

**AZ ENDOGÉN GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HUMÁN GALEKTIN-1
HATÁSMECHANIZMUSA A FEHÉRVÉRSEJTEK
ÉLETKÉPESSÉGÉNEK SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Akadémiai doktori értekezés

Monostori Éva, Ph.D.

**MTA Szegedi Biológiai központ
Genetikai Intézet
Limfocita Jelátviteli Csoport**

2006

TARTALOM JEGYZÉK

Köszönetnyilvánítás, ami előre kívánkozik	3. oldal
Előszó	5. oldal
Bevezetés	5. oldal
Galektin család	6. oldal
A galektin család szerkezete, struktúra-funkció	10. oldal
A Galektin-1 intracelluláris lokalizációja és funkciója	14. oldal
A Gal-1 extracelluláris funkciója	15. oldal
Anyagok és módszerek	28. oldal
Eredmények	36. oldal
CD45 szerepe a Gal-1 citotoxikus hatásában	36. oldal
A Gal-1 által kiváltott apoptózis molekuláris mechanizmusa	39. oldal
Az apoptózis és a lektin-szénhidrát kölcsönhatás	54. oldal
Gal-1 és a csontvelő sejtek differenciálódása és életképessége	58. oldal
Megbeszélés	67. oldal
Halál-receptor vagy mitokondrium?	70. oldal
Cukor-lektin kölcsönhatás és apoptózis?	75. oldal
Módosítja-e a Gal-1 a csontvelő sejtek életképességét?	77. oldal
Végszó	78. oldal
Köszönetnyilvánítás	78. oldal
Bibliográfia	79. oldal
Saját közlemények	104. oldal

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS, AMI ELŐRE KÍVÁNKOZIK

Úgy gondolom, hogy egy doktori disszertáció az életmű összefoglalása kell, hogy legyen. Ehhez az is hozzátartozik, hogy visszatekintek, hogyan is lett belőlem kutató, kik azok, akiktől az útravalót kaptam. Harmad éves biológiai-kémia tanár szakos egyetemistaként kezdtem diákköri munkát végezni az ELTE TTK Biokémia tanszékén. Az indíttatást ott kaptam meg **Szilágyi László** témavezetőmtől. A sok munka és tanulás mellett, mint hallgatóknak részünk volt sok vidámságban és barátságban, megtanulhattuk, milyen másokkal együtt dolgozni, mennyit jelent egy jó közösség. Köszönöm ezt Lacinak és az egész akkori Biokémia Tanszéknek. Még az egyetemi évekhez tartozik, hogy eljártam **Gergely János** professzor úr immunológia speciális kollégiumára. A Tanár úrnak köszönhetem, hogy beleszerettem az immunológiába, azt hiszem, ezzel nem vagyok egyedül. Köszönöm Tanár úr.

A következő fontos állomásra csak végzés után 4 évvel érkeztem, mikor **Péterfy Ferenc** bizalmába és csoportjába fogadott a Humán Oltóanyagtermelő és Kutató Intézet Immunkémiai Osztályán. A gyakorlatban itt ismerkedtem meg az immunológiai módszerekkel, az immunizálással, aminek később nagy hasznát vettem. Köszönet érte. Feri küldött a Szegedi Biológiai Központba, végül ott is ragadtam, hogy megtanuljak monoklonális ellenanyagot készíteni. Bár ennek a módszernek az ismerete mai napig hasznos, és ezért köszönet illeti **Andó Istvánt**, akitől elsajátítottam a technikát, mégis kutatóvá válásom a londoni Imperial Cancer Research Fundban következett be. Itt tanultam meg, hogy a jó kutatás alapja a kíváncsiság, a jó kérdésfeltevés és az ismert és ismeretlen módszerek megfelelő alkalmazása a kérdés megválaszolásához. Érezhettem egy egész intézet stimuláló tudományos légkörét, találkozhattam rendkívül széles látókörű és nagy tudású emberekkel, akikhez, bár nem érhettem fel tudásban, mégis egyenrangúnak fogadtak el. Nem csak gondolkodni és kísérletezni tanultam itt meg, de az eredmények cikké formálását is itt sajátítottam el. Hálás vagyok az egész Intézetnek, de különösen és soha vissza nem adhatóan **Mike Crumptonnak**, aki befogadott a

laborjába és mindig nagy figyelemmel kísérte és segítette munkámat. **Doreen Cantreln**ek, aki mai napig az általam ismert legkiválóbb tudós a szignáltranszdukción területén, akitől meghatározó ismereteket kaptam, és aki megajándékozott barátságával. 1998-ban, mikor lehetőséget kaptam saját csoportom megalakításához, amit **Raskó István** Igazgató úrnak köszönök, azt a célt tűztem magam elé, hogy a mellém vetődő fiataloknak lehetőséget adjak, hogy tanulhassanak, és ha a kutatói pályát választják, akkor a PhD után ne üres kézzel, vagy fejvel fogjanak hozzá. Nem csak, reményeim szerint, ők tanultak tőlem, de én is tőlük. Ezért köszönöm a nálam végzett kollegáimnak, hogy több-kevesebb ideig együtt dolgozhattam velük: **Hegedűs Zoltánn**ak, **Violeta Chitun**ak, **Fajka-Boja Robertánn**ak és **Gabriela Ion**nak. Jelenlegi hallgatóim, **Kovács Ferenc**, **Blaskó Andrea** és **Szebeni Gábor** munkája biztosítja a labor jövőjét. **Katonáné Kinga** és **Gercsóné Andrea** asszisztensek nélkül az egész csoport életképtelen lett volna. Jókedvükkel, hihetetlen munkabírásukkal és szakértelmükkel a csoport oszlopát adták és adják. Köszönöm.

Nem felejtetem kifejezni hálámat azoknak a munkatársaimnak, akik a háttérből kedvesen, nagylelkűen és önfeláldozóan mindig megadták a legnagyobb segítséget a nyugodt munkához: **Tóth Sándorné Marikánn**ak, aki a komputeres ábrakészítés varázslója, **Dózsa Ildikónn**ak és **Újvári Szilviánn**ak, akik a pályázatokkal kapcsolatos gazdasági és **Soltész Csillánn**ak, aki az irodai teendőket teljesen leveszik a vállunkról és **Kasza Györgyne**nek, aki minden műszaki problémánkra megoldást talál.

Jelenlegi munkám nagyban függ azoktól a kollegáimtól, és talán mondhatom barátaimtól, akikkel évek óta együttműködök a tudományos munkában: **Tóth Gábortól** az SZTE Orvosvegytani Intézetében és **Uher Ferentől** az Országos Gyógyintézeti Központban. Köszönöm nekik.

Végül nem hagyhatom ki a köszönetnyilvánításból **szüleimet** sem, akik, bár korán elveszítettem őket, de a rövid idő alatt, amit együtt tölthettünk, megtanítottak, hogy becsületesen kell élni, hogy törődni kell másokkal, és, hogy a szeretet, amit másoknak adunk, mindig megtérül.

ELŐSZÓ

Az elmúlt 18 évben tudományos érdeklődésem elsősorban az emberi T limfociták funkció-szabályozására, annak molekuláris mechanizmusának vizsgálatára irányult. Kutatásaim során folyamatában először a T-sejtek CD2-ön [5-7] és T-sejt receptoron (TCR) [6;8-13] keresztül történő aktiválás során bekövetkező intracelluláris eseményeket tanulmányoztam. Ezt követően a TCR jelátviteli folyamatok szabályozásában alapvető szerepet játszó CD45 tirozin foszfatáz funkciójára [10;13-18] terjesztettem ki a vizsgálatokat. A fő irányvonalak mellett a T sejt aktiváció más aspektusaiba is sikerült bepillantást nyerni [19-21]. Ennek a kutatási folyamatnak részeként, főképpen a CD45 receptor ligandjának meghatározását célzó kísérletek során, jutottam el a jelenlegi kutatásaink célpontjához, az emberi galektin-1 (Gal-1)-hez. A Gal-1-et a korai közlemények a CD45 ligandjaként azonosították. Mára kiderült, hogy bár a Gal-1 valóban kötődik a CD45-höz és bizonyos jeleket továbbít is e receptoron keresztül, az alábbiakban részletezett T sejtekre kifejtett apoptotikus funkcióját mégsem a CD45-ön keresztül látja el.

Bár az előzmények minden szempontból fontosak a dolgozatban bemutatott eredmények eléréséhez, a CD2, TCR és CD45-tel kapcsolatos vizsgálatokat a dolgozat egységességének megőrzése érdekében nem részletezem. Ezen a munkákból származó közleményeket a bibliográfia tartalmazza.

Ezt a disszertációt a Gal-1-gyel végzett kutatásaink leírásának szenteltem.

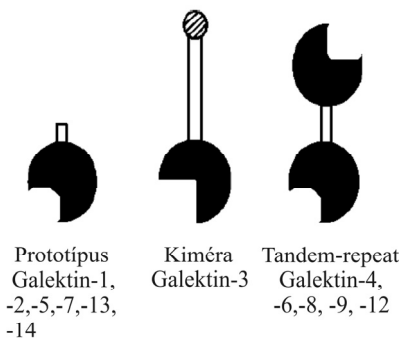
1. BEVEZETÉS

Az immunválasz szabályozása és az immunhomeosztázis fenntartása részben az immunsejtek aktivációjának és effektor funkcióinak szigorú szabályozásától, részben az immunválasz időben történő downregulációjától függ. Az utóbbi folyamat fontos eleme a specifikus antigénnel szemben aktiválódott limfociták programozott sejthalállal, apoptózissal történő eliminációja. Az apoptózis elindulhat az erre a funkcióra rendeltett

halál-receptorokon keresztül, illetve más, az aktivált sejtek, vagy környezetük által kiválasztott citotoxikus „citokinek” által, amelyek közé a lektin természetű Gal-1 is tartozik. Amikor az immunválasz lecsengéséhez vezető mechanizmusok felborulnak, súlyos patológiás következményekkel számolhatunk, mint például az autoimmun, vagy krónikus gyulladásos betegségek kialakulása. Éppen ezért célunk, hogy minél pontosabban és részletesebben megismerjük azokat a faktorokat, jelen esetben a gyulladáscsökkentő Gal-1 funkcióját, melyek szerepet játszanak az immunregulációban.

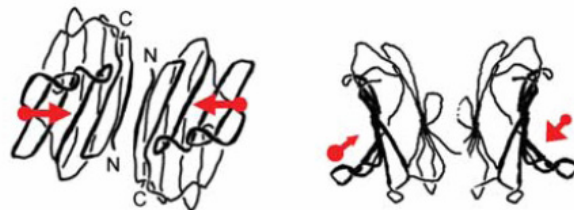
Galektin család

A galektin elnevezés 1994-ben született [22] olyan fehérjék azonosítására, melyek megfelelnek két követelménynek: β -galaktozidokhoz mutatnak affinitást, és a szénhidrát-kötő hely (CRD=carbohydrate recognition domain) cukor-kötésben szerepet játszó aminosavai konzerválódtak. Szerkezetük szerint három típusba sorolhatók (1.1. Ábra) [23]:



1.1. Ábra. A galektin család 3 típusa

A prototípus galektineket egy CRD építi fel. A kiméra galektinben, melynek egyetlen ismert tagja a galektin-3, a C terminálison elhelyezkedő CRD az N terminális felé nyúló prolin és glicin gazdag ismétlődő aminosav szekvenciával folytatódik. Végül a bivalens, az egy polipeptid láncon két



Gal-1 és -2

Gal-7 és valószínűleg Gal-3

1.2. Ábra. A dimerképződés két lehetséges változata.

A Gal-1 és -2 az N és C terminális aminosavakon, míg a Gal-7 és valószínűleg a Gal-3 a C terminálison keresztül kapcsolódnak. A nyilak a diszacharidok kötés helyét, a nyilak iránya a cukrok orientációját mutatják a redukálótól a nem-redukáló végek felé.

különböző CRD-t hordozó galektinek a tandem repeat csoportba tartoznak. A galektinek monomerként, homodimereként vagy magasabb rendű homo-oligomerként épülhetnek fel a koncentrációtól vagy a ligand jelenlététől függően. A bivalens, tandem repeat galektinek főképpen monomerként vannak jelen, de ezek is összekapcsolódhatnak magasabb rendű oligomerekké. A dimer-képződés két módja a 1.2. Ábrán látható (az ábra Leffler H és mtsai-tól származik [24]).

A galektin család tagjainak szöveti és időbeli megjelenése nagymértékben szabályozott

A galektin család tagjai lektin aktivitásuk révén hasonlóan glikozilált, N-acetil laktóزامint tartalmazó fehérjékhez kapcsolódnak, és az egyedfejlődés során és a felnőtt szövetekben többféle biológiai aktivitást fejtenek ki. A nyilvánvaló és jól dokumentált specifikus funkciók csak az egyes galektin tagok szöveti és időbeli expressziójának és celluláris lokalizációjának [25] szigorú szabályozásával valósulhatnak meg. A szabályozás az eltérő szöveti megjelenéssel, a transzkripció szintjének, a szubcelluláris lokalizációnak, illetve a specifikus ligandok expressziójának, illetve glikoziláltsági mintázatának változásával történik. A elsőre jó példa a Gal-1 szintjének változása a differenciálódó izomsejtekben. A mioblasztok nagymennyiségű Gal-1-et termelnek és szekretálnak, majd a miotubulusok kialakulása során a Gal-1 mennyisége lecsökken és celluláris lokalizációja megváltozik [26;27].

Az egyes galektinek szöveti, illetve sejttípus szerinti expresszióját az 1.I. táblázat mutatja.

Galektin	Felnőtt szöveti megjelenés (áttekintés [25])	Embrionális szöveti megjelenés	Megjelenés tumorokban (áttekintés [28;29])
Gal-1	Placenta, petefészek, testis, máj, izomsejtek (mioblasztok), nyirokszervek, tímusz, lép, aktivált makrofágok, T és B-sejtek	Trofoektoderma, utero-placentális komplex[30;31]	A legtöbb transzformált sejtvonalban és tumorban
Gal-2	Emésztő rendszer	NA	
Gal-3	Makrofágok, epiteliális sejtek, fibroblasztok	Utero-placentális komplex [30;32]	Pajzsmirigy-, bélrák végső stádiuma, gyomor-, központi idegrendszeri-, húgyhólyag rákok, nagysejtes limfómák
Gal-4	Emésztő-rendszer		Máj- és gyomorrák
Gal-5	Retikulociták	Blasztociszta[30]	
Gal-6	Emésztő-rendszer	NA	
Gal-7	Keratinociták, epitélium	NA	Emlőrák
Gal-8	Máj, vese, szívizom, tüdő, agy	NA	Hasnyálmirigy-, máj-, bőr-, gégerák
Gal-9 (eaelectin)	Tímusz, vese, adipociták, eozinofilek, monociták, makrofágok, emésztő-rendszer	NA	Hodgkin's limfóma
Gal-9 (urát transzporter csatorna)	Vese, emésztőrendszer, pigmentált melanociták		Hodgkin's limfóma
Gal-10	Eozinofil és bazofil granulociták	NA	
Gal-11	Szemlencse	NA	
Gal-12	Adipociták	NA	
Gal-13	Placenta	Placenta és terhes szérum [33]	
Gal-14	Eozinofil granulociták	NA	

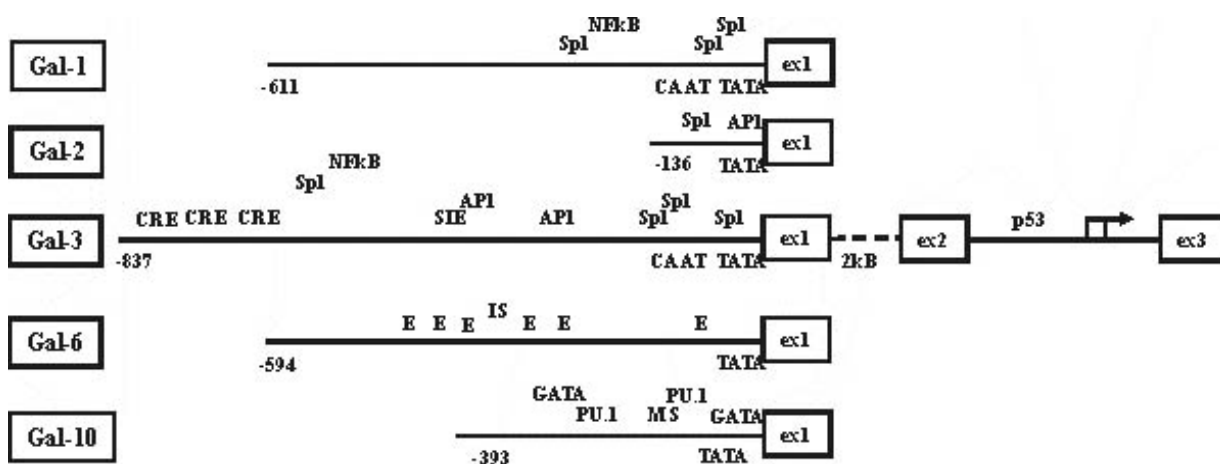
1.I. Táblázat. *A galektin család tagjainak expressziója különböző szövetekben és sejtekben.* NA: nincs adat.

Az 1.II Táblázatból leolvasható, hogy az eddig azonosított galektin tagok különböző kromoszomális lokalizációval és génstruktúrával rendelkeznek.

A fehérjét kódoló gén	Humán lókuszt	Exon szám	Hivatkozás
Gal-1	22q12-13	4	[1;25]
Gal-2	22q12-13	4	[1;25]
Gal-3	14q21-22	6	[1;25]
Gal-4	19q13.2	9	[25]
Gal-5	(17q11)	NA	[1]
Gal-6	(19q13.1-13.3)	8	[1]
Gal-7	19q13.2	4	[25]
Gal-8	1q42-q43	11	[25]
Gal-9	17q11.1	9-11 (izoformától függően)	[25]
Gal-10	19q13.1	4	[1;25]
Gal-11	NA	NA	
Gal-12	11q13	9	[25]
Gal-13	19q13.1	5	[25]
Gal-14	NA	NA	

1.II. Táblázat. *A galektin fehérjéket kódoló gének kromoszomális elhelyezkedése és struktúrája.* A zárójelben jelzett gén lokalizációt az egér kromoszómák homológ régióinak térképezése alapján következtették. NA: nincs adat.

A galektin gének aktivitása korlátozódhat néhány szövetre (például a Gal-4, -6, -7, -10, -13, vagy változhat a fiziológiás vagy patológiás körülmények szerint (Gal-1, -3, -7, -8). Így különösen érdekes annak megismerése, hogyan történik e gének transzkripcionális szabályozása. Ennek ellenére viszonylag kevés adat áll rendelkezésre ebben a tekintetben. A 1.3. Ábra mutatja eddigi ismereteink összefoglalását.

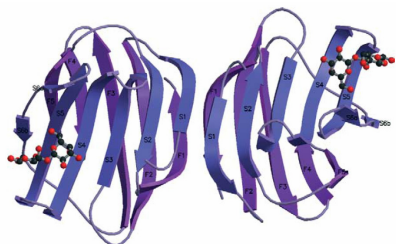


1.3. Ábra. A galektin gének promoter régióinak szerkezete. Jelölések: Sp1, CAAT box, TATA box NFkB kötő hely, cAMP responsive element (CRE), sis- inducible element (SIE), p53 kötő hely (p53), E box (E), exon (ex) [1].

Az ábrából látható, hogy a különböző galektinek transzkripciója eltérő mechanizmussal aktiválódhat. A promoterek szabályozó régióinak jellemzői mellett a galektin gének transzkripció aktivitását kisebb vagy nagyobb mértékben a DNS metiláció mértéke is meghatározza. A Gal-1 esetében ez azt jelenti, hogy a Gal-1 expressziója arányosan változik a DNS teljes metilációjától a nem-metilált állapotig [34].

A galektin-1 szerkezete, struktúra-funkció

A 14 kDa molekulatömegű galektin-1 egyetlen szénhidrát kötő domainből áll, melynek a



1.4. Ábra. A Gal-1 röntgen kristallográfiás képe. [2]

kristálystruktúrából megállapított szerkezete (hasonlóan a többi galektinhoz (1. Ábra)) egy 6-szálú és egy 5-szálú antiparallel β -lemezből felépülő globuláris struktúra (1.4. Ábra) [2;35]. A fehérje szerkezete meghatározza, hogy dimer képződés esetén a két polipeptid asszociációja az N és C terminális molekulárszeken történik, a szénhidrát-kötő zsebek pedig az dimerizációs hely

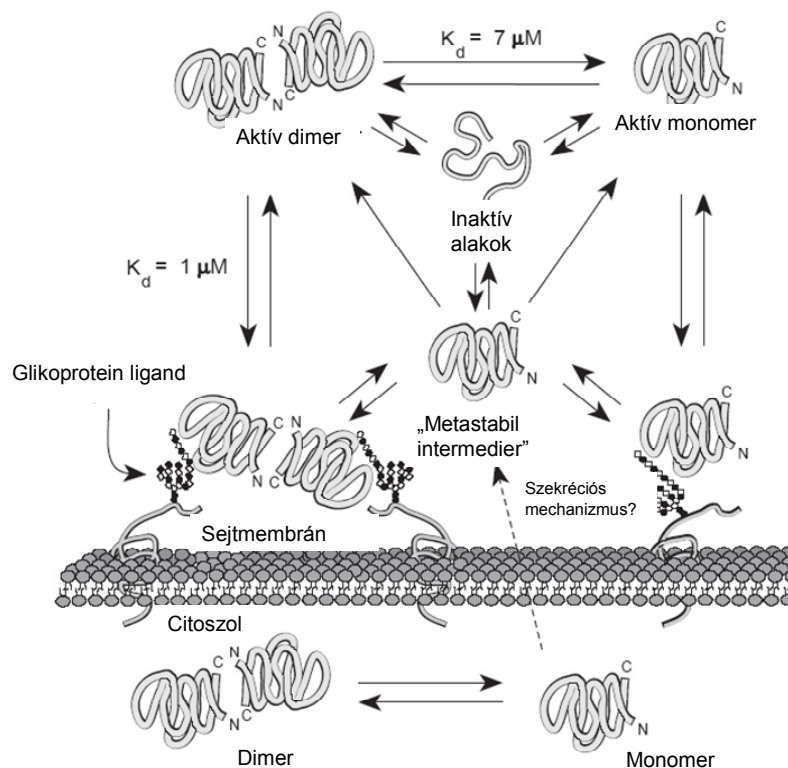
ellenkező oldalán helyezkednek el. Az 1.5. Ábra mutatja a Gal-1 fehérje szekvenciáját, melyben a különböző színek az eltérő funkciókban résztvevő aminosavakat jelzik.

```
MACGLVASNLNLKPGELRVRGEVAPDAKSFVLNLGKDSNNLCLHFNPRFNA
HGDANTIVNSKDGGAWGTREQREAVFPFQPGSVAEVCITFDQANLTVKLPDGY
EFKFPNRLNLEAINYMAADGDFKIKCVAFD
```

1.5. Ábra. A Gal-1 aminosav szekvenciája. Zöld: cisztein aminosavak, piros: cukorkötésben résztvevő, konzervált aminosavak, melyek mutációja a cukorkötő képesség elvesztésével jár, fekete, vastag: konzervált aminosavak, melyeknek mutációja nem befolyásolja a lektin aktivitást [4].

A fehérjében jelenlevő 6 cisztein (C2, C16, C42, C60, C88 és C130) redukált állapota szükséges a natív konformáció fenntartásához, mivel az intramolekuláris diszulfid hidak kialakulása drámaian megváltoztatja a fehérje másodlagos szerkezetét. A strukturális vizsgálatok azt mutatják, hogy a szerkezetből következően a C16 és C88 között intramolekuláris, míg a C terminális végen elhelyezkedő C130 által két monomer közötti intermolekuláris kovalens kötés alakulhat ki. A marha Gal-1-ben a triptikus peptidek vizsgálata során, a C16-C88 mellett, a C2-C130 és C42-C60 között kialakuló diszulfid hidakat is kimutattak [36-38]. Oxidáció következményeként a lektin elveszti cukorkötő képességét. Az emberi Gal-1-ben a C2 kitüntetett szereppel bír, mert helyspecifikus mutációjával a molekula ellenállóvá válik az oxidáció általi inaktivációra [4;35;38]. Azok a Gal-1 mutáns molekulák, melyekben a cisztein aminosavakat egyenként szerinre cserélik, megtartják a vadhoz hasonló mértékű cukorkötő képességüket [4].

A nagymértékben konzervált Trp68 cseréje tirozinra (W68Y) nem jár a cukorkötő képesség megváltozásával. Más konzervált hidrofíli aminosavak mutációja (N46D, E71Q és R73H) azonban a Gal-1 asialofetuinhoz kötődésének teljes gátlásával jár [4].



1.6. Ábra. A Gal-1 bioszintézisére és szekréciónjára javasolt modell (Cho és Cummings 1997 Trends Glycosci Glycotech.9: 47-56).

A fehérje lektin tulajdonsága nem csak az elsődleges és az ebből következő másodlagos és harmadlagos szerkezettől függ, hanem a negyedleges struktúrától is. Ebben a tekintetben azonban ellentmondásosak a kísérleti adatok. Elsőként Cho és Cummings vizsgálta a dimerképződés feltételeit [39] és megállapította, hogy a rekombináns kínai hörcsög Gal-1 koncentrációtól függően monomer vagy dimer állapotban van. A monomer-dimer átalakulás lassú (a $t_{1/2}$ egyensúlyi állapot eléréséhez 10 óra szükséges) és reverzibilis, K_d értéke kb. $7 \mu\text{M}$ és megállapításuk szerint nem függ a ligand (laktóz) jelenlététől (1.6. Ábra). Megjegyzendő, hogy ezekben a kísérletekben a Gal-1 oxidációnak jobban ellenálló mutánsát, a C2S változatot használták, de redukálószer jelentében a vad típusú molekula is hasonló paramétereket mutatott. Ugyanezek a szerzők a dimer forma jelentőségét a lektin tulajdonság kifejeződésében dimer képzésre

alkalmatlan mutánsok segítségével vizsgálták az alábbi 4 konstrukció segítségével (1.6. Ábra)[3].

	N-terminus		C-terminus
	1	10	130 134
Gal-1	M-A-C-G-L-V-A-S-N-L-N-L-K...//...A-D-G-D-F-K-I-K-C-V-A-F-E		
C2S-Gal-1	M-A-S-G-L-V-A-S-N-L-N-L-K...//...A-D-G-D-F-K-I-K-C-V-A-F-E		
V5D-Gal-1	M-A-C-G-L-D-A-S-N-L-N-L-K...//...A-D-G-D-F-K-I-K-C-V-A-F-E		
N-Gal-1	M-A-S-G-Q-D-S-S-N-L-N-L-K...//...A-D-G-D-F-K-I-K-C-V-A-F-E		

1.7. Ábra. A natív és a mutáns Gal-1 N- és C terminális szekvenciái [3].

A V5D- és N-Gal-1 mutáns konstrukciók dominánsan monomer formában voltak jelen. Az equilibrium dialízis kísérletek azt mutatták, hogy a mutánsok mindegyike a natívhoz, illetve a C2S-Gal-1-hez hasonló affinitással (K_d kb. $90\mu\text{M}$) kötődik N-acetil-laktózinhoz. A vörösvértestek keresztkötésén alapuló hemagglutinációs tesztben az N terminális mutánsok a C2S-hez ($0.8\mu\text{M}$) viszonyítva jóval magasabb, a dimerizációt már támogató koncentrációban (V5D: $4\mu\text{M}$, N-Gal-1: $200\mu\text{M}$) okoztak hemagglutinációt. Következésképpen a hemagglutináló képességhez, de nem a cukorkötő képességhez, szükséges a lektin dimerizációja.

A fentiekkel ellentmondásban Giudicelli és mtsai méret kizárásos kromatográfiás kísérletben azt az eredményt kapták, hogy a monomer/dimer egyensúly nem pusztán a Gal-1 koncentráció függvénye, mivel $2-50\mu\text{M}$ közötti tartományban a Gal-1 dimer formában van jelen [40]. Ezzel az eredménnyel van összhangban egy mostanában megjelent közlemény [41], melyben a patkány Gal-1-et vizsgálva megállapították, hogy a $0.7\mu\text{M}$ koncentrációjú Gal-1 stabil dimer állapotban van.

Saját, nem közölt eredményeink szerint a dimer, illetve oligomer forma kialakulása *in vitro* körülmények között leginkább a tisztítás körülményeitől függ. Feltételezhetően a laktóz-affinitás kromatográfiás oszlopról laktózzal tömény ($>50\mu\text{M}$) oldatba eluált Gal-1 dimer/oligomer formában van jelen és hígítással nem alakítható monomerré. A hígabb ($>20\mu\text{M}$) koncentrációjú Gal-1 monomer/dimer állapotban van (Fajka-Boja Roberta és

mtsai, nem közölt adat). Megjegyzendő, hogy a tisztított humán Gal-1 koncentrációtól függetlenül kötődik sejtfelszíni glikokonjugátumokhoz, más biológiai aktivitásukban (pl. T sejt apoptózis indukciója) azonban koncentrációfüggő különbséget mutatnak.

Végül hangsúlyozni kell, hogy a Gal-1 monomer/dimer *in vivo* egyensúlyára vonatkozó kísérleti adatok nem állnak rendelkezésre. Nem világos, hogy a fehérje intracelluláris alakja milyen, sem az, hogy a szekréció során monomer vagy dimer formában kerül-e ki az extracelluláris térbe.

A Gal-1 intracelluláris lokalizációja és funkciója

A Gal-1, hasonlóan a többi galektinhez [42;43], tipikus intracelluláris fehérje jellemzőit mutatja: szignál peptid nélkül, szabad riboszómákon szintetizálódik [44] és a szövetből izolált polipeptid N terminálisa acetylált [45]. Ennek megfelelően számos sejtben a Gal-1 citoplazmatikus, illetve magi lokalizációját mutatták ki. A citoplazmás lokalizációra néhány példa: mioblasztok [46;47], kínai hörcsög ovárium sejtek [48], embrionális pajzsmirigy folliculáris sejtek [49], intrahepatikus kolangiokarcinóma sejtek [50], vagy az eritroid K562 sejtek [51] (G Ion és mtsai. nem közölt adat).

Mioblasztok differenciálódása során a Gal-1 intracelluláris lokalizációja az érés folyamatával változik: a mioblasztok miotubulussá történő fúzióját a Gal-1 intenzív szekréciója kíséri [46]. A K652 eritroid sejt vonalban intracellulárisan jelenlevő Gal-1 differenciálódást indukáló eritropoietin [51] vagy forbolészter (G Ion és mtsai nem közölt adat) kezelés hatására externalizálódik.

A Gal-1-nek a citoplazmában egy prominens funkcióját mutatták ki. H-Ras(12V)-vel transzformált Rat-1 sejtekben a Gal-1 a plazma membránhoz rögzíti a H-Ras-t, ezáltal a sejtek malignus transzformációját segíti elő [52]. A Gal-1-H-Ras direkt kölcsönhatását koprecipitációs kísérletekben igazolták. A két molekula asszociációja független a Gal-1 lektin tulajdonságától (laktózzal nem gátolható), de specifikus a H-Ras-ra. Gal-1 overexpressziója a membrán-asszociált H-Ras megnövekedett mennyiségével jár, míg a

Gal-1 expressziójának gátlása anti-sense RNS bevitelével a H-Ras membránhoz való kapcsolódását csökkenti. Az aktív H-Ras Gal-1 által történő membránhoz kapcsolása és stabil kötődése jelátviteli következményekkel jár. A membránon stabilizált H-Ras aktiválja az ERK MAP kinázt és gátolja az EGF indukált PI3kináz aktiválódását [53].

Bizonyos sejtekben a Gal-1 a sejtmagban is megtalálható [54-58]. Lehetséges magi funkciójára csak közvetett adatok vannak. HeLa sejtekből izolált nukleáris extraktum alkalmazásával sejtmentes rendszerben kimutatták, hogy a Gal-1 (és Gal-3) szükséges faktor a pre-mRNS hasításához (splicing) [58]. Ezzel összhangban a Gal-1 és az SMP (Survival of Motor Neuron protein) komplexben résztvevő Gemin4 fehérje között direkt kölcsönhatást mutattak ki. Az SMN a kis nukleáris RiboNukleoProteinek (snRNP) biogenezisében játszik szerepet, így biztosítja az snRNP-éket a splicozoma komplex felépüléséhez [59].

