

**Galektin-1 indukált
T sejt apoptózis vizsgálatok**

Ph.D. értekezés

Novák Julianna

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

Fajka-Boja Roberta, Ph.D.

SZTE TTIK, Biológia Doktori Iskola

MTA SZBK, Genetikai Intézet

Szeged

2023



Tartalomjegyzék

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
II. BEVEZETÉS	6
II. 1. A GALEKTINEK, A GALEKTIN-1 (GAL-1) SZERKEZETE	6
II. 2. A GAL-1 ÁLTALÁNOS FUNKCIÓI.....	8
II. 3. GAL-1 HATÁSA T SEJTEKRE.....	13
II. 4. GAL-1 INDUKÁLT T SEJT APOPTÓZIS.....	17
II. 5. AZ LCK	20
II. 6. GAL-1 SZEKRÉCIÓ, INTRACELLULÁRIS GAL-1 (INGAL-1)	21
III. CÉLKITŰZÉSEK	23
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
IV. 1. ALKALMAZOTT SEJTEK.....	24
IV. 2. HELa SEJTEK TRANSZFEKCIÓJA.....	25
IV. 3. SEJTFELSZÍNI GAL-1 ÉS GM1 KIMUTATÁSA ÁRAMLÁSI CITOFLUORIMETRIÁVAL.....	26
IV. 4. INTRACELLULÁRIS GALEKTIN-1 KIMUTATÁSA ÁRAMLÁSI CITOFLUORIMETRIÁVAL.....	26
IV. 5. SDS GÉL-ELEKTROFORÉZIS, WESTERN BLOT ANALÍZIS GAL-1 FEHÉRJE KIMUTATÁSÁRA	26
IV. 6. KO-KULTÚRA	27
IV. 7. APOPTÓZIS MÉRÉS.....	28
IV. 8. IMMUNCITOKÉMIAI JELÖLÉSEK.....	28
IV. 9. KASZPÁZ 3 AKTIVITÁS KIMUTATÁSA	29
IV. 10. FLUORESCENS ÉS KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA, KÉPANALÍZISEK.....	29
IV. 11. PUFFEREK, OLDATOK.....	30
V. EREDMÉNYEK	33
V. 1. GM1 FÜGGŐ GAL-1 INDUKÁLT LCK SZEGREGÁCIÓ ÉS T SEJT APOPTÓZIS	33
V. 1. 1. <i>Lck szegregáció</i>	33
V. 1. 2. <i>A tirozin oldalláncon foszforilált fehérjék lokalizációja</i>	40
V. 1. 3. <i>A CD45 szükséges az Lck szegregációhoz</i>	41
V. 1. 4. <i>Az Lck szegregáció raft és GM1 függő</i>	43
V. 1. 5. <i>A Gal-1 indukált T sejt apoptózis GM1 függő</i>	46
V. 2. ENDOGÉN GAL-1 SZEREPE T SEJT APOPTÓZISBAN	48
V. 2. 1. <i>Intracelluláris Gal-1 (inGal-1) aktivált T sejtekben</i>	48
V. 2. 2. <i>Az inGal-1 apoptózisra érzékenyítő hatása</i>	50
VI. DISZKUSSZIÓ	53
VII. IRODALOMJEGYZÉK	59
VIII. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	69
IX. ÖSSZEFOGLALÁS	72
X. SUMMARY	74
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	76

I. Rövidítések jegyzéke

aktT	humán perifériás aktivált T sejt
aktTGM1^{lo}	humán perifériás aktivált T sejt alacsony sejtfelszíni GM1 szinttel
aktTGM1^{hi}	humán perifériás aktivált T sejt magas sejtfelszíni GM1 szinttel
APC	antigén prezentáló sejt (Antigen-Presenting Cell)
β-CD	β-ciklodextrin
CRD	szénhidrát felismerő domén (Carbohydrate Recognition Domain)
CTX	cholera toxin
DC	dendritikus sejtek (Dendritic Cell)
DIC	differenciális interferencia kontraszt mikroszkóp felvételek (Differential Interference Contrast)
exGal-1	extracelluláris galektin-1
ECM	extracelluláris mátrix
ERK	extracelluláris szignál-szabályozott kináz
FITC	fluoreszcein izotiocianát
Gal-1	galektin-1
GM1	monoszialotetrahexoszil gangliozid
HeLa^{Gal-1}	Gal-1 transzfektáns, Gal-1-et kifejező HeLa
HeLa^{mock}	üres vektorral transzfektált, Gal-1-et nem kifejező HeLa
inGal-1	intracelluláris galektin-1
J	Jurkat T sejt vonal
J45.01	CD45 hiányos Jurkat T sejt vonal
J^{Gal}	galektin-1-et kifejező Jurkat T sejt vonal
J.GM1^{lo}	Jurkat T sejt alacsony sejtfelszíni GM1 szinttel
J^{mock}	galektin-1-et nem kifejező, üres vektorral transzfektált Jurkat sejt vonal
KOmAktT	galektin-1 génkiütött egértörzsből származó perifériás aktivált T sejt
lak	laktóz
mAktT	egérből származó perifériás aktivált T sejt
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex)
NOD	nem elhízásos diabétesz (Non Obese Diabetes)
PBMC	perifériás mononukleáris sejtek (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PE	phycoerythrin

PHA	phytohemagglutinin-M
PS	foszfatidil-szerin
P-Tyr	foszfo-tirozin
rGal-1	humán rekombináns galektin-1
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (Sodium Dodecil Sulfate)
SLE	szisztémás lupus erythematosus
T1D	1-es típusú, autoimmun diabétesz (Type-1 Diabetes)
TCR	T sejt receptor (T Cell Receptor)
Th1	I-es típusú segítő T sejt (T helper I)
Th2	II-es típusú segítő T sejt (T helper II)
Th17	IL-17-et termelő segítő T sejt (T helper IL-17)
Tr1	1.-es típusú regulátoros T sejtek (T regulatory I)
Treg	regulátoros T sejt

II. Bevezetés

II. 1. A galektinek, a galektin-1 (Gal-1) szerkezete

A galektinek, a szénhidrát kötő lektinek egy népes csoportját képviselik az élő szervezetekben, a gerinctelen szivacsoktól a legfejlettebb gerincesekig is előfordulnak¹, és sokrétű biológiai funkciót töltenek be. Szerepük van többek között a korai fejlődési folyamatokban², az immunsejtek szabályozásában³, és a potenciális patogének felismerésében, megsemmisítésében⁴. Az egyes fajok között nagymértékű homológiát mutató szénhidrát-felismerő doménjeik (CRD) révén β -galaktóz cukor motívumhoz kötődnek^{5,6}, és ez alapján három nagy csoportba oszthatók⁷. A proto típusú galektinek egy CRD-t⁸, a tandem-ismétlődésűek két eltérő CRD-t⁹, a kiméra típusúak egy CRD mellett egy nem-szénhidrát jellegű ligand kötő domént¹⁰ tartalmaznak. A legtöbb galektin oligomerizációra képes, emlősökben eddig 19 csoporttagot azonosítottak, ebből 13 fejeződik ki humán szövetekben¹¹.

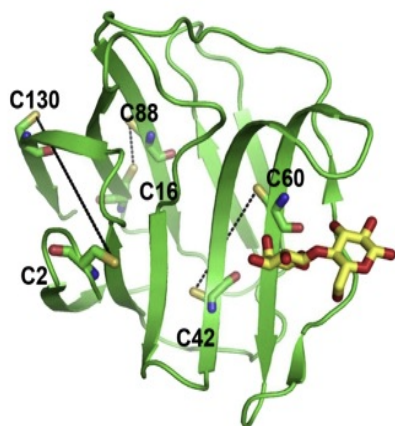
A galektin-1 (Gal-1) proto típusú galektin, a fehérje család legkorábban azonosított tagja¹², egy 135 aminosavból felépülő 14,5 kDa molekulatömegű globuláris fehérje, melyben két egymással szembe futó β -redő alakít ki cukormolekula kötő β -szendvics térszerkezetet¹³. A szénhidrát kötő zsebbel ellentétes oldalon amino és karboxi terminális hidrofób aminosavakon keresztül dimerizációra képes (II. 1. Ábra)⁶, a monomer-dimer forma átalakulásának reverzibilis egyensúlyában (fiziológiásan Kd megközelítőleg $7 \mu\text{M}$ ¹⁴), az asszociáció/disszociáció kinetikájára a koncentráción kívül⁶ a ligand kötés is hatással van: alacsony koncentrációban és ligand hiányában a disszociáció sebessége nő¹⁵. A dimer forma nagyobb affinitással köti a cukormolekulát mint a monomer¹⁶, és nagy valószínűséggel szükséges a keresztköti lektin funkciók betöltéséhez^{17,18,19}.

II. 1. Ábra: Gal-1 homodimer molekula szerkezeti képe. A monomerben, két egymással szembe futó β -redő (kék és lila színnel jelölve) β -szendvics térszerkezetet képez, amibe a β -galaktozid cukor molekula illeszkedik. A monomer forma a cukorkötő zsebbel ellentétes oldalon képes dimerizációra (Camby és mtsai nyomán²⁰).



A Gal-1 meglehetősen érzékeny mikro környezetének redox állapotára²¹, cukorkötő szerkezetének megtartásához redukált környezetet igényel. Aminosav sorrendjében hat cisztein is található (II. 2. Ábra, C2, C16, C42, C60, C88, C130), mely aminosavak kén tartalmú tiol csoportjai könnyen oxidálódnak és intramolekuláris diszulfid híd (II. 2. Ábra) kötések kialakításával^{22,23} megváltoztatják a fehérje térszerkezetét²⁴. Igazolták, hogy az oxidálódott Gal-1 a konformációváltozás következtében nem képes laktóz kötésre²⁵, és ennek feltehető oka a C16 és C88 között kialakuló diszulfid híd kötés²². Ebben az esetben, a cukorkötésért felelős, két egymással szembe fordított β -redőben elhelyezkedő arginin és glutamin interakciója gyengül²². A monomer-dimer egyensúly befolyásolhatja a Gal-1 oxidációra való érzékenységét, mert a dimerizációra képtelen C2S és V5D mutációkat hordozó Gal-1¹⁸ fokozott érzékenységet mutatott az oxidációra²⁶. Kimutatták továbbá, hogy a ligand kötése részben megvédte a Gal-1-et az oxidációtól²⁷, és csökkentette a disszociációt²⁶.

MAC^{C2}GLVASNL NLKPGEC^{C16}LRV RGEVAPDAKS FVLNLGKDSN NL^{C42}LHFNPRF
 NAHG DANTIV ^{C60}NSKDGGAWG TEQREAVFPF QPGSVAEV^{C88}ITFDQANLTVK
 LPDGYEFKFPN RNLNLEAINY MAADGDFKIK ^{C130}VAFD



II. 2. Ábra: A Gal-1 aminosav sorrendje a ciszteinek (sárga) és a CRD-t meghatározó aminosavak (szürke) feltüntetésével. Alul a ciszteinek között prediktálható intramolekuláris diszulfid hidak (fekete vonal) ábrázolása az oxidált Gal-1-ben (UniProt adatbázis, és Yu és mtsai nyomán²¹).

Az egyes galektinek más-más glikán módosulatok iránti kötődési „preferenciájának” nagy jelentősége van^{28,19}, ez határozza meg, hogy mely glikozilált molekulákkal kerülnek interakcióba. A Gal-1 jellemzően az N (fehérjék aszparaginjához kapcsolt) és O (fehérjék hidroxil oldalláncához kapcsolt) glikánok N-acetil-laktózámin diszaharidjához kötődik, és aviditása nő a komplex poliszaharidokhoz, ahol az antenna-szerű elágazás növeli az affinitást (bár csak három ágig)²⁹. A cukormolekulák szerveződésén kívül az utolsó, terminális glikán szerkezete is befolyásolja a Gal-1-glikán kapcsolatot: az α 3 szialilált, és az α 2 fukoziált laktózámin erősítő, de az α 2,6 szialilált és α 3 fukoziált verzió gátló hatású¹⁶. Megállapításra került az is, hogy a Gal-1 jobban

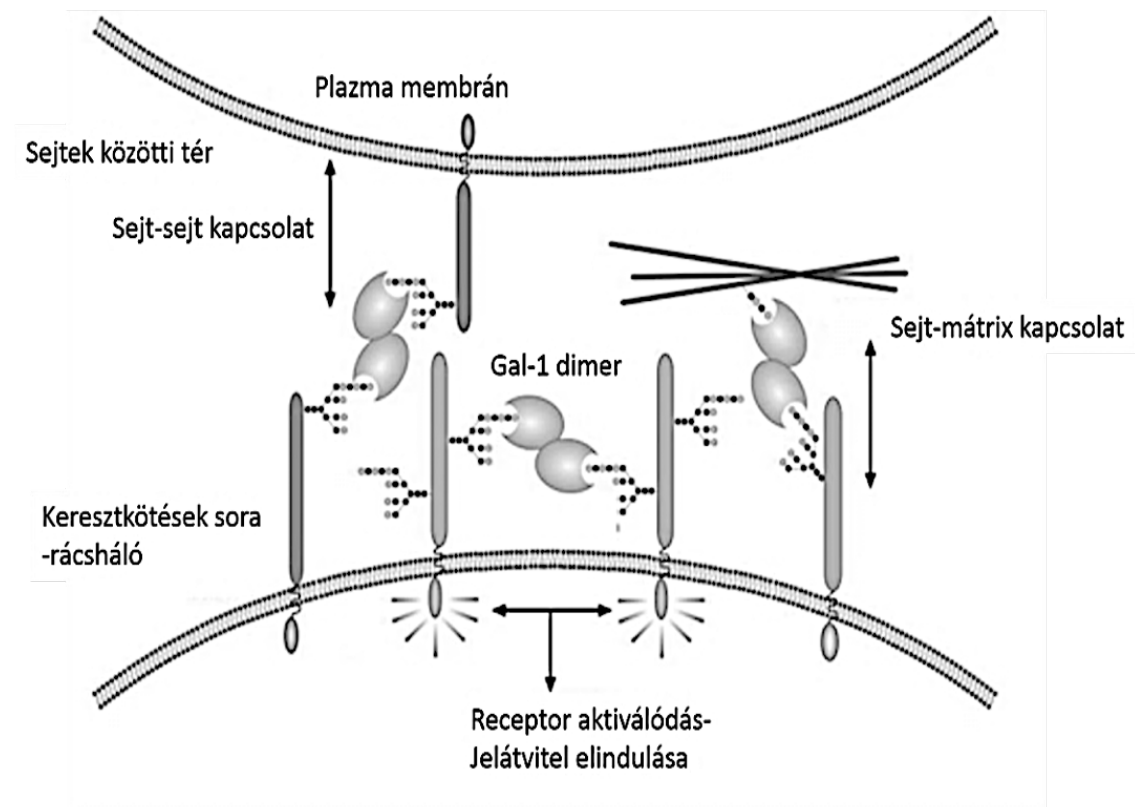
kötődik a felülethez kötött szaharidokhoz (sejtfelszín, extracelluláris mátrix) mint az oldatban lévőkhöz³⁰.

A koncentráció, a dimerizáció, a redox állapot, a glikolizáltság változásainak együttes függvényében a Gal-1 sokféle funkció beteljesítésére képes³¹.

II. 2. A Gal-1 általános funkciói

A Gal-1 modulálja a szignalizációs útvonalakat azáltal, hogy sejtfelszíni glikozilált receptorok kötésével, keresztkötésével megváltoztatja azok csoportokba szerveződését³², endocitózist³³, aktivációs küszöbértékét³⁴, végső soron ezáltal befolyásolja a sejtek aktivációját, differenciációját³⁵ és életképességét³⁶.

A Gal-1 modulálja a sejt adhézióját³⁷ és migrációs³⁸ képességeit is, ugyanis a sejtfelszíni integrinekhez (pl.: $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$) és az extracelluláris mátrixot alkotó (ECM) fibronektinhez, lamininhoz, vitronektinhez²⁰ is kötődik, és így hozzájárul a sejt és az ECM, illetve a sejt-sejt közötti kapcsolat kialakításához³⁹ (II. 3. Ábra).



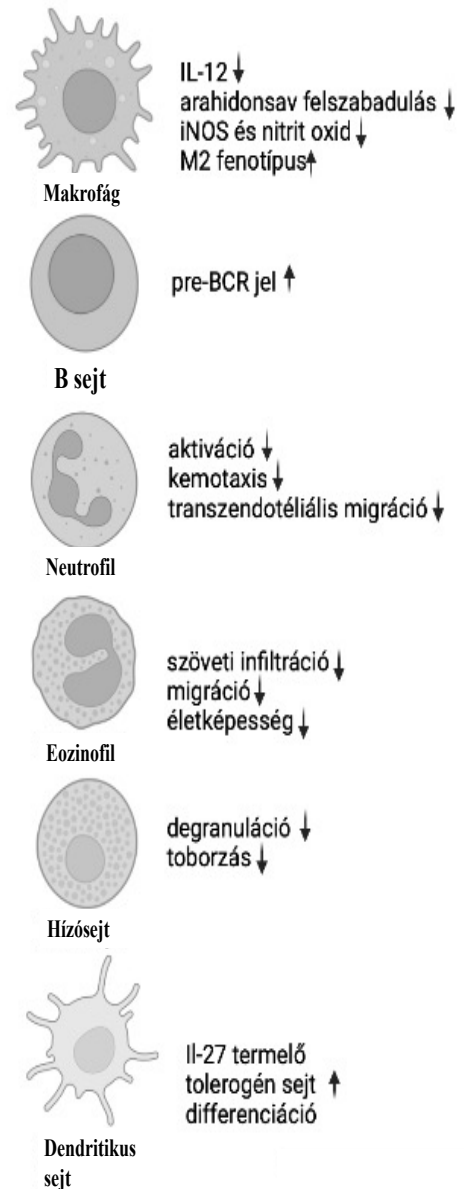
II. 3. Ábra: A Gal-1 lektin funkciói: A Gal-1 kötődik a sejtfelszíni, vagy az extracelluláris mátrix glikozilált elemeihez, és így modulálja a szignalizációs útvonalakat, vagy a sejt adhéziós és migrációs képességeit (Cummins és mtsai nyomán⁴⁰).

A fent említett képességekkel a Gal-1 részt vesz az embrionális és a felnőtt szervek differenciálódásában és fejlődésében²⁰, az immunsejtek működésének szabályozásában²⁸, és az érképződésben⁴¹.

Differenciáció: Az embriogenezis során, már a pár napos embrióban is azonosították expresszióját⁴², és kimutatták, hogy fokozza a trofoblaszt sejtek adhézióját és invázióját⁴³, továbbá az endometriumon található mucin-1-hez kötődve segíti a blasztocita megfelelő beágyazódását⁴⁴. A terhesség első trimeszterében a kötőszövetben, a sima és harántcsíkolt izmokban, a bőrben, az ivarmirigyekben, a pajzsmirigyben és a vesékben tranziensen expresszálódik⁴⁵, és valószínűleg a szöveti átrendeződésekben van leginkább funkciója⁴⁶. Csontvelőben, a hematopoézishez szükséges mikrokörnyezet fenntartásában szerepet játszó mezenchimális őssejtek és endotél sejtek⁴⁷ nagymértékben Gal-1 pozitívak. Kimutatták, hogy a lektin nemcsak a speciális sejt-sejt kapcsolat fenntartásában fontos⁴⁸, hanem direkt, és bifázikus hatást is kifejt a vérképző őssejtekre, kis koncentrációban serkenti, nagy mennyiségben gátolja azok osztódását⁴⁹. A csontvelői stroma sejtek a limfociták érési folyamatait is segítik. Igazolták, hogy a Gal-1 a pre-B sejt receptor (pre-BCR) ligandja, továbbá a stroma sejt - pre-B sejt szinaptikus kapcsolatban fokozza a pre-BCR klaszterba szerveződését, mely felerősíti a pre-B sejtek expansziójához és fejlődéséhez kritikus aktivációs szignált⁵⁰. A Gal-1 a neuronhálózat és izomszövet fejlődésében is szerepet játszik, a sejt - ECM kapcsolat eltérő regulációjával. Fejlődő agyban erősítve az idegsejt - sejt közötti állomány kapcsolatot serkenti az axonok növekedését, így hozzájárul a szaglópályák megfelelő kialakulásához⁵¹, az izomsejtek miotubulussá történő átalakulásakor a mioblasztok citoplazmájában felhalmozódó, majd stimulusra externalizálódó Gal-1 pedig negatívan befolyásolja az izomsejt - ECM kontaktust, és ezzel fúzióra készíti a sejteket⁵².

Immunreguláció: A Gal-1 jelentős immunszuppresszív fehérje, szerepe van a gyulladáshoz vezető folyamatok mérséklésében és az immuntolerancia kialakításában, ennek megfelelően kifejeződik a gyulladás helyén a lecsengő szakaszban, az immunrendszer centrális (timusz, csontvelő, ahol érés során a limfociták megtanulják a sajátot tolerálni) és perifériás (nyirokcsomó, lép, máj, ahol érett limfociták a keringésbe kerülve antigénnel találkozáskor válnak válaszképtelenné) tolerancia helyein¹⁹, a szervezet fontos, immunprivilegizált területein, úgymint agyban⁵³, szemben⁵⁴, a reproduktív szervekben⁵⁵, és a placentában⁵⁶. Az immunsejtek közül a tolerogén dendritikus sejtek⁵⁷, az aktivált T és B sejtek^{58,59}, az aktivált és gyulladáshoz vezető makrofágok⁶⁰, a regulátoros T sejtek (Treg)⁶¹, a $\gamma\delta$ T sejtek⁶², és a természetes ölő sejtek (Natural killer, NK sejtek)⁶³ termelik.

Immunszuppresszív jellegét leginkább T sejt ölő és reguláló képessége révén fejt ki (részletesen lásd **II. 4. és 5. fejezet**), de hatással van más immunsejtekre is (**II. 4. Ábra**)⁶⁴. Csökkenti a makrofágok gyulladásos reakcióit, mint az arachidonsav és prostaglandin E2 felszabadulást⁶⁵, az indukálható nitrogén monoxidáz (iNOS) aktivitását⁶⁶, az IL-12 gyulladásos citokin termelődését, továbbá az L-arginin metabolizmus szabályozásával, elősegíti az M2-es irányú makrofág polarizációt (gyulladás csökkentő és szöveti regeneráló csoport)⁶⁶. Ezen felül, akadályozza a neutrofil granulociták aktivációját, kemotaxisát és ereken keresztül történő kijutását⁶⁷, eozinofil granulociták migrációját⁶⁸ és a hízó sejtek degranulációját akut gyulladásban⁶⁵. Hozzájárul a tolerogén dendritikus sejtek differenciálódásához, mely sejtek IL-27 termelésükkel gyulladás csökkentő IL-10 citokin szekréciót idéznek elő T sejtekben⁵⁷. Hatással van B sejtekre is, bár nem feltétlen szuppresszív értelemben. Erősíti a pre-BCR szignált fejlődésük során, az effektor fázisban pedig elősegíti a plazmasejtté és memóriasejtté történő differenciációt⁶⁹.



II. 4. Ábra: Gal-1 immunreguláló hatása különböző immunsejtekre (Sundblad és mtsai nyomán)⁶⁴.

Az immuntolerancia egyik markáns példája terhesség esetében az anyai immunrendszer alkalmazkodó képessége az alloantigéneket prezentáló magzathoz, a határfelületen kialakuló elfogadás egyik finomhangoló eleme a Gal-1, melynek progeszteron által szabályozott termelődése igazodik a női ciklushoz és a terhességhez⁵⁵. Mind a megvastagodott méhnyálkahártya (decidua sejtek) mind a placenta (trofoblaszt sejtek) kifejezi, de már a menstruációs ciklus második szakaszában növekedni kezd a mennyisége, és részt vesz a terhességre való felkészülésben. Hozzájárul a decidua és a

trofoblaszt sejtek differenciációjához, az utóbbi sejtípus inváziós és migrációs képességeit fokozza is⁴². Differenciációs és immunszuppresszív funkciói mellett kimutatták, hogy fontos pro-angiogén faktor, jelentősen elősegíti a nyálkahártya és a méhlepény megfelelő erezettségének kialakítását^{2,55}.

Angiogenezis: Egészséges felnőtt szervezetben angiogenezis alig (méhnyálkahártya és placenta⁷⁰), patológiásan azonban számos esetben (szöveti sérülés, ishémia, gyulladás, tumor) előfordul⁷¹. Az új erek képződése már meglévő kapillárisokból történik, citokinek, növekedési faktorok vagy hipoxia hatására aktiválódó belső endotél sejtek proliferációjával, migrációjával, mely folyamatban igazolt faktor a Gal-1⁷². Az endotél sejtek IL-1 β , IFN γ , TNF α , LDL, LPS, Cathepsin L hatására megnövekedett Gal-1 expressziót mutatnak, és az aktivált sejtek felszínén megváltozik a glikozilációs mintázat is. Többek között az α 2,6 szialilált N-acetil laktózin szintje is lecsökken, ami elősegíti a Gal-1 kötődését⁷¹ a VEGFR2-hoz és ko-receptorához a neuropilin-1-hez. A lektin megváltoztatja a receptorok szegregációját, késlelteti a VEGFR2 endocitózist⁷³, ami a receptor megnövekedett foszforiláltságához, a downstream szignál felerősítéséhez, végső soron az endotél sejtek proliferációjához vezet⁷⁴.

Fentiekben bemutatott fiziológias pleiotrop funkciók ellenére, a Gal-1 homozigóta géniütött egerek fenotípusa nem tér el jelentősen a vad típushoz képest, ami arra utalhat, hogy valószínűleg más faktorok kompenzálják a hiányát⁷⁵. A Gal-1 negatív egerek életképesek, és fertilisek (stresszre nő a vetélések száma⁷⁶), ugyan a korai szaglóiidegi⁷⁷ és izomszöveti fejlődésben⁷⁸ regisztráltak lemaradást, illetve fokozott érzékenységet mutattak ki kísérletesen indukált autoimmun encefalitiszre⁷⁹ és reumatoid artritiszre⁸⁰.

