

## BUDOWA I FUNKCJE BIOLOGICZNE GALEKTYNY-3. CZĘŚĆ II

### STRUCTURE AND BIOLOGICAL FUNCTIONS OF GALECTIN-3. PART II

Małgorzata POKRYWKA, Anna LITYŃSKA

Zakład Biochemii Glikokoniugatów, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński,  
Kraków

*Streszczenie:* Gal-3 wykazuje podobieństwo w budowie strukturalnej do białka Bcl-2, znanego supresora apoptozy. Gal-3 może jednak stanowić zarówno pro-, jak i antyapoptotyczny czynnik w zależności od typu komórki, jej kondycji oraz natury stymulatora (induktora) programowanej śmierci, który na nią działa. Gal-3 początkowo określana jako białko wiążące immunoglobuliny E (ang. *IgE-binding protein*) jest lektyną pro-zapalną. W odpowiedzi na działanie wielu czynników zapalnych pewne komórki produkują i wydzielają duże ilości gal-3. Funkcje, jakie pełni gal-3 w komórce, sugerują jej ważną rolę w poszczególnych stadiach progresji nowotworowej i przerzutowaniu. Jak wynika z wielu doniesień gal-3 może być obiecującym celem dla terapii nowotworowej, a jej inhibitory mogą zostać użyte jako czynniki antynowotworowe i hamujące proces przerzutowania. Z drugiej strony, zewnątrzkomórkowa gal-3 może być użyteczna jako diagnostyczny i prognostyczny marker.

*Słowa kluczowe:* gal-3, apoptoza, adhezja, nowotwory, odpowiedź immunologiczna.

*Summary:* Gal-3 shares several significant structural properties with Bcl-2 family. Both proteins contain anti-death motif, critical for their anti-apoptotic function but the mechanism by which gal-3 exhibits anti-apoptotic activity cannot be explained solely on it. Depending on the type, state and condition of the cell as well as depending on the type of stimulus gal-3 can show pro- or anti-apoptotic activity. Cytoplasmic gal-3 expression seems to be strongly implicated in an anti-apoptotic function and drug resistance in cancer cells, suggesting that cytoplasmic gal-3 is a candidate target protein to suppress anticancer drug resistance. Gal-3 previously known as IgE-binding protein is a pro-inflammatory lectin. In response to pro-inflammatory agents some cells produce and release high amount of gal-3. Taking together, gal-3 can provide a new therapeutic target for improving chemotherapy of cancer. In addition the detection of extracellular gal-3 may be of diagnostic value as prognostic cancer marker.

*Key words:* Gal-3, apoptosis, adhesion, cancers, immune response.

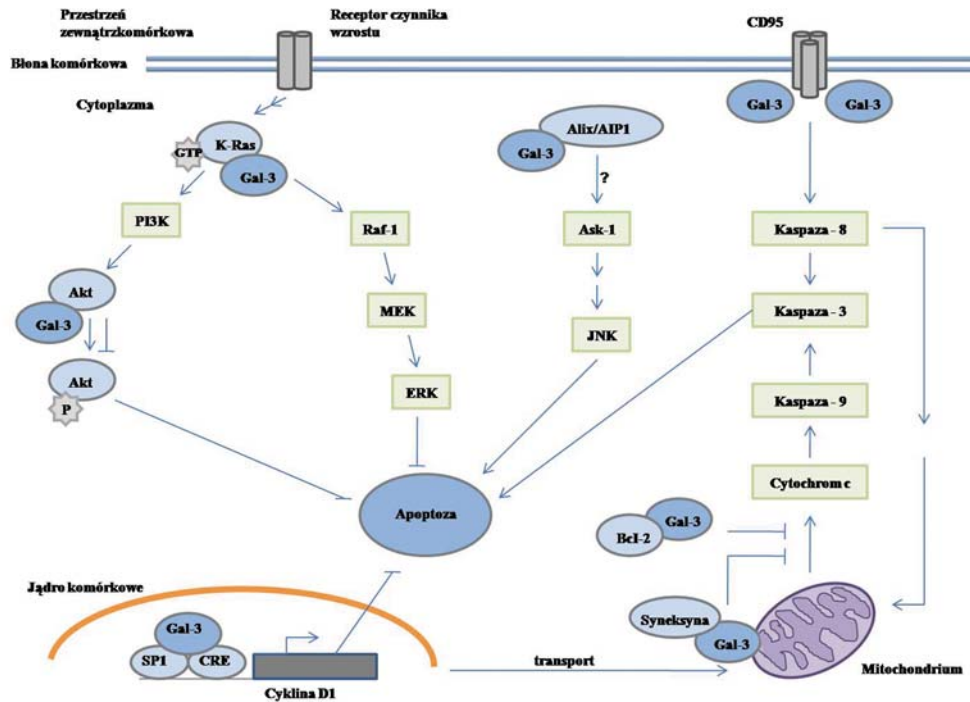
## WPLYW Gal-3 NA APOPTOZĘ

Obecnie istnieje wiele dowodów wskazujących na antyapoptotyczną aktywność galektyny-3 w komórkach indukowanych do śmierci przeciwciałami anty Fas,

staurosporyną (inhibitor kinaz białkowych), czynnikiem martwicy nowotworów, cis-diaminodichloroplatyną (cis platyna), promieniowaniem, tlenkiem azotu, czy utratą kontaktu z podłożem (ang. *anoikis*). Okazuje się jednak, że antyapoptotyczne właściwości wykazuje jedynie wewnątrzkomórkowa gal-3. Pokazano, że makrofagi i neurony rdzenia kręgowego pochodzące od myszy pozbawionych genu *LGALS-3* są znacznie bardziej wrażliwe na czynniki prowadzące do apoptozy niż komórki prawidłowe.

Gal-3 wykazuje znaczące podobieństwa strukturalne do białka Bcl-2 – znanego supresora apoptozy. N-końcowe domeny obydwu białek są bogate w takie aminokwasy, jak: prolina, glicyna i alanina, a C-końcowe domeny zawierają tak zwany motyw przeciwko śmierci (ang. *anti death motif*) Asp-Trp-Gly-Arg (NWGR). Sekwencja ta, obecna w domenie BH-1 rodziny białek Bcl-2, wydaje się być krytyczna dla ich antyapoptotycznych właściwości. Występowanie motywu NWGR w cząsteczce gal-3 u różnych gatunków zwierząt jest silnie konserwatywne i wpływa na zdolność lektyny do wiązania węglowodanów. Pokazano, że substytucja aminokwasu Gly przez Ala w motywie NWGR gal-3 powoduje uwrażliwienie komórek na apoptotyczne działanie cis platyny, co wskazuje na kluczową rolę tej sekwencji w antyapoptotycznej aktywności gal-3 [2].

