Sin embargo, esta variante descripta por primera vez por Fraij y Gonzales en 1996 ha sido muy poco estudiada y se desconocen las implicancias

biológicas de su sobreexpresión. Cabe destacar que TGM2\_v3 carece de una importante porción en el extremo C-terminal lo que condiciona su regulación por calcio y GTP <sup>339</sup> Haciendo un paralelismo con los datos disponibles para la TGM2\_v2, si bien se espera que su actividad TGasa se vea disminuida, la actividad TGasa global en la célula podría verse aumentada por su sobreexpresión y su falta de regulación <sup>33,340</sup>. En consecuencia, esto podría repercutir aumentando el bucle de retroalimentación inflamatorio, por activación de NF-κB <sup>142,341</sup>. Adicionalmente, TGM2v\_3, podría contribuir a la activación de NF-κB por vías independientes a la actividad TGasa <sup>342</sup>.

Por otro lado, en el modelo *in vitro* se observó que frente al estímulo por IL-4 se pierde la mayor contribución relativa de la variante TGM2\_v3 pasando a ser más predominante la variante TGM2\_v4b. Interesantemente, Sestito et al <sup>163</sup> reportaron la predominancia de las variantes TGM2\_v4a y TGM2\_v4b en relación con TGM2\_v1 por sobre las otras variantes en PBMC de pacientes con esclerosis múltiple, donde la respuesta presenta un perfil antiinflamatorio <sup>199</sup>.

El trabajo de estandarización desarrollado en el modelo *in vitro* y la información obtenida en esta parte del trabajo acerca de las diferencias en la expresión relativa de las variantes de TGM2 en relación con las distintas condiciones de cultivo, representan la base experimental para analizar el condicionamiento de los macrófagos por señales derivadas de las células trofoblásticas en condiciones normales y frente a estímulos estresantes como la hipoxia y la inflamación, hechos que analizamos posteriormente en este trabajo. Adicionalmente, consideramos que este punto es muy relevante dada la controversia establecida en la literatura respecto a la diferenciación hacia un fenotipo M2 de las células dTHP-1. Particularmente en cuanto a las diferencias observadas en los marcadores fenotípicos según los protocolos empleados y en comparación a macrófagos derivados de monocitos periféricos <sup>184,206,209,214</sup>.

Para estudiar los efectos de la inflamación y la hipoxia sobre el trofoblasto utilizamos la línea trofoblástica de primer trimestre Swan-7l como modelo y describimos que ambas condiciones tienen efectos diferenciales sobre estas células en cuanto a los niveles de expresión de TG2, su localización y perfil de expresión de sus variantes de *splicing*. Este último punto también fue observado en el caso de las células Swan-7l expuestas a sueros de pacientes con SAF, los cuales son también capaces de activar la vía inflamatoria de NF-κB, llevando a un aumento en la secreción de IL-6.
Además, mostramos que la TG2 está implicada en la regulación de la migración del trofoblasto y sugerimos que la expresión relativamente más alta de TGM2\_v2 y TGM2\_v3 en condiciones de hipoxia química podría ser responsable de la disminución de la migración observada en esta condición debido a la falta en estas dos variantes de los residuos involucrados en la regulación de la actividad TGasa y la migración celular a través de las uniones adhesivas y señalización. Adicionalmente, la TG2 ha sido directamente involucrada en la regulación de genes relacionados a la adhesión celular (integrinas), reorganización del citoesqueleto y migración e invasión principalmente en relación a estas funciones en los procesos de metástasis tumoral<sup>343,344</sup> aunque también en otros tipos celulares <sup>199</sup>. Una limitante de nuestro estudio fue el no poder establecer una relación más directa entre los efectos observados (en condiciones basales y de estrés) y los cambios en la expresión de TG2 por lo que sería interesante a futuro poder silenciar su expresión génica con el fin de evaluar el impacto de sus funciones independientes de su actividad TGasa.

La etapa final de nuestro trabajo fue analizar el efecto de sobrenadantes condicionados obtenidos por cultivo de células Swan-71 en condiciones basales, de inflamación e hipoxia sobre los macrófagos. Los macrófagos que utilizamos en estos ensayos fueron aquellos obtenidos con un protocolo de diferenciación que permite obtener un perfil más próximo al tipo-M0 que presenta mayor plasticidad para diferenciarse a M2.

Nuestros resultados muestran que el sobrenadante de las células Swan-71 incubadas en condiciones basales puede favorecer la polarización de los macrófagos derivados de THP-1 hacia un perfil M2, como lo evidencia la expresión de genes típicos de este perfil (MRC-1 y CCLI3) y una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF-α. Estos resultados están en línea con observaciones previas en ensayos de educación de monocitos por células trofoblásticas en los que se muestra que componentes secretados al medio extracelular son capaces de guiar la polarización de monocitos de sangre hacia un perfil tipo M2<sup>120,329</sup>, e incluso atenuar la respuesta a PAMPs clásicos <sup>118</sup>. Por otro lado, observamos que cuando los sobrenadantes provienen de células Swan-71 previamente tratadas con citoquinas proinflamatorias o sometidas a hipoxia química este perfil fenotípico se pierde, observándose un perfil más inflamatorio, con aumento de producción de citoquinas proinflamatorias y aumento de la expresión del gen MCP-1.

En estas condiciones de ensayo no observamos mayores cambios en otros efectos evaluados como el porcentaje de eferocitosis o los niveles de expresión de la enzima TG2. Interesantemente asociado al condicionamiento al fenotipo del tipo M2 de las células Swan-71 basales, observamos un aumento de TGM2\_v1 y una disminución de la variante corta TGM2\_v3. Este resultado está en línea con nuestras observaciones previas donde reportamos que esta variante fue proporcionalmente menos representada en células dTHP-1 estimuladas con IL-4, pero que aumenta en condiciones inflamatorias patológicas como la enfermedad celíaca o el síndrome antifosfolipídico, así como frente al estímulo de IFN-γ en células dTHP-1. Consideramos que los resultados obtenidos en esta etapa son promisorios y ameritan seguir explorando el modelo de trabajo con ambas líneas celulares para encontrar las mejores condiciones para los ensayos de condicionamiento de macrófagos. Es posible que variaciones en el tiempo de incubación con los sobrenadantes, así como ajustes en la relación de volúmenes permitiera obtener resultados más robustos <sup>198,209</sup>.

En términos generales este trabajo respalda la hipótesis del rol de la TG2 en la regulación de componentes celulares claves de la interfase materno-fetal. Los resultados muestran que cuando se inducen cambios en su expresión y/o actividad TGasa, se ve alterada la funcionalidad de estas células.

## Conclusiones

- El efecto más marcado en la funcionalidad de las células trofoblásticas se observó con la hipoxia química que disminuye significativamente la migración del trofoblasto observándose en paralelo con una expresión disminuida de TG2.
- En cambio, en dichas células, las condiciones de inflamación utilizadas en nuestro modelo tuvieron un efecto más moderado sobre la variación de la expresión de la TG2, sin disminuir la actividad de la enzima ni la migración celular.
- La hipoxia y el microambiente inflamatorio, inducido por citoquinas o los anticuerpos asociados al SAF, indujeron en las Swan-71 la expresión de todas las variantes cortas d splicing con tendencia a mayor expresión de TGM2\_v2 y \_v3.
- El fenotipo con sesgo MI de los macrófagos se correlacionó con la mayor contribución relativa de variantes cortas de la TG2, en forma concordante con lo observado en dTHP-1 o leucocitos expuestos a condiciones inflamatorias características de patologías que cursan con complicaciones de la gestación como ser la EC y SAF.
- Una vez establecido un modelo in vitro que permitió verificar la plasticidad de estas células en cultivo, observamos que el sobrenadante de las Swan-71 en condiciones basales moduló su fenotipo funcional, con un sesgo hacia un perfil M2.
- Este condicionamiento observado con los sobrenadantes se pierde cuando las células trofoblásticas son expuestas a estímulos inflamatorios.
- A pesar de que los principales cambios en las Swan-71 se observaron con la hipoxia, los sobrenadantes obtenidos con estas condiciones de cultivo no afectaron el fenotipo funcional de los macrófagos en forma significativa.
- En términos generales, nuestros resultados confirman que la expresión de variantes de splicing de TG2 es un proceso dependiente del tipo celular y de las condiciones del microambiente al que están expuestas las células con posibles consecuencias sobre su funcionalidad.

## **Perspectivas**

Finalmente hay que destacar que el trabajo centrado en la biología de la TG2 se enfrenta a varios niveles de complejidad debido al carácter ubicuo y multifuncional de esta proteína. A su vez, sus múltiples actividades dependen del compartimento celular y están sujetas a distintos mecanismos de regulación. Por estas características la interpretación de los resultados resulta compleja y sería oportuno realizar abordajes complementarios para confirmarlos y evaluar su significancia fisiológica.