A Gal-1 expresszióját differenciációs és aktivációs szignálok⁵⁸, hipoxia⁸¹, és hormonok⁵⁵ is befolyásolhatják, a szabályozás mikéntje pontosan nem világos, viszont a fehérje termelésének megváltozását számos *patológias elváltozásban* dokumentálták, úgymint gyulladással járó kórképekben (szöveti sérülések, fibrózis, autoimmun megbetegedések) és tumorban⁶⁴.

Különböző típusú és eredetű tumorok esetében írták le a Gal-1 jelentős expresszióját, mint például petefészekrák⁸², méhnyakrák⁸³, melanóma⁸⁴, hasnyálmirigy⁸⁵ és vastagbélrák⁸⁶, és termelődése negatív prognosztikus marker⁸⁷. Újabb kutatások szerint

a tumor mikrokörnyezete is jelentősen Gal-1 pozitív⁸⁸. A rákos sejtek és környezetük sajnos érvényesítik a Gal-1 multivalens hatásmechanizmusát, az általuk kifejezett lektin serkenti a celluláris aggregációt (feltételezhetően a mucin-1-hez kötődve), koncentrációtól függően, bifázikusan szabályozza a sejt - ECM kapcsolatot, növeli a migrációs és inváziós képességeket, elősegíti a tumor angiogenezisét továbbá kivédi az immunrendszer támadásait⁸⁹.

Szöveti sérülések után kialakuló gyulladásos folyamatok következtében termelődve⁹⁰, a Gal-1 a gyógyulási folyamat mindegyik fázisában szerepet kap. Az α IIb β 3 integrin csoportosulását okozza a vérlemezkéken, ami azok aktiválódásához, és aggregációjához vezet. Csökkenti a sebész környezetében létrejövő gyulladást a már korábban bemutatott immunsejt reguláló funkcióival, itt kiemelő a szöveti regeneráló M2-es makrofág polarizációs hatása. Megfigyelték, hogy a Gal-1 miofibroblaszt aktivációt, migrációt és proliferációt indukált a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oxidáz (NADPH) oxidáz 4 (NOX4) fokozásával a neuropilin-1/ Smad3 jelzési útvonalon keresztül, és szerepe van a neovaszkuláris szabályozásban is⁹¹. Érdekes adat, hogy agyi sérülés esetén a környező aktivált makrofágok által termelt, lektin aktivitással nem rendelkező, oxidált formában lévő Gal-1 vesz részt az axonok regenerációjában⁹².

Különböző gyulladásos autoimmun megbetegedésekben regisztrálták a Gal-1 megnövekedett vagy lecsökkent expresszióját⁶⁴, és a betegségeket modellező állatkísérletek pedig rámutattak a Gal-1 gyulladáscsökkentő, terápiás alkalmazásának lehetőségére. Központi idegrendszeri gyulladás esetében, a T sejtek, dendritikus sejtek, mikroglia, asztrociták és oligodendrociták, szabályozásával befolyásolta a kísérletes autoimmun encephalomyelitis (sclerosis multiplex rágcsálómódelje) kialakulását, súlyosságát és megszűnését⁹³. A rheumatoid arthritisz állatmodelljében, kollagénnel indukáltak ízületi gyulladást, és Gal-1 terápia hatására a betegség kifejezett javulása volt tapasztalható, lecsökkent a szérum kollagén elleni antitest szintje is⁹⁴. A nem elhízásos, 1-es típusú autoimmun diabéteszben (T1D) a hasnyálmirigy sejtek pusztulása főként az effektor T sejtek túlzott aktiválásának eredménye, így a Gal-1 T sejt ölő képessége révén ígéretes terápiás szerként merült fel. NOD egerekben (Non-Obese Diabetic " T1D állatmodell) a szolubilis Gal-1 kezelés megelőzte a betegség kialakulását, ami az IL-10- és IL-4-et szekretáló T sejtek számának növekedésével volt magyarázható⁹⁵. A beteg egerek effektor T sejtjeiről kimutatták, hogy rezisztensek a regulátoros T sejtek immunszuppresszív hatásaival szemben, és ennek egyik oka a sejt felszíni GM1 hiánya lehet⁹⁶.

II. 3. Gal-1 hatása T sejtekre

A Gal-1 T sejtekre kifejtett hatása a legszéleskörűbb, szabályozza ezen sejtek életképességét, differenciációját, adhézióját, migrációját, és kihat a citokin termelésükre is⁶⁴.

Prolifерáció: A nyirokcsomó sztrómasejtek által szekretált Gal-1-ről kimutatták, hogy fokozta a naív T sejtek proliferációs képességeit, és támogatta a túlélésüket⁹⁷.

Differenciáció: Azonosították a Gal-1 CD69-en keresztül Th17 sejt differenciációhoz hozzájáruló funkcióját⁹⁸.

TCR moduláció: A T sejt receptor (TCR) és koreceptorai által kiváltott T sejt jelátvitel negatív szabályozása fontos szerepet játszik a T sejtek fejlődésében és aktiválásában és döntő képességű a tolerancia kialakításában⁹⁹. T sejtek érési folyamatuk során a timusz kéreg állományából a velő felé haladva epitél és dendritikus sejtekkel kontaktusba kerülve végleges receptor repertoárjukat folyamatos szomatikus génátrendeződéssel alakítják ki, minek következtében útjuk végére a kezdeti állomány közel 95 %-a pusztul el. A CD4CD8 kettős negatív sejtek sikertelen génátrendeződés esetében nem kapnak megfelelő pre-TCR szignált, ebben az esetben, ez vezet apoptotikus sejthalálhoz. A jó TCR-t kialakító, ezáltal túlélő kettős negatív sejtek tovább fejlődnek kettős pozitív sejtekké, és közülük először a MHC-vel nem reagáló (nem funkcionális), majd a saját antigéneket felismerő (autoreaktív) sejtek táborát vesztik el¹⁰⁰. Az előbbi a pozitív (aki reagál, az él túl), az utóbbi a negatív (aki nem reagál, az él túl) szelekciós folyamat. *In vitro* kísérletekkel kimutatták, hogy a timusz epitél sejtek által expresszált Gal-1 elősegíti mind a kettős negatív mind a kettős pozitív éretlen timociták apoptózisát^{101,102}, továbbá kedvez a TCR közvetített negatív szelekciónak azáltal, hogy elősegíti a gyors és tranziens extracelluláris szignál-szabályozott kináz (ERK) aktivációt, miközben a pozitív szelekció során antagonizálja az ERK aktivitást (**II. 5. Ábra**), vagyis a Gal-1 kétféleképpen szabályozhatja a TCR jelátvitelt a negatív vagy pozitív szelekció során áteső timocitákban¹⁰³. Leírták továbbá, hogy a Gal-1 képes modulálni a jelátviteli folyamatot az immunológiai szinapszis helyein (**II. 5. Ábra**) feltehetőleg úgy, hogy változtatja a TCR és a kostimulátor csoportosulást. Antagonizálja a kostimulációt igénylő TCR-jeleket, mint például a proliferációt és az IL-2 termelést, miközben lehetővé teszi azokat a TCR válaszokat, mint például az apoptózist, amelyek nem igénylik a kostimulációt¹⁰⁴.

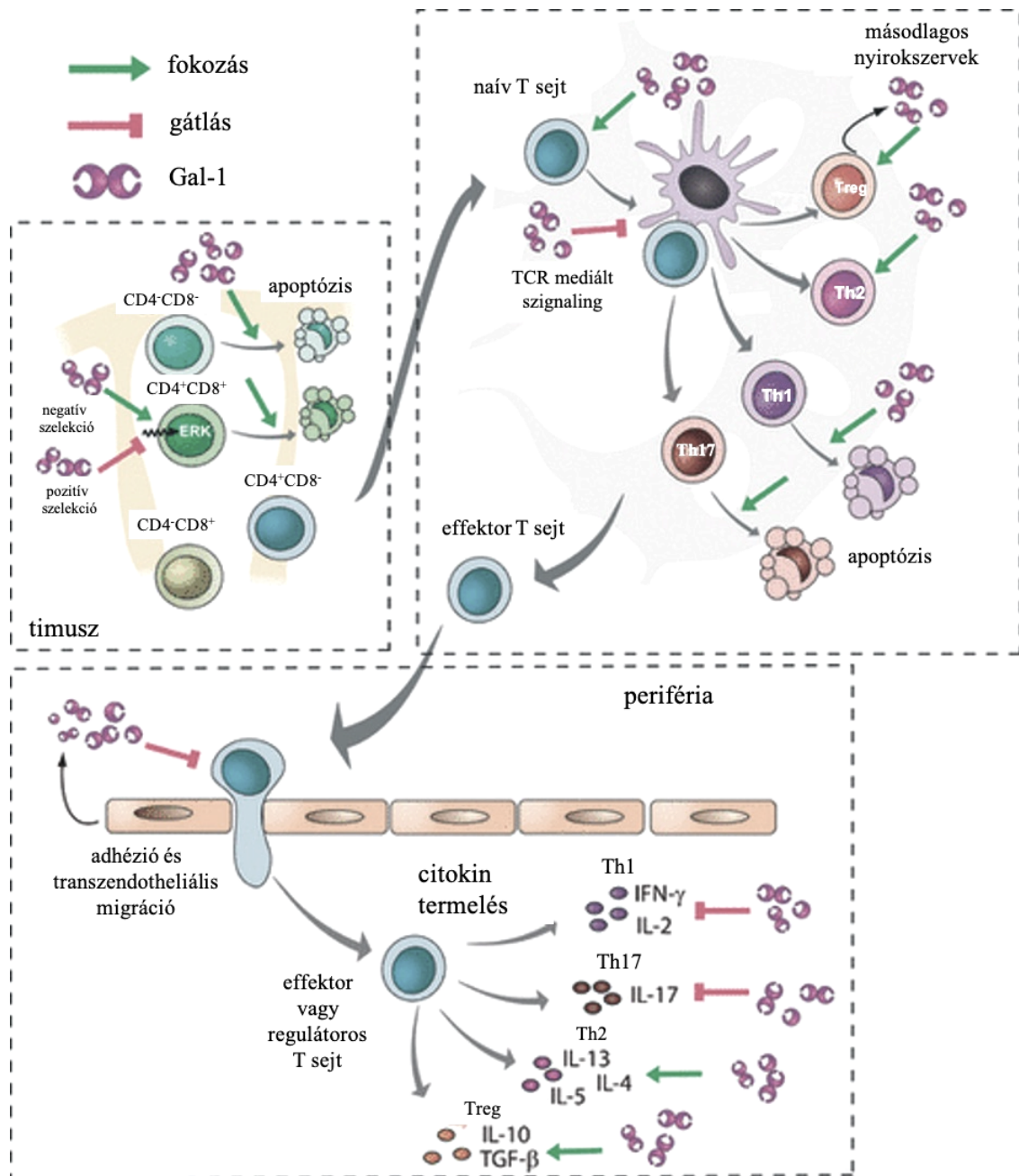
Apoptózis: A Gal-1 aktivált T sejtek apoptózisát váltja ki^{105,106}, de az egyes T sejt alpopulációkat vizsgálva megállapításra került, hogy nem minden alcsoportra apoptotikus, és ennek oka az eltérő sejtfelszíni glikozilációs mintázat az egyes populációk között¹⁰⁷. A Gal-1 sejthalált indukál a Th1-es (I-es típusú segítő T sejt) és Th17-es (IL-17-et termelő segítő T sejt), de a Th2-es (II-es típusú segítő T sejt) sejteken nem (Bővebben: **II. 4. fejezet**).

Citokin termelés: A gyulladáskeltő és csökkentő citokinek egyensúlyának felborulása káros következményekhez vezethet. A Gal-1 a Th2-es, gyulladáscsökkentő citokin profilt (IL-4, IL-5 és IL-13) erősíti, ez egyrészt magyarázható a Th1 és Th17 effektor sejtekre kifejtett szelektív apoptotikus hatásával, másrészt közvetlenül is elnyomja a Th1 típusú (IFN γ , IL-2) és elősegítheti Th2-eredetű citokinek termelődését^{108,109} (**II. 5. Ábra**). Kimutatták, hogy a T sejtek alacsony koncentrációjú rekombináns Gal-1-gyel történő kezelése csökkenti a gyulladást elősegítő Th1 citokin termelést anélkül, hogy befolyásolná a T sejtek életképességét¹¹⁰. Számos jelentés igazolta az IL-10 (gyulladáscsökkentő, és Th1-es citokin gátló) termelődésének kiváltását aktiválatlan és aktivált CD4⁺ és CD8⁺ T sejtekben a rekombináns Gal-1 *in vitro* hatására¹⁰⁸ és *in vivo* beadása után¹¹¹.

Regulátoros T sejt (Treg): A CD4⁺CD25⁺ szabályzó T sejtek funkciója immunszuppresszív és gyulladáscsökkentő, megakadályozzák az autoimmun és a krónikus gyulladási folyamatok kialakulását¹¹². A Treg specifikus immunszuppresszív molekulák azonosítását célzó transzkriptomikai és proteomikai analízisek a Gal-1 szignifikáns expresszióját mutatták ki egér és humán sejtekben, továbbá Garin és munkatársai azt a következtetést vonták le *in vitro* kísérleteikből, hogy a Treg immunszuppresszív aktivitásában nagy szerepe lehet a Gal-1-nek, ugyanis anti-Gal-1 neutralizáló (semlegesítő) antitestet alkalmazva blokkolódtak a Treg funkciók, és bár a Treg sejtek száma a Gal-1 KO egerekben hasonló volt a vad típushoz, szuppresszív potenciáljuk *ex vivo* jelentősen csorbult¹¹³. Wang és munkatársai megállapításai szerint, a mechanizmusban amellyel a Treg-ek gátolják az effektor T sejteket, kritikus faktor az effektor sejtfelszínén lévő Gal-1 kötő GM1 gangliozid¹¹⁴. További vizsgálatok során autoimmun szemgyulladás¹¹⁵ és stressz okozta terhesség¹¹⁶ *in vivo* modellekben azt tapasztalták, hogy a Gal-1 terápiás adására bekövetkező T sejt tolerancia helyreállása összefügghet az IL-10-et és TGF β -t termelő CD4⁺CD25⁺ Treg jelentős sejtszám növekedésével (**II. 5. Ábra**)³¹, mindazonáltal *in vivo* kísérletek arra utalnak, hogy a Gal-

l nem egyformán képes hatni az egyes Treg alcsoportokra a differenciációs és proliferációs képességeket tekintve¹¹⁷. A Gal-1-gyel összefüggésbe hozható IL-10 termelő Treg funkciók felerősítése ígéretes célpont lehet az allograft kilökődés megelőzésére, illetve az anya - magzat tolerancia, és a patogén okozta gyulladásos reakciók javítására¹¹⁸, gyengítése pedig erősebb tumorimmunitást vonhat maga után¹¹⁹.

Adhézió, migráció: A sejtfelszíni szénhidrátok és specifikus glikánkötő fehérjék meghatározó szerepet játszanak a limfociták homing-jában, hogy eljussanak a másodlagos nyirokszervekbe, gyulladt szövetekbe, vagy a rákos sejthez¹²⁰. Gyulladáscsökkentő hatásával összhangban a Gal-1 gátló szerepét írták le T sejt adhézióban és transzendenteliális migrációban (**II. 5. Ábra**). A Gal-1 negatívan befolyásolta az aktivált T sejtek extracelluláris mátrix glikoproteinekhez történő kapcsolódását¹²¹, és az endotélsejtek által termelt Gal-1 szintén gátolta a T sejtek transzendenteliális migrációját a sejtfelszíni CD43 csoportosításával¹²². Norling és munkatársai kísérleteikben kis interferáló RNS-t (siRNS) használtak Gal-1 csendesítésére és megállapították, hogy a Gal-1 korlátozza a T sejtek kitapadását az aktivált endotél sejtekhez, továbbá *in vivo* Gal-1 KO egerekben megnövekedett migrációt tapasztaltak a limfoid szervek és a gyulladt szövetek irányába a vad típusú egerhez képest¹²³. Egy kutatás arról számolt be, hogy a T sejt felszíni GM1 lipid raftok keresztkötése, átszerveződése szabályozhatja a $\beta 1$ integrin funkcióját, így a limfocita migrációját¹²⁴.



II. 5. Ábra: A Gal-1 szabályozó hatásai T sejtekre. A Gal-1 számos ponton befolyásolja a T sejt homeosztázist, kihat a túlélésre, a TCR-közvetített jelátvitelre, a T sejt migrációra és a citokin-szekrécióna egyaránt. Ezek a folyamatok a T sejtek teljes élettartama alatt játszódnak le, a Gal-1-nek szerepe van a timuszban zajló T sejt érési folyamatokban, a másodlagos limfoid szervekben a differenciálódásban effektor vagy szabályozó alcsoportokká, valamint az effektor T sejtek funkcióinak végrehajtásában vagy szabályozásában a perifériás szövetekben (Rabinovich és mtsai nyomán)³¹.

II. 4. Gal-1 indukált T sejt apoptózis

A Gal-1 indukált T sejt apoptózis szakirodalma több ponton ellentmondásos, ennek feltételezhető oka, hogy a T sejtek apoptotikus érzékenysége több szinten kalibrálódhat, befolyásoló tényező a mikrokörnyezet redox állapota, a sejt felszín glikoziláltsága, a Gal-1 koncentrációja és lokalizációja³¹.

Redox állapotok / lektin funkció: Amennyiben a környezet redox állapota a Gal-1 oxidálódását eredményezi, az elveszti cukorkötő szerkezetét, ezáltal az ahhoz kapcsolódó lektin funkciókat²¹, vagyis a Gal-1 indukált T sejt apoptózis függhet a redox állapot ingadozásaitól is³¹.

Sejtfelszíni glikoziláltság / receptorok: Bár sok sejtfelszíni glikoprotein tartalmaz N-acetil-laktóزامint, a Gal-1 csak a megfelelő láncvégű és elágazású N- és O-glikozilált elemek csoportjához kötődik³¹. Ezek azokon a sejteken vannak, melyek képesek a megfelelő glikozidáz és glikozil-transzferáz enzimek expresszáására¹²⁵. A glikoziláltsági státusz folyamatosan változik a T sejt élete során, például aktiválódáskor, differenciálódáskor, és az, hogy a Gal-1 apoptózist vált ki a Th1-es és Th17-es, és aktivált CD8+ T sejteken¹¹¹, ugyanakkor a Th2-es és a naív T sejteken nem, többek között az eltérő sejtfelszíni glikoziláltsággal magyarázható. A Th2-es sejtek felszínén kimutatták az α 2,6 szialilált terminális glikán verziókat, amik gátolják a Gal-1 kötődését¹⁰⁷.

Eddigi ismereteink szerint a CD2, CD3, CD4, CD7, CD43, CD45, CD69^{126,102,127,98} molekulákat, és a GM1 glikolipidet azonosították, mint Gal-1 kötőpartnert T sejtek felszínén¹²⁵.

Az elsők közt lévő vizsgálatok azt mutatták, hogy a CD45-nek van szerepe a Gal-1 indukálta apoptotikus jel továbbításában^{105,128}, de későbbi kísérletek szerint, annak ellenére, hogy a Gal-1 kötődik a CD45-höz, nem feltétlen szükséges a sejthalálhoz^{126,129}, illetve mind pozitív, mind negatív módon is befolyásolja a Gal-1 indukálta T sejt apoptózist¹³⁰. Az eltérések lehetséges oka, hogy a T sejteken kifejeződő CD45 receptor típusú tirozin foszfátáz, a sejt érettségi vagy aktiválódási állapotától függően az extracelluláris részben eltérő izoformában, és eltérő N- és O-glikoziláltságban van jelen¹³¹. A szakirodalom, a mai napig nem tud egyetlen funkcionális receptort megjelölni, például a CD7 is felmerült, mint lehetséges apoptózist közvetítő sejtfelszíni molekula, mert a CD7-et nem kifejező sejtek rezisztensnek bizonyultak Gal-1-re¹³². Chung és munkatársai elmélete, hogy a Gal-1 nem egyetlen specifikus receptoron keresztül hat, hanem a membrán mikrodomének átszervezésével szabályozza a TCR jelátvitelt az

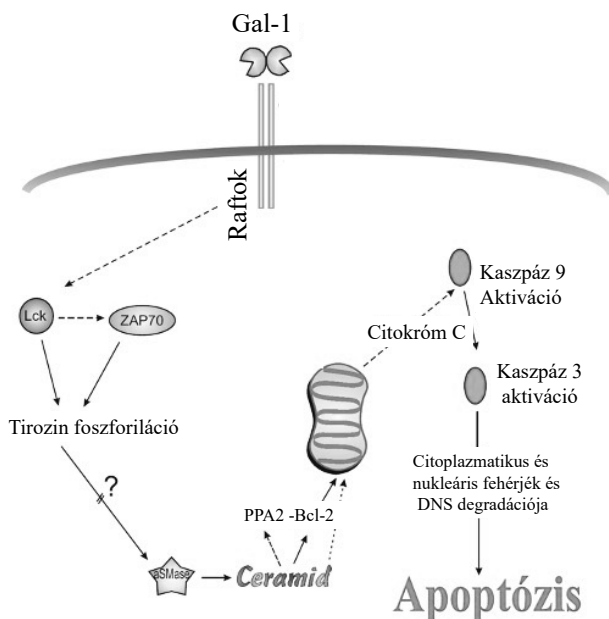
immunológiai szinapszisok helyén, a lipid raft elemek (GM1, CD4), a raftba transzlokálható (CD3) és nem transzlokálódó elemek (CD43, CD45) keresztkötésével¹⁰⁴. Ezt alátámasztja az is, hogy Pace és munkatársai megfigyelték a Gal-1 kötés hatására bekövetkező sejtfelszíni receptorok specifikus mikrodoménekbe történő átrendeződését: a CD45 a CD3-mal, a CD7 a CD43-mal volt együtt kimutatható, és azokon a T sejteken, amelyek nem pusztultak el a Gal-1-re, receptor szegregáció sem történt¹²⁶. Rabinovich és munkatársai több cikkükben javasolják a galektin-glikán rácselméletet, miszerint a galektinek kvázi rácshálónként oligomerizálódva olvassák és kódolják a sejtek felületén szereplő glikán jeleket²⁸.

A Gal-1 kötő GM1¹³³ gangliozid gyakori lipid raft komponens, és számos T sejt funkcióban fontosnak bizonyult¹³⁴. A lipid tutajokról kimutatták, hogy jelentős szerepük van a TCR-en keresztül történő T sejt aktiválásban, és előbbiekkal összhangban megállapításra került az is, hogy aktiválás hatására jelentősen megnő a GM1 expressziója¹³⁵, ugyanez történik differenciálódáskor¹³⁶. Kutatócsoportunk igazolta, hogy a GM1 együtt internalizálódik a Gal-1-gyel, és intracelluláris ko-lokalizációjuk alapján a GM1 gangliozid szerepet játszik az internalizált Gal-1 Golgiba történő szétválogatásában¹³⁷. Kísérletes autoimmun encefalitisz terápiában a GM1 keresztkötése koleratoxin β -vel immunszuppressziót eredményezett, ennek hátterében tesztelték a Gal-1/GM1 „kooperációt” is mind *in vivo* mind *in vitro*, és azt tapasztalták, hogy a betegség javulása mellett, a Treg funkciókat analizálva, a GM1 Gal-1-gyel való keresztkötése fokozta az immunszuppressziót¹³⁸. Érdeemes megjegyezni, hogy a GM1-ben gazdag lipid tutajok keresztkötése integrinen keresztül F-aktin átrendeződéséhez vezethet¹²⁴.

Gal-1 koncentráció / mechanizmus: A T sejt apoptózis mechanizmusát széles körben vizsgálták szolubilis rekombináns Gal-1^{139,140,141} alkalmazásával, az eredmények azonban nagyon ellentmondásosak. Egyes kutatócsoportok szerint a Gal-1 által indukált T sejt apoptózis a kaszpáz-mediált sejthalál mitokondriális típusa^{139,142}, azonban más tanulmányok alapján a mitokondriális depolarizáció nem jár feltétlenül kaszpáz aktiválódással, itt a Bcl-2 alul szabályozását és az AP-1 transzkripció faktor aktiválását, valamint az endonukleáz G transzlokációját írják le a mitokondriumból a sejtmagba, ami a DNS degradációt okozza¹⁴¹. Stowell és munkatársai olyan eredményeket is bemutattak, miszerint a Gal-1 anélkül vált ki foszfatidil-szerin (PS) expozíciót a plazmamembrán külső felületén, hogy apoptózis alakulna ki¹⁰⁸.

Az ellentmondó eredmények nagy valószínűséggel a rekombináns Gal-1 tisztítási technikájából illetőleg az alkalmazott koncentrációból származnak. A szolubilis alacsony (1,8 μM) és magas (18 μM) koncentrációban alkalmazott rekombináns Gal-1 által kiváltott sejthalál mechanizmusát összehasonlítva ugyanis mind az alacsony, mind a magas koncentrációban alkalmazott rekombináns Gal-1 kiváltja a PS expozíciót, a raft tutajok kialakulását és a mitokondriális membránpolarizációt, de a magas koncentrációt alkalmazva az Lck és a ZAP70 jelenlététől független a kaspáz kaszkád aktiválása, tehát az Lck és a ZAP70 csak az alacsony koncentráció hatására aktiválódtak¹⁴³.

