

Egyetemi Doktori (PhD) értekezés tézisei

A szöveti transzglutamináz (TG2) szerepe NB4-es akut promielocita  
leukémia sejtek differenciációs, sejthalál és citokin termelésének  
szabályozásában all-transz-retinsav (ATRA) és arzén-trioxid (ATO)  
kezelés hatására

Jambrovics Károly

**Témavezető:** Balajthy Zoltán, PhD



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUN BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

**DEBRECEN, 2020**

**A szöveti transzglutamináz (TG2) szerepe NB4-es akut promielocita leukémia sejtek differenciációs, sejthalál és citokin termelésének szabályozásában all-transz-retinsav (ATRA) és arzén-trioxid (ATO) kezelés hatására**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében

a **Elméleti orvostudományok** tudományágban

Írta: **Jambrovics Károly** okleveles **biológus (Msc)/gyógyszer-biotechnológus (MSc)**

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt-és Immun doktori iskolája keretében

Témavezető: **Dr. Balajthy Zoltán, PhD**

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, MD, PhD, MTA doktora

tagok: Dr. Ambrus Attila, PhD

Prof. Dr. Sipka Sándor, MD, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai intézet könyvtár, 2017.01.23., Debrecen

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kappelmayer János, MD, PhD, MTA doktora

Dr. Sipeki Szabolcs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, MD, PhD, MTA doktora

tagok: Dr. Ambrus Attila, PhD

Dr. Gyémánt Gyöngyi, PhD

Az értekezés védésének (online formátum) időpontja:

2020. december 9. 13:00

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a [jambrovics.karoly@med.unideb.hu](mailto:jambrovics.karoly@med.unideb.hu) e-mail címre küldött üzenetben a 2020. december 7. 12 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

## Bevezetés

### Akut promielocita leukémia (APL)

Az akut promielocita leukémia az akut mieloid leukémia (AML) altípusa, amelyet mint mieloid rendellenességként írnak le. 1957-ben Hillestad és munkatársai számoltak be róla elsőként, hogy az APL egy progresszív, gyors és halálos hematológiai betegség. Az APL-es betegek immunsejtjei a promielocita stádiumban ragadnak, a differenciálódás gátolt [Bennet és mtsai, 1980]. Ezt az altípust morfológiai és citogenetikai tulajdonságaik alapján könnyű megkülönböztetni a többi leukémia típustól [Bennet és mtsai, 1985; Kühnl és mtsai, 2012].

A 15. kromoszómán keresztüli transzlokáció eredményeként a PML-gén és a 17. kromoszóma RAR $\alpha$ -génje fuzionálódik, kiméra transzkriptum PML/RAR $\alpha$  vagy RAR $\alpha$ /PML keletkezik. Így ezen gének fúziós fehérjéje blokkolja a sejtek differenciálódását és apoptózisát [Kakizuka és mtsai, 1991; Julien és munkatársai, 2011; Grignani és munkatársai, 1993, 1996]. A jól ismert terápiákban elsősorban a fúziós transzkriptum lebontására és represszor funkciójának megszüntetésére koncentrálnak.

Az APL-ben szenvedő betegeknek olyan tünetei lehetnek: súlyos vérzés az egész testben, trombocitopénia, másodlagos fibrinolízis, intravaszkuláris koaguláció [Goldman és mtsai., 1974; Mitrovic és mtsai, 2015]. Nagyon sok atipikusan festődésű promielocita jelenik meg a véráramban, mellyel párhuzamosan sejtmagjuk szerkezete megváltozik, a fibrinogén szint alacsony marad [Bennet és mtsai, 1989; Daniel és mtsai, 2001; Kühnl és mtsai, 2012].

A gyors immunválaszt kiváltó APL sok évvel korábban halálos kimenetelűnek bizonyult, nem lehetett jó eredménnyel kezelni, de 1973-ban Bernard és munkatársai bemutatták, hogy az APL sejtek érzékenyek a daunorubicin kemoterápiára, amely később teljes remissziót eredményezett [Bernard és mtsai., 1973]. 1985-ben az APL-ben szenvedő betegek megkapták az első indukciós, ATRA + ATO-kezelést, amelyet évekkel később négy szakaszra fejlesztettek ki:

- 1) pre-ATRA
- 2) ATRA
- 3) ATO [Niu és mtsai., 1999]
- 4) ATRA + ATO szinergetikus terápia [Abaza és mtsai, 2017]

Az indukciós terápiák között ugyanakkor jellemző volt a napi két alkalom 45 mg/kg retinsav, amelyet napi 60 mg/kg Daunorubicin kezelés követett, három napig. Ezt 100 mg/kg CYT-ARAB intravénás infúzió követett hét napon keresztül, amelyet 2 kör arzén kezelés zárt [Sanz és mtsai, 2009; Powel és munkatársai, 2013].

### **All-transz-retinsav (ATRA)**

Az all-transz-retinsav A-vitaminból származik kétlépéses oxidáción keresztül [Duester és mtsai, 2008]. A retinsav szükséges az egészséges fejlődéshez. Ligandumként kötődik a RAR $\alpha$  receptorhoz, amelyen keresztül szabályozható számos gén expressziója. A DNS-ben az ATRA kötődik a retinsav-receptorhoz (RAR $\alpha$ ), konformációs változást vált ki, mely a génextpressziós változásokhoz vezet [Duester és mtsai, 2008].

Az APL-es betegek kezelésére szolgáló klinikai vizsgálatokban az all-transz-retinsav (ATRA) kezelés a legfontosabb, amellyel 80-90% -os remisszió érhető el. Az ATRA 3-5 nap elteltével indukálja a fúziós onkoprotein degradációját és a promieloid sejtek végső differenciálódását neutrofil granulocitákká [Bennet és mtsai, 1976; 1980 Fenaux és munkatársai, 2007; Ablain és munkatársai, 2011; Wiernik és mtsai, 2013]. Az ATRA-kezelés az APL-sejtek terminális differenciálódásával a betegek jelentős százaléknál remissziót és gyors felépülést eredményez, azonban az esetek 5-25% -ban az úgynevezett differenciálódási szindróma (DS) alakulhat ki [Frankel és mtsai, 1992, Flombaum CD és mtsai, 1996]. Ez a jelenség megnövekedett gyulladáshoz vezet [Tallman és mtsai, 2000; Luesink és mtsai, 2009]. Az ATRA kezelés több ezer gén expresszióját indukálhatja, amelyekben a szöveti transzglutamináz (*TGM2*) az egyik legjobban expresszálandó gén [Balajthy és mtsai, 2006; Csomós és mtsai, 2010].

### **Arzén-trioxid (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/ATO)**

Az irodalomban számos adat található meg arról, hogy az arzén-trioxid (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/ATO) elősegítheti az APL-beteg remisszióját [Zhu és mtsai, 2002; Ghavamzadeh és mtsai, 2005]. Az arzén használata jelátviteli útvonalak indukcióját eredményezi, képes transzkripciós faktorokat aktiválni, amelyek révén a NADPH-oxidáz rendszeren keresztül fokozható a reaktív oxigén formák (ROS) termelése, illetve a kaszpázok aktiválása [Miller és mtsai, 2002; Kawate és mtsai, 2007].