En este sentido, consideramos que, si bien nuestro trabajo contribuye al entendimiento de la biología de la TG2 en la interfase materno-fetal, planteamos los siguientes estudios como perspectivas para profundizar en el conocimiento sobre la base de los resultados obtenidos:

- En pos de establecer una relación más directa entre los efectos observados (en condiciones basales y de estrés) y los cambios en la expresión de TG2 sería interesante a futuro poder silenciar su expresión génica mediante iARN a los efectos de evaluar el impacto de sus funciones independientes de su actividad TGasa en la interfase materno-fetal.
- Dado que en varias situaciones, particularmente en aquellas con componente inflamatorio, detectamos aumentos en la expresión de la variante corta TGM\_v3 creemos que sería importante poder sobreexpresar específicamente esta variante tanto a nivel trofoblástico como de la línea celular utilizada como modelo de macrófago de la interfase para ver como esto afecta a nivel de ambos tipos celulares procesos claves donde está involucrada TG2.
- A los efectos de continuar estudiando el rol de TG2 en los procesos de migración y adhesión celular sería útil explorar un panel más amplio de genes relacionados a esta función (como integrinas y Rho A) y explorar como la expresión de TG2 en el trofoblasto afecta otros fenómenos relacionados como la invasión y la remodelación tisular.
- Para profundizar en el estudio del efecto del condicionamiento de los macrófagos por las trofoblásticas sería importante implementar estrategias de co-cultivo para de esa manera no sólo estudiar los efectos de los mediadores solubles sino tener en cuenta también interacciones de membrana que podrían estar involucradas en dicho proceso. También sería relevante estudiar el efecto de los mediadores producidos

por las células trofoblásticas en las diferentes condiciones de estrés celular sobre la migración de monocitos hacia la interfase.

 Otra perspectiva importante de nuestro trabajo es estudiar la relevancia fisiopatológica de los resultados obtenidos en el modelo in vitro sobre el desarrollo de las placentas llevando a cabo el análisis de la expresión de isoformas de TG2 en placentas normales y patológicas (particularmente aquellas provenientes de gestaciones con preeclampsia ) y realizando estudios de microscopía confocal para ver los patrones de localización de la enzima y su actividad enzimática en los diferentes tipos de muestras.

## REFERENCIAS

- 1. Lorand, L. Transglutaminase Remembering Heinrich Waelsch. Neurochem. Int. 40, 7–12 (2002).
- 2. Sarkar, N. K., Clarke, D. D. & Waelsch, H. An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 451–452 (1957).
- 3. Katt, W. P., Antonyak, M. A. & Cerione, R. A. The diamond anniversary of tissue transglutaminase: a protein of many talents. *Drug Discov. Today* 23, 575–591 (2018).
- 4. Odii, B. O. & Coussons, P. Biological functionalities of transglutaminase 2 and the possibility of its compensation by other members of the transglutaminase family. *Sci. World J.* **2014**, 7–9 (2014).
- 5. Nakaoka, H. *et al.* Gh: A GTP-Binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science (80-. ).* **264**, 1593–1596 (1994).
- 6. Hasegawa, G. *et al.* A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase. *Biochem. J.* **373**, 793–803 (2003).
- Mishra, S. & Murphy, L. J. Tissue transglutaminase has intrinsic kinase activity: identification of transglutaminase 2 as an insulin-like growth factor-binding protein-3 kinase. *J. Biol. Chem.* 279, 23863–23868 (2004).
- Nurminskaya, M. V. & Belkin, A. M. Cellular Functions of Tissue Transglutaminase. Int Rev Cell Mol Biol. vol. 294 (2013).
- 9. Bianchi, N., Beninati, S. & Bergamini, C. M. Spotlight on the transglutaminase 2 gene: A focus on genomic and transcriptional aspects. *Biochem. J.* **475**, 1643–1667 (2018).
- Bergamini, C. M., Collighan, R. J., Wang, Z. & Griffin, M. Structure and regulation of type 2 transglutaminase in relation to its physiological functions and pathological roles. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **781**, 1–46 (2011).
- Peng, X. *et al.* Interaction of tissue transglutaminase with nuclear transport protein importin-α3.
   *FEBS Lett.* 446, 35–39 (1999).
- Kojima, S., Kuo, T.-F. & Tatsukawa, H. Regulation of transglutaminase-mediated hepatic cell death in alcoholic steatohepatitis and non-alcoholic steatohepatitis. J. Gastroenterol. Hepatol. 27 Suppl 2, 52–7 (2012).
- Savoca, M. P., Tonoli, E., Atobatele, A. G. & Verderio, E. A. M. Biocatalysis by transglutaminases: A review of biotechnological applications. *Micromachines* 9, 9–11 (2018).
- Telci, D. & Griffin, M. Tissue transglutaminase (TG2) A wound response enzyme. *Front. Biosci.* 11, 867–882 (2006).
- 15. Lee, C. S. & Park, H. H. Structural aspects of transglutaminase 2: functional, structural, and regulatory diversity. *Apoptosis* **22**, 1057–1068 (2017).
- 16. Prasanna Murthy, S. N. *et al.* Conserved tryptophan in the core domain of transglutaminase is essential for catalytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2738–2742 (2002).
- 17. Király, R. *et al.* Functional significance of five noncanonical Ca2+-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. *FEBS J.* **276**, 7083–7096 (2009).
- Liu, S., Cerione, R. A. & Clardy, J. Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. 99, 2743–2747 (2002).

- Sima, L. E., Matei, D. & Condello, S. The Outside-In Journey of Tissue Transglutaminase in Cancer. *Cells* 11, 1–24 (2022).
- 20. Pinkas, D. M., Strop, P., Brunger, A. T. & Khosla, C. Transglutaminase 2 Undergoes a Large Conformational Change upon Activation. *PLoS Biol.* **5**, e327 (2007).
- 21. Lai, T. S., Lin, C. J. & Greenberg, C. S. Role of tissue transglutaminase-2 (TG2)-mediated aminylation in biological processes. *Amino Acids* **49**, 501–515 (2017).
- 22. Tatsukawa, H., Furutani, Y., Hitomi, K. & Kojima, S. Transglutaminase 2 has opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death. *Cell Death Dis.* **7**, e2244 (2016).
- Bayardo, M., Punzi, F., Bondar, C., Chopita, N. & Chirdo, F. Transglutaminase 2 expression is enhanced synergistically by interferon-γ and tumour necrosis factor-α in human small intestine. *Clin. Exp. Immunol.* **168**, 95–104 (2012).
- 24. Johnson, K., Hashimoto, S., Lotz, M., Pritzker, K. & Terkeltaub, R. Interleukin-1 induces promineralizing activity of cartilage tissue transglutaminase and factor XIIIa. *Am. J. Pathol.* **159**, 149–63 (2001).
- 25. Suto, N., Ikura, K. & Sasaki, R. Expression induced by interleukin-6 of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 7469–7473 (1993).
- 26. Jang, G. Y. *et al.* Transglutaminase 2 suppresses apoptosis by modulating caspase 3 and NF-κB activity in hypoxic tumor cells. *Oncogene* **29**, 356–367 (2010).
- 27. George, M. D., Vollberg, T. M., Floyd, E. E., Stein, J. P. & Jetten, A. M. Regulation of transglutaminase Type II by transforming growth factor-β1 in normal and transformed human epidermal keratinocytes. J. Biol. Chem. 265, 11098–11104 (1990).
- 28. Gundemir, S., Colak, G., Tucholski, J. & Johnson, G. V. W. W. Transglutaminase 2: A molecular Swiss army knife. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1823**, 406–419 (2012).
- 29. Phatak, V. M. *et al.* Expression of transglutaminase-2 isoforms in normal human tissues and cancer cell lines: Dysregulation of alternative splicing in cancer. *Amino Acids* **44**, 33–44 (2013).
- 30. Király, R., Demény, M. Á. & Fésüs, L. Protein transamidation by transglutaminase 2 in cells: A disputed Ca 2+-dependent action of a multifunctional protein. *FEBS J.* **278**, 4717–4739 (2011).
- Fraij, B. M., Birckbichler, P. J., Patterson, M. K., Lee, K. N. & Gonzales, R. a. A retinoic acid-inducible mRNA from human erythroleukemia cells encodes a novel tissue transglutaminase homologue. *J. Biol. Chem.* 267, 22616–22623 (1992).
- 32. Antonyak, M. a *et al.* Two isoforms of tissue transglutaminase mediate opposing cellular fates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18609–18614 (2006).
- 33. Singh, G., Zhang, J., Ma, Y., Cerione, R. A. & Antonyak, M. A. The different conformational states of tissue transglutaminase have opposing affects on cell viability. *J. Biol. Chem.* **291**, 9119–9132 (2016).
- 34. Lai, T.-S. & Greenberg, C. S. TGM2 and implications for human disease: role of alternative splicing Thung-S. Lai 1, 2, Charles S. Greenberg 11. *Front Biosci (Landmark Ed)* **18**, 504–19 (2013).
- 35. Fraij, B. M. GTP hydrolysis by human tissue transglutaminase homologue. Biochem.Biophys.Res.Commun. 218, 45–49 (1996).
- 36. Lai, T.-S., Liu, Y., Li, W. & Greenberg, C. S. Identification of two GTP-independent alternatively spliced forms of tissue transglutaminase in human leukocytes, vascular smooth muscle, and

endothelial cells. FASEB J. 21, 4131-4143 (2007).