Kutatócsoportunk közölte az eddigi legrészletesebb rekombináns Gal-1 indukált T sejt apoptózis mechanizmus leírását, mely kaspáz függőnek bizonyult^{106,142,143}. A korai válaszban tirozin foszforilációs események következnek be, mely folyamat korai kulcsszereplői az intracelluláris p56^{lck}, a továbbiakban Lck, és a ZAP70 tirozin kinázok¹⁰⁶. A receptor-Gal-1 kapcsolódást a sejtmembránban zajló folyamatok kísérik, melyek során az apoptózis egyik markere, a membránban a citoplazma felé tekintő PS kifelé fordul. A továbbiakban az aktiválódó savas szfingomielináz enzim hasítja a szfingomielint, minek következtében ceramid szabadul fel. A ceramid a mitokondrium membránjának depolarizációját váltja ki, a mitokondrium két membránja közötti térből citokróm C szabadul ki, és az Apaf-1 fehérjével és a kaspáz 9-cel apoptozómát képezve a kaspáz 9 aktiválódását okozza. A kaspáz kaszkád utolsó lépéseként az effektor kaspáz 3 aktiválódik, ami után a sejt fehérjéinek és DNS-ének degradációja következik be (II. 6. Ábra)¹⁴².

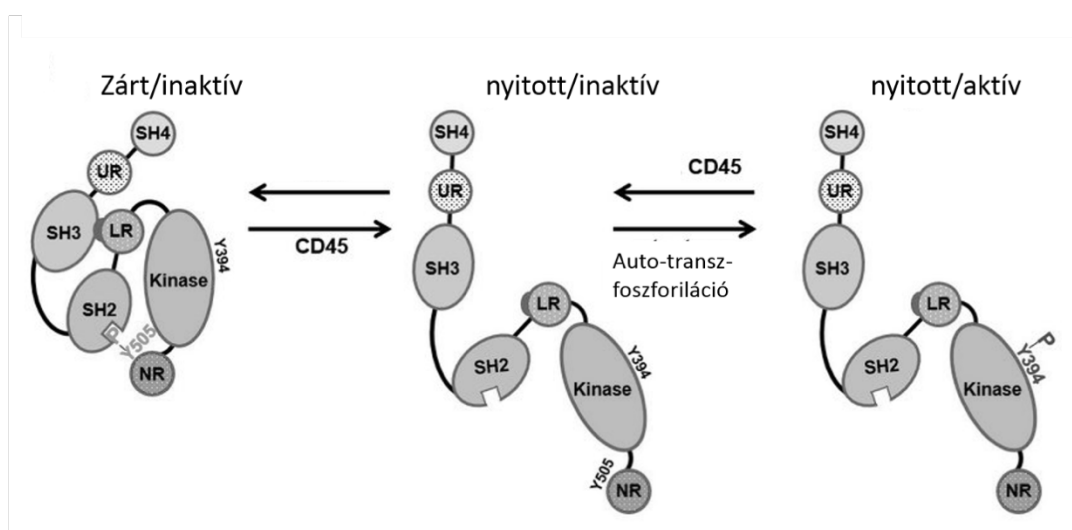


II. 6. Ábra: A szolubilis rekombináns Gal-1 által indukált T sejt apoptózis mechanizmusának leírása. A szaggatott vonallal jelzett nyilak feltételezett lépéseket jelölnek, a folytonos vonallal jelzett nyilakkal nyomán a kísérletekkel bizonyított folyamatok követhetők (Ion és mtsai nyomán¹⁴²).

II. 5. Az Lck

Az Lck 56 kDa molekulatömegű nem receptor típusú, Src tirozin kináz. T limfocitákban aktiválódásához¹⁴⁴, differenciációjához¹⁴⁵, apoptózisához¹⁴⁶ vezető jelátviteli utak eleme. Az N-terminális része mirisztin és palmitil savat hordoz, ami lehetővé teszi az enzim membránhoz történő kapcsolódását¹⁴⁷.

Aktivitását kitüntetett tirozin helyek foszforiláltsági és az enzim konformációs állapota határozza meg (II. 7. Ábra). Az 505-ös tirozin foszforilálásával intramolekuláris kölcsönhatás révén zárt konformáció jön létre¹⁴⁸, az 505-ös tirozin defoszforilációja, amelyet a tirozin-foszfataz CD45 végez, megnyitja a zárt térszerkezetét, így létrejön egy nyitott, de nem aktív enzim. A nyitott konformációban lévő Lck auto- és transz-foszforiláció (394-es tirozinon) következtében aktiválódhat^{148,149}. A CD45 tulajdonképpen a nyitott de inaktív állapotba „tereli” az Lck-t.



II. 7. Ábra: Lck reguláció CD45 által. Lck konformációi és regulációja CD45 által. Az 505-ös tirozinon történő foszforilációt a Csk végzi és zárt inaktív formát eredményez. Ennek a helynek a defoszforilációját a CD45 végzi, mely kinyitja a zárt formációt. Az Lck a 394-es tirozinon történő auto-foszforilációval aktiválódik, és ebből az aktív állapotból a CD45 hatására kerül ismét inaktív állapotba (Bommhardt és mtsai. nyomán¹⁴⁹).

(Lck struktúra: Src homológ domén (SH) 4 (SH4), specifikus domén (UR), Src homológ domén 3 és 2 domén (SH3, SH2), összekötő domén (LR), kináz, és egy negatív regulációs domén (NR))

Az Lck szerepe és működése legrészletesebben a T sejt receptor (TCR) keresztükötése során tanulmányozott. Nyugvó T sejt antigén prezentáló sejtrel (APC) való találkozásánál a TCR jelátvitelt a fő hisztokompatibilitási komplexhez (MHC) kötött megfelelő antigén peptidek felismerése váltja ki. Receptor keresztükötés következtében az Lck kötődik a membránhoz és a T sejt receptor közelében elhelyezkedő CD4 vagy CD8 citoplazmatikus részéhez, és foszforilálja a T sejt receptor CD3 komplex polipeptid láncait¹⁵⁰, ezzel dokkolóhelyet biztosítva a citoplazmatikus ZAP70 tirozin kináznak, melynek aktiválásához szintén az Lck általi foszforilációja szükséges^{151,152}. Az Lck és ZAP70 a továbbiakban egy lipid raft komponens transzmembrán fehérje (LAT) aktivációját idézi elő, mely végsősoron a T sejt aktiválásához vezet¹⁵³.

Bizonyították, hogy a fent vázolt folyamat során a T sejt és az APC között kialakult szoros immunológiai szinaptikus régióban raftokba rendeződnek a TCR szignalizációban részt vevő elemek¹⁵⁴. A kialakult rendezett membrán struktúrájának a létrejöttében specifikus lipidek, úgy mint a koleszterin és a szfingolipidek (például: GM1) vesznek részt, és halmozódnak fel¹⁵⁵. P. W. Janes és munkatársai T sejtekben CD3 keresztükötés után analizálták fluoreszcens konfokális mikroszkóppal az Lck, a LAT, a TCR, és a CD45 ko-lokalizációját a béta-ciklodextrin jelölt raftokkal, és azt a következtetést vonták le, hogy az Lck, a TCR és a LAT a lipidutajokban helyezkedik el, míg a CD45 kizáródik a raftból¹⁵⁶.

II. 6. Gal-1 szekréció, intracelluláris Gal-1 (inGal-1)

A Gal-1 a citoplazmában, szabad riboszómákon szintetizálódik¹⁵⁷ szignál szekvencia nélkül¹⁵⁸, ennek ellenére képes szekretálódni, de nem a klasszikus, endoplazmatikus retikulum (ER) - Golgi útvonalon keresztül¹⁵⁹, aminek feltételezett oka, hogy az ER-ba történő belépés során N-glikán csoport kapcsolódhat a Gal-1-re, mely zavarja, illetve a retikulumban lévő oxidatív mikroökönyezet oxidálja a lektin funkcióhoz szükséges cukorkötő részt¹⁵⁷. A pontos szekréciós mechanizmus nem ismert, de többféle irodalmi adat található rá. Egy munkacsoport feltételezi, hogy szükséges a sejt felszíni molekulák glikoziláltsága, és a sejt felszínre transzlokálódó cukormolekulák „magukkal viszik” a Gal-1-et¹⁶⁰. Popa S.J. és munkatársai más elméletet vallanak, véleményük szerint a szekréció többféle nem konvencionális úton is megtörténhet: ABC transzport pumpákon keresztül, lizoszómákba vagy endoszómákba csomagolva, nagyobb mennyiségben exoszómákba, de kisebb membráncsomagokban, mikrovezikulákban is.

Ebben az utóbbi esetben, a Gal-1 felhalmozódik közvetlenül a membrán alatt, és egy kritikus pont után lefűződik a membránbuborék csomag¹⁶¹. A mikrovezikulák Gal-1 tartalmát számos esetben igazolták¹⁶².

Az intracelluláris endogén Gal-1-et a citoplazmán kívül számos esetben a sejtmagban is kimutatták^{163,164}, de van példa a kizárólagos citoplazmatikus jelenlétre is²⁷. Kísérletesen még nem igazolták, de PSORT program predikció alapján feltételezik a Gal-1 mitokondriális előfordulását is¹⁶⁵.

Az intracelluláris Gal-1 (inGal-1) szerepe CRD független, de protein-protein interakciókhoz kötött, valószínűleg állványfehérjeként vesz részt a jelátviteli utak citoplazmatikus oldalán¹⁶⁶.

Az inGal-1 igazolt interakciós partnere a H-Ras, melynek farnesil²¹ csoportján keresztül elősegíti annak membránhoz kapcsolódását, így azt folyamatosan aktív állapotban tartva hozzájárul a sejt tumoros átalakulásához¹⁶⁷. A Gal-1 ezen szerepének jelentőségét igazolja, hogy amennyiben specifikus inhibítorral gátolták a kapcsolódási pontot, nem történt tumor progresszió, és az inhibítor alkalmazása hatékony kombinációs kezelésnek bizonyult rákterápiában¹⁶⁸.

Membrán-horgonyzó funkcióra következtettek a Gal-1 és protokadherin-24 kapcsolat kimutatása után is. A két fehérje közti interakció fontosnak bizonyult a β -katenin sejtmembránhoz történő asszociációjához, ami a wnt jelátvitel szuppresszióját idézte elő¹⁶³.

Az inGal-1 további azonosított partnere trombocita sejtekben az aktin monomer¹⁶³, ami utalhat a fehérje szerepére az aktin filamentumok polimerizációs, illetve depolimerizációs folyamataiban trombocita aggregáció során.

Sejtmagi kötőpartner is ismert: HeLa sejtek magi extraktumából Gal-1 partnerként mutatták ki a Gemin4-et¹⁶⁹, mely a spliszoszóma működéséhez szükséges kis nukleáris RNS-eket szolgáltató, 15 polipeptidet tartalmazó makromolekuláris komplexum egyik összetevője¹⁷⁰. Ko-immunprecipitációs kísérletek eredményei, hogy a Gal-1 kapcsolatban van még a komplex egyéb összetevőivel: SMN (survival of motor neuron), Gemin2, és kis nukleáris RiboNukleoProteinek (snRMP) polipeptidjeivel¹⁶⁹. Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy a Gal-1-nek valószínűleg szerepe lehet a mRNS érésében.

III. Célkitűzések

A,

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

Ezen tények háttérében célul tűztük ki:

1. az Lck plazmamembrán mozgásának,
2. a tirozinon foszforilált fehérjék lokalizációjának,
3. az Lck mozgásában a CD45,
4. a GM1 és a raftok szerepének vizsgálatát.

Szakirodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy bár a Gal-1-nek nem igazolható egyetlen funkcionális receptora, utalást találunk a Gal-1-gyel keresztkötött GM1 immunszuppresszív terápia eredményeire, mely figyelmünket a GM1 irányba terelte¹⁷¹.

Mindezek függvényében további célunk volt:

5. annak meghatározása, hogy változik-e a Gal-1 által indukált T sejt apoptózis a sejt felszíni GM1 mennyiségétől.

B,

T sejtek aktiváció hatására Gal-1-et kezdenek termelni⁵⁸, amelynek funkciója nem tisztázott.

Kérdésként tettük fel, hogy aktivált T sejtekben, *de novo* kifejeződő endogén Gal-1 részt vesz-e a T sejtek apoptózisában, és válaszára az alábbi vizsgálandó alpontokat jelöltük ki:

1. szekretálódik-e a Gal-1 az aktivált T sejtől,
2. befolyásolja-e a más sejtől származó Gal-1 apoptotikus hatását.

IV. Anyagok és módszerek

IV. 1. Alkalmazott sejtek

Humán sejtek:

Jurkat (humán leukémiás T sejt vonal), J45.01 (CD45 hiányos Jurkat), és J^{Gal} (Gal-1-et termelő Jurkat) sejteket penicillin/streptomocinnel (100 IU és 100 µg/ml), L-glutaminnal (2 mM) 5% illetve 10% (Jurkat illetve J45.01, J^{Gal}) FCS újszülött borjú szérummal (fetal calf serum: FCS, Gibco) kiegészített RPMI-1640 médiumban, a transzgenikus HeLa^{mock}, illetve HeLa^{Gal-1} humán karcinóma sejteket penicillin/streptomocinnel, L-glutaminnal és 10% FCS-el kiegészített MEM (Gibco) médiumban, míg a C32 melanóma sejt vonalakat 5% FCS tartalmú MEM (Gibco) médiumban tenyésztettük.

Humán T sejtek kinyerése és aktiválásuk: egészséges ember véreből perifériás mononukleáris sejteket (Peripheral mononuclear cells, PBMC) izoláltunk Ficoll PaqueTM Plus (Amersham Biosciences) gradiensen 2500 rpm fordulatszámon centrifugálva 30 percig szobanőmérsékleten, majd a mononukleáris sejteket 5 µg/ml phytohemagglutinin-M-mel (PHA) (Calbiochem) aktiváltuk 72 óráig. Hetvenkét óra után friss, 20 ng/ml interleukin-2-vel (IL-2) (Chiron, Harefield) és 10 % FCS-el kiegészített RPMI-1640 médiumban tenyésztettük tovább a sejteket. A ko-kultúra kísérletek előtt egy nappal a médiumot IL-2 mentesre cseréltük.

GM1-et magasan és alacsonyan kifejező T sejtek szeparálása: Jurkat illetve humán aktivált T sejteket 10⁷ sejt/ml koncentrációban FCS mentes DMEM médiumban vettük fel, majd 20 µg/ml biotinizált cholera toxin B-t (Sigma) adtunk hozzájuk és inkubáltuk 15 percig (a cholera toxin B kötődik a sejt felszíni GM1-hez). Ezután a sejteket mostuk FCS mentes DMEM-el, és megfelelő arányban streptavidinnel konjugált mágnesezhető mikrogöngyökkel elegyítettük (BD IMagTM Streptavidin Particles Plus – DM, BD Bioscience) 30 percig jégen. A mágnessel kifogott sejtek (pozitív frakció: mágnesgöngy-streptavidin-biotin-cholera toxin-sejt felszíni GM1-sejt) és a felülúszóban lévő sejtek (negatív frakció) GM1 mennyiségét áramlási citofluorimetriával határoztuk meg (részletesen IV. 3. Részben). A negatív frakcióban lévő sejtek GM1 mennyisége alacsony volt, ezek a sejtek a J.GM1^{lo} (Jurkat háttér) vagy az aktTGM1^{lo} (humán aktivált

T sejt háttér) elnevezést kapták. A pozitív frakcióban lévő, GM1-et magasan kifejező aktivált T sejteket a aktTGM1^{hi} név illette.

Egér sejtek:

Egérből származó T sejtek kinyerése és aktiválása: vad típusú (C57BL/6) és Gal-1 génkiütött egérből (B6.Cg-Lgals1^{tm1Rob}/J,006337, Jackson Laboratory) nyirokcsomót izoláltunk és RPMI-1640 médiumban a szövetek szétnyomkodásával homogén szuszpenziót hoztunk létre. Ezek után egy centrifugálási lépés következett 1800 rpm-el 10 percig, majd a pelletet mostuk még két alkalommal PBS-el. A utolsó mosás-fügálás lépés végeztével a sejteket 10 % FCS és 50 μ M β -merkaptóetanol (Sigma) tartalmú RPMI-1640 médiumban vettük fel és aktiváló ágensként 7,5 μ g/ml Concavalin A-t (ConA, Sigma) adtunk. Az aktiválás 72 óráig történt, majd egy a T sejteket kifogó mágnesgyöngyök felhasználásával (gyártói protokollt követve T enrichment Set DM Kit BD Bioscience) tiszta aktivált T sejt populációt hoztunk létre.

A használt sejtvonalak mindegyikét 37°C-os, 5% CO₂ koncentrációjú magas páratartalmú inkubátorban tenyésztettük.

IV. 2. HeLa sejtek transzfekciója

A HeLa sejteket pcDNA3.1 vektorba ligált Gal-1-1 cDNS-sel, illetve üres plazmiddal (mock) transzfektáltuk: A humán Gal-1 cDNS-t NcoI restrikciós enzim (Fermentas) segítségével kivágtuk a pQE60 prokarióta expressziós vektorból. Az inszertet feltöltöttük DNS polimeráz I Klenow enzimmal (Fermentas) és ligáltuk EcoRV (Fermentas) restrikciós enzimmal hasított pcDNA3-ba (5,4 kb) (Invitrogen), amely neomycin rezisztencia gént tartalmazott. A HeLa sejteket üres (ál-mock) és Gal-1 cDNS-t tartalmazó plazmidokkal transzfektáltuk CaPO₄-közvetített eljárással a javasolt protokollt követve (Promega). A felhasznált plazmidok neomicin rezisztencia gént hordoznak, így a stabil klónok szelekciójához 500 μ g/ml G418-at (Sigma) használtunk. A Gal-1 expressziót áramlási citometriával és Western blot módszerrel ellenőriztük¹⁷².

IV. 3. Sejt felszíni Gal-1 és GM1 kimutatása áramlási citofluorimetriával

2×10^5 sejtet 100 μ l FACS pufferben vettük fel (*pufferek, oldatok*) és a Gal-1 kimutatásához laboratóriumunkban előállított¹⁷² egér eredetű humán Gal-1 elleni (2C1/6-os klón) monoklonális ellenanyagot használtunk 5 μ g/ml koncentrációban, A mintát 45 perc jégen történő inkubáció után kétszer mostuk 1-1 ml FACS pufferrel. Anti-egér IgG ATTO 488 fluorkrómmal konjugált másodlagos ellenanyagot (Sigma) százszoros hígításban használtuk és 30 percig jégen inkubáltuk a sejtekkel.

A sejt felszíni GM1 szint meghatározásához FITC-el jelölt cholera toxin-B-t használtunk 10 μ g/ml végkoncentrációban (30 perc inkubáció jégen). Mosás után 250 μ l FACS puffert adtunk a mintákhoz és a mérést az FL-1 csatornában végeztük. Az elpusztult sejteket 10 μ g/ml propidium-jodid hozzáadásával különítettük el az FL-3 csatornában.

IV. 4. Intracelluláris galektin-1 kimutatása áramlási citofluorimetriával

A sejteket (5×10^5 sejt/minta) PBS-el mostuk és 1800 rpm-el centrifugáltuk 10 percig majd 4% paraformaldehiddel fixáltuk 4 percig, szobahőn. Fixálás után mostuk a sejteket 1 ml PBS-el és centrifugáltuk 1800 rpm-el 10 percig. Ezt követően 0,1%-os TritonX-100-al permeabilizáltuk a mintát szobahőn 10 percig. Újabb mosást követően a Gal-1 kimutatásához egér eredetű humán Gal-1 elleni (2C1/6-os klón) monoklonális ellenanyagot használtunk 5 μ g/ml koncentrációban, 45 perc jégen történő inkubáció után kétszer mostunk 1-1 ml FACS pufferrel. A másodlagos ellenanyagot, anti-egér IgG ATTO 488 (Sigma) 1:100 hígításban használtuk, és 30 percig inkubáltuk a sejtekkel jégen. Mosás után 250 μ l FACS puffert adtunk a mintákhoz és a mérést az FL-1 csatornában végeztük.

A méréseket FACSCalibur (Becton Dickinson) készülékkel végeztük, az adatokat CellQuest™ programmal értékeltük ki.

IV. 5. SDS gél-elektroforézis, Western blot analízis Gal-1 fehérje kimutatására

A sejteket (2×10^5 sejt/minta) lízis pufferben (*pufferek, oldatok*) tártuk fel, a sejtmagokat és a törmeléket 13000 rpm centrifugálással eltávolítottuk. A sejtlizátumot ugyanakkora mennyiségű, kétszeres töménységű redukáló SDS mintapufferrel (*pufferek, oldatok*)

elegyítettük és 12%-os SDS poliakrilamid géltre (*pufferek, oldatok*) vittük fel. A fehérjék méret szerinti szétválasztása után a mintákat elektromos árammal transzfer pufferben (*pufferek, oldatok*) nitrocellulóz membránra (Schleicher & Schuell GmbH, Németország) transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 3% zselatinnal (TBS-Tween-ben, *pufferek, oldatok*) 1 órán át szobahőn telítettük. A Gal-1 kimutatásához a laboratóriumunkban készített nyúl eredetű humán és egér Gal-1-et felismerő poliklonális ellenanyagot használtunk 0,8 µg/ml koncentrációban. Felviteli kontrollként β-aktint felismerő nyúl eredetű ellenanyagot alkalmaztunk (Abcam) 1:10000 hígításban. A membránt TBS-Tween (*pufferek, oldatok*) oldattal mostuk háromszor, majd tormagyökér peroxidáz enzimmel konjugált 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*) festettük és tettük láthatóvá.

Pozitív kontrollként ismert mennyiségű rekombináns Gal-1 fehérjét vittünk fel a géltre. A kísérlet végeredményét adó röntgenfilmet beszkeneltük.

IV. 6. Ko-kultúra

Adherens sejtek kitapasztása a ko-kultúra napját megelőző napon: 24 lyukú szövettenyésztő lemez egy-egy edényébe (3×10^5 db sejt/minta) HeLa^{Gal-1}, HeLa^{mock}, vagy C32 sejteket növesztettünk 12 mm átmérőjű kerek üveg fedőlemezre 24 órán keresztül. Másnap, a T sejtek magját 100 ng/ml koncentrációjú Hoechst33342 (Sigma) festékkel jelöltük (30 perc, 37°C). A felesleges festék kimosása után, a jelölt T sejteket (2×10^5 sejt/minta az apoptózis, 5×10^5 sejt/minta a szignalizáció kinetika tesztekhez) 400 µl végtérfogatban az adherens sejtekhez adtuk.

Kezelések a ko-kultúra előtt:

A sejtfelszíni Gal-1 eltávolítása: a kitapadt adherens sejteket 100 mM laktóz (Sigma) tartalmú médiumban inkubáltunk 30 percig 4 fokon, majd háromszor mostuk médiummal.

CD45 gátlása: Jurkat illetve aktivált T sejteket 10 µM végkoncentrációjú PTP CD45 reverzibilis inhibítort (Santa Cruz) tartalmazó médiumban inkubáltuk 10 percig 37 fokon, és mosási lépés nélkül adtuk a ko-kultúrába.

A β -ciklodextrin kezelés: Jurkat sejteket közvetlenül a ko-kultúra előtt 10mM végkoncentrációjú β -ciklodextrinnel (Sigma) inkubáltunk 30 percig 37 fokon.

IV. 7. Apoptózis mérés

16 órás ko-kultúrát követően, a fedőlemezeket óvatosan kiemeltük a 24 lyukú szövettenyésztő aljáról, 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 FACS pufferrel, majd Annexin V kötő pufferrel (*pufferek, oldatok*) mostuk 5 percig. AlexaFluor488 fluoreszcens festékkel konjugált AnnexinV-öt (Molecular Probes) 1:20 hígításban Annexin kötő pufferben együtt adtuk a mintákhoz és 30 percig inkubáltuk. Ezután az Annexin kötő pufferrel mostuk a mintákat, majd a lemezeket a felesleges puffer leitatását követően FluoromountG (Southern Biotech) használatával tárgylemezre rögzítettük. Száradás után a lemezeket körömlakkal rögzítettük és a szennyeződések desztillált vizes mosással eltávolítottuk.

IV. 8. Immuncitokémiai jelölések

A ko-kultúrát követően, a mintákat 4% paraformaldehiddel 4 percig fixáltuk szobahőn, majd PBS-sel történő mosás után az üveglap fehérjekötő helyeinek telítése érdekében 1 óráig inkubáltuk FACS pufferrel. A sejteket 75 μ g/ml LPC-vel permeabilizáltuk, amit együtt adtunk az ellenanyagokkal. Az elsődleges ellenanyagok 1 óráig, a másodlagos ellenanyagok 30 percig voltak a sejteken jégen, az elsődleges és másodlagos ellenanyaggal történő jelölés között PBS-es mosást végeztünk háromszor.

Elsődleges ellenanyagok:

Az Lck kimutatására 25 μ g/ml koncentrációjú jelöletlen, vagy FITC-el jelölt (saját laboratóriumunkban készített¹⁰⁶) egérben termeltetett monoklonális Lck ellenanyagot, a Gal-1 kimutatására 5 μ g/ml végkoncentrációjú jelöletlen, vagy FITC-el jelölt egérben termeltetett Gal-1 elleni monoklonális (2C1/6 klón) ellenanyagot, a tirozinon foszforilált (P-Tyr) fehérjék jelölésére ezerszeres hígításban egérben termeltetett (klón: 4G10) foszfo-tirozint felismerő monoklonális ellenanyagot (Upstate Biotechnology, Millipore).

Másodlagos ellenanyag:

Anti-egér IgG NL557 fluoreszcens festékekkel konjugált (R&D Systems) ellenanyagot alkalmaztuk 5 µg/ml-es végkoncentrációban.

Az aktin filamentumokat piros fluoreszcenciát adó Rhodamine-Phalloidin (Invitrogene) használatával jelöltük (1:50 hígítás). A jelölt mintákat Fluoromount-G-be ágyztuk, a felesleget leittattuk, 1 órát polimerizálódni hagytuk, majd a körlemezek szélét körömlakkal biztosítottuk.

