Uloga galektina-3 u stanicama monocitne i limfocitne loze

Novak, Ruđer

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:629125

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

RUĐER NOVAK

THE ROLES OF GALECTIN-3 IN MONOCYTE AND LYMPHOCYTE LINEAGES

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

RUĐER NOVAK

ULOGA GALEKTINA-3 U STANICAMA MONOCITNE I LIMFOCITNE LOZE

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Jerka Dumić, red. prof.

Zagreb, 2012.

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

RUĐER NOVAK

THE ROLES OF GALECTIN-3 IN MONOCYTE AND LYMPHOCYTE LINEAGES

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Professor Jerka Dumić

Zagreb, 2012

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te u sklopu projekata „Biološka uloga glikozilacije i drugih posttranslacijskih modifikacija“ (0006611) i „Glikobiološki aspekti stanične prilagodbe i komunikacije“ Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (006-0061194-1218).

Mojoj mentorici, Dr.Sc. Jerki Dumić koja mi je postavila nit kroz labirint znanosti, pripremila me na uspjehe i padove. Hvala na razumijevanju i velikoj slici koju ste gledali od prvoga dana.

Sanji koja me mnogo puta spasila od otkrivanja tople vode i puno doprinijela ovome radu, svim djelatnicima Zavoda s kojima sam živio posljednjih šest godina: Sonja, Fedora, Goga, Sandra, Olga, Gordane i Erime – hvala na prijateljstvu.
Prijatelju i kolegi Denisu koji mi je objasnio značenje šarenih točkica na monitoru i bio na raspolaganju – savjetom i kemikalijom.

Hvala svim djelatnicima Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i desetinama anonimnih donora koji su, uz mene, krvarili tijekom posla.

Mama i tata, hvala vam što sam od malih nogu u životu birao svoj put. Hvala na svoj ljubavi, podršci i razumijevanju od 0 do 24 i od 0 do 30. Braco, Tajči – hvala vam što ste Braco i Tajči.
Baka i deda, znam da vam ovaj doktorat znači najmanje koliko i meni! Jako mi je drago da ste ga pročitali i da sam konačno opravdao što me zovete „doktore" posljednjih dvadesetak godina.

Majki, još jednom, hvala ti na SVEMU!

Veliko hvala svim mojim nadzemnim i podzemnim prijateljima. Bijeg iz grada u planine i pod njih često je bio najbolja vikend psiho-terapija nakon dugih tjedana iza pipete i miša.

Ljubavi, razumiješ me i kad ne bi trebala, tvoj je svaki zarez i točka. Ostala si kad je grmjelo - hvala ti za najljepše razdoblje u životu.

SAŽETAK

Galektini-1 i -3 moduliraju mnoge stanične procese, a regulacijom migracije, fagocitoze i degranulacije upalnih stanica, te sinteze citokina i medijatora upale, ovi su lektini uključeni u sve faze upalnih reakcija urođenog i stečenog imunosnog odgovora. Djelovanje mu izrazito ovisi o lokalizaciji i tipu stanica, no galektin-1 općenito se smatra jakim protu-upalnim signalom, dok galektin-3 uglavnom potiče upalu. Ovim radom ispitana je uloga galektina-3 u fiziologiji limfocita, te uloga i ekspresija galektina-1 i -3 u monocita, te klasično i alternativno diferenciranih i aktiviranih makrofaga.

Humani limfociti i monociti izolirani su iz krvi zdravih dobrovoljnih davatelja. Uzgojem u hranidbenom mediju uz dodatak granulocitno-makrofagnog, odnosno makrofagnog faktora stimulacije rasta kolonija, monociti su diferencirani u makrofage tipa M1 i M2. Diferencirani makrofagi M1 aktivirani su klasično, dodatkom lipopolisaharida i interferona-γ, ili alternativno u fenotip M2a/M2c, dodatkom interleukina (IL)-4/IL-10. Utvrđena je ekspresija galektina-1 i -3 na genskoj i proteinskoj razini, te njihova prisutnost na membrani stanica. U hranidbenom mediju spomenutih stanica određena je koncentracija galektina-3. Utvrđen je učinak egzogeno dodanog galektina-3 na fiziologiju limfocita, monocita i aktiviranih makrofaga.

Dobiveni rezultati upućuju na to da diferencijaciju i polarizaciju humanih monocita u klasično (M1) i alternativno (M2a/M2c) aktivirane makrofage prate izrazite promjene razine ekspresije i proteolitičkog kidanja galektina-3. Ekspresija i sekrecija galektina-3 usko su regulirane i znatno se razlikuju u klasično, u odnosu na alternativno aktivirane makrofage, dok u galektina-1 razlike u razini ekspresije nisu toliko naglašene. Zamijećene su izrazite razlike ekspresijskih profila i kidanja galektina-3 u istih podtipova makrofaga podrijetlom od različitih donora krvi. U klasično aktiviranih makrofaga, temeljem intenziteta ekspresije membranskog galektina-3, zamijećene su dvije odvojene populacije stanica. Humani monociti pokazuju izrazito velik kapacitet vezanja egzogeno dodanog galektina-3, dok su u aktiviranih makrofaga receptori tog proteina u potpunosti zasićeni. Egzogeno dodani galektin-3 ne utječe na izlučivanje citokina limfocita i aktiviranih makrofaga.

Razlike u razini i obrascu ekspresije galektina-3 u različito diferenciranih/aktiviranih makrofaga u odnosu na galektin-1 su značajne. Stoga, specifičan uzorak ekspresije i sekrecije ovog proteina u diferenciranih i aktiviranih makrofaga pridonosi boljem razumijevanju uloge i regulacije galektina-3 u tim stanicama. Novi uvid u biološke karakteristike različito diferenciranih i aktiviranih makrofaga, baca svjetlo na galektin-3 kao modulator pojedinog podtipa makrofaga.

Ključne riječi: galektin-1, galektin-3, diferencijacija monocita, aktivacija makrofaga, makrofagi M1/M2

SUMMARY

Galectins-1 and -3 modulate many cellular processes, and through regulation of cell migration, phagocytosis, immune cell degranulation and modulation of cytokine and inflammatory mediator production, these lectins are intimately involved in all phases of inflammatory reactions of innate and acquired immunity. Galectin-1 is generally considered a strong anti-inflammatory and galectin-3 a pro-inflammatory signal, but their effects tremendously vary with respect to their localization and the cell type. In this work we address the role of galectin-3 in the physiology of lymphocytes and the role and expression of galectins-1 and -3 in human monocytes and classically or alternatively differentiated and activated macrophages.

Human lymphocytes and monocytes were isolated from the blood of healthy donors and differentiated into M1 and M2 subtype of macrophages by cultivation in culture media supplemented with granulocyte-macrophage or macrophage colony-stimulating factor, respectively. M1 macrophages were activated classically by lipopolysaccharide and interpheron-γ or alternatively into M2a/M2c phenotypes by interleukin (IL)-4/IL-10, respectively. The expression of galectins-1 and -3 was determined on gene and protein levels, and the amount of galectins bound to the cell membranes was estimated. Culture media were probed for secreted galectin-3. The effect of exogenously added galectin-3 on the physiology of lymphocytes, monocytes and activated macrophages was investigated.

Obtained results imply that differentiation and activation of monocytes into classically (M1) and alternatively (M2a/M2c) activated macrophages is followed by marked changes of expression and proteolitic cleavage of galectin-3. Expression and secretion of galectin-3 was tightly regulated and significantly differed among classically and alternatively activated macrophages, while the differences of galectin-1 expression profiles were not pronounced. Significant differences in galectin-3 expression profiles were observed between the same macrophage subtypes obtained from different blood donors. Moreover, classically activated macrophages polarize into two distinct populations with respect to the expression of membrane galectin-3. Human monocytes exhibited high amount of free galectin-3 receptors, while on both types of activated macrophages the receptors were fully saturated. Exogenously added galectin-3 does not affect cytokine secretion of lymphocytes or activated macrophages.

Galectin-3 is more distinctive descriptor of macrophage differentiation/activation than galectin-1. Its specific expression and secretion pattern in M1 *vs.* M2a/M2c macrophages contributes to better understanding of its role and regulation in these cells and provides a new insight on biological characteristics of these cells.

Keywords: galectin-1; galectin-3; monocyte differentiation; macrophage activation; M1/M2 macrophages

SADRŽAJ

1 Uvod 1
1.1 Galektini 3
1.1.1 Galektin-1 4
1.1.1.1 Struktura i regulacija ekspresije galektina-1 4
1.1.1.2 Ligandi galektina-1 5
1.1.1.3 Stanična raspodjela i uloge galektina-1 6
1.1.2 Galektin-3 7
1.1.2.1 Struktura galektina-3 7
1.1.2.2 Regulacija ekspresije galektina-3 9
1.1.2.3 Ligandi galektina-3 10
1.1.2.4 Tkivna distribucija galektina-3 13
1.1.2.5 Stanična raspodjela i uloge galektina-3 13
1.3 Imunost 15
1.3.1 Monociti 15
1.3.2 Makrofagi 16
1.3.2.1 Aktivacija makrofaga 17
1.3.3 Limfociti 21
1.4 Galektin-1 i galektin-3 u imunosnom sustavu 22
1.5 Svrha i ciljevi rada 27
2 Materijal i metode 28
2.1 Materijal 29
2.1.1 Standardne kemikalije 29
2.1.2 Proteini i enzimi 30
2.1.3 Protutijela i serum 30
2.1.4 Specifične komercijalne smjese analitičkih reagencija – kompleti 31

2.1.5 Stanične linije 31
2.1.6 Otopine i puferi 32
2.1.7 Gelovi za elektroforezu 34
2.2 Metode 35
2.2.1 Uspostava kratkotrajnih primarnih staničnih kultura i tretman stanica 35
2.2.1.1 Uzorci krvi 35
2.2.1.2 Izdvajanje limfocita i monocita iz krvnog pripravka 35
2.2.1.3 Diferencijacija monocita u makrofage i aktivacija makrofaga 36
2.2.1.4 Tretman limfocita i aktiviranih makrofaga rh-galektinom-3 36
2.2.2 Proizvodnja i pročišćavanje rh-galektina-3 37
2.2.2.1 Utvrđivanje biološke aktivnosti rh-galektina-3 38
2.2.3 Protočna citometrija 38
2.2.3.1 Utvrđivanje ekspresije membranskih proteina 38
2.2.3.2 Utvrđivanje udjela živih, rano i kasno apoptoznih, te mrtvih stanica 39
2.2.3.3 Utvrđivanje citokinskog sastava hranidbenog medija aktiviranih makrofaga 39
2.2.3.4 Utvrđivanje slobodnih membranskih receptora za galektin-3 40
2.2.3.5 Analiza uzoraka na protočnom citometru 40
2.2.4 Utvrđivanje razine ekspresije galektina-1 i -3 na razini proteina 41
2.2.4.1 Priprava i određivanje koncentracije proteina u staničnom homogenatu 41
2.2.4.2 Elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu 41
2.2.5 Utvrđivanje razine ekspresije galektina-1 i -3 na razini mRNA 43
2.2.5.1 Izolacija RNA 43
2.2.5.2 Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimerazom 43
2.2.5.3 Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*eng.* quantitative real-time PCR) 43
2.2.6 Ispitivanje koncentracije galektina-3 izlučenog u hranidbeni medij 45
2.2.7 Imunoprecipitacija 46

2.2.8 Statističke metode....46
3 Rezultati....47
3.1 Diferencijacija i aktivacija makrofaga....48
3.1.1 Vijabilnost i ekspresija površinskog biljega CD14 u monocita....48
3.1.2 Ekspresija membranskih biljega CD163 i CD206 u aktiviranih makrofaga....50
3.1.3 Citokinski profil hranidbenih medija aktiviranih makrofaga....52
3.1.4 Vijabilnost aktiviranih makrofaga....53
3.2 Ekspresija galektina-1 i -3 u monocita i aktiviranih makrofaga....55
3.2.1 Proteinska i genska ekspresija galektina-1 i -3 u monocita i aktiviranih makrofaga....55
3.2.2 Membranska ekspresija galektina-1 i -3 u monocita i aktiviranih makrofaga....59
3.2.3 Izlučivanje galektina-3 monocita i aktiviranih makrofaga....61
3.3 Ekspresija galektina-1 i -3 u diferenciranih makrofaga....62
3.3.1 Proteinska i genska ekspresija galektina-1 i -3 u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga....63
3.3.2 Membranska ekspresija galektina-1 i -3 u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga....67
3.3.3 Izlučivanje galektina-3 u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga....70
3.4 Egzogeno dodani rh-galektin-3....72
3.4.1 Ispitivanje biološke aktivnosti rh-galektina-3....73
3.4.2 Utjecaj egzogeno dodanog rh-galektina-3 na aktivirane makrofage....74
3.5 Utjecaj egzogeno dodanog rh-galektina-3 na limfocite....78
3.5.1 Izolacija i vijabilnost izoliranih limfocita....78
3.5.2 Indukcija apoptoze limfocita galektinom-3....79
3.5.3 Izlučivanje citokina limfocita tretiranih rh-galektinom-3....80
4 Rasprava....82
5 Zaključci....92

6 Popis literature 95

7 Popis kratica i simbola 108

8 Prilog 112

9 Životopis 114

1 Uvod

Život stanica ovisi o njihovim „komunikacijskim vještinama“. Ključna zadaća svake stanice je pravovremeno uočiti i odgovoriti na promjene uvjeta vlastitog mikrookoliša. Osnovno stanično osjetilo je njena membrana na kojoj se odvija veći dio međustanične komunikacije. Vezanjem liganada na membranske receptore, informacija se iz okoliša prenosi u samu stanicu aktivacijom signalnih putova. Značajan dio ove signalizacije pod kontrolom je saharidnih struktura. Naime, membrane mnogih stanica, odnosno njihovi receptori obilato su prekriveni ugljikohidratima koji se enzimski pripajaju kontroliranim procesom – glikozilacijom. Ovo je najsloženija i najučestalija posttranslacijska modifikacija proteina koja ponekad može imati jednostavnu strukturalnu ulogu, no često se njome mijenjaju svojstva i funkcije glikoproteina, a time i njihova uloga u fiziološkim i patofiziološkim procesima. Pojedine vrste stanica eksprimiraju različite setove gena odgovornih za glikozilaciju pa neki protein, podrijetlom iz različitih stanica, može nositi različite glikane i imati specifičnu ulogu, ovisno o stanici iz koje potječe. Stoga nastaju strukturalno iznimno raznolike i promjenjive strukture koje predstavljaju idealan medij za pohranu bioloških informacija. Molekule koje "tumače", te kodirane informacije su fiziološki receptori glikana - lektini.

Prvi lektini su otkriveni u biljkama krajem 19. stoljeća, no danas znamo da su posvuda prisutni u prirodi - nalazimo ih i u prokariotima, mikroorganizmima, gljivama i životinjama pa čak i virusima. Prepoznavanje ugljikohidratnog koda, temelji se na specifičnim ne-enzimskim interakcijama ugljikohidrata i lektinske domene koja prepoznaje ugljikohidrate, CRD (*eng.* carbohydrate recognition domain). Premda su vezna mjesta CRD niskog afiniteta, ona su brojna i visoko specifična. Razvojem molekularne biologije, rasvijetljena je struktura i evolucijska konzerviranost sljedova mnogih lektina, te je time stvoren, temelj za njihovu klasifikaciju. Lektini kralježnjaka, temeljem aminokiselinskog slijeda CRD, podijeljeni su u 13 funkcionalno različitih skupina (Tablica 1.1).

Funkcije su im brojne i raznovrsne, no uzevši općenito, unutarstanični lektini igraju ulogu u razvrstavanju i usmjeravanju glikoproteina i enzima u staničnim sekretornim putovima, dok se izvanstanični lektini mogu izlučiti u međustanični prostor, ili pak vezanjem na staničnoj membrani sudjelovati u procesima kao što su adhezija stanica, uklanjanje glikoproteina iz međustaničnog prostora, ili prepoznavanje patogena unutar imunosnog sustava.

Tablica 1.1 Porodice lektina kralježnjaka. *ER – endoplazmatski retikul, ERGIC (eng. ER-Golgi intermediate compartment) – ER-Golgijev međuodjeljak, GA – Golgijev aparat. Preuzeto i prilagođeno iz [1].*

PORODICA	LOKALIZACIJA	FUNKCIJA
kalneksini	ER	razvrstavanje proteina ER
tip M	ER	razgradnja proteina povezana s ER
tip L	ER, ERGIC, GA	razvrstavanje proteina ER
tip P	sekretorni put	razvrstavanje proteina iz GA, prometovanje glikoproteina, razgradnja proteina povezana s ER, usmjeravanje enzima
tip C	stanična membrana, izvanstanično	adhezija, uklanjanje glikoproteina, urođena imunost
galektini	izvanstanično, citoplazma, stanična membrana, jezgra	adhezija, urođena i adaptivna imunost, umrežavanje glikana izvanstaničnog matriksa
tip I	stanična membrana	adhezija
tip R	GA, stanična membrana	usmjeravanje enzima, regulacija glikoproteinskih hormona
F-box	citoplazma	razgradnja pogrješno oblikovanih glikoproteina
fikolini	stanična membrana, izvanstanično	urođena imunost
chitinase-like	izvanstanično	metabolizam kolagena
tip F	izvanstanično	urođena imunost
intelektini	stanična membrana, izvanstanično	urođena imunost, oplodnja, embriogeneza

1.1 Galektini

Galektini su lektini koje karakterizira specifično prepoznavanje β-galaktozidnih struktura glikokonjugata, te veliki broj očuvanih aminokiselina unutar CRD [2]. Čini se da ne postoje jedinstveni receptori galektina, već oni naprotiv vežu niz glikoproteina i glikolipida različitih oligosaharidnih struktura [3]. Danas je u sisavaca poznato 15 različitih galektina, a mnogi su izolirani i iz drugih kralježnjaka, viših i nižih beskralježnjaka, biljaka, gljiva, te virusa [4]. Svi galektini sadrže barem jednu CRD izgrađenu od oko 130 aminokiselina, od kojih su mnoge

visokoočuvane, što dodatno upućuje na evolucijsku važnost ovih proteina. Prema strukturnim obilježjima podijeljeni su u tri skupine: proto, kimera i tandem-tip [5] (Tablica 1.2).

Tablica 1.2 Struktura galektina. *Proto-tip ima jednu domenu za prepoznavanje ugljikohidrata, CRD (eng. carbohydrate recognition domain), kimera-tip ima CRD povezanu s domenom bogatom prolinom i glicinom, a tandem-tip galektina ima dvije različite, ali homologne CRD.*

TIP	STRUKTURA	GALEKTIN
proto		-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15
kimera		-3
tandem		-4, -6, -8, -9, -12

Galektini su pronađeni u brojnim vrstama stanica i tkiva, te su im pripisivane mnoge različite, katkad i oprječne funkcije pa stoga njihova točna uloga dosad nije razjašnjena. Poznato je da sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa i apoptoze, angiogeneze, imunosnog odgovora, u moduliranju adhezije i migracije stanica, te u transformaciji i metastaziranju tumorskih stanica [6]. Nađeni su u različitim staničnim odjeljcima: citoplazmi, jezgri, površini stanice i u izvanstaničnom prostoru. Mehanizam izlučivanja galektina nije do kraja razjašnjen jer ne sadrže aminokiselinske sljedove karakteristične za upućivanje proteina izvan stanice. Najšire rasprostranjeni i najbolje proučeni članovi ove porodice su galektini-1 i -3.

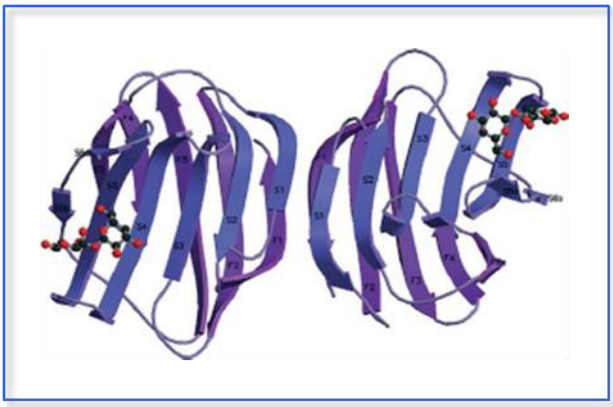
1.1.1 Galektin-1

1.1.1.1 Struktura i regulacija ekspresije galektina-1

Galektin-1 prvi je protein otkriven u porodici galektina. Monomer je molekulske mase 14 kDa, a sastoji se od 135 aminokiselina organiziranih u dvije anti-paralelne β-nabrane ploče, što je karakteristična struktura CRD svih galektina. Pri većim koncentracijama, u otopini galektin-1 može dimerizirati spajanjem podjedinica ne-kovalentnim vezama pri čemu raste afinitet vezanja za ligand [7, 8] (Slika 1.1). Poznat je oksidirani oblik galektina-1 koji ima narušenu lektinsku aktivnost [9].

Gen za galektin-1 - *LGALS1* smješten je na kromosomu 22q12, te kodira transkript od četiri eksona ukupne duljine 0,6 kb. U miša, promotorska regija *LGALS1* gena proteže se uzduž mjesta početka transkripcije (položaji -63 do +45). Osim metilacijskog statusa promotora, čini se da u regulaciji ekspresije galektina-1 sudjeluje transkripcijski faktor Sp1, a unutar promotorske regije pronađeni su i *cis* elementi, konsenzus početni element (*eng.*

consensus initiator element), TATA regija (*eng.* TATA box), te dodatno mjesto početka transkripcije [10].



Slika 1.1 Struktura galektina-1. *Prikazan je dimer galektina-1 s laktozama u veznim domenama. Preuzeto i prilagođeno iz [7].*

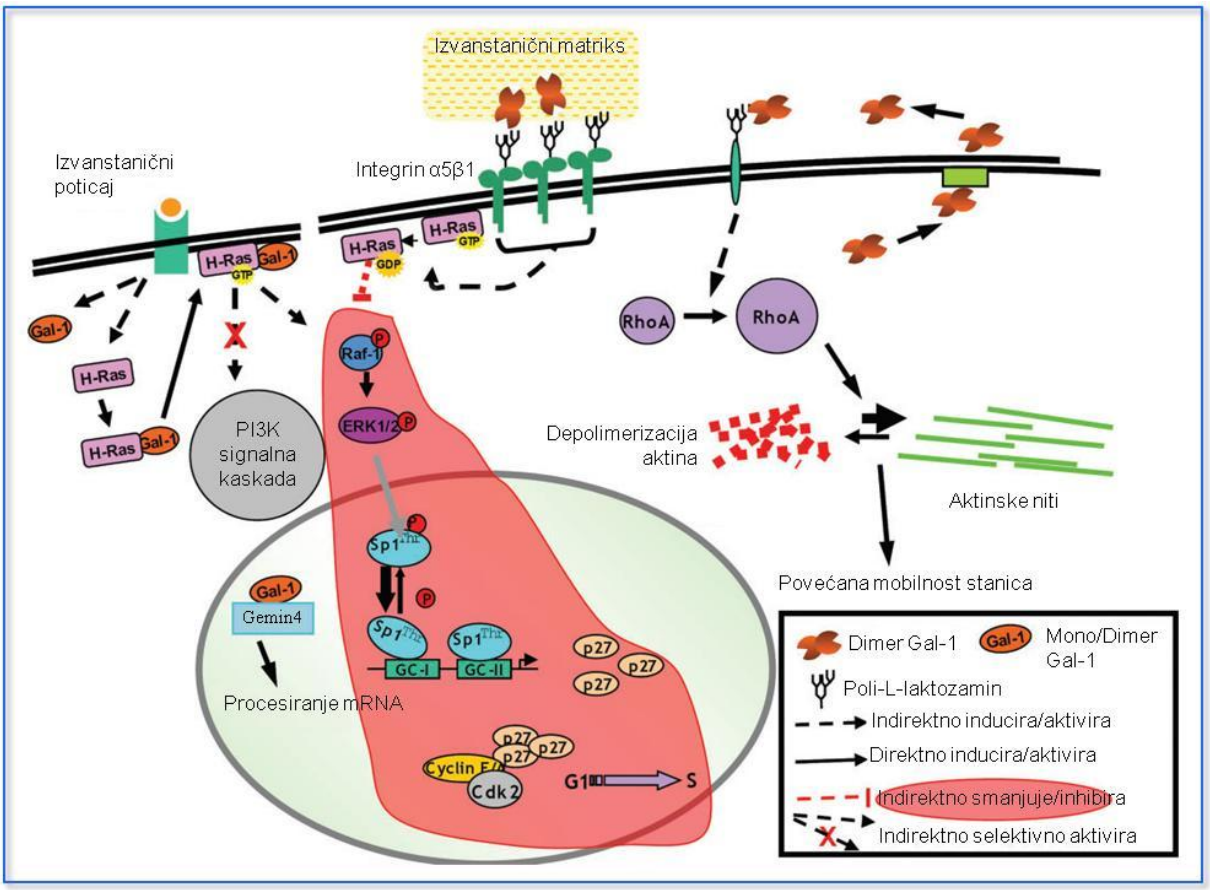
1.1.1.2 Ligandi galektina-1

CRD galektina-1 veže glikokonjugate koji sadrže N-acetil laktozamin (Gal-β1-3/4 GlcNAc, odnosno LacNAcII), no afinitet prema pojedinačnim disaharidima relativno je nizak u odnosu na afinitet vezanja razgranatih, ponavljajućih LacNAcII lanaca [11]. Aviditet dimera galektina-1 također raste ukoliko su glikani imobilizirani na površini stanične membrane ili izvanstaničnom matriksu [12].

U izvanstaničnom prostoru predložene su interakcije galektina-1 s brojnim ligandima. Tako su, primjerice, pokazane interakcije galektina-1 s proteinima izvanstaničnog matriksa, membranskim glikoproteinima uključenim u adheziju stanica, receptorima stanica imunosnog sustava, te ugljikohidratnim dijelovima gangliozida GM1 na stanicama neuroblastoma [13]. Treba, ipak, napomenuti da su potrebne studije afiniteta vezanja, kako bi se utvrdilo koji su ligandi relevantni, a za koje se galektin-1 veže manjim afinitetom koji nema biološkog učinka. Premda je izvorno opisana njegova lektinska aktivnost u izvanstaničnom prostoru, iz objavljenih je podataka jasno da galektin-1 unutar stanice stupa i u protein-protein interakcije. Interakcijom s Gemin4 jezgrenim proteinom, galektin-1 sudjeluje u procesiranju mRNA [14], a značajna je i njegova povezanost s porodicom proteina Ras [15]. Trenutno poznati proteini na koje se galektin-1 veže ne-lektinskim interakcijama nisu strukturalno povezani, odnosno nemaju homologne domene ili motive.

1.1.1.3 Stanična raspodjela i uloge galektina-1

Galektin-1 ima tipična svojstva citoplazmatskog proteina (acetilirani N-kraj, manjak glikozilacije [16]), te je lokaliziran u jezgri i citosolu stanica i s unutarnje strane membrane. Premda nema signalnog slijeda za upućivanje u endoplazmatski retikul, prisutnost galektina-1 na izvanstaničnoj strani membrane i u izvanstaničnom matriksu je dobro dokumentirana [13].



Slika 1.2 Uloge galektina-1. *Izvanstanične uloge galektina-1 povezane su lektinskim vezanjem dimera, dok su za unutarstanične interakcije karakteristične ne-lektinske interakcije. Inhibicija rasta stanica posredovana je interakcijom s α5β1 integrinom. Anti-proliferativni učinci povezani su s inhibicijom Ras-MEK-ERK-signalnog puta, posljedičnom aktivacijom transkripcijskog faktora Spa i indukcijom proteina p27. Nakupljanjem proteina p27 inhibira se ciklin ovisna kinaza 2, Cdk2 (eng. cyclin-dependent kinase 2) što zaustavlja stanični ciklus u G1 fazi rasta. Vezanjem galektina-1 na membranu potiče se ekspresija proteina RhoA (eng. Ras homolog A), depolimerizacija aktina, te povećava mobilnost stanica. Posredstvom H-Ras-gvanozin trifosfata, H-Ras-GTP (eng. H-Ras-guanosine triphosphate) galektin-1 je lokaliziran uz citoplazmatsku stranu stanične membrane, te može potaknuti ERK-signalni put neovisno o signalnoj kaskadi fosfatidil-inozitol 3 kinaze, PI3K (eng. phosphatidylinositol 3 kinase). Jezgreni galektin-1 vezanjem s Gemin4 proteinom sudjeluje u procesiranju mRNA. ERK (eng. extracellular signal-regulated kinase) – kinaza regulirana izvanstaničnim signalom, Gal-1 – galektin-1. Preuzeto i prilagođeno iz [13].*

S obzirom na to da se može pronaći u gotovo svim staničnim odjeljcima, ne iznenađuju brojne i raznolike funkcije ovog proteina. Galektin-1 može imati pozitivan ili negativan učinak na diobu stanica, što izrazito ovisi o tipu i aktivacijskom statusu stanice, ali i staničnom smještaju, koncentraciji, te ravnoteži između monomerne i dimerne forme. Brojne studije upućuju na to da je ekspresija ili pojačana ekspresija galektina-1 u tumoru ili tkivu oko tumora znak maligne transformacije. Ovakve tumorske stanice često ostaju nezamijećene od imunosnog sustava, lakše se rasprostiru tijelom i nastanjuju zdrava tkiva (metastaziraju) [13]. Tako je, primjerice, galektin-1 mitogen za jetrene zvjezdaste stanice, HSC (*eng.* hepatic stellate cells) [17], dok istovremeno inhibira rast stromalnih stanica koštane srži [18], a na rast tumorske stanične linije kolona nema učinka [19]. Izvanstanični galektin-1 modulira adheziju stanica umrežavajući glikoproteine (integrine) stanične membrane s drugim stanicama ili izvanstaničnim matriksom [20]. Nadalje, kod glioma stanica galektin-1 uzrokuje reorganizaciju aktinskog citoskeleta [21], a njegova je ekspresija povezana i s povišemon invazivnošću stanica raka dojke [22]. Konačno, unutarstanični galektin-1 ligand je proteina Ras koji je povezan s malignom transformacijom humanih tumora, a pojačana ekspresija galektina-1 povezana je s Ras-induciranom aktivacijom signalnog puta MEK-ERK [15] (Slika 1.2).

Uloge galektina-1 u modulaciji imunosnog odgovora opisane su u poglavlju 1.4.

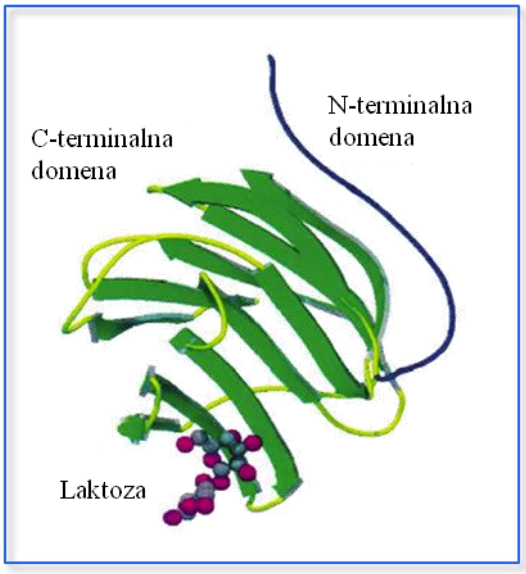
1.1.2 Galektin-3

1.1.2.1 Struktura galektina-3

Galektin-3 je monomer koji, ovisno o vrsti iz koje potječe, ima relativnu molekulsku masu od 26 do 30 kDa. Sastoji se od dvije strukturalno i funkcionalno različite domene: N-terminalne domene od ~120 i C-terminalne domene od ~130 aminokiselina (Slika 1.3).

N-terminalna domena evolucijski je očuvana, te se posttranslacijski modificira fosforilacijom i acetiliranjem. Sastoji se od dvije strukturalno i funkcionalno različite regije. Sam N-kraj galektina-3 (izoliranog iz ekstrakata RL-29 i MDCK stanica) je acetiliran, što je karakteristična post-translacijska modifikacija proteina citosola [23]. Kratki N-terminalni slijed može se fosforilirati na položajima Ser^{6} i Ser^{12}, te tako regulirati unutarstanični smještaj ovog proteina: fosfo-galektin-3 (pI 8,2) je lokaliziran i u jezgri i u citoplazmi, dok je nefosforilirani oblik (pI 8,7) pronađen isključivo u staničnoj jezgri [24]. Osim za lokalizaciju, čini se da je fosforilacija Ser^{6} bitna i za biološke učinke galektina-3 jer izrazito smanjuje njegov afinitet vezanja na glikoproteinske ligande [25], a također je i uvjet protu-apoptoznom

djelovanju galektina-3 [26]. Veći dio N-domene sastavljen od ponavljajućih aminokiselinskih motiva bogatih glicinom i prolinom: -Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly-X-X-X- (gdje X predstavlja bilo koju aminokiselinu). Premda izravno ne veže glikanske strukture, N-domena je nužna za punu lektinsku aktivnost, jer posreduje izvanstaničnu dimerizaciju i oligomerizaciju koje omogućuju multivalentne interakcije izvanstaničnog galektina-3 (opisane u poglavlju 1.1.2.3). [27]. Kidanje N-domene regulirano je fosforilacijom serinskih i tirozinskih aminokiselinskih ostataka kojom se stvaraju, odnosno uklanjaju vezna mjesta za proteolitičke enzime. Tako se N-domena fosforilira na položajima Tyr^{79}, Tyr^{107} i Tyr^{118}, no fosforilacija na položaju Tyr^{107} ključna je za regulaciju kidanja galektina-3 pomoću antigena specifičnog za prostatu, PSA (*eng.* prostate specific antigen) [28]. Izvanstanične funkcije galektina-3 dijelom su regulirane i proteolitičkim kidanjem N-terminalne domene pomoću metaloproteinaza matriksa-2 i -9, MMP-2 i -9 (*eng.* matrix metalloproteinase-2, -9) [29], čime se narušava stvaranje pentamera i smanjuje aviditet vezanja galektina-3 za ligande. N-domena također sudjeluje u izlučivanju galektina-3, s obzirom da delecija prvih 11 aminokiselina koje prethode ponavljajućoj regiji dokida njegovu sekreciju [30].



Slika 1.3 Struktura galektina-3. *Domena za prepoznavanje ugljikohidrata prikazana u kompleksu s ligandom laktozom, sastoji se od 12 β-lanaca (prikazani zelenom bojom) organiziranih u dvije β-nabrane ploče. Hipotetska konformacija fleksibilne N-terminalne domene prikazana je plavom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz [31].*

CRD je odgovorna za lektinsko djelovanje galektina-3, a izgrađena je od 12 β-lanaca organiziranih u dvije β-nabrane ploče. Obuhvaća ~130 aminokiselina C-terminalnog dijela galektina-3 koje su djelomično (<30%) homologne dijelu protu-apoptoznog faktora Bcl-2.

Upravo je evolucijski konzerviran slijed aminokiselina Asn-Trp-Gly-Arg odgovoran za protu-apoptozno djelovanje oba spomenuta proteina [32]. Izolirana C-terminalna domena ima veći afinitet za vezanje završnih produkata glikozilacije, AGE (*eng.* advanced glycation end-products) u odnosu na nativni protein pa se čini da N-domena sterički ometa vezanje liganda nativnog galektina-3 [33]. U odsutnosti ugljikohidratnih liganada galektin-3 može oligomerizirati neovisno o N-domeni i to na način inhibiran laktozom, što upućuje da u ovakvoj multimerizaciji sudjeluje i vezno mjesto CRD [34].

1.1.2.2 Regulacija ekspresije galektina-3

Galektin-3 kodiran je genom *LGALS3*, smještenom na kromosomu 14, lokusu q21-q22 [35]. Gen je veličine od ~17 kb, a organiziran je u šest eksona i pet introna. Postoje dva mjesta inicijacije transkripcije gena *LGALS3*, no zanimljivo je da se unutar drugog introna nalazi interni promotor koji potiče sintezu alternativnog transkripta nazvanog gen unutar galektina-3, galig (*eng.* galectin-3 internal gene) s jedinstvenim okvirom čitanja [36]. Produkt gena galig, protein mitogaligin u izravnom kontaktu s mitohondrijima uzrokuje otpuštanje citokroma c, te potiče apoptozu [37] pa je u tom smislu antagonist djelovanju unutarstaničnog galektina-3.

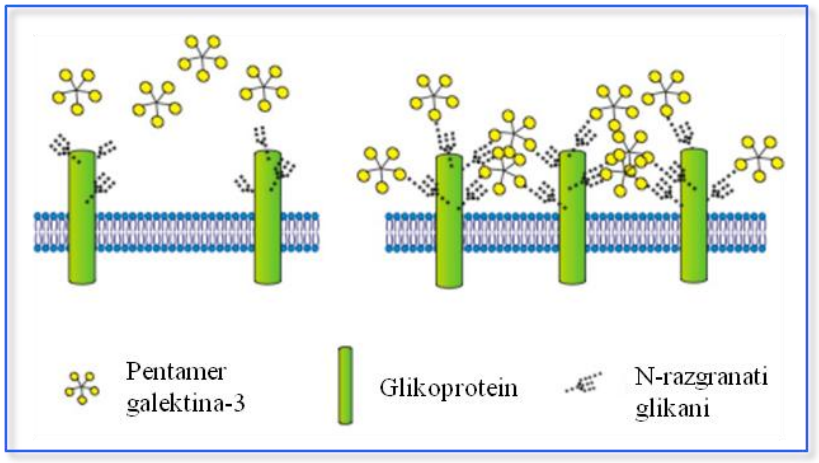
Ekspresija galektina-3 ovisi o vrsti i fiziološkom stanju stanice i mijenja se na transkripcijskoj i translacijskoj razini pod utjecajem različitih stimulansa. Proliferacija i transformacija fibroblasta [38], kao i diferencijacija monocita u makrofage i dendritičke stanice povezane su s pojačanom ekspresijom galektina-3 [39, 40]. Ovisno o vrsti stimulansa, aktivacija monocitno-makrofagnih stanica različito utječe na ekspresiju ovog proteina. Tako, primjerice, tretman forbolnim esterima, lipoproteinima niske gustoće, 1,25-dihidroksivitaminom D3, faktorom stimulacije rasta granulocitno-makrofagnih kolonija, GM-CSF (*eng.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) i fagocitoza mijelina povisuju razinu ekspresije [41-44], dok tretman monocita lipopolisaharidom i interferonom-γ (IFN-γ) [39], te ne-steroidnim i kortikosteroidnim protuupalnim lijekovima snižava razinu ekspresije galektina-3 [45]. Mirujući limfociti ne eksprimiraju galektin-3, no aktivacija limfocita T protutijelima protiv CD3, konkanavalinom A, kao i tretman interleukinom (IL)-2, IL-4 i IL-7 [46], te infekcija virusima [47] podižu razinu ekspresije ovog proteina. Aktivacija limfocita B s IL-4 i protutijelom protiv CD40, kao i infekcija parazitskim bičašem *Trypanosoma cruzi* također uzrokuju podizanje razine ekspresije galektina-3 [48].

Brojni transkripcijski faktori dovedeni su u vezu s galektinom-3, no mehanizam regulacije ekspresije gena *LGALS3* još nije razjašnjen. Genski fragment koji obuhvaća slijed od –836 do +141 nukleotida (relativno od mjesta početka transkripcije +1a) ima snažnu promotorsku

aktivnost. U ovoj je regiji smješteno više "GC box" motiva za vezanje posvuda prisutnog transkripcijskog faktora Sp1, što je osobina promotora konstitutivno eksprimiranih (*eng.* housekeeping) gena. No, kako ekspresija gena *LGALS3* raste prilikom stimulacije mirujućih fibroblasta serumom, ovaj se gen smatra genom ranog odgovora (*eng.* immediate early gene) [38]. Osim Sp1, u promotorskoj regiji identificirani su i sljedovi za vezanje transkripcijskih faktora AP-1, jezgrenog faktora-κB, NF-κB (*eng.* nuclear factor-κB) i proteina koji se veže na element odgovora na cAMP, CREB (*eng.* cAMP-response element binding factor) [49], a dokazana je i aktivacija promotora pomoću transkripcijskog faktora povezanog s Runt genima, Runx2 (*eng.* Runt-related transcription factor) [50], metilacijom CpG otočića [51], te proteinom X hepatitis B virusa [52]. Aktivacija CREB/ATF i NF-κB/Rel signalnih putova potrebna je za ekspresiju gena *LGALS3* potaknutu Tax proteinom u limfocita T zaraženih humanim T-limfotropnim virusom tipa I [47]. Inhibicijom NF-κB pomoću proteina nukling dokida se ekspresija galektina-3 [53]. U regulaciju je uključen i transkripcijski faktor AP-1, odnosno njegova Jun podjedinica [41, 54]. Konačno, Zeng i sur. su pokazali da hipoksija može potaknuti ekspresiju galektina-3 kod HeLa stanica i mišjih fibroblasta [55].

