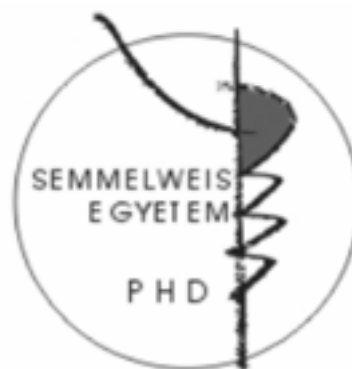


A Notch-jelátvitel elemei, funkcionális jelentősége és lehetséges kölcsönhatása a TGF β -jelúttal humán B-sejtes non-Hodgkin lymphoma és krónikus lymphoid leukémia sejtek túlélésében

Doktori tézisek

Dr. Hajdu Melinda

Semmelweis Egyetem
Patológiai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sebestyén Anna tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók:

Dr. Prohászka Zoltán tudományos főmunkatárs, M.D., Ph.D., D.Sc.
Dr. Koncz Gábor tudományos munkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Falus András egyetemi tanár, Ph.D., D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Csóka Monika egyetemi adjunktus, M.D., Ph.D.
Dr. Tordai Attila főorvos, M.D., Ph.D., D.Sc.

Budapest
2009

1. BEVEZETÉS

A non-Hodgkin lymphomák (NHL) a leggyakoribb malignus hematológiai betegségek; nagy részük (85%) B-sejtes eredetű. A normál és malignus B-sejtekben a proliferációt és az apoptózist számos jelátviteli út szabályozza, amelyek a sejtekben komplex jelátviteli hálózattá szerveződnek. Ezek a jelutak a molekuláris terápia ígéretes célpontjai lehetnek, specifikusabb, kevésbé toxikus gyógyszerek kifejlesztését eredményezhetik, a hagyományos terápia kiegészítőiként alacsonyabb dózisok alkalmazását tehetik lehetővé és a kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia kialakulását késleltethetik.

A Notch jelátviteli út az evolúció során konzervatívan megőrződött szignálút, amely a fejlődés, a differenciáció és tumorgenezis során kiemelt szerepet játszik. Emlősökben négy Notch-receptor ismert (Notch 1-4), amelyek sejtfelszíni transzmembrán fehérjék. A ligand (Jagged1,2, Delta-like 1,3,4 [Dll1,3,4]) kötődése során a receptort a membránban a γ -szekretáz komplex hasítja. A hasítás során keletkezett Notch intracelluláris domén a sejtmagba transzlokálódik, ahol az RBP- κ transzkripció faktorhoz kötődik. Az így létrejövő komplex transzkripcionális aktivátorként számos gén expresszióját szabályozza – közülük a legismertebbek a Hairy/Enhancer of Split (HES) és HES-related represszor protein (HERP) családba tartozó fehérjék.

A Notch-jelút központi patogenetikai szerepét T-sejtes akut lymphoblastos leukémiák (T-ALL) esetében részletesen leírták, a humán T-ALL-k legalább 50%-ában mutattak ki aktiváló Notch-receptor mutációkat. A Notch jelátvitel jelentőségét B-sejtes tumorokban – Hodgkin lymphomában, valamint két B-NHL entitásban, krónikus lymphoid leukémiában (CLL) és myeloma multiplexben – is feltételezték. CLL-ben leírták a Notch2-receptor over-expresszióját, és ennek tulajdonították a betegségre jellemző megnövekedett CD23-termelést, illetve a sejtek apoptózis-rezisztenciáját. Napvilágot láttak azonban ennek ellentmondó adatok is, miszerint az aktivált Notch-receptorok antiproliferatív és apoptotikus hatással rendelkeznek különböző érett és éretlen B-sejt-vonalakban.

A γ -szekretáz komplex farmakológiai gátlószerei (γ -szekretáz inhibitorok; GSI – mind a négy Notch-receptor hasítását és aktiválódását gátolják) ígéretes terápiás eszközök lehetnek Notch-dependens tumorok esetén, és T-ALL-es és metasztatikus emlőrákos betegek bevonásával már indítottak klinikai vizsgálatokat. A GSI-k *in vitro* is gátolják a proliferációt és apoptózist indukálnak több T- és B-lymphoid sejtvonalban.

A transzformáló növekedési faktor béta (TGFB) multifunkcionális citokinként számos biológiai folyamat – például a sejthalál, proliferáció, epithelialis-mesenchymalis tranzíció (EMT) és immunműködés – szabályozásában vesz részt. A TGFB egér és humán

lymphocytákban és több lymphoma sejtvonalban gátolja a sejtproliferációt és apoptózist indukál; a malignus lymphoid sejtek azonban gyakran elvesztik TGFb-érzékenységüket, annak ellenére, hogy a szignál elemei megtalálhatók a sejtekben. Az apoptotikus hatások iránti érzékenység visszaállítása fontos terápiás eszköz lehetne, a háttérben álló tényezők azonban nagyrészt ismeretlenek. Kimutatták, hogy a TGFb bizonyos hatásainak megvalósulásához szükség van a Notch-jelútra, ezért kézenfekvő az a feltételezés, hogy a Notch-szignál hibái a TGFb-érzékenység megváltozásához vezethetnek. A TGFb és a Notch út közötti kölcsönhatást több sejttípusban leírták, és kimutatták, hogy a TGFb citosztatikus és EMT-t indukáló képességének feltétele az ép Notch-szignál. A HES- és a HERP-családba tartozó génekről pedig leírták, hogy bizonyos sejtekben a TGFb transzkripcionális célgénjei lehetnek.