Bár a Gal-1 a Ras membrán kötődésében és az RNS érésben játszott szabályozó szerepe fontos biológiai aktivitásokat feltételez, mégis a Gal-1 génkiütött egerek alapvető fenotípusa nem változik, életképesek és fertilesek [60]. Ez azt mutatja, hogy a Gal-1-nek tulajdonított intracelluláris funkciókban a Gal-1 részvétele nem feltétlenül szükséges.

A Gal-1 extracelluláris funkciója

A Gal-1 intracelluláris fehérjékre jellemző tulajdonságai ellenére az extracelluláris térbe szekretálódik. A szekréció egy nem-konvencionális és részleteiben nem ismert módon történik. A klasszikus szekréciós folyamat során a fehérje N-terminális végén jelenlevő szignál peptid a fehérjét az endoplazmatikus retikulumba (ER), majd innen a Golgi apparátusba irányítja. A Golgi-ból származó szekretórikus vezikulum plazmamembránnal történő fúziója után a fehérje az extracelluláris térbe jut. A fehérje export ilyen módját klasszikus vagy ER/Golgi függő útnak nevezik [61]. A szignál peptid nélkül szintetizálódó polipeptidek egy része- pl. a fibroblaszt növekedési faktor (FGF)-1 és -2, az IL-1 β vagy a galektin család tagjai, úgynevezett nem-

klasszikus, ER/Golgi-független módon szekretálódnak. A nem-konvencionális szekréciónak több, mechanikusan különböző módja létezik [61;62]. A Gal-1 szekréciónak illetően egyelőre több a kérdés, mint a válasz. Hughes és mtsai szerint a galektin család tagjai membrán hólyagosodás folyamatával transzlokálódnak az extracelluláris térbe [62;63]. Egy mostanában megjelent munka azt bizonyítja, hogy a Gal-1 transzport egyirányú, hőmérsékletfüggő, de ATP energia felhasználásától független folyamat, mely az FGF-2-höz hasonlóan integrális membrán komponensek és perifériális membrán fehérjék közreműködését igényli [64], de nincs szükség a fehérje kitekeredésére [65]. Seelenmeyer és mtsai [66] bizonyították, hogy a Gal-1 cukorkötő képessége és a sejtfelszíni, Gal-1 kötő struktúrák megfelelő glikoziláltsága szükséges a Gal-1 membránon keresztüli transzportjához. Kísérleteikben a „cukor-nemkötő” mutáns galektinek exportja gátolt és a CHO (kínai hörcsög ovárium sejtek) 13-as mutáns klónja, mely az UDP-galaktóz transzport hibája miatt nem képes Gal-1 ligandot előállítani, szintén nem szekretálja a citoplazmában jelenlevő Gal-1-et. Feltételezésük szerint a citoplazmatikus Gal-1-re a sejtfelszíni glikokonjugátumok húzóerőt gyakorolnak azáltal, hogy megkötve az extracelluláris Gal-1-et, eltolják az egyensúlyt a membrán két oldalán a szekréciónak felé. Ez azonban nem lehet a teljes magyarázat, hiszen számos olyan sejtvonalat ismerünk, mely Gal-1-et termel és sejtfelszíni Gal-1-kötő struktúrákat hordoz, mégsem szekretálódik az intracelluláris lektin. Az extracelluláris térbe jutó Gal-1 számos biológiai folyamat szabályozója vagy modulátora. Részt vesz a sejtek közötti, valamint a sejtek és az extracelluláris mátrix (ECM) közötti adhéziónak folyamatokban, szabályozza a limfoid sejtek életképességét, bizonyos sejtek osztódási ciklusát és a target sejtek által felszabadított hormonok, citokinek minőségét. Általánosságban azt mondhatjuk, hogy az extracelluláris Gal-1 részt vesz a differenciálódás, az embrió- és tumorigenezis és az immunválasz regulációjában.

Adhéziós folyamatok szabályozása, Gal-1 kötő molekulák

A sejtek kapcsolódása a bazális membránhoz illetve a kötőszövet elemeihez (extracellular matrix, ECM) (adhéziós lépés) és átjutása ezeken a szöveti rétegeken (migrációs lépés) többféle folyamat ko-ordinációját igényli, olyan szereplőkkel, mint a sejtfelszíni adhéziós molekulák, kemokinek és gyulladáscsökkentő citokinek. A sejtek közötti kommunikáció is részben közvetlen sejt-sejt kölcsönhatással valósul meg a sejtfelszínen megjelenő adhéziós molekulák közvetítésével. A sejtek kapcsolódása az adhéziós molekulákon, vagy más receptorokon keresztül (melyek az adhéziós folyamat során fizikai közelségben kerülnek) jelátviteli folyamatokat indít el.

A Gal-1 (más szekretált galektinekhez hasonlóan) lektin tulajdonsága, illetve dimerizációja miatt kiváló mediátora az adhéziós folyamatoknak.

A szekretált Gal-1 rögtön kapcsolódik a kiválasztó, vagy szomszédos sejtek felszínéhez, vagy az ECM fehérjéhez, s ezáltal szabályozza a sejt-sejt és sejt-ECM kölcsönhatást. A kapcsolódás a sejtekhez a Gal-1 kötő fehérjék mintázatától függ. A Gal-1 így szerepet játszik az adhéziós folyamatokban, melyek befolyásolják a tumor sejtek invázióját és metasztázisát más szövetekbe, a gyulladást, illetve a szövet differenciálódás folyamatát. Az adhéziót pozitív és negatív irányban is befolyásolhatja az ECM fehérjék, laminin [67] és fibronectin [68], poli-N acetil-laktózin láncaihoz való kapcsolódásával. A sima és vázizom embrionális differenciálódása, illetve az izom regenerációja során a mioblasztok nagy mennyiségű Gal-1-et tárolnak a citoplazmában. Miotubulusokká történő alakulásuk során a Gal-1-et az extracelluláris térbe szekretálják, ahol a lektin lefedi mind az izomdifferenciálódásban legfontosabb szerepet játszó ECM fehérjét, a laminint [27;46;69;70], mind annak receptorát, az $\alpha 7\beta 1$ integrint [70;71]. Ezáltal gátolja az izomsejtek ECM-hez történő kapcsolódását és elősegíti a miotubulusokká való fúziót. Ebben az esetben tehát a Gal-1 anti-adhéziós szerepet tölt be. A szaglőideg sejtek axon növekedésében ellentétes, pro-adhéziós a szerepe: az integrin és laminin keresztkötésével erősíti az idegsejtek és ECM kölcsönhatását és ezáltal az axon növekedést segíti [72-74].

A Gal-1 expresszió lokális csökkenése vagy növekedése fontos szerepet játszhat a tumor sejtek megtapadásában, vagy leválásában a tumorfejlődés folyamata során [67]. Számos tumorban a Gal-1 részt vesz a tumorsejtek és környezetük kölcsönhatásában, az adhéziós folyamatok szabályozásával. Néhány példa: a Gal-1 részt vesz a melanoma sejtek és az ECM laminin kölcsönhatásában [68], az ovárium karcinóma sejteknek a lamininhez és fibronectinhez történő tapadásában [75], tumor sejtek és az endotélium kapcsolódásban [76].

A Gal-1 kötő glikokonjugátumok, mint ahogy azt a fentiekből is láttuk, szabályozhatják az adhéziós folyamatokat, de jelátviteli szerepet is betölthetnek. A glikolipid, gangliozid GM1 az egyik ilyen Gal-1 kötő struktúra [77]. A Gal-1-GM1 kapcsolódás neuroblasztoma sejtek proliferáció-gátlását okozza [78;79]. A Gal-1 kapcsolódik a lizoszóma asszociált protein (LAMP)-1,2-hez és a karcino-embriónális antigénhez (CEA) és ezáltal valószínűleg részt vesz a vastagbélrák sejtek adhéziós tulajdonságainak módosításában [80].

A legrészletesebben a Gal-1 kötő limfocita sejt felszíni fehérjéket vizsgálták. A CD45 receptor tirozin foszfatáz [14;41;81;82], a CD43 leukoszialin [81;83;84], a CD2 [85], a CD3 [85], a CD4 [86] és a CD7 [87-89] nagyszámú O és N-kötött polilaktózin cukor láncot hordoz, s ennek megfelelően kötődik a Gal-1-hez. Mindezeknek a T sejt receptoroknak a szerepét feltételezik a Gal-1 indukált apoptózisban, a bizonyítékok azonban ellentmondásosak (l. később).

Galektin-1 rákban

A melanoma nem az egyetlen rákos sejt, melyben a Gal-1 magasabb expressziója a betegség rossz prognózisát mutatja. A legkülönbözőbb tumorokban mutatták ki a Gal-1 megnövekedett expresszióját és a lektin nagy mennyisége korrelált a metasztatikus hajlammal és a kedvezőtlen kilátásokkal (1.III. Táblázat). A Gal-1 szerepét nemcsak az

adhéziós folyamatok szabályozásával magyarázzák, hanem a rákos sejtekkel szemben kialakult tumor specifikus immunválasz gátlásával (lévén a Gal-1 egy erős immunszuppresszáns) és így a tumor immunprivilegiumának kialakításával (l. alább). Sok esetben nem is maguk a rákos sejtek, hanem a környező sztróma sejtek termelik a Gal-1-et [28;90-94].

Tumor típus	hivatkozás
Tüdőrák	[95]
Vastagbélrák	[96-98]
Fej-nyak laphámsejt karcinóma (az egyetlen ráktípus, ahol csökken a Gal-1 expresszió)	[99;100]
Petefészek rák	[75;101]
Húgyhólyag rák	[102]
Glioma	[103-105]
Pajzsmirigy rák	[103-108]
Hasnyálmirigy rák	[109]
Prosztata rák	[90;91;93]

1.III. Táblázat. *Gal-1 expressziója rákban.*

Galektin-1 szerepe az immunrendszerben

Galektin-1 expressziója és funkciója az immunrendszer sejtjeiben

Szarvasmarhában a Gal-1 génexpresszió sorozat-analízise azt mutatta, hogy a gén a γ/δ T sejtekben fejeződik ki és a CD8⁻ T-sejtekben nagyobb a génexpresszió, mint a CD8⁺ altípusban [110]. Egérben az LCMV-vel indukált CD8⁺ effektor T sejtekben, Con-A-val vagy peptid antigénnel stimulált CD4⁺ és CD8⁺ T sejtekben [111], allogén válasz során az aktivált T sejtekben [112] nő meg a Gal-1 mennyisége. Normál egér B

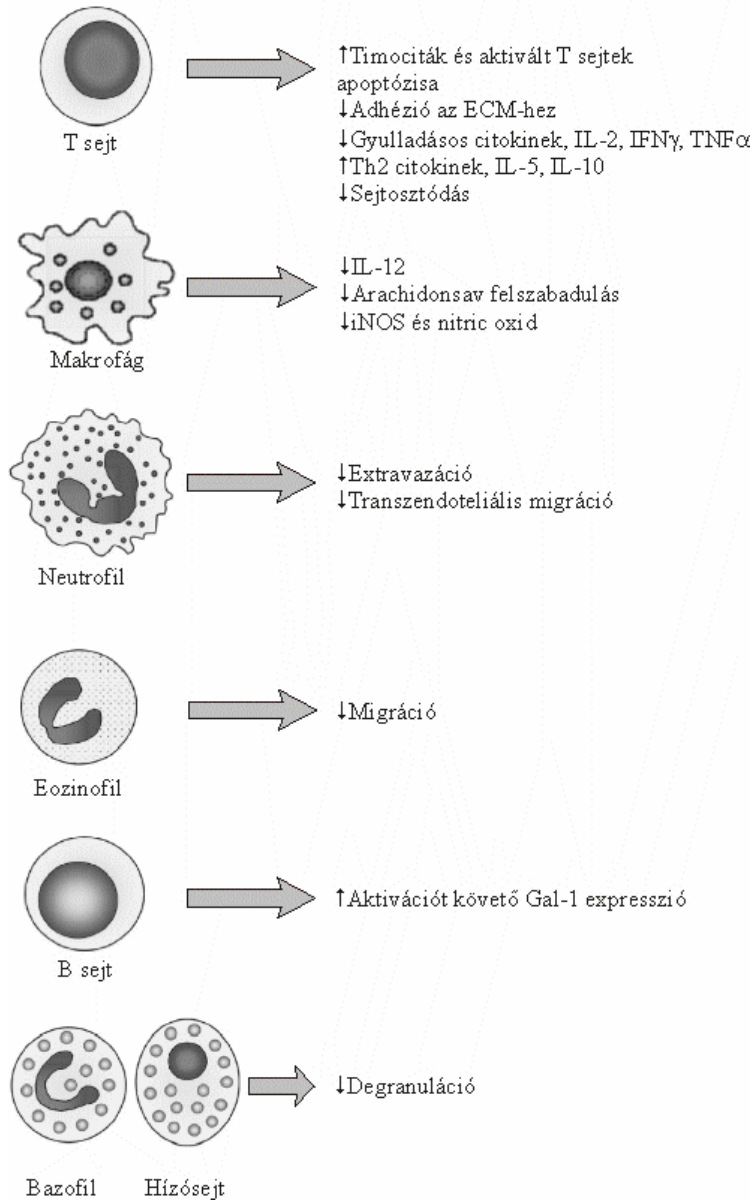
sejtekben kis mennyiségű, míg *Trypanosoma Cruzi*-val fertőzött egér B sejteiben, LPS-sel, a B sejt antigén receptoron vagy CD40-en keresztül stimulált B sejtekben megnövekedett Gal-1 mennyiség található [113]. A *Trypanosoma Cruzi*-val fertőzött egér makrofágok és parazita jelenlétében a J774 makrofág sejtvonal szintén Gal-1-t expresszál [113].

Apoptózis	Gyulladás	Makrofág funkció	Citokin termelés	Hatás immunológiai betegségekben (állatmodellek)
↑Éretlen timociták, aktivált perifériás T és B sejtek, tumoros limfociták (sejtvonalak), fertőzött makrofágok	↓PLA2 indukált ödéma, neutrofil extravazáció, hízósejt degranuláció	↓Arachidon-sav felszabadulás, iNOS és NO és PGE ₂ termelés	↓TNF α , IL-2 és IFN γ termelés az aktivált Th1 sejtek által ↓IL12 felszabadulás a fertőzött M Φ -okból, IL-6 a dendritikus sejtekből ↑IL-5 és -10 termelés az aktivált Th2 sejtek által	↓EAE, EAMG, Con-A indukált hepatitis, rheumatoid arthritis, GVHD

1.IV. Táblázat. *Galektin-1 szerepe az immunválasz szabályozásában.* Piros, lefelé mutató nyíl: a válasz csökkenése; zöld felfelé mutató nyíl: a válasz erősítése. Rövidítések: PLA2; phospholipase A2, iNOS; inducible NO synthase, NO; nitrogén monoxid, PGE₂; prostaglandinE2, TNF; tumor necrosis factor, IL; interleukine, EAE; experimental autoimmune encephalomyelitis, EAMG; experimental autoimmune myasthenia gavis, GVHD; Graft versus Host disease.

A Gal-1 kifejeződése az immunválasz, illetve a gyulladás helyén hatással van az immunsejtekre, mint, ahogy azt az 1.IV. Táblázat mutatja. Az apoptotikus folyamatokkal külön fejezetben foglalkozom. A Gal-1 gátolja a foszfolipáz A2 (PLA2)-indukált ödémát és akut gyulladást, ha az enzim előtt, vagy azzal együtt oltják egerekbe

[114]. Más kísérletek szerint a Gal-1 gátolja a neutrofil granulociták kemotaxisát és az ereken keresztül történő átjutást [115]. A Gal-1 szerepet játszhat az allergiás folyama-



1.8. Ábra. GAL-1 hatása a fehérvérsejt funkcióra.

tokban is. Gátolja az eozinofil granulociták migrációját *in vitro* [116] és a hízó sejtek degranulációját akut gyulladásban [114]. A Gal-1 csökkenti a makrofágok gyulladásos reakcióit is, így az arachidonsav [114] és prostaglandin E2 felszabadulást [114], az

indukálható nitrogén monoxidáz (iNOS) aktivitását [117] és ezáltal a nitrogén monoxid (NO) termelést [113;117]. A citokin mintázat az immunválasz során alapvető szabályozó faktor. Az előzőek alapján nem meglepő, hogy a Gal-1 hatással van erre a mintázatra, úgy, hogy a gyulladáshoz vezető citokinek felszabadulását gátolja. Vírus fertőzés során a Gal-1 a dendritikus sejtek IL-6 termelését fokozza [118]. A Th1 sejtek által termelt TNF α [119;120], IFN γ [119-122], IL-2 [121;123;124] felszabadulás csökkenése mellett a Th2 citokinek, az IL-5 [119] és IL-10 [122] szintje növekedik, ezáltal az immunválasz a Th1-től a Th2 felé tolódik el.

T és B sejt differenciáció szabályozása

A B sejtek differenciálódása során a pre-B sejtek pre-B sejt receptora (pre-BCR) kölcsönhatásba kerül a csontvelői sztróma sejtekkel. Gauthier és mtsai a kölcsönhatást létrehozó fehérjéket vizsgálva azt találta, hogy a sztróma sejtek által termelt Gal-1 fehérje-fehérje kölcsönhatással kapcsolódik a pre-BCR-hez, annak is a „helyettesítő könnyű lánc” alegységéhez, és a Gal-1 szabad CDR-jével a sztróma sejtek specifikus glikoproteinjeihez kötődik. A pre-BCR/galektin-1/ sztróma-glikoprotein komplex a pre-B sejtek és a sztróma sejtek között létrejövő kontaktzónában helyezkedik el és kialakulását intracelluláris tirozin kinázok aktiválódása és a pre-BCR-től érkező jelátviteli folyamatok kísérik [125]. A csontvelői sztróma sejtek Gal-1 pozitivitását mások is igazolták [126]. Saját kísérleteink igazolták, hogy a Gal-1 hatással van a korai és elkötelezett csontvelői sejtek differenciálódására és életképességére [127].

A Gal-1 részt vesz a T sejt differenciálódás és érés folyamatában. A tímusz kortikális epitél sejtek Gal-1-et expresszálnak, mely az éretlen T sejtek apoptózisát okozza. Ez arra utal, hogy a lektin szerepet játszik a T sejtek pozitív és/vagy negatív szelekciójában. Ezt támasztja alá az is, hogy a CD3^{alacsony}/CD4^{alacsony}/CD8^{alacsony}/CD69⁻ és a CD3^{közepes}/CD4^{alacsony}/CD8^{alacsony}/CD69⁻ éretlen timociták a legérzékenyebbek Gal-1 kezelésre [86;128].

Sejtosztódás szabályozása

A Gal-1 sejtnövekedés szabályozó funkciója a célsejt típusától függ. A T limfociták esetében a növekedés gátló funkciót egyértelműen sikerült bizonyítani. A humán Gal-1 gátolja a PHA aktivált T sejtek IL-2 indukált és az IL-2 függő T limfóma sejtek [129], valamint a naiv és antigén-érzékenyített CD8⁺ T sejtek antigénnel stimulált osztódását [111]. Ezekben a kísérletekben a sejt kultúrákhoz kívülről hozzáadott rekombináns Gal-1-et alkalmaztak, így a fehérje fiziológias hatás-mechanizmusának megértéséhez további vizsgálatok szükségesek. Valójában a növekedésszabályozás molekuláris folyamata még a modell, *in vitro* rendszerben sem tisztázott.

Az apoptózis szabályozása

Nagyszámú kísérleti adat bizonyítja, hogy a Gal-1 az aktivált T sejtek és T leukémia sejtvonalak apoptózist okozza [14;84;86;124;130]. Allogén sejtekkel aktivált T limfociták, HIV-1-gyel fertőzött T sejt vonalak és AIDS betegekből izolált CD4⁺ és CD8⁺ perifériás T sejtek szintén nagyobb érzékenységet mutatnak a Gal-1 citotoxikus hatásával szemben [83;112]. A fenti eredményeket nagy mennyiségű (10-20 μ M) Gal-1 hozzáadásakor kapták. A magas koncentrációjú lektin a sejt felszíni glikoproteineken keresztül fejt ki hatását, ennek megfelelően minimális ligandjával, laktózzal gátolható az apoptózis. Ez a fehérje koncentráció azonban még lokálisan is nehezen képzelhető el, így az ilyen típusú kísérletek nagy dilemmája, hogy műtermék vagy tényleges fiziológias hatásokat mérünk-e. Bonyolítja ennek megítélését, hogy a szövettanban alkalmazott Gal-1 lektinfüggő működéséhez redukáló szer hozzáadását igényli, és ez eltér a tényleges *in vivo* szituációtól, ahol az extracelluláris környezet alapvetően oxidáló. Saját eredményeink azt mutatják, hogy a jóval alacsonyabb koncentrációjú, <2 μ M, Gal-1 laktózzal nem gátolható apoptózist okoz (l. kísérleti rész és nem közölt adat), amely arra utal, hogy a Gal-1 fehérje-fehérje, vagy legalábbis nem cukor-lektin kölcsönhatás révén, nem azonosított receptoron keresztül is apoptózist okozhat. Fontosnak tartom He és Baum eredményét, akik kimutatták, hogy Matrigélen kikötött Gal-1 az oldatban levő Gal-1-nél jóval alacsonyabb koncentrációban

(500 μ g/ml=36 μ M versus 45 μ g/ml=3.2 μ M) hatékony apoptózist okoz [131]. A Matrigel egy egér szarkómából izolált basement membrán preparátum, melynek fő komponensei az extracelluláris mátrix fehérjék, a laminin, kollagén IV, heparán szulfát proteoglikánok és entactin. Szobahőmérsékleten a mátrix polimerizálódik és egy biológiailag aktív, a basement membránt mintázó mátrix anyagot hoz létre. Tímusz epitélium sejtek, vagy CHO sejt vonal sejtjei Gal-1-gyet termelnek és szekretálnak. A T sejtek apoptózisa akkor következik be, ha ezekkel a sejtekkel közvetlen sejt-sejt kölcsönhatásba kerülnek. Ha ez kapcsolódás gátolt, például a sejteket membránnal elkülönítjük, a szekretált Gal-1 nem okoz apoptózist, valószínűleg az oldatban való alacsony koncentrációja miatt [131]. Az eddigi irodalmi adatok a Gal-1 apoptotikus hatását lektin tulajdonságának tulajdonították, amely a target sejt felszínén expresszált N-és O-glikánoktól függ. A HIV-fertőzött sejtek glikoziláltsága megváltozik, és ezek a sejtek érzékenyebbé válnak a Gal-1 citotoxikus hatásával szemben [83]. A T sejteken azokat a β -galaktozidot tartalmazó glikozilált receptorokat vizsgálták, melyek Gal-1 kötő képességgel rendelkeznek. A részletesebb vizsgálatok alapján a nagymértékben glikozilált, legtöbb N-glikánt hordozó molekulák, a CD45 receptor tirozin foszfatáz, a CD43 és a CD7 maradtak versenyben. A Gal-1 kötődése a sejtekhez a fenti molekulák lipid mikrodomáinkba, raftokba való rendeződését okozza, egy részük az apoptotikus hólyagokba kerül, míg mások kizáródnak a hólyagokból [81]. Gal-1 receptorként legkorábban a CD45-öt nevezték meg, mivel a Gal-1 kötődik a CD45-höz [14;15;82] és csökkenti annak foszfatáz aktivitását [15;82] igazolva, hogy a lektin-CD45 kapcsolódás jelátvitelt indít el. Arra azonban nincs döntő bizonyíték, hogy az apoptózis szignált a CD45 közvetítene a sejtekbe. Perillo és mtsai a Gal-1 indukálta sejthalált CD45 ellenanyaggal gátolták [84], ez azonban nem kielégítő bizonyíték, mert a Gal-1 számos monoklonális ellenanyagot köt glikozilált Fc részükön. Így az ellenanyag által kifejtett gátlás lehet egyszerűen egy kompetíció következménye. Walzel és mtsai úgy találták, hogy a CD45 deficiens Jurkat sejtek csökkent választ adnak Gal-1 kezelésre [82], mi azonban egyértelműen kimutattuk, hogy a CD45 hiánya nem befolyásolja sem az apoptózis végső sem a korai lépéseit [14]. Az ellentmondás oka valószínűleg az

alkalmazott Gal-1 koncentráció nagy eltérésében keresendő (l. bővebben az Eredmények és Megbeszélés fejezetekben). Később a CD45 szerepének analizisekor úgy találták, hogy nem a CD45 pusztán jelenléte, hanem annak a core 2 -1,6-N-acetilglukozaminotranszferáz által kialakított glikozilációs mintázata határozza meg annak funkcióját [132].

A Gal-1 indukált apoptózis intracelluláris eseményeinek részletes vizsgálata során a következő komponenseket azonosították: az extracelluláris szignál-regulált kináz-2 (ERK-2) aktivációját [124] és az AP-1 transzkripciós faktor indukcióját [133], ami a Bcl-2 anti-apoptotikus fehérje mennyiségének csökkenésével [133;134] és így a pro-apoptotikus Bax fehérje dominanciájával jár [134]. A kaszpázok, kaszpáz 8, 9 és 3 funkciója szintén igazolt [135-137]. A Gal-1 apoptotikus hatását Allione és mtsai azzal magyarázták, hogy a Gal-1 az interferon- γ receptor (IFN- γ R) α és β láncának expresszióját stimulálja és ezzel érzékenyíti a sejteket az IFN- γ indukált apoptózisra [129].

A mitokondrium szerepét szintén kimutatták, mert a Gal-1 a mitokondriális membránpotenciál csökkenését és, ennek megfelelően, a kaszpáz kaszkád aktiválódását okozza [136]. Egy mostanában megjelent cikk szerint a Gal-1 stimuláció az apoptózis nem-klasszikus, kaszpáz független mitokondriális útvonalán zajlik, melynek mediátora az DNS degradáló enzim, a mitokondriumból felszabaduló endonukleáz G. Ezt a folyamatot, a mérések szerint, nem kíséri a mitokondriális citokróm C felszabadulása, vagy a kaszpázok aktiválódása [138]. Ez az eredmény ellentmondásban van az eddig megjelent összes közleménnyel, melynek oka lehet a kísérletekben alkalmazott nagyon magas Gal-1 koncentráció (20 μ M).

Gal-1 in vivo gyulladáscsökkentő hatása

A Gal-1 gyulladáscsökkentő hatását egyértelműen bizonyítják azok a közlemények, melyekben a gyulladáscsökkentő citokinek Gal-1 hatásra bekövetkező csökkenését, a természetes immunválasz sejtjeinek migrációs gátlását és az aktivált T sejtek apoptózisát mutatták ki. Ezek alapján a Gal-1 egy erős, hatásos

gyulladáscsökkentő endogén fehérje. Az igazi bizonyíték azonban, ha ugyanezek a funkciók *in vivo* is kimutathatók. Valóban, a kísérletileg előidézett autoimmun és gyulladásos állatmodellek igazolták a fehérje ilyen szerepét.

Tisztított acetilkolin receptor adásával nyulakban előidézett kísérleti autoimmun *myasthenia gravis* klinikai tüneteit a Gal-1 előzetes, vagy egyidejű adása megszünteti [139]. Ebben a korai munkában nem vizsgálták Gal-1 adminisztráció immunológiai, csak a szövettani és klinikai következményeit. Lewis patkányokban előidézett kísérleti *autoimmun encephalitis* klinikai és hisztopatológiai tüneteinek kialakulását a Gal-1 alkalmazása meggátolta. A hatás immunológiai hátterét itt sem vizsgálták, de ezek a szerzők már feltételezték, hogy a Gal-1 az autoimmun T sejtek funkciójának modulálásával fejt ki hatását [140]. Kollagénnel egerekben indukált *rheumatoid arthritis*ben a szolubilis, vagy szingén fibroblasztokban kifejeztetett Gal-1 (génterápia) nemcsak a betegség klinikai és hisztológiai megjelenését gátolta. A szerzők igazolták azt is, hogy a Gal-1 hatása az immunválasz módosításával, megnövekedett IL-5 (Th2 válasz) és csökkent IFN γ (Th1 válasz) termeléssel és az aktivált T sejtek fokozott apoptózisával magyarázható [141;142]. A concanavalin A-val indukált *hepatitis* súlyos májsérüléssel, a májsejtek apoptózisával, leukocita infiltrációval és a szérum transzamináz szintjének növekedésével jár [143]. Santucci és mtsai szerint [120] Gal-1-gyel kivédhető a ConA által kiváltott a májsérülés, részben az aktivált T sejtek eliminációjával, részben a gyulladásos citokinek (TNF α és IFN γ) T sejtekből és makrofágokból történő felszabadulásának gátlásával. A *Crohn betegség*, és a colitis, vagyis a krónikus bélgyulladások fő oka nem ismert, de az bizonyított, hogy a bél immunrendszer fokozottan reagál endogén antigénekre, és a Th1 citokinek túlsúlyával jellemezhető [144]. Állatmodellben kiváltható a kórkép a béltraktusba adott 2,4,6-trinitrobenzén szulfonsavval. A Gal-1 profilaktikus vagy terápiás adása meglepő javulást eredményez mind klinikai, mind a hisztopatológiai tünetekben és csökkenti a haptén aktivált T sejtek számát a lépben és a nyálkahártyában, valamint a gyulladásos citokinek (TNF α , IL1 β , IL-12, IFN γ) termelődését [145]. Baum és mtsai a Gal-1 hatását vizsgálták egerekben előidézett *Graft versus Host betegség*ben (GVHD), mely a

csontvelő átültetés fő szövődménye [121]. A Gal-1-gyel kezelt GVHD-s egerek 68%-a túlélte a 3% Gal-1-gyel nem-kezelt állattal szemben. A Th1 citokinek (IL-2, IFN γ) mennyisége jelentősen csökkent, míg a Th2 citokinek mennyisége alapvetően nem változott.

Az immunszuppresszív hatás előnyös az autoimmun és gyulladásos betegségekben, de hátrányt jelent tumorok esetében, ahol a tumor specifikus immunválasz gátlása a tumor immunprivilegiumához vezet. Rubinstein és mtsai [146] melanoma sejtekben gátolták a Gal-1 expressziót és ez a tumor kilökődéséhez és a sikeres tumor ellenes immunválasz kialakulásához vezetett.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtek fenntartása

A szövettényésztő munkát CO₂ termosztátban (7% CO₂) 37°C-on végeztük. Jurkat, I 9.2 (kaspáz 8 hiányos Jurkat,) és MOLT-4 leukémiás T sejteket 5% FCS-t tartalmazó RPMI tápfolyadékban (GIBCO BRL) tartottuk. 10% FCS-s tartalmazó RPMI-ben tartottuk a következő sejteket: Epstein-Barr vírus (EBV) negatív B sejtek, Bl21 (Prof. G. Lenoirtól kaptuk, CIRC, Lyon, Franciaország) és DG75, EBV+ BL36 B cells (G. Lenoirtól kaptuk), J45.01 (CD45- Jurkat), JCaM 1.6 (LCK hiányos Jurkat) JCaM/LCK (JCaM1.6 visszatranszfektálva LCK-val), P116 (ZAP70 hiányos Jurkat), P116WT (P116 visszatranszfektálva ZAP70-nel). P116 és P116WT sejtek Dr. RT Abraham szíves ajándéka (Mayo Clinic, Rochester, USA), JCaM/LCK-t Dr. A. Weisstől kaptuk (Howard Hughes Medical Institute, San Francisco, USA), az I 9.2 sejt vonal Dr. V. Chitu, Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, New York, kedves ajándéka.

Aktivált perifériás T limfociták: A perifériás mononukleáris sejteket (PBM) egészséges donortól származó vérből izoláltuk Ficoll (Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences) gradiensen történő centrifugálással (30 perc, 400g, 18°C). A sejteket 5 µg/ml fitohemagglutininnel (PHA) stimuláltuk 10⁶ sejt/ml kiindulási sejt koncentrációban 10% FCS-t tartalmazó RPMI tápfolyadékban 72 órán keresztül. Mosást követően a limfocitákat továbbtenyésztettük 4x10⁵ sejt/ml tápfolyadék koncentrációban 20 ng/ml IL-2 jelenlétében (Chiron Corporation). A sejteket 1-2 hétig IL-2 jelenlétében növesztettük, majd 48 órára megvontuk a növekedési faktort. Ezekkel a sejtekkel végeztük a kísérleteket.

