

Fajka-Boja Roberta

**Tirozin kinázok és foszfatázok szerepe a T sejtek
galektin-1 indukálta apoptózisában**

Ph.D. értekezés

Témavezető: Dr. Monostori Éva

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Biológiai Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet
Limfocita Szignál Transzdukciós Laboratórium

Szeged, 2002

3802

B 3802



1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
3.1. A LEKTINEK ÉS A GLIKOZILÁCIÓ	5
3.2. A GALEKTIN FEHÉRJECSALÁD	6
3.3. A GALEKTIN-1 FEHÉRJE TULAJDONSÁGAI ÉS FUNKCIÓI	7
3.3.1. TERMELŐDÉS ÉS SZEKRECIÓ	7
3.3.2. A GALEKTIN-1 FUNKCIÓI	8
4. CÉLKITŰZÉSEK	18
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19
5.1. A KÍSÉRLETEKBEN FELHASZNÁLT ELLENANYAGOK, INHIBITOROK ÉS SEJTEK	19
5.1.1. ELLENANYAGOK ÉS ELLENANYAG KONJUGÁTUMOK	19
5.1.2. AVIDIN-BIOTIN RENDSZEREK	20
5.1.3. ENZIM INHIBITOROK	20
5.1.4. SEJTEK	20
5.2. BIOKÉMIAI ÉS IMMUNOLÓGIAI MÓDSZEREK	21
5.2.1. REKOMBINÁNS HUMÁN GALEKTIN-1 TERMELÉS ÉS KONJUGÁLÁS BIOTINNAL ÉS FLUORESZCEIN-IZOTIOCIÁNNAL	21
5.2.2. FEHÉRJÉK KAPCSOLÁSA SEPHAROSE 4B GYÖNGYÖKHÖZ	22
5.2.3. SEJTFELSZÍNI STRUKTÚRÁK VIZSGÁLATA ÁRAMLÁSI CITOMÉTERREL	23
5.2.4. APOPTOTIKUS SEJTEK MEGHATÁROZÁSA ÁRAMLÁSI CITOMÉTERREL	24
5.2.5. INTRACELLULÁRIS KALCIUM-ION KONCENTRÁCIÓ VÁLTOZÁS MÉRÉSE ÁRAMLÁSI CITOMÉTERREL	25
5.2.6. SEJTFELSZÍNI FEHÉRJÉK JELÖLÉSE SZULFO-NHS-LC-BIOTINNAL	26
5.2.7. FEHÉRJÉK AFFINITÁS TISZTÍTÁSA	27
5.2.8. SEJTEK AKTIVÁLÁSA TIROZIN-FOSZFORILÁCIÓS VIZSGÁLATOKHOZ	27
5.2.9. DENATURÁLÓ POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZIS (SDS-PAGE)	28
5.2.10. WESTERN BLOT ANALÍZIS	28
5.2.11. FÜGGELÉK I.: PUFFEREK, OLDATOK	30
6. EREDMÉNYEK	34
6.1. A REKOMBINÁNS HUMÁN GALEKTIN-1 JELLEMZÉSE	34
6.2. A GALEKTIN-1 HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA HEMOPOETIKUS EREDETŰ SEJTEKEN	35
6.2.1. A GALEKTIN-1 KÖTŐDIK A VIZSGÁLT SEJTEKHEZ	35

6.2.2. A GALEKTIN-1 A KÖTŐDÉST KÖVETŐEN INTERNALIZÁLÓDIK	38
6.2.3. A GALEKTIN-1 TIROZIN FOSZFORILÁCIÓVAL JÁRÓ JELÁTVITELI UTAT INDÍT EL T ÉS B LIMFOCITÁKBAN	41
6.2.4. A GALEKTIN-1 INDUKÁLTA TIROZIN FOSZFORILÁCIÓBAN RÉSZTVEVŐ JELÁTVIVÓ MOLEKULÁK	43
6.2.5. A GALEKTIN-1 ÁLTAL KIVÁLTOTT JELÁTVITELI ÚT NEM VEZET INTRACELLULÁRIS KALCIUM-ION KONCENTRÁCIÓ NÖVEKEDÉSHEZ	45
6.2.6. A GALEKTIN-1 APOPTÓZIST INDUKÁL T ÉS B SEJTEKBEN	45
6.2.7. TIROZIN KINÁZOK ÉS FOSZFATÁZOK SZÜKSÉGESEK A GALEKTIN-1 INDUKÁLTA APOPTOTIKUS FOLYAMATBAN	49
7. DISZKUSSZIÓ	51
8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	58
9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	65
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	66
11. ÖSSZEFOGLALÓ	67
12. SUMMARY	71

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BSA	szarvasmarha szérumalbumin
ConA	concanavalin A
CRD	szénhidrát-felismerő domén (carbohydrate recognition domain)
DD	haláldomén (death domain)
ECM	extracelluláris mátrix
ERK	extracelluláris szignál által szabályozott kináz
FACS	áramlási citofluoriméter (Fluorescence Activated Cell Sorter)
FADD	Fas asszociált haláldomén fehérje
FCS	magzati borjúsérum
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
Gal	galaktóz
Gal-1	galektin-1
GlcNAc	N-acetil-glükózamin
GTP	guanozin-trifoszfát
HRPO	torma peroxidáz
IgG	immunglobulin G
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
ITAM	immunreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum
LAMP-1, 2	lizoszóma asszociált membrán glikoprotein 1, 2
MAPK	mitogén aktivált fehérje kináz
OD	optikai denzitás
PAO	fénilarzén-oxid
PHA	phytohaemagglutinin
PLCγ	foszfolipáz γ
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PNA	földimogyoró agglutinin (peanut agglutinin)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
TCR	T sejt receptor
TNF	tumor nekrosis faktor
TNF-R	tumor nekrosis faktor receptor
TRADD	TNFR1-hez asszociált haláldomén tartalmú fehérje
Tris	trisz-(hidroximetil)-amino-metán
WGA	búzacsíra agglutinin (wheat germ agglutinin)
ZAP70	ζ -lánchoz kapcsolódó fehérje (ζ associated protein of 70 kDa)

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A LEKTINEK ÉS A GLIKOZILÁCIÓ

A lektinek szénhidrát-oldalláncokat nagy affinitással és specificitással felismerő fehérjék [1]. Előfordulásuk változatos, megtalálhatók mind növényekben, mind állatokban. Szerkezetileg komplex, különböző egységekből felépülő fehérjék, amelyek egy vagy több kisméretű szénhidrát-felismerő domént (CRD) tartalmaznak [1]. A sejtmembránban vagy az extracelluláris mátrixban lokalizált állati lektinek szerepet játszanak a sejtadhézióban, a szöveti szerveződésben, az endocitózisban, a glikozilált molekulák felvételében, valamint az immunfolyamatokban. Az intracelluláris lektinek a fehérjék harmadlagos szerkezetének kialakítását és a kompartmentumok közötti közlekedését, a különböző szekréciós utakra való irányítását végzik [2]. Az állati lektinek által felismert komplex glikokonjugátumok kialakításáért glikozil-transzferázok és -hidrolázok felelősek. Ezeknek az enzimeknek az expressziója és aktivitása szövetspecifikus és differenciáció-függő, így a kialakuló glikozilációs mintázat is változatos [3]. Például a limfociták érése során változik a glikozil-transzferázok expressziója nyomon követhető különböző növényi lektinekkel: a tímusz kérgi részében fejlődő éretlen timocitákhoz nagy affinitással kötődik a földimogyoró agglutinin (PNA), míg a velőbe vándorló érett timocitákon szialil-transzferázok aktivitása elfedi a PNA kötőhelyeit [4]. A membránfehérjék glikozilációs mintázata többek között meghatározza a molekula orientációját és a kötőhelyek helyzetét, és gátolja a nem specifikus fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. A glikozilált receptorok a specifikus ligand távollétében multivalens lektineket kötve rácyszerű struktúrát alkotnak, ami megakadályozza a spontán aggregációjukat. A glikoziláció minősége szabályozza a glikoproteinek lebomlását és a biológiai aktivitását is [2]. A glikoziláció fontosságát hangsúlyozza, hogy hiányában kóros folyamatok következnek be: pl. az IgG ellenanyagok nem megfelelő glikozilációs mintázata az immunglobulinok aggregálódásához és a természetes immunrendszer aktiválásához, végső soron autoimmun betegségek kialakulásához vezet. Bizonyos glikozil-transzferázok hiánya egerekben letális, vagy különböző ideg- és immunrendszeri defektusokhoz vezet, valamint befolyásolja a tumoros sejtek növekedési és áttétképzési tulajdonságait [3].

A lektinek fontos szabályozó szerepet töltenek be a többsejtű állatok szervezetében. Munkámban egy S-típusú lektin, a galektin-1 T és B sejtekre kifejtett hatását vizsgáltam: a limfocitákon kifejeződő galektin-1 kötő fehérjét, az általa kiváltott korai jelátviteli utat, a szignálkaszkádban résztvevő molekulákat, és kapcsolatukat a galektin-1 okozta apoptotikus folyamatokkal.

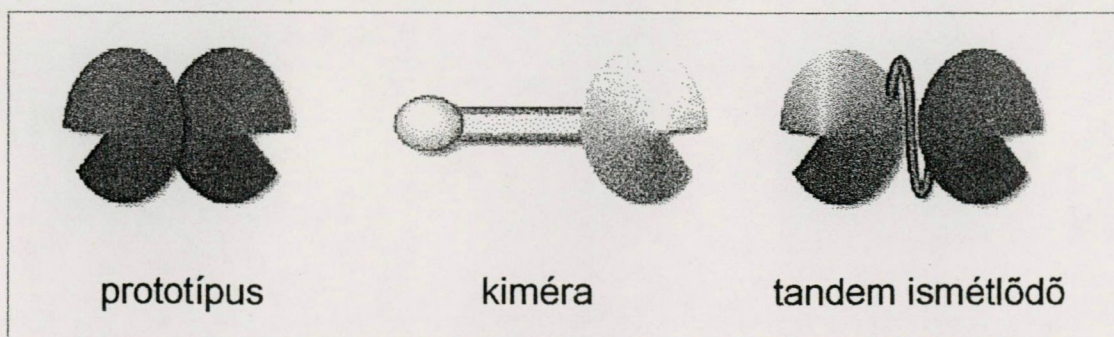
3.2. A GALEKTIN FEHÉRJECSALÁD

A galektin fehérjecsalád tagjai, azaz az S-típusú lektinek, mind a gerinctelen (szivacsok, férgek), mind a gerinces állatokban (halak, kétélűek, madarak, emlősök) jelen vannak (összefoglalók: [5, 6]). Egy családba sorolásuk a nagyfokú szekvencia-homológián és a β -galaktozidokat felismerő tulajdonságukon alapul [7]. Elsősorban a Gal β (1,4)GlcNAc diszacharid egység tartalmú poli-N-acetilaktózaminok iránt mutatnak nagy affinitást [11]. Az emlősökben ez idáig 13 galektint azonosítottak, amelyek szerkezetük alapján három fő csoportba sorolhatók [8]:

1. A *prototípus* egy-egy szénhidrát-felismerő domént (CRD) hordozó azonos alegységekből álló homodimert alkot (galektin-1, -2, -5, -7, -10, -13). A prototípus galektinek globuláris doménjét 11 antiparalel β -lemez alkotja, ez a harmadlagos szerkezet a hüvelyes növények lektinjeinek szerkezetére hasonlít [9, 10].

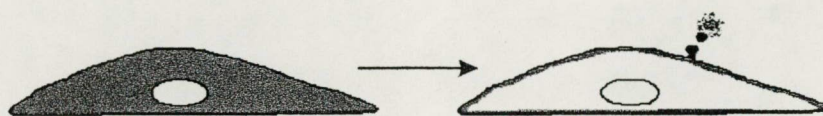
2. A *kiméra típus* a C-terminálisán elhelyezkedő CRD mellett az N-terminálisán 7-10 aminosavból álló ismétlődő glicin és prolin gazdag szakaszt és szerin-foszforilációs helyet hordoz (galektin-3).

3. A *tandem ismétlődő típusban* két különböző CRD-vel rendelkező alegység kapcsolódik össze (galektin-4, -6, -8, -9, -12) (3.1. ábra).



3.1. ábra: A galektin fehérjecsalád tagjainak sematikus szerkezete. Az ábra J. Hirabayashi és K. Kasai cikke [8] nyomán készült.

A galektinek elsődlegesen intracelluláris fehérjék, citoplazmatikus, illetve magi lokalizációval [13, 14]. Az intracelluláris jellegre utaló tulajdonságaik a szabad riboszómákon való szintézis, az N-terminális acetilációja, a glikoziláció hiánya és a redukáló közeg szükségessége a szénhidrát-kötő aktivitás megőrzéséhez [12, 15, 16]. Elsődleges szerkezetük, azaz a szekréción szignál hiánya, ellenére szekretálódnak, mégpedig ún. nem klasszikus úton, vagyis nem az endoplazmatikus retikulum - Golgi rendszer - exocitózis vonalat követve [17, 18]. A feltételezett mechanizmus szerint a fehérje a sejtthártya alatti citoplazma rétegben gyűlik össze, majd vezikulák formájában leválik (3.2. ábra).



3.2. ábra: A galektinek szekréciónjának feltételezett mechanizmusa. A citoplazmában diffúzan lokalizált galektin (bal oldali kép) összegyűlik a sejtmembrán alatt, majd vezikulák formájában lefűződik az extracelluláris térbe (jobb oldali kép). Az ábra a D. Cooper és S. Barondes [17] által feltételezett mechanizmust mutatja.

Mind expressziójuk, mind szekréciónjuk szövetspecifikus és a differenciálódási állapottól függően történik [18]. Cukorkötő tulajdonságuk révén azonnal az extracelluláris mátrix elemeihez, illetve a sejtek felszínéhez kötődnek, így autokrin, vagy parakrin módon fejtik ki változatos funkcióikat.

3.3. A GALEKTIN-1 FEHÉRJE TULAJDONSÁGAI ÉS FUNKCIÓI

3.3.1. Termelődés és szekréción

A galektin-1 az ideg- és izomszövetben, vesében, tüdőben, méhlepényben, az elsődleges (tímusz, csontvelő) és másodlagos (lép, nyirokcsomók) limfoid szervekben termelődik [19]. Ez utóbbiakban főleg a tímusz epitéliumsejtek termelik, de kifejeződik az aktivált T és B sejtekben és makrofágokban is [20-23]. Promótere erősen metilált, ennek foka szabályozza a gén átíródásának mértékét [24]. Nagyobb mértékű expressziója általában a kevésbé differenciált sejtekre és szövetekre jellemző, majd

lecsökken az érés során [25]. Patológiás esetekben termelődése összefügg a sejtek rákos transzformációjával, különös tekintettel a dedifferenciálódott tumorsejtekre [26, 27, 29-31]. Intracelluláris lokalizációja (citoplazmatikus eloszlása, illetve kapcsolódása a nukleáris mátrixhoz) és szekréciója a sejtek érettségi állapotától és differenciálódást indukáló faktorok jelenlététől függ [32-35].

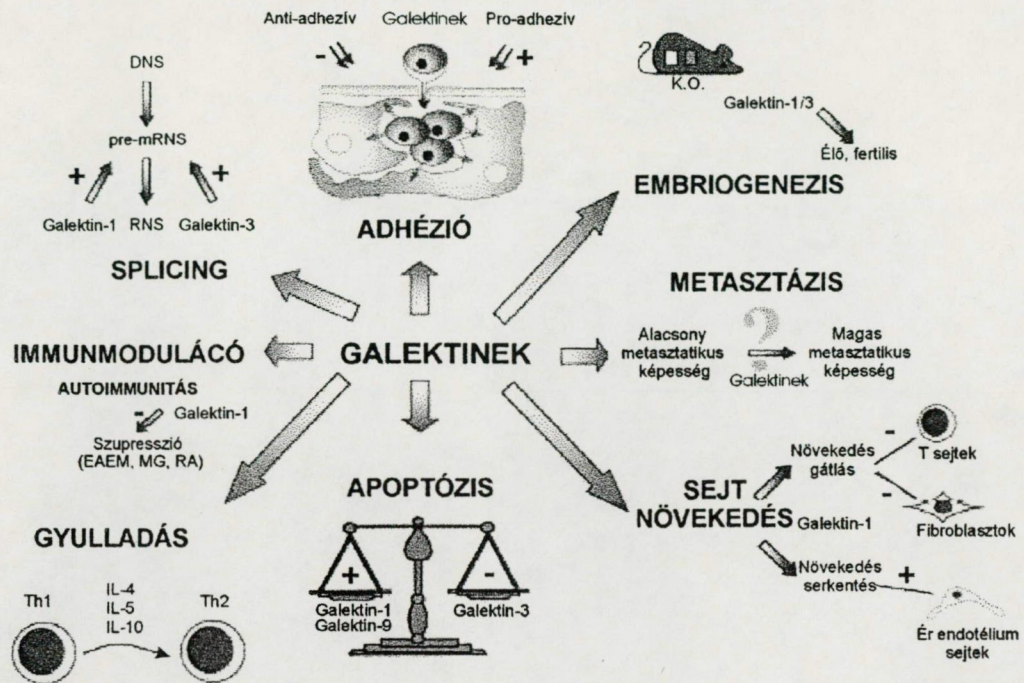
3.3.2. A galektin-1 funkciói

Változatos szöveti megjelenésével összhangban a galektin-1 funkciója pleiotróp (3.3. ábra). Habár a galektin-1 elsődlegesen intracelluláris fehérje, a sejtekben betöltött szerepéről nagyon kevés adat áll rendelkezésre. A szekretált fehérje hatását a különböző sejtekre a lokális koncentrációja határozza meg, ezért az *in vitro* kísérletekben használt koncentrációtól függően gyakran ellentétes eredmények kerülnek közlésre.

3.3.2.1. Intracelluláris funkció

Splicing folyamatok:

Annak ellenére, hogy a galektinek elsősorban intracelluláris fehérjék, intracelluláris funkciójuk alig ismert. A galektin-1 jelen van a sejtmagban, kimutatták HeLa sejtek nukleáris extraktumában, ahol a galektin-3-mal és az SC35 splicing faktorral azonos régióban lokalizálódik. Mindkét galektin asszociálódik a Gemin4 fehérjével, amely a pre-mRNS splicing-ot végző, több polipeptidláncból álló makromolekuláris komplex része [36]. Ezzel összhangban a galektin-1 és -3 eltávolításával megszűnik a nukleáris extraktum splicing aktivitása [14]. A galektin-1 és -3 tehát részt vesz a pre-mRNS splicingban, feltehetőleg a különböző splicing faktorok alkotta spliceosoma összeszerelésében játszik szerepet.



3.3. ábra: A galektin-1 változatos biológiai funkciót tölt be. Intracellulárisan a pre-mRNS splicing-ban vesz részt, a szekretált galektin szabályozza a sejtadhéziót, szerepet játszik az embriogenezisben, termelődése befolyásolhatja a tumorok áttétképzését. *In vitro* befolyásolja különböző sejtek osztódását, apoptózist indukál. *In vivo* immunmoduláló hatását, gátolja a gyulladási folyamatokat és az autoimmun betegségeket. Az ábra a G. Rabinovich összefoglaló cikkében megjelent kép adaptációja [37]. (rövidítések: EAEM – kísérletes autoimmun encefalomyelitisz, MG – miaszténia gravisz, RA- reumatoid arthritisz).

3.3.2.2. Extracelluláris funkció

A galektin-1 az extracelluláris funkcióit alapvetően két mechanizmuson keresztül fejti ki: a sejtadhézió szabályozásával és a sejtosztódás, illetve a sejt életképességének regulációjával (ld. az egyes alfejezetekben tárgyalt példákat).

Sejtadhézió:

A galektin-1 egyik legkorábban felfedezett funkciója a sejtek és az extracelluláris mátrix (ECM) közötti kölcsönhatás és a sejt-sejt kontaktus szabályozása. Az ECM fehérjéi közül elsősorban a laminin és a szöveti fibronectin cukor-oldalláncaihoz kötődik [38-40] (I. táblázat). A galektin-1 pro- és anti-adhéziós szerepet is betölthet a

sejttípustól és a lokális koncentrációtól függően. Például a tímusz epitéliumsejtek és a timociták közötti kapcsolatot elősegíti [20]. Más esetekben, mint pl. a mioblasztok fúziója során, a szekretálódott galektin-1 gátolja a sejtfelszíni integrinek és az ECM laminin közötti adhéziót, ezáltal a sejtek az extracelluláris mátrixtól elválnak, egymással kapcsolódnak és fuzionálnak [39, 41].

Szaporodás és embriogenézis:

A galektin fehérjecsalcid tagjainak expressziója az embriogenézis során szigorú időbeli és szövetspecifikus szabályozás alatt áll. Az egér blasztociszta felületén, a trofoektoderma sejtek felszínén még az embrió beágyazódása előtt megjelenik a galektin-1, -3 és -5 [97]. Minthogy a beágyazódás folyamata sejt-sejt kapcsolatokra épül feltételezhető, hogy a galektinek fontos szerepet játszanak ebben a lépésben. Az embriogenézis további lépéseiben a galektin-1 először az izomszövetek kezdeményeiben, majd a vese, a tüdő és a máj mezodermális sejtjeiben, valamint a mozgató- és érzőneuronokban termelődik [97]. A lektin-szénhidrát kapcsolatok fontosságát szem előtt tartva feltételezik, hogy a galektinek szabályozó szereppel bírnak a különböző szövetek kialakulása, fejlődése során.

Sejtdifferenciáció:

A galektin-1 expressziójának változása számos esetben maga után vonja a termelő sejtek morfológiájának, adhéziós és proliferációs tulajdonságának megváltozását is. Egyes kísérletekben a galektin-1 túlermelletése egér fibroblaszt sejtekben rákos transzformációhoz vezetett [42]. Azok a glióma sejtek, amelyekben az egyébként magas galektin-1 expressziót megakadályozták, kevésbé osztódtak és morfológiai változásokon estek át [29]. Ellenkező eredmények is születtek: a rákos sejtek transzfekciója galektin-1-gyel a sejtosztódás gátlását és a sejtek differenciálódását okozta [28]. A galektin-1 nagy mennyiségben termelődik mioblasztokban, ebben a fejlődési stádiumban az eloszlása diffúz a citoplazmában. A mioblasztok miotubulusokká való fúziója során a fehérje koncentráliódik a sejtmembrán alatti citoplazmatikus területeken és kikerül az extracelluláris térbe (3.2. ábra) [17]. A galektin-1 nem csak autokrin, de parakrin módon is differenciáció szabályozó: axotómia után serkenti az idegsejtek regenerációját, az axon növekedését [43].

I. táblázat: A galektin-1 kötő struktúrák az extracelluláris mátrixban és különböző sejtek felületén

Galektin-1 kötő molekulák	Szöveti előfordulás	Hivatkozás
Laminin	kötőszövet	[38, 39, 41]
Fibronectin	kötőszövet	[40]
CD2	T sejtek	[57]
CD3	T sejtek	[57, 58]
CD4	T sejtek	[58]
CD7	T sejtek	[58, 85]
CD43	éretlen B sejtek és érett T sejtek	[20, 53, 58]
CD45	magvas fehérvérsejtek	[20, 53, 58, 64-66]
LAMP-1, -2	tumorsejtek, stimulált vérlemezkék	[86, 87]
GM1 gangliozid	idegsejtek	[51]

Sejtnövekedés, sejtciklus szabályozás:

A fenti példákból kitűnik, hogy a galektin-1 a sejtosztódásban pozitív és negatív szabályozó szerepet is betölthet. A sejtekhez alacsony koncentrációban (15-300 nM) adott lektin egyes kísérletekben növekedés serkentő faktorként szerepel: mitogén hatást gyakorol az érendotélium és simaizom sejtekre, a fibroblasztokra, a nyirokcsomóból és lépből izolált limfocitákra [93, 45-48]. Az egér galektin-1 az aktivált T sejtek osztódását gátolja, a sejtciklust az S/G₂ fázisok határán berekeszti [21, 49]. Hasonlóan anti-proliferatív hatást fejt ki egér embrionális fibroblasztokon és humán neuroblasztóma sejteken is [50, 51]. A galektin-1 a neuroblasztóma sejteken egy glikoszfinbolipidhez, a GM1 gangliozidhoz kötődik (I. táblázat). A GM1 gangliozid az idegsejtek növekedési hormonjának aktivitását szabályozva feltehetően szerepet játszik e sejtek denzitásfüggő növekedés gátlásában [51]. A galektin-1 sejtnövekedésre gyakorolt hatása koncentrációfüggő, a kísérletek zömében egy szűk koncentráció tartományban serkentette, majd a koncentráció növelésével gátolta a sejtosztódást [46].



