

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI
ÉS INFORMATIKAI KAR BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Galektin-1 indukált

T sejt apoptózis vizsgálatok

Ph.D. értekezés tézisei

Novák Julianna

Témavezetők:

Monostori Éva, Ph.D., D.Sc. professzor emerita

Fajka-Boja Roberta, Ph.D., tudományos főmunkatárs

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA SZEGEDI BIOLÓGIAI
KUTATÓKÖZPONT GENETIKAI INTÉZET

2023

Bevezetés:

A galektin-1 (Gal-1) β -galaktozid szénhidrát kötő lektin fehérje, szignál szekvencia nélkül szintetizálódik, ennek ellenére képes szekretálódni. Az extracelluláris Gal-1 lektin aktivitású, kötődik a sejtfelszíni glikozilált fehérjékhez, lipidekhez, receptorokhoz, az extracelluláris mátrix elemeihez így modulálja a szignalizációs útvonalakat, és részt vesz sejt adhéziós és migrációs folyamataiban.

Számos funkciója közül kiemelendő a gyulladáscsökkentő, immunszuppresszív hatása, mely elsősorban aktivált T sejtek apoptózisával magyarázható. A T sejt apoptózist kiváltó, egyetlen specifikus, funkcionális receptort ugyan nem azonosítottak, de több sejtfelszíni Gal-1 kötőpartner is ismert, többek között a CD45 és a lipid raftokban feldúsuló GM1 gangliozid. Kutatási eredmények mindinkább arra utalnak, hogy a Gal-1 nem egyetlen receptoron keresztül indukál apoptózist, hanem a membrán mikrodomének átszervezésével szabályozza a lipid raft elemek (pl.: GM1), a raftba transzlokálható, és nem transzlokálódó elemek keresztkötésével. Ezzel összhangban Gal-1 kötődés hatására kimutatták az egyes sejtfelszíni kötő partnerek átszerveződését T sejteken.

A Gal-1 indukált T sejt apoptózis jelátviteli mechanizmusában, a korai eseményekben igazolt szereplő az intracelluláris Lck tirozin kináz, mely hozzájárul a korai eseményekben bekövetkező nagymértékű tirozin foszforilációhoz, és hiányában az apoptózis gátlódik. Az Lck bonyolult aktiválódási és inaktiválódási folyamatainak szabályzásában szerepet kap a CD45 foszfatáz.

A Gal-1 T sejt apoptózist vált ki, de a T sejtek aktiválás hatására maguk is Gal-1-et kezdenek termelni, ugyanakkor ennek a *de novo* endogén Gal-1-nek

funkciója nem tisztázott. Egyes kutatók elképzelései szerint autokrin módon visszahatva a termelő sejtre apoptózist vált ki, azonban ezt nem bizonyították.

Célkitűzés:

Bár a Gal-1 indukált T sejt apoptózisban az Lck szükségessége, és az extracelluláris Gal-1- kötő membrán fehérjék lokalizációjának megváltozása Gal-1 hatására jól dokumentáltak, az extracelluláris elemek átszerveződésével összefüggésbe hozható intracelluláris jelátviteli elemek elrendeződését eddig még nem vizsgálták.

Ezen tények háttérében célul tűztük ki, az Lck plazmamembrán mozgásának a tirozinon foszforilált fehérjék lokalizációjának, az Lck mozgásában a CD45, a GM1 és a raftok szerepének vizsgálatát.

Szakirodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy bár a Gal-1-nek nem igazolható egyetlen funkcionális receptora, utalást találunk a Gal-1-GM1 „együtműködés” pozitív terápiás eredményeire, mely figyelmünket a GM1 irányba terelte. Ennek függvényében további célunk volt annak meghatározása, hogy változik-e a Gal-1 által indukált T sejt apoptózis a sejtfelszíni GM1 mennyiségétől.

T sejtek aktiváció hatására Gal-1-et kezdenek termelni, amelynek funkciója nem tisztázott.

