Fajka-Boja Roberta

Tirozin kinázok és foszfatázok szerepe a T sejtek galektin-1 indukálta apoptózisában

Ph.D. értekezés tézisei

Témavezető: Dr. Monostori Éva

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet
Limfocita Szignál Transzdukciós Laboratórium

Szeged, 2002

BEVEZETÉS

A galektinek állati eredetű lektinek, amelyek egy családba való sorolása a poli-*N*-acetillaktózaminok (β-galaktozidok) felismerésén és a szénhidrát-felismerő domén nagy szekvencia-azonosságán alapul. A humán galektin-1 134 aminosavból álló, antiparalel β-lemezekből felépített globuláris fehérje. Habár az intracelluláris fehérjékre jellemző tulajdonságokkal rendelkezik - nincs szekréciós szignál szekvenciája, szabad riboszómákon szintetizálódik, nem glikozilált és szulfhidril csoportjai redukált formában vannak - mégis kijut az extracelluláris térbe, mégpedig ún. nem klasszikus szekrécióval. Intracelluláris szerepéről nem sok adat áll rendelkezésre: kapcsolódik a nukleáris mátrixhoz, és a galektin-3-mal együtt részt vesz a pre-mRNS splicing-ban. Mind termelődése, mind az intracelluláris (citoplazmatikus, illetve magi) és extracelluláris lokalizációja a sejtek differenciálódási állapotától függ. A galektin-1 elsősorban az ideg- és izomszövetben, vesében, tüdőben, méhlepényben termelődik, és megtalálható az elsődleges (tímusz, csontvelő) és másodlagos (lép, nyirokcsomók) limfoid szervekben is. Ez utóbbiakban a tímusz epitéliumsejtek termelik, de kifejeződik az aktivált T és B sejtekben és makrofágokban is.

A szekretált galektin-1 az extracelluláris mátrix elemeihez (lamininhez, fibronektinhez), illetve a sejtek glikozilált struktúráihoz kötődik, ezáltal befolyásolja a sejtek adhéziós képességét és a sejt-sejt kapcsolatokat. A galektin-1 és -3 az embriogenézis során már a korai stádiumban expresszálódik és feltehetően fontos szerepet játszik az embrió beágyazódásában. A galektin-1 és -3 mutáns egerek azonban életképesek és fertilisek, szembetűnő fenotípusos változást nem mutatnak a vad típusú állatokkal szemben. Ez az ellentmondás a galektin fehérjecsalád tagjainak átfedő funkcióival magyarázható. Habár a galektin-1 mutáns egerek vizsgálata nem utal a lektin immunrendszerben

betöltött szerepére (nem lehet kimutatni kóros elváltozást az immunsejtjeinek számában és a különböző limfocita-populációk arányában), mégis, az *in vivo* galektin-1 kezelés immunmoduláló hatású. Kísérletes autoimmun betegségek kialakulását gátolja, illetve megszünteti, csökkenti a gyulladásos reakciókat, az immunválaszt inkább az ellenanyag termelés irányba tereli. Ennek a folyamatnak a hátterében a galektin-1 sejtosztódás szabályozó és apoptózis indukáló hatása állhat. Az *in vitro* kísérletek eredményei szerint a galektin-1 a sejtosztódásban mind pozitív, mind negatív szabályozó szerepet is betölthet. A sejttípustól függően alacsony koncentrációban (10-300 nM) növekedés serkentő és sejtosztódás gátló faktorként is szerepel, a koncentráció növekedésével (0,3-20 μM) apoptotikus hatású. Apoptózist az éretlen timocitákon, az aktivált T sejteken, valamint a tumoros T sejteken indukál. Nem ismert azonban a galektin-1 indukálta apoptózis mechanizmusa, az irodalmi adatok a Fas/FasL és a CD3 közvetítette apoptotikus utakat kizárják.

A galektin-1 funkciói ismeretében felhasználható lehet diagnosztikai és terápiás célokra, az autoimmun betegségek, gyulladásos folyamatok és allergiás reakciók meggátolására. A pleiotróp funkcióval bíró galektinek alkalmazása veszélyt is rejt magában a funkciók pontos mechanizmusának ismerete hiányában.