IV. 9. Kaszpáz 3 aktivitás kimutatása

A ko-kultúra mintákat 24 óra inkubáció után fixáltuk 4% paraformaldehiddel 4 percig szobahőn. Szaponinos oldattal (*pufferek, oldatok*) történő permeabilizálás és telítés után az aktív, hasított kaszpáz 3-at felismerő ellenanyagot százszoros hígításban (Beckton Dickinson) inkubáltuk a mintákkal 45 percig. Mosás után FITC-jelzett anti-nyúl IgG másodlagos ellenanyagot (Dako) használtunk, majd 30 perc inkubáció után a felesleges ellenanyagot kimosva a fedőlemezeket FluoromountG használatával tárgylemezre rögzítettük.

IV. 10. Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia, képanalízisek

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

Az apoptózis analízishez 5 véletlenszerű nem-átfedő 20-as nagyítású objektívvel képet készítettünk Zeiss Axioscope fluoreszcens mikroszkóppal AxioVision 3.1 programot használva. Képkészítésnél ügyeltünk arra, hogy a háttér fluoreszcenciát kiszűrjük azzal, hogy az ellenanyag nélküli mintára normalizáltuk az expozíciós időt. A kiértékeléseket Adobe Photoshop CS4 képanalizáló program segítségével végeztük. Számoltuk az apoptotikus T sejtek (zöld) százalékos arányát az összes T sejthez képest (legkevesebb 100 sejt/ minta).

A szignalizációs elemek topológiai vizsgálata során 10 véletlenszerű nem-átfedő 40-es nagyítású objektívvel képet készítettünk Zeiss Axioscope fluoreszcens mikroszkóppal AxioVision 3.1 programot használva vagy 60-as, immerziós olajos objektívvel OlympusFV1000 konfokális mikroszkóppal FV100-ASW 2.0 viewer programot használva.

Képanalízisek: Az apoptózis mértékének meghatározásához, a mikroszkópos képeken számoltuk az apoptotikus (AnnexinV vagy hasított kaszpáz 3 pozitív) T sejtek arányát. Az Lck szegregáció mértékének meghatározásához számoltuk az Lck szegregációt, vagyis az Lck sejtkapcsolattal ellentétes oldali kirekesztődését mutató T sejtek arányát. A tirozin oldalláncon foszforilált fehérjék (P-Tyr) esetében azoknak a sejteknek az arányát számoltuk, ahol a P-Tyr jel sejtkapcsolati volt.

A relatív apoptózis, relatív Lck szegregáció, relatív sejtkapcsolati P-Tyr értékek meghatározásához (csak a Gal-1 hatására bekövetkező változás ábrázolása) a Hela^{Gal-1}-en számolt értékekből kivontuk a Hela^{mock}-on számolt értékeket.

IV. 11. Pufferek, oldatok

1. RPMI sejtenyésző 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) és 5% (v/v) vagy 10% (v/v) hőinaktivált magzati borjúszérummal (FCS, Protein GMK, Gödöllő)

2. Tripánkék oldat sejtszámoláshoz:

0,16% (w/v) tripánkék
fiziológias sóoldat

3. PBS, pH 7,4:

1,8 mM NaH₂PO₄
10 mM Na₂HPO₄
135 mM NaCl
3 mM KCl

4. FACS puffer:

PBS
1% (w/v) BSA (Sigma) vagy 1% (v/v) FCS (Protein GMK)
0,1% (w/v) nátrium-azid (Sigma)

5. Annexin V-kötő puffer:

10 mM HEPES pH 7,4
140 mM NaCl
2,5 mM CaCl₂

6. Redukáló SDS mintapuffer (kétszeres töménységű):

125 mM Tris/HCl pH 6,8

20% (v/v) glicerin
4% (w/v) SDS
2% (v/v) β -merkaptoetanol (Sigma)
brómfenolkék (Bio-Rad)

7. *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)

8. *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)

9. *Futtató puffer:*

25 mM Tris/HCl pH 8,3
194 mM glicin
0,1% (w/v) SDS

10. *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

11. *Transzfer puffer:*

25 mM Tris-HCl pH 8,3
194 mM glicin
20% (v/v) metanol

12. *TBS-Tween:*

10 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
0,05% (v/v) Tween 20 (Sigma)

13. *Lízispuffer:*

10 mM Tris-HCl pH 8
150 mM NaCl
1% Triton X-100
0,5% nátrium-dezoxikolát
0,1% SDS
2mM EDTA
1mM PMSF

14. *Szaponin:*

0,2% szaponin
0,1% BSA
PBS-ben

15. DNS-festő puffer:

0,1% Triton X
0,1% nátrium-citrát
10 µg/ml RNáz
10 µg/ml propidium-jodid
PBS-ben V. Eredmények

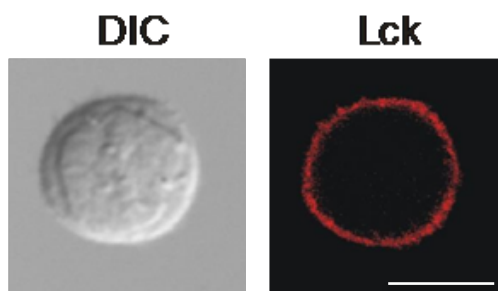
V. Eredmények

V. 1. GM1 függő Gal-1 indukált Lck szegregáció és T sejt apoptózis

V. 1. 1. Lck szegregáció

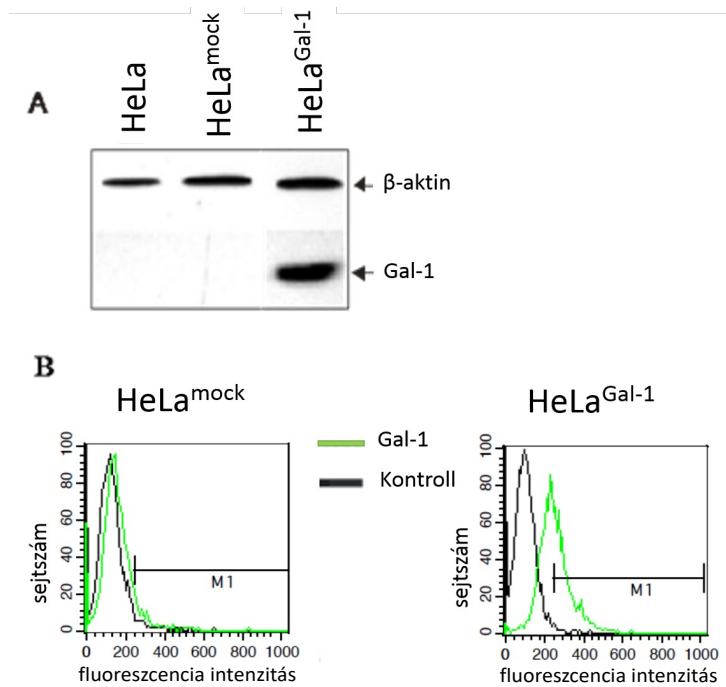
Az Lck eloszlását ko-kultúras kísérleti rendszerben vizsgáltuk, melyben Gal-1-et kifejező letapadó (effektor) sejt került közös kultúrába a szuszpenzióban lévő (target) T sejtekkel.

A ko-kultúra előtt, a szuszpenzióban lévő Jurkat T sejtekben az Lck a membrán mentén gyűrű szerűen oszlik el (V. 1. Ábra).



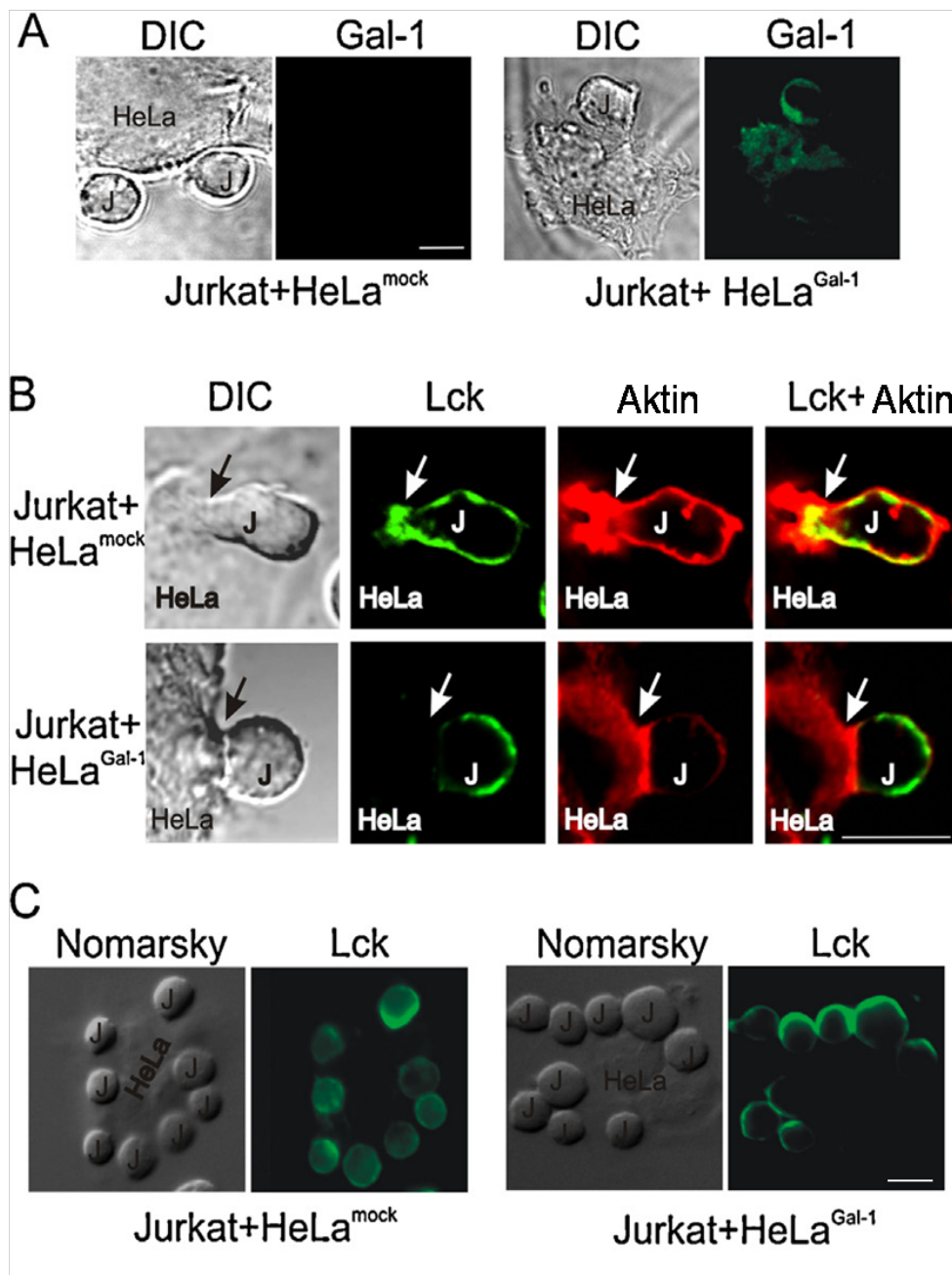
V. 1. Ábra: Lck lokalizációja Jurkat T sejtben. Fixált és permeabilizált Jurkat sejtet immuncitokémiai jelölése egérben termeltetett Lck-t felismerő monoklonális elsődleges ellenanyag és anti-egér IgG NL557 fluorkrómmal konjugált másodlagos ellenanyag felhasználásával történt. A mintákról konfokális mikroszkóp felvételeket készítettünk 60-as objektívvel, a mércé: 5 μm (DIC: differenciális interferencia kontraszt).

A vad típusú HeLa sejt vonal sejtjei letapadóak, de nem fejezik ki a Gal-1-t (V. 2. Ábra A). Ebből a sejt típusból indultunk ki, és transzfekcióval hoztuk létre a HeLa^{Gal-1} módosított sejt vonalat, mely termeli a Gal-1-et (V. 2. Ábra A), és szekretálja is, mert amennyiben a Gal-1 szekretálódik, kimutatható a termelő sejt felszínén (V. 2. Ábra B). A Gal-1 gént nem tartalmazó „üres” vektorral létrehozott HeLa^{mock} nem fejezi ki a Gal-1-et (V. 2. Ábra A és B), ezt kontrollként alkalmaztuk.



V. 2. Ábra: A HeLa^{mock} és HeLa^{Gal-1} Gal-1 termelése, és sejtfelszíni kifejeződése. A, A Gal-1 fehérje termelődését Western blot technikával határoztuk meg HeLa, HeLa^{mock}, HeLa^{Gal-1} sejt esetében. Teljes sejtlizátumot 12%-os SDS-poliakril gélben futtatuk, majd nitrocellulóz filterre transzferáltuk. A Gal-1-et felismerő nyúlban termeltetett poliklonális elsődleges ellenanyagra tormagyökér peroxidáz enzimmel konjugált anti-nyúl IgG másodlagos ellenanyagot használtunk, felviteli kontrollként β -aktint felismerő, nyúl eredetű antitestet alkalmaztunk. Kemilumineszcens detekciós rendszerrel (ECL Plus) tettük láthatóvá a jeleket. **B,** A sejtfelszíni Gal-1 fehérje mennyiséget áramlási citofluorimetriával határoztuk meg. A Gal-1 kimutatását (zöld vonal) egér eredetű humán Gal-1 elleni monoklonális ellenanyag (2C1/6) és az azt felismerő anti-egér IgG ATTO 488 fluorkrómmal konjugált másodlagos ellenanyag felhasználásával valósult meg, a kontroll minták esetében (fekete vonal) megfelelő izotípus kontrollt használtunk.

A fent bemutatott, Gal-1 termelődés szempontjából karakterizált transzfektáns HeLa sejtekből és Jurkat T sejtekből ko-kultúrát állítottunk össze. A T sejtek körülfojták, és kapcsolatba kerültek a letapadó tumor sejtekkel (**V. 3. Ábra A**, DIC mikroszkópos felvételek, és **C**, Nomarsky felvételek), ez a kontaktus valódi sejt-sejt kapcsolati zóna, amit aktin festéssel igazoltunk (**V. 3. Ábra B**).

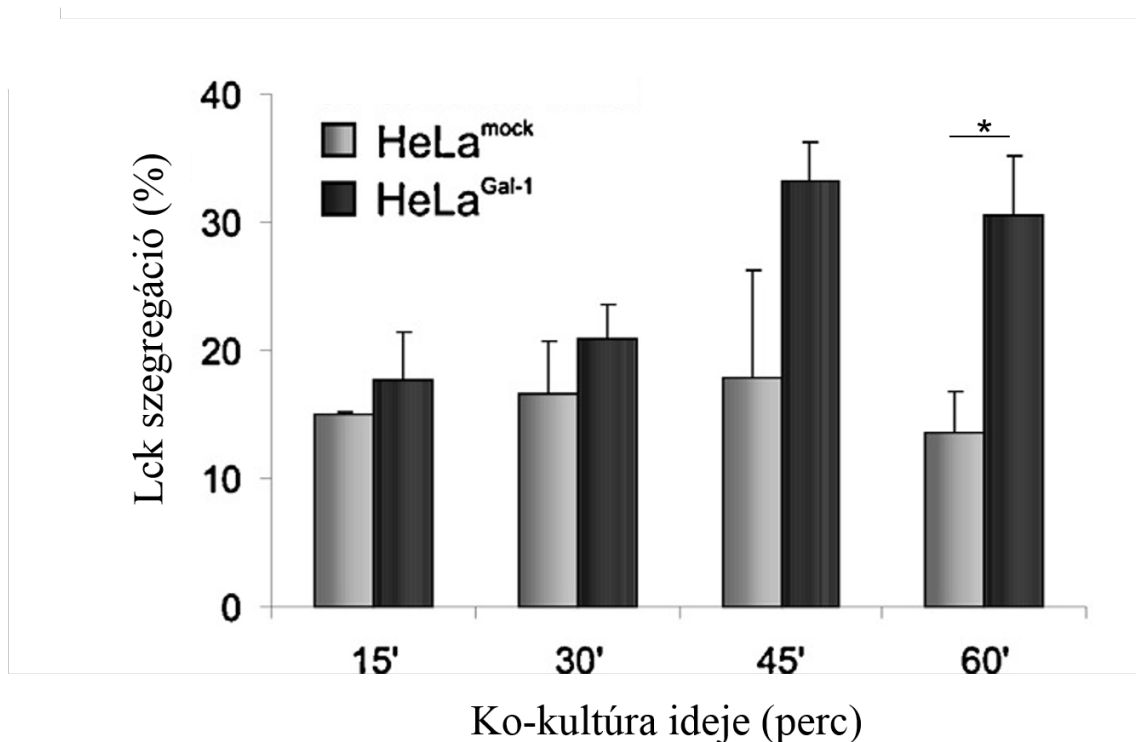


V. 3. Ábra: Sejt közvetített Gal-1 indukált Lck szegregáció Jurkat sejtben. **A**, HeLa^{mock} vagy HeLa^{Gal-1} és Jurkat sejtek 15 perces ko-kultúráját követően a sejteket fixáltuk, és a sejtfelszíni Gal-1 jelölésére FITC fluorokrómmal konjuált egérben termeltetett Gal-1-et felismerő monoklonális ellenanyagot használtunk (2C1/6-FITC). A konfokális mikroszkóp felvételeket 60-as objektívvel készítettünk. **B**, HeLa^{mock} vagy HeLa^{Gal-1} és Jurkat sejtek 60 perces ko-kultúrája után, a sejtek fixálását és permeabilizását követően az Lck és az aktin fehérje intracelluláris jelölését végeztük egérben termeltetett FITC konjugált monoklonális Lck ellenanyaggal (zöld) illetve rhodanin-phalloiddinnal (piros). A mintákról 60-as olajos objektívvel készítettünk konfokális mikroszkóp felvételeket. A sejtkontaktust nyilak jelölik. **C**, HeLa^{mock} vagy HeLa^{Gal-1} és Jurkat sejtek 60 perces ko-kultúrája után Lck jelölést végeztünk (lásd B,) és 40-es objektívvel fluoreszcens mikroszkóppal felvételeket rögzítettünk. A mérce mindenhol: 10 μ m.

Korábbi kísérleteinkből tudjuk, hogy a sejt-sejt kontaktus elengedhetetlen a Gal-1 által kiváltott T sejt apoptózishoz¹⁷², és a **V. 3. Ábra A** mikroszkópos felvételén jól látszik, hogy a kapcsolati pontban a Gal-1 át is kerül a Jurkat T sejtek felszínére.

A ko-kultúras képfelvételeken az Lck eloszlását analizálva azt figyeltük meg, hogy a HeLa^{Gal-1} -gyel együtt tartott T sejtek esetében, az Lck, feltűnően egy jellegzetes mintázatot mutat, a sejt-sejt kapcsolattal ellentétes oldalon csoportosul (**V. 3. Ábra B**, és **C**). Ezt nevezzük Lck szegregációnak.

A fent említett megfigyelés után, elemezni kívántuk, hogy az Lck eloszlása hogyan változik az effektor illetve a target sejt ko-kultúrájának időhosszúságától.



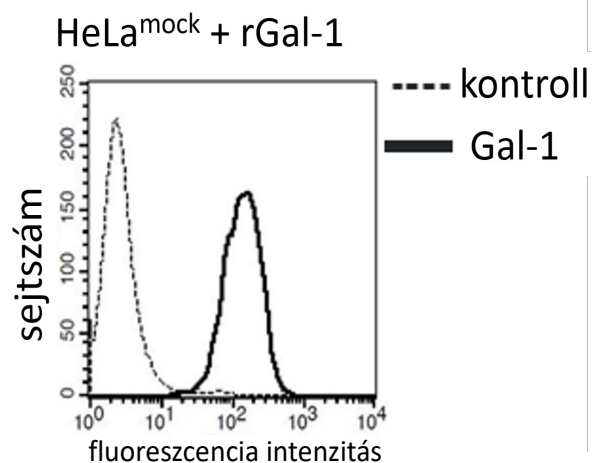
V. 4. Ábra: Lck szegregáció időkinetikája. Jurkat sejteket tartottunk HeLa^{mock} vagy HeLa^{Gal-1} sejtekkel ko-kultúrában az ábrán jelzett időpontokig. Az Lck immuncitokémiai jelölését (Anyagok és módszerek fejezet, és V. 3. Ábra B leírása) követően, számoltuk az Lck szegregációt mutató sejteket. A diagram egy kísérlet 3 párhuzamos mintájának eredményeit mutatja be, a szignifikancia számolása, Student t próbával történt, *p<0.05.

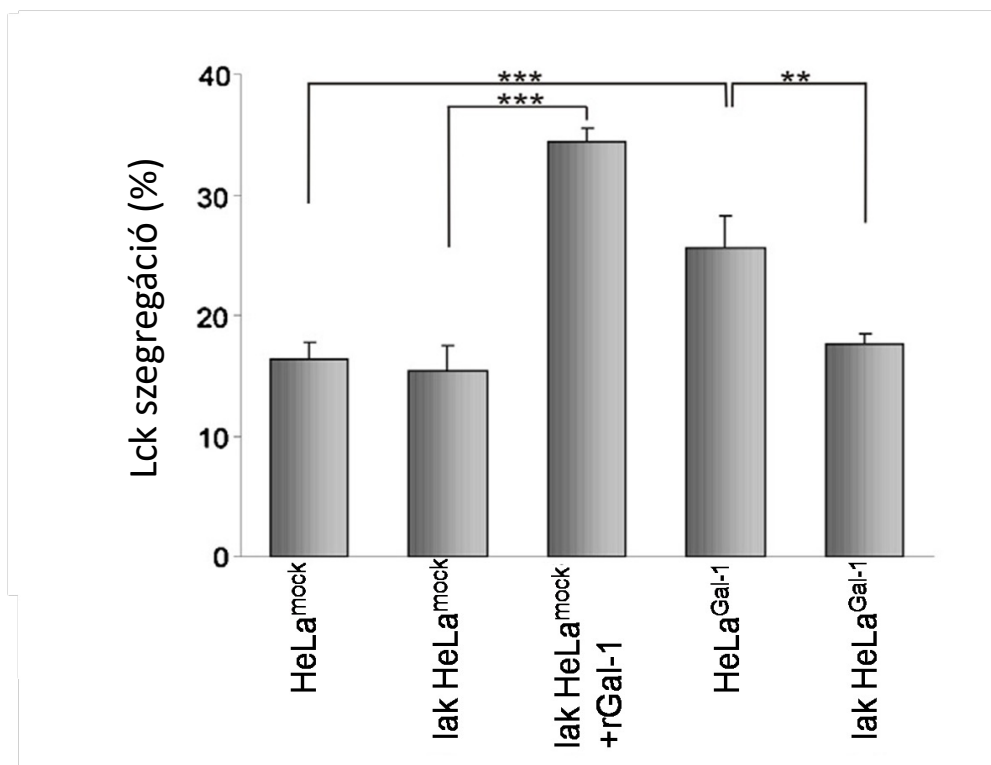
A HeLa^{mock} sejtekkel együtt tartott Jurkat sejtek esetében 15 és 60 perc között nincs látványos különbség az Lck szegregációt mutató T sejtek arányában, de a HeLa^{Gal-1} sejtekkel közös kultúrában lévő Jurkat T sejtek esetében kimutatható, hogy 15 és 45 perc között növekszik az Lck kizáródást mutató sejtek aránya, 45 - 60 percnél tetőzik (V. 4. **Ábra**), 60 percnél a legkifejezettebb, és szignifikáns is a különbség a HeLa^{mock}-al együtt tartott Jurkat sejtek ko-kultúrájához képest.

Továbbiakban igazolni kívántuk a folyamat Gal-1 specifikusságát. A laktóz, a galektinek általános inhibitora, nagy affinitással kötődik a CRD-be, és nagy mennyiségben adva leválasztja a galektineket a sejt felszínről. A laktóz kezelt sejtekhez rekombináns Gal-1-et visszaadva pedig specifikusan a Gal-1 hatását tudjuk mérni.

Áramlási fluorimetriával megbizonyosodtunk arról, hogy a HeLa^{mock} sejt felszíni Gal-1 kötő struktúrái épek, és a sejt vonal képes a rekombináns Gal-1 kötésre (V. 5. **Ábra**), majd elvégeztük a laktóz kezelés - Gal-1 visszaadás kísérletet.

V. 5. Ábra: HeLa^{mock} sejtekhez adott rekombináns Gal-1 kötődik a sejt felszínéhez. HeLa^{mock} sejtekhez adtunk rekombináns Gal-1-et (50 µg/ml) és áramlási citofluorimetriával vizsgáltuk a sejtek felületére kötődött Gal-1 mennyiségét. Szaggatott vonallal az izotípus kontrollt, folytonos vonallal a Gal-1 jelet jelzi.



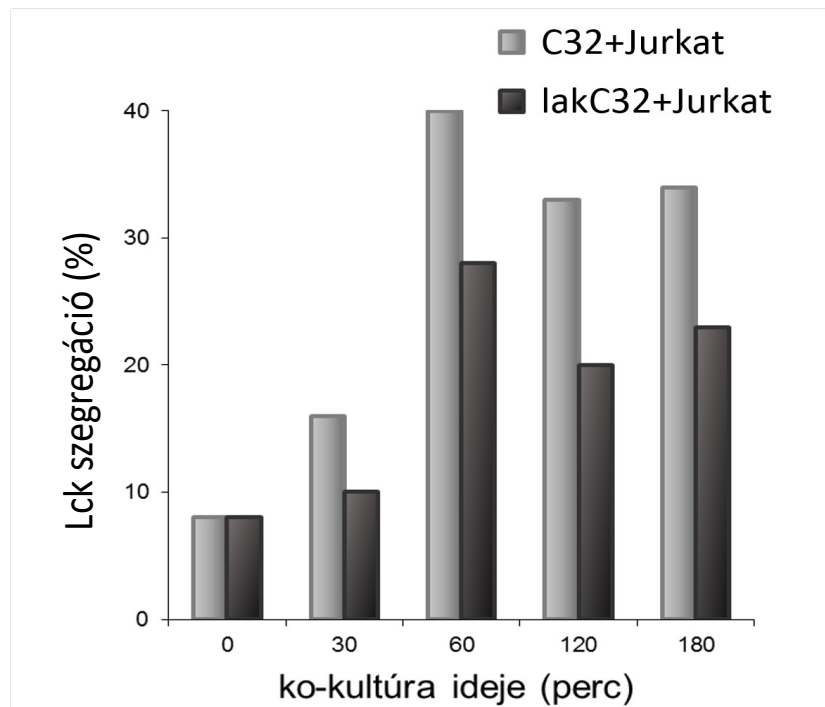


V. 6. Ábra: Az Lck kirekesztődése specifikusan a Gal-1 hatása. Jurkat T sejtvonal sejtjeinek ko-kultúrája az alábbi effektor sejtekkel: HeLa^{mock}, 100 mM laktóz kezelt HeLa^{mock} laktóz kezelés után sejt felszínhez 50 µg/ml rekombináns Gal-1 kötött HeLa^{mock}, HeLa^{Gal-1}, 100 mM laktóz kezelt HeLa^{Gal-1}. A ko-kultúra után, az Lck immuncitokémiai jelölése, majd az Lck szegregációt mutató sejtek számolása történt. A diagram 4 független kísérlet eredményét ábrázolja, mintánként 2-2 párhuzamossal dolgoztunk, a szignifikancia számolása Student t próbával történt, **p<0.01, ***p<0.001.

