

УДК 577.152.23

ТРАНСГЛУТАМИНАЗА 2-ГО ТИПА УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ГОМЕОСТАЗА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

© 2020 С. Оливеро^{1#}, Дж.С.О. Бельтран^{1,2#}, Л. Оккигросси¹, В. Бордони³, К. Аграти³, М. Д'Элетто¹, Ф. Россин¹, П. Борелли², Г.П. Амаранте-Мендес⁴, О. Демидов⁵, Н.А. Барлев⁵, М. Пьячентини^{1,3,5*}

¹ Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", 00133 Rome, Italy; E-mail: mauro.piacentini@uniroma2.it

² Clinical and Experimental Hematology Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ National Institute for Infectious Diseases I.R.C.C.S. "Lazzaro Spallanzani" 00149 Rome, Italy

⁴ Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵ Laboratory of Molecular Medicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, 194064 St. Petersburg, Russia

Поступила в редакцию 09.07.2020

После доработки 21.07.2020

Принята к публикации 21.07.2020

Трансглутаминаза 2-го типа (TG2) – мультифункциональный белок, участвующий в различных биологических процессах, направленных на поддержание клеточного гомеостаза, таких как клеточная гибель и аутофагия. Сейчас появляется все больше исследований, подтверждающих важную роль аутофагии в регуляции гемопоэза. Основываясь на этом, мы решили изучить *in vivo* роль TG2 в гемопоэзе при нормальных условиях и в условиях недостатка питательных веществ. Мы обнаружили, что у мышей, нокаутных по TG2, наблюдается уменьшение числа и скорости дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге. В данной работе мы показали, что, вероятнее всего, подобные эффекты на кроветворную систему обусловлены TG2-зависимыми нарушениями аутофагии. Более того, активация аутофагии при голодании предотвращала остановку дифференцировки гемопоэтических предшественников у TG2-нокаутных мышей. Также мы показали, что в отсутствие TG2 значительно нарушена активация RhoA/ERK1/2 пути, который необходим для регуляции гомеостаза гемопоэтических предшественников в красном костном мозге. Таким образом, наше исследование расширило знания о TG2, обнаружив новую роль этого фермента в регуляции гемопоэза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: трансглутаминаза 2-го типа, гемопоэтические стволовые клетки, аутофагия.

DOI: 10.31857/S0320972520100048

ВВЕДЕНИЕ

Начало кроветворной системы дают гемопоэтические стволовые клетки (HSC). Ключевым свойством HSC является их способность к самообновлению, что обеспечивает поддержание популяции недифференцированных клеток, спо-

собных созревать в различные типы кровяных клеток, необходимых в данный момент организму [1]. HSC представляют собой гетерогенную популяцию, которую можно разделить на долгоживущие (LT, Long-Termed) и короткоживущие (ST, Short-Termed) HSC в зависимости от их потенциала к самообновлению [2]. LT-HSC составляют лишь ~0,05% от клеток красного костного мозга (BM) взрослой мыши, однако они способны обеспечивать гемопоэз на протяжении всего времени жизни организма [3]. Напротив, ST-HSC представлены в большем количестве в BM, но имеют ограниченную способность к самообновлению [3]. HSC дифференцируются в мультипотентные клетки-предшественники (MPP, multipotent progenitors), которые теряют способность к самообновлению, но способны к пролиферации и дальнейшей дифференцировке [4–6]. MPP дают начало клонально ограниченными предшественникам: клеткам-предшествен-

Принятые сокращения: BM – костный мозг; CFU – колониеобразующие единицы; HSC – гемопоэтические стволовые клетки; LT-HSC и ST-HSC – долгоживущие (LT, Long-Termed) и короткоживущие (Short-Termed) HSC; KO – мыши, нокаутные по TG2; LK – Lin⁻ c-Kit⁺ гемопоэтические клетки, обогащенные миелоидными и мегакариоцитарно-эритроидными предшественниками; LSK – Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺ гемопоэтические клетки, содержащие LT-HSC, ST-HSC и MPP; MPP – мультипотентные клетки-предшественники; PHSC – предшественники HSC; TG2 – трансглутаминаза 2-го типа; WT – мыши дикого типа.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

никам миелопоэза и клеткам-предшественникам лимфоцитопоэза [7–9]. HSC совместно с другими клетками и внеклеточным матриксом формируют «нишу» HSC [10, 11], где через межклеточные взаимодействия и секрецию хемокинов и цитокинов [12, 13] осуществляется регуляция HSC [12, 14–17]. «Ниши» HSC очень чувствительны к стрессу [18], инфекциям и воспалительным процессам [19].

Аутофагия – высококонсервативный каталитический процесс деградации внутриклеточных элементов в лизосомах, направленный на поддержание клеточного гомеостаза [20, 21]. Аутофагия участвует в поддержании жизнеспособности HSC, защищая их от метаболического стресса [22–24]. После лишения HSC стимуляции цитокинами *ex vivo* или при голодании *in vivo* в них значительно повышался уровень аутофагии, чего не наблюдалось у их короткоживущих миелоидных потомков [25]. С этим согласуются и другие данные, показывающие снижение уровня аутофагии в целом по мере возрастания уровня дифференцировки клеток [25, 26]. В физиологических условиях взрослые HSC находятся в «спящем», гликолитическом состоянии до тех пор, пока они не будут призваны восполнить запасы кровяных клеток [27]. Высокий уровень аутофагии/митофагии представляется крайне важным для покоящихся клеток, так как избавляет их от поврежденных митохондрий и активных форм кислорода (АФК) [28]. Нарушения в процессе аутофагии вызывают накопление митохондрий и переход HSC в активированное метаболическое состояние, что провоцирует их дифференцировку в миелоидные клетки через эпигенетическую регуляцию [29]. Делеция генов *Atg5* и *Atg7* вызывает снижение количества HSC и нарушение поддержания их гомеостаза [21, 26], что ассоциировано с повышенной продукцией АФК, индукцией апоптоза [30] и в итоге ведет к недостаточности костного мозга [21, 26]. Мы продемонстрировали, что трансглутаминаза 2-го типа (TG2, transglutaminase type 2) играет важную роль в созревании и деградации аутофагосом как в нормальном, так и в стрессовом состояниях [31–33]. Аналогичную роль TG2 играет в митофагии [34] и регуляции метаболизма митохондрий [35]. TG2 – уникальный, повсеместно распространенный многофункциональный член семейства трансглутаминаз, способный катализировать Ca^{2+} -зависимые посттрансляционные модификации белков, такие как межмолекулярные сшивки, аминирование белков и дезаминирование глутамина [36]. Также TG2 может проявлять ГТФазную, АТФазную, протеинкиназную и протеин дисульфидизомеразную активности [37–42]. Благодаря

своей широкой функциональности TG2 вовлечена во многие патофизиологические процессы [37, 43, 44].

