

**Szolubilis és sejteredetű galektin-1 által kiváltott T sejt
apoptózis mechanizmusa; egy összehasonlító tanulmány a
galektin-1 fiziológiás hatásának meghatározására**

Blaskó Andrea

Ph.D. értekezés tézisei

Témavezető: Monostori Éva, Ph.D., D.Sc.
MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet
Limfocita Szignál Transzdukciós Laboratórium

Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK, Szeged

2011

Bevezetés

Az erősen konzervált szénhidrátokat nagy affinitással felismerő galektin fehérjecsalád legkorábban felfedezett és legjobban jellemzett tagja a galektin-1 (Gal-1), amely az immunsejtek toleranciájának és homeosztázisának szabályozásában játszik szerepet. Ez a sokoldalú lektin nagy mennyiségben termelődik az immunprivilegizált szövetekben, valamint a tumor növekedésének helyszínén, ebből kifolyólag a Gal-1-et hatásos immunszuppresszív ágensek tartják, amely képes visszaállítani az immunsejtek homeosztázisát autoimmun és gyulladásos környezetben.

Gyulladáscsökkentő szerepét, legalábbis részben, az aktivált Th1-es és Th17-es T sejtek apoptózisának indukciójával éri el. Emellett, a Gal-1 az immunregulációban egyéb kiegészítő mechanizmusok indukciójával is részt vesz: a citokin termelés egyensúlyát Th2 profil felé tolja el, a regulátor T sejtek immunszuppresszív aktivitását és expanzióját támogatja, valamint szabályozza a T sejtek aktivitását, adhézióját és transzedotheliális migrációját. A Gal-1-et számos sejt termeli, nem csak tumorsejtek, hanem csontvelői eredetű, fiziológiás állapotú mesenchymális őssejtek is (MSC) és ez a fehérje akár részt vehet az MSC immunszuppresszív tulajdonságainak kialakításában.

Az MSC-k *in vitro* és *in vivo* immunszuppresszív hatása a szakirodalomból már ismert és az immunrendszer minden sejtjén érvényesül. Az allogén és mitogén aktiválta T sejtek osztódásának gátlásával, a T sejtek válaszképtelenségének vagy apoptózisának indukciójával, a citokinek termelésének módosításával valamint a dendritikus sejtek érésének és antigén prezentációjának gátlásával fejtik ki az immunszuppresszív hatásukat. Az MSC-k egyik legfontosabb immunválaszt moduláló hatása a Th1-es és a citotoxikus T sejtek illetve az NK sejtek funkciójának gátlása, ebből kifolyólag erős gyulladáscsökkentő hatással is rendelkeznek. A fent felsorolt funkcióknak a pontos mechanizmusa még tisztázásra vár, az irodalmi adatok alapján a közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás és a szolubilis faktorok szerepe is bizonyítottan tűnik. Az MSC által termelt szolubilis faktorok, - a hepatocita növekedési faktor, transzformáló növekedési faktor- β , a prostaglandin-E2, indolamine-2,3-dioxygenáz, nitrogén monoxid, szolubilis HLA-G és az IL10- mind gyulladáscsökkentő mediátorok. Mindazonáltal, a

rendelkezésünkre álló adatok nem bizonyítják, hogy az MSC-k által termelt faktorok bármelyike egyedül elegendő lenne az *in vitro* vagy *in vivo* immunszuppresszív hatáshoz.

Célkitűzések

1. A Gal-1-el végzett kutatások során a szakirodalomban sok ellentmondás született. Az eltérő eredmények oka, feltételezésünk szerint, a különböző kísérleti körülményekben, legfőképpen az alkalmazott Gal-1 koncentrációjában rejlik. Az ellentmondások feloldása érdekében kísérleteinkben összehasonlítottuk az általunk rendszeresen használt alacsony Gal-1 (aGal-1, 1,8 μM) koncentráció hatását a szakirodalomban használt, mintegy 10-szeres mennyiségű, magas koncentrációjú Gal-1 (mGal-1, 18 μM) hatásával.

