

Blaskó Andrea

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

Ph.D. értekezés

témavezető: Monostori Éva, Ph.D., D.Sc.

MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet
Limfocita Szignál Transzdukciós Laboratórium

Biológia Doktori Iskola
SZTE TTIK, Szeged

2011

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	5
Bevezetés	6
1. Az apoptózis általános mechanizmusa	6
2. Az apoptózis szerepe az immunrendszerben	8
3. Gal-1 struktúra és funkció	10
4. Gal-1 immunmoduláló hatása	11
4.1. A Gal-1 szerepe a T sejt apoptózisban	12
4.2. A Gal-1 szerepe a gyulladásban	14
4.3. A Gal-1 szerepe a sejtadhézióban	16
4.4. A Gal-1 szerepe Treg sejtek funkciójában	17
5. Tumor immunprivilegium	17
5.1. Gal-1 a tumorban	19
6. A mesenchymális őssejtekről általában	20
7. MSC-k regeneratív és immunszuppresszív hatása	22
7.1. Az MSC-k <i>in vitro</i> immunszuppresszív hatása	23
7.2. Az MSC-k <i>in vivo</i> immunszuppresszív hatása	24
8. Az MSC-k és Gal-1	25
Célkitűzések	27
Anyagok és módszerek	29
1. Felhasznált sejtvonalak	29
2. Mikroszkópos vizsgálatok	30
3. Áramlási citofluorimetriás vizsgálatok	33
4. SDS gél-elektroforézis, Western blot analízis	34
5. Rekombináns Gal-1 előállítása, tisztítása	35

6. Pufferek, oldatok	36
Eredmények	41
1. Szolubilis, rekombináns Gal-1 hatása a T sejtekre	41
1.1. Különböző koncentrációjú Gal-1-gyel indukált apoptózis eltérő kinetikával zajlik	41
1.2. Az apoptózis a membrán aszimmetria felbomlásával jár, függetlenül az alkalmazott Gal-1 koncentrációjától	42
1.3. A CD45 jelenléte nem szükséges az aGal-1 indukálta apoptózishoz, de negatívan regulálja a mGal-1 indukálta apoptózist	43
1.4. A raftátrendeződés feltétele a Gal-1 indukálta apoptózis lefolyásának	43
1.5. Az Lck és ZAP70 tirozin kinázok nem szükségesek az mGal-1 indukálta apoptózis szignálkövetítéséhez	45
1.6. A mitokondriális membránpotenciál -csökkenés fontos lépése az apoptózisnak mind alacsony, mind magas Gal-1 koncentráció esetében	46
1.7. Az aGal-1 kaszpázfüggő, az mGal-1 kaszpáz független apoptózist okoz	46
2. Sejtek által termelt, natív Gal-1 sejt kötött és nem szolubilis formában hat a T sejtek életképességére	47
3. Pathológiás és fiziológiás állapotú sejtek által termelt Gal-1 szerepe	50
3.1. Humán tumor eredetű Gal-1 által indukált T sejt apoptózis mechanizmusa	51
3.1.1. PS sejt felszíni expozíció	53
3.1.2. Raftátrendeződés	54
3.1.3. Lck és Zap70 kinázok szükségessége	55
3.1.4. Ceramid felszabadulás	56
3.1.5. MMP csökkenés	57
3.1.6. Kaszpáz aktiváció	58
3.2. Fiziológiás, csontvelői MSC sejtek által termelt Gal-1 hatása a T sejtek életképességére	59
3.2.1. Humán csontvelői eredetű MSC hatása Jurkat és aktivált,	

<i>perifériás T sejtek életképességére</i>	59
<i>3.2.2. Egér csontvelői MSC (BM-MSC)</i>	62
Diszkusszió	69
Irodalomjegyzék	75
Saját közlemények	90
Köszönetnyilvánítás	91
Summary	92
Összefoglalás	95

Rövidítések jegyzéke

Ac-IETD:	Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-CHO
aGal-1:	alacsony (1,8 μ M) koncentrációjú Gal-1
aktT sejt:	aktivált T sejt
β -CD:	β -ciklodextrin
BM-MSC:	egér csontvelői mesenchymális őssejt
EAE:	kísérletes autoimmun encephalomyelitis
ECM:	extracelluláris mátrix
HeLa ^{Gal-1} :	Gal-1 termelő Hela
hMSC:	humán mesenchymális őssejt
Gal-1:	galektin-1
GVHD:	graft versus host betegség
mGal-1:	magas (18 μ M) koncentrációjú Gal-1
IDO:	indolamin-2,3-dioxigenáz enzim
INF- γ :	interferon- γ
MMP:	mitokondriális membránpotenciál
MSC:	mesenchymális őssejt
NO:	nitrogén-monoxid
PGE2:	prostaglandin E2
PI:	propidium jodid
PS:	foszfatidil-szerin
rGal-1:	szolubilis rekombináns Gal-1
TDG:	thiodigalaktózid
TGF- β :	transzformáló növekedési faktor
TNF- α :	tumor nekrosis faktor
zVADfmk:	N-Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl keton

Bevezetés

1. Az apoptózis általános mechanizmusa

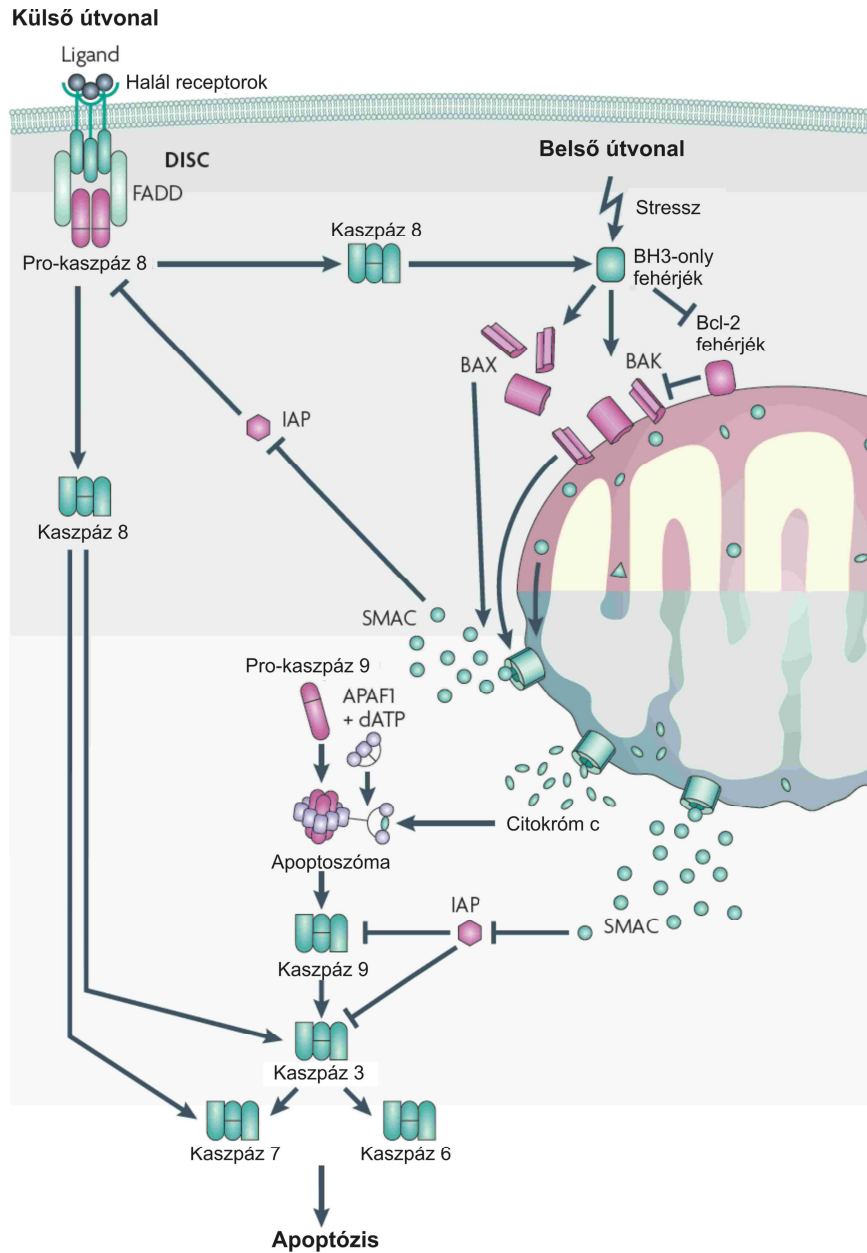
A soksejtes élőlények életének elengedhetetlen része az apoptózis folyamata, amely fontos szerepet játszik az egyedfejlődésben és a szöveti homeosztázis fenntartásában (Prindull 1995). A feleslegessé vált, elöregedett, fertőzött vagy potenciálisan veszélyt jelentő sejtek alkotói a programozott sejthalál során lebomlanak és membránnal határolt vezikulákba csomagolódnak, melyeket a szomszédos sejtek fagocitálnak. Tehát ezek a sejtek gyulladás előidézése nélkül, aktívan, szabályozott körülmények között felszámolják magukat, mint élő rendszert (Savill & Fadok 2000). Ennek a regulációnak a hiánya különböző patológiás állapotokat eredményez, mint például fejlődési rendellenességek, autoimmun betegségek és rák (Thompson 1995).

Az apoptózis jellegzetes jegyei a membránhólyagosodás, sejt zsugorodás, kromatin kondenzáció és fehérje, illetve DNS fragmentáció. A nekrozissal ellentétben, ahol a sejtek tartalma ellenőrizetlenül a környező térbe ürül és ezzel a környező sejtek sérüléseit okozza, az apoptózis nem okoz gyulladást. A becsomagolódott sejtmaradványokat a makrofágok bekebelezéssel távolítják el (Savill & Fadok 2000).

Az apoptózis két fő típusa a molekuláris mechanizmus alapján a külső (extrinsic), azaz receptor mediált és a belső (intrinsic), mitokondrium által mediált útvonal. A két szignál transzdukciós folyamat között átfedés is lehetséges (Li et al. 1998; Luo et al. 1998; Jin & El-Deiry 2005) (1. ábra).

A külső útvonal (1. ábra) a sejtfelszínen levő halál receptorok, mint amilyen a Fas, TNFR (Tumor necrosis factor receptor) vagy a TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), közvetítésével indul meg. A halál-ligand receptorához való kötődésekor bekövetkezik a receptor oligomerizációja. Ez a halál doménnel (DD: death domain) rendelkező adapter molekulák (FADD: Fas-associated death domain, TRADD: TNFR associated death domain) és a pro-kaspáz 8 kapcsolódásához vezet, létrejön a DISC (death-inducing signaling complex), amelyben a pro-kaspáz 8 autoproteolitikus hasítással aktiválódik. Ilyen formában kész lesz proteolízissel aktiválni az effektor kaspázokat (kaspáz 3, kaspáz 6 és 7) (Ashkenazi & Dixit 1998). Az aktív kaspázok

képesek hasítani az ICAD-ot (inhibitor of caspase activated DNase), ezzel engedélyezve a CAD (caspase activated DNase) aktivációját és transzlokációját a sejtmagba, ahol elvégzi a genomi DNS feldarabolását.



1. ábra: Apoptózis általános mechanizmusai (Rudel és mtsai nyomán)
Részletes magyarázat a szövegben.

Emellett a kaszpáz 3-nak egy DNS repair enzimet (PARP1: poly-ADP ribose polymerase) inaktíváló hatása is van, ezzel is biztosítva a DNS degradáció lezajlását. A kaszpázok regulátorai az IAP-ok (inhibitor of apoptosis proteins, apoptózis fehérjék inhibitora), a kaszpázok proteolitikus aktivitásának gátlásával (Scott et al. 2005).

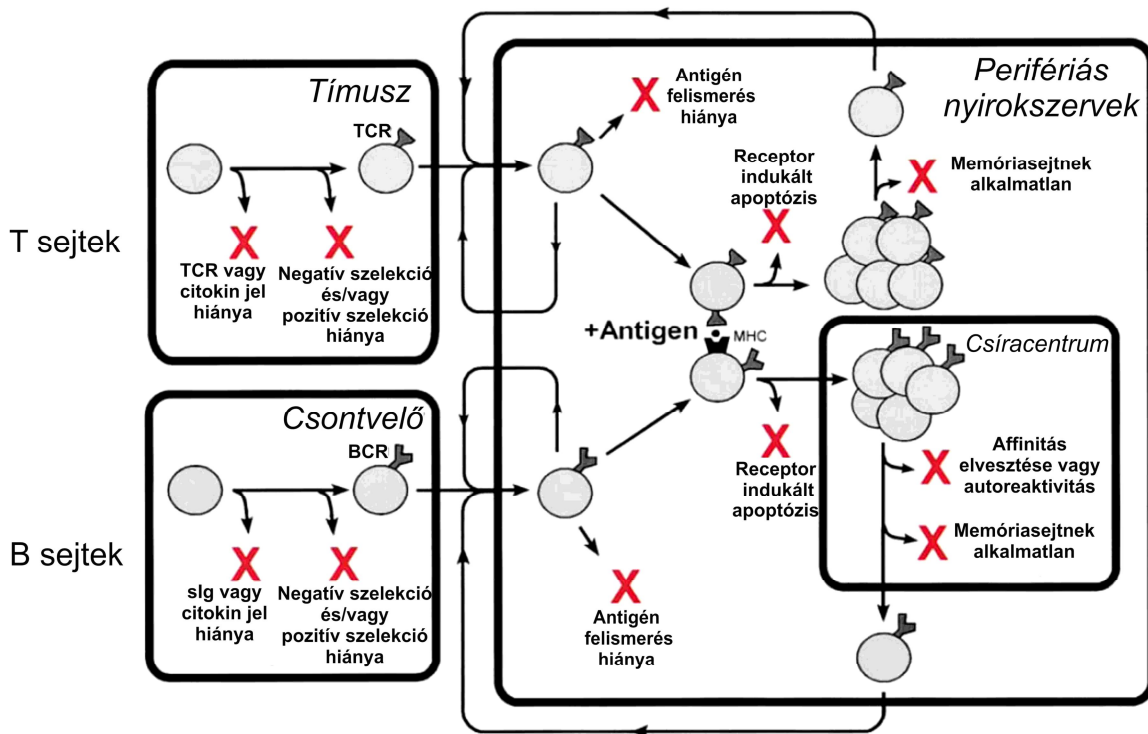
A belső jelátviteli utat (1. ábra) különböző stresszek, pl. UV sugárzás, ozmotikus sokk, oxidálószeres válthatják ki, de a DNS sérülés és a különböző kemoterápiás szerek is a mitokondrium mediálta apoptotikus utat aktiválják. Stressz szignálra a BH3-only fehérjék (Bid, Bim), a sejt stressz-szenzorai, aktiválódnak, hogy legyőzzék a Bcl-2 szerű anti-apoptotikus fehérjék gátló hatását, illetve stimulálják, hogy a mitokondriumban lokalizálódó, illetve oda transzlokálódó proapoptotikus fehérjék, a BAK és a BAX oligomerizálódjanak. Ennek következtében a mitokondrium transzmembrán potenciálja lecsökken, és a citokróm c, kiáramlik a citoplazmába (Wei et al. 2001). Ott az Apaf-1 fehérjével együtt a kaszpáz-9-et aktiválja és a terminális kaszpáz kaszkádot indítja el. A citokróm c mellett a mitokondriumból kikerül a citoszolba a SMAC/DIABLO is, amely egy másodlagos kaszpáz aktivátor, gátolja a IAP-ok működését és így indirekt módon járul hozzá a kaszpáz kaszkád kialakulásához (Shi 2002; Green 2005).

Esetenként a két fent említett útvonal nem különül el szigorúan, átfedésekkel színesítve a sejthalál folyamatát. A halál receptor mediálta apoptózis is aktiválhat mitokondriális útvonalat a DISC-ben aktiválódott kaszpáz 8 segítségével, mely egy BH3 only fehérjét, a BID-et aktiválja proteolitikus hasítással. Az így létrejött aktív BID is képes aktiválni pórusok képződését a mitokondrium membránján, ami a sejtorganelum diszfunkciójához vezet (Li et al. 1998; Luo et al. 1998; Jin & El-Deiry 2005) (1. ábra).

Az apoptózis utolsó lépései közé tartozik a sejttartalom apoptotikus testekbe való csomagolása és a fagocitózis. Az apoptotikus sejtek a megfelelő időben „come and eat me” („gyere és egyél meg”) szignálokat adnak a szomszédos sejteknek vagy a makrofágoknak, megkönnyítve ezzel a felismerésüket és könnyebb elkülönítésüket. Egy tipikus ilyen „eat me” szignál a foszfatidil-szerin (PS: phosphatidylserine), mely a sejtmembrán citoplazmatikus oldalán található, de apoptotikus stimulusra a sejt külső felszínére kerül (Savill & Fadok 2000).

2. Az apoptózis szerepe az immunrendszerben

A limfociták életútjuk során számtalanszor átesnek különböző apoptotikus ellenőrző pontokon, biztosítva a megfelelő fejlődésüket, homeosztázisuk fenntartását és a betegségek megelőzését. A nagyszámú T és B sejtből álló, állandóan megújuló limfocitakészlet folyamatos kialakulása során funkcióképtelen, autoagresszív vagy az adott időpontban már nem szükséges klónok is létrejönnek, melyek eltávolítása a funkcionális repertoár hatékony működése szempontjából elengedhetetlen.



2. ábra: Apoptózis az immunrendszerben (Rathmell és mtsai nyomán)

Részletes magyarázat a szövegben.

Az első ellenőrző pont az elsődleges nyirokszervekben a limfociták kifejlődésének helyén zajlik. Ha nem találkoznak citokinekkal vagy sikertelenül kompetálnak értük, valamint elmarad az antigén receptor (TCR vagy BCR) átszerveződése és hibás vagy egyáltalán nem alakul ki a pozitív szelekció, helyette negatív szelekció működik, mindezek a körülmények a limfociták apoptózisát indukálják.

A következő ellenőrző pont a perifériás limfoid szervekben történik, ahol azok a nyugvó limfociták, melyek nem találkoznak antigénnel illetve nem tudnak átalakulni hosszú életű sejté, apoptózissal elpusztulnak. Az antigénnel való találkozásakor, a perifériás nyirokszervekben, a T sejtek sorsa kétféle lehet: antigén hatására effektor sejtekké differenciálódnak, majd az immunválasz lecsengésekor apoptózissal elpusztulnak. Az antigén specifikus T sejtek egy része hosszú életű memória sejtekké differenciálódik. A B sejtek, melyek megkötik és a T sejteknek prezentálják is az MHCII komplexében az antigén peptideket, szintén elpusztulhatnak receptor indukálta sejthalállal. A csíracentrumban lokalizálódó B sejtek, ha elveszítik az affinitásukat az antigénhez vagy autoreaktivakká válnak, eliminálódnak. Így tehát a T és B limfociták, melyek az antigén felismerést és aktivációt követően nem képesek memóriasejtekké alakulni, effektor funkciójuk ellátása után egyaránt eliminálódnak (Rathmell & Thompson 2002) (2. ábra). Az immunológiai egyensúly fenntartásához tehát a felesleges limfociták eliminálódnak, ennek a folyamatnak a szabályozásában a környező sejtek és citokinek/kemokinek vesznek részt. Az elmúlt évtized tanulmányai alapján a galektin fehérjecsalád tagjai is meghatározott szerepet játszanak az immunsejtek életképességében.

3. Gal-1 struktúra és funkció

A galektin fehérjecsalád tagjai lektinek, melyek legfőbb jellemzőik, hogy szénhidrátkötő domainjük révén sejt felszíni glikokonjugátumokhoz kötődnek, a β -galaktozidokhoz mutatnak nagy affinitást. Ez idáig tizenöt különböző galektin molekulát azonosítottak emlősökben.

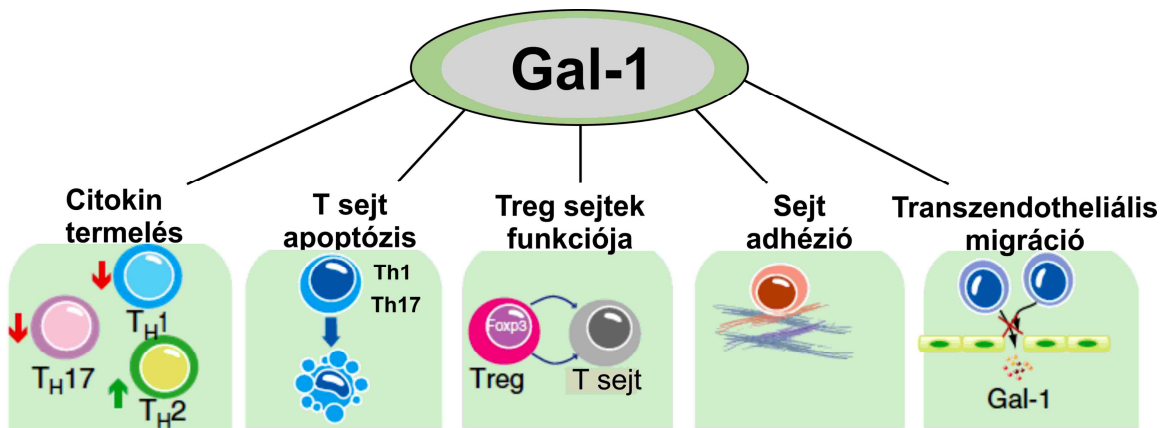
Ezen család legkorábban felfedezett és legjobban jellemzett tagja a galektin-1 (Gal-1), amely egy 14kDa molekulatömegű, egy szénhidrátkötő domainnel rendelkező globuláris fehérje. A Gal-1 az ideg- és izomszövetben, vesében, tüdőben, méhlepényben, az elsődleges (tímusz, csontvelő) és másodlagos (lép, nyirokcsomók) limfoid szervekben termelődik (Perillo et al. 1998). A Gal-1 fehérjének számos olyan funkcióját azonosították, melyek az izom- és idegszövet regenerációjával, valamint az immunhomeosztázis szabályozásával kapcsolatosak. Egérvizsgálatokban kimutatták a szaglóidegek, axonok fejlődésének serkentésében betöltött szerepét (Cooper & Barondes

1990; Horie et al. 1999). A szaglőideg sejtek axon növekedésében az integrin és laminin keresztközítésével erősíti az idegsejtek és ECM kölcsönhatását és ezáltal az axon növekedést segíti (Raabe et al. 1997; McGraw et al. 2005). Az izom differenciáció, illetve regeneráció során is jelentős funkciót tölt be. A mioblasztok nagy mennyiségű galektin-1-et tárolnak a citoplazmájában. Miotubulusokká alakulásuk során a Gal-1-et az extracelluláris térbe szekretálják, ahol a lektin lefedi mind az izomdifferenciálódásban legfontosabb szerepet játszó extracelluláris mátrix (ECM) fehérjét, a laminint (Cooper & Barondes 1990; Gu et al. 1994; Watt et al. 2004), mind annak receptorát, az $\alpha 7\beta 1$ integrint (Gu et al. 1994; Moiseeva et al. 2003). Ezáltal gátolja az izomsejtek ECM-hez történő kapcsolódását és elősegíti a miotubulusokká történő fúziót. A Gal-1 szerepet játszik a szervezetben immunprivilegizált (az immunrendszertől elzárt) területek fenntartásában, például a szemben, reproduktív szervekben vagy a placentában (Blois et al. 2007; Dettin et al. 2003; Ishida et al. 2003). Gyulladáscsökkentő hatása is ismert, az immunválaszt a Th2 sejtek aktiválódása felé tolja el, ami a citokin termelés megváltozásával jár együtt (Toscano et al. 2006).

4. Gal-1 immunmoduláló hatása

Az immunrendszer számos sejtje, így az aktivált T és B sejtek (Blaser et al. 1998; Zuñiga et al. 2001), az aktivált makrofágok (Rabinovich et al. 1998), a $CD4^+CD25^+$ regulátor T-sejtek (Treg) és természetes ölő sejtek (Natural killer, NK sejtek) Gal-1-et termelnek (Garín et al. 2007; Kopcow et al. 2008). A Gal-1 expresszió nagymértékű az immunprivilegizált szövetek sejtjeiben, mint amilyen a placenta (Blois et al. 2007), testis (Dettin et al. 2003), retina (Ishida et al. 2003). Patológias esetben változhat a termelt fehérje mennyisége, növekszik egyes tumorok, vagy csökken fertőzések és autoimmun betegségek esetén (Rubinstein et al. 2004; Toscano et al. 2006). Az aktivált makrofágokban gyulladásos stimulusra, pl. TNF- α adására a Gal-1 mennyisége feldúsul a citoplazmájában, majd röviddel ez után szekretálódik, hogy autokrin vagy parakrin funkciót lásson el (Correa et al. 2003). A monocyták termelte Gal-1 segíti a sejtek migrációját és szerepe játszik a monocyták kemotaxisában (Malik et al. 2009). A deciduális NK sejtek Gal-1 termelésükkel hozzájárulnak a méhlepény immunprivilegizált

környezetének kialakításához és ezzel a terhesség fenntartásához is (Kopcow et al. 2008; Karimi & Arck 2010). A Treg sejteknek kulcsszerepe van az autoimmun betegségek megelőzésében, a perifériás T sejtek toleranciájának kialakításában. Ezen funkcióihoz Gal-1 termelése hozzájárul, a Gal-1 hiánya a Treg sejtek csökkent válaszához vezet (Garín et al. 2007; Baatar et al. 2009). Az IgM⁺ B memóriasjtekben nagy mennyiségű Gal-1 termelődik, mely részt vesz a B sejtek életidejének regulálásában, jelen esetben olyan túlélő faktorok inhibitora melyek gátlásával eltolódik az egyensúly a proapoptotikus faktorok felé, ami sejthalálhoz vezet (Tabrizi et al. 2009). A Gal-1 T sejtek életútjában betöltött szerepét illetve a különböző immunreguláló és -moduláló funkcióját a következő alfejezetekben fogom részletesen tárgyalni (3. ábra).



3. ábra: A Gal-1 immunmoduláló folyamatai (Rabinovich és mtsai nyomán)

Részletes magyarázat a szövegben.

4.1. A Gal-1 szerepe a T sejt apoptózisban

A Gal-1 nagymértékben hozzájárul az immunológiai egyensúly fenntartásához számos fizioológias és patológias szituációban (Rabinovich & Ilarregui 2009). Ezt a sokoldalú funkcióját többek között az aktivált T sejtek viabilitásának szabályozásával valósítja meg (Ion et al. 2006) (3. ábra). A Gal-1 indukálta T sejt apoptózis mechanizmusát elsősorban szolubilis rekombináns fehérjével végzett kísérletek alapján határozták meg a modellként használt Jurkat limfoblasztomás T sejteken, az egyes munkacsoportok elképzelési

azonban még a legjobb indulattal sem nevezhetők hasonlóknak (Hahn et al. 2004; Matarrese et al. 2005; Ion et al. 2006; Stowell et al. 2007, 2009; Lange et al. 2009).

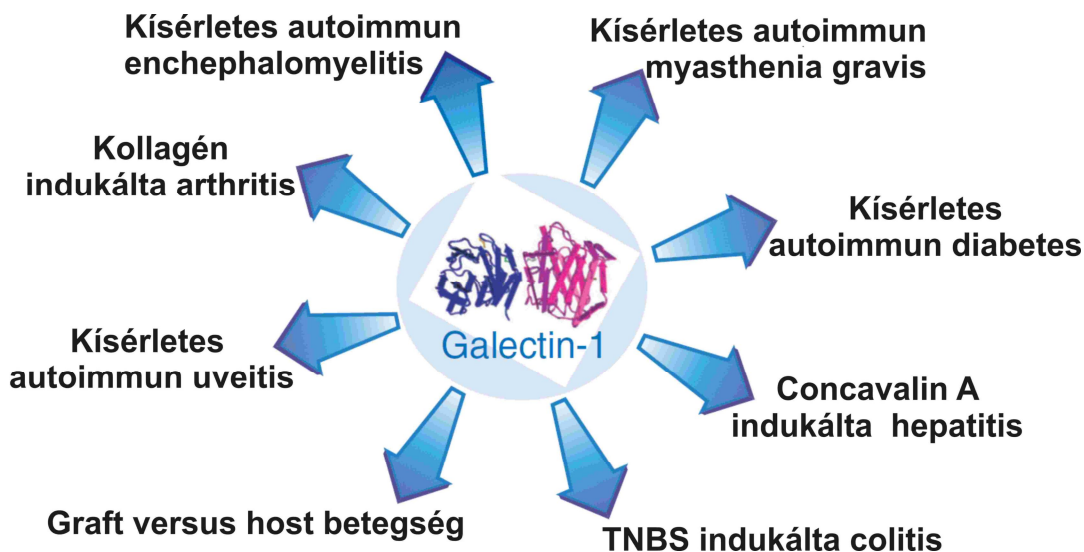
Az első, a mechanizmus meghatározását hátráltató probléma, hogy a Gal-1 receptora ez idáig ismeretlen. Eleinte a CD45 tirozin foszfatázt írták le a Gal-1 egyik lehetséges receptorának (Perillo et al. 1995; Walzel et al. 1999; Pang et al. 2009), míg más szakirodalmi adatok szerint a Gal-1 ugyan kötődik hozzá, de az apoptózis szignált nem a CD45 közvetíti a sejtekbe (Pace et al. 2000; Nguyen et al. 2001; Fajka-Boja et al. 2002). Számos tanulmány szerint a Gal-1 indukálta apoptózis mitokondrium mediálta kaspáz függő úton vonalon halad (Sturm et al. 2004; Ion et al. 2005, 2006; Brandt et al. 2008), míg egyes kutatók szerint a Gal-1 stimuláció kaspáz független apoptózist indít be: a mitokondrium depolarizációját a mérések szerint nem kíséri mitokondriális citokróom C felszabadulása, vagy a kaspázok aktiválódása, hanem az endonukleáz G felelős a DNS degradációért (Hahn et al. 2004). Mi több, Stowell és mtsai úgy tartják, hogy a Gal-1 hatására a fehérvérsejtek felszínén megjelenő PS csupán felkészíti, fagocitálhatóvá teszi a makrofágok számára, anélkül, hogy apoptózis végbemenne ezekben a sejtekben (Stowell et al. 2008). Laboratóriumunkban végzett kísérletek alapján részletesen meghatároztuk a rekombináns Gal-1 indukálta T sejt apoptózis molekuláris mechanizmusát, amely kaspáz függőnek bizonyult. A Gal-1 a T sejtekben a p56^{lck} és a ZAP70 kinázok autofoszforylációját indukálja és a tirozin foszforyláció, mely előfeltétele a további apoptotikus lépéseknek, e két kináz aktivitásának tulajdonítható (Ion et al. 2005, 2006). A kaspázok mellett, a Gal-1 indukálta sejthalál másik központi molekulája a ceramid. A ceramid anabolikus vagy katabolikus úton keletkezhet az apoptotikus sejtekben, a ceramid szintáz, illetve a szfingomielinázok aktiválásának megfelelően (Pettus et al. 2002; Tepper et al. 2000). A Gal-1 stimulálta apoptózisban a savas szfingomielináz aktivitása révén felszabaduló ceramid játszik szerepet (Ion et al. 2006).