Fosforylacja jest jedyną znaną do tej pory potranslacyjną modyfikacją gal-3. Ludzka gal-3 ulega fosforylacji głównie w pozycji Ser<sup>6</sup> w wyniku działania kinazy I. Proces ten wpływa nie tylko na zdolności gal-3 do oddziaływania z ligandami, ale również na jej aktywność antyapoptotyczną. Wykazano, że substytucja Ser<sup>6</sup> na Ala w gal-3 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego i zwiększenie wrażliwości komórek BT549 na czynniki proapoptotyczne. Translokacja Bcl-2 do błony mitochondrialnej prowadzi do zatrzymania uwalniania cytochromu c, co w konsekwencji hamuje apoptozę. Wykazano doświadczalnie, że gal-3 również zapobiega indukowanemu kaskadą kaspaz uwalnianiu cytochromu c w komórkach ludzkiego nowotworu piersi BT547, poddanych działaniu tlenku azotu. Zauważono, że nadekspresja gal-3 zapobiega programowanej śmierci komórki wynikającej z utraty przez nią miejsc zakotwiczenia z innymi komórkami lub składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej w epitelialnych komórkach ludzkiego nowotworu piersi BT549. Hamowanie tego typu apoptozy przez gal-3 może być skutkiem jej zdolności do indukowania zatrzymania cyklu komórkowego w późnej fazie G1, poprzez modulację ekspresji cyklin i ich inhibitorów [24]. Zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 w wyniku działania gal-3 wiąże się z obniżeniem poziomu cyklin E i A (cykliny fazy G1-S) oraz zwiększeniem ekspresji ich inhibitorów – białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i p27<sup>KIP1</sup>, a także cykliny D1 (cyklina wczesnej fazy G1). Zaobserwowano również, że genisteina – regulator cyklu komórkowego efektywnie indukował apoptozę komórek BT549 nie hamując cyklu komórkowego. Z kolei w transfekowanych gal-3 komórkach BT549 izoflawonoid ten prowadził do zatrzymania komórek w fazie G2/M bez indukowania apoptozy [30]. Ponadto zaobserwowano, że *in vitro* gal-3 może się wiązać z białkiem Bcl-2 tworząc heterodimer funkcjonujący podobnie jak kompleks dwóch białek z rodziny Bcl-2 (ryc.1). Warto zaznaczyć, że białko Bcl-2 nie jest



RYCINA 1. Model regulacji sygnalizacji apoptotycznej przez galektynę-3 w komórce, wyjaśnienie w tekście

FIGURE 1. A model for the regulation of apoptotic signaling by galectin-3, comments in the text

glikoproteiną, a pomimo to wiązanie Bcl-2 i gal-3 ulega zahamowaniu w obecności laktozy. Yang i wsp. zasugerowali, że motyw NWGR znajduje się w obrębie domeny wiążącej węglowodany, a wiązanie laktozy powoduje zmiany konformacyjne cząsteczki gal-3 uniemożliwiające jej oddziaływanie z Bcl-2. Drugim ważnym cytoplazmatycznym ligandem gal-3 związanym z jej aktywnością antyapoptotyczną jest syneksyna (anneksyna VII), członek białkowej rodziny aneksyn mający zdolność do wiązania błon lipidowych. Syneksyna działa jako kanał dla jonów  $Ca^{2+}$  oraz aktywowana jonami wapnia GTP-aza regulująca fuzję pęcherzyków i transport przez błonowy. Jak się okazało, odpowiedzialna jest ona również za wewnątrzkomórkową translokację gal-3. Blokowanie syneksyny przy użyciu antysensownych nukleotydów prowadziło do zahamowania transportu gal-3 do błony mitochondrialnej i tym samym znacznie upośledzało jej aktywność antyapoptotyczną w komórce [49]. Do cytoplazmatycznych ligandów gal-3 należy również białko Alix/AIP1, które zostało zidentyfikowane jako cząsteczka oddziałująca z wiążącym wapń, związanym ze śmiercią komórkową białkiem ALG-2 [13]. Gal-3 jest zdolna do modulacji specyficznych szlaków transdukcji sygnału poprzez interakcję z poszczególnymi białkami sygnałowymi. Lektyna wiąże się preferencyjnie do aktywowanego białka K-Ras, a oddziaływanie to promuje między innymi aktywację tzw. szlaków przetrwania:

K-Ras/PI3K/Akt oraz K-Ras/Raf-1/MEK (ryc.1). Zauważono, że komórki J82 nowotworu pęcherza z nadekspresją gal-3, mające wysoki poziom konstytutywnie aktywnego białka Akt wykazują oporność na apoptozę indukowaną TRAIL [41]. Gal-3 może również wchodzić w interakcję z receptorem śmierci CD95 (Fas, Apo-1) i modulować formowanie się kompleksu sygnałnego indukującego śmierć komórki – DISC (ang. *Death Inducing Signaling Complex*), co prowadzi do uwolnienia aktywnej kaspazy 8 i dalszej aktywacji kaskady kaspaz [14] (ryc.1).

Okazało się, że zewnątrzkomórkowa gal-3 w przeciwieństwie do wewnątrzkomórkowej może indukować apoptozę w ludzkich limfocytach T. Zaobserwowano, że limfocyty T chłoniaka różnią się pod względem wrażliwości na proapoptotyczne działanie gal-3 w zależności od linii komórkowej, z której pochodzą. I tak, limfocyty T niewykazujące ekspresji gal-3, takie jak np. komórki linii Jurkat, CEM, MOLT-4, były znacznie bardziej wrażliwe na czynniki indukujące apoptozę w porównaniu z komórkami linii SKW64 i H9, w których obserwowano wysoką ekspresję galektyny-3. Różnice te, jak się wydaje, mogą stanowić wypadkową pomiędzy antyapoptotyczną aktywnością endogennej a proapoptotyczną aktywnością egzogennej gal-3. Zewnątrzkomórkowa gal-3 może się wiązać do kompleksu powierzchniowych glikoprotein CD29/CD7 i aktywować szlak sygnałny prowadzący do uwolnienia cyt c z mitochondriów, następnie aktywacji kaspazy 3 i w konsekwencji do indukcji apoptozy. Bardzo prawdopodobne, że gal-3 uwalniana przez komórki rakowe może wpływać na mechanizm tak zwanej ucieczki immunologicznej w czasie progresji nowotworu indukując apoptozę w infiltrujących nowotwór limfocytach T [34].

