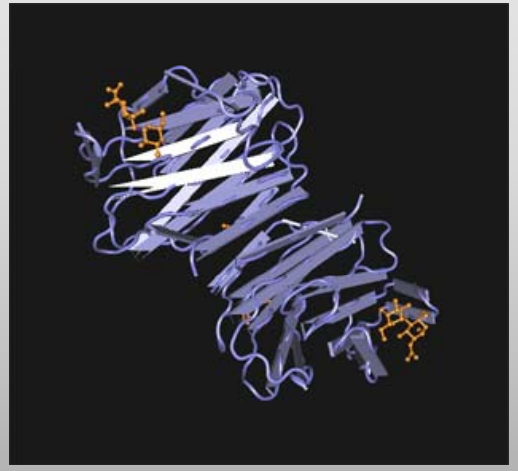
Impacto de la interacción entre proteínas y glicanos en la regulación de la respuesta inmune



Gabriel A Rabinovich
Marta A Toscano
Juan M Ilarregui
Germán A Bianco
Mariana Salatino
Diego O Croci
Juan C Stupirski
Sandra Veliz

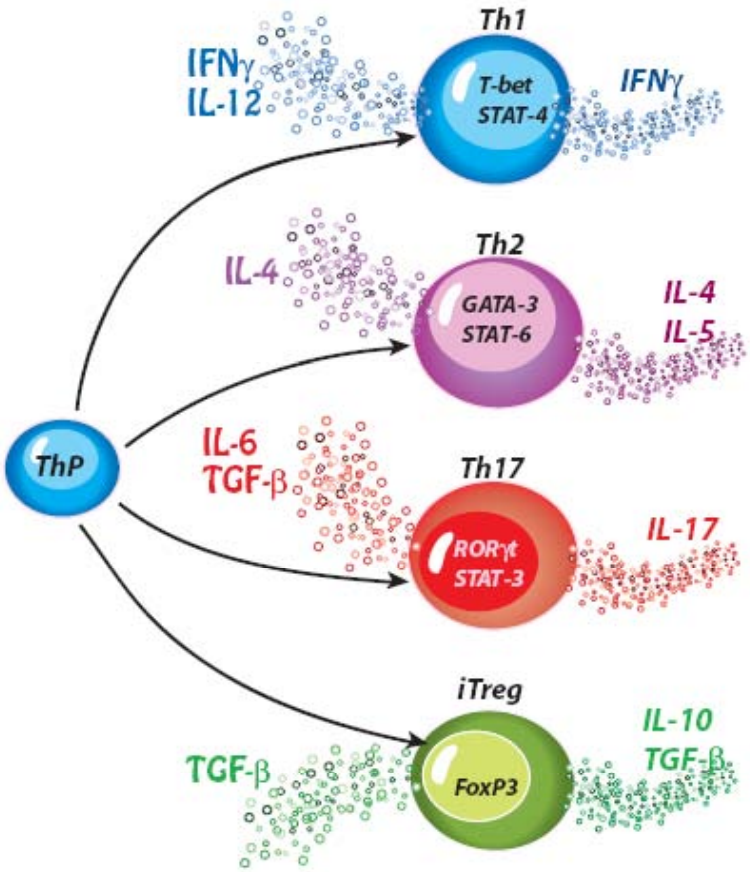
IBYME
CONICET

Laboratorio de Inmunopatología.
Instituto de Biología y Medicina Experimental.

Buenos Aires, 2008

La respuesta inmune adaptativa de los mamíferos, exhibe un alto grado de especialización en los mecanismos efectores que desencadena

Linfocitos T *helper* efectores



Patógenos intravesiculares
Autoinmunidad

Bacterias extracelulares, parásitos
Alergia

Hongos y bacterias
Inflamación crónica y autoinmunidad

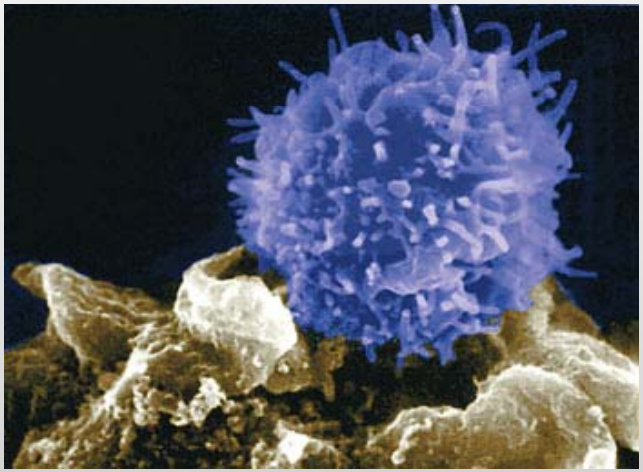
Tolerancia periférica

La glicosilación de proteínas de membrana controla diversos procesos de la fisiología de linfocitos T *helper* efectores

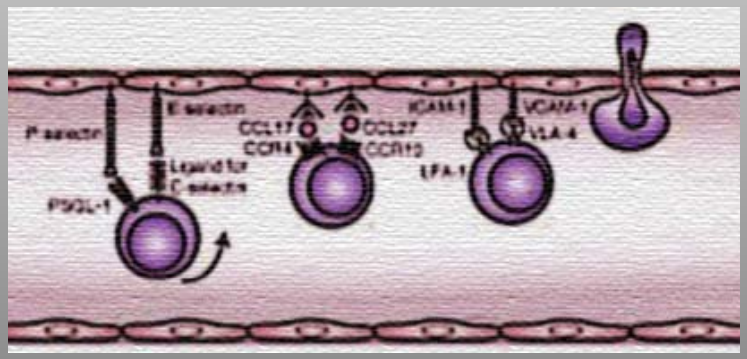
Activación
Demetriou y col. 2001

Migración
Blander y col. 1999; Lim y col. 2001

Producción de citoquinas
Morgan y col. 2004

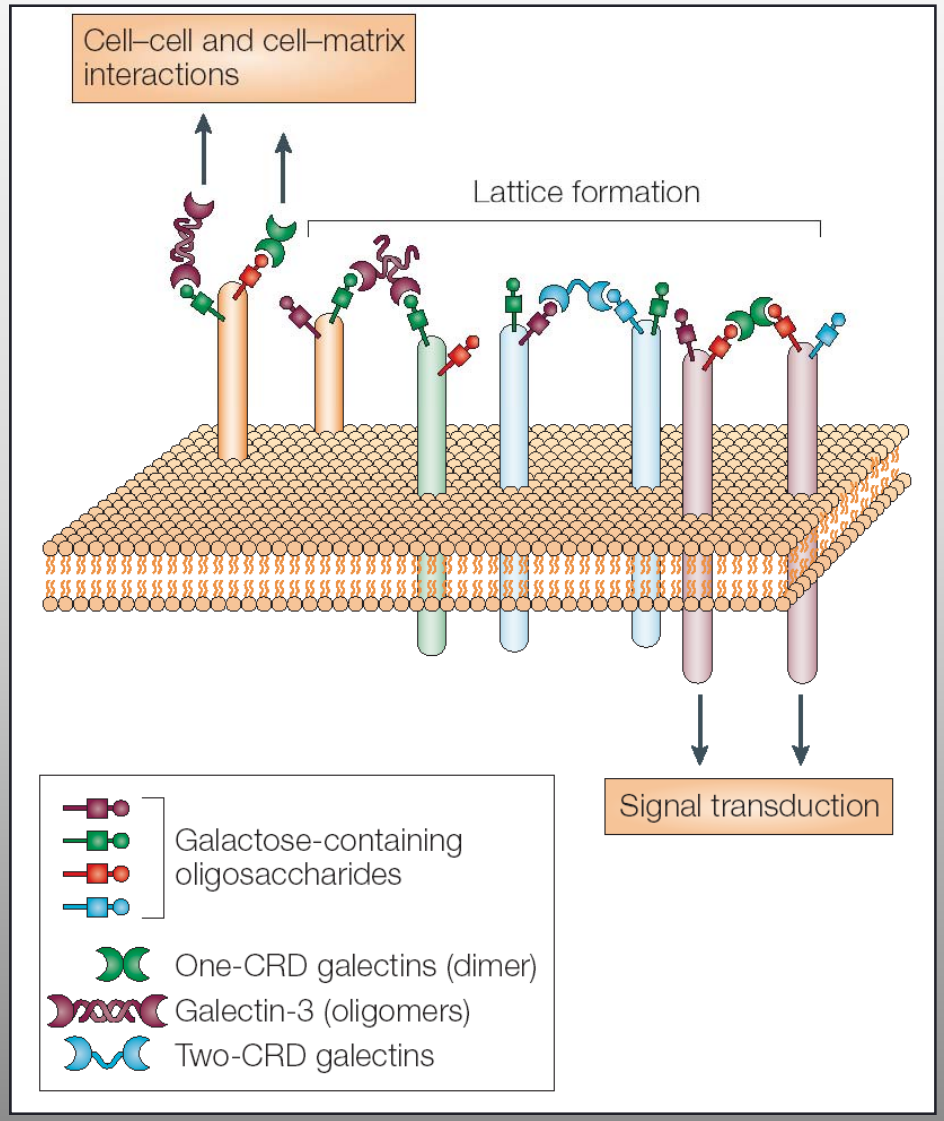


Muchos de estos procesos están mediados por lectinas endógenas …



Selectinas - Tráfico leucocitario

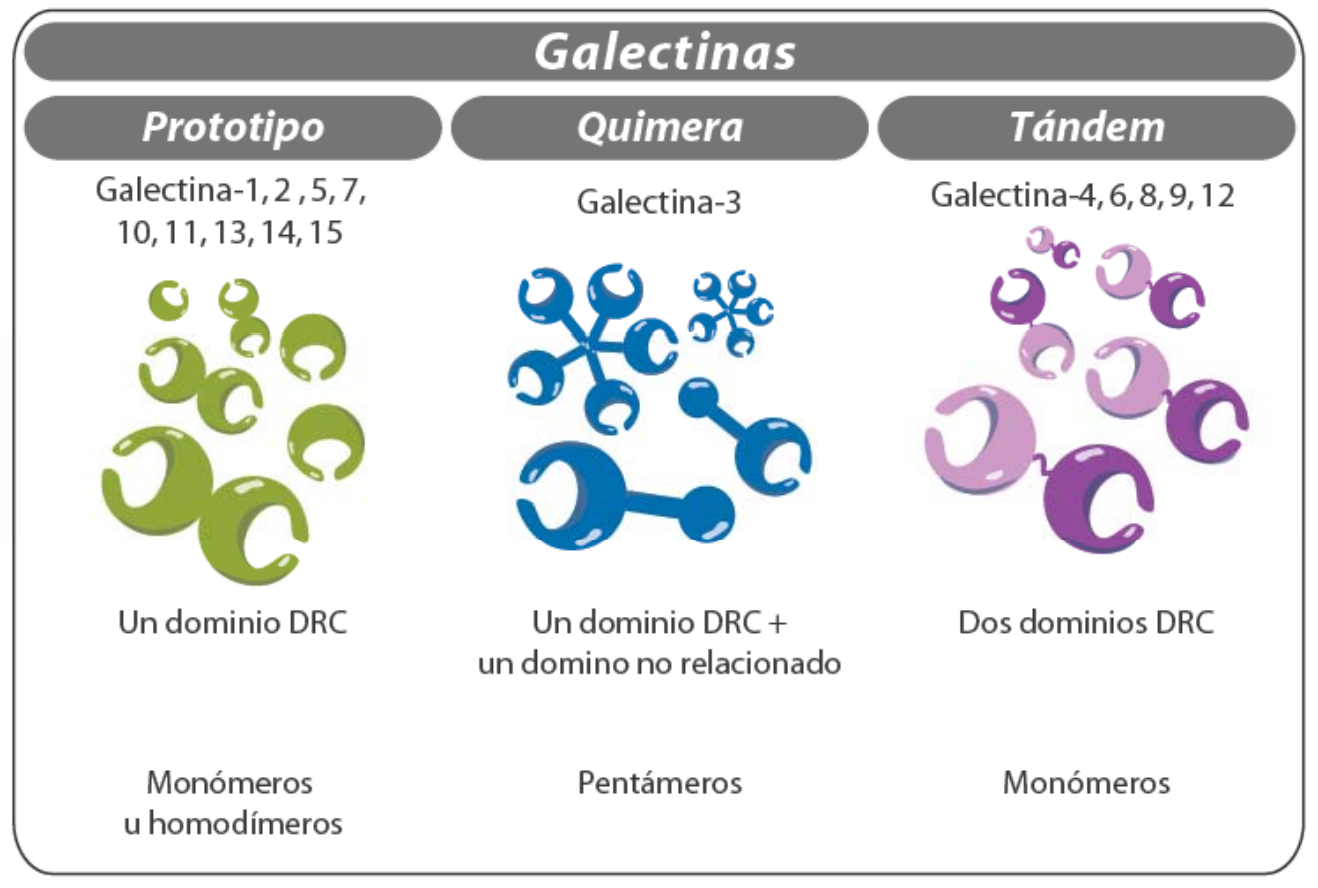
Galectinas



- Las galectinas son una familia de proteínas con alta afinidad por residuos β-galactosidos altamente conservadas a lo largo de la evolución.
- Reconocen residuos sacarídicos presentes en glicoproteínas de la membrana plasmática y la matriz extracelular.
- A través de esta interacción, pueden modular interacciones entre células y la matriz extracelular
- Activar vías de transducción de señales que regulan la proliferación, diferenciación y muerte.

Liu & Rabinovich, Nature Rev Cancer 2005; 5: 29-41

Galectinas


Galectinas
Prototipo
Quimera
Tándem
Galectina-1, 2 , 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15
Galectina-3
Galectina-4, 6, 8, 9, 12
Un dominio DRC
Un dominio DRC + un domino no relacionado
Dos dominios DRC
Monómeros u homodímeros
Pentámeros
Monómeros

Galectina-1

Galectina prototipo
Homodímero compuesto por dos subunidades de 14,5 kDa
Cooper, BBA 2002

Se expresa en:

Macrófagos activados

Linfocitos T activados

Linfocitos B activados

Rabinovich y col., 1996; Blaser y col., 1998; Zuniga y col., 2001

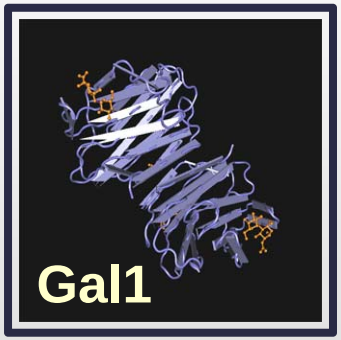
Secretada por una vía no clásica
Cooper, BBA 2002

Modula la sobrevida de células T y su homeostasis
Rabinovich et al, J.Immunol 1998, Garin et al, Blood 2007

Modula las interacciones entre células y la matriz
Elola y col., Cell Mol Life Sci 2007

Galectina-1

La administración de galectina-1 suprime las manifestaciones clínicas en diferentes modelos experimentales de inflamación crónica y autoinmunidad.



Induce un desvío de la respuesta hacia un perfil Th2.