Apoptózis:

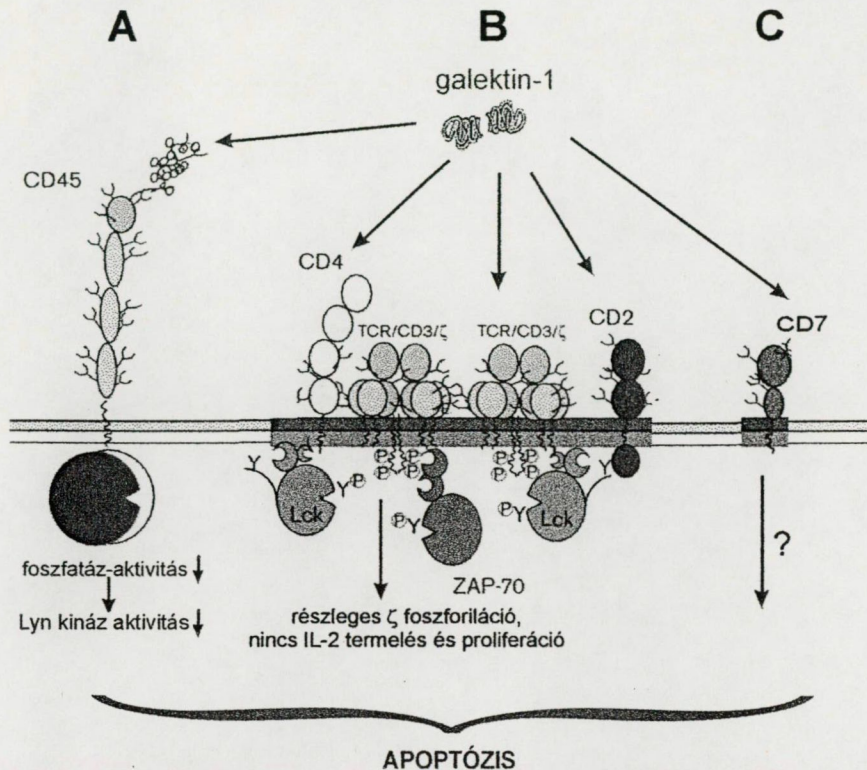
A galektin-1 ismert apoptotikus hatása a T és B limfoid sejtekre korlátozódik. A T sejt érés folyamán a CD4⁺/CD8⁺ timociták szenzitívek a galektin-1 indukálta apoptózisra, ezért feltételezik, hogy a lektinnek szerepe lehet a T sejtek szelekciójában [52]. Az érett, naiv T sejtekben nem, vagy csak kis mértékben [22], de az aktivált limfocitákban ismét apoptózist okoz [53]. A tumoros T és B sejtek szintén elpusztulnak az *in vitro* galektin-1 kezelés hatására [49, 52-54]. A programozott sejthalál elengedhetetlen eleme az immunhomeosztázis fenntartásának. Hiányában súlyos rendellenességek, betegségek alakulnak ki, mint például a saját struktúrákat felismerő autoimmun limfociták elszaporodása, daganatok megjelenése, míg túlzott működése immunhiányos állapothoz vezethet (összefoglalók: [55, 56]). A T limfociták életében és halálában szerepet játszó univerzális és egyedi faktorok, szignálok vizsgálatáról rövid idő alatt kiterjedt irodalmi ismeret gyűlt össze. A galektin-1 apoptotikus hatásának molekuláris hátterét vizsgáló munkák ez idáig javarészt az apoptózist közvetítő membránfehérjék analízisére irányultak.

A normál és tumoros T limfocitákon biokémiai módszerekkel több erősen glikozilált galektin-1 kötő membránfehérjét azonosítottak, amelyek egyébként a T sejt érésben és aktiválódásban fontos szerepet betöltő receptorok [57, 58] (I. táblázat). A CD45 fehérje egy receptor típusú tirozin foszfatáz, amely a hemopoetikus sejteken fejeződik ki. Az adott sejt típusától és érettségi/aktiválódási állapotától függően különböző izoformái lehetnek jelen a sejt felszínén (összefoglaló: [59]). Az izoformák az extracelluláris részben különböznek és alternatív splicing révén jönnek létre [60]. Ez a molekulaszakasz az erőteljes N- és O-glikoziláció következtében különböző lektin-aktivitású molekulákhoz kötődik, ezért az eddig feltételezett ligandjai között a CD22, a mannóz receptor és a galektin-1 szerepelnek [61-66]. A cukor-oldalláncok összetételétől függően növényi lektinek (ConA, PHA) is kapcsolódnak hozzá [67, 68]. A CD45 pozitív szabályozó szerepet tölt be a limfociták jelátvitelében azáltal, hogy a Src családba tartozó kinázokat defoszforilálja, eltávolítja a kináz aktivitását gátló foszfortirozint, így lehetővé teszi azok aktivációját (összefoglaló: [69]). A CD45 keresztkötése mind éretlen, mind érett T limfocitákon apoptózishoz vezet. A galektin-1 biológiai hatását közvetítő receptornak a CD45 fehérje tirozin foszfatázt tartják: a lektin keresztköti a CD45-öt, szabályozza a foszfatáz aktivitását, befolyásolja a CD45 szerepét a jelátvitelben. A Burkitt limfóma eredetű BL-36 sejtvonalban a galektin-1 csökkenti a

CD45 foszfatáz aktivitását, ennek következtében egy Src kináz, a Lyn foszforilációja is megnő (3.4.A ábra) [64, 65]. Azt, hogy a CD45 a felelős a galektin-1 apoptotikus hatásáért, egyéb kísérletek is alátámasztották: bizonyos vizsgálatokban a CD45 ellenanyag meggátolta a galektin-1 indukálta apoptózist, valamint a foszfatáz hiányos T limfoid sejtvonalak galektin-1-gyel szemben rezisztensek voltak [53]. Ezzel ellentétben más kísérletekben a galektin-1 indukálta apoptózis nem csak a CD45 jelenlététől, hanem az alkalmazott sejtvonalak tulajdonságaitól, az expresszált molekulák glikozilációs mintázatától is függött [70, 44].

A galektin-1 kötődik a T sejt receptor CD3 láncához és a CD4 és CD2 koreceptorokhoz. A CD3 komplex (γ , δ , ϵ és a ζ láncok) a T sejt receptor jelátvivő modulja (összefoglaló: [71]). A CD3 komplex alegységei jellegzetes intracelluláris motívumot hordoznak (ITAM - Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), amely tirozinjainak foszforilációs mintázatát a p56^{lck} Src kináz és a CD45 foszfatáz együttes működése alakítja ki [72, 73]. Az így keletkezett, random konformációval rendelkező foszforilált fehérjék horgonyzó helyet jelentenek további jelátvivő komponensek számára, úgy mint különböző tirozin kinázok (ZAP70, Itk), tirozin foszfatázok (SHP-1, -2), adapter molekulák (Shc, LAT, SLP-76, Grb2) számára [74-78]. A ζ lánc foszforilációs mintázatától függően alakul ki a membrán proximális aktivációs komplex, amelynek összetétele egyben azt is meghatározza, hogy a T sejtek a T sejt receptor stimulációjára aktiválódnak-e, vagy anergiával, apoptózissal válaszolnak. A sejtaktiváció kezdeti lépései után a szignálkaskád több irányba ágazik el: a jelátvivő molekulák foszforilálódnak, a fehérjék lokalizációja megváltozik, GTP-kötő fehérjék aktiválódnak, másodlagos hírvivő molekulák keletkeznek, transzkripciós faktorok aktiválódnak és új gének, pl. az interleukin-2 citokin génje, íródnak át. A CD2 és a CD4 a T sejtek koreceptorai, amelyek szintén szerepet játszanak a T sejtek aktiválásában. A CD4 és az intracelluláris részéhez kapcsolódó Lck kináz a T sejt receptorral való keresztkötésétől függően mind a T sejtek aktivációjához, mind a sejtek halálához vezető jelátviteli utat elindíthat [79]. A CD2 molekula ellenanyaggal vagy növényi lektinokkal történő oligomerizációja tirozin foszforilációt és intracelluláris kalcium-ion koncentráció növekedést indukál [80-82]. A fenti limfocita specifikus molekulák galektin-1 kötése meggyőzően bizonyított, ugyanakkor nem igazolt, hogy ezek a receptorok közvetítenék a galektin-1 biológiai hatását. A galektin-1 kezelés hatására a T sejt receptor ζ lánc csak részlegesen foszforilálódik, és olyan jelátviteli utak indulnak

el, amelyek nem a teljes aktivációhoz vezetnek, azaz ezek a sejtek nem osztódnak és nem termelnek citokineket sem (3.4.B ábra) [83-84].

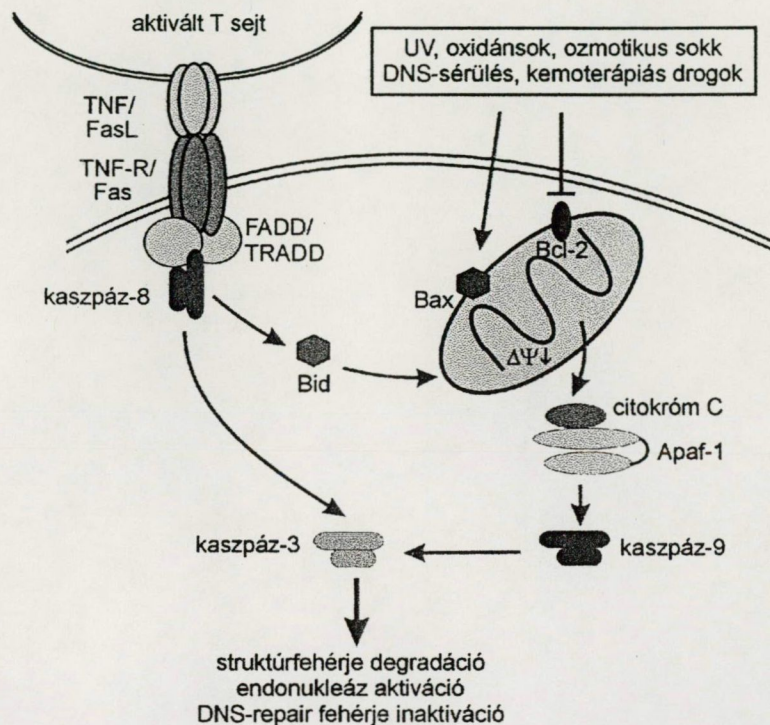


3.4. ábra: A galectin-1 indukálta apoptózis feltételezett közvetítői a T sejteken. A. A galectin-1 a CD45 foszfatázhoz kötődve csökkenti a foszfatáz aktivitását, ezáltal gátolja a Lyn (Src kináz) aktivációját. B. A galectin-1 kötődése a T sejtekhez nem a sejtaktivációhoz vezető jelátviteli utakat indítja el. A T sejt receptor jelátvivő ζ láncában az ITAM motívumok foszforilációja nem teljes, a sejtek osztódása és citokintermelése elmarad. C. A galectin-1 a CD7 fehérjékhez kapcsolódva apoptózist indukál, de a résztvevő szignálmolekulák nem ismertek.

Újabb tanulmány szerint a felsorolt fehérjék (CD2, CD3, CD4, CD45) hiánya nem befolyásolta a különböző T sejt vonalak választását a galectin-1 indukálta apoptózisra [85]. Ezzel szemben a CD7 szerepét hangsúlyozza, ugyanis egy CD7 deficiens T sejt, a HUT78 nem pusztult el galectin-1 kezelésre, a CD7 transzfekciója viszont visszaállította a sejtek érzékenységét a lektinnel szemben. Sem a további jelátviteli lépések, sem a CD7 egyéb *in vivo* funkciója nem ismertek (3.4.C ábra) [85].

Bizonyos elképzelések szerint a galectin-1 az aktivált T sejteket az interferon- γ indukálta apoptózisra teszi érzékennyé. Kimutatták, hogy a kezelt sejteken megváltozik az interferon- γ receptor összetétele, az α lánc mellett megjelenik a β lánc is, és a receptoron át közvetített jelek a proliferáció helyett apoptózist váltanak ki [49, 88]. Minthogy a galectin-1 kezelés során a naiv T sejtek nem, de az aktivált limfociták

elpusztulnak feltételezhető, hogy a lektin az immunválasz lecsengésében, az effektor funkciókat ellátó T sejtek eliminálásában vesz részt. Az aktivált T sejteken megjelenik a CD95 (Fas) és CD95L (FasL) receptor-ligand pár, melyek kapcsolódása a sejtekben kaspázok aktivációjához vezet (az intracelluláris folyamatokat a 3.5. ábra összegzi, bővebb magyarázat az ábra alatti szövegben). A kaspázok számos intracelluláris fehérjét hasítanak, ezáltal struktúrfehérjéket, sejtciklust szabályozó és DNS repair fehérjéket inaktíválnak, degradálnak, de bizonyos molekulákat a hasítással aktiválhatnak (endonukleázok, pro-apoptotikus fehérjék, gyulladáscsökkentő citokinek).



3.5. ábra: A T sejtekben lezajló apoptotikus folyamatok fő lépései. A tumor nekrozis faktor (TNF) citokincsalád és a TNF-receptor (TNF-R) család halál doménnel (DD) rendelkező tagjainak kapcsolódása a receptor trimerizációját idézi elő. Ez a DD doménnel rendelkező adapter molekulák (FADD, TRADD) kapcsolódásához és a kaspáz-8 aktiválódásához vezet. A kaspáz-8 effektor kaspázokat aktivál (kaspáz-3), illetve a Bcl-2 család pro-apoptotikus tagját, a Bid-et hasítja. Ez utóbbi a mitokondriumba transzlokálódik és a Bcl-2 család anti-apoptotikus fehérjéit (Bcl-2, Bcl-XL) gátolja. A mitokondriális utat különböző stresszek, pl. UV sugárzás, ozmotikus sokk, oxidálószeresek is kiválthatják, de a DNS sérülés és a különböző kemoterápiás szerek is elsődlegesen ezt az utat aktiválják. A mitokondriumban lokalizálódó, illetve oda transzlokálódó Bax és Bid az anti-apoptotikus fehérjékkel heterodimerizálódik, ennek következtében a mitokondrium transzmembrán potenciálja lecsökken, és a citokróm C kiáramlik a citoplazmába. Ott az Apaf-1 fehérjével együtt a kaspáz-9-et aktiválja és a terminális kaspáz kaskádát indítja el. A kaspáz-3 számos struktúrfehérjét, szignálmolekulát és enzimet hasít.

A kaszpázok aktivációja szükséges és elégséges a sejtek apoptózisához és a megfelelő morfológiai változások kialakításához (összefoglaló: [89]). A galektin-1 apoptotikus hatása azonban valószínűleg különbözik a Fas/FasL által mediált aktiváció indukálta sejthaláltól, ugyanis a CD3 negatív ARR T sejtek, a FasL indukálta sejthalálra nem szenzitív MOLT-4 T sejtek, valamint a Fas hiányos lpr egerek T sejtjei is elpusztulnak galektin-1 kezelésre [21, 53].

Más eredmények szerint a galektin-1 kezelés leukémiás T sejtekben a Bcl-2 anti-apoptotikus molekula szintjének csökkenését és a Bax pro-apoptotikus fehérje mennyiségének növekedését okozta [116]. Ezt a típusú apoptotikus választ bizonyos drogok, UV sugárzás, ozmotikus és oxidatív stressz váltja ki (3.5. ábra). Az apoptózis során a citoplazmában jelenlevő pro-apoptotikus fehérjék (Bax, Bak, Bad, Bik, Noxa) a mitokondrium membránjába transzlokálódnak és ott heterodimert formálnak a Bcl-2 család anti-apoptotikus fehérjével (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W). Ennek következtében a belső mitokondriális membrán transzmembrán potenciálja lecsökken, vezető csatornák nyílnak meg, és apoptózist indukáló molekulák áramlanak ki (citokróm c), amelyek az Apaf-1-gyel komplexet alkotva szintén kaszpázok aktivációját, és ez által a sejtek degradációját segítik elő (összefoglalók: [90, 91]). A galektin-3 a Bcl-2 család tagjaira jellemző Bcl-2 homológia 1 (BH1) motívummal rendelkezik és kapcsolódik az anti-apoptotikus fehérjéhez, ezzel magyarázható a galektin-3 apoptózist kivédő szerepe [92]. Ennek ismeretében feltételezhető, hogy a galektin-1 a Bcl-2 család anti- vagy pro-apoptotikus fehérjével kapcsolódva szabályozhatja azok szintjét. Ennek ellentmond, hogy a Bcl-2 fehérje túlermelletése T sejtekben nem akadályozza meg a galektin-1 indukálta sejthalált [21].

Immunreguláló hatás:

A galektin-1 sejtosztódás gátló és apoptózist indukáló hatása valószínűleg összefügg az immunrendszerben betöltött szabályozó szerepével. A galektin-1 különböző kísérletes autoimmun betegségek kialakulását gátolja [93-95]. Ha a nyulakat acetilkolin receptor fehérjével oltják, miaszténia gravisz kialakulásához vezet. Ellenben ha az antigénnel egyidejűleg galektin-1-gyel történik az oltás, a betegség klinikai tünetei elmaradnak. A galektin-1 injekció megszünteti a már kialakult betegség tüneteit is. Az autoimmun encefalomyelitisz és reumatoid arthritisz betegségekben szenvedő állatok galektin-1-gyel való kezelésének is hasonló terápiás hatása van. Ez utóbbi modellben



kimutatták, hogy a galektin-1 csökkentette a specifikus autoreaktív ellenanyagok szintjét. Ugyanakkor a gyulladáshoz vezető reakciók helyett az immunválasz a T_H2 sejtek aktiválódása felé tolódott el és megváltozott a termelt citokinek minősége [95]. A galektin-1 gyulladáscsökkentő hatása volt más kísérletekben is: a lektin megszüntette a foszfolipáz A₂ enzimmel történő oltással indukált ödémát, csökkentette az infiltráló neutrofil granulociták és hízósejtek számát, és gátolta a prosztaglandin E₂ és az arachidonsav felszabadulását az aktivált makrofágokból [96]. A galektin-1 immunmoduláló hatását vizsgáló kísérletek eredményei a lektin terápiás célokra való felhasználásának lehetőségét vetítik előre.

A felsorolt funkciók ellenére a galektin-1 és galektin-3 génekben mutáns egerek nem mutatnak szembevető fenotípusos változást: szaporodó- és életképességük, viselkedésük változatlan, a szövetek, szervek szerkezetében sincs eltérés, a vörsejtek száma is azonos a kontroll állatokéval. A vad típusú és mutáns egerek közötti durva fenotípusos eltérés hiányát a galektinek többé-kevésbé átfedő expressziójával és funkciójával magyarázzák (összefoglaló: [97]). A mutánsok alaposabb szövettani vizsgálata rámutatott a galektin-1 potenciális szerepére a szaglórendszer fejlődése során: galektin-1 hiányában a szaglóneuronok axonjának növekedése sérült [98]. A knock out egerek további vizsgálata rá fog mutatni a galektinek specifikus, finom szabályozás alatt álló funkciójára.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Az állati szervezetben termelődő galektin-1 az éretlen timociták, valamint az érett és aktivált perifériás T sejtek apoptózisát indukálja. Az irodalmi adatok alapján a galektin-1 hatásának fő mediátora a CD45 tirozin foszfatáz. A CD45 nagyméretű és erősen glikozilált extracelluláris részéhez különböző lektinek kötődnek. Intracelluláris foszfatáz doménje a T sejtek jelátviteli útjainak nélkülözhetetlen regulátora. A CD45 mellett azonban más potenciális galektin-1 kötő fehérjék is jelen lehetnek a sejteken. A galektin-1 indukálta apoptózisban szerepet játszó molekulák, a szignálok elemei nem ismertek.

A kutatás során a következő kérdésekre kívántunk választ kapni:

1. A T sejteken kívül mely csontvelői eredetű sejteken van galektin-1-et kötő fehérje? Mi történik a galektin-1 fehérjével ezeken a sejteken a kötődést követően?
2. Befolyásolja-e a galektin-1 egyéb hemopoetikus eredetű sejtek életképességét?
3. Milyen jelátviteli folyamatokon keresztül történik a galektin-1 által indukált apoptózis? Milyen specifikus szignálmolekulák aktivitása szabályozza ezt a folyamatot?
4. Valóban a CD45 foszfatáz a galektin-1 biológiai hatásának közvetítője?

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A KÍSÉRLETEKBEN FELHASZNÁLT ELLENANYAGOK, INHIBITOROK ÉS SEJTEK

A kísérletekhez kereskedelmi forgalomban kapható, analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk, amelyeket leggyakrabban a Reanaltól szereztünk be. Az ettől eltérő eredetű reagensek esetében külön feltüntettem, hogy azok mely gyártótól származnak. A pufferek, oldatok összetételét a fejezet végén található függelék tartalmazza (30. oldal).

5.1.1. Ellenanyagok és ellenanyag konjugátumok

II. táblázat:

Monoklonális ellenanyagok	Specifititás	Eredet
OKT3	CD3 ϵ lánc	Ortho, Raritan, USA
10A/2	κ könnyű lánc	Dr. Sármay Gabriella, ELTE Immunológiai Tanszék
GB3	CD45	laboratóriumunkban előállított [99]
KD3	CD45RA izoforma	laboratóriumunkban előállított [99]
UCHL-1	CD45RO izoforma	Dr. P.C.L. Beverly, London
T2/53	CD43	laboratóriumunkban előállított [100]
RH1.A4	glycophorin A	laboratóriumunkban előállított
4G10	foszfo-tirozin	Upstate Biotechnology Inc.

III. táblázat:

Poliklonális ellenanyagok	Konjugátum	Eredet
nyúl anti-egér IgG	torma peroxidáz (HRPO)	DAKO
kecske anti-egér IgG	fluoreszcein izotiocianát (FITC)	Sigma

5.1.2. Avidin-biotin rendszerek

IV. táblázat:

Konjugátum	Eredet
streptavidin-FITC	DAKO
streptavidin-QuantumRed (QR)	Sigma
streptavidin-HRPO	DAKO

5.1.3. Enzim inhibitorok

V. táblázat:

Inhibitor	Specifitás	Eredet
genistein	tirozin kinázok	Sigma
fenilarzén-oxid (PAO)	tirozin foszfatázok	Aldrich
nátrium-vanadát (Na ₃ VO ₄)	tirozin foszfatázok	Merck
aprotinin	szerin proteázok	Sigma
leupeptin	szerin proteázok	Sigma
fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF)	szerin proteázok	Sigma

5.1.4. Sejtek

A MOLT-4, CEM, Jurkat, BL-41, Raji, K562 és U937 sejteket 5% hőinaktivált magzati borjúsérumot (FCS, Protein GMK) tartalmazó *RPMI sejtenyészítő médiumban* (F.1.1., a pufferek, oldatok összetételét ld. a fejezet végén lévő függelékben, 30. oldal) tenyésztettük 37°C hőmérsékleten, 5% CO₂ atmoszférát biztosító termosztátban. A J45.01, JCaM1.6, P116 és Daudi sejteket 10% FCS tartalmú RPMI-ben tenyésztettük. A BL-41 sejtvonal Sármay Gabriella ajándéka (ELTE Immunológiai Tanszék, Budapest), a J45.01 sejteket Oravec Tamástól (NIH, Bethesda), a P116 sejteket R.T. Abraham professzortól (Mayo Clinic, Rochester) kaptuk. A sejteket Bürker-kamrában számoltuk és *tripánkékk festékekkel* (F.1.2.) határoztuk meg az élő sejtek arányát. A sejtek fenotípusát a VI. táblázat részletezi.

VI. táblázat:

Sejttípus	Sejtvonalak	Fenotípus
T sejtek	MOLT-4	éretlen T sejt, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD43 ⁺ , CD45RA ⁻ , CD45RO ⁺
	CEM	glükokortikoid szenzitív, éretlen T sejt, CD3 ⁻ , CD43 ⁻ , CD45RA ⁻ , CD45RO ⁺
	Jurkat	T leukémia, CD3 ⁺ , CD45RA ⁺
	J45.01	Jurkat CD45 ⁻ mutáns
	JCaM1.6	Jurkat p56 ^{lck} mutáns
	P116	Jurkat ZAP70 mutáns
B sejtek	BL-41	Burkitt limfóma, EBV ⁻ , κ ⁺ , CD45RA ⁺ , CD45RO ⁻ , CD43 ⁻
	Raji	Burkitt limfóma, EBV ⁺ , κ ⁻ , CD45RA ⁺ , CD45RO ⁻ , CD43 ⁺
	Daudi	Burkitt limfóma, EBV ⁺ , κ ⁺ , CD45RA ⁺ , CD45RO ⁻ , CD43 ⁻
Nem limfoid eredetű sejtek	K562	eritro-leukémia
	U937	mielo-monocita

5.2. BIOKÉMIAI ÉS IMMUNOLÓGIAI MÓDSZEREK

5.2.1. Rekombináns humán galektin-1 termelés és konjugálás biotinnal és fluoreszcein-izotiocianáttal

Termelés: A galektin-1 cDNS-ét Fouillit *et al.* [101] által leírt módszer szerint pQE-60 plazmidba klónoztuk, ezzel *E. coli* baktérium BL21 törzset (ompT bakteriális proteáz hiányos) transzformáltunk. A baktériumtelepet ezután 100 µg/ml ampicillinnel (Sigma) kiegészített LB tápfolyadékba (F.1.3.) oltottuk és 16 óráig növesztettük 37°C-on rázatva. A kultúrát százszorosára hígítva növesztettük tovább, OD_{600 nm} = 0,6-1,0-ig. A fehérjetermelés indukcióját 0,2 mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranoziddal (IPTG, Fermentas) végeztük 2-4 órán át, majd a baktériumokat centrifugálással (2500 x g, 30 perc, 4°C hőmérséklet, Sorvall RC3B centrifuga) összegyűjtöttük. A baktériumüledéket 160 ml szuszpenziós pufferben (F.1.4.) mostuk (2500 x g, 15 perc, 4°C, Hettich Universal 30 RF, 1424A rotor), végül 80 ml feltároló pufferben (F.1.5.) vettük fel. A

feltárást French press készülékkel végeztük. A baktériumlizátumból ezután centrifugálással (15000 x g, 30 perc, 4°C, Sorvall SS34 rotor) távolítottuk el a sejttörmeléket.

