

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A transzglutamináz 2 szerepe
az akut promielocitás leukémia sejtek *all-trans* retinsav indukálta neutrofil
granulocita irányú differenciációjában**

Csomós Krisztián

Témavezető: Dr. Balajthy Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia
Doktori Iskola

Debrecen, 2010

Témavezető:

Dr. Balajthy Zoltán, Ph. D.

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A szigorlati bizottság tagjai:

A bizottság elnöke:

Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

Bizottsági tagok:

Dr. Széll Márta, Ph.D.

Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

A védési bizottság tagjai:

A bizottság elnöke:

Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

Opponensek:

Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

Dr. Sipeki Szabolcs, Ph. D.

Bizottsági tagok:

Dr. Széll Márta, Ph.D.

Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

A védés helye és ideje:

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum,

I. Belgyógyászati Klinika tanterme

2010. december 16. 13 óra

BEVEZETÉS

Transzglutamináz 2

A transzglutamináz 2 (TG2) egy tiol- és Ca^{2+} - függő aciltranszferáz, amely bizonyos fehérjék peptid kötött glutamin oldalláncok γ -glutamil csoportja és lizin oldalláncok ϵ -lizil csoportja közötti kovalens keresztkötés kialakítását katalizálja. A reakció a két szubsztrát fehérje között a γ -glutamil- ϵ -lizil keresztkötés létrejöttével egy kovalens poszttranszlációs módosítást eredményez. A TG2 687 aminosavból áll, amelyek négy különböző domént alkotnak: az N-terminális β -szendvicset, a katalitikus magot és a két C-terminális β -hordó domént. A katalitikus mag domén hordozza a kalciumfüggő aciltranszfer reakció katalitikus triádját (Cys277-His335-Asp358), és ugyanez felelős a protein diszulfid izomeráz, ATPáz valamint a protein kináz aktivitásokért. A mag domén szintén hordozza a Bcl-2 fehérjecsaládra jellemző BH3 motívumot, és a feltételezett magi lokalizációs szignál (NLS1) egyikét. Ezek alapján a TG2 feltételezhetően kölcsönhat a pro-apoptotikus Bax fehérjével, így érzékenyítheti a sejtet az apoptózisra; valamint az importin- $\alpha 3$ által bejuthat a sejtmagba, ahol a génexpresszió szabályozásában szerepet játszó fehérjéket módosíthat (pl.: hisztonok, retinoblasztoma). Az első β -hordó domén felelős a TG2 GDP/GTP kötéseért. A májban a TG2 G-fehérjeként képes működni, az $\alpha 1$ -adrenerg receptorhoz kapcsolódik, aktiválja a foszfolipáz C-t (PLC $\delta 1$), ezáltal részt vesz a szignál transzdukcióban. Ellentétben a nyitott kalcium kötött formától, a GDP kötött enzim zárt konformációt vesz fel. A GTPáz és aciltranszferáz aktivitású formák közötti átmenet tehát az egész fehérje szerkezetére kiterjedő, radikális konformáció változáson keresztül valósul meg. A második β -hordó domén hordozza a második magi lokalizációs szignált (LNS2), és a foszfolipáz C-vel történő interakcióért felelős rész is ennek a doménnek a C-terminális végén foglal helyet.

Vannak olyan sejtek és szövetek, amelyek konstitutívan expresszálják a TG2-t (pl.: mezengióalis vagy intersticiális sejtek, tímusz epitélsejtek, a vastagbél fibroblasztjai), míg másokban vagy külső stimulus hatására indukálódik (pl.: női emlő epitéliuma), vagy azok differenciációjával/érésével jelenik meg (pl.: fejlődő nefronokban, vékonybél enterocitáiban). Az enzim sejten belüli lokalizációja szintén nagyon különböző lehet, hiszen a citoplazma mellett jelenlétét kimutatták a mitokondriumban és a sejtmagban is. A TG2 transzlokálódhat a plazmamembránba is, ahol β -intergrinnel 1:1 arányú komplexet képezhet. Habár a pontos externalizációs mechanizmusa mindeztáig nem ismert, az enzim mind szabadon, mind pedig az ECM makromolekuláihoz kapcsolva jelen van az extracelluláris mátrixban, és szerepet játszik az ECM szervezésében.

A potenciális TG2 szubsztrátok száma megközelíti a 150-et. Számos TG2 szubsztrát a sejtek szerkezetének felépítésében és mozgásában játszik szerepet (pl.: aktin, miozin, troponin, tubulin, tau, Rho A), valamint az extracelluláris mátrix-szal történő interakcióban vesz részt (pl.: fibronectin, fibrinogén, vitronectin, oszteopontin, laminin). Egyes TG2 szubsztrátok pedig a közti anyagcsere enzimei közül kerülnek ki (pl.: aldoláz A, gliceraldeid-3-foszfát dehidrogenáz, foszforiláz kináz).

A TG2 szerepe az immunrendszerben

A TG2 az immunrendszer számos sejtjében kifejeződik és vagy a differenciációjuk egy fontos mediátoraként működik, vagy közvetlenül részt vesz azok immunfunkciójában. A TG2 indukciója és aktivitása úgy tűnik, hogy a makrofágok differenciációját és funkcionális érését kísérő általános jelenség. A TG2 szerepet játszik a receptor mediált endocitózisban és az apoptotikus sejtek fagocitózissal történő eliminációjában. Szerepét kimutatták a látens TGF β aktivációjában is. A sejtfelszíni TG2 pedig egy integrinhez kapcsolódó adhézis receptorként működik, amely valószínűleg szerepet játszik a monocita/makrofág sejtek extravazációjában és a szövetekbe történő vándorlásában.