- Feng, J. F., Gray, C. D. & Im, M. J. Alpha 1B-adrenoceptor interacts with multiple sites of transglutaminase II: characteristics of the interaction in binding and activation. *Biochemistry* 38, 2224–2232 (1999).
- Feng, J. F., Readon, M., Yadav, S. P. & Im, M. J. Calreticulin down-regulates both GTP binding and transglutaminase activities of transglutaminase II. *Biochemistry* 38, 10743–10749 (1999).
- 39. Vezza, R., Habib, A. & FitzGerald, G. a. Differential signaling by the thromboxane receptor isoforms via the novel GTP-binding protein, Gh. *J. Biol. Chem.* **274**, 12774–9 (1999).
- 40. Baek, K. J. *et al.* A 50 KDa protein modulates guanine nucleotide binding of transglutaminase II. *Biochemistry* **35**, 2651–7 (1996).
- Chen, S. *et al.* Alphal-adrenergic receptor signaling via Gh is subtype specific and independent of its transglutaminase activity. *J. Biol. Chem.* 271, 32385–32391 (1996).
- 42. Akimov, S. S., Krylov, D., Fleischmana, L. F. & Belkin, A. M. Tissue transglutaminase is an integrinbinding adhesion coreceptor for fibronectin. *J. Cell Biol.* **148**, 825–838 (2000).
- LeMosy, E. K. *et al.* Visualization of purified fibronectin-transglutaminase complexes. *J. Biol. Chem.* 267, 7880–7885 (1992).
- Janiak, A., Zemskov, E. A. & Belkin, A. M. Cell surface transglutaminase promotes RhoA activation via integrin clustering and suppression of the Src-p190RhoGAP signaling pathway. *Mol. Biol. Cell* 17, 1606–1619 (2006).
- 45. Belkin, A. M. *et al.* Transglutaminase-mediated oligomerization of the fibrin(ogen) αC domains promotes integrin-dependent cell adhesion and signaling. *Blood* **105**, 3561–3568 (2005).
- 46. Nishimichi, N. *et al.* Osteopontin undergoes polymerization in vivo and gains chemotactic activity for neutrophils mediated by integrin alpha9betal. *J. Biol. Chem.* **286**, 11170–11178 (2011).
- 47. Fésüs, L. & Szondy, Z. Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival. *FEBS Lett.* **579**, 3297–3302 (2005).
- 48. Mehta, K., Fok, J. Y. & Mangala, L. S. Tissue transglutaminase: from biological glue to cell survival cues. *Front. Biosci.* **11**, 173–185 (2006).
- 49. Milakovic, T., Tucholski, J., McCoy, E. & Johnson, G. V. W. Intracellular localization and activity state of tissue transglutaminase differentially impacts cell death. *J. Biol. Chem.* **279**, 8715–8722 (2004).
- 50. Caccamo, D., Currò, M., Ferlazzo, N., Condello, S. & Ientile, R. Monitoring of transglutaminase 2 under different oxidative stress conditions. *Amino Acids* **42**, 1037–1043 (2012).
- Nicholas, B., Smethurst, P., Verderio, E., Jones, R. & Griffin, M. Cross-linking of cellular proteins by tissue transglutaminase during necrotic cell death: a mechanism for maintaining tissue integrity. *Biochem. J.* 371, 413–422 (2003).
- 52. Boehm, J. E., Singh, U., Combs, C., Antonyak, M. A. & Cerione, R. A. Tissue transglutaminase protects against apoptosis by modifying the tumor suppressor protein pl10 Rb. *J. Biol. Chem.* 277, 20127–20130 (2002).
- Tóth, B. *et al.* Transglutaminase 2 Is Needed for the Formation of an Efficient Phagocyte Portal in Macrophages Engulfing Apoptotic Cells. *J. Immunol.* 182, 2084–2092 (2009).

- 54. De Laurenzi, V. & Melino, G. Gene Disruption of Tissue Transglutaminase. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 148–155 (2001).
- 55. Iismaa, S. E., Mearns, B. M., Lorand, L. & Graham, R. M. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol. Rev.* **89**, 991-1023 (2009).
- Szondy, Z., Korponay-Szabó, I., Király, R. & Fésüs, L. Transglutaminase 2 dysfunctions in the development of autoimmune disorders: celiac disease and TG2-/- mouse. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 78, 295–345 (2011).
- 57. Hanayama, R., Miyasaka, K., Nakaya, M. & Nagata, S. MFG-E8-dependent clearance of apoptotic cells, and autoimmunity caused by its failure. *Curr. Dir. Autoimmun.* **9**, 162–172 (2006).
- 58. Tóth, B. *et al.* Over-expression of integrin β3 can partially overcome the defect of integrin β3 signaling in transglutaminase 2 null macrophages. *Immunol. Lett.* **126**, 22–28 (2009).
- 59. Zemskov, E. A., Mikhailenko, I., Strickland, D. K. & Belkin, A. M. Cell-surface transglutaminase undergoes internalization and lysosomal degradation: an essential role for LRP1. *J. Cell Sci.* **120**, 3188–3199 (2007).
- Ientile, R., Caccamo, D. & Griffin, M. Tissue transglutaminase and the stress response. *Amino Acids* 33, 385–394 (2007).
- 61. Grosso, H. & Mouradian, M. M. Transglutaminase 2: Biology, relevance to neurodegenerative diseases and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* **133**, 392–410 (2012).
- 62. Dieterich, W. *et al.* Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat. Med.* **3**, 797–801 (1997).
- 63. Sulkanen, S. *et al.* Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* **115**, 1322–1328 (1998).
- 64. Dieterich, W. *et al.* Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology* **115**, 1317–1321 (1998).
- 65. D, S. *et al.* Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 1253–1257 (2000).
- 66. Calado, J. & Verdelho Machado, M. Celiac Disease Revisited. *GE Port. J. Gastroenterol.* **29**, 111-124 (2022).
- Meresse, B., Malamut, G. & Cerf-Bensussan, N. Celiac Disease: An Immunological Jigsaw. *Immunity* 36, 907–919 (2012).
- 68. Garrote, J. A., Gómez-González, E., Bernardo, D., Arranz, E. & Chirdo, F. Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **47 Suppl 1**, (2008).
- 69. Maglio, M. *et al.* Majority of children with type 1 diabetes produce and deposit anti-tissue transglutaminase antibodies in the small intestine. *Diabetes* **58**, 1578–1584 (2009).
- McAllister, B. P., Williams, E. & Clarke, K. A Comprehensive Review of Celiac Disease/Gluten-Sensitive Enteropathies. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 57, 226–243 (2019).
- 71. Fasano, A. & Catassi, C. Clinical practice. Celiac disease. N. Engl. J. Med. 367, 2419–26 (2012).
- 72. Kemppainen, T. et al. Osteoporosis in adult patients with celiac disease. Bone 24, 249–255 (1999).
- 73. Meloni, G. F., Dessole, S., Vargiu, N., Tomasi, P. A. & Musumeci, S. The prevalence of coeliac disease

in infertility. Hum. Reprod. 14, 2759-2761 (1999).

- 74. Ransford, R. A. J., Hayes, M., Palmer, M. & Hall, M. J. A controlled, prospective screening study of celiac disease presenting as iron deficiency anemia. *J. Clin. Gastroenterol.* **35**, 228–233 (2002).
- Lo, W., Sano, K., Lebwohl, B., Diamond, B. & Green, P. H. R. Changing presentation of adult celiac disease. *Dig. Dis. Sci.* 48, 395–398 (2003).
- 76. Murray, J. A. *et al.* Trends in the identification and clinical features of celiac disease in a North American community, 1950-2001. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 19–27 (2003).
- 77. Bardella, M. T. *et al.* Gluten intolerance: gender- and age-related differences in symptoms. *Scand. J. Gastroenterol.* **40**, 15–19 (2005).
- Soni, S. & Badawy, S. Z. Celiac disease and its effect on human reproduction: A review. J. Reprod. Med. Obstet. Gynecol. 55, 3–8 (2010).
- Saccone, G. *et al.* Celiac disease and obstetric complications: A systematic review and metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 214, 225–234 (2016).
- Mossman, H. W. Classics revisited: Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Placenta* 12, 1–5 (1991).
- Roberts, R. M., Green, J. A. & Schulz, L. C. The evolution of the placenta. *Reproduction* 152, R179– R189 (2016).
- Aplin, J. D., Myers, J. E., Timms, K. & Westwood, M. Tracking placental development in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 479–494 (2020).
- Mannelli, C., Ietta, F., Avanzati, A. M., Skarzynski, D. & Paulesu, L. Biological Tools to Study the Effects of Environmental Contaminants at the Feto-Maternal Interface. *Dose. Response.* 13, 1559325815611902 (2015).
- Norwitz, E. R., Schust, D. J. & Fisher, S. J. Implantation and the Survival of Early Pregnancy. N. Engl. J. Med. 345, 1400–1408 (2001).
- 85. Huppertz, B. The anatomy of the normal placenta. J. Clin. Pathol. 61, 1296–1302 (2008).
- Aplin, J. D. & Ruane, P. T. Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. J. Cell Sci. 130, 15–22 (2017).
- 87. Turco, M. Y. & Moffett, A. Development of the human placenta. Dev. 146, 1-14 (2019).
- Mor, G., Aldo, P. & Alvero, A. B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 469–482 (2017).
- 89. Bulmer, J. N., Morrison, L., Longfellow, M., Ritson, A. & Pace, D. Granulated lymphocytes in human endometrium: Histochemical and immunohistochemical studies. *Hum. Reprod.* **6**, 791–798 (1991).
- Hunt, J. S., Petroff, M. G. & Burnett, T. G. Uterine leukocytes: Key players in pregnancy. Semin. Cell Dev. Biol. 11, 127–137 (2000).
- 91. Aluvihare, V. R., Kallikourdis, M. & Betz, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* **5**, 266–271 (2004).
- 92. Terness, P. *et al.* Tolerance signaling molecules and pregnancy: IDO, galectins, and the renaissance of regulatory T cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **58**, 238–254 (2007).
- 93. Guerin, L. R., Prins, J. R. & Robertson, S. A. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum. Reprod. Update* **15**, 517–535 (2009).