Gal-3 może wykazywać pro- i antyapoptotyczną aktywność w zależności od typu komórki, jej kondycji oraz natury induktora programowanej śmierci który, na nią działa. Generalnie w komórkach nowotworowych aktywność antyapoptotyczną wykazuje cytoplazmatyczna gal-3, z kolei funkcję odwrotną spełnia gal-3 znajdująca się w jądrze. Lee i wsp. pokazali, że w transfekowanych gal-3 komórkach nowotworu piersi BT 549 dochodzi do defosforylacji białka Akt (antyapoptotyczne białko sygnałne) i zwiększenia wrażliwości komórek na działanie związanego z TNF, indukującego apoptozę ligandu TRAIL (ang. *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) [28]. Przeciwnie, komórki nowotworu pęcherza J82 z nadekspresją gal-3 miały wyższy poziom konstytutywnie aktywnego białka Akt, co prowadziło do uzyskania przez nie oporności na indukowaną TRAIL apoptozę [41]. Różnice te mogą wynikać z tego, że w komórkach J82 TRAIL indukuje zależną, a w komórkach BT 549 apoptozę niezależną od mitochondriów [33].

## ANGIOGENEZA

Angiogeneza jest kompleksowym, wielostopniowym procesem związanym z zapaleniem, gojeniem ran, wzrostem nowotworu i przerzutowaniem [39]. Formacja nowych naczyń krwionośnych jest istotna dla wzrostu zarówno pierwotnych, jak i

wtórnych guzów. Nangia Makker i wsp. donieśli, że gal-3 wpływa dodatkowo na proces angiogenezy w obrębie nowotworu [38a]. Gal-3 stymuluje *in vitro* tworzenie kapilarnych tub przez komórki endotelialne ludzkiej pępowiny (HUVEC) i neowaskularyzację *in vivo*. Jak zaobserwowano, indukowane gal-3 tworzenie kapilar hamowała 50 mM laktoza oraz 0,1% modyfikowane pH pektyny cytrusowe (polisacharydowe kompetycyjne ligandy gal-3). Obserwacje te sugerują udział reszt cukrowych w indukowanym przez gal-3 procesie angiogenezy. Ponadto gal-3 stymuluje chemotaksję komórek HUVEC, a wiązanie się tego białka do komórek endotelialnych ludzkiej żyły pępowinowej jest zależne od domeny wiążącej cukrowce [46].

### WPLYW Gal-3 NA ADHEZJĘ KOMÓRKOWĄ

Baptiste i wsp. badając wpływ gal-3 na adhezję i rozplaszczanie się komórek raka piersi, różniących się poziomem ekspresji tej lektyny, zaobserwowali, że komórki okrągłe, nieadherentne, wykazywały gwałtowną sekrecję gal-3, do momentu zakotwiczenia, podczas gdy w pożywce komórek adherentnych, rozplaszczonych na podłożu obserwowano znikomą ilość gal-3. Dodatkowo, komórki z wyższą ekspresją gal-3 chętniej i szybciej adherowały do plastiku [5].

Większość komórek otoczona jest przez macierz zewnątrzkomórkową i syntetyzuje szereg białek adhezyjnych. Białka te odpowiadają za zakotwiczenie się komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej, jak również regulują homotypową i heterotypową adhezję międzykomórkową. Pomimo braku domeny transbłonowej i sekwencji sygnałnej dla sekrecji, gal-3 znajdująca jest na powierzchni komórki i w przestrzeniach międzykomórkowych, gdzie oddziałuje z takimi białkami, jak LAMP 1 i 2, IgE czy białkiem wiążącym Mac-2 [20]. Gal-3 jest jednym z nie-integrinowych białek wiążących lamininę (główną glikoproteinę błony podstawnej). W formie oligomeru, gal-3 indukuje adhezję i rozplaszczanie się komórek czerniaka na lamininie [11]. Egzogenna gal-3 promuje adhezję neutrofilów do lamininy. Wydaje się jednak, że adhezja ta może być skutkiem aktywacji neutrofilów [26].

Z kolei rozpuszczalna gal-3 hamuje adhezję do lamininy w hodowlach komórek czerniaka, nowotworu piersi, włókniakomięsaka i nowotworu prostaty. Pomimo że gal-3 wiąże lamininę, nie jest ona kluczowym mediatorem adhezji komórkowej do lamininy, ale działa na nią pośrednio regulując aktywność białek adhezyjnych, tj. np. podjednostki integrinowej  $\beta$  [11].

Wykazano, że oprócz lamininy gal-3 wiąże się do glikozylowanych składników macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak: fibronektyna, hensyna, elastyna, kolagen IV oraz tenascyny C i R. Gal-3 w znacznym stopniu wpływa na adhezję komórek BT-549 do lamininy i kolagenu, ale nie do fibronektyny. Komórki ludzkiego nowotworu piersi Esva-T transfekowane gal-3, wykazywały wyższą adhezję do lamininy, fibronektyny oraz witronektyny w porównaniu z komórkami rodzicielskimi. Sugeruje się, że interakcje gal-3 z glikoproteinami błony lizosomalnej Lamp-1 i 2, antygenem nowotworów embrionalnych CEA (ang. *Carcinoembryonic Antigen*) oraz mucy-

