

1. Mi az alacsonyabb koncentrációjú (1-2µM) Gal-1 által kiváltott sejthalál közvetítő receptora:

A receptor keresésével kapcsolatos affinitás kromatográfiás és az azt követő QTOF tömegspektrográfiás kísérleteink eredményei: 3 független kísérlet találatai: LAMP-1 (3x), CD45 (2x), ICAM-3 (2x), Leucyl-cystinyl aminopeptidase (2x), Hsp-70, Hsp-90, Integrin alfa-1,-4, -5, beta-1, IGF2R. Ezek a találatok az irodalmi adatokból már ismertek voltak és bár mindegyik Gal-1-kötő fehérjeként ismert, a Gal-1 indukálta T-sejt apoptózis mediátoraként kizárhatók. Korábbi kísérleteinkben magunk is igazoltuk, hogy a CD45 hiánya nem befolyásolja a Gal-1 által indukált T-sejt apoptózis mértékét (R. Fajka-Boja és mtsi. 1999. Immunol Lett. 67: 31). A szakirodalmi adatok és saját internalizációs kísérleteink alapján a CD7 és a GM1 gangliozid szerepének célzott vizsgálata vetődött fel. Ezért Jurkat sejtekből CD7 negatív és CD7-et magasan expresszáló, illetve GM1 gangliozid^{alacsony} és GM1 gangliozid^{magas}, illetve ezek kombinációit (CD7/GM1^{alacsony}, CD7⁺/GM1^{alacsony}, CD7⁻/GM1^{magas}, CD7⁺/GM1^{magas}) hordozó sejtvonalakat létesítettünk. Ezeknek a vonalaknak, jellemzés után, Gal-1 iránti apoptotikus érzékenységét vizsgáltuk ko-kultúras rendszerben. A ko-kultúras rendszert laboratóriumunkban állítottuk fel. Lényege, hogy a T-sejt apoptózist Gal-1-et termelő tumoros sejtvonal jelenlétével váltjuk ki (F. Kovács-Sólyom és mtsi. 2010 Immunol Lett 127:108). Ennek eredménye meglepő volt: A Gal-1 apoptózist indukáló hatásával szemben a sejtvonalak érzékenysége a következő sorrendben változott:

CD7/GM1^{alacsony} > CD7/GM1^{magas} > Jurkat > CD7⁺/GM1^{alacsony} > CD7⁺/GM1^{magas}

Tehát a legérzékenyebbek a CD7 hiányos, kevés sejtfelszíni GM1-et hordozó sejtek, ami a CD7 és GM1 gangliozid negatív reguláló szerepére mutatnak. E-két sejtfelszíni markerről bizonyítottuk, hogy a Gal-1 internalizációjában játszanak szerepet (Roberta Fajka-Boja és mtsi. 2008 CMLS 65: 2586) és a sejtekhez adott szolubilis Gal-1-gyel membrán mikrodomainekbe ko-lokalizálódnak. Ezek a kísérletek azt látszanak alátámasztani, hogy a CD7 és a GM1 nem az apoptózist indukáló Gal-1 kötő struktúrák, hanem vagy a Gal-1 aktív internalizációja révén a Gal-1 hatást késleltető sejtfelszíni molekulák (R. Fajka-Boja és mtsi. Kézirat készülöben), vagy pedig, esetleg más sejtfelszíni molekulákkal együtt, negatív reguláló szerepet töltenek be. A GM1-nek, mint a membrán mikrodomainek, raftok egyik fő komponensének kiemelt szerepe lehet a Gal-1 indukálta raft átrendeződésben (Ism. később: Gal-1 indukálta szignálok).

2. Mi a szerepe a Gal-1 internalizációjának az apoptózis folyamatában?

Kutatásaink szerint a Gal-1 internalizációja a GM1-gangliozid közvetítésével és a CD7 ko-internalizációjával valósul meg. Az endocitózis raft és klatrin-függő útvonalon történik. Az

internalizáció az apoptózisban úgy játszik szerepet, hogy a Gal-1 folyamatos endocitózisa miatt a Gal-1 által indukált apoptózis időkinetikája, a más apoptózist indukáló drogokhoz képest, rendkívül lassú (24 óra) és a Gal-1 folyamatos jelenlétét kívánja a kezelés során (Roberta Fajka-Boja és mtsi. 2008 CMLS 65: 2586).