Tisztítás: A galektin-1 fehérjét affinitás kromatográfiával, α -laktóz-gél oszlopon (EY Laboratories Inc., USA) tisztítottuk. Az oszlopot 20 térfogat *oszlopmosó pufferrel* (F.1.6.) átmostuk, majd rárétegeztük a baktérium-lizátumot. Ezután további 5 térfogat oszlopmosó pufferrel lemostuk a nem kötődő fehérjéket, végül laktóz tartalmú *elúciós pufferrel* (F.1.7.) eluáltuk a galektin-1 fehérjét, 0,5 ml frakciókat szedve. A frakciók fehérjetartalmát és tisztaságát 12% SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük. A megfelelő fehérjetartalmú frakciókat összegyűjtöttük és 100 μ M β -merkaptóetanol tartalmú PBS-be dializáltuk, Spectra/Por (Spectrum Laboratories, Inc., USA) dialízis membránt használva. Az oszlopot 10 oszloptérfogat 1 M nátrium-klorid oldattal átmostuk, majd *tároló pufferben* (F.1.8.) tároltuk a következő felhasználásig.

A fehérje koncentrációját egyrészt 280 nm-en való elnyelése alapján, másrészt Bradford reagenssel a gyártó utasítását követve (Bio-Rad) határoztuk meg ATI UNICAM 5625 UV/VIS spektrométerrel.

Galektin-1 konjugálása biotinnal és fluoreszcein-izotiocianáttal: A fehérjét 50 mM nátrium-hidrokarbonát pufferbe (pH 8,5) dializáltuk, majd 1 mg fehérjéhez 100 μ g biotint (EZ-LinkTM sulfo-N-hydroxysuccinimide-LC-biotin, Pierce), illetve fluoreszcein-izotiocianátot (FITC) adtunk. Két óra 4°C hőmérsékleten való inkubáció után 100 μ M β -merkaptóetanol tartalmazó *PBS pufferbe* (pH 7,4) (F.1.9.) dializáltuk át a galektin-1 oldatot. A biotinilált fehérjét ezután Western blot rendszerben, a FITC jelölést FACSCalibur áramlási citométerrel teszteltük (a módszerek részletezése az 5.2.11. és az 5.2.3. fejezetben található).

5.2.2. Fehérjék kapcsolása Sepharose 4B gyöngyökhöz

A galektin-1 fehérjét cian-bromid aktivált Sepharose 4B (Pharmacia Biotech., Svédország) gyöngyökhöz kötöttük. A gyöngyöket 15 percig duzzasztottuk 1 mM sósavban (1 mg fehérjéhez 100 mg száraz gyantából indultunk ki), ezután üvegszűrő

segítségével 1 mM sósavval, majd *kötő pufferrel (pH 8,3) (F.1.10.)* mostuk. A kötő pufferbe dializált fehérjét hozzáadtuk a gyöngyökhöz és két órán át lassan kevertettük. A gyöngyöket centrifugálással üleptítettük (1 perc, 250 x g, Hettich Universal 30 RF, 1424A rotor), a felülúszót 0,2 M glicin (pH 8,0) oldatra cseréltük, a szabad kötőhelyek lefedése érdekében. További két órán át tartó lassú kevertetés után 2 ciklus mosás következett, váltakozó pH értékű pufferekkel: *kötő puffer (pH 8,3 (F.1.10.))*, majd *acetát puffer (pH 4,0) (F.1.11.)*. A galektin-1-Sepharose 4B gyöngyöket 10% koncentrációban, 0,1% nátrium-azid tartalmú *PBS-ben (F.1.9.)* tároltuk 4°C-on.

5.2.3. Sejtfelszíni struktúrák vizsgálata áramlási citométerrel

A fluoreszcencia intenzitás mérése FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) történt, mintánként 10000 sejtről, 256 csatornás felbontással. Közvetlenül a mérés előtt a mintákhoz az elpusztult sejtpopuláció megkülönböztetése érdekében 10 µg/ml propídium-jodidot adtunk. Az élő sejteket méretük és propídium-jodid kizárásuk alapján kapuztuk ki, ezeket ábrázoltuk, valamint statisztikai számolásokat végeztünk CellQuest™ (Becton Dickinson) programmal. A jel/zaj arányt a következőképpen számoltuk:

$$\text{fluoreszcencia jel} = 10^{((\text{Ch\# minta} - \text{Ch\# kontroll})/64)}$$

ahol „Ch# minta” a kérdéses minta, „Ch# kontroll” pedig a jelöletlen minta fluoreszcencia intenzitás átlaga csatornaszámban kifejezve. A dolgozatomban szereplő ábrák elkészítéséhez a WinMDI 2.7 szoftvert használtam.

Sejtfelszíni molekulák kimutatása specifikus ellenanyaggal: Mintánként 5×10^5 sejtet jelöltünk 20 µg/ml tisztított ellenanyaggal 100 µl térfogatban vagy 100 µl hibridóma felülúszóval, 1 óráig 4°C-on. A sejteket lecentrifugáltuk (5 perc, 250 x g, 4°C) és *FACS pufferrel (F.1.12.)* kétszer megmostuk, majd további 30 percig inkubáltuk az első ellenanyagot felismerő kecske anti-egér IgG-FITC konjugátummal (1:100 hígítás). A sejteket FACS pufferrel való mosás után analizáltuk.

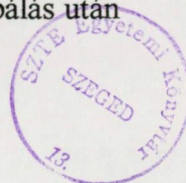
Galektin-1 sejtekhez való kötődésének vizsgálata: A sejtekhez FACS pufferben hígított, 50 µg/ml FITC-, illetve biotin-jelölt galektin-1-et adtunk és 1 óráig 4°C-on inkubáltuk. A galektin-1-FITC kötő sejteket FACS pufferrel való mosás után azonnal analizáltuk, illetve a galektin-1-biotinnal jelzettekhez streptavidin-FITC-et adtunk (1:100 hígítás) és további 30 percig inkubáltuk, majd mosás után vizsgáltuk.

Galektin-1 internalizáció detektálása: A sejtekhez sejtenyésztió médiumban hígított, 50 µg/ml FITC-, illetve biotin-jelölt galektin-1-et adtunk és 1 óráig 4°C-on inkubáltuk (az alacsony hőmérséklet gátolja az endocitózist). Ezután a nem kötődő lektint eltávolítottuk és a mintákat 4°C-on, illetve 37°C-on tároltuk 3 órán át. A galektin-1-biotinnal kezelt sejtekhez ezután streptavidin-FITC-et (1:100 hígítás), meghatározott galektin-1-FITC kezelt mintákhoz 100 mM laktóz oldatot adtunk és további 30 percig 4°C-on inkubáltuk. Végül a sejteket FACS pufferrel mostuk és analizáltuk.

Galektin-1 és membránfehérjék sejt felszíni szintjének együttes követése: A sejteket a fent leírt módon galektin-1-biotinnal kezeltük, és 4°C-on, illetve 37°C-on tároltuk 3 órán át, majd a vizsgálandó membránfehérjéket felismerő monoklonális ellenanyaggal inkubáltuk. Az ellenanyagokat kecske anti-egér IgG-FITC konjugátummal reagáltattuk, míg a biotinilált galektin-1 sejt felszínhez kötött mennyiségét streptavidin-QuantumReddel jelöltük. A kettős jelölés fluoreszcencia intenzitását az FL1 és FL3 detektorokkal követtük.

5.2.4. Apoptotikus sejtek meghatározása áramlási citométerrel

Apoptózis vizsgálat Annexin V-FITC jelöléssel: A sejteket 24 lyukú lemezen (Greiner) növesztettük sejtenyésztió médiumban, és az adott kísérletnél leírt koncentrációjú reagenssel kezeltük. Az inkubáció után a sejtekről eltávolítottuk a médiumot, *Annexin V-kötő pufferben (F.1.13.)* mostuk, majd 5×10^5 sejtet 95 µl Annexin V-kötő pufferben szuszpendáltunk és 5 µl FITC-jelölt Annexin V reagenst (BD PharMingen, USA) adtunk hozzá. 15 perc szobahőmérsékleten való inkubálás után



a sejteket áramlási citométerrel vizsgáltuk. Közvetlenül a mérés előtt 5 µg/ml propidium-joddal egészítettük ki a jelölést, a késői apoptotikus, illetve nekrotikus sejtek meghatározásához.

Apoptotikus sejtek meghatározása DNS-tartalom mérésével: A kísérleteknél meghatározott kezelések után a sejteket kétszer mostuk 0,1% glükóz tartalmú PBS pufferrel (F.1.9.). A sejtek viabilitását tripánkék festéssel állapítottuk meg, majd kezelésként 5×10^5 sejtet 500 µl DNS-festő pufferben (F.1.14.) inkubáltunk 30 percig szobahőmérsékleten. A sejtek DNS tartalmát FACSCalibur áramlási citométerrel mértük, mintánként 10000 sejtről rögzítettük az adatokat, 1024 csatornás felbontással. Az értékelést ModFit LT (Verify Software House, Inc., USA) programmal végeztük, amely görbét illeszt a G_0/G_1 , S, G_2/M sejtciklus fázisokra jellemző DNS tartalommal rendelkező sejtpopulációkra, valamint G_1 DNS tartalmánál kevesebb DNS tartalommal rendelkező sejtekre (sub- G_1). A kezelt sejtek apoptózis százalékát a következő egyenlettel számoltuk ki:

$$\text{apoptózis \%} = 100 \times (\text{sub-}G_1 \% \text{ a kezelt mintában} - \text{sub-}G_1 \% \text{ a kontroll mintában}) / (100 - \text{sub-}G_1 \% \text{ a kontroll mintában}),$$

amit a kontroll minták elhanyagolható mértékű spontán apoptózisa esetében egyszerűsítettünk:

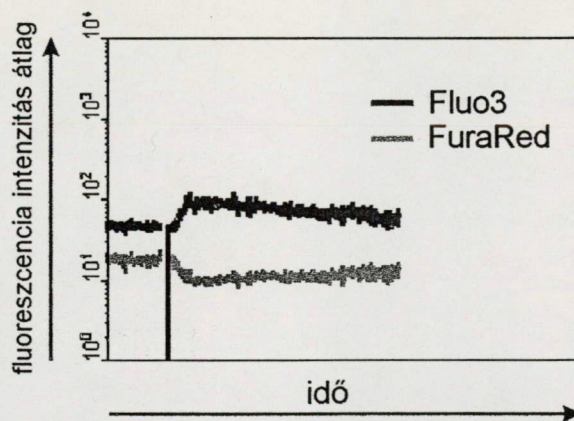
$$\text{apoptózis \%} = \text{sub-}G_1 \% \text{ a kezelt mintában} - \text{sub-}G_1 \% \text{ a kontroll mintában}.$$

A különböző sejteken végzett párhuzamos mérések eredményei közötti eltérés szignifikanciáját Student-eloszlású kétmintás t-próbával ellenőriztük, ahol $T_\alpha=0,05$.

5.2.5. Intracelluláris kalcium-ion koncentráció változás mérése áramlási citométerrel

Az intracelluláris kalcium-ion koncentráció változása a szabad Ca^{++} mennyiségére érzékeny fluoreszcens festékekkel követhető: a Fluo3 és FuraRed (Molecular Probes,

Inc., USA) szelektív próbák az emittált fluoreszcencia jel intenzitásának növekedésével, illetve csökkenésével válaszolnak a kalcium-ion szint változására (5.1. ábra, fekete illetve szürke vonal). A sejteket 10^7 sejt/ml koncentrációban vettük fel *sejtenyésző médiumban* (F.1.1.) és $7,5 \mu\text{M}$ Fluo3 és $7,5 \mu\text{M}$ FuraRed fluoreszcens festékekkel 30 percig inkubáltuk 37°C -on. A sejtekhez ezután 20 térfogat friss médiumot adtunk és további 30 percig inkubáltuk. Végül a mintákat kétszer mostuk RPMI-vel és az analízisig szobahőmérsékleten, sötétben tároltuk, és csak közvetlenül a mérés előtt melegítettük fel 37°C -ra. A FACSCalibur citométerrel történő mérés alkalmával a Fluo3 és FuraRed festékek fluoreszcencia intenzitását detektáltuk az FL1, illetve az FL3 detektorral, az idő függvényében. Hatvan másodpercig az alap kalcium-ion szintet mértük, majd hozzáadtuk a stimuláló anyagot és további 5 percig követtük a jel változását. A fluoreszcencia intenzitások átlagát véve alapul kiszámoltuk a jel/zaj arányt (ld. az 5.2.3. fejezetben), majd a két festék fluoreszcencia jelének arányát ábrázoltuk a továbbiakban.



5.1. ábra: A Fluo3 és FuraRed festékek fluoreszcencia intenzitásának változása az intracelluláris kalcium-ion koncentráció változásával. Az FL1 (Fluo3, fekete vonal), illetve FL3 (FuraRed, szürke vonal) detektorokban mért fluoreszcencia intenzitás átlagokat ábrázoltam az idő függvényében.

5.2.6. Sejtfelszíni fehérjék jelölése szulfo-NHS-LC-biotinnal

A sejtmembrán fehérjéinek extracelluláris szakasza nagy hatékonysággal jelölhető szulfo-NHS-LC-biotinnal (Pierce). A reagens negatív szulfát csoportjának köszönhetően nem jut át a sejtmembránon. Az N-hidroxiszukcinimid (NHS) lép reakcióba a lizinek ϵ -aminocsoportjaival, az LC szakasz pedig távtartó szerepet játszik,

csökkenti a sztérikus gátlást, így a fehérje funkciójának megőrzését biztosítja. A membránfehérjék jelölését Sargiacomo *et. al* (1989) [102] módosított protokollja szerint végeztük. A sejteket hideg, 1 mM magnézium-kloriddal és 0,1 mM kalcium-kloriddal kiegészített *PBS pufferrel* (F.1.9.) mostuk, és 8×10^7 sejthez 1 mg biotint adtunk. A sejteket 20 percig rázattuk 4°C-on, majd a biotin oldatot frissre cserélve megismételtük a kezelést. Végül a felülúszót eltávolítottuk, a maradék NHS-kötőhelyeket szérumentes, szabad aminosavat tartalmazó *RPMI médiummal* (F.1.1.) 10 percig, 4°C hőmérsékleten blokkoltuk. A sejteket ezután kétszer mostuk PBS / 1 mM MgCl₂ / 0,1 mM CaCl₂ pufferrel. A jelölést követően a sejtek átlagosan 93%-a bizonyult élőknek tripánkéék festéssel, tehát az intracelluláris fehérjék csupán elhanyagolható mértékben jelölődtek.

5.2.7. Fehérjék affinitás tisztítása

A biotinilált sejteket 2×10^7 /ml koncentrációban 1% TritonX-100 tartalmú *lízis pufferben* (F.1.15.) szuszpendáltuk, majd 30-60 percig, jégen inkubáltuk. A sejtmagokat és a sejttörmelékét 15000 x g fordulattal 15 percig való centrifugálással (Hettich Universal 30 RF, E1175 rotor) távolítottuk el 4°C-on. A 2×10^7 sejtől készített sejtlizátumot ezután 10 µl ülepített galektin-1-Sepharose 4B gyöngyökre pipettáztuk és 1,5 óráig rázattuk 4°C-on. Végül a PBS-sel háromszor megmosott gyöngyökhöz 10 µl kétszeres töménységű *redukáló SDS mintapuffert* (F.1.16.) adtunk. Bizonyos mintákban a galektin-1-Sepharose 4B gyöngyökről 40 µl 200 mM laktóz tartalmú lízis pufferrel eluáltuk a kötődött fehérjéket, majd redukáló SDS mintapufferben forraltuk 5 percig.

5.2.8. Sejtek aktiválása tirozin-foszforilációs vizsgálatokhoz

Mintánként 10^6 sejtet 5×10^7 sejt/ml koncentrációban vettünk fel szérumentes *RPMI sejtenyésző médiumban* (F.1.1.) (20 µl/minta). A 37°C hőmérsékleten való 5 perces előinkubáció után 5 µl térfogatban adtuk hozzá a stimuláló anyagot: 15 µg/ml anti-CD3 ellenanyagot (OKT3) vagy anti-κ-lánc ellenanyagot (10A/2), illetve 25 µg/ml

galektin-1 fehérjét. A kontroll (nem stimulált) mintákat minden esetben azonos térfogatú pufferrel egészítettük ki. Az antigénfelismerő receptorok keresztkötését követően 1 perccel és a galektin-1 adást követően 10 perccel állítottuk le a reakciót kétszeres töménységű *lízis pufferrel* (F.1.17.), majd 30 percig jégen lizáltuk a sejteket, végül a sejtanyagot és oldhatatlan sejtörmelékét 15000 x g fordulattal 4°C-on 15 percig történő centrifugálással távolítottuk el. A sejtízátumot kétszeres töménységű *redukáló SDS mintapufferrel* (F.1.16.) kevertük össze és forraltuk 5 percig.

5.2.9. Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Az *SDS mintapufferben* (F.1.16.) forralt mintákat SDS-poliakrilamid gélen választottuk szét. Diszkontinuus gélt készítettünk, a *koncentráló gél* (F.1.18.) töménysége 5%, a *szeparáló gél* (F.1.19.) a fehérjék mérete szerint alkalmas töménységű (10%, 12%) volt. Egyes kísérletekben a 7,5-15% gradiens poliakrilamid gélt használtunk a széles molekulatömeg-tartományba eső fehérjéket tartalmazó sejtízátum analízisére. A fehérjék molekulatömegének logaritmusát fordítottan arányos a fehérje relatív mobilitásával (a fehérje futási távolsága osztva a jelzőfesték futási távolságával), ezért azt standard fehérjék (Sigma vagy Gibco BRL) futása alapján készített kalibráló egyenes segítségével határoztuk meg. A gélelektroforézist követően a gélt *Coomassie Brilliant Blue R-250 oldattal* (F.1.21.) festettük 15 percig, majd 4-16 óráig 10% (v/v) ecetsav oldattal szintelenítettük.

5.2.10. Western blot analízis

Az SDS poliakrilamid géleket metanol tartalmú *transzfer pufferben* (F.1.22.) ekvilibráltuk 15 percig. A gélek fehérjetartalmát ezután nitrocellulóz membránra (Schleicher & Schuell GmbH, Németország) transzferáltuk (20V, 16 óra, 4°C). A membrán szabad kötőhelyeit 3% zselatin (Sigma) tartalmú *TBST pufferrel* (F.1.23.) blokkoltuk 1 óráig szobahőmérsékleten. A fehérjéket specifikus ellenanyagokkal, illetve streptavidin-HRP konjugátummal reagáltattuk, a kimutatás céljának megfelelően:

- tirozinon foszforilált fehérjék kimutatása: 4G10 ellenanyaggal, 1:20000 hígítás 3 % zselatin-TBST pufferben, inkubáció 1 óra 4°C-on, majd mosás háromszor 5 percig TBST-nel, a második ellenanyag nyúl anti-egér IgG tormaperoxidázzal konjugálva, 1:7500 hígításban, inkubáció 1 óra 4°C-on.
- anti-CD45 monoklonális ellenanyag keverékkel (GB3 felülúszóban oldott 5 µg/ml T2/48) 16 óra inkubáció 4°C-on, majd mosás háromszor 5 percig TBST-nel, a második ellenanyag nyúl anti-egér IgG - HRPO, 1:7500 hígításban, inkubáció 1 óra 4°C-on.
- streptavidin-HRPO konjugátum 1:40000 hígításban alkalmazva 1 óráig 4°C-on.

Végül a membránt minden esetben ötször 5 percig mostuk TBST-nel. A reaktív fehérjecsíkokat ezután ECL Plus rendszer (Amersham Pharmacia Biotech., UK Ltd.) felhasználásával tettük láthatóvá, a tormaperoxidáz által oxidált luminol fénykibocsátását röntgenfilmen (Agfa-gevaert N.V., E.C.) detektáltuk.

5.2.11. FÜGGELÉK I.: Pufferek, oldatok

F.1.1.: RPMI sejtenyésztő médium:

1,04% (w/v) RPMI 1640 por (Gibco BRL)
0,2% (w/v) NaHCO₃
10 NE/ml penicillin (Biogal Gyógyszergyár Rt.)
0,1 mg/ml streptomycin (Egis Gyógyszergyár Rt.)
sterilre szűrés után kiegészítve 0,63 mg/ml L-glutaminnal (Sigma) és 5% (v/v) vagy 10% (v/v) hőinaktivált magzati borjúsérummal (FCS, Protein GMK, Gödöllő)

F.1.2.: Tripánkék oldat sejtyszámoláshoz:

0,16% (w/v) tripánkék
fiziológias sóoldat

F.1.3.: LB:

10 g/l tripton
5 g/l élesztő kivonat (Difco)
5 g/l NaCl (Merck)
nátrium-hidroxiddal pH 7,0 - ra beállítva

F.1.4.: Szuszpenziós puffer baktérium mosásához:

50 mM Tris/HCl pH 7,5
10 mM EDTA

F.1.5.: Feltáró puffer French press-hez:

50 mM Tris/HCl pH 7,5
10 mM EDTA
4 mM β -merkaptóetanol (Sigma)
1 mM PMSF (Sigma)

F.1.6.: Oszloposó puffer galektin-1 tisztításhoz:

50 mM Tris/HCl pH 7,5
4 mM β -merkaptóetanol
0,25 mM PMSF

F.1.7.: Elúciós puffer galektin-1 tisztításhoz:

50 mM Tris/HCl pH 7,5
100 mM laktóz (Aldrich)
100 mM jódacetamid (Sigma)

F.1.8.: Tároló puffer α -laktóz-gél oszlophoz:

10 mM foszfát puffer pH 7,4
150 mM NaCl
0,1% (w/v) NaN₃

F.1.9.: PBS, pH 7,4:

1,8 mM NaH₂PO₄
10 mM Na₂HPO₄
135 mM NaCl
3 mM KCl

F.1.10.: Kötő puffer Sepharose 4B gyöngyökhöz:

0,1 M NaHCO₃ pH 8,3
0,5 M NaCl

F.1.11.: Acetát puffer Sepharose 4B gyöngyökhöz:

0,1 M Na-acetát pH 4
0,5 M NaCl

F.1.12.: FACS puffer:

PBS
1% (w/v) BSA (Sigma) vagy 1% (v/v) FCS (Protein GMK)
0,1% (w/v) nátrium-azid (Sigma)

F.1.13.: Annexin V-kötő puffer:

10 mM HEPES pH 7,4
140 mM NaCl
2,5 mM CaCl₂

F.1.14.: DNS-festő puffer:

PBS
0,1% (v/v) Triton X-100 (Sigma)
0,1% (w/v) nátrium-citrát
10 μ g/ml RNáz (Sigma)
10 μ g/ml propidium-jodid (Sigma, Fluka)

F.1.15.: Lízis puffer affinitás tisztításhoz:

50 mM Tris/HCl pH 7,5
150 mM NaCl
1% (v/v) Triton X-100
1 mM EDTA
1 mM PMSF
10 μ g/ml aprotinin



F.1.16.: Redukáló SDS mintapuffer (kétszeres töménységű):

125 mM Tris/HCl pH 6,8
20% (v/v) glicerin
4% (w/v) SDS
2% (v/v) β -merkaptoetanol (Sigma)
brómfenolkék (Bio-Rad)

F.1.17.: Lizis puffer foszfo-tirozin analízishez:

50 mM HEPES pH 7,4
1% (v/v) Triton X-100 (Sigma)
150 mM NaCl
20 mM NaF (Sigma)
200 μ M Na_3VO_4 (Merck)
2 mM EDTA
1 mM PMSF (Sigma)
10 μ g/ml leupeptin (Sigma)
10 μ g/ml aprotinin (Sigma)

F.1.18.: Koncentráló gél:

5% (w/v) akrilamid / 0,13% (w/v) bisz-akrilamid (Bio-Rad)
125 mM Tris/HCl pH 6,8
0,1% (w/v) SDS
0,033% (w/v) ammónium-peroxi-diszulfát (APS) (Sigma)
0,07% (v/v) N, N, N, N'-tetrametil-etilén-diamin (TEMED) (Bio-Rad)

F.1.19.: Elválasztó gél:

7-15% (w/v) akrilamid/ 0,182-0,39% (w/v) bisz-akrilamid
125 mM Tris/HCl pH 8,8
0,1% (w/v) SDS
0,033% (w/v) ammónium-peroxi-diszulfát
0,07% (v/v) N, N, N, N'-tetrametil-etilén-diamin (TEMED)

F.1.20.: Futtató puffer:

25 mM Tris/HCl pH 8,3
194 mM glicin
0,1% (w/v) SDS

F.1.21.: Coomassie Brilliant Blue G-250 fehérjeszeparáló gélek festéséhez:

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
50% (v/v) metanol
10% (v/v) ecetsav

F.1.22.: Transzfer puffer:

25 mM Tris-HCl pH 8,3
194 mM glicin
20% (v/v) metanol

F.1.23.: TBST:

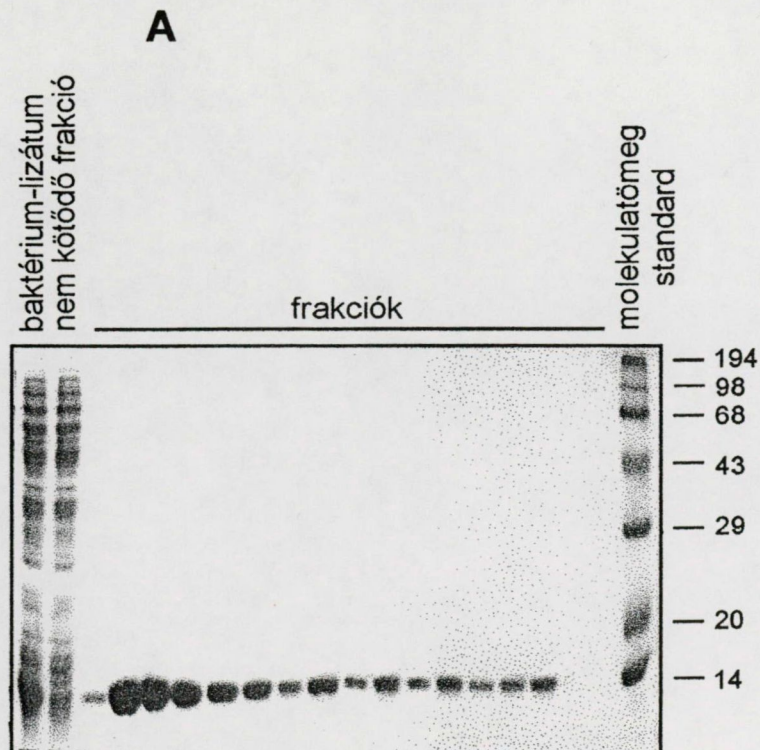
10 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
0,05% (v/v) Tween 20 (Sigma)

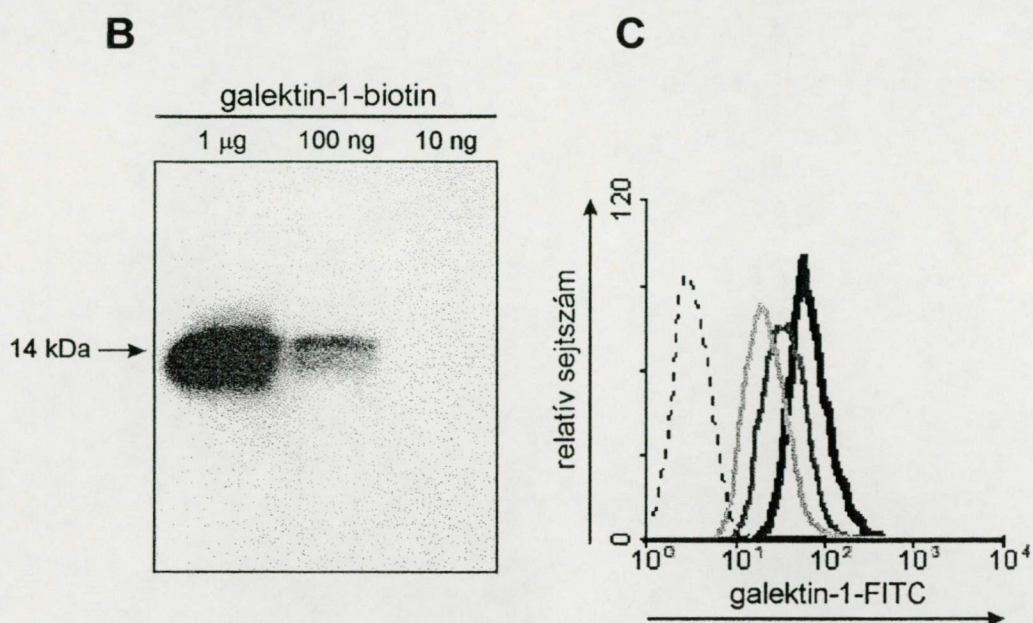
6. EREDMÉNYEK

6.1. A REKOMBINÁNS HUMÁN GALEKTIN-1 JELLEMZÉSE

A rekombináns humán galektin-1 cDNS szekvenciáját tartalmazó pQE-60 expressziós vektort *E. coli* ompT proteázhiányos BL21 törzsébe transzformáltuk. A fehérje termelést IPTG-vel indukáltuk, majd a lektint a baktériumok sejtlizátumából α -laktózs-gél affinitás oszlopon tisztítottuk, laktózt és jódacetamidot tartalmazó elúciós pufferrel. Ha a galektin-1 szulfhidril-csoportjai oxidálódnak, hemagglutináló hatása elveszik [16]. A jódacetamid a szulfhidril csoportok alkilálásával megakadályozza, hogy azok oxidatív körülmények között diszulfid hidat képezzenek. A galektin-1 alkilálása tehát megkönnyíti a fehérje tárolását és alkalmazását az *in vitro* kísérletekben. A laktózoszlopról gyűjtött frakciók tisztaságát és fehérjetartalmát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük (6.1.A ábra).