A galektin-1 biológiai hatását közvetítő receptor(ok) és az apoptózishoz vezető jelátviteli út elemei még nem ismertek. A T limfocitákon biokémiai módszerekkel több galektin-1 kötő membránfehérjét azonosítottak (CD2, CD3, CD4, CD7, CD43, CD45). A galektin-1 kezelés hatására a ζ-lánc részlegesen foszforilálódik, és aktiváció helyett apoptózishoz vezető jelátviteli utat indít el. A galektin-1 gátolja a T sejt receptor keresztkötését követő interleukin-2 termelést és sejtosztódást. Az irodalmi adatok egy része valószínűsíti, hogy a galektin-1 hatásának fő mediátora a CD45 tirozin foszfatáz lehet. Kimutatták a galektin-1 és a CD45 közvetlen kötődését, ami a foszfatáz aktivitás kismértékű

(20-30%) csökkenéséhez és egy Src kináz, a Lyn aktivációjának csökkenéséhez vezet B sejtvonalban. Egyes foszfatáz hiányos T limfoid sejtvonalak rezisztensek voltak a galektin-1-gyel szemben. Ezzel ellentmondó eredmények is születtek, amelyek a CD45-tel szemben inkább egy másik sejtfelszíni fehérjenek, a CD7-nek kitüntetett szerepét hangsúlyozzák a galektin-1 által kiváltott apoptózisban.

CÉLKITŰZÉSEK

A galektin-1 apoptotikus hatását eddig csak a limfocitákon írták le. Annak ellenére, hogy a limfocitákon több galektin-1 kötő membránfehérjét azonosítottak, nem bizonyított, hogy mely potenciális receptor közvetíti a galektin-1 biológiai hatását. Habár néhány tanulmány vizsgálta a galektin-1 által kiváltott korai jelátviteli utakat, a szignálutak elemei még nem ismertek.

A kutatás során a következő kérdésekre kívántunk választ kapni:

1. A T sejteken kívül mely csontvelői eredetű sejteken van galektin-1-et kötő fehérje? A sejtekhez való kötődést követően mi történik a galektin-1-gyel?
2. Befolyásolja-e a galektin-1 egyéb hemopoetikus sejtek életképességét?
3. Milyen jelátviteli folyamatok vezetnek a galektin-1 által indukált apoptózishoz? Milyen specifikus szignálmolekulák aktivitása szabályozza ezt a folyamatot?
4. Valóban a CD45 foszfatáz a galektin-1 biológiai hatásának közvetítője?

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- A humán rekombináns galektin-1 fehérjét biotinnal, illetve fluoreszcein izotiocianáttal jelöltük, a különböző sejtvonalakhoz való kötődését áramlási citométerrel mutattuk ki.
- A galektin-1 kötő fehérjék azonosításához a T sejtek felszínét biotiniláltuk, majd a teljes sejtlizátumból galektin-1 Sepharose 4B gyöngyökkel vontuk ki a galektin-1-hez kötődő fehérjéket. A fehérjéket ezután Western blot rendszerben streptavidin-HRPO-val reagáltattuk. A galektin-1 kötő fehérjék közül a CD45 foszfatázt specifikus ellenanyaggal azonosítottuk.
- A sejtekhez kötődött galektin-1 sejtfelszíni illetve intracelluláris lokalizációját áramlási citométerrel vizsgáltuk. A sejtekhez FITC-, illetve biotin-jelölt galektin-1-et adtunk és a mintákat 4°C-on, illetve 37°C-on tároltuk 3 órán át. A galektin-1-biotinnal kezelt sejteken ezután streptavidin-FITC konjugátummal mutattuk ki a sejtmembránhoz kötődő lektin mennyiségét. A galektin-1-FITC kezelt minták esetében laktóz-oldattal való kompetícióval döntöttük el, hogy a fluoreszcens jel a sejtfelszínen vagy intracellulárisan lokalizálódik. A galektin-1 és a CD2, CD3, CD43, illetve CD45 membránfehérjék sejtfelszíni mennyiségének együttes követéséhez a sejteket galektin-1-biotinnal kezeltük és 4°C-on, illetve 37°C-on tároltuk 3 órán át, majd a vizsgálandó membránfehérjéket felismerő monoklonális ellenanyaggal inkubáltuk. Az ellenanyagokat kecske anti-egér IgG-FITC konjugátummal reagáltattuk, míg a biotinilált galektin-1 sejtfelszínhez kötött mennyiségét streptavidin-QuantumRed-del jelöltük.
- Az apoptózissal elpusztuló sejtek arányát szintén áramlási citométerrel határoztuk meg. A korai apoptotikus folyamatok során a sejtmembrán extracelluláris felszíne felé átforduló foszfatidil-szerint Annexin V - FITC alkalmazásával mutattuk ki. A késői apoptotikus sejteket sejtciklus elemzésnek

vetettük alá, ennek során meghatároztuk a hipodiploid DNS-tartalommal rendelkező apoptotikus sejtek arányát.