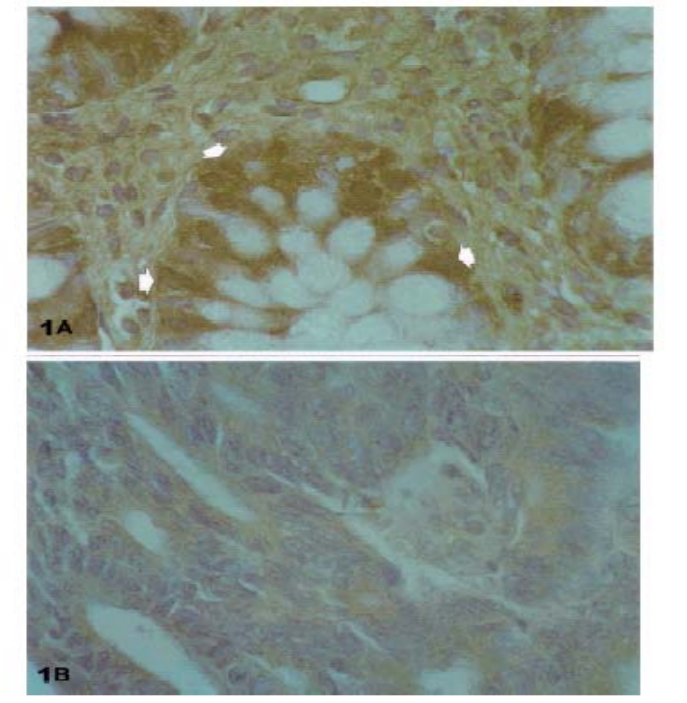
Artritis inducida por colágeno
Rabinovich y col., 1999

Colitis experimental inducida por TNBS
Santucci et al, 2003

Hepatitis inducida por ConA
Santucci et al, 2000

Diabetes autoinmune experimental
Perone et al, 2006

La expresión de galectina-1 se halla asociada con la agresividad y potencial metastásico de diversos tipos de tumores



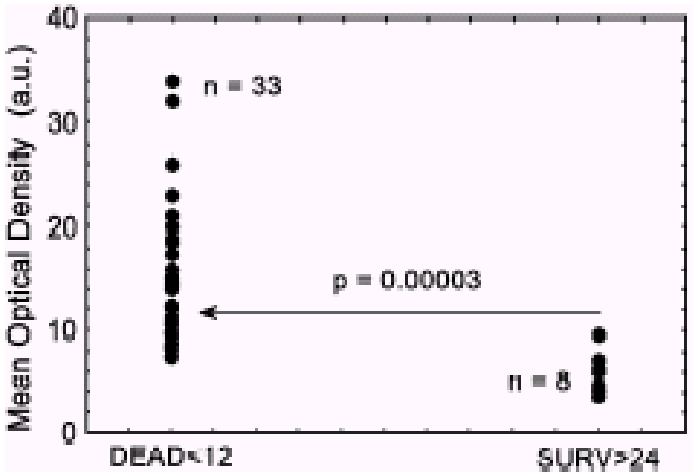
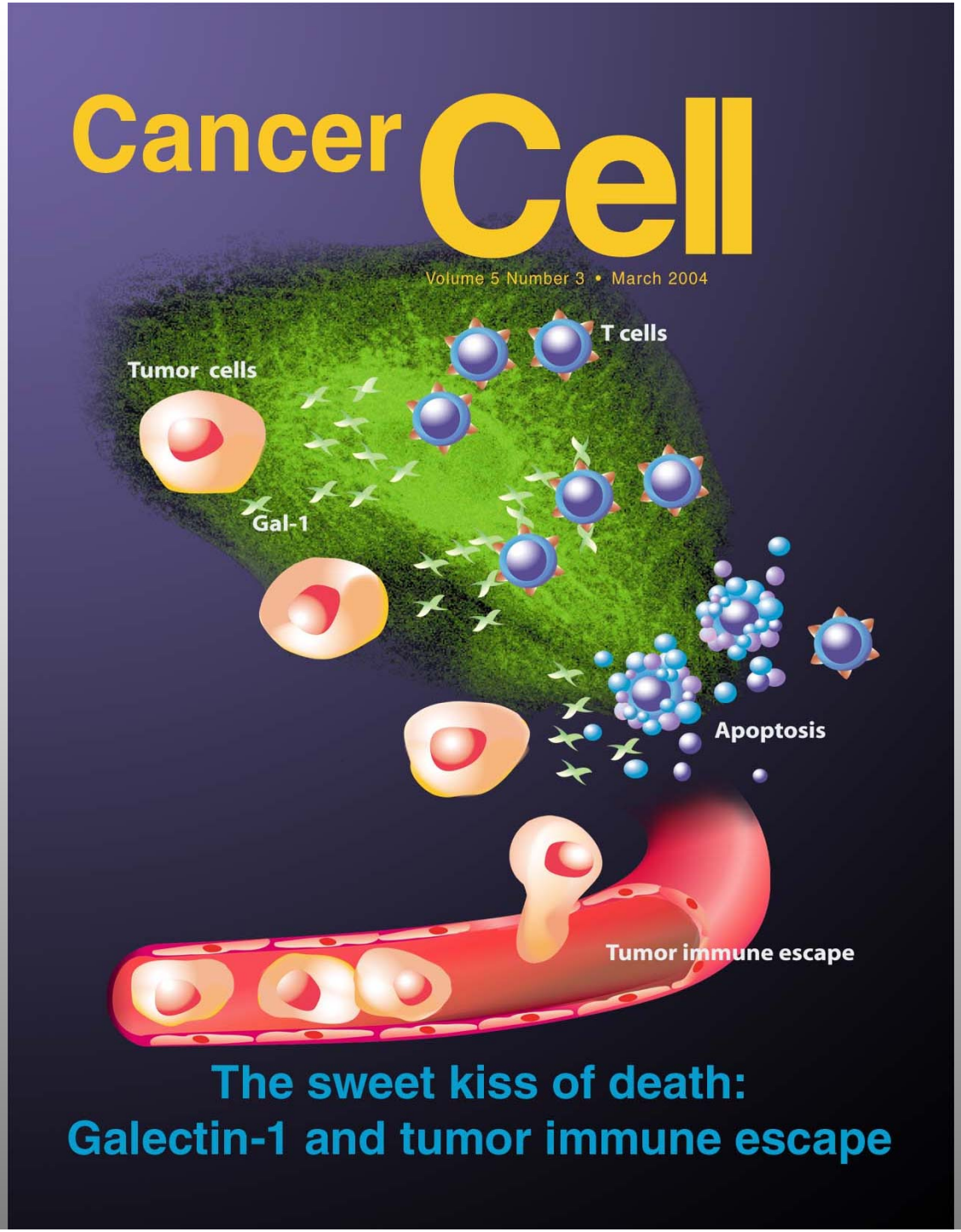


Fig. 2. The galectin-1 staining intensity (Mean Optical Density variable) in the case of 41 patients with high-grade astrocytic tumors with two distinct clinical profiles, i.e. a subgroup of 33 patients who died less than 12 months after the initial histological diagnosis (DEAD < 12 group) and a subgroup of 8 patients who survived at least 24 months after the initial diagnosis (SURV>24 group).

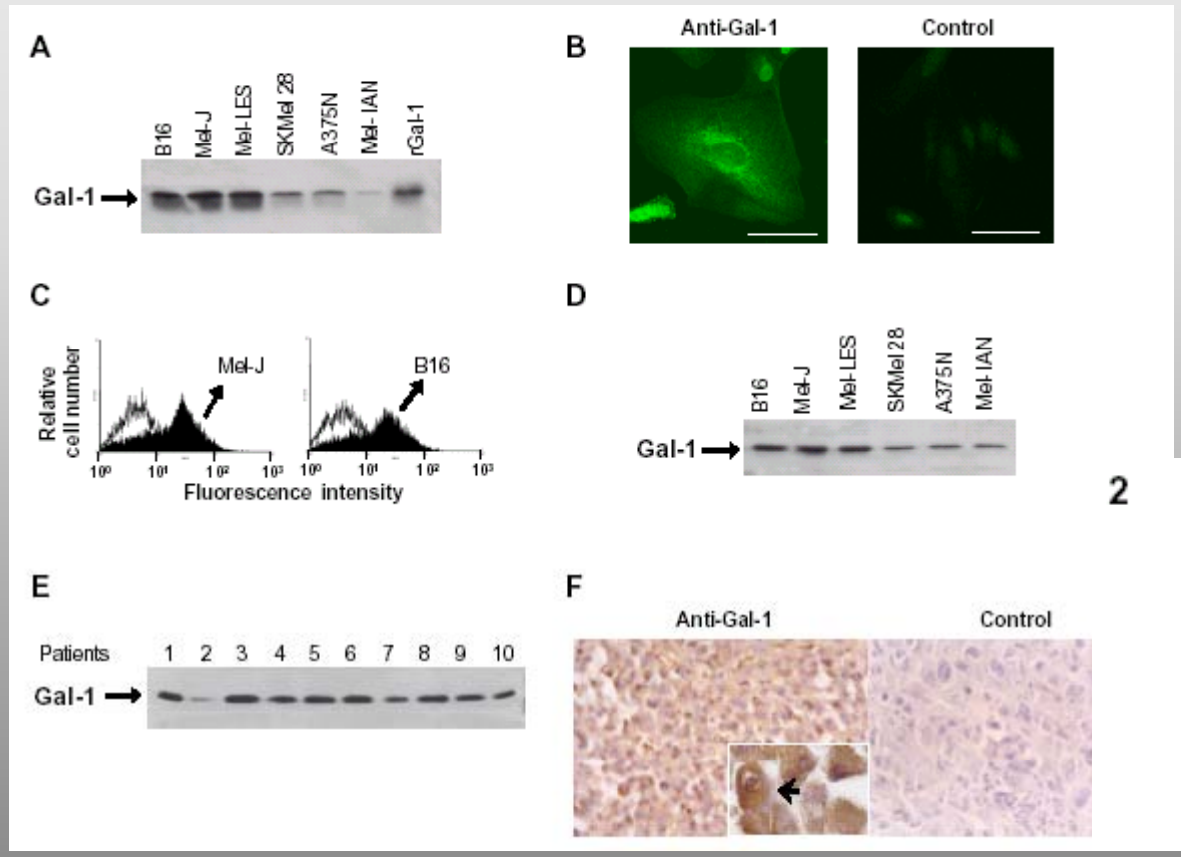
Mama, melanoma, cabeza y cuello, glioma, colon

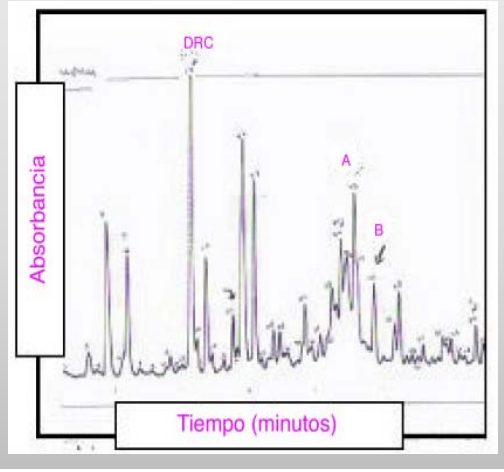
Danguy et al. Biochim Biophys Acta 2002; 1572:285-93
Camby et al. Glycobiology 2006;16:137-57.
Liu & Rabinovich, Nature Rev Cancer 2005; 5:29-41


Cancer Cell
Volume 5 Number 3 • March 2004
T cells
Tumor cells
Gal-1
Apoptosis
Tumor immune escape
The sweet kiss of death:
Galectin-1 and tumor immune escape

Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege

Natalia Rubinstein,[1,2] Mariano Alvarez,[3] Norberto W. Zwirner,[1,2] Marta A. Toscano,[1,2] Juan M. Ilarregui,[1,2] Alicia Bravo,[4] José Mordoh,[3] Leonardo Fainboim,[1,2] Osvaldo L. Podhajcer,[3] and Gabriel A. Rabinovich[1,2,*]



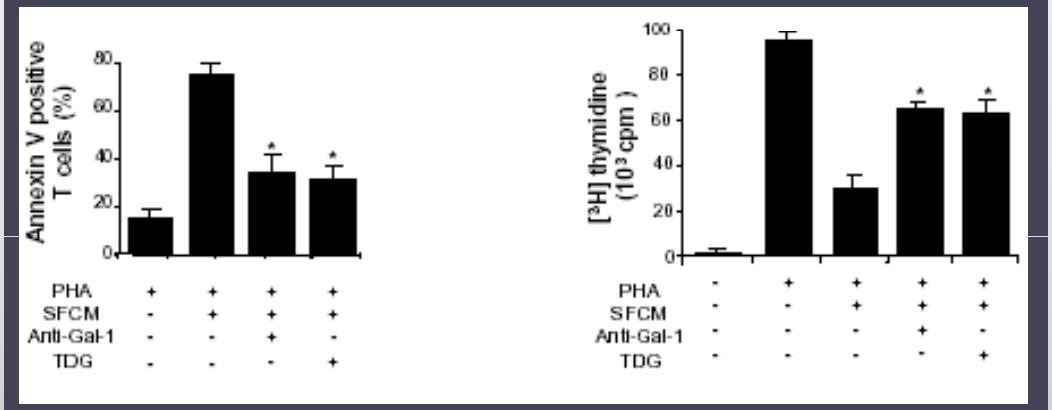


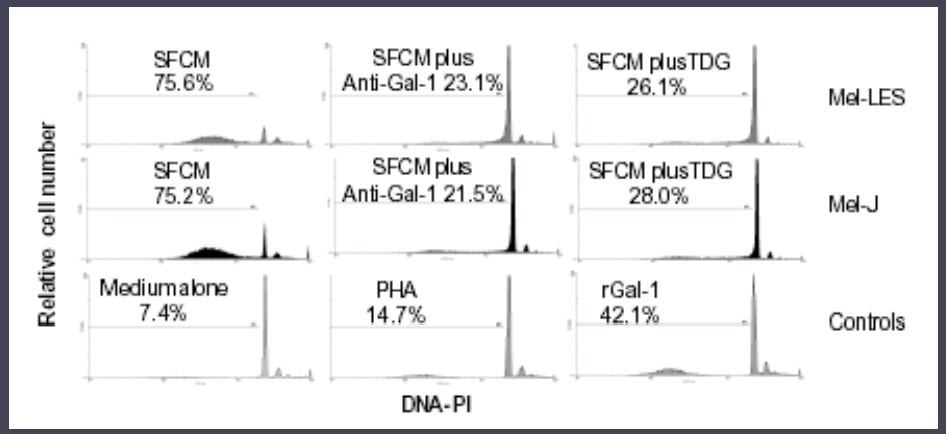
Peptide A (CRD)		Peptide B	
Mel Gal-1	DGGAW GTEQR	Mel Gal-1	FNAHDANTIVXN
hGal-1	DGGAW GTEQR	hGal-1	FNAHDANTIVCN
Peptide C		**Peptide D**	
Mel Gal-1	NLKPGECLR	Mel Gal-1	NLEAINY
hGal-1	NLKPGECLR	hGal-1	NLEAINY

Cancer Cell 2004; 5:241-251.

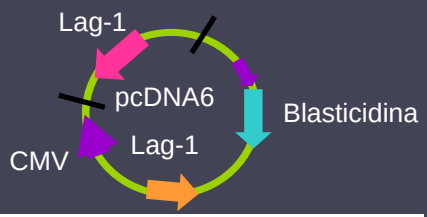
Galectina-1 contribuye sustancialmente a la actividad inmunosupresora de células de melanoma