nami nowotworu okrężnicy są zaangażowane w procesie adhezji komórek nowotworowych do macierzy zewnątrzkomórkowej. Zanotowano również szereg oddziaływań gal-3 z integrynymi. Integryny, ulegające ekspresji we wszystkich typach komórek, stanowią główną rodzinę białek adhezyjnych. Ich rolą jest nie tylko wiązanie komórek z macierzą zewnątrzkomórkową i adhezja międzykomórkowa, ale również transdukcja sygnałów regulujących proliferację, przeżycie, różnicowanie oraz ruchliwość komórek [8]. Badania pokazały, że transfekcja gal-3 do komórek raka piersi powoduje wzrost ekspresji gal-3 na powierzchni komórek i wzmocnienie ich adhezji do lamininy i innych składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Transfekcja ta miała również wpływ na wzrost ekspresji integryny  $\alpha_5\beta_1$  – związanej z inwazyjnością [46]. Przypuszcza się, że w wyniku oddziaływania z integryną  $\alpha_5\beta_1$  gal-3 reguluje adhezję komórek nowotworowych, zapobiegając interakcjom pomiędzy integryną  $\alpha_5\beta_1$  a białkami macierzy zewnątrzkomórkowej [29]. Jak pokazały badania Friedrichsa i wsp., gal-3 moduluje adhezję komórkową do kolagenu I i IV, zachodzącą głównie z udziałem integryny  $\alpha_2\beta_1$  [12]. Gal-3 formuje również kompleksy z integryną  $\alpha_3\beta_1$  i proteoglikanem NG2 na powierzchni komórek endotelialnych, co może wpływać na ruchliwość tych komórek i angiogenezę [29]. Pojawiły się także doniesienia o zaangażowaniu rekombinowanej gal-3 w endocytozę integryny  $\beta_1$  w komórkach MDA-MB-231 nowotworu piersi [5].

Rozgałęzienia  $\beta$ -1,6-glikanów stanowią preferencyjne miejsca, do których dodawane są terminalne struktury cukrowe, tj. łańcuchy poli N-acetylolaktosaminowe, antygeny Lewis, czy kwasy sialowe. Oligosacharydy te mogą wpływać na przezutowanie, tworząc nowe ligandy dla wielu endogennych lektyn, w tym również dla gal-3. Progresję nowotworową może promować zarówno gal-3 ulegająca ekspresji na powierzchni komórek nowotworowych, co wiąże się z jej wpływem na homotypowe oddziaływania pomiędzy komórkami, jak również nadekspresja węglowodanowych ligandów, która skutkuje wzrostem adhezji heterotypowej tych komórek do komórek innych tkanek wykazujących ekspresję gal-3 [45]. Zaobserwowano, że komórki B16 mysiego czerniaka, wykazujące wysoką ekspresję N-glikanów  $\beta$ -1,6 rozgałęzionych ulegają preferencyjnemu przezutowaniu do płuc. Krishnan i wsp. pokazali, że na proces ten w znacznym stopniu wpływają oddziaływania pomiędzy oligosacharydami na powierzchni komórek B16 a gal-3 znajdującą się na powierzchni komórek endotelialnych płucnych naczyń krwionośnych [25].

Pomimo iż gal-3 ma tylko jedną domenę CRD, może wykazywać bi/multiwalencyjne zdolności wiążące. W tworzenie multimerów gal-3 zaangażowany jest zarówno region rozpoznający węglowodany, jak i domena N-końcowa. Tworzenie dimerów lub multimerów gal-3 związane jest z agregacją komórek nowotworowych w układzie krwionośnym w czasie przezutowania i wynika z ich wpływu na homotypową adhezję komórkową poprzez tworzenie mostków z rozgałęzionymi glikokoniugatami. Jak wykazano, na tę spontaniczną, homotypową agregację komórek nowotworowych miały częściowo wpływ oddziaływania pomiędzy gal-3 a glikoantygendem powierzchniowym Thomsena-Friedenreicha (TFAg) [1, 40]. Obecnie obserwuje się zwiększoną koncentrację gal-3 w osoczu pacjentów z nowo-

tworami: piersi, płuc, głowy i szyi oraz jelita grubego. Wprowadzenie rekombinowanej gal-3 do hodowli komórek nowotworowych: jelita grubego, piersi, czy czerniaka, odpowiada za wzrost adhezji tych komórek do komórek endotelialnych [48, 50, 52]. Efekt ten wydaje się mieć związek ze zdolnością gal-3 do oddziaływania z antygenem TF związanym z białkiem MUC1, ulegającym ekspresji na powierzchni komórek nowotworowych [35, 51]. Gal-3 jest również mediatorem dimeryzacji CD98 – białka obecnego na ludzkich i mysich monocytach/makrofagach oraz aktywowanych limfocytach T i tym samym wpływa na aktywność integryny.

Najnowsze badania wskazują, że egzogenna gal-3 promuje formację lamellipodiów w komórkach nabłonkowych ludzkiej rogówki, a aktywność ta zależy od obecności laktozy (kompetycyjnego liganda gal-3). Wykazano, że egzogenna gal-3 aktywuje zarówno kinazę ognisk przylegania FAK (ang. *Focal Adhesion Kinase*) – kluczowego regulatora sygnalizacji międzykomórkowej zależnego od integryn, jak i białko Rac-1 – członka rodziny małych białek GTP-azowych Rho. Metodą chromatografii na kolumnie gal-3 Sefarozą zidentyfikowano integrynę  $\alpha_3\beta_1$  jako główne białko wiązane przez gal-3 w komórkach epitelialnych rogówki [44].

Jest również wiele dowodów wskazujących na zdolności gal-3 do regulacji migracji komórkowej – zaobserwowano zarówno jej pozytywny, jak i negatywny wpływ na ten proces. Gal-3 promuje migrację monocytów i wydaje się być jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za napływ makrofagów do ogniska zapalnego. Dodatkowo lektyna ta odpowiada za zwiększenie ruchliwości szeregu komórek nowotworowych. Z kolei negatywny wpływ gal-3 na migrację wykazano dotychczas w komórkach nowotworu okrężnicy i glejaka [16]. Badania Lagana i wsp. prowadzone na *Mgat*<sup>-/-</sup> i *Mgat*<sup>+/+</sup> (*Mgat* – nazwa genu dla  $\beta$  1,6-N-acetyloglukozaminylotransferazy V) nowotworowych komórkach epitelialnych pokazały, że wiązanie się gal-3 do modyfikowanych przez  $\beta$ 1,6-N-acetyloglukozaminylotransferazę V (GnT V) N-glikanów indukuje aktywację integryny  $\alpha_3\beta_1$  i wzmacnia fibrylogenezę fibronektyny oraz zależne od fibronektyny rozplaszczanie się i migrację komórek nowotworowych [4, 27]. Goetz i wsp. wykazali, że skupiska gal-3/modyfikowane przez GnTV N-glikany, regulują dynamikę łątek przylegania (ang. *focal adhesions*), a aktywność ta zależy od fosforylowanej kaweoliny-1 (pCav1) [20]. Gal-3 i pCav1 wpływają na wzrost stabilnej frakcji – FAK, paksylina, integryna  $\alpha_3\beta_1$  w obrębie łątek przylegania, co wiąże się z utworzeniem stabilnej domeny błonowej [16].