A Gal-1-et nem termelő HeLa^{mock} sejtek felszínéről laktózzal a galektint eltávolítva az Lck szegregációja nem változott (V. 6. Ábra: lak HeLa^{mock}), de ha rekombináns Gal-1-et kötöttünk a laktózzal kezelt HeLa^{mock} sejtek felszínéhez, az Lck szegregációja szignifikánsan megnőtt (V. 6. Ábra: lak HeLa^{mock}+rGal-1). Amennyiben HeLa^{Gal-1} sejteket kezeltük laktózzal, az Lck kizáródása lecsökkent, vagyis a Gal-1 eltávolítására csökkent a szegregációt mutató sejtek száma (V. 6. Ábra: lak HeLa^{Gal-1}). Ezek a kísérletek igazolják, hogy az Lck szegregáció a Gal-1 hatására tapasztalható.

További kísérletben bizonyosodtunk meg arról, hogy az Lck szegregáció nem az eddig használt effektor sejt transzfekciójának (HeLa^{mock}, HeLa^{Gal-1} transzfektáns sejtvonalak) “mellékhatása”, ezért olyan sejtvonalat is alkalmaztunk effektorként, mely eredendően

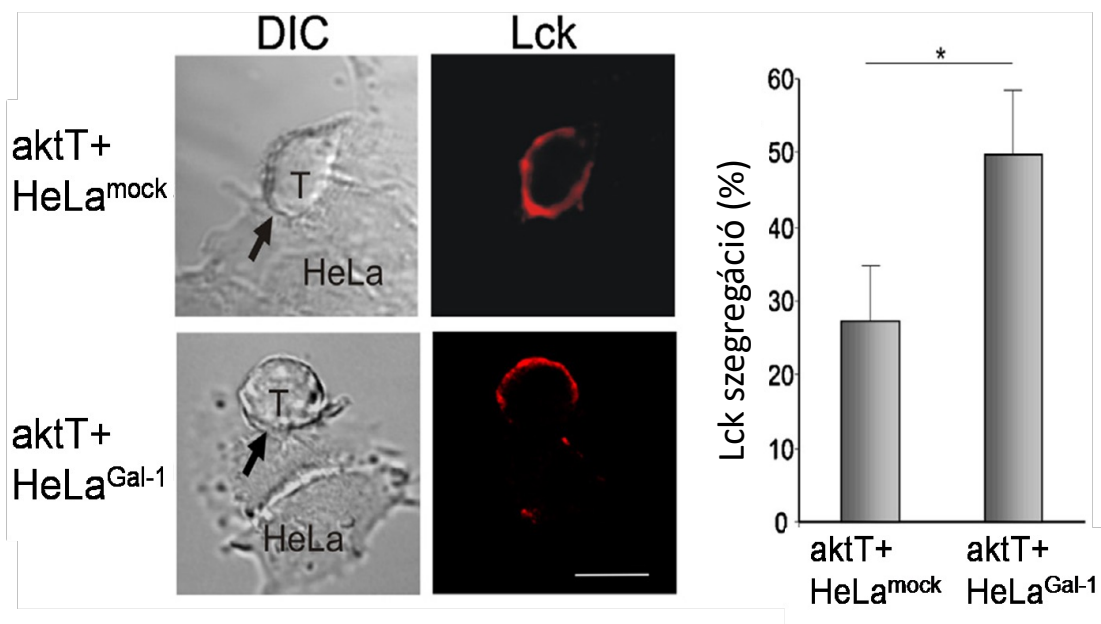
Gal-1 pozitív, és sejt felszínén kimutatható a Gal-1, ez a C32 melanoma tumor sejt vonal¹⁷².



V. 7. Ábra: Jurkat T sejtekben vizsgát Lck szegregáció C32 sejt vonalon a ko-kultúra idejének függvényében. Jurkat T sejteket és C32 illetve 100 mM laktóz kezelt C32 sejteket tartottunk ko-kultúrában különböző ideig, és számoltuk az Lck szegregációt mutató sejtek arányát. Az ábra egy kísérlet eredményét mutatja.

A genetikailag nem módosított, Gal-1-et termelő C32 tumorsejteket alkalmazva szintén kimutatható volt az Lck szegregációt mutató sejtek arányának növekedése, ami a ko-kultúra 60. percében a legkifejezettebb, és az Lck kirekesztődése laktóz kezelésre, vagyis Gal-1 eltávolításra, lecsökkent (**V. 7. Ábra**).

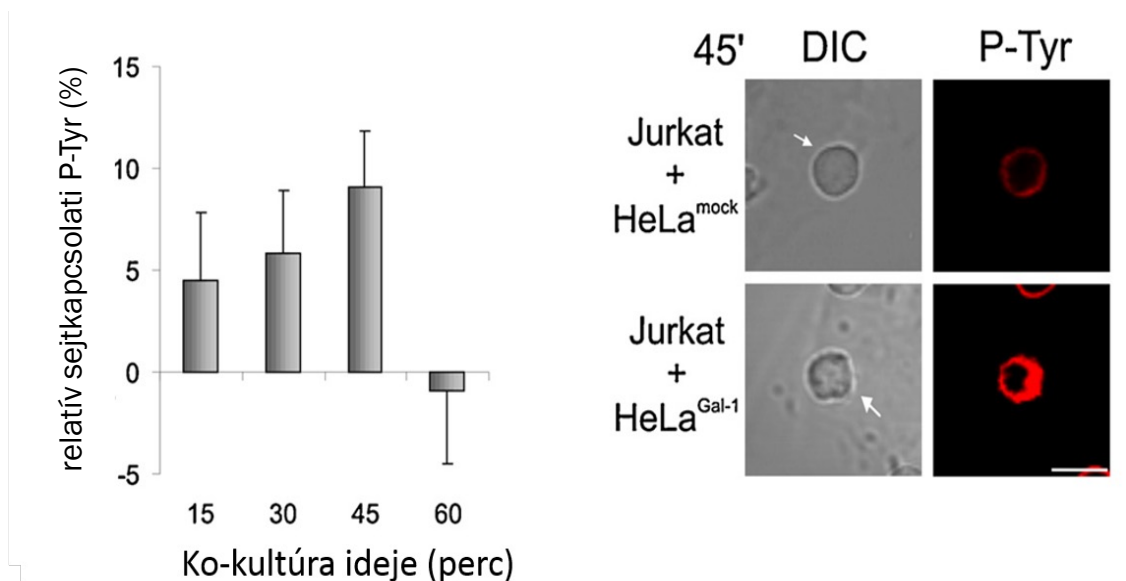
A malignus T sejt vonalak, mint a Jurkat, sejt felszíni glikolizációja változhat¹⁷³, érinthetve ez által a Gal-1 kötődését és szignalizációját is, ezért a következőkben humán aktivált T sejtekkel végeztük el a ko-kultúrát. Ebben az esetben is megfigyelhető az Lck kirekesztődése, és a kirekesztődést mutató sejteket leszámolva szignifikánsabban magasabb értéket kaptunk a HeLa^{Gal-1} sejtekkel történt ko-kultúrában (**V. 8. Ábra**).



V. 8. Ábra: Gal-1 indukált Lck szegregáció humán aktivált T sejteken. PBMC izolálás után phytohaemagglutininnal (PHA) aktiváltuk a T sejteket 3 napig (aktT), majd ko-kultúrában tartottuk HeLa^{mock} illetve HeLa^{Gal-1} sejtekkel. Sejtek fixálása és permeabilizálása után egérben termeltetett anti-Lck elsődleges ellenanyagot majd anti-egér NL557 (piros) másodlagos ellenanyagot használtunk az Lck jelölésére. A mintákról 60-as olajos objektívvel konfokális mikroszkóppal képeket készítettünk (baloldali kép, fekete nyíl a sejt kapcsolatot jelöli, a mércse: 10 μ m.), és a képeket analizálva számoltuk az Lck szegregációt mutató sejtek arányát. A diagram 4 független kísérlet eredményét ábrázolja, mintánként 2-2 párhuzamossal dolgoztunk. Szignifikancia: Student t próba, * $p < 0.05$.

V. 1. 2. A tirozin oldalláncon foszforilált fehérjék lokalizációja

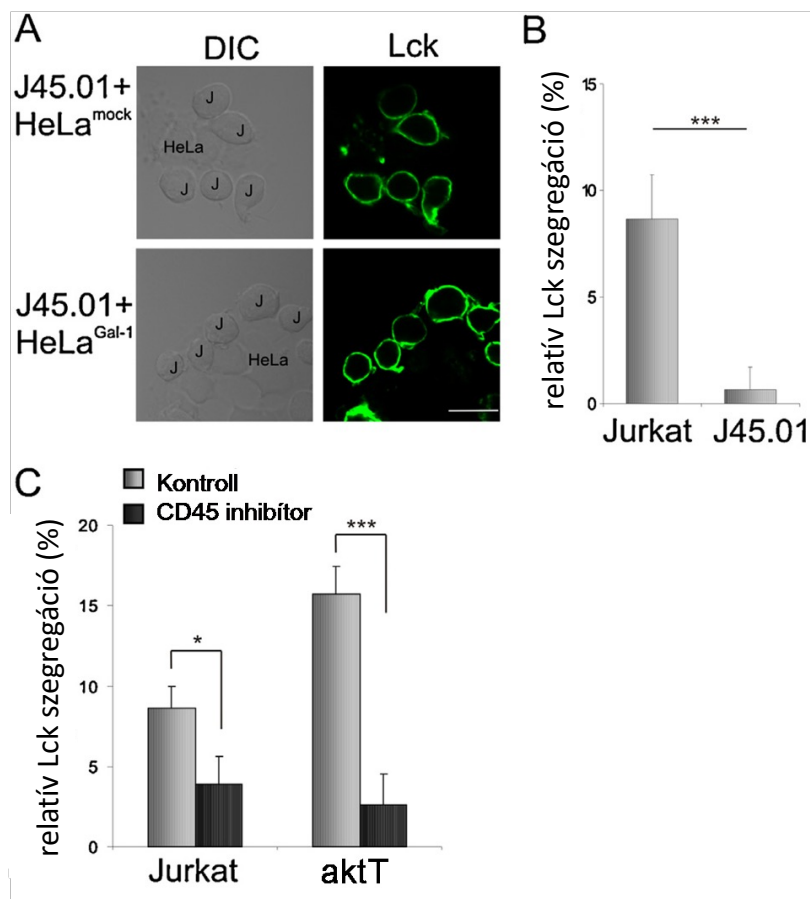
Vizsgáltuk a Gal-1 hatására bekövetkező tirozinon foszforilált fehérjék sejten belüli eloszlását, az effektor és a target sejt ko-kultúrájának időhosszúságának függvényében. A mikroszkópos felvételeket kiértékelve azt tapasztaltuk, hogy az 15 és 45 perc között növekszik a tirozin foszforilációt a sejt kapcsolatban mutató sejtek aránya, és 60. ez az arány jelentősen lecsökken (**V. 9. Ábra**).



V. 9. Ábra: Tirozinon foszforilált fehérjék lokalizációja. Jurkat T sejteket különböző ideig (15,30,45,60 percig) tartottunk HeLa^{mock} és HeLa^{Gal-1} sejtekkel. A sejtek fixálása és permeabilizálása után jelöltük a tirozin oldalláncon foszforilált fehérjéket (P-Tyr) egér anti-foszfotirozin monoklonális elsődleges ellenanyaggal és anti-egér IgG-NL557 (piros) másodlagos ellenanyagokkal. **A**, Mikroszkópos képfelvételeken számoltuk a sejtkapcsolati P-Tyr jelet mutató sejtek arányát, és a HeLa^{Gal-1}-en számolt értékekből kivontuk a HeLa^{mock}-on számolt értékeket (relatív sejtkapcsolati P-Tyr). A diagram 4 független kísérlet eredményét ábrázolja **B**, 60-as objektívvel készített konfokális mikroszkóp képek a ko-kultúra 45 percéről. Fehér nyíl a sejtkapcsolatot jelzi. Mércse 10 μ m.

V. 1. 3. A CD45 szükséges az Lck szegregációhoz

Kérdésként tettük fel, hogy a Gal-1 kötő, Lck aktivitását befolyásolni képes CD45 jelenléte, és foszfatáz aktivitása szükséges-e az Lck kizáródásához, és az ezt eldöntő kísérleteinkben CD45 hiányos (J45.01) Jurkat sejtvonalat és CD45 foszfatáz aktivitást gátló inhibítort alkalmaztunk.



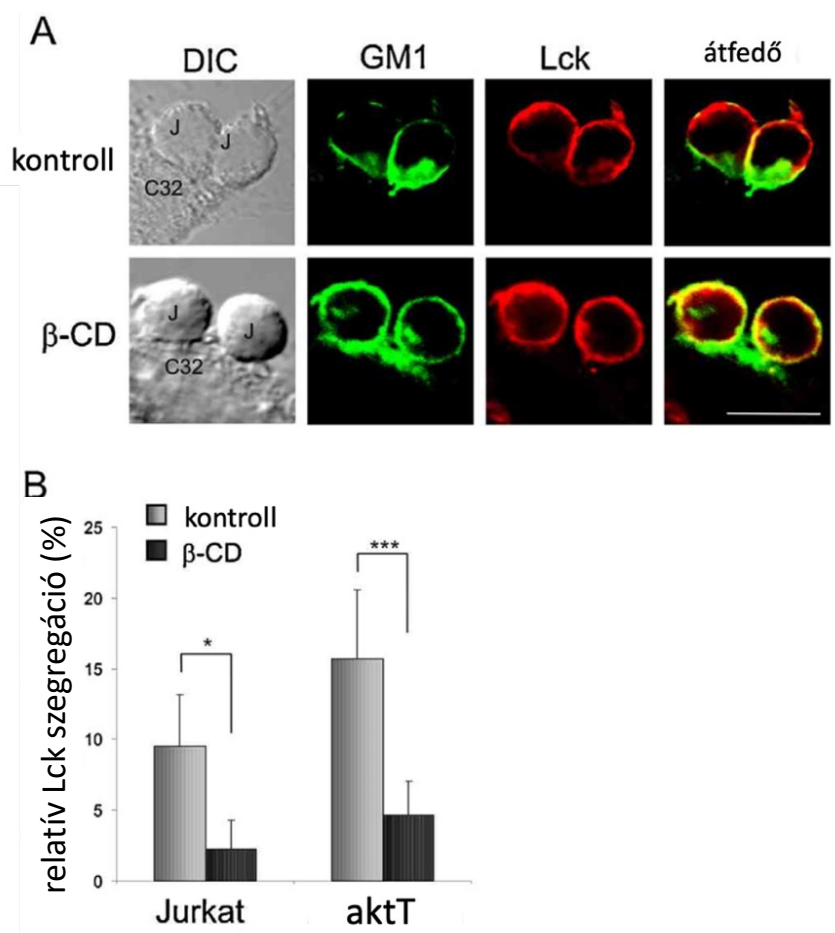
V. 10. Ábra: A CD45 foszfatáz szerepe az Lck szegregációban. **A**, 60-as objektívvel készített konfokális mikroszkóp felvételek a CD45 hiányos J45.01 sejtvonal sejtjei HeLa^{mock} és HeLa^{Gal-1} sejtekkel (60 perces ko-kultúra), az Lck jelölést a V.3 B Ábránál leírtak szerint végeztük. Mércse: 10 μ m. **B**, Jurkat és J45.01 sejtekben számoltuk a relatív Lck szegregációt az alábbiak szerint: HeLa^{Gal-1}-en kapott Lck szegregáció értékéből kivontuk a HeLa^{mock}-on kapott értéket. A diagram 2 független kísérlet átlagát ábrázolja, egy kísérletben 4 párhuzamos minta volt (szignifikancia: Student t próba, *** $p < 0.001$). **C**, CD45 foszfatáz inhibitorral (10 μ M 20 percig) kezelt Jurkat vagy humán aktivált T sejtek 60 perces ko-kultúrája HeLa^{mock} és HeLa^{Gal-1} sejtekkel. Lck jelölése után, számoltuk a relatív szegregációs értéket a B, pontban leírtak szerint. A diagramm 2 független kísérlet átlagát ábrázolja, egy kísérletben 4 párhuzamos minta volt. (szignifikancia: Student t próba, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

A reprezentatív mikroszkópos felvételeken látható, hogy a HeLa^{Gal-1} sejtekkel együtt tartott CD45 hiányos Jurkat sejtekben (J45.01) az Lck eloszlása nem különbözik a HeLa^{mock} sejtekkel együtt tartott sejtek esetétől (V. 10. Ábra A), vagyis nem látjuk az Lck jellegzetes szegregációját. A képfelvételek kvantifikációja során kapott eredmények is ezt tükrözik. A Gal-1 hatására bekövetkező Lck szegregációs változás (HeLa^{Gal-1} -

HeLa^{mock}, relatív Lck szegregáció) a vad típusú Jurkat sejtekhez viszonyítva a CD45 hiányos sejtekben gyakorlatilag nullára csökken (**V. 10. Ábra B**). A CD45 foszfatáz aktivitásának specifikus gátlására szintén lecsökkent az Lck szegregációt mutató sejtek aránya mind Jurkat, mind humán aktivált T sejt minták kezelése esetében (**V. 10. Ábra C**). Ezen kísérletekből az látható, hogy a CD45 jelentéte és foszfatáz aktivitása egyaránt szükséges az Lck kirekesztődéséhez.

V. 1. 4. Az Lck szegregáció raft és GM1 függő

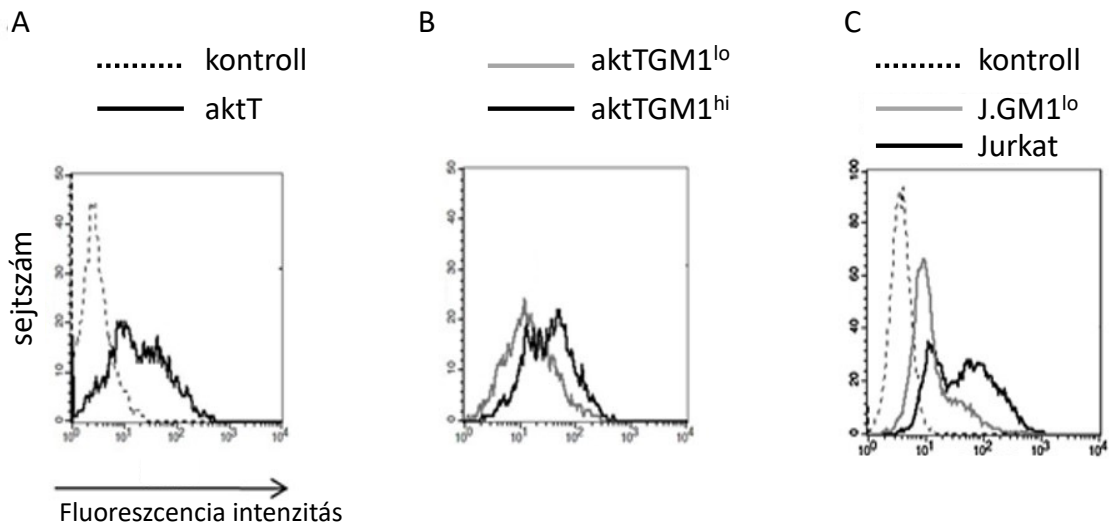
Kérdésként tettük fel, hogy az Lck szegregációjában illetve mozgásában van-e szerepe a membrán lipid raftoknak. Ennek vizsgálatára β -ciklodextrint (β -CD) kezelést alkalmaztunk, ami kivonja a raftkomponenseket összetartó koleszterint, így a lipidtutajok szétesnek. A GM1-el jelölt raftok, a sejtkapcsolati zónában halmozódnak fel, míg az Lck az ellentétes oldali régióban, a raftokból kizáródva (**V. 11. Ábra A**, felső panel). A β -CD-el történő kezelés, vagyis a raftok szétszedésének hatására, az említett mintázatok megszűnnek (**V. 11. Ábra A**, alsó panel), raft képződés hiányában az Lck szegregációt mutató sejtek aránya szignifikánsan lecsökken (**V. 11. Ábra B**). A kísérleteket mind Jurkat, mind aktivált T sejtek esetére is elvégeztük, és ugyanazt az eredményt kaptuk (**V. 11. Ábra B**).



11. Ábra: β -CD kezelés hatása Lck szegregációra. **A**, 60-as objektívvel készített konfokális mikroszkópos felvételek kezeletlen és β -CD-nel (10mM) kezelt Jurkat T sejtek és C32 melanóma sejtvonala egy órás ko-kultúrájáról. A sejt felszíni GM1-et zöld, (FITC-cel jelzett koleratoxin), az Lck-t piros (egér anti-Lck-hoz kapcsolódó anti-egér IgG NL557) szín jelöli. Mércse: 10 μ m. **B**, Kezeletlen és β -CD-nel kezelt Jurkat T sejteket és PHA-val aktivált humán T sejteket (aktT) tartottunk ko-kultúrában HeLa^{mock} és HeLa^{Gal-1} sejtekkel 1 órán keresztül. A relatív Lck szegregációt az alábbiak szerint számoltuk: HeLa^{Gal-1}-en kapott Lck szegregáció értékéből kivontuk a HeLa^{mock}-on kapott értéket. A diagram Jurkat esetében 5, aktivált T sejt esetében 4 független kísérlet átlagát ábrázolja, egy-egy kísérletben 3 párhuzamos minta volt (szignifikancia: Student t próba, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

A sejt felszíni raft komponens GM1 glikolipid, azonosított Gal-1 kötőpartner T sejteken. Gal-1 kötődés hatására aktív membrándinamikai folyamatok zajlanak, mint raftok képződése és extracelluláris sejt felszíni molekulák specifikus átrendeződése, ezért vizsgáltuk, hogy hogyan változik, az ezekkel összefüggésbe hozható, Lck laterális membránmozgása a sejt felszíni GM1 mennyiségétől.

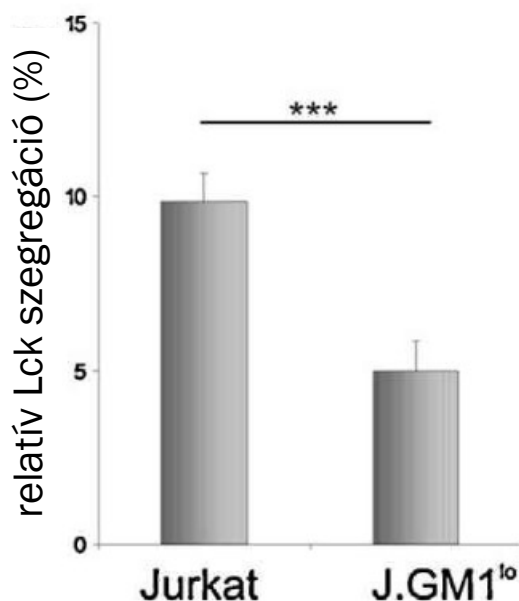
Humán aktivált T sejtek és Jurkat T sejtek sejtfelszíni GM1 mennyisége nagyon eltérő, voltak alacsony és magas sejtfelszíni GM1-et prezentáló sejtek (V. 12. Ábra A, és C fekete vastag vonal).



V. 12. Ábra.: Humán aktivált T (aktT) sejtek és Jurkat T sejtek sejtfelszíni GM1 mennyisége. A GM1-et FITC-cel jelzett coleratoxinnal (FITC-CTX) jelöltük intakt sejteken, és áramlási citofluorimetriával mértük a jelet. **A**, Humán aktivált T sejt sejtfelszíni GM1 mennyisége (kontroll: jelölés nélküli sejtek). Az alacsony és magas sejtfelszíni GM1-et expresszáló sejteket biotinilált CTX- streptavidin kötött mágnesgyöngy szelekciós módszerrel (részletesen lsd.: IV. 1. fejezetben) választottuk szét, és a kapott frakciók (alacsony GM1: aktGM1^{lo} és J.GM1^{lo}, magas GMI: aktGM1^{hi}) sejtfelszíni GM1 szintjét FACS-al mértük aktivált T sejt (**B**) és Jurkat (**C**) esetében.

Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk, hogyan változik az Lck szegregáció a sejtfelszíni GM1 mennyiségének függvényében, szétválogattuk az Anyagok és módszerek fejezetben részletesen leírt szeparálási eljárással a Jurkat sejtvonal esetében a GM1-et alacsonyan kifejező Jurkat sejteket (J.GM1^{lo}, V. 12. Ábra C), a humán aktivált T sejtek esetében a GM1 alacsony (aktTGM1^{lo}) illetve magasan expresszáló T sejteket (aktTGM1^{hi}) (V. 12. Ábra B).

A különböző sejtfelszíni GM1-et kifejező sejtpopulációkat alkalmazva, mértük hogyan változik az Lck szegregációja.