Сведения о том, что ряд внутриклеточных процессов, модулирующих гомеостаз HSC, также регулируется TG2, побудили нас исследовать роль этого фермента в поддержании гомеостаза стволовых клеток. Для этой цели мы проанализировали состав HSC популяций, полученных из ВМ мышей дикого типа (WT), и мышей, нокаутных по TG2 (KO) в нормальных условиях и при недостатке питательных веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В экспериментах использовались мыши-самцы инбредные C57BL/6, дикого типа (WT) и нокаутные по TG2 (KO), возраст 2–3 месяца [45]. Всех животных содержали в свободных от патогенов условиях в виварии University of Rome «Tor Vergata» (Италия) с естественным циклом освещения при 20 °C и свободным доступом к воде и пище. Для эксперимента с активацией аутофагии часть мышей имели свободный доступ к пище, а часть была подвержена голоданию в течение 24 ч.

Клетки костного мозга. Клетки костного мозга (ВМ) были получены путем промывания медуллярной полости бедренной и большеберцовой кости культуральной средой Iscove («Sigma® Chemical Company», США) содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки после отрезания эпифиза. Клетки центрифугировали при 1500 rpm в течение 5 мин при 4 °C, фракцию красных кровяных телец лизировали на льду с 0,2% NaCl в течение 20 с, затем с 1,6% NaCl в течение 20 с, затем промывали с PBS («Gibco», США) и считали количество клеток при помощи гемоцитометра.

Оценка колониеобразующих единиц (CFU). Для оценки функциональности популяции HSC, изолированных из мышей WT и KO, был выполнен анализ колониеобразующих единиц (CFU). Для каждой мыши ($n = 3$ самца в каждой группе) клетки ВМ рассаживали в количестве 10 000 клеток на чашки Петри (диаметр 35 мм) и культивировали в среде, содержащей метилцеллюлозу (MethoCult™ GF M3434, «StemCell Technologies», Канада) [46]. MethoCult™ GF M3434 – специальная среда, предназначенная для поддержания оптимального роста и дифференцировки эритроидных клеток-предшественников (CFU-E, BFU-E), гранулоцитарно-макрофагальных клеток предшественников (CFU-GM, CFU-G, CFU-M) и промиелобластов (CFU-GEMM). Культуры клеток инкубировали

при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ в течение 2 и 12 дней, после чего чашки наблюдали под микроскопом, идентифицировали и подсчитывали образовавшиеся колонии. За колонии считали группы клеток ≥30 штук.

Цитометрическое определение HSC и предшественников HSC (PHSC). Для отличия HSC от других клеток костного мозга была проведена проточная цитометрия с комбинацией окрашивания маркеров клеточной поверхности [47]. Каноническая клеточная стратегия, используемая для анализа популяции HSC, включает в себя первую элиминацию дифференцированных клеток с использованием маркеров, идентифицирующих дифференцированные клетки крови, так называемый lineage cocktail с антителами против примерно восьми маркеров дифференцировки, называемых Lin-селекцией, в сочетании с положительным отбором для маркера, который, как известно, экспрессируется на HSC, таких как Kit1 (K) и Sca-1 (S). Среди гемопоэтических клеток было проведено разделение на Lin⁻ c-Kit⁺ (LK), обогащенные миелоидными предшественниками и мегакариоцитарно-эритроидными предшественниками, и Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺ (LSK), содержащие долгосрочные HSC, краткосрочные HSC и мультипотентные предшественники MPP [5, 48]. Для обнаружения HSC и PHSC все клетки ВМ были помечены антителами, как описано Ema et al. [49]. Все антитела были приобретены у компании «BD Biosciences», США за исключением Lin⁻ («Biotin-antibody cocktail», США) и вторичного антитела anti-Biotin («Miltenyi Biotec®», США). 3 × 10⁶ клеток ВМ (для каждого образца) сначала инкубировали с Biotin-antibodies cocktail (Lin): (anti CD-5; Ter-119; Gr-1 (Ly-6G/C); CD45R (B220); CD11b⁺) 10 мин при 4 °C, промывали PBS и затем инкубировали еще 10 мин в присутствии anti-biotin-PE, Sca-1 PE-Cy^{TM7} и cKit PerCP-CyTM 5.5. Чтобы отличить LT-HSC, ST-HSC и MPP (PHSC) клетки, были также добавлены антитела CD90.1 (Thy-1.1)-APCy-7 и Flt3/Flk-2 лиганд AP, с которыми инкубировали 15 мин при 4 °C. Для анализа мы использовали FACS CANTO II (4 laser, «Becton-Dickson», США). Для проверки результата был использован способ Fluorescent Minus One (FMO). Было получено 3 × 10⁶ событий для каждого образца и 1 × 10⁵ событий для FMO контролей. Данные были обработаны в программе FlowJo v.10.6.

Иммуноблоттинг популяции клеток ВМ. Экспрессия белков TG2, ERK, pMEK, p21, p27 и p53 была проанализирована во всей популяции клеток ВМ. Клетки ВМ, изолированные из мышцей WT и KO, промывали 3 раза в PBS (pH 7,4) и лизировали с буфером RIPA («Pierce Biotechno-

logy Inc.», США), содержащим смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз («Sigma-Aldrich Corp.», США). Количество белка в полученных лизатах определяли по методу Брэдфорда с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. В каждую лунку наносили по 30 мкг белка в буфере Laemmli, разделение проводили в 10–12,5% SDS-полиакриламидном геле, после чего проводили перенос на нитроцеллюлозную мембрану («Millipore Corporation», США) в системе мокрого переноса («Bio-Rad Laboratories Inc.», США). Мембраны инкубировали в 5%-ном растворе обезжиренного молока в T-PBS (PBS + 0,05% (v/v) Tween 20) в течение 1 ч. Затем мембрану инкубировали с первичными антителами в разведении 1/1000 («Cell Signaling Technology», США) в течение ночи. На следующий день мембраны трижды промывали с T-PBS, после чего инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Bio-Rad Laboratories Inc.», США, разбавление 1/5000), в течение 1 ч при комнатной температуре. После трехкратной отмывки с T-PBS в течение 10 мин мембраны промывали с помощью реагентов ECL kit («Amersham ECL WesternTM Advance Blotting Detection», США). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на приборе «Amersham ECL WesternTM Advance Blotting Detection», США. Результаты нормировали по интенсивности хемилюминесценции β-актина (1/40 000 анти-β-актин, «Cell Signaling Technology», США) и выражали в произвольных единицах.