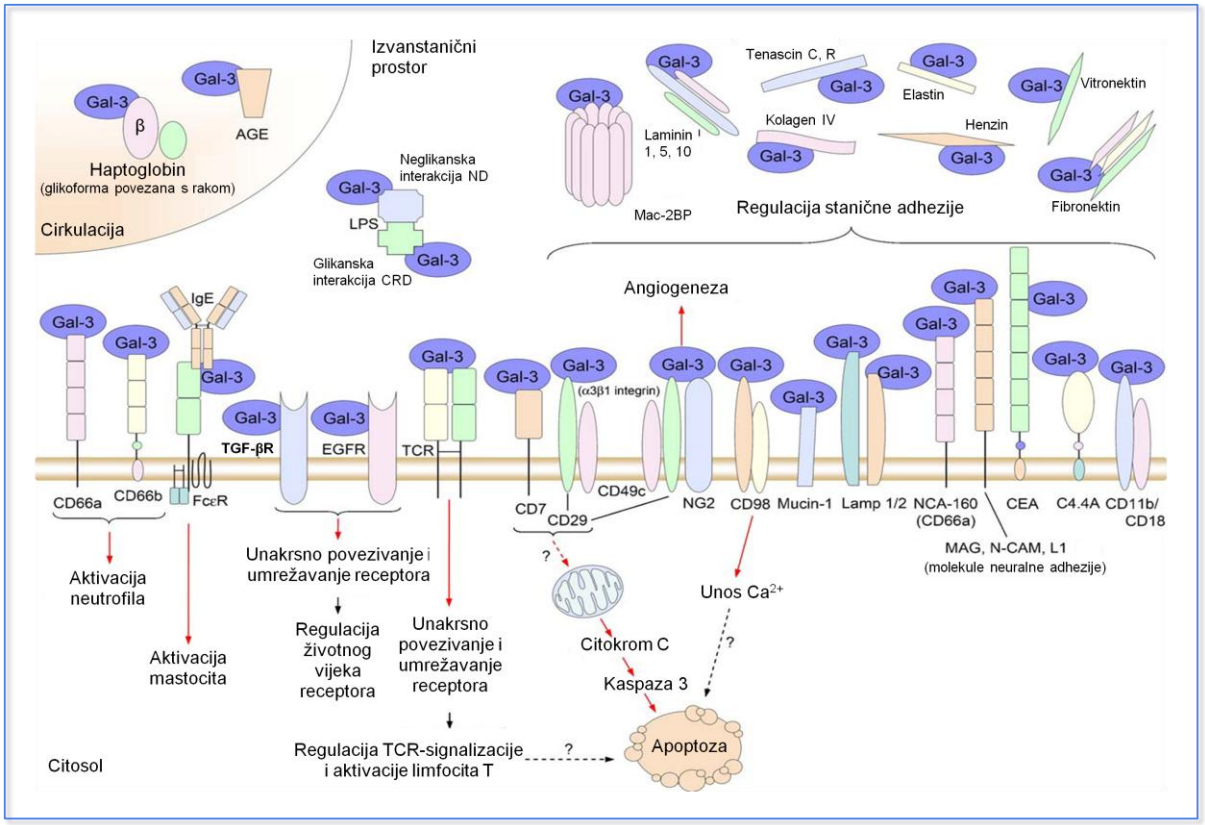
1.1.2.3 Ligandi galektina-3

Kao i ostali galektini, galektin-3 prepoznaje i veže galaktozu, no ispitivanjem afiniteta vezanja za različite oligosaharide i glikopeptide ustanovljeno je da je idealan ligand galektina-3 N-acetillaktozamin (LacNAc, Galβ1,4(3)GlcNAc) [56]. Oligomerizacijom galektina-3 stvara se multivalentni kompleks koji ima puno veći afinitet vezanja za ligand (Slika 1.4). Premda galektin-3 izlučen u izvanstanični prostor može spriječiti vezanje drugih galektina na



Slika 1.4 Pentameri galektina-3. *Pentameri galektina-3 posreduju stvaranje mikrodomena umreženih membranskih receptora. Preuzeto i prilagođeno iz [57].*

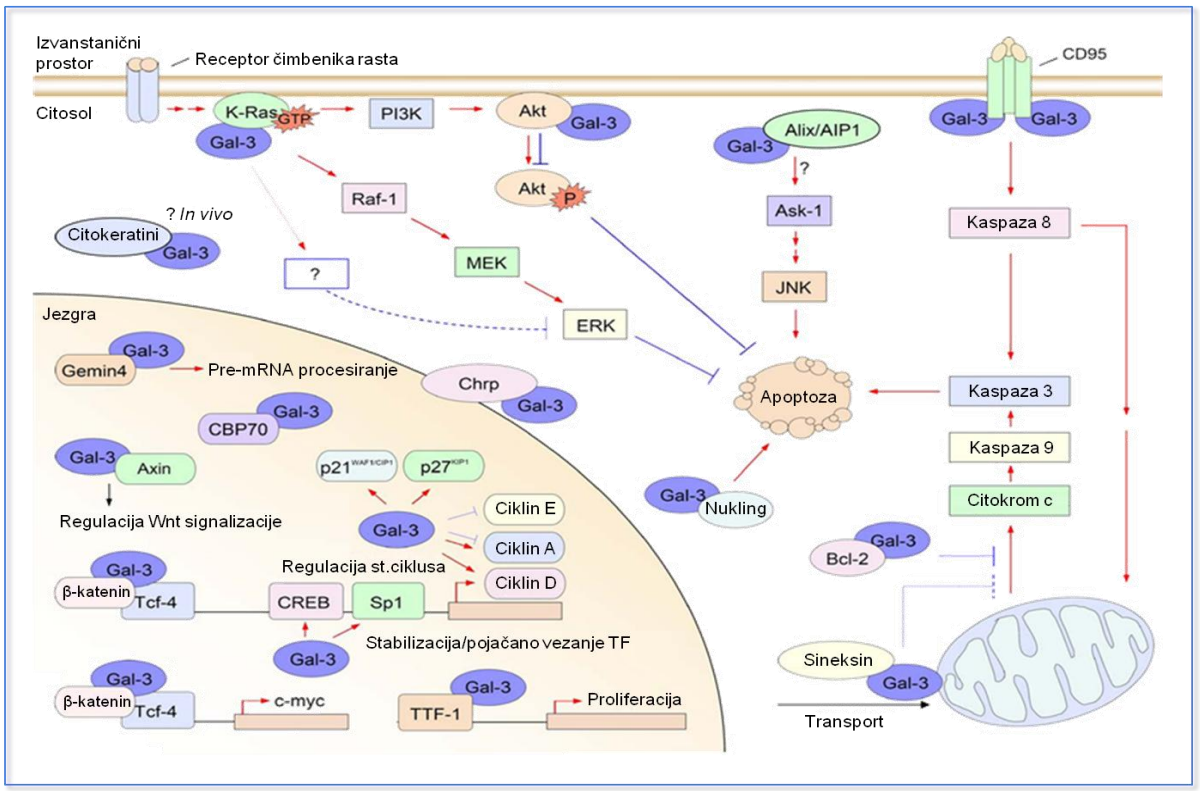
membranu, osnovna funkcija pentamera je regulacija aktivacije stanica umrežavanjem specifičnih glikoziliranih membranskih receptora.



Slika 1.5 Uloge galektina-3 izvan stanice. *Crvene strjelice označuju pozitivne učinke. AGE (eng. advanced glycation end products) – završni proizvodi glikozilacije, C4,4A – protein usidren glikozil fosfatidil-inozitolnim sidrom, CEA (eng. carcinoembryonic antigen) – karcinoembrijski antigen, CRD (eng. carbohydrate recognition domain) – domena koja prepoznaje ugljikohidrate, EGFR (eng. epidermal growth factor receptor) – receptor za epidermalni faktor rasta, FCεR – Fcε receptor, Gal-3 – galektin-3, IgE – imunoglobulin E, Lamp1/2 (eng. lysosome associated membrane protein) – protein membrane lizosoma 1/2, LPS – lipopolisaharid, Mac-2BP (eng. Mac2-binding protein) – protein koji veže Mac2, MAG (eng. myelin associated glycoprotein) – mijelinu pridružen glikoprotein, N-CAM (eng. neural cell adhesion molecule) – neuronska stanična adhezijska molekula, NCA-160 (eng. non-specific cross-reacting antigen 160) – nespecifični unakrsno reagirajući antigen 160, ND – N-terminalna domena, NG2 – transmembranski kondroitin sulfat proteoglikan NG2, TGF-βR (eng. transforming growth factor β receptor) – receptor transformirajućeg faktora rasta β, TCR (eng. T-cell receptor) – receptor limfocita T. Preuzeto i prilagođeno iz [58].*

Brojni strukturalno i funkcionalno različiti proteini identificirani su kao ligandi galektina-3. U izvanstaničnom prostoru prevladavaju lektinske interakcije s glikoziliranim strukturama membrane i međustaničnog prostora kojima galektina-3 sudjeluje u regulaciji aktivacije

stanica imunosnog sustava, apoptozi, angiogenezi i adheziji stanica (Slika 1.5). Bitno je napomenuti da funkcije galektina-3 ne ovise isključivo o oligomerizaciji i afinitetu/aviditetu vezanja, nego i o vremenskoj i prostornoj koordinaciji ekspresije njegovih liganada. U oblikovanju „glikanskog koda“ stanične membrane ključni su enzimi glikozil-transferaze koje stvaraju ili uklanjaju pogodne ligande galektina. Unutar stanice, galektin-3 većinom ostvaruje interakcije protein-protein sudjelujući u regulaciji apoptoze, staničnog ciklusa, pre-mRNA procesiranju, modulaciji signalnih putova i transkripcijskih faktora (Slika 1.6).



Slika 1.6 Funkcije galektina-3 unutar stanice. *Crvene strjelice označuju pozitivne, a plave negativne učinke. Akt – serinska/treoninska kinaza Atkt, Ask-1 (eng. apoptosis signal-regulating kinase 1) – kinaza koja upravlja apoptoznom signalizacijom 1, CBP70 (eng. carbohydrate binding protein 70) – protein koji veže ugljikohidrate 70, Chrp (eng. cysteine- and histidine-rich protein) – protein bogat cisteinom i histidinom, CREB (eng. cAMP-response-element-binding protein) – protein koji veže cAMP-response-element, ERK (eng. extracellular signal-regulated kinase) – kinaza regulirana izvanstaničnim signalom, Gal-3 – galektin-3, GTP (eng. guanosine triphosphate) – gvanozin trifosfat, JNK – c-Jun NH_2-terminalna kinaza, MEK – mitogenom aktivirana protein/ERK kinaza, P – fosfat, PI3K (eng. phosphatidylinositol 3-kinase) – fosfatidil-inozitol 3 kinaza, Raf-1 – serinska/treoninska kinaza Raf-1, Tcf-4 (eng. T-cell factor 4) – faktor limfocita T 4, TF (eng. transcription factor) – transkripcijski faktor, TTF-1 (eng. thyroid-specific transcription factor) – transkripcijski faktor specifičan za štitnjaču. Preuzeto i prilagođeno iz [58].*

1.1.2.4 Tkivna distribucija galektina-3

Tijekom prvog tromjesečja ljudske embriogeneze ekspresija galektina-3 utvrđena je uglavnom u epitelnim tkivima, ali i u stanicama miokarda, hondrocitima, stanicama jetre i notokorda [59]. Uz epitelna tkiva [58], kod odraslih ljudi galektin-3 je pronađen i u stanicama uključenim u imuni odgovor, kao što su neutrofili [60], eozinofili [61], bazofili i mastociti [62], dendritičke stanice [63], Langerhansove stanice [64], monociti [39] i makrofagi iz različitih tkiva [58]. U limfocitima se galektin-3 ne eksprimira, iako se ekspresija može potaknuti aktivacijom tih stanica. Značajna je njegova ekspresija u različitim vrstama tumorskih stanica, a galektin-3 koristi se i kao prognostički biljeg progresije određenih bolesti [65].

1.1.2.5 Stanična raspodjela i uloge galektina-3

Prisutnost galektina-3 utvrđena je u gotovo svim staničnim odjeljcima, ovisno o tipu i proliferacijskom statusu stanice, uvjetima uzgoja, neoplastičnom rastu i transformaciji stanica [58]. Njegove brojne funkcije tijesno su povezane s multimerizacijom i lokalizacijom, kao i post-translacijskim modifikacijama kao što su fosforilacija i proteolitičko kidanje galektina-3 [28]. Promjene njegove ekspresije, staničnog smještaja i sekrecije uočene su tijekom embrionalnog razvoja, karcinogeneze, metastaziranja tumora, imunosnih reakcija, odnosno u procesima koji se, temelje na međudjelovanju stanica, stanica i izvanstaničnog matriksa, te prijenosu signala.

Posljednjih su godina u citoplazmi identificirani brojni ligandi galektina-3 vrlo širokog „spektra djelatnosti“ (Slika 1.4). Unutarstanični galektin-3, djelovanjem na proteinske kinaze K-Ras [66] i Akt [67], modulira signalne putove i sudjeluje u regulaciji fine ravnoteže između proliferacije, diferencijacije, preživljenja i smrti stanice. Poznati regulatori apoptoze Bcl-2 [32], CD95 (APO-1/Fas) [68], nukling [53], Aix/AIP1 [69] ligandi su galektina-3. Vezanjem na sineksin, galektin-3 se transportira na perinuklearnu membranu mitohondrija gdje inhibira otpuštanje citokroma c i indukciju apoptoze [70]. Galektin-3 se može pronaći i u post-Golgi vezikulama koje sadrže glikoproteine (sintetizirane unutar Golgijevog aparata) koji se usmjeravaju na apikalnu stranu polariziranih endotelnih stanica. Ukoliko se inhibira djelovanje galektina-3, spomenuti glikoproteini se pogrješno razmještaju na bazolateralnoj membrani umjesto na apikalnoj pa je stoga predložena uloga galektina-3 kao unutarstaničnog regulatora prometovanja pojedinim glikoproteinima [71].

Galektin-3 je nazočan u staničnoj jezgri, a predloženi su pasivni i aktivni mehanizam njegova unosa iz citoplazme [72]. Sudjelujući u regulaciji transkripcije, jezgreni galektin-3

stabilizira i potiče vezanje transkripcijskih faktora CREB, Sp1 [73] i transkripcijskog faktora specifičnog za štitnjaču, TTF-1 (*eng.* thyroid-specific transcription factor-1) [74]. Nadalje, galektin-3 povezan je i s signalnim putom Wnt uključenim u diferencijaciju i embriogenezu [75], te se povezuje i s ribonukleoproteinskim kompleksima [76], te sudjeluje u sazrijevanju pre-mRNA [77] (Slika 1.4).

Mehanizam izlučivanja galektina-3 nije rasvijetljen. Naime, ovaj protein ne sadrži ni transmembransku domenu niti signalne sljedove za upućivanje u endoplazmatski retikul, a primjenom inhibitora pokazano je da se ne izlučuje klasičnim sekretornim putem [78]. Postoje naznake da se galektin-3 izlučuje iz stanica putem sekretornih vezikula [79] koje se tada mogu lizirati u izvanstaničnom prostoru ili se fuzionirati s obližnjim stanicama, te u njih ispustiti svoj sadržaj. U međustaničnom prostoru galektin-3 može oligomerizirati posredovanjem N-domene, te vezanjem na glikoproteine i glikozilirane strukture izvanstaničnog matriksa modulirati adheziju, aktivaciju i kemoatrakciju stanica imunosnog sustava (Slika 1.3). Alternativno, izlučeni galektin-3 može se ponovo unijeti u stanicu endocitozom, na način ovisan o laktozi [80].

S obzirom na to da je galektin-3 uključen u regulaciju normalne stanične proliferacije, njegova pojačana ekspresija može rezultirati malignom transformacijom stanica. Enzim β1,6 N-acetilglukozaminiltransferaza V (Mgat5) omogućava stvaranje oligosaharidnih struktura na receptorima koje inače vežu galektin-3, a novija istraživanja pokazuju da pojačana ekspresija Mgat5 i umrežavanje membranskih receptora pomoću galektina-3, potiču aktivaciju signalnih putova uključenih u diobu i migraciju stanica [81, 82]. Izvan stanice galektin-3 dodatno pogoduje kancerogenezi jer potiče apoptozu aktiviranih limfocita T i tako pridonosi smanjenoj infiltraciji ovih stanica u tumore [83]. Poznato je i da povišena ekspresija jezgrenog galektina-3 pridonosi proliferaciji stanica [74], a unutarstanični galektin-3, koji ima protu-apoptoznu ulogu, može biti ključan čimbenik preživljenja tumorskih stanica. Tome u prilog ide činjenica da utišavanje *LGALS3* gena potiče apoptozu staničnih linija karcinoma štitnjače [84] i ljudskih stanica kolorektalnog tumora [85]. Uloga galektina-3 u tumorigenezi kod čovjeka najbolje je istražena kod tumora štitnjače kod kojeg je povišena razina ekspresije galektina-3 dosad najtočniji jedinstveni dijagnostički biljeg bolesti [57].

Uloge galektina-3 u modulaciji imunosnog odgovora opisane su u poglavlju 1.4.

1.3 Imunost

Imunosni sustav jest splet bioloških struktura i procesa kojima se organizam štiti od stranih tvari, toksina, mikroorganizama i tumorskih stanica. Imunost se ostvaruje dvama različitim, ali čvrsto isprepletenim sustavima obrane: specifičnom (stečenom) i nespecifičnom (urođenom) imunosti.

Urođena imunost prva je crta obrane organizma koja započinje s kožom i sluznicama sniženih pH vrijednosti koje od patogena štite vanjske ulaze u tijelo. Ukoliko strana tvar ipak dospije u organizam, u pravilu dolazi do aktivacije nespecifičnih efektorskih stanica koje cirkulirajući patroliraju krvlju i limfotokom. U nositelje urođene imunosti ubrajamo stanice prirodne ubojice, NK (*eng.* natural killer), mastocite, eozinofile i bazofile, te stanice sa sposobnošću fagocitoze – monocite, makrofage, neutrofile i dendritičke stanice. Većina prijetnji organizmu vrlo se učinkovito rješava aktivacijom ovog sustava, koji predstavlja evolucijski stariju strategiju obrane što ju pronalazimo u svim koljenima životinja, pa čak i u biljkama. Međutim, aktivacija urođenog sustava ima kao nuspojavu razvoj upale, koja nastaje uglavnom zbog oštećivanja okolnog zdravog tkiva.

U slučaju da se stanice urođenog sustava ne mogu nositi s određenom prijetnjom, njihova je zadaća aktivacija i limfocita T i B, nosioca stečene imunosti. Pretpostavlja se, da se specifična imunost razvila u kralježnjaka kao specijalizirana pomoć u borbi protiv virusa. Stanice ovog sustava prepoznaju i pamte patogene pa pružaju prilagođen i snažan imunosni odgovor. Sve vrste imunosnih stanica, a i eritrociti i trombociti, potječu od hematopoetskih matičnih stanica koštane srži. Te pluripotentne stanice rastu u specifičnom mikrookolišu na mreži stromalnih stanica gdje su izložene djelovanju različitih faktora rasta (primjerice, faktoru stimulacije kolonija), te se diferenciraju u efektorske stanice imunosng sustava.

1.3.1 Monociti

Sustav mononuklearnih fagocita sastoji se od monocita koji cirkuliraju krvlju i makrofaga koji se pretežito nalaze u tkivima. U koštanoj srži progenitori monocita i makrofaga diferenciraju se pod utjecajem citokina – malih topljivih proteina koji potiču međustaničnu komunikaciju, te mogu potaknuti rast i diferencijaciju stanica. Nastali pro-monociti izlaze u krvotok gdje sazrijevaju u zrele monocite. Ove stanice kratkog su životnog vijeka: nakon jednog do četiri dana provedena u krvotoku, većina umire apoptozom, a manji dio potaknut čimbenicima diferencijacije sazrijeva i prolazi u tkiva [86]. Naime, uslijed upale ili lokalne

infekcije patogenima, dolazi do oslobađanja kemotaktičnih citokina (kemokina) i različitih peptidnih i nepeptidnih čimbenika upale, što stimulira ekstravazaciju monocita u tkiva i diferencijaciju u tkivne makrofage ili dendritičke stanice. Donedavno se smatralo da su monociti samo tranzicijske stanice čija je osnovna zadaća repopulacija tkivnih makrofaga, no nedavna su istraživanja pokazala da je to heterogena skupina stanica koja može modulirati upalni proces. Zadaća je ovih stanica da u sebe unose bakterijske ili druge stanice, uklanjaju otpadne produkte metabolizma i otpuštaju medijatore upale koji ubijaju bakterije, viruse i parazite, te pridonose aktivaciji drugih stanica imunosng sustava.

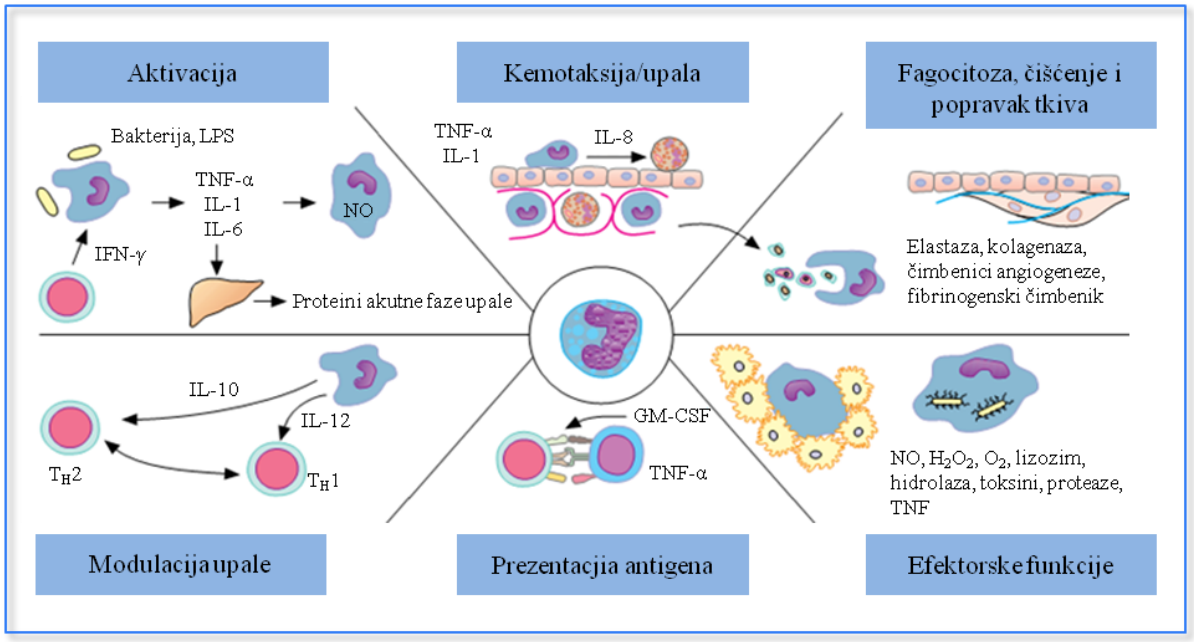
Kod čovjeka postoje dva osnovna tipa monocita, podijeljena, temeljem ekspresije površinskih biljega CD14 (dio membranskog receptora za bakterijski lipopolisaharid) i CD16 (poznat kao Fcγ receptor III). Stanice fenotipa $CD14^{++}CD16^{-}$ zovemo i "klasični" ili CD14 monociti (eksprimiraju mnogo CD14, a na površini nemaju eksprimiran CD16), velike su stanice promjera oko 18 μm, zastupljene s 80% - 90% u ukupnoj populaciji monocita. $CD14^{+}CD16^{++}$ stanice su "ne-klasični" ili CD16 monociti (eksprimiraju malo CD14, a mnogo CD16 receptora) koji su manji, promjera oko 14 μm, te čine 10% ukupnih monocita. Osim dvije osnovne, postoji i prijelazni oblik monocita koji ima fenotip $CD14^{++}CD16^{+}$ [87]. Ukoliko se tijekom infekcije CD16 monociti aktiviraju pomoću *Toll-like* receptora, TLR (*eng.* Toll-like receptors) proizvode se velike količine pro-upalnih citokina, primjerice, faktora nekroze tumora (TNF)-α (*eng.* tumor necrosis factor-α) i IL-1β, te se oni smatraju pro-upalnim monocitima [88]. Moguće je da ovisno o skupini monocita i trenutku izlaska iz krvi u tkiva, iz njih nastaju različite vrste tkivnih makrofaga [89], no regulatorni putovi koji upravljaju polarizacijom makrofaga nisu razjašnjeni.

1.3.2 Makrofagi

Prolaskom monocita kroz stjenku krvne žile, te njihovim sazrijevanjem u tkivne makrofage ili dendritičke stanice nastaju brojne promjene: stanica se povećava pet do deset puta (promjer stanica je od 15 do 40 μm), povećava se broj i složenost organela i unutarstaničnih struktura, raste sposobnost fagocitoze, a stanica proizvodi i znatno više hidrolitičkih enzima i citokina kojima može autokrino i parakrino modulirati aktivaciju imunosnog sustava. Detaljne analize promjena transkriptoma tijekom postupne diferencijacije monocita u makrofage, pokazale su da se mijenja razina ekspresije ukupno 2136 gena [90]. Nastali makrofagi se rasprostranjuju po čitavom tijelu i to tako da dio tzv. „lutajućih makrofaga" ostaje slobodan i putuje tkivima, dok se dio stanica trajno „nastani" u određenom tkivu. Pod utjecajem citokina, a ovisno o

smještaju u pojedinim organima i tkivima, makrofagi se mogu pretvoriti u osteoklaste, Kupfferove stanice, mikroglija, peritonealne makrofage, Langerhansove stanice, alveolarne, te druge vrste makrofaga [91]. Očigledno je da se radi o vrlo heterogenoj skupini u kojoj svaki tip stanica ima jedinstvene morfološke i funkcionalne osobine.

Makrofagi imaju ključne uloge u imunosnom odgovoru: sudjeluju u inicijaciji i rezoluciji upalnog odgovora, a pojedine vrste makrofaga također sudjeluju u popravku oštećenih tkiva. Svoju ulogu ostvaruju različitim mehanizmima (Slika 1.7): izravno, fagocitiranjem bakterija, parazita, virusa i tumorskih stanica, neizravno otpuštanjem medijatora upale (primjerice IL-1 i TNF-α) koji aktiviraju druge stanice imunosnog sustava, ili pak procesiranjem stranih antigena i prezentacijom stranih peptida koji posreduju aktivaciju limfocita T.

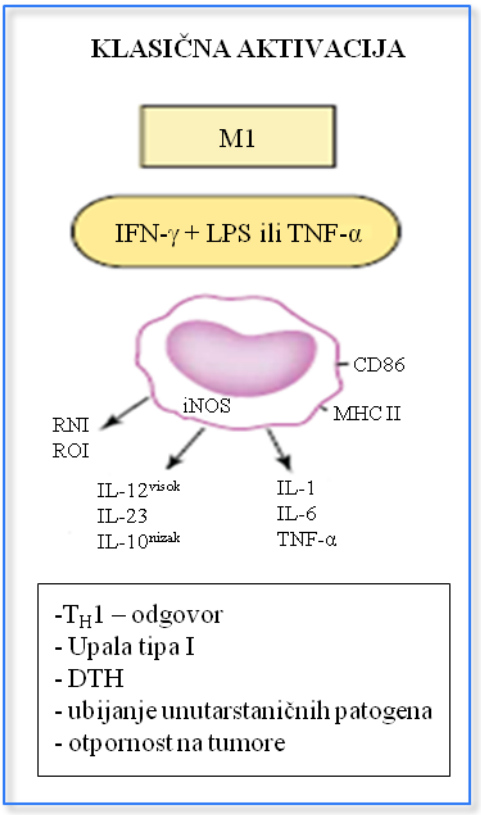


Slika 1.7 Funkcije makrofaga. *GM-CSF (eng. granulocyte macrophage-colony stimulating factor) – faktor stimulacije rasta granulocitnih i makrofagnih kolonija, IFN-γ – interferon-γ, IL-1, -6, -8, -10, -12 – interleukin-1, -6, -8, -10, -12, LPS – lipopolisaharid, TNF-α (eng. tumor necrosis factor-α) – faktor nekroze tumora-α. Preuzeto i prilagođeno iz [92].*

1.3.2.1 Aktivacija makrofaga

Premda se u normalnim uvjetima nalaze u mirujućem stanju, i tkivni i lutajući makrofagi mogu se aktivirati endogenim ili egzogenim podražajima, pri čemu nastaju morfološki i funkcionalno različite stanice. Polarizirani makrofagi su svrstani u skupine ovisno o ekspresiji membranskih receptora, produkciji citokina i kemokina, te specifičnim efektorskim funkcijama. Klasično aktivirani makrofagi razvijaju se u T_H1 citokinskom okruženju (primjerice djelovanjem IFN-γ) i/ili uz dodatak mikrobnih produkata kao što je LPS koji

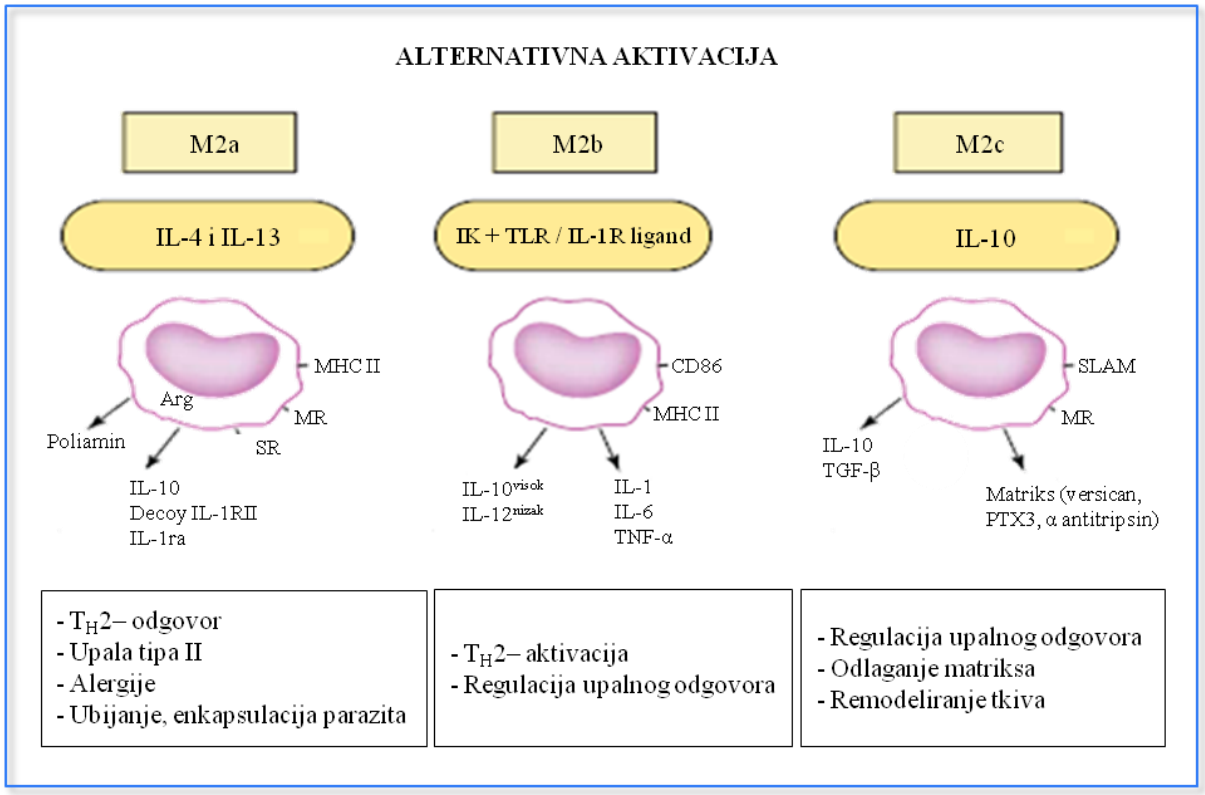
aktivira TLR [92]. Ovakvom aktivacijom nastaju potentne stanice s velikom sposobnošću prezentacije antigena, proizvode upalne citokine IL-12 i IL-23 [93] i posljedično aktiviraju imunosni odgovor tipa I koji podrazumijeva proizvodnju velikih količina dušikovog oksida i reaktivnih kisikovih intermedijera. Klasično aktivirani makrofagi, najčešće se nazivaju makrofagima tipa M1 (Slika 1.8 i 1.10). Uz to, humani monociti diferencirani *in vitro* pomoću GM-CSF pokazuju osobine tipa I, te se i oni označuju kao M1 [93].



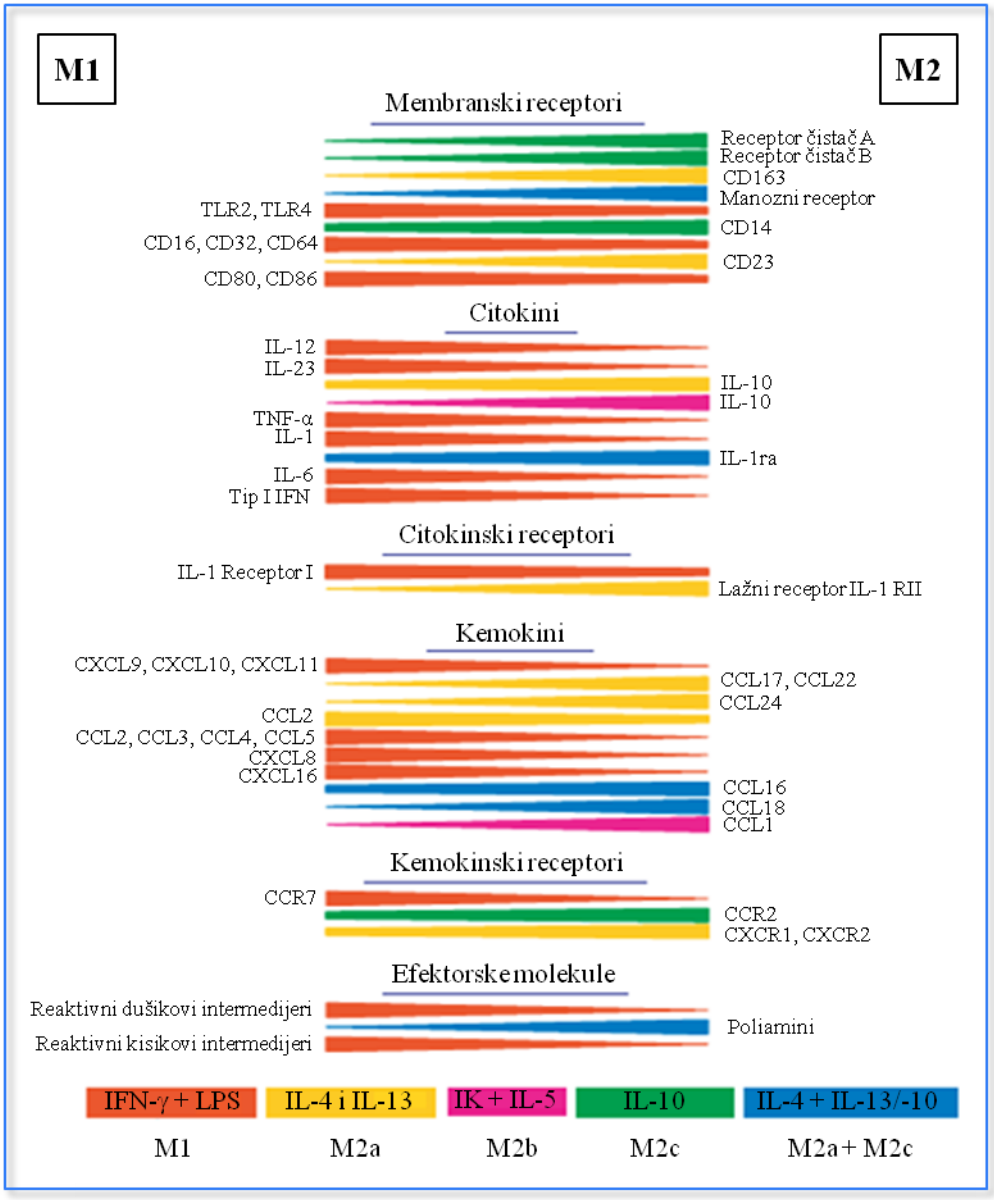
Slika 1.8 Indukcija i funkcionalne karakteristike klasično aktiviranih makrofaga. *Pod utjecajem pro-upalnog signala iz okoliša dolazi do funkcionalne polarizacije makrofaga. DTH (eng. delayed – type hipersensitivity) – odgođeni tip hipersenzitivnosti, IFN-γ – interferon-γ, IL-1, -6, -10, -12, -23 – interleukin-1, -6, -10, -12, -23, iNOS (eng. inducible nitric oxide synthase) – inducibilna sintaza dušikovog oksida, LPS – lipopolisaharid, MHC II (eng. major histocompatibility complex II) - kompleks gena tkivne podudarnosti II, RNI (eng. reactive nitrogen intermediates) – reaktivni dušikovi intermedijeri, ROI (eng. reactive oxygen intermediates) – reaktivni kisikovi intermedijeri, TNF-α (eng. tumor necrosis factor-α) – faktor nekroze tumora-α. Preuzeto i prilagođeno iz [94].*

Svojevremeno se smatralo da T_H2 citokini IL-4 i IL-13 inhibiraju aktivaciju makrofaga, međutim, danas je poznato da oni induciraju drugačiji aktivacijski put, poznat kao ″alternativna aktivacija″ [95, 96]. Nastali M2, alternativno aktivirani makrofagi djeluju u kasnoj fazi razrješenja upale, oslabljuju imunosni odgovor i stečeni odgovor T_H1, raščišćavaju

stanični debris pomoću receptora-čistača (*eng.* scavenger receptors), te sudjeluju u popravku tkiva kontrolirajući zacjeljenje rana. Jedna od bitnih karakteristika alternativne aktivacije je ekspresija membranskih receptora CD163 i CD206 [97]. Naime, receptor čistač CD163 ima protu-upalno djelovanje, jer je odgovoran za uklanjanje kompleksa nastalih raspadanjem eritrocita [98], a lektinski receptor CD206 prepoznaje manozu na površini patogena, te modulira lučenje citokina [99]. Uz spomenute receptore, za alternativnu aktivaciju bitna je i indukcija arginaze 1, koja usmjerava metabolizam arginina s proizvodnje dušikovog oksida prema sintezi ornitina i poliamina, koji su nužni za popravak tkiva [100]. Kod ove heterogene skupine stanica pojedini stimulans potiče jedinstvenu, ali i preklapajuću gensku ekspresiju pa se javila potreba za preciznijom nomenklaturom alternativno aktiviranih makrofaga. Predložena je podjela na M2a, M2b i M2c makrofage (Slika 1.9 i 1.10).



Slika 1.9 Indukcija i funkcionalne karakteristike alternativno aktiviranih makrofaga. *IK – imuni kompleksi, IL-1, -4, -6, -10, -12, -13 - interleukin-1, -4, -6, -10, -12, -13, IL-1r (eng. IL-1 receptor) – receptor za IL-1, IL-1ra (eng. IL-1 receptor antagonist) – antagonist receptora za IL-1, MHC II (eng. major histocompatibility complex II) - kompleks gena tkivne podudarnosti II, MR – manozni receptor, PTX3 – dugi pentraksin PTX3, SLAM (eng. signaling lymphocytic activation molecule) – signalne molekule aktivacije limfocita, SR (eng. scavenger receptor) – receptori čistači, TGF-β (eng. transforming growth factor-β) – transformirajući faktor rast- β, TLR – eng. Toll-like receptors, TNF-α (eng. tumor necrosis factor-α) – faktor nekroze tumora-α. Preuzeto i prilagođeno iz [94].*



Slika 1.10 Razlike u genskoj ekspresiji makrofaga tipa M1, M2a, M2b i M2c. *CCL1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 22, 24 (eng. chemokine (C-C motif) ligand) – kemokin (C-C motiv) ligand 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 22, 24, CXCL8, 9, 10, 11, 16 (eng. chemokine (C-X-C motif) ligand) – kemokin (C-X-C motiv) ligand 8, 9, 10, 11, 16, CCR2, 7 – CCL2, 7 receptor, CXCR1, 2 – CXCL1, 2 receptor, IFN – interferon, IL-1, -4, -5, -6, -10, -12, -13, -23 – Interleukin-1, -4, -5, -6, -10, -12, -13, -23, IL-1ra (eng. IL-1 receptor antagonist) – antagonist receptora za IL-1, LPS – lipopolisaharid, TLR (eng. Toll-like receptors) – Toll-like receptori, TNF-α (eng. tumor necrosis factor-α) – faktor nekroze tumora-α. Preuzeto i prilagođeno iz [94].*

M2a stanicama se smatraju makrofagi aktivirani pomoću IL-4 i IL-13, M2b (nazivaju se i makrofagi tipa II) aktivirani imunosnim kompleksom i ligandom TLR ili ligandima receptora za IL-1, te M2c makrofagi aktivirani pomoću IL-10 i/ili glukokortikoidnim hormonima. M2c

stanice zovu se i deaktiviranim makrofagima jer imaju smanjenu ekspresiju gena koji kodiraju za receptore klase II glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, MHC (*eng.* major histocompatibility complex), spriječena im je prezentacija antigena i suprimiraju upalu [96]. Uz to, humani monociti diferencirani *in vitro* pomoću faktora stimulacije rasta makrofagnih kolonija, M-CSF (*eng*. macrophage colony-stimulating factor) pokazuju osobine makrofaga tipa II, te se također označuju kao M2 [93].

Podjela makrofaga u opisane podtipove eksperimentalno je vrlo korisna, no treba imati na umu njena ograničenja, jer predstavlja krajnje točke pojedinog aktivacijskog stanja, te vrijedi uglavnom u *in vitro* uvjetima. Naime, *in vivo,* makrofagi su izrazito plastične stanice koje zadržavaju mogućnost promjene svojeg aktivacijskog stanja. Pojedinačna stanica tako može proći čitav proces od klasične aktivacije u početku upalnog procesa, do alternativne aktivacije i deaktivacije koje se odvijaju prilikom razrješenja upale [94].

1.3.3 Limfociti

Razlikujemo tri osnovna tipa limfocita: stanice NK, te limfocite T i B. Stanice NK čine oko 7% ukupnih limfocita i dio su urođenog imunosnog sustava. Posredstvom molekula MHC ove stanice prepoznaju i uklanjaju tumorske stanice i stanice inficirane patogenima. Glavne komponente stečene imunosti su limfociti T i B koji čine većinu, odnosno oko 70 i 23% ukupnih limfocita. Njihova je funkcija prepoznati strane antigene i tada omogućiti razvijanje specifičnog staničnog ili humoralnog (posredovanog protutijelima) imunosnog odgovora koji je maksimalno prilagođen patogenu, stanicama inficiranim patogenima ili tumorskim stanicama.