A rekombináns galektin-1 fehérjét a könnyebb kimutatás érdekében közvetlenül jelöltük biotinnal és fluoreszcein-izotiocianáttal. A biotin-jelölés sikerességét Western blot rendszerben streptavidin-HRPO-val (6.1.B ábra), a FITC-kötés hatékonyságát és egyben a galektin-1 kötődését Jurkat T sejtekhez áramlási citométerrel ellenőriztük (6.1.C ábra).





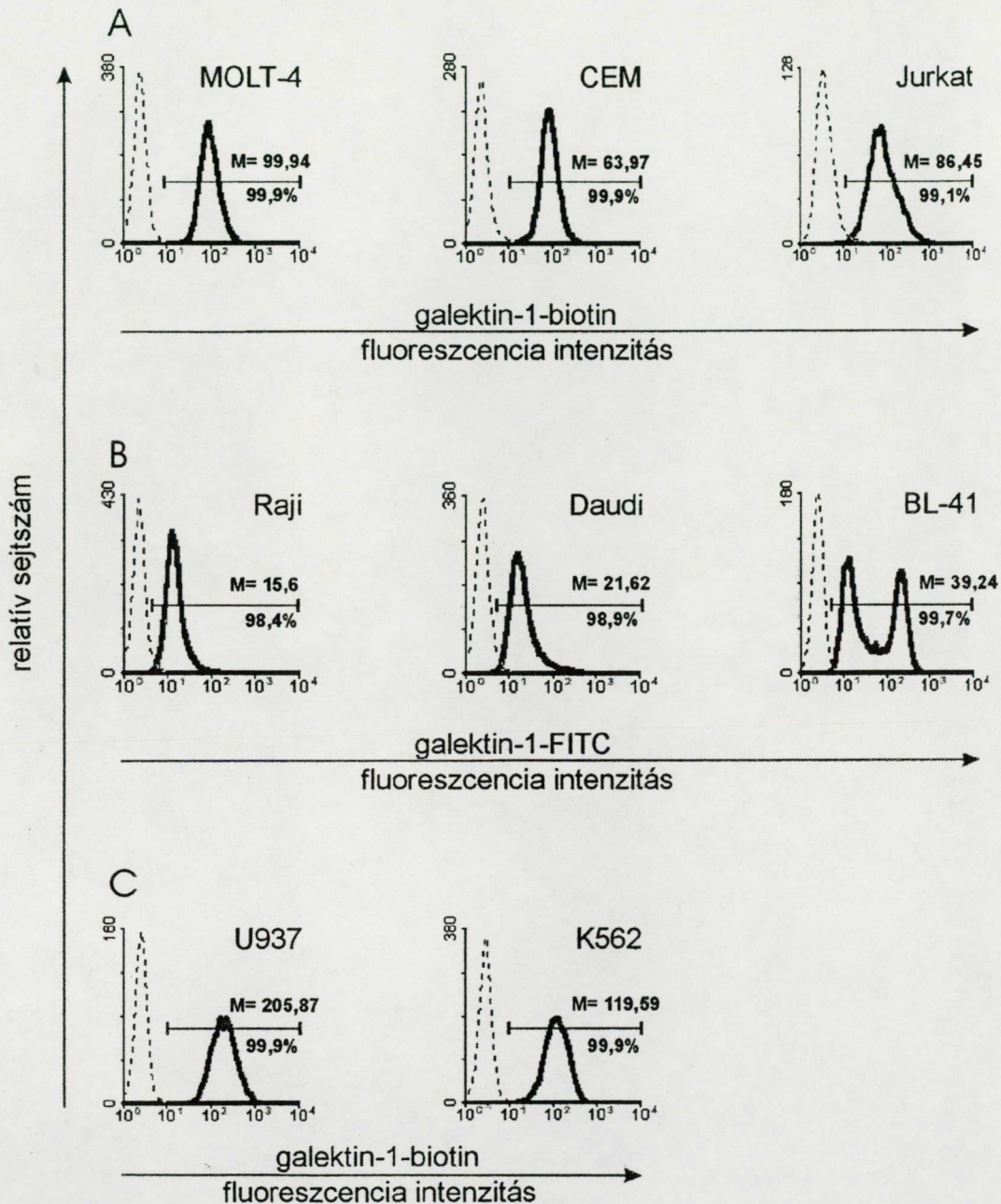
6.1. ábra: Rekombináns humán galektin-1 tisztítása, jelölése biotinnal és fluoreszcein-izotiocianáttal. A. Az *E. coli* baktériumban termeltetett rekombináns galektin-1 fehérjét a baktérium-lizátumból laktóz-gél affinitás oszloppal tisztítottuk. A baktérium-lizátum, a nem kötődő frakció és az elúcióval nyert frakciók fehérjetartalmát 12% SDS-poliakrilamid gélen ellenőriztük. B. A galektin-1 fehérje biotin-jelölését Western blotban ellenőriztük: különböző mennyiségű fehérjét (1 µg, 100 ng és 10 ng) 12% SDS-poliakrilamid gélen futtattunk és nitrocellulóz membránra vittünk át, majd streptavidin-HRPO-val reagáltattunk. C. Jurkat sejtekhez különböző koncentrációjú galektin-1-FITC oldatot adtunk és 1 óráig inkubáltuk 4°C-on, majd a sejteket áramlási citométerrel vizsgáltuk. Galektin-1-FITC koncentrációk: 0 µg/ml (szaggatott vonal), 10 µg/ml (világos szürke vonal), 30 µg/ml (sötét szürke vonal), 50 µg/ml (fekete vonal).

6.2. A GALEKTIN-1 HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA HEMOPOETIKUS EREDETŰ SEJTEKEN

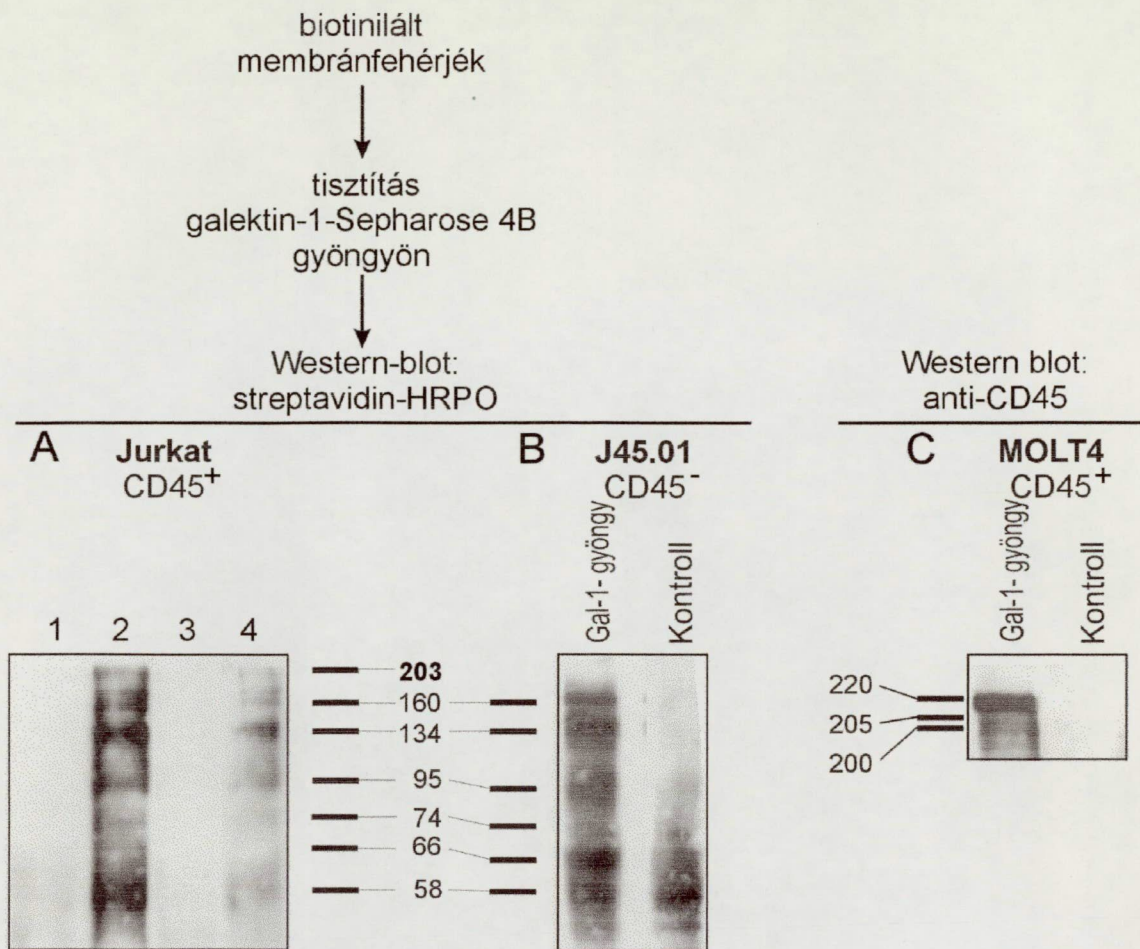
6.2.1. A galektin-1 kötődik a vizsgált sejtekhez

Kísérleteinkben a FITC-cel illetve biotinnal jelölt galektin-1-et használtunk, hogy megvizsgáljuk a lektin kötődését a különböző eredetű és differenciálódási stádiumban levő hemopoetikus sejtekhez. A 6.2. ábra mutatja be a különböző sejtvonalak galektin-1 kötését. A vizsgált sejtvonalak mindegyike kötötte a galektin-1-et. A galektin-1 kötő fehérjék mennyiségében nagy volt a különbség: a T sejtek átlag fluoreszcencia intenzitása $M = 83,45 \pm 18,17$, a B sejteké $M = 25,49 \pm 12,28$ volt, míg az eltérő eredetű limfoid sejtek 100 és 200 közötti értéket adtak (6.2. ábra). Tehát ez utóbbiak hordoznak legnagyobb mennyiségben galektin-1 kötő struktúrákat a felszínükön. A sejtpopuláció minden esetben homogénnek mutatkozott a galektin-1 kötés tekintetében. Egyetlen

kivétel a BL-41 sejtvonal volt, a 60 % többséget képviselő populáció kevesebb galektin-1-et kötött (6.2.B ábra). Ez a kettős csúcs nem tűnt el a galektin-1 koncentráció növekedésével sem (nem bemutatott adat).



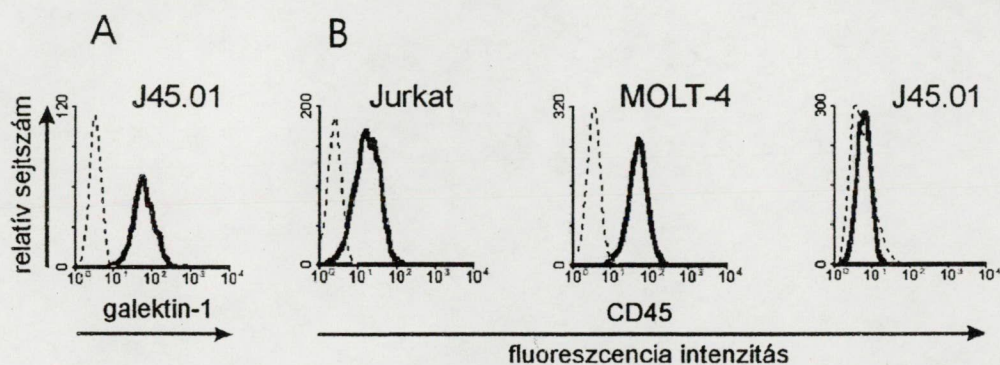
6.2. ábra: A rekombináns humán galektin-1 kötődik a különböző sejtípusokat és érettségi stádiumot reprezentáló sejtvonalakhoz. A. A MOLT-4, CEM és Jurkat sejteket 3,6 μ M biotin-jelölt galektin-1-gyel 1 órán át (a kontrollhoz azonos térfogatú puffert adtunk), majd streptavidin-FITC-cel 30 percig 4°C-on kezeltük. A sejteket ezután áramlási citométerrel vizsgáltuk. **B.** A Raji, Daudi és BL-41 B sejteket 50 μ g/ml FITC-jelölt galektin-1-gyel kezeltük 1 órán át 4°C hőmérsékleten, majd áramlási citométerrel vizsgáltuk a fluoreszcencia intenzitást. **C.** A nem limfoid eredetű sejteket (U937 és K562) az A pontban leírtak szerint kezeltük és analizáltuk. Az áramlási citométerrel való analízis során a méret és propidium-jodid kizárás alapján kapuztuk ki az élő sejteket (nem jelölt, kontroll minták - szaggatott vonal, galektin-1-gyel jelölt minták - vastag vonal, M - fluoreszcencia intenzitás átlag).



1. Kontroll gyöngyökhöz kötődő fehérjék
2. Gal-1-gyöngyökhöz kötődő fehérjék
3. Gal-1-gyöngyön laktóz elúció után maradt fehérjék
4. Gal-1-gyöngyről laktózzal eluált fehérjék

6.3. ábra: A galektin-1 kötő fehérjék azonosítása. **A.** A sejtfelszínen biotinilált Jurkat sejtek lizátumából galektin-1-gyöngyökkel tisztítottuk a galektin-1 kötő fehérjéket (2. oszlop). Kontrollként egér immunglobulinnal konjugált gyöngyöket használtunk (1. oszlop). A galektin-1 és a hozzá kötődött fehérjék közötti kapcsolatot ezután laktózzal kompetáltuk. Mind a gyöngyökön maradt (3. oszlop), mind a laktóz-oldattal lemosott fehérjéket (4. oszlop) megvizsgáltuk. A fehérjéket 7,5-15% gradiens SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét, majd a nitrocellulóz membránra transzferált biotinilált membránfehérjéket streptavidin-HRPO-val reagáltattuk. **B.** A CD45 hiányos J45.01 sejteket a fent leírtak szerint analizáltuk. **C.** A MOLT-4 T sejtek lizátumát az A. pont alatt leírtak szerint kezeltük, majd a fehérjéket 7% SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, és anti-CD45 ellenanyaggal blottoltuk (rövidítés: Gal-1 - galektin-1).

A T sejtek galektin-1 kötő fehérjéit Sepharose 4B gyöngyökhöz kapcsolt galektin-1-gyel tisztítottuk. A galektin-1 gyöngyökhöz több nagyméretű fehérje kötődött, ezek relatív molekulatömege 203, 160, 134, 95, 74, 66 illetve 58 kDa (6.3.A ábra, 2. oszlop). A kontroll gyöngyökhöz a felsorolt fehérjék nem tapadtak ki (6.3.A ábra, 1. oszlop). Ez a kötődés a galektin-1 lektin tulajdonságán alapult, mert a fehérjék magas koncentrációjú laktóz oldattal (200 mM) lemoshatóak voltak a gyöngyökről (6.3.A ábra, 3. és 4. oszlop). Annak eldöntésére, hogy a 203 kDa-os csík a CD45 foszfatáznak felel-e meg, a Jurkat sejt vonal CD45 tirozin foszfatázt nem expresszáló mutánsát alkalmaztuk: e sejtek lizátumából hasonló nagyságú fehérjék kötődtek a galektin-1-hez, a 203 kDa molekulatömegű csík kivételével (6.3.B ábra). A CD45 jelenlétét monoklonális ellenanyaggal is azonosítottuk a MOLT-4 sejt lizátumából kivont galektin-1 kötő fehérjék között (6.3.C ábra). A galektin-1 a CD45 hiányában is kötődött a sejtekhez, ahogy azt a J45.01 sejteken végzett galektin-1 kötési kísérlet is mutatja (6.4. ábra).

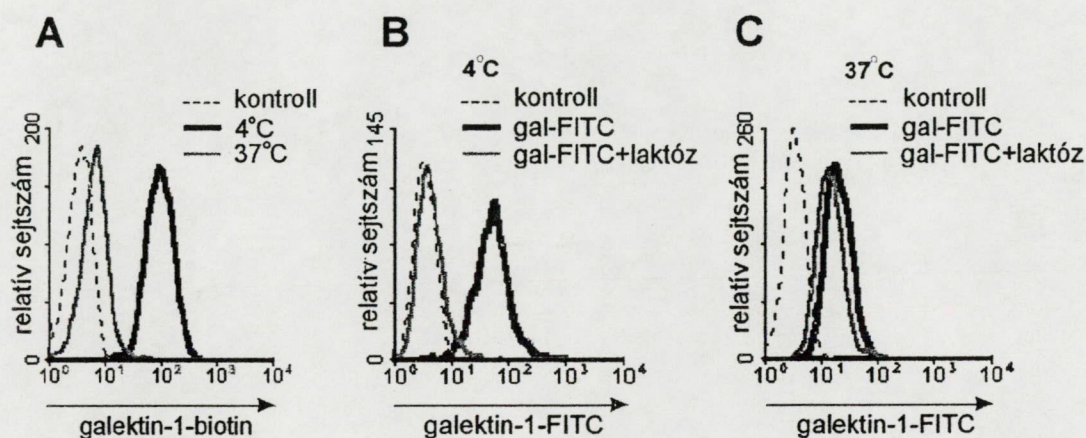


6.4. ábra: A galektin-1 kötődése a T sejtekhez nem függ a CD45 expressziójától. A. A CD45 hiányos Jurkat sejteket (J45.01) 3,6 μ M biotin-jelölt galektin-1-gyel 1 órán át, majd streptavidin-FITC-cel 30 percig kezeltük 4°C-on. B. A sejteket (Jurkat, MOLT-4, J45.01) anti-CD45 ellenanyaggal, majd kecske anti-egér IgG - FITC konjugátummal kezeltük. Az áramlási citométerrel való analízis során a sejtek mérete és propidium-jodid kizárása alapján kapuztuk ki az élő sejteket (nem jelölt, kontroll minták - szaggatott vonal, galektin-1-gyel illetve anti-CD45-tel jelölt minták - vastag vonal).

6.2.2. A galektin-1 a kötődést követően internalizálódik

A receptorok a ligandumkötést követően, így pl. a T sejt receptor az antigénnel való keresztkötése után, gyakran eltűnnek a sejtek felszínéről, endocitózissal a korai endoszómákba kerülnek, majd esetenként reciklizálnak [103]. Minthogy a feltételezett

receptorához való kötődést követően a galektin-1 is bekerülhet a sejtekbe, áramlási citométerrel követtük a biotin jelölt galektin-1 sejt felszíni mennyiségét. Amennyiben a kötődést követően a sejteket 37°C-on tároltuk, a lektin sejt felszínen mérhető szintje csökkent a 4°C tartott sejtekhez képest (6.5.A ábra). A 4°C-on kezelt mintákban a galektin-1-FITC kötődését követően hozzáadott laktóz oldat „lemosta” a lektint a sejt felszínéről (6.5.B ábra), a 37°C-on való inkubálás után viszont a laktóz nem csökkentette a galektin-1-FITC fluoreszcencia intenzitását (6.5.C ábra). Összegezve a 6.5. ábrán bemutatott kísérletek eredményeit arra következtethetünk, hogy a sejt felszínen kötődött galektin-1 37°C-on a sejt belsejébe transzlokálódik, tehát internalizálódik.



6.5. ábra: A galektin-1 internalizálódik a Jurkat sejtekben. A. A sejteket 3,6 μ M biotin-jelölt galektin-1-gyel inkubáltuk 1 óráig 4°C-on, ezután a nem kötődő lektint eltávolítottuk és a mintákat 4°C, illetve 37°C hőmérsékleten tároltuk 3 órán át. A sejtekhez ekkor adtuk a streptavidin-FITC-et, ezután áramlási citométerrel követtük a jelet (nem jelölt, kontroll minták - szaggatott vonal, galektin-1-gyel 4°C-on kezelt minták - vastag fekete vonal, galektin-1-gyel 37°C-on kezelt minták - vékony szürke vonal). B. és C. A sejteket 3,6 μ M FITC-jelölt galektin-1-gyel (rövidítés: gal-FITC) inkubáltuk 1 óráig 4°C-on, ezután a nem kötődő lektint eltávolítottuk és a mintákat 4°C-on (B), illetve 37°C-on (C) tároltuk 3 órán át. A feltüntetett galektin-1-FITC kezelt mintákhoz 100 mM laktóz oldatot adtunk (gal-FITC+laktóz), és tovább inkubáltuk 30 percig 4°C-on (nem jelölt, kontroll minták - szaggatott vonal, galektin-1-FITC kezelt minták - vastag fekete vonal, galektin-1-FITC kompetíciója laktózzal - vékony szürke vonal).

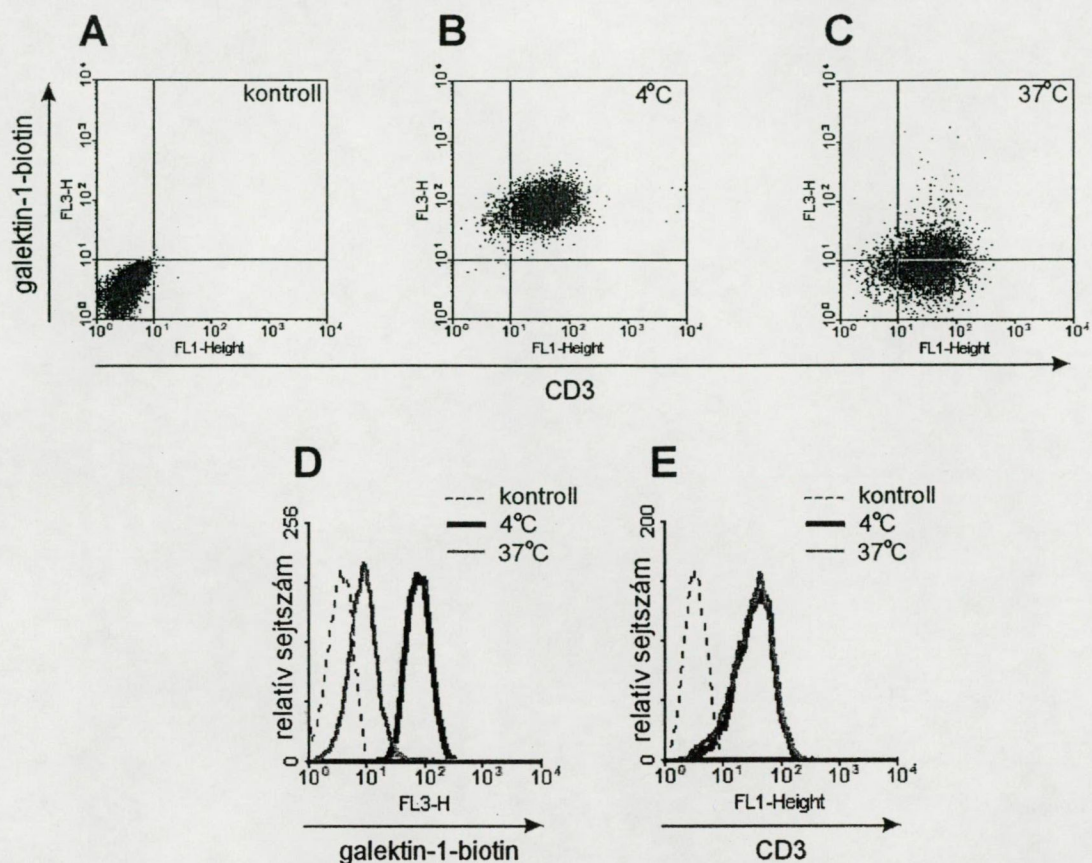
A galektin-1 internalizációja nem csupán a T sejtekre volt jellemző. Minden sejt vonalon, a B sejteken és a nem limfoid eredetű sejteken is ugyanezt tapasztaltuk, ennek eredményét a VII. táblázat foglalja össze.