A TG2 szintén kifejeződik a duodénium CD11c⁺ dendritikus sejtjeiben és kijut a felszínükre, így valószínűleg szerepet játszik a cöliákia patogenézisében a T-sejtek aktivációja által. A perifériás monocita eredetű dendritikus sejtek szintén nagy mennyiségű TG2-t tartalmaznak, amely ezeknek a sejteknek a felszínén is detektálható. Kimutatták, hogy az antigén prezentáló dendritikus sejtek felszínén elhelyezkedő TG2 katalitikusan aktív lehet, így közvetlenül szerepet játszhat a gliadin peptidek deamidációjában, elősegítve a cöliákia kifejlődését. Az enzim keresztkötő aktivitásának a gátlása a dendritikus sejtek funkcióvesztéséhez vezet, amely csökkent IFN- γ termelésben, valamint az LPS kezelést követő csökkent citokin termelésben nyilvánul meg (IL-10, IL-12).

A TG2 szerepe a polimorfonukleáris granulocitákban kevésbé ismert. Mindazonáltal, a jelenlétét és a keresztkötés függő szerepét kimutatták a granulociták zimosán indukálta szuperoxid termelésében. Szintén leírták a szerepét a humán perifériás neutrofilok IL-1 β termelésében *Anaplasma phagocytophila* kezelést követően. Továbbá kimutatták, hogy a neutrofil granulocitákban a TG2 indukálódik granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor (GM-CSF) hatására. Patkány bazofil leukémia sejtekben a TG2 NF- κ B aktivációja általi TG2 indukció és aktiválódás megnövekedett reaktív oxigéngyök termeléshez vezetett, valamint kiváltotta a prosztaglandin E2 szintáz (PGE2 szintáz) kifejeződését és a prosztaglandin E2 fokozott szekrécióját. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a TG2 megnövekedett

expressziója szorosan együtt jár a polimorfonuklális granulociták gyulladásos fenotípusának kialakulásával, hiszen független kísérletek mutatják, hogy ezeknek a sejteknek a szuperoxid gyök és gyulladásos citokin termelése – amely ezeknek a sejteknek a legfontosabb jellemzője – erősen függ a TG2 jelenlététől és keresztkötő aktivitásától.

A mikroglia sejtek szintén kifejezik a TG2-t, amely LPS kezelést követően tovább indukálódik, és valószínűleg szerepet játszik az agy nitrogén-monoxid által kiváltott gyulladásos folyamataiban. Limfocitákban szintén jelen van a TG2 és feltételezhetően meghatározó szerepe van azok proliferációjában.

A TG2 a génexpresszió szabályozásában

Egyre több bizonyíték van arra, hogy a TG2 befolyásolhatja a génexpresszió szabályozásának effektorait (hisztonok, transzkripciós faktorok, kofaktorok) vagy a jelátviteli folyamatok olyan komponenseit, amelyeknek hatása van a transzkripcióra. A TG2 képes keresztkötni és polimerizálni a retinoblasztóma fehérjét (pRb), amely az E2F-1 gyors eltűnésével párosul. Az enzim szintén képes megvédeni a pRb-t a kaszpáz indukálta degradációtól transzamidáció függő módon. Ezen eredmények alapján a TG2 közreműködhet a sejtciklus szabályozásában génexpressziós szinten. BV-2 mikroglia sejtvonalban a TG2 katalizálja az NF- κ B inhibitor alfa alegységének (I- κ B α) polimerizációját. A polimerizáció az NF- κ B disszociációjához és magi transzlokációjához vezet, ahol az képes gyulladásos gének felregulálására, beleértve a nitrogén-monoxid szintázt és a TNF α -t. Az NF κ B hasonló aktivációját figyelték meg doxorubicin-rezisztens emlőrák sejtvonalban, ahol a TG2 szintén felelős ezen transzkripciós faktor konstitutív aktivációjáért, ezáltal a tumorprogresszió fenntartásáért.

A TG2 transzkripciós faktoron történő közvetlen hatását figyelték meg az Sp1 inaktiváció esetében. Hepatociták alkohol indukálta apoptózisában megemelkedik a TG2 aktivitása, amely az enzim magi akkumulációjával párosul. A magi TG2 képes közvetlenül keresztkötni, ezáltal inaktiválni az Sp1 transzkripciós faktort. Ennek hatására az Sp1 függő c-Met csökkent expressziója következik be, amely a sejtek apoptózisához vezet.

A hisztonok szintén kiváló szubsztátok a TG2 keresztkötő aktivitása számára. Ezáltal a TG2 eszköze lehet a hisztonok módosításának, így feltételezhetően az enzimnek szerepe van a kromatin szerkezet és funkció szabályozásában.

Huntington kórban a TG2 gátolja a citokróm c és koaktivátorának, a PGC-1 α -nak az expresszióját a citokróm c proximális promóteréhez, valamint a PGC-1 α kódoló régiójához történő kötődéssel. A TG2 ezen szerepe Ca²⁺-függő és peptid alapú specifikus irreverzibilis

keresztüköt inhibitorral gátolható. Ez az eredmény bizonyítja, hogy a TG2 keresztüköt aktivitásától függő módon képes a transzkripció szelektív korepresszoraként működni.

Akut promielocitás leukémia (APL)

Az akut promielocitás leukémia – az akut mieloid leukémiának (AML) altípusa – a 15-ös és a 17-es kromoszómák hosszú karjai közötti kromoszómális transzlokációval jellemezhető. A transzlokáció eredményeképpen a promielocita leukémia protein (PML) és a retinsav receptor alfa (RAR α) fúziójával létrejön egy domináns negatív fúziós transzkript (PML/RAR α vagy RAR α /PML).

A mieloid prekursor sejtek neutrofil granulocita irányú differenciációja során a retinsav (az RAR α természetes ligandja) az RAR α aktivációja által egy kivételesen nagy génexpressziós változást indukál. A komplex transzkripciós átrendeződés transzkripciós faktorok, kromatin módosító faktorok, sejtciklus regulátorok, valamint az apoptózis szabályozóinak; a stresszválasz, az anyagcsere és a proteinszintézis fehérjéinek az indukcióját érinti. Ezek közül a különbözőképpen expresszálandó gének közül számos, a granulociták terminális differenciációjában játszhat szerepet, míg mások az érett granulociták, biokémiai és funkcionális jellemzőiért felelősek.