Az alternatív kezelésként klinikai vizsgálatokban alkalmazott ATO-val a sejtek részleges differenciálódása indukálható, miközben a ROS-termelés jelentősen megnövekszik, apoptózis iniciálódik [Chen és mtsai, 1997]. Sajnos a megnövekedett ROS-mennyiség a környező szövet roncsolódásához vezethet; ráadásul az arzén nem megfelelő adagolása erős citotoxikus hatást és a beteg korai halálát eredményezheti [Boukhenouna és mtsai, 2018; Chen és munkatársai, 2011].

Az ATO által indukált PML-RAR $\alpha$  konformációs változás után proteaszómális lebomlás történik. Ez a folyamat a sumo-iláláshoz köthető, mely a magasabb kináz-aktivitás után jelentkezik [Kogan és mtsai, 2000; Zhang és munkatársai, 2010; Sumi és munkatársai, 2010]

### **Differenciációs szindróma (DS)**

A differenciálódási szindróma vagy az úgynevezett retinsav-szindróma az ATRA-kezelés gyors és halálos következménye [Frankel és mtsai, 1992, Nim és mtsai, 2007]. Magát a szindrómát hirtelen láz, súlygyarapodás, pleura- és pericardium-kiürülések jellemzik az immunsejtek intersticiális pulmonális infiltrációjával. A leukociták száma kórosan magas a véráramban, és a túlzottan aktivált és differenciálódó neutrofilek bejutnak olyan lágy szövetekbe, mint például a szív, a tüdő, a vesék és a máj. A retinsav önmagában indukálhatja a gyulladáshoz vezető citokinek magas termelését. Ez a citokinvihar súlyosbítja az esetet a betegek halálát okozva. A gyulladáshoz vezető citokinek és kemokinek képződése mellett a CD45/CD11b és CD18 szintje szintén megemelkedett [Luesink és mtsai, 2010; Detmers és munkatársai, 1990].

### **ATRA + ATO**

Az arzént manapság széles körben használják a klinikai vizsgálatokban, mely célpontja a LIC-sejtek. A leukémiát iniciáló sejtek a csontvelőből származnak, azonban az ATRA-kezeléssel elérhető remisszió mellett a kórkép újboli kialakulása várható, mivel a LIC-sejteket sajnos nem eliminálnak teljesen. A remisszió után a betegség második vagy harmadik hulláma alakulhat ki így. Az arzén jelenléte révén elkerülhető ez a jelenség, a LIC sejtek teljesen eliminálódnak [dos Santos és mtsai, 2013; Hyun és munkatársai, 2019].

### **Szöveti transzglutamináz (TG2)**

A TG2 egy multifunkcionális enzim; különféle extra- és intracelluláris kompartmentekben detektálható. Intracellulárisan kimutatható a citoszólban, a sejtmagban, a mitokondriumokban és az endoplazmatikus retikulumban (ER). Működhet Ca<sup>2+</sup>-függő kereszt kötő enzimként, membrán GTP-ázként vagy akár szerin/treonin-kinázként is. Az extracelluláris mátrixban korábban beszámoltak arról, hogy a TG2 az integrinek ko-receptoraként is kimutatható [Kuo és mtsai, 2011; Gundemir és munkatársai, 2011; Fesus és munkatársai, 2002].

A TG2 pleiotrop hatású a jelátviteli folyamatokban, aktivitásához kalcium szükséges. Az enzim aktivitását a guanin-nukleotidok és más redox-folyamatok is szabályozzák. A kalcium vagy a GDP/GTP kötése konformációs változást eredményez, amely szabályozhatja az aktivitását

(nyitott és zárt konformáció). Ha a TG2 GTP-kötött, a konformációs változás a jelátviteli folyamatok szabályozása felé tolja ez a funkcionalitást.

A kalcium megkötése olyan nyílt konformációt eredményez, amely által a GDP/GTP a keresztköti funkciót követően nem képes az enzimhez kötődni. A TG2 katalitikus aktivitásához magas kalcium-szint szükséges. Normális körülmények között azonban a kalcium szintje alacsony a sejten belül, míg a GDP/GTP szint magasabb, így a keresztköti aktivitás gátolt.

Számos új kutatás számolt be arról, hogy az anti-TG2 antitestek jelenléte vagy az enzim keresztköti aktivitása kimutatható volt cöliákia és Huntington betegségekben is. Cöliákia esetén a betegek bél-nyálkahártyája TG2-pozitív volt, míg a gliadin-glutamin-maradékok keresztkötéssel erős immunogén választ eredményeztek, amely révén az erősen aktivált T-limfociták az enterociták felületét és rétegét károsítják [Marzari és mtsai., 2001; Martucciello és munkatársai, 2018; Hietikko és mtsai, 2018].

A szöveti transzglutamináz expressziója és transzamidációs aktivitása gyakran összefügg a gyulladásos válaszokkal. A *TGM2* gén expresszióját az úgynevezett „kanonikus és nem kanonikus” NF- $\kappa$ B útvonal is szabályozhatja. Az útvonal fontos az olyan gyulladást elősegítő molekulák előállításához, mint például a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , a monocita kemoatraktív protein 1 (MCP-1) és az IL-6 [Mangala és mtsai, 2005; Kumar és munkatársai, 2013].

## **ROS termelés**

A reaktív oxigén formák (ROS) kémiaiilag reaktív molekulák, amelyek nitrogén vagy hidrogén mellett oxigént is tartalmaznak. A csoportokat két fő csoportra osztják: nitrogén- és hidrogéntartalmú csoportokra. A peroxidok, a szuperoxid, a hidroxilcsoport, a szinglett oxigén és az alfa-oxigén a reakcióképes fajok legjellemzőbb megjelenési formái.

A ROS képes a sejtmembrán, a DNS és a fehérjék károsítására, citotoxikus hatással bír, és számos extracelluláris és intracelluláris folyamat révén termelődhet. A termeléshez elengedhetelen a mitokondriumok nagyobb aktivitása. A ROS-t számos immunsejt előállíthatja a nicotinamid adenin-dinukleotid-foszfát-oxidáz rendszer (NADPH-oxidáz rendszer) útján.

Az NB4 sejtekkel végzett kísérletek azt mutatták, hogy az ROS kiváltotta károsodás elkerülhető az intracelluláris reduktázokkal [Jing és mtsai, 1999]. A reaktív formák eltávolítását a redukált glutation (GSH) és a tioredoxin/tioredoxin-reduktáz (TrX/TrxR) rendszer hajtja végre [Lu és

mtsai, 2007]. Az ROS induktorok, például az ATO jelenlétében a semlegesítő rendszerek gátolva vannak, míg a ROS termelése növelhető [Schröder K. 2019].

### **Gyulladásos citokinek/kemokinek termelése**

A gyulladás az immunrendszer reakciója kórokozókra/patogénekre vagy mérgező anyagokra sugárzásra, célja a káros hatás eliminálása és a szövetek regenerációs folyamatának megindítása. Az immun interakciók kellően csökkentik a sérülést vagy a fertőzés veszélyét. Ez a csökkentő hatás lehetővé teszi a szövet homeosztázisának helyreállítását és az akut gyulladás kialakítását. Ez a biológiai válasz már a születés idején is megfelelően működik. A szövetek szintjén a gyulladást eritéma, duzzanat, hő, fájdalom és a szöveti funkciók romlása kíséri, melyet a lokális immun-, érrendszeri és gyulladásos sejtválaszok követnek a fertőzésre és sérülésre [Ferrero-Miliani és mtsai, 2007; Granger és munkatársai, 2010].