W wyniku działania metaloproteinaz macierzy komórkowej (MMPs), ludzka gal-3 ulega przecięciu w pozycji Ala<sup>62</sup>-Tyr<sup>63</sup>, co skutkuje powstaniem dwóch białkowych produktów o masie ~9 kDa i ~22 kDa. Pokazano, że 22 kDa produkt traci zdolność do aglutynacji czerwonych krwinek oraz ma zredukowane możliwości samoasocjacji w porównaniu z prawidłową gal-3. Dodatkowo przecięcie gal-3 przez MMPs znacznie zwiększa zdolności komórek do wiązania lamininy oraz do komórek endotelialnych (HUVEC) [36]. Celem dla MMPs może być zarówno wewnątrzkomórkowa, jak i błonowa oraz ulegająca sekrecji gal-3. Aby wyjaśnić znaczenie hydrolizy wiązania Ala<sup>62</sup>-Tyr<sup>63</sup> dla funkcji pełnionych przez gal-3, skonstruowano gen, którego ekspresja prowadziła do powstania białka z Pro zamiast His<sup>6</sup> w pobliżu

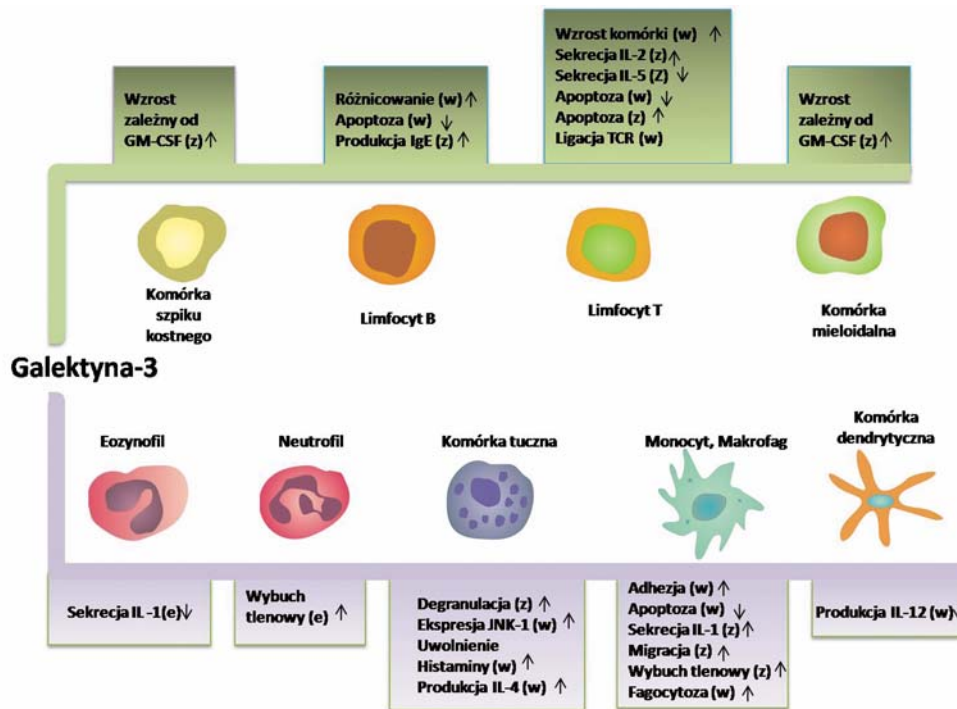
miejsca wrażliwego na działanie MMPs. Substytucja ta czyniła białko opornym na działanie MMP-2 i MMP-9. Przeprowadzono doświadczenie, w którym uzyskano dwie stabilne linie komórkowe ludzkiego nowotworu piersi BT-549 wykazujące ekspresję gal-3 mającej w pozycji 64 His lub Pro (komórki rodzicielskie nie wykazywały ekspresji gal-3). Komórki mające wariant Pro<sup>64</sup> charakteryzowały się zmienioną morfologią, zredukowanymi zdolnościami do chemotaksji i inwazji, wrażliwością na apoptozę oraz zredukowanym potencjałem do tworzenia przerzutów i nowych naczyń krwionośnych (funkcje regulowane przez zewnątrzkomórkową galektynę-3) w porównaniu z komórkami ze stabilnym wariantem His<sup>64</sup> gal-3. Z kolei funkcje regulowane przez wewnątrzkomórkową gal-3, tj. proliferacja, czy niezależny od zakotwiczenia wzrost komórki wydawały się niezmienione [37, 38].

### Gal-3 JAKO MEDIATOR ZAPALENIA

U podłoża procesu zapalnego leżą zmiany prowadzące do rozszerzenia i zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych, co prowadzi do przesączenia płynów oraz białek osocza i ułatwia migrację leukocytów do ogniska zapalnego. Gal-3, początkowo określana jako białko wiążące immunoglobuliny E (*IgE-binding protein*), jest lektyną pro-zapalną. W odpowiedzi na działanie wielu czynników zapalnych pewne komórki produkują i wydzielają duże ilości gal-3. Zewnątrzkomórkowa gal-3 może oddziaływać na komórki biorące udział w procesie zapalnym w drodze parakrynej bądź autokrynej wywołując/promując „wybuch tlenowy” w neutrofilach i monocytach i indukując uwalnianie mediatorów zapalenia przez komórki tuczne (ryc. 2). Chen i wsp. zauważyli, że aktywowane IgE komórki tuczne Gal<sup>-/-</sup> produkowały mniej mediatorów i cytokin w porównaniu z komórkami prawidłowymi [7, 43]. Mechanizm, poprzez który gal-3 reguluje proces uwalniania mediatorów i cytokin przez komórki tuczne, nie jest znany, wydaje się jednak, że może on być, po części, związany ze zdolnością białka do kontroli ekspresji kinazy 1 białka c-jun (JNK1) odgrywającej główną rolę w sygnalizacji prowadzącej do produkcji wybranych cytokin [7, 32]. Gal-3 wzmacnia adhezję ludzkich neutrofilów do lamininy i komórek endotelialnych oraz indukuje proces diapedezy. Dodatkowo lektyna ta stymuluje produkcję IL-1 przez makrofagi (IL-1 jest białkiem indukującym ekspresję limfocytarnych białek adhezyjnych, tj. np. ICAM, ELAM, VCAM). Gal-3 jest również chemoatraktantem dla monocytów i makrofagów (dowodzono, że działa ona silniej niż klasyczny chemokinowy chemoatraktant monocytów-białko MCP-1) [31]. Karlson i wsp. zauważyli, że zewnątrzkomórkowa gal-3 zwiększa zdolność makrofagów do rozpoznawania ulegających apoptozie neutrofilów. Okazało się, że gal-3 działa, w tym przypadku, jako białko opłaszczające neutrofile i łączące komórki fagocytyczne z apoptotycznymi za pomocą mostków cukrowo-białkowych, usprawniając w ten sposób proces „sprzątania” [23].