2. A szolubilis rekombináns fehérjével végzett kísérletek nem világítanak rá a Gal-1 valódi, *in vivo* hatására, két okból kifolyólag: a) Gal-1 nagy valószínűséggel nem fordul elő szolubilis formában a szervezetben, feltehetően visszakötődik a Gal-1-et nagy affinitással kötő struktúrákhoz, melyek a termelő vagy a szomszédos sejt felszínén találhatóak; b) A rekombináns Gal-1 termeltetése és tisztítása laboronként eltérő lehet, emellett a Gal-1 biológiailag aktív formájához redukálószer jelenléte szükséges. Az előzőleg felsorolt mesterséges körülmények elkerülése végett Gal-1-et termelő sejteket használtunk effektor sejtnek és vizsgáltuk a vele kokultúrában tartott T sejtekre (Jurkat vagy aktivált T sejtekre) kifejtett citotoxikus hatását. Célunk az volt, hogy meghatározzuk vajon a sejtek által termelt Gal-1 szolubilis vagy membrán asszociált faktorként hat.

3. Következő lépésként megvizsgáltuk a fiziológiás (mesenchymális őssejtek) és pathológiás állapotú (tumor) sejtek termelte Gal-1 szerepét és mechanizmusát az általa indukált T sejt apoptózisban.

Módszerek

A tumorsejtek által termelt Gal-1 sejt felszíni jelenlétét áramlási citométerrel mutattuk ki a laboratóriumunkban előállított ellenanyag segítségével. A méréseket CellQuest™ software-rel értékeltük ki.

Az apoptotikus sejteket (Sub-G1 sejtpopuláció) DNS tartalom vizsgálatnak vetettük alá, melyet áramlási citofluorimetriával végeztünk.

A Gal-1 indukálta T sejt apoptózisban a foszfatidil szerin megjelenését fluoreszcens festékkel konjugált Annexin V jelöléssel mutattuk ki, majd mikroszkóppal és áramlási citofluorimetriával vizsgáltuk. A p56^{lck} és ZAP70 kinázok szerepét a folyamatban enzim hiányos T sejtek használatával bizonyítottuk. A mitokondrium depolarizációt egy mitokondriális membránpotenciál (MMP)-függő festék követésével igazoltuk. A molekula az egészséges mitokondriumban felhalmozódik, amit piros szín jelez, míg a csökkent membránpotenciálú mitokondriumba nem jut be, így monomer formában, a citoplazmában zöld színnel látható. Az aktív kaszpáz 3 molekulát felismerő ellenanyag használatával megmutattuk, hogy a T sejtekben a Gal-1 indukálta apoptózis során a kaszpáz 3 aktiválódik.

A Gal-1 termelést az egyes sejtvonalakban Western blot technikával igazoltuk.

Eredmények és diszkusszió

1. Munkánk során azt találtuk, hogy mint az aGal-1, mint az mGal-1 indukálja a foszfatidil szerin sejt felszíni expozícióját, raftok átrendeződését és az MMP csökkenését. Eltérést tapasztaltunk viszont a p56^{lck} és ZAP70 kinázok valamint a kaszpázok szerepében. Míg az mGal-1 kaszpáz független apoptózist idéz elő, amely a két kináz aktivitása nélkül is lezajlik, addig az aGal-1 igényli a kaszpázok közreműködését és a két kináz jelenlétét is. Ezek az eredmények alapján arra következtettünk, hogy a Gal-1 indukálta apoptózis mechanizmus szorosan összefügg az alkalmazott fehérje koncentrációjával.

2. A kokultúra rendszerben lehetőségünk volt a natív, nem módosított formában levő Gal-1 T sejt apoptózist indukáló képességének vizsgálatára. Mind a Jurkat, mind pedig az aktivált T sejteken apoptózist detektáltunk a kokultúra után, ellentétben a Gal-1 nem termelő HeLa sejtekkel, melyek nem indukáltak sejthalált a T sejteken. A laktóznak, a Gal-1 minimál ligandjának az analógjával TDG-vel a sejtek felszínéről leszorítható a Gal-1, minek hatására csökkent az apoptotikus T sejtek aránya. A Gal-1 expressziójának csendesítésével is hasonló hatást értünk el. A Gal-1 citotoxikus hatásának kifejtéséhez szoros sejt-sejt kapcsolatra van szükség, ugyanis az effektor és target sejt fizikai szeparációja megakadályozta a T sejtek apoptózist. Továbbá, a Gal-1 termelő sejtek kondicionált médiuma sem okozott apoptózist a T sejteken, vagyis a sejteredetű Gal-1 nem szolubilis faktorként indukálja a T sejtek halálát. Eredményeink azt mutatják, hogy a kokultúrában, az általunk vizsgált tumor sejtek termelte Gal-1 a felelős a T sejt apoptózis indukációjáért, illetve, hogy a Gal-1 nem szolubilis, hanem sejtkötött faktorként fejt ki citotoxikus hatását.