- A galektin-1 által kiváltott korai jelátviteli eseményeket Western blot rendszerben vizsgáltuk. A különböző ideig és különböző koncentrációjú galektin-1 oldattal kezelt T és B sejtek teljes sejtlizátumát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét, a fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át, majd anti-foszfo-tirozin ellenanyaggal reagáltattuk.
- A galektin-1 indukálta jelátviteli útban és apoptotikus folyamatban szerepet játszó szignálmolekulák vizsgálatához egyrészt tirozin kináz és foszfatáz inhibitorokat (genistein, nátrium-vanadát, fenilarzén-oxid), másrészt kináz ($p56^{lck}$ és ZAP70) és foszfatáz (CD45) hiányos sejtvonalakat alkalmaztunk a fent leírt módszerekben.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

- A galektin-1 kötődik a vizsgált csontvelői eredetű sejtekhez: a Jurkat T leukémia sejtekhez, a MOLT-4 $CD4^+/CD8^+$ stádiumban megrekedt és a CEM glükokortikoid érzékeny éretlen T sejtvonalakhoz, a BL-41, Raji és Daudi Burkitt limofóma eredetű B sejtekhez, az eritroid K562 és a granulocita U937 nem limfoid sejtvonalakhoz. A sejtek galektin-1 kötése független az eredetüktől és érettségi állapotuktól. A biokémiai vizsgálatokban a galektin-1 és több nagy molekulasúlyú fehérje (203, 160, 134, 95, 74, 66 és 58 kDa) kapcsolódását mutattuk ki, ezek közül a CD45 foszfatázt azonosítottuk specifikus ellenanyagokkal. Habár a CD45 foszfatáz mennyisége nagy a T sejtek membránjában, hiánya mégsem vezet a galektin-1 kötés drámai csökkenéséhez. A fennmaradó kötési kapacitásért a kísérleteinkben kimutatott további fehérjék, illetve glikolipidek felelősek, amint azt más irodalmi adatok is alátámasztják.

Mind az áramlási citometriai, mind a biokémiai vizsgálatokban a galektin-1 és a fenti sejtfelszíni struktúrák között kimutatható kötődés cukor-specifikus volt.

- Megállapítottuk, hogy a galektin-1 internalizálódik minden vizsgált sejtvonalban fiziológiás hőmérsékleten. Az internalizációért nem sejttípus-specifikus mechanizmus a felelős. Ezzel összhangban megállapítottuk, hogy a lektin internalizációja nem az eddig azonosított T sejt és leukocita specifikus (CD2, CD3, CD43, CD45) galektin-1 kötő fehérjéken keresztül történik. Nem zárjuk ki azonban, hogy a nem vizsgált glikoproteinek (CD4, CD7), esetleg a még nem azonosított receptor közvetítésével történik az endocitózis. Szintén feltehető, hogy nem receptor mediált endocitózis, hanem esetleg más mechanizmus áll az internalizáció hátterében.

- A galektin-1 apoptózist vált ki a különböző érettségi stádiumot reprezentáló T sejtvonalakban és a B limfocitákban, de nem a mieloid sejtvonalakban. A különböző sejtvonalak apoptózis érzékenysége nem hozható összefüggésbe az ezekhez a sejtekhez kötődő galektin-1 mennyiségével. A T sejtek összehasonlítható mennyiségű galektin-1 kötő struktúrákat hordoznak és hasonló mértékű a galektin-1-re adott apoptotikus válaszuk is. Ezzel szemben a Burkitt limfóma eredetű B sejtek, a Raji és Daudi, kevés, de hasonló mennyiségű galektin-1-et kötnek, ugyanakkor eltérő érzékenységet mutatnak a galektin-1-gyel szemben: a Raji a vizsgált B sejtvonalak közül a legkisebb, míg a Daudi messze a legnagyobb apoptotikus választ adja. A mieloid sejtvonalak, a K562 és az U937 sejtekhez a limfocitáknál nagyobb mértékben kötődik a galektin-1, mégsem pusztulnak el galektin-1 kezelésre. A galektin-1 limfocitákra gyakorolt apoptotikus hatása tehát sejtspecifikus.