Reagensek

1. A laboratóriumunkban készített reagensek

Rekombináns galektin-1 előállítása, tisztítása

Előállítás: A galektin-1 cDNS-ét Fouillit *et al.* [147] által leírt módszer szerint pQE-60 plazmidba klónoztuk, ezzel *E. coli* baktérium BL21 törzset (ompT bakteriális proteáz hiányos) transzformáltunk. A baktériumtelepet ezután 200 µg/ml ampicillinnel kiegészített LB tápfolyadékba (10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat (Difco), 5 g/l NaCl (Merck), nátrium-hidroxiddal pH 7,0 - ra beállítva) oltottuk és 16 óráig növesztettük 37°C-on rázatva. A kultúrát hígítva (1 ml törzskultúra 1 l LB-be) növesztettük tovább, OD_{600 nm} = 1,5-ig. A baktériumokat centrifugálással (4000 x g, 20 perc, 4°C hőmérséklet, Sorvall RC3B centrifuga) összegyűjtöttük. A baktériumüledéket 80 ml szuszpenziós pufferben (50 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM EDTA) kétszer mostuk (4000 x g, 20 perc, 4°C, Hettich Universal 30 RF, 1424A rotor), végül 200 ml feltáró pufferben (50 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 14 mM β-merkaptóetanol (ME), 1 mM PMSF) vettük fel. A feltárást French press készülékkel végeztük. A baktérium lizátumból ezután centrifugálással (9200 x g, 30 perc, 4°C, Sorvall SS34 rotor) távolítottuk el a sejttörmelékét. Az így kapott felülúszót 4°C-on Wathman 3M szűrőpapíron szűrtük.

Tisztítás: A galektin-1 fehérjét affinitás kromatográfiával, 1 ml térfogatú α-laktóz-Sepharose oszlopon tisztítottuk. Az oszlopot 20 térfogat oszlopmosó pufferrel (50 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM PMSF, 14 mM ME) átmostuk, majd 25 ml baktérium-lizátumot rétegeztünk rá. Ezután további 7,5 térfogat oszlopmosó pufferrel, majd újabb 7,5 ml 4 mM β-merkaptóetanol tartalmozó mosó pufferrel lemostuk a nem kötődő fehérjéket, végül laktóz tartalmú elúciós pufferrel (50 mM Tris HCl pH 7.5, 0,1 M jóacetamid, 100 mM laktóz) eluáltuk a galektin-1 fehérjét összesen 10 ml térfogatban. A tisztítás hatékonyságát 12% SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel, reverz-fázisú HPLC-vel (Vidac C4 oszlopon) és tömegspektrometriával ellenőriztük. A fehérjét 100 µM β-

merkaptóetanol tartalmú PBS-be 24 órán keresztül 4°C-on dializáltuk (Spectra/Por dialízis membrán (Spectrum Laboratories, Inc., USA). A fehérje koncentrációt UV spektrofotométerrel (UNICAM 5625 UV/VIS) határoztuk meg (OD280=0.566), majd kis részletekben liofilizáltuk és felhasználásig -80C-on tároltuk. Az oszlopot 10 oszloptérfogat 1 M nátrium-klorid oldattal regeneráltuk, majd tároló pufferben (0,01 M foszfát puffer pH 7.2, 015 M NaCl, 0.1% NaN₃) tároltuk a következő felhasználásig.

Az üres vektort hordozó baktérium lizátumot hasonló tisztítási eljárásról vittük keresztül, mint amit a Gal-1 tisztításhoz használtunk és ezt a preparátumot, vagy a Gal-1 oldószerét (PBS, 100 µM β- merkaptóetanol) használtuk kontrollként.

Galektin-1 konjugálása biotinnal és fluoreszcein-izotiocianáttal: A fehérjét 50 mM nátrium-hidrokarbonát pufferbe (pH 8,5) dializáltuk, majd 1 mg fehérjéhez 100 µg biotint (EZ-Link™ sulfo-N-hydroxysuccinimide-LC-biotin, Pierce), illetve fluoreszcein-izotiocianátot (FITC) adtunk. Két óra 4°C hőmérsékleten való inkubáció után 100 µM β-merkaptóetanol tartalmú PBS pufferbe (pH 7,4) dializáltuk.

Antitestek készítése

Immunizálási protokoll:

	µg His-Gal-1/oltás/állat	1. oltás	2. oltás 1. oltást követően 3 hét múlva	3. oltás a 2. oltást követően 3 hét múlva	ellenanyag
Nyúl poliklonális antiszérum anti-Gal-1, anti-ZAP70	100	CFA s.c.	10% CFA+90% IFA s.c.	IFA s.c.	3. oltást követő 10. napon szívpunkcióval történő teljes elvéreztetés
Egér Balb/c monoklonális ellenanyag anti-Gal-1 anti-LCK	100	CFA s.c.	10% CFA+90% IFA s.c.	PBS i.p.	3. oltást követő 4. napon lépsejtek fúziója Sp2/0 mielóma sejtekkel

Rövidítések: mAb: monoklonális ellenanyag, CFA: Complett Freud Adjuváns, IFA: Incomplett Freud Adjuváns, s.c.: subcutan, bőr alá, i.p.: intraperitoneálisan, hasüregbe

2. *Kereskedelembe vásárolt reagensek:* RPMI, MEM (Gibco), nitrocellulóz membrán (Schleicher & Schuell), Immobilon P (Millipore), UltraLink Immobilizált Protein G

(Pierce), Protein G-Sepahrose (Amersham Pharmacia Biotech), anti-foszfotirozin mAb, 4G10 (Upstate Biotechnology Inc), sulfo-NHS biotin (Pierce), egér anti-PARP mAb (Serotec), anti-lactosil-ceramid és anti-ceramid (Biomedica Corp.), anti-LYN (Upstate Biotechnology), nyúl anti-egér-IgG-HRP, biotinilált nyúl anti-egér IgM, streptavidin-FITC és DAKO IntraStain Fixáló és Permeabilizáló Kit (DAKO), kecske anti-nyúl IgG-FITC (BD PharMingen) ECL plus detekciós rendszer (Amersham Bioscience), Röntgen film (Medifort SFB), AnnexinV V-FITC (PharMingen), Alexa647-kolera toxin B és MitoTracker Red CMX-Ros (Molecular Probes), festett molekula súly marker (GIBCO-BRL), kaszpáz inhibitor I (zVAD-fmk), kaszpáz 8 inhibitor I (Ac-IETD-CHO), herbimycin A and bongkrekán sav (Calbiochem), anti-ceramid mAb, MID 15B4 (Alexis Biochemicals), Caspases-Glo™ 9 Assay and Caspases-Glo™ 3 Assay (Promega). A TNF α Dr. Duda Ernő (Szegedi Biológiai Központ) szíves ajándéka. A többi anyagot a Sigmától vásároltuk.

Áramlási citometriás mérések

A citofluorimetriás vizsgálatokat FACSCalibur citofluoriméterrel (Becton and Dickinson) végeztük.

Sejtfelszíni struktúrák analízise

Sejtfelszíni fehérjék: A sejteket hideg FACS pufferben (PBS, 1 % FCS, 0,1 % NaN₃) szuszpendáltuk és a megfelelő ellenanyaggal kezeltük 1 órán át jégen. A FACS pufferben mosott sejteket az első ellenanyagnak megfelelő 2. ellenanyaggal (anti-egér Ig-FITC vagy biotinilált anti-nyúl-Ig és streptavidin-FITC) kezeltük 30 percig jégen és sötétben.

Sejtfelszíni foszfatidil szerin (PS): A sejteket PBS-sel mostuk, majd kötő pufferben (0.01M HEPES, 0.14M NaCl and 2.5mM CaCl₂) szuszpendáltuk. Ezután Annexin V-FITC-et és propidium jodidot (PI) (10 μ g/ml) adtunk a sejtekhez 15 percre, sejteket sötétben, szobahőmérsékleten tartva. A reakciót FACSCalibur citofluoriméterrel (Becton and Dickinson) analizáltuk.

Intracelluláris struktúrák és folyamatok mérése

Gal-1: Az intracelluláris Gal-1 méréséhez IntraStain Fixáló és Permeabilizáló Kit-et, poliklonális nyúl anti-Gal-1 immunszérumot és kecske anti-nyúl IgG-FITC-et használtunk.

Mitokondriális membrán potenciál (MMP): A sejteket MitoTracker Red CMX-Ros (100ng/ml PBS-ben) töltöttük fel 15 percig, 37°C-on, majd mosás után analizáltuk

DNS tartalom, 'sub'-G1 sejtek: A sejteket a DNS tartalom és így a 'sub'-G1 sejtfrakció meghatározásához 0,1 % glükózt tartalmazó PBS-ben mostuk, majd permeabilizáló-jelölő pufferrel (*PBS, 0,1 % Triton X-100, 0,1 % Na₃-citrát, 10 µg/ml RNase és 10 µg/ml PI*) kezeltük. Harminc perc sötétben történő inkubáció után a mintákat citofluoriméterrel analizáltuk és CELLQuest programmal (Becton és Dickinson) értékeltük.

Fluoreszcens mikroszkópia

Hagyományos fluoreszcens mikroszkópia: A sejteket citocentrifugálással (120xg, 1 perc) (Cytospin, Shandon Southern Products Ltd.) tárgylemezre ülepítettük, majd 15 percig fixáltuk 1 % paraformaldehidet tartalmazó PBS-ben. Permeabilizálás után (PBS, 0,1 % Triton X-100, 10 perc) a mintákat anti-ceramid ellenanyaggal kezeltük 45 percig, majd biotinizált anti-egér IgM-et követően (30 perc) Streptavidin-FITC-cel festettük (30 perc). A teljes folyamatot szobahőmérsékleten végeztük. A mintákat Carl Zeiss (Axioskop 2 Mot) fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk AxioCam fényképezőgépet és Axio Vision 3.1 programot alkalmazva. A fluoreszcencia intenzitást Sco Image programmal értékeltük.

Lézer konfokális mikroszkópia: A sejteket 0,1 % BSA-t és 25 % FCS-t tartalmazó PBS-ben mostuk, majd permeabilizáló pufferbe tettük (*PBS, 0,2 % saponint, 0,1 % BSA*) és 10 percig permeabilizáltuk. A minták jelölése az előző bekezdésben leírtakhoz hasonlóan történt. Az ellenanyagokat a hozzáadás előtt permeabilizáló pufferrel kevertük. Az utolsó lépés során Alexa647-kolera toxin-t adtunk a mintákhoz a raftok

festése érdekében. A vizsgálatot Olympus FV500 konfokális lézer pásztázó fluoreszcens mikroszkóppal végeztük, és FluoView programmal értékeltük. A FITC és az Alexa647 festékeket 488 nm, illetve 633 nm hullámhosszon argon, illetve He-Ne lézerrel gerjesztettük

Western blotting

Gal-1 kötő membrán fehérjék: Biotinilált membrán preparátum: A sejteket (8×10^7) 500 µg/ml sulfo-NHS biotinnal jelöltük 1 mM MgCl₂-ot és 0,1 mM CaCl₂-ot tartalmazó PBS-ben 20 percig 4°C-on, majd 30 percig lizáltuk (50 mM HEPES pH 7.4, 1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM fenilmetil-szulfonil fluorid (PMSF) és 10 µg/ml leupeptin). A Gal-1-Sepharose gyöngyökön izolált (l. **Affinitás és immunprecipitáció** fejezet) SDS poliakrilamid gélelektroforézist (PAGE) követően (7-15 % gél) nitrocellulóz membránra transzferáltuk (transzfer puffer: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 % metanol) és Streptavidin-HRPO-val, vagy a laborban előállított CD45 monoklonális ellenanyag keverékkel, (KD3, GB3), és ezt követően anti-egér IgG-HRPO konjugátummal reagáltattuk. A reakciót kemilumineszcens detekciós rendszerrel (ECL Plus) tettük láthatóvá.

Izolált membrán preparátum: A sejtek membránját 20 mM Tris pH 7.4, 10 mM EDTA, 65 mM ditiotreitól, 0.1 µM aprotonin, 1 µM pepstatin, 1 µM leupeptin és 30 mM laktóz tartalmú oldatban extraháltuk, majd centrifugálás után a fenti, 1 % Nonidet P-40-nel kiegészített oldatban szolubilizáltuk. A mintákat SDS-PAGE után Immobilon P membránra vittük át és anti-CD45 ellenanyaggal, majd anti-egér IgG-HRPO konjugátummal, vagy biotinilált Gal-1-gyel és Streptavidin- HRPO-val reagáltattuk. A reakciókat 0,5 mg/ml diaminobenzidin-t és 0,2 % H₂O₂-t tartalmazó PBS oldattal tettük láthatóvá.

Immunblotting: A sejtek üledékéből teljes sejtlizátumot készítettünk, majd SDS PAGE-t követően nitrocellulóz membránra vittük át a mintákat. A blottingot a kimutatandó

fehérjére specifikus első ellenanyaggal, majd az első ellenanyagnak megfelelő HRPO-val kapcsolt második ellenanyaggal végeztük és ECL Plus rendszerrel tettük láthatóvá.

Affinitás és immunprecipitáció

Gal-1 affinitás precipitáció: Sejtfelszínen biotinilált sejtek lizátumához Gal-1 fehérjével kovalensen kapcsolt Sepharose 4B gyöngyöket adtunk és 1 órán át 4°C-on kevertettük. A gyöngyöket kétszer mostuk (lízis pufferrel: l. **Western blotting** fejezet), majd a kötődött fehérjéket SDS PAGE minta pufferrel, 5 percig történő forralással eluáltuk a gyöngyökről.

Kináz immunprecipitáció: LYN: A sejteket lizáltuk (50 mM Tris pH 7.4, 10 mM EDTA, 4 mM β -ME, proteáz inhibitorok, 10 mM CHAPS, 1 mM Na-ortovanadát), majd UltraLink Immobilizált Protein G-vel kapcsolt anti-LYN ellenanyaggal inkubáltuk. Ezután az immunprecipitátumokat 0,2 % Nonidet P 40 tartalmú lízis pufferrel mostuk, majd SDS minta pufferben forraltuk.

LCK, ZAP70: A sejteket RIPA pufferben (25 mM HEPES pH 7.4, 0.1% SDS, 0.5% deoxikolát, 1 % TritonX100, 125 mM NaCl, Foszfataz inhibitor koktél (1:100 hígítás), 10 μ g/ml leupeptin és 1 mM PMSF) lizáltuk, majd centrifugálás után a felülúszókat (5×10^6 sejt/minta) 10 μ g nyúl-anti-ZAP70 vagy 4 μ g nyúl anti-LCK ellenanyaggal inkubáltuk 16 órán át. Végül Protein G-Sepharose gyöngyöket (30 μ l/minta) adtunk a mintákhoz és 3 óra 4°C-on történő inkubálás a mintákat négyszer mostuk lízis pufferrel. Az immunprecipitátumokat *in vitro* kináz assayben használtuk (l. lent).

Enzim aktivitás mérések

PTPáz aktivitás: A sejtmembrán készítményeket foszfataz pufferben (100 mM Na-acetát pH 6.0, 0,1 mM EDTA) szuszpendáltuk és a foszfataz aktivitást a foszfortirozin analog p-nitro-fenil-foszfátból (10 mM) szobahőmérsékleten felszabaduló, 410 nm

hullámhosszon spektrofotometriásan mérhető p-nitro-fenil mennyiségének meghatározásával jellemeztük.

Tirozin kináz aktivitás: LYN: A LYN immunprecipitátumot kináz pufferben szuszpendáltuk (500 mM HEPES pH 7.0, 10 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 50 mM Na-vanadát, 5 μM ATP) és sav-kezelt enolázt adtunk hozzá szubsztrátként, majd SDS PAGE-t követően a szubsztrát foszforilációt anti-foszfotirozin ellenanyaggal Western blottinggal tettük láthatóvá.

LCK, ZAP70: A két kináz immunprecipitátumát kináz pufferben (25 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MnCl₂, 100 μM Na₃VO₃, 5 mM MgCl₂, 5 mM ditiotretitol, 10 μCi ³²P-ATP) szuszpendáltuk és 20 percig 37°C-on inkubáltuk. A foszforilációt SDS minta puffer hozzáadásával és 5 perc forralással állítottuk le és 10 %-os SDS PAGE elektroforézis után Phosphorimager 445 SI (Molecular Dynamics) készülékkel analizáltuk.

Kaspáz aktivitás: A 96 lyukú szövettenyésztő lemezen növesztett és stimulált sejteket a mérés előtt 15 percig szobahőmérsékleten tartottuk. A mintákhoz Caspase-Glo™ 9 or Caspase-Glo™ 3 reagenseket adtunk és a kaspáz aktivitásokat a gyártó útmutatása szerint mértük. A reakciókat, egy óra inkubáció után, a minták lumineszcenciája alapján LuminoScan plate olvasó luminométerrel (Labsystem) mértük.

Csontvelő sejtek vizsgálata

CAFC assay: Lyn⁻ vagy teljes (nem frakcionált) csontvelő sejteket CAFC médiumban (MEM, 12.5 % FCS, 12,5 % lószérum, 3,5 mM HEPES, 2 mM L-glutamin, 100 μM β-merkaptóetanol, 10 μM hidrokortison-hemiszukcinát) szuszpendáltunk. A CAFC assay-t Virág és mtsai [148] szerint végeztük.

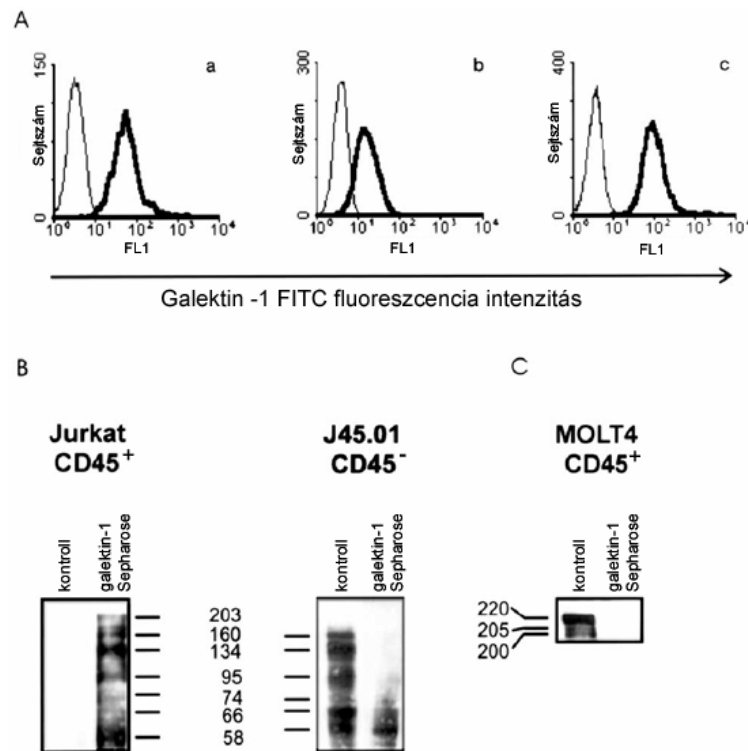
Kolóniaképzés: A CFU-GM és BFU-E számot fél-szilárd kolónia formáló assay-ben határoztuk meg Virág és mtsai által leírtak szerint [148].

3. EREDMÉNYEK

CD45 tirozin foszfatáz szerepe a Gal-1 citotoxikus hatásában

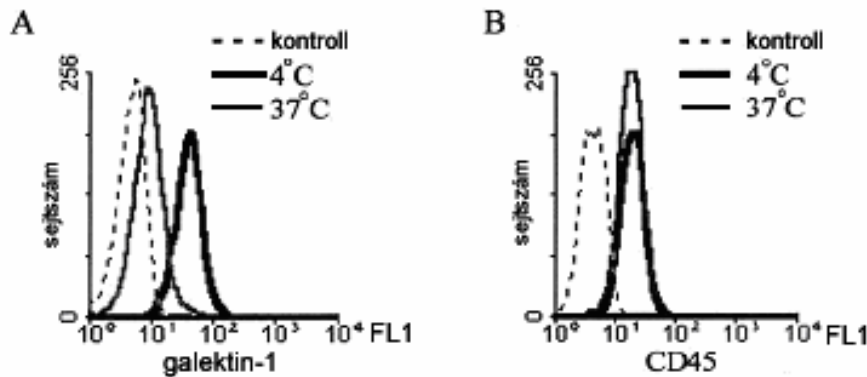
Fajka-Boja R és mtsai 2002. Immunol Letter, **82**, 149-154, Fouillit M és mtsai 2000. Electrophoresis, **21**, 275-280, Fouillit M és mtsai 2000. Glycobiology, **10**, 413-419

Az Gal-1 szignál közvetítő receptoraként, elsőként a nagymértékben glikozilált transzmembrán tirozin foszfatázt, a CD45-öt azonosították [82;84]. Ezzel kapcsolatban mi is azt az eredményt kaptuk (1. ábra), hogy a Gal-1 kötődik a CD45-höz.



3.1. Ábra. Gal-1 kötődik a CD45 receptor tirozin foszfatázhoz. (A) Jurkat (a), CD45 hiányos Jurkat (b) és MOLT-4 (c) sejteket 1 órán keresztül 4°C-on 3,6 µM Gal-1-gyel inkubáltunk, a kötődött Gal-1-et citofluorimetriával analizáltuk. (B) A sejtfelszíni fehérjéket biotiniláltuk, majd a sejteket lizáltuk. A Gal-1-kötő fehérjéket Sepharose 4B-hez kapcsolt Gal-1-gyel izoláltuk és az akrilamid gélen elválasztott biotinilált fehérjéket Strepavidin-HRPO konjugátummal mutattuk ki. (C) MOLT-4 sejtek lizátumából Gal-1-Sepharose 4B gyöngyökkel izoláltuk a Gal-1-kötő fehérjéket, majd a CD45 izoformákat anti-CD45 monoklonális ellenanyaggal, Western blotting technikával tettük láthatóvá.

A citofluorimetriás vizsgálat alapján a Gal-1 kötődik a Jurkat (3.1A. Ábra.), és MOLT-4 (3.1C. Ábra) leukémiás T sejtvonalak felszínéhez, de megjelöli a CD45 hiányos Jurkat mutáns (J45.01) sejteket is. A Gal-1-hez kapcsolódó sejtfelszíni fehérjék között egyértelműen azonosítható a CD45. A vad típusú Jurkat sejtek membránjából Gal-1 affinitás precipitációval kivont fehérjék között 200 kDa-os proteinek jelennek meg, melyek a CD5 deficiens sejtekből készített preparátumból hiányoznak (B). A MOLT-4 sejtvonalból Gal-1-gyel kivont membrán fehérjék között a CD45 ellenanyaggal végzett Western blotting egyértelműen azonosítja a CD45 izoformáit (3.1C Ábra).

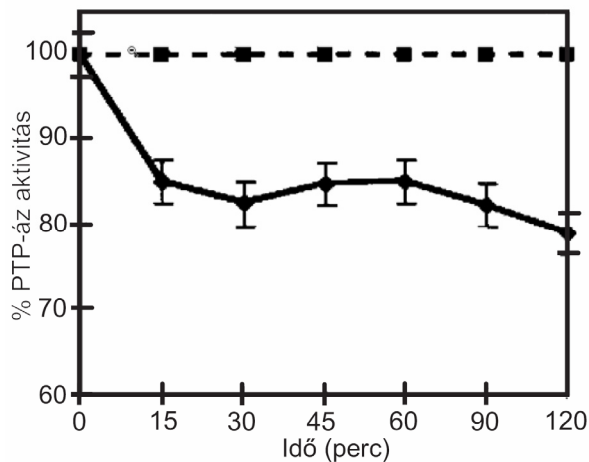


3.2. Ábra. *CD45 nem ko-internalizálódik a Gal-1-gyel.* Jurkat sejteket 3,6 μM biotinnal kapcsolt Gal-1-gyel 1 órán keresztül 4°C -on kezeltünk. A nem kötődött Gal-1-gyet mosással eltávolítottuk és a sejteket további 3 órán át 4°C , illetve 37°C -on tartottuk. (A) A sejtek felszínén jelenlevő Biotin-Gal-1-gyet Streptavidin-Quantum Red festéssel, (B) a CD45 mennyiségét anti-CD45 ellenanyaggal és az azt követő anti- egér Ig-FITC festéssel, citofluorimetriával vizsgáltuk.

Annak eldöntésére, hogy a Gal-1-CD45 kapcsolódás szükséges-e a Gal-1 által indukált apoptózis folyamatában, azt vizsgáltuk, hogy az általunk kimutatott Gal-1 internalizáció együtt jár-e a CD45 sejtfelszíni downregulációjával. A 3.2. Ábra mutatja, hogy a sejtfelszínhez kötődött Gal-1 mennyisége 37°C -on 1 óra alatt csökken (3.2A. Ábra), fluoreszcens festékekkel jelzett Gal-1-gyel kimutatható, hogy a lektin a citoplazmába transzlokálódik (nincs bemutatva), ugyanakkor a CD45 mennyisége nem változik (3.2B.Ábra). Megjegyzendő, hogy más, Gal-1 kötő fehérjék (CD3, CD4, CD43, CD7) vizsgálva sem tudtunk ko-internalizálódást kimutatni (Fajka-Boja és mtsai, nem közölt

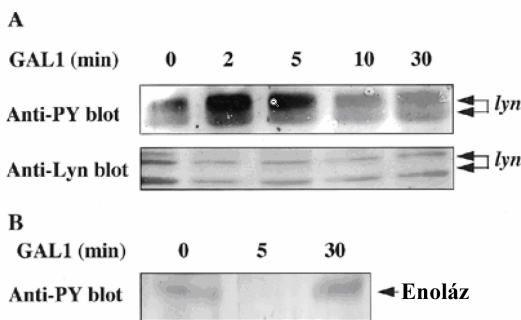
adat). E kísérletek gyengéje, hogy a Gal-1 internalizáció funkcionális jelentőségét az apoptózis indukcióban nem tudjuk bizonyítani, mert a folyamat mechanizmusa, hasonlóan a Gal-1 szekrécióhoz, ismeretlen és nem a konvencionális úton történik. Így nem vizsgálhatjuk, hogy az internalizáció gátlása milyen következményekkel jár az apoptózis indukció szempontjából.

A Gal-1-CD45 kapcsolódás jelátviteli következményekkel jár [15;149]. A Gal-1 kötődése a BL36 B sejtekhez a CD45 foszfatáz aktivitásának csökkenését (3.3. Ábra) és a Lyn *src* tirozin kináz CD45 által szabályozott foszforilációjának csökkenésével járó aktivitás növekedését okozza (3.4. Ábra).

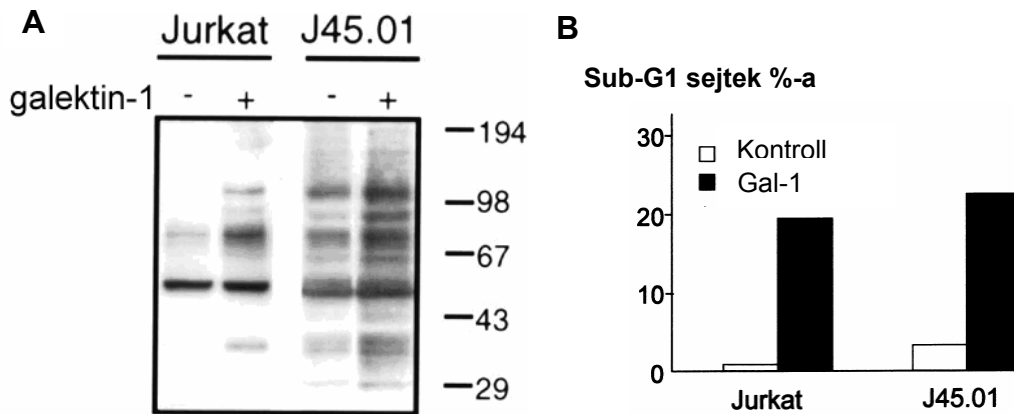


3.3. Ábra. Gal-1 csökkenti a CD45 foszfatáz aktivitását. 2 mM Gal-1-gyel kezelt (folyamatos vonal), vagy nem-kezelt (szaggatott vonal) BL36 sejtek membrán preparátumában mértük a foszfatáz aktivitást para-nito-fenil foszfát szubsztráttal szobahőmérsékleten. Az enzimaktivitás révén felszabadult p-nitro-fenilt mennyiségét 410 nm hullámhosszon, spektrofotometriával mértük. PTPáz aktivitás= PTPáz aktivitás a Gal-1 kezelt mintában/ PTPáz aktivitás a kontrolban X 100%.

Vajon a CD45 funkció Gal-1 általi regulációja azt jelenti-e, hogy a Gal-1 a CD45-ön, mint receptoron keresztül indukálja-e az apoptózist? Jurkat T sejt CD45 hiányos mutánsai



3.4. Ábra. A CD45 foszfatáz aktivitás csökkenése egybeesik a Lyn kináz aktivitás növekedésével. (A) BL36 sejteket 700 nM Gal-1-gyel kezeltünk 2, 5, 10 és 30 percig. A sejtek lizátumából anti-Lyn ellenanyaggal immunprecipitációval izoláltuk a Lyn tirozin kinázt. Az immunprecipitátumokat SDS-poliakrilamid gélelektroforézis követően Western blottinggal vizsgáltuk anti-foszfotirozin (anti-PY), illetve anti-Lyn ellenanyaggal. (B) Az immunprecipitátumok kináz aktivitását *in vitro* foszforilációs kísérletben enoláz szubsztráttal vizsgáltuk. A foszforilált szubsztrátot anti-foszfotirozin ellenanyaggal Western blottinggal mutattuk ki.



3.5. Ábra. *A Gal-1 tirozin foszforilációt és apoptózist stimulál a CD45 hiányos Jurkat sejtekben is.* Jurkat és CD45 hiányos Jurkat sejteket (CD45.01) 1.8 μ M Gal-1-gyel stimuláltunk 10 percig (A) vagy 24 óráig (B) 37°C-on, vagy stimulálatlanul hagytunk. (A) A sejtekből készített lizátumokat SDS-poliakrilamid elektroforézist követő Western blottinggal, anti-foszfortirozin ellenanyag segítségével vizsgáltuk. (B) Az apoptózist a sub-G1 sejtpopuláció citofluorimetriás mérésével határoztuk meg.

a vad típusú Jurkat sejtekkel azonos választ adnak. A CD45 hiányos sejtekben az apoptotikus válaszhoz szükséges tirozin foszforiláció (l. később) (3.5A. Ábra) és a sejtek apoptózisa (3.5B. Ábra) éppen úgy megtörténik, mint a CD45⁺ Jurkat sejtekben. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal, hogy a CD45 nem ko-internalizálódik a Gal-1-gyel és egyértelműen igazolja, hogy bár a CD45-Gal-1 kapcsolódás jelátvitellel jár, ez nem szükséges a Gal-1 citotoxikus hatásához.