A szöveti makrofágok által termelt proinflammatorikus citokinek és kemokinek iniciálják a különböző immunsejtek bevándorlását a vérből. A transzmigráció megkezdéséhez a vérben levő sejteknek érzékelniük kell, ahol szükségesek. Az érzékelést a kapilláris endotélsejtek felületén található P- és E-szelektinek közvetítik, amelyeket az IL-1 $\beta$  vagy TNF- $\alpha$  gyulladáscsökkentő citokinek közvetítnek.

## **Célkitűzések**

Az NB4-es sejtek all transz retinsav (ATRA) kezelés hatására neutrofil granulocitákká differenciálódnak, mely folyamat során az egyik legnagyobb mértékben expresszálódó gén a kettes típusú transzglutamináz (TG2). Korábban munkacsoportunk kimutatta, hogy az enzim hiányában az NB4-es sejtek csökkent fagocitózis, adhézíós, migrációs és ROS-termelő képességet mutatnak

Elsődleges céloom a TG2 funkcionális vizsgálata volt. Az analízishez TALEN technológiával egy transzglutamináz mentes TG2-KO sejtvonalat hoztunk létre vad típusú sejtekből. Mind a vad típusú mind pedig a TG2-KD and TG2-KO sejtvonalakal munkám során megvizsgáltuk, hogy az ATRA kezelés hatására indukálódó TG2 enzim milyen formában járul hozzá a differenciációs szindróma (DS) kialakításához.

A biokémiai funkciók értelmezéséhez elsődleges céloom volt a korábban a laboratóriumunkban vizsgált gyulladásoos citokin/kemokin és ROS-képző aktivitásának meghatározása is annak érdekében, hogy a TG2 mennyisége, illetve jelenléte befolyásolja-e a DS mellékhatások súlyosságát. A gyulladás kialakulásának okát a szekretált fehérjék, illetve a gyulladásoos gén-expressziós szinten is céloom volt megvizsgálni.

Munkám másodík részében az ATRA indukált differenciációs eredmények alapján egy arzén-trioxiddal illetve egy TG2 inhibitorral való kombinált kezelés hatásainak vizsgálatát tűztem ki célul. Ennek érdekében a NB4-WT, TG2-C, TG2-KD es TG2-KO sejtek gyulladásoos citokin/kemokin illetve ROS-termelő képességét vizsgáltam meg.

## **Anyagok és módszerek**

### **Sejttenyésztés**

Az APL sejtvonalakat (DSMZ GmbH) RPMI 1640 HEPES-tartalmú tápfolyadékban (Thermo Fisher; Life Technologies) tenyésztettük, 10% (v/v) magzati szarvasmarha-szérummal (FBS) (Gibco, Paisley, Skócia), 2 mM L-glutamin és 1% (v/v) 100 U/ml penicillin-streptomycin és 1% (v/v) 100 mM nátrium-piruvát oldattal (Sigma-Aldrich, Inc) kiegészítve. A sejteket 37 ° C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében, normál sejttenyésztési körülmények között tartottuk fenn.

### *NB4 sejtvonalak generálása a vizsgálathoz*

- 1) NB4 WT (az APL sejtvonal vad típusa, vásárolt a DSMZ GmbH-től, Németország)
- 2) NB4 TG2-C (nem TG2-shRNS kontroll) [Csomós és mtsai, 2010]
- 3) NB4 TG2-KD (anti-TG2 shRNS) [Csomós és mtsai, 2010]
- 4) NB4 TG2-ha (vad típusú NB4 TALEN alapú elnémítása, heterozigóta TG2-KO)
- 5) NB4 TG2-KO (vad típusú NB4 TALEN alapú elnémítása)

A Talen Library Resource (Szöuli Nemzeti Egyetem) megtervezte a szöveti transzglutamináz gén (*TGM2*) plazmidjait. A transzfekció hatékonyságának igazolására zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) tartalmazó plazmidot és vörös fluoreszcens proteint (RFP) tartalmazó helyettesítő riporter plazmidot (pRG2S fluoreszcencia helyettesítő riporter PRG2S-CS) használtunk a LAMOBICS (GeneCopoeia, Labomics) cégtől (Nivelles, Belgium).

### **NB4 sejtek transzfekciója**

Az NB4 WT sejteket az Amaxa® Cell Line Nucleofector® V Kit segítségével transzfektáltuk a gyártó utasításai szerint. A transzfekciós folyamat során a plazmid DNS aránya 1:1:1 volt. A plazmid DNS maximális mennyisége nem haladta meg a csőben lévő 2 µg-t. A transzfekció hatékonyságát a GFP/RFP pozitivitás alapján értékeltük a transzfektált NB4 sejtekben.

### **Áramlások citometria és GFP pozitív sejtválogatás**

A sejteket elemeztük és szétválogattuk BD FACSAria™ III áramlási citométer segítségével (BD Biosciences, San Jose, CA). Az apoptotikus sejteket előremeneti szórással (FSC) és oldalsó szórással (SSC) különítettük el. A megfelelő válogatáshoz a 488 nm és az 561 nm lézereket alkalmaztuk, fokozott zöld fluoreszcens protein (EGFP) és a monomer-red-fluoreszcens protein (mRFP) gerjesztésére. Az EGFP/mRFP jeleket 530/30 nm és 582/15 nm sávszűrőkkel detektáltuk. A sikeresen transzfektált NB4 WT sejteket az EGFP és mRFP pozitivitás alapján választottuk ki, majd körülbelül 10–12 000 EGFP/mRFP kettős pozitív sejtet új tenyésztő csőbe osztottuk szét a további sejttenyésztés céljából.

### **Az NB4 sejtvonalak kezelése**

A korábban létrehozott (NB4 WT, NB4 TG2-C, NB4 TG2-KD) sikeresen csendesített NB4 TG2-KO sejtvonal felhasználásával a retinsavval történő differenciáltatást 11 napig végeztük. Kombinált terápiaként az ATRA-t és az ATO-t két koncentrációban, 0.5 és 2.0  $\mu\text{M}$ -ban alkalmaztuk 3 és 5 napig. A TG2 szerepének *in vitro* hasonlóságának kiértékelésére egy irreverzibilis TG2 inhibitor, NC9-et alkalmaztunk 30  $\mu\text{M}$  koncentrációban, ATRA-val vagy ATO-val együtt 3 és 5 napig. Az NC9 vegyület Jeffrey Keillor W. barátunk ajándéka volt.