A PML/RAR α mutációja esetén a retinsav fiziológiás koncentrációban képtelen kötődni az RAR α -hoz és ezáltal kiváltani a sejtek terminális differenciálódását. A fúziós termék domináns negatívként hat mind az RAR α -ra, mind a PML-re nézve homodimert formálva, korepresszorokat kötve; és ezáltal gátolja a granulocita differenciálódáshoz szükséges célgének expresszióját.

A retinsav (pl. *all-trans* retinsav, ATRA) azonban farmakológiai koncentrációban képes kötődni a PML/RAR α -hoz és konformációs változást kiváltani. A komplex elengedi a korepresszorokat, aktivátorokat köt és visszaállítódik az RAR α függő gének természetes regulációja. A retinsav kötés hatására tehát iniciálódik az APL sejtek terminális differenciálódása, valamint a következményes apoptózisa. Az APL betegek retinsav kezelésével 90-95% arányú gyógyulás érhető el, amely mindezidáig a legsikeresebb példát jelenti a differenciáció alapú terápiára.

Meg kell azonban jegyezni, hogy habár az ATRA kezelést a betegek többnyire jól tolerálják, az APL betegek 2,5-30%-ában egy, akár halállal végződő mellékhatás, a retinsav- vagy differenciációs-szindróma (RAS vagy DS) jelentkezik. A differenciációs szindrómára jellemző a látszólag megmagyarázhatatlan láz, súlygyarapodás, légzési nehézség, interstitiális

beszűródés a tüdőben, pleurális és pericardiális izzadmány, epizodikus alacsony vérnyomás és az akutan fellépő veseelégtelenség.

A differenciációs szindrómában szisztémás gyulladásos válasz figyelhető meg, ami a differenciálódó APL sejtek masszív szöveti infiltrációját eredményezheti, ahol a tüdő a leginkább érintett szerv. Valószínűleg az alveoláris kemokin szekréció váltja ki az APL sejtek kezdeti migrációját a tüdőbe. A ATRA képes jelentősen megnövelni az alveoláris epitélisejtek specifikus kemokinjeinek termelését (CCL2, -3, -22, -24, CXCL8). Mivel az ATRA kezelt APL sejtek szintén termelik ezeket a kemokineket, a tüdőbe vándorolt sejtek tovább fokozzák a gyulladásos sejtek tüdőbe történő infiltrációját. Ezáltal az alveoláris epitélisejtek és a differenciálódó APL sejtek kemokin termelése fontos szerepet játszhat a differenciációs szindróma kialakulásában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink a TG2 génexpresszió regulációja szempontú szerepének felderítésére irányultak a neutrofil granulociták differenciálódás folyamatában. Ebből a célból egérből származó neutrofil granulocitákat, valamint retinsavas kezeléssel neutrofil granulocita-szerű sejtekké differenciáltatott humán promielocitás leukémia sejteket (NB4 sejtvonal) használtunk.

Céljaink:

- A transzglutamináz 2 szerepének tisztázása a promielocitás leukémia sejtek neutrofil granulocita irányú differenciálódásban.
- A TG2 gén csendesítése NB4 sejtvonalban RNS interferencia használatával (TG2-KD NB4).
- A génexpressziós mintázat összehasonlítása normál és TG2-KD NB4 sejtek differenciálódása során a DNS microarray alkalmazásával.
- Gének azonosítása, melyek kifejeződése függ a TG2-től.
- A TG2 csökkent expressziójának következtében fellépő funkcionális következmények azonosítása
- A hatásmechanizmus felderítése, amivel a TG2 génkifejeződést képes befolyásolni.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztési eljárások

Az NB4 sejteket RPMI 1640, a 293FT csomagoló sejtvonalat DMEM tápfolyadékban tartottuk fenn. Mindkét tápfolyadék 10% FBS-t (foetal bovine serum), 2 mM glutamint, 100 U/mL penicillint és 100 µg/mL streptomycint tartalmazott. Az NB4 sejtek (1×10^5 sejt/mL) differenciációját 1 µM ATRA kezeléssel végeztük.

Western blot analízis

A sejtek mosása és lizálása (250 mM sucrose, 1 mM DTT, 80 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM EDTA, 15 mM PIPES, pH 7.4, 1 mM PMSF, 0.1% NP-40, 4°C) után a citoplazmatikus és magi frakciókat centrifugálással választottuk szét (1100g, 15 min, 4°C). A magi frakciót (pellet) szintén lizáltuk (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 15 mM β-MEA, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM PMSF). A 2 mg/mL koncentrációjúra beállított protein preparátumot azonos térfogatú futtató pufferrel elegyítettünk (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% merkaptotanol, 0.02% bromofenolkék) majd elfőztük (10 min 100°C). 25 µg-nyi fehérjemintát 8%-os SDS–poliakrilamid gélen választottunk szét, majd PVDF membránra blottoltuk. A TG2-t CUB7402 monoklonális antitesttel detektáltuk.

A TG2 keresztkötő aktivitásának mérése

TG2 aktivitásának meghatározása a következő összetételű reakcióelegyben történt: 50 µL (2 mg/mL) sejt homogenizátum, 10 µL N, N-dimetilkazein (40 mg/mL), 20 µL [1,4(n)-3H] putreszcin (30 Ci[37 MBq]/mmol), 10 µL 250 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM β-MEA, 10 µL CaCl₂ (50 mM). A reakciót a CaCl₂ hozzáadásával indítottuk, a reakcióelegyet 5 percig inkubáltuk 37°C-on. Ezután 25 µL-nyi mintát szűrőpapírra cseppentettünk, hideg TCA oldatban precipitáltuk majd etanolban mostuk. A szűrőpapírok radioaktivitását szcintillációs folyadékban β-counter-rel mértük.