A Gal-1 által kiváltott apoptózis molekuláris mechanizmusa

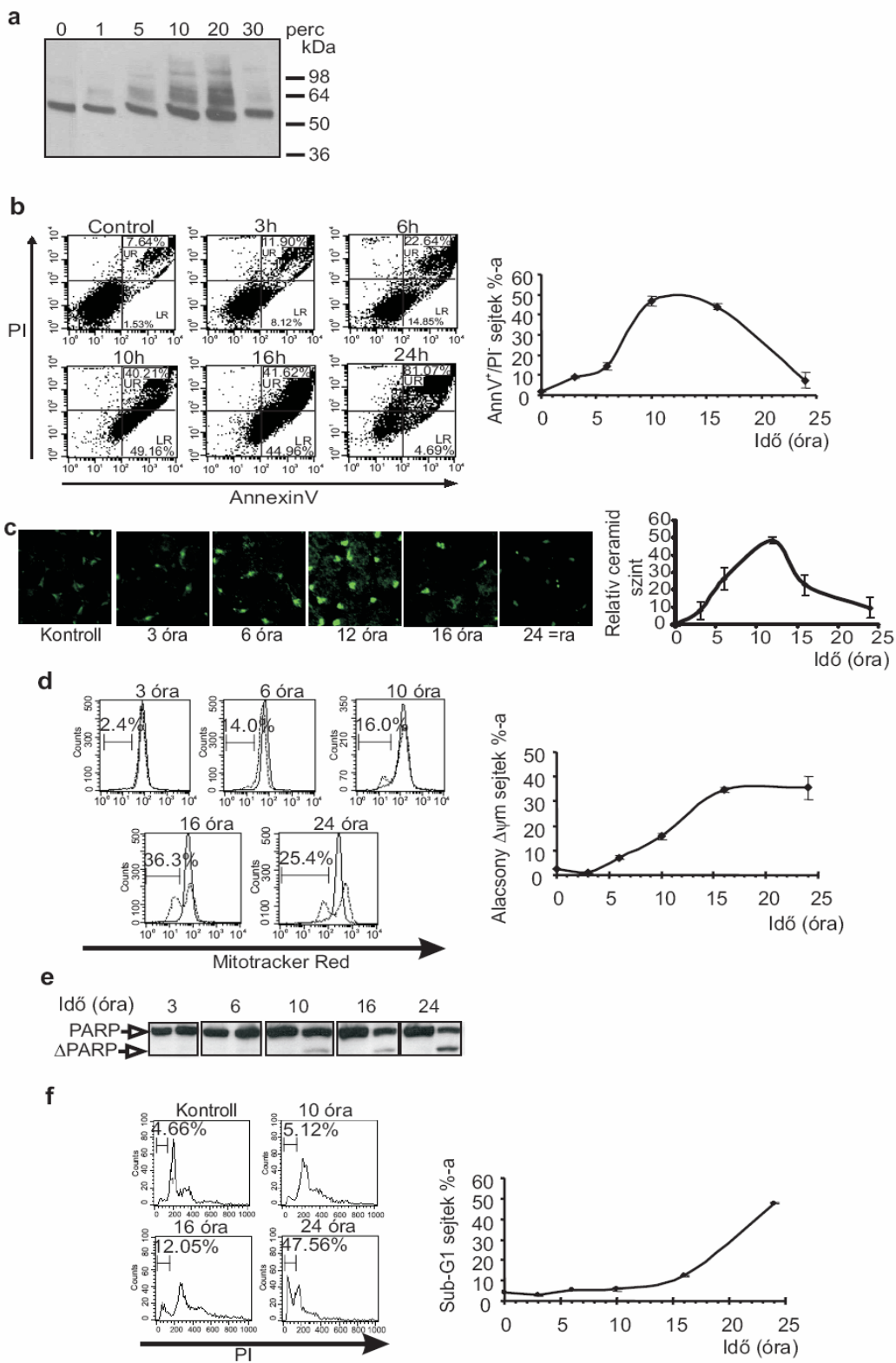
Ion G és mtsai 2005. Cell Death Differ, 12(8):1145-7, Ion G és mtsai 2006. Cell Signalling közlésre elfogadva

1. Az apoptózis folyamatainak sorrendje

Az 3.5. Ábrán bemutattuk, hogy a Gal-1 kezelés tirozin foszforilációt eredményez Jurkat sejtekben. A 3.6A. Ábrán láthatjuk, hogy ennek maximuma 10-20 perc kezelés után van, majd ezután csökken.

A membrán aszimmetria felbomlása és így a plazma membrán belső felszíne felé irányuló foszfatidil-szerin (phosphatidyl-serin, PS) kifelé fordulása az apoptotikus folyamatok általános velejárója. A Gal-1 által indukált apoptózis során PS sejtfelszíni expozíciója a kezelés 10-16 órája között éri el a maximumát (3.6B. Ábra). Ezek a sejtek Annexin V-tel (AnnV) megjelölhetők, membránjuk azonban ebben a stádiumban ép marad, ezért a nem-membránpermeabilis propidium jodidot (PI) nem veszik fel. A késői apoptotikus sejtek membránpermeabilitása olyan mértékben változik, hogy a PI keresztül jut a membránon, megjelölve a DNS-t (3.6B. Ábra dot plot). Az Ann⁺/PI⁺ sejtek száma a mérés 24. órájáig folyamatosan nő. A PS orientáció megváltozásával párhuzamosan ceramid, az apoptotikus válasz egyik gyakori komponense, szabadul fel (3.6C. Ábra). A ceramid expresszió a Gal-1 kezelés első három órájában (1, 5, 10, 30 perc és 1 óra, nincs bemutatva) nem növekszik. Három és 12 óra között meredeken emelkedik (3.6D. Ábra) és 12 óra kezeléskor elért maximuma egybeesik a PS külső membrán felszínen való megjelenésének maximumával (3.6B. Ábra).

A mitokondriális membránpotenciál (MMP, $\Delta\psi_m$) csökkenése a különböző módon (drogok, oxidatív stressz, UV sugárzás) [150;151] indukált apoptózis központi lépése. Az MMP meredeken csökken a Gal-1 stimuláció 6-16 órája között, ezután azonos szinten marad (3.6D. Ábra). A kaszpáz aktiváció időbeli lefutását a nukleáris repair enzim, a poli-ADP-ribóz-polimeráz (PARP), egy jól ismert kaszpáz szubsztrát hasításával követtük. Az apoptózisnak e késői lépését a Gal-1 kezelés 6. órájában látjuk először és a mérés 24. órájáig a hasított PARP mennyisége fokozatosan nő (3.6E. Ábra). A végső lépés a kromoszomális DNS fragmentálódása, amely az alacsony DNS tartalmú 'sub-G-1' sejtfrakció kialakulásával mérhető, a 10 órában kezdődik és a 24. óráig nő (3.6F. Ábra).

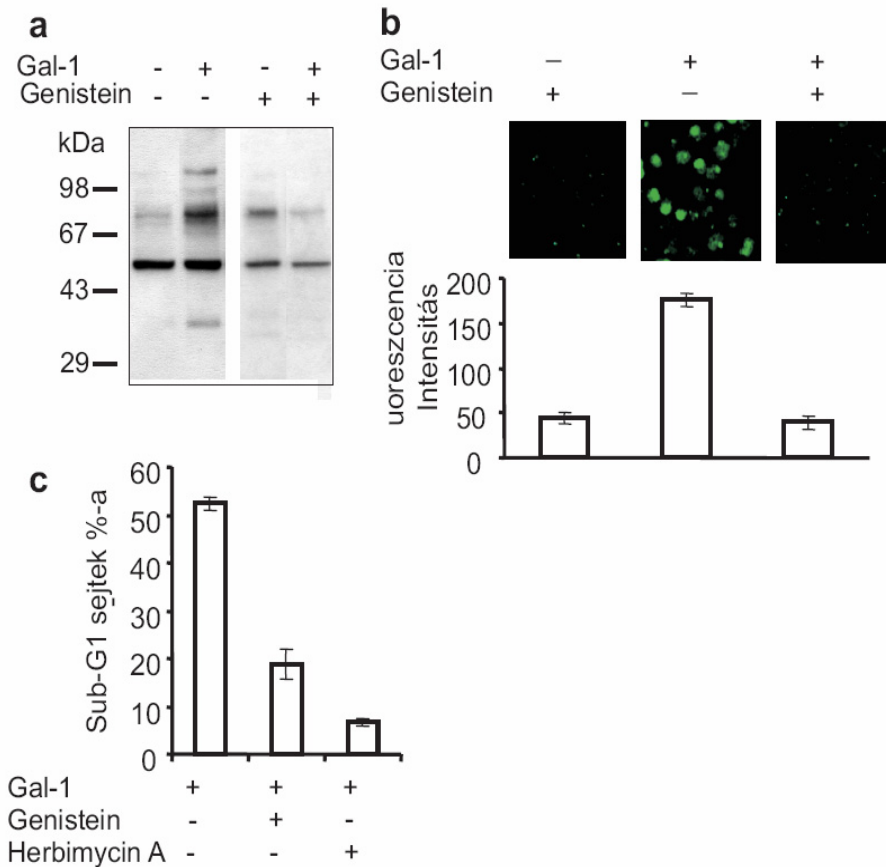


3.6. Ábra. *A Gal-1 által indukált apoptózis intracelluláris folyamatainak időrendi sorrendje.* Jurkat sejteket 1,8 μ M Gal-1-gyel stimuláltunk a feltüntetett ideig, vagy stimulálatlanul hagytuk. **(a)** A sejtek lizátumából készített post-nukleáris felülúszóiban levő fehérjéket 7,7-15 %-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztottuk. A foszforilált fehérjéket Western blottinggal, anti-foszfortirozin ellenanyaggal vizsgáltuk. **(b)** A különböző ideig stimulált sejteket Annexin-V-FITC-cel, illetve propidium jodiddal (PI) jelöltük és citofluorimetriával analizáltuk. A baloldalon a minták dot plot analizisét mutatjuk be. (UR=upper right, jobboldali felső kvadráns, LR=lower right, jobboldali alsó kvadráns). Az Annexin-V⁺/PI⁻ sejtek %-os változását a baloldalon grafikusán mutatjuk be (átlag +/- szórás két párhuzamos mintában). **(c)** A kezelt sejteket tárgylemezre ülepítettük citocentrifugálással, fixáltuk, permeabilizáltuk és anti-ceramid monoklonális ellenanyaggal majd biotinilált anti-egér IgM-mel és Streptavidin-FITC-cel festettük. Felül a mikroszkópos képeket, alatta az ezeken a mintákon Scion Image programmal felvett fluoreszcencia intenzitások grafikus ábrázolását mutatjuk be. **(d)** A kezelt sejteket MitoTracker Red CMX-Ros mitokondrium festékkel töltöttük fel és citofluorimetriával analizáltuk. Az egyes mintákra kapott hisztogramokat a baloldalon, a minták 3 párhuzamosából készített grafikont (átlag/- szórás) a jobboldalon mutatjuk be. **(e)** A sejtek lizátumán végzett Western blotting kísérletben a poli-ADP ribozil-polimeráz (PARP) degradációját PARP ellenanyaggal mutattuk ki. **(f)** A 'sub'-G1 sejt populáció citofluorimetriás meghatározásához a kezelés után a sejteket permeabilizáltuk és PI-dal festettük. A citofluorimetriás mérés egyedi hisztogramjait a baloldalon, a párhuzamos minták méréséből készített grafikont a baloldalon mutatjuk be (átlag/+ szórás)

2. *A Gal-1 indukált apoptózis a p56^{lck} és a ZAP70 által mediált tirozin foszforilációtól függ*

Az 3.5A és 3.6A. Ábrán már bemutattuk, hogy a Gal-1 tirozin foszforilációt stimulál a Jurkat T sejtekben. Kérdés, hogy ez a korai biokémiai lépés fontos-e az apoptózis indukációjában. Genistein, a tirozin kinázok inhibitora gátolja a foszforilációt (3.7A. Ábra). Ez az esemény meghatározó a sejthalál folyamatában, mert gátlása nemcsak a tirozin foszforilációt, de az intracelluláris ceramid szintnövekedését (3.7B. Ábra) és az apoptotikus 'sub-G1' sejtfrakció megjelenését is csökkenti (3.7C. Ábra). A genistein mellett egy másik tirozin kináz inhibitor, a herbimycin A is hasonlóan befolyásolja a sejtek pusztulását (3.7C. Ábra).

A p56^{lck} szerepét a ceramid [152] és a mitokondrium mediált [153;154] apoptózis útvonalakban irodalmi adatok igazolják . Így kézenfekvő, hogy ennek a T sejtek különböző szignálokra adott válaszában is központi szereppel bíró tirozin kináznak és egyik közvetlen szubsztrátjának, a ZAP70-nek a funkcióját vizsgáljuk a Gal-1 indukált tirozin foszforilációban és apoptózisban.



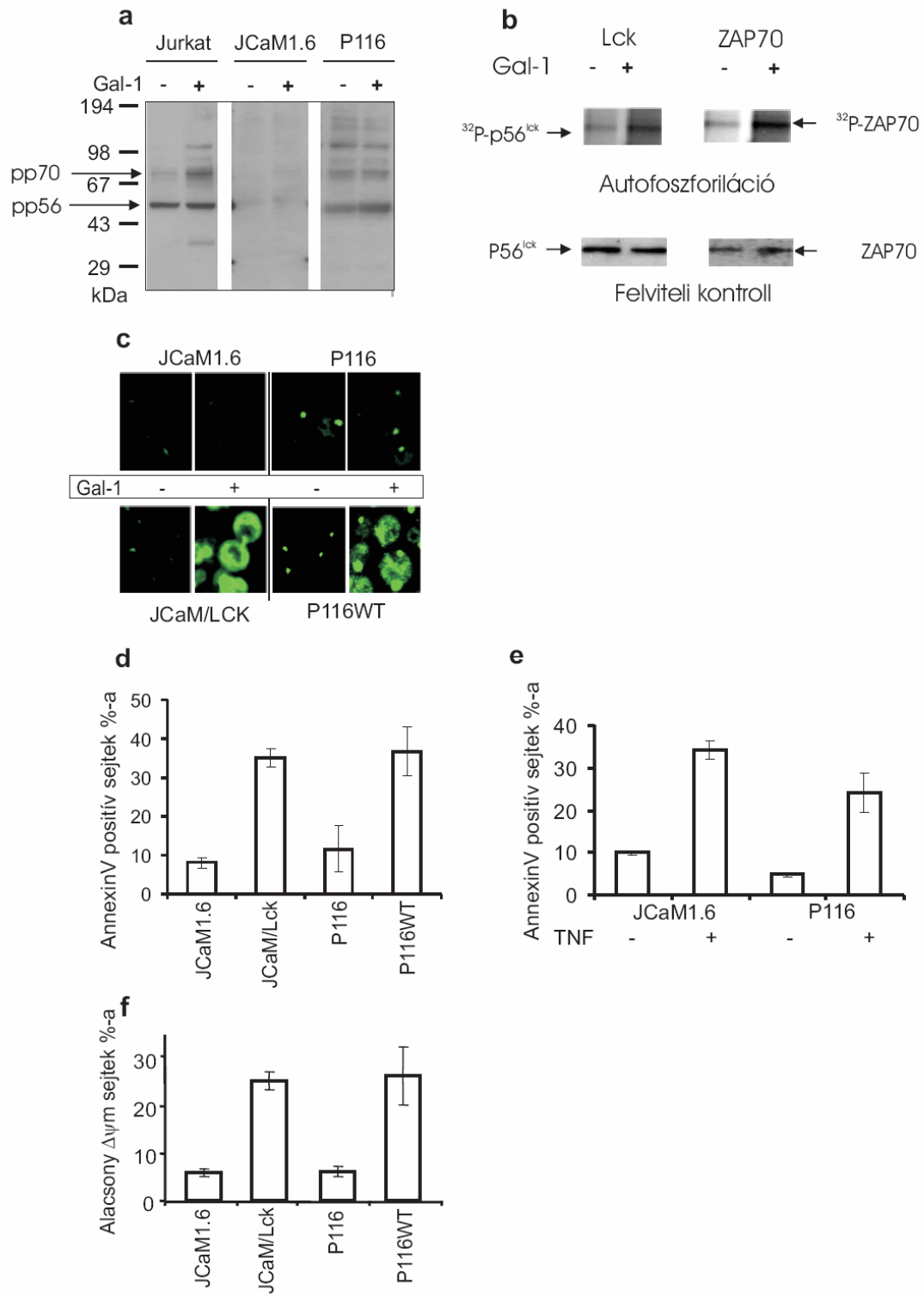
3.7. Ábra. A tirozin foszforiláció fontos lépés az apoptózis folyamatában. Jurkat sejteket 1,8 μ M Gal-1-gyel stimuláltunk 250 μ M (A) vagy 75 μ M (B és C) vagy 1 μ M herbimycin A (C) jelenlétében vagy távollétében. (A) A tirozin foszforilációs vizsgálatot a 6A ábra alatt leírtak szerint végeztük a Gal-1-gyel 10 percig stimulált sejtekből. (B) A ceramid felszabadulás mérését a 6C ábra alatt leírtak szerint hajtottuk végre 12 órán át kezelt sejtekből. A mikroszkópos képek alatt a fluoreszcencia intenzitások grafikus ábrázolását mutatjuk be. (C) A 24 óráig kezelt sejteken a 6F ábra alatt leírtak szerint mértük a 'sub'-G1 sejtek mennyiségét (az eredmények 3 párhuzamos minta átlagát \pm -szórás mutatják).

A 3.8A. Ábra mutatja, hogy az LCK (JCaM1.6) és a ZAP70 (P116) hiányában a Gal-1 által stimulált tirozin foszforiláció elmarad, igazolva, hogy ez a lépés az LCK és ZAP70 aktiválódásának (3.8B. Ábra) következménye. E két kináz aktivitása a további jelátvételi eseményeknek is előfeltétele, hiszen hiányukban elmarad az intracelluláris ceramid felszabadulás (3.8C. Ábra), a PS sejtfelszíni expozíciója (3.8D. Ábra), és az MMP csökkenése (3.8F. Ábra). Az LCK és ZAP70 expressziójának helyreállítása (JCaM /LCK, illetve P116WT) az eredeti sejtválaszok (ceramid felszabadulás, PS expozíció, MMP csökkenés) visszaállítását eredményezi. A kináz hiányos sejtek válaszképtelensége specifikus a Gal-1 kezelésre, hiszen az LCK-től [152] és ZAP70-től [155] igazoltan független apoptózis út vonalat elindító TNF α a hiányos sejtek halálát stimulálja (3.8E. Ábra).

3. A ceramid felszabadulás elengedhetetlen a Gal-1 indukált apoptózisban

Hogy megértsük a ceramid szerepét a Gal-1 indukált sejthalálban különböző eszközökkel befolyásoltuk a ceramid felszabadulását. Ez a szfingolipid két módon, anabolikus vagy katabolikus úton keletkezhet. A ceramid szintézise a ceramid szintáz aktivitása révén keletkezik. Az enzim specifikus inhibitora, a Fumonisin B1, nem gátolja a Gal-1 stimulált apoptózist (3.9A. Ábra) igazolva, hogy nem ez az útvonal aktiválódik. A ceramid katabolikus úton történő felszabadulása a savas vagy neutrális szfingomielinázok (SMáz) aktivitásával valósulhat meg. A neutrális SMáz manumycin A-val gátolható, ez azonban nem befolyásolja a Gal-1 hatására bekövetkező ceramid felszabadulást (3.9B. Ábra). Ha azonban a savas SMáz-t desipraminnal, vagy imipraminnal gátoljuk, sem a ceramid felszabadulás (3.9B. Ábra), sem a MMP csökkenése (3.9C. Ábra), sem a kaszpáz 9 és 3 aktiválódás (3.9D. Ábra) nem következik be.

A Bcl-2 család anti-apoptotikus tagjainak expressziója csökken, vagy funkciója másodlagos módosítással inaktívulódik az apoptotikus folyamatok során [156;157]. A 3.10. Ábra mutatja, hogy a Bcl-2 expresszió Gal-1 hatására csökken, a savas SMáz



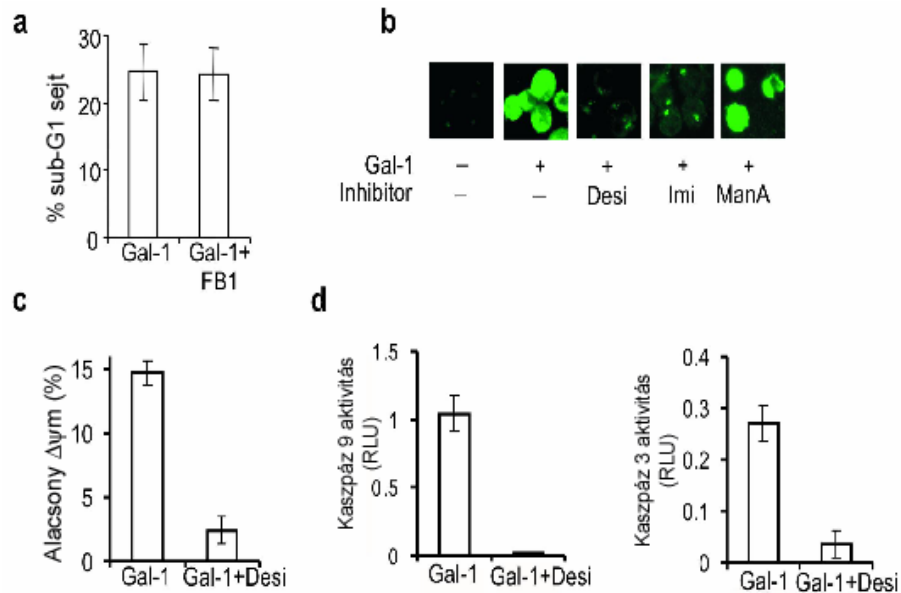
3.8. Ábra. *A Gal-1 indukált apoptózisban fontos tirozin foszforiláció mediátorai a p56lck és a ZAP70 tirozin kinázok.* (a) Jurkat sejteket, p56lck (JCaM1.6) és ZAP70 (P116) deficiens Jurkat sejteket 15 percig stimuláltunk Gal-1-gyel vagy stimulálatlanul hagyttunk. A tirozin foszforilációt a 6A ábra alatt leírtak szerint vizsgáltuk. (b) Az (a) pont szerint stimulált sejtek lizátumából nyúl anti-ZAP70 és nyúl anti-LCK ellenanyaggal immunprecipitátumot készítettünk és a kinázok autofoszforilációját ³²P-ATP beépülésével vizsgáltuk. Az in vitro autofoszforilációnak alávetett immunprecipitátumokat SDS-poliakrilamid gélben futattuk, nitrocellulóz membránra transzferáltuk és a foszforiláció mértékét foszfor imager készülékkel analizáltuk (felső panel). Felviteli kontrolként az immunprecipitátumok LCK és ZAP70 tartalmát anti-LCK és anti-ZAP70 monoklonális ellenanyagokkal vizsgáltuk (alsó panel). (c) A JCaM1.6, a P116 és ezeknek a sejteknek LCK-val (JCaM/LCK), illetve ZAP70-nel (P116WT) helyreállított variánsait 12 óráig kezeltük Gal-1-gyel. A minták ceramid expresszióját a 6C ábra alatt leírtak szerint vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkópiával. (d) A sejteket Gal-1-gyel vagy (e) TNF-fel kezeltük és mértük a PS expozíciót a 6B ábra alatt leírtak szerint. (f) Az MMP változását 16 óra kezelés után a 6D ábra alatt leírtak szerint mértük. A (c), (d) és (f) ábrákon bemutatott kísérleteknél mintánként 3 párhuzamost használtunk és ezek átlagát±/szórás ábrázoltuk a grafikonokon. A (d) és (f) grafikonok esetében a kontrol értéket kivontuk a megfelelő minta értékekből és ezeket az adatokat tüntettük fel.

gátlása desipraminnal ezt a csökkenést megszünteti. A ceramid felszabadulás nemcsak a savas SMáz aktivitásától, hanem az LCK és ZAP70 tirozin kinázok működésétől is függ (3.8C. Ábra).

A ceramid anti-apoptotikus hatású metabolitja, a sphingozin-1-foszfát (S1P), az apoptotikus hatású ceramiddal ellentétesen hat [158], csökkenti a ceramid függő szignálfolyamatokat. Így nem váratlan, hogy az S1P jelenléte redukálja a Gal-1 okozta MMP csökkenést (3.11A. Ábra), a kaszpáz aktiválódást reprezentáló PARP hasítást (3.11B. Ábra) és a 'sub-G1' sejtpopuláció méretét (3.11C. Ábra). Az S1P a külsőleg hozzáadott ceramid citotoxikus hatását is blokkja (3.11C. Ábra).

In vivo az S1P a szfingozin foszforilációjával keletkezik, melyet a szfingozin kináz (SPHK) végez. Ezt az enzimet a protein kináz C (PKC) aktiválja [159]. Ilyen módon az PKC/SPHK útvonal stimulálható a PKC direkt aktiválásával. Ezzel összhangban a PKC aktivátor, a phorbol-dibutirát a Gal-1 indukált apoptózis összes lépését gátolja (MMP csökkenés, PARP degradáció, a 'sub-G1' sejtszám növekedése) (3.11. Ábra) és hasonlóan blokkolja a ceramid indukált sejthalált (3.11C. Ábra).

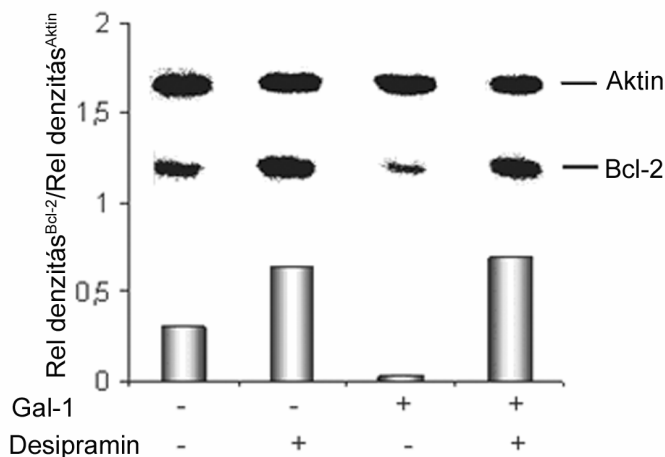
A fenti eredmények nemcsak azt mutatják, hogy a ceramid szükséges komponense a Gal-1 indukált apoptózisnak, hanem azt is igazolja, hogy a ceramid felszabadulás az MMP csökkenése, a kaszpáz aktiváció és a nukleáris DNS lebomlása előtt történik, mivel ezek a lépések gátoltak a ceramid megjelenésének hiányában (3.9. és 3.10. Ábra).



3.9. Ábra. A ceramid felszabadulás a savas szingomielináz aktivitásának köszönhető és a Gal-1 indukált apoptózis központi lépése. (A) Jurkat sejteket 24 órán keresztül Gal-1-gyel stimuláltunk 10 μM fumonisin B1 (FB1) jelenlétében vagy távollétében. A 'sub'-G1 sejtek mennyiségét a 6F ábra alatt leírtak szerint mértük.

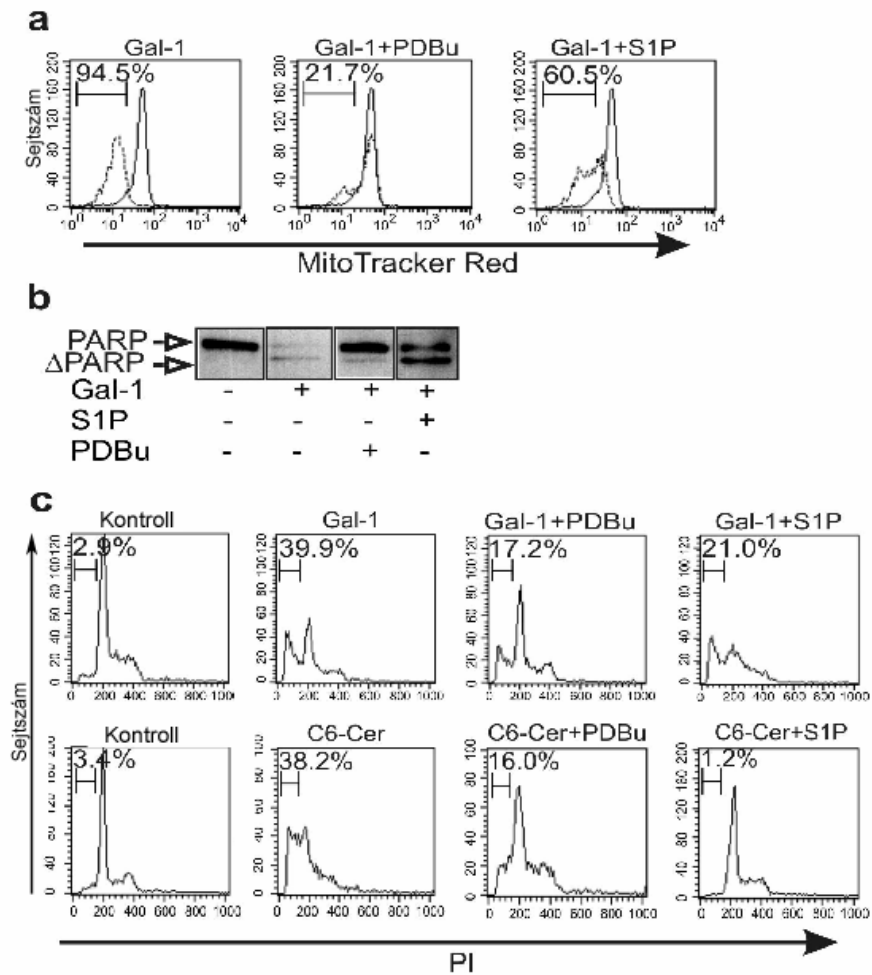
A sejteket előinkubáltuk 2 órát 20 μM desipraminnal (Desi) (B, C és D), vagy 20 μM imipraminnal (Imi) (B), illetve 30 percig 2,5 μM Manumycin A-val (ManA) (B), vagy az inhibitorok nélkül. (B) A ceramid felszabadulást 12 óra kezelés után mikroszkóposan vizsgáltuk (l. 6C ábra). (C) Az MMP csökkenését a 6D ábra alatt leírtak szerint vizsgáltuk. (D) A kaszpáz 9 (balra) és a 3 (jobbra) aktivitást a stimuláció 12. órája után mértük Caspase-GloTM 9, illetve Caspase-GloTM 3 luminescens szubsztrátokat alkalmazva. A reakciókat luminométerrel analizáltuk, az eredményeket relatív fény egységbe (RLU)-ban adtuk meg.

Az (A), (C) és (D) ábrákon bemutatott kísérleteket 3 párhuzamos mintával végeztük, melyeknek átlagát±/szórás ábrázoltuk.



3.10. Ábra. A savas SMáz gátlása a Bcl-2 expresszió csökkenését akadályozza. A 12 óráig desipramin jelenlétében vagy távollétében (l. 9. ábra) Gal-1-gyel stimulált Jurkat sejt lizátumát SDS-poliakrilamid gélben futtattuk, majd Western blottingban anti-Bcl-2 monoklonális ellenanyaggal illetve anti-aktin nyúl szérummal vizsgáltuk a fehérjék mennyiségét. A röntgen film denzitometrlása után a Bcl-2 fehérje mennyiségét az ugyanazon a filteren meghatározott aktin mennyiségére vonatkoztattuk.

Előzetes tanulmányok [81] igazolták, hogy Gal-1 kezelés hatására membrán mikrodomainek, raftok jönnek létre a kezelt sejt plazmamembránjában. A ceramid ezeknek a raftoknak integrális komponense lehet [160], így kézenfekvő a ceramid szubcelluláris lokalizációját vizsgálni annak eldöntésére vagy cáfolatára, hogy a ceramid hatása a membrán mikrodomainek átrendeződésében betöltött szerepének vagy úgynevezett másodlagos jelátvivőként való funkciójának köszönhető-e. A konfokális mikroszkópiás vizsgálat a ceramid Gal-1 kezelés hatására történő intracelluláris foltos megjelenését mutatja (3.12. Ábra). Ez a mintázat jól megkülönböztethető a raftokra jellemző GM-1 gangliozid festődésétől. A ceramid tehát nem a raftok alkotórésze, amit

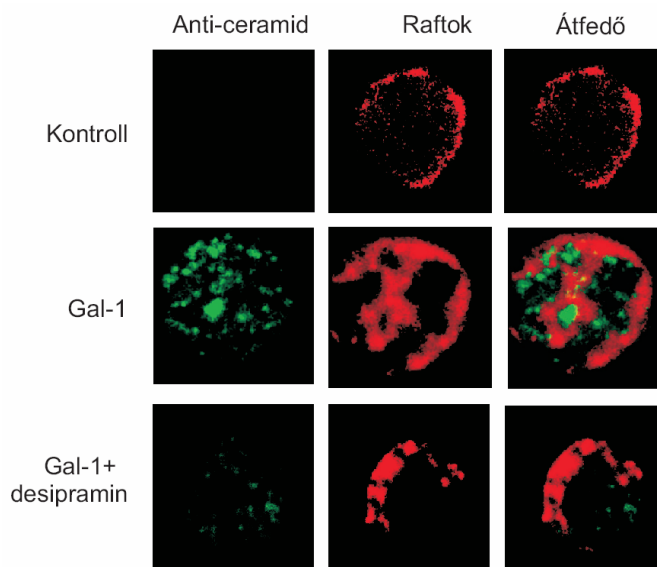


3.11.Ábra. A ceramid anti-apoptotikus metabolitja gátolja a Gal-1 indukált apoptózist. Jurkat sejteket 5 μ M szfingozin-1-foszfát (S1P) vagy 50 ng/ml forbol-dibutirát (PdBu) jelenlétében vagy távollétében Gal-1-gyel stimuláltunk. Ezután vizsgáltuk (A) az MMP változását (l. 6D ábra), (B) a PARP degradációját Western blottinggal (l. 6E ábra) és (C) a 'sub'-G1 sejtek mennyiségét (l. 6F ábra).