Статистический анализ. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Данные были проверены на нормальность, достоверность различий проверяли *t*-тестом Стьюдента и однофакторным дисперсионным тестом (1 way Anova). Значение *p* < 0,05 считалось статистически достоверным. Анализ проводили с использованием программы GraphPad Prism версии 5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие TG2 влияет на дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток. Нокаутные по TG2 мыши, в целом, жизнеспособны и фенотипически нормальны, но в зрелом возрасте в условиях стресса демонстрируют ряд дефектов, таких как умеренная непереносимость глюкозы, нарушение фагоцитоза апоптотических клеток [50, 51] и аутофагии [32, 52]. Чтобы изучить влияет ли отсутствие TG2 на HSC и/или предшественники гемопоэтических стволовых клеток (PHSCs/MPP), мы выделили и охарактеризова-

ли клетки костного мозга от мышей WT и KO (рис. S в Приложении).

Как и ожидалось, белок TG2 полностью отсутствует в клетках BM мышей KO (рис. 1, a). Примечательно, что измерение общего числа клеток в костном мозге показало, что мыши KO демонстрируют заметное снижение клеточности по сравнению с мышами WT (рис. 1, b). Эти данные побудили нас проанализировать, повлияло ли уменьшение количества клеток BM на популяцию HSC. Клетки BM, изолированные из мышей WT и KO, были помечены антителами Lin cocktail (CD-5; Ter-119; Gr-1(Ly-6G/C); CD45R (B220), CD11b⁺), Sca-1, c-Kit и проанализированы методом проточной цитометрии (рис. 1, c). Мы обнаружили значительное увеличение популяции LSK мышей KO по сравнению с WT (рис. 1, d). LSK популяция включает в себя HSC, но она по-прежнему неоднородна и содержит MPP, LT-HSC и ST-HSC. Для определения относительного количества этих клеток внутри LSK популяции были использованы антитела CD90.1 (Thy-1.1) и Flt3/Flk-2 лиганд – для характеристики клеток LT-HSC, ST-HSC и MPP (рис. 1, c). Результаты показали, что хотя популяция LT-HSC увеличивается у мышей KO по отношению к мышам WT (рис. 1, e), ST-HSC (рис. 1, f) и MPP (рис. 1, g), клетки показывают противоположное поведение. Очевидное уменьшение этих абсолютных чисел может свидетельствовать о возможном нарушении их клеточной дифференцировки.

Далее мы проанализировали способность HSC к пролиферации и дифференцировке *in vitro* с помощью анализа колониеобразующих единиц (CFU), используя среду Methocult (GF M3434) (см. Материалы и методы) (рис. 2, a). После 48 ч культивирования клеток мы наблюдали изменения роста эритроидных предшественников с заметным уменьшением числа больших взрывообразующих единиц (BFU-E), содержащих ранние клетки-предшественники, и более дифференцированные миеломонобласты (CFU-E), которые формируют меньшие колонии у мышей KO (рис. 2, b). В то время как после 12 дней культивирования мы наблюдали значительное уменьшение числа CFU-G колоний, содержащих гранулоциты. Для остальных типов колоний существенной разницы не было (рис. 1, c). Эти данные указывают на то, что TG2 может влиять на процесс дифференцировки от предшественника GM к зрелым гранулоцитарным клеткам.

Эти данные указывают на то, что экспрессия TG2 участвует в дифференцировочной способности LT-HSC по отношению к красным и белым кровяным клеткам.

Влияние отсутствия TG2 на экспрессию генов в клетках BM. Чтобы понять молекулярные механизмы, ответственные за наблюдаемые различия в количестве LSK клеток между мышами KO и WT, мы проанализировали возможные изменения в регуляции баланса покоя/пролиферации. Было показано, что в процессе гемопоэза в HSC активируются пути MEK/ERK и PI3K, а фосфорилирование MEK1 активированным ERK противодействует активации AKT/mTORC [53]. В соответствии с этим выводом мы провели вестерн-блот анализ всей популяции клеток BM для выявления уровня активации белков MEK/Erk1/2, участвующих в поддержании покоя HSC [53, 54]. Интересно, что у мышей KO наблюдалась постоянная активация MEK/Erk1/2 пути, что выражалось в повышенном уровне фосфорилирования белков MEK1/2 и ERK1/2 (рис. 3, a). Также есть сведения о том, что TG2 необходима для активации ERK1/2, JNK1 и p38gamma MAP киназ через посттрансляционные модификации RhoA во время нейронной дифференцировки, индуцированной ретиноевой кислотой [55]. Вдобавок к этому, RhoA играет важную роль в регуляции клеточного цикла HSC за счет влияния на микроокружение [56]. Чтобы подтвердить связь между экспрессией TG2 и влиянием RhoA на HSC в BM, мы детектировали их экспрессию у мышей KO и WT.

Данные, представленные на рис. 3, a, демонстрируют, что уровень RhoA значительно увеличен у мышей KO. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что влияние TG2 на RhoA/ERK1/2/Map киназный сигнальный путь может быть компенсаторным физиологическим механизмом. Мы также измерили уровни p53, p21 и p27, чтобы посмотреть может ли отсутствие TG2 сказываться на регуляции клеточного цикла. Однако мы не обнаружили существенных изменений в уровне этих белков (рис. 3, b), таким образом предполагая, что отсутствие TG2 не влияет на пролиферацию клеток BM.

Влияние отсутствия TG2 на гемопоэтические клетки в условиях дефицита питательных веществ. Учитывая тот факт, что TG2 вовлечен в регуляцию аутофагии и контроль TG2 имеет отношение к гомеостазу HSC в BM, мы решили проверить может ли недостаток питательных веществ влиять на дифференцировку HSC. Для этой цели мы проанализировали модуляцию клеток BM у мышей WT и TG2 KO, которых кормили нормально или не давали еды в течение 24 ч. Интересно, что снижение количества клеток BM, наблюдаемое в отсутствие TG2, может быть значительно уменьшено голоданием (рис. 4, a). В то время как у мышей WT не было обнаружено никакого влияния голодания на ко-