Immunfestés

A sejtek fixálása [1. 4% paraformaldehid (4°C; 10 min), 2. 8% paraformaldehid (4°C; 50 min); 3. 4% paraformaldehid (4°C; 20 min), 4. 2% paraformaldehid (15 min), majd 5. metanol (-20°C; 20 min)] után a sejteket 25 mM-os glicin-PBS-ben tartottuk (20 min), majd 0.1%-os Triton X-100 oldatban permeabilizáltuk. Mosás és blokkolás (5% BSA) után anti-TG2 egér monoklonális antitesttel inkubáltuk 2 órán át, majd mostuk a sejteket. Második

antitestként Alexa Fluor 633 goat anti-mouse IgG antitestet használtunk (1 h). A fluoreszcens mikroszkópos felvételek Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal készültek.

Az Nε-(γ-glutamil)-lizin tartalom meghatározása

A citoplazmatikus és magi homogenizátumok fehérjetartalmát precipitáltuk majd liofilizáltuk. Rehidratáció, enzimatis emésztés és fenilizotiocianátos kezelés után az Nε-(γ-glutamil)-lizin izopeptid származékokat kationcserélő gyantán és szilika HPLC oszlopon szeparáltuk, végül reverz-fázisú HPLC-vel határoztuk meg.

A TG2 aktivitás *in situ* kimutatása

A sejtekből 6 mM 5-(biotinamido)-pentilaminos (BNPH₂) kezelés (12 h) után citoplazmatikus és magi frakciókat szeparáltunk. A BNPH₂ fehérjékbe történő beépülésének kimutatására 25 µg proteint 8% SDS-poliakrilamid gélen szeparáltunk, majd PVDF membránra történő blottolás után tormaperoxidáz-konjugált sztreptavidinnel detektáltuk a BNPH₂ jelenlétét.

A szuperoxid anion termelés meghatározása

10⁶ sejthez 0.5 mM-os izoluminol vagy luminol tartalmú Krebs-Ringer oldatot adtunk (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.7 mM KH₂PO₄, 8.3 mM Na₂HPO₄, 10 mM glükóz, 1 mM CaCl₂, and 1.5 mM MgCl₂; pH 7.3). 5 perc 37°C-on történő inkubáció után a sejtek szuperoxid termelését PMA hozzáadásával indítottuk (50 nM) és luminométerrel mértük a keletkező szuperoxid anion mennyiségével arányos kemilumineszcenciát.

TG2 csendesített (knockdown) NB4 sejtvonal (TG2-KD NB4) létrehozása

2 x 10⁴ NB4 sejtet anti-TG2 shRNS kifejező lentivírussal fertőztünk, majd puromicinnel (5 µg/mL) szelektáltuk a stabilan transzdukált sejteket. A vírusfertőzés kontrolljaként non-target shRNS kifejező vektort használtunk.

Microarray analízis

0, 48 és 72 órás ATRA kezelt sejtekből teljes RNS-t izoláltunk. Kísérleteinket triplikátumokban végeztük. A minták további feldolgozása, a microarray hibridizáció, valamint a chip-ek (GeneChip Human Gene 1.0 ST Arrays, Affymetrix) beolvasása az EMBL Microarray Core Facility-ben zajlott (Heidelberg, Németország). Az adatok kiértékelését GeneSpring 10.1. szoftverrel végeztük.

Real-time QPCR

A sejtekből izolált teljes RNS-t cDNS-re írtuk át random primerek felhasználásával. A real-time QPCR reakciót ABI Prism 7900 készülékkel végeztük TaqMan próbákat használva. A transzkripció szinteket a cyclophilin D szintjére normalizáltuk és a génexpresszió szintek meghatározására a comparative cycle threshold (C_T) módszert alkalmaztuk.

Áramlási citometria

A CD11c sejtfelszíni expressziójának detektálásához 8×10^5 sejtet inkubáltunk FITC-cel jelzett anti-human CD11c egér antitesttel (2 h, 4°C, 1 % BSA-PBS). A sejteket mosás és 1%-os paraformaldehidben történő fixálás után FACS Calibur készüléken analizáltuk. A fagocitózis képességének meghatározásához 1×10^5 számú 3 napig differenciáltatott NB4 sejtekkel fagocitáltattunk FITC-cel jelzett *Listeria monocytogenes*-t vagy *Staphylococcus aureus*-t 1:50 sejt/bakterium arányban (2 h, 37°C). A sejtek mosása után 1%-os paraformaldehidben fixáltuk őket, majd FACS Calibur készüléken mértük a jelölődésüket. A sejtciklus analíziséhez a permeabilizált, propídium-jodiddal jelölt és etanolban fixált sejteket analizáltuk FACS Calibur készüléken.

A sejt adhézió és migráció meghatározása

A sejtadhézió meghatározásához 48 és 72 órás ATRA kezelt sejteket BSA-val bevont felületű tenyésztőedénybe helyeztünk, majd a nem letapadó sejtek eltávolítása után metanol:ecetsav 4:1 arányú keverékével fixáltuk a letapadt sejteket, festettük hematoxilinnel, végül számoltuk őket. A migrációs assay-t BD Matrigel Invasion Chamber használatával végeztük 200 nM fMLP-t, vagy 10 ng/mL IL-8-at használva kemoattraktánsként. 2.5×10^4 számú sejtet hagytunk vándorolni 14 órán keresztül. A differenciálódó NB4 sejtekről származó felülúszó perifériás fehérvérsejtekre kifejtett kemotaktikus kapacitását 6.5 mm átmérőjű 5 µm pórusméretű polikarbonát lemez használatával határoztuk meg.