A kívülről hozzáadott ceramid (10 μ M) apoptotikus hatását S1P és PdBu jelenlétében és távollétében vizsgáltuk a 'sub'-G1 sejtek kialakulásának nyomon követésével (l. 6A ábra).

az is igazol, hogy a ceramid felszabadulás gátlása desipraminnal nincs hatással a Gal-1 indukált raftok elrendezésére.

A különböző sejt stimulációk hatására létrejövő membrán újrendeződés a szignál átvitel fontos feltétele, hiszen ezekben a membrán szigetekben gyűlnek össze a jelátvitelhez szükséges fehérjék. A raft képződés a Gal-1 stimulált apoptózisban is alapvető esemény, mert ennek a koleszterol-kezelő β -ciklodextrinnel való gátlása azt eredményezi, hogy a ceramid felszabadulás (3.13A. Ábra), a mitokondriális membrán depolarizációja (13B. Ábra) és a kaspáz 9 és három aktiválódása (3.13C és D. Ábra) elmarad.

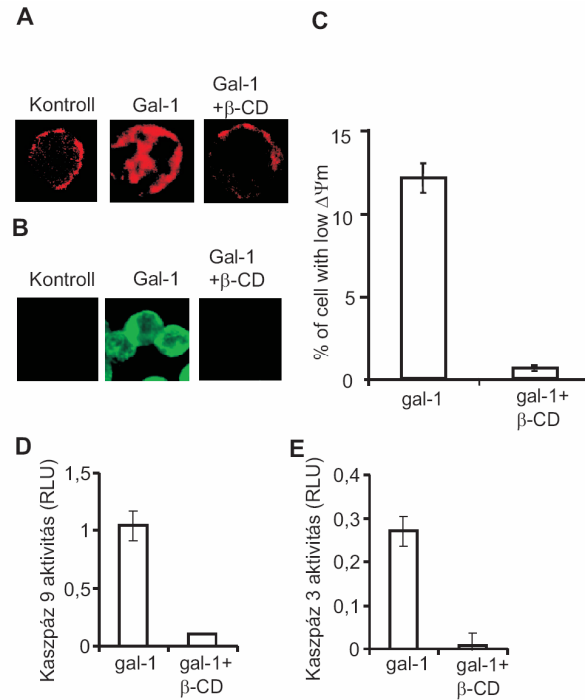


3.12. Ábra. A Gal-1 kezelés hatására felszabaduló ceramid nem a membrán raftok komponense. Jurkat sejteket 20 μ M desipraminnal 2 órán át előinkubáltunk, majd Gal-1-gyel 12 órát stimuláltunk. A fixált és permeabilizált sejteket ezután anti-ceramid mAb és biotinilált anti egér IgM/Streptavidin-FITC-cel (zöld), és a GM1 raft komponenst festő Alexa647-koleratoxin-B alegység (CTX-B)-gel (piros) jelöltük.

4. A Gal-1 az apoptózis mitokondriális útvonalát stimulálja

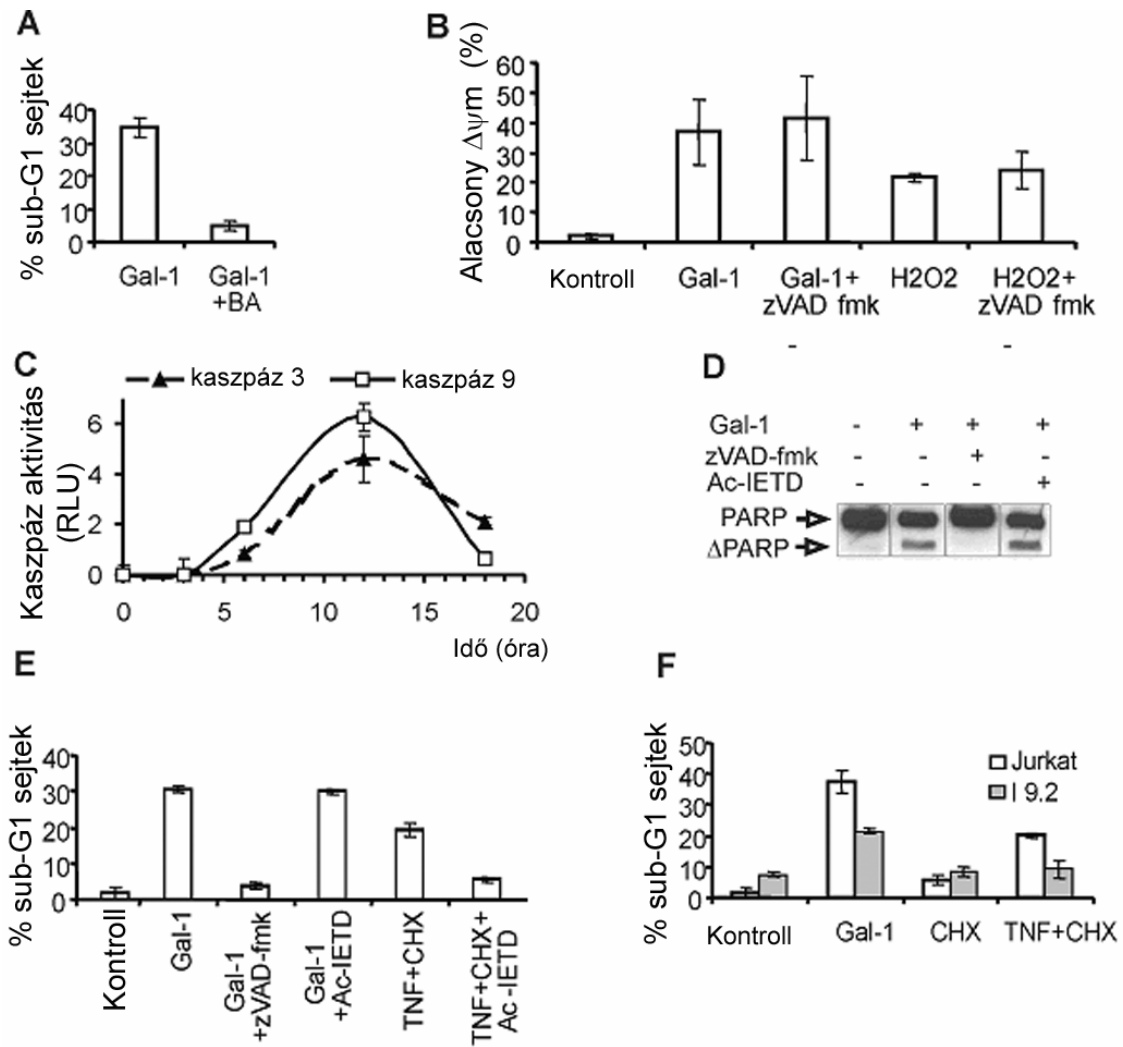
A „halál” szignálok alapvetően két belépési helyen keresztül indíthatják el az apoptózis folyamatát: A „halál” ligandok, a TNF család tagjai a TNF receptor családdhoz tartozó sejtfelszíni molekulák keresztkötésével indukálják a sejt halált. Nem nekrotikus

koncentrációjú drogok, UV sugárzás vagy fizikai stresszhatások közvetlenül a mitokondriumra hatnak. Kérdés, hogy a Gal-1 melyik útvonalat (receptor vagy mitokondriális) aktiválja. Ennek eldöntésére a mitokondriális útvonalat, ennek specifikus inhibitorával, bongkrekán savval gátoltuk. A 3.14A. Ábra mutatja, hogy a mitokondriális események gátlása blokkolja az apoptotikus sejtválaszt.



3.13. Ábra. *A membrán raftok kialakulása szükséges a további apoptotikus folyamatok létrejöttéhez.* A sejteket 10 mM β -ciklodextrin (β -CD) jelenlétében vagy távollétében 12 (A és B) vagy 16 (C, D és E) órát Gal-1-gyel stimuláltunk. (A) A konfokális mikroszkópos analízist a 12. ábra alatt leírtak szerint végeztük. (B) A ceramid felszabadulást fluoreszcenciás mikroszkópos analízissel követtük (l. 6C ábra). (C) Az MMP változását a 6D ábra alatt leírtak szerint végeztük. (D és E) a kaszpáz 9 (D) és 3 (E) aktivitás mérését a 9D ábra alatt leírtak alapján mértük.

Az általános kaszpáz inhibitor, z-VAD-FMK jelenléte nem befolyásolja az MMP csökkenését, jelezve, hogy a kaszpázok aktiválódása a mitokondriális változások után történik (14B. Ábra). Ezzel összhangban a z-VAD-FMK nem befolyásolja a mitokondriális stresszválaszt indukáló H_2O_2 hatását sem (3.14B. Ábra). A mitokondriumban összefutó apoptotikus szignálok a kaszpáz 9-en keresztül indítják el a



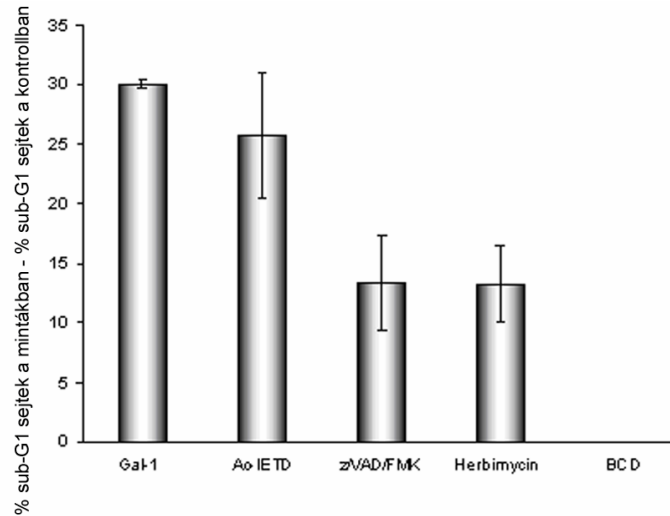
3.14. Ábra. A Gal-1 az apoptózis mitokondriális útját stimulálja. (A) Jurkat sejteket Gal-1-gyel stimuláltunk bongkrekán sav (BA) jelenlétében vagy távollétében 24 órán keresztül, majd a 6F ábra szerint meghatároztuk a 'sub'-G1 sejt populáció méretét. (B) 1,8 μ M Gal-1-gyel, vagy 20 μ M H₂O₂-vel 16 órán keresztül stimuláltuk a sejteket z-VAD-FMK-val együtt vagy anélkül, majd a 6D ábránál leírtak szerint mértük az MMP változást. (C) A kaspáz 9 és 3 aktivitás változását a stimuláció különböző időpontjaiban mértük (lásd 9D ábra). (D) A PARP degradációját 50 mM z-VAD-FMK vagy Ac-IETD jelenlétében vizsgáltuk Western blottinggal (l. 6E ábra). (E) A DNS tartalom meghatározását Gal-1-gyel, vagy 50 ng/ml TNF α és 1,5 mg/ml cikloheximid (CHX) kombinációjával kaspáz inhibitorokkal vagy azok nélkül kezelt sejtekben vizsgáltuk (l. 6F ábra). (F) Vad vagy kaspáz 8 deficiens (I 9.2) sejteket Gal-1-gyel, vagy TNF α -val kezeltünk és 24 óra múlva mértük a DNS tartalmat.

kaspáz kaszkád aktiválódását. A kaspázok aktiválódásának időbeli lefutását mutatja a 14C. Ábra. A kaspáz 9 aktiválódása megelőzi a kaspáz3-ét, és meredekebben csökken az idő elteltével, mint a kaspáz 3-é. A széles spektrumú kaspáz inhibitor, a z-VAD-FMK, de nem az iniciátor kaspáz 8 inhibitor, az Ac-IETD, gátolja a kaspázok működését és így a PARP hasítást (14D Ábra) és következményképpen a 'sub-G1' sejtfrakció kialakulását (3.14E. Ábra). Ezzel szemben a kaspáz 8 inhibitor készséggel gátolja az ismert receptor mediált apoptózist kiváltó TNF hatását (3.14E. Ábra). További bizonyítékot szolgáltat a 3.14.F. ábrán bemutatott kísérlet arra, hogy a kaspáz 8 aktivitás nem szükséges a Gal-1 indukált apoptózishoz. Kaspáz 8 deficiens Jurkat sejtek apoptózissal elpusztulnak Gal-1 hatására, ugyanakkor rezisztensek TNF kezelésre, melynek szüksége van a kaspáz 8 aktivitására (3.14F. Ábra).

A fenti kísérletek egyértelműen bizonyítják, hogy Gal-1 indukált sejthalál nem a kaspáz 8 függő receptor mediált útvonalon folyik.

5. Egészséges aktivált T limfociták a leukémiás T sejtekhez hasonló sejtválaszt adnak

Az eddigi vizsgálatok a leukémiás Jurkat T sejteken történt. Ennek oka, hogy ezek a sejtek könnyebben fenntarthatók sejt kultúrában és számos, a jelátvitelben fontos szerepet játszó szignálmolekulában deficiens változat áll rendelkezésre. Ez megkönnyíti, hogy az egyes lépések biológiai szerepét vizsgáljuk a teljes szignáltranszdukciós folyamatban. A kérdés azonban fennáll, hogy vajon ezek a beteg sejtek azonos módon reagálnak-e az apoptotikus kezelésre, mint az egészséges aktivált T limfociták. Egészséges donortól származó PHA aktivált és IL-2-n fenntartott T limfoblasztokat hasonló módon kezeltünk Gal-1-gyel, mint a Jurkat sejtek. A 3.15. Ábra mutatja, hogy az apoptózis mértéke nem befolyásolható a kaspáz 8 gátlószerrel (Ac-IETD), de csökkenthető általános kaspáz-gátlóval (z-VAD-FMK), és tirozin kináz inhibitorral (herbimycin) és blokkolható raft inhibitorral (β -ciklodextrin). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a leukémiás sejtekben meghatározott, Gal-1 által kiváltott apoptózis mechanizmusa hasonló vagy azonos a leukémiás T sejtekben zajló folyamatokkal.



3.15. Ábra. Az apoptózis molekuláris eseményei hasonlóak leukémiás és egészséges aktivált T sejtekben. Aktivált perifériás T limfocitákat stimuláltunk a 50 nM Ac-IETD vagy z-VAD-FMK, 1 μ M herbimycin A, illetve 10 mM β -ciklodextrin (BCD) jelenlétében vagy távollétében. A kezelés 16. órája után citofluoriméterrel mértük a 'sub'-G1 sejtek mennyiségét.

A Gal-1 által indukált apoptózis és a lektin-szénhidrát kölcsönhatás összefüggése

Fajka-Boja R és mtsai, Gercsó Andrea és mtsai. Nem közölt adatok

1. *A Gal-1 minimális ligandja, a laktóz, nem gátolja teljesen a Gal-1 sejtekhez való kötődését és internalizálódását és nem gátolja az apoptózist*

A szakirodalom a Gal-1 citotoxikus hatását a Gal-1 lektin természetéből eredzetteti, vagyis, hogy a fehérje és a sejtfelszíni glikokonjugátumok kölcsönhatása az alapvető szignál az indukált sejthalálra. A fenti kölcsönhatás révén megvalósuló biológiai válasz gátolható a Gal-1 minimális ligandjával, laktózzal. Az első fejezetben már bemutattuk, hogy a Gal-1 fő receptoraként jellemzett CD45 továbbít ugyan biokémiai jeleket a T sejtekbe, ezek azonban nem szükségesek a Gal-1 által kiváltott apoptózishoz. Vajon

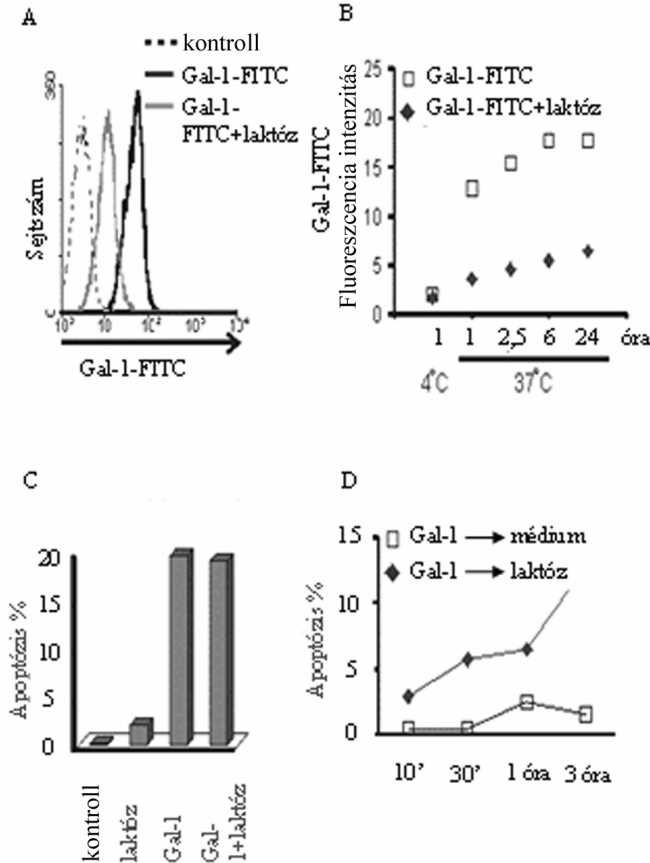
szükséges-e a Gal-1 lektin tulajdonsága a T sejtekre gyakorolt citotoxikus hatáshoz? Ezt kívántuk megválaszolni az alábbi kísérletekben:

A sejtekhez kötődött fluoreszcens festékkel jelölt Gal-1 nem távolítható el teljesen laktózzal, ahogy azt a 3.16A. Ábra mutatja. A kötődött Gal-1 10-15%-a még 100mM (50000-szeres moláris felesleg) laktóz jelenlétében is a sejteken marad és ez így van akkor is, ha a Gal-1 nincs jelölve (nincs adat bemutatva). Ha sejteket 4°C helyett 37°C-on kezeljük a lektinnel, akkor a fehérje internalizálódik (l. 3.2. Ábra). A 3.16B. Ábrán bemutatott kísérletben a sejteket citrát (pH 5.2) pufferrel mostuk. Ez a kezelés eltávolítja a sejt felszínen kötődött, nem internalizálódott fehérjét, így a mért fluoreszcencia intenzitás az intracelluláris Gal-1-FITC mennyiségét mutatja. Laktóz jelenléte csökkenti a Gal-1 internalizálódását de nem gátolja teljesen. Ez összhangban van azzal az eredményünkkel, hogy az ismert Gal-1 kötő sejt felszíni fehérjék, a CD45 (3.2. Ábra), CD43, CD3, CD4 és CD7 (nincs adat bemutatva), nem ko-internalizálódnak a Gal-1-gyel.

Felvetődik az a kérdés, hogy a laktóz-gátlás esetén, a sejteken maradó, illetve internalizálódó Gal-1 elegendő-e az apoptózis indukciójához. A 3.16C. ábrán láthatjuk, hogy a magas koncentrációjú laktóz jelenléte nem gátolja a Gal-1 által kiváltott apoptózist. Ellenkezőleg, 1-3 óra kezelés esetén, amikor a Gal-1 még nem okoz, a 'sub'-G1 sejtfrakció kialakulásával járó, késői apoptózist (ez csak a 10. óra után következik be, (3.6F. Ábra), laktóz jelenléte úgy érzékenyíti a Gal-1 citotoxikus hatását, hogy 1 óra után már apoptotikus sejtek azonosíthatók a sejt kultúrában. Az apoptotikus válasz laktóz általi felgyorsítása, vagy erősítése szuboptimális (rövid idejű stimuláció) körülmények között, illetve a gátlás hiánya arra is utalhat, hogy bár a Gal-1 hatása nem lektin-cukor kölcsönhatás révén valósul meg, mégis ez az interakció szükséges a fehérje biológiailag aktív konformációjának kialakításához.

2. Különböző koncentrációjú Gal-1 kezelések eltérő apoptotikus folyamatokat indukálnak

A szakirodalomban publikált közlemények egy része kísérletesen is bemutatta, hogy a Gal-1 által okozott apoptózis gátolható minimális ligandjával, laktózzal [112;136;161]. Az alapvető különbség az ezekben a cikkekben és az általunk alkalmazott rendszerek között, hogy az előbbiek 20 μM (280 $\mu\text{g/ml}$), míg mi 1,8 μM (25 $\mu\text{g/ml}$) Gal-1-et használtunk



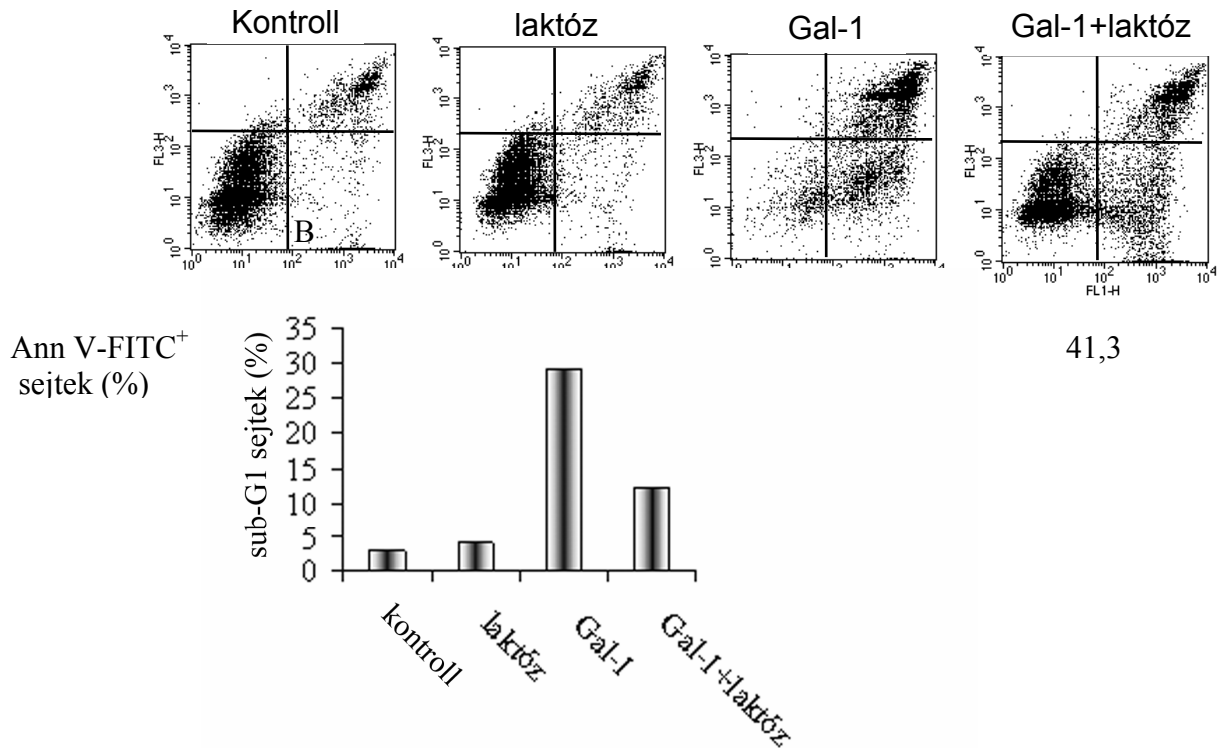
3.16. Ábra. Az apoptózis és a Gal-1 internalizációja nem gátolható a lektin minimális ligandjával, laktózzal. (A)

Jurkat sejteket 3,6 μM FITC-cel kapcsolt Gal-1-gyel inkubáltunk 100 mM laktóz jelenlétében vagy távollétében 3 órán át 37°C-on és citofluoriméterrel mértük a fluoreszcencia intenzitást. (B) A sejteket 1 órán át 4°C-on vagy a bemutatott ideig 37°C-on az (A) panelhez leírtak szerint kezeltük, majd a sejtek felszínén maradt Gal-1 FITC-cet citrát pufferrel (pH 5.2) eltávolítottuk és citofluorimetriával mértük a fluoreszcencia intenzitást. (C) A 24 óra alatt Gal-1-gyel indukált apoptózist 100mM laktóz jelenlétében mértük a 'sub'-G1 sejtfrakció kialakulásával citofluorimetriával. (D) a (C) ábra alatt leírtak szerint mértük az apoptózist a grafikonon jelölt időpontokban.

az apoptózis indukációjához. A több mint 10x-es különbség alapvetően két dolgot eredményezhet: 1. a Gal-1 7 μM koncentráció alatt főleg monomer állapotban van [39],

amelynek a konformációja és preferált ligandja(i) eltérhet(nek) a dimer formáétól; 2. a magas koncentrációjú Gal-1 nagyobb valószínűséggel kerül kölcsönhatásba az akár kisebb affinitással kapcsolódó glikozilált Gal-1-kötő molekulákkal, melyeken keresztül laktózzal gátolható apoptotikus szignál kerülhet a sejtekbe. Ha ez a feltételezés igaz, tehát, hogy az alacsony és magas koncentrációjú Gal-1 más mechanizmus szerint okoz apoptózist, és nem a rekombináns Gal-1 fehérje preparátumok közötti különbség eredményezi az eltérést, akkor az általunk készített Gal-1 magas koncentrációban laktózzal gátolható apoptózist kell, hogy okozzon. Amint azt a 3.17. Ábra mutatja a 250 µg/ml Gal-1 által okozott sejtpusztulás laktóz jelenlétében nagymértékben csökken.

A



3.17. Ábra. A magas koncentrációjú Gal-1 által kiváltott apoptózis laktózzal gátolható. (A) Jurkat sejteket 18 µM Gal-1-gyel 6 órán keresztül 100mM laktózzal, vagy anélkül stimuláltunk, majd AnnexinV-FITC-cel (AnnV-FITC) festettük és citofluorimetriával analizáltuk. (B) A sejteket a (A) ábra alatt szerint 24 óráig kezeltük, majd citofluorimetriával mértük a 'sub'-G1 sejtfraakció kialakulását.

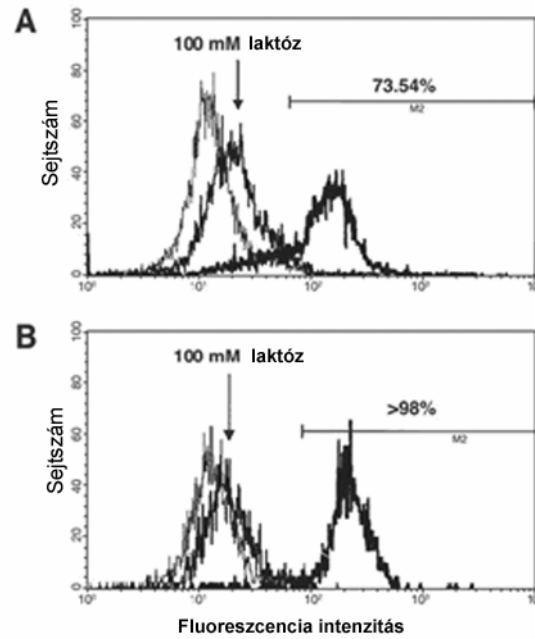
Ez a PS sejtfelszíni expozíciójában (3.17A. Ábra), mind a 'sub'-G1 sejt frakció kialakulásának gátolhatóságában (3.17B. Ábra) kimutatható. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a Gal-1 alacsonyabb koncentrációban (1,8 μ M) fehérje-fehérje kölcsönhatás révén fejt ki citotoxikus hatását, olyan sejtfelszíni fehérjével kerülve kapcsolatba, melynek affinitása nagyobb a Gal-1-hez, mint a lektinnek a cukor oldalláncokhoz való affinitása. Ezt támasztja alá, hogy a Gal-1 nem szorítható le teljesen a sejtfelszínről laktózzal, és hogy az indukált apoptózis nem gátolható a minimális liganddal. Magasabb koncentrációban azonban a lektin-cukor kölcsönhatás is érvényesül és a Gal-1 a glikoproteineken is képes az apoptotikus szignált a sejtbe juttatni. Nem zárható ki azonban, hogy a nem cukor-lektin kölcsönhatás révén megvalósuló apoptózis is igényli a lektin cukorhoz való kötődését, amit a sejtfelszíni glikokonjugátumok, laktóz jelenlétében pedig a minimális ligand biztosítanak.

Gal-1 szabályozza a csontvelő sejtek differenciálódását és életképességét

Vas V és mtsai 2005. Stem Cells **23**, 279-287

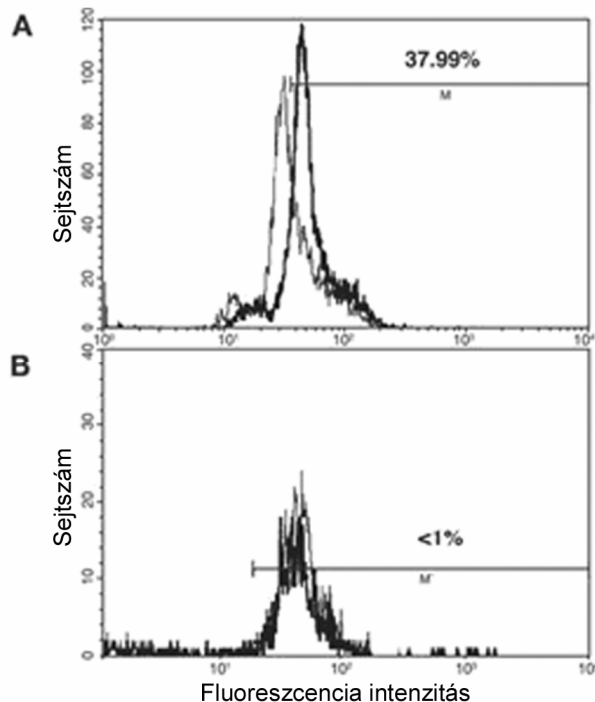
1. A csontvelő sejtek Gal-1 kötő sejtfelszíni struktúrákat hordoznak és egyrésztük Gal-1-et expresszál

A nem-frakcionált (3.18A. Ábra) és a lin⁻ (legéretlenebb sejtek) (3.18B. Ábra) csontvelői (csv) sejtek Gal-1 kötő sejtfelszíni struktúrákat hordoznak. Érdekes módon a teljes csv sejt populációt reprezentáló frakciónak mintegy 30 %-a nem köt Gal-1-gyet. Ezek a sejtek az érett fenotípusú sejtek közé tartoznak, CD3 ϵ , CD45R/B220, CD11b, Ly-6G és TER-119 pozitív sejtek keveréke (nincs adat bemutatva). Magas koncentrációjú laktóz nagymértékben, de nem teljesen, gátolja a Gal-1 kötődését a sejtekhez (3.18. Ábra)



3.18. Ábra. *A csontvelő sejtek Gal-1 kötő sejtfelszíni struktúrákat hordoznak. Teljes (A) vagy nem-elkötelezett, Lin⁻ (B) csv sejteket Gal-1-gyel kezeltünk laktóz jelenlétében vagy anélkül. Mosás után nyúl anti-Gal-1 F(ab')₂-öt, majd kecske anti-nyúl Ig-FITC-et adtunk a sejtekhez. A mintákat citofluoriméterrel analizáltuk.*

A csv sejtek nagy része nem termel endogén Gal-1-et (3.19. Ábra). A nem frakcionált csv sejtek 30 %-nál kimutatott Gal-1 expresszió az adherens (sztróma) sejteknek tulajdonítható (3.19A. Ábra).



3.19. Ábra. A teljes csontvelő sejtpopuláció mintegy 30 % Gal-1-et expresszál. Teljes (A) vagy Lin⁻ (B) csv sejteket permeabilizáltunk és nyúl anti-Gal-1 F(ab')₂-öt, majd kecske anti-nyúl Ig-FITC-et adtunk a sejtekhez. A mintákat citofluoriméterrel vizsgáltuk.

2. A Gal-1 koncentrációtól függő bifázikus módon szabályozza az elkötelezett hemopoietikus sejtek növekedését

Az 3.I. táblázat mutatja, hogy a granulocytá-monocytá (GFU-GM) és erythrocytá (BFU-E) irányba elkötelezett érett csv sejtek alacsony koncentrációjú (10 ng/ml) Gal-1 hatására fokozott növekedést mutatnak, ugyanakkor magas (10 µg/ml) koncentrációjú Gal-1 gátolja ezeknek a sejteknek a szaporodását.