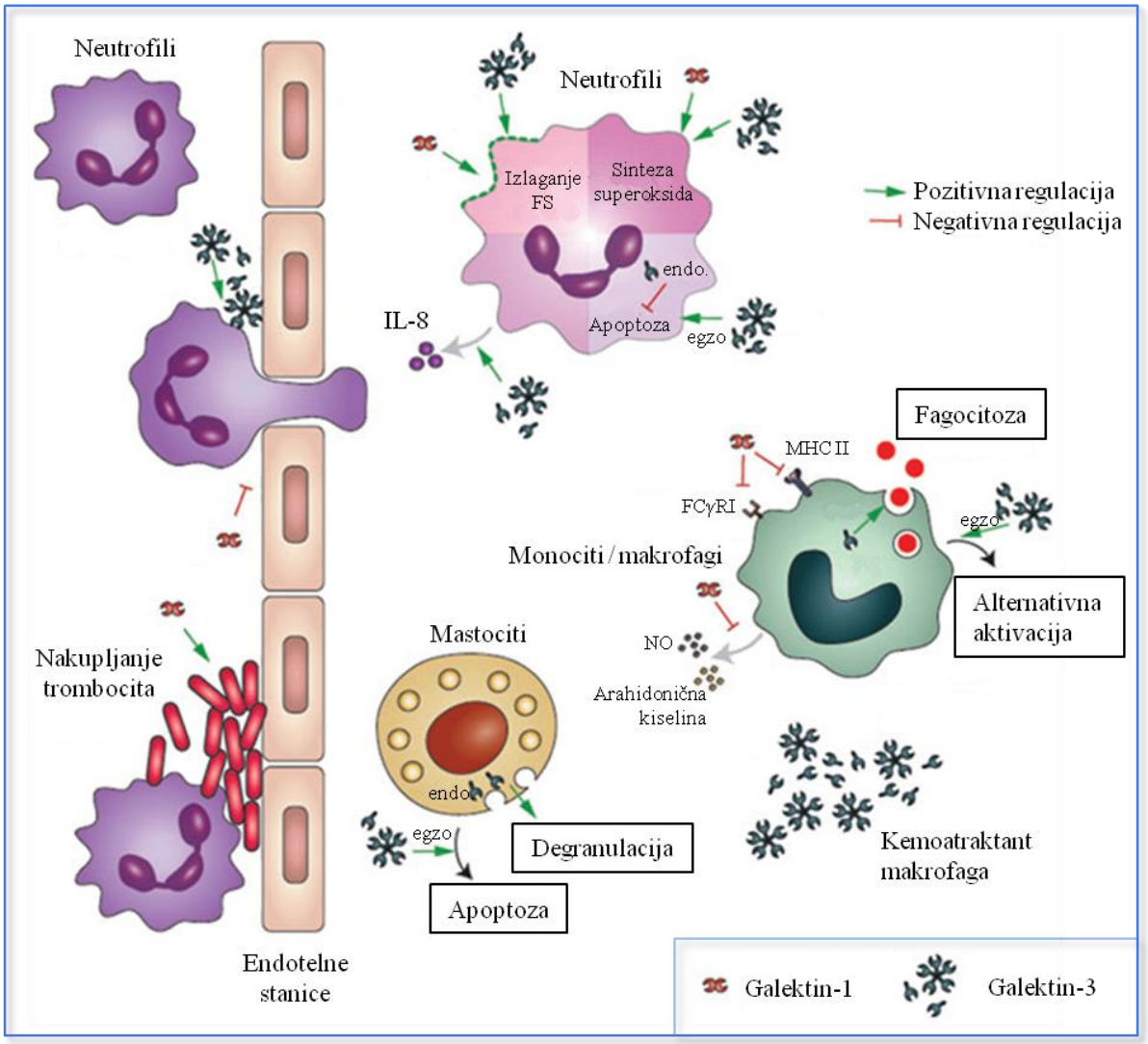
Ljudsko tijelo dnevno proizvodi milijune različitih limfocita B koji cirkuliraju krvlju i limfom, a nosioci su humoralne imunosti. Kod većine sisavaca, nezreli limfociti B nastaju u koštanoj srži odakle prelaze u slezenu, gdje neki od njih sazrijevaju u zrele limfocite B. Svaka pojedina stanica ima specifičan membranski receptor limfocita B, BCR (*eng.* B-cell receptor) kojim prepoznaje samo jedan određeni antigen. Ukoliko se antigen veže na BCR, ove se stanice aktiviraju, proliferiraju i započinju lučiti topive receptore – protutijela, kojima obilježavaju bakterije ili viruse. Po završetku upale limfocit B može sazrjeti u memorijski limfocit koji omogućuje brz i prilagođen imunosni odgovor u slučaju ponovljenog kontakta s istim patogenom. Uz to, ove stanice mogu djelovati i kao predočne stanice koje posredstvom molekula MHC prikazuju strane antigene, što je osnovni mehanizam aktivacije limfocita T.

Limfociti T nosioci su stanične imunosti, a razlikuju se od ostalih limfocita po snažnoj ekspresiji receptora limfocita T, TCR (*eng.* T-cell receptor). Njihovi progenitori iz koštane srži prelaze u timus, gdje se dijele i prelaze u nezrele limfocite T, a njihovim pak sazrijevanjem nastaje nekoliko funkcionalno različitih podvrsta stanica. Pomagački limfociti T, koji na membrani eksprimiraju ko-receptor TCR-a CD4, a izlučivanjem citokina sudjeluju u brojnim imunosnim procesima. Tako, ovisno o podvrsti stanica i profilu citokina koji izlučuju, mogu potaknuti sazrijevanje limfocita B, aktivaciju citotoksičnih limfocita T i makrofaga. Citotoksični limfociti T karakteristični su po membranskoj ekspresiji ko-receptora TCR CD8, a njihova je zadaća da posredstvom molekula MHC ubijaju stanice inficirane virusima, kao i tumorske stanice. U rjeđe limfocite T ubrajamo i memorijske (eksprimiraju CD4 ili CD8), koji u organizmu opstaju nakon razrješenja upale pa tako također sudjeluju u učinkovitijoj obrani u slučaju ponovljene infekcije istim patogenom. Regulatorni limfociti T su ključne stanice zadužene za održavanje imunosne tolerancije. Njihova glavna zadaća je suprimirati neželjenu aktivaciju limfocita T po završetku upale, a također mogu inaktivirati auto-reaktivne limfocite. Aktivirani limfociti T prirodne ubojice, NKT (*engl.* natural killer T-cell) proizvode citokine, ali uz to istovremeno izlučuju citotoksične/citolitičke molekule, odnosno funkcionalno se preklapaju s pomagačkim i citotoksičnim limfocitima T. Limfociti T γδ relativno su rijetke stanice koje na membrani eksprimiraju γδ TCR jedinstvene strukture. Mehanizam aktivacije ovih stanica nije u potpunosti razjašnjen, no poznato je da za aktivaciju (za razliku od ostalih limfocita T) nije potrebna prezentacija antigena posredstvom molekula MHC [101].

1.4 Galektin-1 i galektin-3 u imunosnom sustavu

Istraživanje funkcija galektina raširilo se u mnoga znanstvena područja, no najveći napredak postignut je na otkrivanju njihove uloge u stanicama imunosnog sustava: brojna su istraživanja potvrdila da su galektini bitni igrači urođene i adaptivne imunosti, koji su eksprimirani u primarnim i sekundarnim limfoidnim organima, kao i u cirkulirajućim imunosnim stanicama. Uključeni su u početak, pojačavanje i rezoluciju upalnog odgovora, te igraju ključnu ulogu u održavanju centralne i periferne tolerancije. Općenito se može reći kako galektin-1 ima protu-, a galektin-3 pro-upalno djelovanje, no njihove uloge nije moguće uvijek precizno razlučiti, jer izrazito ovise o tipu i aktivacijskom statusu stanica. Sažeti

pregled ponekad oprečnih, a ponekad istovjetnih funkcija galektina-1 i -3 u imunosnom sustavu prikazan je na slici 1.11.



Slika 1.11 Galektini-1 i -3 u akutnoj upali i urođenoj imunosti. *Galektini-1 i -3 sudjeluju u biološkim procesima koji uključuju razne stanice urođene imunosti, a njihovo djelovanje može biti unutarstanično (endo) ili izvanstanično (egzo). Galektin-1 inhibira adheziju, usporavanje i ekstravazaciju neutrofila, dok oligomeri galektina-3 imaju oprečno djelovanje. Ovi lektini također uzrokuju ispoljavanje fosfatidil serina (FS) na membrani neutrofila bez indukcije apoptoze, moduliraju apoptozu, te reguliraju ispuštanje IL-8. U monocitno-makrofagnih stanica galektini mogu favorizirati alternativnu aktivaciju u odnosu na klasičnu, modulirati sintezu dušikovog oksida (NO) i arahidonične kiseline, te regulirajti Fcγ receptorom-posredovanu fagocitozu i prezentaciju antigena posredstvom MHC II (eng. major histocompatibility complex II - kompleks gena tkivne podudarnosti II) molekula. Galektin-3 također doprinosi kemotaksiji i fagocitozi monocita/makrofaga. Noviji podaci upućuju na ulogu galektina-3 u fiziologiji mastocita: endogeni galektin-3 uzrokuje degranulaciju, a egzogeni apoptozu ovih stanica. Zelene strjelice označuju pozitivne učinke, a crvene strjelice negativne učinke. Preuzeto i prilagođeno iz [102].*

Regulacija apoptoze i učinkovito uklanjanje apoptoznih stanica, ključni su događaji za razvoj, homeostazu i popravak tkiva. Galektin-1 eksprimiran na stromalnim stanicama timusa potiče apoptozu auto-reaktivnih limfocita T [103], a u periferiji potiče apoptozu aktiviranih [104], ali ne i mirujućih limfocita T [105], umanjujući mogućnost pretjeranog ili neprikladnog imunosnog odgovora. Galektin-1 pojačava apoptozu limfocita T potaknutu Fas/kaspaza-8 signalnim putom [106], a pokazano je da je indukcija apoptoze galektinom-1 posredovana vezanjem na TCR, pri čemu vjerojatno dolazi do umrežavanja receptora i aktivacije signalnih kaskada [107]. Osim indukcije apoptoze, galektin-1 inhibira diobu ovih stanica [105] i sprječava njihovu adheziju na izvanstanični matriks (odnosno onemogućuje transendotelnu migraciju) [102]. Bivalentni dimer galektina-1 lektinski se veže na CD2, CD3, CD7, CD43 i CD45 glikoproteinske receptore limfocita T [108] pa bi kontrolirana ekspresija N-acetil-laktozaminskih liganada, mogla upravljati staničnim odgovorom na vezanje galektina-1. Izvanstanični galektin-1 vezan na membranu limfocita T može imati i regulatornu ulogu jer smanjuje izlučivanje pro-upalnog citokina IL-2 [109], ali i potiče ekspresiju protu-upalnog IL-10, te tako usmjerava imunosni odgovor s T_H1 prema T_H2 fenotipu [110, 111]. *In vivo* modeli autoimunih bolesti, potvrdili su da galektin-1 smanjuje razinu ekspresije upalnih citokina IFN-γ, TNF-α i IL-2, te podiže razinu izlučivanja T_H2 citokina IL-5 [13]. Konačno, kod *Lgals1*$^{-/-}$ miševa zabilježen je pojačani T_H1 i T_H17 odgovor i pojačana autoimuna upala u odnosu na divlje stanice, što upućuje na ključnu ulogu endogenog galektina-1 u kontroli homeostaze limfocita T [112].

Osim adaptivnog, galektin-1 može ublažiti upalni odgovor urođenog imunosnog sustava. Primjerice, galektin-1 inhibira izlučivanje medijatora upale kao što je arahidonična kiselina makrofaga aktiviranih LPS [113], degranulaciju mastocita [114], migraciju eozinofila [115] kao i ekstravazaciju neutrofila [116]. Nadalje, ovaj lektin sprječava sintezu dušikovog oksida, te pojačava aktivnost arginaze štakorskih makrofaga, što upućuje na ulogu u stvaranju mikrookoliša koji pogoduje alternativnoj aktivaciji monocitno-makrofagnih stanica [117]. Sukladno tome, tretman humanih monocita i makrofaga galektinom-1 inhibira IFN-γ-induciranu, Fcγ receptor I-ovisnu fagocitozu, ekspresiju MHC molekula [118] i lučenje pro-upalnog IL-12 u makrofaga inficiranih parazitima [119]. Nedavno je predloženo da se umrežavanjem galektina-1 negativno regulira funkcija monocita i makrofaga kao predočnih stanica [102]. Pokazano je i da galektin-1 potiče ekspresiju fosfatidil-serina na vanjskoj strani stanične membrane, no novije studije upućuju da ekspresija ovog biljega na membrani neutrofila ne inducira nužno apoptozu, nego priprema stanice, odnosno signalizira fagocitozu stanica makrofagima [120]. S obzirom na njegovo široko protuupalno djelovanje, galektin-1

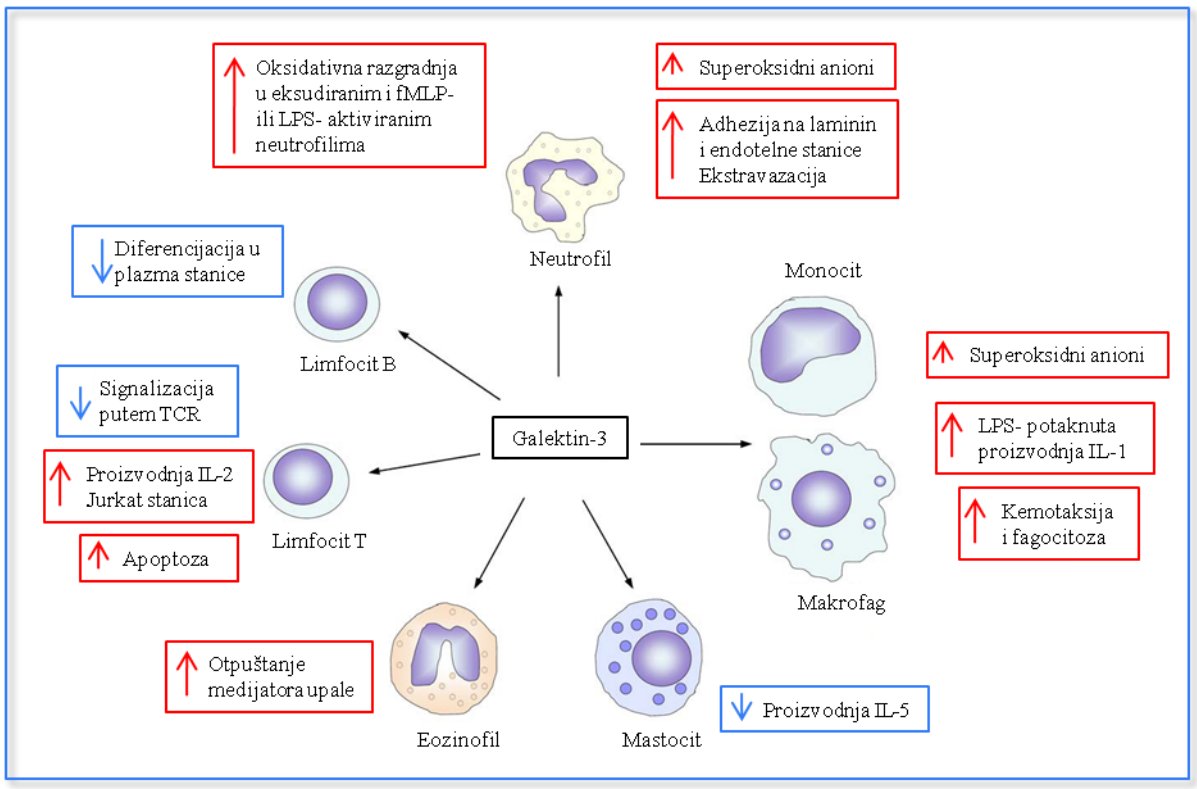
se razmatra kao potencijalni, terapijski imunosupresivni agens koji bi mogao pomoći uspostaviti homeostazu kod autoimunih i upalnih stanja [121].

Za galektine nisu neuobičajene naizgled oprječne uloge u imunosnom sustavu. Tako su uz pretežito imunosupresivne učinke zabilježeni i slučajevi pro-upalnog djelovanja galektina-1. On potiče oksidativni prasak neutrofila u tkivima (ali ne i neutrofila periferne krvi) [122], a ukoliko se doda egzogeno, smanjuje odgovor makrofaga na unutarstanične parazitske infekcije, na način da inhibira njihovo mikrobicidno djelovanje. Time se potiče replikacija parazita i inducira apoptoza stanica domaćina [119].

Galektin-3 također je bitan modulator imunosnog odgovora. Djelovanje mu ovisi o lokalizaciji i tipu stanice, no općenito gledajući galektin-3 spada u pro-inflamatorne signale (Slika 1.12). Neke stanice proizvode i izlučuju velike količine galektina-3 koji tada može djelovati autokrino ili parakrino. Primjerice, glija stanice potaknute IFN-γ, kao i monociti tretirani s GM-CSF proizvode i izlučuju velike količine galektina-3 koji pak potiče izlučivanje medijatora upale okolnih stanica [40, 123]. Galektin-3 inhibira proizvodnju IL-5 kod eozinofila i limfocita T [124] usmjeravajući imunosni odgovor prema T_H1 fenotipu. Galektin-3 vezan na TCR ograničava lateralnu mobilnost i grupiranje receptora na mjestima prezentacije antigena, te tako onemogućuje aktivaciju limfocita T [125]. Ukoliko se, pak, veže na aktivirane limfocite T, kao i galektin-1, galektin-3 inducira apoptozu na način neovisan o aktivaciji kaspaza [126]. Stowell i sur. su pokazali da membranska ekspresija fosfatidil-serina potaknuta galektinom-3 ne vodi nužno u apoptozu, nego priprema neutrofile, ali ne i aktivirane limfocite T, za fagocitozu makrofagima [120]. Unutarstanični galektin-3 održava membranski potencijal mitohondrija i odgađa otpuštanje citokroma c pa tako potiče preživljenje imunih stanica, što dodatno podržava upalno stanje [70].

U urođenom sustavu, galektin-3 potiče respiratorni prasak neutrofila [127] i monocita [39], ispuštanje medijatora upale mastocita [128], aktivaciju eozinofila [61], adheziju neutrofila na laminin [129], te potiče unos Ca^{2+} [39], djeluje kao kemoatraktant [130] i modulator fagocitoze [131] monocita i makrofaga. Ovaj lektin također uzrokuje izlučivanje IL-1 [132] i IL-8 [133] u monocitno-makrofagnih stanica i izlučivanje IL-8 u aktiviranih neutrofila [134], a povišena razina galektina-3 prati diferencijaciju monocitnih staničnih linija u makrofage [39] kao i diferencijaciju humanih monocita u dendritičke stanice [40]. Nedavno je predloženo da galektin-3 inducira fagocitozu potičući aktivaciju KRas-GTP-ovisne fosfatidil-inozitol 3 kinaze, PI3K (*eng.* phosphatidylinositol 3-kinase) [135]. Nedostatak galektina-3 ima najbolje proučene posljedice na stanice urođenog sustava. Pokazano je da je kod *Lgals3*$^{-/-}$

miševa narušena alternativna (IL-4/IL-13-inducirana) aktivacija makrofaga, no istovremeno manjak galektina-3 nije utjecao na klasičnu i IL-10-induciranu alternativnu aktivaciju ovih



Slika 1.12 Učinak galektina-3 na stanice imunosnog sustava. *Crvene strjelice predstavljaju pro-inflamatorne, a plave anti-inflamatorne učinke. IL-1, -2, -5 – interleukin-1, -2, -5, LPS – lipopolisaharid, TCR – receptor limfocita T. Preuzeto i prilagođeno iz [58].*

stanica [136]. U makrofaga spomenutih miševa zabilježena je pojačana indukcija upalnih citokina (IL-6, IL-12 i TNF-α) LPS u odnosu na divlji tip stanica. Ovaj učinak dokinut je dodavanjem rekombinantnog galektina-3, što upućuje da se galektin-3 veže na LPS i smanjuje njegovu pro-inflamatornu funkciju [137]. *In vivo* studije potvrdile su i ublaženi upalni odgovor *Lgals3*$^{-/-}$ miševa na peritonitis (uzrokovan tioglikolatom) u smislu smanjenog broja granulocita [138] i makrofaga [139] u usporedbi s divljim tipom životinja. Kod ljudi, povišena razina ekspresije galektina-3 dobro je dokumentirana u aktiviranim fibroblastima i makrofagima bolesnika sa zatajenjem srca [140]. Protutijela protiv galektina-1 i -3 pronađena su u serumu bolesnika oboljelih od autoimunih i upalnih bolesti, no njihove su uloge u patologiji uglavnom nepoznate [141]. Moguće je da ovi galektini sudjeluju u sprječavanju razvoja autoimunih bolesti na način da potiču apoptozu autoreaktivnih limfocita T. Pripadajuća serumska protutijela tada bi mogla pridonijeti autoimunosti na način da neutraliziraju djelovanje galektina [102].

1.5 Svrha i ciljevi rada

Galektin-1 i galektin-3, prvenstveno putem interakcija s membranskim glikoproteinima, sudjeluju u brojnim fiziološkim i patofiziološkim procesima stanica imunosnog sustava, no njihove su uloge u ovim procesima slabo poznate. Svrha ovoga rada jest pridonijeti razumijevanju biologije humanih limfocita, monocita, te različito diferenciranih i aktiviranih makrofaga, kao i rasvjetljavanju uloge galektina-1 i -3 u fiziologiji ovih stanica. Rezultati istraživanja pomoći će stvoriti, temelje za razvoj novih, terapeutskih pristupa u liječenju upalnih procesa.

Kako bi se ostvario zadani cilj provedeni su sljedeći postupci:

- iz uzoraka krvi zdravih dobrovoljnih davatelja izolirani su limfociti i monociti
- ispitana je vijabilnost i uspješnost izolacije limfocita i monocita, temeljem morfoloških karakteristika i ekspresije površinskog biljega CD14
- monociti su diferencirani izlaganjem odgovarajućim čimbenicima rasta i citokinima u klasično aktivirane (M1) i alternativno aktivirane (M2a/M2c) makrofage
- ispitana je vijabilnost i uspješnost diferencijacije te aktivacije pojedinog podtipa makrofaga, temeljem ekspresije membranskih antigena CD163 i CD206, te izlučivanjem citokina IL-6, -10, -12 i TNF-α
- utvrđena je ekspresija galektina-1 i -3 na genskoj i proteinskoj razini u monocita i različito diferenciranih i aktiviranih makrofaga
- ispitana je ekspresija galektina-1 i -3 vezanih na membrani monocita i različito diferenciranih i aktiviranih makrofaga
- ispitana je razina i broj formi galektina-3 izlučenog u hranidbeni medij monocita i različito diferenciranih, te aktiviranih makrofaga
- proizveden je i pročišćen rekombinantni humani galektin-3, te je potvrđena njegova biološka aktivnost
- ispitan je utjecaj egzogeno dodanog rekombinantnog humanog galektina-3 na fiziologiju limfocita i aktiviranih makrofaga

2 MATERIJAL I METODE

2.1 Materijal

U radu je korišten sljedeći materijal:

2.1.1 Standardne kemikalije

akrilamid/bisakrilamid mix, 30%, 37,5:1	*Sigma*
albumin goveđeg seruma, BSA (*eng.* bovine serum albumin)	*Sigma*
7-AAD, 7-aminoaktinomicin	*Invitrogen*
amfotericin B	*Invitrogen*
ampicilin	*Sigma*
APS, amonijev persulfat	*Sigma*
azid, Na	*Sigma*
bakrov(II)-sulfat pentahidrat, $CuSO_4$ x $5H_2O$	*Sigma*
bicinkoninična kiselina, BCA (*eng.* bicinchoninic acid)	*Sigma*
bromfenol plavo	*Sigma*
dNTP, deoksinukleotid-trifosfat	*Invitrogen*
DTT, ditiotreitol	*Invitrogen*
EDTA, etilen-diamin-tetraoctena kiselina	*Sigma*
fetalni, teleći serum, FBS (*eng.* foetal bovine serum)	*Invitrogen*
fosfatni pufer, PBS (*eng.* phosphate-buffered saline), pH 7,4	*Sigma*
GBX Developer/Replenisher	*Sigma*
GBX Fixer/Replenisher	*Sigma*
glicerol	*Sigma*
glicin	*Sigma*
kalcijev klorid dihidrat, $CaCl_2$ x $2H_2O$	*Sigma*
kloridna kiselina, HCl	*Sigma*
laktoza	*Sigma*
LPS, lipopolisaharid	*Sigma*
HEPES, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina	*Sigma*
izopropanol	*Sigma*
IPTG, izopropil-β-D-tiogalaktozid	*Fermentas*
LB medij, Luria-Bertani, tekući bogati medij	*Invitrogen*
β-merkaptoetanol	*Sigma*

metanol	*Kemika*
nasumične heksamerne početnice	*Invitrogen*
Natrij-dezoksikolat	*Sigma*
natrijev dodecilsulfat, SDS (*eng.* sodium dodecyl sulphate)	*Sigma*
natrijev hidroksid, NaOH	*Sigma*
natrijev klorid, NaCl	*Sigma*
obojeni proteinski standard molekulskih masa	*Sigma*
penicillin G	*Invitrogen*
propidij jodid, PI	*Sigma*
RPMI 1640 hranidbeni medij	*Invitrogen*
streptomicin-sulfat	*Invitrogen*
TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	*Applied Biosystems*
TEMED, N, N, N', N' -, tetrametil-etilen-diamin	*Sigma*
Tris, tris[hidroksimetil]aminometan – Trizma base	*Sigma*
Triton X-100	*Merck*
Tween-20	*Sigma*

2.1.2 Proteini i enzimi

- Accutase™ Enzyme Cell Detachment Medium (*eBioscience*)
- AmpliTaq Gold® DNA-polimeraza (Applied Biosystems)
- aneksin V obilježen fluorescentnom bojom Alexa Fluor488 (*Invitrogen*)
- inhibitori proteaza, Protease Inhibitor Cocktail Tablets (*Roche*)
- inhibitori ribonukleaza RNaseOUT™ (*Invitrogen*)
- M-MLV (Moloney-Murine Leukemia Virus) reverzna transkriptaza (*Invitrogen*)
- rh-M-CSF, rekombinantni humani M-CSF (*Invitrogen*)
- rh-GM-CSF, rekombinantni humani GM-CSF (*Invitrogen*)
- rh-IFN-γ , rekombinantni humani interferon-γ (*Invitrogen*)
- rh-IL-4, rekombinantni humani interleukin-4 (*R&D Systems*)
- rh-IL-10, rekombinantni humani interleukin-10 (*Invitrogen*)

2.1.3 Protutijela i serum

- kozje poliklonsko protutijelo protiv ljudskog galektina-1 (*R&D Systems*)
- kozje poliklonsko protutijelo protiv ljudskog histona H2B (*Santa Cruz Biotechnology*)

- kozje poliklonsko protutijelo protiv štakorskog IgG (imunoglobulina G) obilježeno peroksidazom iz hrena (*Calbiochem*)
- magareće poliklonsko protutijelo protiv kozjeg IgG obilježeno peroksidazom iz hrena (*Santa Cruz Biotechnology*)
- mišje monoklonsko protutijelo protiv ljudskog CD14 obilježeno fikoeritrinom (PE) (*BD*)
- mišje monoklonsko protutijelo protiv ljudskog CD163 obilježeno s PE (*BD*)
- mišje monoklonsko protutijelo protiv ljudskog CD206 obilježeno fluorescein izotiocijanatom (FITC) (*BD*)
- mišje poliklonsko protutijelo protiv štakorskog IgG obilježeno s PE (*BD*)
- štakorsko monoklonsko protutijelo M3/38 protiv mišjeg galektina-3 koje hibridoma stanice TIB-166 izlučuju u medij (*ATCC*)
- zečje poliklonsko protutijelo protiv kozjeg IgG obilježeno s FITC (*Santa Cruz Biotechnology*)
- zečji serum (*Sigma*)

2.1.4 Specifične komercijalne smjese analitičkih reagencija – kompleti

Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	*Sigma*
ECL Plus Western Blotting Detection Kit	*Amersham Biosciences*
EndoTrap Red	*Hyglos GmbH*
Ficoll-Paque^{TM} PLUS	*Amersham Biosciences*
Flow-Check Fluorospheres	*Beckman Coulter*
Flow-Set Fluorospheres	*Beckman Coulter*
Human T_H1/T_H2 11plex RTU FlowCytomix Kit	*eBioscience*
LAL (*eng.* Limulus Amebocyte Lysate) Pyrogent Plus Single Test Kit	*Lonza*
MMB Mycoplasma PCR Kit	*Merck*
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	*Amersham Biosciences*
Quantikine Human Gal-3 Immunoassay	*R&D Systems*
RNeasy Mini Kit	*Qiagen*
Wizard Genomic DNA Purification Kit	*Promega*

2.1.5 Stanične linije

hibridoma stanice TIB-166	*ATCC*
stanična linija akutne leukemije ljudskih limfocita T Jurkat	*ATCC*

2.1.6 Otopine i puferi

ME-PBS, Merkaptoetanol-PBS, pH 8,0

EDTA	0,5 M
β-merkaptoetanol	0,028%
u PBS	

PIB, Pufer za ispiranje i bojanje stanica, pH 7,4

BSA	2%
EDTA	5 mM
u PBS, pH 7,4	

Pufer za vezanje aneksina V, pH 7,4

NaCl	140 mM
HEPES	10 mM
$CaCl_2$ x $2H_2O$	2,5 mM
u destiliranoj vodi	

Pufer za lizu stanica RIPA (eng. Radioimmunoprecipitation assay), pH 8,0

Tris HCl	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1%
Natrij-dezoksikolat	0,5%
SDS	0,1%
smjesa inhibitora proteaza	
u destiliranoj vodi	

Pufer za ispiranje zrnaca gela protein G-Sepharose, pH 8,0

Tris HCl	50 mM
NaCl	500 mM
EDTA	5 mM
azid, Na	0,02%
Triton X-100	0,5%

Na dezoksikolat	0,05%
SDS	0,1%
u destiliranoj vodi	

Pufer za nanošenje uzoraka na SDS-poliakrilamidni gel (PAG), pH 6,8

Tris HCl	187,5 mM
glicerol	20%
SDS	6%
β-merkaptoetanol	5%
bromfenol plavo	0,1%
u destiliranoj vodi	

Pufer za elektroforezu u SDS-PAG, pH 8,3

glicin	192,0 mM
Tris HCl	25,0 mM
SDS	3,5 mM
u destiliranoj vodi	

Pufer za prijenos na membranu - anodni pufer I, pH 10,4

Tris HCl	300 mM
metanol	20%
u destiliranoj vodi	

Pufer za prijenos na membranu - anodni pufer II, pH 10,4

Tris HCl	25 mM
metanol	20%
u destiliranoj vodi	

Pufer za prijenos na membranu - katodni pufer, pH 9,4

Tris HCl	25 mM
glicin	40 mM
metanol	20%
u destiliranoj vodi	

Pufer TBS (eng. Tris-buffered saline), pH 7,5

Tris HCl	50 mM
NaCl	150 mM
u destiliranoj vodi	

Pufer TBST, pH 7,5

Tween-20	0,1%
u TBS, pH 7,5	

Pufer za uklanjanje vezanih protutijela s poliviniliden difluorid (PVDF) membrane, pH 6,7

β-merkaptoetanol	100 mM
Tris HCl	62,5 mM
SDS	2%
u destiliranoj vodi	

2.1.7 Gelovi za elektroforezu

Gel za sabijanje 5%

akrilamid/bisakrilamid mix 37,5:1	5%
Tris HCl, pH 6,8	250 mM
SDS	0,1%
APS	0,1%
TEMED	0,05%
u destiliranoj vodi	

Gel za razdvajanje 12%

akrilamid/bisakrilamid mix 37,5:1	12%
Tris HCl, pH 8,8	375 mM
SDS	0,1%
APS	0,1%
TEMED	0,05%
u destiliranoj vodi	

2.2 Metode

2.2.1 Uspostava kratkotrajnih primarnih staničnih kultura i tretman stanica

2.2.1.1 Uzorci krvi

Uzorci krvi pribavljeni su iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) od dobrovoljnih davatelja koji su, temeljem Helsinške deklaracije potpisali pristanak da se donirana krv koristi u znanstvene svrhe. Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva HZTM (br. odobrenja 624/2008, od 28. ožujka 2008.), te Etičkog povjerenstva Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Klasa: 643-03/10-01/1, Ur.br.: 19-10-40, od 7. srpnja 2010.). Krv je izvađena venepunkcijom na natrij-citrat kao antikoagulans, te je nakon centrifugiranja iz krvi odvojen dio koji sadrži leukocite i trombocite, uz manji broj zaostalih eritrocita (*eng.* buffy coat, u daljnjem, tekstu krvni pripravak).

2.2.1.2 Izdvajanje limfocita i monocita iz krvnog pripravka

Postupak izdvajanja limfocita i monocita proveden je u sterilnim uvjetima. Krvni pripravak (50 mL) je razrijeđen s PBS u omjeru 1:3,5. Po 35 mL tako priređene suspenzije pažljivo je nadslojeno na 15 mL Ficoll-Paque^{TM} PLUS otopine i centrifugirano 40 minuta pri 400 *g* na sobnoj, temperaturi. Nakon uklanjanja površinskog sloja koji sadrži ostatak krvne plazme, sloj koji sadrži periferne mononuklearne stanice preseljen je u novu epruvetu, dva puta resuspendiran u 30 mL PBS i centrifugiran 10 minuta pri 200 *g* na sobnoj, temperaturi. Alikvot stanica potom je razrijeđen s PBS (1:20), prebrojan brojačem stanica (Beckman Coulter, Z2 Cell and Particle Counter), te je dodan hranidbeni medij do koncentracije stanica od 7 x 10^6/mL. Kao hranidbeni medij korišten je RPMI 1640 medij obogaćen dodatkom 10% FCS (inaktiviranog na 56 °C 30 minuta), 1% smjese Antibiotic-Antimycotic 100X (koja sadrži 10000 U/mL penicilina G, 10000 µg/mL streptomicin-sulfata i 25 µg/mL amfotericina B (Fungizone®). Kulture su uzgajane u plastičnim Petrijevim posudicama, u sterilnim uvjetima pri 37 °C, u struji zraka s 5% CO_2, relativne vlažnosti 95%. Nakon dva sata uzgoja, ne-adherirani limfociti ispirani su četiri puta toplim (37 °C) PBS i prebačeni u svježe posudice za staničnu kulturu. Adherirani monociti korišteni su u postupcima opisanim u poglavljima 2.2.1.3 i 2.2.1.4. Protočnom citometrijom utvrđen je udio vijabilnih limfocita i monocita prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.3.1.

2.2.1.3 Diferencijacija monocita u makrofage i aktivacija makrofaga

Za potrebe diferencijacije u makrofage, alikvoti monocita (~5 x 10^6) prenijeti su u plastične Petrijeve posudice koje su sadržavale 10 mL hranidbenog medija. Stanice su diferencirane 6 dana uz dodatak 1 ng/mL rh-GM-CSF za diferencijaciju u M1, te 10 ng/mL rh-M-CSF za diferencijaciju u M2 podtip makrofaga [142]. Nakon 3-4 dana, hranidbeni medij je zamijenjen svježim medijem istog sastava. Kako bi se potaknula klasična, M1 aktivacija makrofaga, nakon 6 dana diferencijacije u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF, stanicama je na 24 sata dodano 20 ng/mL (200 U) rh-IFN-γ i 100 ng/mL LPS iz *E. coli* [143]. Kako bi se potaknula alternativna M2a i M2c aktivacija makrofaga, nakon 6 dana diferencijacije u hranidbenom mediju uz dodatak rh-M-CSF, stanicama je na 24 sata dodano po 20 ng/mL rh-IL-4, za M2a, odnosno 10 ng/mL rh-IL-10 za M2c podtip [144]. Uspješna diferencijacija, te aktivacija M1, M2a i M2c potvrđena je ekspresijom površinskih biljega CD163 i CD206 i karakterističnim profilom izlučenih citokina u hranidbeni medij (postupci opisani u poglavljima 2.2.3.1 i 2.2.3.3). Utvrđen je i udio živih, rano i kasno apoptoznih, te mrtvih stanica, prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.2.

2.2.1.4 Tretman limfocita i aktiviranih makrofaga rh-galektinom-3

Za potrebe pokusa alikvoti limfocita (5 x 10^4) prenijeti su u bunariće sterilnih pločica za stanične kulture koje su sadržavale 250 μL hranidbenog medija, te su uzgajani 24 sata uz dodatak 0,1 – 2 μM rh-galektina-3 (otopljenog u PBS-u, proizvedenog prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.2). Udio živih rano i kasno apoptoznih, te mrtvih limfocita određen je prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.2. Alikvoti monocita (~5 x 10^4) prenijeti su u bunariće sterilnih pločica za stanične kulture s 250 μL hranidbenog medija, te su uzgajani 7 dana, prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.1.3. Aktiviranim M1, M2a i M2c makrofagima, hranidbeni medij zamijenjen je svježim, odnosno hranidbenim medijem s dodanim 1 μM rh-galektinom-3 (otopljenim u PBS, proizvedenim prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.2), te su stanice uzgajane sljedeća 24 h.

Prikupljeni limfociti i monociti centrifugirani su 5 minuta pri 400 *g* na 4 °C, a alikvoti staničnih supernatanata pohranjeni su na -20 °C do analize citokinskog sastava protočnom citometrijom opisane u poglavlju 2.2.3.3.

2.2.2 Proizvodnja i pročišćavanje rh-galektina-3

rh-galektin-3 proizveden je uporabom ekspresijskog sustava *E. coli* soja BL21(DE3) Star transformiranog plazmidom pET-3c koji sadrži kodirajući slijed za galektin-3, te gen za rezistenciju na ampicilin. Spomenuti bakterijski soj ustupljen je ljubaznošću Dr. Hakona Lefflera. Za potrebe pokusa, spomenuti soj uzgajan je u LB hranjivom mediju (tripton 10 g/L, kvaščev ekstrakt 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 8,0) uz dodatak 100 μg/mL ampicilina. Stanice su uzgajane preko noći na 37 °C uz potresanje (*Stuart, Orbital incubator, /SI 500/*), a potom je ekspresija rh-galektina-3 potaknuta dodatkom induktora 0,5 mM IPTG i inkubacijom 3 sata pod istim uvjetima.

Inducirane stanice centrifugirane su 10 minuta pri 3500 *g* na sobnoj, temperaturi nakon čega je supernatant odbačen. Dobiveni talozi su, radi lakšeg soniciranja, pohranjeni preko noći na -80 °C. Talozima stanica dodano je po 10 mL *Pufera ME-PBS*, te su sonicirani na ledu ultrazvučnim sonikatorom Soniprep 150 (*MSE Scientific Instruments*) 10 puta po 1 minutu uz amplitudu od 5 μm i frekvenciju od 22 kHz. Stanični homogenati centrifugirani su 30 minuta pri 16000 *g* na 4 °C. Dobiveni supernatanti koji sadrže rh-galektin-3 filtrirani su (0,45 μm) i naneseni na kolonu za afinitetnu kromatografiju sustava za, tekućinsku kromatografiju ÄKTA purifier (*GE Healthcare, Bio-sciences AB*) na kojoj je za inertni nosač bila vezana laktoza. Kolona je ispirana s *Puferom ME-PBS*, kako bi se eluirali nevezani proteini staničnog homogenata, a vezani rh-galektin-3 eluiran je puferom s povišenom koncentracijom laktoze (*Pufer ME-PBS* uz dodatak 150 mM laktoze). Laktoza je iz prikupljenih frakcija rh-galektina-3 uklonjena dijalizom prema vodi tijekom 24 sata, uz izmjenu vode svakih 6 do 7 sati. Uzorcima pročišćenim od laktoze određena je koncentracija proteina, te su, u svrhu potvrde identiteta rh-galektina-3, analizirani denaturirajućom SDS–PAG elektroforezom i postupkom *Western blot* (prema postupku opisanom u 2.2.4).

Izolirani rh-galektin-3 pročišćen je od zaostalih bakterijskih endotoksina (LPS) uporabom EndoTrap Red kompleta prema uputama proizvođača. rh-galektin-3 (5 mg/mL, otopljen u PBS) pomiješan je u omjeru 2:1 s prethodno aktiviranim zrncima koja vežu bakterijske endotoksine. Smjesa je inkubirana 30 minuta na sobnoj, temperaturi uz stalno miješanje, a potom centrifugirana 5 minuta pri 1200 *g* na sobnoj, temperaturi. Supernatant s pročišćenim rh-galektinom-3 preseljen je u sterilnu epruvetu, te je određena koncentracija proteina metodom s BCA (prema postupku opisanom u 2.2.4.1). Uspješnost pročišćavanja endotoksina iz uzorka rh-galektina-3 provjerena je LAL-testom prema uputama proizvođača. Pročišćeni 1 μM rh-galektin-3 inkubiran je 1 sat pri 37 °C s lizatom amebocita *Limulus polyphemus* kojim

se utvrđuje prisutnost endotoksina Gram-negativnih bakterija (ukoliko su u uzorku sadržani bakterijski endotoksini, dolazi do enzimatske koagulacije lizata). U pročišćenom uzorku rh-galektina-3 utvrđena je koncentracija endotoksina manja od 0,125 EU/mL. Pročišćeni uzorci su liofilizirani i pohranjeni na -20 °C do uporabe.

2.2.2.1 Utvrđivanje biološke aktivnosti rh-galektina-3

Biološka aktivnost pročišćenog rh-galektina-3 potvrđena je uporabom Jurkat stanične linije akutne leukemije ljudskih limfocita T. Stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima u plastičnim bocama za stanične kulture u, termostatu pri 37 °C u struji zraka s 5% CO_2, relativne vlažnosti 95%. Gustoća stanica održavana je između 1 x 10^5 i 8 x 10^5 stanica/mL kulture. Odsutnost kontaminacije staničnih kultura mikoplazmama potvrđena je izolacijom ukupne DNA pomoću kompleta Wizard Genomic DNA Purification Kit, te lančanom reakcijom polimerazom uporabom MMB Mycoplasma PCR kompleta, u skladu s uputama proizvođača.

Jurkat stanice uzgajane su pri koncentraciji 5 x 10^5 stanica/mL 6 sati u hranjivom mediju uz dodatak 15 μM rh-galektina-3 [126]. Indukcija apoptoze ispitana je protočnom citometrijom prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.3.2.

2.2.3 Protočna citometrija

2.2.3.1 Utvrđivanje ekspresije membranskih proteina

Razine ekspresije CD14 na membrani limfocita i monocita, galektina-1 i -3 na membrani monocita, kao i razine ekspresije CD163, CD206, galektina-1 i -3 na M1, M2a i M2c makrofagima utvrđene su protočnom citometrijom. Za potrebe određivanja razine ekspresije CD14, galektina-1 i -3 na monocitima, te galektina-1 i -3 na aktiviranim makrofagima, stanice su prikupljene raspuhavanjem u *Puferu za ispiranje i bojanje stanica (PIB)* ohlađenom na 4 °C. Za utvrđivanje razine ekspresije membranskih biljega CD163 i CD206 aktivirani makrofagi prikupljeni su na sljedeći način: nakon prikupljanja supernatanta, stanice su podignute s podloge enzimski, djelovanjem otopine Accutase kroz 5 – 10 minuta na sobnoj, temperaturi. Supernatant je potom združen s enzimski podignutim stanicama, centrifugiran (5 minuta pri 400 *g* na 4 °C), te je talog stanica resuspendiran u *PIB* i prebrojan brojačem stanica. Alikvoti od 5 x 10^5 makrofaga su isprani u 1 mL *PIB* i centrifugirani. U svaki uzorak (100 μL) dodan je zečji serum razrijeđen 1:20 u *PIB*, kako bi se onemogućilo nespecifično vezanje fluorescentno obilježenih primarnih ili sekundarnih protutijela, te su stanice inkubirane 15 minuta na 4 °C, u mraku.

Razine ekspresije galektina-1 i -3 utvrđene su u odgovarajućim uzorcima inkubacijom s primarnim protutijelima i to: 0.1 μg kozjeg poliklonskog protutijela protiv ljudskog galektina-1 ili 5 μL supernatanta TIB-166 hibridoma stanica koje u medij izlučuju štakorsko monoklonsko protutijelo M3/38 protiv mišjeg galektina-3 (koristi se i za detekciju ljudskog galektina-3). Nakon inkubacije, stanice su dva puta resuspendirane u 1 mL *PIB*, te centrifugirane. Uzorcima je potom dodano 0,5 μg zečjeg poliklonskog protutijela protiv kozjeg IgG obilježenog s FITC za detekciju galektina-1, ili 5 μL mišjeg poliklonskog protutijela protiv štakorskog IgG obilježenog s PE za detekciju galektina-3. Razine ekspresije CD14 i CD163 utvrđene su inkubacijom stanica s 5 μL mišjih monoklonskih protutijela protiv ljudskih CD14 ili CD163 obilježenih PE-om, dok je razina ekspresije CD206 utvrđena inkubacijom s 5 μL mišjeg monoklonskog protutijela protiv ljudskog CD206 obilježenog FITC-om. Protutijela su inkubirana 30 (neobilježena) ili 60 minuta (obilježena fluorescentnim bojama) u 0,1 mL *PIB* pri 4 °C, u mraku. Uz fluorescentno obilježena protutijela, uzorcima je dodano i 1 μg/mL boje 7-AAD (5 minuta pri 4 °C u mraku), kako bi se utvrdio udio živih, rano i kasno apoptoznih, te mrtvih stanica. Prije analize na protočnom citometru (opisane u poglavlju 2.2.3.5) stanice su centrifugiranjem isprane dva puta od nevezanih fluorescentnih protutijela i boje na način opisan u, tekstu, te im je dodano 0,5 mL *PIB*.