3. Az endogén, sejt felszínhez kötött Gal-1 és az alacsony koncentrációjú szolubilis Gal-1 a sejthalál Lck és Zap70 tirozin kinázok és kaspázok aktivitásától függő mitokondriális útvonalát stimulálta, míg a magas koncentrációjú Gal-1 mitokondrium függő, de tirozin kinázok és kaspázok aktivitásától független útvonalat indít be. Tehát, a vizsgálatunk szerint az alacsony koncentrációjú Gal-1 és a sejteredetű Gal-1 ugyanazon a szignáltranszdukciós eseményeken keresztül okoz sejthalált.

A további vizsgálatokhoz egér csontvelői MSC-k (BM-MSK) és egér aktivált T sejtek kokultúráját használtuk. A TDG-s kezelés után, a sejt felszíni Gal-1 eltávolításával csökkent a T sejt apoptózis mértéke. Hasonló eredményeket kaptunk Gal-1 csendesített és knock out BM-MSK-k használatával, mivel a sejt felszíni Gal-1 mennyiségének csökkentése akár kémiai, akár genetikai eszközökkel, csökkent aktivált T sejt apoptózist eredményezett. Az apoptózis egyes lépéseit megvizsgáltuk ezeken a fiziológiás sejteken is, és azt kaptuk, hogy az indukált útvonal az alacsony koncentrációjú szolubilis és a sejtkötött Gal-1-éhez hasonló. Ez esetben is igazoltuk a ceramid felszabadulás szükségességét és az apoptózis mitokondrium mediálta kaspáz függő voltát. Eredményeink alapján a magas koncentrációjú Gal-1-gyel ellentétében, mind a

pathológiás, mind a fiziológiás állapotú sejtek termelte Gal-1 és az alacsony koncentrációjú Gal-1 ugyanazt az apoptotikus útvonalat indukálja.

Összefoglalás

- Mind az aGal-1, mint az mGal-1 indukálja a foszfatidil szerin sejt felszíni expozícióját, a raftok átrendeződését és a mitokondriális membrán potenciál csökkenését. Eltérés van viszont a p56lck és ZAP70 kinázok valamint a kaszpázok szerepében. Míg az mGal-1 kaszpáz független apoptózist idéz elő, amely a két kináz aktivitása nélkül is lezajlik, addig az aGal-1 igényli a kaszpázok közreműködését és a két kináz jelenlétét is.
- A Gal-1 citotoxikus hatásának kifejtéséhez szoros sejt-sejt kapcsolatra van szükség, ugyanis az effektor és target sejt fizikai szeparációja megakadályozta a T sejtek apoptózisát.
- Az endogén, sejt felszínhez kötött Gal-1 és az alacsony koncentrációjú szolubilis Gal-1 a sejt által Lck és Zap70 tirozin kinázok és kaszpázok aktivitásától függő mitokondriális útvonalát stimulálja, míg a magas koncentrációjú Gal-1 mitokondrium függő, de tirozin kinázok és kaszpázok aktivitásától független útvonalat indít be.
- A galektin-1-et nagy mennyiségben expresszáló egér BM-MSC-k az alacsony koncentrációjú szolubilis és a sejtkötött Gal-1-éhez hasonló útvonalon indukálják a T sejtek pusztulását.

Köszönetnyilvánítás

Egyetemi hallgató korom óta tagja vagyok a Limfocita Szigáltranszdukciós Laboratóriumnak. A diploma után lehetőséget kaptam a munkám folytatására, és ezért hálás köszönettel tartozom Dr. Monostori Évának, témavezetőmnek. Gondos tanácsaival, útbaigazításaival támogatta a témám előrehaladását és remélem munkámmal én is hozzájárultam a csoport fő kutatási irányvonalának fejlődéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Fajka-Boja Robertának, aki sokszor, idejét nem sajnálva segítette munkámat, szakmai és az élet más területein is bármikor számíthattam rá. Dr. Kovács-Sólyom Ferencsel, aki már nincs a csapatunkban, nagyszerű együttműködést valósítottunk meg, öröm volt vele együtt dolgozni. Emellett szeretném megköszönni nekik, hogy Dr. Gabriela Ionnal karöltve aktívan részt vettek a dolgozatom témájának kidolgozásában.