Kérdésként tettük fel, hogy aktivált T sejtekben, *de novo* kifejeződő endogén Gal-1 részt vesz-e a T sejtek apoptózisában, és válaszára az alábbi vizsgálandó alpontokat jelöltük ki, szekretálódik-e a Gal-1 az aktivált T sejtől, illetve befolyásolja-e a más sejtől származó Gal-1 apoptotikus hatását.

Módszerek:

A rekombináns Gal-1 használatának hátrányai vannak, ebből kifolyólag vizsgálatainkban a fiziológiás körülményeknek jobban megfeleltethető sejt közvetített Gal-1 apoptotikus hatását vizsgáltuk, ko-kultúras rendszerben, ahol Gal-1 termelő és sejtfelszínen kifejező letapadó effektor sejtet tartunk egy tenyészetben nem letapadó target T sejtekkel.

Effektor sejtneként Gal-1 termelő tumor sejt vonalat (C32) alkalmaztunk, továbbá transzgenikus Gal-1 termelő HeLa^{Gal-1} sejt vonalat hoztunk létre, és megfelelő kontroll párját. A HeLa sejteket pcDNA3.1 vektorba ligált Gal-1-1 cDNS-sel, illetve üres plazmiddal transzfektáltuk, a Gal-1 expressziót áramlási citometriával és Western blot módszerrel ellenőriztük.

Target sejtneként Jurkat sejt vonalat, CD45 hiányos J45.01 sejt vonalat, humán aktivált T sejteket, retrovirális transzfekcióval létrehozott, majd klónozott, Gal-1-et termelő Jurkat sejt vonalat (J^{Gal}), illetve magas és alacsony GM1-es Jurkat és aktivált T sejt vonalakat alkalmaztunk.

Az alacsony és magas sejt felszíni GM1 sejtek létrehozása: Jurkat illetve humán aktivált T sejteket biotinilált cholera toxin B-t adtunk, sztreptavidinnel konjugált mágnesezhető mikrogöngyökkel elegyítettük. A mágnessel kifogott sejtek, a pozitív frakció, GM1-et magasan kifejező aktivált T sejteket a aktTGM1^{hi} a felülúszóban lévő sejtek, a negatív frakció, a J.GM1^{lo} (Jurkat háttér) vagy az aktTGM1^{lo} (humán aktivált T sejt háttér) elnevezést kapták. GM1 mennyiségét áramlási citofluorimetriával határoztuk meg. Egérből származó aktivált T sejteket, vad típusú (C57BL/6) és Gal-1 génkiütött egér (B6.Cg-Lgals1tm1Rob/J,006337) nyirokcsomóiból izolálását perifériás T sejteket konkavalin A aktiválás során kaptunk.

Az Lck és a tirozinon foszforilált fehérjék elhelyezkedését ko-kultúrában tartott sejtek fixált és permeabilizált, majd immuncitokémiai módszerrel

jelölt minták mikroszkópos képanalízisével határoztuk meg. A raft-asszociációt vizsgáló kísérleteinkben β -ciklodextrint alkalmaztunk.

Az apoptózis detektálásához annexinV markert (foszfatidil-szerin kötő), illetve kaszpáz 3 aktivitását mennyiségét mértük, mikroszkópos képfelvételeket készítve.

Eredmények:

A,

1. Sejt közvetített Gal-1 hatására bekövetkező szignalizáció során, az Lck kizáródik a sejtkapcsolati régióból.

Letapadó sejt által termelt Gal-1 hatására a T sejtekben lévő Lck kináz kirekesztődik (szegregálódik) a kapcsolati zónából a ko-kultúra 45-60 percében. A jelenség Gal-1 specifikusságát többféle kísérleti összeállításban is bizonyítottuk, és a laktóz (Gal-1 inhibitor) kezelés az Lck szegregációt gátolta.

2. Tirozin foszforiláció a sejtkapcsolati régióban detektálható.

Tirozin foszforiláció detektálható a ko-kultúra 45 percéig a sejtkapcsolatban, amikor az Lck még a sejtkapcsolatban is megtalálható. Az Lck kizáródásával összhangban a tirozin foszforiláció a 60. percre teljesen lecseng,

3. A CD45 fizikai jelenléte szükséges az Lck szegregációjához.

J45.01 CD45 hiányos sejtvonalon nem tapasztalható az Lck szegregáció.