A TGFb-szignál központi eleme a Smad4, amelyről sokáig azt gondolták, hogy a jelút működéséhez feltétlenül szükséges. Az újabb adatok azonban azt bizonyítják, hogy a TGFb bizonyos hatásaihoz nincs rá szükség, és ezekben az esetekben valószínűleg alternatív jelutak lépnek működésbe. Mivel a TGFb a tumornövekedés és -terjedés során ambivalens módon viselkedik, a Smad4-független hatások feltérképezése a tumorterápia szempontjából fontos, specifikus molekuláris célpontok azonosítását segítheti.

Munkánkban a Notch-jelátviteli út elemeinek expresszióját kívántuk jellemezni normál B- és CLL sejtekben, és ezeknek klinikai és prognosztikai tényezőkkel való összefüggését is vizsgáltuk. *In vitro* B-NHL sejtvonalakon vizsgáltuk a Notch-szignál apoptotikus hatását, illetve a Notch és a TGFb jelút esetleges kölcsönhatását az apoptózis és a génexpresszió szabályozásában. Ezen kívül jellemeztük a TGFb-indukált apoptózis Smad4-függését B-NHL sejtekben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A Notch jelátviteli út jelentősége B-sejtes non-Hodgkin lymphomákban kérdéses, az erre vonatkozó irodalmi adatok pedig részben ellentmondók, ezért munkánk során ennek alaposabb megismerését tűztük ki célul. Kísérleteinkben a következőket kívántuk vizsgálni:

- a Notch jelút elemeinek expresszióját keringő normál B-sejtekben és CLL sejtekben, valamint kapcsolatukat a CLL klinikai és prognosztikai paramétereivel;
- a Notch-ligand és Notch-inhibitor túlélést befolyásoló hatását *in vitro* humán B-sejtes non-Hodgkin lymphoma sejtvonalakban;
- a HES-1 géntranszkripció TGFb-függő szabályozását B-NHL sejtvonalakban;
- a TGFb-érzékenység esetleges változását Notch-ligand és Notch-inhibitor jelenlétében B-NHL sejtvonalakban;
- a TGFb-indukált apoptózis Smad4-függését B-NHL sejtvonalakban.

3. MÓDSZEREK

3.1. Sejtszeparálás és klinikai adatok

24 CLL-es beteg, valamint egészséges normál donorok perifériás véréből izoláltunk B-sejteket mágneses MACS CD19 mikrogyönggyökkel, Histopaque-1077 grádiens centrifugálást követően. A B-CLL-es betegek következő klinikai adatait gyűjtöttük össze: kor, nem, Rai stádium, hemoglobin, lymphocytaszám, thrombocytaszám, alkalmazott terápia és progresszió.

3.2. Sejtenyésztés és kezelések

A HT58, Ramos, BL41, BJAB, U266, MED-B1 B-sejtes non-Hodgkin lymphoma sejteket, Jurkat akut T-sejtes lymphoid leukémia sejteket, valamint négy CLL-es perifériás vérmintát kezeltünk TGF β 1-gyel és ALK-inhibitorral. A Notch-jelút gátlásához DAPT γ -szekretáz inhibitor, ligand általi aktiválásához immobilizált Delta-like 4 ligandot (Dll4) alkalmaztunk. A HT58 sejteket etopoziddal, doxorubicinnal, vincristinnel, rituximabbal, staurosporinnal, bortezomibbal, PD98059 MEK1-inhibitorral, okadaiksavval és endothallal is kezeltük.

3.3. Áramlási citometria

A CLL mintákból áramlási citometriai vizsgálatot végeztünk anti-CD5-FITC, anti-CD38-PE és anti-CD19-PerCP fluoreszcens antitest jelölést követően. A sejtenyésztés során az apoptózis mértékét áramlási citometriával határoztuk meg. A $>2n$ mennyiségű DNS-t tartalmazó subG1 populációt tekintettük apoptotikus sejteknek. A sejtmorfológiát hematoxilin-eozinnal festett citospin lemezekon is vizsgáltuk.

3.4. A Smad4 funkcionális gátlása

A Smad4 gén lecsendesítéséhez szintetikus siRNS-t vagy p-EGFP-N1 vektorba klónozott domináns negatív Smad4 konstrukciót alkalmaztunk.

3.5. RT-PCR és valós idejű PCR

RNS-izolálást és reverz transzkripciót követően szemikvantitatív vagy Taq-Man alapú valós idejű PCR-rel vizsgáltuk a Notch-receptorok, -ligandok, a jelútba tartozó más gének (HES-1, HERP-1, Deltex, NRARP), a C-MYC, a TIEG és a Smad4 expresszióját. A génextpressziót a β -aktin, illetve GAPDH szintjéhez normalizáltuk.

3.6. Az IgV_H gének szekvenanciaanalízise

A CLL szomatikus mutációs státuszának meghatározáshoz 11 CLL mintából genomiális DNS-t izoláltunk, az IgV_H génszakaszokat a megfelelő V_H primerrel és konszenzus J_H primerrel PCR-rel amplifikáltuk, majd a termékeket kapilláris elektroforézissel szekvenáltuk. A szekvenciákat az IMGT/V-QUEST programmal határoztuk meg; a csírvonalbeli szekvenciával mutatott <98%-os egyezés esetén az IgV_H gént szomatikusan hipermutáltnak tekintettük.

3.7. Western-blot

A sejtekből készített fehérjelizátumot poliakrilamid-gélelektroforézissel választottuk szét, PVDF-membránra blottoltuk, majd anti-Smad4/DPC4, anti-Notch1, anti-ERK1, anti-JNK2, anti-foszfo-MAPK/ERK1/2, anti-foszfo-p38MAPK és anti-foszfo-SAPK/JNK elsődleges antitestekkel, ezt követően HRP-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A detektáláshoz ECL-t használtunk. A membránokat levetkőztettük, majd anti-β-aktin antitesttel is előhívtuk.