A Gal-1 aktivált T (Ion et al. 2006) és B sejteken (Fouillit et al. 2000) okoz apoptózist. Későbbi tanulmányokból azonban egyértelműen kiderül, hogy nem az összes T sejt alpopuláció reagál apoptózissal a Gal-1-re. A T helper 1 típusú (Th1), Th2-es és az IL-17-et termelő Th17-es T sejtek differenciálódásuk közben eltérő glikozilációs mintázatot kapnak és ebből kifolyólag az affinitásuk a Gal-1-hez is különbözően alakul. A Th1 és Th17 típusú sejtek sejt felszíni glikoziláltsága megfelelő a Gal-1 indukálta

apoptózis beindításához, míg a Th2-es sejtek védve vannak ettől a folyamattól, a sejtfelszíni glikoproteinjeik eltérő szializáltsága miatt. Így a T sejtek eltérő glikozilációja révén közvetett módon szabályozódik a T sejt apoptózis és az immunválasz lefolyása (Toscano et al. 2007).

4.2. A Gal-1 szerepe a gyulladásban

A Gal-1 immunszuppresszív és terápiás tulajdonságait számos krónikus gyulladásos és autoimmun állatmodellben, mint amilyen az autoimmun myasthenia gravis (Levi et al. 1983), kísérletes autoimmun encephalomyelitis (EAE), ami a humán sclerosis multiplex egérmodellje (Offner et al. 1990), kollagén indukált arthritis (Rabinovich et al. 1999b), 2,4,6 trinitrobenzén-szulfonsav (TNBS) indukálta colitis (Santucci et al. 2003), kísérletes autoimmun uveitis (Toscano et al. 2006), concavalin A indukálta hepatitis (Santucci et al. 2000), és kísérletes autoimmun diabetes (Perone et al. 2006) bizonyították (4. ábra).



4. ábra: Autoimmun és krónikus gyulladásos kísérleti modellek, melyekben kifejti immunreguláló aktivitását a Gal-1 (Rabinovich és mtsai nyomán). Részletes magyarázat a szövegben.

Míg a Gal-1 képes tompítani a káros gyulladásos választ, azonos mechanizmussal hozzájárul ahhoz is, hogy a tumor sejtek kijátsszák az immunválaszt az effektor T sejtek életképességének negatív regulációjával, ezzel eltolva az egyensúlyt a Th2 citokin profil felé (Rubinstein et al. 2004; Le et al. 2005). Számos tanulmányban részletesen vizsgálták a rekombináns Gal-1 hatását az aktivált T sejtek citokin termelésére. Az eredmények azt mutatták, hogy a Gal-1 csökkenti a gyulladásos citokinek, mint amilyenek a TNF- α és INF- γ szekrécióját (Rabinovich et al. 1999a), növeli az interleukin-10 (IL-10) mRNS és fehérje szintjét, miközben csökkenti az interleukin-2 (IL-2) termelődését (van der Leij et al. 2007).

Az első publikációk szerint az elektrolektinnek, amely lektin homológja a Gal-1-nek az *Electrophorus electricus* halban, profilaktikus és terápiás hatása volt a nyulakban előidézett kísérletes myasthenia gravisnál (Levi et al. 1983). Az immunszuppressziót támogató hatásáról a következő kísérletben is meggyőződtek, rekombináns Gal-1 használatával elnyomták a kísérletes autoimmun encephalomyelitis a klinikai és patológias jeleit (Offner et al. 1990).

Rabinovich és munkatársai a Gal-1 terápiás hatását vizsgálva kimutatták, hogy kollagén indukálta arthritis állatmodelljében a betegség kialakulásának kezdetén a Gal-1-et kódoló génnel transzfektált és a fehérjét nagy mennyiségben termelő fibroblasztok beinjektálása elegendő volt a klinikai tünetek eltűnéséhez. Gal-1 adásával lecsökkent a szérum anti-kollagén IgG szintje, csökkent az INF- γ viszont nőtt az IL-5 szintje az efferens nyirokcsomókban. Összességében a Th1-es típusú immunválasz Th2 felé tolódott (Rabinovich et al. 1999b).

Egy másik munkacsoport concavalin A-val idézett elő hepatitist egerekben. A Gal-1 protektív szerepe a máj roncsolódás kivédésével itt is bizonyítást nyert (Santucci et al. 2000). Emellett TNBS-sel indukált colitis-ben, amely a humán gyulladásos bélbetegség állatmodellje, az addig a betegségre jellemző Th-1-es citokinek termelése csökkent a Gal-1 jóvoltából (Santucci et al. 2003).

Egy újabb tanulmány szerint a dominánsan Th1-es és Th17-es immunválasz kísérletében zajló kísérletes autoimmun uveitisben a Gal-1 kezelés elegendőnek bizonyult a klinikai tünetek megszüntetésére a betegség stádiumától függetlenül. Ellensúlyozta a

Th1-es választ, Th2-es vagy Treg mediálta gyulladáscsökkentő válasz támogatásával (Toscano et al. 2006).

Transzgenikus Gal-1-et expresszáló dendritikus sejtek képesek késleltetni az autoimmun diabetes és insulinitis kialakulását egerekben. A fent felsorolt kísérletes modellekhez hasonlóan folyt a beteg egerek gyógyulása, nőtt az apoptotikus T sejtek száma, illetve csökkent az INF- γ termelő CD4⁺ T sejtek száma a pankreászhoz közeli nyirokcsomókban (Perone et al. 2006) (3. ábra). Egy újabb diabeteses állatmodellen végzett kísérletben azt az eredményt kapták, hogy a szolubilis Gal-1 képes megelőzni a hyperglycemia és a β -sejt specifikus autoimmun betegség kialakulását NOD egerekben. Tehát nem csak elnyomja a kísérletesen előidézett autoimmun gyulladást, hanem a spontán kialakuló autoimmun betegségekkel szemben is védettséget nyújt (Perone et al. 2009).

A Gal-1 gyulladáscsökkentő hatásáról elég kevés klinikai adat áll rendelkezésünkre, az erről szóló tanulmányokban szöveti szinten alacsonyabb Gal-1 expresszióról és a szérumban magasabb anti-Gal-1 autoantitestekről számolnak be. A vizsgálatok szerint ezek az értékek a betegség rossz prognózisával vannak összefüggésben (Giordanengo et al. 2001; Harjacek et al. 2001; Romero et al. 2006).

4.3. A Gal-1 szerepe a sejtadhézióban

A Gal-1 mind pro-adhezív, mind pedig anti-adhezív funkcióval is bír, attól függően, hogy segíti vagy akadályozza a sejt-sejt vagy sejt-extracelluláris mátrix (ECM) kapcsolatokat (Elola et al. 2007) (3. ábra).

A Gal-1 erősen támogatja az egészséges és tumoros sejtek kötődését az ECM egyes glikoproteinjeihez, mint amilyen a laminin és fibronectin (Zhou & Cummings 1993; van den Brûle et al. 2003). A Gal-1 lokális koncentrációjának ingadozása fontos szerepet játszhat a tumor sejtek letapadásának vagy éppen a leválásának folyamatában, amely elengedhetetlen a tumorok kifejlődéséhez (Elola et al. 2007). A tumorok életben maradásának létfontosságú lépése a tumor sejtek inváziója és a metasztázis képzés is, melyben a Gal-1 szerepét kimutatták (Glinsky et al. 2000). A Gal-1 expresszió megnő a kapilláris endothél sejtekben egyes tumorsejtek hatására (Clausse et al. 1999). Camby és mtsai az elsők között voltak, akik ki tudták mutatni, hogy a Gal-1 modulálja a glióma

sejtek in vivo migrációját is (Camby et al. 2002). Tehát a Gal-1 segíti a sejt migrációt, és ezen keresztül a tumor sejtek invázióját és angiogenezisét (Camby et al. 2002).

Az immunrendszerben azonban a Gal-1-nek gátló szerepe is van, megakadályozza a neutrofil, eosinofil granulociták, a T sejtek és hízósejtek migrációját gyulladás kialakulásának folyamán (Delbrouck et al. 2002; La et al. 2003; He & Baum 2006; Kiss et al. 2007). Gal-1 termelő endothél sejtek gátolják az odaérkező T sejtek és neutrophilek adhézióját és így megtapadását és gördülését, míg siRNS-sel csendesítve az endothél sejtek a Gal-1 expresszióját kedvező hatást értek el a két sejt típus migrációjában (Norling et al. 2008; Cooper et al. 2008).

4.4. A Gal-1 szerepe Treg sejtek funkciójában

A Gal-1 jól meghatározható mechanizmusokkal befolyásolja a T sejtek homeosztázisát, szabályozza a T sejtek túlélését és citokintermelését illetve modulálja a sejt-sejt és sejt-ECM kapcsolatokat.

Az aktiváció indukálta sejthalál és az immunsejtek válaszképtelensége (anergia) arra szolgál, hogy a járulékos károsodástól megkíméljék a szervezetet, ezek a folyamatok az immunszuppresszív Treg sejtek működésének is köszönhetők. Példa erre, hogy in vivo rGal-1-el kezelve az autoimmun retinagyulladást, megnő az IL-10 és TGF- β termelés, illetve feldúsul a Treg sejtpopuláció (Toscano et al. 2006; van der Leij et al. 2007). Az újabb tanulmányokból már az is kiderül, hogy a Gal-1 gén expressziója szerepet játszik a Treg sejtek funkciójában és blokkolásával nagymértékben csökken a humán és egér CD4⁺CD25⁺ Treg sejtek a szuppresszív hatása (Sugimoto et al. 2006; Garín et al. 2007).

Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a Treg sejtek szuppresszív aktivitása szorosan kapcsolódik a Gal-1 expresszióhoz (3. ábra).

5. Tumor immunprivilegium

A szervezetben előforduló és folyamatosan képződő transzformált sejteket az immunrendszer felismeri és eliminálja. A specifikus antigéneket prezentáló tumorsejtek beindítják az immunválaszt és amennyiben az sikeres, nem alakul ki tumor. Patológiás

eset többek között akkor fordul elő, amikor a rosszindulatú sejtek képesek kivédeni az immunrendszer ellenük irányuló támadását. Ezt számos különböző módon megvalósíthatják, például az MHC molekulák szintézisének felfüggesztésével (Seliger & Pfizenmaier 1989), és így a tumorspecifikus citotoxikus T sejtekkel (Tc) szembeni rezisztencia kialakításával, negatív szabályozó útvonalak beindításával, szupresszor sejtek aktiválásával, valamint citotoxikus faktorok termelésével (Drake et al. 2006). A folyamatban részt vevő molekulák hathatnak szolúbilis, illetve membrán-, vagy ECM-kötött formában.

A tumorsejtek CCL22 kemokint termelnek, melynek hatására a regulátor T sejtek, amelyek az immunválasz szupresszállásáért felelősek, a daganatba vándorolnak, így csökkentik az immunválaszt (Curiel et al. 2004). Számos immunszupresszív faktor termelődését leírták különböző tumorsejtek esetében. Ilyen a TGF- β (transforming growth factor- β), ami egy pleiotrop hatású citokin, gátolja a T sejt aktivációt, proliferációt és differenciációt (Li et al. 2006), illetve gátolja a Tc sejtek antitumor aktivitását (Thomas & Massagué 2005). A TGF- β mellett termelődhet még az IL-10 és a prosztaglandin E₂ (PGE₂), amelyek ugyancsak a tumorspecifikus immunválasz elleni védekezésben játszanak szerepet. A tumorsejtek indolamin2,3-dioxigenáz (IDO) enzimet szekretálnak a mikrokörnyezetbe, ami a triptofán aminosav kinureninné történő bontását végzi (Mellor & Munn 2000). Ez egyrészt lokális triptofán depléciót eredményez, ami a T sejtekre káros, másrészt a kinurenin toxikus a T sejtekre, így az IDO hozzájárul az immunprivilegium kialakításához (Munn et al. 1998). Az említett, tumorsejtek által szekretált anyagok szolúbilis formában jutnak el a célsejtekhez. A rosszindulatú sejtek azonban a sejtfelszínükön is prezentálnak olyan molekulákat, amelyek a velük interakcióba lépő effektor T sejtek funkcióját gátolják. Ilyen sejtfelszíni fehérjék a CD80, CD86, amelyek a citotoxikus T sejtek felszínén lévő CTLA-4 (citotoxikus T limfocita antigén-4) receptornak ligandjai. A CTLA-4 a T sejt aktiváció negatív regulátora (Korman et al. 2006), így tumorsejt általi aktiválódása része az immunszupresszív stratégiának (Perez et al. 1997). Megtalálható még a tumorsejtek membránján a PD-L1 (programmed death receptor ligand-1) (Blank et al. 2005), ami a T sejteken előforduló PD-1 (programmed death-1) transzmembrán receptorral (Ishida et al. 1992) kölcsönhatva a T sejtben aktiváció-indukálta sejthalált idéz elő. A tumorsejtek képesek a velük

kölcsönható T sejtek apoptózisát közvetlenül indukálni. Kifejezik ugyanis a Fas ligand (FasL) (Andreola et al. 2002) és a TRAIL (Giovarelli et al. 1999) fehérjéket, amelyek a T sejten levő megfelelő receptorhoz, a Fas-hoz, illetve a TRAILR-hoz kötődve a T sejtben receptor mediált apoptózist indítanak el.

Hipotézisünk szerint a Gal-1 is a tumor által termelt immunszuppresszív faktorok széles skálájának ebbe a csoportjába tartozik.

5.1. Gal-1 a tumorban

Mint azt az előző fejezetben részleteztem, az immunprivilegizált területekhez hasonlóan a tumorok is sokoldalú immunszuppresszív mechanizmusokat használnak az immunrendszer kijátszására, megmenekülnek a T sejt válasz elől, munkaképtelenné teszik az effektor T sejteket vagy tolerancia alakul ki a tumor antigének felé (Rabinovich et al. 2007; Croci et al. 2007). Ezek a mechanizmusok együttműködése a tumor egyre erőteljesebb fejlődését vonja maga után és limitálja az immunrendszer azon képességeit, hogy egyrészt mérsékelje a tumor progresszióját és másrészt növelje a hatásfokát az immunterápiáknak, amelyekkel esetleg véglegesen ki lehetne irtani a rosszindulatú sejteket (Rabinovich et al. 2007). Újabb keletű microarray és proteomika vizsgálatokkal alátámasztották, hogy a Gal-1 a tumorok rossz prognózisát jelző tipikus molekula (Liu & Rabinovich 2005; Rabinovich 2005). Meglepő módon ugyanez az endogén lektin jótékony hatású az autoimmun és gyulladásos betegségek modelljeiben (Offner et al. 1990; Rabinovich et al. 1999b; Santucci et al. 2000, 2003; Toscano et al. 2006).

Rubinstein és mtsai azt találták, hogy a humán és egér melanóma sejtek által termelt Gal-1 lényegesen hozzájárul ezeknek a sejteknek az immunszuppresszív aktivitásához (Rubinstein et al. 2004). Ezeknek az eredményeknek megfelelően, egy másik munkacsoport bemutatta, hogy a Reed Sternberg (RS) sejtek, melyek a klasszikus Hodgkin lymphoma (cHL) patológiás sejtjei, erőteljesen Gal-1 pozitívak, ami a Th2-es citokinek termelődésének kedvez, indukálja a Treg felszaporodását és elnyomja az Epstein-Barr vírus (EBV) specifikus T sejt választ (Juszczynski et al. 2007; Gandhi et al. 2007). A cHL-ben T sejt gátló molekulák keresése közben bebizonyosodott, hogy a fent említett sejtek Gal-1 expressziója az ezekre a sejtekre jellemző AP-1 függő enhancer-en keresztül történik, ezzel is erősítve a cHL immunprivilegiumát. (Juszczynski et al. 2007).

A Gal-1 T sejt gátló hatását fej és nyaki karcinómás betegek metszetein Le és mtsai vizsgálták, és azt találták, hogy a Gal-1 mennyisége és a jelenlevő éretlen T sejtek száma fordítottan arányos (Le et al. 2005). Emellett, más stimulusok -hypoxiás környezet (Le et al. 2005), TGF- β 1 (Daroqui et al. 2007), egy immunmoduláló drog, a cyclophosphamide (Zacarias Fluck et al. 2007) és a differenciáltató ágens retinol sav (Lu et al. 2000) - növelték egyes tumorok Gal-1 expresszióját.

Tehát a Gal-1 úgy képes létrehozni a tumor optimális növekedéséhez szükséges immunszuppresszív mikrokörnyezetet, hogy felborítja a helper T sejt-válasz egyensúlyát és a Th2-es citokintermelés felé tolja el, elősegíti a Treg sejtek felszaporodását és negatívan regulálja a Th1-es és Th17-es T sejtek életképességét.

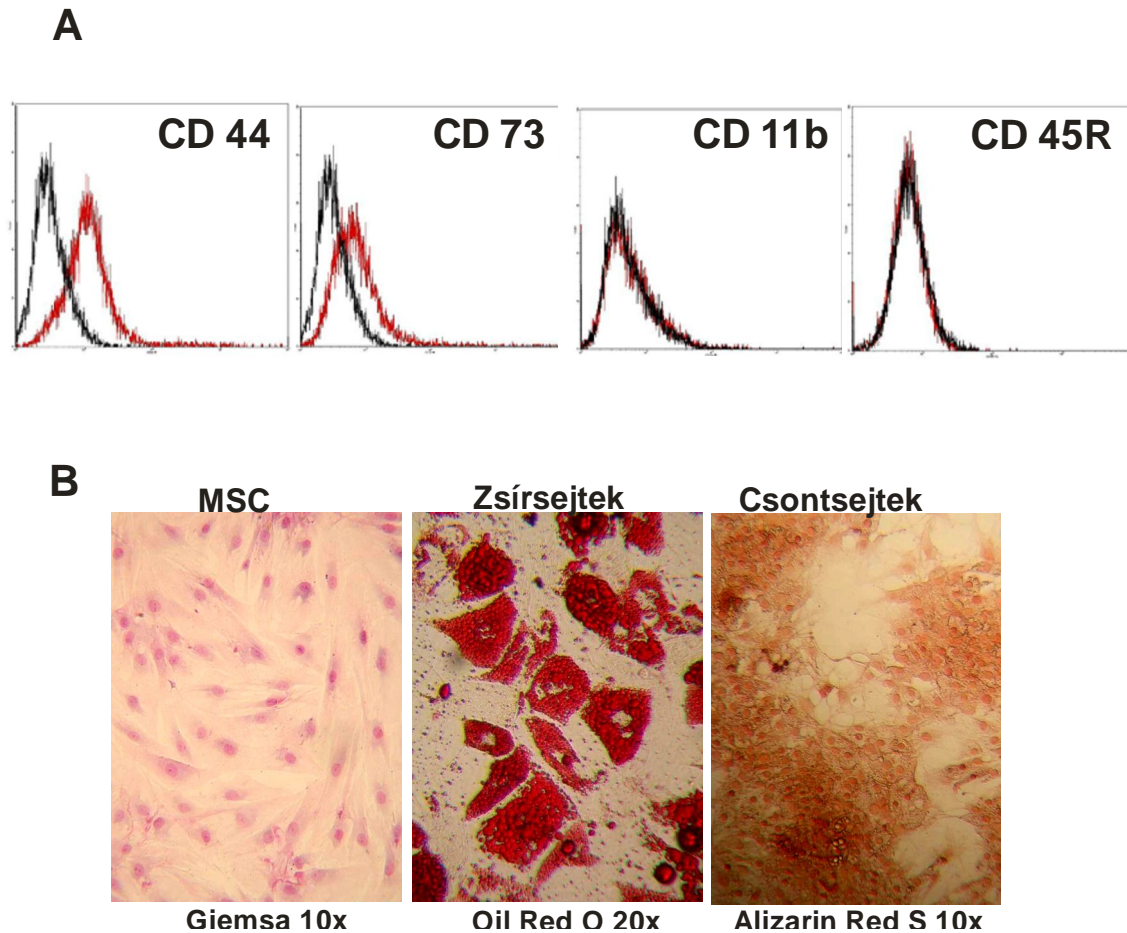
6. A mesenchymális őssejtekről általában

A mesenchymális őssejtek (MSC-k) multipotens progenitor sejtek, melyek mezodermális szövetek sejtjeivé, csonttá, porcsejtté, zsírsejttekké és csontvelői kötőszövetté képesek differenciálódni, valamint a vértképző őssejtek érését és osztódását serkentő növekedési faktorokat termelnek (Valtieri & Sorrentino 2008).

Izolálásuk specifikus, csak az MSC-k felszínén előforduló marker(ek) hiányában ma is adherenciájukon alapszik. A csontvelőből kitapasztott stroma sejteket, miután benőtték a rendelkezésükre álló felületet, tripszin és EDTA segítségével felszedik, majd megfelelő hígítás után új tenyésztőedényekbe oltják őket. Többszöri áttöltés után egy morfológiailag többé-kevésbé homogénnek tűnő, exponenciálisan növekedő sejttenyészetet kapunk, amit – ha már nem tartalmaz vértképző elemeket – MSC sejt kultúrájának tekinthetünk. Mivel az ilyen tenyészetekben a sejtosztódással egyidejűleg mindig történik spontán differenciálódás is, valójában egy heterogén, mesenchymális őssejtekből és a belőlük képződött tri- bi- és unipotens elődsejtek keverékéből álló sejt kultúráról van szó.

Laboratóriumunkban egér csontvelői mesenchymális őssejt populációból (BM-MSC) létrehozott monoklonális kultúrák differenciálódási tulajdonságait vizsgáltuk és azt találtuk, hogy egy, MSC morfológiát mutató sejtéből kialakuló sejt vonal megtartja a

multipotens MSC-kre jellemző differenciálódási képességet (Szabó Enikő, Czibula Ágnes nem közölt adat).



5. ábra: A. Az MSC-k sejtfelszíni markereinek áramlási citofluorimetriás vizsgálata phycoerythrinnel konjugált anti-CD 44, -CD73, -CD11b és –CD45R jelöléssel (Uher F. és mtsai). B. Az MSC-k morfológiáját Giemsa festéssel történő jelölés után vizsgálják (bal oldali kép). Adipogén differenciáció indukálásához konfluens MSC kultúrát két hétig tartottak komplett médiumon, kiegészítve dexamethasonnal és 3-isobutyl-1-methylxanthinnal (adipogén médium), majd fixálták és megjelölték őket Oil Red O festékkel (középső kép). Konfluens MSC sejt kultúrát két hétig tartották dexamethasonnal, β -glycerophosphattal és aszkorbinsavval kiegészített MSC médiumban (osteogén médium). A kalcium lerakódás vizsgálatához a sejt kultúrát Alizarin Red S festékkel jelölték meg (jobb oldali kép, barna) (Uher F. és mtsai).

MSC-k nem csak a csontvelőben találhatók. Gyakorlatilag minden eddig vizsgált szövetünkben, szervünkben előfordulnak (da Silva Meirelles et al. 2006; Hegyi et al. 2010). Könnyen hozzáférhető forrásuk lehet például minden zsírleszívásból származó szövetminta (Zuk et al. 2001) vagy a köldökszínór is (Erices et al. 2000).

Valójában igen nehéz pontosan meghatározni, hogy milyen sejteket nevezzünk/nevezhetünk MSC-knek. Mivel az MSC-k iránti érdeklődés és az ezekkel a sejtekkel dolgozó kutatói csoportok száma az elmúlt két évtizedben drámaian megnőtt, ezért 2006-ban az ISCT (= International Society for Cellular Therapy) a következő javaslatot tette: nevezzük mesenchymális ős-, vagy helyesebben stroma sejteknek (tekintettel a mesenchymális sejtenyészetek heterogén voltára, ld. előbb) mindazokat a humán mintákból származó sejteket, amelyek:

1. kitapadnak a szövettenyésztő edény falához;
2. CD105-, CD73-, CD44- és CD90-pozitívak, de nem hordoznak semmilyen, vérből származó őse- és elődsejtekre, illetve a különböző vérsejtfejlődési sorokra jellemző felszíni markert (azaz CD45-, CD34-, CD14-, CD11b-, CD79a- és CD19-negatívak) (5.A ábra);
3. csont-, porc- és zsírsejtekké egyaránt képesek differenciálódni (5.B ábra).

A humán MSC-khez (hMSC) hasonlóan az egér csontvelői MSC-ket (BM-MSK) is ezekkel a markerekkel határozzák meg, azzal a különbséggel, hogy a CD90 nem expresszálódik a BM-MSK-ken, de egyedülállóan jellemző a Sca-1 (stem cell antigen-1) marker.

A hMSC-k nem halhatatlanok. Bár sok millió utódsejtet képesek létrehozni *in vitro*, az osztódások során öregszenek is, plaszticitásuk fokozatosan csökken, és végül senescenssé válnak. Kísérletekben történő felhasználhatóságuk kb 10-12 átoltásig tart, ellentétben a BM-MSK, melyből halhatatlan, szövettenyészetben fenntartható sejt kultúra alapítható.

7. MSC-k regeneratív és immunszuppresszív hatása

A sejtenyészetben felszaporított és a szervezetbe intravénásan visszajuttatott MSC-k nem vándorolnak a csontvelőbe (minden csontvelő-transzplantált beteg és kísérleti állat sztrómája recipiens eredetű), hanem inkább szétszóródnak a különböző, elsősorban sok

kapillárist tartalmazó szövetekben. Tetemes részük például a tüdőben és a vesékben telepszik meg (Gao et al. 2001; Anjos-Afonso et al. 2004). Ennek lehet egyszerű fizikai oka is: a nagyméretű és könnyen összetapadó sejtek elakadnak a szűk kapillárisokban. Más feltételezések szerint azonban az MSC-k igazi „hazája” az erek falában található és ezért vándorlásuk („homing”-juk) is ide irányul (Zannettino et al. 2008). Sérülés esetén viszont – kemotaktikus ingerek hatására – egy részük a sérült szervekbe, szövetekbe vándorol, ahol kulcsszerepet játszik az adott szövet, illetve szerv regenerációjában. Közvetlenül a sérülés helyére adva az őssejteket, általában még jobb eredmények érhetők el (Chamberlain et al. 2007).

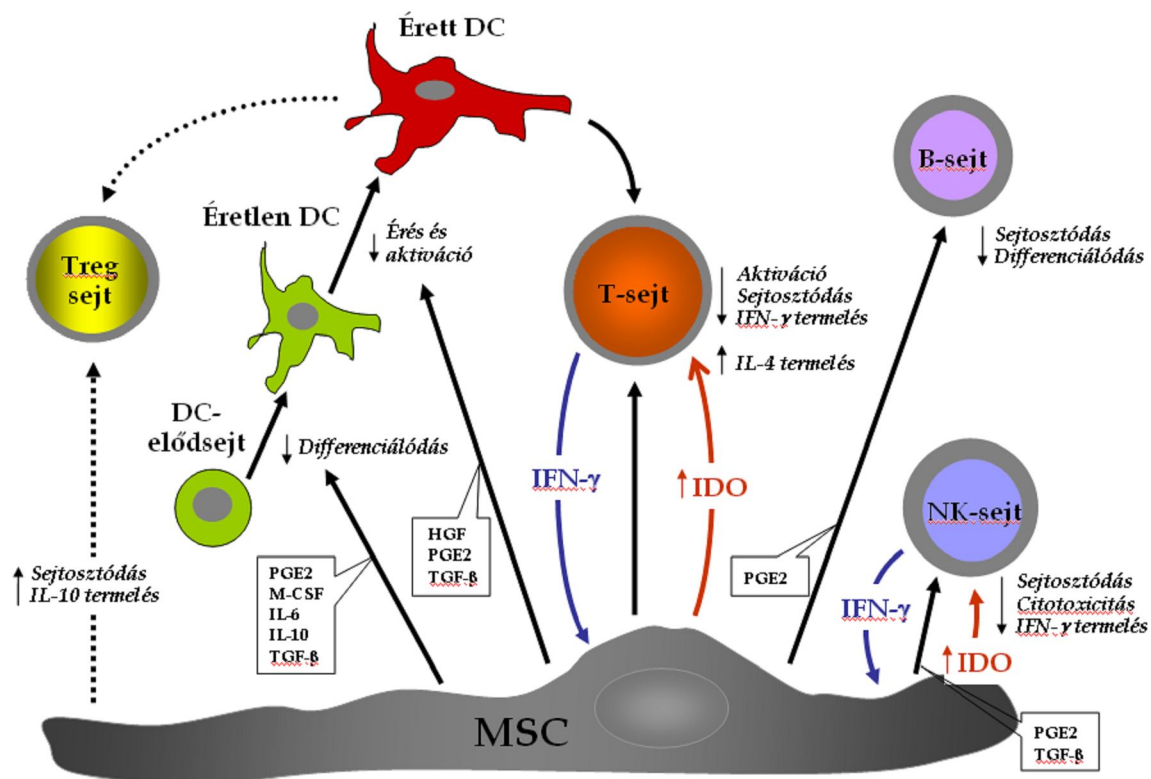
Számos MSC-vel végzett kísérlet során kiderült, hogy az MSC-k két további különleges sajátossággal is rendelkeznek:

1. allogén, sőt néha xenogén recipiensbe oltva sem váltanak ki erőteljes, a sejtek kilökődésével járó immunválaszt, azaz hipoimmunogéneket; ráadásul
2. kifejezett – *in vitro* és *in vivo* egyaránt megfigyelhető – immunszuppresszív hatásuk van.