V. 13. Ábra: Lck kirekesztődés mértékének változása a T sejtek felszínén lévő GM1 mennyiségi változásával.

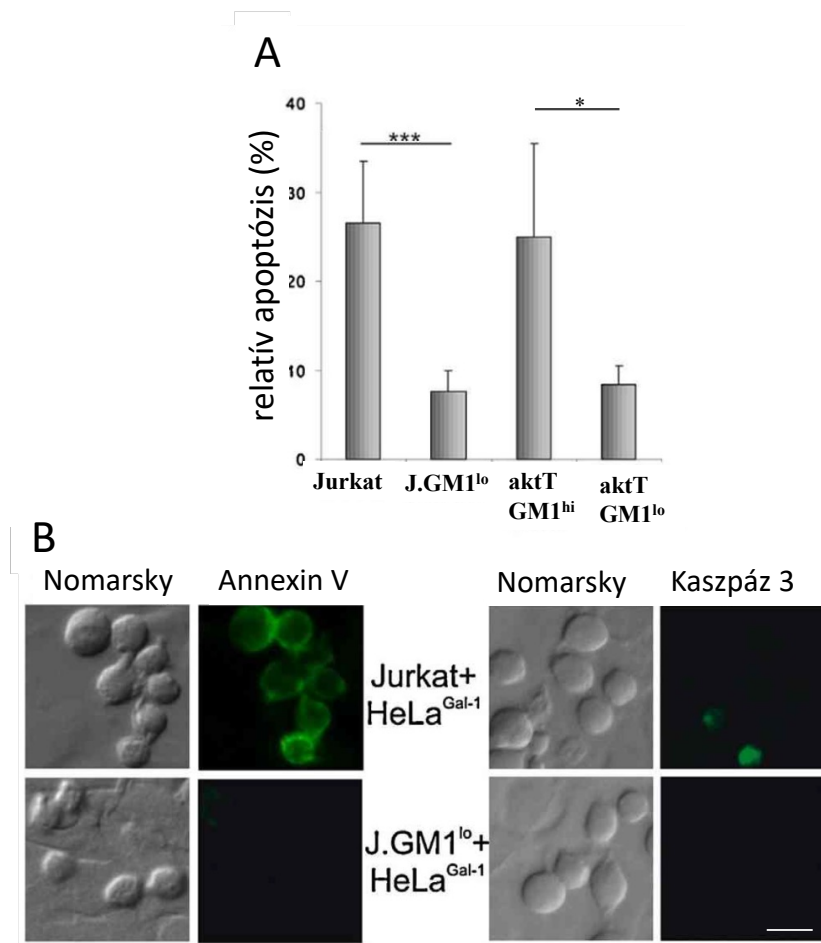
Jurkat vagy J.GM1^{lo} tartottunk ko-kultúrában HeLa^{mock} vagy HeLa^{Gal-1} sejtekkel. A relatív Lck szegregációt az alábbiak szerint számoltuk: HeLa^{Gal-1}-en kapott Lck szegregáció értékéből kivontuk a HeLa^{mock}-on kapott értéket. A diagram 3 független kísérlet 2-2 párhuzamos mintájának eredményét ábrázolja (szignifikancia: Student t próba, ***p<0.001).

Kísérleteinkből megállapítottuk, hogy a GM1-et alacsonyan expresszáló J.GM1^{lo} sejtekben szignifikánsan kevesebb az Lck szegregációt mutató sejtek aránya, mint a több sejt felszíni GM1-et kifejező Jurkat sejtekben (V. 13. Ábra).

V. 1. 5. A Gal-1 indukált T sejt apoptózis GM1 függő

Az Lck szegregáció tehát függ a sejt felszíni GM1 mennyiségétől, ezért kérdésként tettük fel, hogy maga a T sejt apoptózis is mutat-e GM1 függést. Az alacsony és magas sejt felszíni GM1-et kifejező sejt populációkat alkalmazva mértük, hogyan változik a T sejt apoptózis mértéke. Az apoptózis korai fázisában, a foszfatidil-szerin (PS) kifelé fordul a membránban, így a ko-kultúras rendszerünkben, immuncitokémiai módszerrel, fluorokrómmal konjugált AnnexinV molekulával detektálni tudtuk az apoptotikus sejteket. Az apoptózis kései fázisban a kaspáz 3 hasítódik, ezt hasított kaspáz 3 elleni antitest használatával tudtuk detektálni.

Az alacsony sejt felszíni GM1-et kifejező J.GM1^{lo} és aktGM1^{lo} T sejtek esetében kevesebb az AnnexinV, illetve a hasított kaspáz 3 pozitív, vagyis az apoptotikus sejtek aránya, mint a GM1-et magasabban kifejező Jurkat és aktGM1^{hi} sejtek esetében, a sejt felszíni GM1 csökkenése a Gal-1 indukált T sejt apoptózis mértékének csökkenésével járt együtt (V. 14. Ábra A, B), vagyis az apoptózis mértéke is GM1 függő.

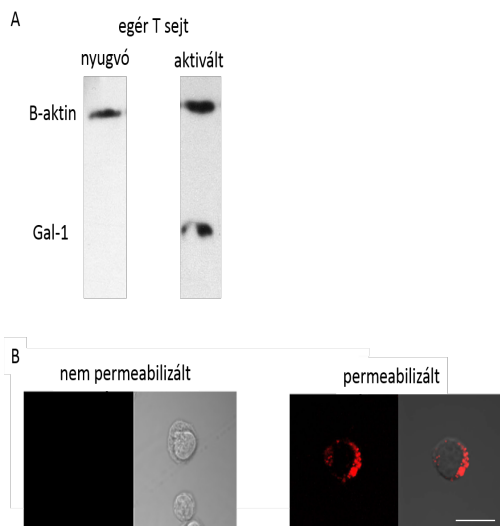


V. 14. Ábra: Gal-1 indukált T sejt apoptózis GM1 függése. Jurkat, J.GM1^{lo}, aktTGM1^{hi}, aktTGM1^{lo} sejteket tartottunk 16 óráig ko-kultúrában HeLa^{mock} vagy HeLa^{Gal-1} sejtekkel. **A**, Az apoptotikus sejteket Annexin V AlexaFluor 488-al jelöléssel detektáltuk, és számoltuk az apoptotikus sejtek arányát. A relatív apoptózis mértékét az alábbiak szerint számoltuk: a HeLa^{Gal-1}-en számolt apoptotikus sejtek értékekből kivontuk a HeLa^{mock}-on számolt értékeket. A diagram 3 független kísérletet ábrázol, kísérletenként 2 párhuzamos mintával dolgoztunk (szignifikancia: Student t próba, *p<0.05, ***p<0.001). **B**, Az apoptotikus sejteket 16 órás ko-kultúrában Annexin V AlexaFluor 488-al (bal), vagy 24 órás ko-kultúrában (jobb) nyúl anti-kaspáz 3-al és anti-nyúl IgG FITC-el (jobb) jelöltük, majd fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk. A mérce 10 µm.

V. 2. Endogén Gal-1 szerepe T sejt apoptózisban

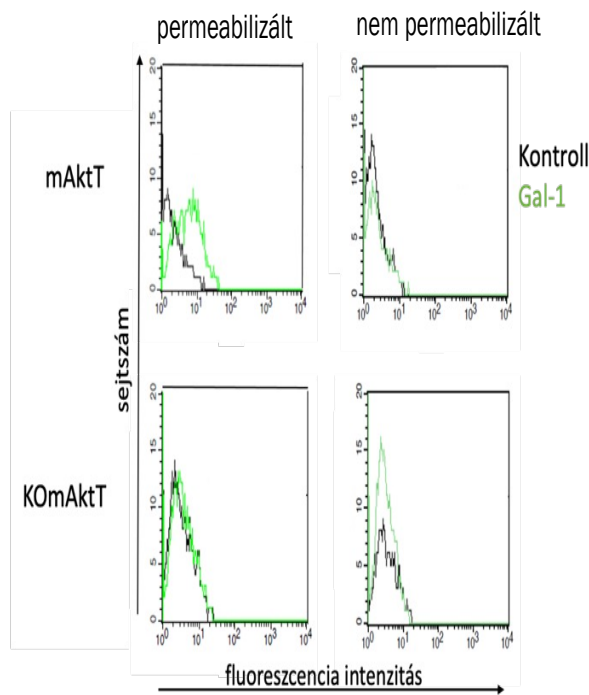
V. 2. 1. Intracelluláris Gal-1 (inGal-1) aktivált T sejtekben

A következőkben az aktivált T sejtek Gal-1 termelődését vizsgáltuk. Egér nyirokcsomóból T sejteket izoláltunk, poliklonálisan aktiváltunk, és Western blottal meghatároztuk, hogy míg a nyugvó T sejt nem, az aktivált T sejt kifejezi a Gal-1-et (V. 15. **Ábra A**). További kérdésünk, hogy szekretálódik-e a Gal-1. Azt tudjuk, hogy amennyiben szekretálódik a lektin, rögtön viszakötődik a termelő sejt felületére, ezért immunfluoreszcenciával, nem permeabilizált sejtek felszínén detektálható lenne a Gal-1.



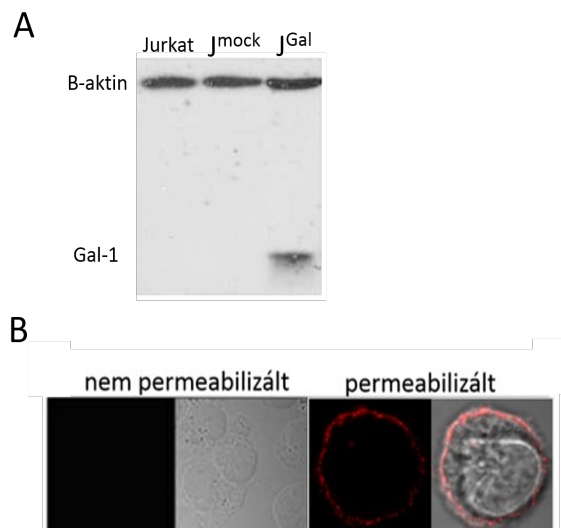
V. 15. Ábra: Egér nyugvó és aktivált T sejt Gal-1 termelődése és lokalizációja. A, Vad típusú (törzs: C57BL/6) egér nyirokcsomójából izolált nyugvó, vagy 3 napig 7,5 µg/ml Concavalin A (ConA)-val aktivált T sejtek Gal-1 fehérje expresszióját az V. 2. Ábránál taglaltak szerint detektáltuk Western blottal. B, A 60-as objektívvel készített konfokális mikroszkópos felvételek a nem permeabilizált és a permeabilizált egér aktivált T sejtek Gal-1 jelenlétét mutatja egér anti-Gal-1 monoklonális ellenanyag és anti-egér IgG NL557, piros) jelöléssel. A mérce 10 µm.

Az egér aktivált T sejtek nem permeabilizált mintáiban azonban a Gal-1 nem volt detektálható a sejtfelszínen sem mikroszkóppal (V. 15. B, nem permeabilizált panel), sem áramlási citofluorimetriával (V. 16. **Ábra** nem permeabilizált panel), míg a permeabilizált mintákban igen (V. 15. B, permeabilizált panel, és V. 16. **Ábra** permeabilizált panel). Mindezekből arra következtethetünk, hogy a Gal-1 valószínűleg nem kerül szekrécióra, és intracellulárisan marad jelen (inGal-1).



V. 16. Ábra: Egér aktivált T sejt (mAktT) és Gal-1 KO egérből származó aktivált T sejt (KOmAktT) intracelluláris és sejtfelszíni Gal-1. Vad típusú (C57BL/6) és Gal-1 génkiütött egérből (B6.Cg Lgals1tm1Rob/J,006337) nyirokcsomót izoláltunk, homogenizáltunk és 7,5 µg/ml ConA-val aktiváltuk 3 napig, majd az így kapott sejtpopulációban szeparációs gyöngyök felhasználásával dúsítottuk a T sejteket. A Gal-1 jel: monoklonális (2C1/6) egér anti-Gal-1-et és anti-egér IgG ATTO 488 ellenanyagot használtunk, az intracelluláris jelölés esetében a sejteket permeabilizáltuk.

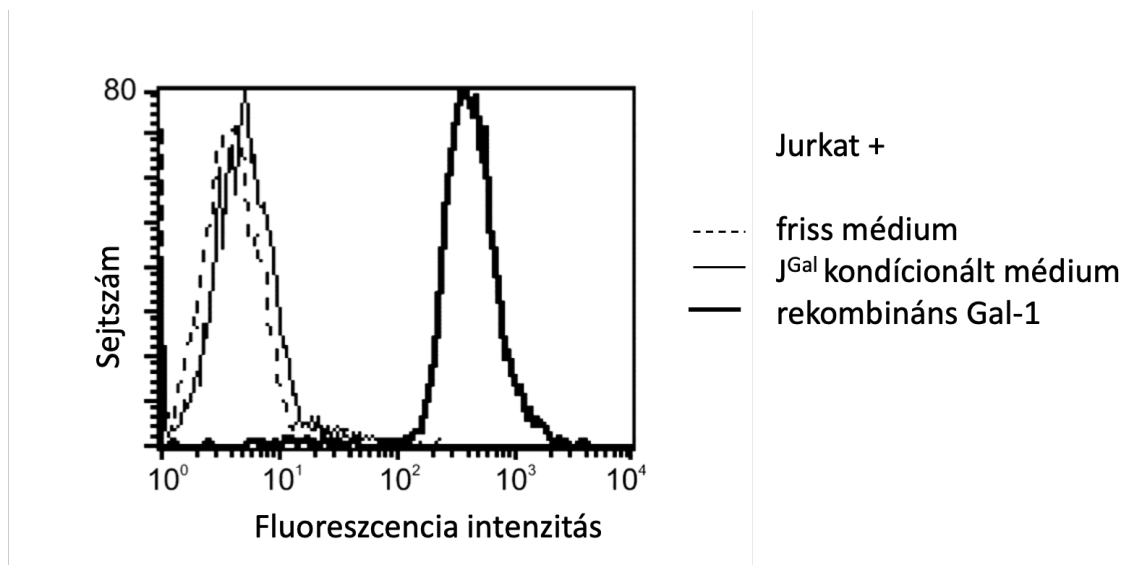
Annak érdekében, hogy vizsgálhassuk a későbbiekben az inGal-1 szerepét, létrehoztunk egy Gal-1 transzgenikus Jurkat T sejt vonalat, mely aktivált T sejt modellként szolgálhat.



V. 17. Ábra: Jurkat, J^{mock} és J^{Gal} T sejt Gal-1 termelése és lokalizációja. A, Jurkat, J^{mock}, J^{Gal} sejtek lizátumaiból V.2. Ábránál leírtak szerint detektáltuk a kifejeződő Gal-1 mennyiségét Western blottal. B, A 60-as objektívvel készített konfokális mikroszkópos felvételek az egér aktivált T sejt nem permeabilizált, vagy a permeabilizált mintáinak Gal-1 jelölését mutatják (egér anti-Gal-1 mAb és anti-egér IgG NL557, piros). A mércé 5 µm.

A Western blot eredmények igazolják, hogy míg a Gal-1-el transzfektált Jurkat T sejtek (J^{Gal}) kifejezik a Gal-1 fehérjét, addig a kontrollként használt Jurkat és az „üres vektorral” transzfektált Jurkat (J^{mock}) nem (V. 17. **Ábra A**), továbbá ebben a modelben is megállapítottuk, hogy a Gal-1 nem szekretálódik (V. 17. **Ábra B**).

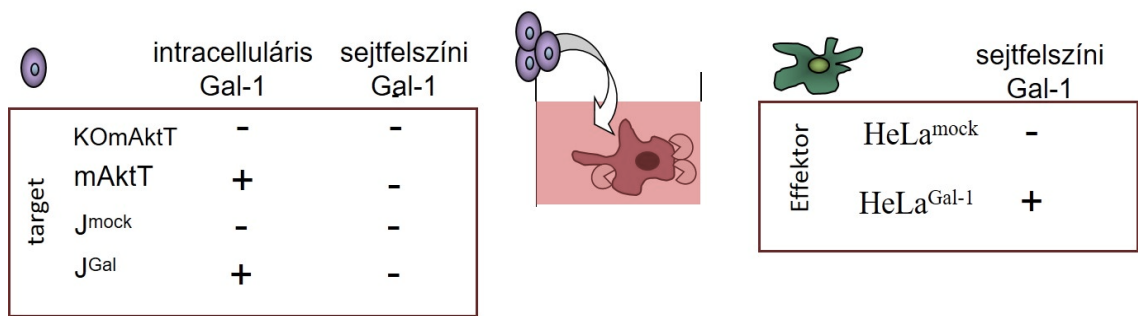
Amennyiben J^{Gal} kondicionált médiumát adtuk Jurkat T sejtekhez, nem volt detektálható Gal-1 jel áramlási citofluorimetriával (V.18. **Ábra** vékony vonal), holott a Jurkat Gal-1 kötő struktúrái épek voltak (V. 18. **Ábra** vastag vonal). Ez arra enged következtetni, hogy a J^{Gal} sejt felülúszó nem tartalmazza lektint, vagyis a J^{Gal} sejtek nem szekretálják a Gal-1-et (V. 18. **Ábra**).



V. 18. **Ábra:** J^{Gal} felülúszó nem tartalmaz Gal-1-et. Jurkat sejtekhez friss médiumot (szaggatott vonal), J^{Gal} kondicionált médiumot (folytonos vékony vonal) és 50 $\mu\text{g/ml}$ rekombináns Gal-1-et (folytonos vastag vonal) adtunk. Biotinilált monoklonális Gal-1 (2C1/6) ellenanyag és streptavidin FITC jelöléssel áramlási citofluorimetriával mértük a Gal-1 sejtfelszíni kötődését.

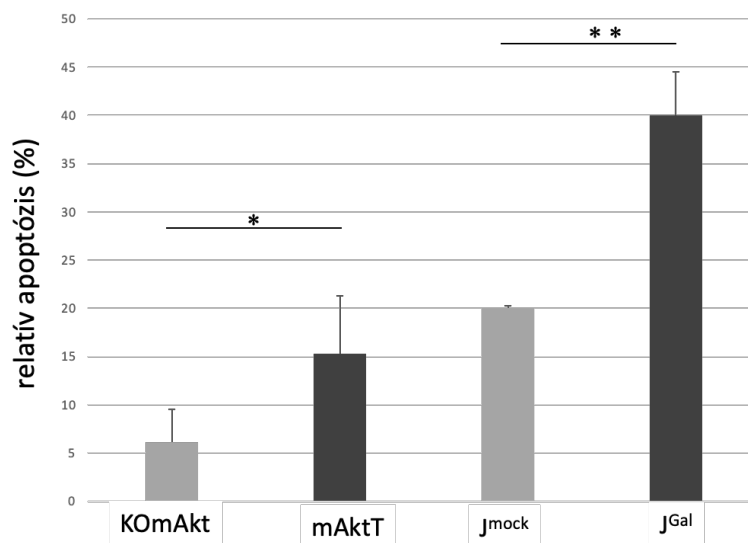
V. 2. 2. Az inGal-1 apoptózisra érzékenyítő hatása

Kérdésünk, hogy az intracelluláris Gal-1 (inGal-1) részt vesz-e az aktivált T sejtek apoptózisában, tágabb értelemben, van-e szerepe az immunrendszer lecsendesítésében, ezért a V. 19. **Ábrán** bemutatott ko-kultúras effektor/target sejt összeállításban vizsgáltuk, hogy az inGal-1 befolyásolja-e a külső, más sejtekből származó extracelluláris Gal-1 (exGal-1) T sejt apoptotikus hatását.



V. 19. Ábra: A ko-kultúrák rendszer target sejtjei: vad típusú (mAktT), vagy Gal-1 hiányos (KOMAktT) egérből származó aktivált T sejtek, valamint Gal-1 hiányos (J^{mock}), vagy Gal-1-gyel transzfektált (J^{Gal}) Jurkat sejtek. A ko-kultúrák rendszer effektor sejtjei: Gal-1 negatív (HeLa^{mock}), és Gal-et expresszáló (HeLa^{Gal-1}) HeLa sejtek.

A J^{Gal} aktivált T sejt modell és az egér aktivált T sejt (mAktT) inGal-1-et fejez ki. Ezeket a sejteket és Gal-1 negatív kontroll párjukat (J^{mock}, KOMAktT) tartottunk együtt HeLa^{mock} és HeLa^{Gal-1} sejtekkel, és mértük ebben a rendszerben az exGal-1 kiváltotta T sejt apoptózis mértékét.



V. 20. Ábra: T sejt apoptózis mértékének függése a T sejtek inGal-1 termelésétől. Gal-1 génkiütött egérből származó aktivált T sejteket (KOMAktT), vad típusú egérből származó aktivált T sejteket (mAktT), Gal-1-et nem termelő Jurkat T sejteket (J^{mock}) és Gal-1 termelő (J^{Gal}) génmódosított Jurkat T sejteket tartottunk ko-kultúrában HeLa^{mock} vagy HeLa^{Gal-1} effektor sejtekkel. Az apoptózist Annexin V-AlexaFluor488-al detektáltuk, és számoltuk az apoptotikus sejtek arányát. A relatív apoptózis mértékét az alábbiak szerint számoltuk: a HeLa^{Gal-1}-en számolt apoptotikus sejtek értékeiből kivontuk a HeLa^{mock}-on számolt értékeket. A diagram 3 független kísérlet 3-3 párhuzamos mintájának eredményét foglalja össze (szignifikancia: Student t próba, *p<0.05, **p<0.01).

Az apoptózis tesztek eredményeiből megállapíthatjuk, hogy az inGal-1-et kifejező T sejtek (mAktT, J^{Gal}) szignifikánsan nagyobb mértékben semmisülnek meg apoptózissal exGal-1 hatására, mint a Gal-1 negatív kontroll párjuk, vagyis az inGal-1 jelenléte érzékenyíti, hiánya pedig ellenállóvá teszi a T sejteket az exGal-1 apoptotikus hatására **(V. 20. Ábra)**.

VI. Diszkusszió

A,

A szolubilis rekombináns Gal-1 hatására bekövetkező T sejt apoptózis korai jelátviteli eseményeiben nagymértékű tirozin foszforiláció zajlik, aminek kulcsszereplője az Lck tirozin kináz¹⁰⁶. Az Lck hiányában az apoptózis is gátlódik¹⁴². A bevezetőben már említett apoptózis mechanizmussal kapcsolatos ellentmondások nagy többsége a rekombináns Gal-1 tisztítási eljárásából, illetve eltérő koncentrációban történő alkalmazásából adódhatnak. A rekombináns Gal-1-hez DTT redukáló ágenst adtak a fehérje funkció megvédése érdekében, azonban a DTT megváltoztatja az apoptózis mértékét^{174,108}. A szolubilis rekombináns fehérjét különböző koncentrációban alkalmazva szintén ellentmondásos eredmények születtek¹⁴³. Mindezek miatt mellőztük kísérleteinkben a rekombináns fehérje használatát, és a sejt közvetített Gal-1 hatását mérő, ko-kultúrás rendszert dolgoztunk ki. A sejt közvetített Gal-1 is T sejt apoptózist vált ki, ennek mechanizmusa szintén igényli az Lck és a ZAP70 jelenlétét, a mitokondriális membránpotenciál csökkentését és a kaszpáz aktivációját, továbbá a sejt-sejt kontaktust^{172, 143}.

A Gal-1 hatására aktív membrándinamikai folyamatok, raftképződések figyelhetők meg az extracelluláris szignalizációs elemek átrendeződésével, csoportosulásával^{175,19}, de az Lck, illetve a proximális jelátviteli elemek lokalizációját a sejt közvetített Gal-1 hatására még nem vizsgálták.

A fent említettek háttérben kérdésként tettük fel, hogy az Lck milyen topológiával, elhelyezkedéssel vesz részt a sejt közvetített Gal-1 által kiváltott T sejt apoptózis szignalizációban.

A Gal-1-et kifejező effektor sejt és a target T sejt között kialakuló GM1 felhalmozódást mutató kapcsolati zónában, valódi sejtkapcsolat révén a Gal-1 átkötődik az effektor sejtről a T sejtre a sejt-kapcsolati zónában és apoptotikus szignalizációs kaszkádot indít el. A sejtkapcsolatban, intracelluláris aktin felhalmozódás is megfigyelhető a T sejtekben.

Gal-1 hatására a tumor sejt - T sejt kapcsolati régióban rövid időn belül (15-45 perc) nagymértékű tirozin foszforiláció történik, a kontaktus elején, megközelítőleg 30 percig az Lck még jelen van a régióban. Az időkinetikai vizsgálatokból az állapítható meg, hogy

45 perc után az Lck kizáródik a sejtkontakt régióból, ezek után a tirozin foszforiláció lecseng. Ez jelentheti azt, hogy az Lck tirozin foszforilációs aktivitásának leállítása tulajdonképpen azzal történik meg, hogy fizikailag kikerül a szignalizációs és szinaptikus kontaktusból. Az, hogy pontosan milyen mechanizmuson keresztül valósul ez meg, illetve, hogy mi állhat ennek hátterében, mi indítja el, további vizsgálatokat tárgyát képezne. Érdekesség ebben az esetben, hogy a laterális membránmozgásnak nem a Gal-1 kötődésekor az Lck aktiválódásában, hanem az inaktiválódásában lehet szerepe azáltal, hogy fizikailag eltávolodik az Lck a szinaptikus és szignalizációs aktív zónából. A Gal-1 specifikusságát többféle ellenőrzési összeállításban elvégeztük, az Lck szegregáció laktózzal gátolható volt és nem a tumoros vagy transzfektált sejt vonalak alkalmazásából eredt.

További kísérleteinkben megállapítottuk, hogy az extracellulárisan Gal-1 kötő, intracellulárisan az Lck kináz aktivitását befolyásoló CD45 fizikai jelenléte és foszfatáz aktivitása egyaránt szükséges az Lck szegregációhoz. Legújabb szakirodalmi adatokat figyelembe véve, az Lck laterális membrán mozgását a konformációk közti ingadozás nagymértékben befolyásolja¹⁷⁶, a CD45 foszfatáz aktivitása pedig előidézhetheti az Lck konformáció változását¹⁴⁹, így elképzelhető, hogy a CD45 indítja el az Lck laterális membrán mozgását, de ennek igazolása vagy cáfolása szintén további vizsgálatokat igényel.