Gal-3 wpływa w znaczący sposób na proces zapalny poprzez zdolność do rozpoznawania zawierających galaktozę glikanów na powierzchni patogenów. Wyka-





RYCINA 2. Funkcje pełnione przez galektynę-3 (w) – wewnątrzkomórkową, (z) – zewnątrzkomórkową w komórkach układu immunologicznego: (↑) promocja lub (↓) inhibicja danej funkcji przez galektynę-3

FIGURE 2. The effects of (w) – cellular, (z) – extracellular galectin-3 on immune cells; (↑) promotion or (↓) inhibition the particular function by galectin-3

ziano, że gal-3 oddziałuje z lipopolisacharydami (LPS) bakterii gramujemnych, takich jak np.: *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Minnesota*, *Salmonella typhimurium* czy *Escherichia coli* [10], a oddziaływania te mogą zachodzić na dwa sposoby poprzez domenę CRD białka i zawierające  $\beta$ -galaktozę łańcuchy polisacharydowe (w warunkach zależnych od laktozy) lub przez domenę N-końcową z lipidem A – składnikiem LPSs (niezależnie od laktozy) [3]. Badania prowadzone *in vivo* dostarczyły wielu dowodów przemawiających za pro-zapalną aktywnością gal-3. Myszy pozbawione genu *gal-3* miały obniżoną odpowiedź zapalną po indukcji zapalenia otrzewnej tioglikolatem. Myszy te, w porównaniu ze szczepem dzikim, charakteryzowały się znaczną redukcją liczby granulocytów oraz zmniejszoną infiltracją makrofagów. Ponadto makrofagi otrzewnej myszy *gal-3<sup>-/-</sup>* wykazywały osłabioną fagocytozę apoptotycznych tymocytów i opsonizowanych IgG erytrocytów [22]. Badania nad mysim modelem chorób infekcyjnych u zwierząt *gal-3<sup>-/-</sup>* zainfekowanych *Toxoplasma gondi* wykazały zmniejszoną odpowiedź odpornościową w ich jelitach, wątrobie i mózgu w porównaniu z osobnikami szczepu dzikiego [6]. Ekspresja specyficznych struktur cukrowych zależy od aktywności glikozylotransferaz. Jedną z nich  $\beta$  1,6-N-acetyloglukozaminylotransferaza V (GnTV) katalizuje

reakcję dodania do N-glikanów jednostek GlcNAc w pozycji  $\beta$  1,6, a tak zmienione glikany ulegają dalszym modyfikacjom prowadzącym do zwiększenia ilości łańcuchów polilaktozaminowych – preferencyjnie wiązanych przez gal-3 liganda. Demetriou i wsp. wykazali, że limfocyty T z myszy pozbawionych genu *Mgat5* wykazują niższy próg aktywacji i zwiększoną agregację receptorów TCR (ang. *T Cell Receptor*) na swojej powierzchni. U myszy szczepu dzikiego gal-3 związana jest z tworzeniem kompleksów receptorów TCR na powierzchni limfocytów T. Pre-inkubacja tych komórek z laktozą (kompetycyjny ligand gal-3) skutkuje hiperaktywacją komórek T obserwowaną u myszy *Mgat5*<sup>-/-</sup>. Badania wskazują, że gal-3 biorąc udział w tworzeniu się skupisk receptorów TCR ma tym samym wpływ na ich oddziaływanie z ligandami oraz transdukcję sygnału, co może zapobiegać niekontrolowanej aktywacji limfocytów T [23]. Peng i wsp. wykazali, że krążąca w osoczu gal-3 może regulować aktywność limfocytów T poprzez indukcję apoptozy i tym samym wpływać na inhibicję antynowotworowej odpowiedzi odpornościowej [42].

### Gal-3 JAKO POTENCJALNY MARKER NOWOTWOROWY

Przerzutowanie jest jednym z najistotniejszych czynników prowadzących do śmierci pacjentów z nowotworami złośliwymi, dlatego poszukiwania biomarkerów mogących jej zapobiec zajmują szczególne miejsce w badaniach klinicznych. Funkcje, jakie pełni gal-3 w komórce, sugerują jej ważną rolę w poszczególnych stadiach progresji i przerzutowaniu nowotworu. Gal-3 ma znaczący wpływ na ucieczkę komórek nowotworowych z pierwotnego miejsca wzrostu do odległych obszarów ciała poprzez swój udział w procesach adhezji komórkowej oraz dzięki wspomaganiamu komórek nowotworowych w tworzeniu agregatów w układzie krwionośnym [47, 53]. Dodatkowo gal-3 indukuje związaną z nowotworem angiogenezę oraz wpływa na apoptozę komórek nowotworowych, wykazując aktywność zarówno pro-, jak i antyapoptotyczną w zależności od natury czynnika stymulującego działającego na komórkę [53]. Jak wynika z wielu prac, gal-3 może być obiecującym celem dla terapii nowotworowej, a jej inhibitory mogą zostać użyte jako czynniki antynowotworowe i hamujące, bądź zapobiegające przerzutowaniu. Z drugiej strony, zewnątrzkomórkowa gal-3 może być użyteczna jako diagnostyczny i prognostyczny marker [13]. Warto wspomnieć, że metodą MALDI-ToF zidentyfikowano gal-3 jako jedno z szesnastu białek ulegające statystycznie istotnej nadekspresji w superinwazyjnych komórkach MDA-MB-435S [9]. Jurisci i wsp. wykazali zwiększony poziom gal-3 w osoczu pacjentów z czerniakiem, chłoniakiem Hodgkina oraz z nowotworami piersi, płuc, jajników i układu pokarmowego; poziom ten z kolei odzwierciedlał zdolność nowotworu do przerzutowania. Co ważne, ekspresja cytoplazmatycznej gal-3 wydaje się być silnie związana z opornością na antynowotworowe leki wykazywaną przez komórki [13]. Obniżenie ekspresji wewnątrzkomórkowej gal-3 z użyciem siRNA może być przydatną strategią prowadzącą do zwiększenia

odpowiedzi komórek na przeciwnowotworowe terapeutyki, zwłaszcza w przypadku nowotworów piersi i prostaty [21].