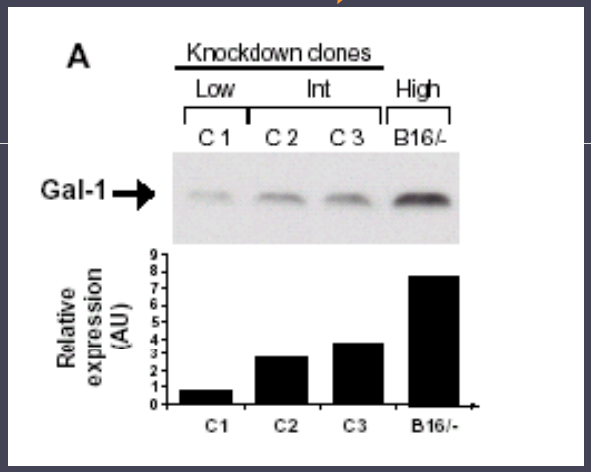
Humano

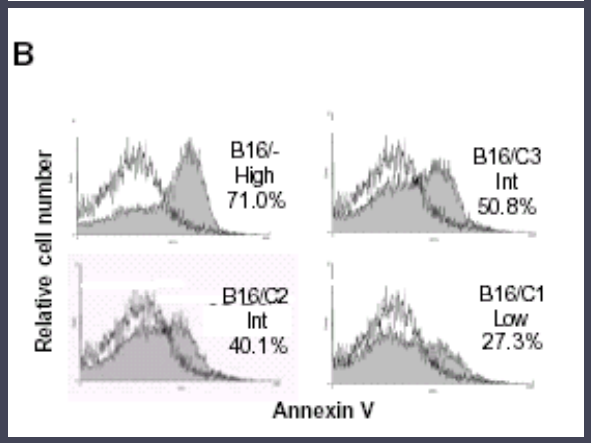




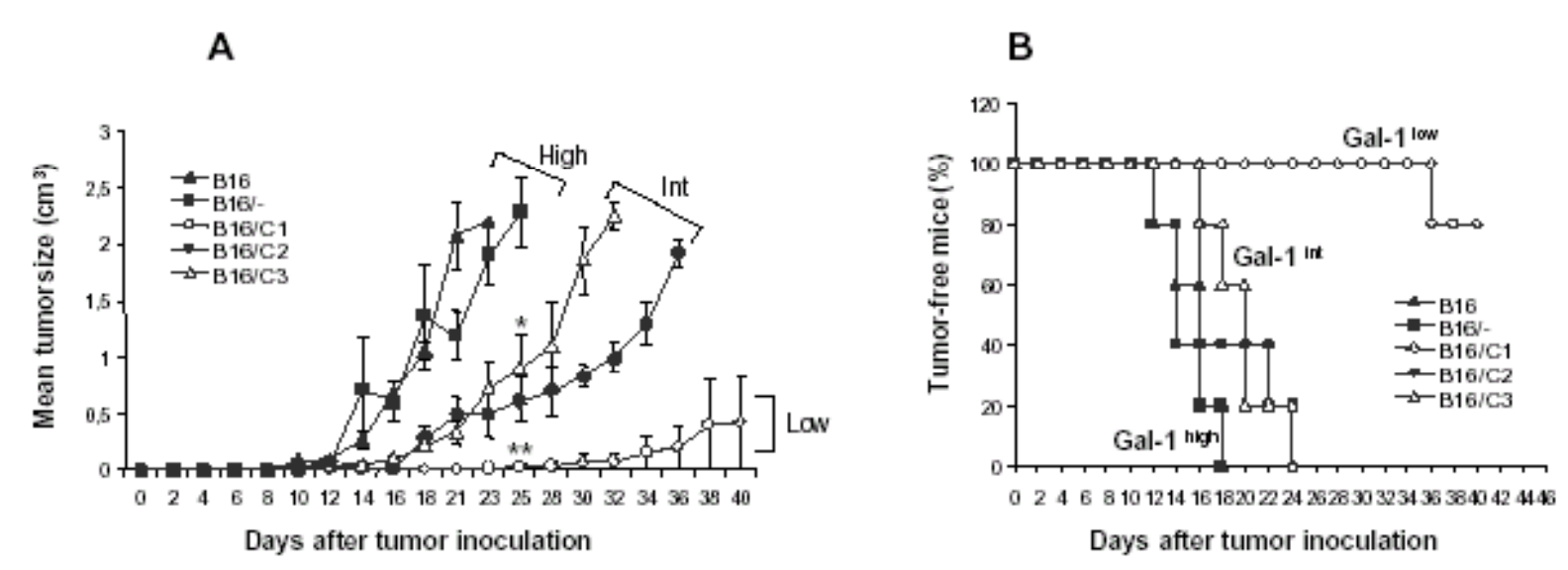
Ratón

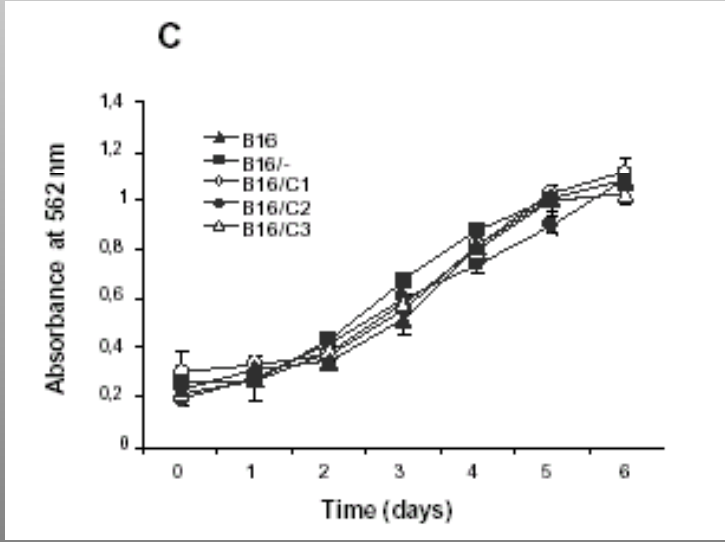






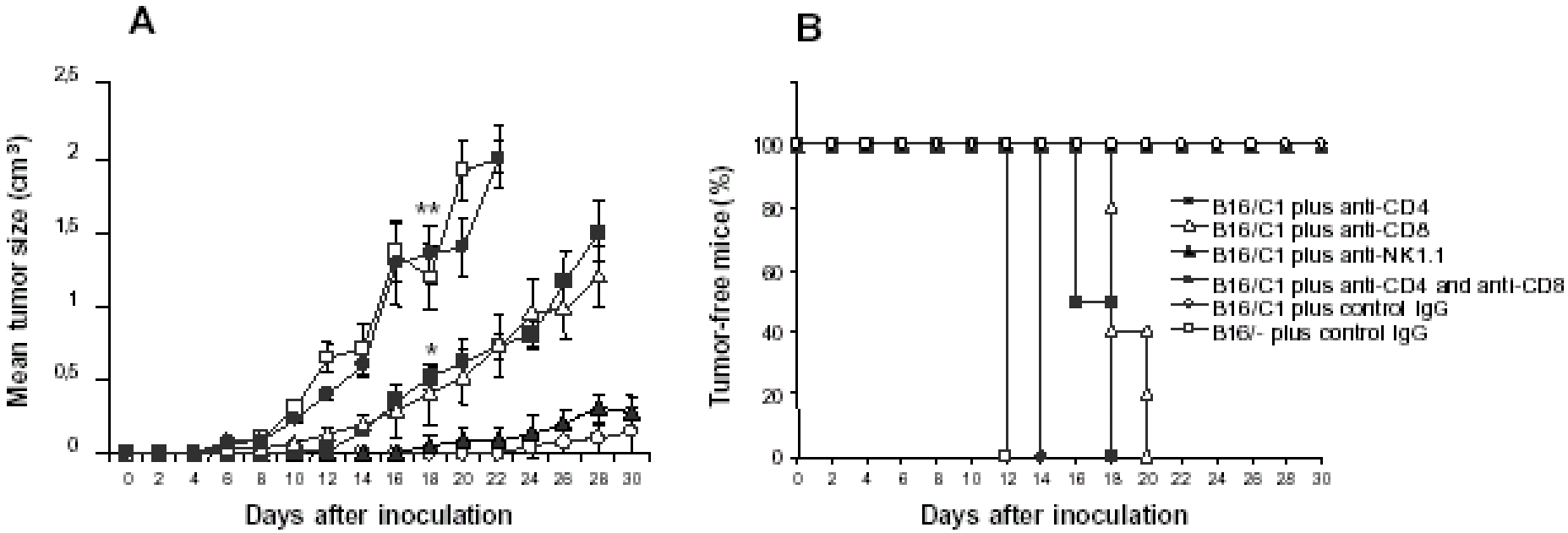
El bloqueo de la expresión génica de Gal-1 genera resistencia al desafío con células tumorales



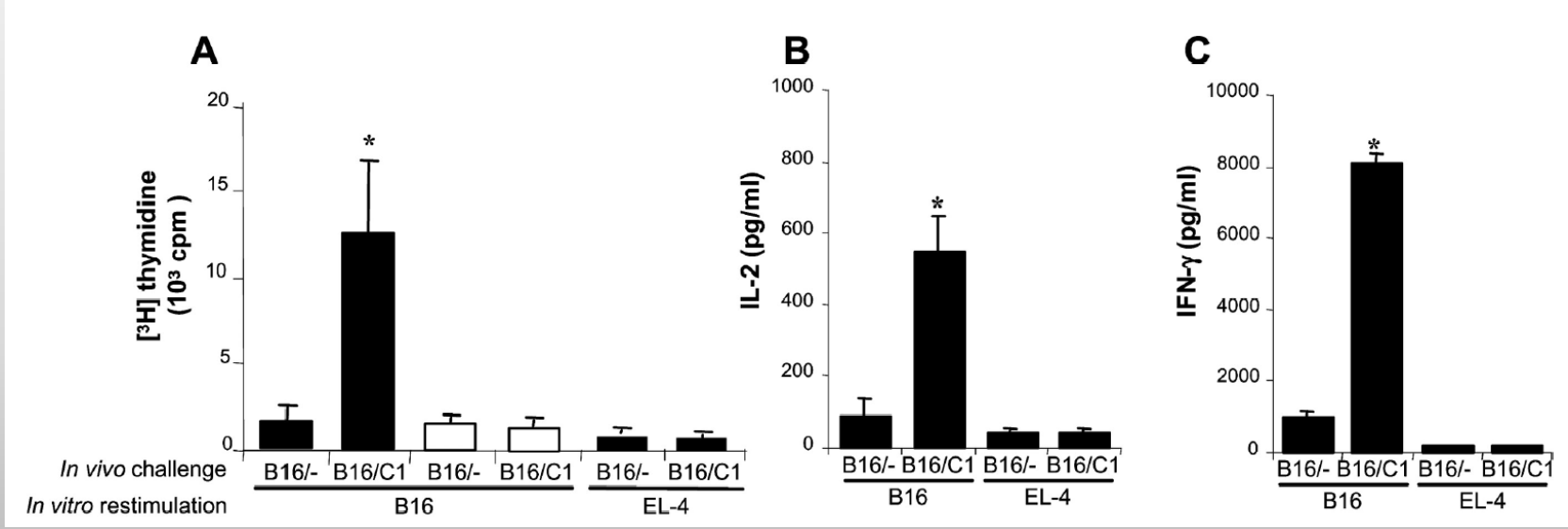


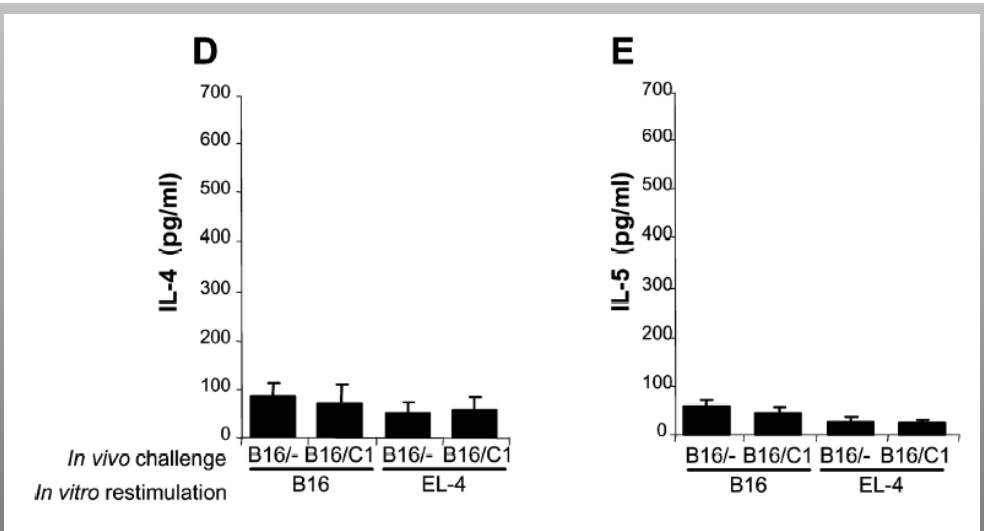
Rubinstein et al, Cancer Cell 2004

El rechazo tumoral inducido por bloqueo de la expresión de Gal-1 requiere de la actividad de linfocitos T CD4+ y CD8+

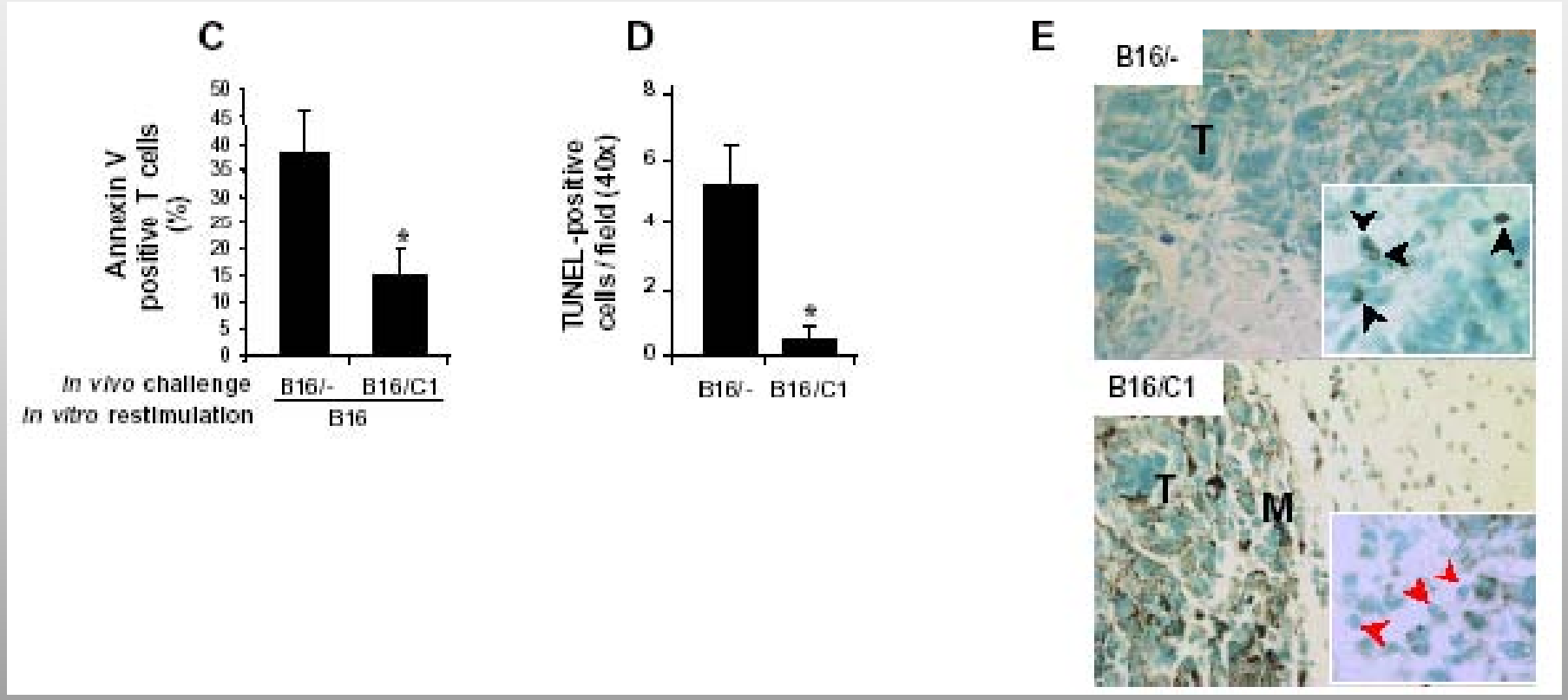


El bloqueo de la expresión de galectina-1 permite el desarrollo de una respuesta anti-tumoral de tipo Th1 *in vivo*

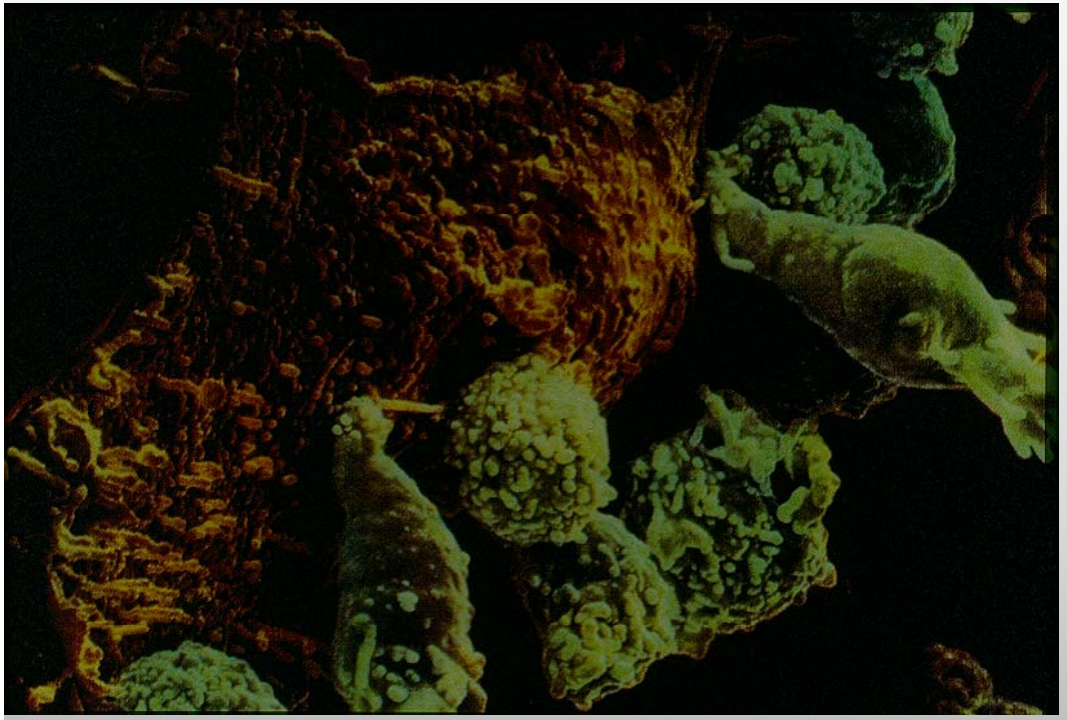




El bloqueo de la expresión de galectina-1 aumenta la supervivencia de células mononucleares in vivo.



Conclusiones



√ Galectina-1 contribuye a la actividad inmunosupresora de células de melanoma humano y de ratón.

√ La inhibición de la expresión génica de galectina-1 en células tumorales genera resistencia al crecimiento tumoral

√ El rechazo tumoral inducido por bloqueo de galectina-1 se halla mediado por células T CD4+ y CD8+

√ El bloqueo de la expresión de galectina-1 en el microambiente tumoral permite el despliegue de una respuesta de tipo Th1 en ganglios drenantes

Cancer Cell 2004; 5:241-251

VOLUME 23 · NUMBER 35 · DECEMBER 10 2005

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ORIGINAL REPORT

Galectin-1: A Link Between Tumor Hypoxia and Tumor Immune Privilege

Quynh-Thu Le, Gongyi Shi, Hongbin Cao, Daniel W. Nelson, Yingyun Wang, Eunice Y. Chen, Shuchun Zhao, Christina Kong, Donna Richardson, Ken J. O'Byrne, Amato J. Giaccia, and Albert C. Koong

From the Departments of Radiation Oncology, Otolaryngology, and Pathology, Stanford University, Stanford, CA; and the Departments of Oncology, Pathology, and Epidemiology, University Hospitals of Leicester National Health Service Trust, United Kingdom.