CC kemokin ELISA

A differenciálódó sejtek felülúszójából a CCL2 és CCL24 szintjének mérésére Quantikine human ELISA kitet, míg a CCL3 és CCL22 meghatározására RayBio human ELISA kitet használtunk.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

4.1. Az NB4 sejtek neutrofil granulocita irányú ATRA indukálta differenciációja a TG2 indukciójával és magba történő transzlokációjával társul

Kimutattuk, hogy 24 órával az ATRA kezelést követően a TG2 megjelenik és a differenciáció 3. napján maximális szintet ér el a citoplazmában. A TG2-t az ATRA kezelt NB4 sejtek mag frakciójában is detektáltuk, habár az enzim magi felhalmozódása csak a második naptól volt megfigyelhető és a negyedik napon érte el a maximumot. A TG2 keresztkötő aktivitása szintén kimutatható volt mindkét frakcióban a [3H]putreszcin kazeinbe történő beépüléssel történő meghatározással. A citoplazma eredetű lizátumban a TG2 keresztkötő aktivitása folyamatosan emelkedett az enzim fehérje szintjével összhangban. A magi TG2 aktivitása szintén mérhető volt, habár mértéke elmaradt a citoplazmatikus formától. A TG2 sejtmagi jelenlétét konfokális mikroszkóppal és immunfestéssel erősítettük meg. Kimutattuk, hogy a differenciáció 6. napján a TG2 szorosan kolokalizálódik a differenciálódó NB4 sejtek kromatinjával. A peptidkötött Nε-(γ-glutamil)-lizin keresztkötések növekvő mennyisége a differenciálódó sejtek citoplazmatikus és a magi frakciójában megerősíti a katalitikusan aktív TG2 felhalmozódását a citoplazmában és a sejtmagban. Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy vajon az ATRA indukálta TG2 aktív-e primer aminokon az NB4 sejten, *in situ* 5-(biotinamido)-pentilamin (BNPH₂) beépülési esszét alkalmaztunk. A differenciáció 4. napján nagyszámú fehérje módosult a BNPH₂ beépülése által a citoszolban és a sejtmagban egyaránt. Ezek az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a TG2 jelen van és keresztkötő aktivitással rendelkezik a differenciálódó NB4 sejtek citoplazmájában és sejtmagjában.

4.2. Az NB4 sejtek ATRA indukálta differenciációja csökkent mértékű a TG2 keresztkötő aktivitásának gátlása következtében

Annak kiderítése érdekében, hogy van-e jelentősége a TG2 keresztkötő aktivitásának a neutrofil differenciációban, egy nem specifikus TG2 inhibitor, a monodanzil-kadaverin (MDC) kezelést alkalmaztunk a differenciáció teljes időtartama alatt. Az MDC kezelés 4. és 5. napján jelentős csökkenést tapasztaltunk a TG2 aktivitásában, valamint a keresztkötések mennyiségében a citoplazmában és a sejtmagban egyaránt, míg a TG2 expressziós szintje nem változott.

A mieloid sejtek differenciálódásának egyik legfontosabb markere az NBT (nitroblue tetrazólium) redukáló képesség, amely a sejtek szuperoxid (O₂⁻) termelésével függ össze. Az ATRA-val nem kezelt proliferáló NB4 sejtek nem képesek redukálni az NBT-t, de 24 órával

az ATRA kezelés után a sejtekben formazán csapadék jelenik meg NBT hozzáadását követően; jelezvén, hogy a sejtek differenciálódása megindult. Amennyiben a sejtek ATRA differenciálódása MDC jelenlétében zajlott, az NBT redukáló kapacitás csökkent mértékű volt a differenciálódás teljes ideje alatt. A MDC kezelt sejtek szuperoxid termelése szintén jelentős csökkenést mutatott a kontroll sejtekhez viszonyítva. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TG2 keresztükötő aktivitása szerepet játszik ezen leukémia sejtek ATRA indukálta differenciálódásában.

Az érett neutrofil granulociták egyik legfontosabb jellemzője a patogének fagocitózisa, valamint azok lizoszómákban történő elölésének képessége, mely folyamatban elsősorban az általuk termelt, oxigén alapú szabadgyökök vesznek részt. A sejtekben a szuperoxid anion termelését a NADPH-oxidáz rendszer végzi. Számos esetben leírták, hogy a neutrofilok csökkent mértékű szuperoxid termelésének oka a NADPH oxidáz rendszer gp91^{phox} nevű alegységének a csökken expressziója. Ebből kiindulva megvizsgáltuk, hogy az MDC kezelt differenciálódó NB4 sejtek csökkent szuperoxid termelésének hátterében vajon a gp91^{phox} alegység alacsonyabb expressziója áll-e. Northern blot analízissel és real-time QPCR mérésekkel azt az eredményt kaptuk, hogy a TG2 keresztükötő aktivitásának a gátlása a gp91^{phox} mRNS-ének alacsonyabb kifejeződéséhez vezet.

4.3. A TG2^{-/-} egerekből származó neutrofil granulocitákban a NADPH-oxidáz gp91^{phox} alegysége alacsonyabb szinten expresszálódik

Annak érdekében, hogy megerősítsük a TG2 szabályozó szerepét a NADPH-oxidáz gp91^{phox} alegységének kifejeződésében, TG2^{+/+} és TG2^{-/-} egerekből származó neutrofil granulocitákat hasonlítottunk össze. A neutrofil granulocitákat az egerek peritoneumából izoláltuk élesztőkivonattal történő beoltást követően. A TG2^{-/-} egerekből származó granulociták mintegy tízszeres csökkenést mutattak az NBT-redukáló képességükben, valamint szintén egy nagyságrenddel kisebb mennyiségű szuperoxidot termeltek a forbol-mirisztol-acetát stimulációt követően, hasonlóan a TG2 inhibitor kezelt differenciáltatott NB4 sejtekhez. Real-time QPCR mérések alapján azt találtuk, hogy az egér neutrofilok esetében is a TG2^{-/-} sejtek csökkent szuperoxid termelésének hátterében a gp91^{phox} alacsonyabb expressziója áll. Western blot analízissel sikerült megerősítenünk, hogy a gp91^{phox} csökkent mRNS szintje a TG2^{-/-} sejtek esetében valóban alacsonyabb fehérje szintet eredményez.