### **A minták előkészítése Western blothoz**

Összesen  $1-2 \times 10^6$  sejtet gyűjtöttünk össze és 12 000 fordulat/perc sebességgel 4 °C-on 15 percig centrifugáltuk, majd a pelletet előhűtött 1x foszfátpufferolt sóoldattal (PBS) mostuk. A pelleteteket lízispufferrel (50 mM Tris, 1 mM EDTA, MEA, 0,5% Triton X 100, 1 mM PMSF) lizáltuk, amely proteáz inhibitor koktélt (Sigma-Aldrich) tartalmazott 1: 100 hígítási arányban. A lizátumokat 5-7 alkalommal homogenizáltuk ultrahanggal 40% -os ciklus intenzitása mellett (Branson Sonifer® 450). Szonikálás után a mintákat 12 000 fordulat/perc sebességgel 4 °C-on 15 percig centrifugáltuk. A kapott felülúszót összegyűjtöttük fehérjekoncentráció mérésre Bradford assay-vel (BIO-RAD). Az összegyűjtött tiszta felülúszó fehérjekoncentrációt 96 lyukú lemezeken (Wallac 1420 VICTOR2™ Multilabel counter) mértük Bradford-tesztel (BIO-RAD) 595 nm hullámhosszon. Mindegyik mintát háromszor mértük le, BSA standard kalibrálással (törzskoncentráció 0,5 mg/ml). A mintákat 2 mg/ml koncentrációig hígítottuk, és azonos térfogatú SDS denaturációs pufferrel elegyítettük (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerin, 10% MEA és 0,02% brómfenol-kék) majd 100 °C-on inkubáltuk 10 percig.

### **Citoszólikus és nukleáris frakciók előállítása**

Az összegyűjtött sejtpeletteket szuszpendáltuk előhűtött Nukleáris izolációs pufferben (Nuclei Isolation Kit - Sigma-Aldrich NUC101-1KT), kiegészítve proteáz inhibitor koktéllal (Sigma-Aldrich), PMSF-vel (Sigma-Aldrich) 100: hígítási arány és foszfátáz inhibitor koktéllal (Sigma-Aldrich) 1:50 hígítási arányban. Az újraszuszpendálás után a lizált mintákat 5 percig centrifugáltuk 500 rcf-en, 4 °C-on, majd a felülúszót félretettük mint citoszólikus frakció. A maradék pelletet még kétszer mostuk előhűtött, nukleáris izolációs pufferrel, kiegészítve inhibitorokkal. A felülúszó eltávolítása után a pelletet lízispufferben (50 mM Tris, 1 mM EDTA, MEA, 0,5% Triton X 100, 1 mM PMSF) lizáltuk, 7-10 alkalommal szonikáltuk/homogenizáltuk. A nukleáris és a citoszólikus frakciókat 12 000 fordulat/perc sebességgel 4 °C-on 20-25 percig centrifugáltuk. A kapott tiszta felülúszókat összegyűjtöttük a fehérjekoncentráció méréséhez, melyet nukleáris frakciónak tekintettünk.

## **Western blot**

Összesen 20-25 µg teljes fehérje/nukleáris/citoszólikus frakciót SDS-elektroforézissel futtatunk meg 10-15% SDS-poliakrilamid gélen, majd polivinilidén difluorid (PVDF) membránra (Millipore) transzferáltuk félszáraz/nedves blot módszerrel. 5% tejpor/1x Tris-pufferolt sóoldattal végzett blotolást és Tween 20 (TTBS) blokkolási eljárást végeztünk 1 órán át szobahőmérsékleten (vagy egy éjszakán át 4 °C-on). Különböző primer antitesteket használtunk, 0.5% tejporban 1x TTBS-sel hígítva, 1: 5 000–1: 10 000 hígítási arány mellett, és egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. A membránokat háromszor mostuk 1x TTBS-sel 15 percig szobahőmérsékleten, majd torna-peroxidázzal jelölt (HRP), affinitás-tisztítású kecske anti-egér IgG szekunder antitesttel (Advansta) inkubáltuk 1: 10.000 hígítási arány mellett 1 órán át szobahőmérsékleten. A fehérje sávokat ECL kemilumineszcencián alapuló módszerrel (Advansta) tettük láthatóvá. A blot képeket ProteinSimple AlphaImager® HP készülékkel készítettük/rögzítettük.

## **Citospin lemezek készítése**

A tárgylemezek (70% alkohol vagy metanol) előtisztítása után 10 µl homogén mintát és 90 µl 1x foszfáttal pufferolt sóoldatot (PBS) adtunk a Cytospin™ csőhöz (Shandon CYTOSPIN II, 6511 Bunker Lake Blvd. Ramsey, MN 55303, USA), majd 800 fordulat/perc sebességgel 3 percig centrifugáltuk. A lemezeket szobahőmérsékleten metanollal rögzítettük és előkészítettük a további festéshez Giemsa-May-Grünwald festékekkel. May – Grünwald és Giemsa (Molar Chemicals) festékeket desztillált vízzel hígítottuk 1:10 arányban. A korábban rögzített metanos mintákat 10 percig festettük may – grünwald-oldattal, majd hígított Giemsa-oldattal 5–30 percig. A tárgylemezeket desztillált vízzel mostuk, és szobahőmérsékleten 10 percig szárítottuk. A fénymikroszkópos képeket és a dokumentációt FLoid® Cell Imaging Station műszer (Life Technologies) segítségével készítetük el.

## **Nitroblue-tetrazolium (NBT) teszt**

Az NB4 sejtvonalak differenciálódását nitroblue-tetrazolium (NBT) redukciós teszttel (Sigma Aldrich), a gyártó utasításai követésével értékeltük. Az összes dokumentáció FLoid® Cell Imaging Station műszer (Life Technologies) segítségével készült.

## **Felszíni markerek detektálása áramlási citometriával**

4x10<sup>5</sup> sejtet 6 lyukú tenyésztő edényben ATRA-val; ATRA + ATO, ATRA + NC9 és ATRA + ATO + NC9 kombinációkban kezeltük. A sejtek kezelése 11 napig tartott. A kezelés végén előhűtött 1x PBS-sel mostuk a sejteket, majd 3000 fordulat/perc sebességgel 3 percig

centrifugáltuk. A pelleteket mostuk, és 1% PBS-t tartalmazó 2% szarvasmarha-szérum-albuminnal (BSA) inkubáltuk 15 percig, majd centrifugáltuk, mostuk és sötétben 2 órán át inkubáltuk a CD11c/CD11b jelöléssel ellátott fitoerytrinnel (PE) és fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt Selectin-L humán antitesttel 1:25 hígítási arányban (R&D Systems). A sejtek geometriai átlagos fluoreszcenciáját használtuk a CD11c/CD11b/Selectin-L felszíni expressziójának kiszámításához az egyes kezelések és a minták izotípus-kontroll értékei alapján. A kiértékeléshez WINMDI 2.9 szoftvert használtunk.

### **A szuperoxid aniontermelés meghatározása luminollal amplifikált kemilumineszcenciával**

A differenciált NB4 sejtvonalak által indukált reaktív  $O_2^-$  termelést kemilumineszcencia vizsgálat segítségével mértük L-012 festékkel (Sigma Aldrich). A reakció térfogata 100  $\mu$ l, amely  $1 \times 10^5$  sejtet és 5.0  $\mu$ l L-012-t (100  $\mu$ M) tartalmazott. Ezután 2  $\mu$ l PMA-t (100 nM) adtunk, majd az elegyet további 5 percig inkubáltuk, ezután kemilumineszcencia-mérést végeztünk 10 másodperces időközönként Synergy Multi-Mode mikrolemez-olvasóval (BioTek Instruments, Inc). A reakció által generált ROS (fény) képződését relatív luminométer egységekben (RLU) regisztráltuk, és az egyes minták fehérjekoncentráció-szintjével korrigáltuk.