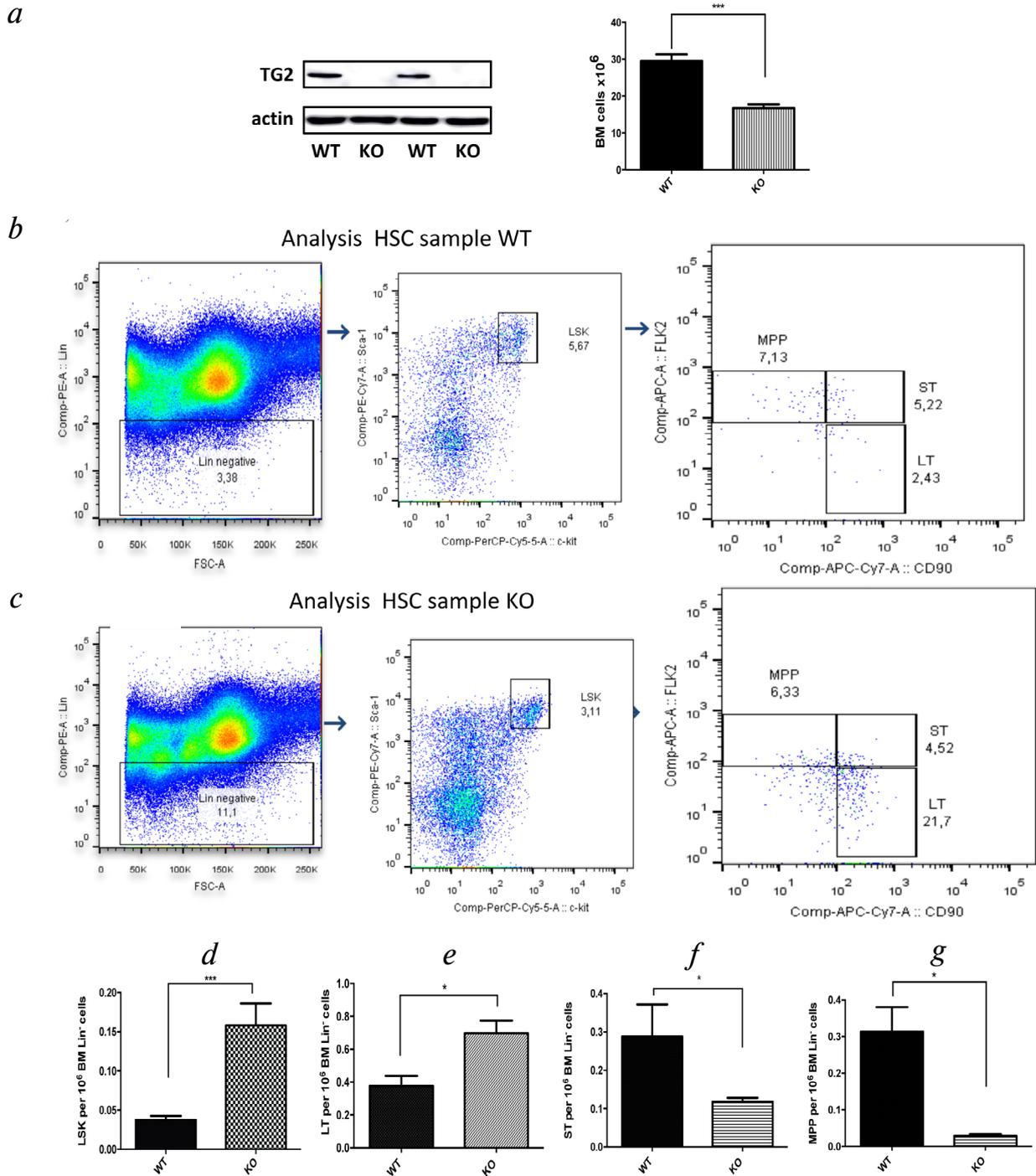


Рис. 1. Отсутствие TG2 изменяет популяцию HSC, полученную из BM взрослых мышей. *a* – Иммуноблоттинг TG2 клеток BM, полученных из $n = 2$ WT и $n = 2$ TG2 KO мышей. В качестве контроля нагрузки использовался актин. *b* – Общее число клеток костного мозга мышей WT и KO. Данные представлены как средние значения \pm стандартное отклонение, $***p < 0,01$ ($n = 6$ самцов в каждой группе). *c* – Схема FACS анализа для иммунофенотипирования HSC и клеток-предшественников (как описано Pronk et al. [48]). С помощью описанного метода были фенотипированы LSK (lin negative Sca-1⁺ cKit⁺), LT (LSK, CD90⁺ Flk2⁻), ST (LSK CD90⁺ Flk2⁺), MPP (LSK CD90⁻ Flk2⁺), Lin: (CD-5; Ter-119; Gr-1(Ly-6G/C); CD45R (B220) и CD11b). Данные для анализа 3×10^5 событий для каждого образца и 1×10^5 событий для контроля FMO были получены с помощью FACS CANTO II. Результаты были проанализированы на программе FlowJo v.10a, были определены проценты каждой популяции по отношению к клеткам BM. Эти % величины были использованы для расчёта абсолютного числа клеток в каждой популяции с использованием количества анализируемых клеток костного мозга. *d–g* – Абсолютные числа LSK, LT, ST, MPP клеток соответственно $\times 10^6$ Lin⁻ клеток. Данные представлены как средние значения \pm стандартное отклонение, $*p < 0,05$; $***p < 0,001$ ($n = 6$ самцов в каждой группе). (С цветными вариантами рис. 1 и 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