- 94. Leber, A., Teles, A. & Zenclussen, A. C. Regulatory T Cells and Their Role in Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 445-459 (2010).
- 95. Saito, S., Nakashima, A., Shima, T. & Ito, M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 601–610 (2010).
- 96. Ramhorst, R. *et al.* Modulation and recruitment of inducible regulatory T cells by first trimester trophoblast cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **67**, 17–27 (2012).
- 97. Sceneay, J. *et al.* Primary tumor hypoxia recruits CDIIb+/Ly6Cmed/Ly6G+ immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Res.* **72**, 3906–3911 (2012).
- Melaiu, O., Lucarini, V., Cifaldi, L. & Fruci, D. Influence of the Tumor Microenvironment on NK Cell Function in Solid Tumors. *Front. Immunol.* 10, 3038 (2019).
- 99. Chambers, A. M. & Matosevic, S. Immunometabolic Dysfunction of Natural Killer Cells Mediated by the Hypoxia-CD73 Axis in Solid Tumors. *Front. Mol. Biosci.* **6**, 60 (2019).
- Chakraborty, D., Rumi, M. A. K. & Soares, M. J. NK cells, hypoxia and trophoblast cell differentiation. *Cell Cycle* 11, 2427–2430 (2012).
- 101. Vince, G. S., Starkey, P. M., Jackson, M. C., Sargent, I. L. & Redman, C. W. Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages. J. Immunol. Methods 132, 181–9 (1990).
- Houser, B. L. Decidual macrophages and their roles at the maternal-fetal interface. *Yale J. Biol. Med.*85, 105–118 (2012).
- 103. Vento-Tormo, R. *et al.* Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal interface in humans. *Nature* **563**, 347–353 (2018).
- Bulmer, J. N. & Johnson, P. M. Macrophage populations in the human placenta and amniochorion. *Clin. Exp. Immunol.* 57, 393–403 (1984).
- 105. Palma, A., Jarrah, A. S., Tieri, P., Cesareni, G. & Castiglione, F. Gene regulatory network modeling of macrophage differentiation corroborates the continuum hypothesis of polarization states. *Front. Physiol.* 9, 1–19 (2018).
- Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969 (2008).
- 107. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35 (2003).
- 108. Grasso, E. N. Mantenimiento de la homeostasis inmunológica desde la decidualización a la implantación: relevancia del sistema VIP/VPAC. (Universidad de Buenos Aires, 2016).
- 109. Svensson, J. *et al.* Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *J. Immunol.* **187**, 3671–3682 (2011).
- Mizuno, M., Aoki, K. & Kimbara, T. Functions of macrophages in human decidual tissue in early pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 31, 180–188 (1994).
- 111. Lidström, C. et al. Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua. Am. J. Reprod. Immunol. 50, 444–452 (2003).
- 112. Nagamatsu, T. & Schust, D. J. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 460–471 (2010).

- 113. Renaud, S. J. & Graham, C. H. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunol. Invest.* **37**, 535–564 (2008).
- 114. Li, C., Houser, B. L., Nicotra, M. L. & Strominger, J. L. HLA-G homodimer-induced cytokine secretion through HLA-G receptors on human decidual macrophages and natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5767–5772 (2009).
- 115. Ambarus, C. a. *et al.* Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J. Immunol. Methods* **375**, 196–206 (2012).
- 116. Jena, M. K., Nayak, N., Chen, K. & Nayak, N. R. Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 67, 295–309 (2019).
- Fest, S. *et al.* Trophoblast-macrophage interactions: A regulatory network for the protection of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 57, 55–66 (2007).
- Grasso, E. *et al.* Differential migration and activation profile of monocytes after trophoblast interaction. *PLoS One* 9, 1–10 (2014).
- Atay, S., Gercel-Taylor, C., Suttles, J., Mor, G. & Taylor, D. D. Trophoblast-derived exosomes mediate monocyte recruitment and differentiation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 65, 65–77 (2011).
- Aldo, P. B. *et al.* Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14+/CD16+ macrophages. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72, 270–284 (2014).
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A. & Locati, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* 229, 176–185 (2013).
- 122. Abumaree, M. H., Chamley, L. W., Badri, M. & El-Muzaini, M. F. Trophoblast debris modulates the expression of immune proteins in macrophages: A key to maternal tolerance of the fetal allograft? *J. Reprod. Immunol.* 94, 131–141 (2012).
- 123. Abrahams, V. M., Kim, Y. M., Straszewski, S. L., Romero, R. & Mor, G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **51**, 275–282 (2004).
- 124. Fesus, L. & Piacentini, M. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 27, 534–9 (2002).
- 125. Hager, H. *et al.* Developmental regulation of tissue transglutaminase during human placentation and expression in neoplastic trophoblast. *J. Pathol.* **181**, 106–110 (1997).
- 126. Fujimoto, M. *et al.* Requirement for transglutaminase in progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* **137**, 1096–1101 (1996).
- 127. Shibuya, H., Sakai, K., Kabir-Salmani, M., Wachi, Y. & Iwashita, M. Polymerization of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) potentiates IGF-I actions in placenta. *J. Cell. Physiol.* 226, 434–9 (2011).
- 128. Sóñora, C. *et al.* Tissue transglutaminase on trophoblast cells as a possible target of autoantibodies contributing to pregnancy complications in celiac patients. *Am. J. Reprod. Immunol.* **72**, 485–95 (2014).
- Robinson, N. J., Baker, P. N., Jones, C. J. P. & Aplin, J. D. A role for tissue transglutaminase in stabilization of membrane-cytoskeletal particles shed from the human placenta. *Biol. Reprod.* 77, 648–657 (2007).
- 130. Blanchon, L. et al. Human choriocarcinoma cell line JEG-3 produces and secretes active retinoids

from retinol. Mol. Hum. Reprod. 8, 485-493 (2002).