VII. táblázat: A galektin-1 internalizálódik a különböző eredetű sejtvonalakban

Sejtvonal	Internalizált galektin-1 ^a
Jurkat	90%
MOLT-4	87%
CEM	100%
BL-41	90%
Raji	100%
Daudi	100%
U937	87%
K562	67%

^a A sejteket FITC-jelölt galektin-1-gyel (3,6 µM) kezeltük 4°C hőmérsékleten, majd 4°C-on, illetve 37°C-on inkubáltuk tovább 3 óráig. Ezután a meghatározott mintákban a galektin-1 kötődését a sejtekhez laktózzal (100 mM) kompetáltuk, majd a sejteket áramlási citométerrel analizáltuk. Az internalizált galektin-1 százalékát a következőképpen számoltuk ki: a laktózzal való kompetíció utáni és előtti fluoreszcencia jel (ld. az 5.2.3. fejezetet) hányadosát százzal szoroztuk.

Feltételezve, hogy a galektin-1 internalizációja receptor-mediált, megvizsgáltuk néhány ismert galektin-1 kötő membránfehérje sejtfelszíni szintjének változását a lektin internalizációjával párhuzamosan. A CD2, CD3, CD43, illetve CD45 molekulák sejtfelszíni szintjét a galektin-1 internalizációját követően monoklonális ellenanyagokkal vizsgáltuk. A 37°C-on kezelt sejteken a galektin-1 sejtfelszíni szintje csökkent a 4°C-on inkubáltakéhoz viszonyítva (6.6.B, C és D ábra), ugyanakkor a CD3 kimutatható mennyisége nem változott (6.6.B, C és E ábra). Megfelelő szignál a CD3 internalizációját okozza, ugyanis ha monoklonális ellenanyaggal keresztkötjük a CD3-at, majd ezután 37°C-on tároljuk a sejteket, a CD3 eltűnik a sejtek felszínéről (nem bemutatott adat). A CD3-hoz hasonlóan a CD2, CD43 és CD45 sem kointernalizálódott a galektin-1-gyel (nem bemutatott adat).

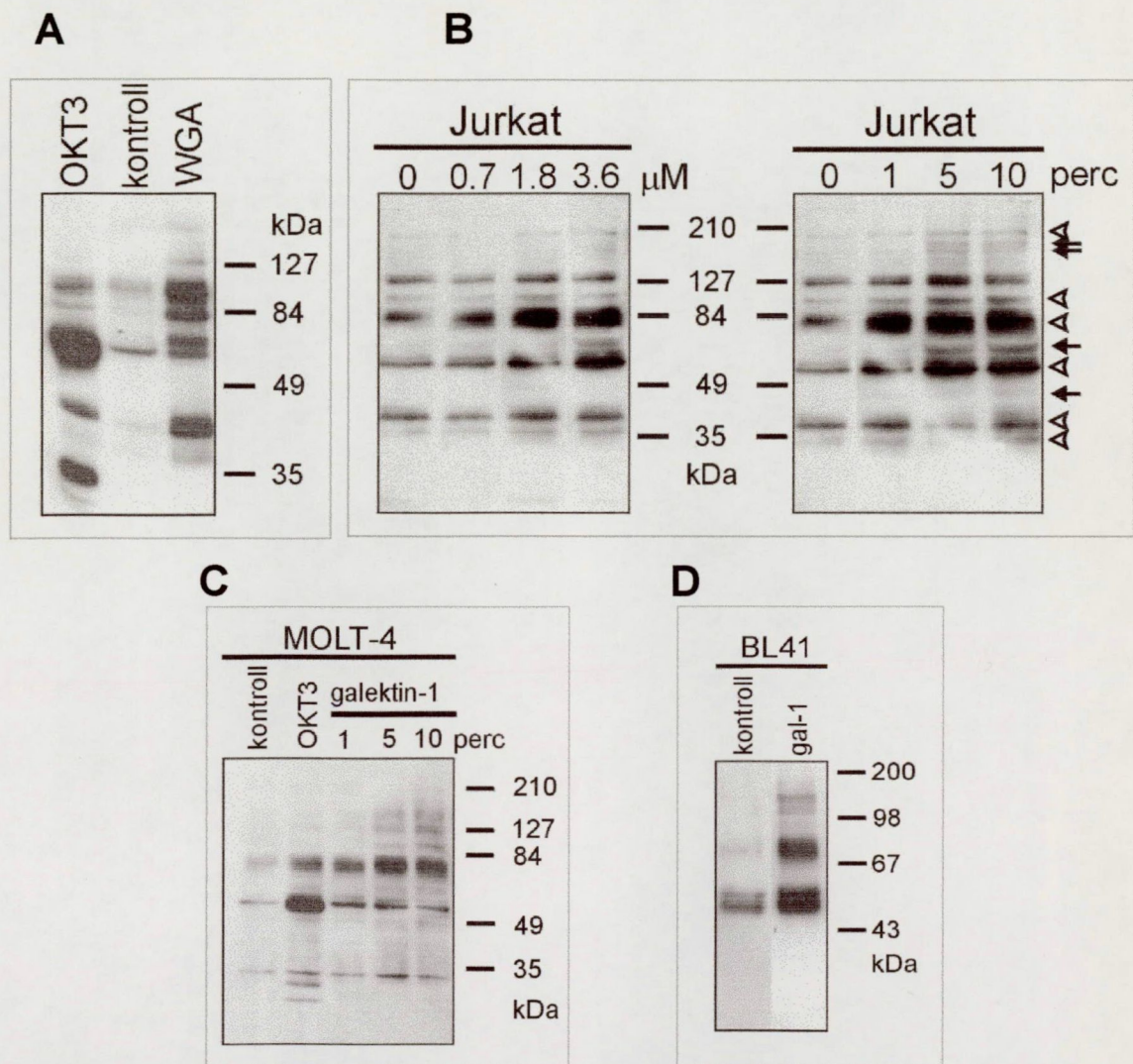


6.6. ábra: A CD3 sejtfelszíni szintje nem csökken a galektin-1 internalizációjával párhuzamosan. A, B és C. Jurkat sejtekhez puffert (A) vagy 3,6 μ M biotin-jelölt galektin-1-et (B és C) adtunk és inkubáltuk 1 óráig 4°C-on. Ezután a nem kötődő lektint eltávolítottuk és a mintákat 4°C (A és B), illetve 37°C hőmérsékleten (C) tároltuk 3 órán át. A sejtekhez ekkor CD3 monoklonális ellenanyagot (OKT3, 20 μ g/ml) (B és C) vagy puffert (A) adtunk. Az ellenanyagot kecske anti-egér IgG - FITC konjugátummal reagáltattuk, míg a biotinilált galektin-1-et streptavidin-QuantumRed-del jelöltük. A kettős jelölés fluoreszcencia intenzitását az FL1 és FL3 detektorokkal követtük áramlási citométerrel. **D és E.** Az A, B és C ábrákon bemutatott eredmények hisztogramja (nem jelölt, kontroll minták - szaggatott vonal, galektin-1-gyel 4°C-on kezelt minták - vastag fekete vonal, galektin-1-gyel 37°C-on kezelt minták - vékony szürke vonal).

6.2.3. A galektin-1 tirozin foszforilációval járó jelátviteli utat indít el T és B limfocitákban

Az immunrendszer receptorainak keresztkötése jelet továbbít a sejtek citoplazmájában a sejtmag felé. A jelátviteli út kezdeti lépése gyakran tirozin kinázok aktiválódása, melyet más szignálmolekulák tirozin foszforilációja követ [75]. A növényi lektinek, mint a PHA [82, 83], WGA (6.7.A ábra), ugyan kiváltanak ilyen választ, de a foszforilált fehérjék mintázata eltér a TCR keresztkötését követő tirozin foszforilációtól (CD3 monoklonális ellenanyag: OKT3, 6.7.A ábra). A növényi lektinekhez hasonlóan a

galektin-1 is tirozin foszforilációt indukált a vizsgált sejtekben (6.7.B ábra), melynek erőssége a galektin-1 koncentrációjától és a stimuláció idejétől függött. A galektin-1 0,7-3,6 μM koncentrációban 5-10 perc stimuláció után növelte a foszforilálódott fehérjék mennyiségét, valamint új fehérjék foszforilációját indukálta (6.7.B ábra). Több kísérlet értékeléséből megállapítható, hogy a galektin-1 a Jurkat

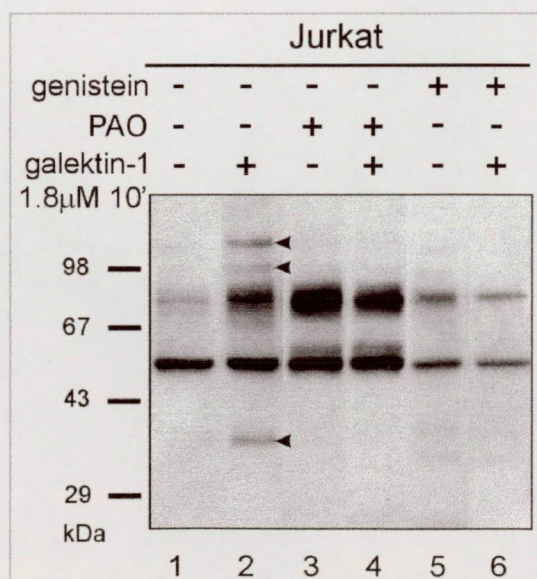


6.7. ábra: A galektin-1 fehérje tirozin foszforilációt indukál a T és B limfocitákban. A sejteket különböző reagensekkel stimuláltuk: kontrollként pufferrel 10 percig; CD3 monoklonális ellenanyaggal (OKT3, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 1 percig (Jurkat, **A** és MOLT-4, **C**); búzacsíra agglutininnel (WGA, 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10 percig (Jurkat, **A**); különböző koncentrációjú galektin-1 oldattal (0,7, 1,8 és 3,6 μM) 1 percig (Jurkat, **A**); illetve különböző ideig (1, 5 és 10 perc, **B** és **C**, 10 perc, **D**) 0,7 μM (**C**) vagy 1,8 μM (**B** és **D**) galektin-1-gyel, majd azonnal lizáltuk. A teljes sejtlizátumot 7,5-15% SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét és nitrocellulóz membránra vittük át. A fehérjéket anti-foszfo-tirozin ellenanyaggal (4G10), majd nyúl anti-egér IgG - HRPO-val reagáltattuk.

sejtekben a 160, 154, 72, 48 kDa molekulatömegű fehérjék foszforilációját indukálta (6.7.B ábra, nyilak) és a 175, 100, 82, 53, 37, 32 kDa molekulatömegű fehérjék foszforilációját megnövelte (6.7.B ábra, üres nyílhegyek). A galektin-1 eltérő mintázatú tirozin foszforilációt stimulált mind Jurkat (6.7.B ábra), mind MOLT-4 T sejtekben (6.7.C ábra), mint a T sejt receptor keresztükötése (6.7.A ábra). A folyamat kinetikája is eltérő volt, amíg a TCR keresztükötése már 1 perc után maximális foszforilációt okozott, a galektin-1 kezelés csak 5-10 perc után váltott ki hasonló választ. A B sejtek, mint a BL-41 (6.7.D ábra) és Raji (nem bemutatott adat) is hasonlóan reagáltak a galektin-1 kezelésre.

6.2.4. A galektin-1 indukálta tirozin foszforilációban résztvevő jelátvivő molekulák

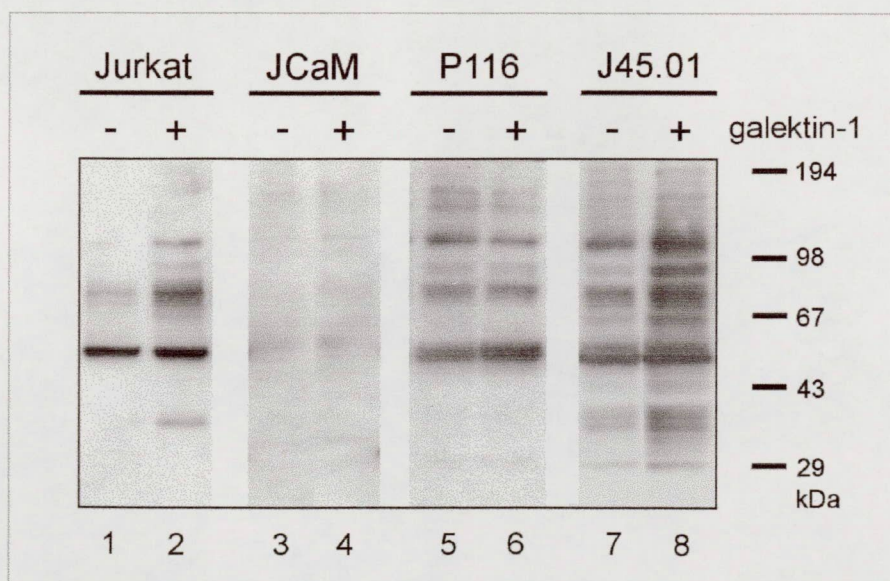
A sejtek jelátvivő molekuláinak foszforilációs szintje mindig az aktív kinázok és foszfatázok működésének egyensúlyát tükrözi [69]. A galektin-1 által indukált korai tirozin foszforilációs mintázat kialakításában tehát mind kinázok, mind foszfatázok is szerepet játszhatnak. A tirozin kinázok aktivitását genisteinnel gátoltuk, ez az inhibitor teljesen blokkolta a galektin-1 által indukált tirozin foszforilációt (6.8. ábra, 5. és 6. minta). A tirozin foszfatáz gátlók, mint a fenilarsén-oxid (PAO, 6.8. ábra, 3. minta),



6.8. ábra: A galektin-1 indukálta fehérje tirozin foszforiláció függ a tirozin kinázok és foszfatázok aktivitásától Jurkat T sejtekben. A sejteket kezeletlenül hagytuk (1. minta), inhibitorral kezeltük (PAO, 20 μ M, 3. minta; genistein, 250 μ M, 5. minta), illetve egyedül galektin-1-gyel (1,8 μ M, 2. minta) vagy galektin-1-gyel inhibitor jelenlétében (PAO, 20 μ M, 4. minta; genistein, 250 μ M, 6. minta) 10 percig stimuláltuk. A teljes sejtizátumot 7,5-15% SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, a Western blotban anti-foszfo-tirozin ellenanyagot használtunk.

valamint a nátrium-vanadát (nem bemutatott adat), növelték a fehérjék foszforilációs szintjét a kontroll mintákban. A galektin-1 a PAO jelenlétében nem indukálta az egyébként jellemző fehérjecsíkok megjelenését (127, 100, 37 kDa, 6.8. ábra, 2. és 4. minta, nyílhegygel jelölve). E fehérjék tirozin foszforilációját végző kinázok aktivitását tehát foszfatázok szabályozzák.

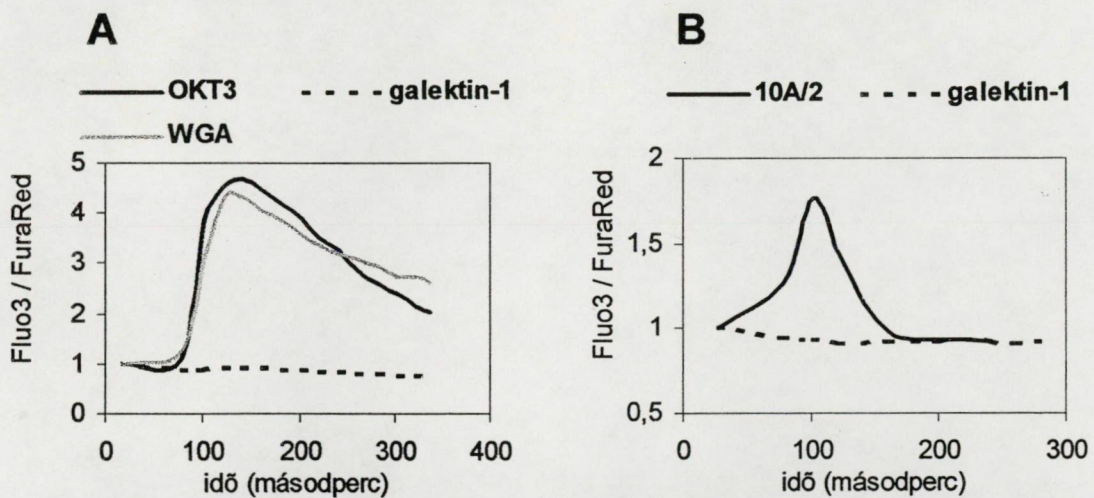
A továbbiakban megvizsgáltuk, mely egyedi szignálmolekulák játszanak szerepet a galektin-1 által kiváltott, tirozin foszforilációval járó korai jelátviteli lépésekben. A Jurkat sejt mutáns vonalait, a $p56^{lck}$ hiányos JCaM1.6 (6.9. ábra 3. és 4. minta), a ZAP70 hiányos P116 (6.9. ábra 5. és 6. minta), valamint a CD45 negatív J45.01 sejteket (6.9. ábra 7. és 8. minta) a vad típusú Jurkat sejtekhez hasonlítottuk (6.9. ábra 1. és 2. minta). A kezeletlen JCaM1.6 sejtek foszforilációs szintje nagyon alacsony (6.9. ábra, 3. minta), ezen felül a galektin-1 sem indukált tirozin foszforilációt ezekben a sejtekben (6.9. ábra, 4. minta). A P116 ezzel szemben rendszeresen magas konstitutív foszforilációt mutatott, amelyet a galektin-1 nem növelt tovább (6.10. ábra, 5. és 6. minta). Habár a konstitutív foszforiláció a CD45 hiányos J45.01 T sejtekben is magas volt, valószínűleg a foszfatáz aktivitás hiánya miatt, mégis ezek a sejtek a Jurkat-hez hasonlóan tirozin foszforilációval válaszoltak galektin-1 kezelésre (6.9. ábra, 7. és 8. minta).



6.9. ábra: A galektin-1 által stimulált tirozin foszforiláció vad típusú, Lck, ZAP70, illetve CD45 hiányos Jurkat sejtekben. Jurkat sejteket (1. és 2. minta), az Lck, illetve ZAP70 kinázokban mutáns vonalait (JCaM1.6: 3. és 4. minta, illetve P116: 5. és 6. minta), valamint a CD45 hiányos sejteket (J45.01: 7. és 8. minta) galektin-1-gyel (1,8 μ M, 2., 4., 6. és 8. minta) kezeltünk 10 percig, vagy kezeletlenül hagytuk (1., 3., 5. és 7. minta). A teljes sejtlyizátumot 7,5-15% SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, majd anti-foszfo-tirozin ellenanyaggal és nyúl anti-egér IgG - HRPO -val blottoltuk.

6.2.5. A galektin-1 által kiváltott jelátviteli út nem vezet intracelluláris kalcium-ion koncentráció növekedéshez

A limfocita receptorok keresztkötése után kiváltott jelátviteli út elágazó, számos esetben a foszfolipáz C γ (PLC γ) aktiválódásához és intracelluláris kalcium-ion koncentráció növekedéshez vezet, amelyet tirozin foszforiláció előz meg [71]. A galektin-1 egyáltalán nem indukált kalcium-ion szint változást sem a Jurkat T sejtekben, sem a BL-41 B sejtekben (6.10.A és B ábra, fekete szaggatott vonalak). Ezek a sejtek más stimulusokra, úgy mint az antigénfelismerő receptoruk keresztkötésére, másodperceken belül nagymértékű kalcium-ion koncentráció növekedéssel válaszoltak (6.10.A. és B ábra, fekete vonalak). A Jurkat sejtekben más lektinek, mint például a WGA növényi lektin is az intracelluláris kalcium-ion szint növekedését okozta (6.10.A ábra, szürke vonal).



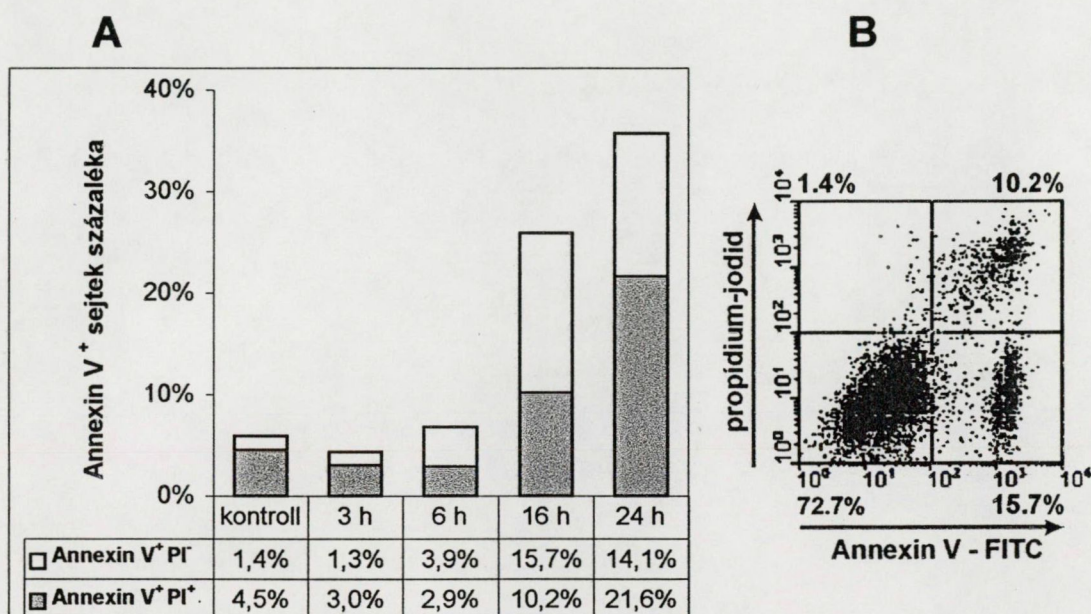
6.10. ábra: A galektin-1 nem indukál intracelluláris kalcium-ion koncentráció növekedést. A. Fluo3 és FuraRed festékekkel jelölt Jurkat T sejteket CD3 ellenanyaggal (OKT3, 15 $\mu\text{g/ml}$, fekete folytonos vonal), galektin-1-gyel (25 $\mu\text{g/ml}$, fekete szaggatott vonal), illetve búzacsíra agglutininrel (WGA, 10 $\mu\text{g/ml}$, szürke vonal) stimuláltuk, és áramlási citométerrel követtük a Ca^{++} érzékeny festékek fluoreszcencia intenzitás változását az idő függvényében. **B.** A fent leírt rendszerben a BL-41 sejteket κ -lánc ellenanyaggal (10A/2, 20 $\mu\text{g/ml}$, fekete folytonos vonal), valamint galektin-1 fehérjével (50 $\mu\text{g/ml}$, fekete szaggatott vonal) kezeltük.

6.2.6. A galektin-1 apoptózist indukál T és B sejtekben

Megvizsgáltuk, hogy a rekombináns humán galektin-1 hogyan befolyásolja a limfoid sejtek életképességét. A sejteket 1,8 μM galektin-1 jelenlétében tenyésztettük és

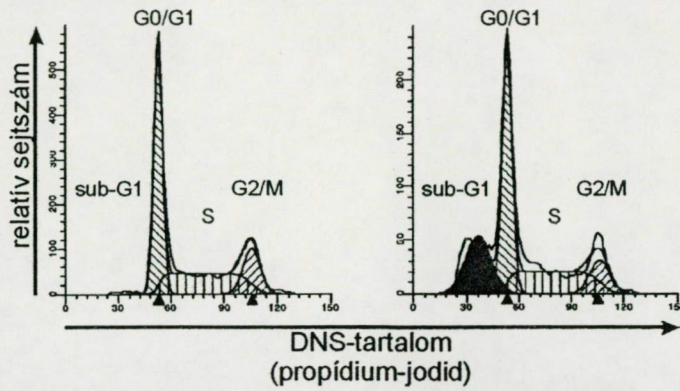


különböző időpontokban vizsgáltuk a viabilitásukat és az apoptózisra jellemző változásokat. A Jurkat T sejtekben már 6 óra inkubáció után kimutatható volt foszfatidil-szerin átfordulása a sejtmembrán extracelluláris felszíne felé (6.11.A ábra), ez a jelenség az apoptózis kezdeti lépéseire jellemző és FITC-jelölt Annexin V molekula kötődésével, áramlási citométerrel követhető (6.11.B ábra). Hosszabb galektin-1 kezelést követően (24 óra) a sejtek 35%-a vált Annexin V pozitívvá, de ezeknek mintegy 2/3-a már propídium-jodid áteresztő is, ami a membránszerkezet megbomlását és permeabilitását jelzi (6.11.A és B ábra).