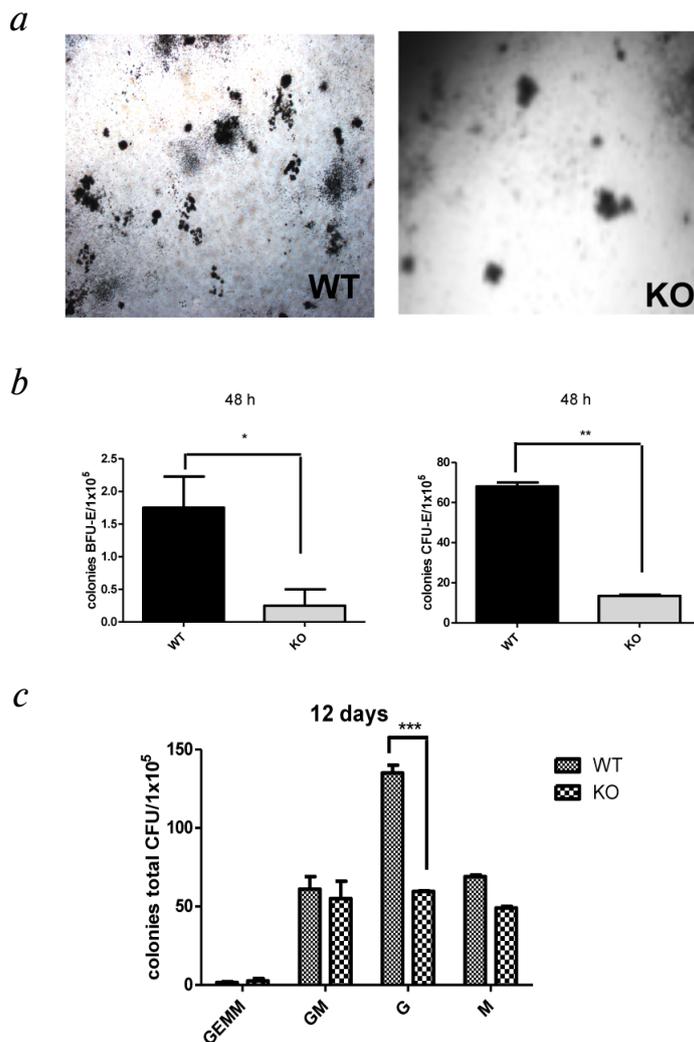


Рис. 2. Изменение колониобразующей способности клеток ВМ мышей, и определение типа колоний. *a* – Фотографии колониобразующих единиц у WT и KO мышей после 12 дней культивирования в специальной среде, содержащей миелоидные и эритроидные факторы роста (см. «Материалы и методы»). *b* – Численность колоний BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) и CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) клеток, образовавшихся из HSC костного мозга после 48 ч methocult анализа. *c* – Количество незрелых популяций ВМ у мышей WT и KO через 12 дней после выделения и культивирования в среде methocult. GEEM – гранулоциты, эритроциты, макрофаги и мегакариоциты, GM – гранулоциты и макрофаги, G – гранулоциты и M – макрофаги. Данные представлены как средние значения \pm стандартное отклонение, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ ($n = 3$ самца в каждой группе)

личество клеток ВМ. Восполнение количества клеток ВМ у мышей KO совпадает со значительным уменьшением числа LSK клеток (рис. 4, *b*) с последующим увеличением популяций ST и MPP (рис. 4, *d–e*). Полученные данные говорят о том, что недостаток питательных веществ индуцирует дифференцировку HSC в ВМ, на что отсутствие TG2 влияет негативно.

Полученные данные позволяют предположить, что отсутствие TG2 ослабляет процесс аутофагии в предшественниках ВМ HSC, тем самым приводя к уменьшению количества стволовых клеток и нарушению статуса их дифференцировки. Наши результаты показали, что,

вероятнее всего, эти эффекты обусловлены TG2-зависимой дисрегуляцией аутофагии. И действительно, индукция аутофагии при голодании снимает блок на дифференцировку на уровне предшественников LT-HSC, как наблюдалось у мышей KO. Дальнейшие исследования необходимы для детального определения молекулярного механизма, который активируется в отсутствие TG2 и ведет к нарушению гомеостаза HSC. Однако мы показали, что RhoA/ERK1/2 путь, необходимый для регуляции гомеостаза клеток-предшественников ВМ, значительно деактивирован в отсутствие TG2. Таким образом, в нашей работе мы показали

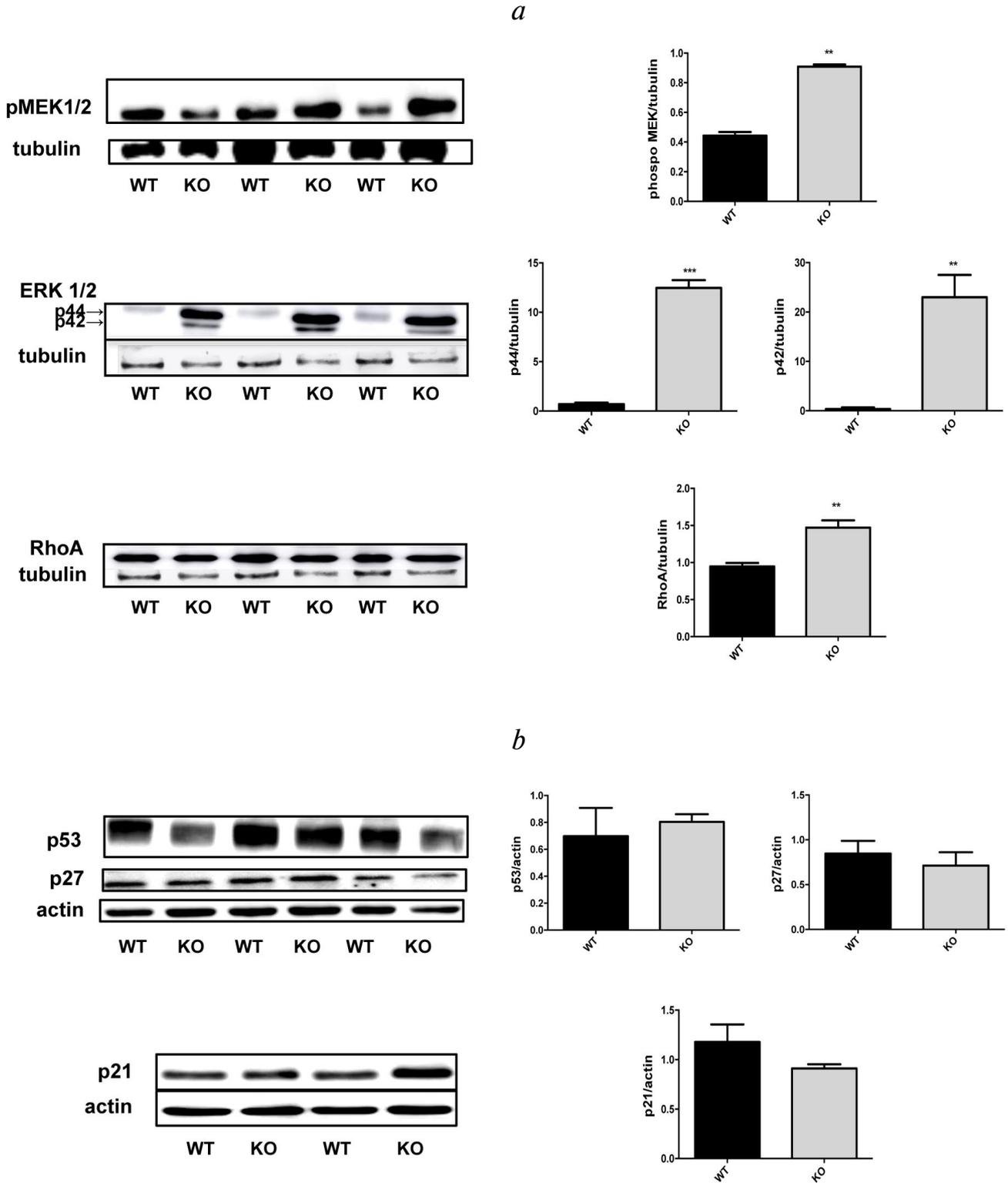


Рис. 3. Влияние отсутствия TG2 на экспрессию генов в клетках ВМ у мышей WT и KO. *a* – Влияние TG2 на RhoA/ERK1/2/Мар сигнальный путь. Иммуноблоттинг для определения уровня активации пути MEK/ERK1/2 и для определения уровня белков RhoA у мышей WT и KO (*a* – левая сторона). Загрузку контролировали по тубулину. Денситометрия (*a* – правая сторона) – количественное определение фосфо-МЕК, ERK1/2, p44, p42 и RhoA, нормализованных по тубулину (*n* = 3 самца в каждой группе). *b* – Влияние TG2 на клеточный цикл. Анализ уровня белков p53, p27 и p21 (*b* – левая сторона). Загрузку контролировали по актину. Денситометрия (*b* – правая сторона) – p53, p27 и p21 нормализованы по актину (*n* = 3 самца в каждой группе)

