



## Општи подаци и протокол истраживања

### Назив Пројекта :

УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 И ST2 У АКТИВАЦИЈИ И ФУНКЦИЈИ НК ЋЕЛИЈА У ТУМОРСКИМ МОДЕЛИМА

### Кључне речи :

NK ћелије, Галектин-3, ST2, малигни меланом, тумор дојке

## Предмет, садржај и циљ истраживања

### Сажетак

NK ћелије као ефекторске ћелије неспецифичног имунског одговора имају значајну улогу у елиминацији малигно трансформисаних ћелија чиме представљају прву линију одбране од тумора. Своју цитотоксичност остварују како ослобађањем молекула (перфорина и гранзима), тако и индукцијом апоптозе посредством рецептора смрти и тиме ефикасно контролишу развој и ширење тумора. Осим туморицидне активности, NK ћелије представљају значајан извор интерферона- $\gamma$  (од енгл. Interferon- $\gamma$ ; IFN- $\gamma$ ) који је важан у активацији антиген-презентујућих ћелија и индукцији анти-туморског имунског одговора. Активација NK ћелија строго је регулисана балансом сигнала са активационих и инхибиторних рецептора.

Галектин-3 (Gal-3) као протеин са имунорегулаторном функцијом појачано је експримиран како на малигним тако и на бројним имунокомпетентним ћелијама у одговору на различите стимулусе. Иако се претпоставља да експресија Gal-3 на NK ћелијама материце (uNK ћелије) може бити повезана са смањивањем њихове функције, генерално говорећи мало се зна о улози Gal-3 у активацији и функцији NK ћелија.

ST2 молекула је члан интерлеукин 1 рецепторске фамилије (IL-1R). Такође је експримиран је на бројним имунокомпетентним ћелијама укључујући и NK ћелије. Блокирање ST2 сигналног пута супримира Th2, а промовише развој Th1/Th17 имунског одговора. Th1/Th17 лимфоцити обезбеђују ефикасан анти-туморски одговор посредован CD8+T лимфоцитима (CTLs). Али опет, улога ST2 у активацији и функцији NK ћелија није испитивана. Због свега наведеног, било би од интереса видети какав је број и функција NK ћелија у ST2 и Gal-3-дефицијентних мишева пре и после убризгавања тумора и у којој мери контрибуирају у цитотоксичности спленоцита.

### Циљ истраживања

Основни циљ планираног истраживања је да се испитају функционалне и феотипске карактеристике NK ћелија у мишјим моделима малигног меланома и тумора дојке, као и евентуални утицај Gal-3 и ST2 у њиховој активацији и функцији.



У складу са основним циљем поставили смо и посебне циљеве:

**Циљ 1.** Одредити процентуални удео и укупан број NK ћелија у дренарајућим лимфним чворовима и слезини код Gal-3 и ST2 *knock-out* мишева пре и после апликације тумора.

**Циљ 2.** Одредити активациони статус NK ћелија у дренарајућим лимфним чворовима и слезини код Gal-3 и ST2 *knock-out* мишева пре и после апликације тумора.

**Циљ 3.** Испитати цитотоксичну активност NK ћелија код Gal-3 и ST2 *knock-out* мишева пре и после апликације тумора.

**Циљ 4.** Испитати продукцију IFN- $\gamma$  и IL-10 у NK ћелијама код Gal-3 и ST2 *knock-out* мишева пре и после апликације тумора.

### Актуелност истраживања

Галектин-3 (Gal-3) је лектин са високим афинитетом за  $\beta$ -галактозиде, и показује различиту дистрибуцију како у нормалним тако и у туморским ћелијама. Овај протеин интерагује са различитим лигандима (гликопротеинима и гликолипидима) и регулише бројне функције као што су ћелијска адхезија, малигна трансформација, инвазија и метастазирање тумора. Осим на малигним ћелијама, Gal-3 је експримиран и на бројним имунокомпетентним ћелијама (моноцити, макрофаги, дендритске ћелије, еозинофили, мастоцити, NK ћелије и активирани Т и В лимфоцити) и има значајну улогу у модулацији имуноског одговора (1, 2). Новија истраживања показују да су Gal-3-дефицијентни мишеви резистентни на експериментални аутоимуни енцефаломијелитис (ЕАЕ) и дијабетес (3, 4). Такође је показано да је Gal-3 испољен и на мишијим трофобластима плаценте и гранулама uNK ћелија (NK ћелије матереце) локализованих у децидуи матереце (5-7). Сматра се да NK ћелије имају важну улогу у одбрани од слабо имуногеног тумора, као што је малигни меланом (8). У бројним студијама, било амплификацијом активности било деплецијом или инхибицијом активности NK ћелија, показано је да NK ћелије имају значајан удео у анти-туморској имуности у моделу мишијег меланома (8-10). Наши прелиминарни резултати на моделу B16 меланома показују да одсуство Gal-3 чини C57BL/6 мишеве резистентним на метастазе, смањује адхезивност малигнућих ћелија за ендотел плућа, а слезинске ћелије показују већу цитотоксичност у Gal-3 *knock-out* мишева.

