

PhD tézisek

**Egy humán immunszuppresszív
protein, a galectin-1, mint új regulációs
faktor az autoimmun betegségekben**

Hornung Ákos

Témavezető: Dr. Kovács László, MD, Ph.D

*Szegedi Tudományegyetem, Általános
Orvostudományi Kar, Reumatológiai és
Immunológiai Klinika*

Szeged, 2016

Bevezetés

A galectin-1 (Gal-1) a β -galaktozid kötő lektinek családjának egy tagja, mely specifikus affinitást mutat a terminális N-acetil-laktozamin motívumokhoz a több antennás sejt felszíni N-glikánokon. Kötődését részlegesen gátolja a terminális α -2-3, és teljesen az α -2,6 szializáció. A Gal-1 kötő struktúrák megtalálhatóak majdnem minden sejt típuson, és részt vesznek a sejtadhézióban, migrációban, és jelátvitelben. A Gal-1 extracelluláris és intracelluláris feladatokban is részt vesz. Sejten belül részt vesz a spliceozóma kialakításában a Gemin4-gyel való asszociáción keresztül, illetve a H-RAS nanocluster részét képezi. A sejten kívül a Gal-1 immunszuppresszív hatású, az aktivált T-sejtek apoptózisát váltja ki. A Gal-1 kötéshez szükséges laktozamin láncok jelenléte irányítja a sejtek érzékenységét a Gal-1-gyel szemben, és ezek szintézisét glikoziltranszferázok végzik. A Gal-1 általi apoptózis az Lck és ZAP70 kinázok közreműködésével zajlik, ceramid szabadul fel, a mitokondriális membrán potenciál csökken, majd kaspázok aktiválódnak.

A szisztémás lupusz erythematosus (SLE) az egyik leggyakoribb szisztémás autoimmun betegség. Az SLE molekuláris patológiáját többszervi immunmediált gyulladás és autoantitest termelés jellemzi. Az apoptózis zavara fontos eleme az SLE patofiziológiájának.

A sejtfelszíni fehérjék felszínén összetett oligoszacharid komplexek találhatók, melyeket enzimátikus lépések sorozata hoz létre. A cukor komplexek szerepét kimutatták már az adhézió, migráció és a sejtbe történő jelátvitel területein. A fehérje glikoziláció az autoimmunitás kutatásának fontos részévé vált, mivel hibás cukor komplexeket mutattak ki szérum immunglobulinokon és a glikán bioszintézis hibái is kapcsolatba hozhatók egy öröklött autoimmun betegséggel és a T-sejt receptor működési zavarával. A Mezenhimális sztróma sejt (MSC) a multipotens őssejtek egy típusa, mely immunreguláló szereppel bír. Több immunszuppresszív faktort termelnek és kiválasztanak, köztük a Gal-1-et is.

Célok

Célunk a Gal-1 *in vitro* és *in vivo* **immunszuppresszív hatásának vizsgálata volt egy immunszuppresszív sejttípusban (MSC)**. Az *in vitro* analízis modelljeként Gal-1 termelő MSC és aktivált T-sejtek ko-kultúrárs rendszere szolgált. Az MSC által termelt Gal-1 *in vivo* hatásának megértéséhez sztreptozotocin (STZ) indukált I-es típusú cukorbetegség egér modellrendszert használtunk. Mivel a Gal-1-et aktivált T-sejtek is termelik, **tisztázni akartuk a lektin lokalizációját (kiválasztódik-e a sejtekből, vagy nem) és hogy a sejten kívüli Gal-1 által kiváltott apoptózist befolyásolja-e az aktivált T-sejtek által *de novo* termelt Gal-1**. A *de novo* Gal-1 lokalizációját a T-sejtben flow citometriás és fluoreszcens mikroszkópos módszerrel vizsgáltuk, az apoptózis teszteket pedig aktivált vad típusú és Gal-1 knock-out egér T-sejteken végeztük el.