### **Az NF- $\kappa$ B indukálta luciferáz aktivitás mérést**

A transzkripcióra vizsgálatára transzkripciós faktor-érzékeny lentivírus riporter rendszert (CLS-013-L8 -QIAGEN) tranziens és állandó transzfektálási módszerekben is alkalmaztuk. A lépéséhez a gyártó cég protokollja alapján hajtottuk végre. A luciferáz aktivitás mérést Bright-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay rendszer (Promega) alkalmazásával végeztük el. Az eredményeket Graphpad Prism 8.00 szoftver segítségével validáltuk, a normalizálási módszerek alkalmazásával, a sejtszám és a fehérjekoncentráció alapján.

### **Gén expressziós elemzés valós idejű kvantitatív PCR-rel (Q-PCR)**

A valós idejű kvantitatív PCR-mérésekhez az összes RNS-t a TRIzol<sup>®</sup> reagens (Invitrogen) segítségével izoláltuk, a cég utasításai szerint. A teljes RNS-t NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher, Waltham, MA USA 02451) számszerűsítettük. Mindegyik mintát 200 ng/ $\mu$ L-ig hígítottuk a reverz transzkriptáz PCR-hoz (RT-PCR). Az RT-PCR-t nagykapacitású cDNS reverz transzkripciós kittel (Thermo Fisher) végeztük 10  $\mu$ L minta + 10  $\mu$ l RT-reakció elegyében. A valós idejű Q-PCR reakcióhoz a következő TaqMan próbákat (ABI, Applied Biosystems, Waltham, MA USA 02451) használtuk: *TGM2*, *NCF2*, *GPPHox91*, *IL-1 $\beta$* , *MCP-1*, *TNF- $\alpha$*  és *GAPDH*. Az elemzést az ABI Prism 7900 (ABI, Applied Biosystems)

alkalmazásával végeztük. A relatív mRNS expressziós szinteket  $\Delta\Delta C_t$  módszerrel normalizáltuk a *GAPDH* szintjére.

### **Enzim-kapcsolt immunabszorbens vizsgálat (ELISA)**

A szekretált gyulladáscsökkentő citokinek és kemokinek meghatározását ELISA-val (deluxe ELISA, Biolegend) mértük. Mindegyik kezelés után a sejtek felülcsúszóját összegyűjtöttük, tízszeres hígítást végeztünk és 96 lyukú lemezekben analizáltuk MCP-1-re, IL-1 $\beta$ -ra és TNF- $\alpha$ -ra. Az ATRA és az ATRA + NC9 kezelt és az NB4 sejteket felülcsúszóit 11 napig gyűjtöttük és a Raybiotech Inc. cég segítségével humán citokin kvantitatív mérésével analizáltuk. Az elemzést követően a vállalattól kapott adatok a cég protokollja alapján normalizálva lettek.

### **Statisztikai analízis**

A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 8.00 verzióval végeztük, hallgatói T-teszttel és kétirányú ANOVA-val (Bonferroni posthoc teszt; \* P <0,05, \*\* P <0,01 és \*\*\* P <0,001 \*\*\*\* P <0,0001).

## Eredmények

### **A TG2 növeli az érő NB4 sejtvonalak fagocitotikus és antimikrobiális erejét**

Az NB4 sejtvonalakat differenciáltuk ATRA jelenlétében vagy TG2 inhibitorral kombinálva. Az eredmények azt mutatják, hogy a differenciálódási folyamat végbement, azonban TG2 hiányában vagy egy irreverzibilis TG2 inhibitor jelenlétében lassabban valósul meg. Az NB4 sejtvonalakban meghatároztuk a *TGM2* mRNS és a fehérje expresszióját; míg az NB4 TG2-KO sejtvonal nem expresszálta a TG2-t, a vad típusú és az NB4 TG2-C (víruskontroll) sejtvonalak nagymértékben expresszálták azt. 30  $\mu$ M NC9 hatására a TG2 mRNS expressziója nem mutatott szignifikáns különbséget az ATRA kezelésekhez viszonyítva.

### **Az ATRA indukálja az L-szelektin és a leukocita $\beta$ 2 integrin receptorok (CD11b, CD11c) expresszióját magas affinitású állapotukkal az NB4 sejtvonalak sejtfelszínén**

Eredményeink azt mutatták, hogy míg az L-szelektin, CD11b és CD11c expressziója szignifikánsan növekedett a 0. naptól a harmadik napig, majd a 11. napig szinte változatlan maradt a sejtfelszíni pozitivitás szempontjából, addig a sejtek átlagos fluoreszcencia-intenzitása jelentősen megnőtt a kezelések során. Sem a TG2 csökkent mennyisége, sem annak hiánya nem változtatta meg az L-szelektin, CD11b és CD11c sejtfelszíni expresszióját az ATRA-indukált differenciációban. A teljesen aktív indukált expressziós mintázat vizsgálatához PMA-t használtunk 20 percig, hogy megvizsgáljuk, lehet-e tovább növelni a felületi expressziót. A mérések azt mutatták, hogy a PMA nem volt képes tovább emelni a CD11b és CD11c sejtfelszíni expresszióját az alap expressziótól. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a retinsavkezelés nemcsak fokozta a CD11b és CD11c expresszióját a sejt felületén, hanem kiváltotta nagy affinitási állapotukat, melyeket CBRM1/5 és CD11c (3.9. Klón típusú) antitestekkel lehetett detektálni.

### **A retinsav által indukált TG2 elősegíti az NB4 sejtvonalak oxidatív fellobbanását**

Megállapítottuk, hogy a retinsav által indukált differenciálódás növeli az *NCF2/P91PHOX* mRNS expresszióját NB4 sejtekben a TG2 jelenlétében. A TG2-KD és a TG2-KO sejtek kevésbé expresszálták ezeket a géneket. A TG2 gátlásával az mRNS expresszió szignifikánsan alacsonyabb szinten maradt, ami jól tükrözi a TG2 hozzájárulását a NADPH-oxidáz rendszer működéséhez. A PMA-indukált teljes ROS-termelést a relatív fényegységben (RLU) mértük, normalizálva a sejtek 100  $\mu$ g-os fehérjetartalmára. Az NB4 WT és TG2-C sejtek szignifikánsan nagyobb mennyiségű ROS-t termeltek, mint a TG2-KD vagy a TG2-KO sejtek, míg a TG2 gátlása hasonló hatást eredményezett.