3.8. Foszfátázaktivitás mérése

A foszfátázaktivitást Non-Radioactive Serine/Threonine Phosphatase Assay Systemmel mértük a gyártó leírása szerint.

3.9. Statisztika

A statisztikai kiértékeléshez Mann-Whitney U-tesztet, rank korrelációs tesztet, kovariancia analízist és kétmintás párosított t-próbát alkalmaztunk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A Notch-jelátvitel elemeinek génexpressziós mintázata CLL és normál B-sejtekben; összefüggés a CLL klinikai és prognosztikai jellemzőivel

RNS alapú vizsgálataink szerint a Notch1 és Notch2 receptor mind a leukémiás, mind a normál B-sejtekben jelen van. A Notch1 fehérje jelenlétét Western-blot technikával is kimutattuk CLL sejtekben. Normál B-sejtekben mérsékelt Deltex-expresszió volt megfigyelhető, míg a CLL sejtek változó mértékben expresszáltak Deltex mRNS-t. A CLL minták egy részében kismértékű Delta1 ligand expressziót tapasztaltunk, a normál B-sejtekben azonban nem detektáltunk Delta1-t. Sem a normál B-sejtekben, sem a CLL sejtekben nem tudtunk kimutatni Notch3, Notch4, Jagged1 és Jagged2 mRNS-t. A normál B-sejtek expresszáltak HES-1-t, a CLL minták között azonban jelentős ingadozást tapasztaltunk: 19/24 esetben igen kis mértékű (a normál B-sejtek átlagához képest 0,1-17,5%), 4/24 esetben a normál B-sejtekkel összemérhető (67,6-115,3%), egy esetben azt meghaladó mértékű (339,8%) HES-1-expressziót detektáltunk. A normál B-sejtek medián HES-1 expressziója szignifikánsan magasabb volt, mint a CLL sejteké (95% vs. 6%; $p=0,022$).

A vizsgált gének expressziós mintázata és a CLL-es betegek klinikai és prognosztikus adatai (sejtfelszíni CD38-expresszió, illetve 11 esetben az immunglobulin nehézláncok [IgV_H] szomatikus hipermutációs státusza) között nem tudtunk korrelációt kimutatni. Az intenzív HES-1 expressziót mutató öt CLL-minta közül négyben <10G/l lymphocytaszámot találtunk.

4.2. A Notch-ligand és Notch-gátlás hatása B-NHL sejtvonalakban

RT-PCR-rel valamennyi vizsgált sejtvonalban detektáltuk valamely Notch-receptor és Notch-ligand expresszióját. A Dll4 és a DAPT hatását a Jurkat T-sejtes leukémia sejtvonalon teszteltük; a 48 órás kezelés után Dll4 ligand hatására a HES-1 expressziója növekedett, DAPT-kezelés során pedig mind a nyugalmi, mind a ligand indukálta HES-1 expresszió csökkent. A B-NHL sejtvonalak közül csak BJAB sejtekben tapasztaltunk számottevő változást a HES-1 expresszió mértékében 48 órás kezelést követően. A HERP-1 mRNS mennyiségét HT58 sejtekben mind a Dll4, mind a DAPT kis mértékben növelte; a többi vizsgált sejtvonalban nem tapasztaltunk szignifikáns változást.

A 72 órás Dll4 vagy DAPT-kezelés sem a vizsgált B-NHL sejtvonalakban, sem Jurkat sejtekben nem befolyásolta az apoptózis mértékét.

4.3. A TGFb hatásai B-NHL sejtvonalakban

A TGFb a HT58, BL41 és Ramos sejtvonalakban indukált apoptózist. A hatás a TGFbR-on keresztül jött létre, a receptorról induló szignált gátló ALK-inhibitor a TGFb-indukált apoptózist a kontroll szintre csökkentette.

A TIEG (amely a klasszikus TGFb-szignál ismert célgénje) expressziója csak a HT58 és Ramos sejtvonalban növekedett TGFb hatására, 1 óra kezelést követően. Míg a TGFb gyors HES-1 expressziónövekedést indukált HT58, Ramos és BL41 sejtekben, BJAB sejtekben csak kismértékben fokozódott a HES-1 transzkripció; a többi sejtvonal esetén nem tapasztaltunk változást.

4.4 A Notch-ligand és -inhibitor hatása a TGFb-indukált apoptózisra B-NHL sejtvonalakban

A TGFb a vizsgált sejtvonalak közül a HT58 sejtekben indukált apoptózist, amelyet az egyidejűleg alkalmazott DAPT szignifikáns mértékben csökkentett; HT58 sejtekben a DAPT hatása 1 μ M koncentrációig dóziszfüggően növekedett. A TGFb-val együtt adott Dll4 nem befolyásolta szignifikánsan az apoptózis mértékét. Hasonló jelenséget figyeltünk meg a BL41 sejtvonal esetén is. A TGFb-rezisztens BJAB, U266 és MED-B1 sejtvonalakban sem a Dll4, sem a DAPT nem állította helyre a TGFb-indukált apoptózis iránti érzékenységet. A TGFb-érzékeny Ramos sejtek Notch-ligandra és -inhibitorra adott válasza változó volt.

4.5. A DAPT hatása a drogindukált apoptózisra HT58 sejtekben

HT58 sejtekben a DAPT nem befolyásolta szignifikáns mértékben az etopozid, doxorubicin, rituximab, bortezomib, vincristin és staurosporin által indukált apoptózist.