4. A CD45 foszfatáz aktivitása is szükséges az Lck szegregációjához

Specifikus CD45 foszfatáz gátolót alkalmazva nem tapasztaltuk az Lck szegregációját.

5. Az Lck szegregáció raft asszociált.

A membrántutajokat összetartó koleszterin eltávolítása után, a raftok szétroncsolásával, az Lck szegregációja szintén elmaradt.

6. Létrehoztunk alacsony és magas GM1-et kifejező T sejt populációkat.

A GM1 expresszióra tekintve heterogén Jurkat és és humán aktivált T sejt populációból kiindulva alacsony (J.GM1^{lo}, aktTGM1^{lo}) és magas (Jurkat, aktTGM1^{hi}) GM1 szintű sejteket szeparáltunk.

7. Az Lck szegregációjának mértéke összefüggésben van a sejtfelszíni GM1 mennyiséggel.

A több sejtfelszíni GM1-et kifejező Jurkat és aktTGM1^{hi} magasabb az Lck kirekesztődést mutatott, mint a kevesebb sejtfelszíni GM1-et kifejező J.GM1^{lo} és aktTGM1^{lo}.

8. A Gal-1 indukálta T sejt apoptózis mértéke összefügg a T sejtek felszíni GM1 mennyiségével.

A több sejtfelszíni GM1-et kifejező Jurkat és aktTGM1^{hi} magasabb a Gal-1 indukált T sejt apoptózis mértéke, mint a kevesebb sejtfelszíni GM1-et kifejező J.GM1^{lo} és aktTGM1^{lo}.

B,

9. Egér T sejtekben aktiválás hatására Gal-1 termelődik.

Kimutattuk, hogy egér perifériás T sejtek poliklonális stimulusra Gal-1-et kezdenek termelni.

10. T sejtekben *de novo* endogén Gal-1 intracellulárisan van jelen.

Bizonyítottuk, hogy normál egerből származó aktivált T sejtek kifejezik a Gal-1-et, de a fehérje nem kerül szekrécióna, a Gal-1

fehérje detektálható az összsejt lizátum mintákból, azonban sem a sejt kultúra felülúszóban, sem a sejt felszínen nem volt kimutatható.

11. A transzgenikus Gal-1-et kifejező Jurkat T sejt vonalat hoztunk létre (J^{Gal}).

12. Meghatároztunk, hogy a J^{Gal} sejtek szintén nem szekretálják a Gal-1-et.

10-es pontban leírtakhoz hasonlóan a J^{Gal} -ra is kimutattuk, hogy a Gal-1 sejtben belül marad.

13. Az inGal-1 tartalom érzékenyíti a T sejtet az extracelluláris Gal-1 apoptotikus hatására.

A ko-kultúras apoptózis tesztek eredménye, hogy a Gal-1-et nem kifejező T sejtek ellenállóbbak az exGal-1 apoptotikus hatására, mint a Gal-1-et expresszáló kontroll párjaik.

Összefoglalás:

Vizsgáltuk a sejt közvetített Gal-1 indukálta T sejt apoptózis legkorábbi folyamataiban szerepet játszó Lck tirozin kináz laterális membrán mozgását. Megállapítottuk, hogy az effektor-target sejt kontaktusából az Lck tirozin kináz egy idő után kizáródik, ezzel párhuzamosan a tirozin foszforiláció megszűnik a sejt kapcsolatban, ami utalhat arra, hogy az Lck fizikai kirekesztődésével egy inaktiválódási folyamat következik be. Megállapítottuk, hogy a Gal-1 kötő, és az Lck aktivitását szabályozó CD45 receptor tirozin foszfatáz jelenléte és enzim aktivitása egyaránt szükséges az Lck kizáródásához. A raftkomponens GM1 gangliozid szintén egy azonosított Gal-1 kötőpartner T sejtek felszínén. Kimutattuk, hogy a raftoknak eszenciális szerepük van az Lck laterális membrán mozgásában, és a sejt felszíni GM1 mennyiségének csökkenésével mind az Lck szegregáció, mind a Gal-1 indukált T sejt apoptózis lecsökken.

