

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A tumorsejtek által kiválasztott galektin-1 T-sejtekre
kifejtett apoptotikus hatásának mechanizmusa**

Kovács-Sólyom Ferenc

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

MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet
Limfocita Sznál Transzdukciós Laboratórium

Biológia Doktori Iskola
SZTE TTIK, Szeged
2009.

Bevezetés

A galektin-1 (Gal-1) a galektin fehérjecsalád legkorábban felfedezett, legjobban jellemzett tagja. Homodimer képzésére képes, szénhidrátkötő doménnel rendelkező molekula, amely a fehérjék glikozilált oldalláncait ismeri fel. A Gal-1 fehérjének számos különböző funkcióját azonosították. A szaglóidegek, axonok fejlődésének serkentésében betöltött szerepét egérvizsgálatokban mutatták ki. Az immunválaszt a Th2 sejtek aktiválódása felé tolja el, ami a citokin termelés megváltozásával jár együtt, így gyulladáscsökkentő hatása is van. *In vivo* szerepet játszik az aktivált T és B sejtek apoptózisának indukciójában, valamint az aktivált T sejtek programozott sejthalálát az immunválasz lecsengésekor beindító regulátoros T sejtek egyik effektor molekulájaként is azonosították. A tumorsejtek által kialakított immunprivilegium fenntartásában is szerepet játszik. A Gal-1 szénhidrátkötő képességének köszönhetően kötődik az extracelluláris mátrixot alkotó fehérjékhez, befolyásolja az adhéziós folyamatokat. E tulajdonsága révén segíti a tumorsejtek migrációját és az ér endothélen való átjutását, ezzel együtt az áttétképzést. Egészséges szervezetben finom szabályozó szerepet tölt be, fontosságát pathológiás körülmények között tapasztalhatjuk igazán. Gal-1 hiányában, vagy működésének zavara esetén az immunreguláló szerepe megszűnik, vagy korlátozott, így krónikus gyulladás lép fel például psoriasis, illetve rheumathoid arthritis esetén. Túlműködése rákos megbetegedéskor veszélyes, hiszen ekkor az immunreguláló funkció felerősödik, így a tumor progressziója gyorsabb lesz. A növekvő daganat belsejében levő sejtek hipoxiás állapotba kerülnek, a sejtpusztulás elkerülése érdekében új erek képzését indítják el (angiogenezis). Hipoxia hatására aktiválódik a Gal-1 és az angiogenezist elősegítő faktorok termelődését serkenti, hozzájárul az új erek képződéséhez.

Ezekre a tényekre alapozva elmondhatjuk, hogy a galektin-1 a rosszindulatú sejtek központi, nagy jelentőségű molekulája, a különböző rákterápiás kezelések ígéretes célpontja lehet.

A Gal-1 hatásait *in vivo* nagy valószínűséggel szilárd fázishoz (sejtmembránhoz vagy extracelluláris mátrixhoz) kötötten fejt ki, mivel nagy affinitással kötődik szénhidrát oldalláncokhoz, amelyek jelentős mennyiségben fordulnak elő a sejtek környezetében.

Célkitűzés

A Gal-1 által aktivált T sejtekben indukált apoptózisról a szakirodalomban fellelhető adatok nagyrészt szolubilis, rekombináns fehérjével végzett munkákból származnak. Munkám célja volt megvizsgálni a sejtmembránhoz kötődött Gal-1 apoptózist kiváltó képességét illetve a sejthalál molekuláris mechanizmusát.

A következő kérdéseket, feladatokat fogalmaztuk meg:

1. egy olyan *in vitro* modellrendszer kifejlesztése, amelyben megfigyelhető a sejt-sejt kölcsönhatás során bekövetkező apoptózis
2. a tumorsejtek T sejt apoptózist indukáló képességének vizsgálata sejttenyészetben
3. annak megállapítása, hogy a tumorsejtek által termelt és a sejtmembránra kötődött Gal-1 részt vesz-e a T sejt apoptózis kiváltásában
4. a tumorsejt eredetű Gal-1 okozta apoptózis mechanizmusának vizsgálata, a folyamat összehasonlítása a rekombináns, szolubilis Gal-1 által indukált sejthalál egyes lépéseivel

Módszerek

A tumorsejtek által termelt Gal-1 sejtfelszíni jelenlétét áramlási citométerrel mutattuk ki a laboratóriumunkban előállított ellenanyag segítségével. A méréseket CellQuestTM software-rel értékeltük ki.

A sejt-sejt kölcsönhatást mikroszkóppal vizsgáltuk, az apoptózist fluoreszcens festékekkel konjugált Annexin V jelöléssel mutattuk ki. A p56^{lck} és ZAP70 kinázok szerepét a folyamatban enzim hiányos T sejtek használatával bizonyítottuk. A mitokondrium depolarizációt egy mitokondriális membránpotenciál-függő festék követésével igazoltuk. A molekula az egészséges mitokondriumban felhalmozódik, amit piros szín jelez, míg a csökkent membránpotenciálú mitokondriumba nem jut be, így monomer formában, a

citoplazmában zöld színnel látható. Az aktív kaszpáz 3 molekulát felismerő ellenanyag használatával megmutattuk, hogy a T sejtekben az apoptózis során a kaszpáz 3 aktiválódik. A Gal-1 termelést az egyes sejtvonalakban Western blot technikával igazoltuk.