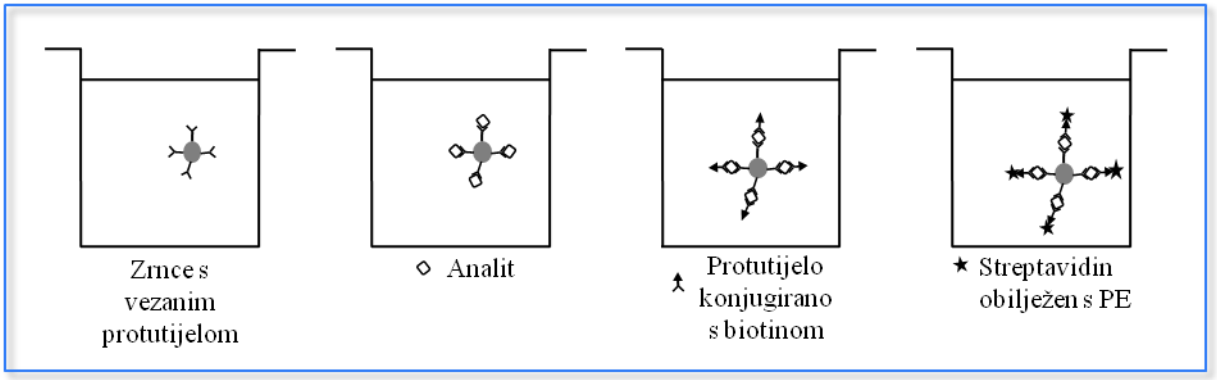
2.2.3.2 Utvrđivanje udjela živih, rano i kasno apoptoznih, te mrtvih stanica

Udio živih, rano i kasno apoptoznih, te mrtvih Jurkat stanica kao i limfocita, te aktiviranih M1, M2a i M2c makrofaga (prikupljenih djelovanjem otopine Accutase) određen je protočnom citometrijom. Alikvoti kulture s po 10^5 stanica centrifugirani su (5 minuta, 400 *g*, sobna, temperatura), resuspendirani u 1 mL *Pufera za vezanje aneksina V* i iznova centrifugirani. Stanice su inkubirane 5 minuta pri sobnoj, temperaturi u 0,5 mL *Pufera za vezanje aneksina V* uz dodatak 2,5 μL aneksina V obilježenog fluorescentnom bojom Alexa Fluor® 488 i 0,25 μg PI. Uzorci su analizirani na protočnom citometru na način opisan u poglavlju 2.2.3.5.

2.2.3.3 Utvrđivanje citokinskog sastava hranidbenog medija aktiviranih makrofaga

Citokinski sastav hranidbenog medija limfocita i aktiviranih M1, M2a i M2c makrofaga analiziran je na protočnom citometru upotrebom Human T_H1/T_H2 11plex RTU FlowCytomix kompleta. Stanice su centrifugirane 5 minuta pri 400 *g* na 4 °C i alikvoti staničnih supernatanata inkubirani su 2 sata u mraku na sobnoj, temperaturi u smjesi fluorescentno obilježenih zrnaca s vezanim specifičnim protutijelima protiv ljudskih citokina IFN-γ, IL-1β,

IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF-α i TNF-β i odgovarajućih protutijela obilježenih biotinom koja prepoznaju alternativne epitope na spomenutim analitima. Nakon dva koraka ispiranja nevezanih biotiniliranih protutijela i citokina puferom iz kompleta, te centrifugiranja (5 minuta, 200 *g*, sobna, temperatura), uzorcima je dodan streptavidin obilježen s PE, te su inkubirani 1 sat u mraku na sobnoj, temperaturi (Slika 2.1). Zrnca su centrifugirana i isprana dva puta u 1 mL pufera iz kompleta, a prije analize na protočnom citometru (opisane u poglavlju 2.2.3.5) dodano je 0,5 mL istog pufera.



Slika 2.1 Shema detekcije citokina u staničnim supernatantima. PE (eng. phycoerythrin) - fikoeritrin.

2.2.3.4 Utvrđivanje slobodnih membranskih receptora za galektin-3

Ekspresija slobodnih membranskih receptora za galektin-3 na monocitima i aktiviranim M1, M2a i M2c makrofagima procijenjena je inkubacijom stanica (30 minuta, 4 °C) u *PIB* uz dodatak 1 μM rh-galektina-3. Količina vezanog rh-galektina-3 na membrani utvrđena je protočnom citometrijom po postupku opisanom u poglavlju 2.2.3.5.

2.2.3.5 Analiza uzoraka na protočnom citometru

Fluorescentno obilježeni uzorci analizirani su pomoću Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*), koji je prije analize standardiziran Flow-Check Fluorospheres i Flow-Set Fluorospheres reagensima prema uputama proizvođača. Fluorescentne boje pobuđene su laserom valne duljine 488 nm, a prelijevanje njihove fluorescencije kompenzirano je po potrebi. U pojedinom uzorku stanica, temeljem prednjeg, FS (*eng.* forward scatter) i bočnog raspršenja, SS (*eng.* side scatter) iz analize su isključeni stanični agregati, kao i jezgre i ostali manji dijelovi raspadnutih stanica. Fluorescencija FITC, Alexa Fluor 488 izmjerena je pomoću fluorescencijskog-1 (FL-1) detektora koji propušta valnu duljinu od 525 nm, fluorescencija PE izmjerena je pomoću FL-2 detektora koji propušta valnu duljinu od 575 nm, fluorescencija PI pomoću FL-3 detektora koji propušta valnu duljinu od

620 nm, a fluorescencija 7-AAD i zrnaca za vezanje citokina pomoću FL-4 detektora koji propušta valnu duljinu od 675 nm. Ispitivanjem vezanja fluorokroma odabrani su uvjeti (količina dodanog protutijela/aneksina V, vrijeme i, temperatura inkubacije) koji osiguravaju maksimalnu zasićenost ciljnog epitopa. Po uzorku je ispitano 10000 stanica/fluorescentnih zrnaca, a prikupljeni rezultati analizirani su pomoću Beckman Coulter CXP Analysis 2.1 kompjuterskog programa.

2.2.4 Utvrđivanje razine ekspresije galektina-1 i -3 na razini proteina

2.2.4.1 Priprava i određivanje koncentracije proteina u staničnom homogenatu

Prikupljeni humani monociti i makrofagi (~4 x 10^6 stanica) isprani su PBS-om, centrifugirani 5 minuta pri 400 *g* na 4 °C, resuspendirani u 150 µl *RIPA pufera za lizu stanica, te* sonicirani na ledu ultrazvučnim sonikatorom Soniprep 150 (*MSE Scientific Instruments*) 4 puta po 15 sekundi uz amplitudu 5 µm i frekvenciju 22 kHz. Nakon centrifugiranja 10 minuta pri 600 *g* na 4 °C stanični homogenati su odvojeni od netopljivih taloga.

Koncentracija proteina u uzorcima određena je metodom s BCA [145]. U tu svrhu, 2 µl staničnih homogenata razrijeđeno je destiliranom vodom do konačnog volumena 25 µL (razrjeđenje 1:12,5). Uzorci su inkubirani 30 minuta pri 37°C s 0,1 mL otopine dobivene miješanjem otopine BCA s 4%-tnom otopinom $CuSO_4$ x $5H_2O$ u volumnom omjeru 50:1. Intenzitet obojenja otopine izmjeren je pri valnoj duljini 560 nm na spektrofotometru Victor^2 1420 Multilabel Counter (*PerkinElmer*). Koncentracija proteina u uzorcima očitana je pomoću baždarnog pravca. Kao standardna otopina proteina rabljena je otopina BSA u vodi raspona koncentracija od 0,1 – 1 mg/mL). Uzorci standardne otopine, kao i otopine uzoraka, priređeni su u duplikatu.

2.2.4.2 Elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu

Odgovarajućim volumenima uzoraka staničnih homogenata koji su sadržavali 600 µg proteina dodano je 100 µL *Pufera za nanošenje uzoraka na SDS-PAG*, te destilirane vode do konačnog volumena 300 µL (odnosno konačne koncentracije proteina 2 mg/mL). Tako priređeni uzorci kuhani su 5 minuta pri 96 °C.

Diskontinuirana denaturirajuća gel-elektroforeza proteina provedena je u 5%-tnom sabijajućem i 12%-tnom razdvajajućem poliakrilamidnom gelu, debljine 0,5 mm, prema metodi po Laemmliju [146]. U pojedinu je jažicu nanošeno po 20 i 5 µL uzorka za detekciju

galektina-1 i -3. Korišten je i prethodno obojan standard proteina poznatih molekulskih masa kojeg je naneseno 5 μL.

2.2.4.3 Prijenos i detekcija proteina

Elektroforezom razdvojeni proteini prenijeti su na PVDF membranu (Immobilon-PVDF membrane, *Millipore*) u uređaju za polusuhi elektroforetski prijenos (Semi-Dry Blotting System IMM 1-A, *The W.E.P. Company*) pri gustoći električne struje 0,8 mA/cm^2 (Raz, 1987). Dio PVDF membrane koji je sadržavao proteine molekulske mase manje od ≈20 kDa inkubiran je preko noći s kozjim poliklonskim protutijelima protiv ljudskog galektina-1, razrijeđenim 1:1000 u *Puferu TBS* uz dodatak 3% BSA (TBS/3% BSA) dok je dio PVDF membrane koji je sadržavao proteine molekulske mase veće od ≈20 kDa inkubiran preko noći sa štakorskim monoklonskim protutijelima M3/38 protiv mišjeg galektina-3 (supernatant kulture hibridoma stanica TIB-166), razrijeđenim 1:2000 u TBS/3% BSA. BSA je dodan istovremeno s primarnim protutijelima radi sprječavanja nespecifičnog vezanja primarnih protutijela na slobodna vezna mjesta na PVDF membrani. Membrane su zatim ispirane tri puta po 15 minuta u *Puferu TBST* i izložene odgovarajućim sekundarnim protutijelima obilježenim peroksidazom iz hrena tijekom 1 h. Korištena su magareća poliklonska protutijela protiv kozjeg IgG razrijeđena 1:50000 u *Puferu TBS* za detekciju galektina-1 i kozja poliklonska protutijela protiv štakorskog IgG razrijeđena u *Puferu TBS* 1:10000 za detekciju galektina-3. Po ispiranju tri puta po 10 minuta u *Puferu TBST*, membrane su inkubirane s ECL Plus Western Blotting Detection reagensom 5 minuta na sobnoj, temperaturi, a zatim je na njih u mraku postavljen film (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, *Roche*), pri čemu je vrijeme izlaganja filma membrani ovisilo o intenzitetu signala. Film je potom razvijen u mraku pomoću razvijača (GBX Developer/Replenisher, *Sigma*) i fiksativa (GBX Fixer/Replanisher, *Sigma*).

Kako bi se detektirao histon H2B, dio membrane koji je sadržavao proteine molekulske mase manje od ≈20 kDa potom je inkubiran 30 minuta pri 50 °C u *Puferu za uklanjanje vezanih protutijela s PVDF membrane*, a nakon toga je membrana isprana tri puta po 15 minuta u *Puferu TBST*. Histon H2B vizualiziran je na opisani način uporabom primarnih kozjih poliklonskih protutijela protiv ljudskog histona H2B razrijeđenih 1:500 u TBS/3% BSA i sekundarnih magarećih poliklonskih protutijela protiv kozjeg IgG obilježenih peroksidazom iz hrena, razrijeđenih 1:10000 u *Puferu TBS*.

Intenzitet signala dobivenih razvijanjem filma procijenjen je pomoću kompjuterskog programa ImageJ 1.44p [147] tako da je uzorcima zbrojen intenzitet svih detektiranih signala.

Razina ekspresije galektina-1 i -3 u pojedinom uzorku normirana je na razinu ekspresije histona H2B i izražena kao relativni omjer ekspresije makrofaga u odnosu na monocite.

2.2.5 Utvrđivanje razine ekspresije galektina-1 i -3 na razini mRNA

2.2.5.1 Izolacija RNA

Ukupna RNA izolirana je iz monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga pomoću kompleta RNeasy® Mini Kit. Po 10^6 stanica isprano je PBS-om, centrifugirano 5 minuta pri 400 *g* na sobnoj, temperaturi i lizirano dodatkom 350 µL pufera RLT. U lizat je dodano 350 µL 70% etanola u vodi, te je tako priređena smjesa nanijeta na RNeasy mini kolonu. Nakon centrifugiranja (15 sekundi, 8000 *g*, sobna, temperatura), filtrat je odbačen, a kolona je isprana sa 700 µL pufera RW1 (iz kompleta), te dva puta s 500 µL pufera RPE (iz kompleta). Nakon dodatka svakog pojedinog pufera slijedilo je centrifugiranje i odbacivanje filtrata. Ukupna RNA s kolone je eluirana vodom u kojoj su uništene ribonukleaze (30 µL) uz centrifugiranje 1 minutu pri 8000 *g* na sobnoj, temperaturi. U otopinu RNA dodana je otopina ribonukleaznog inhibitora do konačne koncentracije 2 U/µL, te je otopina RNA pohranjena na -80 °C do daljnjih postupaka.

2.2.5.2 Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimerazom

Reverzna transkripcija ukupne izolirane RNA (0,8 µg) napravljena je u reakcijskoj smjesi konačnog volumena 20 µL koja je sadržavala 5 ng/µL nasumičnih heksamernih početnica, 10 U/µL M-MLV reverzne transkriptaze, 1 mM smjese dNTP, 2 U/µL inhibitora RNaza, 10 mM DTT u puferu za reverznu transkripciju (75 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$; pH 8.3). Uzorci su inkubirani 1 sat pri 37 °C. Reverzna transkripcija okončana je zagrijavanjem 5 minuta na 85 °C, a potom su uzorci ohlađeni na 4 °C.

2.2.5.3 Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*eng*. quantitative real-time PCR)

Relativna količina mRNA galektina-1 i -3 u monocitima, diferenciranim i aktiviranim makrofagima analizirana je kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom na instrumentu ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (*Applied Biosystems*), uporabom TaqMan metode prema uputama proizvođača. TaqMan probe i parovi početnica za ispitivanje genske ekspresije posebno su naručeni (*Microsynth*) i konstruirani tako obuhvaćaju granicu između

egzona, kako bi se izbjeglo umnažanje genomske DNA. Svaki je uzorak konačnog volumena 25 μL sadržavao 1 μL otopine cDNA, reagens TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, naprijed, F (*eng.* forward) i unatrag, R (*eng.* reverse) početnice za odgovarajući gen (0,1 μM), te probe TaqMan (0,1 μM). TaqMan probe su na 5' kraju bile obilježene fluorescentnom bojom 6-karboksifluoresceinom (FAM) koja je služila kao 'reporter', a na 3' kraju fluorescentnom bojom , tetrametilrodaminom (TAMRA) koja je služila kao prigušivač (*eng.* quencher). Reakcijske smjese pomiješane su pri 4 °C. Sljedovi korištenih početnica i proba prikazani su u tablici 2.1.

Tablica 2.1 ***Sljedovi početnica i proba za kvantitativni PCR.*** *Naprijed, F (eng. forward) početnica, unatrag, R (eng. reverse) početnica, P – proba, gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GAPDH (eng.* g*lyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).*

GEN	POČETNICA	
galektin-1	F	5' – GCGGGAGGCTGTCTTTCC – 3'
	R	5' – CCTGGTCGAAGGTGATGC – 3'
	P	5' – ACCTCTGCAACACTTCCAGGCTGGAA – 3'
galektin-3	F	5' – GCGGAAAATGGCAGACAATT – 3'
	R	5' – CTTGAGGGTTTGGGTTTCCA – 3'
	P	5' – ACCCAGATAACGCATCATGGAGCGA – 3'
GAPDH	F	5' – ACCCACTCCTCCACCTTTGAC – 3'
	R	5' – CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA – 3'
	P	5' – CTGGCATTGCCCTCAACGACCA – 3'

Lančana reakcija polimerazom otpočela je zagrijavanjem 10 minuta na 95 °C, kako bi se aktivirala AmpliTaq Gold DNA-polimeraza, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa zagrijavanja 15 sekundi na 95 °C (pri čemu se denaturira dvolančana DNA) i hlađenja 1 minutu na 60 °C (sparivanje lanaca i sinteza DNA).

Optimizacija koncentracija početnica i probe TaqMan i provjera njihove uporabe s TaqMan PCR Master Mix reagensom, učinjena je prema protokolu proizvođača. Ukratko, ispitane su različite koncentracije početnica i TaqMan proba, te su odabrane one koje su u uzorcima s cDNA dale najnižu vrijednost graničnog ciklusa C_T (*eng.* treshold cycle), a u kontrolnim uzorcima bez cDNA, vrijednost veću od 39. Ispitana su i četiri serijska razrjeđenja cDNA, kako bi se provjerilo imaju li testirani geni s odabranim koncentracijama početnica

efikasnost umnažanja jednaku onoj kontrolnog gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GAPDH (*eng.* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) gena.

U svrhu procjene jačine ekspresije, vrijednosti C_T dobivene za mRNA galektina-1 i -3 normirane su na vrijednosti dobivene za GAPDH u istom uzorku cDNA (ΔC_T). Kako bi se usporedile jačine ekspresije mRNA galektina-1 i -3 u diferenciranih i aktiviranih makrofaga u odnosu na monocite, broj dva potenciran je na negativnu razliku vrijednosti ΔC_T diferenciranih i aktiviranih makrofaga i monocita ($\Delta\Delta C_T$). Dakle, promjena razine ekspresije pojedinog gena, relativni omjer, RFR (*eng.* relative fold ratio) izračunata je prema formuli:

$$RFR = 2^{-\Delta\Delta CT} \text{ pri čemu je}$$

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T\ \text{galektin-1/galektin-3}} - C_{T\ \text{GAPDH}})_{\text{makrofaga}} - (C_{T\ \text{galektin-1/galektin-3}} - C_{T\ \text{GAPDH}})_{\text{monocita}}$$

Smatralo se da dobivene vrijednosti RFR makrofaga u odnosu na monocite između 0,5 i 2 nisu odražavale značajnu promjenu razine mRNA galektina-1 i -3.

2.2.6 Ispitivanje koncentracije galektina-3 izlučenog u hranidbeni medij

Imunoenzimskom metodom sendvič ELISA (*eng.* enzyme-linked immunosorbent assay) pomoću Quantikine Human Gal-3 Immunoassay kompleta određena je koncentracija galektina-3 u supernatantima monocita uzgajanih 24 sata u hranidbenom mediju, stanica diferenciranih s M-CSF/GM-CSF tri i šest dana, te aktiviranih M1, M2a i M2c makrofaga. Hranidbeni medij centrifugiran je 5 minuta pri 400 *g*, a potom je 50 µL uzorka supernatanta inkubirano 2 sata na sobnoj, temperaturi u mikrotitarskoj pločici s vezanim monoklonskim protutijelom protiv ljudskog galektina-3 u 100 µL pufera iz kompleta. Nakon četiri ispiranja (po 400 µL pufera za ispiranje iz kompleta po bunariću) dodano je po 200 µL poliklonskog protutijela protiv ljudskog galektina-3 iz kompleta, te su uzorci inkubirani 2 sata pri sobnoj, temperaturi u mraku. Nevezana protutijela isprana su četiri puta na opisani način, te je dodano 200 µL otopine supstrata i inkubirano 30 minuta na sobnoj, temperaturi u mraku. Inkubacija je završena dodavanjem 50 µL Stop otopine. Apsorbancija uzoraka određena je pri 450 nm (uz korekciju pri 540 nm) pomoću spektrofotometra Victor^2 1420 Multilabel Counter (*PerkinElmer*). Dobivene koncentracije galektina-3 normirane su na koncentraciju koju je izlučilo 10^6 stanica u 1 mL hranidbenog medija.

2.2.7 Imunoprecipitacija

Galektina-3 izlučen u supernatante monocita, stanica diferenciranih s M-CSF/GM-CSF tri i šest dana, te aktiviranih M1, M2a i M2c makrofaga analiziran je imunoprecipitacijom uporabom zrnca gela protein G-Sepharose. Prije uporabe zrnca gela su oprana dva puta u po 1 mL redestilirane vode i dva puta u po 1 mL PBS, uz centrifugiranje (5 minuta pri 5600 g na sobnoj, temperaturi). U svaki uzorak od 1 mL staničnog supernatanta potom je dodano monoklonsko protutijelo M3/38 protiv galektina-3 (1:500, predinkubirano 30 minuta na 4 °C) i 35 μL suspenzije zrnaca gela protein G-Sepharose razrijeđene s PBS 1:5 [148]. Uzorci su inkubirani preko noći u rotacionoj miješalici na 4 °C, a zrnca su potom uz centrifugiranje oprana četiri puta u po 1 mL *Pufera za ispiranje zrnaca gela*. Konačni talog zrnaca gela resuspendiran je u 10 μL *Pufera za nanošenje uzoraka na SDS-PAG* i kuhan 5 minuta na 95 °C. Uzorak je centrifugiran, a dobiveni supernatant sačuvan. Postupak je ponovljen tri puta.

2.2.8 Statističke metode

Srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) izračunate su pomoću računala uporabom programa Excel, Microsoft®. Razina značajnosti (p) izračunata je uporabom parnog Student t-testa, istog programa. Statistički značajnom promjenom smatrana je promjena za koju je $p<0,05$.

3 REZULTATI

3.1 Diferencijacija i aktivacija makrofaga

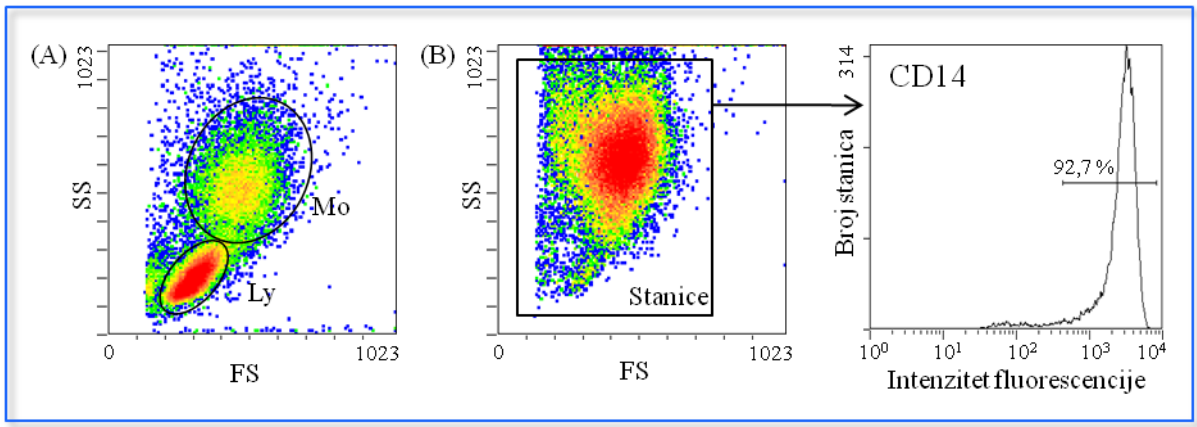
Ispitana je ekspresija galektina-1 i -3 na ljudskim monocitima, te klasično (M1) i alternativno aktiviranim (M2a i M2c) makrofagima. Monociti su tijekom 7 dana izloženi djelovanju rh-GM-CSF, te rh-M-CSF, kako bi se potaknula diferencijacija u M1, odnosno M2 podtip. Tijekom posljednja 24 sata, M1 makrofagi aktivirani su dodatkom LPS i rh-IFN-γ, a M2a/M2c makrofagi aktivirani su dodatkom rh-IL-4/rh-IL-10 u hranidbeni medij. Diferencijacija monocita u makrofage, te njihova aktivacija, potvrđena je povišenom ekspresijom membranskih biljega CD163 i CD206, te specifičnim citokinskim profilima u hranidbenom mediju pojedinih tipova stanica. Ekspresija galektina-1 i -3 tijekom diferencijacije monocita i aktivacije makrofaga praćena je na genskoj i proteinskoj razini. Ispitana je količina endogenih galektina-1 i 3 vezanih na membrani stanica, a utvrđena je i količina galektina-3 izlučenog u hranidbeni medij. Sposobnost vezanja galektina-3 na membranu monocita i makrofaga procijenjena je uporabom egzogeno dodanog rh-galektina-3, te je određen učinak egzogeno dodanog rh-galektina-3 na izlučivanje citokina aktiviranih makrofaga.

3.1.1 Vijabilnost i ekspresija površinskog biljega CD14 u monocita

Periferne mononuklearne stanice izolirane su iz krvnih pripravaka zdravih dobrovoljnih davatelja krvi centrifugiranjem pomoću Ficoll-paque^{TM} PLUS otopine. Monociti su izolirani adhezijom na posudice za staničnu kulturu tijekom dva sata u standardnim uvjetima, a uspješnost njihove izolacije potvrđena je uporabom Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*). Stanicama su izmjerene vrijednosti FS, koji je u korelaciji s veličinom stanica, i SS, koji se dovodi u vezu s granuliranošću stanica. Određivanjem FS i SS, temeljem morfoloških karakteristika iz analize su isključene raspadnute stanice (karakteriziraju ih niske vrijednosti FS i SS u odnosu na pojedine stanice) i veće nakupine stanica (koje imaju visoke vrijednosti FS i SS u odnosu na pojedine stanice). Tako je utvrđena regija (prozor) koja po morfološkim karakteristikama obuhvaća pojedine stanice, te su samo one korištene u daljnjoj analizi. Kao negativna kontrola, analizom neobilježenih stanica, utvrđena je razina autofluorescencije monocita pri uporabljenim valnim duljinama svjetlosti. Vijabilnost stanica ispitana je uporabom fluorescentne boje za protočnu citometriju 7-AAD koja lako prolazi staničnu membranu mrtvih i kasno apoptoznih stanica, a ne može proći intaktnu membranu živih stanica. Iz uzorka pojedinačnih stanica, iz daljnje analize isključene

su mrtve i kasno apoptozne stanice koje karakterizira visoka razina fluorescencije 7-AAD (pri valnoj duljini od 647 nm) u odnosu na žive/neobilježene stanice. Mrtve stanice potrebno je isključiti iz analize zbog njihova nespecifičnog vezanja (fluorescentno obilježenih) protutijela, a koje daje lažno pozitivne signale. Živim (7-AAD negativnim) stanicama utvrđena je razina ekspresije membranskog biljega CD14 uporabom odgovarajućih monoklonskih protutijela obilježenih fluorescentnom bojom PE-om. Ovaj receptor bakterijskog LPS visoko je eksprimiran na monocitno-makrofagnim stanicama u odnosu na ostale limfocite.

Rezultati dva neovisna pokusa provedena u triplikatu sa stanicama izoliranim od različitih donora krvi, pokazala su da su stanice izolirane adhezijom perifernih mononuklearnih stanica bile 98,2±0,5% žive. Štoviše, od ukupnih živih, 91,9±1,1% izoliranih stanica bili su monociti s jakom fluorescencijom PE pri valnoj duljini od 575nm, odnosno ekspresijom membranskog biljega CD14 (prosječni intenzitet fluorescencije bio je ~200 puta veći u odnosu na CD14 negativne limfocite). Preostale stanice, imale su manji prednji i bočni rasap svjetlosti i CD14 negativni fenotip, odnosno spadale su u limfocite zaostale prilikom pročišćavanja (Slika 3.1).

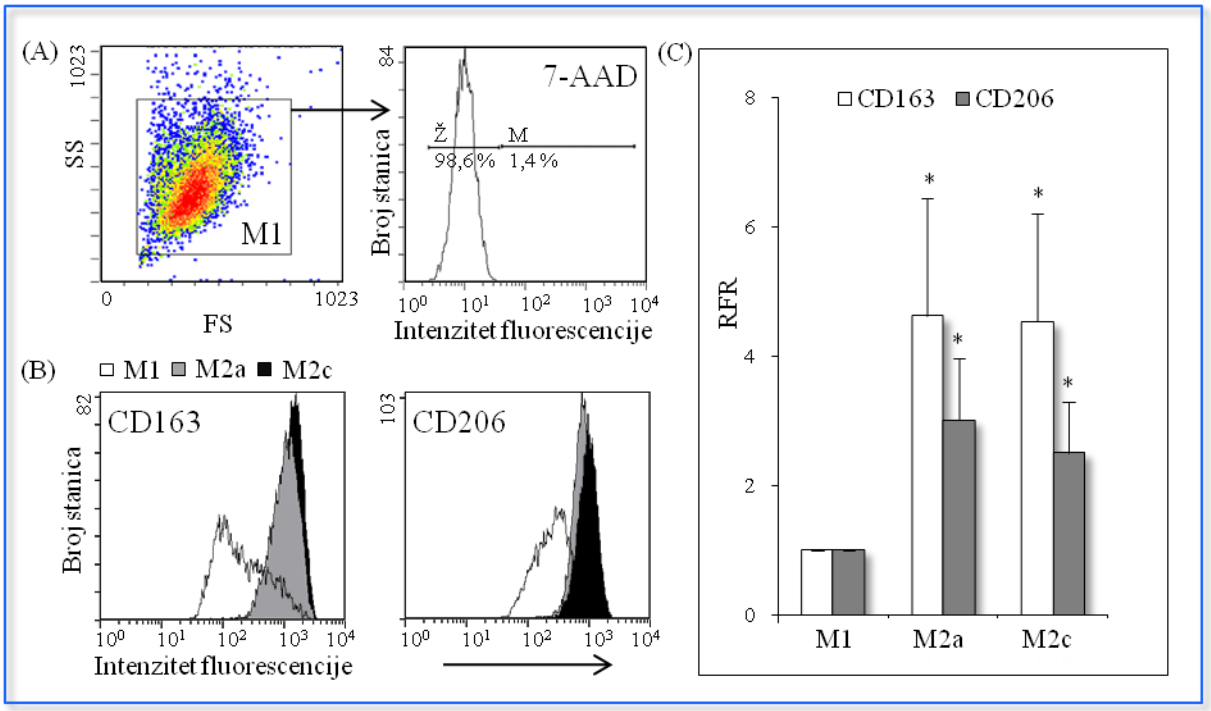


Slika 3.1 Izolacija monocita. *Periferne mononuklearne stanice izolirane su iz krvnih pripravaka. mrtve stanice isključene bojanjem pomoću 7-aminoaktinomicina (7-AAD). (A) Reprezentativni dvoparametarski dijagram prednjeg (eng. forward scatter, FS) i bočnog (eng. side scatter, SS) rasapa svjetlosti prikazuje periferne mononuklearne stanice prije izolacije monocita. Označena je regija s manjim i manje granuliranim stanicama koja odgovara limfocitima (Ly), te regija s većim i jače granuliranim stanicama koja odgovara monocitima (Mo). (B) Reprezentativni dvoparametarski dijagram FS i SS prikazuje stanice prikupljene nakon izolacije monocita (Stanice). Razina ekspresije membranskog CD14 na prikupljenim stanicama utvrđena je uporabom odgovarajućih protutijela obilježenih FITC-om, a prikazana je bijelim histogramom.*

3.1.2 Ekspresija membranskih biljega CD163 i CD206 u aktiviranih makrofaga

Monociti su tijekom 7 dana izloženi djelovanju rh-GM-CSF, te rh-M-CSF, kako bi se potaknula diferencijacija u M1, odnosno M2 podtip. Tijekom posljednja 24 sata M1 makrofagi aktivirani su dodatkom LPS u rh-IFN-γ, a M2a/M2c makrofagi aktivirani su dodatkom rh-IL-4/rh-IL-10 u hranidbeni medij. Kako bi se ispitalo jesu li diferencijacijom i aktivacijom monocita dobivene željene stanice, razina ekspresije karakterističnih biljega klasično (M1) i alternativno (M2a i M2c) aktiviranih makrofaga, utvrđena je uporabom Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*), prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.1. Manozni receptor (CD206) i receptor čistač (*eng.* scavenger receptor) CD163 jače eksprimiraju u odnosu na M1 podtip, te se smatraju biljezima alternativne aktivacije makrofaga. Određivanjem FS i SS, temeljem morfologije isključeni su raspadnuti dijelovi stanica, kao i veće nakupine stanica pa su analizirane samo pojedine stanice. Stanice koje nisu inkubirane s fluorescentnim bojama/protutijelima uporabljene su kao negativna kontrola za utvrđivanje razine autofluorescencije M1, M2a i M2c makrofaga pri uporabljenim valnim duljinama svjetlosti. Kako bi se iz analize izbacila fluorescencija nespecifično vezanih protutijela, mrtvi i kasno apoptozni makrofagi isključeni su, temeljem visoke fluorescencije boje za vijabilnost 7-AAD u odnosu na žive/neobilježene stanice. Razina ekspresije CD163 i CD206 na membrani živih stanica određena je uporabom odgovarajućih monoklonskih protutijela, obilježenih s PE i FITC, čija je fluorescencija detektirana pri valnim duljinama svjetlosti 575 i 518 nm.

Rezultati tri neovisna pokusa provedena u duplikatu sa stanicama izoliranim od različitih donora krvi, pokazali su da su aktivirani M1 makrofagi bili 95,1±3,1%, M2a makrofagi 99±0,7% i M2c makrofagi 98,3±1,5% živi. Polarizacija u klasično i alternativno aktivirane makrofage potvrđena je povišenom ekspresijom membranskih biljega. Razina ekspresije CD163 bila je 4,6±1,8 puta i 4,5±1,7 puta povišena u M2a i M2c u odnosu na M1 makrofage. Razina ekspresije CD206 bila je 3±1 put i 2,5±0,8 puta povišena u M2a i M2c, u odnosu na M1 makrofage (Slika 3.2). Kao što je poznato iz literature [142], zamijećena je izrazita varijabilnost u razini ekspresije membranskog receptora CD163 u alternativno aktiviranih makrofaga podrijetlom od različitih donora krvi.

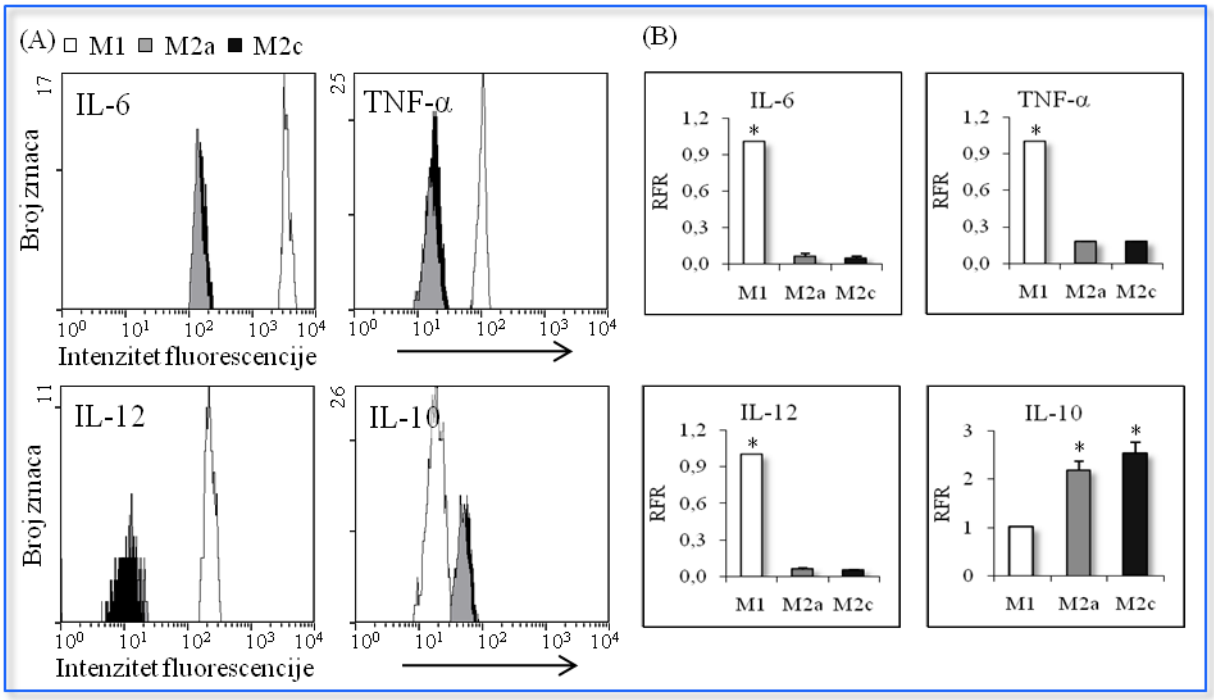


Slika 3.2 Ekspresija CD163 i CD206 na membrani aktiviranih makrofaga. *Humani monociti uzgajani su tijekom 7 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10, kako bi se dobili klasično aktivirani M1, ili alternativno aktivirani M2a/M2c makrofagi. Ekspresija površinskih biljega utvrđena je protočnom citometrijom. (A) Reprezentativni dvoparametarski dijagram prednjeg, FS (eng. forward scatter) i bočnog, SS (eng. side scatter) rasapa svjetlosti prikazuje regiju koja veličinom i granuliranošću stanica odgovara M1 makrofagima (iz analize su isključeni raspadnuti dijelovi stanica i veće nakupine stanica). U daljnjoj analizi korištene su žive stanice (Ž). Mrtve i kasno apoptozne (M) stanice isključene su, temeljem visoke fluorescencije 7-aminoaktinomicina (7-AAD) u odnosu na žive stanice. (B) Razina ekspresije membranskih biljega CD163 i CD206 utvrđena je uporabom odgovarajućih monoklonskih protutijela obilježenih PE-om, odnosno FITC-om. Histogrami predstavljaju reprezentativne podatke od jednog donora i prikazuju razinu ekspresije membranskih CD163 i CD206 na M1 (bijeli histogrami), M2a (sivi histogrami) i M2c makrofagima (crni histogrami). (C) Prosječna razina membranske ekspresije CD163 (bijeli stupci) i CD206 (sivi stupci) na membrani aktiviranih makrofaga podrijetlom od različitih donora krvi, predstavljena je kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) ekspresije M2a/M2c u odnosu na M1 makrofage odgovarajućeg donora ± standardna devijacija. Statistički značajne razlike u razini ekspresije pojedinog biljega na membrani M2a/M2c u odnosu na M1 makrofage ($p<0,05$) označene su zvjezdicom. Pokus je ponovljen u duplikatu sa stanicama izoliranim od tri neovisna donora krvi.*

3.1.3 Citokinski profil hranidbenih medija aktiviranih makrofaga

Monociti su tijekom 7 dana izloženi djelovanju rh-GM-CSF, te rh-M-CSF, kako bi se potaknula diferencijacija u M1, odnosno M2 podtip. Tijekom posljednja 24 sata M1 makrofagi aktivirani su dodatkom LPS u rh-IFN-γ, a M2a/M2c makrofagi aktivirani su dodatkom rh-IL-4/rh-IL-10 u hranidbeni medij. Klasično i alternativno aktivirani makrofagi izlučuju karakteristične pro-, odnosno protuupalne citokine u svoju okolinu. Stoga, kako bi se dodatno potvrdila polarizacija stanica u željene podtipove, u staničnim supernatantima aktiviranih makrofaga utvrđena je razina izlučenih IFN-γ, IL-1β, IL-2, -4, -5, -6, -8, -10, -12p70, TNF-α i -β uporabom Human T_H1/T_H2 11plex RTU FlowCytomix kompleta i analizom pomoću Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*), prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.3. Ukratko, stanični supernatanti inkubirani su u smjesi zrnaca (s različitim intenzitetima fluorescencije) na koja su vezana protutijela protiv spomenutih humanih citokina. Količina vezanih citokina iz staničnih supernatanata na spomenutim zrncima, detektirana je na principu imunoenzimske metode sendvič ELISA, uporabom protutijela obilježenih biotinom, te inkubacijom sa streptavidin-PE konjugatom. Kao negativna eksperimentalna kontrola korištena su fluorescentna zrnca, a kao pozitivna kontrola otopine rekombinantnih humanih citokina iz kompleta.

Rezultati tri neovisna pokusa provedena u triplikatu sa stanicama izoliranim od različitih donora krvi, pokazali su da su supernatanti klasično aktiviranih M1 makrofaga imali povišenu razinu pro-upalnih citokina: razina IL-6 bila je 18±6,9 i 22±7,6 puta, IL-12 18±0,4 puta i 22±0,4 puta, te TNF-α 5,8±0,4 i 5,7±0,1 put viša kod supernatanata M1 u odnosu na M2a i M2c makrofage. Razina protuupalnog citokina IL-10 bila je 2,2±0,2 i 2,5±0,2 viša u supernatantima alternativno aktiviranih M2a i M2c u odnosu na klasično aktivirane M1 makrofage, što je odgovaralo literaturnim podacima [94] (Slika 3.3). Razlike u razini ekspresije IFN-γ, IL-1β, IL-2, -4, -5, -8 i TNF-β u supernatantima M1 i M2a/M2c stanica nisu zabilježene ($p>0,05$).