A Gal-1 az effektor T-sejtek apoptotikus faktora, ez pedig fontos jelöltté teszi a fehérjét az autoimmun patológiák kutatásában. **Célunk a Gal-1 termelésének és szerepének vizsgálata volt SLE-s betegek T-sejtjeiben.**

Ehhez a Gal-1 mRNS szintjének PCR-es technikával történő mérését és apoptózis teszteket végeztünk. Mivel a Gal-1 aktivitásához elengedhetetlen sejtfelszíni ligandjainak jelenléte, **megvizsgáltuk a Gal-1 kötő felszíni cukorstruktúrák összetételét és hozzáférhetőségét SLE, SS és RA betegek T-sejtjein.** Ehhez lektin kötési kísérleteket végeztünk és a releváns glikozilációs enzimek termelését vizsgáltuk PCR technikával.

Anyagok és módszerek

Vérmintákat gyűjtöttünk 14 aktív SLE, 9 inaktív SLE, 13 RA és 11 SS betegtől, valamint 16 egészséges kontroll személytől. A T-sejteket 1 $\mu\text{g/ml}$ Phytohaemagglutinin-el stimuláltuk 72 órán át 37 °C-on.

Az apoptózis tesztekhez HeLa^{mock} vagy HeLa^{Gal} sejteket helyeztünk kultúrába humán aktivált T-sejtekkel 16 órán át. Az egér T-sejtekkel végzett ko-kultúras kísérletek is hasonlóan zajlottak, de egér csontvelői MSC volt jelen Gal-1 termelő sejtként.

A Gal-1 apoptózis lépéseit flow citometriás és fluoreszcens mikroszkópos technikával vizsgáltuk.

A Gal-1 mRNS szintjét és a glikozilációs enzimeket valós idejű qPCR technikával, míg a lektin kötési vizsgálatok és a T-sejtek Gal-1 kötési képességét flow citometriával mértük.

Results

A Gal-1 hatását annak a termelő sejt felszínén vagy az extracelluláris mátrixon való bemutatása váltja ki. Hogy megérthessük a Gal-1 szerepét az MSC általi immunmodulációban, vad típusú (wtMSC) és Gal-1 knock-out ($MSC^{gal^{-/-}}$) MSC-t izoláltunk egér csontvelőből és *in vivo*, valamint *in vitro* kísérleteket végeztünk. Mind az STZ által kiváltot diabétesz, mind a DTH modell esetében hasonlóan bizonyult a wtMSC és $MSC^{gal^{-/-}}$ hatása a vér glükóz szint csökkentése és a túlélési idő meghosszabbítása szempontjából. Ezek az eredmények megerősítették, hogy a Gal-1 nem játszik szerepet az MSC szisztémás immunszuppresszív hatásában. Azonban a wtMSC képes volt T-sejt apoptózist kiváltani közvetlen ko-kultúrában, míg az $MSC^{gal^{-/-}}$ nem. A wtMSC által kiváltott apoptózis a felszíni foszfatidilszerin megjelenésével kezdődött, majd ceramid felszabadulást tapasztaltunk, melyet mitokondriális membránpotenciál csökkenés követett, végül kaszpáz aktiváció és DNS fragmentáció volt tapasztalható. Az apoptózis lezajlásához közvetlen sejt-sejt kapcsolatra volt szükség az MSC és a

T-sejtek között. A sejtek fizikai szétválasztása esetén nem volt megfigyelhető apoptózis.

Ismert, hogy a T-sejtek maguk is termelnek Gal-1-et aktiváció után, így felmerült, hogy a lektin autokrin apoptótikus faktorként funkcionálhat. Azonban korábban kimutattuk, hogy az egészséges aktivált T-sejtek nem választják ki a Gal-1-et, így kizárható az autokrin hatás. A *de novo* termelt Gal-1 hatásának tisztázásához aktivált egér T-sejteket, illetve Gal-1 knock-out T-sejteket tenyésztettünk Gal-1-et kiválasztó egér MSC-vel együtt. A Gal-1 hiányos T-sejtek jelentősen csökkent apoptózist mutattak a külső Gal-1-re a vad típusú, Gal-1 termelő T-sejtekhez képest. Jurkat sejtek esetén is hasonló eredményeket kaptunk, ami arra engedett következtetni, hogy a *de novo* termelt, belső Gal-1 irányítja a külső Gal-1-re adott apoptótikus választ.

Ennek figyelembe vételével értékeltük a Gal-1 termelést egészséges kontrollok, aktív stádiumú SLE-s páciensek és kezelésen átesett SLE-s betegek T-sejtjeiben. Az aktív SLE-s betegek T-sejtjei termelték a legkisebb mennyiségű Gal-1 mRNS-t, míg az egészséges T-sejtek és

a kezelt betegek T-sejtjei hasonló értékeket mutattak. Kiemelendő eredmény, hogy a Gal-1 mRNS termelés a kezelés utáni remisszióban visszatért az egészséges szintre.