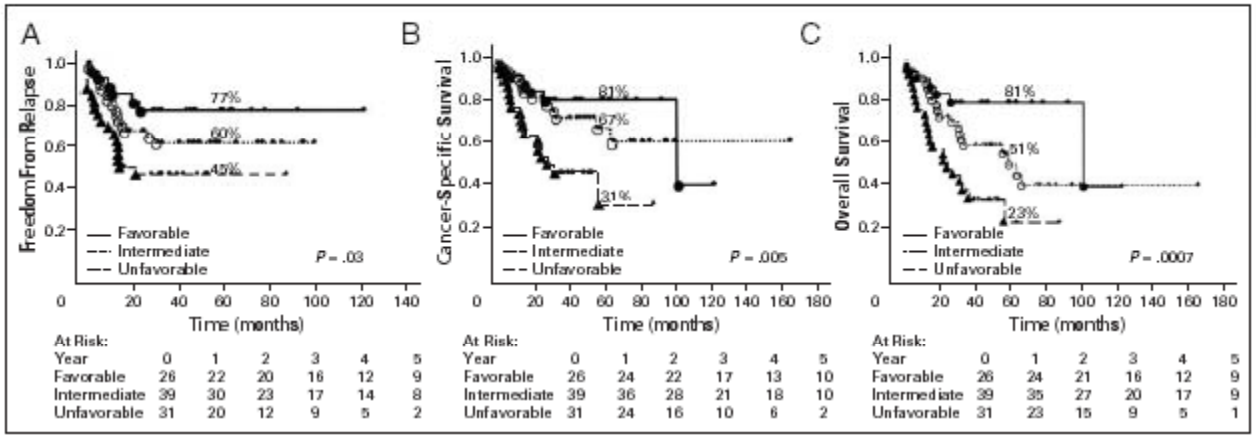


Fig 5. Kaplan-Meier estimates of (A) freedom from relapse by galectin-1 and CD3 grouping; (B) cancer-specific survival by galectin-1 and CD3 grouping; (C) overall survival by galectin-1 and CD3 grouping. The favorable group has negative to weak (neg-weak) galectin-1 and strong CD3 staining; intermediate group has either strong both galectin-1 and CD3 staining or neg-weak both galectin-1 and CD3 staining; unfavorable group has strong galectin-1 and neg-weak CD3 staining.

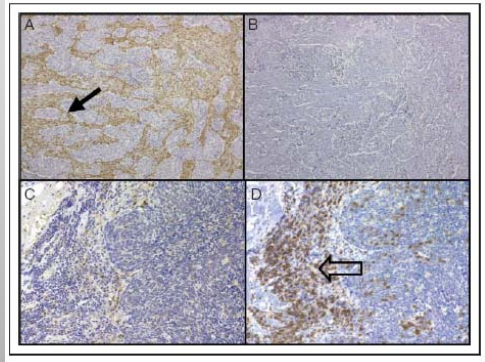
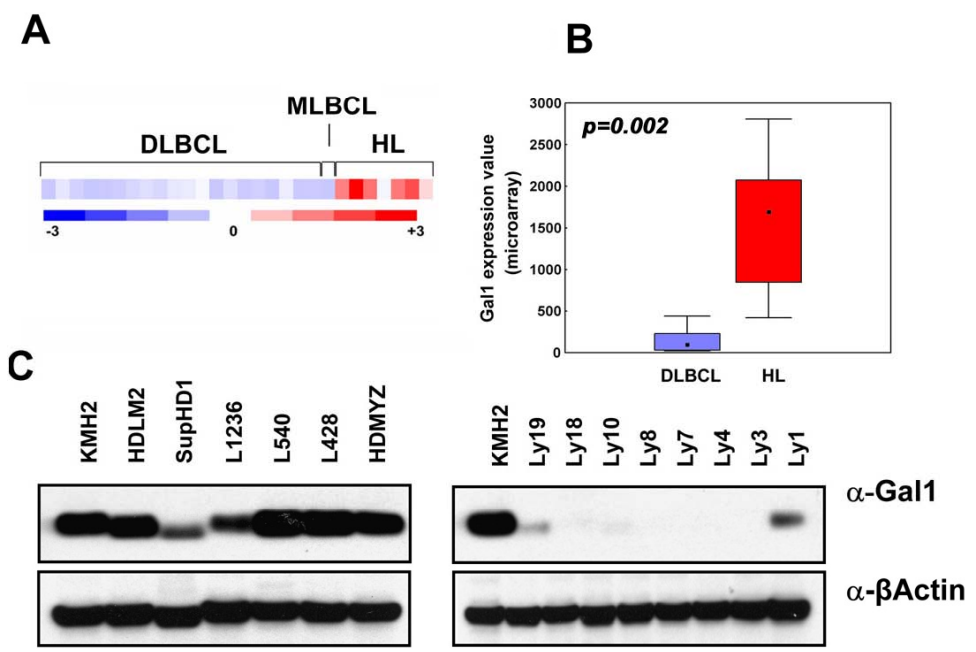


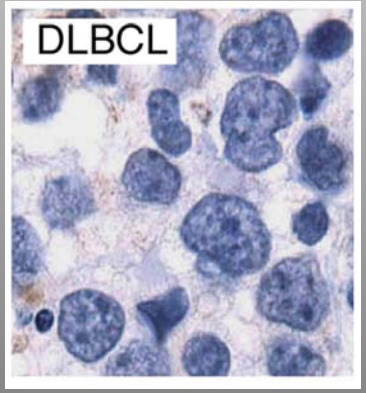
Fig 3. Comparison between galectin-1 and CD3 staining in consecutive sections of the same tumor. Note the inverse relationship between the two markers. Tumors that stained strongly for galectin-1 (A, solid arrow) had minimal CD3 staining (B), and tumors that stained minimally for galectin-1 (C) had strong CD3 staining (D, clear arrow).

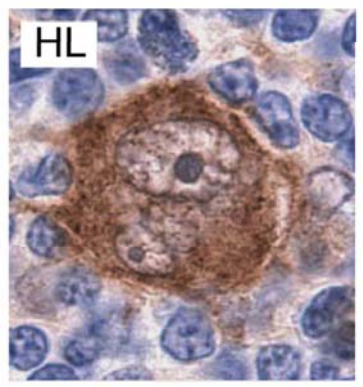
The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed–Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma

- Gal-1 se halla representada en forma particular en Linfoma Hodgkin respecto a otros tipos de linfoma

- El silenciamiento de Gal-1 utilizando estrategias de RNA de interferencia resultó en un incremento de citoquinas Th1 y una disminución marcada de células T regulatorias CD4+ CD25+ FoxP3+ en el microambiente tumoral.

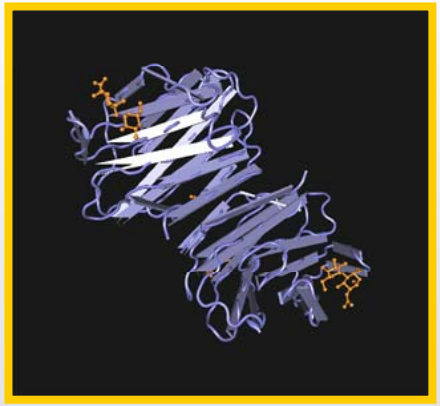






P. Juszczynski et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007 Aug 7;104(32):13134-9

✓ Desvía la respuesta inmune hacia un perfil Th2 en diversos modelos de inflamación crónica y autoinmunidad



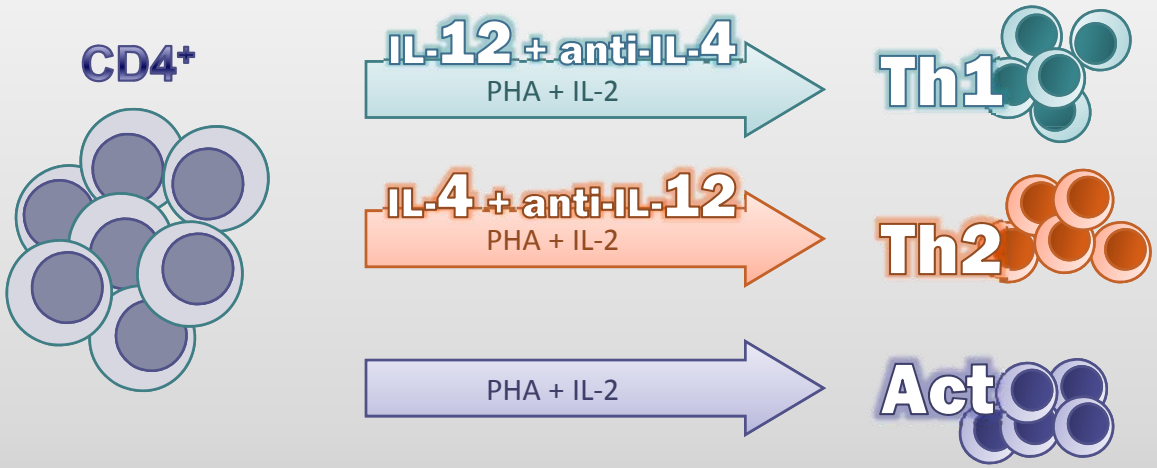
✓ El bloqueo de la expresión génica de Gal-1 en el microambiente tumoral genera una respuesta de tipo Th1 previamente reprimida

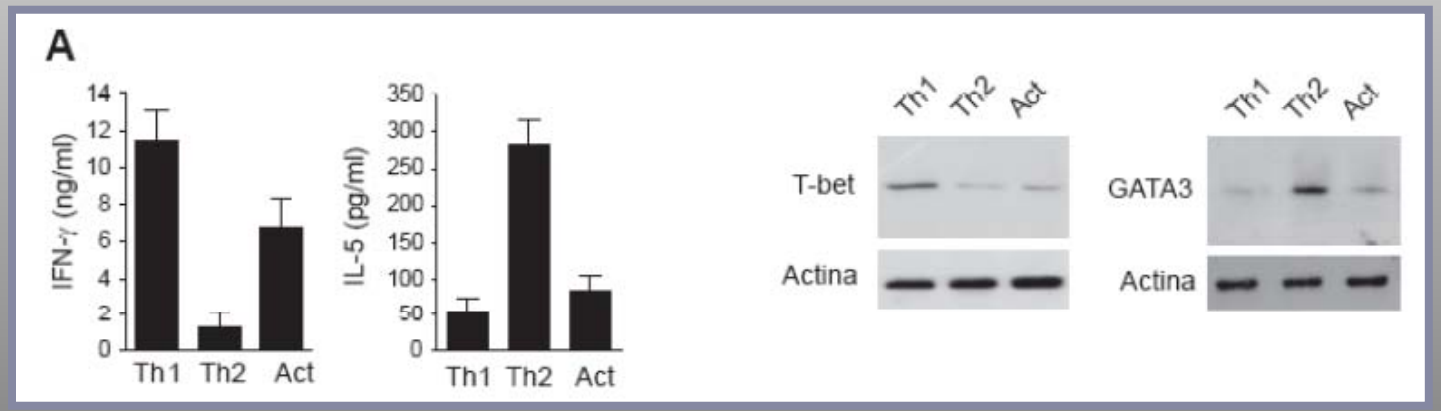
Rabinovich et al, *J Exp Med 1999;190*
Santucci et al, *Hepatology 2000; 31*
Santucci et al, *Gastroenterology 2003;124*
Baum et al, *Clin Immunol 2003; 109*
Toscano et al, *J. Immunol. 2006; 176*
Perone et al, *J. Immunol. 2006; 177*

Rubinstein et al, *Cancer Cell 2004; 5:241*
Przemek et al, *PNAS 2007;104:13134-9*

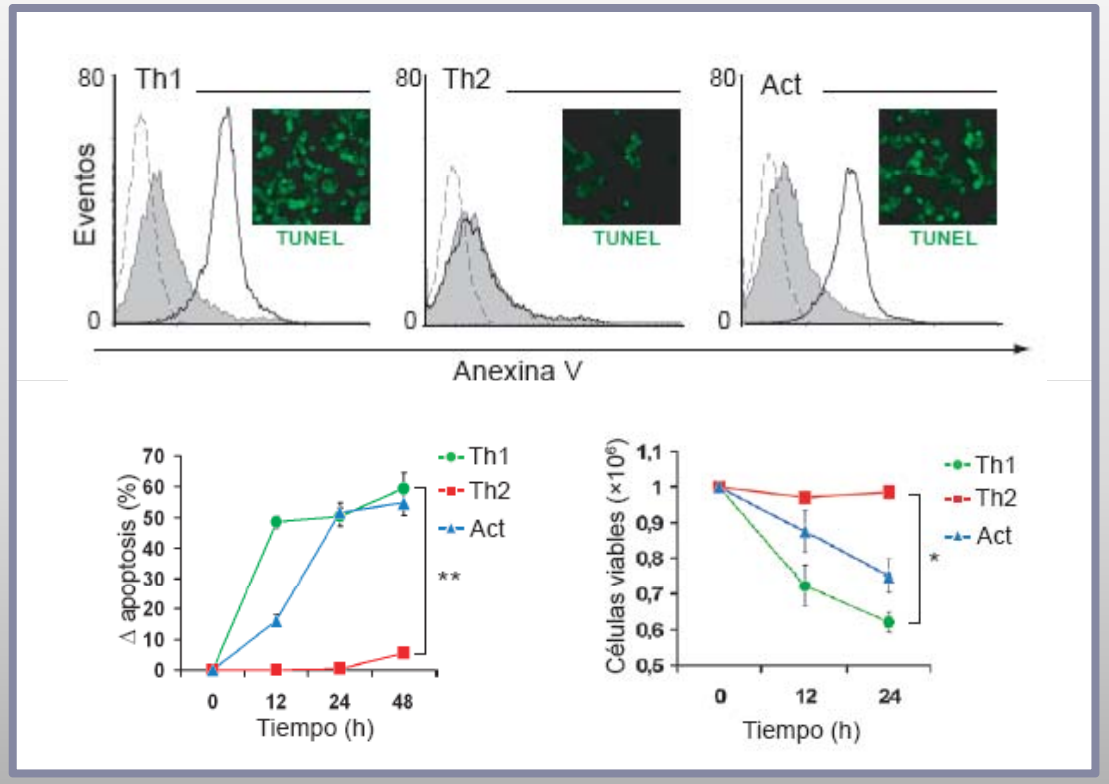
¿Existe una susceptibilidad diferencial de células T helper a Gal-1?

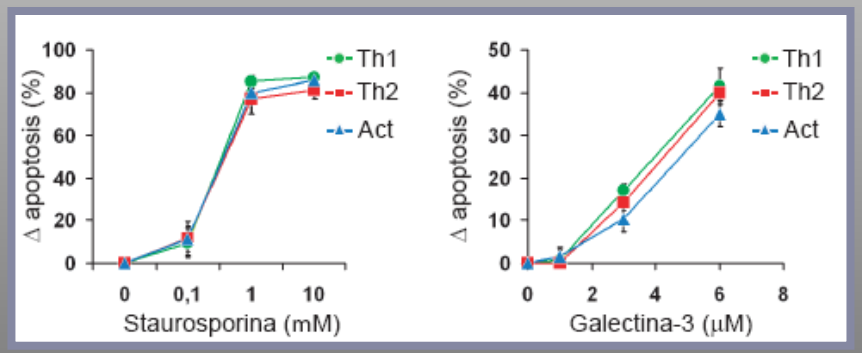
Estrategia experimental:
Polarización *in vitro* de células T CD4+ humanas





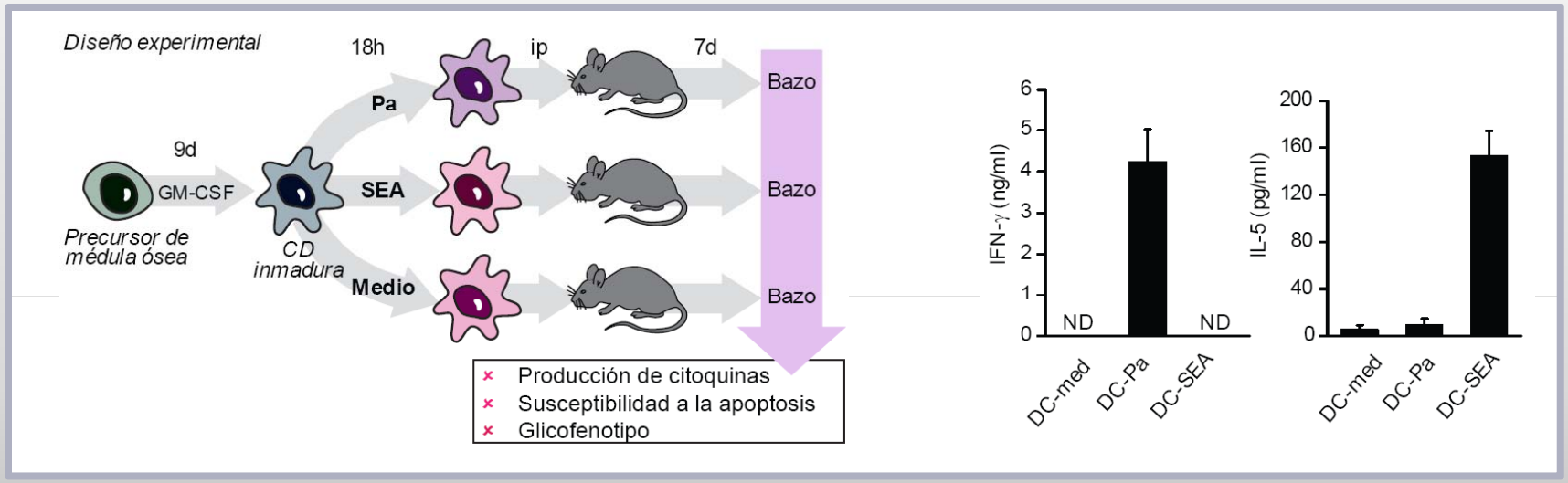
Linfocitos Th1 y Th2 humanos presentan una susceptibilidad diferencial a la apoptosis inducida por galectina-1