4.4. A TG2 shRNS indukált csendesítése az NB4 sejtek differenciálódásának csökkenését okozza

Annak érdekében, hogy tisztázzuk a TG2 szerepét a neutrofil granulocita differenciálódásban, NB4 sejteket anti-TG2 shRNS expresszáló lentivírus vektorral stabilan fertőztünk (TG2-KD NB4). A vírusfertőzés aspecifikus hatásainak nyomon követésére egy olyan, random shRNS-t expresszáló vírus vektorral is fertőztünk NB4 sejteket, amely egyetlen humán génre sem specifikus (vírus kontroll NB4). Meg kell jegyezni, hogy az RNS interferencia alapú géncsökkentés sosem vezet az adott gén transzkripciójának 100%-os megszűnéséhez, de jól megválasztott siRNS szekvenciával kellő mértékű csökkenés érhető el az adott gén mRNA- és ezáltal fehérjeszintjében. Esetünkben a TG2 gén csökkentésének hatásfokát a TG2 mRNA szintének mérésével (real-time QPCR), a fehérje mennyiségének Western blottal történő detektálásával, valamint az enzim keresztkötő aktivitásának meghatározásával ellenőriztük. Mindhárom módszerrel azt az eredményt kaptuk, hogy a TG2-KD NB4 sejtekben a TG2 csökkentésének mértéke olyan szintet ért el, hogy a modell alkalmas a TG2 funkcióvesztés következményeinek vizsgálatára.

A vad típusú és vírus kontroll NB4 sejtek NBT redukáló képessége azonos módon emelkedett a sejtek ATRA indukálta differenciációja során és 72-96 óránál érte el a maximális, 100%-os szintet. A differenciálódó TG2-KD NB4 szintén képesek voltak az NBT redukálásra, de az NBT pozitív sejtek száma esetünkben jelentősen elmaradt a kontroll vagy vírus kontroll sejtekéhez képest a differenciáció teljes folyamata alatt és 96 óránál sem érte el a 100%-os szintet.

A CD11c valamint a CD11b integrinek, mint differenciálódási markereknek az expressziós szintje jelentősen elmaradt a TG2-KD NB4 sejtekben real-time QPCR mérések alapján. Áramlási citometriás módszerrel vizsgálva a CD11c és CD11b sejtfelszíni kifejeződését, megerősítettük, hogy a TG2 csökkentésének következtében jelentősen csökken ezen integrinek szintje. A differenciálódási markerek csökkent megjelenése tehát egységesen arra utal, hogy a TG2 jelentős szerepet játszik a promielociták neutrofil granulocita irányú differenciációjában.

4.5. A TG2 hatása az NB4 sejtek neutrofil granulocita irányú differenciálódását kísérő génexpressziós változásokra

A TG2 NB4 differenciációra kifejtett hatásának vizsgálata céljából összehasonlítottuk a normál (vad-típusú/kontroll) NB4 sejtek ATRA által kiváltott expressziós változásait a TG2-KD NB4 sejtekével a differenciáció 0, 2. és 3. napján. A kontroll sejtek esetében a második

napon 340 gént, a harmadik napon 599 gént azonosítottunk, amelyek szignifikánsan ($p \leq 0,05$) minimum kétszeres expressziós növekedést mutatott a differenciáció során a kezletlen (0 nap) sejtekhez képest. Ezek közül 307 regulálódott fel mindkét nap. A második napon 1281 gén, míg a harmadik napon 1586 gén expressziója mutatott minimum 2-szeres csökkenést és 1059 számú gén expressziója csökkent mindkét nap. Figyelemre méltó, hogy a TG2-KD sejtek esetében csak 254, ill. 344 gén regulálódott fel a második, ill. harmadik nap, és ezek közül 208 fedett át. A leregulálódó géneket tekintve 1011 és 1360 expressziója csökkent minimum 2-szeresen a második, ill. harmadik nap és ezek közül 808 volt jellemző mindkét napra. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a TG2 jelentős számú gén regulációját befolyásolja az NB4 sejtek ATRA indukálta differenciációja során.

Az eredeti NB4 sejtek differenciációjára jellemző változó gének az "immune function", a "cell cycle regulation", a "nucleotide metabolism" és a "protein metabolism" elnevezésű gén ontológiai kategóriákban és azok alcsoportjaiban dúsultak fel szignifikánsan. Ez a tény összhangban áll azokkal a biológiai jelenségekkel, amelyek az ATRA kezelésre következnek be az NB4 sejtekben. A sejtprolifерáció csökkenésével, ill. megszűnésével párhuzamosan ugyanis csökken a sejtciklust szabályozásában, valamint a sejtek osztódásához szükséges nukleotid anyagcserében szerepet játszó gének dominanciája; ezzel egy időben pedig indukálódnak, ill. felregulálódnak olyan gének, amelyek az érett neutrofilok immunfunkciójában játszanak szerepet.

A TG2-KD sejtek esetében azonban a fent említett kategóriákba jelentősen kisebb számú gén esett, a feldúsulás kevésbé, vagy egyáltalán nem volt szignifikáns. A TG2 csendesítése tehát egyaránt hatással van a sejtprolifерációval kapcsolatos gének, valamint az immunfunkcióban szerepet játszó gének ATRA által vezérelt transzkripció változásaira.

4.6. A TG2 elősegíti az ATRA által kiváltott transzkripciós változásokat

A TG2 313 gén kifejeződését befolyásolja az NB4 sejtek differenciációja során. Ezek közül 197 expresszióját az ATRA regulálja, a TG2 génexpressziót moduláló hatása tehát túlnyomórészt a retinoid-függő géneken érvényesül. A TG2 hatását tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy azok a gének, amelyek az ATRA kezelést követően leregulálódnak, a TG2 hiányában magasabb expressziós szinten maradnak és elsősorban a sejtciklus szabályozásában, valamint a sejtosztódás magas nukleotid igényének biztosításában játszanak szerepet.