A Gal-1 fehérjét nem termelő HeLa sejteket a Gal-1 cDNS-ét tartalmazó pcDNA3.1 vektorral, a nagy mennyiségű Gal-1-et kifejező U87 glioblasztóma sejteket a Gal-1 génjét csendesítő siRNS-t kódoló pSUPERIOR-NEO plazmiddal transzfektáltuk. Mindkét esetben a $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mediálta módszert választottuk és a pozitív klónokat neomycin rezisztenciát kihasználva szelektáltuk.

Eredmények

Kifejlesztettünk egy *in vitro* tesztrendszert, amelynek segítségével vizsgálni tudtuk a tumorsejtek és a T sejtek kölcsönhatását. Az adherens glióma vagy melanóma sejteket üveg fedőlemezre növesztettük, majd hozzáadtuk az aktivált T sejteket vagy a modellként használt Jurkat sejteket és egy kultúrában inkubáltuk őket (ko-kultúra). A T sejteket előzőleg Hoechst33342 sejtmagfestékkel jelöltük a pontos elkülöníthetőség érdekében, ami nem befolyásolja a sejtek életképességét. A T illetve Jurkat sejtek apoptózisát, annak molekuláris mechanizmusát ebben a rendszerben vizsgáltuk. Kísérleteink során az alábbi eredményeket kaptuk:

1. az általunk vizsgált Gal-1 fehérjét termelő melanóma és glióma sejtek a T sejtek apoptózisát okozzák ko-kultúra rendszerünkben, szemben a Gal-1-et nem termelő HeLa méhnyakrák sejtekkel
2. a Gal-1 fehérjét nem termelő HeLa sejtek nem okoznak T sejt apoptózist, a sejtfelszínükön viszont megkötik a hozzáadott rekombináns Gal-1 fehérjét, a növekvő koncentrációval egyre nagyobb mennyiségben, így képessé válnak az apoptózis indukcióra, a T sejt halál mértéke arányos az alkalmazott Gal-1 fehérje koncentrációjával
3. a Gal-1 cDNS-sel transzfektált HeLa sejtek közül a fehérjét különböző mértékben kifejező stabil klónokat szelektáltunk, amelyek a transzgenikus Gal-1

- fehérje expressziójának mértékével arányos T sejt apoptózist váltanak ki, szemben az üres plazmákkal transzfektált, Gal-1-et nem termelő HeLa sejtekkel
4. ha a nagy mennyiségű Gal-1-et kifejező U87 glioblastóma sejtek felszínéről eltávolítjuk a Gal-1 nagy részét a fehérje szénhidrát-kötő motívumához kapcsolódó thiodigalaktóziddal (a Gal-1 minimális ligandja), csökken a T sejt apoptózis indukáló képesség
 5. U87 glioblastóma sejtekben siRNA technikával csendesítettük a Gal-1 gént (ennek sikerességét áramlási citometriával és Western blottal ellenőriztük), a csökkent Gal-1 fehérje szint az okozott T sejt halál mértékének csökkenését eredményezi
 6. mivel a ko-kultúra rendszerben a T sejtek programozott halála csak Gal-1 jelenlétében következik be, kijelenthetjük, hogy a tumorsejtek által kiváltott T sejt apoptózis fő indukáló faktora a Gal-1 fehérje
 7. az okozott T sejt halál mechanizmusának leírására irányuló kísérleteink során megállapítottuk, hogy a Gal-1-et kifejező tumorsejtek koncentrált felülűszójában tartott T sejtek nem szenvedtek apoptózist
 8. ha a tumorsejteket és a T sejteket félig áteresztő hártyával fizikailag elválasztjuk, így meggátoljuk a közvetlen sejt-sejt kapcsolatot, míg a felülűszóban előforduló szolubilis molekulák szabad áramlását biztosítjuk, elmarad a T sejt apoptózis indukció
 9. a ko-kultúra kísérletek során a sejtek között tapasztalt kölcsönhatást konfokális mikroszkóppal vizsgálva megállapítottuk, hogy a Gal-1 fehérje átkerül a tumorsejtről a T sejtekre
 10. ezen eredmények megmutatják, hogy a T sejt halál kiváltásához a tumorsejttel kialakuló közvetlen sejt-sejt kölcsönhatásra van szükség, melynek során a Gal-1 a tumorsejtről a T sejtre átkerül
 11. a p56^{lck} és ZAP70 kinázokban hiányos T sejtek nem szenvednek apoptózist a ko-kultúra rendszerben Gal-1 fehérjét termelő tumorsejtekkel együtt tartva, tehát ezek az enzimek részt vesznek a folyamatban
 12. az apoptózis egyik legjellemzőbb markere a foszfatidil-szerin transzlokációja a sejtmembrán extracelluláris felszínére, ezt fluoreszcens festékkel jelzett Annexin V molekulával mutattuk ki