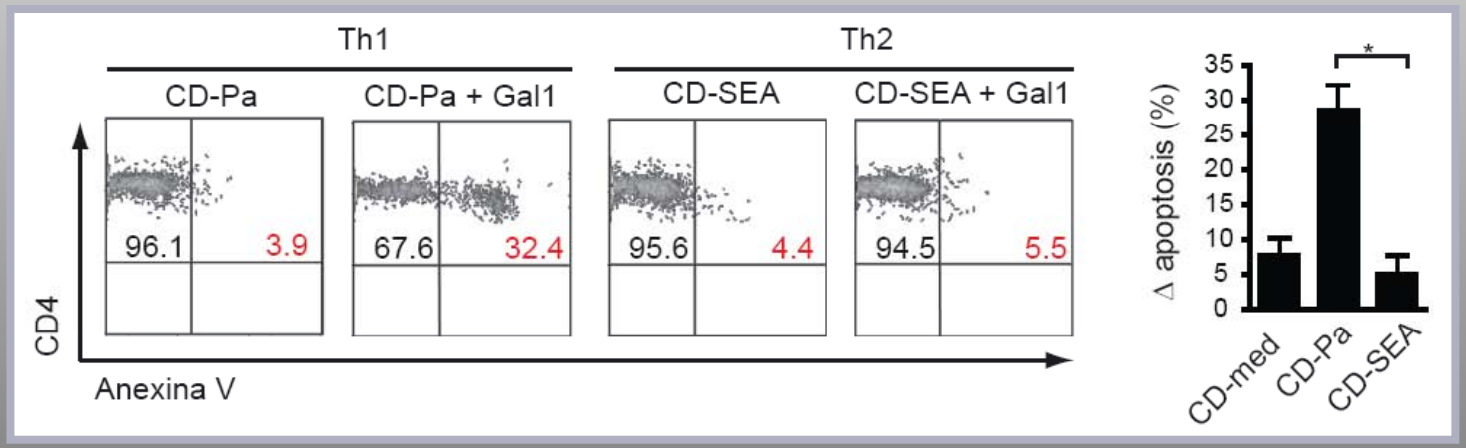




El efecto pro-apoptótico selectivo de linfocitos Th1 no es un propiedad general de las galectinas

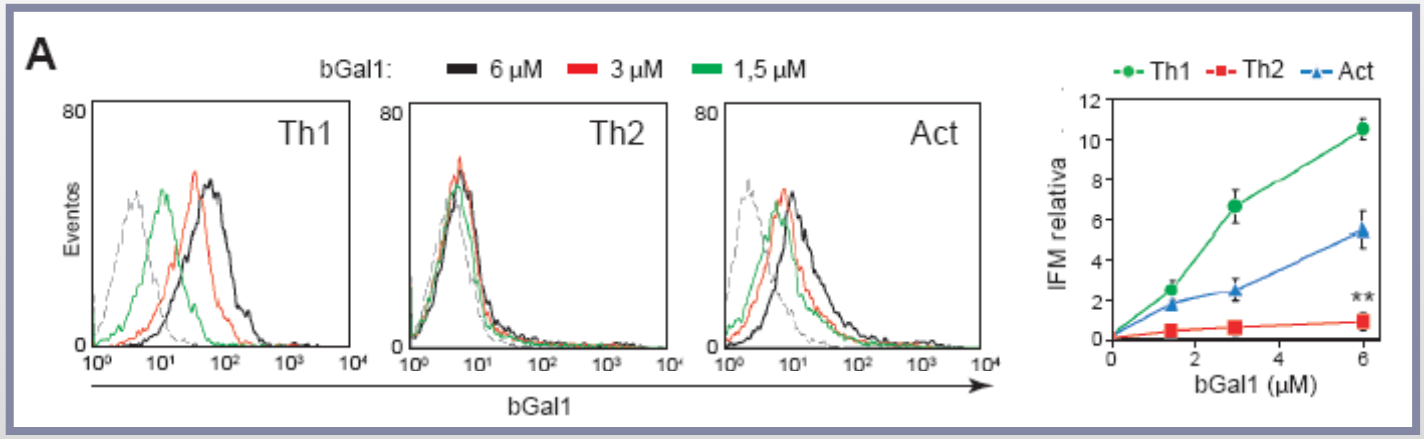
Susceptibilidad diferencial a la apoptosis inducida por galectina-1 de linfocitos Th1 y Th2 generados *in vivo*

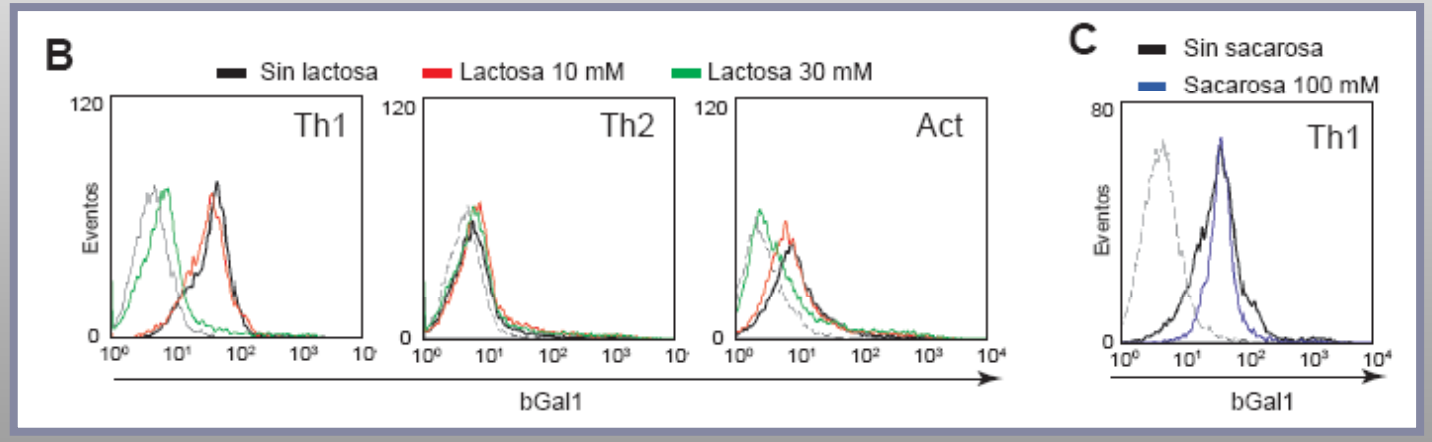




¿Cuáles son los mecanismos?

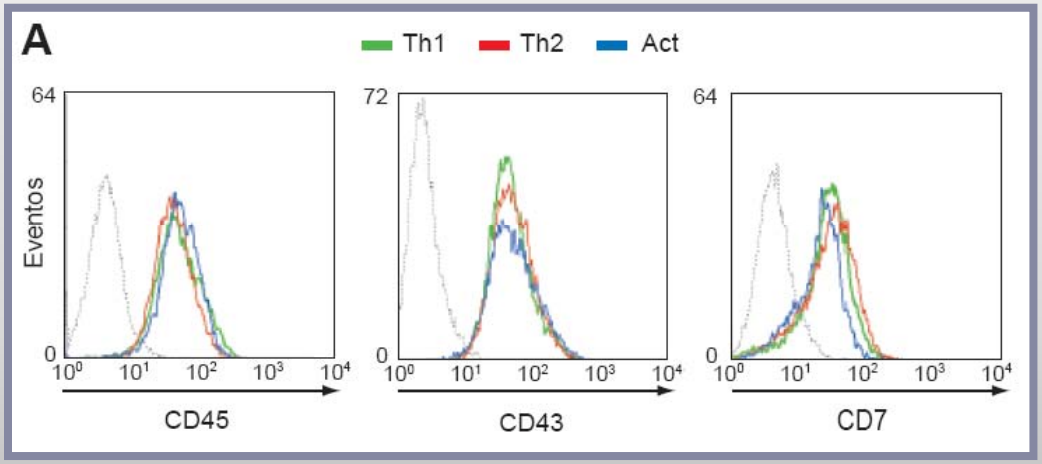
Los linfocitos Th2 no presentan sitios de unión de galectina-1

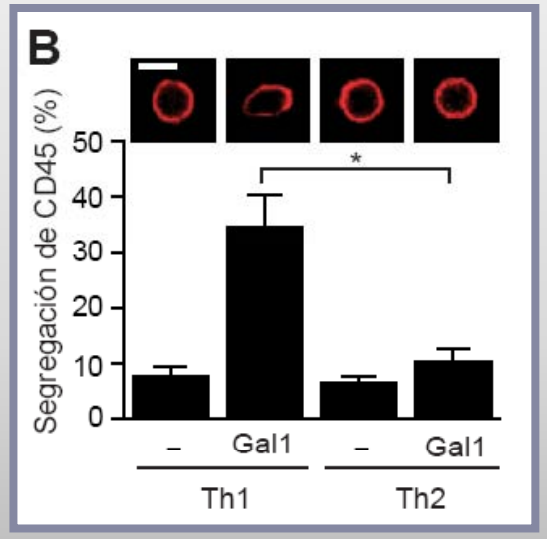




La unión de galectina-1 a linfocitos Th1 y linfocitos activados es específica y depende del dominio de reconocimiento de carbohidratos

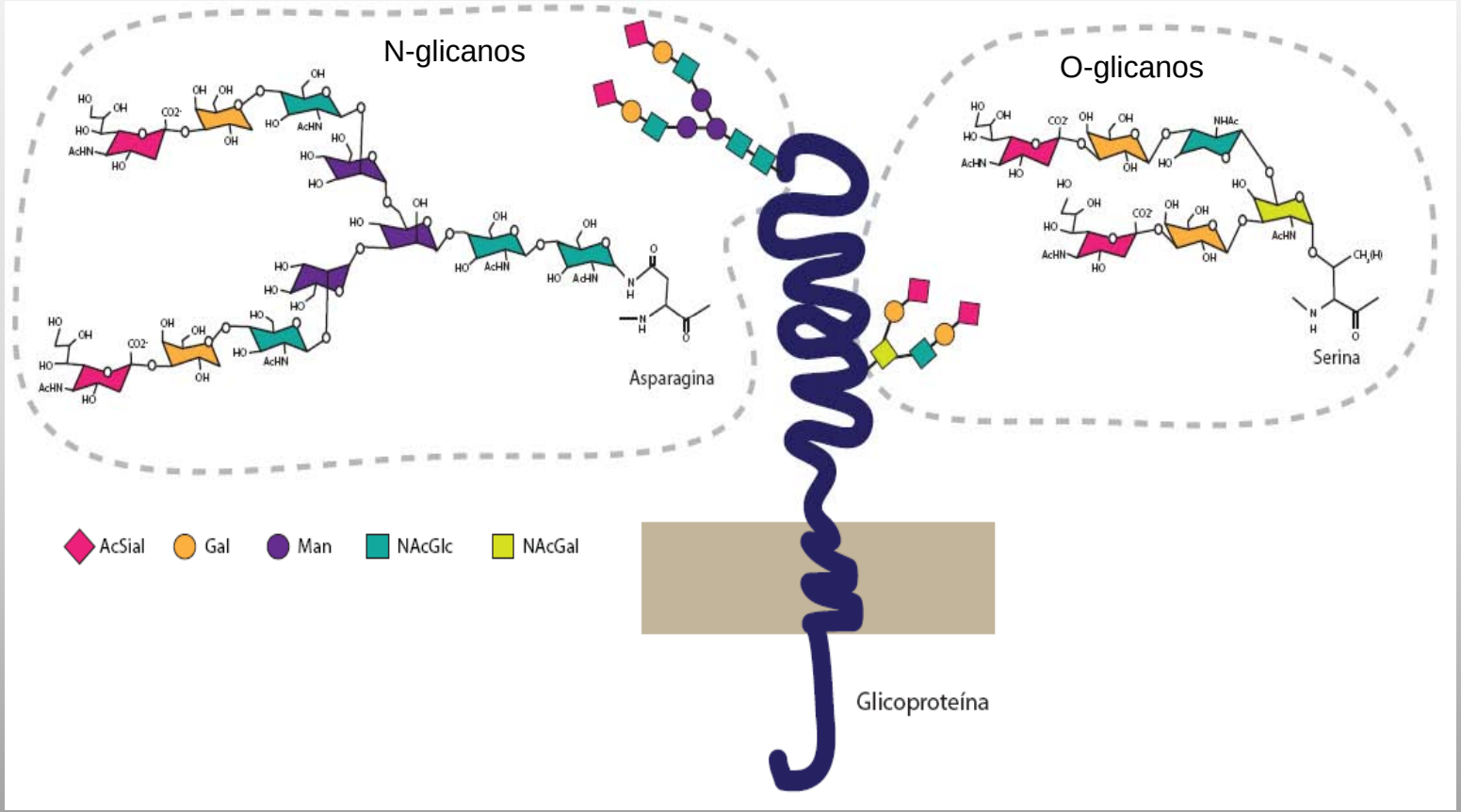
Linfocitos Th1 y Th2 expresan niveles equivalentes de glicoproteínas receptoras para galectina-1

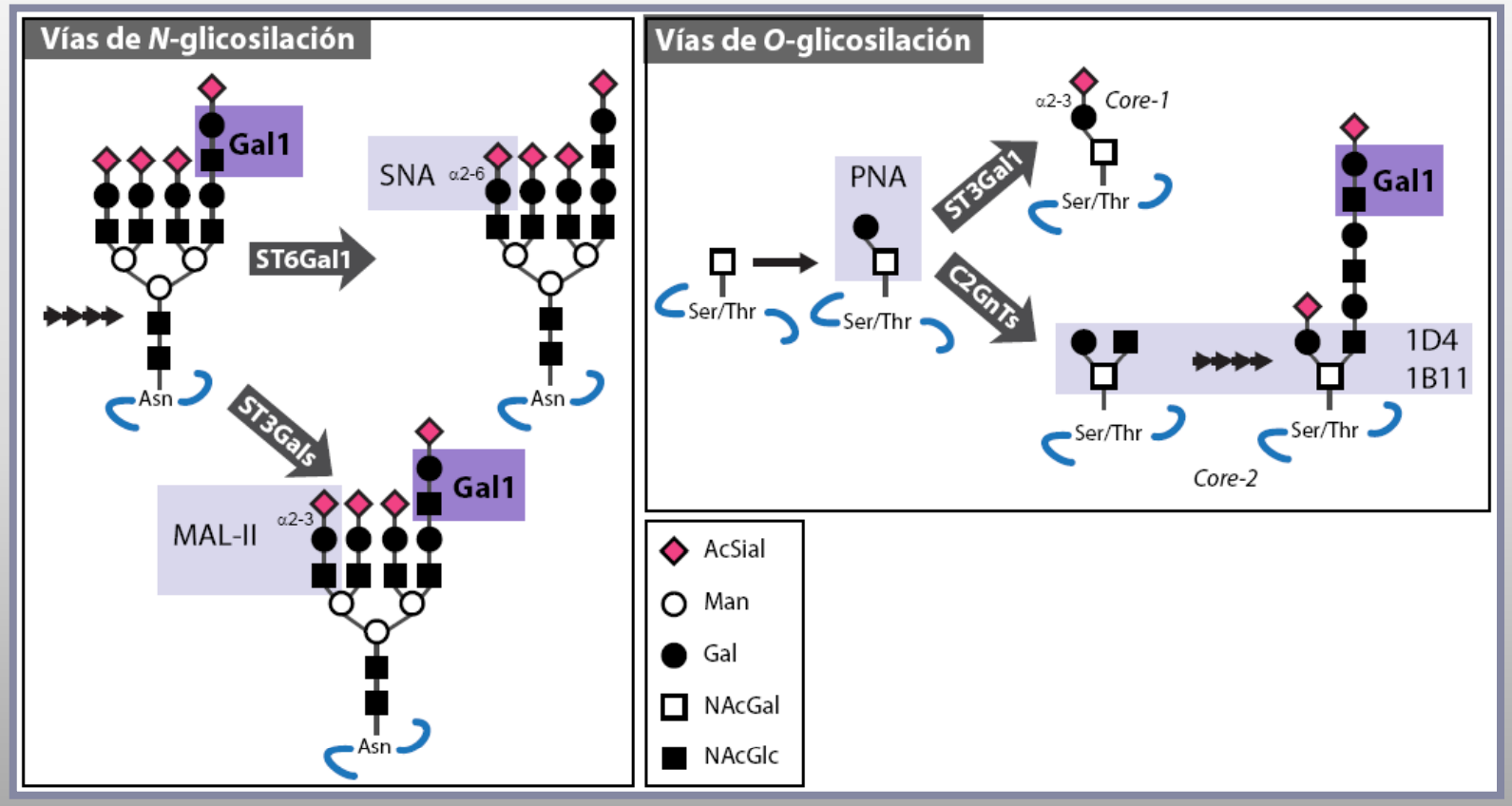




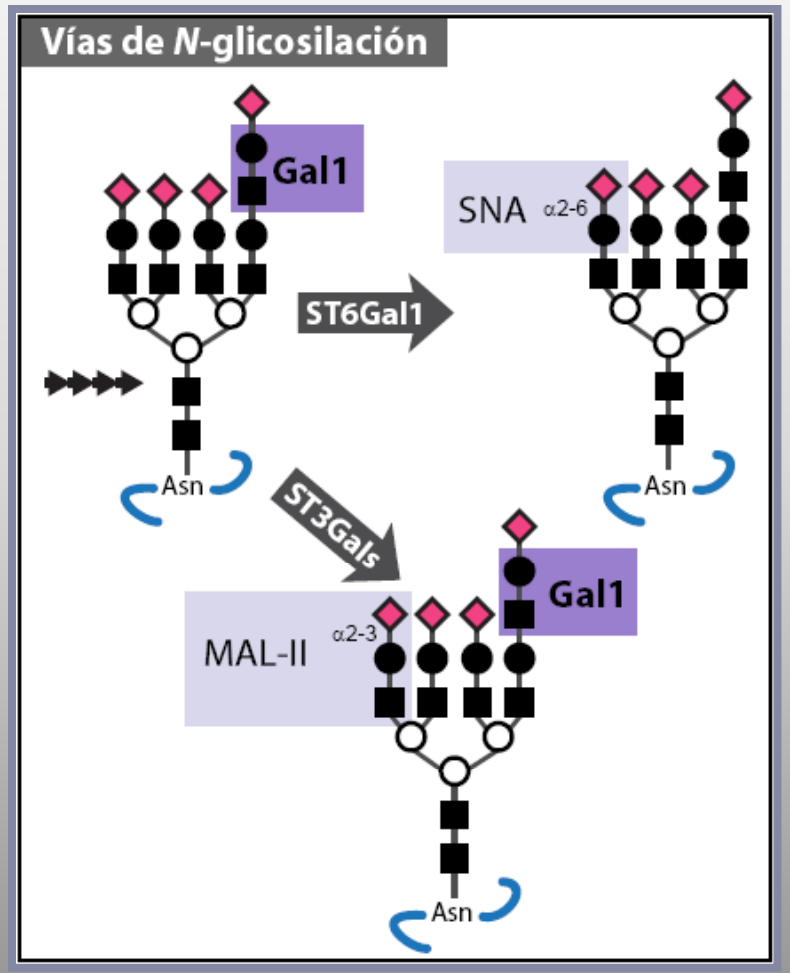
Galectina-1 es capaz de interaccionar con CD45 en la superficie de linfocitos Th1, pero no de linfocitos Th2