4.6. TGFb-indukált génexpresszió-változások és DAPT-függésük HT58 sejtekben

Több, a TGFb vagy Notch jelút szempontjából fontos gén (HES-1, HERP-1, TIEG, NRARP, C-MYC) expresszióváltozását és ezek DAPT-függését követtük nyomon TGFb-val kezelt HT58 sejtekben (1h, 2h, 4h, 6h és 8h kezelés után). A TGFb-indukált HES-1 expresszió csúcsát a kezelés után egy órával érte el, majd 4 óráig meredeken csökkent, 6 és 8 óránál pedig kis mértékben emelkedett. Az egyidejű DAPT-kezelés a HES-1 mRNS mennyiségét 2 óránál kis mértékben, a későbbi időpontokban pedig nagyobb arányban csökkentette, de nem állította vissza a kontroll értékre. A TIEG gén mRNS-szintje HT58 sejtekben is csak kezelés után 1 és 2 órával volt szignifikánsan magasabb a kontroll értéknél; a TGFb-indukált TIEG-expressziót a DAPT nem változtatta szignifikáns mértékben.

A HERP-1 mRNS 1 óra TGFb-kezelés után kismértékben nőtt, szintjét pedig a DAPT csökkentette, azonban egyik változás sem volt szignifikáns. Az NRARP génexpresszió TGFb

hatására szintén kismértékű növekedést mutatott. A C-MYC expresszióját sem a TGFb, sem a DAPT nem befolyásolta jelentős mértékben.

4.7. Génexpresszió-változások Dll4-gyel kezelt HT58 sejtekben

A HES-1, HERP-1, NRARP és C-MYC mRNS-expresszió mértéke Dll4 hatására egyik vizsgált időpontban (1h, 4h, 24h, 48h) sem változott jelentős mértékben. (HES-1 esetében kezelés után 4 órával kismértékű növekedés figyelhető meg, a génexpresszió mértéke azonban még így is rendkívül alacsony maradt [$\Delta\text{CT}_{\text{HES-1}} \sim 35$ ciklus; $\Delta\text{CT}_{\text{GAPDH}} \sim 20$ ciklus].)

4.8. A TGFb és a kombinált kezelés hatása CLL sejtekben

Négy CLL-es perifériás vérmintából B-sejteket szeparáltunk, majd rövidtávú (48 óra) *in vitro* kultúrában a sejteket Dll4-gyel, DAPT-tal, TGFb-val, illetve ezek kombinációjával kezeltük. Dll4 hatására HES-1 indukciót figyeltünk meg, amelyet a DAPT gátolt. Az apoptózist mértékét egyik kezelés sem befolyásolta jelentősen.

4.9. A Smad4 gén lecsendesítése HT58 sejtekben

A Smad4 tranziens lecsendesítéséhez a HT58 sejteket siRNS-sel kezeltük; a transzfekció hatékonysága 95-98%-osnak bizonyult, a sejtek viabilitását az siRNS-transzfekció nem befolyásolta. Hat órával az siRNS-transzfekció után mind a Smad4 mRNS, mint a Smad4 fehérje mennyisége csökkent. Smad4 mRNS-t nem detektáltunk a TGFb-kezelés teljes időtartama alatt. TGFb hatására kontroll HT58 sejtekben megjelent a TIEG mRNS; siRNS-transzfekció után 6, illetve 24 órával TGFb-val kezelt sejtekben a TIEG mRNS-indukció elmaradt.

4.10. A Smad4 gátlása nem befolyásolja a TGFb-indukált apoptózist

A Smad4 siRNS-sel kezelt HT58 sejtekben a TGFb-indukált apoptózis mértéke nem változott. A Smad4 gátlását domináns negatív Smad4 vektor tranziens transzfekciójával is elvégeztük. A vektortranszfekció hatékonysága 65% volt és – az siRNS-transzfekcióhoz hasonlóan – a TGFb-indukált apoptózis mértékét nem befolyásolta.

4.11. MAP-kinázok és a PP2A foszfatáz szerepe a TGFb-indukált, Smad4-független apoptózisban

HT58 sejtekben TGFb-kezelés hatására rövid időn belül csökkent az aktív foszforilált ERK1/2 és foszforilált JNK mennyisége; a foszforilált p38MAPK, valamint a JNK és ERK kinázok össz mennyisége nem változott. Az ERK/JNK-inaktiváció funkcionális

jelentőségének tisztázásához a sejteket TGFb-val és MEK1 kináz inhibitorral kezeltük. A MEK1 kináz inhibitor és a TGFb hatása szinergistának bizonyult: 48 órával a kombinált kezelést követően az indukált apoptózis mértéke olyan magas volt, mint 72 órával csak TGFb kezelést követően. 72 órával a kombinált kezelés után a sejt kultúrák gyakorlatilag csak apoptotikus és nekrotikus sejteket tartalmaztak. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a kinázok gátlása az apoptózis programját elősegíti, illetve felgyorsítja.

A TGFb a PP2A aktivációjához vezetett a szignál korai, iniciátor fázisában (20 perccel és 1 órával TGFb-kezelést követően), és a későbbi fázisban is, 48 órával TGFb-kezelést követően, az apoptotikus effektor mechanizmusok kezdetével egyidőben. A PP2A funkcionális szerepének vizsgálatához a TGFb-kezelést első 4 órában okadaiksavval (általános foszfatazinhibitor) és endothallal (az alkalmazott dózistartományban a PP2A gátlószere) egészítettük ki. A kombinált kezelés a TGFb apoptotikus hatását szinte teljes mértékben gátolta.

5. MEGBESZÉLÉS

A daganatkutatás történetében új korszakot nyitott a túlélést szabályozó, gyakran a jelátviteli utakat érintő molekuláris folyamatok feltárása, amelyek a célzott terápia számára célpontokat kínálhatnak. Akut T-sejtes leukémiákban ilyen terápiás célpontot jelenthet a Notch-jelút. Abban az esetben, ha a Notch-jelút aktivációja B-sejtes daganatokban is a túlélést elősegítő tényezőnek bizonyulna, akkor a jelátvitelt gátló GSI-k itt is új alternatívát jelenthetnének. A Notch farmakológiai gátlásának klinikai bevezetése előtt azonban szükség van a jelút elemeinek, aktivitásának és biológiai hatásainak részletes feltérképezésére különböző típusú B-sejtes non-Hodgkin lymphomákban.