7.1. Az MSC-k *in vitro* immunszuppresszív hatása

Bár az MSC-k hatásának pontos mechanizmusa még feltárássra vár, az irodalmi adatok alapján a közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás és a szolubilis faktorok szerepe bizonyítottan tűnik. Kétségtelen, hogy a szövettenyésztésben tartott MSC-k minden, az immunválaszban fontos szerepet játszó sejt – T- és B-lymphocyták, NK-sejt, és hivatásos antigén-bemutató sejt (APC) – funkcióját képesek gátolni *in vitro*. Az MSC által termelt szolubilis faktorok, a hepatocita növekedési faktor (HGF), transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) (Di Nicola et al. 2002), a prostaglandin-E2 (PGE-2) (Aggarwal & Pittenger 2005), az indolamine-2,3-dioxygenáz (IDO) (Meisel et al. 2004), nitrogén monoxid (NO) (Sato et al. 2007; Ren et al. 2008), szolubilis HLA-G (Selmani et al. 2008) és az IL10 – mind gyulladáscsökkentő mediátorok (Chen & Tuan 2008). Az MSC-k és az immunsejtek közötti párbeszéd végeredményben szintén az MSC-k gyulladáscsökkentő funkciójára hat: az aktivált T-sejtek és az NK sejtek gyulladásos citokineket, IFN- γ -t és TNF- α -t termelnek, melyek aztán úgy hatnak az MSC-kre, hogy azok PGE2-t, egy T-sejtostódást gátló faktort választanak ki. Az IFN- γ ezen felül az MSC-k IDO

expresszióját is serkenti. Ez az enzim a triptofánt pikolén- és kinolénsavra bontja le, ennek eredményeképpen triptofán hiány és a triptofán metabolitjainak megnövekedett koncentrációja gátolja a T és NK sejt osztódást (English et al. 2007; Ryan et al. 2007). Az MSC-k beleszólnak az immunválaszba a Th1-es helper és a citotoxikus T-sejtek valamint az NK sejtek funkciójának gátlásával (Gerdoni et al. 2007; Nauta & Fibbe 2007) (6. ábra). Mindazonáltal az adatok nem bizonyítják, hogy az MSC-k által termelt faktorok bármelyike egyedül elegendő lenne az *in vitro* vagy *in vivo* immunszuppresszív hatásához.



6. ábra: Az MSC-k immunszuppresszív hatásának feltételezett mechanizmusa (Uher F. nyomán).

7.2. Az MSC-k *in vivo* immunszuppresszív hatása

Az *in vitro* kísérletek mellett számos állatmodellben, sőt néhány esetben már betegeken is igazolták, hogy az MSCk képesek gátolni immunválaszt. Elsőként páviánokon figyelték meg, hogy MSC-k szisztémás adásával megnövelhető az allogén bőrgraftok

túlélése (Bartholomew et al. 2002). Az MSC-k jól alkalmazhatónak bizonyultak allogén csontvelő-átültetésen átesett rosszindulatú hematológiai betegek szteroid-rezisztens graft-versus-host (GVHD) betegségének kezelésében (Le Blanc & Ringdén 2006). Kísérletes autoimmun EAE-ben, az intravénásan bejuttatott MSC-k elsősorban a szekunder nyirokszervekben telepednek meg, és, ha a betegség kezdeti stádiumában adják őket, hatékonyan gátolják az autoreaktív T- és B-sejtek működését (Gerdoni et al. 2007). Emellett az állatok keringésében csökken a gyulladásos citokinek – TNF- α - és IFN- γ -szintje és az idegrendszerben kevésbé kifejezett a gyulladásos beszűrődés és a demielinizáció. Mivel az MSC-k immunszuppresszív hatása IL-2 adásával részben feloldható, az őssejtek ebben a rendszerben valószínűleg T-sejt anergiát idéznek elő, így gátolva az EAE kialakulását, illetve progresszióját (Zappia et al. 2005). Az MSC-k az endotoxinnal kiváltott lokális és szisztémás gyulladást is gátolják egerekben (Xu et al. 2007). A bleomycinnel indukált tüdőkárosodás szintén megelőzhető MSC-k adásával (Rojas et al. 2005). Emellett az MSC-k csökkentik a kísérleti állatmodellekben előidézett I típusú diabetes tüneteit (Lee et al. 2006; Urbán et al. 2008). Teljesen ellentmondó eredmények születtek viszont a kísérletes, kollagén-indukált arthritisben szenvedő egerek vizsgálata során. Sem szisztémásan, sem lokálisan adott MSC-k nem befolyásolták a betegség lefolyását, tehát az MSC-kezelés az adott arthritis modellben hatástalan volt Djouad és munkatársai eredményi szerint (Djouad et al. 2005). Ugyanakkor Augello és mtsai szerint kísérletes arthritisben allogén MSC-k egyszeri intraperitoneális adásával jelentősen csökkenthető a szérum-TNF- α szintje az állatokban, sőt a csont- és porckárosodás(ok) kialakulása is megelőzhető (Augello et al. 2007). Mindezt az MSC kezelés hatására keletkező, antigén- (kollagén-II-) specifikus Treg-sejtek hatásával magyarázzák.

Fontos lenne tehát tudni, hogy mi lehet az MSC-k immunszuppresszív hatásának pontos mechanizmusa a szervezetben.

8. Az MSC-k és Gal-1

A mesenchymalis őssejtek ígéretes terápiás felhasználása részletes genomikai és proteomikai kutatásokra ösztönözte a munkacsoportokat. Először 2003-ban mutatták ki a

Gal-1-et kódoló LGALS1 gén mRNS termékét MSC-ben valós idejű polimeráz láncreakciós (RT-PCR) technikával és a 8. leggyakrabban előforduló mRNS szekvenciának bizonyult az MSC-ben. Eredményeik szerint a Gal-1 közreműködik a sejtadhézió szabályozásában, a sejt proliferációban, a T és B sejtek apoptózisában és a bőrben levő fibroblasztok izommá differenciálódásában (Silva et al. 2003). A későbbiek folyamán egy proteomikai cikkben Western blottal és 2D gélelektroforézist követő MALDI-TOF MS tömegspektrométerrel kimutatták az intracelluláris és extracelluláris Gal-1 expressziót (Kadri et al. 2005). Egy 2009-es tanulmányban azt találták, hogy a Gal-1 és a semaphorin-3a egyaránt nagy mennyiségben expresszáldott és szekretáldott az MSC-ből, illetve specifikus anti-Gal-1 vagy az anti-semaphorin-3a ellenanyaggal visszafordítható volt az MSC által okozott T sejt proliferáció gátlás. Ez tehát indirekt bizonyítéka annak, hogy a Gal-1 és/vagy a semaphorin-3 hozzájárul az MSC immunszuppresszív hatásához (Lepelletier et al. 2010). Legutóbbi közlemények arról számolnak be, hogy a Gal-1 gén csendesítése az MSC-k immunszuppresszív funkciójának csökkenéséhez vezet (Giesecke et al. 2010; Sioud et al. 2011). Ezek az új eredmények jelzik, hogy a Gal-1 expressziója és szekréciója az MSC-k immunmoduláló hatásának fontos komponense.

Célkitűzések

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. Kísérleteinkben összehasonlítottuk az általunk rendszeresen használt alacsony Gal-1 (aGal-1, 1,8 μ M) koncentráció hatását a szakirodalomban használt, mintegy 10-szeres mennyiségű, magas koncentrációjú Gal-1 (mGal-1, 18 μ M) hatásával. A Gal-1 fiziológias körülmények között azonban nem fordul elő szolubilis formában, mivel a fehérje, szekréció után, azonnal a kiválasztó vagy szomszédos sejthez, illetve az extracelluláris mátrixhoz kötődik. Ezért a Gal-1 T sejtekre kifejtett citotoxikus hatásának vizsgálatához olyan általunk kidolgozott modellt használtunk, melyben Gal-1-et termelő sejtekkel aktivált T sejteket tartottunk kokultúrában. Először Gal-1 termelő tumorsejteket használtunk erre a célra, de ez felvette azt a kérdést, hogy patológiás és fiziológias körülmények között is szerepet játszik-e a sejtek által termelt Gal-1 az immunszuppresszióban.

A Gal-1 fiziológias előfordulását jól példázzák az erősen immunszuppresszív hatású mesenchymalis őssejtek, melyek nagy mennyiségű Gal-1-t termelnek és szekretálnak. A Gal-1 szerepe azonban még nem tisztázott ezeknek a sejteknek az immunszuppresszív funkciójában.

Ilyen összehasonlító munka eddig még nem született a szakirodalomban, így eredményeink lehetőséget adhatnak a Gal-1 valódi, *in vivo* hatásmechanizmusának tisztázására, illetve a gyulladáscsökkentő Gal-1 szerepének felderítésére a fiziológias és tumorsejtek immunszuppresszív hatásában.

Munkánk során a következő kérdéseket és feladatokat foglalmaztuk meg:

1. Az aGal-1 és mGal-1 azonos, vagy eltérő apoptotikus folyamatokat indukál-e? A következő lépéseket vizsgáltuk:

- sejtekhez való kötődés és raftszerveződés
- specifikus tirozin kinázok szerepe
- mitokondriális membránpotenciál csökkenése

- kaspáz aktiváció.
2. A sejtek termelte Gal-1 szolubilis vagy sejt kötött formában hat-e?
 3. A patológias tumorsejtek, illetve a fiziológias mesenchymalis őssejtek által termelt Gal-1 hozzájárul-e ezeknek a sejteknek az immun-suppresszív funkciójához?

Anyagok és módszerek

1. Felhasznált sejtvonalak

A modellként használt Jurkat leukémiás T sejtvonalat 5% FCS-t (fetal calf serum) (Gibco) tartalmazó RPMI-1640 (*pufferek, oldatok pont*) médiumban tartottuk. A JCaM1.6 és P116 (p56^{lck} illetve ZAP70 kináz hiányos T sejtvonalak), valamint a CD45 deficiens J45.01 sejtvonalakat 10% FCS tartalmú RPMI-1640 médiumban tenyésztettük. A P116 sejtvonalat R.T. Abraham professzortól (Mayo Clinic, Rochester) (Williams et al. 1998), a JCaM1.6 sejteket A. Weiss-től (Howard Hughes Medical Institute, San Francisco, USA) (Straus & Weiss 1992) kaptuk. Az U87 glioblasztóma, illetve a C32 melanóma sejtvonalakat 5% FCS, míg a HeLa méhnyakrák karcinóma sejteket 10% FCS tartalmú MEM (Gibco) médiumban tartottuk. A humán MSC és vad típusú, Gal-1 KO és siRNS-sel csendesített egér BM-MSC sejteket 10% FCS-t tartalmazó DMEM-ben (Gibco) tenyésztettük. Az MSC-eket Dr. Uher Ferenc (Országos Vérellátó Szolgálat, Óssejtbiológiai Laboratórium) izolálta. A sejtvonalakat 37°C-os inkubátorban 5% CO₂ koncentráció mellett tenyésztettük. A kokultúra kísérleteket MEM illetve DMEM médiumban 5% FCS tartalom jelenlétében végeztük.

A humán aktivált T sejteket egészséges donor perifériás véréből (Peripheral mononuclear cells) izoláltuk. A vérmintát Ficoll Paque™ Plus (Amersham Biosciences) grádiensre rétegezve 2200 rpm fordulatszámon centrifugáltuk 30 percig. A mononukleáris sejteket 10% FCS tartalmú RPMI médiumban 5 µg/ml phytohemagglutinin-M-mel (PHA) (Calbiochem) aktiváltuk. Hetvenkét óra után friss, 20 ng/ml interleukin-2-vel (IL-2) (Chiron, Harefield) kiegészített médiumban tenyésztettük tovább a sejteket. A kokultúra kísérletek előtt 24 órával a sejtenyésző médiumot IL-2 mentesre cseréltük.

Az egér aktivált T sejteket Balb/c törzsű egerek mezenterialis, inguinális és brachiális nyirokcsomókból izoláltuk. Az említett nyirokcsomókat cervicalis dislocatio-t követően távolítottuk el, majd összekeverve őket egy Petri-csészébe gyűjtöttük és RPMI médiumban homogenizáltuk. A nyirokcsomó-szuszpenziót rövid ülepítés után egy centrifugacsőbe transzferáltunk, így szövetdaraboktól mentes sejtsuszpenziót nyertünk,

melynek meghatároztuk a sejtkoncentrációját. A sejteket 10^6 /ml koncentrációra hígítottuk 10% FCS-sel és $50\text{ }\mu\text{M}$ β -merkaptoetanollal kiegészített RPMI médiummal, és $7,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A-val stimuláltuk 3 napig a felhasználás előtt.

2. Mikroszkópos vizsgálatok

A mintákat OlympusFV1000 konfokális mikroszkóppal, illetve Zeiss Axioscope fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Kokultúra készítés és AnnexinV jelölés

U87, C32, HeLa, HeLa Gal-1, BM-MSK, Gal-1 KO BM-MSK sejtet (10^4 sejt/minta) 12 mm átmérőjű kerek üveg fedőlemezre növesztettünk. A mintákat 24 lyukú szövettenyésztő lemez egy-egy edényébe helyeztük. A T sejtek magját 100 ng/ml koncentrációjú Hoechst33342 (Sigma) festékkel megjelöltük (30 perc, 37°C). A felesleges festéket kimosva a jelölt T sejteket (2×10^5 sejt/minta) $400\text{ }\mu\text{l}$ térfogatban az adherens sejtekhez adtuk. A fedőlemezeket 16 óra inkubáció után kiemeltük, majd a mintákat 4% paraformaldehiddel (Sigma) 4 percig fixáltuk szobahőn. A PBS-sel történő mosás után az üveglap fehérjekötő helyeinek telítése érdekében a mintákat 1 órát inkubáltuk immunfluoreszcencia pufferrel. A Gal-1-1 kimutatásához az áramlási citometriás kísérletekhez használt ellenanyagot használtuk ugyanabban a hígításban. 45 perc után a mintákat Annexin V kötő pufferrel (*pufferek, oldatok pont*) mostuk kétszer. A másodlagos ellenanyagot, anti-egér IgG NL557 fluoreszcens festékkel konjugálva 1:200 hígításban (R&D Systems) és az AlexaFluor488 fluoreszcens festékkel konjugált AnnexinV (Molecular Probes) molekulát 1:20 hígításban Annexin kötő pufferben együtt adtuk a mintákhoz és 30 percig inkubáltuk. Ezután a pufferrel mostuk a mintákat, majd a lemezeket a felesleges puffer leitatását követően FluoromountG (Southern Biotech) használatával tárgylemezre rögzítettük. Száradás után a lemezeket körömlakkal leszigeteltük és a szennyeződések desztillált vizes mosással eltávolítottuk.

A mikroszkópos minták kiértékelése: az egyes minták véletlenszerűen kiválasztott területein megszámoltuk az előforduló jelöletlen és az AnnexinV festéket felvett T sejteket. Az apoptotikus sejtek: AnnexinV⁺-ak és zöld színűek; egészséges sejtek: nem

festődtek, majd kiszámoltuk egy %-os arányt, a reakciót mutató sejtek számát elosztottuk össz sejtszámmal.

A sejtfelszíni Gal-1 eltávolítását 100 mM thiodigalaktóziddal (TDG) (Sigma) a sejtek kitapadását követően végeztük. 30 perc 4°C-on történő inkubáció után a sejteket PBS-sel (*pufferek, oldatok pont*) mostuk, majd a fent említett protokoll szerint elvégeztük a jelölést és a mérést.

A közvetlen sejt-sejt kapcsolat gátlásához Transwell insertet (Corning, Costar) használtunk, 0,4 µm pórusátmérőjű membránnal.

Mitokondriális membránpotenciál csökkenésének kimutatása

A kokultúra rendszerben a mitokondrium depolarizációjának kimutatására JC-1 (Fluka) festéket használtunk. A 16 órás inkubáció után a sejteket 5 µg/ml JC-1-el inkubáltuk 10 percig 37°C-on. Ezt követően a mintákat mostuk, majd fixáltuk 4%-os paraformaldehiddel 4 percig és újabb mosás után a fedőlemezeket FluoromountG használatával tárgylemezre rögzítettük. A molekula monomer állapotban gerjesztésre zöld jelet ad, az egészséges mitokondriumokban akkumulálódva piros szín jelenik meg. A csökkent membránpotenciállal rendelkező mitokondriumokat tartalmazó apoptotikus sejtekben tehát csak a zöld szín látható, az egészséges sejtekben piros szín is megfigyelhető.

Kaspáz 3 aktivitás kimutatása

A kokultúrák mintákat 24 óra inkubáció után fixáltuk 4% paraformaldehiddel 4 percig szobahőn. Ezt követte a telítés, majd a sejtmembrán permeabilizálása 75 µg/ml lizofoszfatidil-kolinnal (LPC, Sigma) és az aktív, hasított kaspáz 3-at felismerő ellenanyag 1:200-ban hígításban (Beckton Dickinson) 16 óráig 4°C-n nedves kamrában. Az inkubáció lejárta után mosás következett, majd 75 µg/ml LPC-t és TRITC-jelzett anti-nyúl IgG másodlagos ellenanyagot (Dako) használtunk 1:100-hoz hígításban, majd 30 perc inkubáció után a felesleges ellenanyagot kimosva a fedőlemezeket FluoromountG használatával tárgylemezre rögzítettük.

Ceramid felszabadulás kimutatása

A 16 órás inkubáció végén, a kokultúrában tartott sejteket szobahőn 4% paraformaldehiddel fixáltuk 4 percig. Mosás után a mintához 75 µg/ml LPC-t és 1:10-ben hígított anti-ceramidot (Alexis Biochemicals) adtunk, majd 1 órát inkubáltuk 4°C-on. Újabb mosást követően 30 percig tartottunk 75 µg/ml LPC-t és 1:250-ben hígított anti-egér biotint (Dako) a mintákon, továbbra is 4°C-on. A felesleges ellenanyagok kimosása után 75 µg/ml LPC és 1:100-ban hígított streptavidin-FITC (Dako) keverékével jelöltük a mintákat 30 percet 4°C-on. A felesleges ellenanyagot kimosva a fedőlemezeket FluoromountG használatával tárgylemezre rögzítettük.

Raftátrendeződés detektálása Jurkat sejteken

Jurkat T sejteket 50 µg/ml AlexaFluor555-tel (Molecular Probes) konjugált Gal-1-gyel kezeltünk 20 percig 4°C-on. Ezt követően a GM1-et koleratoxin-AlexaFluor488-cal (Molecular Probes) tettük láthatóvá.

Raftátrendeződés detektálása kokultúrában

A sejteket 1 órát tartottuk kokultúrában 37°C-on. A fixálást követően a raftkomponens GM-1 gangliozid kimutatására koleratoxin B alegységét használtuk, AlexaFluor488-cal konjugálva (Molecular Probes, Invitrogen). A jelölést 4°C-on végeztük 1 órát. Ezt követően megjelöltük a sejtfelszíni Gal-1-et egér anti Gal-1-el, majd anti-egér IgG NL557-el. A fedőlemezeket FluoromountG használatával tárgylemezre rögzítettük, az uszékony sejteket pedig szuszpenzióban vizsgáltuk.

TUNEL reakció

A TUNEL reakciót a DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System (Promega) utasításai alapján végeztük el. A sejteket 24 órát tartottuk kokultúrában, majd szobahőn fixáltuk 4%-os paraformaldehiddel 4 percig és permeabilizáltuk 0,2%-os TritonX-100-al 5 percig. Ezt követően 5-10 percig Equilibration buffer-rel kezeltük szobahőn, majd 60 percig TdT reakció mixszel inkubáltuk nedves kamrában 37°C-on. A reakció leállítására NaCl és Na-citrát elegyét használtuk, majd a lemezeket 0,3%-os hidrogén-peroxiddal kezeltük 3-5 percig. Ezt követte a minták 30 perces Streptavidin HRP-s inkubációja

szobahőn, majd a 10 perces DAB kezelés. Végül a fedőlemezeket Fluoromount G-vel a tárgylemezre rögzítettük.

3. Áramlási citofluorimetriás vizsgálatok

A méréseket FACSCalibur (Becton Dickinson) készülékkel végeztük, az eredményt CellQuest™ software-rel értékeltük ki.

A sejtfelszíni Gal-1 kimutatása

A sejteket (2×10^5 sejt/minta) immunfluoreszcencia (FACS) pufferben (*pufferek, oldatok pont*) szuszpendáltuk. A Gal-1 kimutatásához egér eredetű humán Gal-1 elleni monoklonális ellenanyagot (laboratóriumunkban előállított, 2C1/6 klón) használtunk 5 µg/ml koncentrációban. 45 perc jégen történő inkubáció után kétszer mostuk 1-1 ml immunfluoreszcencia pufferrel. A másodlagos ellenanyagot (anti-egér IgG, ATTO 488 fluorokrómmal konjugálva, Sigma) 1:100 hígításban használtuk és 30 percig jégen inkubáltuk a sejteket. Mosás után 300 µl immunfluoreszcencia puffert adtunk a mintákhoz és a mérést FACSCalibur (Becton Dickinson) készülékkel végeztük FL-1 csatornában. Az elpusztult sejteket 10 µg/ml propidium-jodid jelöléssel különítettük el FL-3 csatornában.

A sejtfelszíni Gal-1 eltávolítását thiodigalaktóziddal (TDG) (Sigma) végeztük, amelyet 100 mM koncentrációban alkalmaztunk. 30 perc 4°C-on történő inkubáció után a sejteket PBS-sel (*pufferek, oldatok pont*) mostuk, majd a fent említett protokoll szerint elvégeztük a jelölést és a mérést.

Mitokondriális membrán potenciál (MMP)

A rekombináns Gal-1-gyel kezelt sejteket JC-1 (5 µg/ml) festékkel töltöttük fel 15 percig 37°C-on, majd mosás után áramlási citométerrel analizáltuk. A JC-1 a működő mitokondriumok membránjába beépülve piros aggregátumokat formál, az elpusztult sejtek citoplazmájában zölden fluoreszkál.

Sub-G1 sejtek meghatározása (DNS tartalom mérése, azaz apoptózis vizsgálat)

A rekombináns galektin-1-gyel kezelt, illetve a tumor sejtek koncentrált médiumában 24 óráig 37°C-on tartott T sejteket PBS-sel mostuk, majd DNS-festő pufferben (*pufferek, oldatok pont*) felszuszpendáltuk. Az RNáz enzim megemésztí a sejtekben levő RNS-t, így a propídium-jodid csak a DNS-t jelöli. Az apoptotikus sejtek DNS állománya fragmentálódik és vezikulákba csomagolódik. A permeabilizált sejthártyán ezek a vezikulák távoztak, így a sejt DNS tartalma csökkent. A sejtciklus analízis során ezek a sejtek az egészséges, normál DNS tartalmú, G1 fázisban levő sejt populáció előtt jelentek meg, ezért az apoptotikus sejtek ebben az úgynevezett subG1 fázisban találhatók.

Foszfatidil szerin (PS) kimutatása

A sejteket PBS-sel mostuk, majd Annexin V-kötő pufferben (*pufferek, oldatok pont*) szuszpendáltuk. Ezután Annexin V-Alexa488-at (1:20 hígítás) és propidium jodidot (PI) (10 µg/ml) adtunk a sejtekhez 15 percre, sejteket sötétben, szobahőmérsékleten tartva.

4. SDS gél-elektroforézis, Western blot analízis

A sejteket (2×10^5 sejt/minta) lízis pufferben (*pufferek, oldatok pont*) tártuk fel, a sejtmagokat és törmeléket 13000 rpm centrifugálással eltávolítottuk. A sejt-lízátumot ugyanakkora mennyiségű, kétszeres töménységű redukáló SDS mintapufferrel (*pufferek, oldatok pont*) elegyítettük és 12%-os SDS poliakrilamid gélre (*pufferek, oldatok pont*) vittük fel. A fehérjék méret szerinti szétválasztása után a mintákat elektromos árammal transzfer pufferben (*pufferek, oldatok pont*) nitrocellulóz membránra (Schleicher & Schuell GmbH) transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 3% zselatinnal (TBS-Tweenben, (*pufferek, oldatok pont*)) 1 órán át szobahőn telítettük. A Gal-1 kimutatásához a laboratóriumunkban készített egér eredetű humán Gal-1 elleni monoklonális ellenanyagot (3C1/A1 klón) használtunk 1 µg/ml koncentrációban. Felviteli kontrollként β -aktint felismerő nyúl eredetű ellenanyagot alkalmaztunk (Abcam) 1:10000 hígításban. A membránt TBS-Tween (*pufferek, oldatok 12. pont*) oldattal mostuk háromszor, majd tormagyökér peroxidáz enzimmel konjugált anti-egér IgG és anti-nyúl IgG ellenanyagokat (Dako) használtunk. A membránt ECL Plus (GE Healthcare

Amersham™) oldattal hívtuk elő AGFA röntgen filmet exponálva. A gélben maradt fehérjéket Coomassie festékes oldattal (*pufferek, oldatok pont*) festettük és tettük láthatóvá.

5. Rekombináns Gal-1 előállítása, tisztítása

Előállítás

A Gal-1 cDNS-ét Fouillit és mtsai által leírt módszer szerint pQE-60 plazmidba klónoztuk, ezzel *E. coli* baktérium BL21 törzset (ompT bakteriális proteáz hiányos) transzformáltunk (Fouillit et al. 1998). A baktériumtelepet ezután 200 µg/ml ampicillinnel kiegészített LB tápfolyadékba (*pufferek, oldatok pont*) oltottuk és 16 óráig növesztettük 37°C-on rázatva. A kultúrát hígítva (1 ml törzskultúra 1 l LB-be) növesztettük tovább, OD_{600nm}=1,5-ig. A baktériumokat centrifugálással (4000 x g, 20 perc, 4°C hőmérséklet, Sorvall RC3B centrifuga) összegyűjtöttük. A baktériumüledéket 80 ml szuszpenziós pufferben (*pufferek, oldatok pont*) kétszer mostuk (4000 x g, 20 perc, 4°C, Hettich Universal 30 RF, 1424A rotor), végül 200 ml feltáró pufferben (*pufferek, oldatok pont*) 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 sejttörmeléket. Az így kapott felülúszót Wathman 3M szűrőpapíron szűrtük.

Tisztítás

A galektin-1 fehérjét affinitás kromatográfiával, 1 ml térfogatú α-laktóz- Sepharose oszlopon tisztítottuk. Az oszlopot 20 térfogat oszloposó pufferrel (*pufferek, oldatok pont*) átmostuk, majd 25 ml baktérium-lizátumot rétegeztünk rá. Ezután további 7,5 térfogat oszloposó pufferrel, majd újabb 7,5 ml 4 mM β-merkaptóetanolt tartalmazó mosó pufferrel lemostuk a nem kötődő fehérjéket, végül laktóz tartalmú elúciós pufferrel (*pufferek, oldatok pont*) eluáltuk a galektin-1 fehérjét összesen 10 ml térfogatban. A tisztítás hatékonyságát 12% SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük. A gélelektroforézist követően a gél Coomassie Brilliant Blue G-250 oldattal festettük 15 percig, majd 4-16 óráig 10%-os ecetsav oldattal differenciáltattuk. A fehérjét 250 µM β-

merkaptóetanol tartalmú desztillált vízbe 24 órán keresztül 4°C-on dializáltuk Spectra/Por dialízis membránban (Spectrum Laboratories, Inc., USA). A fehérje koncentrációt UV spektrofotométerrel (UNICAM 5625 UV/VIS) határoztuk meg ($OD_{280nm}=0,566$ 1 mg/ml Gal-1-nek felel meg), majd kis részletekben liofilizáltuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk. Az oszlopot 10 oszloptérfogat 1 M nátrium-klorid oldattal regeneráltuk, majd tároló pufferben (0,01 M foszfát puffer pH 7.2, 0,15 M NaCl, 0.1% NaN₃) tároltuk a következő felhasználásig. Az üres vektort hordozó baktérium lizátumot hasonló tisztítási eljárásen vittük keresztül, mint amit a Gal-1 tisztításhoz használtunk és ezt a preparátumot, vagy a Gal-1 oldószerét (PBS, 250 µM β-merkaptóetanol) használtuk kontrollként.