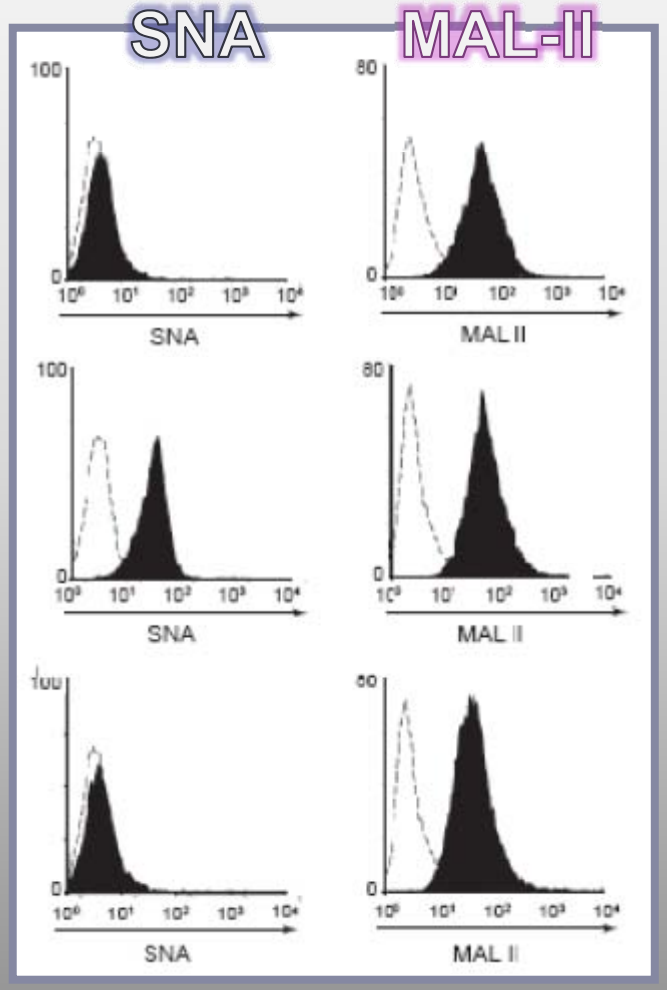
¿Dependerá del estado de glicosilación de las glicoproteínas de los linfocitos Th1 y Th2?


N-glicanos
O-glicanos
Asparagina
Serina
AcSial
Gal
Man
NAcGlc
NAcGal
Glicoproteína

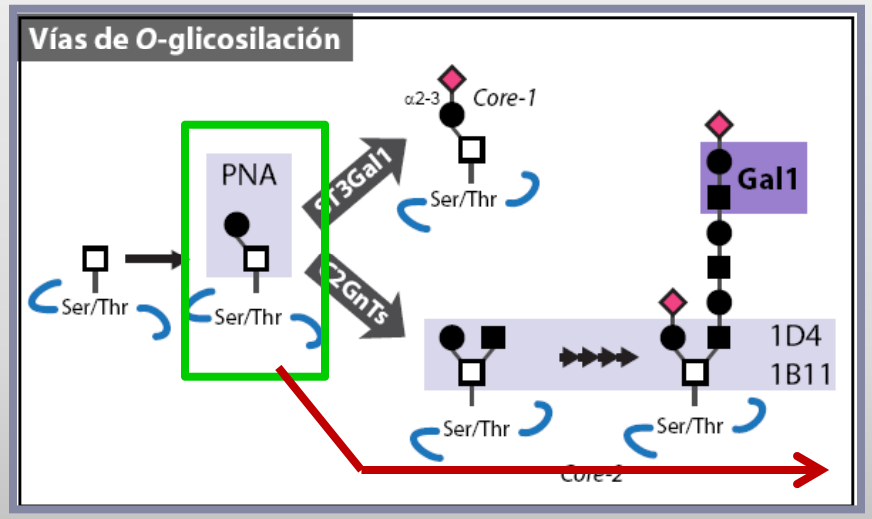

Vías de N-glicosilación
Gal1
SNA
α2-6
ST6Gal1
Asn
ST3Gals
Gal1
MAL-II
α2-3
Asn
Vías de O-glicosilación
α2-3
Core-1
PNA
ST3Gal1
Ser/Thr
Gal1
Ser/Thr
Ser/Thr
C2GnTs
1D4
1B11
Ser/Thr
Ser/Thr
Core-2
AcSial
Man
Gal
NAcGal
NAcGlc

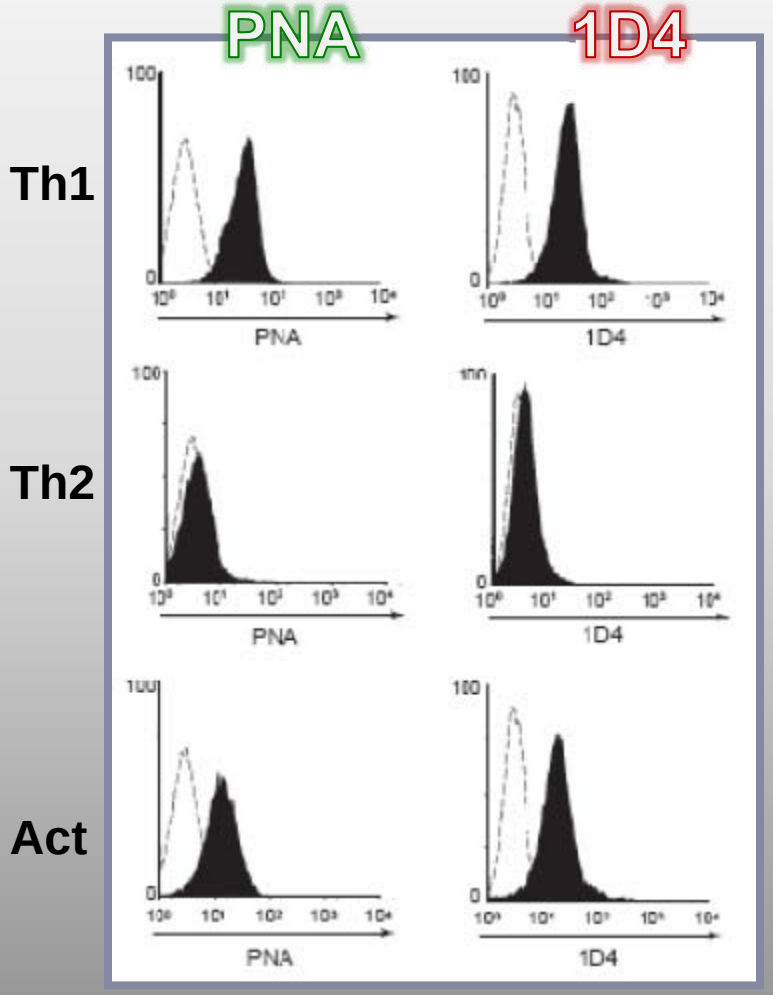
Linfocitos Th1 y Th2 presentan un patrón de glicosilación diferencial



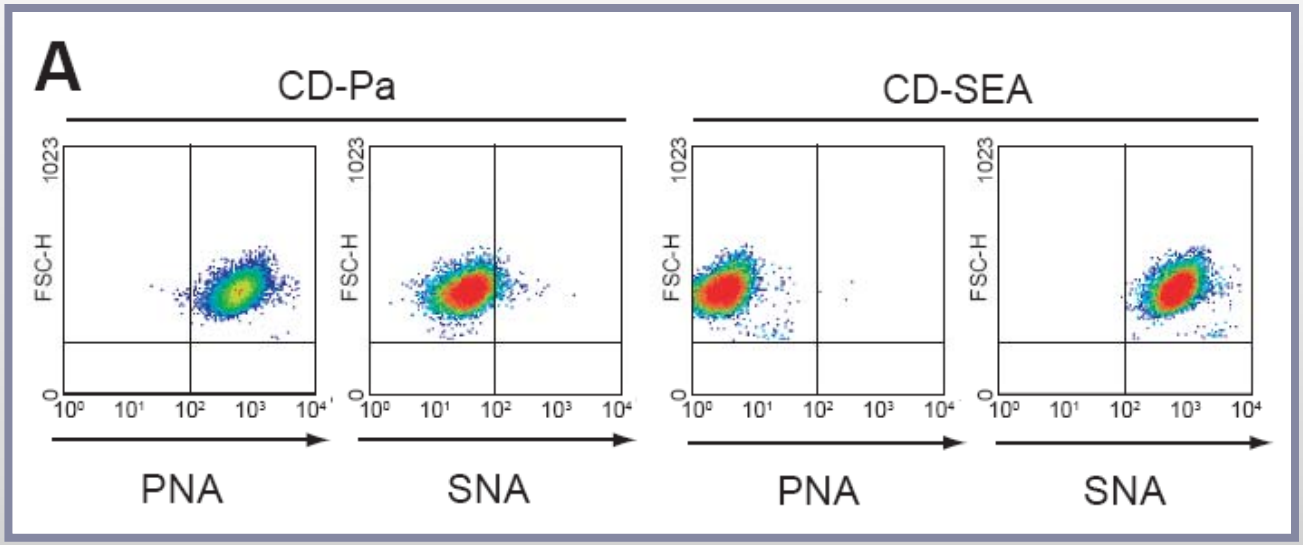


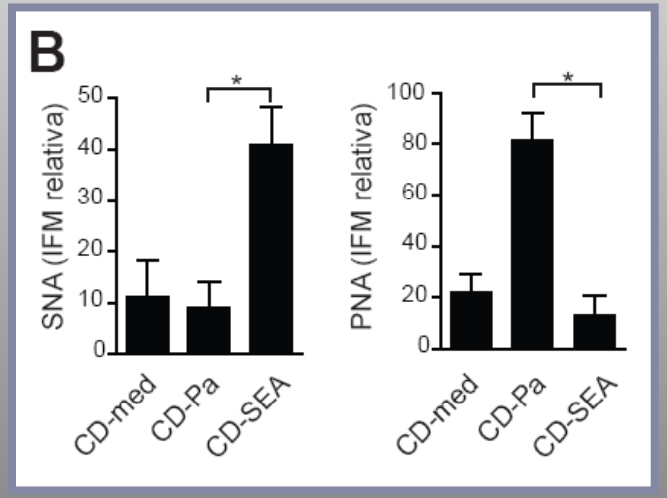
Linfocitos Th1 y Th2 presentan un patrón de glicosilación diferencial



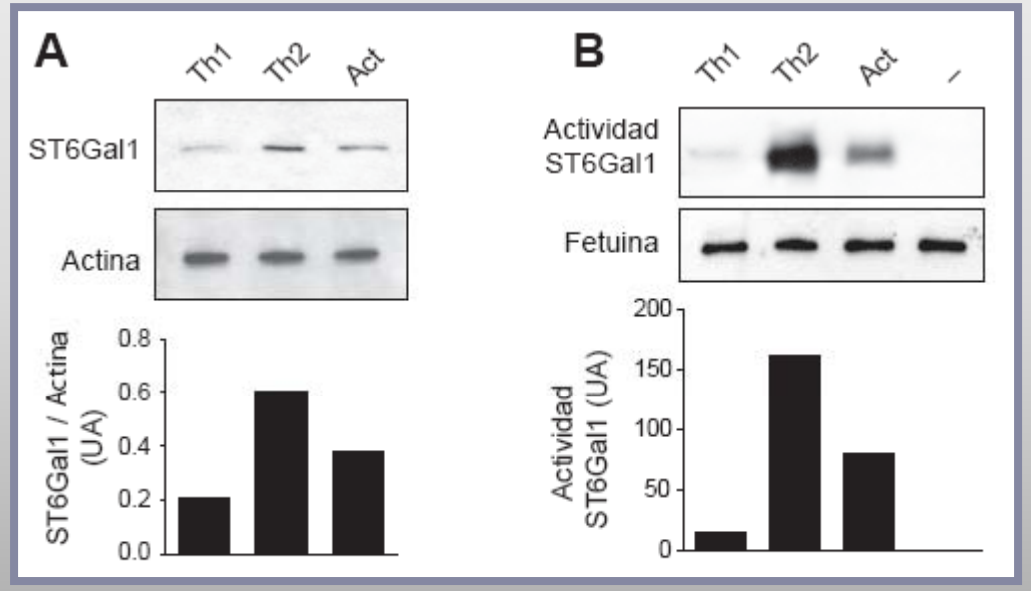


Linfocitos Th1 y Th2 presentan un patrón de glicosilación diferencial

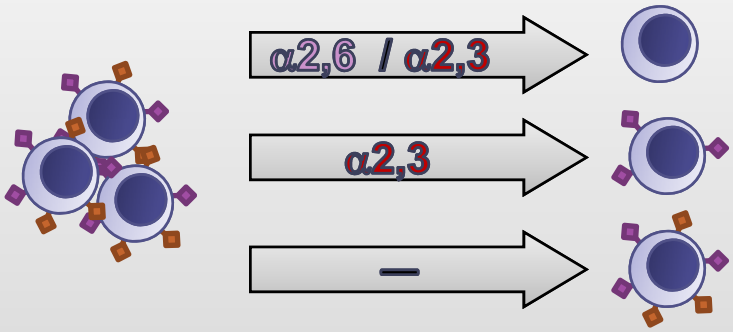




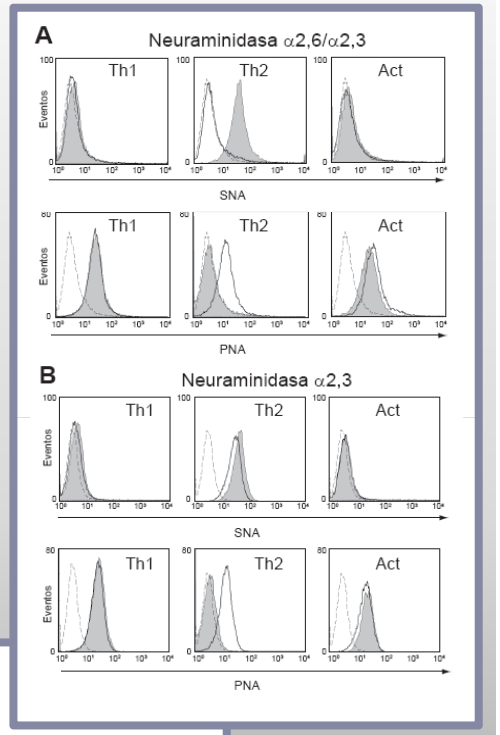
Linfocitos Th2 poseen niveles incrementados de expresión y actividad de ST6Gal1