Vizsgálataink alapján humán keringő CLL sejtekben és a normál B-lymphocytákban a Notch jelátvitel elemeinek génexpressziós mintázata nagyrészt hasonló. A jelút aktivitására a HES-1 célgén mRNS mennyiségét vizsgálva következtettünk: a CLL minták nagyobb részében jóval alacsonyabb HES-1 expressziót mértünk, mint normál B-sejtekben. Csak öt CLL esetben detektáltunk a többitől eltérő, a normál B-sejtekével összevethető HES-1 mRNS-expressziót. A vizsgált gének mRNS expressziója, és a CLL-es betegek klinikai paraméterei és prognosztikus markerei között nem találtunk statisztikai összefüggést. A mi adataink tehát nem támasztják alá a Notch2-receptor kóros felhalmozódását és aktiválódását a perifériás vérben keringő CLL sejtekben. Természetesen tudatában vagyunk annak, hogy rendkívül fontosak lennének a párhuzamos, mRNS és fehérje szintű vizsgálatok, ez utóbbinak azonban gátat szab a sejtekből nyerhető kis fehérjemennyiség, illetve a kereskedelembe kapható antitestek korlátozott alkalmazhatósága. A szöveti kötetekben – pl. a nyirokcsomókban – található CLL sejtek jelátviteli aktivitását eddig még nem jellemezték, de nem kizárt, hogy a mikro környezetben található Notch-ligandok aktiváló hatása számottevő lehet.

A B-NHL sejtvonalak kifejeznek Notch-receptorokat, ezért a ligandfüggő aktiváció, valamint a jelút gátlásának célmolekulái adottak. *In vitro* kísérleteinkben a Dll4 Notch-ligand, valamint a DAPT γ -szekretáz-inhibitor apoptotikus hatásait vizsgáltuk B-sejtes lymphoma vonalakon. Önmagában sem a Dll4, sem a DAPT nem befolyásolta az apoptózis mértékét az általunk vizsgált sejtvonalakban. Úgy tűnik tehát, hogy a Notch-szignál nem központi, általános szabályozó tényező az apoptózis szempontjából B-sejtes non-Hodgkin lymphomákban. Természetesen a Notch-érzékenység sejtvonalspecifikus lehet, és irodalmi adatok szerint bizonyos B-sejtes sejtvonalakban a jelút gátlása apoptózist indukál, míg más sejtvonalakban éppen ellenkezőleg: a jelút aktivációja vezet sejtciklus-gátláshoz és apoptózishoz.

Az utóbbi években több adat jelent meg, amely a Notch és a TGFb jelút együttműködésére szolgáltat bizonyítékot, de B-sejtes lymphomák esetében a két jelátviteli út kapcsolatát még nem vizsgálták. Kísérleteinkben a TGFb-rezisztens B-NHL sejtvonalakban a Dll4 vagy DAPT hozzáadása nem állította helyre a TGFb-érzékenységet. A TGFb-érzékeny HT58 és a BL41 sejtvonalban azonban a DAPT szignifikáns mértékben csökkentette a TGFb-indukált apoptózist – ez szintén nem támasztja alá azt a feltevést, miszerint a Notch a lymphomasejtek túlélését segítené elő. Ezekben a sejtvonalakban tehát a TGFb apoptotikus hatásának kifejtéséhez részben szükség lehet a Notch jelútra. A TGFb, a Dll4 és a DAPT apoptotikus hatását perifériás vérből szeparált CLL sejteken is vizsgáltuk. Rövidtávú *in vitro* kultúrában, 48 óra kezelés után önmagában egyik szer sem befolyásolta az apoptózis mértékét, és kombinált kezelés során sem tapasztaltunk változást. Eredményeink ellentmondanak annak a nemrég publikált közleménynek, amelyben leírták, hogy *in vitro* kultúrában GSI-kezelés hatására fokozódik, Jagged1 liganddal kezelt sejtekben pedig csökken az apoptózis CLL sejtekben. A GSI-kezelésben tapasztalt különbségeket magyarázhatja esetleg az alkalmazott GSI eltérő típusa és dózisa, de az ellentmondások tisztázásához további vizsgálatokra van szükség.

A GSI-k természetesen más vegyületekkel együtt, kombinációban is alkalmazhatók lehetnének, ha bebizonyosodna, hogy valamely más kemoterápiás szer hatását elősegítik. HT58 sejtekben a DAPT GSI több apoptózist indukáló szerrel kombinációban adva azok apoptotikus hatását nem módosította. Adataink ezért fokozott óvatosságra intenek, és a GSI-k több fajtájának gondos, dóziszfüggő, a lymphomák típusától függő, lehetőleg *in vivo* tesztelésének fontosságát támasztják alá.

A Notch-szignál legismertebb célgénje a HES-1, illetve a HES és a HERP családba tartozó transzkripciós faktorok. Saját kísérleteink során – a Dll4 és a DAPT teszteléséhez alkalmazott Jurkat sejtvonalon kívül – csak B-JAB sejtekben változott a HES-1 expresszió mértéke Dll4, illetve DAPT hatására. Ennek háttere egyelőre tisztázatlan; elképzelhető, hogy a sejteken található Notch-receptorok affinitása a Dll4 ligandokhoz eltérő, illetve a különböző receptoroktól induló jelátvitel más, HES-1-független jelutakat aktivál.