6. Pufferek, oldatok

Elúciós puffer:

50 mM Tris HCl pH 7,5
0,1 M jódacetamid
100 mM laktóz

Oszlopmosó puffer:

50 mM Tris HCl pH 7,5
1 mM PMSF
14 mM β-merkaptóetanol

Feltáró puffer:

50 mM Tris HCl pH 7,5
10 mM EDTA
14 mM β-merkaptóetanol (ME)
1 mM PMSF

Szuszpenziós puffer:

50 mM Tris HCl pH 7,5

10 mM EDTA

LB tápfolyadék:

10 g/l tripton

5 g/l élesztő kivonat (Difco)

5 g/l NaCl (Merck)

nátrium-hidroxid pH 7,0

RPMI sejttenyésztő médium:

1,04% (w/v) RPMI 1640 por (Gibco BRL)

0,2% (w/v) NaHCO₃

10 NE/ml penicillin (Biogal Gyógyszergyár Rt.)

0,1 mg/ml streptomycin (Egis Gyógyszergyár Rt.)

sterilre szűrés után kiegészítve 0,63 mg/ml L-glutaminnal (Sigma),

5% (v/v) vagy 10% (v/v) hőinaktivált magzati borjúsérummal (FCS, Gibco)

Tripánkék oldat sejtszámoláshoz:

0,16% (w/v) tripánkék

fiziológiás sóoldat

PBS, pH 7,4:

1,8 mM NaH₂PO₄

10 mM Na₂HPO₄

135 mM NaCl

3 mM KCl

FACS puffer:

PBS

1% (w/v) BSA (Sigma) vagy 1% (v/v) FCS (Gibco)

0,1% (w/v) nátrium-azid (Sigma)

Annexin V-kötő puffer:

10 mM HEPES pH 7,4

140 mM NaCl

2,5 mM CaCl₂

Redukáló SDS mintapuffer (kétszeres töménységű):

125 mM Tris/HCl pH 6,8

20% (v/v) glicerín

4% (w/v) SDS

2% (v/v) β -merkaptoetanol (Sigma)

brómfenolkék (Bio-Rad)

Koncentráló gél:

5% (w/v) akrilamid / 0,13% (w/v) bisz-akrilamid (Bio-Rad)

125 mM Tris/HCl pH 6,8

0,1% (w/v) SDS

0,033% (w/v) ammónium-peroxi-diszulfát (APS) (Sigma)

0,07% (v/v) N, N, N, N'-tetrametil-etilén-diamin (TEMED) (Bio-Rad)

Elválasztó gél:

7-15% (w/v) akrilamid/ 0,182-0,39% (w/v) bisz-akrilamid

125 mM Tris/HCl pH 8,8

0,1% (w/v) SDS

0,033% (w/v) ammónium-peroxi-diszulfát

0,07% (v/v) N, N, N, N'-tetrametil-etilén-diamin (TEMED)

Futtató puffer:

25 mM Tris/HCl pH 8,3

194 mM glicin

0,1% (w/v) SDS

Coomassie Brilliant Blue G-250 fehérjeszeparáló gélek festéséhez:

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

50% (v/v) metanol

10% (v/v) ecetsav

Transzfer puffer:

25 mM Tris-HCl pH 8,3

194 mM glicin

20% (v/v) metanol

TBS-Tween:

10 mM Tris-HCl pH 7,5

150 mM NaCl

0,05% (v/v) Tween 20 (Sigma)

Lízispuffer:

10 mM Tris-HCl pH 8

150 mM NaCl

1% Triton X-100

0,5% nátrium-dezoxikolát

0,1% SDS

2 mM EDTA

1 mM PMSF

DNS-festő puffer:

0,1% Triton X

0,1% nátrium-citrát

10 µg/ml RNáz

10 µg/ml propidium-jodid

PBS-ben

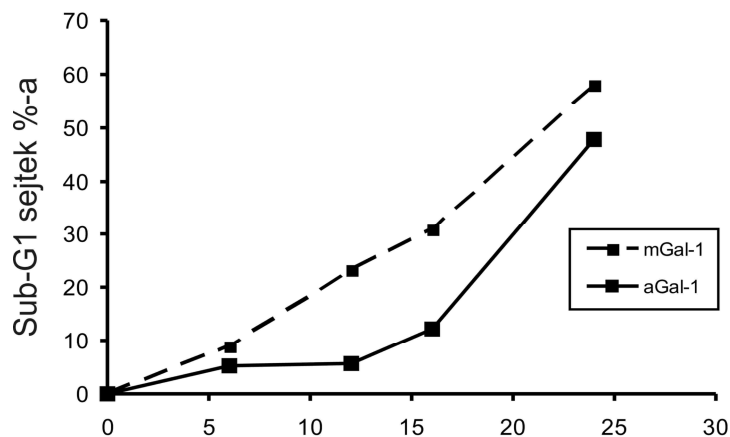
Eredmények

A Gal-1 egy erős immunszuppresszív, gyulladáscsökkentő fehérje, mely támogatja az érképződést és szabályozza a sejtadhéziót. Különböző patológiaszituációban szerepet játszik, tumorokban fontos résztvevő, a betegség rossz prognózisát jelzi, míg autoimmun betegségekben Gal-1 adásával terápiás hatást értek el. Ezért felvetődött ennek a sokoldalú fehérjének terápiás célpontként történő alkalmazása, ehhez azonban elengedhetetlen a Gal-1 hatásmechanizmusának részletes feltárása és a szakirodalomban közölt ellentmondások feloldása.

1. Szolubilis, rekombináns Gal-1 hatása a T sejtekre

1.1. Különböző koncentrációjú Gal-1-gyel indukált apoptózis eltérő kinetikával zajlik

Megvizsgáltuk, hogy a rekombináns humán Gal-1 hogyan befolyásolja a T limfociták életképességét. A sejteket aGal-1 és mGal-1 jelenlétében tenyésztettük és különböző időpontokban vizsgáltuk a viabilitásukat.

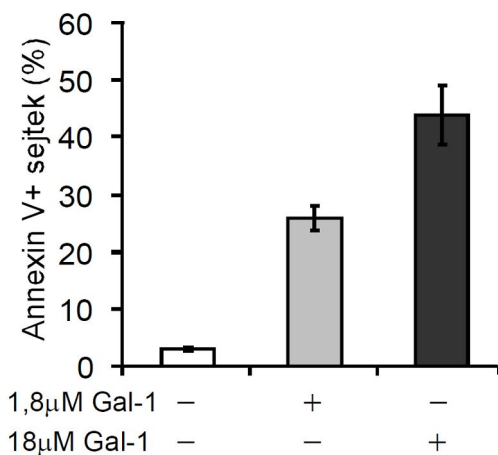


7. ábra: Jurkat T sejteket 1,8 μ M (aGal-1) és 18 μ M (mGal-1) Gal-1-gyel kezeltük 6, 12, 16, 24 óráig 37°C-on. Az inkubációs idő elteltével, a sejtciklus analízisével meghatároztuk a Sub-G1 populáció arányát. Három független kísérlet reprezentatív ábrája

Az apoptózis kései szakaszában a DNS fragmentálódik és a DNS darabok ún. apoptotikus testekbe csomagolódnak, elhagyják a sejtet és így a G1 fázis egyszeres DNS tartalmú sejtömege előtt jelennek meg az ún. Sub-G1 populációt alkotva. Az aGal-1 (7.A ábra) és mGal-1 (7.B ábra) is egyaránt apoptózist okozott Jurkat sejtekben. Az apoptózis, azaz a Sub-G1 populáció kialakulása azonban eltérő időpontban indult meg: az aGal-1 esetében 16 óra elteltével, míg a mGal-1-gyel kezelve már 6 óra után.

1.2. Az apoptózis a membrán aszimmetria felbomlásával jár, függetlenül az alkalmazott Gal-1 koncentrációjától

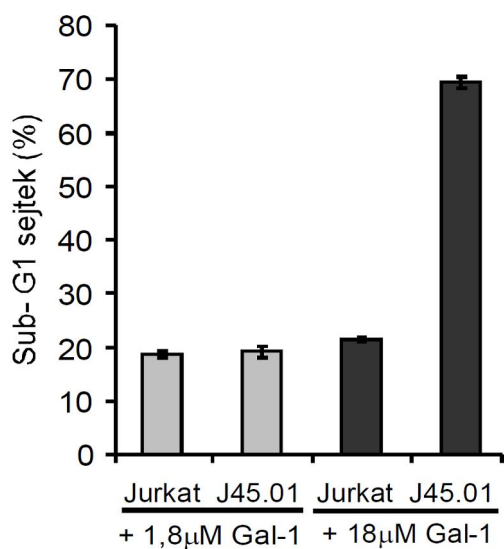
Az egészséges sejtekben a foszfatidil-szerin (PS) a plazmamembrán belső felszíne felé irányul. Az apoptotikus folyamatok során a membrán aszimmetria felbomlik és a PS kifelé fordul. Az AnnexinV kötődik a PS-hez, így az apoptotikus sejtek megjelölhetővé válnak. Propidium jodiddal (PI), egy, a DNS-hez kötődő fluoreszcens festékkel, mely az ép sejtek membránján nem tud átjutni, elkülöníthetjük a korai apoptotikus sejteket a késői apoptotikus/nekrotikus sejtektől. A PS sejtfelszíni expozíciója aGal-1 és mGal-1 alkalmazásakor is bekövetkezik, tehát az apoptózisnak ez a lépése nem függ a fehérje koncentrációjától. (8. ábra). A detektálhatóság időpontja ebben az esetben is különbözik az aGal-1 és mGal-1 kezelés során: 12h, illetve 6h elteltével mérhető a PS a membrán külső felszínén.



8. ábra: Jurkat T sejteket aGal-1-gyel (világosszürke) és mGal-1-gyel (sötétszürke) kezeltük 12 illetve 6 óráig, majd AnnexinV-FITC-cel és PI-dal jelöltük az áramlási citofluorimetriás vizsgálathoz. A diagramon az AnnexinV-öt kötő, de a PI-t át nem eresztő sejtek százalékát ábrázoltuk. Az ábrán bemutatott kísérletnél mintánként 3 párhuzamost használtunk, ezek átlagát és +/- szórását ábrázoltuk a grafikonon.

1.3. A CD45 jelenléte nem szükséges az aGal-1 indukálta apoptózishoz, de negatívan regulálja a mGal-1 indukálta apoptózist

Az első vizsgálatok azt mutatták, hogy a CD45 glikozilált transzmembrán foszfatáznak, a Gal-1 receptoraként, kiemelt szerepe van a Gal-1 indukálta apoptotikus jel továbbításában (Perillo et al. 1995; Walzel et al. 1999; Pang et al. 2009). Számos más adat azonban azt igazolja, hogy, annak ellenére, hogy a Gal-1 kötődik a CD45-höz, nem ez a szignál a Gal-1 indukálta apoptózishoz (Pace et al. 2000; Nguyen et al. 2001; Fajka-Boja et al. 2002). A CD45 szerepének vizsgálatához Jurkat és CD45 deficiens (J45.01) Jurkat sejtvonalakat használtunk. Laboratóriumunkban az eddigi kutatások folyamán kimutattuk, hogy a CD45 hiánya nem befolyásolja az apoptózis kimenetelét és lefolyását az aGal-1-gyel történő kezelés során (Fajka-Boja et al. 2002). Az mGal-1 esetében a CD45^{-/-} sejtekben az apoptózis majdnem kétszeresére nőtt a kontroll vad típushoz képest, tehát a CD45 jelenléte gátolja az mGal-1 által okozott apoptózist, míg az aGal-1 indukálta sejthalál lefolyását nem befolyásolja. (9. ábra)

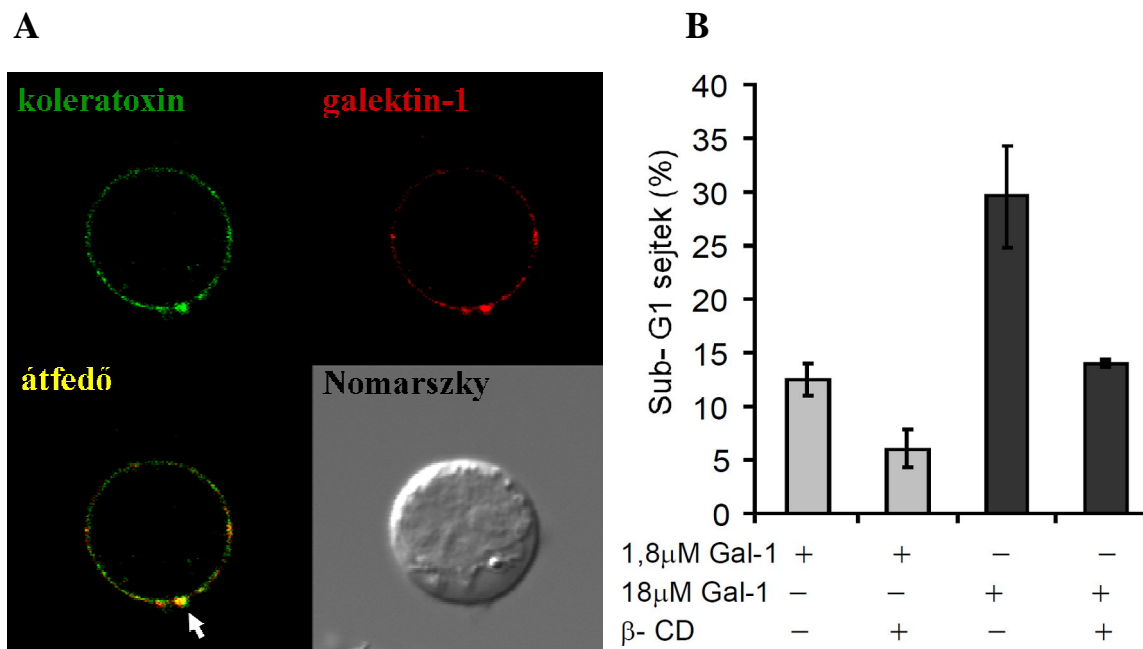


9. ábra: Jurkat és J45.01 sejteket aGal-1-el (szürke oszlopok) és mGal-1-el (fekete oszlopok) kezeltünk 24 illetve 16 óráig. Kezelés után mértük a Sub-G1 sejtek mennyiségét. Az ábrán bemutatott kísérletnél mintánként 3 párhuzamost használtunk és ezek átlagát és +/- szórását ábrázoltuk a grafikonon.

1.4. A raftátrendeződés feltétele a Gal-1 indukálta apoptózis lefolyásának

A membrán mikrodomaineknek és raftoknak fontos szerepük van a jelátvitelben, különböző stimulusokra átrendeződnek és az összetett jel továbbításához fontos fehérjék itt gyűlnek össze. Szakirodalmi adatokból már ismert, hogy a Gal-1 stimulálja a

raftátrendeződést (Pace et al. 2000). Kettős festéssel detektáltuk, hogy a koleratoxin, mely az egyik fő raft komponens, a GM1-gangliozidhoz kapcsolódik, és aGal-1 gyöngysorszerű mintázatban átfedő jelet ad a kezelt T sejteken, azaz az aGal-1 kötő receptor(ok) a raftokban helyezkednek el (10.A ábra, fehér nyíl). Előzetes eredményeink pedig bizonyították az aGal-1 indukálta raftátrendeződés szerepét az apoptózisban. Koleszterol-keláló β -ciklodextrin (β -CD) használatával gátoltuk az apoptózis további lépéseit: a ceramid felszabadulást, a mitokondriális membránpotenciál csökkenését, a kaszpáz 9 és 3 aktiválódását (Ion et al. 2006).

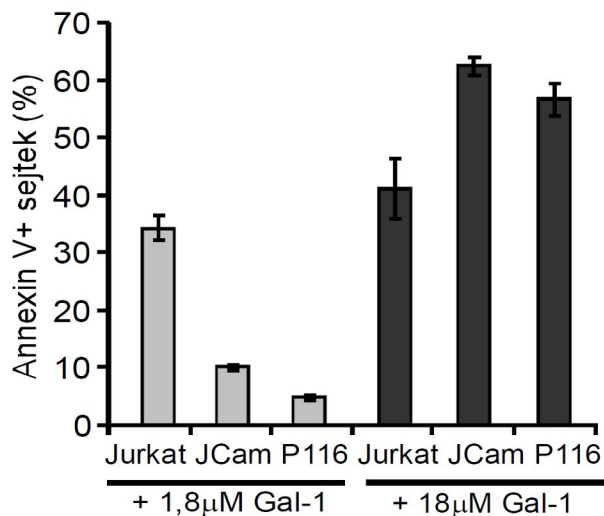


10. ábra: **A:** Jurkat T sejteket AlexaFluor555-tel konjugált Gal-1-gyel kezeltünk alacsony koncentrációban 20 percig 4°C-on (piros). Ezt követően a GM1-et koleratoxin-AlexaFluor488-cal (zöld) tettük láthatóvá. A piros és zöld átfedő képén a fehér nyíl a raftok gyöngysorszerű elrendezését mutatja. **B:** Mind az aGal-1 (szürke oszlopok), mind az mGal-1 (fekete oszlopok) használatakor kialakuló raft-átrendeződés szükséges a T sejt apoptózis folyamatának elindításához. A β -CD (10 mM) hozzáadásával mindkét esetben gátlást tapasztaltunk. A Sub-G1 sejtek arányát az 7. ábra alatt leírtak alapján határoztuk meg. A **B.** ábrán bemutatott kísérletnél mintánként 3 párhuzamost használtunk és ezek átlagát és +/-szórását ábrázoltuk a grafikonon.

Az mGal-1 kezelés esetén is hasonló eredményeket tapasztaltunk, az inhibitor ez esetben is nagymértékben csökkentette a Gal-1 apoptotikus hatását, tehát a raftképződés a mGal-1 alkalmazásakor is elengedhetetlen a sejthalál teljes mértékű lefolyásához. (10.B ábra)

1.5. Az Lck és ZAP70 tirozin kinázok nem szükségesek az mGal-1 indukálta apoptózis szignálkövetítéséhez

A szakirodalomból már ismert, hogy a Gal-1 kezelés tirozin foszforilációt indukál a Jurkat sejteken (Fajka-Boja et al. 2002; Ion et al. 2005). Laboratóriumunkban kimutattuk, hogy a Gal-1 indukálta apoptózis egyik kulcsfontosságú korai lépése a tirozin foszforiláció, amely magába foglalja az Lck és Zap70 kinázok aktivitását. Ez az esemény elengedhetetlennek bizonyult az aGal-1 indukálta apoptózis korrekt lefolyásához, ugyanis, ha Lck vagy ZAP70 hiányos Jurkat sejteket (JCam1.6 vagy P116) kezeltünk aGal-1-gyel, az apoptózis elmaradt (Ion et al. 2005, 2006). Ezzel szemben mGal-1 használatakor azt tapasztaltuk, hogy az apoptotikus sejtek populációja nőtt az említett kinázok hiányában. Ezek szerint az mGal-1 indukálta apoptózis nem igényeli az Lck és ZAP70 kinázok közvetítését. (11. ábra)

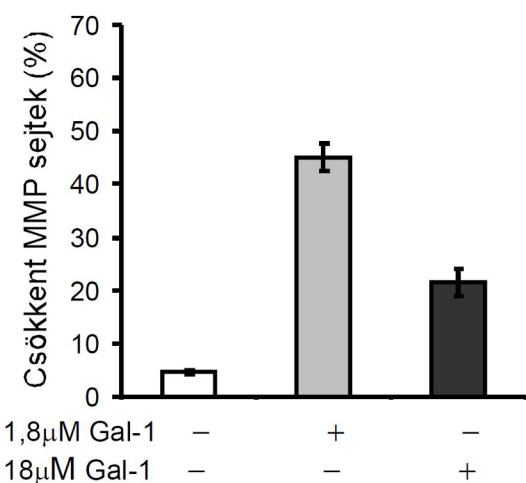


11. ábra: *Jurkat, JCam1.6 ($p56^{lck}$ deficiens Jurkat, JCam) és P116 (ZAP70 deficiens Jurkat) sejteket stimuláltunk aGal-1-el (szürke oszlopok) vagy mGal-1-el (fekete oszlopok), majd a 8. ábra alatt leírt módszer szerint analizáltuk az AnnexinV⁺ sejteket. Az ábrán bemutatott kísérletnél mintánként 3 párhuzamost használtunk és ezek átlagát és +/- szórását ábrázoltuk a grafikonon.*

1.6. A mitokondriális membránpotenciál-csökkenés fontos lépése az apoptózisnak mind alacsony, mind magas Gal-1 koncentráció esetében

A mitokondriális membránpotenciál (MMP) csökkenése az egyik központi lépése a különböző drogokkal, UV besugárzással vagy oxidatív stresszel előidézett apoptózisnak (Green 2005). Laboratóriumunkban már kimutattuk, hogy az aGal-1 hatására a Jurkat sejtekben MMP csökkenés indul meg (Ion et al. 2006). A szakirodalomban alkalmazott mGal-1 szintén drasztikus MMP csökkenést okoz (Hahn et al. 2004).

A 12. ábrán bemutatott kísérletben a JC1-et, a működő mitokondrium membránjába beépülő és ott aggregálódó membrán permeábilis fluoreszcens festéket használtuk, majd áramlási citofluorimetriával detektáltuk a JC1-et akumuláló sejtek arányát. Az aGal-1 és mGal-1 esetében is nagyfokú MMP csökkenést tapasztaltunk, de eltérő időkinetikával: az inkubációs idő aGal-1 esetében 16 órá, míg mGal-1 esetében 6 órá volt.

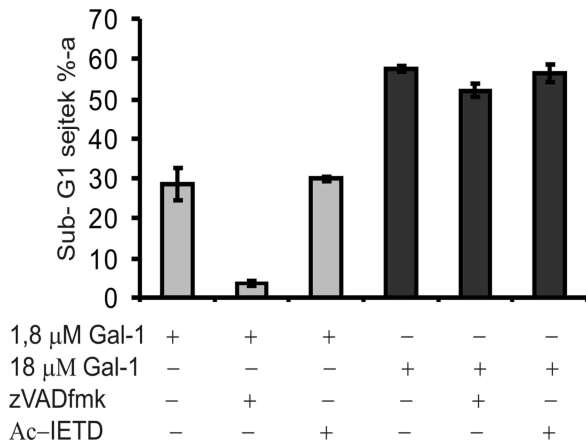


12. ábra: Jurkat sejteket aGal-1-gyel (szürke) 16 órán keresztül vagy mGal-1-gyel (fekete) 6 órán keresztül stimuláltunk. Kontrollként nem kezelt Jurkat sejteket használtunk (fehér). A sejteket JC-1 fluoreszcens festékkel jelöltük és az MMP-t a fluoreszcencia intenzitás citofluorimetriás mérésével határoztuk meg. Az ábrán bemutatott kísérletnél mintánként 3 párhuzamot használtunk és ezek átlagát és +/-szórását ábrázoltuk a grafikonon.

1.7. Az aGal-1 kaspázfüggő, az mGal-1 kaspáz független apoptózist okoz

Csoportunk eddigi eredményei szerint az aGal-1-gyel indukált apoptózis kaspáz-függő útvonalon halad (Ion et al. 2006). Bizonyítottuk, hogy az aGal-1 indukálta apoptózis a kaspáz 9 és 3 aktiválódásával jár, de nem függ a kaspáz 8-tól, majd megvizsgáltuk, hogy a mGal-1 kezelés során kiváltott apoptózisban mely kaspázok aktiválódnak. A vizsgálathoz zVAD-fmk általános kaspáz inhibitor, illetve Ac-IETD-t, a kaspáz 8

inhibitorát használtuk. A kapott értékek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a mGal-1 kaszpáz független apoptózist okoz, azaz nem gátolható az apoptózis mértéke a kaszpáz inhibitorokkal. (13. ábra)



13. ábra: A Jurkat sejteket 50 μ M zVAD-fmk és Ac-IETD kaszpáz inhibitor jelenlétében vagy a nélkül 24h-ig aGal-1-gyel, illetve 16h-ig mGal-1-gyel kezeltük, majd az 7. ábra alatt leírtak alapján meghatároztuk a Sub-G1 sejtek arányát. Az ábrán bemutatott kísérletnél mintánként 3 párhuzamost használtunk és ezek átlagát és +/-szórását ábrázoltuk a grafikonon.

2. Sejtek által termelt, natív Gal-1 sejtkötött és nem szolubilis formában hat a T sejtek életképességére

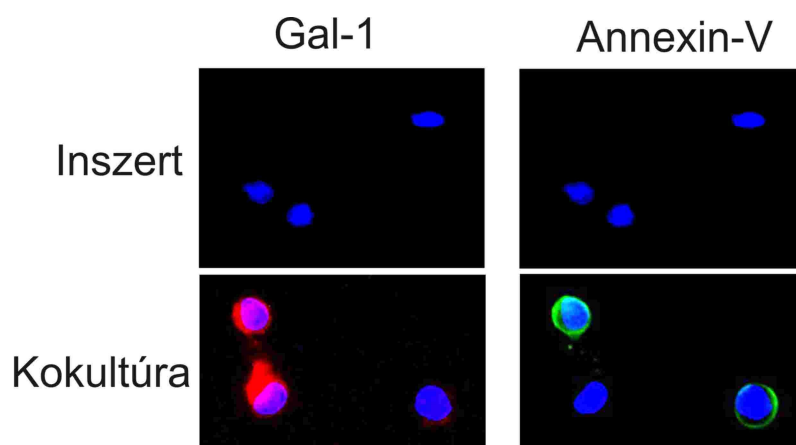
A kísérleteinkben alkalmazott melanóma és glióma sejtvonalak Gal-1-et termelnek. Negatív kontrollként Gal-1-et nem termelő HeLa sejteket használtunk, emellett pedig a laboratóriumunkban már előzőleg előállított, Gal-1-et expresszáló transzgénikus HeLa sejteket is vizsgáltuk kokultúrában.

A kokultúra kísérletek során megfigyeltük, hogy a tumorsejtek és az aktivált T sejtek (aktT sejt) fizikai kölcsönhatásba kerülnek egymással. (14. ábra)



14. ábra: C32 melanóma és aktivált T sejtek kokultúrájában a két sejt között jelentős fizikai kontaktus jön létre. A tumor sejteket az aktT sejtekkel 16 órán át együtt tenyésztettük, majd fluoreszcens- és fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A tumorsejtek (adherens, alul, kis nyíl) és a T sejtek (kisebb, kerek vagy csepp alakú sejtek, nagy nyíl) morfológiájuk alapján is megkülönböztethetők.

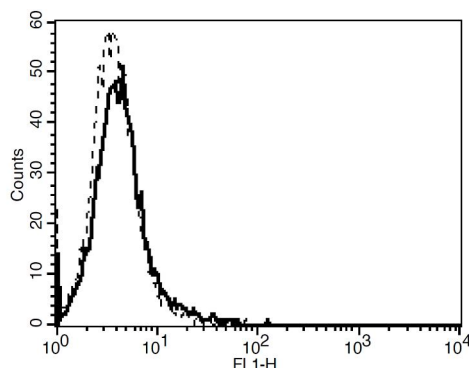
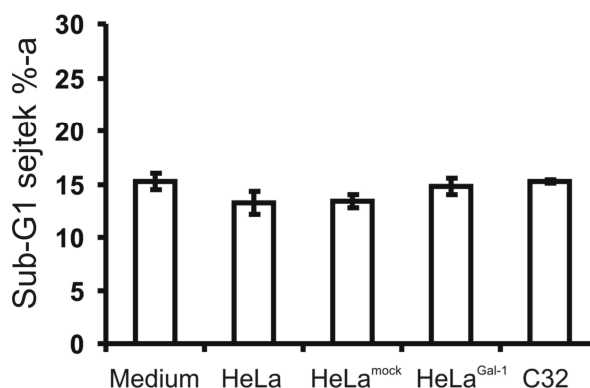
Annak eldöntésére, hogy a Gal-1-et termelő és szekretáló sejtek kiváltják-e a T sejtek pusztulását, és ha igen, szolubilis (a médiumba kiválasztott) vagy közvetlen sejtkapcsolat szükséges-e a tumor sejtek által kiváltott T sejt pusztuláshoz, kokultúrák és Transwell kísérleteket végeztünk. A sejtek fizikai kölcsönhatását megengedő kokultúrák rendszerben az U87 glióma sejtek a T sejtek apoptózisát váltotta ki (15. ábra két alsó panel), mégpedig azokban a T sejtekben, melyekre a Gal-1 a tumor sejtekről átkerült. Itt meg kell jegyezni, hogy sem az aktivált T sejtek, sem a leukémias Jurkat T sejtek felszínén nem mutatható ki endogén Gal-1. A Transwell rendszerben a 24 lyukú sejttenyésztő lemezhez egy inszert tartozik, amelynek alját egy mikropórusos hártya képezi. Az U87 sejteket a szövettenyésztő lemez aljára növesztettük, majd az inszertbe helyeztük a T sejteket. Így fizikai gát alakult ki a két sejtípus között, ami a szolubilis faktorok áramlását nem gátolta (15. ábra két felső panel). Ilyen elrendezésben a T sejtek apoptózisa elmaradt. Ezek az eredmények igazolják, hogy a tumor sejtek által indukált T sejt apoptózishoz szükséges az effektor és target sejtek közvetlen kapcsolata. A kísérletek azt is jelzik, de nem igazolják, hogy a tumorsejtek által termelt Gal-1 szerepet játszik ebben a folyamatban.