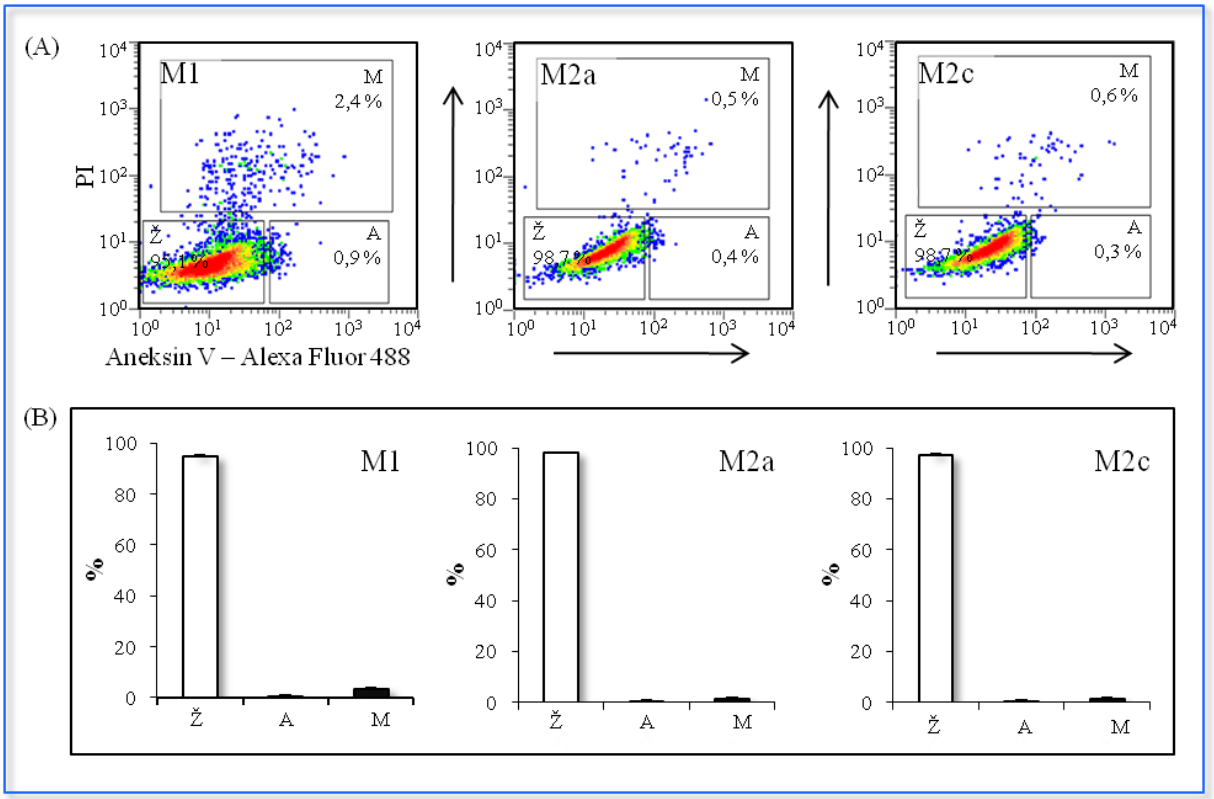


Slika 3.3 Citokinski profil hranidbenih medija aktiviranih makrofaga. *Humani monociti uzgajani su tijekom 7 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10, kako bi se dobili klasično aktivirani M1, ili alternativno aktivirani M2a/M2c makrofagi. U staničnim supernatantima protočnom citometrijom (uz odgovarajući analitički komplet) utvrđena je razina izlučenih citokina. (A) Histogrami predstavljaju reprezentativne podatke od jednog donora; prikazana je razina izlučenih IL-6, TNF-α, IL-12 i IL-10 u supernatantima M1 (bijeli histogrami), M2a (sivi histogrami) i M2c makrofaga (crni histogrami). (B) Prosječna razina izlučenih IL-6, TNF-α, IL-12 i IL-10 u supernatantima M1 (bijeli stupci), M2a (sivi stupci) i M2c makrofaga (crni stupci) podrijetlom od različitih donora krvi, predstavljena je kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) ekspresije M2a/M2c u odnosu na M1 makrofage odgovarajućeg donora ± standardna devijacija. Statistički značajne razlike u razini ekspresije pojedinog citokina M2c/M2c u odnosu na M1 makrofaga ($p<0,05$) označene su zvjezdicom. Pokus je ponovljen u triplikatu sa supernatantima stanica izoliranih iz tri neovisna donora krvi.*

3.1.4 Vijabilnost aktiviranih makrofaga

Humani monociti diferencirani su uzgajanjem uz rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ u klasično aktivirane ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10 u alternativno aktivirane M2a/M2c makrofage. Kako bi se provjerila vijabilnost dobivenih stanica utvrđen je udio živih, rano i kasno apoptoznih, te mrtvih stanica pomoću Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*). U ranoj fazi apoptoze, stanice na površini ispoljavaju fosfatidil-serin koji je moguće detektirati protočnom citometrijom pomoću fluorescentno obilježenog proteina aneksina V.

Za razliku od stanica u ranoj fazi, stanice u kasnoj fazi apoptoze i nekrozne stanice imaju narušen integritet membrane, te, uz vezanje aneksina V, postaju propusne i za fluorescentnu boju PI.



Slika 3.4 Vijabilnost aktiviranih makrofaga. *Humani monociti uzgajani su tijekom 7 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10, kako bi se dobili klasično aktivirani M1, ili alternativno aktivirani M2a/M2c makrofagi. Upotrebom protočnog citometra, temeljem prednjeg i bočnog rasapa svjetlosti, iz analize su isključene raspadnute stanice i nakupine stanica. Udio živih (Ž), rano apoptoznih (A), te mrtvih i kasno apoptoznih (M) stanica utvrđen je bojanjem pomoću Aneksina V obilježenog fluorescentnom bojom Alexa Fluor 488 i propidij jodida (PI). (A) Dvoparametarski dijagrami predstavljaju reprezentativne rezultate jednog donora. Utvrđen je udio živih (aneksin V-Alexa Fluor 488$^-$/PI$^-$), rano apoptoznih (aneksin V-Alexa Fluor 488$^+$/PI$^-$), te mrtvih i kasno apoptoznih (aneksin V-Alexa Fluor 488$^+$/PI$^+$) stanica. (B) Bijeli stupci označuju žive (Ž), sivi rano apoptozne (A), a crni kasno apoptozne i mrtve stanice (M). Udio pojedinih stanica prikazan je kao postotak ukupnih stanica ± standardna devijacija. Pokus je ponovljen u duplikatu sa stanicama izoliranim od tri neovisna donora krvi.*

Temeljem morfoloških karakteristika (FS i SS) u analizu su uključene samo pojedine stanice. Stanice koje nisu inkubirane s fluorescentnim bojama/aneksinom V, uporabljene su kao negativna kontrola za utvrđivanje razine autofluorescencije M1, M2a i M2c makrofaga

pri uporabljenim valnim duljinama svjetlosti. Inkubiranjem aktiviranih makrofaga s aneksinom V obilježenim fluorescentnom bojom Alexa Fluor488 i PI (prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.2), utvrđen je postotak živih, rano i kasno apoptoznih, te mrtvih stanica.

Rezultati tri neovisna pokusa provedena u duplikatu sa stanicama izoliranim od različitih donora krvi, pokazali su da je među aktiviranim makrofagima 96,7±1,6% stanica bilo živo (aneksin V – Alexa Fluor488$^-$/PI$^-$), 0,25±0,2% stanica je bilo u ranoj fazi apoptoze (aneksin V – Alexa Fluor488$^+$/PI$^-$), a 1,99±1,8% stanica je bilo u kasnoj fazi apoptoze/nekrozi (aneksin V – Alexa Fluor488$^+$/PI$^+$) (Slika 3.4).

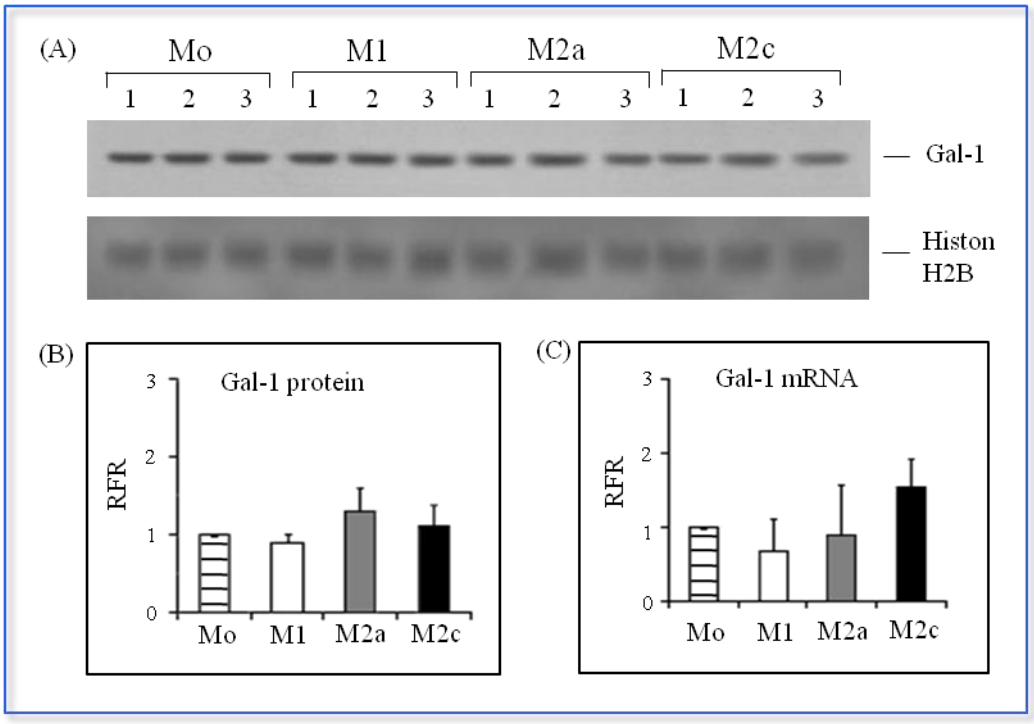
3.2 Ekspresija galektina-1 i -3 u monocita i aktiviranih makrofaga

Fiziologija galektina-1 i -3 u procesima diferencijacije i aktivacije makrofaga slabo je poznata. Premda dosad nije razjašnjeno kako djeluje na ekspresiju galektina-1, prilikom diferencijacije monocitnih staničnih linija u makrofage, kao i diferencijacije monocita u dendritičke stanice dolazi do rasta ekspresije galektina-3 na genskoj i proteinskoj razini. U tu svrhu, humani monociti izolirani iz periferne krvi diferencirani su kultiviranjem uz rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ u klasično aktivirane ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10 u alternativno aktivirane M2a/M2c makrofage. U monocita, te klasično i alternativno aktiviranih humanih makrofaga, na genskoj i proteinskoj razini, ispitana je ekspresija ovih galektina, a utvrđena je i razina njihove ekspresije na membrani makrofaga u odnosu na monocite. Poznato je da stanice imunosnog sustava u međustanični prostor mogu izlučiti galektin-3 koji ima autokrino ili parakrino djelovanje pa je stoga ispitana sposobnost monocita i aktiviranih makrofaga da u hranidbeni medij izlučuju galektin-3.

3.2.1 Proteinska i genska ekspresija galektina-1 i -3 u monocita i aktiviranih makrofaga

Humani monociti diferencirani su u klasično i alternativno aktivirane makrofage (prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.1.3). Razina ekspresije galektina-1 na proteinskoj razini u monocita, te aktiviranih makrofaga ispitana je imunoblot analizom. Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su prenijeti na PVDF membranu, te je galektin-1 vizualiziran kemiluminiscencijom, uporabom odgovarajućih protutijela. U svakom je uzorku na isti način određena razina konstitutivno eksprimiranog proteina histona H2B. Intenzitet dobivenih vrpci galektina-1 procijenjen je pomoću kompjuterskog programa ImageJ 1.44p, na način opisan u

poglavlju 2.2.4.3, a rezultati (za svaki uzorak) normirani su prema intenzitetu dobivenih vrpca histona H2B.



Slika 3.5 Proteinska i genska ekspresija galektina-1 u monocita i aktiviranih makrofaga. *Humani monociti (Mo) uzgajani su tijekom 7 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10, kako bi se dobili klasično aktivirani M1, ili alternativno aktivirani M2a/M2c makrofagi. (A) Imunoblot analiza ekspresije galektina-1 (Gal-1) i kontrolnog proteina histona H2B u monocita i aktiviranih makrofaga od tri (1, 2 i 3) reprezentativna donora krvi. (B) Prosječna razina ekspresije Gal-1 u staničnim homogenatima Mo (bijeli isprugani stupci), M1 (bijeli stupci), M2a (sivi stupci) i M2c (crni stupci) makrofaga izoliranih iz različitih donora, normalizirana je na razinu ekspresije histona H2B i predstavljena kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) ekspresije makrofaga u odnosu na monocite odgovarajućeg donora ± standardna devijacija. (C) Prosječna razina ekspresije mRNA Gal-1 u monocitima (bijeli isprugani stupci), M1 (bijeli stupci), M2a (sivi stupci) i M2c makrofagima (crni stupci) izoliranim od različitih donora mjerena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu. Razina ekspresije mRNA Gal-1 normalizirana je na razinu ekspresije mRNA kontrolnog GAPDH gena i predstavljena kao RFR ekspresije makrofaga u odnosu na monocite odgovarajućeg donora ± standardna devijacija. Pokus je ponovljen sa stanicama izoliranim od sedam neovisnih donora krvi.*

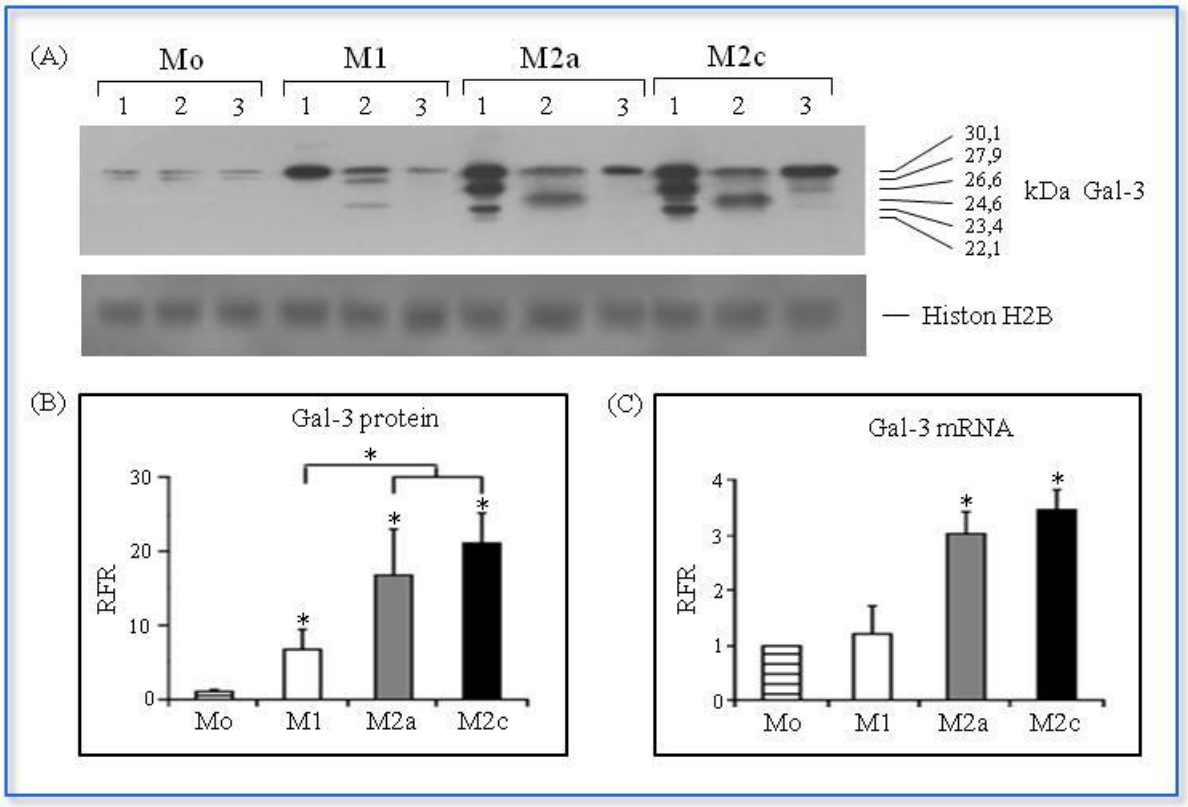
Nakon izolacije RNA i reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimerazom, relativna količina mRNA galektina-1 u monocitima i aktiviranim makrofagima određena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu pomoću instrumenta

ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (*Applied Biosystems*), prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.5.3. Dobiveni rezultati za svaki su uzorak normirani na razinu ekspresije konstitutivno eksprimiranog gena GAPDH.

Rezultati pokusa provedenih sa stanicama izoliranim od sedam različitih donora krvi, pokazali su da tijekom aktivacije M1 i M2a/M2c makrofaga nije došlo do promjene ekspresije galektina-1 ni na genskoj niti na proteinskoj razini, mjereno u odnosu na monocite prikupljene odmah nakon njihova izdvajanja iz perifernih mononuklearnih stanica ($p>0,05$) (Slika 3.5A, 3.5B i 3.5C).

Razina ekspresije galektina-3 na proteinskoj razini u monocita, te aktiviranih makrofaga ispitana je imunoblot analizom. Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su prenijeti na PVDF membranu, te je galektin-3 vizualiziran kemiluminiscencijom, uporabom odgovarajućih protutijela. U svakom je uzorku na isti način određena razina konstitutivno eksprimiranog proteina histona H2B. Intenzitet dobivenih vrpci galektina-3 procijenjen je pomoću kompjuterskog programa ImageJ 1.44p, na način opisan u poglavlju 2.2.4.3, a rezultati su (za svaki uzorak) normirani prema intenzitetu dobivenih vrpca histona H2B. Rezultati pokusa provedenih sa stanicama izoliranim od sedam različitih donora krvi, pokazali su da je ekspresija galektina-3 na proteinskoj razini u aktiviranih makrofaga znatno povišena u odnosu na monocite. Tako M1 makrofagi imaju 6,8±2,9 puta, M2a 16,7±6,3 i M2c 21,0±4,5 puta višu ekspresiju galektina-3 u odnosu na monocite prikupljene odmah nakon njihova izdvajanja iz perifernih mononuklearnih stanica (Slika 3.6A i 3.6B). Međutim, zamijećena je značajna varijabilnost u ekspresiji galektina-3 u makrofaga dobivenih diferencijacijom monocita različitih donora krvi (Slika 3.6A). Također, razina ekspresije ovog proteina značajno je povišena u oba tipa alternativno aktiviranih makrofaga (~2,5 puta u M2a i ~3,0 puta u M2c) u odnosu na klasično aktivirane M1 makrofage, dok međusobne razlike u ekspresiji galektina-3 M2a i M2c makrofaga nisu bile toliko naglašene (Slika 3.6B). Osim različitog intenziteta ekspresije, kod različitih je donora zamijećena i varijabilnost u broju detektiranih vrpci u aktiviranih makrofaga, ali ne i monocita. Kod svih ispitanih monocita zamijećene su dvije vrpce koje odgovaraju galektinu-3 molekulske mase 30,1 i 27,9 kDa. U aktiviranih makrofaga, uz vrpcu koja odgovara glavnoj formi galektina-3 (veličine 30,1 Kda), pronađena je jedna do čak pet dodatnih vrpci (od 27,9, 26,6, 24,6, 23,4 i 22,1 kDa). Kod M1 klasično aktiviranih makrofaga većine donora detektirane su dvije vrpce, no neki su imali dodatnu vrpcu galektina-3 veličine 24,6 kDa. Suprotno tome, u alternativno aktiviranih makrofaga svih donora, zamijećene su više od dvije vrpce koje su odgovarale skraćenom (*eng.* truncated) galektinu-3. Konačno, intenzitet spomenutih vrpci galektina-3 izrazito je

varirao među istim podtipovima makrofaga dobivenih diferencijacijom monocita podrijetlom iz različitih donora krvi (Slika 3.6A).



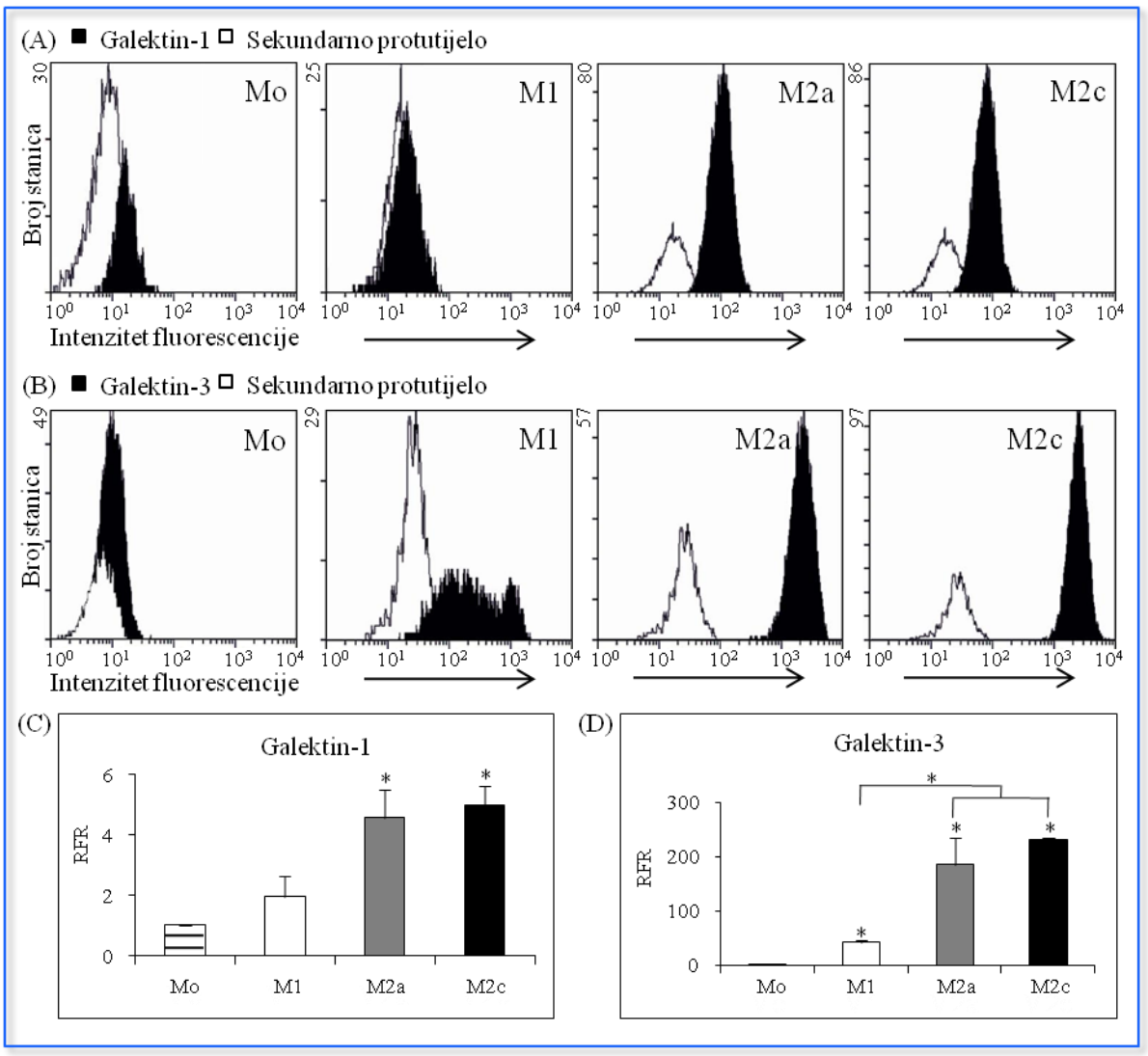
Slika 3.6 Proteinska i genska ekspresija galektina-3 u monocita i aktiviranih makrofaga. *Humani monociti (Mo) uzgajani su tijekom 7 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10, kako bi se dobili klasično aktivirani M1, ili alternativno aktivirani M2a/M2c makrofagi. (A) Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 (Gal-3) i kontrolnog proteina histona H2B u monocita i aktiviranih makrofaga od tri (1, 2 i 3) reprezentativna donora krvi. (B) Prosječna razina ekspresije Gal-3 u staničnim homogenatima, izoliranim od različitih donora, normalizirana je na razinu ekspresije histona H2B i predstavljena kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) ekspresije makrofaga u odnosu na monocite odgovarajućeg donora ± standardna devijacija. (C) Prosječna razina ekspresije mRNA Gal-3 u monocitima (bijeli isprugani stupci), M1 (bijeli stupci), M2a (sivi stupci) i M2c makrofagima (crni stupci) izoliranim od različitih donora mjerena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu. Razina ekspresije mRNA Gal-3 normalizirana je na razinu ekspresije mRNA kontrolnog GAPDH gena i predstavljena kao RFR ekspresije makrofaga u odnosu na monocite odgovarajućeg donora ± standardna devijacija. Statistički značajne razlike razine u razini ekspresije Gal-3 proteina i mRNA M2a/M2c u odnosu na M1 makrofage ($p<0,05$) označene su zvjezdicom. Pokus je ponovljen sa stanicama izoliranim od sedam neovisnih donora krvi.*

Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimerazom, relativna količina mRNA galektina-3 u monocitima i aktiviranim makrofagima određena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu pomoću instrumenta ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (*Applied Biosystems*), prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.5.3. Dobiveni rezultati za svaki su uzorak normirani na razinu ekspresije konstitutivno eksprimiranog gena GAPDH. Pokusi su provedeni sa stanicama izoliranim od sedam različitih donora krvi. Ekspresija galektina-3 na genskoj razini bila je blago povišena u oba tipa alternativno aktiviranih makrofaga (u M2a 3,0±0,4 puta, a u M2c 3,5±0,4 puta) u odnosu na razinu ekspresije monocita, dok je razina ekspresije M1 klasično aktiviranih makrofaga bila ista onoj u monocita ($p>0,05$) (Slika 3.6C).

3.2.2 Membranska ekspresija galektina-1 i -3 u monocita i aktiviranih makrofaga

Humani monociti diferencirani su uzgajanjem uz rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ u klasično aktivirane ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10 u alternativno aktivirane M2a/M2c makrofage. Galektin-1 i -3 detektirani su na površini monocita prikupljenih odmah nakon izdvajanja iz perifernih mononuklearnih stanica kao i na površini aktiviranih makrofaga pomoću Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*). Temeljem morfoloških karakteristika (FS i SS) isključeni su raspadnuti dijelovi stanica i nakupine stanica pa su analizirane samo pojedine stanice. Stanice inkubirane s odgovarajućim fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima uporabljene su kao negativna kontrola za utvrđivanje razine autofluorescencije i nespecifične fluorescencije pri uporabljenim valnim duljinama svjetlosti. Mrtvi i kasno apoptozni monociti i makrofagi isključeni su, temeljem visoke fluorescencije boje za vijabilnost 7-AAD u odnosu na žive/neobilježene stanice. Razina ekspresije galektina-1 i -3 vezanih na membrani određena je protočnom citometrijom uporabom primarnih i odgovarajućih sekundarnih protutijela, obilježenih s FITC i PE, prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.1.

Rezultati šest neovisnih pokusa provedenih u duplikatu sa stanicama izoliranim od različitih donora krvi, pokazali su da je većina analiziranih stanica (94,8±2,7% monocita, 88,2±6,7% M1, 97,6±2,4% M2a i 98±1,3% M2c makrofaga) živa, odnosno 7-AAD-negativna. U klasično aktiviranih makrofaga nije zamijećena povišena razina ekspresije površinskog galektina-1 ($p>0,05$), no alternativnu aktivaciju makrofaga prati povišena razina ekspresije ovog lektina na membrani (u M2a 4,6±0,9, a u M2c 5,0±0,7 puta) u odnosu na monocite (Slike 3.7A i 3.7C).



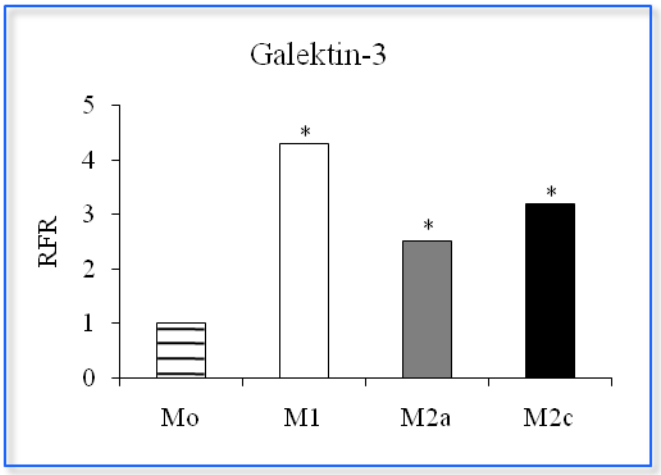
Slika 3.7 Ekspresija galektina-1 i -3 na membrani monocita i aktiviranih makrofaga. *Humani monociti (Mo) uzgajani su tijekom 7 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10, kako bi se dobili klasično aktivirani M1, ili alternativno aktivirani M2a/M2c makrofagi. Upotrebom protočnog citometra, temeljem prednjeg i bočnog rasapa svjetlosti, iz analize su isključene raspadnute stanice i nakupine stanica, dok su mrtve stanice isključene bojanjem pomoću 7-aminoaktinomicina (7-AAD). Galektin-1 i -3 detektirani su uporabom primarnih, te sekundarnih, fluorescentno obilježenih, protutijela. Histogrami predstavljaju podatke prikupljene od reprezentativnog donora; crni histogrami prikazuju razinu ekspresije galektina-1 (A) i -3 (B) na membrani monocita i aktiviranih makrofaga, a bijeli histogrami odgovaraju nespecifičnom vezanju odgovarajućih fluorescentno obilježenih sekundarnih protutijela. Prosječna razina ekspresije galektina-1 (C) i -3 (D) na membrani monocita (Mo, bijeli isprugani stupci), M1 (bijeli stupci), M2a (sivi stupci) i M2c makrofaga (crni stupci) izoliranih iz različitih donora predstavljena je kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) makrofaga u odnosu na monocite odgovarajućeg donora (prosječni intenzitet fluorescencije ± standardna devijacija, (normirano na fluorescenciju koja odgovara nespecifičnom vezanju sekundarnih protutijela). Statistički značajne razlike u razini ekspresije galektina-1 i -3 kod pojedinih stanica ($p<0,05$) označene su zvjezdicom. Pokus je ponovljen u duplikatu sa stanicama izoliranim od 6 donora krvi.*

Vrlo niska razina ekspresije vezanog galektina-3 detektirana je na membrani monocita, no razina njegove ekspresije silno raste na površini oba tipa aktiviranih makrofaga. Tako su alternativno aktivirani M2a i M2c makrofagi imali 186,0±48.8 i 230,6±4,5 puta višu razinu ekspresije u odnosu na monocite, dok su klasično aktivirani makrofagi imali 42,1±3,0 puta višu razinu ekspresije u odnosu na iste stanice (Slika 3.7B i 3.7D). Zanimljivo je napomenuti, da su populacije analiziranih monocita i alternativno aktiviranih makrofaga svih donora bile relativno homogene (što sugerira ujednačenu raspodjelu galektina-3 na membrani svih stanica), dok su u klasično aktiviranih makrofaga zamijećene dvije populacije: heterogena populacija s nižom razinom ekspresije i homogena populacija s relativno višom razinom ekspresije membranskog galektina-3 (prosječni porast srednje vrijednosti fluorescencije bio je pet puta viši) (Slika 3.7B).

3.2.3 Izlučivanje galektina-3 monocita i aktiviranih makrofaga

Humani monociti diferencirani su uzgajanjem uz rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ u klasično aktivirane ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10 u alternativno aktivirane M2a/M2c makrofage. Metodom ELISA ispitana je sposobnost monocita, te aktiviranih makrofaga da izlučuju proizvedeni galektin-3. Ukratko, koncentracija galektina-3 izlučenog u hranidbeni medij stanica određena je uporabom imunoenzimske metode sendvič ELISA pomoću Quantikine Human Gal-3 Immunoassay kompleta, a apsorbancija uzoraka određena je pomoću spektrofotometra Victor^2 1420 Multilabel Counter (*PerkinElmer*), prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.6.

Provedeno je sedam neovisnih pokusa u duplikatu sa stanicama izoliranim od različitih donora krvi. Zbog različitog broja stanica u pojedinom uzorku, izmjerene koncentracije normirane su na koncentraciju galektina-3 koju izlučuje 10^6 stanica u 1 mL hranidbenog medija. Razina galektina-3 u supernatantima makrofaga bila je znatno viša od one izmjerene u supernatantu monocita uzgajanih 24 sata u hranidbenom mediju. Alternativno aktivirani makrofagi lučili su 45,1±1,7% (M2a) i 28,8±4,3% (M2c) manje galektina-3 u odnosu na klasično aktivirane (M1) makrofage. Međutim, kao i kod razine ekspresije ukupnog staničnog galektina-3, i pri njegovu izlučivanju zamijećena je velika varijabilnost među istim podtipovima stanica dobivenim od različitih donora krvi. Primjerice, koncentracije galektina-3 izlučenog u hranidbeni medij M1 makrofaga iznosile su od 0,13 do 0,26 nM po 10^6 stanica/mL. (Slika 3.8.)

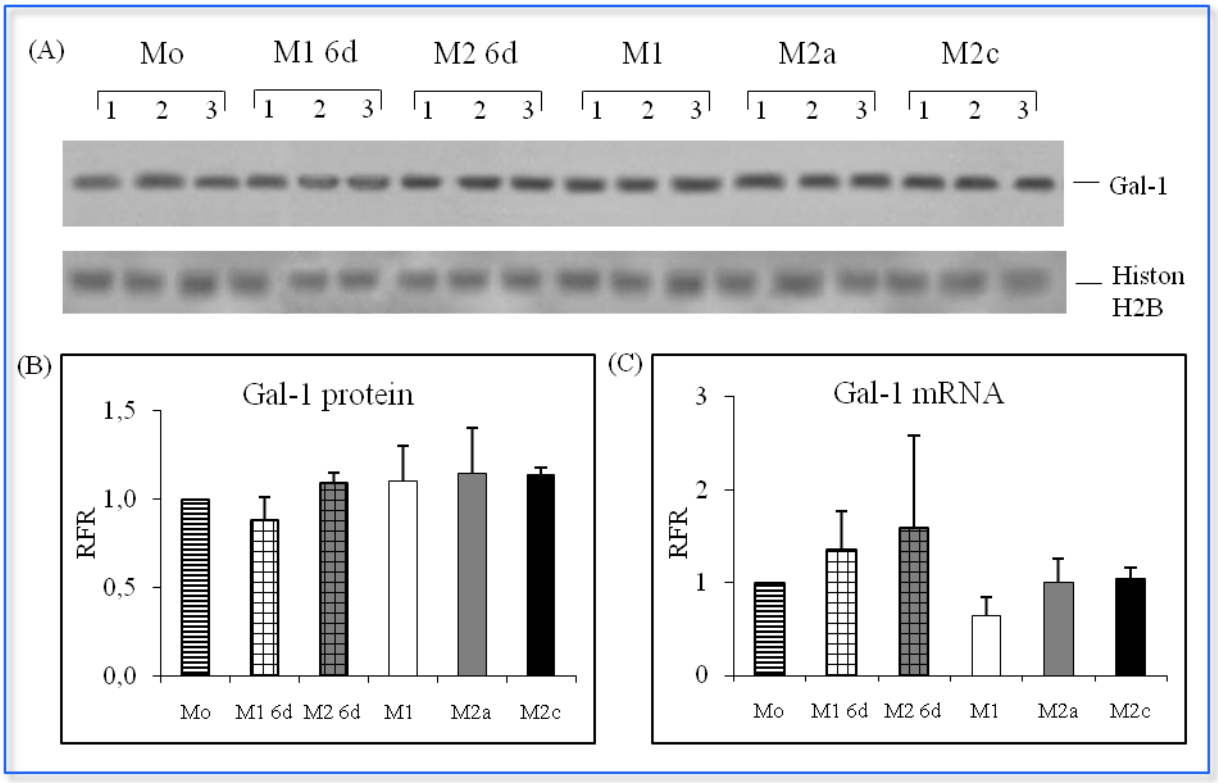


Slika 3.8 Izlučivanje galektina-3 monocita i aktiviranih makrofaga. *Humani monociti (Mo) uzgajani su tijekom 7 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10, kako bi se dobili klasično aktivirani M1, ili alternativno aktivirani M2a/M2c makrofagi. Koncentracija izlučenog galektina-3 u supernatantu Mo uzgajanih 24 sata u hranidbenom mediju (bijeli isprugani stupci) i aktiviranih M1 (bijeli stupci), M2a (sivi stupci) i M2c (crni stupci) makrofaga izmjerena je metodom ELISA i prikazana kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) izlučivanja makrofaga u odnosu na monocite. Prikazani su reprezentativni rezultati. Statistički značajne razlike u razini izlučenog galektina-3 makrofaga u odnosu na Mo ($p<0,05$) označene su zvjezdicom.*

3.3 Ekspresija galektina-1 i -3 u diferenciranih makrofaga

Kako bi se provjerilo jesu li ekspresijski profili galektina-1 i -3, zamijećeni u aktiviranih makrofaga, rezultat diferencijacije, ili pak aktivacije diferenciranih makrofaga, analizirani su ekspresijski profili ovih galektina u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga podrijetlom od istih donora krvi. U tu svrhu, humani monociti izolirani iz periferne krvi diferencirani su uzgajanjem uz rh-GM-CSF u M1 (M1 6d) ili rh-M-CSF u M2 makrofage (M2 6d). Dio M1 stanica potom je aktiviran klasično uzgojem tijekom 24 sata uz dodatak IFN-γ/LPS, a dio M2 stanica aktiviran je alternativno u M2a/M2c fenotip uzgojem uz dodatak IL-4/IL-10. U monocita, diferenciranih, te različito aktiviranih makrofaga, na genskoj i proteinskoj razini, ispitana je ekspresija galektina-1 i -3, a utvrđena je i razina njihove ekspresije na membrani svih tipova stanica. Ispitana je sposobnost monocita, diferenciranih i različito aktiviranih makrofaga da u hranidbeni medij izlučuju galektin-3.

3.3.1 Proteinska i genska ekspresija galektina-1 i -3 u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga



Slika 3.9 Proteinska i genska ekspresija galektina-1 u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga. *Humani monociti (Mo) uzgajani su tijekom 6 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF ili rh-M-CSF, kako bi se dobili diferencirani M1 (M1 6d) ili M2 (M2 6d) makrofagi. Dio M1 stanica aktiviran je tijekom 24 sata uzgojem uz dodatak IFN-γ/LPS, a dio M2 stanica u M2a/M2c fenotip uzgojem uz dodatak IL-4/IL-10. (A) Imunoblot analiza ekspresije galektina-1 (Gal-1) i kontrolnog proteina histona H2B u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga od tri (1, 2 i 3) donora krvi. (B) Prosječna razina ekspresije Gal-1 u staničnim homogenatima, Mo (bijeli isprugani stupci), M1 6d (bijeli iscrtani stupci), M2 6d (sivi iscrtani stupci), M1 (bijeli stupci), M2a (sivi stupci) i M2c (crni stupci) makrofaga izoliranih iz različitih donora, normalizirana je na razinu ekspresije histona H2B i predstavljena kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) ekspresije makrofaga u odnosu na monocite odgovarajućeg donora ± standardna devijacija. (C) Prosječna razina ekspresije mRNA Gal-1 u stanicama izoliranim od različitih donora mjerena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu. Razina ekspresije mRNA Gal-1 normalizirana je na razinu ekspresije mRNA kontrolnog GAPDH gena i predstavljena kao RFR ekspresije makrofaga u odnosu na monocite odgovarajućeg donora ± standardna devijacija. Pokus je ponovljen sa stanicama izoliranim od tri neovisna donora krvi.*

Humani monociti diferencirani su u M1 i M2 makrofage (prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.1.3). Razina ekspresije galektina-1 na proteinskoj razini u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga ispitana je imunoblot analizom. Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su prenijeti na PVDF membranu, te je galektin-1 vizualiziran kemiluminiscencijom, uporabom odgovarajućih protutijela. U svakom je uzorku na isti način određena razina konstitutivno eksprimiranog proteina histona H2B. Intenzitet dobivenih vrpci galektina-1 procijenjen je pomoću kompjuterskog programa ImageJ 1.44p, na način opisan u poglavlju 2.2.4.3, a rezultati (za svaki uzorak) normirani su prema intenzitetu dobivenih vrpca histona H2B.

Nakon izolacije RNA i reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimerazom, relativna količina mRNA galektina-1 u monocitima, diferenciranim i aktiviranim makrofagima određena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu pomoću instrumenta ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (*Applied Biosystems*), prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.5.3. Dobiveni rezultati za svaki su uzorak normirani na razinu ekspresije konstitutivno eksprimiranog gena GAPDH.

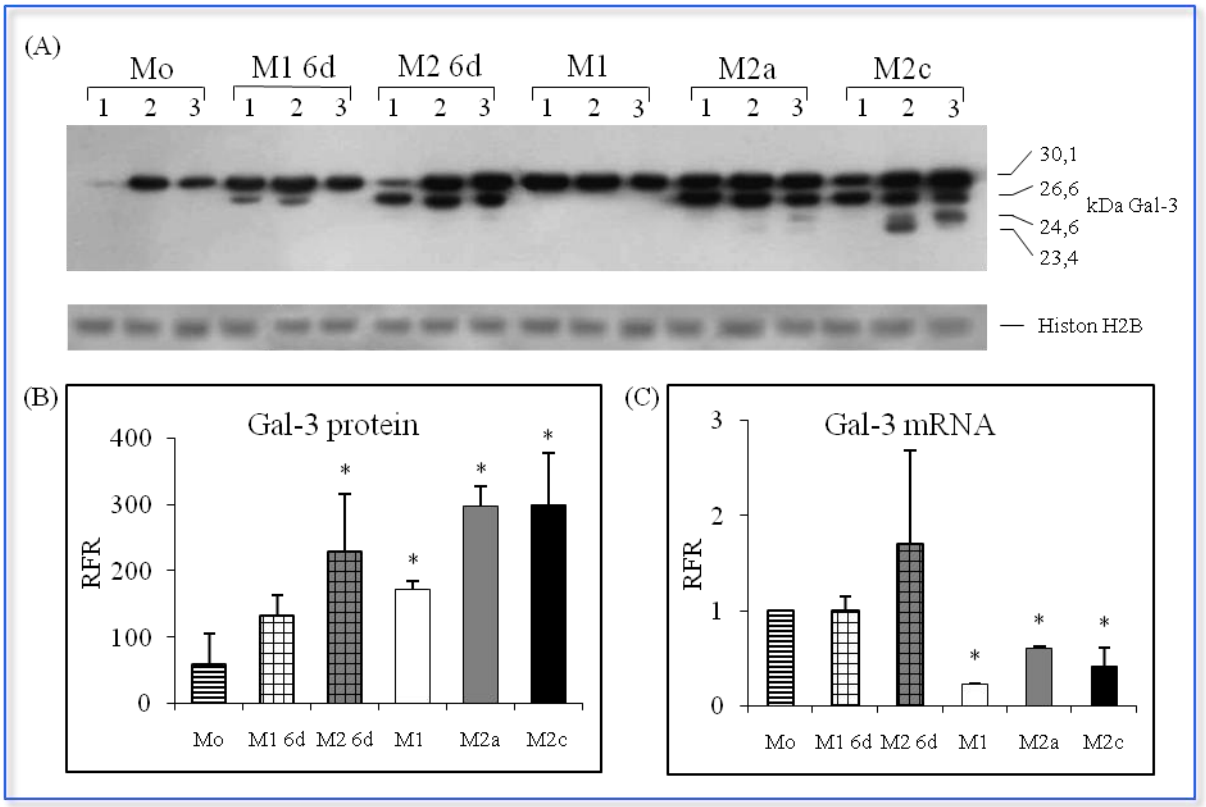
Rezultati pokusa provedenih na stanicama izoliranim od tri neovisna donora krvi, pokazali su da tijekom diferencijacije monocita u M1 i M2 makrofage, kao ni tijekom aktivacije makrofaga, nije došlo do promjene ekspresije galektina-1 ni na genskoj niti na proteinskoj razini, mjereno u odnosu na monocite prikupljene odmah nakon njihova izdvajanja iz perifernih mononuklearnih stanica ($p>0,05$) (Slika 3.9A, 3.9B i 3.9C).