A HES és HERP gének transzkripcionális szabályozásában nem csak a Notch szignál vesz részt. Saját adataink alapján a HES-1 mRNS-expressziót B-sejtes non-Hodgkin lymphomák bizonyos típusaiban szabályozhatja a TGFb, valószínűleg közvetlenül, transzkripcionális szinten. Kísérleteinkben a TGFb kezelés hatására megfigyelhető HES-1 indukció kétfázisú volt; a DAPT a HES-1 génexpressziót csak a második fázisban, részlegesen gátolta. A TGFb-indukált HES-1 expresszió tehát korai fázisában nem, későbbi fázisában viszont részben Notch-függő lehet bizonyos B-sejtes lymphomákban.

Az epithelialis-mesenchymalis tranzíció során TGFb kezelés hatására nemcsak a HES-1, hanem a HEY-2/HERP-1 és HEY-1/HERP-2 gén transzkripciója is fokozódik. Az általunk vizsgált HT58 sejtvonalban a HERP-1 mRNS expressziója nem emelkedett szignifikáns mértékben TGFb hatására, így valószínűbbnek tűnik, hogy ebben a sejtvonalban a HERP-1 nem a TGFb célgénje. Érdekes módon a HERP-1 expressziója Dll4-kezelés hatására esetünkben csupán a HT58 sejtekben nőtt kismértékben, de ugyanezt tapasztaltuk DAPT-kezelést követően is. Ennek magyarázata az lehet, hogy a Notch-célgénnek sejt típusonként eltérőek.

A HES-1 transzkripciós faktornak a B-sejtes lymphomák biológiai folyamataiban betöltött szerepéről keveset tudunk. *In vitro* modellünkben a TGFb azokban a sejtvonalakban fokozta a HES-1 gén átírását, amelyekben apoptózist is indukált, ezért felmerül annak a lehetősége, hogy a HES-1 szükséges az apoptózishoz. Ezzel összhangban áll az a megfigyelésünk, hogy a DAPT a TGFb-indukált HES-1 mRNS szintjét csökkentette a kezelés után 6-8 órával, és a TGFb-indukált apoptózist részben gátolta a HT58 sejtvonalban.

A HES-1 és HERP-1 génen kívül három másik olyan gén expresszióját is jellemeztük, amely a TGFb (TIEG), a Notch (NRARP) vagy mindkét jelút (C-MYC) szabályozása alatt állhat. Adataink szerint a TIEG csak a TGFb szignálútba tartozik, és – a HES-1-től eltérően – nem jelent kapcsolódási pontot a TGFb és a Notch között. Az NRARP-ot a Notch út target génjeként írták le, HT58 sejtekben azonban sem a Dll4, sem a DAPT nem befolyásolta mRNS-szintjét; TGFb-kezelt sejtekben csak kismértékű növekedést tapasztaltunk, és ez nem volt elég jelentős ahhoz, hogy az NRARP-ot a TGFb targetjének tekintsük. A haematolymphoid sejtek közül eddig T-sejtekben írták az NRARP-ot mint Notch-célgént, így elképzelhető, hogy Notch-függő szabályozása ezekre a sejt típusokra jellemző.

Akut T-sejtes leukémiákban a C-MYC a Notch1 közvetlen target génje lehet, megnövekedett szintje pedig a kóros sejtek túlélését biztosítja. A C-MYC gén ugyanakkor a TGFb jelút célpontja is lehet, down-regulációja pedig a TGFb citosztatikus tulajdonságainak érvényesüléséhez elvileg szükséges. Ezen irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a két jelátviteli út B-sejtes non-Hodgkin lymphomákban is szabályozhatja a C-MYC gén transzkripcióját. Az általunk vizsgált B-NHL sejtvonalakban azonban egyszer sem tapasztaltunk változást a C-MYC génexpresszió mértékében – sem Notch-ligand, sem Notch-inhibitor, sem pedig TGFb hatására.

A B-NHL sejtek apoptotikus szabályozásában jól ismert a TGFb szerepe, a TGFb sokrétű működésének megvalósulásához pedig a Smad4 fehérjét sokáig nélkülözhetetlennek gondolták. Az utóbbi években azonban kiderült, hogy a szabályozó funkciók egy része Smad4-független. Kísérleteinkben a TGFb-indukált apoptózis Smad4-függését vizsgáltuk B-

NHL sejtvonalakban. A Smad4 lecsendesítéséhez tranziens, szintetikus siRNS-t használtunk, amelynek alkalmazásával a Smad4 mennyiségének csökkenését tudtuk kimutatni, mind mRNS, mind fehérje szinten. Bebizonyosodott, hogy B-NHL sejtekben a TGFb Smad4 hiányában is képes apoptózist indukálni. Vizsgálatainkkal elsőként igazoltuk, hogy a TGFb-indukált apoptózis lehet Smad4-független jelenség B-sejtes lymphomákban.

Saját megfigyeléseink szerint ebben az esetben az apoptózishoz alternatív jelutak – a PP2A foszfatáz aktivációja, illetve az ERK és a JNK MAP-kináz inaktivációja – szükségesek. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a TGFb-indukált apoptózis során a TGFb-kezelést követően a PP2A foszfatáz aktiválódik, míg az ERK1/2 és JNK kinázok inaktiválódnak. Ezen folyamatok funkcionális jelentőségét is igazoltuk: a MAP-kinázok gátlása a TGFb-indukált apoptózis mértékét fokozta, illetve az apoptózis bekövetkeztéhez szükséges időt lerövidítette, a PP2A foszfatáz gátlása pedig ellenkezőleg: lecsökkentette a TGFb-indukált apoptózis mértékét. Feltételezzük, hogy a TGFb-indukált apoptózis során a TGFb a PP2A foszfatázt aktiválja, amely a MAP-kinázok defoszforilálásán keresztül a túlélést szabályozó jelek eredőjét az apoptózis irányába tolja – ez a közvetlen összefüggés a TGFb-indukált apoptózis folyamatában azonban még bizonyításra vár.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy B-NHL-ben a Notch-jelút nem játszik központi apoptotikus szabályozó szerepet, azonban a TGFb hatásait módosíthatja: TGFb-érzékeny sejtekben az indukált apoptózishoz részben szükség lehet a Notch-jelútra, és esetleg a HES-1 közös, időben összehangolt szabályozására. A TGFb Smad4-függő és Smad4-független hatásainak háttérben álló jelutak pontos jellemzésével pedig hatékonyabb és specifikusabb támadáspontok azonosítására nyílhat lehetőség a lymphomák terápiájában.