Igazoltuk, hogy aktivált T sejtekben *de novo* Gal-1 expresszálódik, de nem szekretálódik, és intracellulárisan érzékenyíti a T sejteket az extracelluláris Gal-1 apoptotikus hatására.

Summary:

We investigated the lateral membrane movement of the Lck tyrosine kinase involved in the earliest processes of cell-derived Gal-1 induced T cell apoptosis. We have found, that the Lck tyrosine kinase is excluded from the effector-target cell contact (Lck segregation), and parallelly tyrosine phosphorylation ceases in the cell connection, which may indicate that an inactivation process occurs with the physical exclusion of Lck. We have found that the physical presence and enzyme activity of Gal-1 binding partner CD45 receptor tyrosine phosphatase is necessary for the exclusion of Lck. The raft component GM1 ganglioside is also an identified Gal-1 binding partner on the surface of T cells. We have shown, that rafts have an essential role in the lateral membrane movement of the Lck, and both Lck segregation and Gal-1-induced T cell apoptosis decrease with a decrease in the amount of GM1 on the cell surface.

We have shown that Gal-1, expressed in Gal-1-transgenic Jurkat cells or in activated T-cells, remained intracellularly, and sensitizes T cells to the apoptotic effect of extracellular Gal-1.

A dolgozat témájául alapul szolgáló folyóirat cikkek:

1. GM1 controlled lateral segregation of non-receptor tyrosine kinase Lck predispose T-cells to tumour cell-derived galectin-1 induced apoptosis

Julianna Novák, Éva Kriston-Pál, Magdolna Deák, László Kovács, Éva Monostori, Roberta Fajka-Boja

Mol Immunol. 2014 Feb;57(2):302-9. doi: 10.1016/j.molimm.2013.10.010. Epub 2013 Nov 12. **IF (2013): 3,003**

2. Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions.

Magdolna Deák, Ákos Hornung, Julianna Novák, Dima Demydenko, Enikő Szabó, Ágnes Czibula, Roberta Fajka-Boja, Éva Kriston-Pál, Éva Monostori, László Kovács.

Immunobiology. 2014 Oct 30. pii: S0171-2985(14)00221-6. doi: 10.1016/j.imbio.2014.10.023. **IF (2014): 3,044**

Idézhető absztrakt

3. Focusing on the activated T cell produced endogene galectin-1

Julianna Novák

Acta Biologica Szegediensis Volume 55 (1) 2011.

A dolgozat témájához kapcsolódó folyóirat cikkek:

1. Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1

Ferenc Kovács-Sólyom, Andrea Blaskó, Roberta Fajka-Boja, Róbert L. Katona, Lea Végh, Julianna Novák, Gábor János Szebeni, László Krenács, Ferenc Uher, Vilmos Tubak, Robert Kiss, Éva Monostori

Immunol Lett. 2010 Jan 4;127(2):108-18. Epub 2009 Oct 27, **IF(2009): 2.858**

2. Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mesenchymal stem cell-mediated tumor promotion

Gábor János Szebeni, Éva Kriston-Pál, Péter Blaszó, Róbert Katona, Julianna Novák, Enikő Szabó, Gabriella Joó, Beáta Hegyi, Ferenc Uher, László Krenács, Roberta Fajka-Boja, Ágnes Czibula, Éva Monostori

PLoS One. 2012;7(7):e41372. Epub 2012 Jul 23 **IF(2012): 3,73**

Poszter nemzetközi konferencián:

IMPULSE 2011 Immune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies, 3-6 September 2011 Visegrad, Hungary

Focusing on the function of endogenous galectin-1 in activated T-cells

Julianna Novák, Magdolna Deák, Ágnes Czibula, Roberta Fajka-Boja, László Kovács, Éva Monostori

Prezentáció belföldi konferencián:

Magyar Immunológiai Társaság 40. Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011.
október 12-14.