- Kimutattuk, hogy a galektin-1 kezelés tirozin-foszforilációval járó jelátviteli utat indít el T és B sejteken. A galektin-1 által kiváltott tirozin foszforilációs események szükségesek az apoptotikus folyamatokhoz: a tirozin kináz és foszfatáz inhibitorok alkalmazása gátolja a sejtek apoptotikus válaszát. A galektin-1 biológiai hatásában szerepet játszó egyedi molekulák vizsgálata azt mutatja, hogy a $p56^{lck}$ és ZAP70 kinázok nélkülözhetetlenek a tirozin foszforilációs eseményekben. A $p56^{lck}$ és ZAP70 kináz hiányos Jurkat sejtvonalakban a vad típusú sejtekhez képest mintegy 50%-kal csökkent az apoptózissal válaszoló sejtek száma. A specifikus kinázok tehát szerepet játszanak a galektin-1 által kiváltott apoptózisban, ugyanakkor szerepük nem kizárólagos, mert hiányuk csak csökkenti az elpusztult sejtek arányát, de nem védi ki teljes mértékben a sejthalált.

- Kimutattuk, hogy a galektin-1 a CD45 hiányos sejtekben a vad típusú Jurkat sejtvonalhoz hasonló mértékű tirozin foszforilációt és apoptózist okoz. A CD45 tirozin foszfatáz, melynek az előző irodalmi adatok szerint kitüntetett szerepe van a galektin-1 biológiai funkciójának közvetítésében, nem játszik szerepet a galektin-1 indukálta tirozin foszforilációban és apoptózisban. Ennek ellenére a tirozin foszfatáz inhibitorok mind a galektin-1 kiváltotta tirozin foszforilációt, mind az apoptózist csökkentetik, ezért valószínűsíthető, hogy egyéb, általunk nem vizsgált foszfatázok lehetnek elemei a galektin-1 kötődése által elindított a jelátviteli útnak.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. A galektin-1 kötődik a dolgozatban vizsgált T és B limfocitákhoz és a nem limfoid sejtvonalakhoz, ezt követően internalizálódik. A lektin internalizációja nem az eddig azonosított galektin-1 kötő fehérjéken (CD2, CD3, CD43, CD45) keresztül történik.
2. A dolgozatban használt valamennyi T és B sejt eredetű sejtvonal apoptotikus választ adott galektin-1 kezelésre, ugyanakkor a mieloid (eritroid és granulocita) sejtek elkerülték a galektin-1 által kiváltott sejthalált.
3. A galektin-1 által elindított, tirozin foszforilációval járó jelátviteli folyamatok vezetnek a lektin okozta apoptózishoz. A $p56^{lck}$ és ZAP70 tirozin kinázok nélkülözhetetlenek a galektin-1 indukálta tirozin foszforilációban, ugyanakkor központi, de nem kizárólagos, szerepet játszanak a galektin-1 által kiváltott apoptózisban.
4. Annak ellenére, hogy a CD45 tirozin foszfatáz az egyik fő galektin-1 kötő glikoprotein a fehérvérsejteken, nem játszik szerepet sem a galektin-1 indukálta tirozin foszforilációban, sem az apoptózisban.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban Monostori Évának, a Limfocita Szignál Transzdukciós Laboratórium vezetőjének és Raskó István igazgatónak, hogy lehetővé tették az MTA SZBK Genetikai Intézetében a doktori munkám elvégzését.

Monostori Évát külön hálás köszönet illeti a gondos témavezetésért és a sok segítségért, amit a felmerülő problémák megoldása kapcsán nyújtott.

Köszönöm a Limfocita Szignál Transzdukciós Laboratórium munkatársainak együttműködését az itt végzett munkám során: Gabriela Ionnak, hogy segített az apoptózis vizsgálatokban, Légrádi Ádámnak, hogy engedélyezte a kináz és foszfatáz inhibitorokkal és a mutáns sejtekkel végzett apoptózis tesztek eredményeinek doktori dolgozatomban történő felhasználását, Dmytro Demydenko és Szemes Marianna segítségét a rekombináns humán galektin-1 termelésében és tisztításában, Székely Szűcs Kingának és Gercsó Andrásnénak a kiváló technikai segítséget, valamint Frankó Andrásnak a Ph.D. dolgozat gondos átolvasását.