Korábbi eredményeink alapján feltételezhető, hogy az SLE T-sejtek által mutatott alacsony Gal-1 expresszió kihathat a külső Gal-1 apoptotikus hatásával szemben mutatott érzékenységére. T-sejteket tenyésztettünk kokultúrában Gal-1 hiányos HeLa sejtekkel, (HeLa^{mock}), vagy Gal-1 termelő HeLa sejtekkel (HeLa^{Gal}). Az egészséges, aktivált T-sejtek és a remisszióban lévő, kezelt betegek T-sejtjei hasonló arányú apoptózissal reagáltak a Gal-1 termelő sejtek jelenlétében, míg az aktív stádiumú SLE-s betegek T-sejtjei nem reagáltak a Gal-1 jelenlétére. Az SLE-s T-sejtek érzéketlenségének másik oka lehet a Gal-1 kötő struktúrák hiánya a sejteken, illetve a Gal-1 ligandjainak hozzáférhetelensége. A sejtfelszíni glikoziláció feltérképezéséhez fluoreszcensen jelölt növényi lektintet használtunk. Egészséges, SLE-s, reumatoid arthritisz (RA) és Sjögren szindrómás (SS) betegek T-sejtjeit vizsgáltuk nyugvó és aktivált

állapotban. Aktiválás előtt az egészséges, RA-s és SS-es T-sejtek hasonló mennyiségű Gal-1-et kötöttek a felszínükön, de az SLE-s sejtek ennél jelentősen nagyobb mennyiség kötésére voltak képesek. Aktiválás során a kötött Gal-1 mennyisége nagyban növekedett az egészséges T-sejtek és az RA sejtek esetében, míg az SLE és SS T-sejtek sokkal kisebb változást mutattak. Aktiváció után minden betegcsoport jelentősen kevesebb Gal-1-et volt képes megkötni, mint az egészséges T-sejtek. A nyugvó SLE T-sejtek magasabb ConA, WGA és SNA kötést mutattak, mint a kontroll T-sejtek. Aktiválás során a glikozilációs változások eltértek az SLE és SS sejtek esetében. A ConA, LCA, WGA és PHA-L kötés az SLE, az LCA és PHA-L kötés pedig az SS T-sejtek esetében volt jelentősen alacsonyabb, mint a kontrollokban.

A glikozilációban részt vevő enzimek mRNS szintjeit is megvizsgáltuk. A Neuraminidáz 1 (NEU1), egy szialsav hasító enzim jelentősen alacsonyabb szinten volt jelen az SLE, RA és SS T-sejtekben, mint a kontrollokban. Mivel a neuraminidázok és a szialiltranszferázok ellentétes reakciókat katalizálnak, meghatároztuk ezen enzimek

közötti génexpressziós arányokat, hogy így mutassuk ki a sejtfelszíni szializáció állapotát a T-sejtekben. Jelentősen magasabb ST6GAL1/NEU1 arányt mutattunk ki RA és SS T-sejtekben, és az ST3GAL6/NEU1 arány SLE, RA és SS T-sejtekben is magasabb volt az egészséges T-sejtekhez képest. Fontos megjegyezni, hogy az ST6GAL1/NEU1 arány pozitív korrelációt mutatott a SLEDAI értékekkel az SLE-s betegek esetében.

Összegzés

- Eredményeink arra utalnak, hogy a Gal-1, bár potens immunszuppresszív faktor, nem játszik szerepet az MSC **szisztémás** immunszuppresszív folyamataiban *in vivo*.
- A Gal-1 termelő MSC-k T-sejt apoptózist váltanak ki *in vitro* ko-kultúras körülmények között és Gal-1 függő módon, melynek mechanizmusa megegyezik a szolubilis Gal-1 által kiváltott apoptóziséval.
- Az endogén Gal-1-et nem választják ki a T-sejtek, azonban egy ismeretlen mechanizmuson keresztül alapvetően hozzájárul a sejten kívüli Gal-1 által kiváltott apoptózishoz.
- Az aktivált SLE T-sejtek alacsonyabb mennyiségű Gal-1 mRNS-t termelnek, amely arra utal, hogy a sejten belüli Gal-1 releváns lehet a sejten kívüli Gal-1 által kiváltott apoptózissal szembeni védelemben.
- A sejt felszíni glikoziláció megváltozott az SLE T-sejtekben. Ezek a sejtek kisebb komplexitású láncokat és megnövekedett terminális szializációt mutatnak. Mindkét