- Kabir-Salmani, M., Nikzad, H., Shiokawa, S., Akimoto, Y. & Iwashita, M. Secretory role for human uterodomes (pinopods): Secretion of LIF. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 553–559 (2005).
- Robinson, N. J., Glazier, J. D., Greenwood, S. L., Baker, P. N. & Aplin, J. D. Tissue transglutaminase expression and activity in placenta. *Placenta* 27, 148–157 (2006).
- Mincheva-Nilsson, L. & Baranov, V. Placenta-Derived Exosomes and Syncytiotrophoblast Microparticles and their Role in Human Reproduction: Immune Modulation for Pregnancy Success. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72, 440–457 (2014).
- 134. Piredda, L. *et al.* Lack of 'tissue' transglutaminase protein cross-linking leads to leakage of macromolecules from dying cells: relationship to development of autoimmunity in MRLIpr/Ipr mice. *Cell Death Differ.* 4, 463–472 (1997).
- 135. Sóñora, C. *et al.* Celiac disease and gyneco-obstetrics complications: can serum antibodies modulate tissue transglutaminase functions and contribute to clinical pattern? *Am. J. Reprod. Immunol.* 66, 476–87 (2011).
- 136. Sóñora, C. *et al.* Anti-tissue transglutaminase antibody inhibits apoptotic cell clearance by macrophages in pregnant NOD mice. *J. Reprod. Immunol.* **103**, 59–66 (2014).
- 137. Hadziselimovic, F., Geneto, R. & Buser, M. Celiac disease, pregnancy, small for gestational age: role of extravillous trophoblast. *Fetal Pediatr. Pathol.* **26**, 125–134 (2007).
- 138. Liu, C. *et al.* Tissue transglutaminase contributes to the pathogenesis of preeclampsia and stabilizes placental angiotensin receptor type 1 by ubiquitination-preventing isopeptide modification. *Hypertension* **63**, 353–361 (2014).
- Kuncio, G. S. *et al.* TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. *Am. J. Physiol.* 274, G240-5 (1998).
- 140. Lu, S., Saydak, M., Gentile, V., Stein, J. P. & Davies, P. J. Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem* vol. 270 9748–9756 (1995).
- Johnson, K., Hashimoto, S., Lotz, M., Pritzker, K. & Terkeltaub, R. Interleukin-1 induces promineralizing activity of cartilage tissue transglutaminase and factor XIIIa. *Am. J. Pathol.* 159, 149–163 (2001).
- 142. Lee, J. *et al.* Transglutaminase 2 induces nuclear factor-κB activation via a novel pathway in BV-2 microglia. *J. Biol. Chem.* **279**, 53725–53735 (2004).
- 143. Mann, A. P. *et al.* Overexpression of Tissue Transglutaminase Leads to Constitutive Activation of Nuclear Factor-κB in Cancer Cells: Delineation of a Novel Pathway. *Cancer Res.* 66, 8788–8795 (2006).
- 144. Kumar, S. & Mehta, K. Tissue Transglutaminase Constitutively Activates HIF-1α Promoter and Nuclear Factor-κB via a Non-Canonical Pathway. *PLoS One* **7**, (2012).
- 145. Straszewski-Chavez, S. L. *et al.* The Isolation and Characterization of a Novel Telomerase Immortalized First Trimester Trophoblast Cell Line, Swan 71. *Placenta* **30**, 939–948 (2009).
- Mastropietro, G., Tiscornia, I., Perelmuter, K., Astrada, S. & Bollati-fogolín, M. HT-29 and Caco-2
   Reporter Cell Lines for Functional Studies of Nuclear Factor Kappa B Activation. 2015, (2015).
- 147. Green, M.R., Sambrook, J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor Laboratory

Press, 2012).

- 148. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
- 149. Dumitriu, I. E. *et al.* 5,6-Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester-Labeled Apoptotic and Necrotic as Well as Detergent-Treated Cells Can Be Traced in Composite Cell Samples. *Anal. Biochem.* 299, 247–252 (2001).
- 150. Akimov, S. S. & Belkin, A. M. Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood* **98**, 1567–1576 (2001).
- 151. Murtaugh, M. P., Arend, W. P. & Davies, P. J. A. Induction of tissue transglutaminase in human peripheral blood monocytes. *J. Exp. Med.* **159**, 114–125 (1984).
- 152. Leroy, P., Berto, F., Bourget, I. & Rossi, B. Down-regulation of Hox A7 is required for cell adhesion and migration on fibronectin during early HL-60 monocytic differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 75, 680– 688 (2004).
- 153. Muszbek, L., Bereczky, Z., Bagoly, Z., Komáromi, I. & Katona, É. Factor XIII: A coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol. Rev.* **91**, 931–972 (2011).
- 154. Balajthy, Z. *et al.* Tissue-transglutaminase contributes to neutrophil granulocyte differentiation and functions. *Blood* **108**, 2045–2054 (2006).
- 155. Meresse, B., Ripoche, J., Heyman, M. & Cerf-Bensussan, N. Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol.* **2**, 8–23 (2009).
- 156. Anjum, N., Baker, P. N., Robinson, N. J. & Aplin, J. D. Maternal celiac disease autoantibodies bind directly to syncytiotrophoblast and inhibit placental tissue transglutaminase activity. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 16 (2009).
- 157. Di Simone, N. *et al.* Potential new mechanisms of placental damage in celiac disease: antitransglutaminase antibodies impair human endometrial angiogenesis. *Biol. Reprod.* **89**, 88 (2013).
- Burke, S. D., Dong, H., Hazan, A. D. & Croy, B. A. Aberrant endometrial features of pregnancy in diabetic NOD mice. *Diabetes* 56, 2919–2926 (2007).
- 159. Lin, Y. *et al.* CXCLI2 enhances exogenous CD4+CD25+ T cell migration and prevents embryo loss in non-obese diabetic mice. *Fertil. Steril.* **91**, 2687–2696 (2009).
- 160. Sblattero, D. *et al.* Characterization of the anti-tissue transglutaminase antibody response in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **174**, 5830–5836 (2005).
- 161. Green, P. H. R. & Cellier, C. Celiac disease. N. Engl. J. Med. 357, 1731-43 (2007).
- 162. Eckert, R. L. et al. Transglutaminase regulation of cell function. Physiol. Rev. 94, 383-417 (2014).
- Sestito, C. *et al.* Differential Expression of Tissue Transglutaminase Splice Variants in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Primary Progressive Multiple Sclerosis Patients. *Med. Sci.* 6, 108 (2018).
- 164. Zonca, S. *et al.* Tissue transglutaminase (TG2) enables survival of human malignant pleural mesothelioma cells in hypoxia. *Cell Death Dis.* **8**, 1–7 (2017).
- Sollid, L. M. & Jabri, B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 294–302 (2013).
- 166. Chrobok, N. L., Sestito, C., Wilhelmus, M. M. M., Drukarch, B. & van Dam, A. M. Is monocyte- and macrophage-derived tissue transglutaminase involved in inflammatory processes? *Amino Acids* **49**,

441-452 (2017).

- 167. Lee, J. et al. Transglutaminase 2 Induces Nuclear Factor-κB Activation via a Novel Pathway in BV-2 Microglia. J. Biol. Chem. 279, 53725–53735 (2004).
- 168. Park, K.-S. Increase in transglutaminase 2 expression is associated with NF-kappaB activation in breast cancer tissues. *Front. Biosci.* Volume, 1945 (2009).
- Beltagy, A. *et al.* Anti-phospholipid antibodies and reproductive failures. *Am. J. Reprod. Immunol.* 85, (2021).
- 170. Ruiz-Irastorza, G., Crowther, M., Branch, W. & Khamashta, M. A. Antiphospholipid syndrome. *Lancet (London, England)* **376**, 1498–1509 (2010).
- 171. Xie, H., Sheng, L., Zhou, H. & Yan, J. The role of TLR4 in pathophysiology of antiphospholipid syndrome-associated thrombosis and pregnancy morbidity. *Br. J. Haematol.* **164**, 165–176 (2014).
- 172. Willis, R. & Pierangeli, S. S. Pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Auto-Immun. highlights* **2**, 35–52 (2011).
- 173. Sorice, M. *et al.* Anti-β2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor α and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts. *Arthritis Rheum.* **56**, 2687–2697 (2007).
- 174. Arbildi, P. *et al.* β2GPI-specific antibodies induce pro-inflammatory mediators and tissue transglutaminase differential variant expression on trophoblast cells and monocytes-macrophages. *Placenta* **51**, 111 (2017).
- 175. Arbildi, P. et al. β2GPI-specific antibodies induce pro-inflammatory mediators and tissue transglutaminase differential variant expression on trophoblast cells and monocytes-macrophages. *Placenta* **51**, 111 (2017).
- 176. Monsonego, A. *et al.* Expression of GTP-dependent and GTP-independent tissue-type transglutaminase in cytokine-treated rat brain astrocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 3724–32 (1997).
- 177. Citron, B. a., SantaCruz, K. S., Davies, P. J. a & Festoff, B. W. Intron-Exon Swapping of Transglutaminase mRNA and Neuronal Tau Aggregation in Alzheimer's Disease. J. Biol. Chem. 276, 3295–3301 (2001).
- 178. Citron, B. a. *et al.* Protein crosslinking, tissue transglutaminase, alternative splicing and neurodegeneration. *Neurochem. Int.* **40**, 69–78 (2002).
- 179. Nourshargh, S. & Alon, R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 41, 694–707 (2014).
- Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455 (2013).
- Locati, M., Curtale, G. & Mantovani, A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 15, 123–147 (2020).
- 182. Murray, P. J. Macrophage Polarization. Annu. Rev. Physiol. 79, 541–566 (2017).
- Martinez, F. O., Helming, L. & Gordon, S. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–483 (2009).
- 184. Tedesco, S. *et al.* Convenience versus biological significance: Are PMA-differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying in vitro polarization? *Front. Pharmacol.* 9, 1–13 (2018).

- Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. cancer* 26, 171–176 (1980).
- 186. Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifacetted model for the study of monocytemacrophage differentiation. *Experientia* **47**, 22–31 (1991).
- 187. Chanput, W., Mes, J. J. & Wichers, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* **23**, 37–45 (2014).
- 188. Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A. & Donnelly, S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. J. Immunol. Methods 430, 64–70 (2016).
- 189. Shapouri-Moghaddam, A. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440 (2018).
- Sun, H. & Kaartinen, M. T. Transglutaminases in Monocytes and Macrophages. *Med. Sci. (Basel, Switzerland)* 6, 1–18 (2018).
- Mehta, K. & Lopez-Berestein, G. Expression of Tissue Transglutaminase in Cultured Monocytic Leukemia (THP-1) Cells during Differentiation. *Cancer Res.* 46, 1388–1394 (1986).
- 192. Hodrea, J. *et al.* Transglutaminase 2 is expressed and active on the surface of human monocytederived dendritic cells and macrophages. *Immunol. Lett.* **130**, 74–81 (2010).
- 193. Kohro, T. *et al.* A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate
  13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J. Atheroscler. Thromb.* 11, 88–97 (2004).
- 194. Mirza, A. *et al.* A role for tissue transglutaminase in hepatic injury and fibrogenesis, and its regulation by NF-kappaB. *Am. J. Physiol.* **272**, (1997).
- 195. Mehta, K., Lopez-Berestein, G., Moore, W. T. & Davies, P. J. Interferon-gamma requires serum retinoids to promote the expression of tissue transglutaminase in cultured human blood monocytes. *J. Immunol.* 134, 2053–6 (1985).
- 196. Currò, M. *et al.* Transglutaminase 2 and phospholipase A2 interactions in the inflammatory response in human Thp-1 monocytes. *Amino Acids* **46**, 759–766 (2014).
- 197. Currò, M. *et al.* Transglutaminase 2 is involved in amyloid-betal-42-induced pro-inflammatory activation via API/JNK signalling pathways in THP-1 monocytes. *Amino Acids* **49**, 659–669 (2017).
- 198. Purcu, D. U. *et al.* Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. *PLoS One* **17**, 1–14 (2022).
- 199. Sestito, C. *et al.* Monocyte-derived tissue transglutaminase in multiple sclerosis patients: Reflecting an anti-inflammatory status and function of the cells? *J. Neuroinflammation* **14**, 1–12 (2017).
- 200. Martinez, F. O. *et al.* Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: Similarities and differences. *Blood* **121**, 57–70 (2013).
- 201. Gratchev, A., Kzhyshkowska, J., Utikal, J. & Goerdt, S. Interleukin-4 and Dexamethasone Counterregulate Extracellular Matrix Remodelling and Phagocytosis in Type-2 Macrophages.
- 202. Rose, D. M., Sydlaske, A. D., Agha-Babakhani, A., Johnson, K. & Terkeltaub, R. Transglutaminase 2 limits murine peritoneal acute gout-like inflammation by regulating macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Arthritis Rheum.* **54**, 3363–3371 (2006).

- 203. Blencowe, B. J. Alternative Splicing: New Insights from Global Analyses. Cell 126, 37–47 (2006).
- 204. Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B. & Dockrell, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **5**, (2010).
- 205. Browne, E., Kavanagh, S. & Devery, S. The Cytotoxicity of Phorbol 12- Myristate 13-Acetate and Lipopolysaccharide on THP-1 Cells and an Optimized Differentiation Protocol. *Med. Sci. Forum* 2022, Vol. 11, Page 5 11, 5 (2022).
- 206. Stossi, F., Madak-Erdoğan, Z. & Katzenellenbogen, B. S. Macrophage-elicited loss of estrogen receptor-α in breast cancer cells via involvement of MAPK and c-Jun at the ESRI genomic locus. Oncogene 31, 1825–1834 (2012).
- 207. Park, E. K. *et al.* Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm. Res.* **56**, 45–50 (2007).
- 208. Festoff, B. W. *et al.* Injury-induced 'switch' from GTP-regulated to novel GTP-independent isoform of tissue transglutaminase in the rat spinal cord. *J. Neurochem.* **81**, 708–718 (2002).
- 209. Shiratori, H. *et al.* THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol. Immunol.* **88**, 58–68 (2017).
- 210. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6, (2014).
- 211. Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M. & Mantovani, A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. J. Immunol. 177, 7303–7311 (2006).
- Roszer, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015, (2015).
- 213. Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
- 214. Xue, J. *et al.* Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* **40**, 274–288 (2014).
- 215. Arbildi, P., Sóñora, C., Del Río, N., Marqués, J. M. & Hernández, A. Alternative RNA splicing of leucocyte tissue transglutaminase in coeliac disease. *Scand. J. Immunol.* (2018) doi:10.1111/sji.12659.
- 216. Yamaguchi, M., Zacharia, J., Laidlaw, T. M. & Balestrieri, B. PLA2G5 regulates transglutaminase activity of human IL-4-activated M2 macrophages through PGE2 generation. J. Leukoc. Biol. 100, 131–41 (2016).
- 217. Martinez, F. O. *et al.* Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: Similarities and differences. *Blood* **121**, 57–70 (2013).
- 218. Sestito, C. *et al.* Tissue Transglutaminase contributes to myelin phagocytosis in interleukin-4-treated human monocyte-derived macrophages. *Cytokine* **128**, 155024 (2020).
- 219. Li, P. *et al.* Proteomic characterization of four subtypes of M2 macrophages derived from human THP-1 cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 23, 407–422 (2022).
- 220. Wheaton, W. W. & Chandel, N. S. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **300**, (2011).

- 221. Schanne, F. A. X., Kane, A. B., Young, E. E. & Farber, J. L. Calcium Dependence of Toxic Cell Death: A Final Common Pathway. *Science (80-. ).* **206**, 700–702 (1979).
- 222. Russo, M. A., Cittadini, A., Dani, A. M., Inesi, G. & Terranova, T. An ultrastructural study of calcium induced degenerative changes in dissociated heart cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **13**, 265–279 (1981).
- 223. Yang, D., Han, Z. & Oppenheim, J. J. Alarmins and immunity. Immunol. Rev. 280, 41–56 (2017).
- 224. Liu, C., Kellems, R. E. & Xia, Y. Inflammation, autoimmunity, and hypertension: The essential role of tissue transglutaminase. *Am. J. Hypertens.* **30**, 756–764 (2017).
- 225. Semenza, G. L. Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factors, and Disease Pathophysiology. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104720 9, 47–71 (2014).
- 226. Tafani, M. *et al.* Hypoxia-increased RAGE and P2X7R expression regulates tumor cell invasion through phosphorylation of Erk1/2 and Akt and nuclear translocation of NF-κB. *Carcinogenesis* **32**, 1167–1175 (2011).
- 227. Sandholm, J. *et al.* Hypoxia regulates Toll-like receptor-9 expression and invasive function in human brain cancer cells in vitro. *Oncol. Lett.* **8**, 266–274 (2014).
- 228. Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 617–626 (2005).
- Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 343–354 (2004).
- Schofield & Zhang. 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases and Related Enzymes. *Curr. Opin. i* 722– 731 (1999).
- Ivan, M. & Kaelin, W. G. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 27–34 (2001).
- 232. Kamura, T. *et al.* Activation of HIFlα ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10430–10435 (2000).
- 233. Jaakkola, P. *et al.* Targeting of HIF-α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* (80-. ). **292**, 468–472 (2001).
- 234. Hirsilä, M., Koivunen, P., Günzler, V., Kivirikko, K. I. & Myllyharju, J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 278, 30772–30780 (2003).
- 235. Muñoz-Sánchez, J. & Chánez-Cárdenas, M. E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J. Appl. Toxicol.* **39**, 556–570 (2019).
- 236. Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, 1–14 (2009).
- 237. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, (2017).
- 238. Torchinsky, A. & Toder, V. To die or not to die: the function of the transcription factor NF-kappaB in embryos exposed to stress. *Am. J. Reprod. Immunol.* **51**, 138–143 (2004).
- Zhou, A., Scoggin, S., Gaynor, R. B. & Williams, N. S. Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* 22, 2054–2064 (2003).