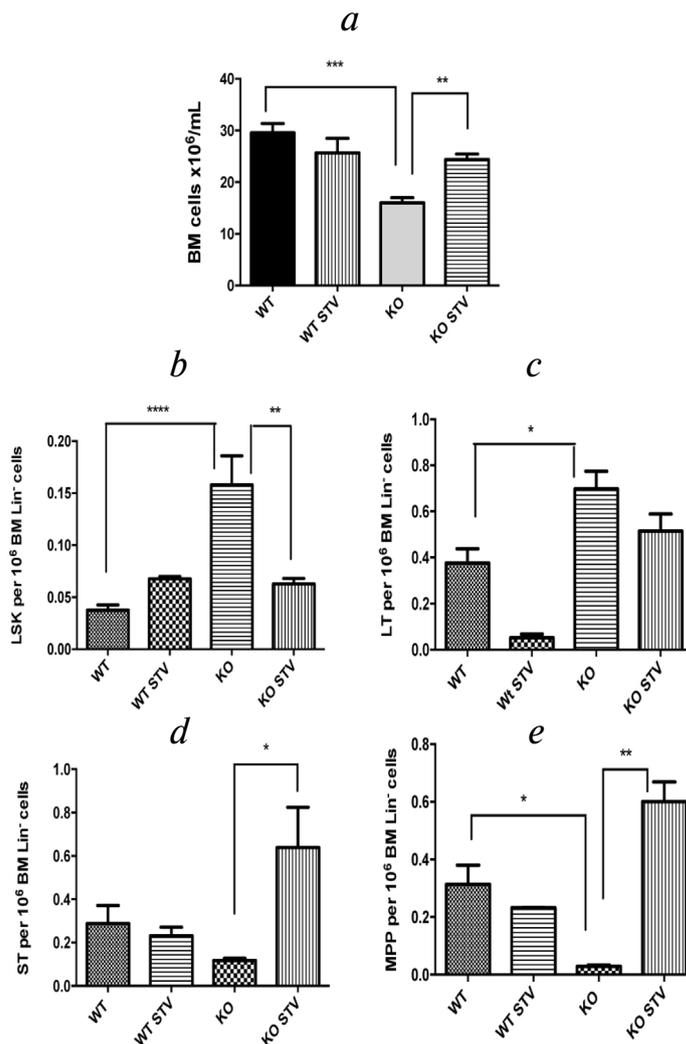


Рис. 4. Влияние недостатка питательных веществ на дифференцировку HSC. *a* – Общее число клеток BM у мышей WT и KO, нормально питающихся или голодающих 24 ч (STV). *b–e* – Абсолютное число LSK, LT, ST, MPP клеток $\times 10^6$ BM Lin⁻ клеток у мышей WT и KO, нормально питающихся или голодающих 24 ч (STV). Данные представлены как средние значения \pm стандартное отклонение, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ ($n = 3$ самца в каждой группе)

важную роль TG2 в регуляции и дифференцировке HSC.