Razina ekspresije galektina-3 na proteinskoj razini u monocita, te diferenciranih i aktiviranih makrofaga ispitana je imunoblot analizom. Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su prenijeti na PVDF membranu, te je galektin-3 vizualiziran kemiluminiscencijom, uporabom odgovarajućih protutijela. U svakom je uzorku na isti način određena razina konstitutivno eksprimiranog proteina histona H2B. Intenzitet dobivenih vrpci galektina-3 procijenjen je pomoću kompjuterskog programa ImageJ 1.44p, na način opisan u poglavlju 2.2.4.3, a rezultati su (za svaki uzorak) normirani prema intenzitetu dobivenih vrpca histona H2B.

Rezultati pokusa provedenih sa stanicama izoliranim od tri različita donora krvi, pokazali su da ekspresija galektina-3 na proteinskoj razini raste prilikom diferencijacije monocita u makrofage, dok promjene ekspresije nisu tako naglašene prilikom aktivacije diferenciranih stanica. Tako tijekom tretmana GM-CSF ili M-CSF, odnosno diferencijacijom monocita u M1 ili M2 podtip makrofaga, ekspresija galektina-3 raste 6,9±9,1, odnosno 7,9±7,7 puta u odnosu

na monocite odgovarajućeg donora krvi prikupljene odmah nakon izdvajanja iz perifernih mononuklearnih stanica. Klasičnu M1 aktivaciju makrofaga prati porast ekspresije galektina-3 od 1,3±0,2 puta, a alternativnu M2a i M2c 1,5±0,8 i 1,4±0,2 puta u odnosu na pojedini podtip diferenciranih stanica (Slika 3.10A i 3.10B). Zamijećena je izrazita varijabilnost u ekspresiji galektina-3 u monocita, a u manjoj mjeri i diferenciranih, te aktiviranih makrofaga dobivenih od monocita različitih donora krvi (Slika 3.10A). Premda je kod svih monocita detektiran jednak broj vrpci koje odgovaraju galektinu-3, u različitih je donora zamijećena izrazita varijabilnost u njihovu intenzitetu. U diferenciranih M1 i M2, te kod različito aktiviranih makrofaga, razlike u ukupnoj ekspresiji između istih podtipova stanica dobivenih od različitih donora nisu bile toliko naglašene kao u monocita, no zamijećena je varijabilnost broja i intenziteta pojedinih vrpci koje odgovaraju galektinu-3. U makrofaga dobivenih diferencijacijom monocita pomoću rh-GM-CSF, kod većine donora zamijećene su dvije vrpce koje odgovaraju galektinu-3 molekulske mase 30,1 i 26,6 kDa, dok je kod nekih donora zamijećena samo osnovna forma ovog proteina. Dominantna forma kod M1 makrofaga bila je osnovna forma galektina-3 (molekulske mase 30,1 kDa). U makrofaga dobivenih diferencijacijom monocita pomoću rh-M-CSF, kod svih donora zamijećene su vrpce od 30,1 i 26,6 kDa. Kod većine donora obje forme bile su podjednako zastupljene, a kod nekih je dominirala iskidana forma galektina-3 od 26,6 kDa. Klasičnu aktivaciju M1 makrofaga uzgojem uz dodatak IFN-γ/LPS pratila je ekspresija osnovne forme, dok je alternativnu aktivaciju pratilo pojačano kidanje galektina-3. Tako se kultiviranjem M2 makrofaga u mediju uz dodatak IL-4 ekspresija galektina-3 i dominantnih formi (od 30,1 i 26,6 kDa) nije znatno mijenjala, no pojačavalo se njegovo kidanje, pa su detektirane dodatne, skraćene forme galektina-3 molekulske mase 24,6 i 23,4 kDa. Aktivacijom M2 makrofaga pomoću IL-10 u M2c fenotip, ukupna ekspresija i ekspresija formi od 30,1 i 26,6 kDa također se ne mijenja, no raste ekspresija (7,5±2,3 puta) skraćenih formi galektina-3 molekulske mase 24,6 i 23,4 kDa.

Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije praćene lančanom reakcijom polimerazom, relativna količina mRNA galektina-3 u monocitima, diferenciranim i aktiviranim makrofagima određena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu pomoću instrumenta ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (*Applied Biosystems*), prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.5.3. Dobiveni rezultati za svaki su uzorak normirani na razinu ekspresije konstitutivno eksprimiranog gena GAPDH. Pokusi su provedeni sa stanicama izoliranim od tri različita donora krvi.



Slika 3.10 Proteinska i genska ekspresija galektina-3 u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga. *Humani monociti (Mo) uzgajani su tijekom 6 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF ili rh-M-CSF, kako bi se dobili diferencirani M1 (M1 6d) ili M2 (M2 6d) makrofagi. Dio M1 stanica aktiviran je tijekom 24 sata uzgojem uz dodatak IFN-γ/LPS, a dio M2 stanica u M2a/M2c fenotip uzgojem uz dodatak IL-4/IL-10. (A) Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 (Gal-3) i kontrolnog proteina histona H2B u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga od tri (1, 2 i 3) donora krvi. (B) Prosječna razina ekspresije Gal-3 u staničnim homogenatima, Mo (bijeli isprugani stupci), M1 6d (bijeli iscrtani stupci), M2 6d (sivi iscrtani stupci), M1 (bijeli stupci), M2a (sivi stupci) i M2c (crni stupci) makrofaga izoliranih iz različitih donora, normalizirana je na razinu ekspresije histona H2B i predstavljena kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) ekspresije makrofaga u odnosu na monocite odgovarajućeg donora ± standardna devijacija. (C) Prosječna razina ekspresije mRNA Gal-3 u stanicama izoliranim od različitih donora mjerena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu. Razina ekspresije mRNA Gal-1 normalizirana je na razinu ekspresije mRNA kontrolnog GAPDH gena i predstavljena kao RFR ekspresije makrofaga u odnosu na monocite odgovarajućeg donora ± standardna devijacija. Statistički značajne razlike u razini ekspresije galektina-3 ($p<0,05$) u odnosu na Mo, označene su zvjezdicom. Pokus je ponovljen sa stanicama izoliranim od tri neovisna donora krvi.*

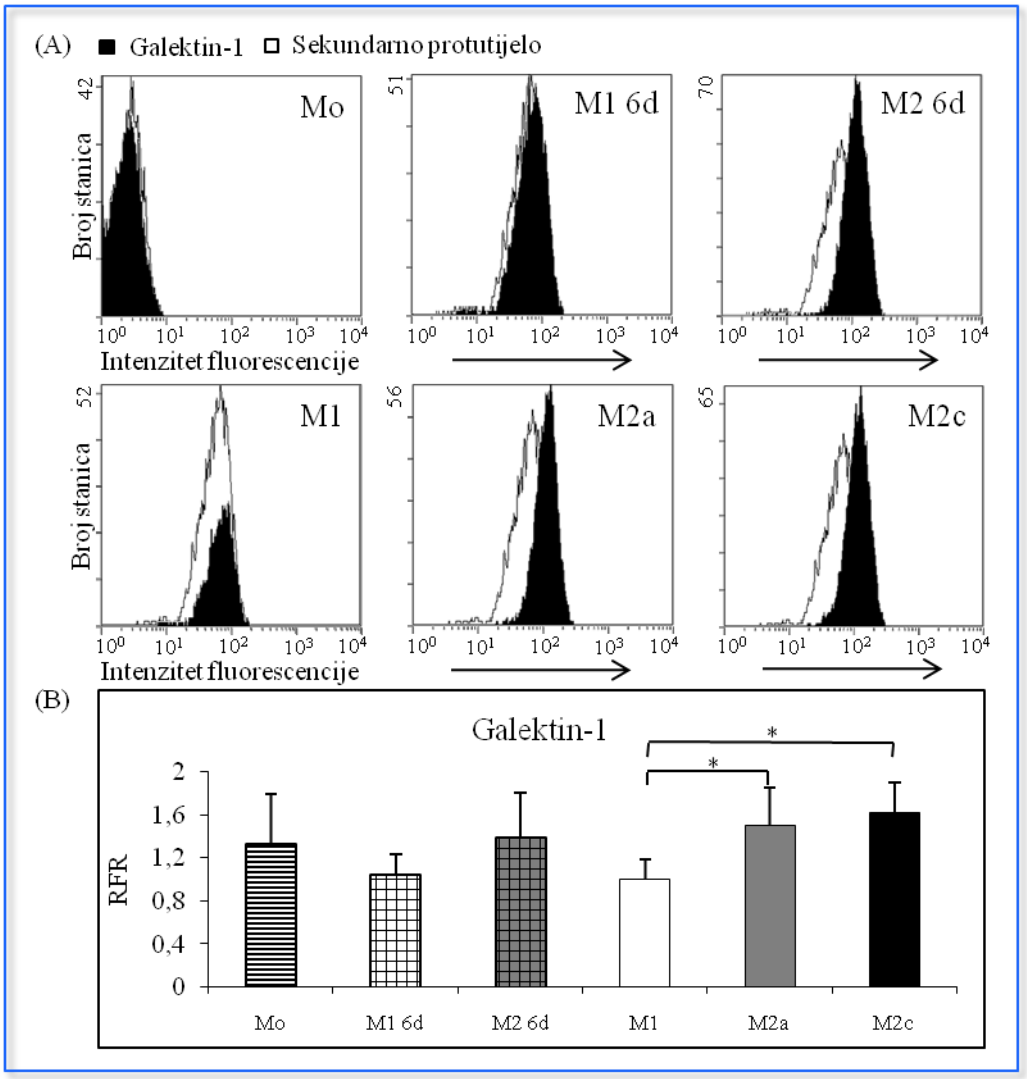
Rezultati pokusa provedenih sa stanicama izoliranim od tri različita donora krvi, pokazali su da se ekspresija galektina-3 na genskoj razini ne mijenja ($p<0,05$) prilikom diferencijacije

makrofaga u odnosu na monocite odgovarajućeg donora. Aktivacijom diferenciranih M1 makrofaga pomoću LPS i IFN-γ, razina mRNA galektina-3 pada za 4,5±0,9 puta, dok alternativnom aktivacijom M2a/M2c makrofaga pomoću IL-4 ili IL-10 razina ekspresije pada za 2,8±1,6, odnosno 5,0±3,5 puta u odnosu na diferencirane M2 makrofage.

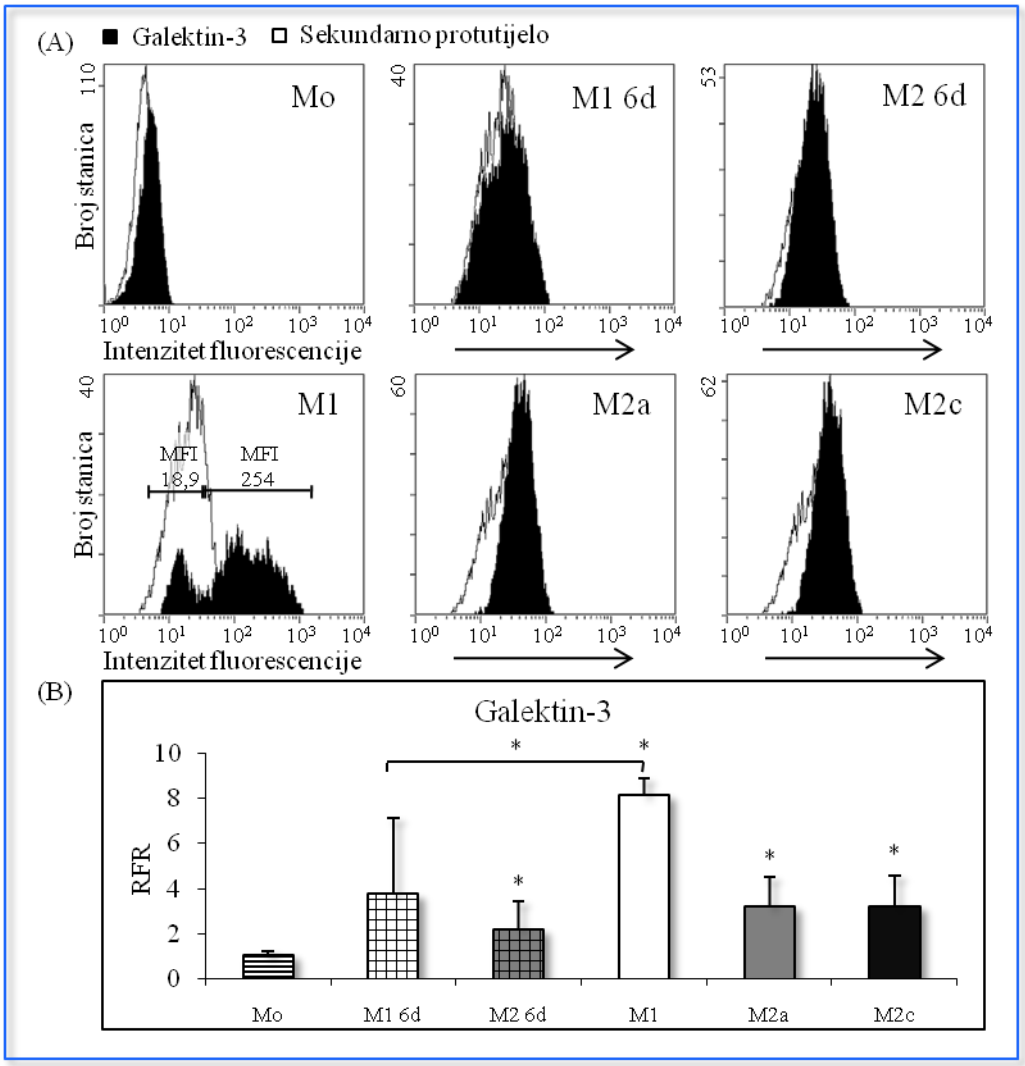
3.3.2 Membranska ekspresija galektina-1 i -3 u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga

Humani monociti izolirani iz periferne krvi diferencirani su uzgajanjem uz rh-GM-CSF u M1 ili rh-M-CSF u M2 makrofage. Dio M1 stanica potom je aktiviran klasično uzgojem tijekom 24 sata uz dodatak IFN-γ/LPS, a dio M2 stanica aktiviran je alternativno u M2a/M2c fenotip uzgojem uz dodatak IL-4/IL-10. Galektin-1 i -3 detektirani su na površini monocita prikupljenih odmah nakon izdvajanja iz perifernih mononuklearnih stanica kao i na površini različito diferenciranih, te različito aktiviranih makrofaga pomoću Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*). Temeljem morfoloških karakteristika (FS i SS) isključeni su raspadnuti dijelovi stanica i nakupine stanica pa su analizirane samo pojedine stanice. Stanice inkubirane s odgovarajućim fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima uporabljene su kao negativna kontrola za utvrđivanje razine autofluorescencije i nespecifične fluorescencije pri uporabljenim valnim duljinama svjetlosti. Mrtvi i kasno apoptozni monociti i makrofagi isključeni su, temeljem visoke fluorescencije boje za vijabilnost 7-AAD u odnosu na žive/neobilježene stanice. Razina ekspresije galektina-1 i -3 vezanih na membrani određena je protočnom citometrijom uporabom primarnih i odgovarajućih sekundarnih protutijela, obilježenih s FITC i PE, prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.1.

Rezultati tri neovisna pokusa provedena u duplikatu sa stanicama izoliranim od neovisnih donora krvi, pokazali su da je većina analiziranih stanica (98,6±0,4% monocita, 98,2±0,9% M1 6d, 99,0±0,9% M2 6d, 95,4±1,8% M1, 99,0±0,8% M2a i 99,2±0,4% M2c makrofaga) živa, odnosno 7-AAD-negativna. U monocita diferenciranih uzgojem u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF ili rh-M-CSF tijekom 6 dana nije zamijećen porast ekspresije galektina-1 vezanog na membrani u odnosu na monocite. Klasična aktivacija diferenciranih makrofaga izlaganjem IFN-γ/LPS tijekom 24 sata također nije utjecala na ekspresiju galektina-1, no alternativna aktivacija M2 makrofaga izlaganjem IL-4 ili IL-10 tijekom 24 sata uzrokovala je 1,5±0,3 ili 1,6±0,2 puta veću ekspresiju ovog lektina na membrani makrofaga u odnosu na klasično aktivirane M1 makrofage ($p<0,05$) (Slike 3.11A i 3.11B).



Slika 3.11 Ekspresija galektina-1 na membrani monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga. *Humani monociti (Mo) uzgajani su tijekom 6 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF ili rh-M-CSF, kako bi se dobili diferencirani M1 (M1 6d) ili M2 (M2 6d) makrofagi. Dio M1 stanica aktiviran je 24 sata dodatkom IFN-γ/LPS, a dio M2 stanica u M2a/M2c fenotip dodatkom IL-4/IL-10. Temeljem prednjeg i bočnog rasapa svjetlosti, odnosno bojanjem pomoću 7-aminoaktinomicina iz analize su isključene raspadnute stanice i nakupine stanica, te mrtve stanice. Galektin-1 je detektiran odgovarajućim primarnim, te sekundarnim fluorescentno obilježenim protutijelima. (A) Histogrami predstavljaju reprezentativne podatke prikupljene od jednog donora; crnim histogrami prikazuju razinu ekspresije monocita (Mo), diferenciranih i aktiviranih makrofaga, a bijeli histogrami odgovaraju nespecifičnom vezanju fluorescentno obilježenih sekundarnih protutijela. (B) Prosječna razina ekspresije galektina-1 na membrani Mo (bijeli isprugani stupci), M1 6d (bijeli iscrtani stupci), M2 6d (sivi iscrtani stupci), M1 (bijeli stupci), M2a (sivi stupci) i M2c (crni stupci) makrofaga, izoliranih iz različitih donora, predstavljena je kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) fluorescencije pojedinog tipa stanice u odnosu na nespecifičnu fluorescenciju sekundarnih protutijela ± standardna devijacija). Statistički značajne razlike u razini ekspresije galektina-1 ($p<0,05$) označene su zvjezdicom. Pokus je ponovljen u duplikatu sa stanicama izoliranim od tri neovisna donora krvi.*

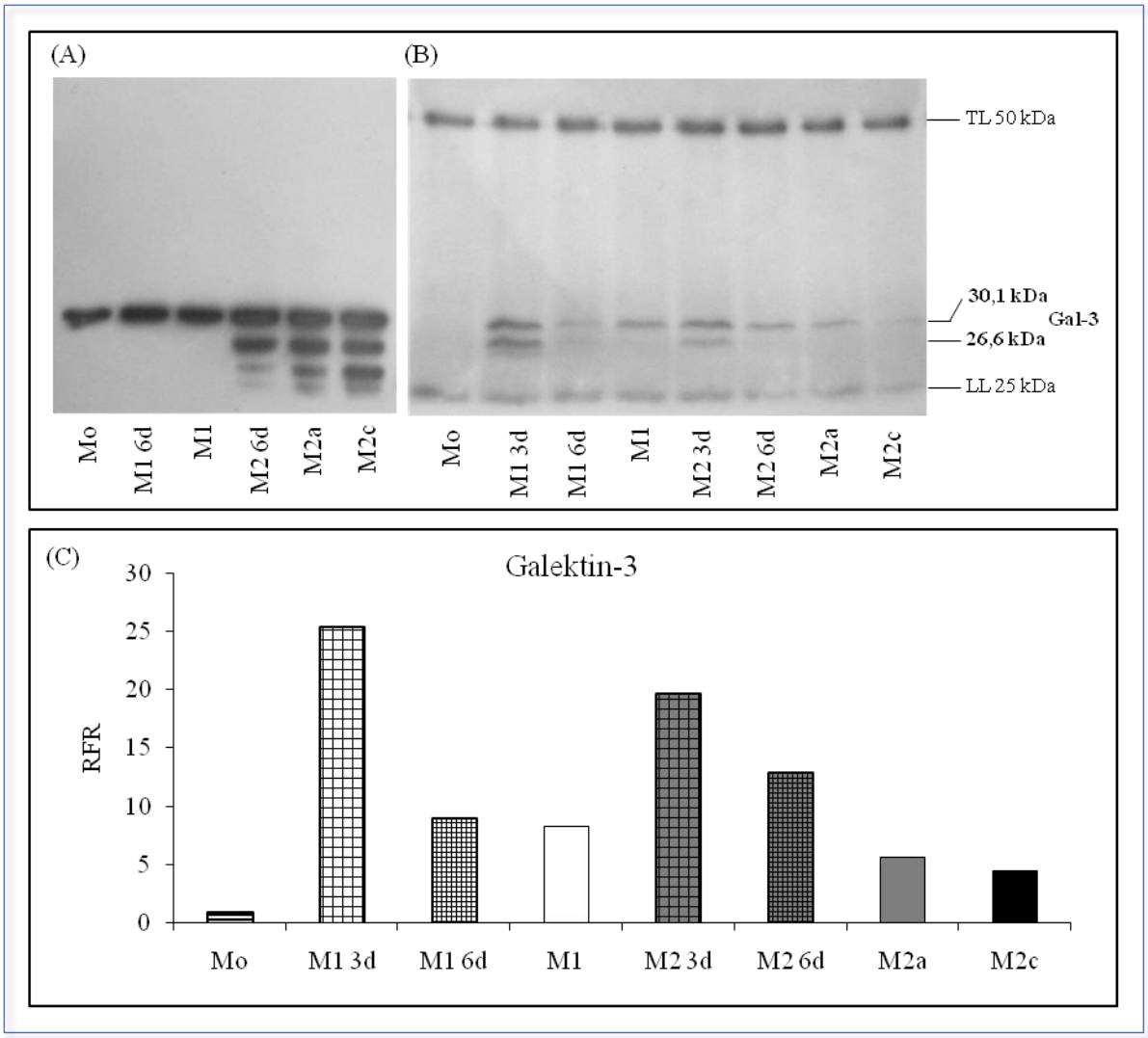


Slika 3.12 Ekspresija galektina-3 na membrani monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga. *Humani monociti (Mo) uzgajani su tijekom 6 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF ili rh-M-CSF, kako bi se dobili diferencirani M1 (M1 6d) ili M2 (M2 6d) makrofagi. Dio M1 stanica aktiviran je tijekom 24 sata dodatkom IFN-γ/LPS, a dio M2 stanica u M2a/M2c fenotip dodatkom IL-4/IL-10. Temeljem prednjeg i bočnog rasapa svjetlosti, odnosno bojanjem pomoću 7-aminoaktinomicina iz analize su isključene raspadnute stanice i nakupine stanica, te mrtve stanice. Galektin-3 je detektiran odgovarajućim primarnim, te sekundarnim fluorescentno obilježenim protutijelima. (A) Histogrami predstavljaju reprezentativne podatke; crnim histogrami prikazuju razinu ekspresije galektina-3 na membrani monocita (Mo), diferenciranih i aktiviranih makrofaga, a bijeli odgovaraju nespecifičnom vezanju fluorescentno obilježenih sekundarnih protutijela. MFI (eng. mean fluorescence intensity) - srednji intenzitet fluorescencije. (B) Prosječna razina ekspresije galektina-3 na membrani Mo (bijeli isprugani stupci), M1 6d (bijeli iscrtani stupci), M2 6d (sivi iscrtani stupci), M1 (bijeli stupci), M2a (sivi stupci) i M2c (crni stupci) makrofaga, izoliranih iz različitih donora, predstavljena je kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) fluorescencije pojedinog tipa stanice u odnosu na nespecifičnu fluorescenciju sekundarnih protutijela ± standardna devijacija). Statistički značajne razlike u razini ekspresije galektina-3 ($p<0,05$) označene su zvjezdicom. Pokus je ponovljen u duplikatu sa stanicama izoliranim od tri donora krvi.*

Diferencijacijom monocita većine donora u M1 makrofage izlaganjem rh-GM-CSF tijekom 6 dana, ekspresija galektina-3 se ne mijenja značajno, no kod nekih je donora ipak zabilježen znatan porast (7,8 puta) ekspresije u odnosu na odgovarajuće monocite. Diferencijacijom monocita većine donora u M2 makrofage izlaganjem rh-M-CSF tijekom 6 dana, ekspresija galektina-3 vezanog na membrani raste 2,8±1,1 put, no kod nekih donora nije zabilježen porast ekspresije u odnosu na odgovarajuće monocite. Aktivacijom oba tipa diferenciranih makrofaga raste ekspresija membranskog galektina-3. Tako klasična aktivacija M1 makrofaga pomoću IFN-γ/LPS uzrokuje 8,1±1,8 ili 3,9±2,5 puta pojačanu ekspresiju u odnosu na monocite ili diferencirane M1 makrofage. Alternativna aktivacija M2 makrofaga u M2a i M2c podtip uzrokuje 3,3±1,6 i 3,3±1,7 puta višu ekspresiju u odnosu na monocite, dok se ekspresija membranskog galektina-3 u odnosu na diferencirane M2 makrofage ne mijenja (Slika 3.12A i 3.12B). Zanimljivo je napomenuti da su kod većine donora populacije analiziranih monocita, različito diferenciranih makrofaga, te oba podtipa alternativno aktiviranih makrofaga, bile relativno homogene (što sugerira ujednačenu raspodjelu galektina-3 na membrani svih stanica), dok su u klasično aktiviranih makrofaga zamijećene dvije populacije. Naime, kod svih donora, klasičnom aktivacijom rh-GM-CSF-induciranih makrofaga, jasno se razdvajaju dvije populacije stanica, temeljem količine vezanog membranskog galektina-3. Stanice s visokom ekspresijom imale su 7,2±5,1 put višu, dok su M1 makrofagi s niskom ekspresijom, imali 0,5±0,3 puta manje galektina-3 vezanog na membrani. (Slika 3.12A).

3.3.3 Izlučivanje galektina-3 u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga

Humani monociti izolirani iz periferne krvi diferencirani su uzgajanjem uz rh-GM-CSF u M1 ili rh-M-CSF u M2 makrofage. Dio M1 stanica potom je aktiviran klasično uzgojem tijekom 24 sata uz dodatak IFN-γ/LPS, a dio M2 stanica aktiviran je alternativno u M2a/M2c fenotip uzgojem uz dodatak IL-4/IL-10. Galektin-3 izlučen u stanične supernatante precipitiran je uporabom protutijela M3/38 protiv galektina-3 i zrncima protein G-Sepharose. Ekspresija galektina-3 u spomenutim supernatantima ispitana je imunoblot analizom. Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su prenijeti na PVDF membranu, te je galektin-3 vizualiziran kemiluminiscencijom, uporabom odgovarajućih protutijela (Slika 3.13).



Slika 3.13 Izlučivanje galektina-3 u monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga. *Humani monociti (Mo) uzgajani su u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF ili rh-M-CSF. Stanični supernatanti prikupljeni su nakon tri (M1 3d, M2 3d) i šest dana (M1 6d, M2 6d) diferencijacije. Dio M1 stanica aktiviran je tijekom 24 sata dodatkom IFN-γ/LPS (M1), a dio M2 stanica u M2a/M2c fenotip dodatkom IL-4/IL-10 (M2a, M2c). (A) Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 (Gal-3) u staničnim homogenatima monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga. (B) Imunoblot analiza ekspresije Gal-3, precipitiranog iz staničnih supernatanata monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga. TL -, teški lanci protutijela protiv Gal-3 (M3/38), LL - laki lanci M3/38. (C) Koncentracija izlučenog galektina-3 u supernatantu Mo (bijeli isprugani stupci), M1 3 i 6d (bijeli rjeđe i gušće iscrtani stupci), M1 (bijeli stupci), M2 3 i 6d (sivi rjeđe i gušće iscrtani stupci), M2a (sivi stupci) i M2c (crni stupci) makrofaga izmjerena je metodom ELISA i prikazana kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) izlučivanja makrofaga u odnosu na Mo. Prikazani su reprezentativni rezultati od jednog donora krvi.*

Sposobnost spomenutih stanica da izlučuju galektin-3 ispitana je i imunoenzimskom metodom sendvič ELISA pomoću Quantikine Human Gal-3 Immunoassay kompleta, a apsorbancija

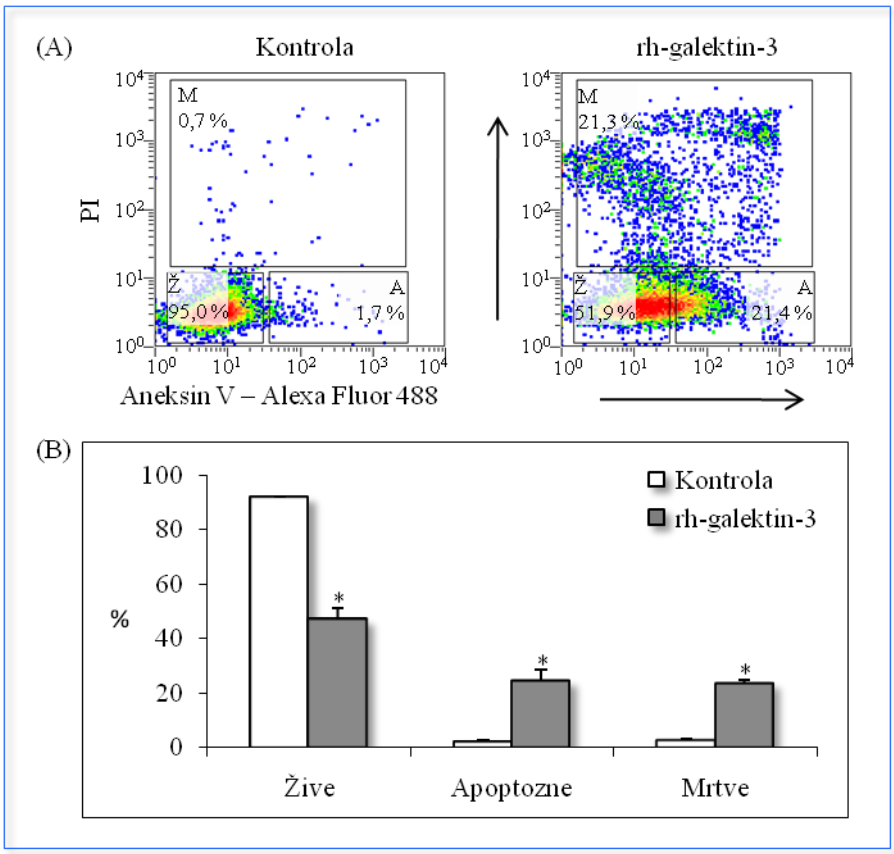
uzoraka određena je pomoću spektrofotometra Victor^2 1420 Multilabel Counter (*PerkinElmer*), prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.6. Provedena su tri neovisna pokusa u duplikatu sa stanicama izoliranim od različitih donora krvi. Zbog različitog broja stanica u pojedinom uzorku, izmjerene koncentracije normirane su na koncentraciju galektina-3 koju izlučuje 10^6 stanica u 1 mL hranidbenog medija. Razina galektina-3 u supernatantima različito diferenciranih i aktiviranih makrofaga bila je znatno viša od one izmjerene u supernatantima monocita. Uzgojem monocita u hranidbenom mediju uz dodatak GM-CSF tijekom tri dana, kod svih donora, galektin-3 se snažnije izlučuje u odnosu na stanice uzgajane uz dodatak M-CSF (izlučivanje je bilo 1,7±0,4 puta veće). Tijekom sljedeća tri dana, makrofagi M1 u hranidbeni su medij izlučili 2,6±1,2 puta manje galektina-3 u odnosu na prva tri dana diferencijacije, dok je u makrofaga M2 smanjenje u količini izlučenog galektina-3, u istom vremenu, bilo znatno manje (1,2±0,8 puta). Klasičnom aktivacijom makrofaga uporabom LPS i IFN-γ, galektin-3 se pojačano izlučuje u odnosu na makrofage aktivirane alternativno, uporabom IL-4/IL-10. Klasično aktivirani makrofagi M1, tijekom 24 sata, u hranidbeni su medij izlučili 2,0±1,3, ili 2,0±1,0 puta više galektina-3 u odnosu na makrofage M2a ili M2c (Slika 3.13). Također, pri izlučivanju ovoga lektina zamijećena je golema varijabilnost među istim podtipovima stanica dobivenim od različitih donora krvi. Najveća varijabilnost u količini izlučenog galektina-3 (do čak 10 puta) zamijećena je u monocita podrijetlom od različitih donora koji su uzgajani tri dana uz dodatak GM-CSF.

3.4 Egzogeno dodani rh-galektin-3

Poznati su brojni ligandi galektina-3 na površini stanica i u međustaničnom prostoru, pa je stoga ovaj protein uključen u mnoge fiziološke procese, kao što su stanična adhezija, regulacija aktivacije imunih stanica i apoptoza. U ovome je radu prvo provjerena biološka aktivnost proizvedenog rh-galektina-3, a potom ispitan njegov kapacitet vezanja (prisutnost slobodnih receptora galektina-3) na monocite, te klasično i alternativno aktivirane makrofage. Kako bi se provjerilo ima li uzgoj aktiviranih makrofaga uz dodatak galektina-3 biološkog učinka, stanice su tretirane rh-galektinom-3, te je ispitana razina citokina izlučenih u hranidbeni medij.

3.4.1 Ispitivanje biološke aktivnosti rh-galektina-3

rh-galektin-3 proizveden je uporabom ekspresijskog sustava *E. coli* soja BL21(DE3) Star transformiranog plazmidom pET-3c koji sadrži kodirajući slijed za galektin-3. Protein je izoliran na koloni laktoze pomoću sustava za, tekućinsku kromatografiju ÄKTA purifier (*GE Healthcare, Bio-sciences AB*) i pročišćen od zaostalih bakterijskih endotoksina prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.2.



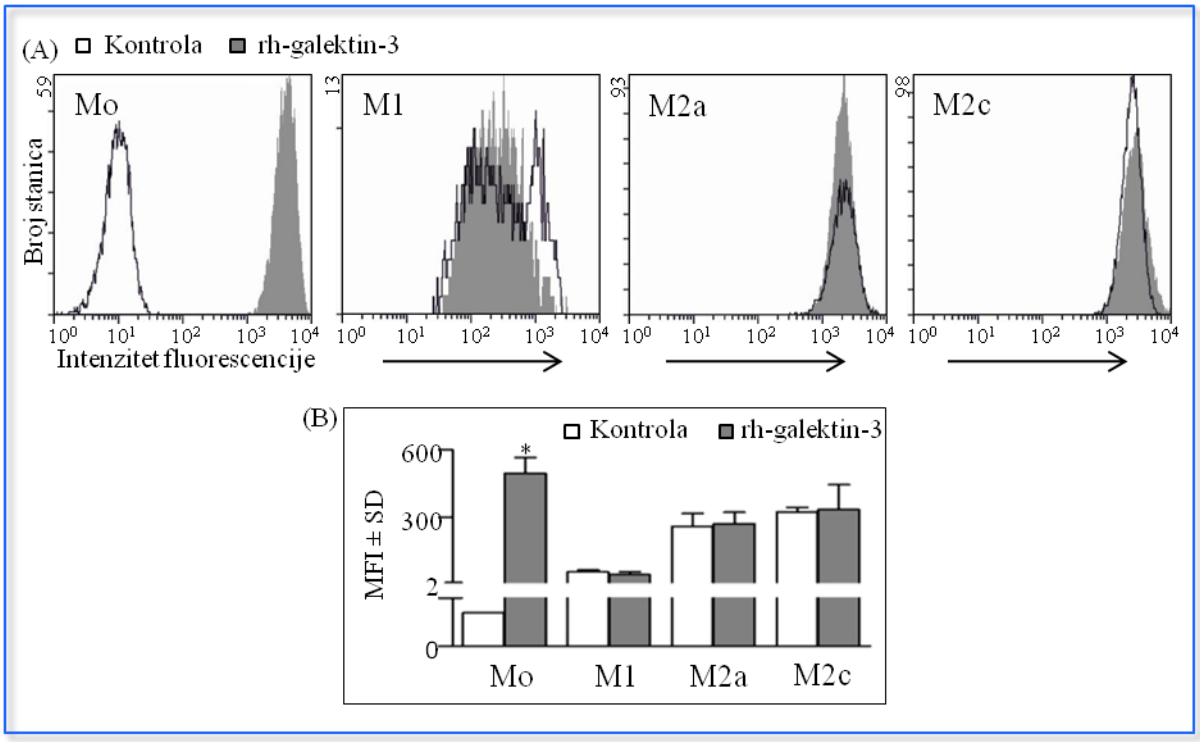
Slika 3.13 Indukcija apoptoze Jurkat stanica. *Jurkat stanična linija akutne leukemije ljudskih limfocita T izložena je djelovanju 15 µM rh-galektina-3 tijekom 24 sata. Udio živih (Ž), rano apoptoznih (A), te mrtvih i kasno apoptoznih (M) stanica utvrđen je protočnom citometrijom pomoću Aneksina V obilježenog fluorescentnom bojom Alexa Fluor 488 i PI. Temeljem prednjeg i bočnog rasapa svjetlosti iz analize su isključene raspadnute stanice i nakupine stanica. (A) Prikazani su reprezentativni rezultati jednog pokusa. Na dvoparametarskim dijagramima utvrđen je udio živih (aneksin V$^-$/PI$^-$), rano apoptoznih (aneksin V$^+$/PI$^-$), te mrtvih i kasno apoptoznih (aneksin V$^+$/PI$^+$) stanica. (B) Prosječan udio živih (bijeli stupci), rano apoptoznih (sivi stupci) i kasno apoptoznih i mrtvih stanica (crni stupci). Udio pojedinih stanica prikazan je kao postotak ukupnih stanica ± standardna devijacija. Statistički značajne razlike udjela živih, apoptoznih i mrtvih stanica tretiranih rh-galektinom-3 u odnosu na kontrolne stanice ($p<0,05$) označene su zvjezdicom. Pokus je ponovljen tri puta u duplikatu.*

Biološka aktivnost proizvedenog i pročišćenog rh-galektina-3 potvrđena je indukcijom apoptoze kod Jurkat stanične linije akutne leukemije ljudskih limfocita T. Jurkat stanice uzgajane su tijekom 6 sati u hranidbenom mediju uz dodatak 15 μM rh-galektina-3 [126], a udio živih, rano i kasno apoptoznih, te mrtvih stanica utvrđen je Cytomics FC500 MPL protočnim citometrom (*Beckman Coulter*), prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.2. Temeljem morfoloških karakteristika (FS i SS) u analizu su uključeni samo pojedinačni limfociti T. Stanice koje nisu inkubirane s fluorescentnim bojama/aneksinom V, uporabljene su kao negativna kontrola za utvrđivanje razine autofluorescencije pri uporabljenim valnim duljinama svjetlosti. Inkubiranjem Jurkat stanica s aneksinom V obilježenim fluorescentnom bojom Alexa Fluor488 i PI (prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.2) utvrđen je postotak živih, rano i kasno apoptoznih, te mrtvih stanica.

Rezultati tri neovisna pokusa provedena u duplikatu pokazali su da je 46,7±4,6% stanica tretrtanih rh-galektinom-3 živo (aneksin V – Alexa Fluor488$^-$/PI$^-$), 24,3±4,1% stanica je u ranoj fazi (aneksin V – Alexa Fluor488$^+$/PI$^-$), a 23,5±1,4% stanica je u kasnoj fazi apoptoze/nekrozi (aneksin V – Alexa Fluor488$^+$/PI$^+$). S obzirom da je ~50% galektinom-3-tretiranih Jurkat stanica umiralo apoptozom, potvrđena je funkcionalnost korištenog rh-galektina-3 (Slika 3.14).

3.4.2 Utjecaj egzogeno dodanog rh-galektina-3 na aktivirane makrofage

Humani monociti diferencirani su uzgajanjem uz rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ u klasično aktivirane, ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10 u alternativno aktivirane M2a/M2c makrofage. Stanice su potom tretirane 1 sat s egzogeno dodanim rh-galektinom-3 (1 μM), kako bi se utvrdilo postoje li na njihovoj membrani slobodna vezna mjesta za galektin-3. Uporabom Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*), a, temeljem morfoloških karakteristika (FS i SS), iz analize su isključeni raspadnuti dijelovi stanica i nakupine stanica. Mrtvi i kasno apoptozni monociti i makrofagi isključeni su, temeljem visoke fluorescencije boje za vijabilnost 7-AAD u odnosu na žive stanice. Stanice inkubirane s odgovarajućim fluorescentno obilježenim sekundarnim protutijelima uporabljene su kao negativna kontrola za utvrđivanje razine autofluorescencije i nespecifične fluorescencije pri uporabljenim valnim duljinama svjetlosti. Kod stanica tretiranih i netretiranih rh-galektinom-3, razina ovog lektina vezanog na membrani određena je uporabom primarnih i odgovarajućih sekundarnih protutijela obilježenih fluorescentnom bojom PE (prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.1).