15. ábra: *Transwell inszeretben (két felső panel) vagy inszeret nélküli (két alsó panel) kokultúrában vizsgáltuk a kiváltott apoptózist aktT sejteken, melyek magját előzőleg Hoechst33342 festékkel megjelöltük (kék). A 16 órás inkubációs idő után a sejteket AlexaFluor488-konjugált AnnexinV-tel (zöld) reagáltattuk vagy anti-galektin-1 monoklonális ellenanyaggal és Northern Lights 557- konjugált anti-egér Ig másodlagos ellenanyaggal mutattuk ki a sejtfelszíni Gal-1 jelenlétét (piros). A mintákat fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk.*

A közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás szükségességét igazolta az a kísérlet is, melyben Gal-1-et expresszáló C32 melanóma és Gal-1 transzgenikus HeLa, illetve Gal-1-et nem termelő vad típusú, és üres plazmiddal transzfektált HeLa (HeLa mock) tumorsejtek koncentrált felülszójának Gal-1 tartalmát és aktT sejtekre kifejtett citotoxikus hatását vizsgáltuk. Az aktT sejtekhez adott C32 kondicionált médiumából nem kötődött galektin-1 az aktT sejtek felszínére, ahogy azt az áramlási citometriás analízis mutatta (16.A ábra). Amikor az aktT sejteket a C32, illetve galektin-1-et kifejező HeLa sejtek kondicionált médiumában tartottuk, nem tapasztaltunk apoptózist, hasonlóan a vad típusú, vagy kontroll, üres plazmiddal transzfektált HeLa sejtekről nyert médiumhoz (16.B ábra).

Meg kell jegyezni, hogy a fenti eredmények nem igazolják, csak jelzik, hogy a Gal-1-et termelő sejtekben a Gal-1 a T-sejt apoptózist okozó faktor. Ennek bizonyítását a későbbi fejezetekben mutatjuk be.

A**B**

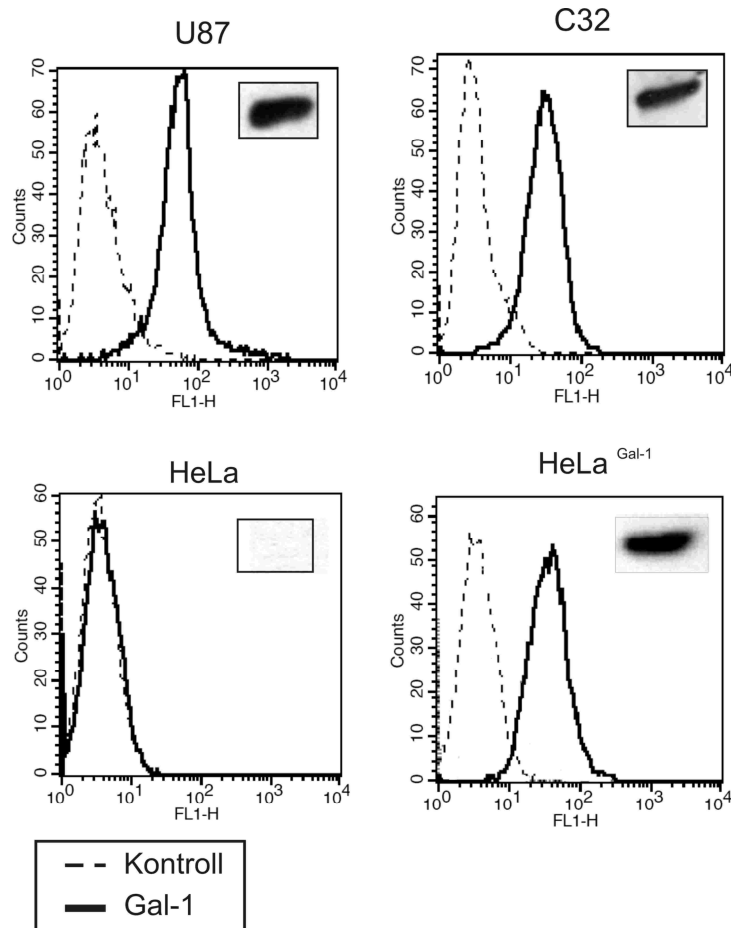
16. ábra: **A:** Nem kondicionált (szaggatott vonal) és C32 melanóma sejtekkel kondicionált (teli vonal) médiumban inkubáltuk az aktT sejteket 1h-át 4°C-on, majd a sejtfelszínhez kötődött Gal-1-et áramlási citofluorimetriával detektáltuk. A sejteket anti-galektin-1 monoklonális ellenanyaggal, majd Atto488 fluorokrómmal konjugált anti-egér IgG-vel kezeltük. **B:** Az aktT sejteket galektin-1-et expresszáló (Hela^{Gal-1}) és a kontroll HeLa sejtek (HeLa és HeLa^{mock}) valamint C32 sejtek felülszójában tartottuk 24h-ig, majd Sub-G1 analízissel vizsgáltuk a kiváltott apoptózist.

3. Pathológiás és fiziológiás állapotú sejtek által termelt Gal-1 szerepe

Az előző fejezetben tárgyaltuk, hogy a Gal-1 sejt-kötött faktorként hat. Számos pathológiás és fiziológiás környezetből származó sejt, melyeknek szerepe eredetükből adódóan eltérő, termeli ezt a fehérjét. Kíváncsiak voltunk, hogy a különböző környezetből származó sejtek sejtfelszíni Gal-1-e vajon ugyanolyan szerepet tölt-e be az immunszuppresszióban. Pathológiás modellként humán tumorsejtvonalakat, U87 glioblasztóma, C32 melanóma illetve HeLa cervix karcinóma sejtvonalakat, míg fiziológiás sejt-ként humán és egér eredetű mesenchymális őssejteket használtunk.

3.1. Humán tumor eredetű Gal-1 által indukált T sejt apoptózis mechanizmusa

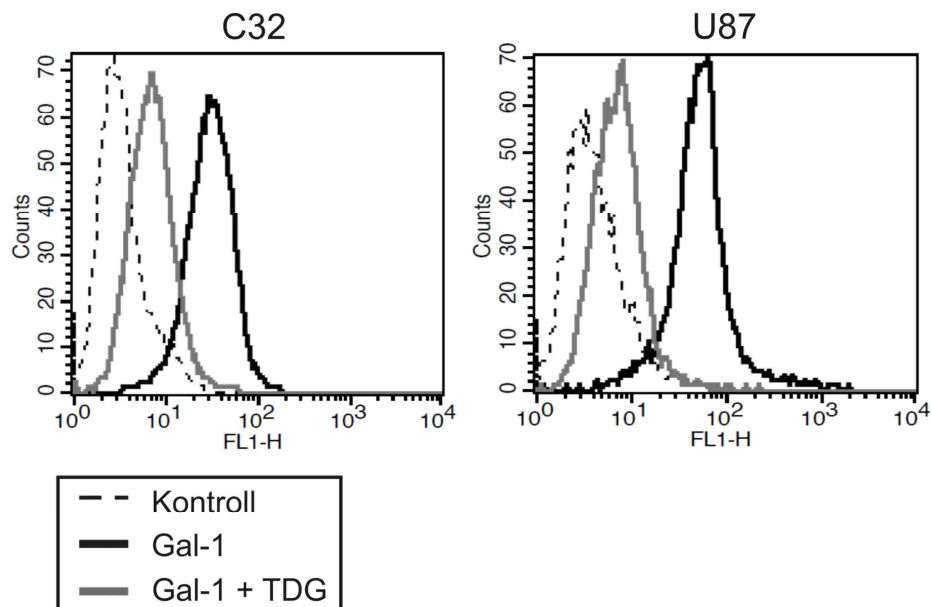
A tumorok és/vagy a tumort környező stroma sejtek Gal-1 termelése vagy túltermelése úgy is értelmezhető, mint a rosszindulatú progresszió egyértelmű jele, melynek velejárója a metasztázis képződés és az immunválasz kijátszása.



17. ábra: C32, U87, HeLa és HeLa^{Gal-1} sejtek által termelt Gal-1 vizsgálata. Az össz Gal-1-et Western blott technikával teszteltük (beszúrt téglalap): a sejtlyázátumokat 12%-os SDS-poliakrilamid gélen megfutattuk, majd transzferáltuk nitrocellulóz filterre. A Gal-1 kimutatása monoklonális egér anti-Gal-1-gyel történt, ezt követte a nyúl anti-egér IgG-HRPO konjugátum és ECL plus szubsztrátként. A sejtfelszíni Gal-1 kimutatása a 16. ábrán leírtak alapján történt áramlási citometriával. A fekete görbék mutatják a sejtfelszíni Gal-1 szintet, a szaggatott görbe az első ellenanyag nélküli kontroll mintát.

A Gal-1 sejtfelszíni jelenlétét az általunk használt tumoros sejtvonalakon a laboratóriumunkban kifejlesztett monoklonális antitest és fluoreszcens molekulával konjugált másodlagos ellenanyag használatával, áramlási citometriás módszerrel detektáltuk. A sejtekben található össz Gal-1 mennyiségét pedig Western blottinggal mutattuk ki. Jól látható, hogy a C32 melanóma, az U87 glióma, valamint a Gal-1 transzfektált HeLa sejtek felszínén nagymértékű a Gal-1 jelenléte, míg a vad típusú HeLa sejtek felszínén nem mutatható ki a vizsgált fehérje (17. ábra).

A Gal-1 β -galaktozid (laktóz)-kötő tulajdonságát kihasználva, egy laktóz analóggal a thiodigalaktóziddal (TDG) eltávolíthatjuk a vizsgált fehérjét a sejtek felszínéről. A TDG a Gal-1 szénhidrátkötő motívumához kapcsolódik, így nagy feleslegben alkalmazva hatékonyan csökkenti a sejtfelszíni Gal-1 mennyiségét mind a melanóma, mind pedig a glióma sejtvonalakon (18. ábra).

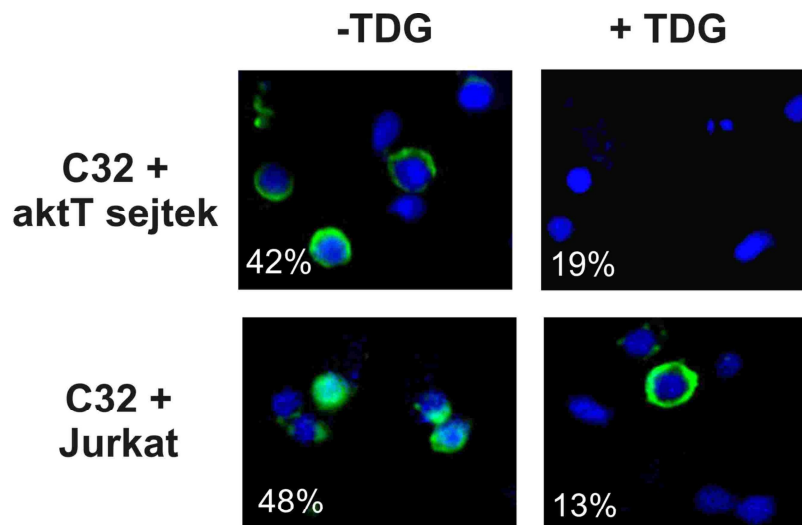


18. ábra: A tumor sejteket 30 percig kezeltük 4°C-on 100 mM TDG-vel (szürke), vagy kezeletlenül hagytuk (fekete). A sejtfelszíni Gal-1 mennyiségét a 16. ábra alatt leírt módon áramlási citofluorimetriával határoztuk meg. A szaggatott görbék az első ellenanyag nélküli kontroll mintákkal kapott fluoreszcencia intenzitást mutatják.

A következő kísérletekben a tumor sejt által termelt Gal-1 által indukált aktivált T-sejt apoptózis elemi lépéseit határoztuk meg.

3.1.1. PS sejtfelszíni expozíció

Szolubilis, rekombináns Gal-1-gyel végzett kísérleteinkből tudjuk, hogy a T sejt apoptózis egyik korai lépése a membrán lipidjeinek aszimmetrikus elhelyezkedésének felbomlása és a PS külső membránfelszín felé történő fordulása.



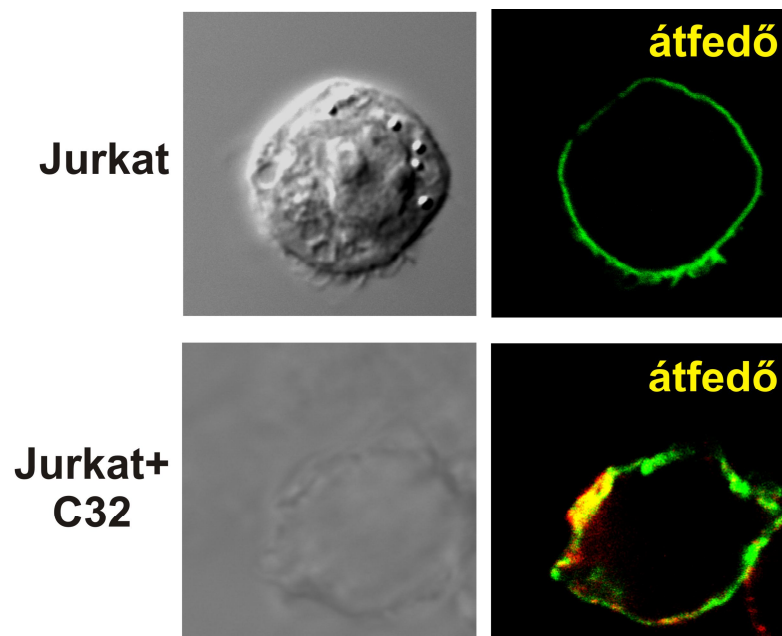
19. ábra: C32 tumor sejteket kitapadás után 30 percig kezeltük 4°C-on 100 mM TDG-gel, vagy kezeletlenül hagytuk, majd Jurkat vagy aktT sejteketadtunk a tumor sejt kultúrához. A kokultúrás kísérlet kiértékelését a 15. ábra alatt leírtakhoz hasonlóan végeztük. A bal alsó sarokban levő értékek az össz T sejt számhoz viszonyított apoptotikus T sejtek százalékát mutatják.

A kokultúra kísérletek során is azt tapasztaltuk, hogy a Gal-1-et termelő tumor sejtek a Jurkat T sejtek membrán asszimetriájának felbomlását és apoptózist okozták (19. ábra bal oldali alsó kép). Ebben a rendszerben teszteltünk perifériás vérből izolált, majd aktivált humán T sejteket (aktT sejtek) is, amelyeken szintén detektáltuk apoptózisnak ezt az elemét (19. ábra bal oldali felső kép). A Gal-1 szerepét a tumor sejtek által indukált T sejt apoptózisban úgy is vizsgálhatjuk, hogy a Gal-1-et expresszáló C32

tumor sejt felszínéről TDG-vel eltávolítjuk a fehérjét. A sejtfelszíni Gal-1 eltávolítása a C32 sejtek Jurkat és aktT sejt apoptózist indukáló képességének csökkenésével járt (19. ábra jobb oldali képek). Az, hogy azonos eredményt kaptunk, mikor target sejtként nem T sejtvonalat, hanem humán perifériás aktivált T sejteket használtunk, azt igazolja, hogy a Jurkat sejtek nem rákos voltak miatt reagálnak az adott módon. Így a kísérletek egy részét, modellként alkalmazva, Jurkat T sejteken végeztük a könnyebb kezelhetőség és mutáns Jurkat sejtvonalakhoz való könnyebb hozzáférés miatt.

3.1.2. Raftátrendeződés

Gal-1 kezelés hatására membrán mikrodomainek, raftok jönnek létre a kezelt sejt plazmamembránjában. A raftkomponensként számon tartott GM-1 gangliozid (zöld) egyenletes festődést mutat az egyedül tartott Jurkat sejtek membránján.

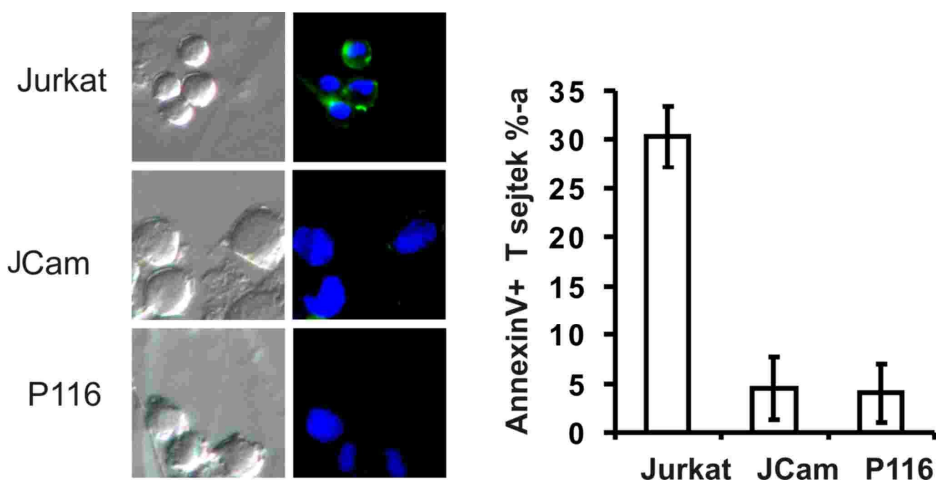


20. ábra: Jurkat sejteket tartottunk kokultúrában C32 melanóma sejtekkel 1 órát 37°C-on. A kontroll Jurkat sejteket tumor sejtek nélkül azonos körülmények között inkubáltuk. A GM-1 gangliozid kimutatására koleratoxin B alegységét használtuk, AlexaFluor488-cal jelölve (zöld). A Gal-1-et (piros) anti-galektin-1 monoklonális ellenanyaggal és Northern Lights 557-konjugált anti-egér Ig másodlagos ellenanyaggal mutattuk ki.

A tumor sejttel kokultúrában tartott Jurkat T sejt Gal-1-kötő struktúrai megkötik a tumor sejtek felszínén levő Gal-1-et (piros). A két sejt kontaktusában a Gal-1 és a GM1 ko-lokalizálódik (20. ábra, zöld és piros szín átfedésekor sárgán jelenik meg), hasonlóan ahhoz, ahogyan azt a rekombináns Gal-1 használatakor tapasztaltuk (10. ábra).

3.1.3. *Lck és Zap70 kinázok szükségessége*

Szolubilis, rekombináns Gal-1-el végzett kísérleteink szerint az apoptózisban szerepet játszik a T sejtekre jellemző két kináz, a $p56^{lck}$ és a ZAP70. Annak eldöntésére, hogy ezek a kinázok szerepet játszanak-e a tumor sejt eredetű Gal-1 indukálta T sejt apoptózisban, U87 glióma sejteket és vad típusú, Lck hiányos (JCam1.6) vagy ZAP70 deficiens (P116) Jurkat sejteket tartottunk kokultúrában. A kokultúrákat vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a kináz hiányos T sejtekben nem indukált apoptózist az U87 sejtekkel való együtt inkubálás, míg a vad típusú T sejtekben igen (21. ábra).

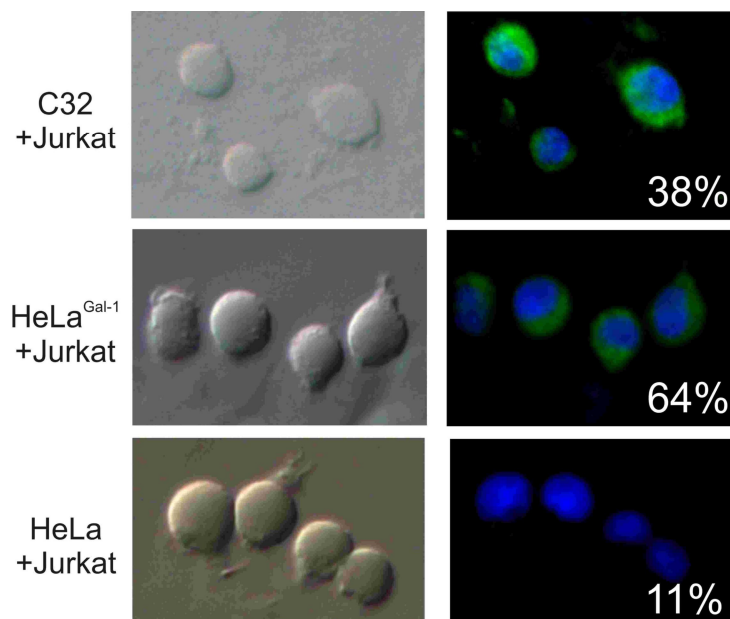


21. ábra: Jurkat, $p56^{lck}$ (JCam) vagy ZAP70 (P116) deficiens Jurkat sejteket és U87 glióma sejteket tartottunk kokultúrában, majd 16 óra együtt tenyésztés után az apoptotikus sejteket AnnexinV-FITC festéssel jelöltük. A pozitív sejtek arányát oszlopdiagramban ábrázoltuk.

A kísérlet azt igazolta, hogy az említett enzimek, hasonlóan a rekombináns, szolubilis Gal-1-gyel indukált sejthalálhoz, szerepet játszanak a humán tumorsejt eredetű galektin-1 indukálta T sejt apoptózisban.

3.1.4. Ceramid felszabadulás

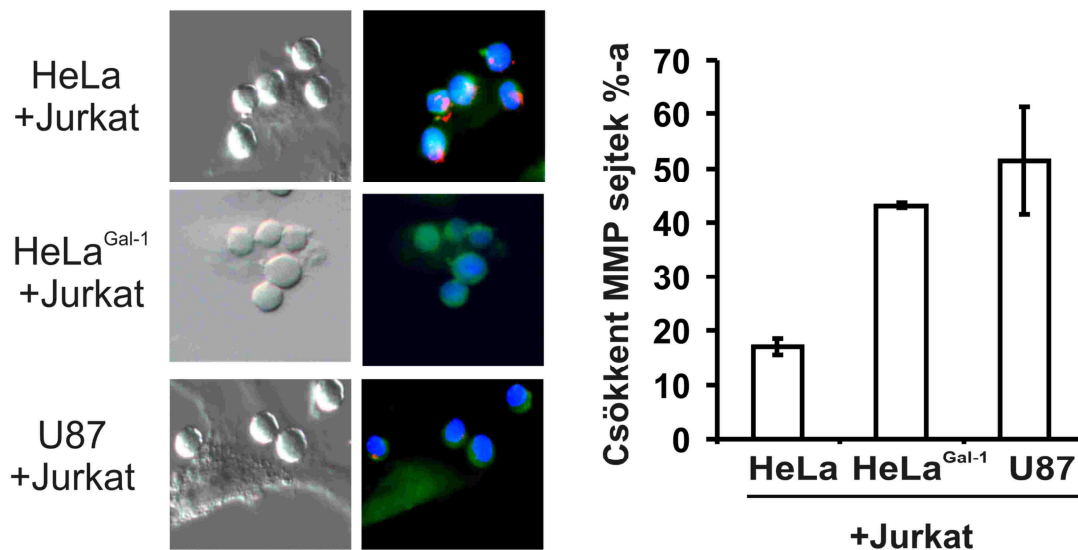
Ceramid az apoptotikus sejtekben *de novo* szintézissel vagy szfingolipidből keletkezhet neutrális és savas szfingomielináz aktivitása révén. Előzetes kísérleteink alapján tudjuk, hogy a ceramid nélkülözhetetlen lépése a szolubilis Gal-1 indukálta apoptózisnak. A Gal-1 indukálta apoptózis jelátvitelében a savas szfingomielináz működése révén kialakuló ceramid játszik szerepet (Ion et al. 2006). Annak eldöntésére, hogy a ceramid a tumor sejt eredetű Gal-1 által indukált T sejt apoptózis mechanizmusában is szerepet játszik-e, vizsgáltuk a tumor sejt T sejt kokultúrában a ceramid felszabadulást. A 22. ábra mutatja, hogy a Jurkat T sejtekben intenzív ceramid felszabadulás tapasztalható C32 melanóma sejtekkel történő együtt tenyésztéskor.



22. ábra: C32, HeLa és Gal-1 termelő HeLa sejteket és Jurkat T sejteket inkubáltunk kokultúrában. A mintákat fixálás, permeabilizálás után anti-ceramiddal jelöltük, a jelet biotin-konjugált másodlagos ellenanyaggal és streptavidin-FITC-cel tettük detektálhatóvá.

3.1.5. MMP csökkenés

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a tumor sejt eredetű Gal-1 okozza-e, a T sejt apoptózis során, a mitokondriális membrán potenciál változását. Ezt a kísérletet JC-1-es jelöléssel végeztük, ami áramlási citofluorimetria mellett mikroszkópos analízishez is használható. Monomer formában a sejtek citoplazmájába kerülve zöld színnel jelenik meg, az egészséges mitokondriumba beépülve pedig piros színt ad. Az apoptotikus sejtekben a mitokondriális membrán potenciál csökkenése miatt a festék nem képes a mitokondriumba beépülni, így ezekben a sejtekben csak zöld festődést tapasztalunk, míg az egészséges sejtekben jelen van a zöld és a piros szín is.



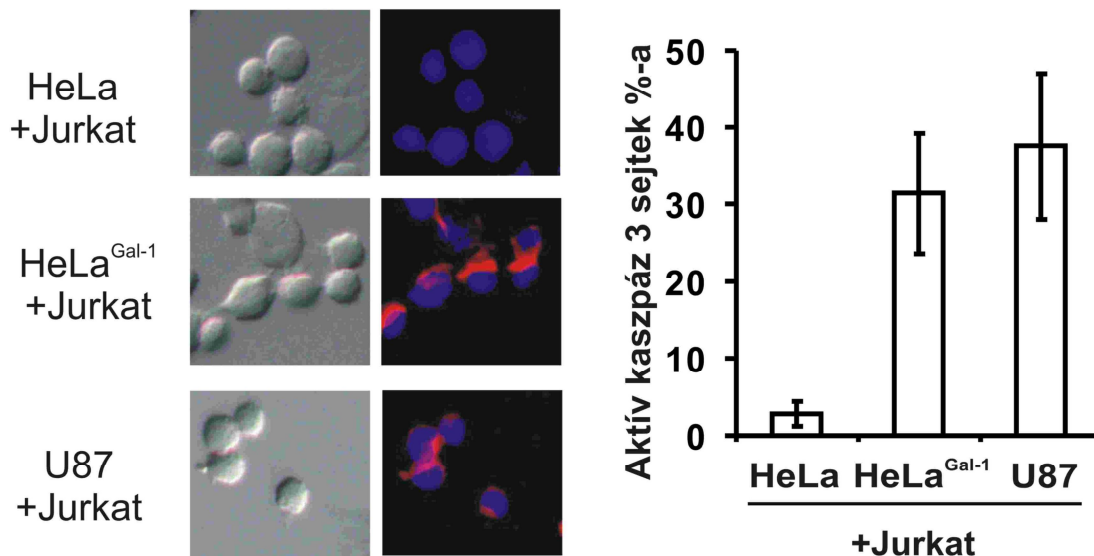
23. ábra: 16 órás kokultúrában tartott sejteket JC-1 festékkel inkubáltuk 10 percig, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A képen piros szín jelzi az egészséges mitokondriumokat (felső kép, HeLa+Jurkat), a két alsó panelen az Gal-1 termelő tumorsejtekkel együtt tartott Jurkat sejtekben a piros szín hiánya a mitokondriumok membránpotenciál csökkenését jelzi. Az oszlopdiagram a csökkent mitokondriális membránpotenciálú T sejtek arányát mutatja HeLa, HeLa^{Gal-1}, illetve U87 sejtekkel történt együtt inkubáció után.

A mikroszkópos analízis során megszámloltuk az egészséges és a csökkent mitokondriális membránpotenciált mutató sejteket, majd meghatároztuk az arányukat. A

23. ábra mutatja, hogy a galektin-1-et nem termelő HeLa-val szemben a Gal-1-gyel transzfektált HeLa ($\text{HeLa}^{\text{Gal-1}}$) és Gal-1 pozitív U87 glióma a T sejtek közel 50%-ában mitokondriális membránpotenciál csökkenést okozott.

3.1.6. Kaszpáz aktiváció

A kaszpázok szerepét az aktív kaszpáz 3-ra specifikus ellenanyaggal vizsgáltuk. Az U87 és a $\text{HeLa}^{\text{Gal-1}}$ a T sejtekben kaszpáz kaszkád aktiválódásával kísért apoptózist indított el, tehát klasszikus, kaszpáz-függő apoptózis zajlott le. Ezzel ellentétben HeLa sejtekkel együtt tartott T sejtekben az effektor kaszpáz aktivitása elmaradt (24. ábra).



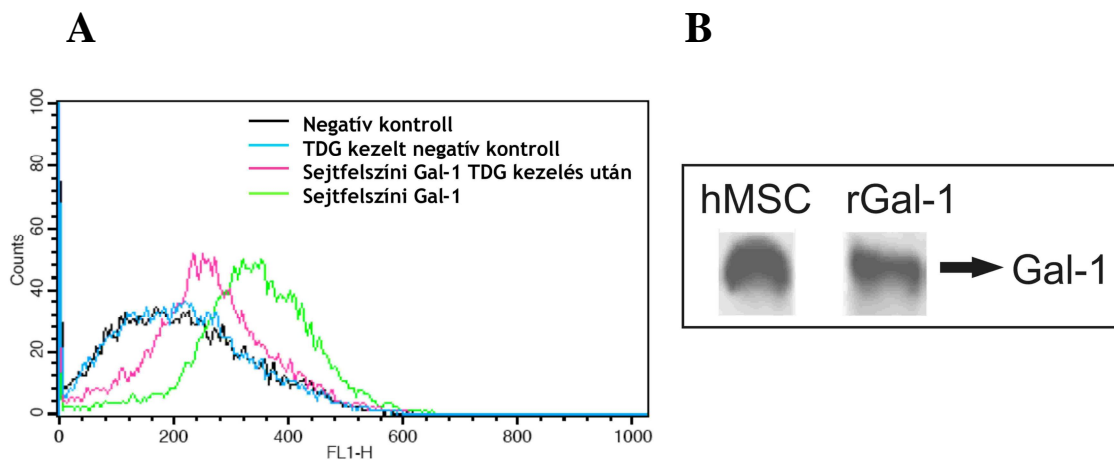
24. ábra: A kokultúrás rendszerben HeLa, Gal-1 termelő HeLa és U87 tumor sejteket tartottunk együtt Jurkat T sejtekkel. A mintákat fixálás és permeabilizálás után nyúl-aktív kaszpáz 3-at felismerő ellenanyaggal inkubáltuk 16 órán át 4°C-on, majd TRITC-jelzett anti-nyúl IgG ellenanyaggal hívtuk elő, végül a mintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A pozitív sejtek arányát oszlopdiagramban ábrázoltuk.