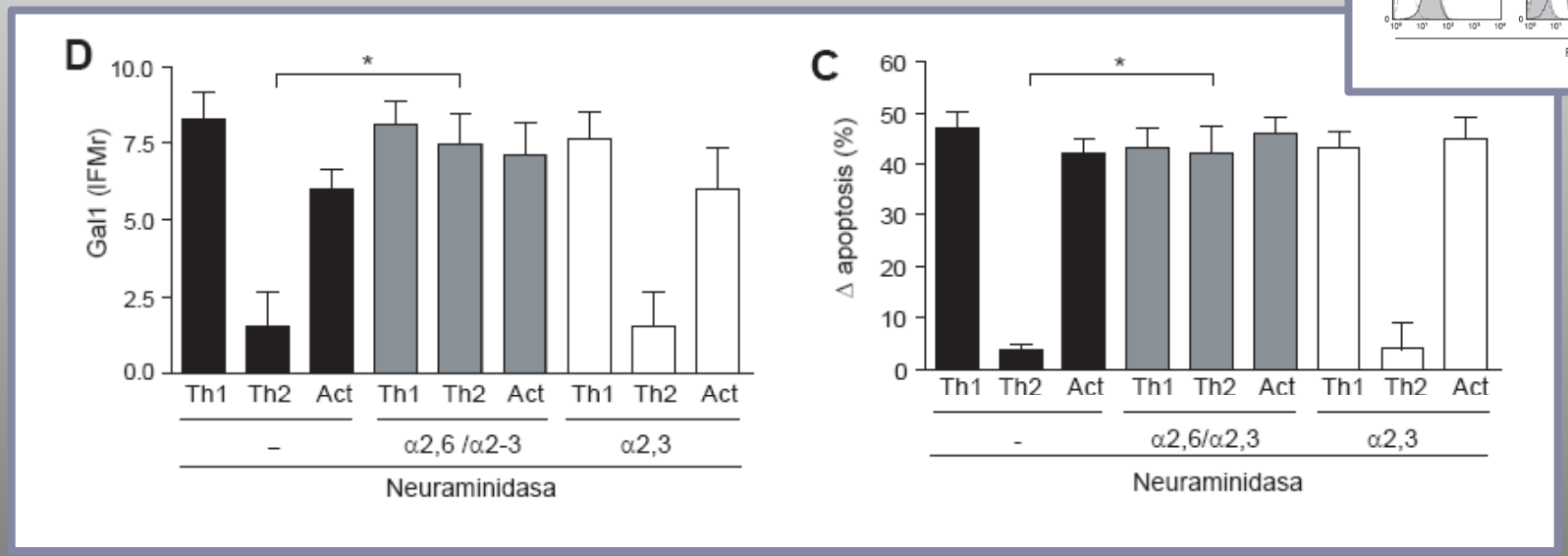


La sialilación en posición α2,6 es responsable de la resistencia de linfocitos Th2 a galectina-1



- **Unión de Gal1**
- **Susceptibilidad a la apoptosis**





Conclusiones

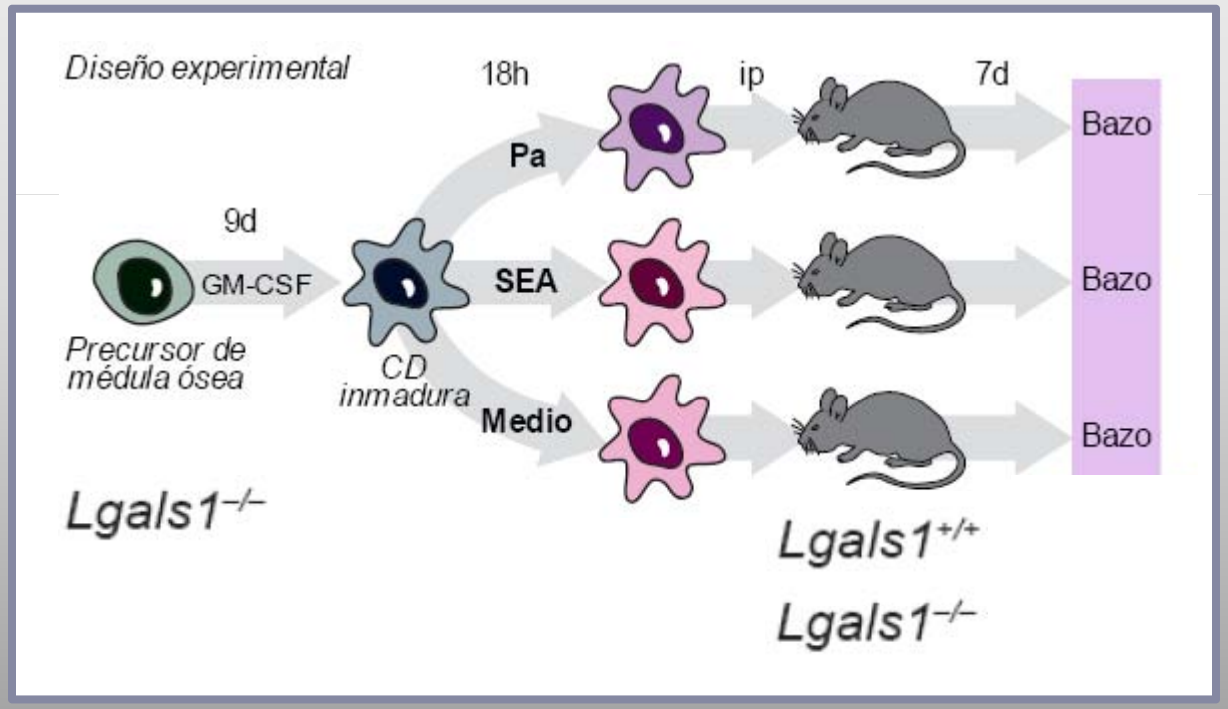
- Galectina-1 induce apoptosis de forma selectiva a linfocitos Th1. En cambio, los linfocitos Th2, son resistentes a la acción pro-apoptótica de esta proteína.

- Al explorar los mecanismos involucrados, encontramos que linfocitos Th1 y Th2 presentan un patrón de glicosilación diferencial.

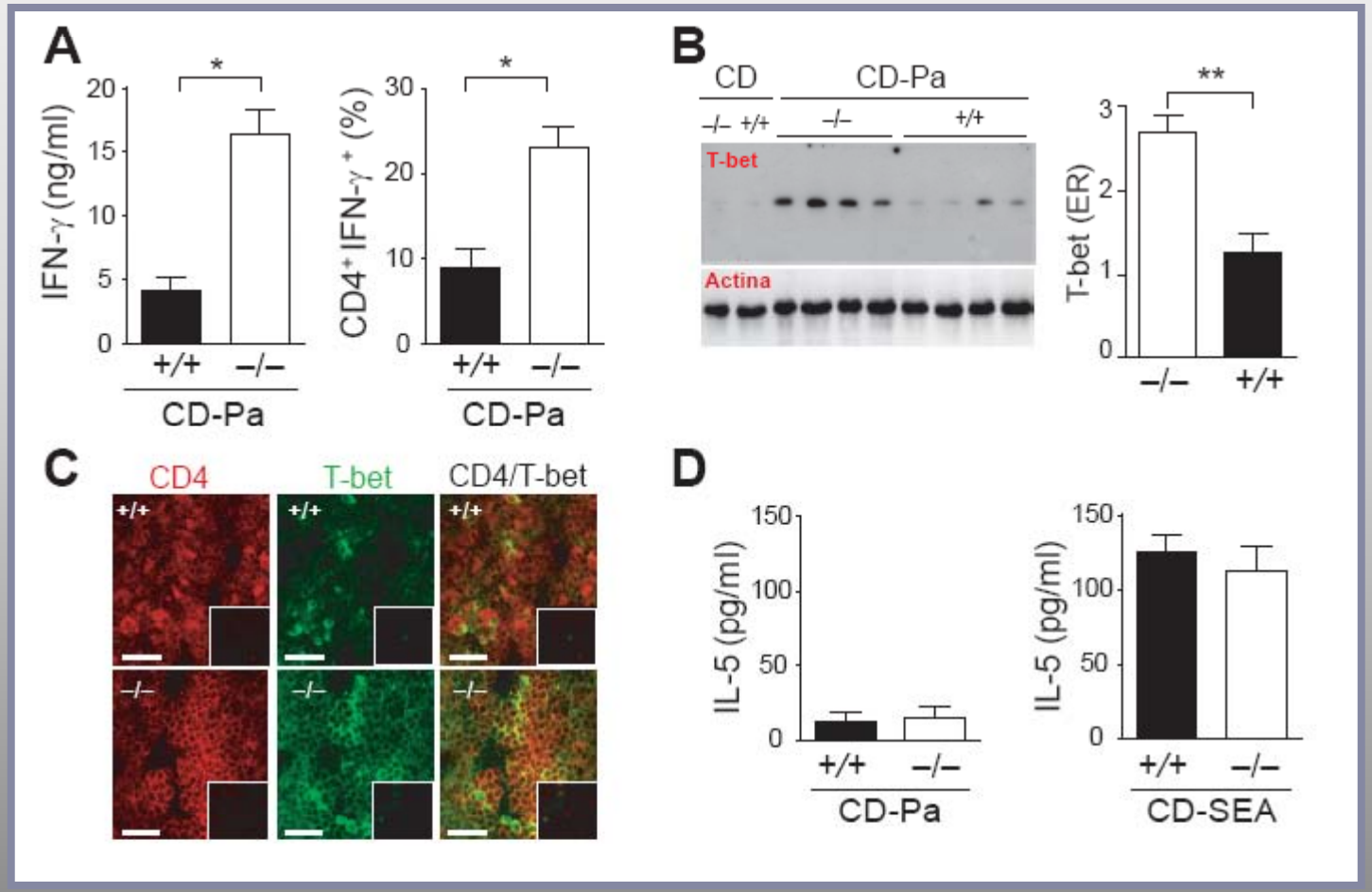
- La sialilación en la posición α2,6 en N-glicanos es la responsable de la resistencia de células Th2 a la apoptosis inducida por galectina-1.

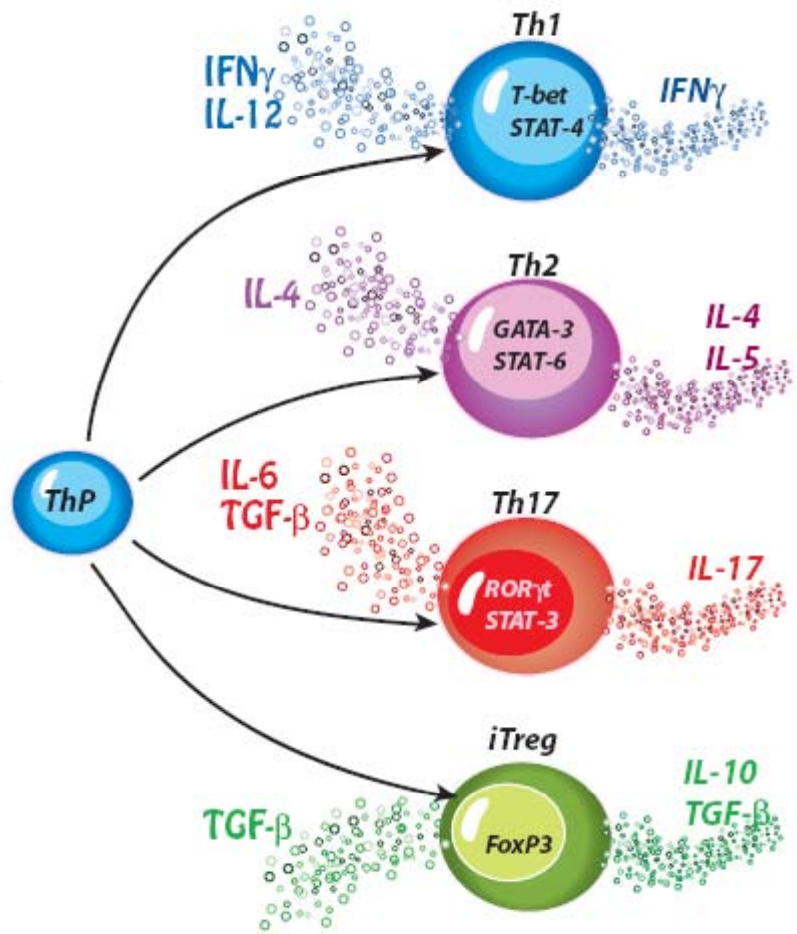
¿Cuál es la relevancia de galectina-1 en el desarrollo de respuestas Th1?

Relevancia de galectina-1 en el desarrollo de respuestas Th1 y Th2 *in vivo*



La deficiencia de galectina-1 favorece el desarrollo de respuestas Th1 *in vivo*





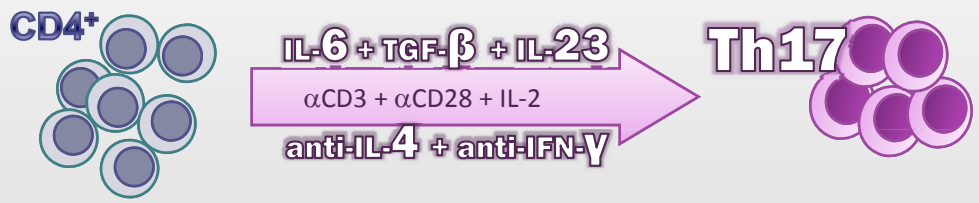
Patógenos intravesiculares
Autoinmunidad

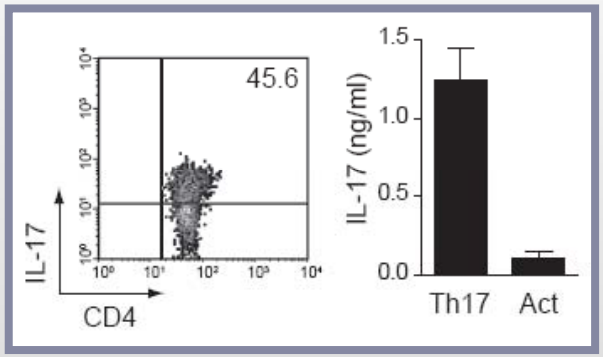
Bacterias extracelulares, parásitos
Alergia

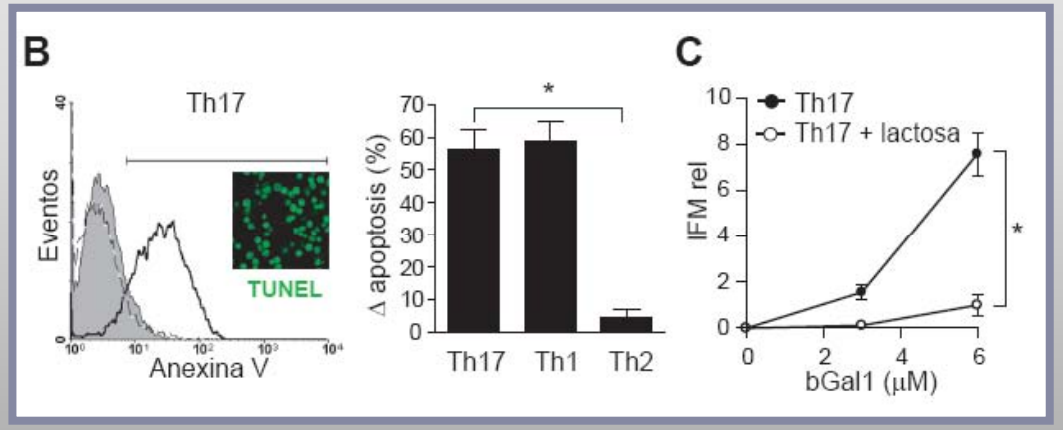
Hongos y bacterias
Inflamación crónica y autoinmunidad

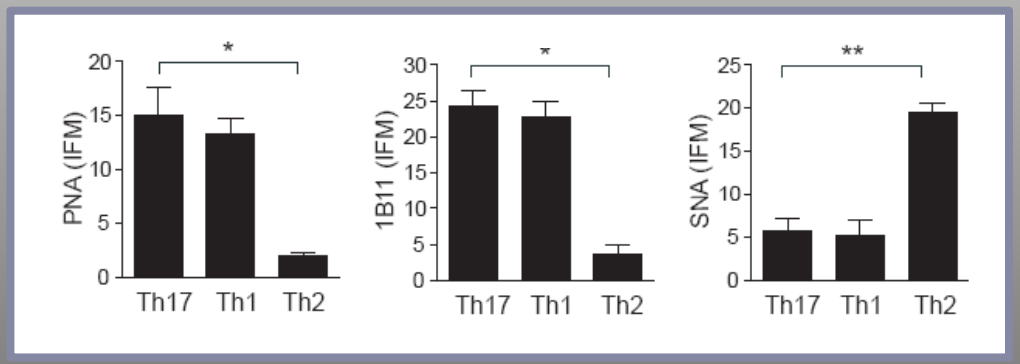
Tolerancia periférica

Los linfocitos Th17 son susceptibles a galectina-1 y exhiben un glicofenotipo similar a linfocitos Th1