ST2 молекул је члан интерлеукин 1 рецепторске фамилије (IL-1R). Налази на површини хелперских Т лимфоцита тип 2 (Th2; 11), као и мастоцита (16), инваријантних iNKT ћелија (17), базофила (17), еозинофила (18), дендритских ћелија и NK ћелија (17). IL-33, нови члан IL-1 цитокинске фамилије, представља специфичан лиганд за ST2 рецептор који индукује Th2 имуноски одговор (18). Ово је у супротности са карактеристикама других цитокина из IL-1 фамилије, као што су IL-1 $\beta$  и IL-18, који доводе до развоја Th1 имуног одговора. ST2 *knock-out* мишеви немају један од најзначајнијих маркера Th2 ћелија (11) и имају смањену активност Th2 ћелија, што фацилитира ефекат Th1 ћелија. То је показано у више модела у инфективном имунитету, алергијама и у аутоимуности (11-15). Нашим прелиминарним резултатима показали смо да у туморском систему примарног карцинома дојке, ST2-дефицијентни мишеви показују закасни раст примарног тумора, смањену инциденцу метастаза, повећану продукцију проинфламаторних цитокина и повећану цитотоксичност спленоцита. Али опет,



улога NK ћелија није испитивана. Због свега наведеног, било би од интереса видети какав је број и функција NK ћелија у ST2 и Gal-3-дефицијентних мишева пре и после убризгавања тумора и у којој мери контрибуирају у цитотоксичности спленоцита.

**Предмет и опис истраживања,  
задачи, методологија, очекивани резултати:**

### **Експерименталне животиње**

Као експерименталне животиње користиће се мишеви сојева BALB/C, C57BL/6 и нокаут мишеви (Gal-3<sup>-/-</sup> и ST2<sup>-/-</sup>), старости од 8 до 12 недеља. Све експерименталне и контролне групе у истраживању садржаће по 50 мишева.

### **Индуковање тумора**

Тумори ће се индуковати апликацијом слабо имуногених малигнућ ћелијских линија: 4T1 и B16F1, сингених за BALB/C, односно C57BL/6 мишеве. За индуковање примарног тумора ћелије ће се убризгавати субкутано. За модел експерименталне метастазе, ћелије ће се убризгавати интравенски, у латералну репну вену.

### **Изолација ћелија**

Након жртвовања мишева изоловаће се тумор дренирајући лимфни чворови и слезина. Пропуштањем поменутих органа кроз ћелијско сито (cell strainer) добиће се једноћелијска суспензија (леукоцити лимфног чвора и спленоцити). Коришћењем анти-CD49b (DX5) магнетима коњугованих антитела и пропуштањем предходно изолованих спленоцита кроз LS колоне магнетног MACS сепаратора изоловаће се NK ћелије.

### **Квантификација и фенотипизација NK ћелија**

Проточном цитометријом, коришћењем моноклонских антимишћјих антитела (CD3, CD19, NK1.1 и NKp46) одређиваћемо процентуални удео и укупан број NK ћелија у дренирајућим лимфним чворовима и слезини. Комбинацијом поменутих антитела са анти: KLRG, CD69, NKG2D, CD27 и CD11b одредићемо активациони статус NK ћелија пре и после апликације тумора.

### **Цитотоксичност NK ћелија**

Цитотоксичност NK ћелија мериће се МТТ- тестом цитотоксичности, након 24- часовне кокултивације са туморским ћелијама.