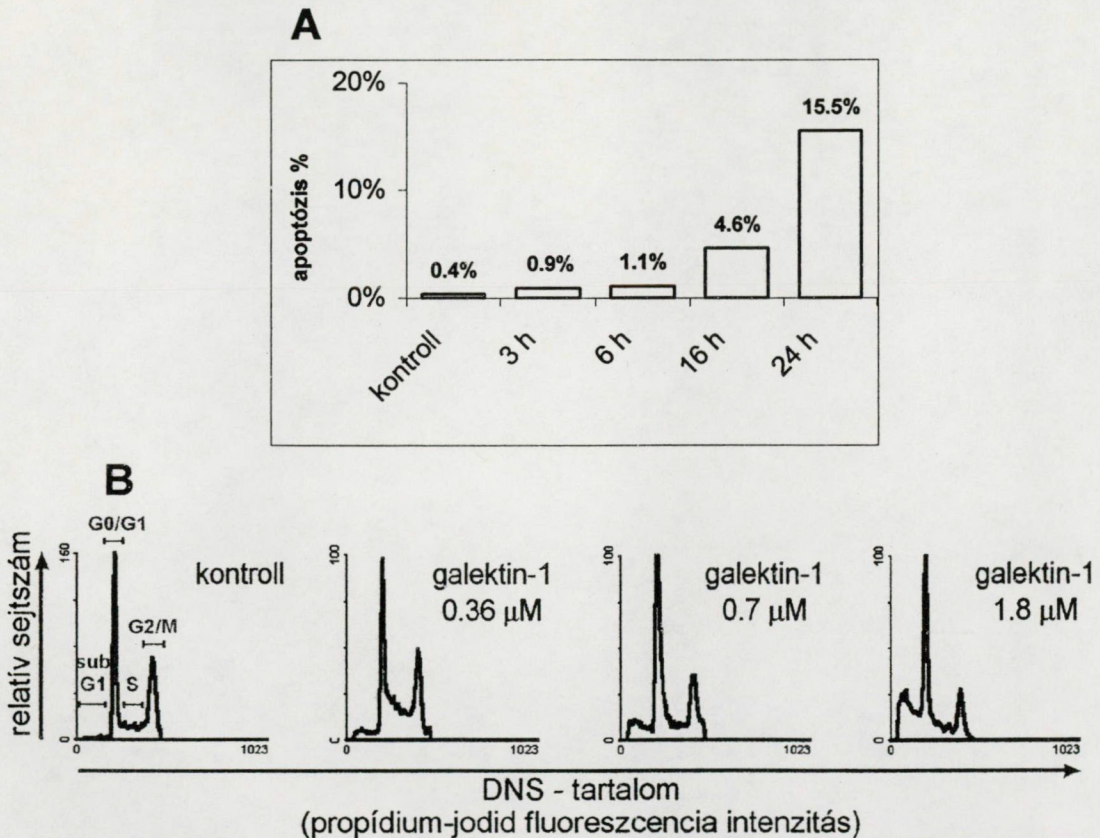


6.11. ábra: Jurkat sejtekben a galektin-1 kezelés apoptózist indukál. A. A sejteket 1,8 μ M galektin-1 fehérjével tenyésztettük együtt 3, 6, 16, illetve 24 óráig, majd Annexin V - FITC - cel és propídium-jodiddal jelöltük az áramlási citometriai vizsgálathoz. A diagram az Annexin V - kötő sejtek százalékát ábrázolja, ebből az oszlopok fehér területe a propídium-jodidot kizáró sejteket, míg a szürke oszloprészek az Annexin V kötő és egyben propídium-jodidra is áteresztő sejteket mutatják. B. Az ábra az Annexin V - FITC és propídium-jodid kettős jelölést mutatja be az A. pontban leírt kezelés 16. órájában.

Az apoptózis kései szakaszában a DNS fragmentálódik és a DNS darabok ún. apoptotikus testekbe csomagolódnak. A sejtciklus analízishez használt módszer során a sejteket permeabilizáljuk, ezért a DNS fragmentumok elvesznek, a sejtek hipodiploiddá válnak, a DNS tartalmuk a G_0/G_1 sejtciklus fázisához képest kevesebb lesz, és ez a sub- G_1 populáció képviseli az apoptotikus sejteket. A galektin-1 Jurkat sejtekben 24 óra alatt apoptózist okozott, azaz kialakult a sub- G_1 populáció (6.12. ábra).



6.12. ábra: A Jurkat sejtek DNS-tartalma csökken a galektin-1 indukálta apoptózis során. A sejteket 1,8 μM galektin-1-gyel (jobb oldali ábra), illetve kontrollként a lektint nem tartalmazó pufferrel (bal oldali ábra) kezeltük 24 óráig, majd meghatároztuk azok DNS-tartalmát propidium-jodid festéssel, áramlási citométerrel. A sejtciklus fázisok jelölése a következő: sub-G₁ (apoptózis) - fekete terület, G₀/G₁ - jobbra futó ferde csíkozás, S - függőleges csíkozás, G₂/M - balra futó ferde csíkozás.



6.13. ábra: A galektin-1 indukálta apoptózis idő- és koncentrációfüggése Jurkat sejteken. **A.** A sejteket 1,8 μM galektin-1-gyel kezeltük, és a 3., 6., 16., valamint a 24. óra elteltével jelöltük propidium-jodiddal, majd áramlási citométerrel meghatároztuk a DNS-tartalmat. A sub-G₁ populációt tekintettük apoptotikusnak, ezek százalékát tüntettük fel a diagramban. A kontroll kezelés a lektint nem tartalmazó pufferrel történt, 24 óráig. **B.** A sejteket 24 óráig kezeltük 0,36, 0,7 és 1,8 μM galektin-1-gyel, illetve a kontroll mintához csak puffert adtunk. A jelölés és a mérés az A pontban leírtak szerint történt.

A DNS fragmentáció mértéke függ a stimuláció idejétől, a sub-G₁ populáció megjelenése már a 16. órától detektálható (6.13.A ábra). A galektin-1 már alacsony koncentrációban (0,36 μM) apoptózist indukált Jurkat sejteken, a galektin-1 koncentráció növelésével nőtt az apoptotikus sejtek aránya (6.13.B ábra).

VIII. táblázat: A galektin-1 apoptózist indukál a limfoid eredetű sejtvonalakban

Sejttípus	Sejtvonalak	Apoptotikus sejtek száma ^a		
		Galektin-1 koncentráció		
		0,36 μM	0,7 μM	1,8 μM
T sejtek	MOLT-4	2,1 %	2,8 %	21,3 %
	CEM	1,4 %	6 %	31 %
	Jurkat	9,1 %	12 %	26,6 %
B sejtek	BL-41	n. a. ^b	14,3 %	30,4 %
	Raji	4,7 %	14,5 %	7,56 %
	Daudi ^c	29,1 %	31,4 %	35,4 %
Nem limfoid eredetű sejtek	K562	0 %	0 %	0 %
	U937	0,1 %	1,8 %	3,1 %

^a A sejteket 24 óráig kezeltük galektin-1-gyel, majd áramlási citométerrel mértük a DNS tartalmat. Az apoptotikus sejtek százalékát az Anyagok és módszerek 5.2.4. fejezetében leírtak szerint számoltuk.

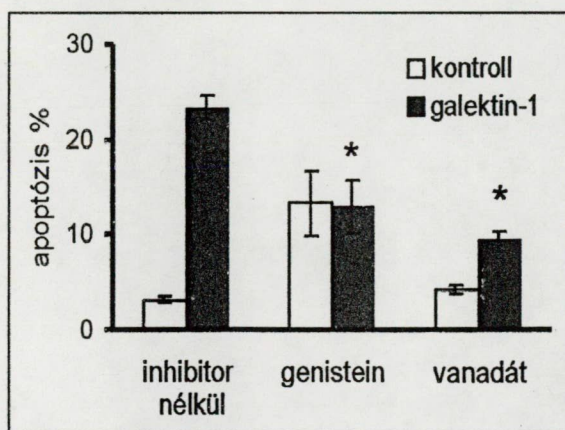
^b Nincs adat.

^c A galektin-1 kezelés 16 óráig tartott.

A rekombináns humán galektin-1 a Jurkat sejteken kívül több T és B sejtvonal apoptózist indukálta koncentrációfüggő módon (VIII. táblázat). Az éretlen T sejteknek megfeleltethető sejtvonalak, a MOLT-4 és CEM, válasza egymáshoz és az érett fenotípusú Jurkat sejtekhez képest hasonló volt, a Burkitt limfóma eredetű B sejtek viszont eltérően viselkedtek. Az Raji sejtek több kísérletben reprodukálhatóan, de csupán alacsony százalékban pusztultak el galektin-1 kezelésre, a Daudi sejtek érzékenysége viszont a lektin alacsony koncentrációjára (0,36 μM) és rövidebb inkubációs idő (16 óra) alatt is nagymértékű volt. Ezzel szemben a csontvelői eredetű nem limfoid sejtek, mint az U937 és K562, nem válaszoltak apoptózissal (VIII. táblázat).

6.2.7. Tirozin kinázok és foszfatázok szükségesek a galektin-1 indukálta apoptotikus folyamatban

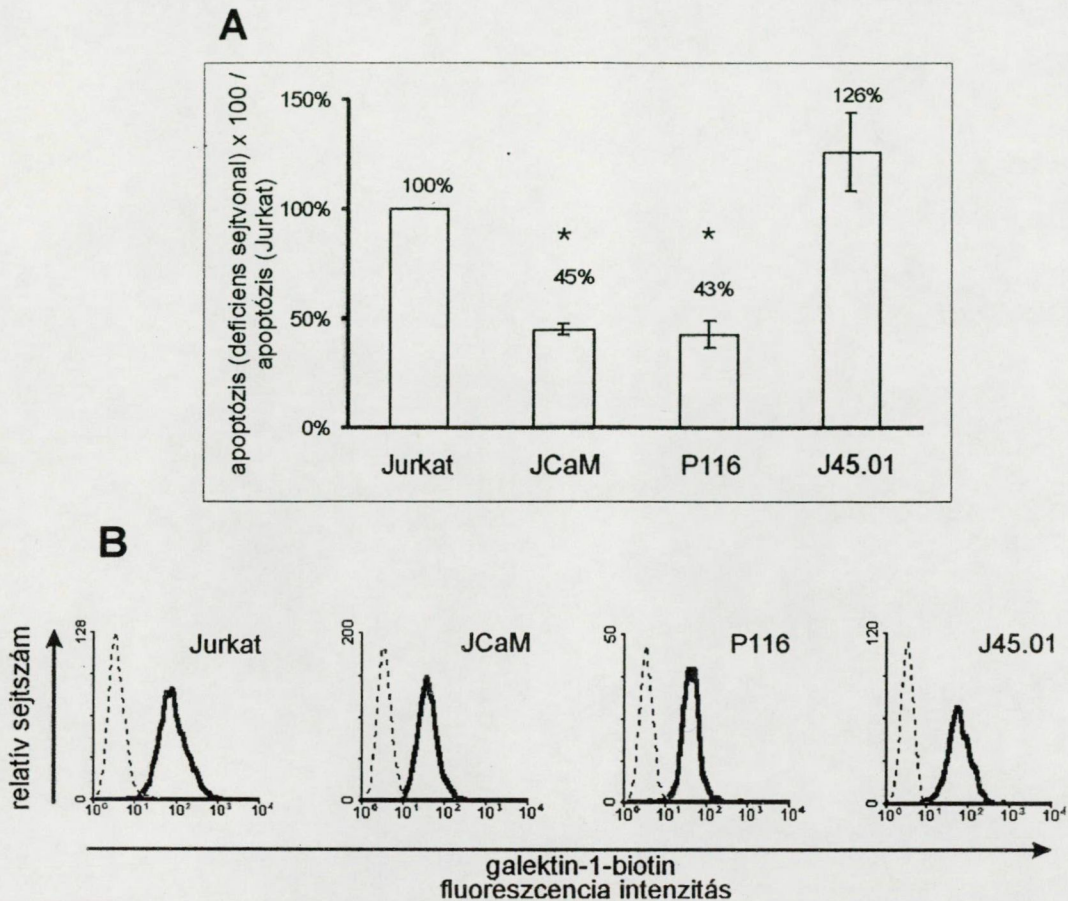
A 6.2.3. fejezetben bemutattuk, hogy a galektin-1 tirozin foszforilációval járó jelátviteli utat indít el limfoid sejtekben. A tirozin foszforiláció és az apoptotikus válasz közötti kapcsolatot a következő kísérletekben tisztáztuk. Jurkat sejteket genistein (tirozin kináz inhibitor), valamint nátrium-vanadát (tirozin foszfatáz inhibitor) jelenlétében kezeltük a galektin-1-gyel, majd az apoptózis mértékét a sub-G₁ populáció mérésével határoztuk meg (6.14. ábra). A genistein önmagában is elég magas arányú apoptózist okozott [104]. A galektin-1 ezen felül nem növelte tovább az apoptotikus sejtek számát, a genistein jelenlétében kiváltott apoptotikus hatása szignifikánsan alacsonyabb volt az inhibitorok nélkül okozott apoptózisnál. A Na-vanadát szintén csökkentette az apoptotikus sejtek számát a galektin-1 kezelt mintákban (6.14. ábra).



6.14. ábra: A tirozin kináz és foszfatáz inhibitorok csökkentik a galektin-1 indukálta apoptózist Jurkat sejtekben.

A sejteket 1,8 μ M galektin-1-gyel (fekete oszlopok), illetve kontrollként a lektint nem tartalmazó pufferrel (fehér oszlopok) kezeltük 24 óráig inhibitorok jelenlétében (250 μ M genistein, 250 μ M Na-vanadát) vagy inhibitorok nélkül. A sejtek a DNS tartalmát propídiium-jodid festéssel, áramlási citométerrel határoztuk meg, az apoptózis százalékának a sub-G₁ populáció százalékát vettük. Az oszlopok 3-3 párhuzamos minta átlagát és szórását mutatják. A csillaggal jelölt minták a Student-eloszlású kétmintás t-próba alapján szignifikánsan eltértek az inhibitorok nélkül mért eredményektől (* $p < 0,01$).

A galektin-1 indukálta tirozin foszforilációhoz nélkülözhetetlen volt a p56^{lck} és a ZAP70 tirozin kinázok jelenléte (6.9. ábra). Ezzel egybehangzóan a p56^{lck} és ZAP70 kináz hiányos Jurkat vonalak, a JCaM1.6, illetve a P116 sejtek érzékenysége a galektin-1 indukálta apoptózisra mintegy 50%-kal kisebb volt, mint a vad típusú sejteké (6.15.A ábra). Ugyanakkor a CD45 foszfatáz deficiens J45.01 a Jurkat-hez hasonló mértékű apoptózist szenvedett, a két értéksorozat közötti különbség nem volt szignifikáns.



6.15. ábra: Az Lck és ZAP70 tirozin kinázok hiánya csökkenti a galektin-1 indukálta apoptózist Jurkat sejtekben. A. Jurkat sejteket és mutáns vonalait, az Lck hiányos JCaM1.6, a ZAP70 deficiens P116, valamint a CD45 foszfatáz mutáns J45.01 sejteket galektin-1-gyel (1,8 μM) tenyésztettük együtt 24 óráig. Ezután a sejtek DNS tartalmát propídium-jodid festéssel, áramlási citométerrel határoztuk meg. A vad típusú Jurkat sejtekben azonos körülmények között okozott apoptózis értékét 100%-nak tekintettük, és ehhez viszonyítottuk a deficiens sejtvonalakban indukált apoptózis mértékét. Több kísérlet párhuzamos mintáiból származó átlagát és szórását ábráztuk (n=9 a JCaM, n=6 a P116 esetében). A csillaggal jelölt minták a Student-eloszlású kétmintás t-próbával ellenőrizve szignifikánsan eltértek a Jurkat sejten mért eredményektől (* $p < 0,01$). B. A sejteket (Jurkat, JCaM1.6, P116, illetve J45.01) 50 $\mu\text{g/ml}$ biotin-jelölt galektin-1-gyel, majd streptavidin-FITC-cel kezeltük. Az áramlási citométerrel való analízis során a méret és propídium-jodid kizárás alapján kapuztuk ki az élő sejteket (nem jelölt, kontroll minták - szaggatott vonal, galektin-1-gyel jelölt minták - vastag vonal).

A Jurkat és mutánsainak galektin-1-re adott válasza (mind a tirozin foszforilációban, mind az apoptózisban) közötti eltérés nem magyarázható kizárólag ezeknek a sejteknek a galektin-1 kötésével, hisz mindegyik sejtvonal hasonló mértékben hordoz galektin-1 kötőhelyet (6.15.B ábra). Ugyanakkor a galektin-1 internalizációja független volt a tirozin kináz és foszfatáz inhibitorok jelenlététől, valamint a hiányos sejtvonalakban (JCaM1.6, P116, J45.01) is végbement (nem bemutatott adat).

7. DISZKUSSZIÓ

A galektin-1 számos szövetben, szervben expresszálódik, funkciója sokoldalú, biológiai hatása minden esetben az adott sejt típusától és a galektin-1 lokális koncentrációjától függ. A galektin-1 jelen van az immunsejtek érésének helyszínén, az elsődleges nyirokszervekben (tímusz, csontvelő), és a másodlagos nyirokszervekben (lép, nyirokcsomók), ahol az immunfolyamatok zajlanak [19]. Azon felül, hogy elősegíti a timociták és a tímusz epitéliumsejtek közötti kapcsolatot, a galektin-1 a $CD4^+/CD8^+$ kortikális timociták apoptózisát okozza, ezért feltételezik, hogy szerepet játszik az éretlen T sejtek szelekciójában [20, 52]. A tímuszt elhagyó érett T sejtek csak aktiváció után válnak érzékennyé a galektin-1 indukálta apoptózisra [53]. A szakirodalomban nincs adat arra vonatkozóan, hogy a galektin-1 apoptotikus lenne a limfocitákon kívül más típusú sejtekre is. A neuroblasztóma sejtekben ugyan gátolja a sejtek denzitás függő növekedését, de nem okoz apoptózist jellemző biokémiai és morfológiai változásokat: kaspáz aktivációt és DNS fragmentációt [51]. Kérdésünk az volt, hogy vajon ez az apoptotikus hatás valóban specifikus a limfocitákra, milyen molekulák állnak a jelenség hátterében, milyen kezdeti szignálok szükségesek az apoptotikus kaszkád lefutásához.

Kísérleteinkben nem csak a T sejt eredetű tumoros sejtvonalak, de B limfociták, és egyéb hemopoetikus sejtek galektin-1-re adott válaszát is vizsgáltuk. A különböző érettségi stádiumot reprezentáló T sejtvonalak, a $CD4^+/CD8^+$ éretlen MOLT-4 és a glükokortikoid érzékeny éretlen CEM, az érett fenotípusúnak megfelelő T sejt, Jurkat, valamint a B sejtek, a BL-41, Raji és Daudi is apoptózissal válaszolnak a galektin-1 kezelésre. A limfocitákkal szemben a mieloid eredetű sejtekben, mint az eritroid K562 és a granulocita U937 sejtekben a galektin-1 kezelés nem okoz apoptózist. A különböző sejtvonalak apoptózis érzékenysége nem hozható összefüggésbe az ezekhez a sejtekhez kötődő galektin-1 mennyiségével. A különböző érettségi stádiumban megrekedt T sejtek összehasonlítható mennyiségű galektin-1 kötő struktúrát hordoznak és hasonló mértékű a galektin-1-re adott apoptotikus válaszuk is. Ezzel szemben a Raji és a Daudi, amelyek Burkitt limfóma eredetű EBV^+ B sejtek, kevés, de hasonló mennyiségű galektin-1-et kötnek, ugyanakkor eltérő érzékenységet mutatnak a galektin-1-gyel szemben: a Raji a vizsgált B sejtvonalak közül a legkisebb, míg a Daudi messze a legnagyobb apoptotikus választ adja. A mieloid sejtvonalakhoz, a K562 és U937



sejtekhez a limfocitáknál nagyobb mértékben kötődik a galektin-1, mégsem pusztulnak el galektin-1 kezelésre. A galektin-1 limfocitákra gyakorolt apoptotikus hatása tehát sejtspecifikus. A BL-41 galektin-1 kötése, az összes vizsgált sejtvonal közül egyedülként kettős csúcsot mutat az áramlási citometriai vizsgálatokban, ugyanakkor a sejtvonal egységes populációként viselkedik egyéb sejtfelszíni struktúrák vizsgálatakor (κ könnyű lánc, CD45; nem bemutatott adat). A BL-41 sejtciklusának elemzésekor azt találtuk, hogy a nagyobb mennyiségű galektin-1-et kötő populációban jóval nagyobb mértékű az S fázisban levő sejtek aránya, mint a lektint gyengébben kötők között (G. Ion, személyes közlés). Ennek oka valószínűleg az, hogy a sejtciklus során eltérő mennyiségű és minőségű glikoproteinek lehetnek jelen a sejtek felszínén [105].

A galektin-1 a cukorkötő aktivitása révén nagy affinitással kötődik számos membránalkotó glikoproteinhez és glikolipidhez [38-40, 51, 57, 58, 86, 87]. A galektin-1 kötő membránfehérjék biokémiai vizsgálatában több nagy molekulatömegű (203, 160, 134, 95, 74, 66 és 58 kDa) fehérjét mutattunk ki, amelyek közül specifikus ellenanyaggal a CD45 foszfatázt azonosítottuk. Habár a CD45 foszfatáz mennyisége jelentős a T sejtek membránjában, hiánya mégsem vezet a galektin-1 kötés drámai csökkenéséhez. A fennmaradó kötési kapacitásért a kísérleteinkben kimutatott további fehérjék, illetve glikolipidek felelősek, amint azt más irodalmi adatok is alátámasztják [57, 58]. A szakirodalom a már azonosított galektin-1 kötő fehérjéket a galektin-1 receptoraiként említi, azonban egyikről sem bizonyított, hogy valóban a galektin-1 biológiai hatásának közvetítője lenne. Ezeknek a „receptoroknak” a többsége T sejt specifikus (CD2, CD3, CD4, CD7), amely nincs rajta más szöveti eredetű sejteken. Mások, mint a CD45 és a CD43, egyéb fehérvérsejteken is expresszálódnak, amelyeken a galektin-1-nek nincs apoptotikus hatása. Mind az áramlási citometriai, mind a biokémiai vizsgálatokban a galektin-1 és a fenti sejtfelszíni struktúrák között kimutatható kötődés cukorspecifikusnak bizonyult. A galektin-1-nek olyan specifikus receptora is lehet a limfocitákon, amelyhez nem a lektin tulajdonság alapján kötődik. Ezt az elképzelést támasztják alá azok az adatok, melyek a galektin-1 cukorkötéstől független működését bizonyítják, például az egér embrionális fibroblasztokra gyakorolt növekedésgátlás és a perifériás idegek axon-regenerációjának szabályozása [43, 50]. A laboratóriumunk jelenleg a szénhidrát-felismerő doménben pontmutációt tartalmazó mutánsok előállításán és biológiai tesztelésén dolgozik. A szénhidrátkötésben mutáns galektin-1 vizsgálatának fontosságát az is igazolja, hogy a galektin-3, a galektin

fehérjecsald másik jól ismert tagjának szénhidrátkötő doménjében az anti-apoptotikus molekulákra jellemző funkcionális motívumot azonosítottak [92]. Sőt másodlagos módosítás (szerin foszforiláció) következtében megszűnik a galektin-3 cukorkötő kapacitása, és az anti-apoptotikus funkció kerül előtérbe [106].

A receptor ligandumkötése után nem ritka esemény a receptor mediált endocitózis, illetve az internalizáció más formája [103]. Ez a mechanizmus szolgálhatja létfontosságú anyagok felvételét (pl. a transferrin szállította vas), a receptor sejtfelszíni szintjének csökkentésével a jelfogadás szabályozását, más esetben a receptor-ligand kapcsolat megszüntetését az endoszómák savas környezetében, majd a szabad receptor újrahasznosítását. A sejtfelszínhez kötődő galektin-1 áramlási citometriával kimutatható szintje csökken fiziológias hőmérsékleten, ami jelentheti a kötődés affinitásának csökkenését, a receptor leválását a ligandjával együtt, vagy internalizációját. Eredményeink az internalizációra utalnak ezt a mikroszkópos vizsgálatok is bizonyítják: a galektin-1 lokalizációját ellenanyaggal követve 4°C-on a sejteknek csupán a membránja festődik, 37°C-on pedig citoplazmatikus festődést tapasztaltunk (nem bemutatott adat). A galektin-1 sejtfelszínhez való kötődése savas közegben (pH 5) gátolt (nem bemutatott adat), ami utalhat arra, hogy receptor mediált endocitózissal kerül be a sejtekbe és az endoszómák savanyú környezetében disszociálódik a receptorától. Vizsgálatainkban az ismert galektin-1 kötő fehérjék (CD2, CD3, CD43, CD45) sejtfelszíni szintje nem csökkent a galektin-1 internalizációjával párhuzamosan, tehát nem ezek közvetítik az endocitózist. Elképzelhető, hogy más, nem vizsgált glikoprotein (CD4, CD7), esetleg a még nem azonosított receptor közvetítésével történik az endocitózis. Az sem kizárt, hogy a galektin-1 internalizációja nem receptor-függő, hanem más mechanizmus áll a háttérben. Az egyik feltételezésünk szerint a galektin-1 más fehérjékhez hasonlóan szabadon átjuthat (penetrál) a sejtmembránon. Az így penetrálódó fehérjék, pl. a fibroblaszt növekedési faktor (FGF-1, -2), a HIV vírus TAT fehérjéje, a *D. melanogaster* Engrailed és Hoxa-5 fehérjéi, sem rendelkeznek szekréciós szignál szekvenciával, ennek ellenére szekretálódnak, szabadon átjutnak a sejtmembránon, sőt a maghártyán is, mindkét irányban [107]. Minthogy a galektin-1 hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, feltehető, hogy az internalizációja is a felsorolt fehérjékéhez hasonló [17, 18]. Ezt a feltételezést nem támasztja alá az a tény, hogy a szabad penetráció nem függ a hőmérséklettől, 4°C-on is végbemegy, míg a galektin-1 4°C-on nem internalizálódik, legalábbis nem a mérési határok között kimutatható

mértékben. Az endocitózis fenti két formája érvényes lehet ugyanazon molekula esetében is: a specifikus receptorokkal rendelkező FGF és interleukin-1 penetrációval is bekerülhet a sejtekbe. A kétféle internalizáció megoszlásának szabályozása még nem ismert. A mi vizsgálataink szempontjából azért lényeges az internalizáció mechanizmusának ismerete, hogy meghatározzuk, az internalizáció szerepet játszik-e a galektin-1 biológiai hatásában, azaz a limfocitákon kiváltott apoptózisban. A galektin-1 a nem limfoid sejtekben is internalizálódik, ami megkérdőjelezi az internalizáció szükségességét az apoptózis kiváltásában. E kérdés az internalizáció folyamatának gátlásával és a galektin-1 indukálta apoptózis mértékének változásának vizsgálatával dönthető el. Az erre irányuló kísérleteink eddig nem jártak sikerrel: a klatrin függő endocitózis gátlása nem akadályozta a galektin-1 internalizációját (nem bemutatott adat). Az ettől eltérő endocitotikus folyamatok sokkal kevésbé jellemzettek és gátlásuk is nehezebben valósítható meg.