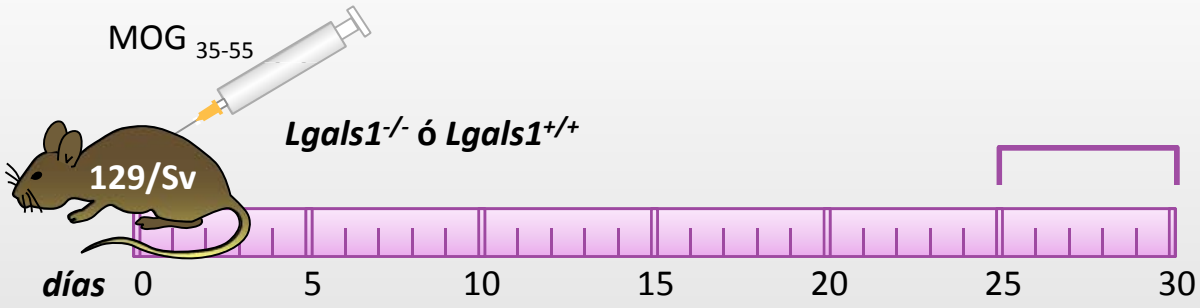




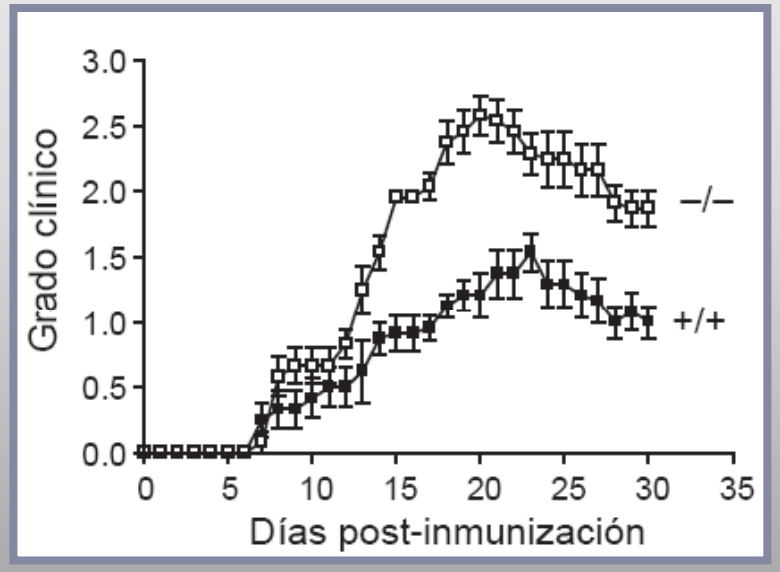


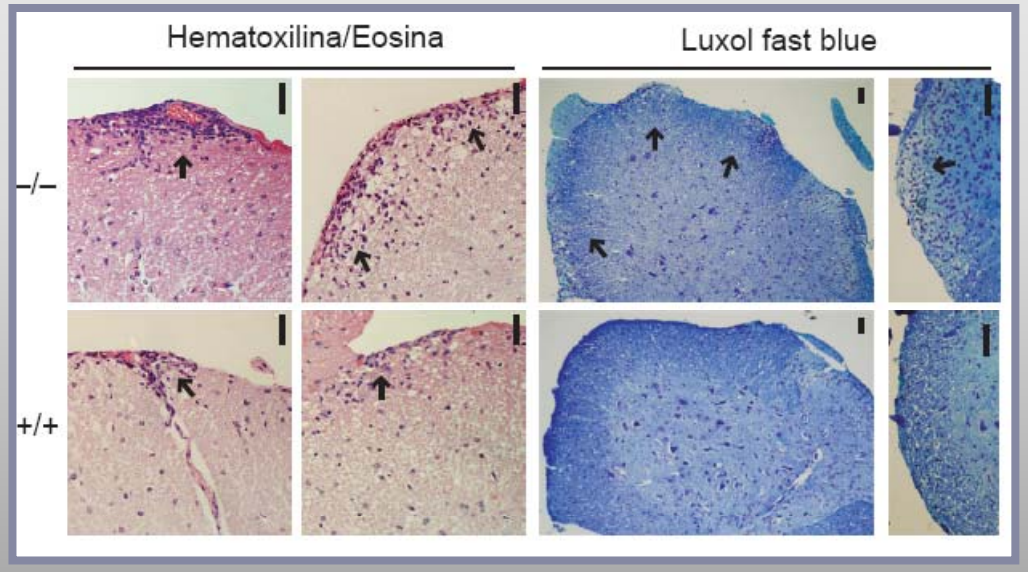
¿Cuál es la relevancia patológica de estos hallazgos?

EAE: modelo de esclerosis múltiple Th1-Th17



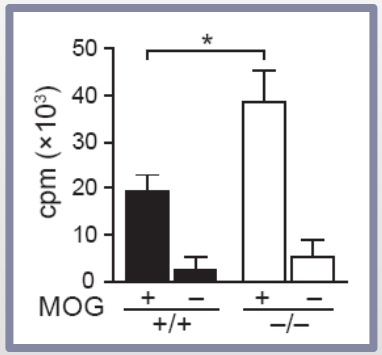
- Histopatología
- Magnitud de la respuesta inmunológica
- Apoptosis

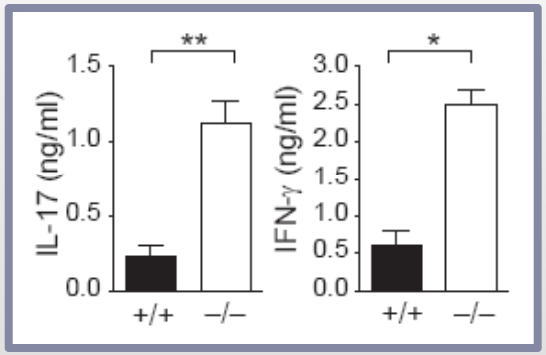


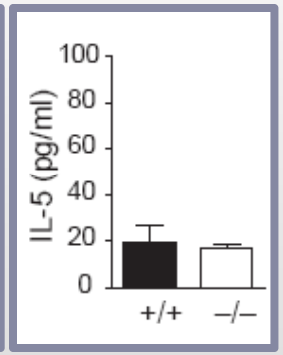


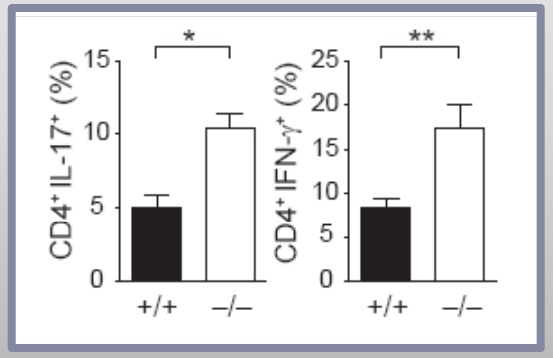
Cepa	Grupo	Incidencia (%)	Día de inicio (media ± s.e.m.)	Grado clínico máximo (media ± s.e.m.)
129/Sv	*Lgals1* $^{+/+}$	27/30 (90%)	11.3 ± 3.3	1.4 ± 0.2
129/Sv	*Lgals-1* $^{-/-}$	26/28 (93%)	10.0 ± 2.2	2.6 ± 0.1**

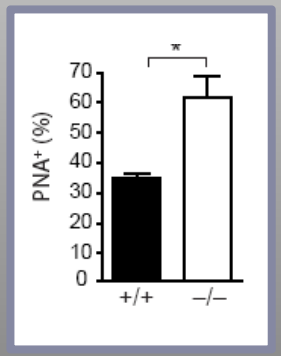
Papel crítico de galectina-1 en la regulación negativa de respuestas patogénicas Th1 –Th17 *in vivo*

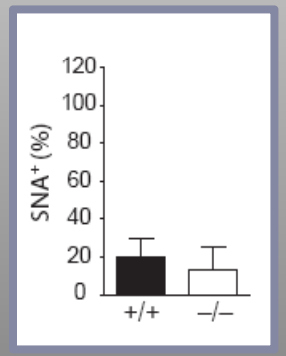


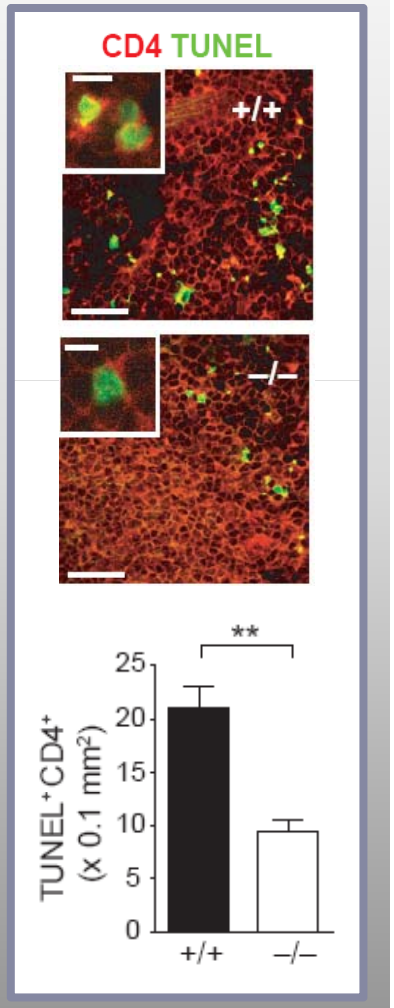




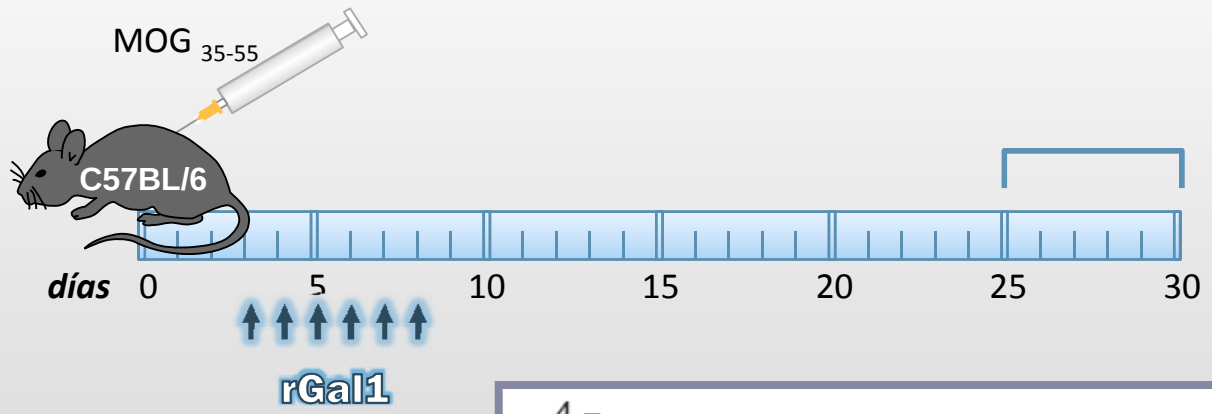




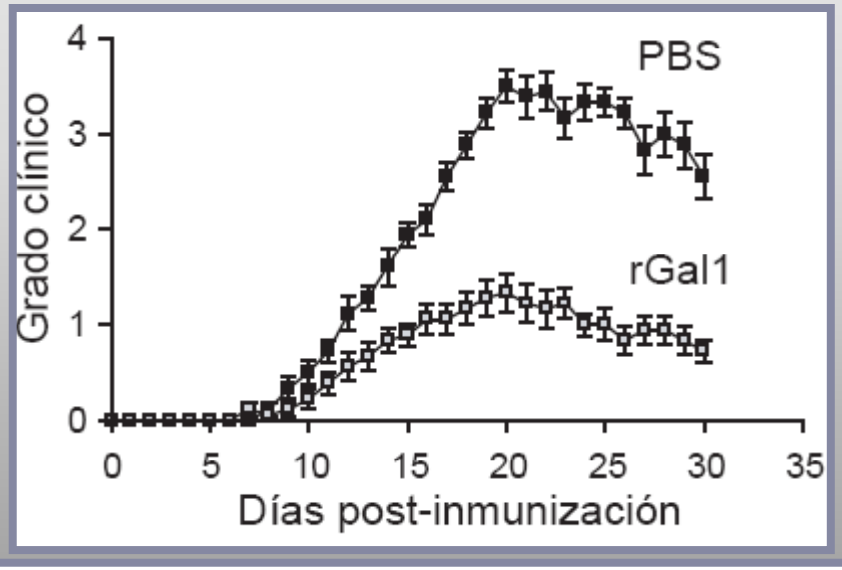




El tratamiento con galectina-1 suprime las manifestaciones clínicas de la EAE

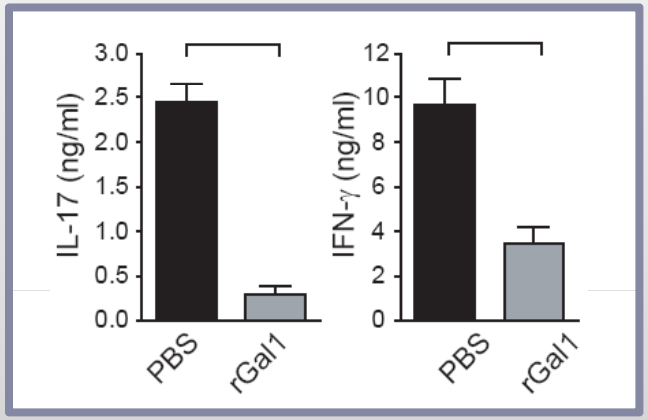


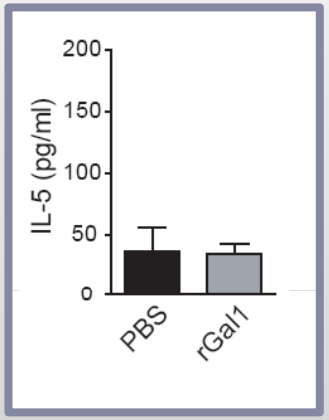
- Histopatología
- Magnitud de la respuesta inmunológica
- Apoptosis

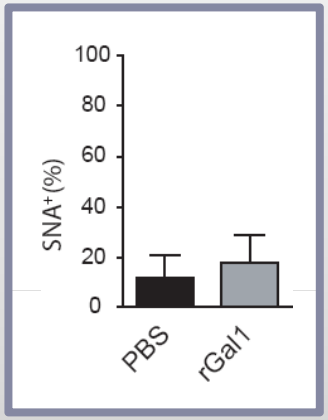


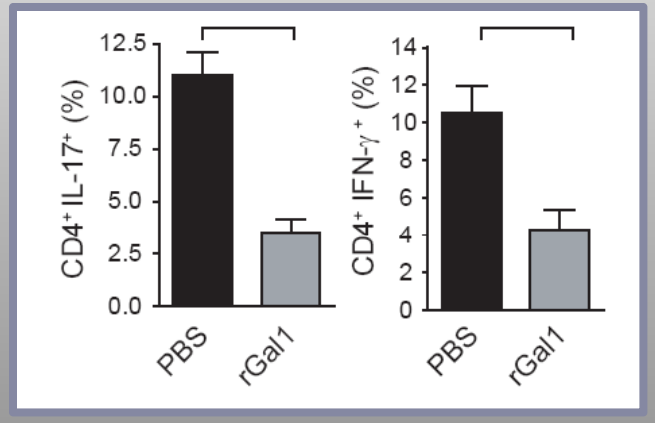
Cepa	Grupo	Incidencia (%)	Día de inicio (media ± s.e.m.)	Grado clínico máximo (media ± s.e.m.)
C57BL/6	PBS	24/24 (100%)	10.0 ± 1.2	3.5 ± 0.2
C57BL/6	rGal1	22/24 (92%)	12.3 ± 4.4	1.3 ± 0.2***

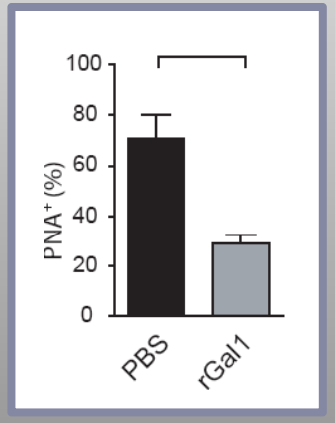
El tratamiento con galectina-1 inhibe el desarrollo de respuestas Th1 y Th17 patogénicas

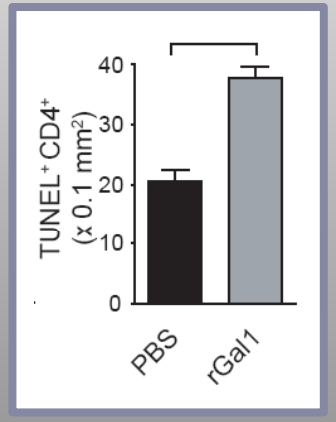












Conclusiones parciales

En el modelo de transferencia de CD pulsadas con antígenos capaces de dirigir la respuesta inmune hacia perfiles Th1 y Th2, hallamos que ratones deficientes para galectina-1 presentan una respuesta Th1 exacerbada.

En el modelo de EAE encontramos que ratones L*gals1*$^{-/-}$ presentan mayor severidad en las manifestaciones clínicas que ratones L*gals1*$^{+/+}$.
Dicho efecto está asociado a un amento en la frecuencia de células Th1 yTh17.

A su vez, observamos que la administración de rGal-1 suprime las manifestaciones clínicas de la EAE e inhibe el desarrollo de respuestas Th1 y Th17 antígeno específicas.

Conclusiones

La glicosilación diferencial de células Th1, Th2 y Th17 constituiría un rótulo que gobierna la sobrevida de células T creando o enmascarando ligandos para galectina-1.

Mientras que células Th1 y Th17 expresan los glicanos específicos de galectina-1, células Th2 se hallan decoradas en su superficie con ácido siálico en posición α2,6.

La eliminación selectiva de linfocitos Th1 y Th17 representa un mecanismo fisiológico de acción de esta lectina endógena.

Por lo tanto, la integración de los resultados expuestos, nos brinda la posibilidad de postular a galectina-1 como un factor esencial en la regulación homeostática de la respuesta inmune.

El Grupo

Marta Toscano
Juan Ilarregui
German Bianco
Diego Croci
Mariana Salatino
Juan Stupirski
Sandra Veliz

Colaboradores:

Sandra Blois (Charite, Berlin)
Petra Arck (Charite, Berlin)
Margaret Shipp (Dana Farber, Boston)
Osvaldo Podhajcer (Leloir)
Francoise Poirier (Jacques Monod, Paris)