## **A TG2 tipikus gyulladási citokineket és kemokin expressziót indukál NF- $\kappa$ B és transzkripció aktiváció révén**

Az NB4 sejtekben a TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  és MCP-1 mRNS és fehérje expressziós mintázatát tekintve nagyon hasonló eredményeket mutattak a szöveti transzglutamináz expresszió szempontjából. Míg a magas TG2 expresszió megnövekedett mRNS és citokinek/kemokin fehérje expresszió kísérte, alacsony (NB4 TG2-KD) vagy a TG2 expresszió hiánya az NB4 TG2-KO sejt vonalban szignifikánsan alacsony szinten maradt mind az ELISA, mind a Q-PCR esetében. A gyulladási biomarkereket az ATRA differenciált NB4 WT, TG2-KD, TG2-KO és NB4 WT ATRA + NC9 kezelt sejtek felülírójából humán citokin kvantitatív többjelöléses ELISA segítségével azonosítottuk. A 200 fehérje közül 50 volt kimutatható az NB4-es sejtek felülírójában. Az 50 kimutatható fehérjéből 44 expresszáldott TG2-függő módon, amelyekből 18-at azonosítottunk NF- $\kappa$ B transzkripció faktor célgénekkkel, melyek megtalálhatók voltak az USA Boston NF- $\kappa$ B célgén-adatbázisában (Boston University Biology; 2018). Megállapítottuk továbbá, hogy a TG2 eltérő expressziós szintjei a sejt vonalakban a kezelése során az NF- $\kappa$ B promotor által vezérelt luciferáz riportter arányos aktivitásával jár, és a jól ismert exogén induktor, TNF- $\alpha$  nem volt képes tovább emelni azt. Ezen túlmenően, a TG2 gátlásával, az aktivitás szignifikánsan csökkenthető volt azokban a sejt vonalakban, amelyekben a TG2 expresszáldott.

## **A TG2 hozzájárul az NF- $\kappa$ B expressziójához és nukleáris transzlokációjához, amelyet jelentősen csökkent a TG2 inhibitor NC9**

Az 1  $\mu$ M ATRA + 30  $\mu$ M NC9 kezelt NB4 sejtek kevesebb mennyiségű TG2-et expresszáltak, mint azok a sejtek, amelyeket csak ATRA kezelést kaptak. Az NC9 a *TGM2* mRNS expresszióját azonban nem változtatta meg. Az ATRA differenciált sejtekben nemcsak az totál, hanem a citoszólikus és nukleáris frakciók is nagymértékben tartalmaztak TG2-t. Ugyanakkor az ATRA + NC9 kezelés szignifikánsan megnövelte citoszólikus TG2 és csökkentette nukleáris TG2 expressziót, a csak ATRA-val kezelt sejtekhez képest. Ezen túlmenően a teljes p65/RelA és a nukleáris mennyisége is csökkent a TG2 inhibitor jelenlétében. A foszfo (Ser536) - p65/RelA expressziója, amely a dimer p65/RelA komponensének „transzkripciósan aktív” formája, nagyon hasonló volt ahhoz, amit megfigyeltünk a TG2 fehérje esetében a totál, citoszólikus és sejt magi frakciókban. TG2 inhibitor jelenlétében a TG2 fehérje expressziójának csökkenését tapasztaltuk, melyet MG132-es proteozóma gátlóval vizsgáltunk meg. Amennyiben gátoljuk a fehérje lebontást, úgy a TG2 szintje nem változik.

### **Az ATO morfológiai és sejtszám-változásokat indukál az ATRA + ATO kezelés során differenciált NB4 sejtekben, dózisfüggő módon**

Eredményeink azt mutatják, hogy öt napos differenciálódás után az ATO idő- és dózisfüggő citotoxikus hatást vált ki, sérült és késői apoptotikus-nekrotikus NB4 sejteket eredményezve. A magasabb ATO-koncentrációk erősen társultak az apoptotikus és nekrotikus sejtek számának növekedésével. Magasabb apoptotikus arány volt kimutatható az ATRA + ATO 2.0  $\mu\text{M}$  kombinált kezelésnél, mint az ATRA + ATO 0.5  $\mu\text{M}$ , míg az differenciált sejtek száma alacsonyabb volt az NB4 WT és NB4 TG2-C sejt vonalakban. Összességében a Giemsa-May-Grünwald festés alapján magasabb fokú apoptózist vagy nekrozist figyeltünk meg a TG2-KD vagy a TG2-KO sejtekben.

### **Az ATRA és az ATO önmagában indukálja a ROS termelését és az NCF2 és GPphox91 mRNS expresszióját differenciált NB4 sejt vonalakban, amelyeket az ATO dózisfüggő módon változtat meg**

Mindkét gént, az *NCF-2/P67PHOX* és a *GP91PHOX* mRNS expressziós szinteket 1  $\mu\text{M}$  ATRA, 0.5  $\mu\text{M}$  és 2.0  $\mu\text{M}$  arzén után, és kombinálva, ATRA + ATO kezeléssel öt napig mértük. Megfigyeltük a TG2-függő mRNS-expressziót az ATRA kezelés után, míg az ATO-kezelések szinte hasonlókat eredményeztek az NB4 vad típusú sejtekben a retinsavhoz viszonyítva. Az irodalmi adatok alapján, amire számíthattunk, hogy az ATRA vagy az ATO önmagában is fokozhatja a ROS termelődését, a NADPH-oxidáz rendszer fokozásával megerősítettük ezt a jelenséget, de kombinációban (ATRA + ATO, 0.5 és 2.0  $\mu\text{M}$ ) a gén expressziója az értékek alacsonyak voltak, csak a kezeléseknél. Az *NCF2* és a *GP91PHOX* mRNS expressziós értékeit szinkronizáltuk a ROS termelődésével, különösen az ATRA + ATO 2.0  $\mu\text{M}$  kezelés után. Az NB4 sejt vonalakban azt találtuk, hogy ahol a TG2-t az ATRA kezelés indukálta, az *NCF-2/P67PHOX* és a *GP91PHOX* mRNS szignifikánsan alacsonyabb expressziós szintjét mértük az NC9 jelenlétében, összehasonlítva az ATRA kontrollokkal. Az ATRA + ATO + NC9 kezelt sejtekben az NC9 szignifikánsan csökkentette a ROS termelődését 5 nap után ATO koncentrációtól függő módon.

## **A TG2 jelenléte szabályozza a TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ és MCP-1 gének expresszióját és fehérje szekréciónak differenciált NB4 sejtekben**

Az ATO önmagában nem indukál gyulladáscsökkentő citokineket és kemokineket. Az MCP-1, IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  körülbelül 50%-kal alacsonyabb volt a kombinált ATRA + ATO 2.0  $\mu$ M-os kezelésnél, mint önmagában a retinsav esetében, de ezeket az értékeket tovább csökkentek TG2-mennyiségétől függő módon. Öt nap elteltével azt tapasztaltuk, hogy az NB4 vad típusú sejtek esetében az ATRA + ATO 2.0  $\mu$ M kezelés során az MCP-1, IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  termelés nagyobb mértékben csökkent (5x, 10x és 20x alacsonyabb értékekkel). Összehasonlítva a kontrollokkal) az NC9 kezelés során, különösen a TNF- $\alpha$  esetében, összehasonlítva az ATRA kezelés eredményeivel.