Manapság, amikor a célzott, személyre szabott terápiák kifejlesztésére törekszünk, újra és újra szembesülnünk kell azzal, hogy a vonzó támadáspontokat kínáló jelátviteli utak rendkívül összetettek. Egy jelátviteli rendszer több, alternatív utat igénybe vehet, amelyeken keresztül eltérő hatásokat valósíthat meg, és közben más jelutakkal is kölcsönhatásba kerül – minden sejttípusban kicsit másképp. Éppen ezért törekednünk kell arra, hogy ennek a komplex hálózatnak a történéseit abban a rendszerben vizsgáljuk, amibe szeretnénk beavatkozni. Reméljük, hogy ehhez a mi munkánk is hozzájárult.

6. AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI – KÖVETKEZTETÉSEK

- A Notch-receptorok és ligandok expressziója a normál B-sejtekben és a CLL sejtekben hasonló. A Dll1 ligand és a Deltex szabályozó molekula expressziója kismértékben eltér.
- A normál B-sejtekben a HES-1 mRNS nagyobb mértékben expresszálódik, mint a CLL minták nagy részében.
- A Notch-receptorok és -ligandok, a HES-1 és a Deltex expresszió intenzitása nem mutat összefüggést a CLL klinikai és prognosztikai paramétereivel.
- A Notch-jelút gátlása vagy ligandfüggő aktivációja önmagában nem befolyásolja az apoptózist B-sejtes non-Hodgkin lymphoma sejtvonalakban *in vitro*.
- A TGFb-érzékeny B-NHL sejtvonalakban a DAPT csökkenti a TGFb-indukált apoptózist. A TGFb-rezisztens sejtvonalakban sem a DAPT, sem a Dll4 nem állította helyre a TGFb-érzékenységet.
- A DAPT a különböző drogok által indukált apoptózis mértékét nem befolyásolja HT58 B-lymphoma sejtekben.
- A HES-1 a TGFb transzkripcionális target génje bizonyos B-NHL sejtvonalakban. A TGFb-indukált HES-1 expresszió kétfázisú, korai fázisában Notch-független, későbbi fázisában részben Notch-függő lehet.
- A HERP-1, C-MYC és NRARP gén kifejeződését sem a Notch, sem a TGFb nem befolyásolja jelentősen B-NHL sejtekben. A TIEG csak a TGFb célgénje, expresszióját a Notch nem befolyásolja.
- HT58 B-lymphoma sejtekben a TGFb-indukált apoptózis Smad4 hiányában is lezajlik. Munkánk során elsőként igazoltuk, hogy a TGFb-indukált apoptózis lehet Smad4-független.
- A TGFb-indukált, Smad4-független apoptózis során kiemelt jelentősége van az ERK1/2 és JNK MAP-kinázok inaktivációjának és a PP2A foszfatáz aktivációjának.

7. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

7.1. A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

1. **Hajdu M**, Sebestyén A, Barna G, Reiniger L, Jánosi J, Sréter L, Várkonyi J, Demeter J, Kopper L. Activity of the notch-signalling pathway in circulating human chronic lymphocytic leukaemia cells. *Scand J Immunol.* 2007;65:271-5. **IF: 1,928**
2. *Sebestyén A, ***Hajdu M**, Kis L, Barna G, Kopper L. Smad4-independent, PP2A-dependent apoptotic effect of exogenous Transforming Growth Factor beta1 in lymphoma cells. *Exp Cell Res.* 2007;313:3167-74. (*Sebestyén A. és Hajdu M. mindketten első szerzőnek minősülnek.) **IF: 3,695**
3. **Hajdu M**, Kopper L, Sebestyén A. Notch-regulation of TGFb-induced apoptosis and gene expression in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Cytokine* – közlésre elküldve.

7.2. A disszertációtól független saját közlemények:

1. Kohut E, **Hajdu M**, Gergely P, Gopcsa L, Kilián K, Pálóczi K, Kopper L, Sebestyén A. Expression of TGFβ1 and its signaling components by peripheral lymphocytes in SLE. *Pathol Oncol Res.* 2008. Epub ahead of print. **IF: 1,272** – 2007.
2. **Hajdu M**, Luttun A, Pelacho B, Burns CT, Chase L, Gutiérrez-Pérez M, Jiang Y, Lenvik T, Vas V, Uher F, Sebestyén A, Verfaillie C. Transcriptional characterization of the notch signaling pathway in rodent multipotent adult progenitor cells. *Pathol Oncol Res.* 2007;13:302-10. **IF: 1,272**
3. Végső G, Sebestyén A, Paku S, Barna G, **Hajdu M**, Tóth M, Járny J, Kopper L. Antiproliferative and apoptotic effects of mycophenolic acid in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Res.* 2007;37:1003-8. **IF: 2,561**
4. Sebestyén A, **Hajdu M**, Kopper L. TGFb – a Janus-arcú citokin: a TGFb tumorszuppresszor és tumorpromoter szerepének kettőssége. *Orvostudományok.* 2006;3:169-183.
5. Kopper L, **Hajdu M**. Tumor stem cells. *Pathol Oncol Res.* 2004;10:69-73. Review.
6. **Hajdu M**, Puskás É, Sipos A, Barta A, Pálóczi K, Uher F. Homogeneous immunoglobulins following allogeneic bone marrow transplantation. *Acta Haematol.* 2003;109:124-8. **IF: 1,874**
7. Uher F, **Hajdu M**, Vas V. Self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: a molecular approach (a review). *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2003;50:3-21.
8. Vas V, **Hajdu M**, Pálóczi K, Uher F. Alternative views of tissue stem cell plasticity. *Haematologia.* 2002;32:175-90. Review. **IF: 0,293**