Az ATRA által indukálódó gének pedig a TG2 hiányának következtében alacsonyabban fejeződnek ki és ezek azok a gének, amelyek az érett neutrofil granulociták

immunológiai sajátosságaiért felelősek. Ezen eredmények alapján tehát arra a következtetésre jutottunk, hogy a TG2 az ATRA-val szinergista módon együttműködve szerepet játszik a mieloid sejtek osztódásának csökkentésében és leállításában, a sejtproliferációval kapcsolatos gének expressziójának csökkentésével. Ugyanakkor hozzájárul a promielocita sejtek funkcióképes neutrofil granulocitává történőéréséhez az immunfunkcióban szerepet játszó gének felregulációjával.

4.7. A TG2-KD NB4 sejtek hosszabb ideig megőrzik proliferációs képességüket ATRA kezelést követően

A génexpressziós eredmények alapján feltételeztük, hogy a differenciálódó TG2-KD NB4 sejtek magasabb proliferációs képességgel rendelkeznek. Méréseink alapján bebizonyosodott, hogy az ATRA kezelés második napján a TG2-KD NB4 sejt kultúrában közel 30%-kal több sejt található a kontrollhoz viszonyítva, annak ellenére, hogy az ATRA kezelést azonos számú sejttel végeztük. Differenciálódó NB4 sejteket propídium-jodiddal jelölve áramlásos citometriás méréssel megállapítottuk, hogy a TG2-KD NB4 sejt kultúrában jelentősen nagyobb arányban fordulnak elő a sejtek az S-fázisban, utalva arra, hogy ezek a sejtek nagyobb mértékben osztódnak.

4.8. A TG2-KD NB4 sejtek immunológiai sajátosságai kisebb mértékben fejlődnek ki az ATRA indukálta differenciáció során

Az úszó promielocita NB4 sejtek az ATRA kezelést követően részben képessé válnak szilárd felülethez történő letapadásra, ugyanakkor az érett neutrofilokra jellemző módon képesek lesznek a kemotaktikus anyagok (pl.: IL-8, fMLP) által kiváltott vándorlásra. A TG2-KD NB4 sejtek esetében a „cell adhesion” és a „cell motility” kategóriába tartozó gének csökken kifejeződését figyeltük meg. Ezzel összhangban kísérleteink alapján bebizonyosodott, hogy a TG2 csendesített differenciálódó NB4 sejtek letapadása és migrációs képessége jelentősen elmarad a kontroll sejtekéhez képest.

A differenciálódó TG2-KD NB4 sejtek baktérium (FITC-cel jelzett *Listeria monocytogenes* és *Staphylococcus aureus*) fagocitáló képessége jelentősen elmarad a kontroll NB4 sejtekéhez képest; annak megfelelően, hogy a TG2 csendesített sejtekben az ATRA kezelést követően kisebb mértékben indukálódik több fagocitózisban szerepet játszó gén (pl.: CD14, CD36, MERTK). A bekebelezett baktériumok lizoszómában történő elpusztítására termelt szuperoxid gyök mennyisége szintén kevesebb a TG2-KD sejtekben, összhangban a szuperoxid termelést végző több gén csökkent expressziójával (pl.: gp91^{phox}, NCF2).

4.9. A differenciációs szindróma létrejöttében szerepet játszó kemokinek termelődése csökkent mértékű a TG2-KD NB4 sejtekben az ATRA kezelést követően

A microarray adatok szerint a TG2-KD NB4 sejtek CCL2, -3, -22 és -24 kemokin termelése alacsonyabb mértékű a kontroll sejtekéhez képest a differenciáció második és harmadik napján. A differenciációs szindróma kialakulásában kulcsfontosságú kemokinek alacsonyabb expressziós szintjét real-time QPCR mérésekkel is megerősítettük. A kemokineknek a sejtek felülúszójában történő fehérjeszintjének ELISA módszerrel történő meghatározása igazolta, hogy a TG2-KD sejtek jelentősen alacsonyabb mennyiségben termelik ezeket a citokineket.

Annak kiderítése érdekében, hogy vajon a csökkent kemokin termelésnek van-e funkcionális következménye, a differenciálódó kontroll, vírus kontroll és TG2-KD NB4 sejtekről származó felülúszót kemoattraktánsként használva megvizsgáltuk, hogy milyen mértékben fokozzák perifériás vérből származó fehérvérsejtek migrációs képességét. Eredményeink azt mutatják, hogy a TG2 csendesítésének következtében olyan mértékben marad el a sejtek kemokin termelése a differenciáció során, hogy ezen sejtekről származó felülúszó szignifikánsan kisebb mértékben váltja ki a fehérvérsejtek vándorlását a kontrollokról származókhöz képest. Ezek alapján tehát azt feltételezzük, hogy a TG2 az akut promielocitás leukémia betegek ATRA alapú kezelése során a fent említett kemokinek termelődésének génexpressziós szintű fokozásával hozzájárul a differenciációs szindróma kialakulásához.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A mieloid eredetű neutrofil granulociták differenciálódása a csontvelőben indul, majd az innen kijutó előalakok a keringésben válnak érett funkcióképes sejtekké. A transzglutamináz 2 (TG2) egy tiol és Ca^{2+} -függő acil-transzferáz, amely peptidkötésben lévő glutamin γ -karboxamin csoportja és különböző elsődleges aminok, valamint fehérjék lizin oldalláncának ϵ -amino csoportja közötti kovalens izopeptid kötés kialakulását katalizálja. Az enzim az immunrendszer legtöbb sejtjében kifejeződik és bebizonyosodott róla, hogy számos biológiai folyamatban aktív szerepet játszik (pl. fagocitózis, a sejtek letapadása és vándorlása, látens TGF- β aktiváció stb). Annak ellenére, hogy a neutrofilokról ismert, hogy a differenciálódásuk során az enzim indukálódik és az érett sejtekben nagy mennyiségű aktív enzim mutatható ki, a TG2 ezekben a sejtekben, ill. a hozzájuk köthető immunológiai folyamatokban betöltött szerepe egyelőre tisztázatlan.