Финансирование. Эта работа была частично поддержана AIRC (грант № IG2018-21880 М. П.), Итальянским Министерством Здравоохранения («Ricerca corrente and ricerca finalizzata», грант № RF2010 2305199), Regione Lazio (Gruppi di ricerca, грант № E56C18000460002, М. П.), Фондом Фиброза Cistica (грант № ФФК#10/2018 М. П.). Авторы также признают поддержку Российской Государственной Программы по привлечению ведущих ученых в российские высшие учебные заведения (грант № 14.W03. 31.0029, М. П.). Ф. Р. поддержан «Фондом Umberto Veronesi» и AIRC стипендией.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры в экспериментах на мышах выполнялись согласно стандартным руководящим принципам и этически утвержденным протоколам в соответствии с законодательным указом правительства Италии № 116 от 27 января 1992 г., меморандумом министра здравоохранения № 6 от 14 мая 2001 г. и утвержденными правовыми актами Российской Федерации и международных организаций.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 10, 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Orsini, M., Morceau, F., Dicato, M., and Diederich, M. (2018) Autophagy as a pharmacological target in hematopoiesis and hematological disorders, *Biochem. Pharm.*, **152**, 347-361, doi: 10.1016/j.bcp.2018.04.007.
- Ema, H., Morita, Y., and Suda, T. (2014) Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells, *Exp. Hematol.*, **42**, 72-82, doi: 10.1016/j.exphem.2013.11.004.
- Sharpless, N. E., and DePhino, R. A. (2007) How stem cells age and why this makes us grow old, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 703-713, doi: 10.1038/nrm2241.
- Miharada, K., Karlsson, G., Rehn, M., Rorby, E., Cammenga, J., and Karlsson, S. (2011) Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78, *Cell Stem Cell*, **9**, 330-344, doi: 10.1016/j.stem.2011.07.016.
- Challen, G. A., Boles, N., Lin, K. Y. K., and Goodell, M. A. (2009) Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis, *Cytometry*, **75**, 14-24, doi: 10.1002/cyto.a.20674.
- Weissman, I. L., Anderson, D. J., and Gage, F. (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**, 387-403, doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.387.
- Seita, J., and Weissman, I. L. (2010) Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **2**, 640-653, doi: 10.1002/wsbm.86.
- Christensen, J. L., and Weissman, I. L. (2001) Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14541-14546, doi: 10.1073/pnas.261562798.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages, *Nature*, **404**, 193-197, doi: 10.1038/35004599.
- Ehninger, A., and Trumpp, A. (2011) The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in, *J. Exp. Med.*, **208**, 421-428, doi: 10.1084/jem.20110132.
- Ho, Y. H., and Méndez-Ferrer, S. (2020) Microenvironmental contributions to hematopoietic stem cell aging, *Haematologica*, **105**, 38-46, doi: 10.3324/haematol.2018.211334.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006) Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches, *Immunity*, **25**, 977-988, doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.016.
- Guerrouahen, B. S., Al-Hijji, I., and Tabrizi, A. R. (2011) Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia, *Stem Cells Int.*, **2011**, doi: 10.4061/2011/375857.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G. Y., and Suda, T. (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche, *Cell*, **118**, 149-161, doi: 10.1016/j.cell.2004.07.004.
- Scadden, D. T. (2006) The stem-cell niche as an entity of action, *Nature*, **441**, 1075-1079, doi: 10.1038/nature04957.
- Butler, J. M., Nolan, D. J., Vertes, E. L., Varnum-Finney, B., Kobayashi, H., Hooper, A. T., Seandel, M., Shido, K., White, I. A., Kobayashi, M., Witte, L., May, C., Shawber, C., Kimura, Y., Kitajewski, J., Rosenwaks, Z., Bernstein, I. D., and Rafii, S. (2010) Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of notch-dependent hematopoietic stem cells, *Cell Stem Cell*, **6**, 251-264, doi: 10.1016/j.stem.2010.02.001.
- Lèvesque, J. P., Helwani, F. M., and Winkler, I. G. (2010) The endosteal "osteoblastic" niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization, *Leukemia*, **24**, 1979-1992, doi: 10.1038/leu.2010.214.
- Leveque, L., Le Texier, L., Lineburg, K. E., Hill, G. R., and Macdonald, K. P. (2015) Autophagy and haematopoietic stem cell transplantation, *Immunol. Cell Biol.*, **93**, 43-50, doi: 10.1038/icb.2014.95.
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., and Wolf, D. H. (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, **349**, 275-280, doi: 10.1016/0014-5793(94)00672-5.
- Liu, F., Lee, J. Y., Wei, H., Tanabe, O., Engel, J. D., Morrison, S. J., and Guan, J. L. (2010) FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells, *Blood*, **116**, 4806-4814, doi: 10.1182/blood-2010-06-288589.
- Mortensen, M., Soilleux, E. J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A. J., Gianville, J., Knight, S., Jacobsen, S. E., Kranc, K. R., and Simon, A. K. (2011) The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance, *J. Exp. Med.*, **208**, 455-467, doi: 10.1084/jem.20101145.
- Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H. W. (2011) Autophagy in immunity and inflammation, *Nature*, **469**, 323-335, doi: 10.1038/nature09782.
- Oh, J. E., and Lee, H. K. (2013) Autophagy as an innate immune modulator, *Immune Netw.*, **13**, 1-9, doi: 10.4110/in.2013.13.1.1.
- Kim, S. J., Hong, E. H., Lee, B. R., Park, M. H., Kim, J. W., Pyun, A. R., Kim, Y. J., Chang, S. Y., Chin, Y. W., and Ko, H. J. (2012) α -Mangostin reduced ER stress-mediated tumor growth through autophagy activation, *Immune Netw.*, **12**, 253-260, doi: 10.4110/in.2012.12.6.253.
- Warr, M. R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J., and Passegué, E. (2013) FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cell, *Nature*, **494**, 323-327, doi: 10.1038/nature11895.
- Watson, A. S., Riffelmacher, T., Stranks, A., Williams, O., De Boer, J., et al. (2015) Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia, *Cell Death Discov.*, **1**, doi: 10.1038/cddiscovery.2015.8.
- Kohli, L., and Passegué, E. (2014) Surviving change: the metabolic journey of hematopoietic stem cells, *Trends Cell Biol.*, **24**, 479-487, doi: 10.1016/j.tcb.2014.04.001.
- Riffelmacher, T., and Simon, A. K. (2017) Mechanistic roles of autophagy in hematopoietic differentiation, *FEBS J.*, **284**, 1008-1020, doi: 10.1111/febs.13962.
- Ho, T. T., Warr, M. R., Adelman, E. R., Lansinger, O. M., Flach, J., Verovskaya, E. V., Figueroa, M. E., and Passegué, E. (2017) Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells, *Nature*, **543**, 205-210, doi: 10.1038/nature21388.
- Gomez-Puerto, M. C., Folkerts, H., Wierenga, A. T. J., Schepers, K., Schuringa, J. J., Coffey, P. J., and Vellenga, E. (2016) Autophagy protein ATG5 and ATG7 are essential for the maintenance of human CD34(+) hematopoietic