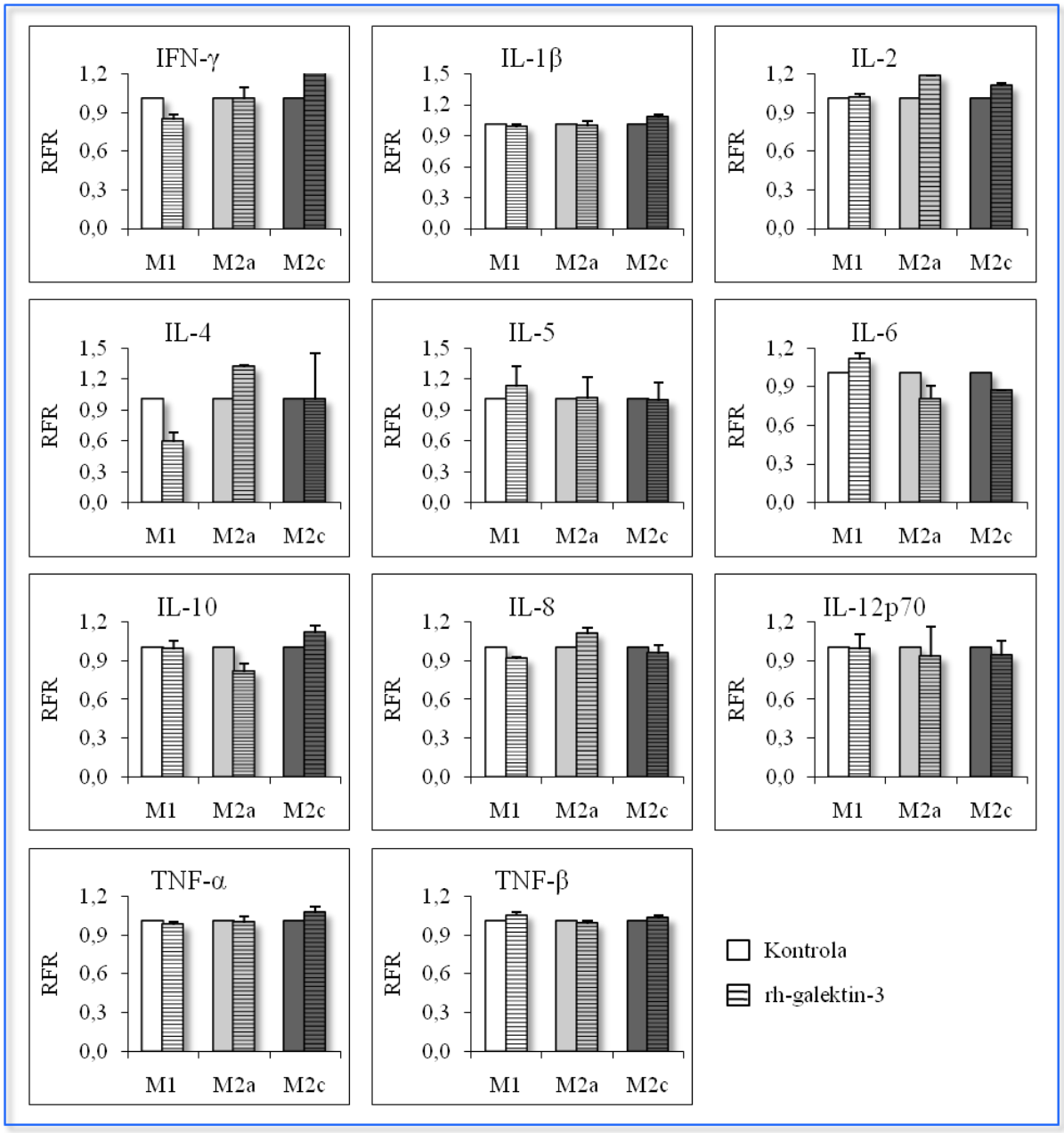
Slika 3.15 Vezanje egzogeno dodanog rh-galektina-3 na monocite i makrofage. *Humani monociti (Mo) uzgajani su tijekom 7 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10, kako bi se dobili klasično aktivirani M1, ili alternativno aktivirani M2a/M2c makrofagi. Stanice su 1 sat inkubirane s 1μM rh-galektinom-3, a potom je galektin-3 vezan na membranu detektiran protočnom citometrijom uporabom odgovarajućih primarnih i sekundarnih protutijela. Temeljem prednjeg i bočnog rasapa svjetlosti, iz analize su isključene raspadnute stanice i nakupine stanica, dok su mrtve stanice isključene bojanjem pomoću 7-aminoaktinomicina (7-AAD). (A) Histogrami predstavljaju reprezentativne podatke od jednog donora; bijeli histogrami predstavljaju stanice koje nisu izložene rh-galektinu-3 (kontrolne stanice), a sivi histogrami predstavljaju stanice inkubirane s 1 μM rh-galektinom-3. (B) Prosječna razina galektina-3 vezanog na membrani stanica podrijetlom od različitih donora krvi predstavljena je kao srednji intenzitet fluorescencije, MFI (eng. mean fluorescence intensity) ± standardna devijacija (SD) (normirano na fluorescenciju koja odgovara nespecifičnom vezanju sekundarnih protutijela). Statistički značajne razlike u razini vezanog galektina-3 ($p<0,05$), u usporedbi s monocitima i/ili M1 makrofagima) označene su zvjezdicom. Pokus je ponovljen u duplikatu sa stanicama izoliranim od šest neovisnih donora krvi.*

Rezultati šest neovisnih pokusa provedenih u duplikatu pokazali su da humani monociti, koji imaju nisku razinu endogenog membranskog galektina-3, imaju veliki potencijal vezanja ovog lektina: razina fluorescencije detektiranog egzogeno dodanog membranskog rh-galektina-3 bila je 355,1±49,3 puta viša od fluorescencije endogenog galektina-3. Suprotno

tome, nije bilo razlike ($p>0,05$) u količini vezanog membranskog galektina-3 kod rh-galektin-3 tretiranih u odnosu na netretirane aktivirane makrofage (Slika 3.15). Ovi rezultati upućuju na postojanje velikog broja slobodnih receptora galektina-3 na membrani monocita, dok su isti receptori na membrani klasično i alternativno aktiviranih makrofaga u potpunosti saturirani. S obzirom da nemaju slobodnih receptora, pretpostavljeno je da uzgoj aktiviranih makrofaga uz dodatak rh-galektina-3 nema biološkog učinka.

Kako bi se provjerila pretpostavka da egzogeno dodani rh-galektin-3 nema biološkog učinka na aktivirane M1, M2a i M2c makrofage, spomenute stanice uzgajane su 24 sata u svježem hranidbenom mediju uz dodatak 1 μM rh-galektina-3. U staničnim supernatantima potom je utvrđena razina izlučenih IFN-γ, IL-1β, IL-2, -4, -5, -6, -8, -10, -12p70, TNF-α i -β uporabom Human T_H1/T_H2 11plex RTU FlowCytomix kompleta i analizom pomoću Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*), prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.3. Ukratko, stanični supernatanti inkubirani su u smjesi zrnaca (s različitim intenzitetima fluorescencije) na koja su vezana protutijela protiv spomenutih humanih citokina. Količina vezanih citokina iz staničnih supernatanata na spomenutim zrncima detektirana je na principu imunoenzimske metode sendvič ELISA uporabom protutijela obilježenih biotinom, te inkubacijom sa streptavidin-PE konjugatom. Kao negativna eksperimentalna kontrola korištena su fluorescentna zrnca, a kao pozitivna kontrola otopine rekombinantnih humanih citokina iz kompleta.

Rezultati tri neovisna pokusa provedena u triplikatu sa stanicama izoliranim od različitih donora krvi, pokazali su da supernatanti makrofaga tretiranih rh-galektinom-3 nisu imali različit citokinski sastav od supernatanta netretiranih stanica ($p>0,05$), odnosno rh-galektin-3 nije pokrenuo signalne kaskade koje uzrokuju izlučivanje mjerenih citokina (IFN-γ, IL-1β, -2, -4, -5, -6, -8, -10, -12p70, TNF-α i -β) (Slika 3.16).



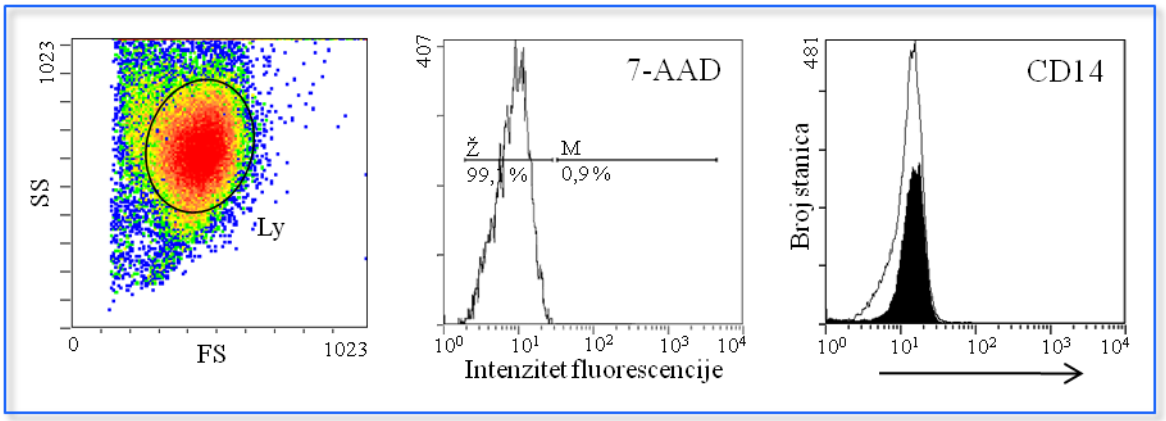
Slika 3.16 Utjecaj egzogeno dodanog rh-galektina-3 na izlučivanje citokina aktiviranih makrofaga. *Humani monociti uzgajani su tijekom 7 dana u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF i LPS/rh-IFN-γ ili rh-M-CSF i rh-IL-4/rh-IL-10, kako bi se dobili klasično aktivirani M1, ili alternativno aktivirani M2a/M2c makrofagi. Stanice su potom uzgajane s 1μM rh-galektinom-3 dodatna 24 sata. U supernatantima su protočnom citometrijom ispitane koncentracije IFN-γ, IL-1β, -2, -4, -5, -6, -8, -10, -12p70, TNF-α i –β. Prazni stupci predstavljaju stanice koje nisu izložene rh-galektinu-3 (kontrolne stanice), a isprugani stupci predstavljaju stanice uzgajane uz dodatak rh-galektina-3. Citokinski profil M1 (bijeli stupci), M2 (svijetlo sivi stupci) i M2c (tamno sivi stupci) makrofaga prikazan je kao relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) ± standardna devijacija izlučivanja pojedinog citokina rh-galektinom-3 tretiranih, u odnosu na kontrolne makrofage. Pokus je ponovljen u triplikatu sa stanicama izoliranim od tri neovisna donora krvi.*

3.5 Utjecaj egzogeno dodanog rh-galektina-3 na limfocite

3.5.1 Izolacija i vijabilnost izoliranih limfocita

Periferne mononuklearne stanice izolirane su iz krvnih pripravaka zdravih dobrovoljnih davatelja krvi centrifugiranjem pomoću Ficoll-paque^{TM} PLUS otopine. Adherirane stanice su izdvojene adhezijom na posudice za staničnu kulturu tijekom dva sata u standardnim uvjetima, a limfociti su prikupljeni ispiranjem PBS-om. Uspješnost izolacije limfocita potvrđena je uporabom Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*). Određivanjem FS i SS, temeljem morfoloških karakteristika iz analize su isključene raspadnute stanice (karakteriziraju ih niske vrijednosti FS i SS u odnosu na pojedine stanice) i veće nakupine stanica (koje imaju visoke vrijednosti FS i SS u odnosu na pojedine stanice). Tako je utvrđena regija (prozor) koja po morfološkim karakteristikama obuhvaća pojedine stanice, te su samo one korištene u daljnjoj analizi. Stanicama su izmjerene vrijednosti FS, koji je u korelaciji s veličinom stanica, i SS koji se dovodi u vezu s granuliranošću stanica. Kao negativna kontrola, analizom neobilježenih stanica, utvrđena je razina autofluorescencije limfocita pri uporabljenim valnim duljinama svjetlosti. Vijabilnost stanica ispitana je uporabom fluorescentne boje za protočnu citometriju 7-AAD koja lako prolazi staničnu membranu mrtvih i kasno apoptoznih stanica, a ne može proći intaktnu membranu živih stanica. Iz uzorka pojedinačnih stanica, analize isključene su i mrtve, te kasno apoptozne stanice koje karakterizira visoka razina fluorescencije 7-AAD (pri valnoj duljini od 647 nm) u odnosu na žive/neobilježene stanice. Mrtve stanice potrebno je isključiti iz analize radi njihova nespecifičnog vezanja (fluorescentno obilježenih) protutijela, a koje daje lažno pozitivne signale. Živim (7-AAD negativnim) stanicama utvrđena je razina ekspresije membranskog biljega CD14 uporabom odgovarajućih monoklonskih protutijela obilježenih fluorescentnom bojom PE-om. Ovaj receptor bakterijskog LPS visoko je eksprimiran na monocitno-makrofagnim stanicama, dok na limfocitima nije eksprimiran.

Rezultati dva neovisna pokusa provedena u triplikatu sa stanicama izoliranim od različitih donora krvi pokazala su niže vrijednosti FS i SS neadheriranih stanica (limfocita) u odnosu na adherirane stanice (monocite). Izolirane stanice bile su 98,6±0,7% žive i nisu eksprimirale membranski biljeg CD14 (Slika 3.17).



Slika 3.17 Izolacija limfocita. *Periferne mononuklearne stanice izolirane su iz krvnih pripravaka. Monociti su uklonjeni adhezijom na posudice za staničnu kulturu. Označena regija na reprezentativnom dvoparametarskom dijagramu prednjeg (eng. forward scatter, FS) i bočnog (eng. side scatter, SS) rasapa svjetlosti prikazuje limfocite (Ly). Mrtve stanice isključene su bojanjem pomoću 7-aminoaktinomicina (7-AAD). Razina ekspresije membranskog CD14 na prikupljenim stanicama utvrđena je uporabom odgovarajućih protutijela obilježenih FITC-om. Crni histogram prikazuje razinu ekspresije galektina-3 na membrani Ly, a bijeli histogram odgovara autofluorescenciji stanica.*

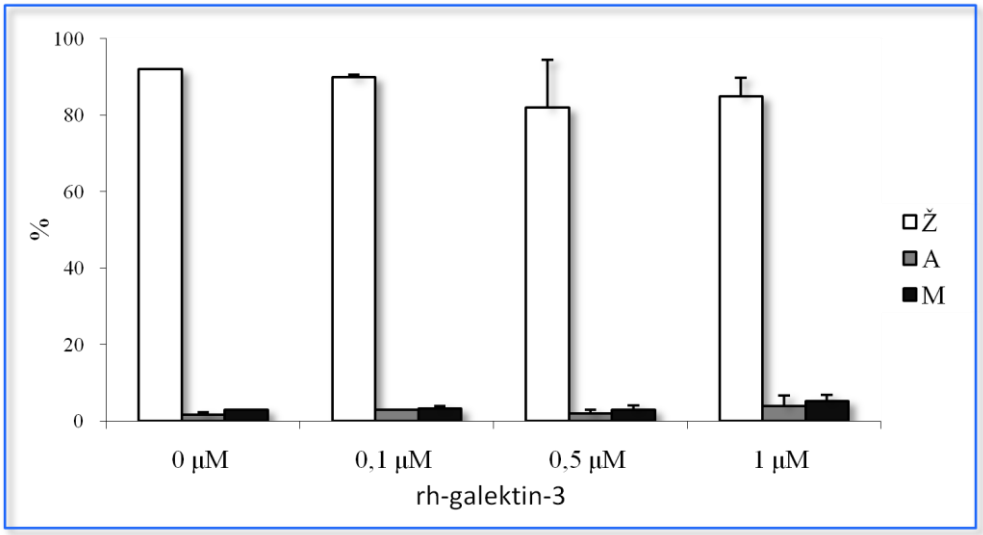
3.5.2 Indukcija apoptoze limfocita galektinom-3

Humani limfociti uzgajani su 24 sata u hranidbenom mediju uz dodatak galektina-3, kako bi se utvrdila koncentracija egzogeno dodanog rh-galektina-3 koja ne inducira apoptozu ovih stanica. Vijabilnost stanica, odnosno udio živih, rano i kasno apoptoznih, te mrtvih stanica utvrđen je pomoću Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*). U ranoj fazi apoptoze stanice na površini ispoljavaju fosfatidil-serin koji je moguće detektirati protočnom citometrijom pomoću fluorescentno obilježenog proteina aneksina V. Za razliku od stanica u ranoj fazi, stanice u kasnoj fazi apoptoze i nekrozne stanice imaju narušen integritet membrane, te, uz vezanje aneksina V, postaju propusne i za fluorescentnu boju PI.

Temeljem morfoloških karakteristika (FS i SS) u analizu su uključeni samo pojedinačni limfociti. Stanice koje nisu inkubirane s fluorescentnim bojama/aneksinom V uporabljene su kao negativna kontrola za utvrđivanje razine autofluorescencije limfocita pri uporabljenim valnim duljinama svjetlosti. Inkubiranjem limfocita s aneksinom V obilježenim fluorescentnom bojom Alexa Fluor488 i PI (prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.2), utvrđen je postotak živih, rano i kasno apoptoznih, te mrtvih stanica.

Rezultati dva neovisna pokusa, provedena u triplikatu sa stanicama izoliranim od različitih donora krvi, pokazali su da jednodnevni tretman uporabljenim koncentracijama rh-galektina-3

ne inducira značajno apoptozu/nekrozu humanih limfocita ($p<0,05$). Najviša korištena koncentracija rh-galektina-3 inducirala je apoptozu kod 4,0±2,6%, nekrozu kod 5,3±1,5% stanica, dok je 85,0±4,7% stanica bilo živo (Slika 3.18); stoga su u daljnjim pokusima limfociti uzgajani u hranidbenom mediju uz dodatak 1μM rh-galektina-3.



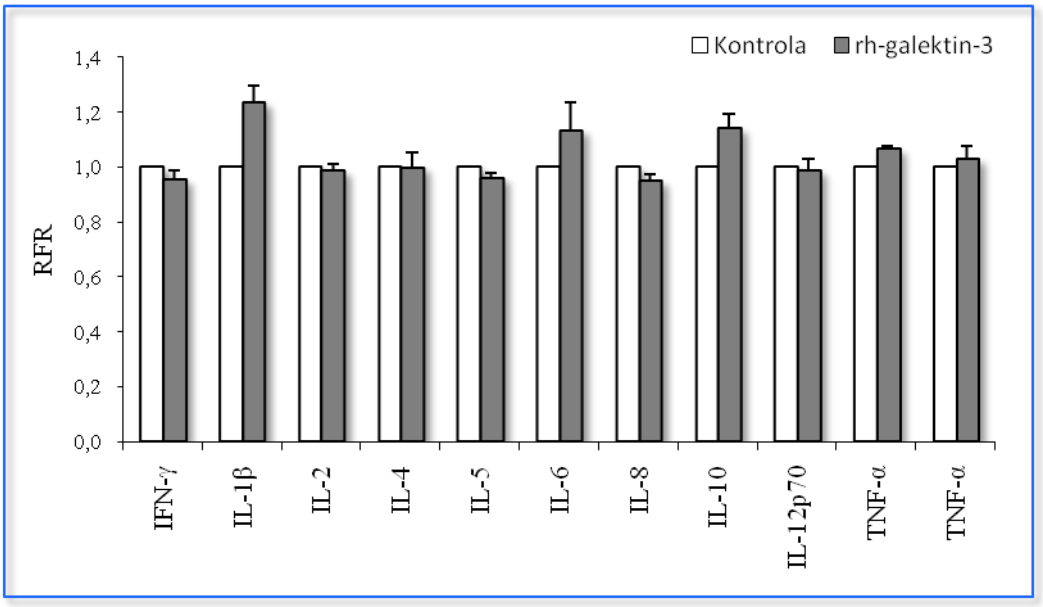
Slika 3.18 Vijabilnost limfocita tretiranih rh-galektinom-3. *Humani limfociti uzgajani su tijekom 24 sata u hranidbenom mediju uz dodatak 0, 0,1, 0,5 i 1 μM rh-galektina-3.Upotrebom protočnog citometra, temeljem prednjeg i bočnog rasapa svjetlosti, iz analize su isključene raspadnute stanice i nakupine stanica. Udio živih (Ž, bijeli stupci), rano apoptoznih (A, sivi stupci), te mrtvih i kasno apoptoznih (M, crni stupci) stanica utvrđen je bojanjem pomoću Aneksina V obilježenog fluorescentnom bojom Alexa Fluor 488 i propidij jodida. Udio pojedinih stanica prikazan je kao postotak ukupnih stanica ± standardna devijacija. Pokus je ponovljen u triplikatu sa stanicama izoliranim od dva neovisna donora krvi.*

3.5.3 Izlučivanje citokina limfocita tretiranih rh-galektinom-3

Humani limfociti uzgajani su 24 sata uz dodatak 1 μM galektina-3, kako bi se utvrdila količina citokina izlučenih u hranidbeni medij stanica. Razina izlučenih IFN-γ, IL-1β, IL-2, -4, -5, -6, -8, -10, -12p70, TNF-α i -β utvrđena je uporabom Human T_H1/T_H2 11plex RTU FlowCytomix kompleta i analizom pomoću Cytomics FC500 MPL protočnog citometra (*Beckman Coulter*), prema postupcima opisanim u poglavlju 2.2.3.3. Ukratko, stanični supernatanti inkubirani su u smjesi zrnaca (s različitim intenzitetima fluorescencije) na koja su vezana protutijela protiv spomenutih humanih citokina. Količina vezanih citokina iz supernatanata limfocita na spomenutim zrncima detektirana je na principu imunoenzimske metode sendvič ELISA, uporabom protutijela obilježenih biotinom, te inkubacijom sa

streptavidin-PE konjugatom. Kao negativna eksperimentalna kontrola korištena su fluorescentna zrnca, a kao pozitivna kontrola, otopine rekombinantnih humanih citokina iz kompleta.

Rezultati dva neovisna pokusa provedena u triplikatu sa stanicama izoliranim od različitih donora krvi, pokazali su da limfociti tretirani 24 sata rh-galektinom-3 nisu imali različit citokinski sastav od supernatanta netretiranih stanica ($p>0,05$), odnosno rh-galektin-3 nije pokrenuo signalne kaskade koje uzrokuju izlučivanje mjerenih citokina (IFN-γ, IL-1β, -2, -4, -5, -6, -8, -10, -12p70, TNF-α i -β) (Slika 3.19).



Slika 3.19 Utjecaj egzogeno dodanog rh-galektina-3 na izlučivanje citokina limfocita. *Humani limfociti uzgajani su tijekom 24 sata u hranidbenom mediju uz dodatak 1 μM rh-galektina-3. U supernatantima su protočnom citometrijom ispitane koncentracije IFN-γ, IL-1β, -2, -4, -5, -6, -8, -10, -12p70, TNF-α i –β. Prazni stupci predstavljaju stanice koje nisu izložene rh-galektinu-3 (kontrolne stanice), a sivi stupci predstavljaju stanice uzgajane uz dodatak rh-galektina-3. Prikazan je relativni omjer, RFR (eng. relative fold ratio) ± standardna devijacija izlučivanja pojedinog citokina rh-galektinom-3 tretiranih, u odnosu na kontrolne limfocite. Pokus je ponovljen u triplikatu sa stanicama izoliranim od dva neovisna donora krvi.*

4 RASPRAVA

Galektini su evolucijski očuvani proteini koji utječu na brojne stanične procese, ponajviše specifičnim prepoznavanjem β-galaktozidnih struktura glikoproteina i glikolipida stanične membrane. Najšire rasprostranjeni i najbolje proučeni članovi ove porodice, galektini-1 i -3, pronađeni su u brojnim vrstama stanica, i to gotovo u svim staničnim odjeljcima (jezgri, citoplazmi, membrani, te izvanstaničnom prostoru). Sudjelujući u brojnim fiziološkim i patofiziološkim procesima kao što su adhezija, dioba, apoptoza i maligna transformacija stanica, oni igraju važnu ulogu u modulaciji upalnih reakcija, te svih faza urođenog i stečenog upalnog odgovora. Točna uloga galektina u upalnom procesu do danas nije razjašnjena jer njihovo djelovanje uvelike ovisi o staničnom smještaju, oligomerizaciji i oksidacijskom stanju galektina, te vrsti, fiziološkom statusu i uvjetima rasta stanica na koje djeluju. Premda postoji niz oprečnih studija, općenito je moguće zaključiti da je galektin-1 moćan protu-upalni signal, dok, suprotno njemu, galektin-3 uglavnom potiče upalu.

Stanice monocitne loze spadaju u prvu liniju nespecifične obrane organizma. Prilikom uklanjanja patogena, u ranoj fazi upale aktiviraju se mononuklearni fagociti, u koje spadaju monociti i makrofagi. Monociti su kratko-živuće stanice koje cirkuliraju krvlju, a mogu, pod utjecajem vlastitog citokinskog okruženja, iz krvi ekstravazacijom prijeći u tkiva, te diferencirati u tkivne makrofage ili dendritičke stanice. Nastali tkivni makrofagi izrazito su plastične stanice koje, ovisno o primljenim informacijama iz okoliša, mogu prilagođavati svoj metabolizam pa tako nastaju morfološki i funkcionalno različiti tipovi makrofaga. Ukoliko se, primjerice, uslijed upale ispuštaju endogeni ili egzogeni pro-inflamatorni signali, kao što su IFN-γ ili LPS, diferencirani makrofagi aktiviraju se u jake pro-upalne stanice, koje nazivamo M1, ili klasično aktiviranim makrofagima. Ukoliko pak citokinsko okruženje, povišenim koncentracijama protu-upalnih T_H2 citokina IL-4 i IL-10 podržava razrješenje upale i popravak upalom oštećenih tkiva, nastaju alternativno aktivirani M2a i M2c makrofagi, koji izvršavaju spomenute zadaće. Bitna zadaća urođenog imunosnog sustava je i aktivacija stečene imunosti, čiji su glavni nosioci limfociti T i B.

Uloge galektina-1 i -3 u fiziologiji limfocita i monocitno-makrofagnih stanica nisu u potpunosti razjašnjene. Poznato je, međutim, da galektin-1 negativno regulira predočne funkcije monocita i makrofaga, može inhibirati fagocitozu i lučenje medijatora upale (arahidonične kiseline, NO) makrofaga, te tako pogodovati stvaranju T_H2 citokinskog okruženja. Djelovanje galektina-3 je suprotno: on potiče lučenje medijatora upale tkivnih makrofaga, potiče respiratorni prasak, te djeluje kao kemoatraktant i modulator fagocitoze monocita i makrofaga. Ovaj lektin također potiče monocitno-makrofagne stanice na lučenje pro-upalnih citokina (IL-1, IL-8), a uključen je i u diferencijaciju monocita i alternativnu

aktivaciju makrofaga. Konačno, protu-apoptozno djelovanje unutarstaničnog galektina-3 pridonosi produljenju opstanka upalnih stanica, a time i upalnog odgovora. Oba lektina modulatori su apoptoze limfocita T, a galektin-3 utječe i na aktivaciju i lučenje citokina u ovih stanica.

Monocitno-makrofagne stanice imaju centralnu ulogu u inicijaciji, podržavanju i razrješenju upale, a u spomenutim su procesima izrazito bitne uloge galektina-1 i -3. U ovom je radu ispitana ekspresija galektina-1 i -3 kod ljudskih monocita, diferenciranih i aktiviranih makrofaga, te utjecaj galektina-3 na fiziologiju limfocita i aktiviranih makrofaga, kako bi se pridonijelo razumijevanju biologije ovih stanica i uloge proučavanih galektina u njihovoj fiziologiji.

Kao prvi korak u istraživanju, valjalo je uspostaviti odgovarajući model na kojem će se proučavati uloga galektina-1 i -3 u limfocita i monocitno-makrofagnih stanica. S obzirom da je poznato iz literature da ekspresija galektina-3 raste diferencijacijom monocita u makrofage *in vitro* [45] i *ex vivo* [39], kao modelni sustav izabrani su humani monociti periferne krvi. Limfociti i monociti su izolirani iz uzoraka krvi zdravih dobrovoljnih davatelja, a njihova čistoća, odnosno uspješnost pročišćavanja potvrđena je protočnom citometrijom: monocitne stanice identificirane su po visokim vrijednostima rasapa svjetlosti laserske zrake (FS, SS) i po jakoj ekspresiji biljega CD14, dok su limfociti imali niže vrijednosti rasapa svjetlosti, te nisu eksprimirali spomenuti biljeg na membrani. Također je utvrđeno da je većina izoliranih stanica bilo živo (7-AAD negativno). Monociti su potom diferencirani u podtip makrofaga M1 uzgojem u hranidbenom mediju uz dodatak rh-GM-CSF, odnosno u podtip M2 uz dodatak rh-M-CSF tijekom 6 dana. Diferencirani makrofagi su aktivirani klasično (M1) jednodnevnim uzgojem uz dodatak IFN-γ i LPS ili alternativno u podtip M2a ili M2c uzgojem uz dodatak IL-4 ili IL-10. Uspješna aktivacija diferenciranih makrofaga, potvrđena je protočnom citometrijom. Klasično aktivirani pro-upalni makrofagi u svoje su okruženje lučili više upalnih citokina IL-6, -10, -12 i TNF-α u odnosu na M2a/M2c podtip stanica. Također, alternativno aktivirani makrofagi imali su povišenu membransku ekspresiju biljega alternativne aktivacije - receptora čistača CD163 i manoznog receptora CD206, u odnosu na klasično aktivirane stanice. Kod svih aktiviranih makrofaga protočnom citometrijom određen je postotak živih, rano i kasno apoptoznih i mrtvih stanica, te je ustanovljeno da je većina stanica vijabilna.

Već petnaest godina poznato je da monociti izolirani iz ljudske krvi eksprimiraju galektin-3 [39]. Diferencijacijom monocitnih stanica u makrofage raste ekspresija ovog proteina, no

njegova je točna uloga, kao i regulacija ekspresije još nerazjašnjena. Ovaj rad pruža uvid u ekspresiju i sekreciju galektina-3 u klasično aktiviranih M1 i alternativno aktiviranih M2a i M2c makrofaga. Također je ispitana uloga egzogeno dodanog rh-galektina-3 na fiziologiju limfocita, te klasično i alternativno aktiviranih makrofaga.

Ekspresija galektina-3 na površini monocita prethodno je zabilježena elektronskim mikroskopom pomoću *Imuno-gold* metode [149] i protočnom citometrijom [40]. Ovim radom potvrđena je prisutnost galektina-3 u staničnim homogenatima monocita, no razina ekspresije ovog proteina na membrani monocita nije bila tako izražena kao što je ranije dokumentirano [40]. Zamijećena razlika u ekspresiji membranskog galektina-3 u monocita mogla bi biti posljedica različitih protokola izolacije ovih stanica iz perifernih krvnih mononuklearnih stanica. Naime, van Stijn i suradnici su se za izolaciju koristili metodom pozitivne selekcije monocita pomoću magnetskih mikrozrnaca obilježenih s protutijelom protiv CD14 biljega monocita (razvrstavanje stanica pomoću magneta, MACS [*eng.* magnetic activated cell-sorting]) [40]. U ovome su radu monociti izdvojeni nakon dva sata uzgoja u hranidbenom mediju, na temelju njihove adhezije na posudice za staničnu kulturu. Ostale periferne mononuklearne stanice, odnosno limfociti, prikupljeni su ispiranjem puferom. Čini se da monociti tijekom početnog razdoblja uzgoja (odnosno dvosatne izolacije adhezijom) otpuštaju ili internaliziraju galektin-3 vezan na membrani. Naime, membranski proteini 1/2 povezani s lizosomima, LAMP 1/2 (*eng.* lysosome associated membrane proteins 1/2) su ligandi galektina-3 [150] koji se u monocita ispoljavaju na staničnoj membrani pa bi mogli biti povezani s brzim unosom ovog proteina u lizosomalni ili endosomalni odjeljak stanice. Predstavljeni rezultati u skladu su s činjenicom da prijenos mišjih peritonealnih makrofaga u *in vitro* uvjete uzgoja izrazito utječe na unutarstaničnu razdiobu: naime, razina ekspresije galektina-3 vezanog na membrani ovih stanica pada na 37% početne, nakon svega 90 minuta uzgoja u hranidbenom mediju [151].

Dobro je poznato da diferencijaciju monocita u makrofage prati povišena razina ekspresije galektina-3 [39, 45], međutim, malo je poznata njegova ekspresija u različito diferenciranih i aktiviranih humanih makrofaga koji imaju specifične uloge u imunosnom odgovoru, a razlikuju se i po biokemijskim karakteristikama (obrascima proizvodnje citokina i ekspresiji karakterističnih membranskih biljega). Klasično aktivirani makrofagi M1 potiču razvijanje upale, uništavaju patogene mikroorganizme i tumorske stanice lučenjem medijatora upale, reaktivnih kisikovih i dušikovih intermedijera. Suprotno tome, alternativno aktivirani makrofagi općenito se smatraju medijatorima razrješenja upale, povezani su s cijeljenjem rana, ali i raznim patološkim stanjima kao što je fibroza kod granulomatoznih bolesti ili astma

[152]. Ovim smo radom pokazali da se alternativno diferencirani i aktivirani makrofagi M2 razlikuju od klasično diferenciranih i aktiviranih makrofaga M1 po intenzitetu i obrascu ekspresije galektina-3. U makrofaga diferenciranih iz monocita uporabom M-CSF i GM-CSF zabilježen je porast ekspresije galektina-3 u odnosu na monocite, no njihove međusobne razlike nisu bile toliko naglašene. Indukcija ekspresije galektina-3 kod humanih monocita uzgajanih uz GM-CSF odgovara prethodnim istraživanjima [40], no porast ekspresije ovog lektina uzgojem uz dodatak M-CSF zabilježen je samo u mišjih preosteoklasta [153]. Aktivacijom diferenciranih makrofaga, ukupna razina ekspresije galektina-3 se ne mijenja, no u oba podtipa alternativno aktiviranih makrofaga (M2a i M2c) razina ekspresije galektina-3 bila je značajno viša od one u klasično aktiviranih makrofaga (M1), dok razlike između stanica M2a i M2c nisu bile toliko uočljive. Kod nekih donora krvi zabilježena je viša razina ekspresije galektina-3 u M2a, u odnosu na M2c podtip makrofaga, no u nekim je uzorcima ipak bilo suprotno. MacKinnon i suradnici ranije su pokazali da tretman s IL-4 potiče ekspresiju galektina-3 u mišjih makrofaga izoliranih iz koštane srži i kod ljudskih makrofaga dobivenih diferencijacijom monocita izoliranih iz perifernih mononuklearnih stanica. Predloženo je da galektin-3 igra ključnu ulogu u alternativnoj aktivaciji M2a makrofaga signalnim putom koji uključuje membranski receptor CD98 (koji je ligand galektina-3 [31]) i PI3K [136]. Suprotno prethodnom istraživanju, u kojem su autori pokazali da izlaganje mišjih makrofaga koštane srži 100 ng/mL LPS suprimira ekspresiju i sekreciju galektina-3, ovim je radom utvrđeno da se klasičnom aktivacijom ljudskih makrofaga (potaknutom sa 100 ng/mL LPS i 20 ng/mL IFN-γ) značajno povećava razina ekspresije galektina-3 u odnosu na monocite. Ova bi se nedosljednost mogla pripisati razlikama u fiziologiji ljudskih i mišjih klasično aktiviranih makrofaga, kao i činjenici da su u istraživanju MacKinnon i suradnika rabljeni makrofagi podrijetlom iz koštane srži, dok su u ovom radu uporabljeni makrofagi podrijetlom iz monocita izoliranih iz periferne krvi. Konačno, u ovom su istraživanju makrofagi aktivirani uzgojem uz LPS i IFN-γ koji su stanicama dodani istovremeno, a ne isključivo LPS, kao u slučaju mišjih makrofaga. Razina ekspresije galektina-3 u monocita, kao i porast ekspresije u makrofaga M1 i M2a/M2c podrijetlom od različitih donora izrazito je varirao. Ovi rezultati upućuju na goleme razlike u ekspresiji ovog proteina unutar zdrave populacije, a jedina pravilnost u obrascu ekspresije galektina-3, uočena kod stanica podrijetlom od svih donora, bio je porast prilikom diferencijacije monocita, te porast u klasično aktiviranih makrofaga u odnosu na monocite i alternativno aktiviranih u odnosu na klasično aktivirane makrofage. Zaključno, ekspresija galektina-3 nije povezana samo s alternativno, već i klasično aktiviranim ljudskim makrofagima.

Vezanje i oligomerizacija izvanstaničnog galektina modulirani su proteolitičkim kidanjem ovisnim o aktivnosti specifičnih proteaza, primjerice, metaloproteinaza matriksa, kolagenaze, gelatinaze, antigena specifičnog za prostatu, PSA (*eng.* prostate specific antigen). Ovim kidanjima nastaju različite forme galektina-3 veličine 27, 22, 20,2, 18,9, 16, 15,5, i 14 kDa [154-156], a dodatne su forme pokidanog galektina-3 otkrivene i kod ljudskog papilarnog karcinoma štitnjače [149]. U ovome radu pokazano je da se tijekom diferencijacije i aktivacije monocita u alternativno aktivirane makrofage i, u manjoj mjeri, u klasično aktivirane makrofage, galektin-3 intenzivno proteolitički kida. Utvrđena je golema varijabilnost u broju i intenzitetu ekspresije pojedinih formi galektina-3 u makrofaga podrijetlom iz različitih donora krvi, analiziranih postupkom *Western blot*. U dijelu uzoraka monocita utvrđena je samo osnovna forma galektina-3 veličine 30,1 kDa, no u nekih je monocita zabilježena i dodatna forma veličine 27,9 kDa. Većina diferenciranih makrofaga tipa M1 imaju jako eksprimiranu osnovnu formu galektina-3 od 30,1 kDa dok je dodatna, krnja forma od 26,6 kDa bila znatno slabije eksprimirana. Klasično aktivirani makrofagi M1 većine donora imalo je isti obrazac kidanja galektina-3 kao u monocita, dok je samo u nekih zabilježena dodatna forma ovog proteina. Valja naglasiti i to da klasičnom aktivacijom diferenciranih stanica pomoću LPS i IFN-γ pada razina ekspresije iskidanog galektina-3 (26,6 kDa), dok se razina ekspresije osnovne forme znatno ne mijenja. U diferenciranih makrofaga M2 također su zamijećene dvije forme, no ekspresija galektina-3 od 26,6 kDa bila je izrazito naglašena u M2 u odnosu na M1 makrofage istoga donora. Čini se da tretman humanih monocita GM-CSF, a posebice M-CSF, uz pojačanu ekspresiju, potiče i proteolitičko kidanje osnovne forme galektina-3. Alternativna aktivacija diferenciranih makrofaga M2 potiče dodatno proteolitičko kidanje galektina-3. Kod staničnih ekstrakata aktiviranih M2 makrofaga, tako je uz glavnu formu veličine 30,1 kDa, identificirano do 5 manjih formi od oko 27,9, 26,6, 24,6, 23,4, i 22,1 kDa. Sličan obrazac s nekoliko krnjih formi galektina-3 zabilježen je i u mišjih peritonealnih makrofaga potaknutih tioglikolatom nakon četiri dana uzgoja [157]. Konačno, u makrofaga M2 aktiviranih pomoću IL-4 (M2a) zabilježena je slabija ekspresija dodatnih, manjih formi galektina-3 u odnosu na makrofage M2 aktivirane pomoću IL-10 (M2c).

Opravdano je pretpostaviti, da zamijećene forme odgovaraju krnjem galektinu-3 koji se tijekom fizioloških procesa diferencijacije i aktivacije iskidao u izvanstaničnom prostoru (te ponovo vezao na staničnu membranu), odnosno da predstavljeni rezultati nisu proteolitički artefakt uzrokovan obradom samih uzoraka. Također, membranski galektin-3 može se vrlo intenzivno unositi u citoplazmu endocitozom pa bi se uneseni protein mogao proteolitički kidati u lizosomima [158]. S obzirom da su vrpce koje odgovaraju formama galektina-3

detektirane uporabom M3/38 monoklonskih protutijela protiv N-terminalne domene spomenutog proteina [159], proteoliza se očito dogodila izvan mjesta prepoznavanja spomenutog protutijela. Ukoliko barem dio iskidanih formi detektiranih postupkom *Western blot* predstavlja galektin-3 vezan na membrani, opravdano je pretpostaviti da proteoliza nije utjecala na lektinsku aktivnost proteina. Premda neke od zabilježenih vrpci, prema procijenjenim molekulskim masama, odgovaraju ranije opisanim proteolitičkim formama galektina-3 iskidanim pomoću MMP-2 i MMP-9 koje makrofagi izlučuju [154], teško je pretpostaviti koje su proteaze uzrokovale kidanje galektina-3 u ovom istraživanju. Također, vrijedi spomenuti da se proteolitičko kidanje događalo većim dijelom u alternativno diferenciranih i aktiviranih makrofaga koji su glavni izvor izvanstaničnih proteaza u procesu cijeljenja rana i pregradnji tkiva. Međutim, najinteresantnija je činjenica da postoje goleme razlike u broju i intenzitetu iskidanih formi galektina-3 u alternativno aktiviranih makrofaga podrijetlom od različitih donora krvi. Ove razlike možda bi se mogle objasniti prisutnošću različitih specifičnih sljedova unutar polimorfnih mjesta galektina-3 koji stvaraju ili uklanjaju mjesta kidanja koja prepoznaju određene proteaze [160], no ovu bi hipotezu trebalo podrobnije istražiti.

Mehanizam regulacije ekspresije galektina-3 u makrofaga dobivenih diferencijacijom i aktivacijom ljudskih monocita nije razjašnjen. Postoje naznake da je ekspresija ovog proteina u monocita i makrofaga dijelom regulirana posttranskripcijski, stabilizacijom njegove mRNA [161], a dijelom signalnim putem proteinske kinaze aktivirane mitogenom, MAP-kinaze, (*eng.* mitogen-activated protein-kinase) koji uključuje transkripcijske faktore AP-1 i NF-κB, koji su ključni elementi uključeni u regulaciju ekspresije galektina-3 [41, 54]. Uporabom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, pokazano je da diferencijacija monocita u klasično aktivirane M1 i alternativno aktivirane M2a i M2c makrofage, uzgojem tijekom 7 dana uz odgovarajuće faktore rasta i citokine, potiče slabi porast razine mRNA galektina-3 samo u M2 makrofaga. Istovremeno nije bilo razlike u razini ekspresije galektina-1, ni na genskoj niti na proteinskoj razini, premda je ranije zabilježeno da ekspresija galektina-1 raste u mišjih peritonealnih makrofaga aktiviranih pomoću forbol-12-miristat-13-acetata, PMA (*eng.* phorbol 12-myristate 13-acetate) ili kemoatraktantom formil-metionil-leucil-fenilalaninom, fMLP (*eng.* formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine), odnosno ukoliko se iste stanice tretiraju s LPS ili TNF-α [117].

Ekspresija galektina-1 i -3 na membrani monocita, klasično i alternativno diferenciranih, te aktiviranih makrofaga utvrđena je protočnom citometrijom uporabom primarnih i odgovarajućih fluorescentno obilježenih sekundarnih protutijela. Utvrđeno je da se

diferencijacijom monocita ekspresija znatno ne mijenja, no oba tipa alternativno aktiviranih makrofaga (M2a i M2c) na membrani ispoljavaju značajno više vezanog galektina-1 u odnosu na monocite, odnosno klasično aktivirane (M1) makrofage. Razina ekspresije galektina-3 na membrani diferenciranih makrofaga M1 porasla je u odnosu na monocite, a razlika je bila još naglašenija prilikom aktivacije ovih stanica pomoću LPS i IFN-γ. Ovi su rezultati u skladu s time da tretman mišjih makrofaga i Schwann stanica GM-CSF, koji smo koristili za dobivanje M1 fenotipa, uzrokuje povišenu membransku ekspresiju galektina-3 [43]. Razina membranske ekspresije galektina-3 u alternativno diferenciranih i aktiviranih M2a i M2c makrofaga također je porasla u odnosu na monocite, no zamijećena je izrazita varijabilnost u intenzitetu ekspresije aktiviranih stanica. Tako tretman makrofaga M2 s IL-4 ili IL-10, kod dijela donora uzrokuje izrazito jaku, a kod dijela relativno blagu membransku ekspresiju galektina-3, pa je moguće zaključiti da podtip M2 ima varijabilnu galaktozilaciju membranskih struktura koje prepoznaje galektin-3. S obzirom da galektini-1 i -3 preferencijalno vežu visoko razgranate poli-N-acetil-laktozaminirane (polyLacNAc) glikane [8, 162, 163], moguće je da je izvor varijabilnosti membranske ekspresije ovih lektina u razlika u raspoloživosti njihovih liganada na membrani klasično i alternativno aktiviranih makrofaga. Treba, međutim, napomenuti da postoji mnogo finih razlika u afinitetu vezanja galektina-1 i -3 za pojedinu glikansku strukturu, što pak izravno utječe na vezanje ovih galektina za membranu, njihovu nizvodnu aktivaciju signalnih kaskada i biološki značaj [11].