- 240. Cummins, E. P., Comerford, K. M., Scholz, C., Bruning, U. & Taylor, C. T. Hypoxic Regulation of NFκB Signaling. *Methods Enzymol.* **435**, 479–492 (2007).
- 241. Huber, M. A., Beug, H. & Wirth, T. Epithelial-mesenchymal transition: NF-kappaB takes center stage. *Cell Cycle* **3**, 1477–1480 (2004).
- 242. Taylor, C. T. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-κB in hypoxic inflammation. *J. Physiol.* **586**, 4055–4059 (2008).
- 243. Knöfler, M. *et al.* Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 3479–3496 (2019).
- 244. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, 1–10 (2009).
- 245. Dorrington, M. G. & Fraser, I. D. C. NF-κB Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
- 246. Kim, K. S., Rajagopal, V., Gonsalves, C., Johnson, C. & Kalra, V. K. A Novel Role of Hypoxia-Inducible Factor in Cobalt Chloride- and Hypoxia-Mediated Expression of IL-8 Chemokine in Human Endothelial Cells. J. Immunol. 177, 7211–7224 (2006).
- 247. Kong, T., Westerman, K. A., Faigle, M., Eltzschig, H. K. & Colgan, S. P. HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB J.* **20**, 2242–2250 (2006).
- 248. Zhou, J. & Brune, B. Cytokines and Hormones in the Regulation of Hypoxia Inducible Factor-1α (HIF-1α). *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **4**, 189–197 (2008).
- 249. D'ignazio, L. & Rocha, S. Hypoxia induced NF-kB. Cells 5, 1-8 (2016).
- 250. Cummins, E. P. *et al.* Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IκB kinase-β, giving insight into hypoxia-induced NFκB activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18154–18159 (2006).
- 251. Xie, X. *et al.* Over-expression of prolyl hydroxylase-1 blocks NF-κB-mediated cyclin DI expression and proliferation in lung carcinoma cells. *Cancer Genet.* **207**, 188–194 (2014).
- 252. Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J. W. & Fisher, S. J. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277, 1669–1672 (1997).
- 253. Armistead, B., Kadam, L., Drewlo, S. & Kohan-Ghadr, H. R. The role of NFκB in healthy and preeclamptic placenta: Trophoblasts in the spotlight. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
- 254. Lum, D. H., Kuwabara, P. E., Zarkower, D. & Spence, A. M. Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev.* 14, 3153–3165 (2000).
- 255. D'Ignazio, L., Bandarra, D. & Rocha, S. NF-κB and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J.* **283**, 413–424 (2016).
- 256. Jauniaux, E. *et al.* Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: A possible factor in human early pregnancy failure. *Am. J. Pathol.* **157**, 2111–2122 (2000).
- 257. Caniggia, I., Winter, J., Lye, S. J. & Post, M. Oxygen and placental development during the first trimester: Implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* **21**, 25–30 (2000).
- 258. Sakowicz, A. The role of NFκB in the three stages of pregnancy implantation, maintenance, and labour: a review article. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **125**, 1379–1387 (2018).
- 259. Chang, C. W., Wakeland, A. K. & Parast, M. M. Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension. *J. Endocrinol.* **236**, R43–R56 (2018).

- 260. Wakeland, A. K. *et al.* Hypoxia Directs Human Extravillous Trophoblast Differentiation in a Hypoxia-Inducible Factor–Dependent Manner. *Am. J. Pathol.* **187**, 767–780 (2017).
- 261. Liu, J., Lv, S. S., Fu, Z. Y. & Hou, L. L. Baicalein Enhances Migration and Invasion of Extravillous Trophoblasts via Activation of the NF-κB Pathway. *Med. Sci. Monit.* 24, 2983–2991 (2018).
- Tabruyn, S. P. & Griffioen, A. W. NF-kappa B: a new player in angiostatic therapy. *Angiogenesis* 11, 101–106 (2008).
- 263. Hiden, U. *et al.* Expression of matrix metalloproteinase 12 is highly specific for non-proliferating invasive trophoblasts in the first trimester and temporally regulated by oxygen-dependent mechanisms including HIF-1A. *Histochem. Cell Biol.* **149**, 31–42 (2018).
- 264. Cross, J. C., Werb, Z. & Fisher, S. J. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science (80-. ).* 266, 1508–1518 (1994).
- 265. Cowden Dahl, K. D., Robertson, S. E., Weaver, V. M. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factor regulates alphavbeta3 integrin cell surface expression. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1901–1912 (2005).
- 266. Wich, C., Kausler, S., Dotsch, J., Rascher, W. & Knerr, I. Syncytin-1 and glial cells missing a: hypoxiainduced deregulated gene expression along with disordered cell fusion in primary term human trophoblasts. *Gynecol. Obstet. Invest.* 68, 9–18 (2009).
- 267. Mao, J., Zheng, Q. & Jin, L. Physiological function of the dynamic oxygen signaling pathway at the maternal-fetal interface. *J. Reprod. Immunol.* **151**, 103626 (2022).
- Pavlacky, J. & Polak, J. Technical Feasibility and Physiological Relevance of Hypoxic Cell Culture Models. Front. Endocrinol. (Lausanne). 11, (2020).
- 269. Mole, D. R. *et al.* 2-Oxoglutarate analogue inhibitors of HIF prolyl hydroxylase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **13**, 2677–2680 (2003).
- 270. Kaczmarek, M. *et al.* Metal Ions-Stimulated Iron Oxidation in Hydroxylases Facilitates Stabilization of HIF-1α Protein. *Toxicol. Sci.* **107**, 394 (2009).
- Harvey, A. J. *et al.* Effect of the oxidative phosphorylation uncoupler 2,4-dinitrophenol on hypoxiainducible factor-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 665–673 (2005).
- 272. Davidson, T., Chen, H., Garrick, M. D., D'Angelo, G. & Costa, M. Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis. *Mol. Cell. Biochem.* **279**, 157–162 (2005).
- 273. Davidson, T. L., Chen, H., Di Toro, D. M., D'Angelo, G. & Costa, M. Soluble nickel inhibits HIFprolyl-hydroxylases creating persistent hypoxic signaling in A549 cells. *Mol. Carcinog.* 45, 479–489 (2006).
- 274. Salnikow, K. *et al.* Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J. Biol. Chem.* **279**, 40337–40344 (2004).
- 275. Goldberg, M. A., Dunning, S. P. & Bunn, H. F. Regulation of the erythropoietin gene: Evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science (80-. ).* **242**, 1412–1418 (1988).
- 276. Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T. & Millhorn, D. E. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-α. *J. Biol. Chem.* 278, 15911–15916 (2003).
- 277. Kanaya, K., Tsai, A. L., Kamitani, T. & Kamitani, T. Cobalt- and nickel-binding property of cullin-2.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 290, 294-299 (2002).

- Szpilbarg, N. *et al.* Oxygen regulation of aquaporin-4 in human placenta. *Reprod. Biomed. Online* 37, 601–612 (2018).
- 279. Abán, C. *et al.* Endocannabinoids participate in placental apoptosis induced by hypoxia inducible factor-1. *Apoptosis* **21**, 1094–1105 (2016).
- Castro-Parodi, M. *et al.* Oxygen tension modulates AQP9 expression in human placenta. *Placenta* 34, 690–698 (2013).
- 281. Liu, J., Yao, L. & Wang, Y. Resveratrol alleviates preeclampsia-like symptoms in rats through a mechanism involving the miR-363-3p/PEDF/VEGF axis. *Microvasc. Res.* **146**, (2023).
- 282. Anton, L., Olarerin-george, A. O., Hogenesch, J. B. & Elovitz, M. a. Placental Expression of miR-517a
  / b and miR- 517c Contributes to Trophoblast Dysfunction and Preeclampsia. 1–18 (2015) doi:10.1371/journal.pone.0122707.
- Xu, J. *et al.* Vitamin D Reduces Oxidative Stress-Induced Procaspase-3/ROCK1 Activation and MP Release by Placental Trophoblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, 2100–2110 (2017).
- 284. Oh, S. young *et al.* Autophagy regulates trophoblast invasion by targeting NF-κB activity. *Sci. Rep.* 10, 1–10 (2020).
- 285. Yamanaka-Tatematsu, M. *et al.* Autophagy induced by HIFlα overexpression supports trophoblast invasion by supplying cellular energy. *PLoS One* **8**, (2013).
- 286. Dai, H. & Lu, X. MGST1 alleviates the oxidative stress of trophoblast cells induced by hypoxia/reoxygenation and promotes cell proliferation, migration, and invasion by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Open Med. (Warsaw, Poland)* **17**, 2062–2071 (2022).
- 287. Knyazev, E. N., Paul, S. Y. & Tonevitsky, A. G. Chemical Induction of Trophoblast Hypoxia by Cobalt Chloride Leads to Increased Expression of DDIT3. *Dokl. Biochem. Biophys.* **499**, 251–256 (2021).
- 288. Zhang, Y. *et al.* Hypoxia-induced and HIF1α-VEGF-mediated tight junction dysfunction in choriocarcinoma cells: Implications for preeclampsia. *Clin. Chim. Acta* **489**, 203–211 (2019).
- 289. Grosfeld, A. et al. Transcriptional eject of hypoxia on placental leptin. doi:10.1016/S0014-5793.
- 290. Shirasuna, K. *et al.* Moderate hypoxia down-regulates interleukin-6 secretion and TLR4 expression in human Sw.71 placental cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **36**, 2149–2160 (2015).
- 291. Lison, D., De Boeck, M., Verougstraete, V. & Kirsch-Volders, M. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup. Environ. Med.* **58**, 619–625 (2001).
- 292. Mahey, S. *et al.* Effect of cobalt(II) chloride hexahydrate on some human cancer cell lines. *Springerplus* **5**, (2016).
- 293. Battaglia, V. *et al.* Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocyte primary cultures. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 586–594 (2009).
- 294. Kameda, T. *et al.* Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta* **11**, 205–213 (1990).
- 295. Paulesu, L. *et al.* Immunohistochemical localization of IL-1α and IL-1β in normal human placenta. *Lymphokine Cytokine Res.* **10**, 443–448 (1991).
- 296. Sharkey, A. M., Charnock-Jones, D. S., Boocock, C. A., Brown, K. D. & Smith, S. K. Expression of

mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J. Reprod. Fertil.* **99**, 609–615 (1993).