7.3. Előadások, poszterek

1. **Melinda Hajdu**, Anna Sebestyén, László Kopper. Characterization of Notch and TGFb induced early HES-1 and TIEG expression in B-cell lymphomas. EMBO Meeting – Cellular Signaling and Molecular Medicine; May 29 – June 4, 2008; Dubrovnik, Croatia. Poster abstract: P65.
2. **Melinda Hajdu**, Anna Sebestyén, László Kopper. Interacting effect of TGFb and Notch signaling in B-cell lymphomas. ECCO 14 – the European Cancer Conference; September 23-27, 2007; Barcelona, Spain. Poster abstract: P-382.
3. **Hajdu Melinda**. A TGFb és a Notch jelátviteli út kölcsönhatása B-sejtes lymphomákban. Semmelweis Egyetem Doktori Iskola, PhD Tudományos Napok; Budapest, 2007. április 12-13. Absztrakt szám: E-IV/3.
4. **Melinda Hajdu**, Anna Sebestyén, Gábor Barna, Lilla Kis, László Kopper. Potential cross-talk of TGFb and Notch-signaling in B-cell lymphomas. International Conference of Immunogenomics and Immunomics; October 8-12, 2006; Budapest. Poster abstract: P-1-58.
5. **Hajdu Melinda**, Sebestyén Anna, Kopper László. A Notch jelátviteli útvonal aktivitása keringő chronicus lymphoid leukémiás sejtekben. 65. Patológus Kongresszus; Hajdúszoboszló, 2006. október 5-7. Absztrakt szám: P2-5.
6. A. Sebestyén, G. Barna, L. Kis, **M. Hajdu**, L. Kopper. Smad4 independent signaling pathways in TGFb1 induced apoptosis of lymphoma cells. EACR 19 Meeting; 1-4 July, 2006; Budapest. Poster abstract: P-163.
7. **Melinda Hajdu**, Anna Sebestyén, László Kopper. Expression of Notch pathway genes in chronic lymphocytic leukemia cells. FEBS Special Meeting – Molecular Signaling; May 26 – June 1, 2006; Dubrovnik, Croatia. Poster abstract: P-72.
8. **Hajdu Melinda**. A Notch jelátviteli út elemeinek expressziója krónikus lymphoid leukémiás sejtekben. Semmelweis Egyetem Doktori Iskola, PhD Tudományos Napok; Budapest, 2006. április 13-14. Absztrakt szám: P-I/10.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként és legfőképpen Dr. Sebestyén Annának, témavezetőmnek szeretnék köszönetet mondani, aki megtanított az alapos és kritikus tudományos kutatás módszereire, és aki segítőkészségével és ötleteivel mindig lelkesen támogatott és mellettem állt. Nélküle ez a munka nem jött volna létre!!!

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Kopper László professzor úrnak, hogy az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Ph.D. programjában lehetőséget biztosított a kutatáshoz, hogy munkámat támogatta és értékes tanácsaival segítette.

Köszönettel tartozom Dr. Matolcsy András professzor úrnak, hogy további szakmai fejlődésemet segítette és segíti az Intézetben.

Köszönetet szeretnék mondani Csorba Gézánnak a sejttenyésztésben és a kísérletek kivitelezésében nyújtott pótolhatatlan segítségéért, és még inkább szerető gondoskodásáért.

Köszönöm Dr. Barna Gábornak az áramlási citometriához nyújtott segítséget.

Köszönet a Matolcsy-labor jelenlegi és volt tagjainak, Dr. Reiniger Lillának, Dr. Bödör Csabának, Dr. Timár Botondnak és Dr. Fülöp Zsoltnak segítségükért.

Köszönet Dr. Imre Gergelynek a tudományos és kevésbé tudományos eszmecsérékért.

Köszönöm a Kopper-labor többi tagjának, Mallászné Bagi Györgyinek, Dr. Berczi Lajosnak és Márk Ágnesnek, hogy munkámat baráti légkörben végezhettem és végezhetem.

Köszönöm Kis Lillának és Péterfia Bálintnak önkéntes segítségüket.

Köszönettel tartozom a Kovalszky-labornak a technikai és módszertani kérdésekben nyújtott tanácsaikért.

Köszönöm Dr. Uher Ferencnek tudományos pályám elindulásához nyújtott pótolhatatlan segítségét.

Köszönet Dr. Demeter Juditnak, Dr. Jánosi Juditnak, Dr. Sréter Lídiának és Dr. Várkonyi Juditnak a klinikai mintákért és adatokért.

Köszönöm az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet összes dolgozójának az adminisztratív teendőkhöz és a mindennapi problémákhoz nyújtott segítséget.

A doktori értekezés az OKM Deák Ferenc Ösztöndíj támogatásával készült.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családomnak, barátaimnak (és egyéb állatfajtáknak:), hogy lelkesen biztattak, nem engedték, hogy feladjam, és hogy mellettem álltak és állnak jó és rossz pillanataimban.