3.2. Fiziológiás, csontvelői MSC sejtek által termelt Gal-1 hatása a T sejtek életképességére

Az MSC-k erős immunszuppresszív hatású sejtek (l. Bevezetés). Mi a Gal-1 szerepét vizsgáltuk az MSC-k által kiváltott T sejt apoptózis során. Munkacsoportunkban az első MSC-vel végzett kísérletek humán mesenchymális őssejteken (hMSC) történtek, a kérdések feltevését és megválaszolását ezekkel a sejtekkel indítottuk. Az általunk használt hMSC-k csontvelő-átültetések során kimaradt sejtek.

3.2.1. Humán csontvelői eredetű MSC hatása Jurkat és aktivált, perifériás T sejtek életképességére

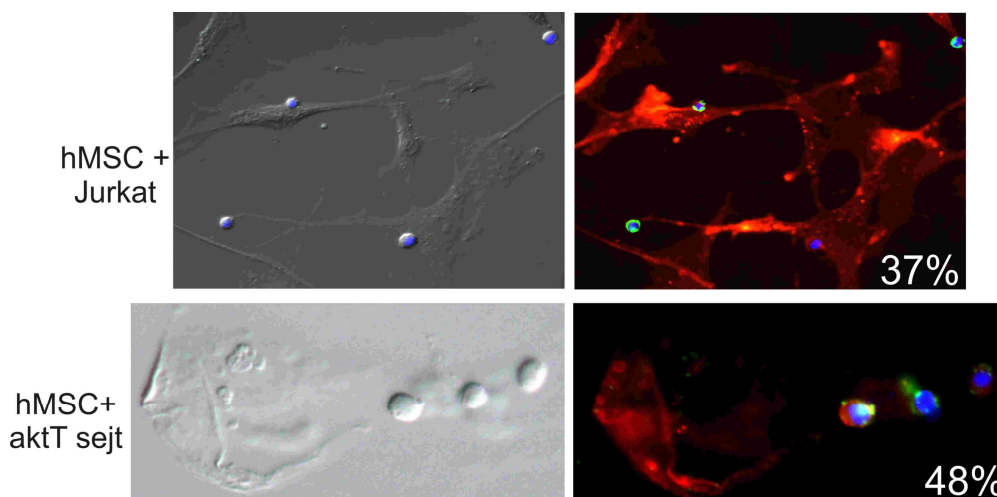
Első lépésben megvizsgáltuk a hMSC Gal-1 tartalmát áramlási citofluorimetriával (25. ábra A) és Western blottinggal (25. ábra B). Mivel humán eredetű sejtekről van szó, a Gal-1 könnyen kimutatható volt a sejtek felszínéről, Western blottinggal pedig az sejtekben termelt teljes Gal-1 mennyiséget mutattuk ki.



25. ábra: A: A sejtfelszíni Gal-1 jelenlétét áramlási citométerrel, anti-Gal-1 monoklonális ellenanyaggal vizsgáltuk a 16. ábra alatt leírtak szerint. A fekete (nincs TDG), illetve kék (TDG kezelés) görbe az ellenanyag nélküli kontrollt, a zöld vonal sejtfelszíni Gal-1 mennyiségét, a lila görbe a sejtek TDG kezelése után a sejtfelszínen maradt Gal-1 mennyiségét ábrázolja. **B:** hMSC teljes sejtlizátumából anti-Gal-1 monoklonális ellenanyaggal és peroxidázzal kapcsolt anti egér-Ig-nal Western blotting segítségével mutattuk ki a Gal-1-et. Kontrollként tisztított rekombináns Gal-1-et (rGal-1) használtunk.

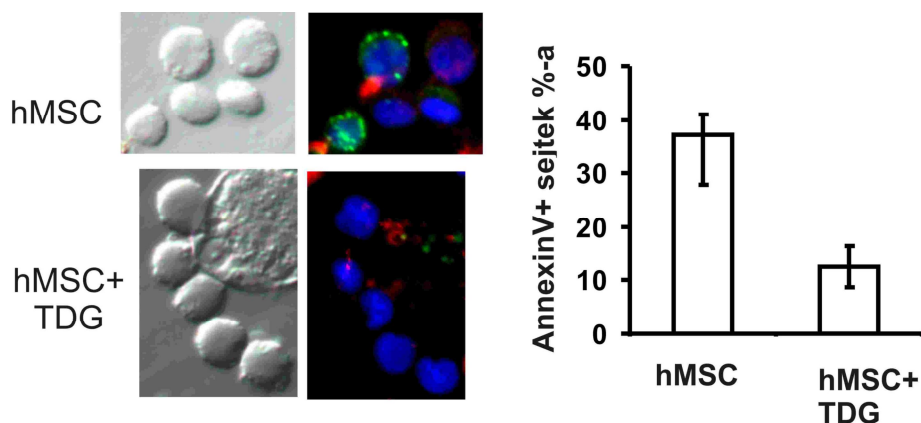
A hMSC-k nagy mennyiségű Gal-1-et termelnek és a fehérje jelentős mértékben szekretálódik, majd visszakötődik az MSC-k felszínére. A sejtek kezelése egy laktóz analóggal, TDG-vel a sejtfelszíni Gal-1 mennyiségének csökkenéséhez vezetett (25.A ábra, lila vonal).

Kokultúrában vizsgáltuk a hMSC-k apoptotikus hatását Jurkat leukémiás Jurkat T sejtvonalon és humán aktT sejttel. A Gal-1 az MSC-kről átragadt T sejt felszínére. Mind a Jurkat, mind pedig az aktT sejteken az AnnexinV kifordulását, apoptózist detektáltunk (26. ábra).

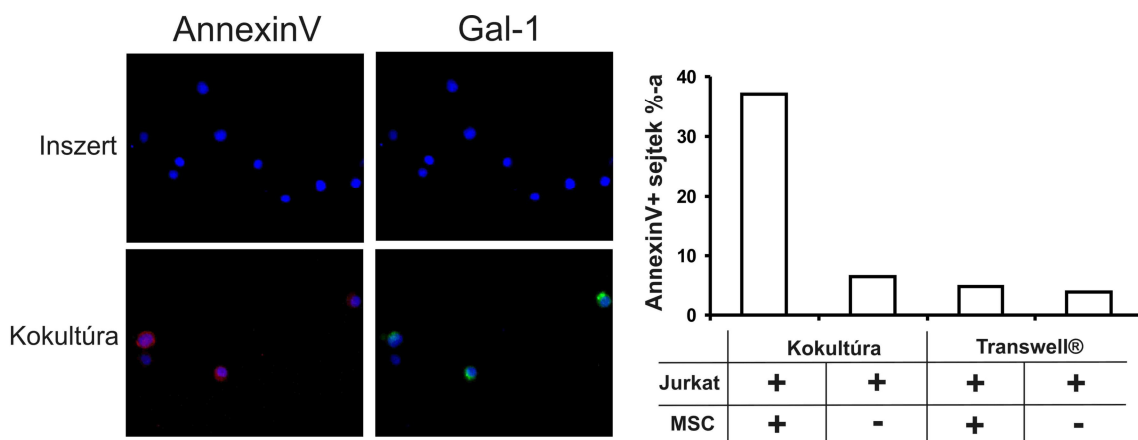


26. ábra: Jurkat vagy PHA-val aktivált perifériás T-sejteket (aktT sejtek) hMSC-vel tartottunk kokultúrában 16 órán keresztül. A kokultúra jelölése és kiértékelése a 15. ábrán leírtak alapján történt.

Mivel a hMSC-k nagy mennyiségű Gal-1-et expresszálnak (25. ábra), valószínűnek találtuk, hogy szerepe lehet az összejtek indukálta T sejthalálban. Hogy ezt megvizsgáljuk, a Gal-1-et TDG-vel eltávolítottuk a hMSC felszínéről és így inkubáltuk őket a T sejtekkel. Azt tapasztaltuk, hogy a sejtfelszíni Gal-1 mennyiségének csökkenésével, csökkent a Jurkat T sejtek apoptózisa (27. ábra).



27. ábra: hMSC sejteket TDG-vel kezeltünk vagy kezeletlenül hagytunk a 19. ábrában említett módon, majd 16 órán keresztül Jurkat sejteket adtunk a kultúrákhoz. A sejt felszíni Gal-1 piros, az apoptotikus sejtek zöld színnel jelennek meg. Az apoptózis detektálása a 15. ábrán leírt módon történt. A grafikonok az apoptotikus sejtek százalékat ábrázolják.



28. ábra: Az MSC és T sejteket Transwell lemezen (felső képek), vagy kokultúrában (alsó képek) tartottuk. A T-sejtek pusztulását Annexin-V-Alexa488-cal történő festéssel fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk a ábra alatt leírtak szerint. A T sejteket Hoechst festékkel jelöltük (kék), a sejt felszíni Gal-1-et anti-Gal-1 ellenanyaggal (piros) mutattuk ki, az apoptotikus sejteket Annexin-V- Alexa488-cal jelöltük a 15. ábra alatt leírtak szerint. Az apoptotikus sejtek arányának változását különböző kezelések esetén, grafikonon ábrázoltuk.

Kokultúrási módszerrel lehetőségünk volt megvizsgálni, hogy a Gal-1 szolúbilis faktorként vagy sejtkötött formában hat-e? A kísérletet Transwell rendszerben végeztük, és megállapítottuk, hogy a közvetlen sejt-sejt kontaktus megakadályozó inszertben levő Jurkat T sejtek viabilitása nem változott, szemben a hMSC és T sejtek kapcsolatát megengedő kokultúrával (28. ábra).

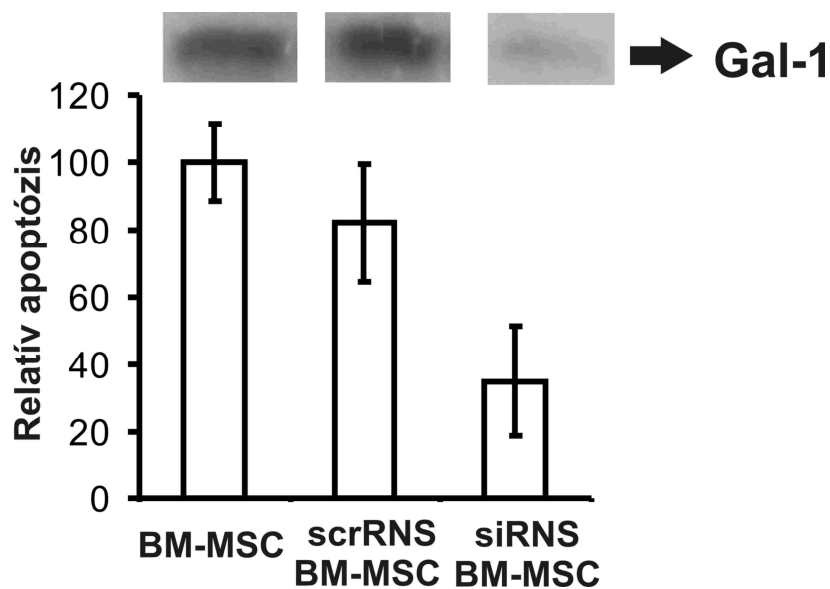
3.2.2. Egér csontvelői MSC (BM-MSC)

A hMSC-k, bár sok utódsejtet képesek létrehozni, nem hallhatatlanok, az életidejük rövid, plaszticitásuk fokozatos csökkenésével végül előregednek. Felhasználhatóságuk kb. 10-12 átoltásig tart. Beszerzésük, fenntarthatóságuk tehát nehézkes, és érzékeny sejtekről lévén szó, transzfektálásuk is skertelen volt. Ezen hátráltató körülmények elkerülése végett vezettük be laboratóriumunkban az egér mesenchymális őssejtek (BM-MSC) használatát, melyből hosszú életű sejt kultúra indítható és fenntartásuk is sokkal egyszerűbb. A Gal-1 termelésük siRNS technikával csökkenthető és a hosszú életidejüknek köszönhetően stabil transzfektált klónok hozhatók létre. Másrészt, a Gal-1 knock out egér is rendelkezésre áll, az ezekből izolált BM-MSCk egyáltalán nem termelnek Gal-1-et, ezzel teljes bizonyítást nyer ennek a fehérjének a szükségessége az apoptózis indukcióban.

3.2.2.1. Gal-1 szerepének vizsgálata az egér MSC-k T sejtekre kifejtett apoptotikus hatásában

A BM-MSC sejtekben termelt Gal-1 szerepét elsőként a humán Jurkat T sejtekre kifejtett citotoxikus hatásában vizsgáltuk. A xenogén, egér-humán rendszer azért alkalmazható a Gal-1 szerepének vizsgálatára, mert a két fajból származó fehérje rendkívül nagymértékű azonosságot mutat (89%) (Wilson et al. 1989) és funkcióját eltérő fajok között is kifejti (Levi et al. 1983; Offner et al. 1990; Rabinovich et al. 1999b; Santucci et al. 2000, 2003; Toscano et al. 2006; Perone et al. 2006). A kísérletekhez olyan genetikailag stabil módon módosított MSC sejteket alkalmaztunk, melyekben a Gal-1 expressziót siRNS-sel csendesítettük. A Gal-1 siRNS-t, illetve a kontroll scrRNS-t (scrambled RNS) kifejező sejteket, a szelekciót és klónozást követően, Western blottinggal (teljes Gal-1 tartalom) jellemeztük (29. ábra). Áramlási citofluorimetriával történő jellemzésre nem volt

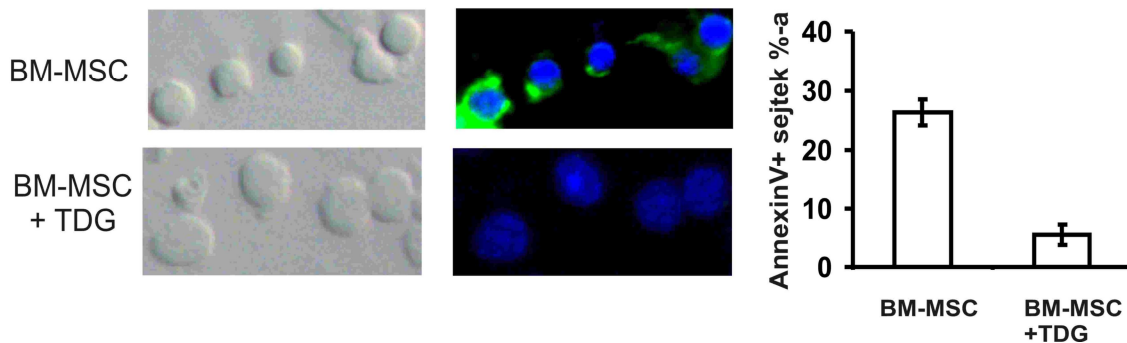
lehetőségünk, ugyanis az egér sejtek felszínéhez kötött Gal-1-et nem ismeri fel a laboratóriumunkban előállított ellenanyag. A scrRNS-t expresszáló sejteken a teljes Gal-1 mennyisége nem változott a nem transzfektált, vad típusú BM-MSC sejtekkel összehasonlítva, míg az siRNS-sel transzfektált sejtek expressziója jelentősen csökkent (29. ábra). Összehasonlítottuk ezen sejtek által kokultúrában indukált Jurkat T sejtek apoptózisának mértékét. Az siRNS-t kifejező BM-MSC sejtek kisebb mértékű T sejt apoptózist okoztak, mint a kezeletlen, vagy scrRNS-t expresszáló sejtek (29. ábra). Ezek az eredmények egyértelműen megmutatták, hogy a galektin-1 központi szerepet játszik a BM-MSC sejtek Jurkat T sejtekre kifejtett citotoxikus hatásában, mivel az MSC-k okozott T sejthalál mértéke összefüggött a BM-MSC által expresszált Gal-1 mennyiségével.



29. ábra: Western blottinggal a 17. ábra alatt leírtak alapján megvizsgáltuk az siRNS technikával csendesített BM-MSC-k Gal-1 szintjét. Kontrollként vad típusú és scrRNS-sel transzfektált BM-MSC-eket használtunk. Az MSC sejtek által kiváltott T sejt apoptózis mértékét MSC-Jurkat sejt kokultúrájában vizsgáltuk a 15. ábránál leírt módon.

3.2.2.2. Aktivált egér T sejtek MSC-kel szembeni érzékenysége az MSC-k Gal-1 expressziójától függ

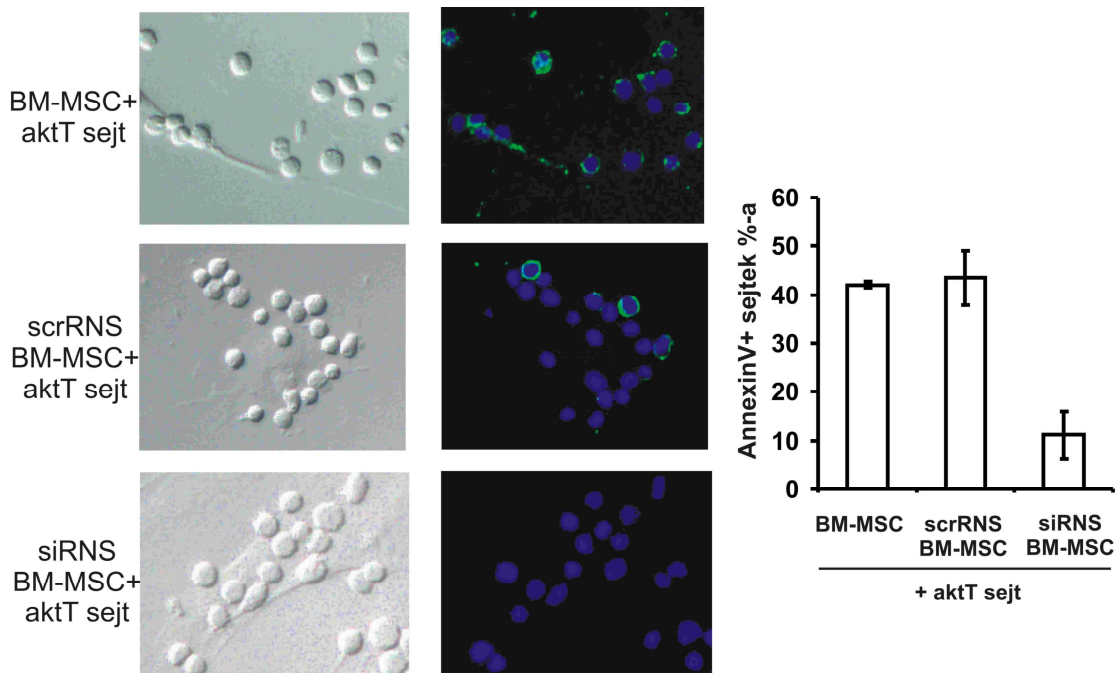
Azért, hogy a fiziológias eseményeket jobban tükröző rendszerben analizálhassuk a fenti kérdést, a továbbiakban target sejként egerből izolált, és *in vitro* aktivált T sejteket alkalmaztunk. Többféle vizsgálattal bizonyítottuk, hogy a BM-MSC termelte Gal-1 kulcsszerepet játszik az összejt aktivált T sejtekre (akt T sejt) gyakorolt citotoxikus hatásában.



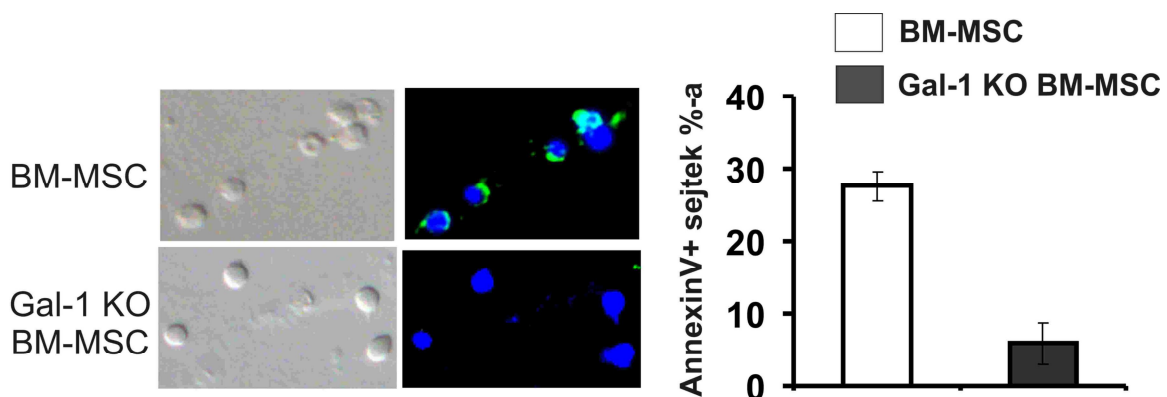
30. ábra: BM-MSC-ket kezeltünk TDG-vel a 19. ábra alatt leírt módon, majd egér aktT sejteken vizsgáltuk a csökkent felszíni Gal-1-et hordozó MSC sejtek apoptózist indukáló képességét, a TDG-vel nem kezelt MSC mintákhoz hasonlítva. A kísérletet és a grafikonon ábrázolt apoptotikus sejtek arányának meghatározását a 15. ábra alatt leírt módon végeztük.

Elsőként a Gal-1 szerepét a sejthalál folyamatában úgy támasztottuk alá, hogy a Gal-1-et TDG-vel eltávolítottuk BM-MSC felszínéről (l. 3.1. fejezet). A sejtfelszíni galektin-1 mennyiségének csökkenése az apoptotikus aktT sejtek számának redukciójához vezetett. (30. ábra). Másodsorban, a Gal-1 funkciójának meghatározásához Gal-1 siRNS-sel csendesített BM-MSC aktT sejtekre gyakorolt citotoxikus hatását vizsgáltuk. A 31. ábra mutatja, hogy a csökkentett Gal-1 termelés a BM-MSC aktT sejt apoptózis indukáló képességének csökkenésével jár. A legfontosabb bizonyíték azonban a Gal-1 szerepére a Gal-1 knock out egerből izolált csontvelői MSC (Gal-1 KO BM-MSC) használata volt. Kokultúrában a Gal-1 KO BM-MSC az aktT sejtek minimális

apoptózisát okozta.(32. ábra) Az indukált T sejt apoptózis mértéke tehát függ a sejtfelszíni Gal-1 mennyiségétől, ami alátámasztja, hogy a sejthalál fő effektor molekulája a Gal-1.



31. ábra: Vad típusú, scrRNS-sel és si RNS-sel transzfektált BM-MSC-eket egér aktT sejtekkel tartottunk kokultúrában és vizsgáltuk az apoptózist indukáló képességüket. A kísérletet a 15. ábra alatt leírt módon végeztük.



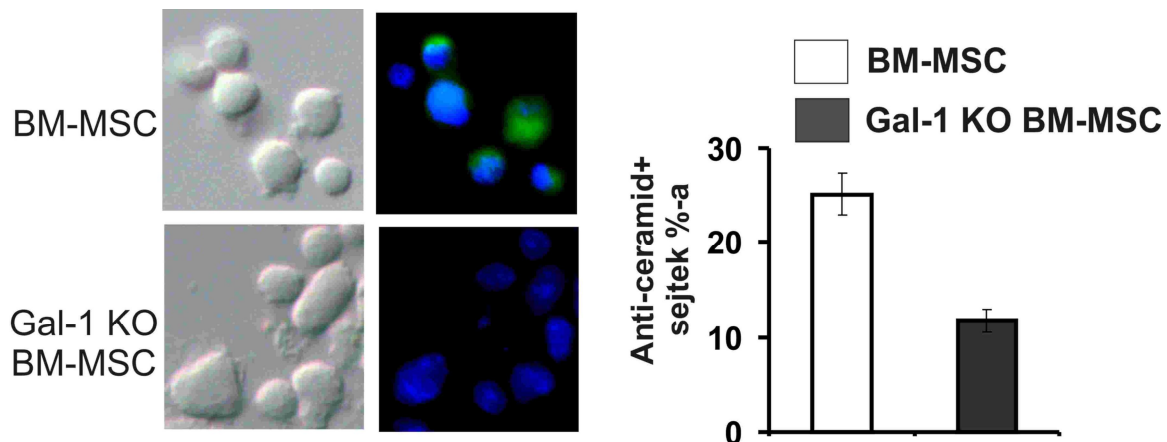
32. ábra: BM-MSC és Gal-1 KO BM-MSC egér aktT sejten okozott sejthalál mértékét hasonlítottuk össze a 15. ábra alatt leírt kokultúrás apoptózis tesztben. A kísérlet számszerű kiértékelését a jobb oldali grafikonon ábrázoltuk.

3.2.2.3. BM-MSc eredetű Gal-1 által indukált apoptózis molekuláris mechanizmusa

A továbbiakban azt vizsgáltuk meg, hogy a fiziológias BM-MSc aktivált T sejtekkel kokultúrában az apoptózisnak ugyanazon lépéseit indukálja-e mint a patológiás tumorosejtek termelte, illetve a szolubilis Gal-1?

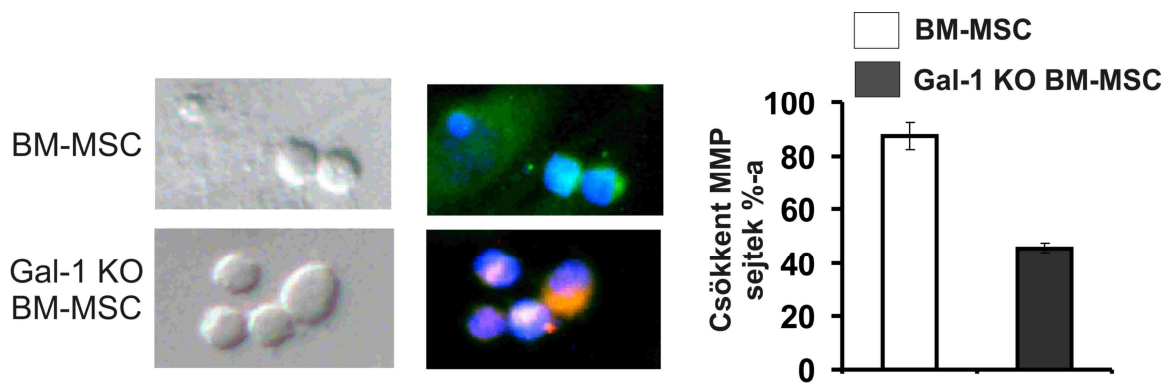
Az PS sejt felszíni megjelenését az apoptózis korai lépéseként tartjuk számon. BM-MSc és aktT sejtek kokultúrájában detektáltunk ilyen elváltozást a T sejteken, míg Gal-1 KO BM-MSc esetében ez a szám minimálisra csökkent. (32. ábra)

Hasonlóan a szolubilis Gal-1 (Ion et al. 2006) és a tumor sejtek által expresszált Gal-1 (3.1.4. fejezet) hatásához, az MSC sejtek is ceramid felszabadulást indukáltak a target aktivált T sejtekben. A Gal-1 hiánya a knock out MSC-kben a ceramid felszabadulás nagymértékű csökkenését okozta. (33. ábra)



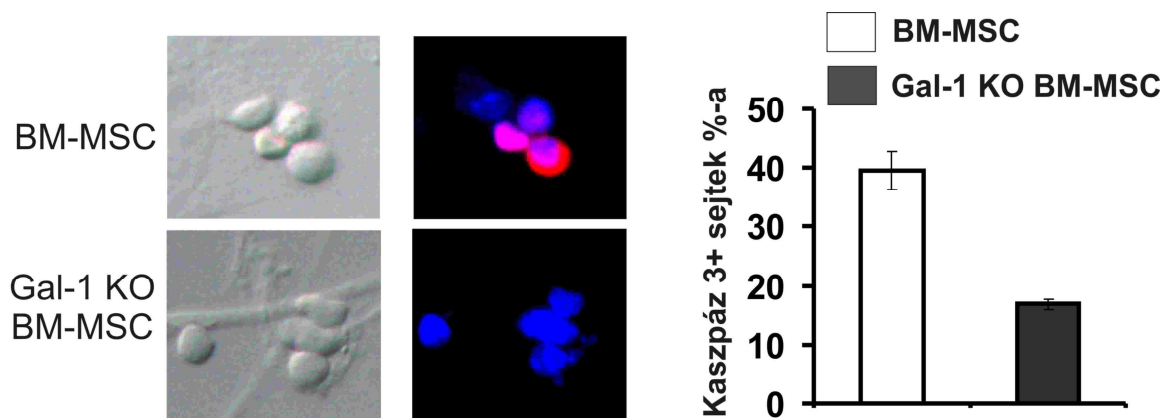
33. ábra: Vad típusú vagy Gal-1 KO BM-MSc-kkel együtt tartott egér aktT sejtekben vizsgáltuk a ceramid felszabadulást a 22. ábra alatt leírt módon. A diagrammon a ceramid pozitív sejteket százalékos mennyiségét ábrázoltuk.