- 297. Shore, V. H. *et al.* Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* **18**, 657–665 (1997).
- 298. Librach, C. L. *et al.* Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J. Biol. Chem.* **269**, 17125–17131 (1994).
- 299. Meisser, A., Cameo, P., Islami, D., Campana, A. & Bischof, P. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol. Hum. Reprod.* **5**, 1055–1058 (1999).
- 300. Hanna, N. *et al.* Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J. Immunol.* **164**, 5721–5728 (2000).
- 301. Lombardelli, L. *et al.* At Embryo Implantation Site IL-35 Secreted by Trophoblast, Polarizing T Cells towards IL-35+ IL-10+ IL-4+ Th2-Type Cells, Could Favour Fetal Allograft Tolerance and Pregnancy Success. *Int. J. Mol. Sci.* 23, (2022).
- 302. Dubinsky, V. *et al.* Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63, 193–199 (2010).
- Vilotić, A. *et al.* IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. *Int. J. Mol. Sci.* 23, (2022).
- 304. Lockwood, C. J. *et al.* Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. *Am. J. Pathol.* **172**, 1571–1579 (2008).
- 305. Aggarwal, R. *et al.* Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. *J. Clin. Lab. Anal.* **33**, (2019).
- 306. Benyo, D. F., Miles, T. M. & Conrad, K. P. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 1582–1588 (1997).
- 307. Geldenhuys, J., Rossouw, T. M., Lombaard, H. A., Ehlers, M. M. & Kock, M. M. Disruption in the Regulation of Immune Responses in the Placental Subtype of Preeclampsia. *Front. Immunol.* 9, (2018).
- 308. Bellos, I., Karageorgiou, V., Kapnias, D., Karamanli, K. E. & Siristatidis, C. The role of interleukins in preeclampsia: A comprehensive review. *Am. J. Reprod. Immunol.* 80, (2018).
- Jovanović, M. & Vićovac, L. Interleukin-6 Stimulates Cell Migration, Invasion and Integrin Expression in HTR-8/SVneo Cell Line. *Placenta* 30, 320–328 (2009).
- 310. Onogi, A. *et al.* Hypoxia inhibits invasion of extravillous trophoblast cells through reduction of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation in the early first trimester of human pregnancy. *Placenta* 32, 665–670 (2011).
- 311. Zhao, H., Jiang, Y., Cao, Q., Hou, Y. & Wang, C. Role of integrin switch and transforming growth factor beta 3 in hypoxia-induced invasion inhibition of human extravillous trophoblast cells. *Biol. Reprod.* 87, 1–7 (2012).
- 312. Farrell, A. *et al.* Faulty oxygen sensing disrupts angiomotin function in trophoblast cell migration and predisposes to preeclampsia Graphical abstract Find the latest version : Faulty oxygen sensing disrupts angiomotin function in trophoblast cell migration and predisposes. *JCI insight* **4**, e127009 (2019).

- 313. Ahn, J. S. *et al.* Tissue transglutaminase-induced down-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 743–747 (2008).
- 314. Belkin, A. M. *et al.* Cell-surface-associated tissue transglutaminase is a target of MMP-2 proteolysis. *Biochemistry* **43**, 11760–11769 (2004).
- 315. Satpathy, M., Shao, M., Emerson, R., Donner, D. B. & Matei, D. Tissue transglutaminase regulates matrix metalloproteinase-2 in ovarian cancer by modulating cAMP-response element-binding protein activity. *J. Biol. Chem.* **284**, 15390–15399 (2009).
- 316. Beninati, S., Facchiano, F. & Piacentini, M. Transglutaminases: Future perspectives. *Amino Acids* 44, 1–9 (2013).
- 317. Adamczyk, M., Griffiths, R., Dewitt, S., Knäuper, V. & Aeschlimann, D. P2X7 receptor activation regulates rapid unconventional export of transglutaminase-2. *J. Cell Sci.* **128**, 4615–4628 (2015).
- 318. Upchurch, H. F., Conway, E., Patterson, M. K. & Maxwell, M. D. Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: Characteristics of the matrix bound enzyme. *J. Cell. Physiol.* **149**, 375–382 (1991).
- 319. Martinez, J., Chalupowicz, D. G., Roush, R. K., Sheth, A. & Barsigian, C. Transglutaminase-mediated processing of fibronectin by endothelial cell monolayers. *Biochemistry* **33**, 2538–2545 (1994).
- 320. Kuo, T. F., Tatsukawa, H. & Kojima, S. New insights into the functions and localization of nuclear transglutaminase 2. *FEBS J.* **278**, 4756–4767 (2011).
- 321. Hang, J., Zemskov, E. A., Lorand, L. & Belkin, A. M. Identification of a novel recognition sequence for fibronectin within the NH2-terminal β-sandwich domain of tissue transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 280, 23675–23683 (2005).
- 322. Cardoso, I. *et al.* Dissecting the interaction between transglutaminase 2 and fibronectin. *Amino Acids* **49**, 489–500 (2017).
- 323. Al-ofi, E., Coffelt, S. B. & Anumba, D. O. Monocyte Subpopulations from Pre-Eclamptic Patients Are Abnormally Skewed and Exhibit Exaggerated Responses to Toll-Like Receptor Ligands. *PLoS One* 7, e42217 (2012).
- 324. Schonkeren, D. *et al.* Differential distribution and phenotype of decidual macrophages in preeclamptic versus control pregnancies. *Am. J. Pathol.* **178**, 709–717 (2011).
- 325. Ning, F., Liu, H. & Lash, G. E. The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **75**, 298–309 (2016).
- 326. McIntire, R. H., Ganacias, K. G. & Hunt, J. S. Programming of human monocytes by the uteroplacental environment. *Reprod. Sci.* **15**, 437–447 (2008).
- 327. Zhang, Z. *et al.* HIF-lα affects trophoblastic apoptosis involved in the onset of preeclampsia by regulating FOXO3a under hypoxic conditions. *Mol. Med. Rep.* **21**, 2484–2492 (2020).
- 328. Arbildi, P. *et al.* Hypoxia and inflammation conditions differentially affect the expression of tissue transglutaminase spliced variants and functional properties of extravillous trophoblast cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **87**, 1–13 (2022).
- 329. Zhang, Y.-H. *et al.* Trophoblast-secreted soluble-PD-L1 modulates macrophage polarization and function. *J. Leukoc. Biol.* **108**, 983–998 (2020).
- 330. Grasso, E. et al. Trophoblast cells primed with vasoactive intestinal peptide enhance monocyte

migration and apoptotic cell clearance through  $\alpha v\beta 3$  integrin portal formation in a model of maternal-placental interaction. *Mol. Hum. Reprod.* **21**, 930–941 (2015).

- 331. Renaud, S. J. *et al.* Activated macrophages inhibit human cytotrophoblast invasiveness in vitro. *Biol. Reprod.* **73**, 237–243 (2005).
- 332. Heikkinen, J., Möttönen, M., Komi, J., Alanen, A. & Lassila, O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **B1**, 498 (2003).
- 333. Reister, F. *et al.* Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab. Invest.* **81**, 1143–1152 (2001).
- 334. Mor, G. & Abrahams, V. M. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, (2003).
- 335. Huppertz, B., Tews, D. S. & Kaufmann, P. Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. *Int. Rev. Cytol.* **205**, 215–253 (2001).
- Gregory, C. D. CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. *Curr.* Opin. Immunol. 12, 27–34 (2000).
- 337. Rodrigues, R., Grosso, A. R. & Moita, L. Genome-Wide Analysis of Alternative Splicing during Dendritic Cell Response to a Bacterial Challenge. *PLoS One* 8, e61975 (2013).
- 338. Novogrodsky, A., Quittner, S., Rubin, A. L. & Stenzel, K. H. Transglutaminase activity in human lymphocytes: early activation by phytomitogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 1157–1161 (1978).
- 339. Fraij, B. M. & Gonzales, R. A. A third human tissue transglutaminase homologue as a result of alternative gene transcripts. *Biochim. Biophys. Acta* **1306**, 63–74 (1996).
- 340. Fraij, B. M. Induction and translocation of tissue transglutaminase isoforms increased phosphorylation in retinoic acid treated erythroleukemia cells. *Protein J.* **32**, 426–434 (2013).
- Brown, K. D. Transglutaminase 2 and NF-κB: An odd couple that shapes breast cancer phenotype.
   Breast Cancer Res. Treat. 137, 329–336 (2013).
- 342. Kumar, S. & Mehta, K. Tissue Transglutaminase Constitutively Activates HIF-1?? Promoter and Nuclear Factor-??B via a Non-Canonical Pathway. *PLoS One* 7, (2012).
- 343. Wang, Z. & Griffin, M. The Role of TG2 in Regulating SI00A4-Mediated Mammary Tumour Cell Migration. PLoS One 8, (2013).
- 344. Wang, B. *et al.* eEF-2K knockdown synergizes with STS treatment to inhibit cell proliferation, migration, and invasion via the TG2/ERK pathway in A549 cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **36**, (2022).