Jednym z kandydatów na terapeutyk przeciwnowotworowy mającym zdolność do kompetycyjnej inhibicji gal-3 są modyfikowane pektyny cytrusowe – MCP (ang. *modified citrus pectin*). Pektyny są silnie rozgałęzionymi złożonymi polisacharydami, występującymi w ścianach komórkowych wszystkich tkanek roślinnych. Komercyjnie używane pektyny otrzymuje się głównie z owoców cytrusowych (limonki, cytryny, grejpfruty, pomarańcze), buraków i jabłek. Pektyny te poddaje się modyfikacjom (wysokie pH i temperatura), dzięki którym uzyskują one lepszą rozpuszczalność w wodzie i stają się lepiej przyswajalne przez organizm ludzki [17, 19]. Wykazano, że MCP są zdolne *in vitro* do zahamowania homotypowej agregacji komórek nowotworowych, angiogenezy i adhezji komórek nowotworowych do endotelium. Dożylna iniekcja MCP hamowała przerzutowanie komórek czerniaka B16-F1 do płuc. Doustne podawanie MCP prowadziło z kolei do inhibicji spontanicznego przerzutowania szczurzych komórek prostaty i ludzkich komórek nowotworu piersi [13]. Dokładne poznanie i zrozumienie, w jaki sposób, z udziałem jakich ligandów i poprzez jakie szlaki sygnalizacyjne działa gal-3 w komórce, przyczyni się być może do znalezienia odpowiedniego leku hamującego patologiczną aktywność tej lektyny.

## LITERATURA

- [1] AHMAD N, GABIUS HJ, ANDRE S, KALTNER H, SABESAN S, ROY R, LIU B, MACALUSO F, BREWER CF. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous crosslinked complexes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 10841–10847.
- [2] AKAHANI S, NANGIA-MAKKER P, INOHARA H, KIM H.R, RAZA A. Galectin-3 a novel antiapoptotic molecule with a functional BHI (NWGR) domain of Bcl family. *Cancer Res* 1997; **57**: 5272–5276.
- [3] ALMKVIST J, KARLSSON A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J* 2004; **19**: 575–581.
- [4] ARGÜESO P, GUZMAN-ARANGUEZ A, MANTELLI F, CAO Z, RICCIUTO J, PANJWANI N. Association of cell surface mucins with galectin-3 contributes to the ocular surface epithelial barrier. *J Biol Chem* 2009; **284**: 23037–23045.
- [5] BAPTISTEA T, JAMESA A, SARIAA M, OCHIENGA J. Mechano-transduction mediated secretion and uptake of galectin-3 in breast carcinoma cells: implications in the extracellular functions of the lectin. *Exp Cell Res* 2007; **313**: 652–664.
- [6] BERNARDES ES, SILVA NM, RUAS LP. *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role of galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *Am J Pathol* 2006; **168**: 1910–1920.
- [7] CHEN HY, SHARMA BB, Yu L. Role of galectin-3 in mast cell functions: Galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression. *J Immunol* 2006; **177**: 4991–4997.
- [8] DAVIDSON PJ, LI SY, LOHSE AG, VANDERGAAST R, VERDE E, PEARSON A, PATTERSON RJ, WANG JL, ARNOYSL EJ. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. I. Identification of the signals for nuclear import. *Glycoconj J* 2006; **16**: 602–611.
- [9] DOWLING P, MELEADY P, DOWDA, HENRY M, GLYNN S, CLYNES M. Proteomics analysis of isolated membrane fractions from superinvasive cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1774**: 93–101.
- [10] DUMIC J, DABELIC S, FLOGEL M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1760**: 616–635.
- [11] ELOLAMT, WOLFENSTEIN-TODEL C, TRONCOSO MF, VASTA GR, RABINOVICH GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration and survival. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**: 1679–1700.
- [12] FRIEDRICH S, MANNINEN A, MULLER D, HELENIUS J. Galectin-3 regulates integrin  $\alpha_2\beta_1$ -mediated adhesion to collagen-I and -IV. *J Biol Chem* 2008; **283**: 32264–32272.