Hasonlóan a rekombináns és tumorok termelte Gal-1-hez, a BM-MSc-k is a mitokondriális membránpotenciál csökkenését okozta az aktivált T sejtekben. Ezzel szemben a Gal-1 deficiens BM-MSc-k a mitokondriális membrán depolarizáció csökkent mértékét váltotta ki (34. ábra)



34. ábra: Vad típusú vagy *Gal-1 KO* BM-MSC által *aktT* sejtekben előidézett MMP csökkenését a 23. ábrán leírtak alapján vizsgáltuk. A grafikonon az oszlopok a csökkent MMP-ú sejtek százalékát jelenítik.

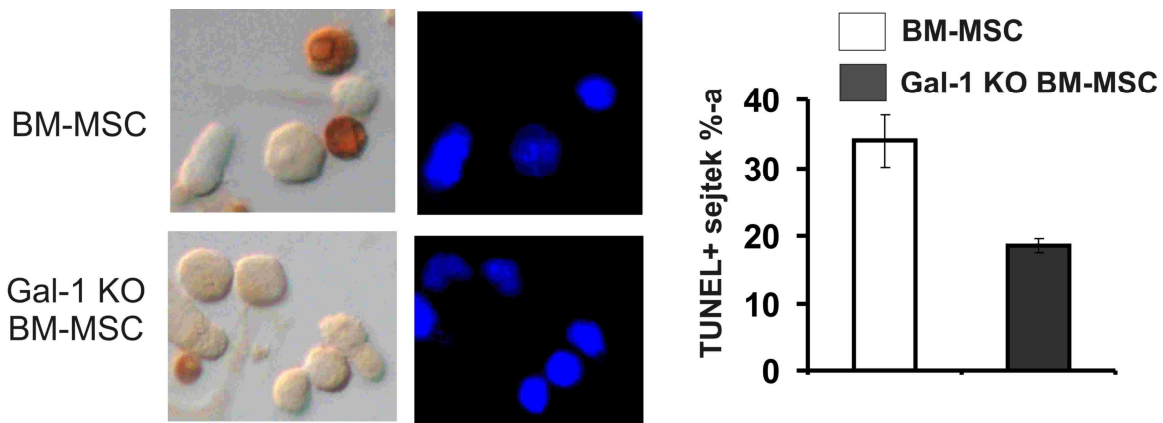
Az effektor kaszpáz 3 szerepét is vizsgáltuk. A *Gal-1* termelő BM-MSC esetében nagymértékű aktivációt tapasztaltunk az *aktT* sejtekben, míg ez a *Gal-1* hiányában, a BM-MSC-vel inkubált *aktT* sejteknél elmaradt. (35. ábra).



35. ábra: Vad típusú, vagy *Gal-1 KO* BM-MSC és egér *aktT* sejtek kokultúrájában az aktív kaszpáz 3 mennyiségét a 24. ábra alatt leírt módon vizsgáltuk. A grafikonon a kaszpáz 3 pozitív sejtek %-át ábrázoltuk.

A szakirodalomban a *Gal-1* indukálta apoptózisról egyesek úgy tartják, hogy PS sejt felszíni expozíció a sejtek fagocitózissal történő eltávolításának a szignálja és nem feltétlenül követik az apoptózis további lépései (Dias-Baruffi et al. 2003; Stowell et al.

2007, 2008, 2009). Az előző alfejezetekben bemutattuk, hogy az aktivált T sejtek a sejthalál következő lépéseit is végigjárják (MMP csökkenés, kaszpáz aktiváció), azonban sok esetben a sejthalál egyértelmű bizonyítékeként a DNS degradáció kimutatását fogadják el. Ezért a citokémiai, mikroszkópos rendszerben is használható TUNEL reakciót, amely a DNS-törések kimutatásán alapul, választottuk a DNS degradáció nyomonkövetésére. Az általunk végzett DNS károsodást kimutató kísérletekkel igazoltuk, hogy a korai PS kifordulás valóban apoptózissal végződik. Kokultúra rendszerben a BM-MS-C-vel tartott aktT sejtek 30-40%-a TUNEL pozitív reakciót mutatott, míg a Gal-1 knock out sejtekkel indukált aktT sejtekben csökkent az apoptózis mértéke (36. ábra).



36. ábra: BM-MS-C vagy Gal-1 KO BM-MS-C-vel együtt tartott aktT sejteken vizsgáltuk az apoptózis végső stádiumát, a DNS degradációt. A fixált, majd permeabilizált mintáinkat DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System Kit-ben javasoltak alapján hajtottuk végre (l. anyagok és módszerek fejezet). A sötétbarna csapadék DNS fragmentáció végbemenetelére, azaz sejthalál kialakulására utal. Az apoptotikus sejtek %-át diagramon ábrázoltuk.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy mind a hMS-C-n és mind pedig a BM-MS-C-n végzett kísérletek végkimenetele és konklúziója azonos.

Diszkusszió

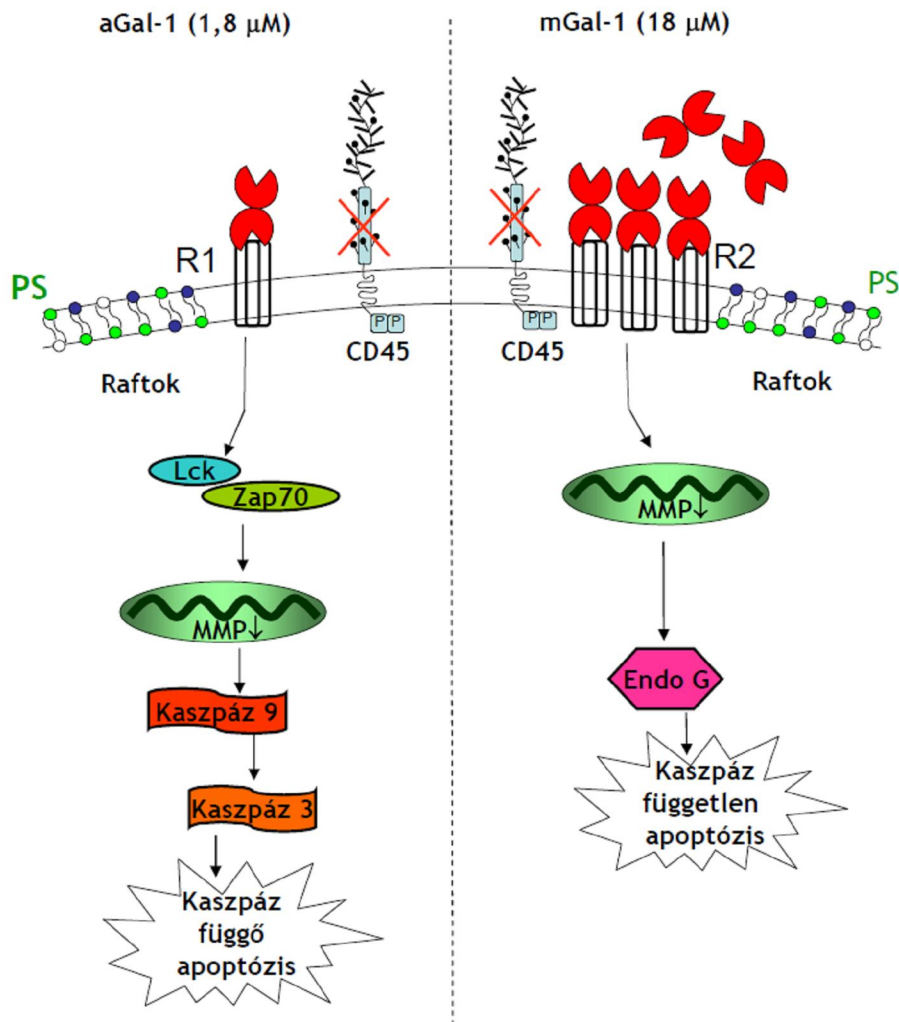
Ismert, hogy a Gal-1 erősen immunszuppresszív fehérje, a szervezetben immunprivilegizált területek fenntartásában játszik szerepet (Dettin et al. 2003; Ishida et al. 2003; Blois et al. 2007). A Gal-1 nagymértékben hozzájárul az immunológiai egyensúly fenntartásához számos fiziológiás és patológias szituációban (Rabinovich & Ilarregui 2009). *In vitro* adatok alátámasztják, hogy a Gal-1 az aktivált T sejtek apoptózisát indukálja (Hahn et al. 2004; Matarrese et al. 2005; Ion et al. 2006; Stowell et al. 2007, 2009; Lange et al. 2009). Az irodalmi adatok elsősorban a rekombináns, oldatban alkalmazott Gal-1 citotoxikus hatásáról számolnak be. A Gal-1 indukálta T sejt apoptózis mechanizmusát illetően azonban lényegesen különböző nézetek alakultak ki az egyes munkacsoportokban. E mellett az apoptózis szignált közvetítő receptort a mai napig sem sikerült azonosítani.

Eleinte a CD45 tirozin foszfatázt írták le a Gal-1 egyik lehetséges receptorának (Perillo et al. 1995; Walzel et al. 1999; Pang et al. 2009), míg más szakirodalmi adatok szerint az apoptózis szignált nem a CD45 közvetíti a sejtekbe (Pace et al. 2000; Nguyen et al. 2001; Fajka-Boja et al. 2002). Számos tanulmány szerint a Gal-1 indukálta apoptózis mitokondrium mediálta kaspáz függő úton vonalon halad (Sturm et al. 2004; Ion et al. 2005, 2006; Lange et al. 2009), míg egyes kutatók szerint a Gal-1 stimuláció kaspáz független apoptózist indít be: a mitokondrium depolarizációját a mérések szerint nem kíséri mitokondriális citokróm C felszabadulása, vagy a kaspázok aktiválódása, hanem az endonukleáz G felelős a DNS degradációért (Hahn et al. 2004). Mi több, Stowell és mtsai úgy tartják, hogy a Gal-1 hatására a fehérvérsejtek felszínén megjelenő PS csupán felkészíti, fagocitálhatóvá teszi a makrofágok számára, anélkül, hogy apoptózist indukálna ezeken a sejteken (Dias-Baruffi et al. 2003; Stowell et al. 2007, 2008, 2009). Laboratóriumunkban végzett kísérletek alapján mi is részletesen meghatároztuk és felállítottuk a rekombináns Gal-1 indukálta T sejt apoptózis molekuláris mechanizmusát. A Gal-1 kötődése a target sejt felszínéhez valószínűleg a membrán mikrodomainek átszerveződését és a feltételezett specifikus receptor oligomerizációját idézi elő, ami a target sejtben elindítja az apoptotikus kaszkádot. Az

intracelluláris p56^{lck} és ZAP70 aktiválódása tirozin-foszforilációt eredményez, aminek következtében foszforilálódik többek közt a savas szfingomielináz is. Az aktivált enzim hasítja a szfingomielint, ennek eredményeképpen ceramid szabadul fel, ami ebben az esetben másodlagos jelátvivőként működik. A mitokondrium membránjának depolarizációját idézi elő, így a citokróm c kiszabadulhat a mitokondrium intermembrán teréből. A citokróm c az Apaf-1 fehérjével és a kaszpáz 9-cel, apoptoszómát képezve, a kaszpáz 9 aktiválását segíti. A kaszpáz kaszkád utolsó lépéseként az effektor kaszpáz 3 aktiválódik, ami után a sejt fehérjéinek és DNS-ének degradációja következik (Ion et al. 2005, 2006).

Az eltérések kulcsa nagy valószínűséggel a kísérletekben alkalmazott szolubilis, rekombináns Gal-1 (rGal-1) különböző koncentrációjában rejlik. Laboratóriumunkban a Gal-1 indukálta apoptózis mechanizmusának feltárásához 1,8 μ M rGal-1-et használtunk (Fajka-Boja et al. 2002; Ion et al. 2005, 2006), míg más munkacsoportok ennek a mennyiségnek akár tízszeresét, 20 μ M-t is alkalmazták vizsgálataikhoz (Pace et al. 2000; Stowell et al. 2008; Pang et al. 2009). Hogy összevethessük a rendszereket, két koncentráció tartományt határoztunk meg. Mivel a Gal-1 disszociációs állandója 7 μ M (Cho & Cummings 1995), ezért a 7 μ M alatti értékeket alacsonynak, a 7 μ M felettieket pedig magasnak vettük. Kiderült, hogy a Gal-1 indukálta apoptózis mechanizmusára vonatkozó kutatások zöme magas, 7 μ M feletti koncentrációt alkalmazott (Perillo et al. 1995; Pace et al. 2000; Nguyen et al. 2001; Hahn et al. 2004; Stowell et al. 2007, 2009; Karmakar et al. 2008; Pang et al. 2009; Lange et al. 2009). Összehasonlító kísérleteinket ezért alacsony koncentrációként, 1,8 μ M és magas koncentrációként, 18 μ M rGal-1-gyel végeztük Jurkat T sejteken. Eredményeink a várakozásnak megfelelően alakultak. 1,8 μ M rGal-1-gyel indukált apoptózis mitokondrium mediálta ceramid és kaszpáz függő mechanizmussal zajlik le (Ion et al. 2006) (37. ábra). Egyidőben eredményeink közlésével Matarrese és mtsai is hasonló adatokat publikáltak, ők 0.64 μ M rGal-1-et használtak a T-sejt apoptózis indukációjához (Matarrese et al. 2005). Stowell és mtsai 20 μ M (Stowell et al. 2008), illetve 10 μ M rGal-1-et (Stowell et al. 2009) alkalmazva azt találták, hogy a Gal-1 a PS sejtfelszíni expozícióját indukálja, melyet nem követnek az apoptózis további lépései. Ezzel ellentétben a mi eredményeink azt igazolták, hogy koncentrációtól függetlenül, a szolubilis, vagy a sejt eredetű Gal-1 az apoptózis késői

lépéseit és így a teljes sejthalált is indukálják. Hahn és mtsai kísérleteikhez 14 μM rGal-1-et használtak, hozzájuk hasonlóan magas koncentráció alkalmazásakor mi is kaspáz független apoptózist detektáltunk (Hahn et al. 2004) (37. ábra). Ezek az eredmények rávilágítanak arra, hogy a Gal-1, valószínűleg más receptorokon hatva, koncentrációtól függően az apoptózis eltérő útvonalait stimulálja. Emellett, a kapott eredményeket befolyásolhatja a rGal-1 előállítása, a termeltetése és a tisztítása a különböző laboratóriumokban.



37. ábra: A magas és alacsony koncentrációjú Gal-1 indukálta apoptózis mechanizmusa

A rekombináns Gal-1 előállítása során nagy mennyiségű redukálószerrel használnak annak érdekében, hogy az oxidációra hajlamos fehérje megtartsa biológiai aktivitását. A

redukálószeres magas koncentrációja azonban önmagában is toxikus a Gal-1 targetként használt T-sejtekre (nem publikált saját adat). Ezért kísérleteinkben olyan redukáló szer koncentrációt használtunk, mely nem csökkentette a T-sejt életképességet és a kontroll mintákban is jelen volt a vizsgált mintákkal azonos mennyiségben. A Gal-1, tisztítás során bekövetkező, oxidációjának elkerülésére és a fehérje stabilizálására sok esetben alkiláló szereket is használnak, ezzel kovalens módosításokat hoznak létre fehérjén. Ráadásul a rGal-1, magas koncentrációjú oldatban előszeretettel aggregálódik, még inkább összezsapja a sejtfelszíni glikozilált struktúrákat, és ilyen formában akár módosíthatja a fehérje eredeti hatását. A fent leírtakból következik, hogy a szolubilis Gal-1-gyel végzett munka során kapott eredmények sok műtermékhez és fals adatokhoz vezethetnek. A Gal-1 valóságos hatásának megismeréséhez azt is figyelembe kell venni, hogy a Gal-1 fiziológiás körülmények között nem fordul elő szolubilis formában, hiszen a fehérjét szekretáló sejtek, a szomszédos sejtek, vagy az extracelluláris mátrix Gal-1 kötő fehérjéi nagy affinitással magukhoz kötik. A Gal-1 szérumban detektálható szintje patológiás szituációban is mindössze 13 ng/ml, egészséges egyénben pedig még ennél is elenyészőbb (Saussez et al. 2008). Ilyen kis mennyiségű szolubilis fehérje azonban még nem elégséges a T sejtek apoptózisának beindításához. He és Baum közleményében leírja, hogy a szilárd fázishoz (az ECM-et modellező fehérjekeverékhez) kötött Gal-1 T sejt apoptózist indukál (He & Baum 2004). Ez a rendszer már jobban közelít az *in vivo* állapothoz, ezért mi, a Gal-1 T sejtekre kifejtett citotoxikus hatásának vizsgálatához egy új módszert dolgoztunk ki. A modellben a Gal-1-et termelő sejteket T sejtekkel (aktivált vagy Jurkat T sejtekkel) tartottunk kokultúrában és vizsgáltuk a Gal-1 T sejt apoptózist indukáló képességét. A részletes vizsgálatokat követően megállapítottuk, hogy a humán tumor sejt eredetű Gal-1 hasonló molekuláris útvonalon indukál T sejt apoptózist, mint az alacsony koncentrációjú rekombináns fehérje. A tumor sejtek a velük együtt tartott T sejteken raft átrendeződést és PS kifordulását okozzák. A tumor sejtek termelte Gal-1 apoptózis indukációjához szintén szükséges a kinázok jelenléte, hiszen a hiányos Jurkat sejtek nem válaszolnak apoptózissal. Az rGal-1 indukálta T sejt apoptózis egyik központi molekulája a ceramid, és ennek megfelelően a melanóma sejtek is ceramid felszabadulását indukálják a T sejteken. Az rGal-1 az MMP csökkenését is okozza, ugyanezt tapasztaltuk a Gal-1 termelő tumorok használatakor is. Az effektor kaspáz 3

szerepét is igazoltuk, mivel a Gal-1 termelő tumor sejtek nagymértékű kaszpáz aktivációt idéznek elő a velük együttartatott T sejtekben. (I. táblázat)

Ez a kokultúra rendszer jól reprezentálja a pathológiás *in vivo* állapotokat, így joggal feltételezzük, hogy a folyamat *in vivo* körülmények között is hasonlóképpen játszódik le. Eredményink azt jelzik, hogy a tumor sejtek által termelt Gal-1 szerepet játszik a tumor specifikus immunválasz gátlásában az aktivált T sejtek apoptózisának indukciója révén.

	aGal-1	mGal-1	Sejtkötött Gal-1
Raftképződés	+	+	+
PS kiorulás	+	+	+
CD45 jelenléte	-	↓	n.a.
Lck és ZAP70 aktivitás	+	-	+
Ceramid	+	n.a.	+
MMP csökkenés	+	+	+
Kaspáz aktivitás	+	-	+
DNS degradáció	+	+	+

I. táblázat: Az aGal-1, mGal-1 és a sejteredetű Gal-1 apoptotikus hatásmechanizmusának összehasonlítása (+:szükséges az apoptózis korrekt lefolyásához, -: nem szükséges, nyíl: csökken az apoptózis mértéke, na: nincs adat)

A kokultúra rendszerben először Gal-1 termelő tumor sejteket használtunk, de ez felvette azt a kérdést, hogy vajon pathológiás és fiziológiás körülmények között is szerepet játszik-e a sejtek által termelt Gal-1 az immunszuppresszióban? A Gal-1 fiziológiás hatásának vizsgálatához tumor sejtek alkalmazása modellként, nem túl

szerencsés választás, ugyanis számos gén, ahogy a Gal-1 génje is, a tumoros transzformáció során aktiválódhat, vagy a működése fokozódhat. Az egészséges melanociták például nem expresszálják, míg melanóma sejtekben a fehérje nagy mennyiségben jelen van. Egérkísérletek igazolják, hogy a B16 melanóma progresszivitásának meghatározásában a Gal-1-nek kulcsfontosságú szerepe van (Mathieu et al. 2007). A fiziológiás sejtek modelljeként egér MSC használatát vezettük be, hogy ez a rendszer hűen tükrözze az *in vivo* állapotokat. A kokultúrában target sejtként aktivált egér T sejteket alkalmaztunk. A Gal-1 szerepének vizsgálatát az is könnyítette, hogy rendelkezésünkre álltak Gal-1 KO BM-MSC-k melyek bizonyítottan nem termelnek Gal-1-et. Így ezekben a kísérletekben kapott eredményeket egyértelműen a Gal-1 hatásának tudhattuk be. Eredményeink szerint a fiziológiás sejtek által termelt Gal-1 az aktivált T sejtek apoptózisát az alacsony koncentrációjú rGal-1-hez és tumor sejt eredetű Gal-1-hez hasonló útvonalon indukálja (37. ábra).

Irodalomjegyzék

- Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**: 1815-1822.
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G. & Fais, S. (2002) Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *The Journal of Experimental Medicine* **195**: 1303-1316.
- Anjos-Afonso, F., Siapati, E. K. & Bonnet, D. (2004) In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *Journal of Cell Science* **117**: 5655-5664.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)* **281**: 1305-1308.
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Cancedda, R. & Pennesi, G. (2007) Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **56**: 1175-1186.
- Baatar, D., Olkhanud, P. B., Wells, V., Indig, F. E., Mallucci, L. & Biragyn, A. (2009) Tregs utilize beta-galactoside-binding protein to transiently inhibit PI3K/p21ras activity of human CD8+ T cells to block their TCR-mediated ERK activity and proliferation. *Brain, Behavior, and Immunity* **23**: 1028-1037.
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A. & Hoffman, R. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology* **30**: 42-48.
- Blank, C., Gajewski, T. F. & Mackensen, A. (2005) Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* **54**: 307-314.
- Blaser, C., Kaufmann, M., Müller, C., Zimmermann, C., Wells, V., Mallucci, L. & Pircher, H. (1998) Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *European Journal of Immunology* **28**: 2311-2319.
- Blois, S. M., Ilarregui, J. M., Tometten, M., Garcia, M., Orsal, A. S., Cordo-Russo, R.,

- Toscano, M. A., Bianco, G. A., Kobelt, P., Handjiski, B., Tirado, I., Markert, U. R., Klapp, B. F., Poirier, F., Szekeres-Bartho, J., Rabinovich, G. A. & Arck, P. C. (2007) A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nature Medicine* **13**: 1450-1457.
- Brandt, B., Büchse, T., Abou-Eladab, E. F., Tiedge, M., Krause, E., Jeschke, U. & Walzel, H. (2008) Galectin-1 induced activation of the apoptotic death-receptor pathway in human Jurkat T lymphocytes. *Histochemistry and Cell Biology* **129**: 599-609.
- van den Brûle, F., Califice, S., Garnier, F., Fernandez, P. L., Berchuck, A. & Castronovo, V. (2003) Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* **83**: 377-386.
- Camby, I., Belot, N., Lefranc, F., Sadeghi, N., de Launoit, Y., Kaltner, H., Musette, S., Darro, F., Danguy, A., Salmon, I., Gabius, H. & Kiss, R. (2002) Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **61**: 585-596.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* **25**: 2739-2749.
- Chen, F. H. & Tuan, R. S. (2008) Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Research & Therapy* **10**: 223.
- Cho, M. & Cummings, R. D. (1995) Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 5198-5206.
- Clausse, N., van den Brûle, F., Waltregny, D., Garnier, F. & Castronovo, V. (1999) Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. *Angiogenesis* **3**: 317-325.
- Cooper, D. N. & Barondes, S. H. (1990) Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *The Journal of Cell Biology* **110**: 1681-1691.
- Cooper, D., Norling, L. V. & Perretti, M. (2008) Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. *Journal of Leukocyte Biology* **83**: 1459-1466.

- Correa, S. G., Sotomayor, C. E., Aoki, M. P., Maldonado, C. A. & Rabinovich, G. A. (2003) Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology* **13**: 119-128.
- Croci, D. O., Zacarías Fluck, M. F., Rico, M. J., Matar, P., Rabinovich, G. A. & Scharovsky, O. G. (2007) Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* **56**: 1687-1700.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L. & Zou, W. (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* **10**: 942-949.
- Darogui, C. M., Ilarregui, J. M., Rubinstein, N., Salatino, M., Toscano, M. A., Vazquez, P., Bakin, A., Puricelli, L., Bal de Kier Joffé, E. & Rabinovich, G. A. (2007) Regulation of galectin-1 expression by transforming growth factor beta1 in metastatic mammary adenocarcinoma cells: implications for tumor-immune escape. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* **56**: 491-499.
- Delbrouck, C., Doyen, I., Belot, N., Decaestecker, C., Ghanooni, R., de Lavareille, A., Kaltner, H., Choufani, G., Danguy, A., Vandenhoven, G., Gabius, H., Hassid, S. & Kiss, R. (2002) Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* **82**: 147-158.
- Dettin, L., Rubinstein, N., Aoki, A., Rabinovich, G. A. & Maldonado, C. A. (2003) Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis. *Biology of Reproduction* **68**: 51-59.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S. & Gianni, A. M. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**: 3838-3843.
- Dias-Baruffi, M., Zhu, H., Cho, M., Karmakar, S., McEver, R. P. & Cummings, R. D. (2003) Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 41282-41293.
- Djouad, F., Fritz, V., Apparailly, F., Louis-Plence, P., Bony, C., Sany, J., Jorgensen, C. & Noël, D. (2005) Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal

- stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **52**: 1595-1603.
- Drake, C. G., Jaffee, E. & Pardoll, D. M. (2006) Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in Immunology* **90**: 51-81.
- Elola, M. T., Wolfenstein-Todel, C., Troncoso, M. F., Vasta, G. R. & Rabinovich, G. A. (2007) Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **64**: 1679-1700.
- English, K., Barry, F. P., Field-Corbett, C. P. & Mahon, B. P. (2007) IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology Letters* **110**: 91-100.
- Erices, A., Conget, P. & Minguell, J. J. (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology* **109**: 235-242.
- Fajka-Boja, R., Szemes, M., Ion, G., Légrádi, A., Caron, M. & Monostori, E. (2002) Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. *Immunology Letters* **82**: 149-154.
- Fouillit, M., Joubert-Caron, R., Poirier, F., Bourin, P., Monostori, E., Levi-Strauss, M., Raphael, M., Bladier, D. & Caron, M. (2000) Regulation of CD45-induced signaling by galectin-1 in Burkitt lymphoma B cells. *Glycobiology* **10**: 413-419.
- Fouillit, M., Lévi-Strauss, M., Giudicelli, V., Lutomski, D., Bladier, D., Caron, M. & Joubert-Caron, R. (1998) Affinity purification and characterization of recombinant human galectin-1. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* **706**: 167-171.
- Gandhi, M. K., Moll, G., Smith, C., Dua, U., Lambley, E., Ramuz, O., Gill, D., Marlton, P., Seymour, J. F. & Khanna, R. (2007) Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* **110**: 1326-1329.
- Gao, J., Dennis, J. E., Muzic, R. F., Lundberg, M. & Caplan, A. I. (2001) The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells, Tissues, Organs* **169**: 12-20.
- Garín, M. I., Chu, C., Golshayan, D., Cernuda-Morollón, E., Wait, R. & Lechler, R. I. (2007) Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* **109**: 2058-2065.
- Gerdoni, E., Gallo, B., Casazza, S., Musio, S., Bonanni, I., Pedemonte, E., Mantegazza, R., Frassoni, F., Mancardi, G., Pedotti, R. & Uccelli, A. (2007) Mesenchymal

- stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of Neurology* **61**: 219-227.
- Gieseke, F., Böhringer, J., Bussolari, R., Dominici, M., Handgretinger, R. & Müller, I. (2010) Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood* **116**: 3770-3779.
- Giordanengo, L., Gea, S., Barbieri, G. & Rabinovich, G. A. (2001) Anti-galectin-1 autoantibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection: differential expression of this beta-galactoside-binding protein in cardiac Chagas' disease. *Clinical and Experimental Immunology* **124**: 266-273.
- Giovarelli, M., Musiani, P., Garotta, G., Ebner, R., Di Carlo, E., Kim, Y., Cappello, P., Rigamonti, L., Bernabei, P., Novelli, F., Modesti, A., Coletti, A., Ferrie, A. K., Lollini, P. L., Ruben, S., Salcedo, T. & Forni, G. (1999) A "stealth effect": adenocarcinoma cells engineered to express TRAIL elude tumor-specific and allogeneic T cell reactions. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **163**: 4886-4893.
- Glinsky, V. V., Huflejt, M. E., Glinsky, G. V., Deutscher, S. L. & Quinn, T. P. (2000) Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells. *Cancer Research* **60**: 2584-2588.
- Green, D. R. (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**: 671-674.
- Gu, M., Wang, W., Song, W. K., Cooper, D. N. & Kaufman, S. J. (1994) Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. *Journal of Cell Science* **107** (Pt 1): 175-181.
- Hahn, H. P., Pang, M., He, J., Hernandez, J. D., Yang, R., Li, L. Y., Wang, X., Liu, F. & Baum, L. G. (2004) Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in caspase- and cytochrome c-independent T cell death. *Cell Death and Differentiation* **11**: 1277-1286.
- Harjacek, M., Diaz-Cano, S., De Miguel, M., Wolfe, H., Maldonado, C. A. & Rabinovich, G. A. (2001) Expression of galectins-1 and -3 correlates with defective mononuclear cell apoptosis in patients with juvenile idiopathic arthritis. *The Journal of Rheumatology* **28**: 1914-1922.
- He, J. & Baum, L. G. (2004) Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 4705-4712.
- He, J. & Baum, L. G. (2006) Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. *Laboratory Investigation; a*

- Hegyi, B., Sági, B., Kovács, J., Kiss, J., Urbán, V. S., Mészáros, G., Monostori, E. & Uher, F. (2010) Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *International Immunology* **22**: 551-559.
- Horie, H., Inagaki, Y., Sohma, Y., Nozawa, R., Okawa, K., Hasegawa, M., Muramatsu, N., Kawano, H., Horie, M., Koyama, H., Sakai, I., Takeshita, K., Kowada, Y., Takano, M. & Kadoya, T. (1999) Galectin-1 regulates initial axonal growth in peripheral nerves after axotomy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **19**: 9964-9974.
- Ion, G., Fajka-Boja, R., Tóth, G. K., Caron, M. & Monostori, E. (2005) Role of p56lck and ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in galectin-1-induced cell death. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1145-1147.
- Ion, G., Fajka-Boja, R., Kovács, F., Szebeni, G., Gombos, I., Czibula, A., Matkó, J. & Monostori, E. (2006) Acid sphingomyelinase mediated release of ceramide is essential to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1. *Cellular Signalling* **18**: 1887-1896.
- Ishida, K., Panjwani, N., Cao, Z. & Streilein, J. W. (2003) Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocular Immunology and Inflammation* **11**: 91-105.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal* **11**: 3887-3895.
- Jin, Z. & El-Deiry, W. S. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy* **4**: 139-163.
- Juszczynski, P., Ouyang, J., Monti, S., Rodig, S. J., Takeyama, K., Abramson, J., Chen, W., Kutok, J. L., Rabinovich, G. A. & Shipp, M. A. (2007) The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 13134-13139.
- Kadri, T., Lataillade, J., Doucet, C., Marie, A., Ernou, I., Bourin, P., Joubert-Caron, R., Caron, M. & Lutonski, D. (2005) Proteomic study of Galectin-1 expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* **14**: 204-212.
- Karimi, K. & Arck, P. C. (2010) Natural Killer cells: keepers of pregnancy in the turnstile of the environment. *Brain, Behavior, and Immunity* **24**: 339-347.