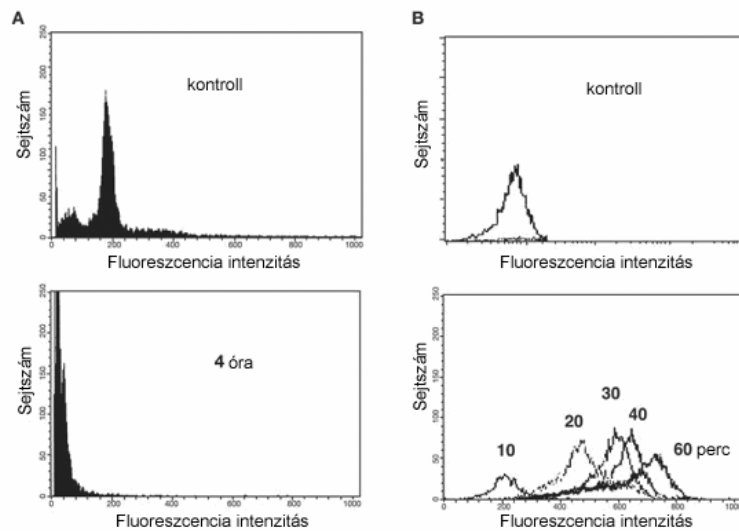
A Gal-1 növekedés gátló hatása apoptózis indukáló képességének tulajdonítható (3.20. Ábra). A 10 µg/ml koncentrációjú Gal-1 már 20 perc stimuláció után stimulálja a PS

Galektin-1 ($\mu\text{g/ml}$)	Kolónia szám/ 10^5 sejt			
	Egér csv magvas sejtek		Emberi csv mononukleáris sejtek	
	CFU-GM	BFU-E	CFU-GM	BFU-E
kontroll	142.5 ± 3.5	61.5 ± 6.4	174.0 ± 9.5	83.8 ± 7.2
10.0	0.0^a	0.0^a	0^a	0.0^a
1.0	117 ± 10.6^a	72.0 ± 4.2^a	149.5 ± 10.5^a	68.8 ± 6.6^a
0.1	160.0 ± 7.1^a	82.5 ± 6.4^a	199.9 ± 8.9^a	95.9 ± 7.9^a
0.01	230.0 ± 7.1^a	85.5 ± 6.4^a	239 ± 7.5^a	111.5 ± 11.5^a
0.001	157 ± 10.6^a	55.5 ± 5.4	201 ± 11.0^a	91.2 ± 8.2

3.I. Táblázat Alacsony és magas koncentrációjú Gal-1 különböző módon befolyásolja az érett cs sejtek növekedését. A CFU-GM és BFU-E kolónia számot a sejtek fél lág agarban történő növekedésével határoztuk meg Gal-1 jelenlétében vagy anélkül, a tenyésztés 9 és 14. napján. A táblázatban szereplő értékek 5 minta átlagát \pm szórás mutatják.

^aSzignifikáns különbség (>0.05) a kontrollhoz viszonyítva

Rövidítések: Csv: csontvelő; CFU-GM: monocita-granulocita kolóniaformáló egység; BFU-E: eritrocita kolóniaformáló egység



3.20. Ábra. A magasabb koncentrációjú Gal-1 növekedés gátló hatása apoptózis indukciónak tulajdonítható. (A) A nem-letapadó egér csv sejteket $10 \mu\text{g/ml}$ Gal-1-gyel inkubáltuk 4 órán keresztül, majd a DNS tartalmat, a sejtek propidium joddal történő festése után, citofluorimetriával határoztuk meg. (B) A fenti sejtek Annexin V-FITC kötő képességét (mely a PS expozíció mértékét mutatja) 10, 20, 30, 40, és 60 perc Gal-1 kezelés után citofluorimetriával vizsgáltuk.

sejtfelszíni expozícióját (3.20A. Ábra) és 4 óra alatt az összes sejt pusztulását okozza, melyet a 'sub'-G1 sejtpopuláció kialakulásával mértünk.

A különböző koncentrációjú Gal-1 kezelésnek nem csak a hatása, de a mechanizmusa is eltérő. Az alacsony koncentrációval előidézett növekedésserkentés a Gal-1 lektin tulajdonságától függ, a Gal-1 ligandja, a laktóz gátolja a lektin ilyen biológiai hatását (3.II. táblázat). Ezzel szemben az apoptózis indukáló hatás (10 µg/ml Gal-1) nem függ a fehérje cukorkötő képességétől és ennek megfelelően ez a hatás nem módosítható laktóz hozzáadásával (3.II. táblázat).

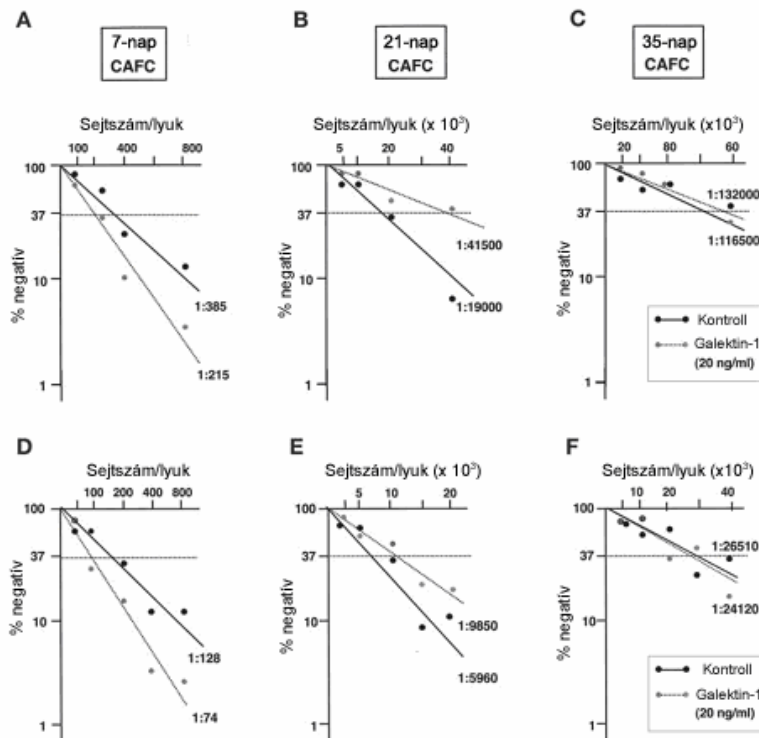
Galektin-1 ($\mu\text{g/ml}$)	Laktóz (30 mM)	Szukróz (30 mM)	CFU-GM/ 10^5 csv. magvas sejtek	BFU-E/ 10^5 csv. magvas sejtek
Kontroll	-	-	108.0 ± 6.2	51.0 ± 4.1
	+	-	111.7 ± 8.8	52.1 ± 5.1
	-	+	104.5 ± 9.8	49.6 ± 4.4
10.0	-	-	0.0 ^a	0.0 ^a
	-	-	0.0 ^a	0.0 ^a
	-	+	0.0 ^a	0.0 ^a
5.0	-	-	9.2 ± 2.1^a	5.1 ± 2.1^a
	+	-	8.9 ± 3.3^a	3.2 ± 1.5^a
	-	+	10.4 ± 4.1^a	3.9 ± 3.3^a
0.1	-	-	115.1 ± 4.1	61.1 ± 4.1
	+	-	97.8 ± 5.5	51.2 ± 3.3
	-	+	111.8 ± 3.9	60.6 ± 5.7
0.01	-	-	141.4 ± 6.4^a	73.3 ± 5.1^a
	+	-	103.2 ± 6.1	50.5 ± 4.1
	-	+	138.2 ± 4.3^a	69.8 ± 5.4^a

3.II. Táblázat *Laktóz gátolja az alacsony de nem befolyásolja a magas koncentrációjú Gal-1 biológiai hatását.* A CFU-GM és BFU-E számot Gal-1 jelenlétében vagy távollétében laktózzal, vagy anélkül határoztuk meg fél-lágy agarban 9 és 14 napig tartó növekedés után. Az értékek 3 párhuzamos minta átlagát +/- szórás mutatják.

^aSzignifikáns különbség (>0.05) a kontrollhoz viszonyítva

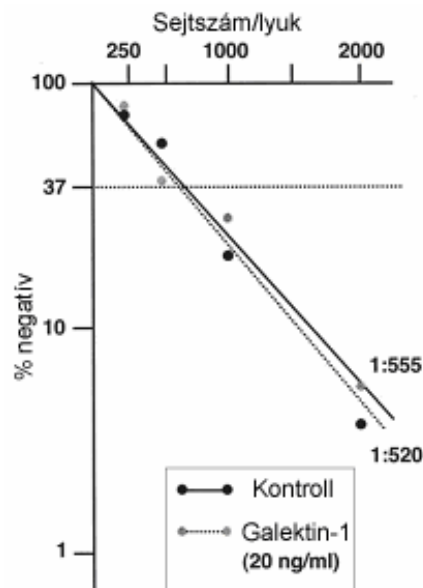
3. Az elkötelezett csv sejtek érzékenyebbek a Gal-1 hatására, mint az éretlen lyn-
őssejtek

A Gal-1 hatását a különböző érettségű csv sejtekre a limitált hígítási módszert használó, úgynevezett „macskakő” formáló assay-ben (cobblestone area forming cells=CAFC) vizsgáltuk. A 35 napos kísérletben az eltérő érettségű sejtek más-más időben nőnek a kultúrában: először legérettebb, elkötelezett sejtek (7-14 napos CAFC), majd a közepes (21 napos CAFC), végül a legkevésbé érett őssejtek (35 napos CAFC) alkotnak kolóniát.



3.21. Ábra. A Gal-1 különböző módon hat az eltérő érettségű sejtek CAFC gyakoriságára. Egér (A,B,C) és emberi (D,E,F) csv sejteket 20 ng/ml Gal-1 jelenlétében vagy távollétében limitált hígítási módszerrel 96 lyukú szövettenyésztő lemezre osztottunk szét. A „macskakő” képződményeket (CAFC) az egyes lyukakban 7-35. napig hetenként értékeltük. A 7-napos (A,D), 21-napos (B,E) és 35-napos (C,F) CAFC gyakoriságot az L-Calc programmal (Stem Cell Technologies) számoltuk.

Az alacsony koncentrációjú (20 ng/ml) Gal-1 mind egér, mind emberi csv-ből származó 7 napos CAFC sejtek számát növelte (3.21A és D Ábra), szemben a 21 napos CAFC-cal melyek kis mértékben, de reprodukálhatóan csökkentette (3.21B és E Ábra). A legéretlenebb 35 napos CAFC sejtek növekedését nem befolyásolta a Gal-1 jelenléte (3.21C és F Ábra). Ez utóbbi sejtek válaszképtelensége a Gal-1 kezelésre nem a sejtek nagyon alacsony számának köszönhető a csv preparátumban, ahogy azt a 3.22. Ábra mutatja. Az érettebb sejtektől elkülönített Lin^- csv sejtek 35 napos CAFC kultúrája szintén érzéketlen volt a Gal-1 jelenlétére.



3.22. Ábra. . Az éretlen Lin^- csv sejtek nem reagálnak alacsony koncentrációjú Gal-1 kezelésre. Egér Lin^- sejtek arányát 1:80,000-ról 1:400-ra növeltük a csv sejtek frakcionálásával, majd a 21. ábra alatt leírt kísérleti rendszerben vizsgáltuk ezeknek a sejteknek a CAFC gyakoriságát 20 ng/ml Gal-1 jelenlétében és hiányában a tenyésztés 35. napján.

Magas koncentrációjú Gal-1 (5-10 μ g/ml) jelenléte nagymértékben citotoxikus a 7 napos érett CAFC sejtekre (3.III. táblázat). A toxicitás mértéke a kevésbé érett sejtek felé

csökken a következő sorrend szerint: 7 napos > 14 napos > 21 napos > 28 napos > 35 napos CAFC. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Gal-1 növekedés gátló hatása a sejtek érettségével fokozódik.

Sejtek	Idő (nap)	CAFC gyakoriság		
		Középérték	Galektin-1	
			5µg/ml	10µg/ml
Csontvelő magvas sejtek	7	1:421	<1:10 ⁶	NA
	14	1:1,655	<1:10 ⁶	NA
	21	1:9,548	1:951,566 (99.7)	NA
	28	1:32,252	1:695,200	NA
	35	1:125,450	1765,351 (6.1)	NA
Lin ⁻ csontvelő sejtek	28	1:332	1:6,966 (21.0)	1:15642 (47.1)
	35	1:496	1:3,158 (6.4)	1:9,951 (20.1)

3.III. Táblázat . *A csv sejtek a differenciálódás előrehaladtával egyre érzékenyebbé válnak a magas koncentrációjú Gal-1 citotoxikus hatására.* Teljes és Lin⁻ csv sejteket 4 órán keresztül 5-10 µg/ml Gal-1-gyel, majd a nem kötődött Gal-1-et mosással eltávolítottuk és a sejtek növekedését (CAFC gyakoriság) 35 napon keresztül a megadott időpontokban vizsgáltuk.

4. MEGBESZÉLÉS

A Gal-1 a galektin család legkorábban felfedezett tagja. Az intenzív vizsgálatok ellenére a Gal-1 irodalmát számos, jelentős ellentmondás szövi át. Ez különösen igaz a Gal-1 immunmoduláló, a T limfocitákra és hemopoietikus csontvelői sejtekre kifejtett citotoxikus hatásának jellemzésére is. Ebben a dolgozatban azokat az eredményeket foglaltam össze, amely alapvető válaszokat adnak a Gal-1 hatásmechanizmusát illetően.

CD45, mint receptor?

A Gal-1 T sejtekre kifejtett apoptotikus hatását elsőként Baum és munkacsoportja írta le két értékes közleményben [84;128]. E cikkek fő érdeme az, hogy ráirányították figyelmet a Gal-1 fontos biológiai aktivitására. Mindkét közleményben hangsúlyozták, hogy a CD45 receptor tirozin foszfatáz a Gal-1 fő receptora és a lektin e molekulán keresztül fejt ki apoptotikus hatását. Igazolással a Gal-1 hatását CD45-re specifikus monoklonális ellenanyagokkal (mAb) gátolták. Érvelésük két szempontból is megkérdőjelezhető: 1. Hogyan gátolhatja egy CD45 fehérje epitóppal reagáló mAb a CD45-ön jelenlevő számos Gal-1 kötő helyet?; 2. Hogyan magyarázható, hogy különféle specifitású (CD3, CD4, CD8, CD43, CD45RA, CD45RB és CD45RO) mAb-ok mind 50%-os mértékben gátolják a Gal-1 kötődését a T sejtekhez? A szerzők nyilvánvalóan műterméket vizsgáltak, amit a mi nem közölt adataink is alátámasztanak: a Gal-1 számos egér monoklonális ellenanyagot köt, specifitásuktól függetlenül, így az ellenanyagok egyszerű kompetítorként alkalmazhatóak a Gal-1 biológiai aktivitásának vizsgálatokor. Ezt valószínűleg a szerzők is belátták, mert későbbi munkájukban (az előbbiek tárgyalása nélkül!) már egyenesen a CD45 gátló szerepéről számolnak be [132]. A Baum csoport kísérletesen próbálta igazolni, hogy talán nem is a Gal-1-kötő molekulák jelenléte, hanem inkább a core 2 O-glikánok jelenléte határozza meg a sejtek Gal-1-gyel szembeni érzékenységét. A core 2 β -1,6-N-acetilglukozaminil transzferáz (C2GnT), amely a laktóزامint hordozó elágazó O-glikánok szintéziséért felelős enzim,

hiányában a sejtek rezisztensek, míg az enzimet expresszáló sejtek érzékennyé válnak a Gal-1 kezelésre [132]. Később Carlow és mtsai [161] cáfolták a C2GnT szerepét a Gal-1 ligandok expressziójában. Az enzim hiányában módosult az O- és N-glikánok laktózamin összetétele, ez azonban nem befolyásolta a Gal-1 által indukált apoptózist.

Mi a CD45 funkció szisztematikus [10;16-18] vizsgálata során leírtuk, hogy a Gal-1 kötődik a CD45-höz [14;15;149]. A lektin-foszfataz kapcsolódás következményeként a CD45 foszfataz aktivitása csökken, és a CD45 egyik markáns szubsztrátja B sejtekben, a *lyn src* tirozin kináz aktivitása szintén downregulálódik [15;147]. A CD45 foszfataz aktivitása jól jellemzett módon szabályozza a *src* tirozin kináz család aktivitását [162], így nem meglepő, hogy a CD45-lektin kapcsolódás ilyen jelátviteli következményekkel jár. A CD45-Gal-1 interakció és a CD45 foszfataz aktivitásának ezt követő csökkenése összhangban van Walzel és mtsai eredményeivel [82]. Kétségtelen, hogy a lektin-CD45 kapcsolódás jelátviteli következményekkel jár. Kérdés, hogy e folyamatoknak van-e szerepe és jelentősége a Gal-1 T sejtekre kifejtett apoptotikus hatásában. Ennek eldöntésére CD45 hiányos Jurkat sejteket (J45.01) használtunk. A Gal-1, a vad típusú sejtekhez hasonlóan, kötődik a deficiens J45.01 sejtekhez, ezekben a sejtekben is tirozin foszforilációt és apoptózist okoz. Ezek az eredményeink összhangban vannak Baum és mtsai által publikáltakkal [132], de ellentétben vannak Walzel és mtsai közlésével [82]. Valószínűsíthető, hogy az ellentmondás oka a Gal-1 különböző tisztítási módjában és a kísérlet során alkalmazott különböző Gal-1 koncentrációkban keresendő (l. később). A Gal-1 citotoxikus hatásának mediátora mindeztáig nem tisztázott. Bár a mi és mások munkái kizárják a CD45 szerepét, a receptort nem sikerült azonosítani. A T sejt receptor (TCR) szóba jöhetne, mint közvetítő molekula, mert a Gal-1 kötődik a TCR-hez [85], és a Gal-1 specifikusan módosítja TCR jelátvitelt [124]. A CD3 stimulációja egyidejű Gal-1 kezeléssel az összes vizsgált timocita sejtpopuláció apoptózisát okozza, melyet az Erk-2 aktivitás drámai növekedése kísér [124]. Ha nem is közvetlen kapcsolódás révén, de a TCR ζ -láncának részleges tirozin foszforilációjának indukciója által a Gal-1 antagonizál az antigén aktiváló hatásával [123]. A TCR abszolút szerepe a Gal-1 apoptózis szignáljában eredményeink szerint kizárható [163], mert a TCR negatív CEM T sejtek

készséggel pusztulnak Gal-1 hatására (nincs bemutatva). A T sejtek Gal-1-kötő sejtfelszíni fehérjéi közül a CD7 molekula állta ki többé-kevésbe a próbát a mai napig, mint a Gal-1 apoptotikus hatásának közvetítője. Az összes vizsgált T sejtvonal, az éretlen timociták és az aktivált T sejtek CD7 pozitívak és érzékenyek Gal-1 kezelésre. A HUT78, amely CD7 negatív, érdekes módon nem válaszol apoptózissal a Gal-1-re, azonban a CD7 genetikai rekonstitúciója a Gal-1 kezelésre adott apoptotikus választ eredményezi [164]. Ezek a CD7⁺ sejtek fiziológiás kapcsolatba kerülnek a tímusz hámsejtekkel a T sejtérés során [165], illetve a perifériás nyirokszervekben a sztróma és dentritikus sejtekkel [166]. A hámsejtek, a fibroblasztok és a dentritikus sejtek Gal-1-et termelnek és a közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás során a Gal-1 a CD7 molekulán keresztül apoptózist okozhat. A fenti eredményeket részben erősíti, részben gyengíti ugyanazon szerzők Sezary sejtekkel végzett kísérlete [89]. Mycosis Fungoides, a legáltalánosabb bőr limfóma, az úgynevezett Sezary T sejtekkel jellemezhető [167]. Ezeknek a sejteknek nagy része CD4⁺ és CD7⁻ fenotípusú T limfocita, és ennek megfelelően a sejtek rezisztensek a Gal-1 indukált sejthalálra [89]. A Sezary sejtek egy része CD7⁺, azonban ezek is ellenállóak Gal-1 kezelésre. A szerzők szerint a CD7⁺ Sezary sejtek Gal-1 rezisztenciája egyfajta specifikus glikozilációs mintázatnak tulajdonítható, amely nem kedvez a Gal-1 kötődésének. Így arra a következtetésre jutnak, hogy a CD7 szükséges, de nem elégséges feltétele a Gal-1 citotoxikus hatásnak. Bár Rappl és mtsai eredményei szintén amellezt szólnak, hogy a CD7⁻ T-sejtek ellenállóak a Gal-1 hatásával szemben, itt azonban a kísérleti körülmények megkérdőjelezhetők, mivel a CD7⁺ Jurkat T sejtek, melyek eddig minden közölt adat szerint nagymértékben érzékenyek Gal-1 kezelésre, ebben a munkában nem pusztultak a lektin hozzáadására [88].

Az eddigi irodalomban közölt eredmények alapján nem nevezhető meg biztonsággal egyetlen T sejt specifikus sejtfelszíni molekula sem, amely a Gal-1 citotoxikus hatásának közvetítője és így a Gal-1 receptora lehetne. A későbbiekben egyik fő célunk ennek a receptornak az azonosítása.

Halál-receptor vagy mitokondrium?

A Gal-1 által kifejtett apoptózis mechanizmusának vizsgálatában az eddig közölt adatokhoz képest jelentős eredményeket értünk el.

Az apoptotikus folyamatok két egyszerűsített útvonalba sorolhatók [168]: a/ Az úgynevezett „kaspáz elsőként” (caspase first) típus első lépése a halál-receptorok valamelyikének oligomerizációja, melyet az iniciátor kaspáz 8, majd az effektor kaspáz 3 aktivációja követ. b/ A másik típus a „mitokondrium először” (mitochondrion first) útvonal, amikor az apoptotikus stimulus közvetlen célpontja a mitokondrium és ezt követi az iniciátor kaspáz 9, majd az effektor kaspáz 3 aktivációja (a fenti elnevezéseket Blatt és Glick-től vettük át [168]). Kísérleteink világosan igazolják, hogy a mitokondriális változások megelőzik a kaspáz 9 aktivációját, így a Gal-1 indukálta sejthalál az apoptózis „mitokondrium először” típusába sorolható. Régebbi vizsgálatok kimutatták, hogy a Gal-1 indukált sejthalál független a Fas/FasL kölcsönhatástól, mivel a Fas mediált apoptózisra érzéketlen MOLT-4 sejtek és, ezzel összhangban, a Fas deficiens *lpr* egerekből izolált aktivált T sejtek Gal-1 kezelés hatására elpusztulnak [84;111]. Eredményeink ezeket az adatokat támogatják, hiszen a halál-receptor által indukált iniciátor kaspáz 8 aktivációnak nincs szerepe a Gal-1 citotoxicitásban. Ugyanakkor a kaspáz 9, majd a kaspáz 3 aktivitása megnő Gal-1 stimulációra. Az összes eddigi irodalmi adattal, beleértve a saját közleményeinket is, ellentmondásban van egy napjainkban megjelent munka: a naiv perifériás T sejtek, melyek általában ellenállóak az apoptotikus stimulusokra, beleértve a Fas stimulációt is [169], késleltetetten (72 óra) bár, de pusztulnak Gal-1 és anti-Fas együttes alkalmazásakor [136]. Ebben az esetben az apoptotikus útvonalak egy keveréke érvényesül, mivel nemcsak a mitokondriális apoptózis iniciátora, a kaspáz 9, de a halál-receptor útvonal iniciátora, a kaspáz 8 is aktiválódik. Az ellentmondó eredmények egyik magyarázata lehet, hogy a naiv és az aktivált perifériás T, illetve az aktivált fenotípusú Jurkat sejtek eltérő jelátviteli rendszert használnak a Gal-1 indukálta sejthalálhoz. Bár ez a feltételezés nem zárható ki, a másik, valószínűbb magyarázat az, hogy a kaspáz 8 egy

visszacsatolás útján aktiválódik. A fenti szerzők ugyanis csak az aktiválódást vizsgálták, a kaszpáz 8 gátlásának eredményét azonban nem. Esetünkben a kaszpáz 8 inhibitor, illetve a kaszpáz 8 hiánya nem gátolta a Gal-1 indukált apoptózist, ami a mi eredményeinket támasztja alá. Megjegyzendő, hogy a mi kísérleteinkben is tapasztalható volt a kaszpáz 8 aktiválódása (nem közölt adat), ami az enzim visszacsatolás után történő működését igazolja.

Az irodalmi és saját adatok egyértelműen igazolják a kaszpázok szerepét az apoptózisban [112;136;137]. Ezzel szemben egy mostanában megjelent cikk kizárja a kaszpázok működését és a Gal-1 indukálta sejthalált a mitokondriális endonukleáz felszabadulással magyarázza [138]. Ez az ellentmondás könnyen feloldható, mivel ebben a munkában nagyon magas koncentrációban (20 μ M) használták Gal-1-et, amely 10x több az általunk alkalmazott lektin mennyiségnél (1,8 μ M). A fehérje ebben, a fiziológiástól valószínűleg távol eső, nagy feleslegben számos receptoron (például CD3, CD45, CD2, stb.) keresztül különböző jelátviteli utakat indíthat be.

Az intracelluláris események időrendjének megállapítása segítséget nyújthat ezen események sorrendjének meghatározásához. A jelátviteli lépések következő sorrendjét határoztuk meg: a korai tirozin foszforilációt a plazma membrán aszimmetria felbomlása követi, melyeknek biokémiai jelei a foszfatidil szerin extracelluláris tér felé fordulása és a ceramid felszabadulása. Ezt követi a mitokondriális membránpotenciál (MMP) csökkenése és a kaszpáz 9 és 3 aktiválódás. A végső szakaszban a kaszpáz szubsztrátok proteolízise és a kromoszómális DNS degradációja zajlik.

A Gal-1 stimuláció a p56^{lck} és a ZAP70 kinázok autofoszforilációját indukálja és tirozin foszforiláció, mely előfeltétele a további apoptotikus lépéseknek, e két kináz aktivitásának tulajdonítható. A két kináz valamelyekének hiányában, illetve a tirozin foszforiláció teljes gátlása esetén minden ezt követő lépés (ceramid felszabadulás, MMP csökkenés, DNS degradáció) elmarad, az enzimek genetikai rekonstitúciója pedig visszaállítja a sejtek Gal-1-re adott válaszát. Ezt az eredményt alátámasztják az irodalmi adatok is, ugyanis az Lck szerepét egyértelműen kimutatták az apoptózis ceramid-mediált [152] és mitokondriális [153;154] útvonalában, melyek a Gal-1 indukált

sejthalálban is központi szerepet játszanak.

A Gal-1 indukált sejthalál mechanizmusában az egyik kulcskérdés a pro-apoptotikus szfingolipid, a ceramid szerepe. A ceramid számos módon játszik szerepet a homeosztázis fenntartásában és a sejtek túlélésében. A TNF receptoron és Fas-on keresztüli apoptózis stimulációkor, vagy UV és ionos sugárzás hatására ceramid szabadul fel [170-172], de nem feltétlenül nem játszik esszenciális szerepet az apoptózisban [173]. Ezért fontos annak eldöntése, hogy a ceramid milyen helyet foglal el a Gal-1 indukált sejthalál jelátvitelében. Az Lck és ZAP70 hiányos Jurkat sejtek Gal-1-gyel történő stimulációjakor elmarad a ceramid felszabadulás, s ennek eredményeként az apoptotikus válasz is, ami a ceramid jelentőségét támogatja. A ceramid anabolikus vagy katabolikus úton keletkezhet az apoptotikus sejtekben, a ceramid szintáz, illetve a sfingomielinázok (SMáz) aktiválásának megfelelően [174;175]. Az anabolikus út effektorának, a ceramid szintáznak gátlása nincs hatással a Gal-1 stimulált sejthalálra. Hasonlóan a katabolikus út egyik enzimének, a neutrális SMáz-nak a blokkolása sem befolyásolja a sejtpusztulást. Ezzel szemben a savas SMáz inhibitorai mind a ceramid felszabadulást, mind az ezt követő lépéseket drámai mértékben akadályozzák. A savas SMáz aktivációjának módja nemcsak a Gal-1 indukálta sejthalál során, de más esetekben sem ismert [176]. Az enzim lizoszómákban helyezkedik el. Bizonyos stimulációkra egy, proteolízis során keletkező, szekretált formája is ismert, utóbbi esetben a membrán extracelluláris felszíne felé néző sfingomielint hasítja. Az azonban nem ismert, hogy az intracelluláris enzim számára hogyan válik szubsztrátja hozzáférhetővé [174]. Saját nem közölt kísérleteinkből tudjuk, hogy a Gal-1 indukció során nem a szekretált forma az effektor enzim, mert egyetlen vizsgált időpontban (1 perctől 16 óráig analizálva) sem tudtunk sejtfelszíni savas SMázt, vagy ceramidot kimutatni.

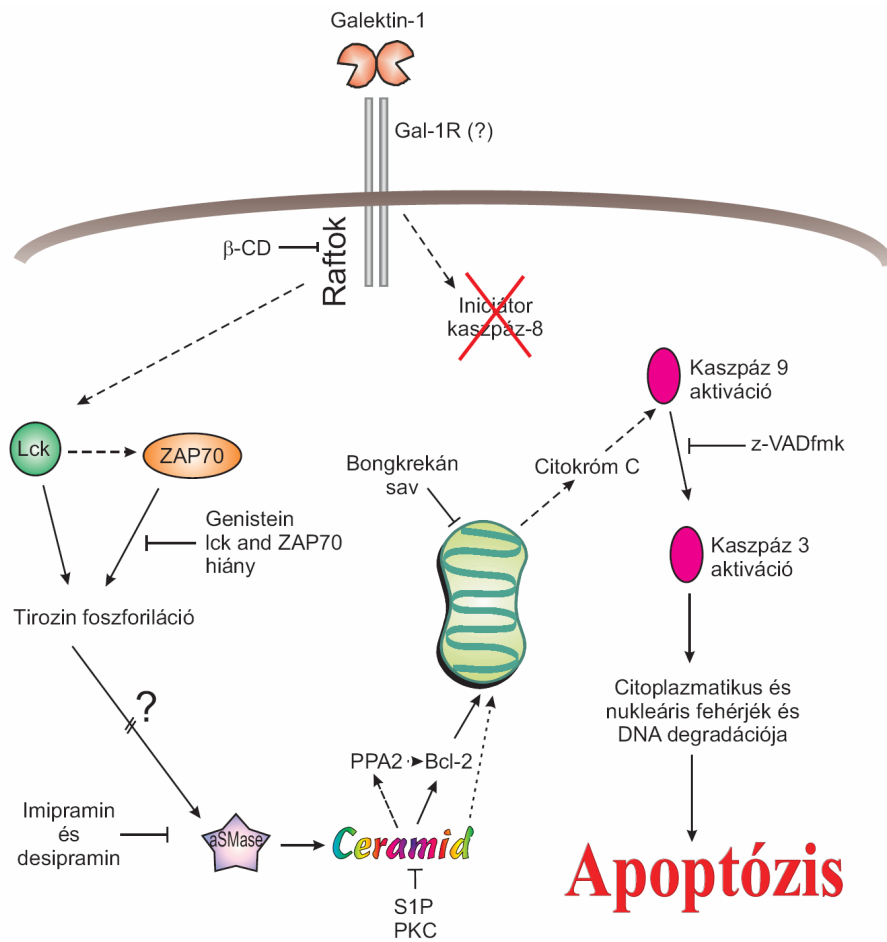
A protein kináz C (PKC) aktivációja a ceramid képződéssel ellentétesen hat, melynek oka, hogy a PKC foszforilálja és így aktiválja a szfingozin kinázt, és ezzel hozzájárul az anti-apoptotikus szfingolipid, az S1P keletkezéséhez [177]. A S1P, a ceramid egy metabolitja, anti-apoptotikus szfingolipid, mely a ceramiddal ellentétben a proliferációt

és a sejtek túlélését támogatja [178;179]. A legújabb közlés szerint az S1P gátolja a savas SMÁzt [180] és gátolja a citokróm C és a Smac/DIABLO felszabadulását a mitokondriumból [181]. Az, hogy a PKC aktiváció és az S1P gátolja nemcsak a ceramid felszabadulást, de a teljes Gal-1 indukálta sejthalált is, azt támasztja alá, hogy a ceramid valóban fontos szerepet tölt be ebben a folyamatban. Mivel a ceramid két ponton, a raftok komponálásában [160;176] és a későbbi lépésekben, mint másodlagos messenger [175;176;182] is részt vehet az apoptózis jelátviteli folyamatában, ezért érdemes tisztázni, hogy a Gal-1 jelátvitelben hol a helye. A ceramid részvétele a lipid platformok kialakulásában feltételezi a stimulációt követő gyors, korai felszabadulást. A sejtek Gal-1 kezelése után, az első 3 órában nem detektálunk ceramidot. A ceramid felszabadulás maximuma egybeesik a PS extracelluláris membrán oldal felé fordulásával, ami azt jelzi, hogy a ceramid keletkezésének feltétele, ebben az esetben, a membrán aszimmetria felbomlása. Ilyen módon nem meglepő, hogy a ceramid szubcelluláris lokalizációja nem fed át a Gal-1 hatására keletkező lipid platformokkal. A raftok keletkezése meghatározó a Gal-1 indukálta apoptózis folyamatában, hiszen a koleszterol keláló β -CD kivédi a sejthalált, beleértve a ceramid felszabadulást is. Ezzel szemben a savas SMÁz inhibitora, a desipramine, nem befolyásolja a raft szerveződést, de gátolja az ezt követő apoptotikus lépéseket, ami azt is igazolja, hogy a ceramid felszabadulás a Gal-1 által indukált raftok kialakulása után történik.