Nagyon köszönöm az LSTL minden volt és jelenlegi tagjának: Dr. Légrádi Ádának, Dr. Czibula Ágnesnek, Szebeni Gábornak, Novák Julinak, Kriston-Pál Évának és Végh Leának a remek munkahelyi légkört, sok jókedvet és segítőkészséget, amit a hosszú évek alatt nyújtottak.

Köszönet illeti Gercsó Andrásné a kiváló technikai segítségért, ami nagymértékben hozzájárult a munkám előrehaladásához.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Katona Róbertnek és Dr. Blazsó Péternek az siRNS-sel transzfektált MSC-kért, Kotogány Editnek az áramlási citofluoriméter, Ferhan Ayaydinnak és Kószó Zsuzsannának a konfokális mikroszkópiában nyújtott segítségéért.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Uher Ferencnek, akitől a munkám alapjául szolgáló MSC-ket kaptuk számos hasznos tanács és praktika kíséretében. Emellett Robert Kissnek is szeretném megköszönni a melanóma és glióma sejteket.

Köszönettel tartozom az egyetemi tanárainknak is, akik közül sokakhoz bármikor bátran fordulhattam szakmai és lelki támogatásért is.

Köszönet illeti szeretett családomat és Bozsó Mikit, akik mindvégig töretlenül hittek bennem és mindenben támogattak.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni drága barátaimnak (nagy részüket a „biológiának” köszönhetem) akik pont olyannak szeretnek engem, amilyen vagyok.

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

Publikációk

Fajka-Boja R, **Blaskó A**, Kovács-Sólyom F, Szebeni GJ, Tóth GK, Monostori E (2008) Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cell Mol Life Sci*; 65(16):2586-93 IF: 5.511

Kovács-Sólyom F[#], **Blaskó A**[#], Fajka-Boja R, Katona RL, Végh L, Novák J, Szebeni GJ, Krenács L, Uher F, Tubak V, Kiss R, Monostori E.(2010) Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunol Lett.*; 127(2):108-18. IF: 2.906
[#]megosztott első szerzők

Blaskó A, Fajka-Boja R, Ion G, Monostori E (2011) How does it act when soluble? Critical evaluation of mechanism of galectin-1 induced T-cell apoptosis. *Acta Biologica Hungarica*; 62(1):114–119 IF: 0.551

Előadások

Gábor J. Szebeni, Roberta Fajka-Boja, **Andrea Blaskó**, Éva Kriston-Pál, Ágnes Czibula, Ferenc Uher, Péter Blaszó, Róbert Katona, Gabriella Joó, László Krenács, Éva Monostori (2010) Straub-days, Szeged
'Is mesenchymal stem cell - derived galectin-1 a master or staff in immunomodulation and tumor progression?'

Szebeni Gábor János, Kriston-Pál Éva, Blaszó Péter, Katona Róbert, Joó Gabriella, Uher Ferenc, Krenács László, **Blaskó Andrea**, Fajka-Boja Roberta, Vizler Csaba, Monostori Éva (2010) MIT, Szeged
'A mesenchymális őssejtekben termelődő galectin-1 alapvetően szabályozza a mesenchymális őssejtek tumor fejlődést serkentő hatását'

Fajka-Boja Roberta, **Blaskó Andrea**, Czibula Ágnes, Szebeni Gábor János, Blaszó Péter, Katona Róbert, Hegyi Beáta, Uher Ferenc, Monostori Éva (2010) MIT, Szeged
'A galectin-1 termelés befolyásolja a mesenchymális őssejtek limfocita proliferáció-szabályozó hatását'

Blaskó Andrea, Kovács-Sólyom Ferenc, Fajka-Boja Roberta, Szebeni Gábor János, Tubak Vilmos, Krenács László, Végh Lea, Monostori Éva (2009) MIT, Harkány
'A galectin-1 a tumorsejtek egyik fő, T-sejtekre ható citotoxikus faktora'