változás csökkenti a Gal-1 kötődési képességét a sejt felszínre. Így az SLE-ben tapasztalt hibás apoptotikus válasz visszavezethető lehet a Gal-1 patológiás termelésére és a módosult glikozilációra. Az SS betegek T-sejtjei is hasonló eltéréseket mutattak, míg az RA-s T-sejtek esetében csak szializációs eltérést tapasztaltunk.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom dr. Monostori Évának és dr. Kovács Lászlónak a munkám során nyújtott kiváló témavezetésükért és segítségükért. Köszönöm továbbá dr. Szabó Enikőnek, dr. Deák Magdolnának, dr. Fajka-Boja Robertának, dr. Czibula Ágnesnek, dr. Kriston-Pál Évának, Makra Ildikónak, és Novák Juliannának a kísérletekben nyújtott segítségüket és társszerzői munkájukat. Köszönöm Gercsó Andreának a kitűnő laboratóriumi segítségéért. Köszönöm a családomnak a folyamatos támogatásukat és bátorításukat.

Felhasznált közlemények

- I. M. Deák*, Á. Hornung*, J. Novák, D. Demydenko, E. Szabó, Á. Czibula, R. Fajka-Boja, É. Kriston-Pál, É. Monostori, L. Kovács, **Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions**, Immunobiology. 220(4):483-489 (2015). *these authors contributed equally
- II. Á. Hornung, É. Monostori, L. Kovács. **Sytemic lupus erythematosus in the light of the regulatory effects of galectin-1 on T-cell function**. Lupus (accepted for publication)
- III. R. Fajka-Boja, V.S. Urbán, GJ. Szebeni, Á. Czibula, A. Blaskó, É. Kriston-Pál, I. Makra, Á. Hornung, E. Szabó, F. Uher, N.G. Than, É. Monostori, **Galectin-1 is a local but not systemic immunomodulatory factor in mesenchymal stromal cells**, Cytotherapy. 2016 Mar;18(3):360-70.
- IV. Á. Hornung, E. Szabó*, Á. Czibula, É. Monostori, L. Kovács. **Altered glycosylation of activated autoimmune T-cells**. (submitted for publication)

Disszertációban fel nem használt közlemények

E. Szabó, R. Fajka-Boja, É. Kriston-Pál, Á. Hornung, I. Makra, G. Kudlik, F. Uher, R.L. Katona, É. Monostori, Á. Czibula. **Licensing by inflammatory cytokines abolishes heterogeneity of immunosuppressive function of mesenchymal stem cell population.** Stem Cells Dev. 2015 Sep 15;24(18):2171-80

Konferencia Előadások

- I. Ákos Hornung^{*}, Magdolna Deák^{*}, Julianna Novák, Dmytro Demidenko, Enikő Szabó, Ágnes Czibula, Roberta Fajka-Boja, Éva Kriston-Pál, Éva Monostori, László Kovács. **Abnormal regulation of T-cell function by galectin-1 in systemic lupus erythematosus.** Controversies in Rheumatology and Immunology conference (Sorrento, Italy 2015)
- II. Ákos Hornung^{*}, Magdolna Deák^{*}, Julianna Novák, Enikő Szabó, Ágnes Czibula, Roberta Fajka-Boja, Éva Kriston-Pál, Éva Monostori, László Kovács.

Novel role for galectin-1 in T-cell apoptosis regulation and its relevance to systemic lupus erythematosus. European Workshop of Rheumatology Research (Budapest, Hungary 2015)

- III. Ákos Hornung*, Magdolna Deák*, Julianna Novák, Enikő Szabó, Ágnes Czibula, Roberta Fajka-Boja, Éva Kriston-Pál, Éva Monostori, László Kovács. **Insights into the physiology of galectin-1 mediated T-cell apoptosis regulation, and its dysfunction in systemic lupus erythematosus.** European Society for Clinical Investigation Annual Congress (Cluj-Napoca, Romania 2015)

*Authors contributed equally