13. a Gal-1-et expresszáló tumorsejtekkel ko-kultúrában tartott T sejtekben a mitokondriális membrán-potenciál csökkenését mutattuk ki egy speciális festékkel, amely színváltozással jelzi a mitokondriális membrán depolarizációt
14. az apoptotikus T sejtekben a kaszpáz 3 aktivációját figyeltük meg, amit olyan ellenanyag használatával tettünk láthatóvá, amely csak az aktivált kaszpáz 3 molekulát ismeri fel
15. a tumorsejt eredetű Gal-1 által a ko-kultúra rendszerünkben okozott T sejt apoptózis molekuláris mechanizmusa tehát megegyezik, a rekombináns Gal-1 indukálta T sejt halál főbb lépéseivel, amit csoportunk korábban publikált

Eredményeink tükrében elmondhatjuk, hogy a Gal-1 fehérjét termelő tumorsejtek a T sejtek apoptózisát indukálják, szemben a Gal-1-et nem termelő tumorsejtekkel. Az apoptózis közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás során valósul meg, a Gal-1 átkerül a tumorsejtről a T sejtre. A tumorsejtek által termelt Gal-1 tehát a T sejtek apoptózisát okozza, melynek főbb lépései megegyeznek a csoportunk által korábban publikált, rekombináns Gal-1 okozta T sejt halál molekuláris mechanizmusával.

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

Publikációk

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

Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunology Letters* in press Impact factor (IF): 2,86

Gabriela Ion, Roberta Fajka-Boja, **Ferenc Kovács**, Gábor Szebeni, Imre Gombos, Ágnes Czibula, János Matkó, Éva Monostori:

Acid sphingomyelinase mediated release of ceramide is essential to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1. *Cellular Signaling* (2006) IF: 4,89

Előadások

Kovács-Sólyom Ferenc, Blaskó Andrea, Katona Róbert, Szebeni Gábor János, Krenács László, Végh Lea, Fajka-Boja Roberta, Tubak Vilmos, Robert Kiss, Monostori Éva: A galektin-1, mint legfőbb effektor molekula az U87 glioblasztóma által indukált T sejt apoptózisban

Magyar Immunológiai Társaság XXXVII. Vándorgyűlése, Budapest, 2008. 10. 29-31.

Ferenc Kovács-Sólyom, Andrea Blaskó, Gábor János Szebeni, Vilmos Tubak, László Krenács, Roberta Fajka-Boja, Lea Végh, Éva Monostori:

The role of galectin-1 in the war of tumor cells against T cells

Straub days, Szeged, 2007.11.28-30.

Kovács Ferenc, Tubak Vilmos, Monostori Éva:

Tumorsejtek által termelt galektin-1 T sejtekre gyakorolt citotoxikus hatása

VII.Magyar Genetikai Kongresszus és XIV.Sejt-és Fejlődésbiológiai Napok

Balatonfüred, 2007.04.15-17.

Poszterek

Kovács-Sólyom Ferenc, Blaskó Andrea, Katona Róbert, Szabeni Gábor János, Krenács László, Végh Lea, Fajka-Boja Roberta, Tubak Vilmos, Robert Kiss, Monostori Éva:

A galektin-1, mint legfőbb effektor molekula az U87 glioblasztóma által indukált T sejt apoptózisban. Kiemelt poszter

38.Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 2008.05.20-23.

Kovács Ferenc, Tubak Vilmos, Monostori Éva:

Rákos sejtek által termelt galektin-1 T sejtekre gyakorolt citotoxikus hatása

36.Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 2006.05.23-26.

Kovács Ferenc, Monostori Éva:

A galektin-1 tumor ellenes immunszuppresszív hatása

Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése, Sopron, 2005.10.19-22.

Egyéb közlemények

Roberta Fajka-Boja, Andrea Blaskó, Ferenc Kovács-Sólyom, Gábor János Szabeni, Gábor K. Tóth and Éva Monostori:

Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin-and raft-dependent endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2008) IF: 5,24

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek,

Monostori Évának

és az általa vezetett Limfocita Szignál Transzdukciós Laboratórium munkatársainak:

Fajka-Boja Robertának, Blaskó Andreának, Szebeni Gábor Jánosnak, Novák Juliannának,
Végh Leának, Gercsó Andrásnének.

Köszönet illeti továbbá

Tubak Vilmost, Katona L. Róbertet, Blaszó Pétert, Krenács Lászlót,
Kotogány Editet, Ferhan Ayaydint, Kószó Zsuzsát, Tóth Sándornét.

A sejtvonalakat köszönöm

Robert Kissnek, Arthur Weissnek és Robert T. Abrahamnak.