Egyre több irodalmi adat utal arra, hogy az Lck aktivitását nem csupán a konformáció és a kitüntetett tirozin csoportok foszforiláltsági állapota határozza meg, hanem a mikrodoménbe történő csoportosulás¹⁷⁷. Nyugvó T sejtben például nagy mennyiségben van jelen aktív Lck és receptor keresztkötésre ez az érték szinte alig változik¹⁷⁸, ami egy konstitutív egyensúlyi aktív Lck készletet feltételez. A mi eredményeink arra utalhatnak, hogy az Lck inaktiválódásában is szerepe lehet a laterális membrán mozgásoknak, és a mikrodoménekből történő kirekesztődésnek.

A membránhoz kapcsolódó molekulák irányított mozgása a membrán lipidkomponensektől is függ. Az egyik ilyen „kitüntetett” lipid a GM1-gangliozid, amely nem csak szerepet játszik a raftok szerveződésében, hanem szabályozza a jelátvitelt is a fent említett módon. A GM1 sejt felszíni mennyisége a T sejt élete során dinamikusan változik. Az aktivált T sejtek emelkedett GM1 expressziót mutatnak¹⁷¹ ami összhangban van azzal, hogy stimulus hatására raftképződés indul meg. Glükoszilceramid szintáz inhibitor alkalmazva a glikoszifingolipidek szintjének csökkenésére gyengül a TCR jelátvitel, a T sejt proliferáció és az IL-2 termelés¹⁷⁹.

Korábbi eredményeink is¹⁷² és az itt bemutatott eredmények is utalnak arra, hogy a membrán mikrodomének integritása elengedhetetlen a Gal-1 kiváltotta T sejt apoptózishoz. Ennek megfelelően a sejtmembrán GM1 szintje szintén döntő szerepet játszott a Gal-1 hatására kialakuló Lck szegregációban, és az apoptózisban is. Alacsony sejtfelszíni GM1 szintű T sejtek kevésbé érzékenyek a Gal-1 által indukált apoptózisra mint a GM1-et jobban expresszáló T sejtek. A Gal-1 által indukált T sejt apoptózis sejtfelszíni GM1 mennyiségével való összefüggés jelentőségét kiemeli, hogy patológiásan megváltozhat a GM1 mennyisége, például kimutatták, hogy normál egészséges kontrollhoz képest diabéteszes NOD egerek¹⁸⁰ illetve szisztémás lupus erythematosus-os (SLE) humán betegek T sejtjein¹⁸¹ lecsökkent, illetve megváltozott a GM1 szintje. A GM1 mennyiségi változásával együtt leírták a csökkent TCR¹⁸² zéta láncának és az Lck¹⁸³ szintjének megváltozását is, mely feltehetőleg hozzájárulhat az SLE-s T sejtek rendellenes TCR jelátviteléhez és diszfunkciójához. A GM1, a Gal-1 egyik azonosított kötőpartnere^{171,157}, és feltehetőleg fontos szerepe van a Gal-1 indukált T sejt apoptózisban, hiszen mennyiségével az apoptózis mértéke is változik.

Munkánk során kapott eredményeink nem közvetlenül, de összeegyeztethetők azzal a szemlélettel^{175,184, 185}, miszerint a galektinek egyfajta sejtfelszíni galektin-glikán rácsháló létrehozásával modulálják a szignalizációs kompartment képződéseket, és ezáltal befolyásolják a jelátviteli utakat.

B,

A Gal-1 T sejt apoptózisban betöltött szerepét kizárólag az extracelluláris Gal-1 funkciója szempontjából vizsgálták, azonban a Gal-1 egy tipikus citoplazmatikus fehérje, mely ugyan sok, a lektint termelő sejtől szekretálódik, de sok sejtben intracellulárisan marad^{186,157,187}.

Az aktivált T sejtek Gal-1 termelését már korábbi tanulmányok is leírják, Blaser és munkatársai kimutatták, hogy a T sejtekben aktiválás hatására Gal-1 mRNS termelődik⁵⁸. A *de novo* endogén Gal-1 funkciója azonban nem világos. Egyes kutatók feltételezik, hogy részt vesz a T sejt homeosztázis fenntartásában azáltal, hogy autokrin módon apoptózist indukál⁵⁸, azonban a szekréciót nem bizonyították.

Munkánk során igazoltuk, hogy poliklonális aktiválás hatására a T sejtek endogén Gal-1-et kezdenek termelni. Fent említettek tekintetében az endogén Gal-1 szekrécióját vizsgálva arra a megállapításra jutottunk, hogy egér és humán (e dolgozatban nem bemutatott adat) aktivált és a transzgenikus Gal-1⁺ Jurkat T sejtek a Gal-1-et nem

szekretálják, az intracellulárisan van jelen, a Gal-1 ugyanis kimutatható volt a sejtlizátumban, de nem volt detektálható sem a sejtfelszínen, sem a sejtkultúrák kondicionált médiumában.

A Gal-1 által kiváltott apoptózis szabályozható upstream vagy downstream intracelluláris eseményekkel, amelyek felerősíthetik vagy megakadályozhatják e fehérje által kiváltott apoptotikus jelet³¹. A galektin család különböző tagjai között ilyen tekintetben kisebb fajta „áthallásról” számoltak be, kimutatták, hogy az intracelluláris galectin-3 (inGal-3) a T sejteket rezisztenssé tette a Gal-1 által kiváltott sejthalálra^{141,109}.

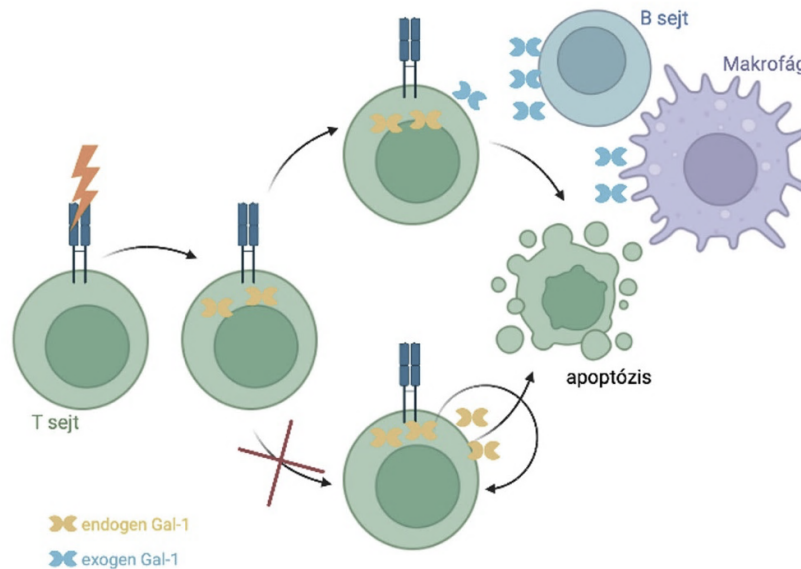
Az intracelluláris Gal-1 szerepét (inGal-1) a T sejt apoptózisra a már korábban bemutatott ko-kultúras rendszerben elemeztük, ahol egér aktivált T sejt, illetve Gal-1 negatív és Gal-1 pozitív Jurkat T sejteket használtunk modell sejtnek, és ahol az apoptotikus ágens a sejt közvetített extracelluláris Gal-1 (exGal-1) volt. Eredményeink azt tanúsították, hogy az inGal-1 hatással van az exGal-1 okozta T sejt apoptózis mértékére, a Gal-1-et termelő T sejtek érzékenyebbek az exGal-1 apoptotikus hatására, mint a Gal-1-et nem termelők. (Megjegyzendő, hogy az inGal-1 termelő aktivált T sejtek magasabb Lck szegregációt is mutattak.)

Megállapítottuk, hogy az aktivált T sejtekben *de novo* endogén Gal-1 intracellulárisan van jelen és érzékenyíti a sejteket az exGal-1 indukálta apoptózisra, illetve amennyiben nincs jelen, ellenállóbbak az apoptotikus szignálra. Feltételezésünk szerint, melyet a VI. 1. Ábrán foglaltunk össze, az endogén Gal-1 nem autokrin módon vesz részt a T sejtek lecsendesítésében, hanem intracelluláris jelenlétével, fokozza az exGal-1 T sejtekre irányuló apoptotikus hatását. Kísérletesen kimutatták, hogy aktivált B sejtek és aktivált makrofágok által közvetített szekretált Gal-1 T sejt apoptózist indukál^{59,60,188}, ezért elképzelhető, hogy gyulladós területeken ezek a sejtek szolgáltatják az extracelluláris Gal-1-et.

Az inGal-1 apoptózisra érzékenyítő hatásának mechanizmusa még tisztázásra vár. Míg az inGal-3 anti-apoptotikus hatása egy Bcl-2 homológ motívummal magyarázható¹⁸⁹, addig a Gal-1-nek nem ismert pro-apoptotikus fehérjékkel homológ szegmense, és az eddig leírt inGal-1 partnerfehérjéket átnézve sem találunk olyat, amelyik magyarázná a jelenséget, vagy következtetni engedne valamilyen irányba.

Kísérleteinkből tudjuk (dolgozatban nem prezentált adatok), hogy a Gal-1⁺ Jurkat sejtek felszínén megnő a TCR mennyisége, és nagyobb mennyiségű Ca²⁺ ion koncentráció mérhető a citoplazmába TCR stimulusra, továbbá magasabb a mitokondriális aktivitás is mint a Gal-1-et nem tartalmazó kontroll. Mivel a Gal-1

indukálta apoptózis mitokondriális útvonalon halad, az inGal-1 pozitív sejtek magasabb mitokondriális aktivitása lehetséges magyarázatként felmerülhet. Megjegyzendő, hogy vizsgáltuk más mitokondriális útvonalon haladó apoptotikus ágens hatását (pl.: staurosporin, hidrogén peroxid) is, és ezekben az esetekben pont az ellenkezőjét kaptuk eredményként, tehát ezekben az esetekben az inGal-1 tartalmú sejtek kevésbé apoptotizáltak.



VI. 1. Ábra: Aktivált T sejtekben termelődő Gal-1 immunszuppresszív szerepe

Aktivált T sejtek által termelt inGal-1 érzékenyíti a T sejteket a gyulladásos környezetben megjelenő (például aktivált makrofágok és B sejtek által szekretált) exGal-1 apoptotikus hatására, így az inGal-1 hozzájárulhat az immunrendszer lecsillapításához (az ábra a BioRender programmal felhasználásával készült).

Ebben a dolgozatban nem részletezett, további kísérleteket végeztünk az inGal-1 szerepére vonatkozólag. Szisztémás autoimmun betegek (szisztémás lupus erythematosus, SLE) aktivált T sejtjeit analizálva megállapítottuk, hogy a betegekből származó aktivált T sejtek csökkent mennyiségben fejezik ki az inGal-1-et, és a dolgozatban bemutatott inGal-1 eredményekkel összhangban, ezek a sejtek ellenállóbbak az exGal-1 apoptotikus hatásával szemben, mint az egészséges kontroll sejtek¹⁹⁰. Elképzelhető, hogy az inGal-1 hiánya egyik oka lehet a megnövekedett autoreaktív T sejtek számának ebben a komplex, szisztémás gyulladásos megbetegedésben.

Munkacsoportunk még további kísérletei szerint, a betegekből származó aktivált T sejtek felszíni glikozilációs mintázata eltér az egészséges humán aktivált T sejtekehez

képest, így nemcsak az inGal-1 hiánya okozhatja egyedül az SLE-s aktivált T sejtek rezisztenciáját az exGal-1 apoptotikus hatásával szemben, hanem a Gal-1 eltérő kötődése is¹⁹¹.

A Gal-1 transzgenikus Jurkattal végzett kísérleteink szerint, az inGal-1 csökkenti a T sejt proliferációs képességét is. Ezen eredményünket más kutatócsoport prosztata rák egér preklinikai modellje is támogatja, amelyben a szerzők kimutatták, hogy tumoros egérből származó T limfocitákban az endogén Gal-1 modulálja a tumorsejtből származó exGal-1 immunsejtre ható proliferációs és citotoxikus képességét. A T sejtekben a Gal-1 hiánya fokozta a tumorelles immunválaszt¹⁹².

Összegezve két alapvető új szemponttal bővítettük eddigi ismereteinket a Gal-1 apoptózis mechanizmusát illetően:

1, Részletesen vizsgáltuk a Gal-1 indukálta T sejt apoptózis legkorábbi folyamatait, különösen az exGal-1 kötődését követő membrán folyamatokat. Megállapítottuk, hogy:

- Az effektor-target sejt kontaktusából az Lck tirozin kináz kizáródik
- Az Lck aktivitását szabályozó receptor tirozin foszfatáz, a CD45 jelenléte és foszfatáz aktivitása is szükséges az Lck membránban való mozgásához.
- A GM1 gangliozid szintje, a membrán raftok alapvető komponense és egyben a Gal-1 kötő receptor, szabályozza az Lck kizáródás folyamatát és párhuzamosan a T sejt apoptózis mértékét.

2, Meghatároztunk egy új az inGal-1 funkciót:

- Az aktivált T sejtekben, *de novo* Gal-1 expresszálódik. A Gal-1 mind az aktivált T sejtekben, mind a Gal-1-gyel transzfektált Jurkat sejtekben a sejt belsejében marad, nem szekretálódik.
- Az inGal-1 mennyisége befolyásolja a sejtek érzékenységét az exGal-1 apoptotikus hatásával szemben, ugyanis az inGal-1 csökkent mennyisége, vagy hiánya a sejtek rezisztenciáját váltja ki.

VII. Irodalomjegyzék

1. Kasai, K.-I. *et al.* Galectins: A Family of Animal Lectins That Decipher Glycocodes. *J Biol Chem* 271, 1–8 (1996).
2. Blois, S. M. *et al.* Pregnancy galectinology: Insights into a complex network of glycan binding proteins. *Front Immunol* 10, 1166 (2019).
3. Rabinovich, G. A. *et al.* Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1572, 274–284 (2002).
4. Vasta, G. R. *et al.* Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol* 7, 424–438 (2009).
5. Cooper, D. N. W. *et al.* Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *Journal of Cell Biology* 110, 1681–1691 (1990).
6. Leffler, H. *et al.* Introduction to galectins. *Glycoconj J* 19, 433–40 (2002).
7. Yang, R. Y. *et al.* Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 10, (2008).
8. Brewer, C. F. *et al.* Clusters, bundles, arrays and lattices: Novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Current Opinion in Structural Biology* vol. 12 616–623 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00364-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00364-0) (2002).
9. Liu, F. T. *et al.* Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 136, 385–400 (2005).
10. Ahmad, N. *et al.* Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem* 279, 10841–10847 (2004).
11. Barrientos, G. *et al.* Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. *Hum Reprod Update* 20, 175–193 (2014).
12. Teichberg, V. I. *et al.* A β D galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1383–1387 (1975).
13. López-Lucendo, M. F. *et al.* Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. *J Mol Biol* 343, 957–70 (2004).
14. Cho, M. *et al.* Characterization of monomeric forms of galectin-1 generated by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 35, 13081–13088 (1996).
15. Romero, J. M. *et al.* Impact of human galectin-1 binding to saccharide ligands on dimer dissociation kinetics and structure. *Glycobiology* 26, 1317–1327 (2016).
16. Leppänen, A. *et al.* Dimeric galectin-1 binds with high affinity to α 2,3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetyllactosamine units on surface-bound extended glycans. *J Biol Chem* 280, 5549–5562 (2005).
17. Modenutti, C. P. *et al.* The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design. *Front Chem* 7, 823 (2019).
18. Dias-Baruffi, M. *et al.* Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *J Biol Chem* 278, 41282–41293 (2003).

19. Rabinovich, G. A. *et al.* Turning ‘sweet’ on immunity: Galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Reviews Immunology* vol. 9 338–352 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri2536> (2009).
20. Camby, I. *et al.* Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 16, 137R-157R (2006).
21. Yu, X. *et al.* Redox state influence on human galectin-1 function. *Biochimie* 116, 8–16 (2015).
22. Guardia, C. M. *et al.* Structural basis of redox-dependent modulation of galectin-1 dynamics and function. *Glycobiology* 24, 428–441 (2014).
23. Summers, F. A. *et al.* Identification of proteins susceptible to thiol oxidation in endothelial cells exposed to hypochlorous acid and N-chloramines. *Biochem Biophys Res Commun* 425, 157–161 (2012).
24. Kadoya, T. *et al.* Structural and functional studies of galectin-1: a novel axonal regeneration-promoting activity for oxidized galectin-1. *Curr Drug Targets* 6, 375–383 (2005).
25. Arata, Y. *et al.* Effects of substitution of conserved amino acid residues on the sugar-binding property of the tandem-repeat 32-kDa galectin of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biol Pharm Bull* 24, 14–18 (2001).
26. Stowell, S. R. *et al.* Ligand Reduces Galectin-1 Sensitivity to Oxidative Inactivation by Enhancing Dimer Formation. *Journal of Biological Chemistry* 284, 4989–4999 (2009).
27. Cho, M. *et al.* Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. *J Biol Chem* 270, 5198–5206 (1995).
28. Cerliani, J. P. *et al.* Translating the ‘Sugar Code’ into Immune and Vascular Signaling Programs. *Trends Biochem Sci* 42, 255–273 (2017).
29. Ahmad, N. *et al.* Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Glycobiology* 14, 817–825 (2004).
30. He, J. *et al.* Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J Biol Chem* 279, 4705–4712 (2004).
31. Rabinovich, G. A. *et al.* Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments. *Immunol Rev* 230, 144–159 (2009).
32. Grigorian, A. *et al.* T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice. *Immunological Reviews* vol. 230 232–246 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00796.x> (2009).
33. Nabi, I. R. *et al.* The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci* 128, 2213–2219 (2015).
34. Bonzi, J. *et al.* Pre-B cell receptor binding to galectin-1 modifies galectin-1/carbohydrate affinity to modulate specific galectin-1/glycan lattice interactions. *Nat Commun* 6, (2015).
35. Goldring, K. *et al.* The effect of galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro. *J Cell Sci* 115, 355–366 (2002).
36. Nguyen, J. *et al.* Galectin-1 Specifically Modulates TCR Signals to Enhance TCR Apoptosis but Inhibit IL-2 Production and Proliferation1. *Article in The Journal of Immunology* (1999).
37. Rabinovich, G. A. *et al.* Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 97, 100–106 (1999).

38. Moiseeva, E. P. *et al.* Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. *J Vasc Res* 36, 47–58 (1999).
39. Suzuki, O. *et al.* Galectin-1-mediated cell adhesion, invasion and cell death in human anaplastic large cell lymphoma: Regulatory roles of cell surface glycans. *Int J Oncol* 44, 1433 (2014).
40. Cummings, R. D. & Etzler, M. E. *R-type Lectins*. (2009).
41. Lthijssen, V. *et al.* Galectin-1 and -9 in angiogenesis: a sweet couple. *Glycobiology* 24, 915–920 (2014).
42. Tirado-gonzález, I. *et al.* Galectin-1 influences trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy. *Mol Hum Reprod* 19, 43–53 (2013).
43. Kolundžić, N. *et al.* Galectin-1 Is Part of Human Trophoblast Invasion Machinery - A Functional Study In Vitro. *PLoS One* 6, (2011).
44. Jeschke, U. *et al.* The human endometrium expresses the glycoprotein mucin-1 and shows positive correlation for Thomsen-Friedenreich epitope expression and galectin-1 binding. *J Histochem Cytochem* 57, 871–881 (2009).
45. Kaltner, H. *et al.* Galectin-1 and galectin-3 in fetal development of bovine respiratory and digestive tracts: Comparison of cell type-specific expression profiles and subcellular localization. *Cell Tissue Res* 307, 35–46 (2002).
46. Hughes, R. C. *et al.* Galectins in kidney development. *Glycoconj J* 19, 621–629 (2004).
47. Wei, Q. *et al.* Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity* 48, 632–648 (2018).
48. Rabinovich, G. A. *et al.* Galectins and microenvironmental niches during hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 18, 443–451 (2011).
49. Vas, V. *et al.* Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells* 23, 279–287 (2005).
50. Gauthier, L. *et al.* Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13014–13019 (2002).
51. McGraw, J. *et al.* Regulation of neuronal and glial galectin-1 expression by peripheral and central axotomy of rat primary afferent neurons. *Exp Neurol* 195, 103–114 (2005).
52. Watt, D. J. *et al.* The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration. *Glycoconj J* 19, 615–619 (2002).
53. Sakaguchi, M. *et al.* A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7112–7117 (2006).
54. Luis, J. *et al.* Galectins and their involvement in ocular disease and development. *Exp Eye Res* 197, 108120 (2020).
55. Barrientos, G. *et al.* Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. *Hum Reprod Update* 20, 175–193 (2014).
56. Ramhorst, R. E. *et al.* Galectin-1 confers immune privilege to human trophoblast: implications in recurrent fetal loss. *Glycobiology* 22, 1374–1386 (2012).
57. Ilarregui, J. M. *et al.* Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 10, 981–991 (2009).

58. Blaser, C. *et al.* β -Galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol* 28, 2311–2319 (1998).
59. Zuñiga, E. *et al.* Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J Leukoc Biol* 70, 73–79 (2001).
60. Rabinovich, G. A. *et al.* Regulated expression of a 16-kd galectin-like protein in activated rat macrophages. *J Leukoc Biol* 59, 363–70 (1996).
61. Dalotto-Moreno, T. *et al.* Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer Res* 73, 1107–1117 (2013).
62. Rutkowski, M. R. *et al.* Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation. *Cancer Cell* 27, 27–40 (2015).
63. Garín, M. I. *et al.* Galectin-1: A key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109, 2058–2065 (2007).
64. Sundblad, V. *et al.* Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *The Journal of Immunology* 199, 3721–3730 (2017).
65. Rabinovich, G. A. *et al.* Evidence of a Role for galectin-1 in Acute Inflammation. *Eur J Immunol* 30, (2000).
66. Correa, S. G. *et al.* Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology* 13, 119–128 (2003).
67. Cooper, D. *et al.* Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. *J Leukoc Biol* 83, 1459–1466 (2008).
68. Delbrouck, C. *et al.* Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration. *Laboratory Investigation* 82, 147–158 (2002).
69. Anginot, A. *et al.* Galectin 1 modulates plasma cell homeostasis and regulates the humoral immune response. *J Immunol* 190, 5526–5533 (2013).
70. Huang, Z. *et al.* Placental Angiogenesis in Mammals: A Review of the Regulatory Effects of Signaling Pathways and Functional Nutrients. *Advances in Nutrition* 12, 2415–2434 (2021).
71. Croci, D. O. *et al.* Regulatory role of glycans in the control of hypoxia-driven angiogenesis and sensitivity to anti-angiogenic treatment. *Glycobiology* 24, 1283–1290 (2014).
72. Thijssen, V. L. *et al.* Galectins in Endothelial Cell Biology and Angiogenesis: The Basics. *Biomolecules* 11, (2021).
73. D’Haene, N. *et al.* VEGFR1 and VEGFR2 Involvement in Extracellular Galectin-1- and Galectin-3-Induced Angiogenesis. *PLoS One* 8, e67029 (2013).
74. Hsieh, S. H. *et al.* Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* 2008 27:26 27, 3746–3753 (2008).
75. Poirier, F. *et al.* Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development* 119, 1229–1236 (1993).
76. Blois, S. M. *et al.* A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 13, 1450–1457 (2007).
77. Puche, A. C. *et al.* Role of Galectin-1 in the Developing Mouse Olfactory System. *Dev Biol* 179, 274–287 (1996).
78. Georgiadis, V. *et al.* Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev Dyn* 236, 1014–1024 (2007).

79. Toscano, M. A. *et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature Immunology* 2007 8:8 8, 825–834 (2007).
80. Iqbal, A. J. *et al.* Endogenous galectin-1 exerts tonic inhibition on experimental arthritis. *J Immunol* 191, 171–177 (2013).
81. Yamamoto, T. *et al.* Hypoxia Induces Galectin-1 Expression Via Autoinduction of Placental Growth Factor in Retinal Pigment Epithelium Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 62, (2021).
82. Zhang, P. *et al.* Galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis* 5, (2014).
83. Kim, H. J. *et al.* Galectin 1 expression is associated with tumor invasion and metastasis in stage IB to IIA cervical cancer. *Hum Pathol* 44, 62–68 (2013).
84. Brown, E. R. *et al.* Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis. *Eur J Cancer* 48, 865–874 (2012).
85. Xue, X. *et al.* Galectin-1 secreted by activated stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma stroma promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells: an in vitro study on the microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 40, 832–839 (2011).
86. Bacigalupo, M. L. *et al.* Contribution of galectin-1, a glycan-binding protein, to gastrointestinal tumor progression. *World J Gastroenterol* 23, 5266–5281 (2017).
87. Wu, R. *et al.* Prognostic significance of galectin-1 expression in patients with cancer: A meta-analysis. *Cancer Cell Int* 18, 1–8 (2018).
88. Martínez-Bosch, N. *et al.* Galectins in the Tumor Microenvironment: Focus on Galectin-1. *Adv Exp Med Biol* 1259, 17–38 (2020).
89. Cousin, J. M. *et al.* The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int J Mol Sci* 17, (2016).
90. Kokkas, B. *et al.* Tissue injury and inflammation. *Ann Gen Psychiatry* 9, S1 (2010).
91. Hermenean, A. *et al.* Galectin 1-A Key Player between Tissue Repair and Fibrosis. (2022) doi:10.3390/ijms23105548.
92. Horie, H. *et al.* Oxidized galectin-1 stimulates macrophages to promote axonal regeneration in peripheral nerves after axotomy. *J Neurosci* 24, 1873–1880 (2004).
93. Mendez-Huergo, S. P. *et al.* Integration of lectin-glycan recognition systems and immune cell networks in CNS inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 25, 247–255 (2014).
94. Rabinovich, G. A. *et al.* Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med* 190, 385–397 (1999).
95. Perone, M. J. *et al.* Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1. *J Immunol* 182, 2641–2653 (2009).
96. Wu, G., Lu, Z. H. *et al.* Ganglioside GM1 deficiency in effector T cells from NOD mice induces resistance to regulatory T-cell suppression. *Diabetes* 60, 2341–2349 (2011).
97. Endharti, A. T. *et al.* Galectin-1 supports survival of naive T cells without promoting cell proliferation. *Eur J Immunol* 35, 86–97 (2005).
98. de la Fuente, H. *et al.* The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. *Mol Cell Biol* 34, 2479–2487 (2014).