Korábbi vizsgálataink alapján bebizonyosodott, hogy a promielocita sejtek neutrofil granulocita irányú differenciációja során a TG2 alapvető szerepet játszik az érett sejtek immunológiai tulajdonágainak kifejlődésében. Eredményeink azt mutatják, hogy a TG2 transzlokálódik a sejtmagba és ott keresztkötő aktivitásától függő módon részt vesz a sejtekéréséhez vezető génregulációs folyamatok szervezésében. Jelen értekezés célja a TG2-től függő regulációs események felderítése, valamint az enzim ezen folyamatokban betöltött szerepének tisztázása volt.

A TG2 szerepének vizsgálatára rendelkezésünkre áll a TG2 knockout egértörzs, valamint az NB4 promielocita sejtvonal, melyből all-transz retinsav (ATRA) kezeléssel egy, a természetes neutrofil granulocita állapothoz közeli alak differenciálható. A TG2 közvetlen $\text{RAR}\alpha$ célgénként a retinsavas kezelés hatására nagymértékben indukálódik a differenciáció folyamata során. Lentivirus alapú shRNS vektor felhasználásával az eredeti NB4 sejtvonalból létrehoztunk egy stabil TG2 knock-down sejtvonalat, mely az ATRA kezelés után is csak mintegy 15%-ban képes a TG2 enzimet expresszálni.

Megfigyeléseink arra utalnak, hogy amennyiben a sejtek differenciációja TG2 hiányában (KO egér vagy knock-down NB4 sejtvonal) mellett zajlik, a sejtproliferációval kapcsolatos számos gén, valamint a neutrofil immunfunkcióban szerepet játszó több gén expressziója eltérést mutat. Annak kiderítése érdekében, hogy a TG2 mely gének expresszióját befolyásolja a neutrofil granulociták differenciálódása során, teljes génexpressziós vizsgálatot végeztünk DNS microarray technika alkalmazásával. Összehasonlítva a TG2-KD NB4 sejtek differenciálódására jellemző génexpressziós

mintázatot a normál NB4 sejtekével több mint 300 olyan gént azonosítottunk, melyek kifejeződése függ a TG2-től. Eredményeink azt mutatják, hogy a TG2 szinergista módon részt vesz az ATRA által indukált génexpressziós átrendeződésben, hiszen a hiányában elmarad számos sejtproliferációval kapcsolatos gén repressziója, valamint az immunfunkcióval kapcsolatos gének kellő mértékű indukciója. A TG2 hiányának következtében fellépő génexpressziós eltérések fenotípus szinten is megnyilvánulnak, mivel a TG2-KD sejtek magasabb proliferációs képességgel, ugyanakkor csökkent mértékű immunológiai tulajdonságokkal (pl. baktérium fagocitózis, migráció, szuperoxidgyök termelés stb) jellemezhetőek.

A csökkent mértékű immunológiai sajátságok kifejlődésével függ össze, hogy a TG2 hiányos sejtek kisebb mértékben képesek a differenciációs szindróma létrejöttében kulcsszerepet játszó CC kemokinek termelésére. Mivel a differenciációs szindróma az akut promielocitás leukémia ATRA alapú terápiájának legmeghatározóbb, akár halálos kimenetelű mellékhatása, a TG2 szintjének, vagy aktivitásának befolyásolása a terápia során potenciális beavatkozási lehetőséget vet fel.

6. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Csomos K, Nemet I, Fesus L, Balajthy Z.: Tissue transglutaminase contributes to the all-trans retinoic acid induced differentiation syndrome phenotype in the NB4 model of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. **116**(19): 3933-43. (2010)

IF: 10,55

Balajthy Z, **Csomos K**, Vamosi G, Szanto A, Lanotte M, Fesus L.: Tissue-transglutaminase contributes to neutrophil granulocyte differentiation and functions. *Blood*. **108**(6):2045-54. (2006)

IF: 10,37

Egyéb publikációk

Keresztessy Z, Csosz E, Harsfalvi J, **Csomos K**, Gray J, Lightowlers RN, Lakey JH, Balajthy Z, Fesus L.: Phage display selection of efficient glutamine-donor substrate peptides for transglutaminase 2. *Protein Sci*. **15**(11):2466-80 (2006)

IF: 3,46

Majai G, Sarang Z, **Csomos K**, Zahuczky G, Fesus L.: PPARgamma-dependent regulation of human macrophages in phagocytosis of apoptotic cells. *Eur J Immunol*. **37**(5):1343-54 (2007)

IF: 4,66

Az értekezéshez kapcsolódó nemzetközi konferencián bemutatott posztterek

Balajthy Z, **Csomos K**, Fesus L.: Retinoic acid-induced tissue-transglutaminase contributes to neutrophil granulocyte differentiation by modulating the expression of gp91^{phox}.

8th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases.

Lübeck, Germany (2005)

Majai Gy, Sarang Zs, **Csomos K**, Fesus L.: PPAR gamma dependent programming of macrophage capacity for phagocytosis of apoptotic cells.

13th ECDO Euroconference on Apoptosis.

Budapest, Hungary, (2005)

Csomos K, Balajthy Z, Zahuczky G, Fesus L.: Studying the role of tissue-transglutaminase in neutrophil granulocyte differentiation.

32nd FEBS Congress Molecular Machines.

Vienna, Austria (2007)

Csomos K, Balajthy Z, Zahuczky G, Fesus L.: Studying the role of tissue-transglutaminase in neutrophil granulocyte differentiation.

9th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases.

Marrakesh, Morocco (2007)

Csomos K, Nemet I, Fesus L, Balajthy Z.: Tissue transglutaminase contributes to all-trans retinoic acid induced gene expression remodelling in acute promyelocytic leukemia. Remodelling in Acute Promyelocytic Leukemia.

Gordon Research Conferences: Transglutaminases In Human Disease Processes.

Davidson College, NC, US. (2010)