A sejtek glikoproteinjeihez kötődve a galektin-1 különböző jelátviteli utakat aktiválhat. Más lektin típusú fehérjék, például a ConA és a PHA, cukorkötő aktivitásuk révén keresztükölik a T limfociták sejtfelszíni receptorait (CD2, CD3), tirozin foszforilációt és intracelluláris kalcium-ion koncentráció növekedést váltanak ki, és a T sejteket sejtosztódásra serkentik [80-82, 108]. A galektin-1 által elindított jelátviteli utakat vizsgáló eddigi tanulmányok arról számoltak be, hogy a galektin-1 kezelés a T limfocitákban módosítja a specifikus antigénfelismerő receptortól induló jelátviteli utakat, tirozin foszforilációt okoz, de nem vezet a sejtek aktiválódásához, osztódáshoz és citokin termeléshez. Kísérleteinkben a rekombináns humán galektin-1 mind a T, mind a B limfocitákon tirozin foszforilációt váltott ki, de az antigénfelismerő receptorokon keresztül elinduló folyamatoktól eltérő kinetikával és mintázattal. Ez a biokémiai folyamat szerepet játszik a galektin-1 apoptotikus hatásában, amit az bizonyít, hogy a galektin-1 indukálta tirozin foszforilációban nélkülözhetetlen tirozin kinázok és tirozin foszfatázok gátlásával csökken az apoptotikus sejtek aránya is. A Jurkat sejt mutáns vonalaival végzett kísérleteinkben kimutattuk, hogy a galektin-1 indukálta tirozin foszforiláció elmarad az Lck és ZAP70 hiányában. Hasonlóan a tirozin kináz inhibitorral kapott eredményekhez, az Lck és ZAP70 kináz hiányos Jurkat sejt vonalakban a vad típusú sejtekhez képest mintegy 50 %-kal csökken az apoptózissal válaszoló sejtek száma. Az Lck és a ZAP70 szerepe a galektin-1 biológiai hatásában nem azonos a T sejt receptoron keresztüli aktiválódásban betöltöttel. A TCR

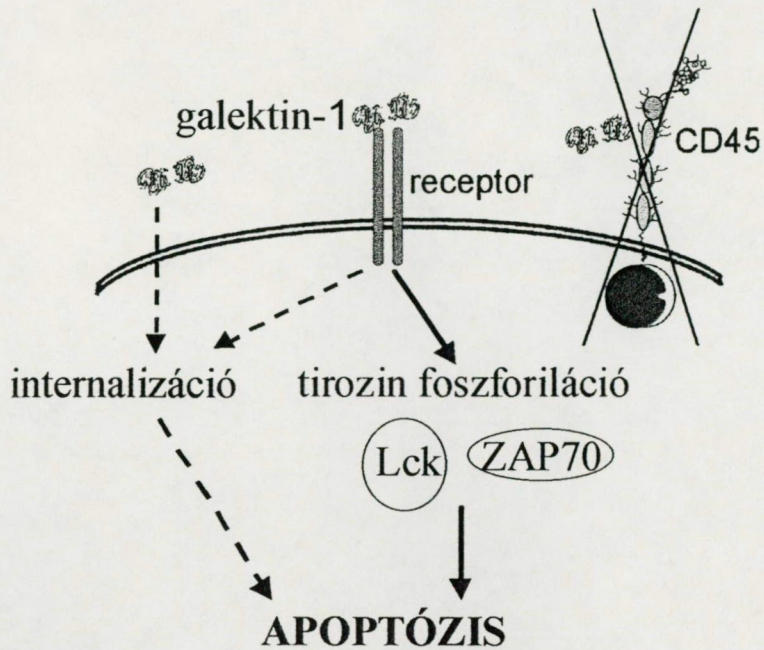
ligandkötése az aktiváció helyett apoptózishoz is vezethet, amennyiben a stimuláció szintje nem optimális. A folyamat biokémiai alapja a TCR jelátvivő alegységének, a ζ láncnak részleges foszforilációja és ezt követően az aktivációtól eltérő membrán proximális szignál komplex kialakulása. A galektin-1 indukálta, apoptózishoz vezető jelátviteli folyamat annyiban hasonlít a TCR-től indulóhoz, hogy a ζ lánc foszforilációja nem teljes és az Lck és ZAP70 kinázok aktiválódnak. Ugyanakkor a galektin-1-re adott válasz esetében az Lck/ZAP70 tirozin kináz útvonal aktivációjának kinetikája, és a szerepet játszó kinázok szubsztrátjai eltérnek a TCR keresztkötésével indukált jelátviteli folyamattól. A TCR hiánya, pl. a CEM sejteken, nem jár együtt a galektin-1 stimulált apoptózis válasz elmaradásával, így joggal feltételezhető, hogy a TCR nem játszik szerepet ebben a folyamatban. Az Lck és ZAP70 a TCR jelátvitelben betöltött szerepétől eltérő funkcióját a galektin-1 és a TCR agonista stimulációt követő kalcium-ion válaszbeli különbség is igazolja. A TCR stimuláció gyors és percekig tartó intracelluláris kalcium-ion koncentráció növekedést eredményez, ami az Lck és ZAP70 kinázok korai aktivációjától függ. Ezzel szemben a galektin-1 stimuláció kísérleteink szerint nem jár együtt az intracelluláris Ca^{++} szint növekedésével. Az Lck és ZAP70 kinázok aktivitása és az általuk aktivált Ras/ERK jelátviteli út nélkülözhetetlenek a CD95L (FasL) expressziójában és az aktiváció indukálta sejthalálban [109, 110]. Ennek ellenére az eddigi eredmények szerint a galektin-1 okozta apoptózis független a Fas/FasL útvonaltól, mert a Fas hiányos lpr egerek T sejtei [21], valamint az anti-Fas rezisztens MOLT-4 sejtvonal is érzékeny a galektin-1 által okozott apoptózisra. A $p56^{lck}$ nem csak a Fas/FasL közvetítette apoptotikus folyamatban, de más tényezők, pl. a stressz által indukált sejthalálban is részt vesz. Kimutatták, hogy aktivitása fontos a ceramid által kiváltott apoptózisban a Jurkat sejtekben, ehhez a folyamathoz az NF- κ B és JNK aktiválásával járul hozzá [111]. Más stimulusokra, így az ionizáló sugárzás hatására bekövetkező apoptózisban, a kaszpáz-8 aktiválódása az Lck közvetítésével, de a Fas/FasL kapcsolódástól függetlenül történik [112]. Az ionizáló sugárzás a B leukémia sejtekben is apoptózis okoz, ebben szintén szerepet játszik a CD19-hez kapcsolódó Lck [113]. Az Lck, a ZAP70 és az apoptotikus folyamatok kapcsolata ugyan még nem ismert, de eredményeink erősen alátámasztják ezen kinázok részvételét a galektin-1 indukálta apoptózisban. A ZAP70 hiányos sejtekbe újratranszfektált kináz visszaállítja a sejtek választ, mind a galektin-1 kezelésre adott tirozin foszforilációs eseményeket, mind az apoptózist. Az eredmények azt is sugallják, hogy ezeknek a

kinázoknak a szerepe a galektin-1 indukálta apoptózisban nem kizárólagos, hiányuk csak csökkenti az elpusztult sejtek arányát, de nem védi ki teljes mértékben a sejthalált.

A CD45 vizsgálatát a galektin-1 apoptotikus hatásának közvetítésében különösen indokolták az ellentmondó és nehezen értelmezhető irodalmi adatok ebben a témában [53, 85], valamint hogy szerepét kimutatták bizonyos apoptotikus folyamatokban: a CD45 keresztkötése éretlen timociták és érett T és B sejtek apoptózisához vezetett [114, 115]. A CD45 és a galektin-1 kötődése több vizsgálatban kimutatott, és a CD45 aktivitása 20-30%-ban csökken e kölcsönhatás során [64-66]. Annak ellenére, hogy a galektin-1 szabályozhatja a CD45 aktivitását és részvételét a jelátvitelben, nem bizonyított, hogy a CD45 valóban a galektin-1 receptora és biológiai hatásának közvetítője. Kísérleteinkben a CD45 hiányos sejtekben a vad típusú Jurkat sejtvonalhoz hasonló mértékű tirozin foszforilációt és apoptózist okozott a galektin-1. Ennek ellenére a tirozin foszfatáz inhibitorok mind a galektin-1 kiváltotta tirozin foszforilációt, mind az apoptózist csökkentették, ezért valószínűsíthető, hogy nem a CD45, de más, általunk nem vizsgált foszfatázok lehetnek elemei a galektin-1 kötődése által elindított a jelátviteli útnak.

Az alábbi pontok és a 7.1. ábra foglalják össze eredményeinket:

1. A galektin-1 kötődik a dolgozatban vizsgált a T és B limfocitákhoz és a nem limfoid sejtvonalakhoz, ezt követően internalizálódik. A lektin internalizációja nem az eddig azonosított galektin-1 kötő fehérjéken (CD2, CD3, CD43, CD45) keresztül történik.
2. A dolgozatban használt valamennyi T és B sejt eredetű sejtvonal apoptotikus választ adott a galektin-1 kezelésre, ugyanakkor a mieloid (eritroid és granulocita) sejtek elkerülték a galektin-1 indukálta sejthalált.
3. A galektin-1 által elindított, tirozin foszforilációval járó jelátviteli folyamatok vezetnek a lektin indukálta apoptózishoz. A p56^{lck} és ZAP70 tirozin kinázok nélkülözhetetlenek a galektin-1 indukálta tirozin foszforilációban, és központi, de nem kizárólagos, szerepet játszanak a galektin-1 által kiváltott apoptózisban.
4. Annak ellenére, hogy a CD45 tirozin foszfatáz az egyik fő galektin-1 kötő glikoprotein a fehérvérsejteken, nem játszik szerepet a galektin-1 indukálta tirozin foszforilációban, sem az apoptotikus folyamatokban.



7.1. ábra: A galektin-1 kötődve feltételezett receptorához tirozin foszforilációt indukál, amelyhez az Lck és ZAP70 kinázok hozzájárulnak. Ez a tirozin foszforiláció és a kinázok működése szükséges a sejtek galektin-1 indukálta apoptózisához. A galektin-1 a receptora közvetítésével, vagy más mechanizmus révén internalizálódik. Az internalizáció és az apoptózis összefüggése még nem ismert. A CD45 nem játszik szerepet a galektin-1 internalizációjában, a jelátviteli folyamatokban és az apoptózisban.

A további kísérleteinkben választ szeretnénk arra kapni, hogy vajon a galektin-1 indukálta jelátviteli útban milyen egyéb szignálmolekulák vesznek részt. Elsősorban a szerin/treonin kinázok, mint a protein kináz C és a MAP kinázok (ERK) vizsgálatát célozzuk meg. Vizsgálni fogjuk a galektin-1 indukálta apoptózis mechanizmusát is, a „halálreceptoroknak”, a kaszpázoknak, a mitokondriumnak, valamint a Bcl-2 család fehérjéinek részvételét a folyamatban.

8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Weis WI, Drickamer K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 441-73.
- [2] Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. (2000) Glycosylation and the immune system. *Science* 291: 2370-6.
- [3] Dennis JW, Granovsky M, and Warren CE (1999) Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays* 21: 412-21.
- [4] Gillespie W, Paulson JC, Kelm S, Pang M, Baum LG. (1993) Regulation of alpha 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)⁺ to PNA⁻ phenotype in developing thymocytes. *J. Biol. Chem.* 268: 3801-4.
- [5] Hakon L. (1997) Introduction to galectins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 9: 9-19.
- [6] Barondes SH. (1997) Galectins: A Personal Overview. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 9: 1-7.
- [7] Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K. (1994) Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76: 597-8.
- [8] Hirabayashi J, Kasai K. (1993) The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 3: 297-304.
- [9] Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. (1993) X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 268: 27034-8.
- [10] Liao DI, Kapadia G, Ahmed H, Vasta GR, Herzberg O. (1994) Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1428-32.
- [11] Ahmed H, Allen HJ, Sharma A, Matta KL. (1990) Human splenic galaptin: carbohydrate-binding specificity and characterization of the combining site. *Biochemistry* 29: 5315-9.
- [12] Wilson TJ, Firth MN, Powell JT, Harrison FL. (1989) The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes. *Biochem. J.* 261: 847-52.
- [13] Sanford GL, Davis LD, Powell JT. (1982) The subcellular localization of the beta-galactoside-binding protein of rat lung. *Biochem. J.* 204: 97-102.
- [14] Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. (1997) Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4730-7.
- [15] Clerch LB, Whitney P, Hass M, Brew K, Miller T, Werner R, Massaro D. (1988) Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry* 27: 692-9.
- [16] Whitney PL, Powell JT, Sanford GL. (1986) Oxidation and chemical modification of lung beta-galactoside-specific lectin. *Biochem. J.* 238: 683-9.
- [17] Cooper DN, Barondes SH. (1990) Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J. Cell Biol.* 110: 1681-91.



- [18] Hughes RC. (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1473: 172-85.
- [19] Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. (1998) Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J. Mol. Med.* 76: 402-12.
- [20] Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH, Fukuda M, Seilhamer JJ. (1995) Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* 181: 877-87.
- [21] Blaser C, Kaufmann M, Muller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, Pircher H. (1998) Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 2311-9.
- [22] Zuniga E, Rabinovich GA, Iglesias MM, Gruppi A. (2001) Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 70: 73-9.
- [23] Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, Sotomayor CE. (1998) Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J. Immunol.* 160: 4831-40.
- [24] Salvatore P, Benvenuto G, Caporaso M, Bruni CB, Chiariotti L. (1998) High resolution methylation analysis of the galectin-1 gene promoter region in expressing and nonexpressing tissues. *FEBS Lett.* 421: 152-8.
- [25] Clerch LB, Whitney PL, Massaro D. (1987) Rat lung lectin synthesis, degradation and activation. Developmental regulation and modulation by dexamethasone. *Biochem. J.* 245: 683-90.
- [26] Chiariotti L, Benvenuto G, Salvatore P, Veneziani BM, Villone G, Fusco A, Russo T, Bruni CB. (1994) Expression of the soluble lectin L-14 gene is induced by TSH in thyroid cells and suppressed by retinoic acid in transformed neural cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 540-6.
- [27] Lotan R, Lotan D, Carralero DM. (1989) Modulation of galactoside-binding lectins in tumor cells by differentiation-inducing agents. *Cancer Lett.* 48: 115-22.
- [28] Ellerhorst J, Nguyen T, Cooper DN, Estrov Y, Lotan D, Lotan R. (1999) Induction of differentiation and apoptosis in the prostate cancer cell line LNCaP by sodium butyrate and galectin-1. *Int. J. Oncol.* 14: 225-32.
- [29] Yamaoka K, Mishima K, Nagashima Y, Asai A, Sanai Y, Kirino T. (2000) Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J. Neurosci. Res.* 59: 722-30.
- [30] Cindolo L, Benvenuto G, Salvatore P, Pero R, Salvatore G, Mirone V, Prezioso D, Altieri V, Bruni CB, Chiariotti L. (1999) Galectin-1 and galectin-3 expression in human bladder transitional-cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 84: 39-43.
- [31] Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. (1995) Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am. J. Pathol.* 147: 815-22.
- [32] Choi JY, van Wijnen AJ, Aslam F, Leszyk JD, Stein JL, Stein GS, Lian JB, Penman S. (1998) Developmental association of the beta-galactoside-binding protein galectin-1 with the nuclear matrix of rat calvarial osteoblasts. *J. Cell Sci.* 111: 3035-43.
- [33] Harrison FL, Wilson TJ. (1992) The 14 kDa beta-galactoside binding lectin in myoblast and myotube cultures: localization by confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 101: 635-46.
- [34] Lutomski D, Fouillit M, Bourin P, Mellottee D, Denize N, Pontet M, Bladier D, Caron M, Joubert-Caron R. (1997) Externalization and binding of galectin-1 on cell surface of K562 cells upon erythroid

differentiation. *Glycobiology* 7: 1193-9.

[35] Akimoto Y, Obinata A, Hirabayashi J, Sakakura Y, Endo H, Kasai K, Hirano H. (1993) Secretion of endogenous 16-kDa beta-galactoside-binding lectin from vitamin A-pretreated chick embryonic cultured skin. *Exp. Cell Res.* 205: 251-60.

[36] Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ. (2001) Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res.* 27: 3595-3602.

[37] Rabinovich GA. (1999) Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death. Differ.* 6: 711-21.

[38] Zhou Q, Cummings RD. (1990) The S-type lectin from calf heart tissue binds selectively to the carbohydrate chains of laminin. *Arch. Biochem. Biophys.* 281: 27-35.

[39] Cooper DN, Massa SM, Barondes SH. (1991) Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J. Cell Biol.* 115: 1437-48.

[40] Ozeki Y, Matsui T, Yamamoto Y, Funahashi M, Hamako J, Titani K. (1995) Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1. *Glycobiology* 5: 255-61.

[41] Zhou Q, Cummings RD. (1993) L-14 lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 6-17.

[42] Yamaoka K, Ohno S, Kawasaki H, Suzuki K. (1991) Overexpression of a beta-galactoside binding protein causes transformation of BALB3T3 fibroblast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 272-9.

[43] Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, Nozawa R, Kadoya T. (2000) Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur. J. Biochem.* 267: 2955-64.

[44] Galvan M, Tsuboi S, Fukuda M, Baum LG. (2000) Expression of a specific glycosyltransferase enzyme regulates T cell death mediated by galectin-1. *J. Biol. Chem.* 275: 16730-7.

[45] Sanford GL, Harris-Hooker S. (1990) Stimulation of vascular cell proliferation by beta-galactoside specific lectins. *FASEB J.* 4: 2912-8.

[46] Adams L, Scott GK, Weinberg CS. (1996) Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1312: 137-44.

[47] Lipsick JS, Beyer EC, Barondes SH, Kaplan NO. (1980) Lectins from chicken tissues are mitogenic for Thy-1 negative murine spleen cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 56-61.

[48] Pitts MJ, Yang DC. (1981) Mitogenicity and binding properties of beta-galactoside-binding lectin from chick-embryo kidney. *Biochem. J.* 195: 435-9.

[49] Allione A, Wells V, Forni G, Mallucci L, Novelli F. (1998) Beta-galactoside-binding protein (beta GBP) alters the cell cycle, up-regulates expression of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor, and triggers IFN-gamma-mediated apoptosis of activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 161: 2114-9.

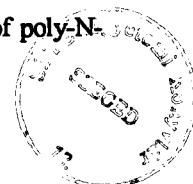
[50] Wells V, Mallucci L. (1991) Identification of an autocrine negative growth factor: mouse beta-galactoside-binding protein is a cytostatic factor and cell growth regulator. *Cell* 64: 91-7.

[51] Kopitz J, von Reitzenstein C, Andre S, Kaltner H, Uhl J, Ehemann V, Cantz M, Gabius HJ. (2001) Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *J. Biol. Chem.* 276: 35917-23.

[52] Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG. (1997) Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J. Exp. Med.* 185: 1851-8.

- [53] Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378: 736-9.
- [54] Murphy JJ, Stevanin T, Schoendorf DS, Wells V, Mallucci L. (1997) Beta galactoside binding protein inhibits B cell growth and induces cell apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 248S.
- [55] Sabelko-Downes KA, Russell JH. (2000) The role of fas ligand in vivo as a cause and regulator of pathogenesis. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 330-5.
- [56] Green DR, Ferguson TA. (2001) The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 917-24.
- [57] Walzel H, Blach M, Hirabayashi J, Kasai KI, Brock J. (2000) Involvement of CD2 and CD3 in galectin-1 induced signaling in human Jurkat T-cells. *Glycobiology* 10: 131-40.
- [58] Pace KE, Lee C, Stewart PL, Baum LG. (1999) Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J. Immunol.* 163: 3801-11.
- [59] Trowbridge IS, Thomas ML. (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 85-116.
- [60] Streuli M, Hall LR, Saga Y, Schlossman SF, Saito H. (1987) Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *J. Exp. Med.* 166: 1548-66.
- [61] Furukawa K, Funakoshi Y, Autero M, Horejsi V, Kobata A, Gahmberg CG. (1998) Structural study of the O-linked sugar chains of human leukocyte tyrosine phosphatase CD45. *Eur. J. Biochem.* 251: 288-94.
- [62] Aruffo A, Kanner SB, Sgroi D, Ledbetter JA, Stamenkovic I. (1992) CD22-mediated stimulation of T cells regulates T-cell receptor/CD3-induced signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10242-6.
- [63] Martinez-Pomares L, Crocker PR, Da Silva R, Holmes N, Colominas C, Rudd P, Dwek R, Gordon S. (1999) Cell-specific glycoforms of sialoadhesin and CD45 are counter-receptors for the cysteine-rich domain of the mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 274: 35211-8.
- [64] Walzel H, Schulz U, Neels P, Brock J. (1999) Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. *Immunol. Lett.* 67: 193-202.
- [65] Fouillit M, Joubert-Caron R, Poirier F, Bourin P, Monostori E, Levi-Strauss M, Raphael M, Bladier D, Caron M. (2000) Regulation of CD45-induced signaling by galectin-1 in Burkitt lymphoma B cells. *Glycobiology* 10: 413-9.
- [66] Fouillit M, Poirier F, Monostori E, Raphael M, Bladier D, Joubert-Caron R, Caron M. (2000) Analysis of galectin-1 mediated cell signaling by combined precipitation and electrophoresis techniques. *Electrophoresis* 21: 275-80.
- [67] Sitkovsky MV, Pasternack MS, Lugo JP, Klein JR, Eisen HN. (1984) Isolation and partial characterization of concanavalin A receptors on cloned cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 1519-23.
- [68] Monostori E, Hartanyi Z, Ocsovszky I, Hegedus Z, Oravec T, Kalman M, Ando I. (1994) Effect of phytohaemagglutinin on CD45 in T cells. *Immunol. Lett.* 42: 197-201.
- [69] Thomas ML. (1999) The regulation of antigen-receptor signaling by protein tyrosine phosphatases: a hole in the story. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 270-6.

- [70] Nguyen JT, Evans DP, Galvan M, Pace KE, Leitenberg D, Bui TN, Baum LG. (2001) CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J. Immunol.* 167: 5697-707.
- [71] Kane LP, Lin J, Weiss A. (2000) Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 242-9.
- [72] Chitu V, Fajka-Boja R, Toth GK, Varadi G, Hegedus Z, Franko A, Szucs KS, Monostori E. (2001) Comparative study on the effect of phosphorylated TCR zeta chain ITAM sequences on early activation events in Jurkat T cells. *Peptides* 22: 1963-71.
- [73] Hegedus Z, Chitu V, Toth GK, Finta C, Varadi G, Ando I, Monostori E. (1999) Contribution of kinases and the CD45 phosphatase to the generation of tyrosine phosphorylation patterns in the T-cell receptor complex zeta chain. *Immunol. Lett.* 67: 31-9.
- [74] Laczko I, Hollosi M, Vass E, Hegedus Z, Monostori E, Toth GK. (1998) Conformational effect of phosphorylation on T cell receptor/CD3 zeta-chain sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242: 474-9.
- [75] Latour S, Veillette A. (2001) Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 299-306.
- [76] Lewis CM, Broussard C, Czar MJ, Schwartzberg PL. (2001) Tec kinases: modulators of lymphocyte signaling and development. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 317-25.
- [77] Leo A, Schraven B. (2001) Adapters in lymphocyte signalling. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 307-16.
- [78] Tamir I, Dal Porto JM, Cambier JC. (2000) Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 307-15.
- [79] Milia E, Di Somma MM, Majolini MB, Ulivieri C, Somma F, Piccolella E, Telford JL, Baldari CT. (1997) Gene activating and proapoptotic potential are independent properties of different CD4 epitopes. *Mol. Immunol.* 34: 287-96.
- [80] O'Flynn K, Krensky AM, Beverley PC, Burakoff SJ, Linch DC. (1985) Phytohaemagglutinin activation of T cells through the sheep red blood cell receptor. *Nature* 313: 686-7.
- [81] Stanley JB, Gorczynski R, Huang CK, Love J, Mills GB. (1990) Tyrosine phosphorylation is an obligatory event in IL-2 secretion. *J. Immunol.* 145: 2189-98.
- [82] Monostori E, Desai D, Brown MH, Cantrell DA, Crumpton MJ. (1990) Activation of human T lymphocytes via the CD2 antigen results in tyrosine phosphorylation of T cell antigen receptor zeta-chains. *J. Immunol.* 144: 1010-4.
- [83] Vespa GN, Lewis LA, Kozak KR, Moran M, Nguyen JT, Baum LG, Miceli MC. (1999) Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* 162: 799-806.
- [84] Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Carrie Miceli M. (2000) Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J. Immunol.* 165: 3722-9.
- [85] Pace KE, Hahn HP, Pang M, Nguyen JT, Baum LG. (2000) CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. *J. Immunol.* 165: 2331-4.
- [86] Skrincoosky DM, Allen HJ, Bernacki RJ. (1993) Galaptin-mediated adhesion of human ovarian carcinoma A121 cells and detection of cellular galaptin-binding glycoproteins. *Cancer Res.* 53: 2667-75.
- [87] Do KY, Smith DF, Cummings RD. (1990) LAMP-1 in CHO cells is a primary carrier of poly-N-



acetyllactosamine chains and is bound preferentially by a mammalian S-type lectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 1123-8.