### **Diszkusszió**

Az all-transz-retinsav (ATRA) terápia az egyik leggyakrabban alkalmazott szer az akut promielocita leukémia (APL) kezelésére. Az ATRA indukálja a leukémia sejtek terminális differenciálódását neutrofil granulocitákká, míg az arzén-trioxidot (ATO) a közelmúltban egy alternatív, hatékony gyógyszerként alkalmazták az APL kezelésére. Az ATO kombinálva ATRA-val szinergikus hatást fejt ki, amely dóziszfüggő módon elősegíti az APL-es betegek túlélését. Az ATO transzkripciós faktorokon keresztül képes aktiválni a celluláris jelátviteli útvonalakat, amelyek reaktív oxigén formák (ROS) képződését eredményezik a NADPH-oxidáz rendszeren keresztül. Ezek az eredmények magyarázzák az arzén trioxid azon képességét, hogy részleges differenciálódást és apoptózist indukáljon, továbbá remissziót a PML-RAR $\alpha$  degradációjának megindításával APL-es betegekben [de Thé és mtsai, 2017].

Az ATRA-indukált sejt differenciálódás NB4/APL rendszerben jól modellezhető. A differenciálódási folyamat több gén modulálását foglalja magában, mely funkcionális neutrofil granulocitákat eredményez a folyamat végeztével. Az NB4 sejtek ATRA által indukált érésében az egyik legszabályozottabb gén a szöveti transzglutamináz (TG2). A TG2 expressziójának NB4 sejtekben (NB4 TG2-KD) történő csökkentése hatással volt a reaktív oxigén formák (ROS) termelésére; a citokin/kemokin mRNS és fehérje expresszióira, az érett neutrofil granulociták adhéziójára, migrációjára és fagocitikus képességére [Balajthy és mtsai, 2006; Csomós és mtsai, 2010].

A differenciálódási szindrómát hirtelen megjelenő láz jellemzi; pleurális és pericardialis folyadék; hipotenzió, érrendszeri kapilláris szivárgás, légzési zavar és a vér alvadási hiánya miatt súlyos vérzés [Larson és mtsai, 2003; Chen és munkatársai, 2011]. Ezt számos gyulladáscsökkentő citokin / kemokin, például a tumor nekrosis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), az interleukin-1 $\beta$

(IL-1 $\beta$ ) és a kemokinek, például a monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1/CCL2) felszabadulása váltja ki [Luesink és mtsai, 2009].

Az elmúlt évtized irodalmából tudjuk, hogy két lehetséges molekuláris mechanizmus felelős a súlyos mellékhatásokért:

- 1) az akut promieloid sejtek differenciálódási folyamata és
- 2) ezen differenciálódó sejtek infiltrációja a lágy szövetekbe.

Ezeknek a biokémiai folyamatoknak a sejtadhéziós molekulákra, például szelektinekre, integrinekre és oldható mediátorokra (gyulladáscsökkentő citokinek/kemokinek) van szükségük, amelyek kiváltják a receptorok aktiválását, és a nyugvó immunsejtek adhéziós/migrációs aktiválását. Az ATRA-indukált differenciálódás a gyulladásos citokinek/kemokinek és adhéziós molekulák fokozott expressziójával jár [Balajthy és mtsai, 2006; Luesink és munkatársai, 2009; Csomós és mtsai, 2010].

A pro- és gyulladásos citokinek/kemokinek termelése szerepet játszik a differenciált APL-sejtek gördülési folyamatában, stabil adhéziójában és infiltrációjában, hatalmas potenciállal jár az APL-sejtek által közvetített szervkárosodás szempontjából, ezt a folyamatot többször megfigyelték a differenciálódási szindrómában [Harada és mtsai., 1994; Luesink és mtsai, 2009]. A fő citokinek és kemokinek, például a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  és MCP-1/CCL2 transzkripciója az NF- $\kappa$ B útvonalon történik. Eredményeink azt mutatják, hogy az ATRA által indukált differenciálódás a gyulladásos citokinek/kemokinek magas expressziójával jár az mRNS és az NB4 sejtekben szekretált fehérjék szintjén, ami önmagában az ATO-kezeléssel nem kimutatható. Az NF- $\kappa$ B dimer magba történő transzlokációja különféle gyulladásos gének pozitív irányú szabályozását, majd termékeik szekrécióját eredményezik, beleértve a TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-9 és MCP-1. A TNF- $\alpha$ -t korábban 0,8–1,2 ng/L koncentrációban detektálták APL/DS betegekben, ami kapilláris szivárgást, valamint a tüdő, a szív és a veseműködés zavarát okozta [Tang és mtsai, 2017]. A differenciálódó APL/NB4 sejtek stimulálják extravazációjukat és különféle szervekbe történő migrációjukat gyulladásos citokinek, kemokinek és interleukinek (TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$ ) előállításával autokrin módon.

Az ATRA által indukált potenciális gyulladáshoz vagy gyulladáshoz citokinek / kemokinek teljes skálájának vizsgálata céljából egy Human 200 citokin-kvantitatív analízist (Raybiotech) használtunk, mely segítségével 11 napos retinsav-indukált differenciálódás által kiválasztott molekulák azonosítása és különféle csoportokba való besorolását tette lehetővé:

- 1) TG2-függő
- 2) TG2 és NF- $\kappa$ B függő
- 3) TG2-től független, de NF- $\kappa$ B-függő
- 4) TG2-függő, de NF- $\kappa$ B-független

A jól ismert NF- $\kappa$ B útvonalon termelődő citokinek és a kemokinek elemztük a humán citokin „array” eredményekkel összehangban. Az összes 480 molekula közül 50 olyan fehérjét találtunk, amelyek kimutathatók voltak a differenciált NB4 sejtek felülírójában. Az 50 kimutatható fehérjéből 44 expresszáldott TG2-függő módon, amelyekből 18-at azonosítottunk NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor célgénekként.

A vad típusú sejtekben, ahol a TG2 fehérje mennyisége magas szinten expresszáldik, az NF- $\kappa$ B dimer fehérje expressziója, valamint a foszforilált és transzkripciós aktív p65 expresszió együtt magas volt. A TG2 gátlása hatására a p50 és a foszfor-p65/RelA (Ser536) szignifikánsan alacsony szintjével, ami arra utalhat, hogy a TG2 expressziója az NB4 sejtek gyulladáshoz neutrofil granulocitákká alakulásával és az NF- $\kappa$ B dimer transzlokációjával hozható párhuzamba.

A citokinek és a kemokinek megnövekedett szekréciója mellett a differenciáló APL sejtek nagymértékben képesek reaktív oxigén formák (ROS) előállítására, ami károsítja a környező szöveteket. Az ATRA által indukált differenciációval összefüggő ROS-termelés a NADPH-oxidáz rendszer két elemének, az *NCF-2/P67PHOX* és a *GP91PHOX* emelkedett expressziója mellett megnövekedett ROS-termelést és ennek következtében súlyosabb szervkárosodás lehetőségét eredményezi. Az arzénterápia esetében az úgynevezett „oxidatív stressz” a kezelés egyik fő következménye, amelyet a reaktív oxigén formák indukálhatnak.