99. Shah, K. *et al.* T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 6:1 6, 1–26 (2021).
100. Kondo, K. *et al.* Thymus machinery for T-cell selection. *Int Immunol* 31, 119–125 (2019).
101. Perillo, N. L. *et al.* Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med* 185, 1851–1858 (1997).
102. Stillman, B. N. *et al.* Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol* 176, 778–789 (2006).
103. Liu, S. D. *et al.* Endogenous galectin-1 enforces class I-restricted TCR functional fate decisions in thymocytes. *Blood* 112, 120–130 (2008).
104. Chung, C. D. *et al.* Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol* 165, 3722–3729 (2000).
105. Perillo, N. L. *et al.* Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378, 736–739 (1995).
106. Ion, G. *et al.* Role of p56lck and ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in galectin-1-induced cell death. *Cell Death Differ* 12, 1145–7 (2005).
107. Toscano, M. A. *et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 8, 825–834 (2007).
108. Stowell, S. R. *et al.* Differential Roles of Galectin-1 and Galectin-3 in Regulating Leukocyte Viability and Cytokine Secretion. *The Journal of Immunology* 180, 3091–3102 (2008).
109. Motran, C. C. *et al.* Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function. *Eur J Immunol* 38, 3015 (2008).
110. Rabinovich, G. A. *et al.* Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death & Differentiation* 2002 9:6 9, 661–670 (2002).
111. Perone, M. J. *et al.* Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1. *J Immunol* 182, 2641–2653 (2009).
112. Shevryev, D. *et al.* Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol* 10, (2020).
113. Garín, M. I. *et al.* Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109, 2058–2065 (2007).
114. Wang, J. *et al.* Cross-linking of GM1 ganglioside by galectin-1 mediates regulatory T cell activity involving TRPC5 channel activation: possible role in suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 182, 4036–4045 (2009).
115. Toscano, M. A. *et al.* Galectin-1 Suppresses Autoimmune Retinal Disease by Promoting Concomitant Th2- and T Regulatory-Mediated Anti-Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology* 176, 6323–6332 (2006).
116. Blois, S. M. *et al.* A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 13, 1450–1457 (2007).
117. Juszczynski, P. *et al.* The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13134–13139 (2007).
118. Brusko, T. M. *et al.* Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev* 223, 371–390 (2008).

119. Rabinovich, G. A. *et al.* Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25, 267–296 (2007).
120. Khanna, K. M. *et al.* Regulation of T Cell Trafficking by enzymatic Synthesis of O-Glycans. *Article* 8, 1 (2017).
121. He, J. *et al.* Galectin interactions with extracellular matrix and effects on cellular function. *Methods Enzymol* 417, 247–256 (2006).
122. He, J. *et al.* Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. *Laboratory Investigation* 2006 86:6 86, 578–590 (2006).
123. Norling, L. v. *et al.* Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. *FASEB J* 22, 682–690 (2008).
124. Mitchell, J. S. *et al.* Clustering T-cell GM1 lipid rafts increases cellular resistance to shear on fibronectin through changes in integrin affinity and cytoskeletal dynamics. *Immunol Cell Biol* 87, 324–336 (2009).
125. Elola, M. T. *et al.* Galectin-1 receptors in different cell types. *Journal of Biomedical Science* 2005 12:1 12, 13–29 (2005).
126. Pace, K. E. *et al.* Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol* 163, 3801–11 (1999).
127. Walzel, H. *et al.* Involvement of CD2 and CD3 in galectin-1 induced signaling in human Jurkat T-cells. *Glycobiology* 10, 131–140 (2000).
128. Walzel, H. *et al.* Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. *Immunol Lett* 67, 193–202 (1999).
129. Fajka-Boja, R. *et al.* Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. in *Immunology Letters* vol. 82 149–154 (2002).
130. Nguyen, J. T. *et al.* CD45 Modulates Galectin-1-Induced T Cell Death: Regulation by Expression of Core 2 O -Glycans . *The Journal of Immunology* 167, 5697–5707 (2001).
131. Earl, L. A. *et al.* N- and O-Glycans Modulate Galectin-1 Binding, CD45 Signaling, and T Cell Death. *J Biol Chem* 285, 2232 (2010).
132. Roberts, A. A. *et al.* Galectin-1-mediated apoptosis in mycosis fungoides: the roles of CD7 and cell surface glycosylation. *Mod Pathol* 16, 543–551 (2003).
133. Kopitz, J. *et al.* Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture. *J Biol Chem* 273, 11205–11211 (1998).
134. Zhang, T. *et al.* The role of glycosphingolipids in immune cell functions. *Front Immunol* 10, 90 (2019).
135. Tuosto, L. *et al.* Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. doi:10.1002/1521-4141.
136. Brumeanu, T. D. *et al.* Differential partitioning and trafficking of GM gangliosides and cholesterol-rich lipid rafts in thymic and splenic CD4 T cells. *Mol Immunol* 44, 530–540 (2007).
137. Fajka-Boja, R. *et al.* Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 65, 2586–2593 (2008).
138. Wang, J. *et al.* Cross-Linking of GM1 Ganglioside by Galectin-1 Mediates Regulatory T Cell Activity Involving TRPC5 Channel Activation: Possible Role in Suppressing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 182, 4036–4045 (2009).

139. Matarrese, P. *et al.* Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *Journal of Biological Chemistry* 280, 6969–6985 (2005).
140. Brandt, B. *et al.* Galectin-1 induced activation of the apoptotic death-receptor pathway in human Jurkat T lymphocytes. *Histochem Cell Biol* 129, 599–609 (2008).
141. Hahn, H. P. *et al.* Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in caspase- and cytochrome c-independent T cell death. *Cell Death Differ* 11, 1277–1286 (2004).
142. Ion, G. *et al.* Acid sphingomyelinase mediated release of ceramide is essential to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1. *Cell Signal* 18, 1887–96 (2006).
143. Blaskó, A. *et al.* How does it act when soluble? Critical evaluation of mechanism of galectin-1 induced T-cell apoptosis. *Acta Biol Hung* 62, 106–111 (2011).
144. Stirnweiss, A. *et al.* T cell activation results in conformational changes in the Src family kinase Lck to induce its activation. *Sci Signal* 6, (2013).
145. Chiang, Y. J. *et al.* T cell development is regulated by the coordinated function of proximal and distal Lck promoters active at different developmental stages. *Eur J Immunol* 46, 2401 (2016).
146. Sharif-Askari, E. *et al.* p56Lck Tyrosine Kinase Enhances the Assembly of Death-inducing Signaling Complex during Fas-mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 282, 36048–36056 (2007).
147. Ventimiglia, L. N. *et al.* The role of membrane rafts in Lck transport, regulation and signalling in T-cells. *Biochemical Journal* vol. 454 169–179 Preprint at <https://doi.org/10.1042/BJ20130468> (2013).
148. Boggon, T. J. *et al.* Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* vol. 23 7918–7927 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208081> (2004).
149. Bommhardt, U. *et al.* Beyond TCR signaling: Emerging functions of Lck in cancer and immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms20143500> (2019).
150. Barber, E. K. *et al.* The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56(lck)) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3277–3281 (1989).
151. Wange, R. L. *et al.* Complex complexes: Signaling at the TCR. *Immunity* vol. 5 197–205 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80315-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80315-5) (1996).
152. Palacios, E. H. *et al.* Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* vol. 23 7990–8000 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208074> (2004).
153. Zhang, W. *et al.* LAT: The ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83–92 (1998).
154. Janes, P. W. *et al.* The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* 12, 23–34 (2000).
155. Brown, D. A. *et al.* Function of lipid rafts in membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111–136 (1998).
156. Janes, P. W. *et al.* Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *Journal of Cell Biology* 147, 447–461 (1999).
157. Kutzner, T. J. *et al.* How presence of a signal peptide affects human galectins-1 and -4: Clues to explain common absence of a leader sequence among adhesion/growth-regulatory galectins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1864, 129449 (2020).

158. Wang, J. L. *et al.* Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta* 1673, 75–93 (2004).
159. Hughes, R. C. *et al.* Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* vol. 1473 172–185 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00177-4) (1999).
160. Seelenmeyer, C. *et al.* Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *J Cell Biol* 171, 373–81 (2005).
161. Popa, S. J. *et al.* Unconventional secretion of annexins and galectins. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vol. 83 42–50 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.022> (2018).
162. Bänfer, S. *et al.* Galectins in Intra- and Extracellular Vesicles. *Biomolecules* 10, 1–12 (2020).
163. Ose, R. *et al.* Galectin-1 and Galectin-3 Mediate Protocadherin-24-Dependent Membrane Localization of β -catenin in Colon Cancer Cell Line HCT116. *Curr Chem Genomics* 6, 18–26 (2012).
164. Saussez, S. *et al.* Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth-regulatory lectins galectins-1 and -7 during tumour progression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. *Histopathology* 52, 483–493 (2008).
165. Vladoiu, M. C. *et al.* Intracellular galectins in cancer cells: Potential new targets for therapy (review). *Int J Oncol* 44, 1001–1014 (2014).
166. Cousin, J. M. *et al.* The role of galectin-1 in cancer progression, and synthetic multivalent systems for the study of Galectin-1. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms17091566> (2016).
167. Paz, A. *et al.* Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 20, 7486–93 (2001).
168. Michael, J. v. *et al.* Inhibition of Galectin-1 Sensitizes HRAS-driven Tumor Growth to Rapamycin Treatment. *Anticancer Res* 36, 5053–5061 (2016).
169. Park, J. W. *et al.* Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res* 29, 3595–3602 (2001).
170. Will, C. L. *et al.* Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, 1–2 (2011).
171. Wang, J. *et al.* Cross-Linking of GM1 Ganglioside by Galectin-1 Mediates Regulatory T Cell Activity Involving TRPC5 Channel Activation: Possible Role in Suppressing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 182, 4036–4045 (2009).
172. Kovács-Sólyom, F. *et al.* Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunol Lett* 127, 108–118 (2010).
173. Ju, T. *et al.* A novel fluorescent assay for T-synthase activity. (2010) doi:10.1093/glycob/cwq168.
174. Stowell, S. R. *et al.* 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 (2007).
175. Rabinovich, G. A. *et al.* Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* 17, 513–20 (2007).
176. Hilzenrat, G. *et al.* Conformational States Control Lck Switching between Free and Confined Diffusion Modes in T Cells. *Biophys J* 118, 1489–1501 (2020).

177. Rossy, J. *et al.* How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Front Immunol* 3, 167 (2012).
178. Paster, W. *et al.* Genetically encoded Förster resonance energy transfer sensors for the conformation of the Src family kinase Lck. *J Immunol* 182, 2160–2167 (2009).
179. Zhu, Y. *et al.* Lowering glycosphingolipid levels in CD4⁺ T cells attenuates T cell receptor signaling, cytokine production, and differentiation to the Th 17 lineage. *Journal of Biological Chemistry* 286, 14787–14794 (2011).
180. Wu, G. *et al.* Ganglioside GM1 deficiency in effector T cells from NOD mice induces resistance to regulatory T-cell suppression. *Diabetes* 60, 2341–2349 (2011).
181. Jury, E. C. *et al.* Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation* 113, 1176–1187 (2004).
182. Liossis, S. N., Ding, X. Z., Dennis, G. J. & Tsokos, G. C. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest* 101, 1448–1457 (1998).
183. Jury, E. C. *et al.* Increased ubiquitination and reduced expression of LCK in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48, 1343–1354 (2003).
184. Garner, O. B. *et al.* Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. in *Biochemical Society Transactions* vol. 36 1472–1477 (Biochem Soc Trans, 2008).
185. Grigorian, A. *et al.* T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice. *Immunol Rev* 230, 232–46 (2009).
186. Harrison, F. L. *et al.* The 14 kDa β -galactoside binding lectin in myoblast and myotube cultures: Localization by confocal microscopy. *J Cell Sci* 101, 635–646 (1992).
187. Clerch, L. B. *et al.* Rat lung lectin gene expression is regulated developmentally and by dexamethasone. *Am J Physiol Cell Physiol* 256, (1989).
188. Rabinovich, G. A. *et al.* Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol* 160, 4831–40 (1998).
189. Yang, R. Y. *et al.* Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6737–6742 (1996).
190. Deák, M. *et al.* Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions. *Immunobiology* 220, 483–489 (2015).
191. Szabó, E. *et al.* Altered Cell Surface N-Glycosylation of Resting and Activated T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci* 20, (2019).
192. Corapi, E. *et al.* Endogenous Galectin-1 in T Lymphocytes Regulates Anti-prostate Cancer Immunity. *Front Immunol* 9, 2190 (2018).

VIII. Saját közlemények

A dolgozat témájául alapul szolgáló folyóirat cikkek:

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

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

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

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

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

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

Egyéb cikkek :

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

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

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

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

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

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

3. Chronic treatment with rofecoxib but not ischemic preconditioning of the myocardium ameliorates early intestinal damage following cardiac ischemia/reperfusion injury in rats

László Szilvia, Lázár Bernadett, Brenner Gábor, Makkos András, Balogh Mihály, Al-Khrasani Mahmoud, Hutka Barbara, Mohammadzadeh Amir, Kemény Ágnes, László Terézia, Scheich Bálint, Szabados Tamara, Kenyeres Éva, Giricz Zoltán, Bencsik Péter, Varga Zoltán V., Novák Julianna, Helyes Zsuzsanna, Ferdinándy Péter, Gyires Klára, Zádori Zoltán.

Biochem Pharmacol. 2020 Aug;178:114099. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114099. Epub 2020 Jun 12. **IF(2020): 5,858**

4. Balanced Intense Exercise Training Induces Atrial Oxidative Stress Counterbalanced by the Antioxidant System and Atrial Hypertrophy That Is Not Associated with Pathological Remodeling or Arrhythmogenicity

Oláh Attila, Barta András Bálint, Alex Ali Sayour, Ruppert Mihály, Tulassay Eszter Virág, Novák Julianna, Varga Zoltán V., Ferdinándy Péter, Merkely Béla, Radovits Tamás.

Antioxidants (Basel). 2021 Mar 15;10(3):452. doi: 10.3390/antiox10030452. **IF(2021): 5,952**

5. AIM2-driven inflammasome activation in heart failure

Onódi Zsófia, Ruppert Mihály, Kucsera Dániel, Sayour Alex Ali, Tóth Viktória Éva, Koncsos Gábor, Novák Julianna, Brenner Gábor, Makkos András, Baranyai Tamás, Giricz Zoltán, Görbe Anikó, Leszek Przemyslaw, Gyöngyösi Mariann, Horváth Iván G., Schulz Reiner, Merkely Béla, Ferdinándy Péter, Radovits Tamás, Varga Zoltán V. Cardiovasc Res. 2021 Jun 12:cvab202. doi: 10.1093/cvr/cvab202. **IF(2021): 13,081**

Idézhető absztraktok:

Mechanism of T-cell death induced by tumor cell-derived galectin-1, that acts via direct cell-cell contact

Fajka-Boja Roberta, Kovács-Sólyom Ferenc, Katona Róbert I., Szebeni Gábor J., Krenács László, Végh Lea, Blaskó Andrea, Uher Ferenc, Novák Julianna, Tubak Vilmos, Kiss Róbert, Monostori Éva
Eur.J.Immunol, VOLUME 39 Issue S1, Page S195 (September 2009) **IF: 5,179**

Focusing on the activated T cell produced endogene galectin-1

Julianna Novák

Acta Biologica Szegediensis Volume 55 (1) 2011.

Novel role for galectin-1 in T-cell apoptosis regulation and its relevance to systemic lupus erythematosus.

Hornung Ákos, Deák Magdolna, Novák Julianna, Szabó Enikő, Czibula Ágnes, Fajka-Boja Roberta, Kriston-Pál Éva, Monostori Éva, Kovács László (2015)
Annals of the Rheumatic Diseases 74, A19 doi:10.1136/annrheumdis-2015-207259.44

Impact Factor Összesen: 42,705

Poszter nemzetközi konferencián:

Signals and Signal Processing in the Immune System, 2009. Balatonőszöd, nemzetközi konferencia

Mechanism of T cell death induced by tumor cell-derived galectin-1, that acts via direct cell-cell contact

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

2nd European Congress of Immunology (ECI) Berlin, Germany, September 13-16, 2009

Mechanism of T-cell death induced by tumor cell-derived galectin-1, that acts via direct cell-cell contact.

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

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

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

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

Prezentáció belföldi konferencián:

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

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

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

Magyar Immunológiai Vándorgyűlés, 2010. Szeged

Hogyan szabályozza a transzgenikus Jurkat sejtekben termelődő galektin-1 a T sejtek különböző citotoxikus stimulusokkal szembeni érzékenységét?

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

IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt-és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011.03.25-27:

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

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

IX. Összefoglalás

A galektin-1 (Gal-1) β -galaktozid szénhidrát kötő lektin típusú fehérje, szignál szekvencia nélkül szintetizálódik, ennek ellenére szekretálódhat. Amennyiben szekretálódik, kötődik a sejtfelszíni glikolipidekhez, glikoproteinekhez vagy az extracelluláris mátrix glikozilált elemeihez, és így modulálja a szignalizációs útvonalakat, vagy a sejt adhéziós és migrációs képességeit.

A Gal-1 számos funkciója közül kiemelendő gyulladáscsökkentő, immunszuppresszív képessége, ami elsősorban azzal magyarázható, hogy aktivált T sejtek apoptózisát indukálja. Ezt feltehetően nem egyetlen funkcionális receptoron keresztül váltja ki, hanem inkább a sejtfelszíni glikolipidek, glikoproteinek átszervezésével. A Gal-1 több kötőpartnerét is meghatározták T sejtek felszínén, mint pl. az Lck tirozin kináz aktivitását befolyásoló CD45 foszfatázt, és a raftkomponens GM1 glikolipidet. A Gal-1 indukált T sejt apoptózis jelátviteli mechanizmusának korai eseményeiben nagymértékű tirozin foszforiláció zajlik, amelyet többek között az Lck tirozin kináz aktivitása okoz. Az Lck hiányában az apoptózis is gátlódik.

A Gal-1 kiváltott T sejt apoptózis vizsgálatok eredményei számos esetben ellentmondásosak, melynek feltételezett oka a rekombináns Gal-1 eltérő használata, ezért vizsgálatunkban a fiziológias körülményeknek jobban megfeleltethető sejt közvetített Gal-1 hatását mérő, ko-kultúras rendszert dolgoztunk ki, amiben Gal-1 termelő letapadó effektor sejtet tartunk együtt nem letapadó target T sejtekkel. A ko-kultúrában sejt-sejt kapcsolat alakul ki, mely szükséges a sejt közvetített Gal-1 indukált T sejt apoptózis kiváltásához, feltehetőleg ezen a ponton kerül át az effektor sejtek felszínén lévő Gal-1 a T sejtekre.

Munkánk során célunk volt a sejt közvetített Gal-1 által kiváltott T sejt apoptózisban fontos szerepet játszó Lck tirozin kináz topológiai vizsgálata, a mozgására ható elemek azonosítása.

T sejtekben az Lck elhelyezkedését analizálva azt a megfigyelést tettük, hogy Gal-1 hatására az Lck kirekesztődik, szegregálódik a sejt-sejt kapcsolati zónából. A jelenség Gal-1 specifikusságát többféle kísérleti összeállításban is bizonyítottuk, továbbá megállapítottuk, hogy abban az időintervallumban amikor még az Lck is jelen van a sejt kapcsolatban, tirozinon foszforilált fehérjék jelenléte detektálható a régióban, de az Lck kizáródásával ez a jel lecseng. Ez utalhat arra, hogy az Lck aktivitásának leállítását

egy laterális membrádinamikai folyamat is szabályozhatja. A továbbiakban vizsgáltuk a Gal-1 kötő, és egyben az Lck aktivitását befolyásoló CD45 foszfatáz szerepét az Lck mozgásában, és azt tapasztaltuk, hogy a CD45 fizikai jelenléte és foszfatáz aktivitása egyaránt szükséges az Lck szegregációjához. Megállapítottuk továbbá, hogy a sejt közvetített Gal-1 hatására bekövetkező Lck szegregációban fontos szerepe van a raftok kialakulásának, mert a membrántutajok szétroncsolása után az Lck szegregációja lecsökkent. Vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a Gal-1 kötő és egyben raft komponens GM1 sejt felszíni mennyisége az Lck szegregációt, illetve a T sejt apoptózist. Megállapítottuk, hogy több GM1 esetében, magasabb mind az Lck szegregációt, mind a T sejt apoptózist mutató sejtek aránya, mint a kevesebb GM1 esetében, vagyis ezek a folyamatok függenek a sejt felszíni GM1 mennyiségétől.

T sejt aktiválás hatására Gal-1-et kezdenek termelni, ugyanakkor ennek a *de novo* endogén Gal-1-nek a szerepe nem tisztázott, ezért további célul tűztük ki, a T sejtekben aktiválás hatására megjelenő Gal-1 funkciójának vizsgálatát.

Bizonyítottuk, hogy aktivált T sejtek kifejezik a Gal-1-et, de a fehérje nem kerül szekrécióra, intracellulárisan van jelen. A transzgenikus Gal-1-et kifejező Jurkat T sejtvonal létrehozásával megalkottuk azt a modellt, mely alkalmas az aktivált T sejtek, illetve az intracelluláris Gal-1 (inGal-1) funkcionális elemzésére, mert ebben a transzfektáns sejtvonalban a Gal-1 szintén intracellulárisan marad. Vizsgáltuk, hogy az aktivált T sejtekben lévő inGal-1 hogyan befolyásolja a sejt közvetített exGal-1 T sejt apoptotikus hatását, és a ko-kultúras apoptózis tesztekkel azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Gal-1-et termelő T sejtek érzékenyebben reagálnak a külső, exGal-1 apoptotikus hatására, ezzel pedig egy új inGal-1 funkciót azonosítottuk.

X. Summary

Galectin-1 (Gal-1) is a β -galactoside carbohydrate binding lectin type protein. Once synthesized, it may remain inside the cell and control intracellular processes, or may be released to the extracellular space through a nonconventional pathway. By crosslinking or formation of multivalent galectin–glycan complexes it contributes to the assembly and organization of cell surface receptors, controlling their segregation, internalization, and signaling.

Accumulating evidence suggests that Gal-1 plays an important role as a mediator of inflammatory resolution phases and maintains immune tolerance thorough it is apoptotic activity on activated T-cells. Induction of apoptosis of activated T-cells by a process dependent on the activity of the Src family tyrosine kinase, Lck.

Although the requirement of Lck in Gal-1 induced T-cell apoptosis and the ability of Gal-1 to affect the membrane localization of extracellular Gal-1-binding proteins have been well documented, the consequence of the complex and related reorganization of extra- and intracellular signaling components upon Gal-1 treatment of T-cells has not yet been revealed. Therefore, we have analyzed the plasma membrane movement of Lck upon Gal-1 triggered signaling.

Lck primarily localized in the synapse of tumor cell-T-cell at the beginning of the established direct cell contact. Later, a lateral segregation of Lck from the cell synapse was observed. The migration of Lck to the opposite of the cell contact apparently depended on the expression and cell surface presentation of Gal-1 on the tumor cells. Receptor tyrosine phosphatase, CD45 played crucial role in this event since CD45 deficiency or inhibition of its phosphatase activity resulted in the failure of Lck membrane movement. Level of the Gal-1-binding glycolipid GM1 ganglioside also essentially regulates Lck localization. Segregation of Lck and Gal-1 induced apoptosis was diminished in T-cells with low GM1 expression compared to T-cells with high GM1. Our results show that Gal-1 induces spatial regulation of Lck that depends on CD45 and GM1 and raft assembly.

Secreted, extracellular galectin-1 (exGal-1) but not intracellular Gal-1 (inGal-1) has been described as a strong immunosuppressive protein due to its major activity of inducing apoptosis of activated T-cells. It has been previously reported that T-cells

express Gal-1 upon activation, however its participation in T-cell functions has remained largely elusive.

To determine function of Gal-1 expressed by activated T-cells, we have carried out a series of experiments. We have shown that Gal-1, expressed in Gal-1-transgenic Jurkat cells or in activated T-cells, remained intracellularly indicating that Gal-1-induced T-cell death was not a result of an autocrine effect of the de novo expressed Gal-1. Rather, a particular consequence of the inGal-1 expression was that T-cells became more sensitive to exGal-1 added either as a soluble protein or bound to the surface of a Gal-1-secreting effector cell.

XI. Köszönetnyilvánítás

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

Dr. Czibula Ágnest a qRT-PCR kísérletes munkáiért illeti köszönet, **Dr. Kriston-Pál Évát** pedig a laktóz mosásos Lck-s kísérletek elvégzéséért. **Dr. Kovács-Sólyom Ferenc** a ko-kultúra rendszer kifejlesztője, továbbá a HeLa transzfektáns sejtek létrehozója.

Szeretném megköszönni **Gercsó Andrásné**nek, hogy mindig első osztályú, prémium sejteket kaptam tőle.

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

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

*Végül, mindezek felett és leginkább, köszönöm azt a hatalmas szerencsét, hogy olyan **Szülők** állnak mögöttem, akiktől nemcsak minőségi génkészletet, hanem olyan értékrendszert, munkamorált és emberi normákat is kaptam, amik nélkül nem lennék itt.*