Hogyan befolyásolja a T-sejtekben, aktiválás hatására megjelenő galektin-1 a T-sejtek apoptózis szignálokkal szembeni érzékenységét?

Novák Julianna, Deák Magdolna, Czibula Ágnes, Fajka-Boja Roberta, Kovács László, Monostori Éva

Magyar Immunológiai Vándorgyűlés, 2010. Szeged

Hogyan szabályozza a transzgenikus Jurkat sejtekben termelődő galektin-1

a T sejtek különböző citotoxikus stimulusokkal szembeni érzékenységét?

Novák Julianna, Dmytro Demydenko, Fajka-Boja Roberta, Blaskó Andrea, Monostori Éva

IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt-és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok,

2011.03.25-27:

Az exogén galektin-1 és más apoptotikus faktorok hatásának vizsgálata galektin-1-et termelő T limfocita sejtvonalon

Novák Julianna, Dmytro Demydenko, Fajka-Boja Roberta, Blaskó Andrea, Monostori Éva

Köszönetnyilvánítás:

Szeretném megköszönni **prof. Dr. Monostori Évának** a témavezetői tevékenységét, a sok gyakorlati és elméleti tanácsait. **Dr. Fajka-Boja Roberta** az Lck szegregációs projekt finomhangolója, mérhetsenül köszönöm munkáját.

Dr. Czibula Ágnest a qRT-PCR kísérletes munkáiért illeti köszönet, **Dr. Kriston-Pál Évát** pedig a laktóz mosásos Lck-s kísérletek elvégzéséért. **Dr. Kovács-Sólyom Ferenc** a ko- kultúra rendszer kifejlesztője, továbbá a HeLa transzfektáns sejtek létrehozója. Szeretném megköszönni **Gercsó Andrásné**nek, hogy mindig első osztályú, prémium sejteket kaptam tőle.

Dr. Ferhan Ayaydint és **Koszó Zsuzsát** a konfokális mikroszkópia használata során nyújtott tanácsaikért illeti köszönet, **Kotogány Edit**, és **Fehér Nóra** az áramlási citométer nagymesterei, köszönöm nekik a kiváló szakmai segítségüket.

A munkához nyújtott pályázati támogatások: NKTH-OTKA CK 78188, OTKA PD 75938, TÁMOP- 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035

NYILATKOZAT

Mint az alábbi közlemény felelős szerzője igazolom, hogy a Ph.D. jelölt Novák Julianna jelentős mértékben hozzájárult az alábbi cikk létrehozásához, és téziseiben felhasznált eredményeket más Ph.D. dolgozatban nem használjuk fel.

Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions.

Magdolna Deák, Ákos Hornung, Julianna Novák, Dima Demydenko, Enikő Szabó, Ágnes Czibula, Roberta Fajka-Boja, Éva Kriston-Pál, Éva Monostori, László Kovács.
Immunobiology. 2015 Apr;220(4):483-9. doi:
10.1016/j.imbio.2014.10.023. Epub 2014 Oct 30.



.....

Prof. Dr. Monostori Éva

Professzor Emerita

NYILATKOZAT

Mint az alábbi közlemény felelős szerzője igazolom, hogy a Ph.D. jelölt Novák Julianna jelentős mértékben hozzájárult az alábbi cikk létrehozásához, és téziseiben felhasznált eredményeket más Ph.D. dolgozatban nem használjuk fel.

GM1 controlled lateral segregation of non-receptor tyrosine kinase Lck predispose T-cells to tumour cell-derived galectin-1 induced apoptosis

Julianna Novák, Éva Kriston-Pál, Magdolna Deák, László Kovács, Éva Monostori, Roberta Fajka-Boja Mol Immunol. 2014 Feb;57(2):302-9.



Dr. Fajka-Boja Roberta

Tudományos főmunkatárs

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetika Intézet