- Karmakar, S., Stowell, S. R., Cummings, R. D. & McEver, R. P. (2008) Galectin-1 signaling in leukocytes requires expression of complex-type N-glycans. *Glycobiology* **18**: 770-778.
- Kiss, J., Kunstár, A., Fajka-Boja, R., Dudics, V., Tóvári, J., Légrádi, A., Monostori, E. & Uher, F. (2007) A novel anti-inflammatory function of human galectin-1: inhibition of hematopoietic progenitor cell mobilization. *Experimental Hematology* **35**: 305-313.
- Kopcow, H. D., Rosetti, F., Leung, Y., Allan, D. S. J., Kutok, J. L. & Strominger, J. L. (2008) T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 18472-18477.
- Korman, A. J., Peggs, K. S. & Allison, J. P. (2006) Checkpoint blockade in cancer immunotherapy. *Advances in Immunology* **90**: 297-339.
- La, M., Cao, T. V., Cerchiaro, G., Chilton, K., Hirabayashi, J., Kasai, K., Oliani, S. M., Chernajovsky, Y. & Perretti, M. (2003) A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. *The American Journal of Pathology* **163**: 1505-1515.
- Lange, F., Brandt, B., Tiedge, M., Jonas, L., Jeschke, U., Pöhland, R. & Walzel, H. (2009) Galectin-1 induced activation of the mitochondrial apoptotic pathway: evidence for a connection between death-receptor and mitochondrial pathways in human Jurkat T lymphocytes. *Histochemistry and Cell Biology* **132**: 211-223.
- Le Blanc, K. & Ringdén, O. (2006) Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Current Opinion in Immunology* **18**: 586-591.
- Le, Q., Shi, G., Cao, H., Nelson, D. W., Wang, Y., Chen, E. Y., Zhao, S., Kong, C., Richardson, D., O'Byrne, K. J., Giaccia, A. J. & Koong, A. C. (2005) Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**: 8932-8941.
- Lee, R. H., Seo, M. J., Reger, R. L., Spees, J. L., Pulin, A. A., Olson, S. D. & Prockop, D. J. (2006) Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 17438-17443.
- van der Leij, J., van den Berg, A., Harms, G., Eschbach, H., Vos, H., Zwiers, P., van Weeghel, R., Groen, H., Poppema, S. & Visser, L. (2007) Strongly enhanced IL-

- 10 production using stable galectin-1 homodimers. *Molecular Immunology* **44**: 506-513.
- Lepelletier, Y., Lecourt, S., Renand, A., Arnulf, B., Vanneaux, V., Femand, J., Menasché, P., Domet, T., Marolleau, J., Hermine, O. & Larghero, J. (2010) Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells and Development* **19**: 1075-1079.
- Levi, G., Tarrab-Hazdai, R. & Teichberg, V. I. (1983) Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits. *European Journal of Immunology* **13**: 500-507.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. L. & Flavell, R. A. (2006) Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology* **24**: 99-146.
- Liu, F. & Rabinovich, G. A. (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews. Cancer* **5**: 29-41.
- Lu, Y., Lotan, D. & Lotan, R. (2000) Differential regulation of constitutive and retinoic acid-induced galectin-1 gene transcription in murine embryonal carcinoma and myoblastic cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1491**: 13-19.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**: 481-490.
- Malik, R. K. J., Ghurye, R. R., Lawrence-Watt, D. J. & Stewart, H. J. S. (2009) Galectin-1 stimulates monocyte chemotaxis via the p44/42 MAP kinase pathway and a pertussis toxin-sensitive pathway. *Glycobiology* **19**: 1402-1407.
- Matarrese, P., Tinari, A., Mormone, E., Bianco, G. A., Toscano, M. A., Ascione, B., Rabinovich, G. A. & Malorni, W. (2005) Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 6969-6985.
- Mathieu, V., Le Mercier, M., De Neve, N., Sauvage, S., Gras, T., Roland, I., Lefranc, F. & Kiss, R. (2007) Galectin-1 knockdown increases sensitivity to temozolomide in a B16F10 mouse metastatic melanoma model. *The Journal of Investigative Dermatology* **127**: 2399-2410.

- McGraw, J., Gaudet, A. D., Oschipok, L. W., Kadoya, T., Horie, H., Steeves, J. D., Tetzlaff, W. & Ramer, M. S. (2005) Regulation of neuronal and glial galectin-1 expression by peripheral and central axotomy of rat primary afferent neurons. *Experimental Neurology* **195**: 103-114.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W. & Dilloo, D. (2004) Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **103**: 4619-4621.
- Mellor, A. L. & Munn, D. H. (2000) Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annual Review of Immunology* **18**: 367-391.
- Moiseeva, E. P., Williams, B., Goodall, A. H. & Samani, N. J. (2003) Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **310**: 1010-1016.
- Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C. & Mellor, A. L. (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science (New York, N.Y.)* **281**: 1191-1193.
- Nauta, A. J. & Fibbe, W. E. (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **110**: 3499-3506.
- Nguyen, J. T., Evans, D. P., Galvan, M., Pace, K. E., Leitenberg, D., Bui, T. N. & Baum, L. G. (2001) CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **167**: 5697-5707.
- Norling, L. V., Sampaio, A. L. F., Cooper, D. & Perretti, M. (2008) Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**: 682-690.
- Offner, H., Celnik, B., Bringman, T. S., Casentini-Borocz, D., Nedwin, G. E. & Vandenbark, A. A. (1990) Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* **28**: 177-184.
- Pace, K. E., Hahn, H. P., Pang, M., Nguyen, J. T. & Baum, L. G. (2000) CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **165**: 2331-2334.
- Pang, M., He, J., Johnson, P. & Baum, L. G. (2009) CD45-mediated fodrin cleavage during galectin-1 T cell death promotes phagocytic clearance of dying cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **182**: 7001-7008.

- Perez, V. L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X. X., Strom, T. B. & Abbas, A. K. (1997) Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* **6**: 411-417.
- Perillo, N. L., Marcus, M. E. & Baum, L. G. (1998) Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* **76**: 402-412.
- Perillo, N. L., Pace, K. E., Seilhamer, J. J. & Baum, L. G. (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* **378**: 736-739.
- Perone, M. J., Bertera, S., Shufesky, W. J., Divito, S. J., Montecalvo, A., Mathers, A. R., Larregina, A. T., Pang, M., Seth, N., Wucherpennig, K. W., Trucco, M., Baum, L. G. & Morelli, A. E. (2009) Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **182**: 2641-2653.
- Perone, M. J., Bertera, S., Tawadrous, Z. S., Shufesky, W. J., Piganelli, J. D., Baum, L. G., Trucco, M. & Morelli, A. E. (2006) Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **177**: 5278-5289.
- Pettus, B. J., Chalfant, C. E. & Hannun, Y. A. (2002) Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1585**: 114-125.
- Prindull, G. (1995) Apoptosis in the embryo and tumorigenesis. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* **31A**: 116-123.
- Raabe, E. H., Yoshida, K. & Schwarting, G. A. (1997) Differential laminin isoform expression in the developing rat olfactory system. *Brain Research. Developmental Brain Research* **101**: 187-196.
- Rabinovich, G. A. (2005) Galectin-1 as a potential cancer target. *British Journal of Cancer* **92**: 1188-1192.
- Rabinovich, G. A., Ariel, A., Hershkovich, R., Hirabayashi, J., Kasai, K. I. & Lider, O. (1999a) Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* **97**: 100-106.
- Rabinovich, G. A., Daly, G., Dreja, H., Taylor, H., Riera, C. M., Hirabayashi, J. & Chernajovsky, Y. (1999b) Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* **190**: 385-398.
- Rabinovich, G. A., Iglesias, M. M., Modesti, N. M., Castagna, L. F., Wolfenstein-Todel, C., Riera, C. M. & Sotomayor, C. E. (1998) Activated rat macrophages produce a

- galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **160**: 4831-4840.
- Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D. & Sotomayor, E. M. (2007) Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual Review of Immunology* **25**: 267-296.
- Rabinovich, G. A. & Ilarregui, J. M. (2009) Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments. *Immunological Reviews* **230**: 144-159.
- Rathmell, J. C. & Thompson, C. B. (2002) Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* **109 Suppl**: S97-107.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C. & Shi, Y. (2008) Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* **2**: 141-150.
- Rojas, M., Xu, J., Woods, C. R., Mora, A. L., Spears, W., Roman, J. & Brigham, K. L. (2005) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **33**: 145-152.
- Romero, M. D., Muiño, J. C., Bianco, G. A., Ferrero, M., Juarez, C. P., Luna, J. D. & Rabinovich, G. A. (2006) Circulating anti-galectin-1 antibodies are associated with the severity of ocular disease in autoimmune and infectious uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **47**: 1550-1556.
- Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N. W., Toscano, M. A., Ilarregui, J. M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O. L. & Rabinovich, G. A. (2004) 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* **5**: 241-251.
- Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M. & Mahon, B. P. (2007) Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and Experimental Immunology* **149**: 353-363.
- Santucci, L., Fiorucci, S., Cammilleri, F., Servillo, G., Federici, B. & Morelli, A. (2000) Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **31**: 399-406.
- Santucci, L., Fiorucci, S., Rubinstein, N., Mencarelli, A., Palazzetti, B., Federici, B., Rabinovich, G. A. & Morelli, A. (2003) Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* **124**: 1381-1394.

- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K. & Ozawa, K. (2007) Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* **109**: 228-234.
- Saussez, S., Lorfevre, F., Lequeux, T., Laurent, G., Chantrain, G., Vertongen, F., Toubeau, G., Decaestecker, C. & Kiss, R. (2008) The determination of the levels of circulating galectin-1 and -3 in HNSCC patients could be used to monitor tumor progression and/or responses to therapy. *Oral Oncology* **44**: 86-93.
- Savill, J. & Fadok, V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**: 784-788.
- Scott, F. L., Denault, J., Riedl, S. J., Shin, H., Renatus, M. & Salvesen, G. S. (2005) XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *The EMBO Journal* **24**: 645-655.
- Seliger, B. & Pfizenmaier, K. (1989) Post-transcriptional downregulation of MHC class I expression in oncogene-transformed cells is reverted by IFN-gamma and TNF-alpha. *Journal of Immunogenetics* **16**: 315-320.
- Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D. & Deschaseaux, F. (2008) Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* **26**: 212-222.
- Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* **9**: 459-470.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* **119**: 2204-2213.
- Silva, W. A., Covas, D. T., Panepucci, R. A., Proto-Siqueira, R., Siufi, J. L. C., Zanette, D. L., Santos, A. R. D. & Zago, M. A. (2003) The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* **21**: 661-669.
- Sioud, M., Mobergslien, A., Boudabous, A. & Fløisand, Y. (2011) Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *International Journal of Oncology* **38**: 385-390.
- Stowell, S. R., Karmakar, S., Arthur, C. M., Ju, T., Rodrigues, L. C., Riul, T. B., Dias-Baruffi, M., Miner, J., McEver, R. P. & Cummings, R. D. (2009) Galectin-1 induces reversible phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell* **20**: 1408-1418.

- Stowell, S. R., Karmakar, S., Stowell, C. J., Dias-Baruffi, M., McEver, R. P. & Cummings, R. D. (2007) Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells. *Blood* **109**: 219-227.
- Stowell, S. R., Qian, Y., Karmakar, S., Koyama, N. S., Dias-Baruffi, M., Leffler, H., McEver, R. P. & Cummings, R. D. (2008) Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **180**: 3091-3102.
- Straus, D. B. & Weiss, A. (1992) Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* **70**: 585-593.
- Sturm, A., Krivacic, K. A., Fiocchi, C. & Levine, A. D. (2004) Dual function of the extracellular matrix: stimulatory for cell cycle progression of naive T cells and antiapoptotic for tissue-derived memory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **173**: 3889-3900.
- Sugimoto, N., Oida, T., Hirota, K., Nakamura, K., Nomura, T., Uchiyama, T. & Sakaguchi, S. (2006) Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *International Immunology* **18**: 1197-1209.
- Tabrizi, S. J., Niino, H., Masui, M., Yoshimoto, G., Iino, T., Kikushige, Y., Wakasaki, T., Baba, E., Shimoda, S., Miyamoto, T., Hara, T. & Akashi, K. (2009) T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **182**: 1490-1499.
- Tepper, A. D., Ruurs, P., Wiedmer, T., Sims, P. J., Borst, J. & van Blitterswijk, W. J. (2000) Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *The Journal of Cell Biology* **150**: 155-164.
- Thomas, D. A. & Massagué, J. (2005) TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**: 369-380.
- Thompson, C. (1995) Protein proves to be a key link in innate immunity. *Science (New York, N.Y.)* **269**: 301-302.
- Toscano, M. A., Bianco, G. A., Ilarregui, J. M., Croci, D. O., Correale, J., Hernandez, J. D., Zwirner, N. W., Poirier, F., Riley, E. M., Baum, L. G. & Rabinovich, G. A. (2007) Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature Immunology* **8**: 825-834.

- Toscano, M. A., Commodaro, A. G., Ilarregui, J. M., Bianco, G. A., Liberman, A., Serra, H. M., Hirabayashi, J., Rizzo, L. V. & Rabinovich, G. A. (2006) Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **176**: 6323-6332.
- Urbán, V. S., Kiss, J., Kovács, J., Gócza, E., Vas, V., Monostori, E. & Uher, F. (2008) Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* **26**: 244-253.
- Valtieri, M. & Sorrentino, A. (2008) The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *Journal of Cellular Physiology* **217**: 296-300.
- Walzel, H., Schulz, U., Neels, P. & Brock, J. (1999) Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. *Immunology Letters* **67**: 193-202.
- Watt, D. J., Jones, G. E. & Goldring, K. (2004) The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration. *Glycoconjugate Journal* **19**: 615-619.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. & Korsmeyer, S. J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)* **292**: 727-730.
- Williams, B. L., Schreiber, K. L., Zhang, W., Wange, R. L., Samelson, L. E., Leibson, P. J. & Abraham, R. T. (1998) Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 1388-1399.
- Wilson, T. J., Firth, M. N., Powell, J. T. & Harrison, F. L. (1989) The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes. *The Biochemical Journal* **261**: 847-852.
- Xu, J., Woods, C. R., Mora, A. L., Joodi, R., Brigham, K. L., Iyer, S. & Rojas, M. (2007) Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **293**: L131-141.
- Zacarias Fluck, M. F., Rico, M. J., Gervasoni, S. I., Ilarregui, J. M., Toscano, M. A., Rabinovich, G. A. & Scharovsky, O. G. (2007) Low-dose cyclophosphamide modulates galectin-1 expression and function in an experimental rat lymphoma model. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* **56**: 237-248.

- Zannettino, A. C. W., Paton, S., Arthur, A., Khor, F., Itescu, S., Gimble, J. M. & Gronthos, S. (2008) Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Physiology* **214**: 413-421.
- Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., Mancardi, G. & Uccelli, A. (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* **106**: 1755-1761.
- Zhou, Q. & Cummings, R. D. (1993) L-14 lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**: 6-17.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. & Hedrick, M. H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* **7**: 211-228.
- Zuñiga, E., Rabinovich, G. A., Iglesias, M. M. & Gruppi, A. (2001) Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology* **70**: 73-79.

Saját közlemények

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

Köszönetnyilvánítás

Egyetemi hallgató korom óta tagja vagyok a Limfocita Szignáltranszdukciós 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 Ferencce, 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-eket kaptuk számos hasznos tanács és praktika kíséretében. Emellett Robert Kissnek is szeretném megköszönni a melanóma és glióma sejteket.

Köszönettel tartozom az egyetemi tanáraimnak 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.

Summary

Galectin-1 (Gal-1) is a mammalian lectin with β -galactoside binding activity. It is expressed by numerous cell types and binds to cells and extracellular matrix components presenting glycoconjugates of N-acetyl-lactosamine. The most prominent biological function of Gal-1 is its anti-inflammatory effect which is predominantly exerted by induction of apoptosis of Th1 and Th17 cells. Many studies have emerged analyzing Gal-1 signal transduction mechanism during T cell apoptosis. However these data have resulted confusing knowledge due to using soluble recombinant protein although Gal-1 exerts its physiological function bound to the producing or neighboring cells or extracellular matrix components.

We have aimed to resolve this controversy by comparing cell death induced by low (1.8 μ M, lowGal-1) and high (18 μ M, highGal-1) concentration of soluble Gal-1. We show that lowGal-1 and highGal-1 trigger phosphatidylserine exposure, generation of rafts and mitochondrial membrane depolarization. In contrast, lowGal-1 but not highGal-1 are dependent on the presence of p56lck and ZAP70 and activates caspase cascade. The results allow the conclusion that the cell-death mechanism strictly depends on the used concentration of Gal-1.

Recombinant Gal-1 is always manipulated during purification and in apoptosis assays since it has to be in reduced form for functional conformation. To avoid this process we analyzed the role and mechanism of cell-derived Gal-1 in the apoptotic process. In co-culture system Gal-1 remains as a native, functional protein without any chemical modification and the apoptosis assay also avoids addition of reducing agent. We applied co-cultures of various cell lines producing Gal-1 as effectors and T cells (activated peripheral blood cells or Jurkat lymphoblasts) as targets.

Both Jurkat and activated peripheral T cells died when co-cultured with various Gal-1 expressing cells, but HeLa, a Gal-1 non-expressing cervix carcinoma cell line did not affect T cell viability. Removing cell surface Gal-1 with lactose analogue TDG, a competitor for the carbohydrate recognition or knocking down Gal-1 expression in Gal-1 producing tumor cells resulted in the diminution of the cytotoxic effect of these cell

lines. Moreover, T cell apoptosis required intimate interaction between the effector tumor and target T cells since neither conditioned supernatant harvested from the tumor cells, nor physical separation of tumor and T cells in the same medium triggered T cell death. Mechanism of apoptosis by cell-bound Gal-1 was comparable to that of low concentration of soluble recombinant Gal-1. Requirement for p56^{lck} and ZAP70 kinases has been proved and both the decrease of mitochondrial membrane potential and caspase activation was detected in T cell apoptosis triggered by tumor cell-derived Gal-1.

Our results show that cell-derived Gal-1 and low concentration of the soluble lectin triggers identical pathway of T cell apoptosis in contrast to high concentration soluble Gal-1 which act on a different fashion.

Not only the tumor cells produce Gal-1, but mesenchymal stem cells (MSCs) derived from physiological, healthy tissues also express and secrete Gal-1 to the cell surface. MSCs are multipotent progenitor cells with the ability to differentiate into mesodermal tissues. They are typically isolated from the bone marrow (BM-MSCs), but can also be expanded from a wide variety of other fetal and adult tissues. One of the main functions of MSCs is to support hematopoietic cell differentiation in bone marrow. MSCs have a powerful *in vitro* and *in vivo* immunosuppressive effect on all cells of the immune system, including direct suppression of allogeneic and mitogenic T cell proliferation, induction of T cell anergy or apoptosis, modulation of cytokine production, inhibition of dendritic cell maturation and antigen presentation. Moreover, MSCs regulate immune response by downregulating Th1 and CTL, as well as NK cell response. Thus, they possess a powerful anti-inflammatory effect.

The mechanisms underlying these effects remain to be fully elucidated, but are suggested to be mediated by direct cell-to-cell interactions in combination with soluble factors. MSC derived soluble factors, hepatocyte growth factor, transforming growth factor- β , prostaglandin-E2, indolamine-2,3-dioxygenase, nitrogen monoxide, soluble HLA-G and IL-10, all act as anti/inflammatory mediators. There is no evidence, however, that any of these factors would be solely and sufficiently responsible for the immunosuppressive effect *in vitro* or *in vivo*.

For our studies first we have used coculture of human MSCs and Jurkat T cells or activated peripheral blood T cells. Removal of MSC cell surface Gal-1 with TDG results

in amelioration of MSC induced T cell apoptosis. MSC-bound Gal-1 translocates to target T cells via direct cell-cell contact, and does not act as a soluble protein.

Human MSCs are difficult to obtain and can be kept in culture for limited period of time, thus we have carried on the further experiments on MSCs derived from mouse bone marrow (BM-MSC) which can be cultured for prolonged time. To determine the role of Gal-1 in BM-MSCs immunosuppressive effect, the expression of Gal-1 by MSCs has been knocked down using Gal-1 interfering small RNA method. The Gal-1 negative MSCs were cytotoxic to both Jurkat T cells and freshly isolated and activated mouse T cells. Paralelly, TDG competition and BM-MSCs derived from Gal-1 knock out mice (Gal-1 KO BM-MSCs) were used to prove the necessity of Gal-1 in BM-MSCs induced T cell death. Gal-1 was removed from MSCs surface with TDG and it resulted in decreased T cell apoptosis, as well as Gal-1 KO BM-MSCs did not trigger T cell death compared to wild type BM-MSCs. BM-MSC-derived Gal-1 triggered T cell apoptosis via the same apoptotic pathway as low concentration of soluble or tumor cell derived Gal-1 did. T cell death progressed on mithochondrial pathway, which involved activation of caspase cascade. The signalling events included of p56^{lck} and ZAP70 mediated tyrosine phosphorylation, with the subsequent activation of acid sphingomyelinase and ceramide production and these steps were strictly required to fulfilment of the T cell apoptosis. These results show that one of the major T cell cytotoxic factors in MSC is Gal-1.

Hence we proved that T cell apoptosis induced by Gal-1 derived from pathological or physiological cells or low concentration of soluble Gal-1 acted on the same mechanism. This is the first study which compares the mechanism of T cell apoptosis induced by Gal-1 of different origin and is able to determine the real pathway.

Összefoglalás

A galektin fehérjecs család legfőbb jellemzője, hogy szénhidrátkötő domainjük révén sejtfelszíni glikokonjugátumokhoz kötődnek. Ez idáig tizenöt különböző galektin molekulát azonosítottak, melyeket a nagyfokú szekvencia homológia és a β -galaktozidokat felismerő tulajdonság alapján soroltak egy csoportba. Ezen család legkorábban felfedezett és legjobban jellemzett tagja a galektin-1 (Gal-1). Számos sejt expresszálja a Gal-1-et, mely szekréció után, azonnal a kiválasztó vagy szomszédos sejthez, illetve az extracelluláris mátrixhoz kötődik. A Gal-1 az immunválasz szabályozásában résztvevő, egyik fontos gyulladáscsökkentő faktor. Immunszuppresszív szerepét, legalábbis részben, az aktivált Th1-es és Th17-es T sejtek apoptózisának indukciójával éri el. A Gal-1 indukálta apoptózis molekuláris mechanizmusának megértése különösen fontos a Gal-1 autoimmun/gyulladásos betegségek terápiájában való lehetséges felhasználásának fényében. 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. Kísérleteinkben összehasonlítottuk az általunk rendszeresen használt alacsony Gal-1 (aGal-1, 1,8 μ M) koncentráció hatását a szakirodalomban használt, mintegy 10-szeres mennyiségű, magas koncentrációjú Gal-1 (mGal-1, 18 μ M) hatásával. Munkánk során azt találtuk, hogy mint az aGal-1, mint az mGal-1 indukálja a foszfatidil szerin sejtfelszíni 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.

A rekombináns termeltetés és tisztítás során a fehérjék módosulhatnak, így nem biztos, hogy a Gal-1 az apoptózis kísérletekben a megfelelő, aktív formában van jelen. Ezért a Gal-1 T sejtekre kifejtett citotoxikus hatásának vizsgálatához olyan, általunk kidolgozott modellt használtunk, melyben Gal-1-et termelő sejtekkel Jurkat sejteket vagy aktivált T sejteket tartottunk kokultúrában. Gal-1 termelő, effektor sejtneként először C32,

U87 és Gal-1-el transzfektált HeLa tumorsejteket használtunk. 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 Gal-1 sejt kötött faktorként indukálja a T sejtek halálát.

A kokultúrák rendszer lehetőséget adott a Gal-1 indukálta apoptózis valódi mechanizmusának a feltárására. Az endogén, sejt felszínhez kötött Gal-1 és az alacsony koncentrációjú szolubilis Gal-1 a sejthalál Lck és Zap70 tirozin kinázok és kaszpázok aktivitásától függő mitokondriális útvonalát stimulálta, míg a magas koncentrációjú Gal-1 mitokondrium függő, de tirozin kinázok és kaszpázok aktivitásától független útvonalat indít be.

Egér mesenchymális őssejteken vizsgáltuk meg, hogy a sejtek által termelt Gal-1 pathológiás és fiziológias körülmények között is szerepet játszik-e az immunszuppresszióban. A Gal-1 fiziológias előfordulását ugyanis jól példázzák a mesenchymális őssejtek, melyek nagy mennyiségű Gal-1-t termelnek és szekretálnak. A Gal-1 szerepe még nem tisztázott ezeknek a sejteknek az immunszuppresszív funkciójában.

Az MSC-k multipotens progenitor sejtek, melyek mezodermális szövetek sejtjeivé, csonttá, porcsejtté, zsírsejttekké és csontvelői kötőszövetté képesek differenciálódni. Leggyakrabban csontvelőből izolálják, de számos magzati és felnőtt szövetből is kivonhatóak. Az MSC-k *in vitro* és *in vivo* immunszuppresszív hatása a szakirodalomból már ismert és az immunrendszer minden sejtjén érvényesül. Az allogén és mitogén 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 bizonyítottnak 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, az rendelkezésünkre álló adatok nem bizonyítják, hogy az MSC-k által termelt faktorok bármelyike egyedül elegendő lenne az *in vitro* vagy *in vivo* immunszuppresszív hatáshoz.

Annak eldöntésére, hogy az MSC-ben termelődő Gal-1-nek szerepe van-e az MSC immunszuppresszív hatásában, humán MSC-k Jurkat és aktivált T sejtekre kifejtett citotoxikus hatását vizsgáltuk. A TDG-s kezelés után, a sejtfelszíni Gal-1 eltávolításával csökkent a T sejt apoptózis mértéke. Mivel azonban a humán MSC-k beszerzése és fenntartása igen körülményes, további kísérleteinket egér csontvelőből izolált MSC-ken (BM-MSK) végeztük. Ezek a sejtek ugyanis korlátlan ideig fenntarthatók kultúrában. Target sejtekként egerből izolált aktivált T sejteket használtunk. A Gal-1 szerepét az immunszuppresszív folyamatokban először a Gal-1 BM-MSK sejtfelszínről való eltávolításával illetve Gal-1 csendesített és knock out BM-MSK-k használatával bizonyítottuk be, mivel a sejtfelszíni Gal-1 mennyiségének csökkentése akár kémiai, akár genetikai eszközökkel, csökkent aktivált T sejt apoptózist eredményezett. Az adekvát bizonyítéokra a Gal-1 KO BM-MSK-kkel végzett kísérletek során tettünk szert, ezek a sejtek ugyanis nem indukáltak apoptózist a velük kokultúrában tartott aktivált T sejteken. Az apoptózis egyes lépéseit megvizsgáltuk ezeken a fiziológiás sejteken is, és azt kaptuk, hogy az indukált útvonal az alacsony koncentrációjú szolubilis és a sejt kötött Gal-1-éhez hasonló. Ez esetben is igazoltuk az apoptózis mitokondrium mediálta kaspáz függő voltát, a tirozin foszforiláció és az azt követő savas szfingomielináz aktiváció és ceramid felszabadulás szükségességét. Eredményink szerint tehát aGal-1 az egyik legjelentősebb T sejtekre ható citotoxikus faktor.

Bizonyítottuk tehát, hogy a különböző patológiás és fiziológiás sejtek termelte valamint az alacsony koncentrációjú szolubilis Gal-1 azonos apoptotikus mechanizmust

aktivál. Ilyen összehasonlító munka eddig még nem született a szakirodalomban, így eredményeink lehetőséget adhatnak a Gal-1 valódi, *in vivo* hatásmechanizmusának tisztázására, illetve az eltérő szituációkból származó, gyulladáscsökkentő Gal-1 szerepének felderítésére a fiziológiás és tumorsejtek immunszuppresszív hatásában.