### **Испитивање продукције цитокина NK ћелија**

Проточном цитометријом, коришћењем анти-IFN- $\gamma$  и анти-IL-10 антитела за интрацелуларно бојење, мерићемо продукцију поменутих цитокина у NK ћелијама пре и после апликације тумора.



### Статистичка обрада података

Разлике између група анализираћемо или не-параметријским Mann-Whitney тестом или параметријским независним Т-тестом, у зависности од нормалности расподеле. Нормалност расподеле вредности унутар група анализираћемо Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk тестовима. Вредност  $p$  мању од 0.05 рачунаћемо као статистички значајну. За статистичку обраду свих података користиће се SPSS пакет, верзија 16.0.

### Значај истраживања

Ово истраживање нам може дати нове податке о улози Gal-3 и ST2 у активацији NK ћелија у антитуморском имунском одговору на туморе. Добијањем одговарајућих резултата истраживања отварају се врата потенцијалној терапијској примени испитиваних ћелија и молекула.

### Временски оквир

Истраживање ће се спровести у периоду од две године.

### Литература

1. Dumić J, Dabelić S. and Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760:616–35.
2. Hsu DK, Chen HY, and Liu FT. Galectin-3 regulates T cells. *Immunol Rev* 2009; 230:114-27.
3. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, Fukada SY, Liu FT, Liew FY, Lukic ML. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009; 182(2):1167-73.
4. Mensah-Brown EP, Al Rasebi Z, Shahin A, Al Shamsi M, Arsenijević N, Hsu DK, Liu FT, Lukic ML. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Clin Immunol* 2009; 130(1):83-8.
5. Knisley KA, Weitlauf H. M. Compartmentalized reactivity of M3/38 (anti-Mac-2) and M3/84 (anti-Mac-3) in the uterus of pregnant mice. *J Reprod Fertil* 1993; 97:521–7.
6. Phillips B, Knisley K, Weitlauf KD, Dorsett J, Lee V, Weitlauf HM. Differential expression of two B-galactoside binding lectins in the reproductive tracts of pregnant mice. *Biol Reprod* 1996; 55:548–58.
7. Lee VH, Lee AB, Phillips EB, Roberts JK, Weitlauf HM. Spatio-temporal pattern for expression of galectin-3 in the murine utero-placental complex: evidence for differential regulation. *Biol Reprod* 1998; 58:1277–82.
8. Yang Q, Goding SR, Hokland ME, Basse PH. Antitumor activity of NK cells. *Immunologic Research* 2006; 36(1-3):13-25.
9. Wiltrott RH, Herberman RB, Zhang SR, Chirigos MA, Ortaldo JR, Green KM, Talmadge JE. Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. *The Journal of Immunology* 1985; 134(60):4267-75.
10. Grundy MA, Zhang T, Sentman CL. NK cells rapidly remove B16F10 tumor cells in a perforin and interferon-gamma independent manner in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56:1153-61.



11. Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D, Robinson JH, Liew FY. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med* 1998; 187:787–94.
12. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie AN. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 2000; 191:1069–76.
13. Lohning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:6930–5.
14. Mensah-Brown E, Shahin A, Parekh K, Hakim AA, Shamisi MA, Hsu DK, Lukic ML. Functional capacity of macrophages determines the induction of type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1084:49-57.
15. Zdravkovic N, Shahin A, Arsenijevic N, Lukica ML, Mensah-Brownc EPK. Regulatory T cells and ST2 signaling control diabetes induction with multiple low doses of streptozotocin. *Mol. Immunol.* 2009; 47(1):28-36.
16. Moritz DR, Rodewald HR, Gheyselinck J, Klemenz R. The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *J Immunol* 1998; 161:4866-74.
17. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BP, Kaufman D, Armitage R. and Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2- type responses through its activity on human basophils, allergen- reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *International Immunology* 2008; 20(8): 1019–30.
18. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL- 33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005; 23:479-90.
19. Mayuzumi N, Matsushima H. and Takashima A. IL-33 promotes DC development in BM culture by triggering GM-CSF production. *Eur J Immunol* 2009; 39: 3331–42.

**Руководилац пројекта:**

Асс. Гордана Радосављевић

**Главни истраживач:**

Асс. Гордана Радосављевић

**Ангажовани истраживачи:**

Проф. др Миодраг Лукић  
Проф. др Небојша Арсенијевић  
Асс Иван Јовановић