- [13] FUKUMORI T, KANAYAMA H, RAZ A. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. *Drug Resistance Updates* 2007; **10**: 101–108.
- [14] FUKUMORI T, TAKENAKA Y, OKA N, YOSHII T, HOGAN V, INOHARA H, KANAYAMA H, CHOI KIM H, RAZ A. Endogenous galectin-3 determines the routing of pathways CD95 apoptotic signaling pathways. *Cancer Res* 2004; **64**: 3376–3379.
- [16] GAUS K, LE LAY S, BALASUBRAMANIAN N, SCHWARTZ MA. Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *J Cell Biol* 2006; **174**: 725–734.
- [17] GLINSKY V, RAZ A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydrate Res* 2009; **344**: 1788–1791.
- [18] GOETZ JG, JOSHI B, LAJOIE P, SCUDAMORE T, KOJIC L. Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *J Cell Biol* 2008; **180**: 1261–1275.
- [19] GUNNING A, ROY J, BONGAERTS M, MORRIS V. Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. *FASEB J* 2009; **23**: 415–424.
- [20] HAUDEK K, SPRONK K, VOSS P, PATTERSON R, WANG J, ARNOYS E. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1800**: 181–189.
- [21] HONJO Y, NANGIA-MAKKER P, INOHARA H, RAZ A. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human Breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 661–668.
- [22] HSU DK, YANG RY, YU L, PAN Z, SALOMON DR, FUNG-LEUNG WP, LIU FT. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol* 2000; **156**: 1073–1083.
- [23] KARLSSON A, CHRISTENSON K, MATLAK M, BJORSTAD A, BROWN KL, TELEMO E, SALOMONSSON E, LEFFLER H, BYLUND J. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology* 2009; **19**: 16–20.
- [24] KIM HR, LIN HM, BILIRAN H, RAZ A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res* 1999; **59**: 4148–4154.
- [25] KRISHNAN V, BANE SM, KAWLE PD, NARESH KK, KALRAIYA RD. Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on lung vascular endothelium. *Clin Exp Metastasis* 2005; **22**: 11–24.
- [26] KUWABARA I, LIU F. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 1996; **156**: 3939–3944.
- [27] LAGANA A, GOETZ JG, CHEUNG P, RAZ A, DENNIS JW, NABI IR. Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 3181–3193.
- [28] LEE Y, SONG Y, SONG J, SIERVO-SASSI R, KIM HR, LI L, SPITZ D, LOKSHIN A, KIM J. Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. *Exp Cell Res* 2003; **288**: 21–34.
- [29] LE MERCIER M, FORTIN S, MATHIEU V, KISS R, LEFRANC F. Galectins and Gliomas. *Brain Pathol* 2010; **20**: 17–27.
- [30] LIN HM, MOON BK, YU F, KIM HR. Galectin-3 mediates genistein induced G(2)/M arrest and inhibits apoptosis. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 1941–1945.
- [31] LIU FT. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; **136**: 385–400.
- [32] LIU FT, HSU DK. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug News Perspect* 2007; **20**: 1–6.
- [33] MAZUREK N, SUN Y, LIU KF, GLICREASE M, SCHOBER W, NANGIA-MAKKER P, RAZ A, BRESALIER R. Phosphorylated galectin-3 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling by regulation phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 in human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 2007; **282**: 21337–21348.
- [34] NAKAHARA S, OKA N, RAZ A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 2005; **10**: 267–275.
- [35] NAKAHARA S, RAZ A. Biological modulation by lectins and their ligands in tumor progression and metastasis. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; **8**: 22–36.
- [36] NANGIA-MAKKER P, BALAN V, RAZ A. Regulation of tumor Progression by Extracellular Galectin-3. *Cancer Microenviron* 2008; **1**: 43–51.
- [37] NANGIA-MAKKER P, NAKAHARA S, HOGAN V, RAZ A. Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target. *J Bioenerg Biomembr* 2007; **39**: 79–84.

- [38] NANGIA-MAKKER P, RAZ T, TAIT L, HOGAN V, FRIDMAN R, RAZ A. Galectin-3 cleavage: a novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers. *Cancer Res* 2007; **67**: 11760–11768.
- [38a] NANGIA-MAKKER P, HONJO Y, SARVIS R, AKAHANI S, HOGAN V, PIANTA K, RAZ A. Galectin-3 Induces Endothelial Cell Morphogenesis and Angiogenesis. *Amer J Pathology*. 2000; **156**: 899–909.
- [39] NGUYEN A, HOANG V, LAQUER V, KELLY KM. Angiogenesis in cutaneous disease. Part I. *J Am Acad Dermatol* 2009; **61**: 921–942.
- [40] NIEMINEN J, KUNO A, HIRABAYASHI J, SATO S. Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 2007; **282**: 1374–1383.
- [41] OKA N, NAKAHARA S, TAKENAKA Y, FUKUMORI T, HOGAN V, KANAYAMA HO, YANAGAWA T, RAZ A. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. 2005; **65**: 7546–7553.
- [42] PENG W, WANG HY, MIYAHARA Y, PENG G, WANG RF. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer Res* 2008; **68**: 7228–7236.
- [43] RODRIGUEZ ZUBIETA M, FURMAN D, BARRIO M, INES BRAVO A, DOMENICHINI E, MORDOH J. Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. *Am J Pathol* 2006; **168**: 1666–1675.
- [44] SERAVANAN CH, LIU FT, GIPSON JK, PANJWANI N. Galectin-3 promotes lamellipodia formation in epithelial cells by interacting with complex N-glycans on  $\alpha_3\beta_1$  integrin. *J Cell Sci* 2009; **122**: 3684–3693.
- [45] SRINIVASAN N, BANE SM, AHIRE SD, INGLE AD, KALRAIYA RD. Poly N-acetylactosamine substitutions on N- and not O-oligosaccharides or Thomsen-Friedenreich antigen facilitate lung specific metastasis of melanoma cells via galectin-3. *Glycoconj J* 2009; **26**: 445–456.
- [46] TAKENAKA Y, FUKUMORI T, RAZ A. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J* 2004; **19**: 543–549.
- [47] VAN DEN BRULE F, CALIFICE S, CASTRONOVO V. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J* 2004; **19**: 537–542.
- [48] VEREERÉCKEN P, AWADA A, SUCIU S, CASTRO G, MORANDI R, LITNSKA A, LIENARD D, EZZEDINE K, GHANEM G, HEENEN M. Evaluation of the prognostic significance of serum galectin-3 in American Joint Committee on Cancer stage III and stage IV melanoma patients. *Melanoma Res* 2009; **19**: 316–320.
- [49] YU F, FINLEY RL, RAZ A, KIM HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 15819–15827.
- [50] YU L. Circulating galectin-3 in the bloodstream: An emerging promoter of cancer metastasis. *World J Gastrointest Oncol* 2010; **2**: 177–180.
- [51] YU L, ANDREWS N, ZHAO Q, MC KEAN D, WILLIAMS J, CONNOR L, GERASIMENKO O, HILKENS J, HIRABAYASHI J, KASAI K, RHODES J. Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion. *J Biol Chem* 2007; **282**: 773–781.
- [52] ZHAO Q, GUO X, NASH G, STONE P, HILKENS J, RHODES J, YU L. Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface. *Cancer Res* 2009; **69**: 6799–6806.
- [53] ZUBIETA M, FURMAN D, BARRIO M, BRAVO A, DOMENICHINI E, MORDOH J. Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. *Am J Path* 2006; **168**: 1666–1675.

Redaktor prowadzący – B. Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 11.06. 2010 r.

Przyjęto: 11.07. 2010 r.

prof. A. Lityńska,

Zakład Biochemii Glikokoniugatów UJ,

30-060 Kraków, ul. Ingardena 6

E-mail: [anna.litynska@uj.edu.pl](mailto:anna.litynska@uj.edu.pl)