3. A Gal-1 indukálta T-sejt apoptózis molekuláris mechanizmusának részletesebb megismerése:

a) *Szignál folyamatok:* A Gal-1-et szekretáló tumor sejt tirozin foszforilációt indukál a vele közvetlen kölcsönhatásba kerülő T-sejtben. Ennek kinetikája hasonló a szolubilis Gal-1 által indukált tirozin foszforilációhoz, vagyis a ko-kultúra indítása után 30 perccel a T-sejtek 60-80%-ában kimutatható. Ezután az intenzitás csökken. A tirozin foszforilált fehérjék a T-sejt - tumor sejt kapcsolódás ellenkező a pólusára vándorolnak. Hasonló jelenséget tapasztalunk, ha a Gal-1 indukált T-sejt apoptózisban szerepet játszó kináz, az Lck lokalizációját vizsgáljuk, igazolva, hogy a Gal-1 a p56lck aktivitásának fokozásával indítja el a tirozin foszforilációt. Mindkét folyamat laktózzal, a Gal-1 minimális ligandjával gátolható, igazolva, hogy ezek a biokémiai folyamatok a tumor sejtekben expresszált Gal-1-nek és nem más biológiai faktoroknak tulajdonítható. Az Lck és a tirozin foszforilált fehérjék specifikus lokalizációja függ a jellegzetes raftátrendeződéstől és így β -ciklodextrinnel gátolható (R Fajka-Boja, J Novák és mtsi kézirat készülőben). Vizsgáltuk az Erk2 szerepét is. A szolubilis és sejt eredetű Gal-1 az Erk2 foszforilációját okozza és ez az aktiválás 5. percében éri el maximumát. Ennek az eseménynek azonban nem az apoptózis indukációjában van szerepe, mivel az Erk2 inhibitor (PD998059) jelenléte nem befolyásolja a T-sejt pusztulást.

b) *Gal-1 apoptótikus hatásának fiziológias mechanizmusa:* Az Gal-1 indukálta T-sejt apoptózis valódi mechanizmusának meghatározásához összehasonlítottuk az alacsony (1,8 μ M) és magas (18 μ M) koncentrációjú szolubilis, rekombináns Gal-1, valamint a sejt (tumor sejt és MSC) eredetű Gal-1 által kiváltott sejthalál elemi molekuláris lépéseit. Megállapíthattuk, hogy az alacsony koncentrációjú szolubilis és a sejteredetű natív Gal-1 azonos módon (F Kovács-Sólyom és mtsi Immunol Lett 127 (2010) 108–118) okozza az apoptózist. Mivel ennek az összehasonlító munkának az eredményeit rendkívül fontosnak tartottuk közölni, hiszen a Gal-1 indukálta apoptózis irodalmában hosszú ideje fennálló ellentmondásokat tisztázta, ugyanakkor a közlemény újdonságtartalmát tekintve nem erős, ezért szabad hozzáférésű cikkben az Acta Biologica Hungarica-ban publikáltuk (A. Blaskó et al. Acta Biol Hun, 62 (2011) 106–111, Blaskó Andrea PhD disszertáció 2011). Ezzel a munkával, reményeink szerint, pontot tettünk a Gal-1 kutatásokat kísérő hosszan tartó vitára a Gal-1 indukált T-sejt apoptózist illetően.

c) *Monomer vagy dimer?* Maradt azonban a Gal-1 hatásmechanizmusának egy kérdése: a citotoxikus hatáshoz szükséges-e a lektin dimerizációja. Ennek vizsgálatához dimerizációban mutáns (V5D) Gal-1-gyel HeLa (HeLa^{V5DGal-1}) sejteket transzfektáltunk. E sejteket a jellemeztük. Olyan V5D Gal-1 transzgenikus HeLa sejtvonalat létesítettünk, melynek Gal-1 expressziója összevethető a vad típusú Gal-1-et expresszáló transzgenikus HeLa sejtvonallal (HeLa^{wtGal-1}). A jellemzést megnehezítette, hogy az anti-Gal-1 monoklonális ellenanyag (a világon az egyetlen a laborunkban előállított ellenanyag, mely felismeri a natív Gal-1-et) nem reagál a V5D mutánssal. Ezt követően a sejt-sejt kölcsönhatáson alapuló ko-kultúras modellrendszerben vizsgáljuk a dimerizáció jelentőségét a T sejt apoptózisban. A V5D mutáns a vad típusú Gal-1-hez hasonló mértékű és laktózzal (a Gal-1 minimális ligandja) gátolható T-sejt apoptózist okoz (L Végh és mtsi kézirat készülében).

NMR vizsgálatok ¹⁵N és ¹³C jelzett V5D Gal-1-gyel: Szerkezeti vizsgálatokat is végeztünk a V5DGal-1 rekombináns fehérjével, Martinek Tamással és mtsi-val (SZTE Gyógyszerkémiai Intézet) együttműködésben.

Ezeknek a vizsgálatoknak a nehézségét az okozta, hogy a szerkezeti vizsgálatokra használt technikák (pl. NMR) kevésbé érzékenyek. Ezért a Gal-1 fiziológiás koncentrációjától távol eső töménység, 0,4-1,0 mM V5D Gal-1 koncentrációt alkalmaztunk. Ebben a koncentrációtartományban a fehérje dimer formája van feleslegben, tekintve, hogy az irodalmi adatok szerint a dimerizációs $K_d \approx 70 \mu\text{M}$. Kísérleteinkben a V5D Gal-1 méretét tekintve hasonló képet mutatott (jelszélesség, jelek hőmérsékletfüggése, relaxáció), mint a vad típusú, dimer Gal-1.

3D NMR technikák segítségével a fehérje amid jeleinek 85 %-át sikerült beazonosítani. A kémiai eltolódások a vad típusú Gal-1 értékeivel nagy hasonlóságot mutattak, ami azt jelzi, hogy a V5D Gal-1 térszerkezete nem térhet el lényegesen a vad típusútól. Laktózzal történő ¹⁵N HSQC titrálás során hasonló eltolódási mintázatot kaptunk, mint a vad típusú Gal-1 esetén. Ez igazolja, hogy dimer V5D esetén a laktózkötés affinitását és módját a mutáció nem befolyásolja jelentősen.