Gábor János Szebeni, **Andrea Blaskó**, Gabriella Joó, László Krenács, Csaba Vizler, Ferenc Uher Éva Monostori (2008) Straub-days, Szeged
'Bone marrow derived mesenchymal stem cells influence the progression of mouse tumors in models of 4T1 breast carcinoma and B16F10 melanoma'

Kovács-Sólyom Ferenc, **Blaskó Andrea**, Katona Róbert, Szebeni Gábor János , Krenács László, Végh Lea, Fajka-Boja Roberta, Tubak Vilmos, Monostori Éva (2008) MIT, Budapest

'A galectin-1, mint legfőbb effektormolekula az U87-globlasztóma által indukált T sejt apoptózisban'

Fajka-Boja Roberta, **Blaskó Andrea**, Kovács-Sólyom Ferenc, Szebeni Gábor János, Tóth K. Gábor, Monostori Éva (2008) MIT, Budapest

'A galectin-1 és GMI gangliozid kolokalizációja a klatrin- és raftfüggő endocitózis során'

Ferenc Kovács-Sólyom, **Andrea Blaskó**, Gábor János Szebeni, Vilmos Tubak, László Krenács, Roberta Fajka-Boja, Lea Végh, Éva Monostori (2007) Straub-days, Szeged

'The role of galectin-1 in the war of tumor cells against T cells'

Poszterek

Szebeni Gábor János, **Blaskó Andrea**, Blaszó Péter, Katona Róbert, Joó Gabriella, Uher Ferenc, Krenács László, Fajka-Boja Roberta, Kriston-Pál Éva , Vizler Csaba, Monostori Éva (2010) 40. Membántranszport Konf., Sümeg

'A csontvelői eredetű mesenchymális őssejtek és az általuk termelt galectin-1 szerepe 4T1 emlő karcinóma és B16 melanóma fejlődésében'

Szebeni Gábor János, **Blaskó Andrea**, Joó Gabriella , Krenács László, Fajka-Boja Roberta, Katona Róbert, Blaszó Péter, Vizler Csaba, Uher Ferenc, Monostori Éva (2009) MIT, Harkány

'A csontvelői eredetű mezenchymális őssejtek és az általuk termelt galectin-1 szerepe a tumorfejlődésben'

R. Fajka-Boja, F. Kovács-Sólyom, R.L. Katona, G.J. Szebeni, L. Krenács, L. Végh, **A. Blaskó**, F. Uher, J. Novák, V. Tubak, R. Kiss, É. Monostori (2009) EFIS, Berlin

'Mechanism of T-cell death induced by tumor cell derived galectin-1, that acts via direct cell-cell contact'

Blaskó A., F. Kovács-Sólyom, R. Fajka-Boja, R.L.Katona, G.J.Szebeni, L. Krenács, L.Végh, J. Novák, V. Tubak, É. Monostori (2009) Signals and signal processing in the immune system, Balatonöszöd

'Mechanism of T-cell death induced by tumor cell-derived galectin-1, that acts via direct cell-cell contact'

Blaskó Andrea, Kovács-Sólyom Ferenc, Fajka-Boja Roberta, Uher Ferenc, Monostori Éva (2008) MIT, Budapest

'Galectin-1 a mesenchymális őssejtek által termelt egyik fő T sejtekre ható citotoxikus faktor'

Fajka-Boja Roberta, **Blaskó Andrea**, Kovács-Sólyom Ferenc, Szebeni Gábor János, Tóth K. Gábor, Monostori Éva (2008) Membántranszport Konf., Sümeg

'A Galektin-1 klatrin- és raftfüggő endocitózisa'

Kovács-Sólyom Ferenc, **Blaskó Andrea**, Katona Róbert, Szebeni Gábor János, Krenács László, Végh Lea, Fajka-Boja Roberta, Tubak Vilmos, Robert Kiss, Monostori Éva (2008) Membrántranszport Konf., Sümeg

'A galektin-1, mint legfőbb effektormolekula az U87-globlasztóma által indukált T sejt apoptózisban'

Blaskó Andrea, Kovács-Sólyom Ferenc, Fajka-Boja Roberta, Uher Ferenc, Monostori Éva (2008) Membrántranszport Konf., Sümeg

'A mesenchymális őssejtek által termelt galektin-1 aktivált T-sejtek apoptózisát okozza: egy újonnan azonosított citotoxikus faktor az MSC-ben'