[88] Bernabei P, Allione A, Rigamonti L, Bosticardo M, Losana G, Borghi I, Forni G, Novelli F. (2001) Regulation of interferon-gamma receptor (INF-gammaR) chains: a peculiar way to rule the life and death of human lymphocytes. *Eur. Cytokine. Netw.* 12: 6-14.

[89] Rathmell JC, Thompson CB. (1999) The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 781-828.

[90] Green DR, Reed JC. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-12.

[91] Hengartner MO. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-6.

[92] Yang RY, Hsu DK, and Liu FT (1996) Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6737-42.

[93] Levi G, Tarrab-Hazdai R, Teichberg VL. (1983) Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits. *Eur. J. Immunol.* 13: 500-7.

[94] Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, Nedwin GE, Vandenbark AA. (1990) Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 28: 177-84.

[95] Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky Y. (1999) Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 190: 385-98.

[96] Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG. (2000) Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur. J. Immunol.* 30: 1331-9.

[97] Colnot C, Ripoché MA, Fowles D, Cannon V, Scaerou F, Cooper DNW, Poirier F. (1997) The role of galectins in mouse development. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 9: 31-40.

[98] Puche AC, Poirier F, Hair M, Bartlett PF, Key B. (1996) Role of galectin-1 in the developing mouse olfactory system. *Dev. Biol.* 179: 274-87.

[99] Ando I, Zakany J, Takacs L, et al., Rohlich P, Bacsy E, editors. *Tissue Culture and Res.* N.Y. and Amsterdam Academic Press Elsevier North Holland (1984) The use of monoclonal antibody to dissect the human haemopoietic and lymphoreticular system. p. 241-6.

[100] Ando I, Ramadan H, Bogdan G, et al., Schlossman SF, editors. *Leukocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens.* Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press (1995) Induction of cell aggregation by the Workshop Adhesion Structure Subpanel 9 (CD43) mAb. p. 1711-2.

[101] Fouillit M, Levi-Strauss M, Giudicelli V, Lutowski D, Bladier D, Caron M, Joubert-Caron R. (1998) Affinity purification and characterization of recombinant human galectin-1. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 706: 167-71.

[102] Sargiacomo M, Lisanti M, Graeve L, Le Bivic A, Rodriguez-Boulan E. (1989) Integral and peripheral protein composition of the apical and basolateral membrane domains in MDCK cells. *J. Membr. Biol.* 107: 277-86.

[103] Alcover A, Alarcon B. (2001) Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit. Rev. Immunol.* 20: 325-46.

[104] Spinozzi F, Pagliacci MC, Migliorati G, Moraca R, Grignani F, Riccardi C, Nicoletti I. (1994) The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Leuk. Res.* 18: 431-9.

- [105] Pocsik E, Mihalik R, Penzes M, Loetscher H, Gallati H, Aggarwal BB. (1995) Effect of cell cycle on the regulation of the cell surface and secreted forms of type I and type II human tumor necrosis factor receptors. *J. Cell Biochem.* 59: 303-16.
- [106] Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, Raz A. (2002) Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* 277: 6852-7.
- [107] Prochiantz A. (2000) Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12: 400-6.
- [108] Miller K. (1983) The stimulation of human B and T lymphocytes by various lectins. *Immunobiology* 165: 132-46.
- [109] Latinis KM, Carr LL, Peterson EJ, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. (1997) Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *J. Immunol.* 158: 4602-11.
- [110] Eischen CM, Williams BL, Zhang W, Samelson LE, Lynch DH, Abraham RT, Leibson PJ. (1997) ZAP-70 tyrosine kinase is required for the up-regulation of Fas ligand in activation-induced T cell apoptosis. *J. Immunol.* 159: 1135-9.
- [111] Manna SK, Sah NK, Aggarwal BB. (2000) Protein tyrosine kinase p56lck is required for ceramide-induced but not tumor necrosis factor-induced activation of NF-kappa B, AP-1, JNK, and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: 13297-306.
- [112] Belka C, Marini P, Lepple-Wienhues A, Budach W, Jekle A, Los M, Lang F, Schulze-Osthoff K, Gulbins E, Bamberg M. (1999) The tyrosine kinase lck is required for CD95-independent caspase-8 activation and apoptosis in response to ionizing radiation. *Oncogene* 18: 4983-92.
- [113] Waddick KG, Chae HP, Tuel-Ahlgren L, Jarvis LJ, Dibirdik I, Myers DE, Uckun FM. (1993) Engagement of the CD19 receptor on human B-lineage leukemia cells activates LCK tyrosine kinase and facilitates radiation-induced apoptosis. *Radiat. Res.* 136: 313-9.
- [114] Klaus SJ, Sidorenko SP, Clark EA. (1996) CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes. *J. Immunol.* 156: 2743-53.
- [115] Lesage S, Steff AM, Philippoussis F, Page M, Trop S, Mateo V, Hugo P. (1997) CD4+ CD8+ thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway. *J. Immunol.* 159: 4762-71.
- [116] Novelli F, Allione A, Wells V, Forni G, Mallucci L. (1999) Negative cell cycle control of human T cells by beta-galactoside binding protein (beta GBP): induction of programmed cell death in leukaemic cells. *J. Cell Physiol.* 178: 102-8.

9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. R. Fajka-Boja, M. Szemes, G. Ion, Á. Légrádi, M. Caron, É. Monostori (2002) Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. *Immunol. Lett.* 82: 149-154.
2. R. Fajka-Boja, G. Ion, Á. Légrádi, M. Szemes, M. Caron, D. Demydenko, G. Tóth, É. Monostori. Tyrosine kinases, p56^{lck} and ZAP70 participate in the regulation of galectin-1 induced apoptosis in T cells. *Glycobiology, közlésre elküldve.*
3. R. Fajka-Boja, M. Hidvégi, Y. Shoenfeld, G. Ion, D. Demydenko, R. Tömösközi-Farkas, Cs. Vizler, A. Telekes, Á. Resetár, É. Monostori (2002) Fermented wheat germ extract induces apoptosis and downregulation of major histocompatibility complex class I proteins in tumor T and B cell lines. *Int. J. Oncol.* 20: 563-570.
4. V. Chitu, R. Fajka-Boja, G. Tóth, Gy. Váradi, Z. Hegedüs, A. Frankó, K. Székely Szűcs, É. Monostori (2001) Comparative study on the effect of phosphorylated TCR ζ chain ITAM sequences on early activation events in Jurkat T cells. *Peptides* 22: 1963-1971.
5. L. Cervenak, A. Magyar, R. Boja, G. László (2001) Differential expression of GL7 activation antigen on bone marrow B cell subpopulations and peripheral B cells. *Immunol. Lett.* 78: 89-96.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban Monostori Évának, a Limfocita Szignál Transzdukciós Laboratórium vezetőjének és Raskó István igazgatónak, hogy lehetővé tették az MTA SZBK Genetikai Intézetében a doktori munkám elvégzését.

Monostori Évát külön hálás köszönet illeti a gondos témavezetésért és a sok segítségért, amit a felmerülő problémák megoldása kapcsán nyújtott.

Köszönöm a Limfocita Szignál Transzdukciós Laboratórium lelkes munkatársainak együttműködését az itt végzett munkám során: Gabriella Ionnak, hogy segített az apoptózis vizsgálatokban, Légrádi Ádámnak, hogy engedélyezte a kináz és foszfatáz inhibitorokkal és a mutáns sejtekkel végzett apoptózis tesztek eredményeinek doktori dolgozatomban történő felhasználását, Dmytro Demydenko és Szemes Marianna segítségét a rekombináns humán galektin-1 termelésében, Székely Szűcs Kingának és Gercsó Andrásnének a kiváló technikai segítséget, valamint Frankó Andrásnak a Ph.D. dolgozatom gondos átolvasását.

Szeretném megköszönni Kotogány Editnek az áramlási citofluoriméter használatában és Tóth Sándornének az ábrák elkészítésében nyújtott segítséget.

Köszönöm Michel Caron (Université Paris 13, Bobigny Cedex) együttműködését, valamint Robert T. Abraham professzornak (Mayo Clinic, Rochester), Oravec Tamásnak (NIH, Bethesda) és Sármay Gabriellának (ELTE Immunológiai Tanszék, Budapest) a rendelkezésünkre bocsátott sejtvonalakat.

A munkához az OTKA T-029706 és ETT T05/016/2000 pályázatok és a Biomedicina Rt. nyújtottak kutatásfejlesztési támogatást.

11. ÖSSZEFOGLALÓ

A galektinek szolubilis állati lektinek, amelyek egy családba való sorolása a poli-*N*-acetillaktózinok (β -galaktozidok) felismerésén és a szénhidrátfelismerő domén nagy szekvencia-azonosságán alapul. Változatos biológiai funkciót töltenek be, részt vesznek a pre-mRNS splicing-ban, a sejtadhézióban, a sejtek növekedésének és differenciálódásának szabályozásában, az embriogenezisben, a metasztázisban, az apoptózisban, az autoimmun folyamatok és a gyulladások szabályozásában. Ennek ismeretében diagnosztikai és terápiás célokra való felhasználásukat is ajánlják. Azonban a pleiotróp funkcióval bíró galektinek alkalmazása veszélyt is rejt magában a funkciók pontos mechanizmusának ismerete hiányában.

A galektin-1 funkciói bonyolult szabályozás alatt állnak, a fehérje hatását meghatározza a fejlődés- és szövetfüggő expressziója, a celluláris lokalizációja, receptorának glikozilációs mintázata és a sejtek aktiválódási állapota. A humán galektin-1 többek között jelen van az elsődleges és másodlagos limfoid szervekben, a T sejt fejlődés és aktiváció színhelyén. Minthogy *in vitro* apoptózist indukál az éretlen timocitákon és az aktivált T sejteken, feltételezik, hogy szerepet játszik az éretlen T sejtek szelekciójában és az immunválasz lecsengése során az aktivált T sejtek eliminálásában. A galektin-1 biológiai hatását közvetítő receptor(ok) és az apoptózishoz vezető jelátviteli út elemei még nem ismertek. A T limfocitákon biokémiai módszerekkel több, erősen glikozilált galektin-1 kötő membránfehérjét azonosítottak (CD2, CD3, CD4, CD7, CD43, CD45). Az irodalmi adatok alapján a galektin-1 hatásának fő mediátora a CD45 tirozin foszfatáz lehet.

A galektin-1 apoptotikus hatását eddig csak a limfocitákon írták le. Kérdésünk az volt, hogy vajon ez az apoptotikus hatás valóban specifikus-e a limfocitákra, milyen molekulák állnak a jelenség hátterében, milyen kezdeti szignálok szükségesek az apoptotikus kaszkád lefutásához. Munkámban választ kerestem arra, hogy 1/ a T sejteken kívül mely csontvelői eredetű sejteken van galektin-1-et kötő fehérje? Mi történik a galektin-1-gyel a sejtekhez való kötődését követően? 2/ A T sejteken kívül befolyásolja-e a galektin-1 egyéb hemopoetikus eredetű sejtek életképességét? 3/ Milyen jelátviteli folyamatokon keresztül történik a galektin-1 által indukált apoptózis?

Milyen specifikus szignálmolekulák aktivitása szabályozza ezt a folyamatot? 4/
Valóban a CD45 foszfatáz a galektin-1 biológiai hatásának közvetítője?

A rekombináns humán galektin-1 különböző sejtvonalakhoz való kötődését áramlási citométerrel mutattuk ki. A galektin-1 kötődött minden vizsgált sejttípushoz, függetlenül azok eredetétől és érettségi állapotától. A vizsgált sejtek között T limfociták (Jurkat - érett T sejt fenotípust mutató, MOLT-4 - CD4⁺CD8⁺ stádiumban megrekedt éretlen T sejt, CEM - glükokortikoid szenzitív éretlen T sejt), B limfociták (BL-41, Raji, Daudi - Burkitt limfómák) és nem limfoid sejtvonalak (K562 - eritroid vonal, U937 - granulocita fejlődési vonal) voltak. A galektin-1 kötő fehérjét sejt felszínen biotinilált T sejtek teljes sejt lizátumából vontuk ki galektin-1 Sepharose 4B gyöngyökkel, majd Western blot rendszerben streptavidin-HRPO-val reagáltattuk. A lektinhez több nagy molekulású fehérje kapcsolódott (203, 160, 134, 95, 74, 66 és 58 kDa), ezek közül a CD45 foszfatázt azonosítottuk specifikus ellenanyagokkal. A galektin-1 és a fenti sejt felszíni struktúrák között kimutatható kötődés cukorspecifikus volt.

A galektin-1 kötődése utáni extra- vagy intracelluláris lokalizációját áramlási citométerrel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a galektin-1 minden vizsgált sejtvonalban internalizálódott fiziológias hőmérsékleten, 3 órán belül. Az internalizáció egyik lehetséges mechanizmusa a receptor mediált endocitózis. Annak eldöntésére, hogy a galektin-1 internalizációjában mely fehérje játszik szerepet, követtük az egyes galektin-1 kötő fehérjék (CD2, CD3, CD43, CD45) sejt felszíni mennyiségét a galektin-1 internalizációjával párhuzamosan. A vizsgált fehérjék sejt felszíni szintje nem változott a galektin-1 internalizációja során, azaz a lektin internalizációja nem az eddig azonosított galektin-1 kötő fehérjéken (CD2, CD3, CD43, CD45) keresztül történik. Nem zárható ki, hogy az endocitózis az eddig még nem vizsgált glikoproteinek (CD4, CD7), esetleg még nem azonosított receptorok közvetítésével történik. Szintén elképzelhető, hogy nem a receptor mediált endocitózis, hanem esetleg más mechanizmus áll az internalizáció hátterében.

A galektin-1 kezelés során apoptózissal elpusztuló sejtek arányát szintén áramlási citométerrel követtük. A korai apoptotikus folyamatokban a sejt membrán extracelluláris felszíne felé átforduló foszfatidil-szerint Annexin V - FITC-cel mutattuk ki. A késői apoptotikus sejteket sejt ciklus analízisnek vetettük alá, ennek során meghatároztuk a hipodiploid DNS tartalommal rendelkező apoptotikus sejtek arányát. A galektin-1 apoptózist indukált a vizsgált T és B limfocitákon. A különböző sejtvonalak apoptózis

érzékenysége nem hozható összefüggésbe a sejtekhez kötődő galektin-1 mennyiségével. A T sejtek összehasonlítható mennyiségű galektin-1 kötő struktúrát hordoztak és hasonló mértékű volt a galektin-1-re adott apoptotikus válaszuk is. Ezzel szemben az Burkitt limfóma eredetű B sejtek, a Raji és Daudi, kevés, de hasonló mennyiségű galektin-1-et kötöttek, ugyanakkor eltérő érzékenységet mutattak a galektin-1-gyel szemben: a Raji a vizsgált B sejtvonalak közül a legkisebb, míg a Daudi messze a legnagyobb apoptotikus választ adta. Ezzel ellentétben a nem limfoid sejtvonalak (eritroid, granulocita) a galektin-1 kezelésre nem válaszoltak apoptózissal, pedig rendelkeztek galektin-1 kötő fehérjékkel és internalizálták a lektint.

Előző tanulmányokban kimutatták, hogy a galektin-1 kezelés hatására a ζ -lánc részlegesen foszforilálódik, és a sejtek aktivációja helyett azok apoptózisához vezető jelátviteli utat indít el. A galektin-1 által indukált korai jelátviteli eseményeket Western blot analízissel vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a galektin-1 kezelés tirozin-foszforilációt indukált T és B sejteken, amely tirozin kináz és foszfatáz inhibitorokkal (genistein, nátrium-vanadát, fenilarsén-oxid) meggátolható volt. A kináz és foszfatáz inhibitorok csökkentették a galektin-1 hatására elpusztuló sejtek arányát, ez arra utal, hogy a galektin-1 által kiváltott tirozin foszforiláció szükséges az ezt követő apoptotikus lépésekhez.

A galektin-1 indukálta jelátviteli útban és apoptotikus folyamatban szerepet játszó egyedi szignálmolekulák vizsgálatához kináz (p56^{lck} és ZAP70) és foszfatáz (CD45) hiányos sejtvonalakat alkalmaztunk a fent leírt módszerekben. A kináz mutáns sejtvonalakban a galektin-1 nem indukált tirozin foszforilációt, valamint ezek a sejtek kevésbé voltak érzékenyek a galektin-1 indukálta apoptózisra. Annak ellenére, hogy az irodalmi adatok többsége a CD45 foszfatázt, mint a galektin-1 biológiai hatásának közvetítőjét tartja számon, a CD45 hiánya nem befolyásolta sem a galektin-1 indukálta tirozin foszforilációt, sem az apoptózist. Minthogy a tirozin foszfatáz inhibitorok gátolták a galektin-1-re adott sejtválaszt, más tirozin foszfatázok közreműködése nem zárható ki.

Összefoglalva: 1/ A galektin-1 kötődik a dolgozatban vizsgált T és B limfocitákhoz és nem limfoid sejtvonalakhoz, ezt követően internalizálódik. A lektin internalizációja nem az eddig azonosított galektin-1 kötő fehérjéken (CD2, CD3, CD43, CD45) keresztül történik. 2/ A dolgozatban használt valamennyi T és B sejt eredetű sejtvonal apoptotózissal válaszol galektin-1 kezelésre, ugyanakkor a mieloid (eritroid és

granulocita) sejtek elkerülnek a galektin-1 indukálta sejthaláltól. 3/ A galektin-1 által elindított, tirozin foszforilációval járó jelátviteli folyamatok vezetnek a lektin indukálta apoptózishoz. A p56^{lck} és ZAP70 tirozin kinázok nélkülözhetetlenek a galektin-1 indukálta tirozin foszforilációban, és központi szerepet játszanak a galektin-1 által kiváltott apoptózisban. 4/ Annak ellenére, hogy a fehérvérsejteken a CD45 tirozin foszfatáz az egyik fő galektin-1 kötő glikoprotein, nem játszik szerepet sem a galektin-1 indukálta tirozin foszforilációban, sem az apoptotikus folyamatokban.

12. SUMMARY

Galectins are endogenous animal lectins, sharing conserved amino acid sequence and affinity for β -galactosides. Galectin-1 participates in a wide variety of biological events, such as cell adhesion, cell growth regulation, apoptosis, immunomodulation, inflammation, pre-mRNA splicing, metastasis and embryogenesis. The functions of galectin-1 are susceptible to modulation according to the glycosylation state of the receptors, cell activation status, developmentally regulated expression and subcellular compartmentalization. Galectin-1 is present at the sites of apoptosis during normal T cell development and effector functions. According to this, galectin-1 induces apoptosis of immature thymocytes, activated T cells, and several T leukemia cell lines *in vitro*. However, the molecular mechanism of the galectin-1 induced apoptotic process is not well understood yet. Recently, different T cell surface receptors have been identified as galectin-1 binding proteins, including CD45, CD43, CD2, CD3, CD4 and CD7. From these receptors CD45 has been implicated as a putative mediator of the biological effect of galectin-1 in T lymphocytes.

Galectin-1 has been shown to be apoptotic on lymphocytes, but there are no data regarding other haematopoietic cells. In this study we investigated the effect of recombinant human galectin-1 on different cell types of bone marrow origin. It is not proved, which of the identified galectin-1 binding protein mediates its apoptotic effect. Moreover, the elements of the galectin-1 induced signal transduction pathway are not known.

To examine the binding of galectin-1 to various cell lines we used flow cytometry. All the cell lines tested, e.g. the T leukemia cell line, Jurkat, a T lymphoblastic cell line with CD4⁺CD8⁺ immature phenotype, MOLT-4, a glucocorticoid-sensitive T cell line, CEM, Burkitt's lymphoma B cell lines, BL-41, Raji, Daudi and non-lymphoid cell lines, such as the myelo-monocytic U937 and the erythro-leukemic K562 bound galectin-1. The binding of galectin-1 was sugar dependent since it was competed by excess of β -galactoside (lactose). Galectin-1-interacting glycoproteins were isolated from cell surface biotinylated Jurkat T cell lysate using immobilized galectin-1 and then analyzed

by Western blotting. Among several high molecular weight proteins (203, 160, 134, 95, 74, 66 and 58 kDa) we identified CD45 using monoclonal antibodies. When CD45^{-/-} Jurkat variant cells were analyzed on the same way, identical galectin-1 binding protein bands were detected except the CD45 bands.

We explored the post-binding behavior of galectin-1 by monitoring its extra- and intracellular localization at 37°C. The flow cytometry experiments showed internalization of galectin-1 within 3 hours in all the cell lines listed above. Searching for the possible mediator of endocytosis we analyzed whether the cell surface quantity of known galectin-1 binding glycoproteins, such as CD45, CD43, CD3 and CD2 decreased together with the surface bound galectin-1. Our results showed that the internalization of galectin-1 was not accompanied with the down-regulation of the cell surface level of these glycoproteins, indicating that these receptors were not involved. Other identified galectin-1 binding proteins (CD4, CD7) or a not yet identified receptor(s) could mediate the down-regulation of the surface bound galectin-1. It is also possible that galectin-1 is internalized by other mechanism and not by receptor mediated endocytosis.

The effect of galectin-1 on cell viability was tested by flow cytometry. The early apoptotic cells were detected by binding of Annexin V - FITC to the membrane phosphatidyl serine, which is translocated from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane when cells undergo apoptosis. In the late apoptotic cells the DNA lost was measured by DNA content analysis. The T cell lines, Jurkat, MOLT-4 and CEM representing different stage of T cell differentiation showed similar level of apoptotic death after galectin-1 treatment. In addition to T cells, the different B cell lines, BL-41, Raji and Daudi were also killed by galectin-1. The sensitivity of the cells did not correlate with the amount of the bound galectin-1, since the B cell lines bound similar amounts of galectin-1 but Daudi was the most sensitive and Raji was the least responsive to galectin-1 induced apoptosis. In contrast to T and B cells, the non-lymphoid cell lines, U937 and K562 did not undergo apoptosis, although these cells also bound and internalized galectin-1.

Recent studies showed that galectin-1 treatment induces partial TCR ζ chain phosphorylation. We explored the galectin-1 induced early signaling steps in Western blot. The T and B cell lines were treated with galectin-1 and the cell lysates were immunoblotted with anti-phosphotyrosine. Galectin-1 induced time and concentration

dependent protein tyrosine phosphorylation in these cells. This was inhibited with tyrosine kinase inhibitor, genistein and tyrosine phosphatase inhibitors, phenylarsine oxide and sodium vanadate. The galectin-1 induced tyrosine phosphorylation was essential for the subsequent apoptosis, since the tyrosine kinase and phosphatase inhibitors blocked the apoptosis when added together with galectin-1 to the cells.

The components of galectin-1 induced signal transduction pathway were further analysed using kinase (p56^{lck} and ZAP70) and phosphatase (CD45) mutant cell lines. In contrast to the wild type Jurkat cells, galectin-1 treatment did not result in tyrosine phosphorylation of intracellular proteins either in p56^{lck} or ZAP70 deficient cells. Consistently, the kinase mutant cells showed about 50% less apoptotic cells after 24 hours of galectin-1 treatment as Jurkat cells did, indicating that the specific kinases, Lck and ZAP70 were involved in galectin-1 induced T cell apoptosis. Galectin-1 treatment resulted in a definite tyrosine phosphorylation in both wild type and CD45 deficient Jurkat cells. Jurkat and CD45 deficient J45.01 responded a similar degree of apoptosis when co-cultured with galectin-1 under identical conditions. In contrast to recent studies our results prove that the galectin-1 induced tyrosine phosphorylation and apoptosis is not mediated by CD45.

Summarizing our results, galectin-1 binds to and is internalized in cell lines of haematopoietic origin. The internalization of galectin-1 is not mediated by CD2, CD3, CD43, CD45, the identified galectin-1 binding proteins. As an early response, galectin-1 treatment induces tyrosine phosphorylation in lymphocytes and this signaling pathway leads to apoptosis. Galectin-1 induces cell death only in T and B cell lines, but not in the non-lymphoid (erythroid and granulocytic) cells. The tyrosine kinases, p56^{lck} and ZAP70 are necessary in the signaling pathway triggered by galectin-1. These signaling proteins are specifically but not solely involved in apoptosis induced by galectin-1 in T cells. CD45 tyrosine phosphatase does not play a role in galectin-1 induced tyrosine phosphorylation and apoptosis. Since tyrosine phosphatase inhibitors abolish the galectin-1 induced apoptosis, one can hypothesize that phosphatases other than CD45 are participating in the biological effect of galectin-1.