Az ATO önmagában kiválthatja az *NCF2/P67PHOX* és *GP91PHOX* mRNS expressziós szintjének növekedését, valamint a ROS termelését, hasonlóan az ATRA-hoz differenciált NB4 sejt vonalakban. Az ATO önmagában képes megindítani a sejtek apoptózist, hatalmas ROS-termeléssel, míg a gyulladáshoz citokintermelés sokkal kevesebb, mint az ATRA-kezelés esetében. Ezenkívül az ATO jelenléte nem indukálta a TG2-t. Az ROS képződése és a

mitokondriális membránpotenciál változása mellett az NB4 sejtekben az arzén morfológiai változásokat is eredményez [Zhang és mtsai, 2010]. Az apoptotikus sejtek száma az ATO-kezeléstől függően koncentrációtól és időtől függ. Eredményeink alapján az ATO-koncentráció citotoxikus még a kezelés korai szakaszában is, amikor meghaladja a 0.5  $\mu\text{M}$ -t. Mivel az arzén gyorsabban képes eliminálni a PML-komponenst, a kombinált terapiák az elmúlt évtizedben egyre nagyobb érdeklődést mutattak. Az ATO-kezelés másik olyan jótékony hatása, amely kombinációban elpusztítja a leukémiát iniciáló sejteket (LIC), elkerülve a betegség második / harmadik generációját [Dos Santos és mtsai., 2013].

Amikor a sejteket ATRA + ATO-val kezeltük, az NB4 WT és TG2-C sejtek nagyobb túlélési arányt mutattak, mint a csak ATO-val kezelt sejtek. Megállapítottuk továbbá, hogy az ATRA indukálta TG2 védőfehérjeként mutatkozik meg az ATO által kiváltott sejthalál ellen a differenciálódáskor. Az NB4 TG2-KD és TG2-KO sejtekben az ATRA + ATO kezelésknél magasabb sejthalál arányt detektáltunk, az egyre növekvő számú apoptotikus és nekrotikus sejtek formájában. Áramlási citometriával megvizsgáltuk az Annexin-V és a Propidium jodid százalékos arányát az ATRA + ATO kezelés során, és azt találtuk, hogy TG2 nélkül az Annexin-V pozitív sejtek száma és ezen keresztül az apoptózis szignifikánsan magasabb volt a vad típusú sejtekhez képest. Ezen adatok alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a csökkentett TG2 mennyiség fokozta az NB4 sejtek érzékenységét a kombinált ATRA + ATO kezeléssel szemben, szignifikánsan magasabb apoptotikus és nekrotikus arányokkal.

Az ATRA és az ATO önmagában is szignifikánsan növelheti a szuperoxid termelődését. A ROS termelésének kétszeres csökkenése volt kimutatható az ATRA + ATO-ra adott válaszban, összehasonlítva az egyszeri ATRA vagy ATO kezelésekkel. Míg az atipikusan expresszált TG2 a differenciált NB4 sejtekben javíthatja a NADPH-oxidáz rendszer működését, magas ROS termelést eredményezve, addig a TG2 hiány a TG2-KD vagy a TG2-KO sejtekben szignifikánsan alacsony ROS termeléssel jár, ami tovább tovább csökkenthető az ATRA + ATO kezelésekkel.

A gyulladást elősegítő és gyulladásoos fehérjetermelés szignifikánsan alacsonyabb volt a csökkent (TG2-KD), vagy még kevésbé a TG2 (TG2-KO) hiányában. Ezek az eredmények alátámasztják azt a hipotézist, miszerint az ATRA indukálta a TG2 expressziót, hogy pozitív módon befolyásolja az NF- $\kappa$ B útvonal aktivitását. A TG2 atipikusan magas expressziója mellett az NF- $\kappa$ B út szignifikánsan nagyobb aktivitást mutatott a luciferáz riporter génben mért ATRA kezelés során, míg a TG2 hiánya vagy csökkent expresszió alacsonyabb luciferáz riporter gén

aktivitást eredményezett. Az NC9 jelenlétében, amely a szöveti transzglutamináz visszafordíthatatlan transzamidáz helyspecifikus inhibitora, a TG2 konformációs egyensúlya a zárt GTP-kötő forma helyett a nyitott konformáció felé tolódik el, amelyet egy dezorganizált GTP-kötő hely jellemez [Eckert és mtsai , 2015]. Eredményeink szerint az NC9 által indukált konformációs változások a szöveti transzglutamináz fehérjében szignifikánsan csökkentik az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalat.

Az ATRA + NC9 kezelés hatására az összes TG2 fehérje mennyisége csökken, és a TG2 nukleáris transzlokációja csökken, növelve a citoszólikus TG2-t. A redukált nukleáris TG2 összefüggésbe hozható a csökkent p50, p65/RelA és foszfo-p65/RelA fehérjék teljes szintjével az NB4 WT sejtek magjában, míg a p65, a foszfo-p65 transzkripciósan aktív formájának szintje (Ser 536) szignifikánsan megnőtt a citoszólban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TG2 egy GTP-hez kötött, „zárt” konformációban átjuthat a magba, és következésképpen segíti a p65 transzlokációját is. Amikor az NC9 módosítja a TG2 szerkezetét, mind a TG2, mind a p65/RelA felhalmozódik a citoszólban, így az NF- $\kappa$ B út alacsony transzkripciós aktivitását eredményezve.

Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy a TG2 kulcsfontosságú eleme a gyulladás kialakulásában és a szövetek degradaációjában közvetetten, míg a TG2 gátlása az NC9-vel megakadályozhatja a retinsav-terápia ezen súlyos mellékhatásainak kialakulását. A TG2-függő folyamatok célzott elnyomása enyhítheti a retinoid kezelés általános és potenciálisan halálos toxicitását APL/DS-ben szenvedő betegek esetében, ami a jövőbeni potenciális terápiás stratégia lehet.



Nyilvántartási szám: DEENK/237/2020.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Jambrovics Károly  
Neptun kód: B0LXWU  
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Jambrovics, K.**, Uray, I. P., Keillor, J. W., Fésüs, L., Balajthy, Z.: Benefits of Combined All-Trans Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia Cells and Further Enhancement by Inhibition of Atypically Expressed Transglutaminase 2. *Cancers (Basel)*. 12 (3), 648-, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12030648>  
IF: 6.126 (2019)
2. **Jambrovics, K.**, Uray, I. P., Keresztessy, Z., Keillor, J. W., Fésüs, L., Balajthy, Z.: Transglutaminase 2 programs differentiating acute promyelocytic leukemia cells in all-trans retinoic acid treatment to inflammatory stage through NF-kB activation. *Haematol-Hematol. J.* 104 (3), 505-515, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2018.192823>  
IF: 7.116





**További közlemények**

3. Volkó, J., Kenesei, Á., Zhang, M., Várnai, P., Mocsár, G., Petrus, M. N., **Jambrovics, K.**, Balajthy, Z., Müller, G., Dóczy-Bodnár, A., Tóth, K., Waldmann, T. A., Vámosi, G.: IL-2 receptors preassemble and signal in the ER/Golgi causing resistance to antiproliferative anti-IL-2R[alfa] therapies.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (42), 21120-21130, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1901382116>  
IF: 9.412
4. Beyer, D., Tándor, I., Kónya, Z., Bátor, R. K., Roszik, J., Vereb, G., Erdődi, F., Vasas, G., Mikóné Hamvas, M., **Jambrovics, K.**, Máthé, C.: Microcystin-LR, a protein phosphatase inhibitor, induces alterations in mitotic chromatin and microtubule organization leading to the formation of micronuclei in *Vicia faba*.  
*Ann. Bot.* 110 (4), 797-808, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcs154>  
IF: 3.449

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 26,103**

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
13,242**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.08.17.