Razlike u ekspresiji pojedinih glikoziliranih struktura mogle bi objasniti i postojanje dvije pod-populacije M1 makrofaga. Naime, temeljem razine ekspresije površinskog galektina-3 u aktiviranih makrofaga M1, zamijećena je skupina stanica koje eksprimiraju male ili umjerene količine galektina-3 i druga populacija s povišom razinom vezanog proteina na membrani. Ovaj učinak nije zamijećen u diferenciranih makrofaga M1 (izloženih GM-CSF-u), već isključivo kod stanica dodatno aktiviranih LPS i IFN-γ. Moguće je da dvije zamijećene populacije M1 makrofaga odgovaraju stanicama dobivenim iz različitih populacija monocita ljudske krvi. Naime, $CD14^{++}CD16^{-}$ „klasični“ i $CD14^{+}CD16^{++}$ „ne-klasični“ monociti [87] mogli bi različito odgovarati na indukciju klasične (M1) aktivacije, no ovu zanimljivu pretpostavku potrebno je detaljnije ispitati.

Količina galektina-3 vezanog na membrani nije definirana isključivo ekspresijom specifičnih glikanskih liganada, nego i količinom raspoloživog izvanstaničnog galektina-3. Mnoge vrste stanica, uključujući one monocitno-makrofagne loze, mogu u okoliš izlučivati galektin-3 [58], no postoje izrazite razlike u količini izlučenog proteina među različitim vrstama stanica [164]. Prethodno je pokazano da diferencijacija monocita uz dodatak GM-

CSF uzrokuje pojačano izlučivanje galektina-3 [40]. U ovome je radu pokazano da monociti diferencirani uporabom GM-CSF i M-CSF, kao i klasično, te alternativno aktivirani humani makrofagi (podrijetlom od monocita) snažno izlučuju galektin-3 u hranidbeni medij. Tijekom prva 72 sata diferencijacije, oba podtipa makrofaga su, uz osnovnu formu galektina-3 od 30,1 kDa, u hranidbeni medij izlučivali dodatnu krnju formu od 26,6 kDa. Izlučivanje ove forme galektina-3 smanjuje se u slijedeća 72 sata diferencijacije, a nije zabilježeno niti prilikom aktivacije diferenciranih makrofaga. Razlike u količini izlučenog proteina zamijećene su tijekom diferencijacije, kao i aktivacije diferenciranih makrofaga M1. Naime, makrofagi M1 nekih donora izlučili su u hranidbeni medij i do 40 puta više galektina-3 u odnosu na monocite odgovarajućeg donora. Galektin-3 djeluje kao negativni regulator funkcije LPS, i suprimira njegove pro-inflamatorne učinke, na način da se izravno veže za molekulu LPS [137]. Stoga je moguće da pojačano izlučivanje galektina-3, koje je zamijećeno kod M1 makrofaga, barem dijelom služi modulaciji djelovanja LPS. M2 makrofagi također izlučuju galektin-3 u hranidbeni medij, no kod većine je donora krvi razina izlučenog proteina odgovarala polovici one koju izlučuju M1 makrofagi odgovarajućeg donora. Čini se, da se veći dio galektina-3 što ga luče M2 makrofagi veže na površinu tih stanica.

Zabilježene razlike u količini izlučenog galektina-3, ponukale su pitanje potencijala ovih stanica da vežu egzogeno dodani rh-galektin-3. Prikupljeni rezultati potvrdili su otprije uočenu činjenicu, da monociti imaju veliki kapacitet vezanja galektina-3 [40], no veća razina vezanja rh-galektina-3 na M1 ili M2a/M2c podtip aktiviranih makrofaga nije zamijećena. Čini se da su receptori za galektin-3 na aktiviranim makrofagima u potpunosti zasićeni, dok u monocita postoji velik broj slobodnih receptora pa je stoga moguće da su monociti osjetljiviji od aktiviranih makrofaga na promjene koncentracije galektina-3, te da na njih mogu brzo reagirati kemoatrakcijom, proizvodnjom superoksidnih iona ili, moguće, diferencijacijom. Tretman stanica imunosnog sustava galektinom-3 može modulirati njihovu aktivaciju i izlučivanje upalnih citokina [124, 132-134]. Kako bi se potvrdila pretpostavka da su receptori galektina-3 u klasično i alternativno aktiviranih makrofaga zasićeni, ove su stanice izložene jednodnevnom uzgoju uz galektin-3, a potom su u staničnim supernatantima protočnom citometrijom izmjerene količine izlučenih citokina. U supernatantima spomenutih makrofaga nisu zabilježene povišene razine upalnih citokina u odnosu na kontrolne stanice. Povišene razine citokina nisu zabilježene ni u supernatantima humanih limfocita uzgajanih uz dodatak galektina-3.

Razlike u razini i obrascu ekspresije galektina-3 kod različito diferenciranih i aktiviranih humanih makrofaga u odnosu na galektin-1 su značajne. Stoga, specifičan uzorak ekspresije i sekrecije ovog proteina u diferenciranih i aktiviranih makrofaga pridonosi boljem razumijevanju uloge i regulacije galektina-3 u tim stanicama. Novi uvid u biološke karakteristike različito diferenciranih i aktiviranih makrofaga, te limfocita baca svjetlo na galektin-3 kao modulator ovih stanica, te će pomoći će stvoriti temelje za razvoj novih terapeutskih pristupa pri liječenju upalnih procesa.

5 Zaključci

Na, temelju provedenih pokusa, dobivenih rezultata i rasprave – može se zaključiti sljedeće:

- Na genskoj i proteinskoj razini galektin-1 se jednako eksprimira kod humanih monocita, diferenciranih, te klasično (M1) i alternativno (M2a/M2c) aktiviranih makrofaga. Na membrani alternativno aktiviranih makrofaga, zabilježena je povišena razina ekspresije galektina-1 u odnosu na klasično aktivirane makrofage.

- Ekspresija galektina-3 povišena je u oba tipa diferenciranih, te klasično i alternativno aktiviranih makrofaga, u odnosu na monocite. Uzevši generalno, ekspresija je povišena u alternativno, u odnosu na klasično aktivirane makrofage.

- U monocita, diferenciranih, te klasično i alternativno aktiviranih makrofaga pojedinih donora, uz osnovnu formu, zabilježeno je od jedne do čak pet formi iskidanog galektina-3. Također, zabilježena je iznimna varijabilnost u broju i intenzitetu ekspresije pojedine forme galektina-3 među istim podtipovima stanica podrijetlom od različitih donora krvi. Općenito, u alternativno aktiviranih makrofaga dolazi do pojačanog kidanja galektina-3.

- Na membrani diferenciranih i aktiviranih makrofaga zabilježena je povišena ekspresija vezanog galektina-3 u odnosu na monocite, no postoji izrazita varijabilnost u razini ekspresije u istih podtipova diferenciranih i aktiviranih makrofaga izoliranih iz različitih donora krvi.

- U klasično aktiviranih M1, ali ne i u alternativno aktiviranih makrofaga, zabilježena je podjela na dvije različite populacije stanica na, temelju razine ekspresije galektina-3 vezanog na membrani.

- Diferencirani i aktivirani makrofagi u hranidbeni medij izlučuju više galektina-3 u odnosu na monocite. Štoviše, klasično diferencirani i aktivirani makrofagi izlučuju znatno više galektina-3 od alternativno aktiviranih makrofaga. U hranidbenom mediju oba tipa diferenciranih makrofaga, uz osnovnu, zabilježena je i pokidana forma galektina-3, dok je u klasično M1, te makrofaga M2a i M2c detektirana isključivo osnovna forma galektina-3.

- Humani monociti imaju golemi kapacitet vezanja egzogeno dodanog rh-galektina-3, dok su membranski receptori ovog lektina u aktiviranih makrofaga zasićeni. Egzogeno dodani rh-galektin-3 ne utječe na lučenje citokina makrofaga M1, M2a i M2c.

- Egzogeno dodani rh-galektin-3 ne utječe na lučenje citokina u humanih limfocita.

6 POPIS LITERATURE

1. Drickamer, K. *Structures and functions of animal lectins*. 2006; Available from: http://www.imperial.ac.uk/research/animallectins/ctld/lectins.html.
2. Fred Brewer, C., *Binding and cross-linking properties of galectins.* Biochimica et Biophysica Acta, 2002. 1572(2-3): p. 255-62.
3. Yang, R.Y., G.A. Rabinovich, and F.T. Liu, *Galectins: structure, function and therapeutic potential.* Expert Reviews in Molecular Medicine, 2008. 10: p. e17.
4. Cooper, D.N., *Galectinomics: finding themes in complexity.* Biochimica et Biophysica Acta, 2002. 1572(2-3): p. 209-31.
5. Hirabayashi, J. and K. Kasai, *The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution.* Glycobiology, 1993. 3(4): p. 297-304.
6. Liu, F.T. and G.A. Rabinovich, *Galectins as modulators of tumour progression.* Nature Reviews Cancer, 2005. 5(1): p. 29-41.
7. Lopez-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.* Journal of Molecular Biology, 2004. 343(4): p. 957-70.
8. Leppanen, A., et al., *Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha2,3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetyllactosamine units on surface-bound extended glycans.* The Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(7): p. 5549-62.
9. Outenreath, R.L. and A.L. Jones, *Influence of an endogenous lectin substrate on cultured dorsal root ganglion cells.* Journal of Neurocytology, 1992. 21(11): p. 788-95.
10. Chiariotti, L., et al., *Galectin genes: regulation of expression.* Glycoconjugate Journal, 2004. 19(7-9): p. 441-9.
11. Ahmad, N., et al., *Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3.* Glycobiology, 2004. 14(9): p. 817-25.
12. He, J. and L.G. Baum, *Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death.* The Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(6): p. 4705-12.
13. Camby, I., et al., *Galectin-1: a small protein with major functions.* Glycobiology, 2006. 16(11): p. 137R-157R.
14. Vyakarnam, A., et al., *Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing.* Molecular and Cellular Biology, 1997. 17(8): p. 4730-7.

15. Paz, A., et al., *Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation.* Oncogene, 2001. 20(51): p. 7486-93.
16. Clerch, L.B., et al., *Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin.* Biochemistry, 1988. 27(2): p. 692-9.
17. Maeda, N., et al., *Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways.* The Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(21): p. 18938-44.
18. Andersen, H., et al., *A proteome study of secreted prostatic factors affecting osteoblastic activity: galectin-1 is involved in differentiation of human bone marrow stromal cells.* Journal of Bone and Mineral Research, 2003. 18(2): p. 195-203.
19. Hittelet, A., et al., *Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration.* International Journal of Cancer, 2003. 103(3): p. 370-9.
20. van den Brule, F., et al., *Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin.* Laboratory Investigation, 2003. 83(3): p. 377-86.
21. Camby, I., et al., *Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases.* Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2002. 61(7): p. 585-96.
22. Harvey, S., et al., *Insights into a plasma membrane signature.* Physiological Genomics, 2001. 5(3): p. 129-36.
23. Herrmann, J., et al., *Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase.* The Journal of Biological Chemistry, 1993. 268(35): p. 26704-11.
24. Huflejt, M.E., et al., *L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I.* The Journal of Biological Chemistry, 1993. 268(35): p. 26712-8.
25. Mazurek, N., et al., *Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands.* The Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(46): p. 36311-5.
26. Yoshii, T., et al., *Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest.* The Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(9): p. 6852-7.
27. Ahmad, N., et al., *Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes.* The Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(12): p. 10841-7.

28. Balan, V., et al., *Tyrosine phosphorylated galectin-3 is resistant to PSA cleavage.* The Journal of Biological Chemistry, 2012.
29. Ochieng, J., et al., *Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases.* Biochimica et Biophysica Acta, 1998. 1379(1): p. 97-106.
30. Menon, R.P. and R.C. Hughes, *Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex.* European Journal of Biochemistry, 1999. 264(2): p. 569-76.
31. Hughes, R.C., *Galectins as modulators of cell adhesion.* Biochimie, 2001. 83(7): p. 667-76.
32. Yang, R.Y., D.K. Hsu, and F.T. Liu, *Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1996. 93(13): p. 6737-42.
33. Vlassara, H., et al., *Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex.* Molecular Medicine, 1995. 1(6): p. 634-46.
34. Yang, R.Y., et al., *Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3.* Biochemistry, 1998. 37(12): p. 4086-92.
35. Raimond, J., et al., *Mapping of the galectin-3 gene (LGALS3) to human chromosome 14 at region 14q21-22.* Mammalian Genome, 1997. 8(9): p. 706-7.
36. Guittaut, M., et al., *Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3.* The Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(4): p. 2652-7.
37. Duneau, M., et al., *Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release.* Experimental Cell Research, 2005. 302(2): p. 194-205.
38. Agrwal, N., J.L. Wang, and P.G. Voss, *Carbohydrate-binding protein 35. Levels of transcription and mRNA accumulation in quiescent and proliferating cells.* The Journal of Biological Chemistry, 1989. 264(29): p. 17236-42.
39. Liu, F.T., et al., *Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages.* American Journal of Pathology, 1995. 147(4): p. 1016-28.
40. van Stijn, C.M., et al., *Regulation of expression and secretion of galectin-3 in human monocyte-derived dendritic cells.* Molecular Immunology, 2009. 46(16): p. 3292-9.
41. Kim, K., E.P. Mayer, and M. Nachtigal, *Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins.* Biochimica et Biophysica Acta, 2003. 1641(1): p. 13-23.

42. Abu-Amer, Y. and Z. Bar-Shavit, *Modulation of vitamin D increased H2O2 production and MAC-2 expression in the bone marrow-derived macrophages by estrogen.* Calcified Tissue International, 1994. 55(1): p. 29-32.

43. Saada, A., F. Reichert, and S. Rotshenker, *Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells.* The Journal of Cell Biology, 1996. 133(1): p. 159-67.

44. Reichert, F. and S. Rotshenker, *Galectin-3/MAC-2 in experimental allergic encephalomyelitis.* Experimental Neurology, 1999. 160(2): p. 508-14.

45. Dabelic, S., S. Supraha, and J. Dumic, *Galectin-3 in macrophage-like cells exposed to immunomodulatory drugs.* Biochimica et Biophysica Acta, 2006. 1760(4): p. 701-9.

46. Joo, H.G., et al., *Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes.* Journal of Leukocyte Biology, 2001. 69(4): p. 555-64.

47. Hsu, D.K., et al., *Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3.* American Journal of Pathology, 1996. 148(5): p. 1661-70.

48. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during Trypanosoma cruzi infection.* The Journal of Immunology, 2004. 172(1): p. 493-502.

49. Kadrofske, M.M., K.P. Openo, and J.L. Wang, *The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998. 349(1): p. 7-20.

50. Stock, M., et al., *Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2.* The Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(19): p. 17360-7.

51. Ruebel, K.H., et al., *Effects of DNA methylation on galectin-3 expression in pituitary tumors.* Cancer Research, 2005. 65(4): p. 1136-40.

52. Hsu, D.K., et al., *Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma.* International Journal of Cancer, 1999. 81(4): p. 519-26.

53. Liu, L., et al., *Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling.* Biochem J, 2004. 380(Pt 1): p. 31-41.

54. Dumic, J., G. Lauc, and M. Flogel, *Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB.* Cellular Physiology and Biochemistry, 2000. 10(3): p. 149-58.

55. Zeng, Y., et al., *HIF-1 alpha is a regulator of galectin-3 expression in the intervertebral disc.* Journal of Bone and Mineral Research, 2007. 22(12): p. 1851-61.

56. Sato, S. and R.C. Hughes, *Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin.* The Journal of Biological Chemistry, 1992. 267(10): p. 6983-90.

57. Chiu, C.G., et al., *Diagnostic utility of galectin-3 in thyroid cancer.* American Journal of Pathology, 2010. 176(5): p. 2067-81.

58. Dumic, J., S. Dabelic, and M. Flogel, *Galectin-3: an open-ended story.* Biochimica et Biophysica Acta, 2006. 1760(4): p. 616-35.

59. Van den Brule, F.A., et al., *Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis.* Developmental Dynamics, 1997. 209(4): p. 399-405.

60. Truong, M.J., et al., *Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation.* The Journal of Experimental Medicine, 1993. 177(1): p. 243-8.

61. Truong, M.J., et al., *IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity.* European Journal of Immunology, 1993. 23(12): p. 3230-5.

62. Craig, S.S., et al., *Immunoelectron microscopic localization of galectin-3, an IgE binding protein, in human mast cells and basophils.* The Anatomical Record, 1995. 242(2): p. 211-9.

63. Dietz, A.B., et al., *Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. 275(3): p. 731-8.

64. Wollenberg, A., et al., *Human keratinocytes release the endogenous beta-galactoside-binding soluble lectin immunoglobulin E (IgE-binding protein) which binds to Langerhans cells where it modulates their binding capacity for IgE glycoforms.* J Exp Med, 1993. 178(3): p. 777-85.

65. Califice, S., V. Castronovo, and F. Van Den Brule, *Galectin-3 and cancer (Review).* International Journal of Oncology, 2004. 25(4): p. 983-92.

66. Shalom-Feuerstein, R., et al., *Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells.* Cancer Research, 2005. 65(16): p. 7292-300.

67. Oka, N., et al., *Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells.* Cancer Research, 2005. 65(17): p. 7546-53.

68. Fukumori, T., et al., *Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways.* Cancer Research, 2004. 64(10): p. 3376-9.

69. Liu, F.T., R.J. Patterson, and J.L. Wang, *Intracellular functions of galectins.* Biochimica et Biophysica Acta, 2002. 1572(2-3): p. 263-73.

70. Yu, F., et al., *Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation.* The Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(18): p. 15819-27.

71. Delacour, D., et al., *Requirement for galectin-3 in apical protein sorting.* Current Biology, 2006. 16(4): p. 408-14.

72. Nakahara, S., et al., *Characterization of the nuclear import pathways of galectin-3.* Cancer Research, 2006. 66(20): p. 9995-10006.

73. Lin, H.M., et al., *Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells.* Oncogene, 2002. 21(52): p. 8001-10.

74. Paron, I., et al., *Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. 302(3): p. 545-53.

75. Shimura, T., et al., *Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin.* Cancer Research, 2004. 64(18): p. 6363-7.

76. Laing, J.G. and J.L. Wang, *Identification of carbohydrate binding protein 35 in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex.* Biochemistry, 1988. 27(14): p. 5329-34.

77. Park, J.W., et al., *Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein.* Nucleic Acids Research, 2001. 29(17): p. 3595-602.

78. Hughes, R.C., *Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins.* Biochimica et Biophysica Acta, 1999. 1473(1): p. 172-85.

79. Thery, C., et al., *Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles.* The Journal of Immunology, 2001. 166(12): p. 7309-18.

80. Furtak, V., F. Hatcher, and J. Ochieng, *Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. 289(4): p. 845-50.

81. Dennis, J.W., et al., *Adaptive regulation at the cell surface by N-glycosylation.* Traffic, 2009. 10(11): p. 1569-78.

82. Lajoie, P., et al., *Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane.* The Journal of Cell Biology, 2009. 185(3): p. 381-5.

83. Nakahara, S., N. Oka, and A. Raz, *On the role of galectin-3 in cancer apoptosis.* Apoptosis, 2005. 10(2): p. 267-75.

84. Lin, C.I., et al., *Galectin-3 regulates apoptosis and doxorubicin chemoresistance in papillary thyroid cancer cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. 379(2): p. 626-31.

85. Shi, Y., et al., *Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes beta-catenin and induces apoptosis in human colorectal cancer cells.* International Journal of Cancer, 2007. 121(6): p. 1175-81.

86. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells.* Annual Review of Immunology, 2009. 27: p. 669-92.

87. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood.* Blood, 2010. 116(16): p. e74-80.

88. Parihar, A., T.D. Eubank, and A.I. Doseff, *Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death.* Journal of Innate Immunity, 2010. 2(3): p. 204-15.

89. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions.* The Journal of Experimental Medicine, 2007. 204(12): p. 3037-47.

90. Liu, H., et al., *Transcriptional diversity during monocyte to macrophage differentiation.* Immunology Letters, 2008. 117(1): p. 70-80.

91. Hume, D.A., et al., *The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs.* The Journal of Experimental Medicine, 1983. 158(5): p. 1522-36.

92. Burmester, G.R.i.P., A., *Color atlas of immunology*. 2003, Stuttgart-New York.: Thieme.

93. Verreck, F.A., et al., *Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2004. 101(13): p. 4560-5.

94. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.* Trends in Immunology, 2004. 25(12): p. 677-86.

95. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation.* The Journal of Experimental Medicine, 1992. 176(1): p. 287-92.

96. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages.* Nature Reviews Immunology, 2003. 3(1): p. 23-35.

97. Pechkovsky, D.V., et al., *Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction.* Clinical Immunology, 2010. 137(1): p. 89-101.

98. Moniuszko, M., et al., *Monocyte CD163 and CD36 expression in human whole blood and isolated mononuclear cell samples: influence of different anticoagulants.* Clinical and Vaccine Immunology, 2006. 13(6): p. 704-7.

99. Vautier, S., G. Sousa Mda, and G.D. Brown, *C-type lectins, fungi and Th17 responses.* Cytokine & Growth Factor Reviews, 2010. 21(6): p. 405-12.

100. Hesse, M., et al., *Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism.* The Journal of Immunology, 2001. 167(11): p. 6533-44.

101. Goldsby, R. and J. Kuby, *Immunology - Fifth Edition*. 2005: W H Freeman & Co.

102. Liu, F.T. and G.A. Rabinovich, *Galectins: regulators of acute and chronic inflammation.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. 1183: p. 158-82.

103. Perillo, N.L., et al., *Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes.* The Journal of Experimental Medicine, 1997. 185(10): p. 1851-8.

104. Perillo, N.L., et al., *Apoptosis of T cells mediated by galectin-1.* Nature, 1995. 378(6558): p. 736-9.

105. 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): p. 661-70.

106. Matarrese, P., et al., *Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission.* The Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(8): p. 6969-85.

107. Reich, Z., et al., *Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules.* Nature, 1997. 387(6633): p. 617-20.

108. Pace, K.E., et al., *Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1.* The Journal of Immunology, 1999. 163(7): p. 3801-11.

109. Rabinovich, G.A., et al., *Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1.* Immunology, 1999. 97(1): p. 100-6.

110. van der Leij, J., et al., *Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers.* Molecular Immunology, 2007. 44(4): p. 506-13.

111. 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, 2006. 176(10): p. 6323-32.

112. Norling, L.V., et al., *Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking.* FASEB J, 2008. 22(3): p. 682-90.

113. Rabinovich, G.A., et al., *Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation.* European Journal of Immunology, 2000. 30(5): p. 1331-9.

114. Delbrouck, C., et al., *Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration.* Laboratory Investigation, 2002. 82(2): p. 147-58.

115. La, M., et al., *A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation.* American Journal of Pathology, 2003. 163(4): p. 1505-15.

116. Cooper, D., L.V. Norling, and M. Perretti, *Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow.* Journal of Leukocyte Biology, 2008. 83(6): p. 1459-66.

117. Correa, S.G., et al., *Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages.* Glycobiology, 2003. 13(2): p. 119-28.

118. Barrionuevo, P., et al., *A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway.* The Journal of Immunology, 2007. 178(1): p. 436-45.

119. Zuniga, E., et al., *Regulated expression and effect of galectin-1 on Trypanosoma cruzi-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival.* Infection and Immunity, 2001. 69(11): p. 6804-12.

120. Stowell, S.R., et al., *Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion.* The Journal of Immunology, 2008. 180(5): p. 3091-102.

121. Rabinovich, G.A., et al., *An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer.* Scandinavian Journal of Immunology, 2007. 66(2-3): p. 143-58.

122. Almkvist, J., et al., *Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1.* The Journal of Immunology, 2002. 168(8): p. 4034-41.

123. Sohn, W.Y., et al., *Solvent-assisted conformational isomerization and the conformationally-pure REMPI spectrum of 3-aminophenol.* Physical Chemistry Chemical Physics. 13(15): p. 7037-42.

124. Cortegano, I., et al., *Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types.* The Journal of Immunology, 1998. 161(1): p. 385-9.

125. Demetriou, M., et al., *Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation.* Nature, 2001. 409(6821): p. 733-9.

126. Fukumori, T., et al., *CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis.* Cancer Research, 2003. 63(23): p. 8302-11.

127. Almkvist, J., et al., *Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe.* Infection and Immunity, 2001. 69(2): p. 832-7.

128. Frigeri, L.G., R.I. Zuberi, and F.T. Liu, *Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells.* Biochemistry, 1993. 32(30): p. 7644-9.

129. Kuwabara, I. and F.T. Liu, *Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin.* The Journal of Immunology, 1996. 156(10): p. 3939-44.

130. Sano, H., et al., *Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages.* The Journal of Immunology, 2000. 165(4): p. 2156-64.

131. Karlsson, A., et al., *Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils.* Glycobiology, 2009. 19(1): p. 16-20.

132. Jeng, K.C., L.G. Frigeri, and F.T. Liu, *An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes.* Immunology Letters, 1994. 42(3): p. 113-6.

133. Nishi, Y., et al., *Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis.* Allergology International, 2007. 56(1): p. 57-65.

134. Farnworth, S.L., et al., *Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function.* American Journal of Pathology, 2008. 172(2): p. 395-405.

135. Rotshenker, S., *The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease.* Journal of Molecular Neuroscience, 2009. 39(1-2): p. 99-103.

136. MacKinnon, A.C., et al., *Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3.* The Journal of Immunology, 2008. 180(4): p. 2650-8.

137. Li, Y., et al., *Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation.* The Journal of Immunology, 2008. 181(4): p. 2781-9.

138. Colnot, C., et al., *Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice.* Immunology, 1998. 94(3): p. 290-6.

139. Hsu, D.K., et al., *Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses.* American Journal of Pathology, 2000. 156(3): p. 1073-83.

140. de Boer, R.A., L. Yu, and D.J. van Veldhuisen, *Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure.* Current Heart Failure Reports, 2010. 7(1): p. 1-8.

141. Romero, M.D., et al., *Circulating anti-galectin-1 antibodies are associated with the severity of ocular disease in autoimmune and infectious uveitis.* Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006. 47(4): p. 1550-6.

142. Verreck, F.A., et al., *Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation.* Journal of Leukocyte Biology, 2006. 79(2): p. 285-93.

143. Solinas, G., et al., *Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility.* The Journal of Immunology, 2010. 185(1): p. 642-52.

144. Lolmede, K., et al., *Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways.* Journal of Leukocyte Biology, 2009. 85(5): p. 779-87.

145. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Analytical Biochemistry, 1985. 150(1): p. 76-85.

146. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.

147. Girish, V. and A. Vijayalakshmi, *Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ.* Indian Journal of Cancer, 2004. 41(1): p. 47.

148. Lindstedt, R., et al., *Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway.* The Journal of Biological Chemistry, 1993. 268(16): p. 11750-7.

149. Sawangareetrakul, P., et al., *Galectin-3 expression in human papillary thyroid carcinoma.* Cancer Genomics & Proteomics, 2008. 5(2): p. 117-22.

150. Wang, W.C., et al., *The poly-N-acetyllactosamines attached to lysosomal membrane glycoproteins are increased by the prolonged association with the Golgi complex.* The Journal of Biological Chemistry, 1991. 266(34): p. 23185-90.

151. Dumic, J., et al., *Transfer to in vitro conditions influences expression and intracellular distribution of galectin-3 in murine peritoneal macrophages.* Zeitschrift für Naturforschung C, 2000. 55(3-4): p. 261-6.

152. Mantovani, A. and M. Locati, *Orchestration of macrophage polarization.* Blood, 2009. 114(15): p. 3135-6.

153. Niida, S., et al., *Expression of Mac-2 antigen in the preosteoclast and osteoclast identified in the op/op mouse injected with macrophage colony-stimulating factor.* Journal of Bone and Mineral Research, 1994. 9(6): p. 873-81.

154. Ochieng, J., et al., *Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9.* Biochemistry, 1994. 33(47): p. 14109-14.

155. Guevremont, M., et al., *Galectin-3 surface expression on human adult chondrocytes: a potential substrate for collagenase-3.* Annals of the Rheumatic Diseases, 2004. 63(6): p. 636-43.

156. Saraswati, S., et al., *Galectin-3 is a substrate for prostate specific antigen (PSA) in human seminal plasma.* Prostate. 71(2): p. 197-208.

157. Ho, M.K. and T.A. Springer, *Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies.* The Journal of Immunology, 1982. 128(3): p. 1221-8.

158. Schneider, D., et al., *Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells.* European Journal of Cell Biology. 89(11): p. 788-98.

159. van den Brule, F., S. Califice, and V. Castronovo, *Expression of galectins in cancer: a critical review.* Glycoconjugate Journal, 2004. 19(7-9): p. 537-42.

160. Nangia-Makker, P., et al., *Cleavage of galectin-3 by matrix metalloproteases induces angiogenesis in breast cancer.* International Journal of Cancer, 2010. 127(11): p. 2530-41.

161. Nangia-Makker, P., et al., *Regulation of the expression of galactoside-binding lectin during human monocytic differentiation.* Cancer Research, 1993. 53(20): p. 5033-7.

162. Hirabayashi, J., et al., *Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography.* Biochimica et Biophysica Acta, 2002. 1572(2-3): p. 232-54.

163. Stowell, S.R., et al., *Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens.* The Journal of Biological Chemistry, 2008. 283(15): p. 10109-23.

164. Sato, S. and R.C. Hughes, *Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages.* The Journal of Biological Chemistry, 1994. 269(6): p. 4424-30.

7 POPIS KRATICA I SIMBOLA

7-AAD	7-aminoaktinomicin
Ala	alanin
APS	amonijev persulfat
Arg	arginin
Asn	aspargin
BCA	bicinkoninična kiselina (*eng.* bicinchoninic acid)
Bcl-2	protein 2 limfoma limfocita B (*eng.* B-cell lymphoma 2)
BCR	receptor limfocita B (*eng.* B-cell receptor)
BSA	albumin goveđeg seruma (*eng.* bovine serum albumin)
cAMP	ciklički adenozin mono fosfat (*eng.* cyclic adenosine monophosphate)
cDNA	prateća DNA (*eng.* complementary DNA)
CRD	domena koja prepoznaje ugljikohidrate (*eng.* carbohydrate recognition domain)
CREB	protein koji se veže na element odgovora na cAMP (*eng.* cAMP-response element binding factor)
C_T	granični ciklus (*eng.* treshold cycle)
dNTP	deoksinukleotid-trifosfat
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilen-diamin-tetraoctena kiselina
ELISA	enzimski vezan imunosorbent, test (*eng.* enzyme-linked immunosorbent assay)
ER	endoplazmatski retikul
FBS	fetalni, teleći serum (*eng.* foetal bovine serum)
FITC	fluorescein izotiocijanat
FL	fluorescencijski
FS	prednje raspršenje (*eng.* forward scatter)
Gal	galaktoza
galig	gen unutar galektina-3 (*eng.* galectin-3 internal gene)
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, (*eng.* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GlcNAc	N-acetilglukozamin
Gly	glicin (*eng.* glycine)
GM1	monosijalotetraheksozilgangliozid
GM-CSF	faktor stimulacije rasta granulocitno-makrofagnih kolonija (*eng.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

GTP	gvanozin trifosfat (*eng.* guanosine triphosphate)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina
HZTM	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu
IFN-γ	interferon-γ
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktozid
kDa	kilodalton
LacNAc	N-acetillaktozamin
LAL	lizat amebocita *Limulus polyphemus* (*eng.* Limulus Amebocyte Lysate)
LB medij	Luria-Bertani, tekući bogati medij
LGALS1, 3	gen za galektin-1, -3 (*eng.* lectin, galactoside-binding, soluble 1, 3)
LPS	lipopolisaharid
M-CSF	faktor stimulacije rasta makrofagnih kolonija (*eng*. macrophage colony-stimulating factor)
MDCK	Madin-Darby stanice psećeg bubrega (*eng.* Madin-Darby Canine Kidney Cells)
ME-PBS	Merkaptoetanol-PBS
MHC	glavni kompleks tkivne podudarnosti (*eng.* major histocompatibility complex)
MMP-2, -9	metaloproteinaza matriksa-2, -9 (*eng.* matrix metalloproteinase-2, -9)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. messenger ribonucleic acid)
NF-κB	jezgreni faktor-κB (*eng.* nuclear factor-κB)
NK	prirodni ubojica (*eng.* natural killer)
PAG	poliakrilamidni gel
PBS	fosfatni pufer (*eng.* phosphate-buffered saline),
PE	fikoeritrinom
pI	izoelektrična točka
PI	propidij jodid
PIB	Pufer za ispiranje i bojanje stanica
Pro	prolin
PVDF	poliviniliden difluorid
RFR	relativni omjer (*eng.* relative fold ratio)
rh	rekombinantni humani
RIPA	Pufer za lizu stanica (*eng.* Radioimmunoprecipitation assay)
SDS	natrijev dodecilsulfat (*eng.* sodium dodecyl sulphate)

Ser	serin
Sp1	protein specifičnosti 1 (*eng.* specificity protein 1)
SS	bočno raspršenje (*eng.* side scatter)
TBS	otopina puferurana Trisom (*eng.* Tris-buffered saline)
TCR	receptor limfocita T (*eng.* T-cell receptor)
TF	transkripcijski faktor (*eng.* transcription factor)
TLR	*Toll-like* receptor (*eng.* Toll-like receptor)
TNF-α	faktor nekroze tumora-α (*eng.* tumor necrosis factor-α)
Trp	triptofan
Tyr	tirozin (*eng.* tyrosine)

8 PRILOG

Ovaj prilog sadrži dva znanstvena rada objavljena u časopisima zastupljenim u bazama Current Contents ili Science Citation Index – Expanded koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

Novak, R., Dabelić, S. and Dumić, J., *Galectin-1 and galectin-3 expression profiles in classically and alternatively activated human macrophages.* Biochimica et Biophysica Acta, 2011.

Lepur, A., Carlsson, M., **Novak, R.**, Dumić, J., Nilsson, U. and Leffler, H., *Galectin-3 is rapidly endocytosed into macrophages by carbohydrate independent and dependent pathways.* Biochimica et Biophysica Acta, 2012.

9 Životopis

Ruđer Novak rođen je 5. lipnja 1982. godine u Zagrebu, gdje je završio osnovnu školu, a 2000. godine i opću gimnaziju. Iste godine upisao je studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je 2005. godine s izvrsnim uspjehom, a sljedeće je godine zaposlen kao znanstveni novak – asistenta na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta upisao je 2007. godine. Sudjelovao je na brojnim domaćim i međunarodnim, tečajevima i znanstvenim skupovima. Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, te Hrvatskog društva za istraživanja raka. Koautor je pet znanstvenih radova, četiri objavljena u časopisima zastupljenim u bazama Current Contents, 16 kongresnih priopćenja i jednog nastavnog, teksta. Održao je jedno predavanje na domaćem znanstvenom skupu s međunarodnim sudjelovanjem.

Objavljeni znanstveni radovi:

Novak, R., Dabelić, S. i Dumić, J., *Galectin-1 and galectin-3 expression profiles in classically and alternatively activated human macrophages.* Biochimica et Biophysica Acta, 2011.

Lepur, A., Carlsson, M., **Novak, R.**, Dumić, J., Nilsson, U. and Leffler, H., *Galectin-3 is rapidly endocytosed into macrophages by carbohydrate independent and dependent pathways.* Biochimica et Biophysica Acta, 2012.

Radošević K., **Novak, R.**, Slivac, I., Mihajlović, M., Dumić, J., Kniewald, Z. i Gaurina Srček, V. *Cytotoxic and apoptotic effects of 17α-ethynylestradiol and diethylstilbestrol on CHO-K1 cells.* Food Technol Biotechnol, 2011. 49(4): p. 447-452.

Hranilović, D., **Novak, R.**, Babić, M., Novokmet, M., Bujas-Petković, Z., i Jernej, B., *Hyperserotonemia in autism : the potential role of 5HT-related gene variants.* Coll Antropol, 2008. 32(S1): p. 75-80.

Šeruga Musić, M., Novokmet, M., **Novak, R.**, Krajačić, M. i Škorić, D., *Distribution of phytoplasma diseases in the Lombardy poplar tree population of Zagreb urban area.* Acta Bot Croat, 2008. 67(2): p. 119-130.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

ULOGA GALEKTINA-3 U STANICAMA MONOCITNE I LIMFOCITNE LOZE

Ruđer Novak

SAŽETAK

Galektini-1 i -3 moduliraju mnoge stanične procese, a regulacijom migracije, fagocitoze i degranulacije upalnih stanica, te sinteze citokina i medijatora upale, ovi su lektini uključeni u sve faze upalnih reakcija urođenog i stečenog imunosnog odgovora. Djelovanje mu izrazito ovisi o lokalizaciji i tipu stanica, no galektin-1 općenito se smatra jakim protu-upalnim signalom, dok galektin-3 uglavnom potiče upalu. Ovim radom ispitana je uloga galektina-3 u fiziologiji limfocita, te uloga i ekspresija galektina-1 i -3 u monocita, te klasično i alternativno diferenciranih i aktiviranih makrofaga.

Humani limfociti i monociti izolirani su iz krvi zdravih dobrovoljnih davatelja. Uzgojem u hranidbenom mediju uz dodatak granulocitno-makrofagnog, odnosno makrofagnog faktora stimulacije rasta kolonija, monociti su diferencirani u makrofage tipa M1 i M2. Diferencirani makrofagi M1 aktivirani su klasično, dodatkom lipopolisaharida i interferona-γ, ili alternativno u fenotip M2a/M2c, dodatkom interleukina (IL)-4/IL-10. Utvrđena je ekspresija galektina-1 i -3 na genskoj i proteinskoj razini, te njihova prisutnost na membrani stanica. U hranidbenom mediju spomenutih stanica određena je koncentracija galektina-3. Utvrđen je učinak egzogeno dodanog galektina-3 na fiziologiju limfocita, monocita i aktiviranih makrofaga.

Dobiveni rezultati upućuju na to da diferencijaciju i polarizaciju humanih monocita u klasično (M1) i alternativno (M2a/M2c) aktivirane makrofage prate izrazite promjene razine ekspresije i proteolitičkog kidanja galektina-3. Ekspresija i sekrecija galektina-3 usko su regulirane i znatno se razlikuju u klasično, u odnosu na alternativno aktivirane makrofage, dok u galektina-1 razlike u razini ekspresije nisu toliko naglašene. Zamijećene su izrazite razlike ekspresijskih profila i kidanja galektina-3 u istih podtipova makrofaga podrijetlom od različitih donora krvi. U klasično aktiviranih makrofaga, temeljem intenziteta ekspresije membranskog galektina-3, zamijećene su dvije odvojene populacije stanica. Humani monociti pokazuju izrazito velik kapacitet vezanja egzogeno dodanog galektina-3, dok su u aktiviranih makrofaga receptori tog proteina u potpunosti zasićeni. Egzogeno dodani galektin-3 ne utječe na izlučivanje citokina limfocita i aktiviranih makrofaga.

Razlike u razini i obrascu ekspresije galektina-3 u različito diferenciranih/aktiviranih makrofaga u odnosu na galektin-1 su značajne. Stoga, specifičan uzorak ekspresije i sekrecije ovog proteina u diferenciranih i aktiviranih makrofaga pridonosi boljem razumijevanju uloge i regulacije galektina-3 u tim stanicama. Novi uvid u biološke karakteristike različito diferenciranih i aktiviranih makrofaga, te limfocita baca svjetlo na galektin-3 kao modulator ovih stanica.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 117 stranica, 32 slike, 3 tablice i 164 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi: galektin-1, galektin-3, diferencijacija monocita, aktivacija makrofaga, M1/M2 makrofagi
Mentor: **Dr. sc. Jerka Dumić**, red. prof., *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*
Ocjenjivači: **Dr. sc. Sanja Dabelić**, docent, *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*
Dr. sc. Jerka Dumić, red. prof., *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*
Dr. sc. Branko Malenica, *red. prof., Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Rad prihvaćen: 25.4.2012.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

THE ROLES OF GALECTIN-3 IN MONOCYTE AND LYMPHOCYTE LINEAGES

Ruđer Novak

SUMMARY

Galectins-1 and -3 modulate many cellular processes, and through regulation of cell migration, phagocytosis, immune cell degranulation and modulation of cytokine and inflammatory mediator production, these lectins are intimately involved in all phases of inflammatory reactions of innate and acquired immunity. Galectin-1 is generally considered a strong anti-inflammatory and galectin-3 a pro-inflammatory signal, but their effects tremendously vary with respect to their localization and the cell type. In this work we address the role of galectin-3 in the physiology of lymphocytes and the role and expression of galectins-1 and -3 in human monocytes and classically or alternatively differentiated and activated macrophages.

Human lymphocytes and monocytes were isolated from the blood of healthy donors and differentiated into M1 and M2 subtype of macrophages by cultivation in culture media supplemented with granulocyte-macrophage or macrophage colony-stimulating factor, respectively. M1 macrophages were activated classically by lipopolysaccharide and interpheron-γ or alternatively into M2a/M2c phenotypes by interleukin (IL)-4/IL-10, respectively. The expression of galectins-1 and -3 was determined on gene and protein levels, and the amount of galectins bound to the cell membranes was estimated. Culture media were probed for secreted galectin-3. The effect of exogenously added galectin-3 on the physiology of lymphocytes, monocytes and activated macrophages was investigated.

Obtained results imply that differentiation and activation of monocytes into classically (M1) and alternatively (M2a/M2c) activated macrophages is followed by marked changes of expression and proteolitic cleavage of galectin-3. Expression and secretion of galectin-3 was tightly regulated and significantly differed among classically and alternatively activated macrophages, while the differences of galectin-1 expression profiles were not pronounced. Significant differences in galectin-3 expression profiles were observed between the same macrophage subtypes obtained from different blood donors. Moreover, classically activated macrophages polarize into two distinct populations with respect to the expression of membrane galectin-3. Human monocytes exhibited high amount of free galectin-3 receptors, while on both types of activated macrophages the receptors were fully saturated. Exogenously added galectin-3 does not affect cytokine secretion of lymphocytes or activated macrophages.

Galectin-3 is more distinctive descriptor of macrophage differentiation/activation than galectin-1. Its specific expression and secretion pattern in M1 *vs.* M2a/M2c macrophages contributes to better understanding of its role and regulation in these cells and provides a new insight on biological characteristics of these cells.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes:	117 pages, 32 figures, 3 tables and 164 references. Original is in Croatian language.
Keywords:	galectin-1; galectin-3; monocyte differentiation; macrophage activation; M1/M2 macrophages
Supervisor:	**Jerka Dumić, Ph.D.** *Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.*
Reviewers:	**Sanja Dabelić, Ph.D.** *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.* **Jerka Dumić, Ph.D.** *Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.* **Branko Malenica, Ph.D.** *Professor, School of Medicine, University of Zagreb*.

The thesis accepted: April, 25th, 2012