A ceramid, mint jelközlő molekula, részben az anti-apoptotikus Bcl-2 funkciójára hat. A ceramid aktiválja a PP2A szerin-treonin foszfatázt [174-176], melynek egyik szubsztrátja éppen a Bcl-2 [157]. A Bcl-2 70-es pozícióban levő szerin aminosavának defoszforilációja inaktiválja az anti-apoptotikus funkciót [183]. A Bcl-2 foszforilációs állapotának Gal-1 hatására bekövetkező változását nem sikerült igazolnunk, mert a PP2A gátlószere nem volt hatással a Gal-1 stimulált apoptózisra (nem közölt adat). Gal-1 kezelés hatására azonban csökken a Bcl-2 fehérje mennyisége és a ceramid felszabadulás gátlása megakadályozza ezt a folyamatot. A Bcl-2 fehérje mennyiség változása vagy a transzkripció/transzláció szintjén, vagy ubiquitinálással [184;185] a protein degradációja által valósulhat meg. Ennek eldöntésére további vizsgálatokat kell

végeznünk, annál is inkább, mert nincs tudomásunk arról, hogy a ceramid direkt vagy közvetett módon szabályozná az ubiquitinálásért felelős gépezetet.

A Bcl-2 mennyiségének csökkenése azt támasztja alá, hogy a ceramid vagy ezáltal, vagy/és a mitokondriumra való közvetlen hatással szabályozza a Gal-1 indukálta apoptózis folyamatát. A ceramid felszabadulás gátlása ugyanis gátolja a mitokondriális membrán depolarizációját és az azt követő kaspáz aktivációt.



4.1 Ábra. . A Gal-1 indukált apoptózis modellje

A fenti eredmények alapján az eddig legteljesebb, kísérleti eredményekkel alátámasztott, modellt javasoljuk a Gal-1 indukálta sejthalál mechanizmusára a 4.1. Ábrán. Eszerint a

Gal-1 kapcsolódik a T sejtek egy, még nem azonosított receptorához és a membrán lipidek platformmá szerveződését stimulálja. Az intracelluláris lépések első bizonyított eseménye a p56^{lck} és a ZAP70 tirozin kinázok aktivitásának köszönhető tirozin foszforiláció. Ezt követően a savas szfingomielináz aktiválódik, melynek eredményeként ceramid szabadul fel. A kinázok és a szfingomielináz aktiválódása közötti lépések még felderítésre várnak. A ceramid, általunk elsőként bizonyítva, központi szerepet játszik a vizsgált apoptotikus folyamatban. Az intracelluláris ceramid felszabadulását az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérje mennyiségének csökkenése és a mitokondriális membrán potenciál csökkenése követi. A végső lépéseket, a klasszikus mitokondriális apoptózis folyamatának megfelelően, az iniciátor kaszpáz 9 és az effektor kaszpáz 3 aktiválódása, az ezt kísérő fehérje és DNS degradáció jellemzi.

Cukor-lektin kölcsönhatás és apoptózis?

Az ebben a fejezetben tárgyalt eredményeket még nem publikáltuk, tárgyalását mégis fontosnak érzem, mert alapvető jelentőségű a Gal-1 indukálta apoptózis mechanizmusának megértéséhez. A jelenlegi dogma ebben a kérdésben, hogy a Gal-1 biológiai, különösen a citotoxikus hatása, a fehérje lektin tulajdonságának tulajdonítható. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a fehérje biológiai tulajdonságát „lektinológusok” kezdték vizsgálni és mind a mai napig az ezen a területen kutató kollégák vannak túlsúlyban. Az ő következtetéseiket, viszont nagymértékben behatárolja az a szemléletük, hogy a lektinek biológiai aktivitása csak cukor-lektin kölcsönhatás által valósulhat meg.

Jó néhány citokin ismert (IL1-8, -12, TNF), amely képes specifikus kölcsönhatásba lépni glikokonjugátumok cukor részével [186], ennek ellenére alapvető biológiai aktivitásuk nem ehhez a tulajdonságukhoz kapcsolható. Ennek példáján mi is vizsgáltuk, hogy vajon a Gal-1 apoptotikus hatása kizárólag, vagy egyáltalán a lektin tulajdonságnak tudható-e be. A Gal-1 minimális ligandja, a laktóz nem szorítja le teljesen a sejtekhez kötődött Gal-1-et, mindig marad kb. 10% lektin a sejtek felszínén. A lektin internalizációja során

az ismert Gal-1-kötő fehérje sem ko-internalizálódik a Gal-1-gyel. A laktóz nem gátolja a fehérje által kiváltott apoptózist, ami azt támasztja alá, hogy a citotoxikus hatás nem vagy nem teljesen tulajdonítható a cukor-lektin interakciónak. Ez azonban nem zárja ki, hogy a folyamat szempontjából fontos a cukor és fehérje kapcsolódása, mert szuboptimális rövid idejű stimuláció esetén a laktóz jelenléte felgyorsítja az apoptotikus választ. Feltételezésünk szerint, a laktóz úgy érzékenyíti a Gal-1 citotoxikus hatását, hogy hozzájárul a fehérje biológiailag aktív konformációjának kialakításához. Ez jelenleg csak spekuláció a kapott eredmények magyarázatára, addig, míg nem sikerül a Gal-1 olyan receptorát azonosítani, mellyel a Gal-1 fehérje-fehérje interakció útján továbbít apoptotikus jelet a sejtekbe. Más példa is igazolja, hogy a Gal-1-nek van lektin tulajdonságától független funkciója, pl. az elkötelezett csontvelő sejtek (CFU-GM) Gal-1 indukált apoptózisa [127], vagy a fibroblasztok proliferáció indukciója [187] nem gátolható laktózzal.

Eredményeink szerint Gal-1 koncentrációtól függő bifázikus módon stimulálhatja a T sejt halált. A laktóz gátolható apoptózist detektáló kísérletek nagy többségében igen magas koncentrációjú ($20\mu\text{M}$) Gal-1-et használtak. Összehasonlítottuk az alacsonyabb, $1,8\mu\text{M}$ (aGal-1), és a magas koncentrációjú, $20\mu\text{M}$ (mGal-1) laktóz gátolhatóságát ugyanannak a Gal-1 preparátumnak a használatával. Azt az eredményt kaptuk, hogy az mGal-1-gyel indukált apoptózis időbeli lefolyása jóval gyorsabb (6 versus 24 óra) és laktóz nagy feleslege 50-60 %-ban gátolja az apoptózist, szemben az aGal-1 kezeléssel, mely nem gátolható laktózzal. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy magasabb koncentrációban a lektin-cukor kölcsönhatás (is) érvényesül, és a Gal-1 a glikoproteineken keresztül is képes az apoptotikus szignált a sejtbe juttatni. Az aGal-1 viszont a lektin-cukor kölcsönhatástól független módon, nem ismert, nagy affinitású receptoron keresztül fejt ki hatását. Nem zárható ki azonban, hogy a nem cukor-lektin kölcsönhatás révén megvalósuló apoptózis is igényli a lektin szénhidrátokhoz való kötődését, amit a sejt felszíni glikokonjugátumok, laktóz jelenlétében pedig a minimális ligand biztosítanak.

A fenti eredmények még korántsem válaszolják meg a kérdést, hogyan indítja el a Gal-1 a T sejt apoptózist, de kiindulási pontjai annak az analízisnek, melynek során meghatározhatjuk azt.

Módosítja-e a Gal-1 a csontvelő sejtek életképességét?

A kérdés azért jogos, mert Baum és mtsai kimutatták, hogy a Gal-1 nemcsak a Bevezetésben ismertetett autoimmun és gyulladásszerű szituációkban alkalmazható, mint hatásos immunszuppresszív drog, hanem sikeresen kivédhető segítségével a csontvelő (csv) átültetés elsőrendű szövődménye, a Graft versus Host betegség (GVHD) is [121]. A Gal-1 hatását a donor T sejtek aktivitásának gátlásával magyarázták. A csontvelő átültetés sikere azonban nemcsak a GVHD kialakulásának gátlásával, hanem az erre használt immunszuppresszív gyógyszer csontvelői sejtekre gyakorolt hatásától is függ. Ezidáig az első irodalmi adatot mi szolgáltatottuk abban a vonatkozásban, hogy hogyan befolyásolja a Gal-1 a csontvelő sejtek differenciálódását és életképességét. A lektin koncentrációtól függően bifázikus módon hat a csv sejtekre. Alacsony koncentrációban (1 nM) segíti a csv sejtek elkötelezett CFU-GM és BFU-E progenitor sejtekké történő differenciálódását. Ezzel szemben a magasabb (>1 μ M) koncentrációjú lektin drámai módon gátolja az elkötelezett vérképző elődsejtek növekedését, de csökkenti a kevésbé érett csv sejtek osztódását is. A növekedés gátlás összhangban van az apoptózis indukciójával ezeken a sejteken. A Gal-1 indukálta apoptózisra legérzékenyebbek a legelkötelezettebb elődsejtek és a legkevésbé érzékenyek a legfiatalabb pluripotens őssejtek.

A bifázikus hatás azt is mutatja, hogy az alacsony, illetve magas koncentrációjú Gal-1 különböző mechanizmus útján hat. A növekedésserkentő hatás laktózzal gátolható, míg a növekedés gátló, apoptotikus folyamatot a laktóz jelenléte nem befolyásolja.

Ez összhangban van azokkal az eredményeinkkel, melyeket a Gal-1 T sejtekre kifejtett apoptotikus hatásának vizsgálata során kaptunk.

5. VÉGSZÓ

Az endogén immunszuppresszív fehérje, a galektin-1, az utóbbi 10 év kutatásainak előterébe került. Bár a lektin felfedezése a korai 80-as évekre tehető, az érdemi, biológiai hatást csak az utolsó 10 évben vizsgálják, s ezalatt közel 500 közlemény jelent meg csak a Gal-1-gyel kapcsolatban. Az áttörési pontot a Gal-1 T sejtekre kifejtett citotoxikus hatásának közlése jelentette 1995-ben. Ennek azért volt nagy jelentősége, mert az ezt követő intenzív kutatások kimutatták, hogy a Gal-1 modulálja a Th1 sejtek citokin termelését és az aktivált T sejtek apoptózisát okozza, ezáltal egy rendkívül hatásos, az autoimmun és gyulladásos kórképekben alkalmazható immunszuppresszív fehérje. Immunválasz gátló hatása nem mindig pozitív, hiszen ezáltal rosszindulatú daganatokban, a rákos sejtek immunprivilegiumát, vagyis a tumor specifikus immunválasz gátlását okozza.

A számos és értékes irodalmi adat ellenére az apoptózis mechanizmusát nem sikerült kielégítően leírni. Úgy gondolom, hogy a Gal-1-gyel végzett munkánk és ebben a dolgozatban bemutatott eredményeink alapvetően hozzájárulnak a Gal-1 indukálta apoptózis mechanizmusának, és csontvelő sejtekre gyakorolt hatásának megértéséhez, s ezáltal a lektin jövőbeli terápiás felhasználhatóságához.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS II

Köszönettel tartozom Bob Abrahamnak a P116 és P116WT, Art Weissnek a JCaM/LCK és Violeta Chitunak a I9.2 sejtekért, Duda Ernőnek a TNF-ért, Matkó Jánosnak és Gombos Imrének a konfokális mikroszkópiában nyújtott segítségért.

BIBLIOGRÁFIA

1. **Chiariotti,L., Salvatore,P., Benvenuto,G., and Bruni,C.B.,** Control of galectin gene expression *Biochimie* 1999. **81**: 381-388.
2. **Lopez-Lucendo,M.F., Solis,D., Andre,S., Hirabayashi,J., Kasai,K., Kaltner,H., Gabius,H.J., and Romero,A.,** Growth-regulatory humán galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. *J.Mol.Biol.* 2004. **343**: 957-970.
3. **Cho,M. and Cummings,R.D.,** Characterization of monomeric forms of galectin-1 generated by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 1996. **35**: 13081-13088.
4. **Hirabayashi,J. and Kasai,K.,** Effect of amino acid substitution by sited-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of humán 14-kDa beta-galactoside-binding lectin. *J.Biol.Chem.* 1991. **266**: 23648-23653.
5. **Brown,M.H., Monostori,E., Gullberg,M., Zamoyska,R., Lang,G., Kioussis,D., and Crumpton,M.J.,** Structure-function relationships of the humán T lymphocyte CD2 antigen. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 1989. **54 Pt 2**: 627-636.
6. **Monostori,E., Desai,D., Brown,M.H., Cantrell,D.A., and Crumpton,M.J.,** Activation of humán T lymphocytes via the CD2 antigen results in tyrosine phosphorylation of T cell antigen receptor zeta-chains. *J.Immunol.* 1990. **144**: 1010-1014.
7. **Monostori,E., Lang,G., Kioussis,D., Cantrell,D.A., Zamoyska,R., Brown,M.H., and Crumpton,M.J.,** Humán CD2 is functional in CD2 transgenic mice. *Immunology* 1991. **74**: 369-372.

8. **Chitu,V., Fajka-Boja,R., Toth,G.K., Varadi,G., Hegedus,Z., Franko,A., Szucs,K.S., and Monostori,E.,** Comparative study on the effect of phosphorylated TCR zeta chain ITAM sequences on early activation events in Jurkat T cells. *Peptides* 2001. **22**: 1963-1971.
9. **Hegedus,Z., Ando,I., Toth,G.K., Varadi,G., and Monostori,E.,** Application of polyacrylamide gel electrophoresis for analysis of oligopeptide phosphorylation in vitro. *Biotechniques* 1995. **18**: 631-634.
10. **Hegedus,Z., Chitu,V., Toth,G.K., Finta,C., Varadi,G., Ando,I., and Monostori,E.,** Contribution of kinases and the CD45 phosphatase to the generation of tyrosine phosphorylation patterns in the T-cell receptor complex zeta chain. *Immunol.Lett.* 1999. **67**: 31-39.
11. **Kurucz,E., Glavits,R., Krenacs,L., Krenacs,T., Ocsovszky,I., Keresztes,G., Monostori,E., and Ando,I.,** An antiserum reacts with an evolutionary conserved region in the epsilon subunit of the T-cell receptor-CD3 complex in phylogenetically distant species. *Immunol.Lett.* 1993. **38**: 167-170.
12. **Laczko,I., Hollosi,M., Vass,E., Hegedus,Z., Monostori,E., and Toth,G.K.,** Conformational effect of phosphorylation on T cell receptor/CD3 zeta-chain sequences. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1998. **242**: 474-479.
13. **Oravecz,T., Monostori,E., Kurucz,E., Takacs,L., and Ando,I.,** CD3-induced T-cell proliferation and interleukin-2 secretion is modulated by the CD45 antigen. *Scand.J.Immunol.* 1991. **34**: 531-537.
14. **Fajka-Boja,R., Szemes,M., Ion,G., Legradi,A., Caron,M., and Monostori,E.,** Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. *Immunol.Lett.* 2002. **82**: 149-154.
15. **Fouillit,M., Joubert-Caron,R., Poirier,F., Bourin,P., Monostori,E., Levi-Strauss,M., Raphael,M., Bladier,D., and Caron,M.,** Regulation of CD45-

- induced signaling by galectin-1 in Burkitt limfóma B cells. *Glycobiology* 2000. **10**: 413-419.
16. **Monostori,E., Hartyani,Z., Ocsovszky,I., Hegedus,Z., Oravecz,T., Kalman,M., and Ando,I.**, Effect of phytohaemagglutinin on CD45 in T cells. *Immunol.Lett.* 1994. **42**: 197-201.
 17. **Monostori,E., Hartyani,Z., Hegedus,Z., Ocsovszki,I., Pallinger,E., and Ando,I.**, Microheterogeneity of the cell surface tyrosine phosphatase, CD45RA, on T cells: phytohaemagglutinin binding and non-binding fraction of the 220 kDa isoform. *Immunol.Lett.* 1997. **59**: 171-176.
 18. **Oravecz,T., Monostori,E., Adrian,O., Kurucz,E., and Ando,I.**, Novel heterogeneity of the leucocyte common antigen (CD45): disulfide-bound heterodimers between CD45 and an 80 kDa polypeptide. *Immunol.Lett.* 1994. **40**: 7-11.
 19. **Chitu,V., Demydenko,D., Toth,G.K., Hegedus,Z., and Monostori,E.**, Conditions for permeabilization of cells used for intracellular tyrosine phosphorylation studies. *Biotechniques* 1999. **27**: 435-437.
 20. **Fajka-Boja,R., Hidvegi,M., Shoenfeld,Y., Ion,G., Demydenko,D., Tomoskozi-Farkas,R., Vizler,C., Telekes,A., Resetar,A., and Monostori,E.**, 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.* 2002. **20**: 563-570.
 21. **Legradi,A., Chitu,V., Szukacsov,V., Fajka-Boja,R., Szekely,S.K., and Monostori,E.**, Lysophosphatidylcholine is a regulator of tyrosine kinase activity and intracellular Ca(2+) level in Jurkat T cell line. *Immunol.Lett.* 2004. **91**: 17-21.

22. **Barondes,S.H., Castronovo,V., Cooper,D.N., Cummings,R.D., Drickamer,K., Feizi,T., Gitt,M.A., Hirabayashi,J., Hughes,C., Kasai,K., and** **.,** Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994. **76**: 597-598.
23. **Hirabayashi,J. and Kasai,K.,** The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 1993. **3**: 297-304.
24. **Leffler,H., Carlsson,S., Hedlund,M., Qian,Y., and Poirier,F.,** Introduction to galectins. *Glycoconj.J.* 2004. **19**: 433-440.
25. **Chiariotti,L., Salvatore,P., Frunzio,R., and Bruni,C.B.,** Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj.J.* 2004. **19**: 441-449.
26. **Kami,K. and Senba,E.,** Galectin-1 is a novel factor that regulates myotube growth in regenerating skeletal muscles. *Curr.Drug Targets.* 2005. **6**: 395-405.
27. **Watt,D.J., Jones,G.E., and Goldring,K.,** The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration. *Glycoconj.J.* 2004. **19**: 615-619.
28. **Danguy,A., Camby,I., and Kiss,R.,** Galectins and cancer. *Biochim.Biophys.Acta* 2002. **1572**: 285-293.
29. **Lahm,H., Andre,S., Hoeflich,A., Kaltner,H., Siebert,H.C., Sordat,B., der Lieth,C.W., Wolf,E., and Gabius,H.J.,** Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj.J.* 2004. **20**: 227-238.
30. **Colnot,C., Fowlis,D., Ripoche,M.A., Bouchaert,I., and Poirier,F.,** Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev.Dyn.* 1998. **211**: 306-313.

31. **Poirier,F., Timmons,P.M., Chan,C.T., Guenet,J.L., and Rigby,P.W.,** Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. *Development* 1992. **115**: 143-155.
32. **Lee,V.H., Lee,A.B., Phillips,E.B., Roberts,J.K., and Weitlauf,H.M.,** Spatio-temporal pattern for expression of galectin-3 in the murine utero-placental complex: evidence for differential regulation. *Biol.Reprod.* 1998. **58**: 1277-1282.
33. **Burger,O., Pick,E., Zwickel,J., Klayman,M., Meiri,H., Slotky,R., Mandel,S., Rabinovitch,L., Paltieli,Y., Admon,A., and Gonen,R.,** Placental protein 13 (PP-13): effects on cultured trophoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies. *Placenta* 2004. **25**: 608-622.
34. **Benvenuto,G., Carpentieri,M.L., Salvatore,P., Cindolo,L., Bruni,C.B., and Chiariotti,L.,** Cell-specific transcriptional regulation and reactivation of galectin-1 gene expression are controlled by DNA methylation of the promoter region. *Mol.Cell Biol.* 1996. **16**: 2736-2743.
35. **Lobsanov,Y.D., Gitt,M.A., Leffler,H., Barondes,S.H., and Rini,J.M.,** 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.* 1993. **268**: 27034-27038.
36. **Tracey,B.M., Feizi,T., Abbott,W.M., Carruthers,R.A., Green,B.N., and Lawson,A.M.,** Subunit molecular mass assignment of 14,654 Da to the soluble beta-galactoside-binding lectin from bovine heart muscle and demonstration of intramolecular disulfide bonding associated with oxidative inactivation. *J.Biol.Chem.* 1992. **267**: 10342-10347.
37. **Yamaoka,K., Ingendoh,A., Tsubuki,S., Nagai,Y., and Sanai,Y.,** Structural and functional characterization of a novel tumor-derived rat galectin-1 having transforming growth factor (TGF) activity: the relationship between

- intramolecular disulfide bridges and TGF activity. *J.Biochem.(Tokyo)* 1996. **119**: 878-886.
38. **Inagaki,Y., Sohma,Y., Horie,H., Nozawa,R., and Kadoya,T.,** Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur.J.Biochem.* 2000. **267**: 2955-2964.
 39. **Cho,M. and Cummings,R.D.,** Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. *J.Biol.Chem.* 1995. **270**: 5198-5206.
 40. **Giudicelli,V., Lutomski,D., Levi-Strauss,M., Bladier,D., Joubert-Caron,R., and Caron,M.,** Is human galectin-1 activity modulated by monomer/dimer equilibrium? *Glycobiology* 1997. **7**: viii-viix.
 41. **Symons,A., Cooper,D.N., and Barclay,A.N.,** Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1. *Glycobiology* 2000. **10**: 559-563.
 42. **Liu,F.T., Patterson,R.J., and Wang,J.L.,** Intracellular functions of galectins. *Biochim.Biophys.Acta* 2002. **1572**: 263-273.
 43. **Wang,J.L., Gray,R.M., Haudek,K.C., and Patterson,R.J.,** Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim.Biophys.Acta* 2004. **1673**: 75-93.
 44. **Wilson,T.J., Firth,M.N., Powell,J.T., and Harrison,F.L.,** The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes. *Biochem.J.* 1989. **261**: 847-852.
 45. **Clerch,L.B., Whitney,P., Hass,M., Brew,K., Miller,T., Werner,R., and Massaro,D.,** Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry* 1988. **27**: 692-699.

46. **Cooper,D.N. and Barondes,S.H.**, Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J.Cell Biol.* 1990. **110**: 1681-1691.
47. **Harrison,F.L. and Wilson,T.J.**, The 14 kDa beta-galactoside binding lectin in myoblast and myotube cultures: localization by confocal microscopy. *J.Cell Sci.* 1992. **101 (Pt 3)**: 635-646.
48. **Cho,M. and Cummings,R.D.**, Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. *J.Biol.Chem.* 1995. **270**: 5207-5212.
49. **Savin,S.B., Cvejic,D.S., and Jankovic,M.M.**, Expression of galectin-1 and galectin-3 in humán fetal thyroid gland. *J.Histochem.Cytochem.* 2003. **51**: 479-483.
50. **Shimonishi,T., Miyazaki,K., Kono,N., Sabit,H., Tuneyama,K., Harada,K., Hirabayashi,J., Kasai,K., and Nakanuma,Y.**, Expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum.Pathol.* 2001. **32**: 302-310.
51. **Lutowski,D., Fouillit,M., Bourin,P., Mellottee,D., Denize,N., Pontet,M., Bladier,D., Caron,M., and Joubert-Caron,R.**, Externalization and binding of galectin-1 on cell surface of K562 cells upon erythroid differentiation. *Glycobiology* 1997. **7**: 1193-1199.
52. **Paz,A., Haklai,R., Elad-Sfadia,G., Ballan,E., and Kloog,Y.**, Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrán anchorage and cell transformation. *Oncogene* 2001. **20**: 7486-7493.
53. **Elad-Sfadia,G., Haklai,R., Ballan,E., Gabius,H.J., and Kloog,Y.**, Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J.Biol.Chem.* 2002. **277**: 37169-37175.

54. **Akimoto,Y., Kawakami,H., Oda,Y., Obinata,A., Endo,H., Kasai,K., and Hirano,H.,** Changes in expression of the endogenous beta-galactoside-binding 14-kDa lectin of chick embryonic skin during epidermal differentiation. *Exp.Cell Res.* 1992. **199**: 297-304.
55. **Akimoto,Y., Hirabayashi,J., Kasai,K., and Hirano,H.,** Expression of the endogenous 14-kDa beta-galactoside-binding lectin galectin in normal human skin. *Cell Tissue Res.* 1995. **280**: 1-10.
56. **Vyakarnam,A., Lenneman,A.J., Lakkides,K.M., Patterson,R.J., and Wang,J.L.,** A comparative nuclear localization study of galectin-1 with other splicing components. *Exp.Cell Res.* 1998. **242**: 419-428.
57. **Choi,J.Y., van Wijnen,A.J., Aslam,F., Leszyk,J.D., Stein,J.L., Stein,G.S., Lian,J.B., and Penman,S.,** Developmental association of the beta-galactoside-binding protein galectin-1 with the nuclear matrix of rat calvarial osteoblasts. *J.Cell Sci.* 1998. **111 (Pt 20)**: 3035-3043.
58. **Park,J.W., Voss,P.G., Grabski,S., Wang,J.L., and Patterson,R.J.,** Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res.* 2001. **29**: 3595-3602.
59. **Pellizzoni,L., Kataoka,N., Charroux,B., and Dreyfuss,G.,** A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 1998. **95**: 615-624.
60. **Poirier,F. and Robertson,E.J.,** Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development* 1993. **119**: 1229-1236.
61. **Nickel,W.,** The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur.J.Biochem.* 2003. **270**: 2109-2119.

62. **Hughes,R.C.**, Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1999. **1473**: 172-185.
63. **Mehul,B. and Hughes,R.C.**, Plasma membrán targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J.Cell Sci.* 1997. **110 (Pt 10)**: 1169-1178.
64. **Schafer,T., Zentgraf,H., Zehe,C., Brugger,B., Bernhagen,J., and Nickel,W.**, Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 is mediated by direct translocation across the plasma membrán of mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 2004. **279**: 6244-6251.
65. **Backhaus,R., Zehe,C., Wegehingel,S., Kehlenbach,A., Schwappach,B., and Nickel,W.**, Unconventional protein secretion: membrán translocation of FGF-2 does not require protein unfolding. *J.Cell Sci.* 2004. **117**: 1727-1736.
66. **Seelenmeyer,C., Wegehingel,S., Tews,I., Kunzler,M., Aebi,M., and Nickel,W.**, Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *J.Cell Biol.* 2005. **171**: 373-381.
67. **Zhou,Q. and Cummings,R.D.**, L-14 lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion. *Arch.Biochem.Biophys.* 1993. **300**: 6-17.
68. **van den Brule,F.A., Buicu,C., Baldet,M., Sobel,M.E., Cooper,D.N., Marschal,P., and Castronovo,V.**, Galectin-1 modulates humán melanoma cell adhesion to laminin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995. **209**: 760-767.
69. **Cooper,D.N., Massa,S.M., and Barondes,S.H.**, Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J.Cell Biol.* 1991. **115**: 1437-1448.
70. **Gu,M., Wang,W., Song,W.K., Cooper,D.N., and Kaufman,S.J.**, Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. *J.Cell Sci.* 1994. **107 (Pt 1)**: 175-181.

71. **Moiseeva,E.P., Williams,B., Goodall,A.H., and Samani,N.J.,** Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003. **310**: 1010-1016.
72. **McGraw,J., Gaudet,A.D., Oschipok,L.W., Kadoya,T., Horie,H., Steeves,J.D., Tetzlaff,W., and Ramer,M.S.,** Regulation of neuronal and glial galectin-1 expression by peripheral and central axotomy of rat primary afferent neurons. *Exp.Neurol.* 2005. **195**: 103-114.
73. **Puche,A.C. and Key,B.,** Identification of cells expressing galectin-1, a galactose-binding receptor, in the rat olfactory system. *J.Comp Neurol.* 1995. **357**: 513-523.
74. **Raabe,E.H., Yoshida,K., and Schwarting,G.A.,** Differential laminin isoform expression in the developing rat olfactory system. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 1997. **101**: 187-196.
75. **van den,B.F., Califice,S., Garnier,F., Fernandez,P.L., Berchuck,A., and Castronovo,V.,** Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral sztróma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. *Lab Invest* 2003. **83**: 377-386.
76. **Kuwabara,I., Sano,H., and Liu,F.T.,** Functions of galectins in cell adhesion and chemotaxis. *Methods Enzymol.* 2003. **363**: 532-552.
77. **Kopitz,J., von Reitzenstein,C., Burchert,M., Cantz,M., and Gabius,H.J.,** Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on humán neuroblastoma cells in culture. *J.Biol.Chem.* 1998. **273**: 11205-11211.
78. **Andre,S., Kaltner,H., Lensch,M., Russwurm,R., Siebert,H.C., Fallsehr,C., Tajkhorshid,E., Heck,A.J., von Knebel,D.M., Gabius,H.J., and Kopitz,J.,**

- Determination of structural and functional overlap/divergence of five proto-type galectins by analysis of the growth-regulatory interaction with ganglioside GM1 in silico and in vitro on human neuroblastoma cells. *Int.J.Cancer* 2005. **114**: 46-57.
79. **Kopitz,J., von Reitzenstein,C., Andre,S., Kaltner,H., Uhl,J., Ehemann,V., Cantz,M., and Gabius,H.J.,** Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *J.Biol.Chem.* 2001. **276**: 35917-35923.
 80. **Ohannesian,D.W., Lotan,D., and Lotan,R.,** Concomitant increases in galectin-1 and its glycoconjugate ligands (carcinoembryonic antigen, lamp-1, and lamp-2) in cultured human colon carcinoma cells by sodium butyrate. *Cancer Res.* 1994. **54**: 5992-6000.
 81. **Pace,K.E., Lee,C., Stewart,P.L., and Baum,L.G.,** Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J.Immunol.* 1999. **163**: 3801-3811.
 82. **Walzel,H., Schulz,U., Neels,P., and Brock,J.,** Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. *Immunol.Lett.* 1999. **67**: 193-202.
 83. **Lanteri,M., Giordanengo,V., Hiraoka,N., Fuzibet,J.G., Auberger,P., Fukuda,M., Baum,L.G., and Lefebvre,J.C.,** Altered T cell surface glycosylation in HIV-1 infection results in increased susceptibility to galectin-1-induced cell death. *Glycobiology* 2003. **13**: 909-918.
 84. **Perillo,N.L., Pace,K.E., Seilhamer,J.J., and Baum,L.G.,** Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995. **378**: 736-739.