- stem-progenitor cells, *Stem Cells*, **34**, 1651-1663, doi: 10.1002/stem.2347.
31. D'Eletto, M., Farrace, M. G., Falasca, L., Reali, V., Oliverio, S., Melino, G., Griffin, M., Fimia, G. M., and Piacentini, M. (2009) Transglutaminase 2 is involved in autophagosome maturation, *Autophagy*, **5**, 1145-1154, doi: 10.4161/auto.5.8.10040.
 32. D'Eletto, M., Farrace, M. G., Rossin, F., Strappazon, F., Di Giacomo, G., et al. (2012) Type 2 transglutaminase is involved in the autophagy-dependent clearance of ubiquitinated proteins, *Cell Death Differ.*, **19**, 1228-1238, doi: 10.1038/cdd.2012.2.
 33. D'Eletto, M., Rossin, F., Fedorova, O., Farrace, M. G., and Piacentini, M. (2019) Transglutaminase type 2 in the regulation of proteostasis, *Biol. Chem.*, **400**, 125-140, doi: 10.1515/hsz-2018-0217.
 34. Rossin, F., D'Eletto, M., Falasca, L., Sepe, S., Cocco, S., Fimia, G. M., Campanella, M., Mastroberardino, P., Farrace, M. G., and Piacentini, M. (2015) Transglutaminase 2 ablation leads to mitophagy impairment associated with a metabolic shift towards aerobic glycolysis, *Cell Death Differ.*, **22**, 408-418, doi: 10.1038/cdd.2014.106.
 35. Altuntas, S., D'Eletto, M., Rossin, F., Hidalgo, L. D., Farrace, M. G., Falasca, L., Piredda, L., Cocco, S., Mastroberardino, P. G., Piacentini, M., and Campanella, M. (2014) Type 2 Transglutaminase, mitochondria and Huntington's disease: menage a trois, *Mitochondrion*, **19**, 97-104, doi: 10.1016/j.mito.2014.09.008.
 36. Piacentini, M., D'Eletto, M., Falasca, L., Farrace, M. G., and Rodolfo, C. (2011) Transglutaminase 2 at the crossroads between cell death and survival, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **78**, 197-246, doi: 10.1002/9781118105771.ch5.
 37. Fesus, L., and Piacentini, M. (2002) Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions, *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 534-539, doi: 10.1016/s0968-0004(02)02182-5.
 38. Gundemir, S., Colakb, G., Tucholskic, J., and Johnson, G. V. (2012) Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife, *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 406-419, doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.09.012.
 39. Mishra, S., Melino, G., and Murphy, L. J. (2007) Transglutaminase 2 kinase activity facilitates protein kinase A-induced phosphorylation of retinoblastoma protein, *J. Biol. Chem.*, **282**, 18108-18115, doi: 10.1074/jbc.M607413200.
 40. Nurminskaya, M. V., and Belkin, A. M. (2012) Chapter one – cellular functions of tissue transglutaminase, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **294**, 1-97, doi: 10.1016/B978-0-12-394305-7.00001-X.
 41. Belkin, A. M. (2011) Extracellular TG2: emerging functions and regulation, *FEBS J.*, **278**, 4704-4716, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08346.x.
 42. Mastroberardino, P. G., Farrace, M. G., Viti, I., Pavone, F., Fimia, G. M., Melino, G., Rodolfo, C., and Piacentini, M. (2006) "Tissue" transglutaminase contributes to the formation of disulphide bridges in proteins of mitochondrial respiratory complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1357-1365, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.07.007.
 43. Lorand, L., and Graham, R. M. (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 140-156, doi: 10.1038/nrm1014.
 44. Collighan, R. J., and Griffin, M. (2009) Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications, *Amino Acids*, **36**, 659-670, doi: 10.1007/s00726-008-0190-y.
 45. De Laurenzi, V., and Melino, G. (2001) Gene disruption of tissue transglutaminase, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 148-155, doi: 10.1128/MCB.21.1.148-155.2001.
 46. URL: <https://www.stemcell.com>. StemCell Technologies, Mouse Colony-Forming Cell Assays Using MethoCult®. Technical Manual, Catalog #28405, Version 3.1. June 2005.
 47. Mayle, A., Luo, M., Jeong, M., and Goodell, M. A. (2013) Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells, *Cytometry A*, **83**, 27-37, doi: 10.1002/cyto.a.22093.
 48. Pronk, C. J. H., Rossi, D. J., Mansson, R., Attema, J. L., Norddal, G. L., Fai Chan, C. K., Sygvarsson, M., Weissman, I. L., and Bryder, D. (2007) Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy, *Cell Stem Cell*, **1**, 428-442, doi: 10.1016/j.stem.2007.07.005.
 49. Ema, H., Morita, Y., Yamazaki, S., Matsubara, A., Seita, J., Tadokoro, Y., Kondo, H., Takano, H., and Nakauchi, H. (2006) Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays, *Nature Protoc.*, **1**, 2979-2987, doi: 10.1038/nprot.2006.447.
 50. Bernassola, F., Federici, M., Corazzari, M., Terrinoni, A., Hribal, M. L., De Laurenzi, V., Ranalli, M., Massa, O., Sesti, G., Irwin McLean, W. H., Citro, G., Barbetti, F., and Melino, G. (2002) Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient, *FASEB J.*, **16**, 1371-1378, doi: 10.1096/fj.01-0689com.
 51. Szondy, Z., Sarang, Z., Molnár, P., Nemeth, T., Piacentini, M., Mastroberardino, P. G., Falasca, L., Aeschlimann, D., Kovacs, J., Kiss, I., Szegzedi, E., Lakos, G., Rajnavolgyi, E., Birckbichler, P. J., Melino, G., and Fesus, L. (2003) Transglutaminase 2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7812-7817, doi: 10.1073/pnas.0832466100.
 52. Rossin, F., D'Eletto, M., Farrace, M. G., and Piacentini, M. (2014) Transglutaminase type 2: a multifunctional protein chaperone? *Mol. Cell. Oncol.*, **1**, e968506, doi: 10.4161/23723548.2014.968506.
 53. Baumgaertner, C., Toifl, S., Farlik, M., Halbritter, F., Scheicher, R., Fischer, I., Sexl, V., Bock, C., and Baccarini, M. (2018) An ERK-dependent feedback mechanism prevents hematopoietic stem cell exhaustion, *Cell Stem Cell*, **22**, 879-892, doi: 10.1016/j.stem.2018.05.003.
 54. Zarrabi, M., Afzal, E., Hossein Asghari, M., Monireh, M., Aboulkheyr, Es H., and Ebrahimi, M. (2018) Inhibition of MEK/ERK signalling pathway promotes erythroid differentiation and reduces HSCs engraftment in *ex vivo* expanded haematopoietic stem cells, *J. Cell. Mol. Med.*, **22**, 1464-1474, doi: 10.1111/jcmm.13379.
 55. Singh, U. S., Pan, J., Kao, Y. L., Joshi, S., Keri, L., Young, K. L., and Baker, K. M. (2003) Tissue transglutaminase mediates activation of RhoA and MAP kinase pathways during retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 391-399, doi: 10.1074/jbc.M206361200.
 56. Jaganathan, B. G., Afonso, F. A., Kumar, A., and Bonnet, D. (2013) Active RHO a favors retention of human hematopoietic stem/progenitor cells in their niche, *J. Biomed. Sci.*, **20**, 66, doi: 10.1186/1423-0127-20-66.

**TRANSGLUTAMINASE TYPE 2 IS INVOLVED
IN THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS HOMEOSTASIS**

**S. Oliverio^{1#}, J.S.O. Beltran^{1,2#}, L. Occhigrossi¹, V. Bordoni³, C. Agrati³, M. D'Eletto¹,
F. Rossin¹, P. Borelli², G.P. Amarante-Mendes⁴, O. Demidov⁵,
N.A. Barlev⁵, and M. Piacentini^{1,3,5*}**

¹ Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", 00133 Rome, Italy; E-mail: mauro.piacentini@uniroma2.it

² Clinical and Experimental Hematology Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ National Institute for Infectious Diseases I.R.C.C.S. 'Lazzaro Spallanzani' 00149 Rome, Italy

⁴ Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵ Laboratory of Molecular Medicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, 194064 St. Petersburg, Russia

Received July 9, 2020

Revised July 21, 2020

Accepted July 21, 2020

Type 2 transglutaminase (TG2) is a multifunctional protein involved in various biological processes playing a key regulatory role in cell homeostasis such as cell death and autophagy. New evidence is emerging that support an important role of autophagy in regulating normal hematopoiesis. Prompted by these findings, in this study we investigated *in vivo* involvement of TG2 in mouse hematopoiesis under normal or nutrient deprivation conditions. We found that the number and rate of differentiation of bone marrow hematopoietic stem cell was decreased in the TG2 knockout mice. We present evidence showing that these effects on hematopoietic system are very likely due to the TG2-dependent impairment of autophagy. In fact, stimulation of autophagy by starvation is able to rescue the block of the differentiation of stem cells progenitors in the TG2 KO mice. It was also show that the RhoA/ERK1/2 pathway, known to be essential for regulation of the bone marrow progenitor cells homeostasis, was significantly impaired in the absence of TG2. Hence, this study expanded our knowledge about TG2 discovering a role of this enzyme in regulation of hematopoiesis.

Keywords: TG2, hematopoietic stem cells, autophagy