Szeretném megköszönni Kotogány Editnek az áramlási citofluoriméter használatában és Tóth Sándornénak az ábrák elkészítésében nyújtott segítséget.

Köszönöm Michel Caron együttműködését (Université Paris 13, Bobigny Cedex), valamint Robert T. Abraham professzornak (Mayo Clinic, Rochester), Oravecz Tamásnak (NIH, Bethesda) és Sármay Gabriellának (ELTE Immunológiai Tanszék, Budapest) a rendelkezésünkre bocsátott sejtvonalakat.

A munkához az OTKA T-029706 és ETT T05/016/2000 pályázatok, és a Biromedicina Rt. nyújtottak kutatásfejlesztési támogatást.

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. R. Fajka-Boja, M. Szemes, G. Ion, Á. Légrádi, M. Caron, É. Monostori (2002) Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. *Immunol. Lett.* 82: 149-154.

2. R. Fajka-Boja, G. Ion, Á. Légrádi, M. Szemes, M. Caron, D. Demydenko, G. Tóth, É. Monostori. Tyrosine kinases, $p56^{lck}$ and ZAP70 participate in the regulation of galectin-1 induced apoptosis in T cells. *Glycobiology, közlésre elküldve.*

3. R. Fajka-Boja, M. Hidvégi, Y. Shoenfeld, G. Ion, D. Demydenko, R. Tömösközi-Farkas, Cs. Vizler, A. Telekes, Á. Resetár, É. Monostori (2002) Fermented wheat germ extract induces apoptosis and downregulation of major histocompatibility complex class I proteins in tumor T and B cell lines. *Int. J. Oncol.* 20: 563-570.

4. V. Chitu, R. Fajka-Boja, G. Tóth, Gy. Váradi, Z. Hegedüs, A. Frankó, K. Székely Szűcs, É. Monostori (2001) Comparative study on the effect of phosphorylated TCR ζ chain ITAM sequences on early activation events in Jurkat T cells. *Peptides* 22: 1963-1971.

5. L. Cervenak, A. Magyar, R. Boja, G. László (2001) Differential expression of GL7 activation antigen on bone marrow B cell subpopulations and peripheral B cells. *Immunol. Lett.* 78: 89-96.

KONFERENCIA ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

É. Monostori, R. Fajka-Boja, G. Ion, Á. Légrádi, M. Szemes, M. Caron: A study on the cell response induced by S-type human lectin, galectin-1 in cell lines of different tissue origin. 11th Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, Pécs, 2-6 September, 2001.

R. Fajka-Boja, M. Szemes, Á. Légrádi, G. Ion, M. Caron, É. Monostori: Galectin-1 binds to and internalizes in T leukemia cells. 11th Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, Pécs, 2-6 September, 2001.

Fajka Boja R, Szemes M, Demydenko D, Ion G, Monostori É: A galektin-1 hatása limfoid sejtvonalakra. A Magyar Immunológiai Társaság XXX. Kongresszusa, Budapest, 2000. október 25-27.

G Ion**,** R Fajka Boja, M Hidvégi, K Székely Szűcs, É Monostori: Fermented wheat germ extract triggers apoptois in human leukemic cells. A Magyar Immunológiai Társaság XXX. Kongresszusa, Budapest, 2000. október 25-27.

Pozsgai M, Boja R, Prechl J, László G: A GL7 specifikus ellenanyag variábilis doménjeit tartalmazó scFv konstrukció előállítása. A Magyar Immunológiai Társaság XXX. Kongresszusa, Budapest, 2000. október 25-27.

Boja R, Cervenak L, László G: Antigén specifikusan aktivált $GL7^+$ B és Th limfociták funkcionális vizsgálata. A Magyar Immunológiai Társaság XXVIII. Kongresszusa, Harkány, 1998. szeptember 30 - október 2.

G László, L Cervenak, R Boja, A Magyar: Functional study on GL7 expressing mouse B and T cells. 10th Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System, Balatonöszöd, September 13-17, 1998.