85. **Walzel,H., Blach,M., Hirabayashi,J., Kasai,K.I., and Brock,J.,** Involvement of CD2 and CD3 in galectin-1 induced signaling in humán Jurkat T-cells. *Glycobiology* 2000. **10**: 131-140.
86. **Perillo,N.L., Uittenbogaart,C.H., Nguyen,J.T., and Baum,L.G.,** Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of humán thymocytes. *J.Exp.Med.* 1997. **185**: 1851-1858.
87. **Rappl,G., Abken,H., Hasselmann,D.O., Tilgen,W., Ugurel,S., and Reinhold,U.,** The CD7(-) subset of CD4(+) memory T cells is prone to accelerated apoptosis that is prevented by interleukin-15 (IL-15). *Cell Death.Differ.* 2001. **8**: 395-402.
88. **Rappl,G., Abken,H., Muche,J.M., Sterry,W., Tilgen,W., Andre,S., Kaltner,H., Ugurel,S., Gabius,H.J., and Reinhold,U.,** CD4+CD7- leukemic T cells from patients with Sezary syndrome are protected from galectin-1-triggered T cell death. *Leukemia* 2002. **16**: 840-845.
89. **Roberts,A.A., Amano,M., Felten,C., Galvan,M., Sultur,G., Pinter-Brown,L., Dobbeling,U., Burg,G., Said,J., and Baum,L.G.,** Galectin-1-mediated apoptosis in mycosis fungoides: the roles of CD7 and cell surface glycosylation. *Mod.Pathol.* 2003. **16**: 543-551.
90. **Ellerhorst,J., Troncoso,P., Xu,X.C., Lee,J., and Lotan,R.,** Galectin-1 and galectin-3 expression in humán prostate tissue and prostate cancer. *Urol.Res.* 1999. **27**: 362-367.
91. **Ellerhorst,J., Nguyen,T., Cooper,D.N., Lotan,D., and Lotan,R.,** Differential expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in humán prostate cancer cell lines and effects of overexpressing galectin-1 on cell phenotype. *Int.J.Oncol.* 1999. **14**: 217-224.

92. **Liu,F.T. and Rabinovich,G.A.**, Galectins as modulators of tumour progression. *Nat.Rev.Cancer* 2005. **5**: 29-41.
93. **van den Brule,F.A., Waltregny,D., and Castronovo,V.**, Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated sztróma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J.Pathol.* 2001. **193**: 80-87.
94. **van den,B.F., Califice,S., and Castronovo,V.**, Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj.J.* 2004. **19**: 537-542.
95. **Andre,S., Kojima,S., Yamazaki,N., Fink,C., Kaltner,H., Kayser,K., and Gabius,H.J.**, Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology. Non-uniform properties in cell-surface presentation and modulation of adhesion to matrix glycoproteins for various tumor cell lines, in biodistribution of free and liposome-bound galectins and in their expression by breast and colorectal carcinomas with/without metastatic propensity. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 1999. **125**: 461-474.
96. **Irimura,T., Matsushita,Y., Sutton,R.C., Carralero,D., Ohannesian,D.W., Cleary,K.R., Ota,D.M., Nicolson,G.L., and Lotan,R.**, Increased content of an endogenous lactose-binding lectin in humán colorectal carcinoma progressed to metastatic stages. *Cancer Res.* 1991. **51**: 387-393.
97. **Lotan,R., Matsushita,Y., Ohannesian,D., Carralero,D., Ota,D.M., Cleary,K.R., Nicolson,G.L., and Irimura,T.**, Lactose-binding lectin expression in humán colorectal carcinomas. Relation to tumor progression. *Carbohydr.Res.* 1991. **213**: 47-57.
98. **Hittelet,A., Legendre,H., Nagy,N., Bronckart,Y., Pector,J.C., Salmon,I., Yeaton,P., Gabius,H.J., Kiss,R., and Camby,I.**, Upregulation of galectins-1 and -3 in humán colon cancer and their role in regulating cell migration. *Int.J.Cancer* 2003. **103**: 370-379.

99. **Gillenwater,A., Xu,X.C., el Naggar,A.K., Clayman,G.L., and Lotan,R.,** Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 1996. **18**: 422-432.
100. **Choufani,G., Nagy,N., Saussez,S., Marchant,H., Bisschop,P., Burchert,M., Danguy,A., Louryan,S., Salmon,I., Gabius,H.J., Kiss,R., and Hassid,S.,** The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and the Thomsen-Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in head and neck cancers. *Cancer* 1999. **86**: 2353-2363.
101. **Allen,H.J., Sucato,D., Woynarowska,B., Gottstine,S., Sharma,A., and Bernacki,R.J.,** Role of galaptin in ovarian carcinoma adhesion to extracellular matrix in vitro. *J.Cell Biochem.* 1990. **43**: 43-57.
102. **Cindolo,L., Benvenuto,G., Salvatore,P., Pero,R., Salvatore,G., Mirone,V., Prezioso,D., Altieri,V., Bruni,C.B., and Chiariotti,L.,** galectin-1 and galectin-3 expression in humán bladder transitional-cell carcinomas. *Int.J.Cancer* 1999. **84**: 39-43.
103. **Yamaoka,K., Mishima,K., Nagashima,Y., Asai,A., Sanai,Y., and Kirino,T.,** Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of humán gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J.Neurosci.Res.* 2000. **59**: 722-730.
104. **Belot,N., Rorive,S., Doyen,I., Lefranc,F., Bruyneel,E., Dedecker,R., Micik,S., Brotchi,J., Decaestecker,C., Salmon,I., Kiss,R., and Camby,I.,** Molecular characterization of cell substratum attachments in humán glial tumors relates to prognostic features. *Glia* 2001. **36**: 375-390.
105. **Rorive,S., Belot,N., Decaestecker,C., Lefranc,F., Gordower,L., Micik,S., Mauraige,C.A., Kaltner,H., Ruchoux,M.M., Danguy,A., Gabius,H.J., Salmon,I., Kiss,R., and Camby,I.,** Galectin-1 is highly expressed in humán

- gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. *Glia* 2001. **33**: 241-255.
106. **Chiariotti,L., Berlingieri,M.T., De Rosa,P., Battaglia,C., Berger,N., Bruni,C.B., and Fusco,A.**, Increased expression of the negative growth factor, galactoside-binding protein, gene in transformed thyroid cells and in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 1992. **7**: 2507-2511.
 107. **Chiariotti,L., Berlingieri,M.T., Battaglia,C., Benvenuto,G., Martelli,M.L., Salvatore,P., Chiappetta,G., Bruni,C.B., and Fusco,A.**, Expression of galectin-1 in normal human thyroid gland and in differentiated and poorly differentiated thyroid tumors. *Int.J.Cancer* 1995. **64**: 171-175.
 108. **Xu,X.C., el Naggar,A.K., and Lotan,R.**, Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am.J.Pathol.* 1995. **147**: 815-822.
 109. **Berberat,P.O., Friess,H., Wang,L., Zhu,Z., Bley,T., Frigeri,L., Zimmermann,A., and Buchler,M.W.**, Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer. *J.Histochem.Cytochem.* 2001. **49**: 539-549.
 110. **Meissner,N., Radke,J., Hedges,J.F., White,M., Behnke,M., Bertolino,S., Abrahamsen,M., and Jutila,M.A.**, Serial analysis of gene expression in circulating gamma delta T cell subsets defines distinct immunoregulatory phenotypes and unexpected gene expression profiles. *J.Immunol.* 2003. **170**: 356-364.
 111. **Blaser,C., Kaufmann,M., Muller,C., Zimmermann,C., Wells,V., Mallucci,L., and Pircher,H.**, Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur.J.Immunol.* 1998. **28**: 2311-2319.

112. **Rabinovich,G.A., Ramhorst,R.E., Rubinstein,N., Corigliano,A., Daroqui,M.C., Kier-Joffe,E.B., and Fainboim,L.,** Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death.Differ.* 2002. **9**: 661-670.
113. **Zuniga,E., Gruppi,A., Hirabayashi,J., Kasai,K.I., and Rabinovich,G.A.,** Regulated expression and effect of galectin-1 on Trypanosoma cruzi-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival. *Infect.Immun.* 2001. **69**: 6804-6812.
114. **Rabinovich,G.A., Sotomayor,C.E., Riera,C.M., Bianco,I., and Correa,S.G.,** Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur.J.Immunol.* 2000. **30**: 1331-1339.
115. **La,M., Cao,T.V., Cerchiaro,G., Chilton,K., Hirabayashi,J., Kasai,K., Oliani,S.M., Chernajovsky,Y., and Perretti,M.,** A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. *Am.J.Pathol.* 2003. **163**: 1505-1515.
116. **Delbrouck,C., Doyen,I., Belot,N., Decaestecker,C., Ghanooni,R., de Lavareille,A., Kaltner,H., Choufani,G., Danguy,A., Vandenhoven,G., Gabius,H.J., Hassid,S., and Kiss,R.,** Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration. *Lab Invest* 2002. **82**: 147-158.
117. **Correa,S.G., Sotomayor,C.E., Aoki,M.P., Maldonado,C.A., and Rabinovich,G.A.,** Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology* 2003. **13**: 119-128.
118. **Levroney,E.L., Aguilar,H.C., Fulcher,J.A., Kohatsu,L., Pace,K.E., Pang,M., Gurney,K.B., Baum,L.G., and Lee,B.,** Novel innate immune functions for galectin-1: galectin-1 inhibits cell fusion by Nipah virus envelope glycoproteins

- and augments dendritic cell secretion of proinflammatory cytokines. *J.Immunol.* 2005. **175**: 413-420.
119. **Rabinovich,G.A., Ariel,A., Hershkovich,R., Hirabayashi,J., Kasai,K.I., and Lider,O.,** Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 1999. **97**: 100-106.
 120. **Santucci,L., Fiorucci,S., Cammilleri,F., Servillo,G., Federici,B., and Morelli,A.,** Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2000. **31**: 399-406.
 121. **Baum,L.G., Blackall,D.P., Arias-Magallano,S., Nanigian,D., Uh,S.Y., Browne,J.M., Hoffmann,D., Emmanouilides,C.E., Territo,M.C., and Baldwin,G.C.,** Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin.Immunol.* 2003. **109**: 295-307.
 122. **van der,L.J., van den,B.A., Blokzijl,T., Harms,G., van Goor,H., Zwiers,P., van Weeghel,R., Poppema,S., and Visser,L.,** Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J.Pathol.* 2004. **204**: 511-518.
 123. **Chung,C.D., Patel,V.P., Moran,M., Lewis,L.A., and Miceli,M.C.,** Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J.Immunol.* 2000. **165**: 3722-3729.
 124. **Vespa,G.N., Lewis,L.A., Kozak,K.R., Moran,M., Nguyen,J.T., Baum,L.G., and Miceli,M.C.,** Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J.Immunol.* 1999. **162**: 799-806.
 125. **Gauthier,L., Rossi,B., Roux,F., Termine,E., and Schiff,C.,** Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse

- formation between pre-B and sztrómal cells and in pre-BCR triggering. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002. **99**: 13014-13019.
126. **Purkrabkova,T., Smetana,K., Jr., Dvorankova,B., Holikova,Z., Bock,C., Lensch,M., Andre,S., Pytlik,R., Liu,F.T., Klima,J., Smetana,K., Motlik,J., and Gabius,H.J.**, New aspects of galectin functionality in nuclei of cultured bone marrow sztrómal and epidermal cells: biotinylated galectins as tool to detect specific binding sites. *Biol.Cell* 2003. **95**: 535-545.
 127. **Vas,V., Fajka-Boja,R., Ion,G., Dudics,V., Monostori,E., and Uher,F.**, Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells* 2005. **23**: 279-287.
 128. **Baum,L.G., Pang,M., Perillo,N.L., Wu,T., Delegeane,A., Uittenbogaart,C.H., Fukuda,M., and Seilhamer,J.J.**, Humán 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.* 1995. **181**: 877-887.
 129. **Allione,A., Wells,V., Forni,G., Mallucci,L., and Novelli,F.**, 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 humán T lymphocytes. *J.Immunol.* 1998. **161**: 2114-2119.
 130. **Rabinovich,G.A., Iglesias,M.M., Modesti,N.M., Castagna,L.F., Wolfenstein-Todel,C., Riera,C.M., and Sotomayor,C.E.**, Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J.Immunol.* 1998. **160**: 4831-4840.
 131. **He,J. and Baum,L.G.**, Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J.Biol.Chem.* 2004. **279**: 4705-4712.

132. **Nguyen,J.T., Evans,D.P., Galvan,M., Pace,K.E., Leitenberg,D., Bui,T.N., and Baum,L.G.**, CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J.Immunol.* 2001. **167**: 5697-5707.
133. **Rabinovich,G.A., Alonso,C.R., Sotomayor,C.E., Durand,S., Bocco,J.L., and Riera,C.M.**, Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. *Cell Death.Differ.* 2000. **7**: 747-753.
134. **Novelli,F., Allione,A., Wells,V., Forni,G., and Mallucci,L.**, 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* 1999. **178**: 102-108.
135. **Martinez,V.G., Pellizzari,E.H., Diaz,E.S., Cigorraga,S.B., Lustig,L., Denduchis,B., Wolfenstein-Todel,C., and Iglesias,M.M.**, Galectin-1, a cell adhesion modulator, induces apoptosis of rat Leydig cells in vitro. *Glycobiology* 2004. **14**: 127-137.
136. **Matarrese,P., Tinari,A., Mormone,E., Bianco,G.A., Toscano,M.A., Ascione,B., Rabinovich,G.A., and Malorni,W.**, Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *J.Biol.Chem.* 2005. **280**: 6969-6985.
137. **Sturm,A., Lensch,M., Andre,S., Kaltner,H., Wiedenmann,B., Rosewicz,S., Dignass,A.U., and Gabius,H.J.**, Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J.Immunol.* 2004. **173**: 3825-3837.
138. **Hahn,H.P., Pang,M., He,J., Hernandez,J.D., Yang,R.Y., Li,L.Y., Wang,X., Liu,F.T., and Baum,L.G.**, Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in caspase- and cytochrome c-independent T cell death. *Cell Death.Differ.* 2004. **11**: 1277-1286.

139. **Levi,G., Tarrab-Hazdai,R., and Teichberg,V.I.**, Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits. *Eur.J.Immunol.* 1983. **13**: 500-507.
140. **Offner,H., Celnik,B., Bringman,T.S., Casentini-Borocz,D., Nedwin,G.E., and Vandembark,A.A.**, Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Neuroimmunol.* 1990. **28**: 177-184.
141. **Rabinovich,G.A., Daly,G., Dreja,H., Tailor,H., Riera,C.M., Hirabayashi,J., and Chernajovsky,Y.**, Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress kollagén-induced arthritis via T cell apoptosis. *J.Exp.Med.* 1999. **190**: 385-398.
142. **Rabinovich,G.A.**, Apoptosis as a target for gene therapy in rheumatoid arthritis. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 2000. **95 Suppl 1**: 225-233.
143. **Tsutsui,H., Adachi,K., Seki,E., and Nakanishi,K.**, Cytokine-induced inflammatory liver injuries. *Curr.Mol.Med.* 2003. **3**: 545-559.
144. **Gordon,J.N., Di Sabatino,A., and Macdonald,T.T.**, The pathophysiologic rationale for biological therapies in inflammatory bowel disease. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2005. **21**: 431-437.
145. **Santucci,L., Fiorucci,S., Rubinstein,N., Mencarelli,A., Palazzetti,B., Federici,B., Rabinovich,G.A., and Morelli,A.**, Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 2003. **124**: 1381-1394.
146. **Rubinstein,N., Alvarez,M., Zwirner,N.W., Toscano,M.A., Ibarregui,J.M., Bravo,A., Mordoh,J., Fainboim,L., Podhajcer,O.L., and Rabinovich,G.A.**, Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 2004. **5**: 241-251.

147. **Fouillit,M., Levi-Strauss,M., Giudicelli,V., Lutomski,D., Bladier,D., Caron,M., and Joubert-Caron,R.,** Affinity purification and characterization of recombinant humán galectin-1. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* 1998. **706**: 167-171.
148. **Vas,V., Szilagyil,L., Paloczi,K., and Uher,F.,** Soluble Jagged-1 is able to inhibit the function of its multivalent form to induce hematopoietic stem cell self-renewal in a surrogate in vitro assay. *J.Leukoc.Biol.* 2004. **75**: 714-720.
149. **Fouillit,M., Poirier,F., Monostori,E., Raphael,M., Bladier,D., Joubert-Caron,R., and Caron,M.,** Analysis of galectin 1-mediated cell signaling by combined precipitation and electrophoresis techniques. *Electrophoresis* 2000. **21**: 275-280.
150. **Green,D.R. and Reed,J.C.,** Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998. **281**: 1309-1312.
151. **Perl,A., Gergely,P., Jr., Nagy,G., Koncz,A., and Banki,K.,** Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2004. **25**: 360-367.
152. **Manna,S.K., Sah,N.K., and Aggarwal,B.B.,** Protein tyrosine kinase p56lck is required for ceramid-induced but not tumor necrosis factor-induced activation of NF-kappa B, AP-1, JNK, and apoptosis. *J.Biol.Chem.* 2000. **275**: 13297-13306.
153. **Belka,C., Gruber,C., Jendrossek,V., Wesselborg,S., and Budach,W.,** The tyrosine kinase Lck is involved in regulation of mitochondrial apoptosis pathways. *Oncogene* 2003. **22**: 176-185.
154. **Hur,Y.G., Yun,Y., and Won,J.,** Rosmarinic acid induces p56lck-dependent apoptosis in Jurkat and peripheral T cells via mitochondrial pathway independent from Fas/Fas ligand interaction. *J.Immunol.* 2004. **172**: 79-87.

155. **Takada,Y. and Aggarwal,B.B.,** TNF activates Syk protein tyrosine kinase leading to TNF-induced MAPK activation, NF-kappaB activation, and apoptosis. *J.Immunol.* 2004. **173**: 1066-1077.
156. **Cory,S. and Adams,J.M.,** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat.Rev.Cancer* 2002. **2**: 647-656.
157. **Ruvolo,P.P., Deng,X., and May,W.S.,** Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* 2001. **15**: 515-522.
158. **Cuvillier,O., Rosenthal,D.S., Smulson,M.E., and Spiegel,S.,** Szfingozine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramid-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 1998. **273**: 2910-2916.
159. **Buehrer,B.M., Bardes,E.S., and Bell,R.M.,** Protein kinase C-dependent regulation of humán erythroleukemia (HEL) cell szfingozine kinase activity. *Biochim.Biophys.Acta* 1996. **1303**: 233-242.
160. **van Blitterswijk,W.J., Van Der Luit,A.H., Veldman,R.J., Verheij,M., and Borst,J.,** Ceramid: second messenger or modulator of membrán structure and dynamics? *Biochem.J.* 2003. **369**: 199-211.
161. **Carlow,D.A., Williams,M.J., and Ziltener,H.J.,** Modulation of O-glycans and N-glycans on murine CD8 T cells fails to alter annexin V ligand induction by galektin 1. *J.Immunol.* 2003. **171**: 5100-5106.
162. **Tamir,I. and Cambier,J.C.,** Antigen receptor signaling: integration of protein tyrosine kinase functions. *Oncogene* 1998. **17**: 1353-1364.
163. **Ion,G., Fajka-Boja,R., Toth,G.K., Caron,M., and Monostori,E.,** Role of p56lck and ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in galektin-1-induced cell death. *Cell Death.Differ.* 2005. **12**: 1145-1147.

164. **Pace,K.E., Hahn,H.P., Pang,M., Nguyen,J.T., and Baum,L.G.,** CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. *J.Immunol.* 2000. **165:** 2331-2334.
165. **Surh,C.D. and Sprent,J.,** T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994. **372:** 100-103.
166. **Sebzda,E., Mariathasan,S., Ohteki,T., Jones,R., Bachmann,M.F., and Ohashi,P.S.,** Selection of the T cell repertoire. *Annu.Rev.Immunol.* 1999. **17:** 829-874.
167. **Siegel,R.S., Pandolfino,T., Guitart,J., Rosen,S., and Kuzel,T.M.,** Primary cutaneous T-cell limfóma: review and current concepts. *J.Clin.Oncol.* 2000. **18:** 2908-2925.
168. **Blatt,N.B. and Glick,G.D.,** Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorg.Med.Chem.* 2001. **9:** 1371-1384.
169. **Roberts,A.I., Devadas,S., Zhang,X., Zhang,L., Keegan,A., Greenelch,K., Solomon,J., Wei,L., Das,J., Sun,E., Liu,C., Yuan,Z., Zhou,J.N., and Shi,Y.,** The role of activation-induced cell death in the differentiation of T-helper-cell subsets. *Immunol.Res.* 2003. **28:** 285-293.
170. **Dai,Q., Liu,J., Chen,J., Durrant,D., McIntyre,T.M., and Lee,R.M.,** Mitochondrial ceramid increases in UV-irradiated HeLa cells and is mainly derived from hydrolysis of sphingomyelin. *Oncogene* 2004. **23:** 3650-3658.
171. **Haimovitz-Friedman,A., Kan,C.C., Ehleiter,D., Persaud,R.S., McLoughlin,M., Fuks,Z., and Kolesnick,R.N.,** Ionizing radiation acts on cellular membráns to generate ceramid and initiate apoptosis. *J.Exp.Med.* 1994. **180:** 525-535.

172. **Tepper,C.G., Jayadev,S., Liu,B., Bielawska,A., Wolff,R., Yonehara,S., Hannun,Y.A., and Seldin,M.F.,** Role for ceramid as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995. **92**: 8443-8447.
173. **Tepper,A.D., Ruurs,P., Wiedmer,T., Sims,P.J., Borst,J., and van Blitterswijk,W.J.,** Sphingomyelin hydrolysis to ceramid during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *J.Cell Biol.* 2000. **150**: 155-164.
174. Pettus, B. J., Chalfant, C. E., and Hannun, Y. A. Ceramid in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim.Biophys.Acta* 1585(2-3), 114-125. 12-30-2002.
175. **Ruvolo,P.P.,** Ceramid regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia* 2001. **15**: 1153-1160.
176. **Gulbins,E.,** Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramid. *Pharmacol.Res.* 2003. **47**: 393-399.
177. **Johnson,K.R., Johnson,K.Y., Becker,K.P., Bielawski,J., Mao,C., and Obeid,L.M.,** Role of humán szfingozine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular szfingozine-1-phosphate levels and cell viability. *J.Biol.Chem.* 2003. **278**: 34541-34547.
178. **Maceyka,M., Milstien,S., and Spiegel,S.,** Szfingozine kinases, szfingozine-1-phosphate and szfingolipidomics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005. **77**: 15-22.
179. **Olivera,A. and Rivera,J.,** Szfingolipids and the balancing of immune cell function: lessons from the mast cell. *J.Immunol.* 2005. **174**: 1153-1158.
180. **Gomez-Munoz,A., Kong,J., Salh,B., and Steinbrecher,U.P.,** Szfingozine-1-phosphate inhibits acid sphingomyelinase and blocks apoptosis in macrophages. *FEBS Lett.* 2003. **539**: 56-60.

181. **Cuvillier,O. and Levade,T.,** Szfingozine 1-phosphate antagonizes apoptosis of humán leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood* 2001. **98**: 2828-2836.
182. **Kolesnick,R. and Fuks,Z.,** Radiation and ceramid-induced apoptosis. *Oncogene* 2003. **22**: 5897-5906.
183. **Lin,C.F., Chen,C.L., Chang,W.T., Jan,M.S., Hsu,L.J., Wu,R.H., Fang,Y.T., Tang,M.J., Chang,W.C., and Lin,Y.S.,** Bcl-2 rescues ceramid- and etoposide-induced mitochondrial apoptosis through blockage of caspase-2 activation. *J.Biol.Chem.* 2005. **280**: 23758-23765.
184. **Heckman,C.A., Duan,H., Garcia,P.B., and Boxer,L.M.,** Oct transcription factors mediate t(14;18) limfóma cell survival by directly regulating bcl-2 expression. *Oncogene* 2005.
185. **Marshansky,V., Wang,X., Bertrand,R., Luo,H., Duguid,W., Chinnadurai,G., Kanaan,N., Vu,M.D., and Wu,J.,** Proteasomes modulate balance among proapoptotic and antiapoptotic Bcl-2 family members and compromise functioning of the electron transport chain in leukemic cells. *J.Immunol.* 2001. **166**: 3130-3142.
186. **Kilpatrick,D.C.,** Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim.Biophys.Acta* 2002. **1572**: 187-197.
187. **Adams,L., Scott,G.K., and Weinberg,C.S.,** Biphasic modulation of cell growth by recombinant humán galectin-1. *Biochim.Biophys.Acta* 1996. **1312**: 137-144.

**A DISSZERTÁCIÓBAN ISMERTETETT ERDMÉNYEKBŐL SZÜLETETT
KÖZLEMÉNYEK**

1. FOUILLIT M, POIRIER F, MONOSTORI E, RAPHAEL M, BLADIER D, JOUBERT-CARON R, CARON M. Analysis of galectin 1-mediated cell signaling by combined precipitation and electrophoresis techniques *ELECTROPHORESIS*, **21**, 275-280 (2000) IF:3.385

2. FOUILLIT M, JOUBERT-CARON R, POIRIER F, BOURIN P, MONOSTORI E, LEVI-STRAUSS M, RAPHAEL M, BLADIER D, CARON M. Regulation of CD45-induced signaling by galectin-1 in Burkitt limfóma B cells *GLYCOBIOLOGY*, **10**, 413-419 (2000) IF:3.419

3. FAJKA-BOJA R, SZEMES M, ION G, LÉGRÁDI A, CARON M, MONOSTORI E. Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines *IMMUNOL LETT*, **82**, 149-154 (2002) IF: 1.847

4. VAS V, FAJKA BOJA R, ION G, DUDICS V, MONOSTORI E, UHER F. Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells *STEM CELLS*, **23**, 279-287 (2005) IF: 5.500

5. ION G, FAJKA-BOJA R , TOTH GK, CARON M MONOSTORI E. Role of p56lck and ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in galectin-1-induced cell death . *CELL DEATH DIFFER*, 12(8):1145-7 (2005) IF:8.192

6. ION G, FAJKA-BOJA R, KOVACS F, SZEBENI G, GOMBOS I, CZIBULA A, MATKÓ J, MONOSTORI E. Acid sphingomyelinase mediated release of ceramid is essential to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1. *CELL SIGNAL*, accepted for publication (2006) IF:4,741

A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ, NEM RÉSZLETEZETT EREDMÉNYEKBŐL SZÜLETETT KÖZLEMÉNYEK

1 KURUCZ E , GLAVITS R, KRENACS T, OCSOVSKY I, KERESZTES G, MONOSTORI E, ANDO I. An antiserum reacts with an evolutionary conserved region in the ϵ -subunit of the T-cell receptor-CD3 complex in phylogenetically distant species. IMMUNOL LETT, **38**, 167- (1993)

IF: 1.241

2 TOTH KG, VARADY G, NAGY Z, MONOSTORI E, PENKE B, HEGEDUS Z, ANDO I, FAZEKAS G, KURUCZ I, MAK M, RAJNAVOLGYI E. Branched polypeptides as antigens for influenza virus haemagglutinin and T cell receptor subunits. PEPTIDE RES, **6**, 272- (1993)

IF:1.522

3 MONOSTORI E, HARTYANI Z, OCSOVSKY I, HEGEDUS Z, ORAVECZ T, KALMAN M, ANDO I. Effect of phytohaemagglutinin on CD45 in T cells. IMMUNOL LETT, **42**, 197- (1994)

IF: 1.223

4 ORAVECZ T, MONOSTORI E, ONU A, KURUCZ E, ANDO I. Novel heterogeneity of the leucocyte common antigen (CD45):disulfide bound heterodimers between CD45 and 80 kDa polypeptide. IMMUNOL LETT, **40**, 7- (1994)

IF: 1.223

5 TOTH GK, VARADY G, JANAKY T, PENKE B, MAK M, LANG E, OTVOS L, HEGEDUS Z, MONOSTORI E. Synthesis of phosphotyrosine-containing peptides comparison of different methods and their use to investigate cell signalling via the T-cell receptor. ESCOM SCI.PUBL., pp. 0 (1994)

6 HEGEDUS Z, ANDO I, TOTH GK, VARADI GI, MONOSTORI E. Application of polyacrylamide gel electrophoresis for analysis of oligopeptide phosphorylation In vitro. BIOTECHNIQUES, **18**, 631- (1995)

IF: 2.305

7 TOTH GK, LACZKO I, HEGEDUS Z, VASS E, HOLLOSI M, JANAKY T, VARADI G SZBK, PENKE B, MONOSTORI E. Synthesis of phosphotyrosine-containing peptides:immunological and conformational investigations. in: SCHNEIDER CH PEPTIDES IN IMMUNOLOGY. ismeretlen, (1996) 223-

8 TOTH KG, LACZKO I, HEGEDUS Z, VASS E, HOLLOSI M, JANAKY T, VARADI G SZBK, PENKE B, MONOSTORI E. Synthesis of phosphotyrosine-containing T-cell receptor-zeta-sub unit peptides: conformational and immunological studies. in: PKAUMAYA, RHODGES PEPTIDES CHEMISTRY, STRUCTURE AND BIOLOGY. PROC.14.AM. PEPTI MAYFLOWER SCI.LTD, (1996) 460-

9 LACZKO I, HOLLOSI M, MONOSTORI E, TOTH GK. Conformational consequences of the phosphorylation of the T cell receptor complex zeta chain. EUR BIOPHYS J BIOPHY, **26**, 26- (1997)
IF: 1.613

10 MONOSTORI E, HARTYANI Z, HEGEDUS Z, OCSOVSKY I, PALINGER E, ANDO I. Microheterogeneity of the cell surface tyrosine phosphatase, CD4 5RA on T cells:phytohaemagglutinin

binding and non-binding fraction of the 220 kDa isoform. IMMUNOL LETT, **59**, 171- (1997)

IF: 1.096

11 LACZKO I, HOLLÓSI M, VASS E, HEGEDUS Z, MONOSTORI E, TOTH GK. Conformational Effect of Phosphorylation on T Cell Receptor/CD3 Zeta-Chain Sequences BIOCHEM BIOPH RES CO, **242**, 474-479 (1998)

IF: 2.78

12 CHITU V, DEMYDENKO D, HEGEDUS Z, MONOSTORI E, TÓTH GK. Conditions for permeabilization of cells used for intracellular tyrosine phosphorylation studies BIOTECHNIQUES, **27**, 435-437 (1999)

IF: 1.749

13 HEGEDÚS Z, CHITU V, TÓTH GK, FINTA C, VÁRADI G, ANDO I, MONOSTORI E. 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**, 31-39 (1999)

IF: 1.494

14 CHITU V, FAIKA BOJA R, TOTH GK, VARADI G, HEGEDUS Z, FRANKO A, SZUCS KS, MONOSTORI É. Comparative study on the effect of phosphorylated TCR zeta chain ITAM sequences on early activation events in Jurkat T cells PEPTIDES, **22**, 1963-1971 (2001)

IF: 2.137

15 LEGRADI A, CHITU V, SZUKACSOV V, FAJKA BOJA R, SZUCS KS, MONOSTORI E. Lysophosphatidylcholine is a regulator of tyrosine kinase activity and intracellular Ca²⁺ level in Jurkat T cell line IMMUNOL LETT, **91**, 17-21 (2004)

IF: 2.136

A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁTÓL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK

1 RAMADAN HAI, MONOSTORI E, CSERPAN I, OCSOVSZKY I, ANDO I. Expression of humán sialpohorin (CD43) in a humán x mouse somatic cell hybrid. HAEMATOLOGIA, **25**, 237- (1993)
IF: 0.071

2 HOLLAND KA, KERESO J, ZAKANY J, PRAZNOVSZKY T, MONOSTORI E, BELYAER N, HADLACZKY G. A tightly bound chromosome antigen is detected by monoclonal antibodies in a ring-like structure on humán centromeres. CHROMOSOMA, **103**, 559- (1995)
IF: 2.825

3 KUPIHAR Z, VARADI GY, MONOSTORI E, TOTH GK. Preparation of an asymmetrically protected phosphoramidite and its application in solid-phase synthesis of phosphopeptides TETRAHEDRON LETT, **41**, 4457-4461 (2000)

IF: 2.558

4 FAJKA-BOJA R, HIDVÉGI M, SHOENFELD Y, ION G, DEMYDENKO D, TOMOSKÖZI-FARKAS R, VIZLER C, TELEKES A, RESETAR A, MONOSTORI E. 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 (2002)

IF: 2.931

5 SZAKAL B, CSERPAN I, CSONKA E, MONOSTORI E, UDVARDY A, HADLACZKY G.

Cloning, characterization and localization of Chinese hamster HP1 isoforms CHROMOSOME RES, **12**,
483-493 (2004)

IF: 2.346