

İnek Böbreküstü Bezlerinde Galectin-1'in Varlığı, Ayırımı ve Karakterizasyonu

Kamil SEYREK

Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 07.12.2002

Özet: Memeli hayvanların böbreküstü bezi embriyonik kaynağı, sekresyon tipi ve fonksiyonu farklı iki ayrı endokrin bölge içerir. Bu özelliğinden dolayı fetal gelişim evresinde lektinlerin araştırılmasına iyi bir örnek teşkil etmektedir. Galectin-1 ve galectin-1 için spesifik glikokonjugatların gelişmekte olan inek böbreküstü bezindeki varlığına ilişkin bir bilginin bulunmaması bu çalışmaya temel teşkil etmiştir.

Galectin-1'in dokulardan ayrıştırılması için diyaliz, affinite kromatografi ve SDS-PAGE teknikleri kullanıldı. Bu proteinin ve epitoplarının hücrelerdeki lokalizasyonu immunhistokimyasal yöntem ile tespit edildi. Standart bir protein (α -laktoglobulin) eşliğinde poliakrilamid jel üzerinde yürütülen proteinin 14 kD moleküler ağırlığında tek bir bant oluşturduğu görüldü. Ayrıca galectin-1'in kan damarlarının duvarında bulunan düz kas hücrelerinde ve göç eden glia hücrelerinde yoğun olarak bulunduğu tespit edildi. Yine, Zona fasciculata hücrelerinin galectin-1 ligandlarını yoğun olarak içerdikleri saptandı.

Anahtar Sözcükler: Galectin-1, izolasyon, lokalizasyon, inek, adren

The Presence, Isolation and Characterisation of Galectin-1 in Bovine Adrenal Gland

Abstract: The mammalian adrenal gland in the developmental stage provides excellent system for studying the role(s) of lectins in the foetal period because the adrenal gland is composed of two separate endocrine organs which differ in embryologic origin, type of secretion, and function. There is no information on the presence of galectin-1 or galectin-1 reactive glycoconjugates in the development of the bovine adrenal gland. Therefore, the present study focused on this protein.

For separation of galectin-1 dialysis, affinity chromatography and SDS-PAGE were used. To monitor the localisation of galectin-1 and its epitopes immunohistochemistry was used. A single 14-kD band comigrated with a standard marker (α -lactoglobulin) of the molecule was seen on polyacrylamide gel. It was also found that galectin-1 exists abundantly in the smooth muscle cells of blood-vessels and in the migrating glia cells. Likewise, biotin-marked galectin-1 exhibits intensive staining in zona fasciculata cells.

Key Words: Galectin-1, isolation, localisation, bovine, adrenal gland

Giriş

Endojen lektinlerin ve bunlara özgü karbonhidrat ünitelerinin dokulardaki açılımlarının diyaliz, affinite kromatografi, SDS-PAGE ve immunhistokimyasal tekniklerin bir arada kullanılarak gösterilebilmesi glikobiyojide yeni bir çığır açmıştır (1,2). Biyolojik rolleri henüz tam olarak açıklanamayan bu proteinlerin, fetal gelişimin farklı evrelerindeki miktar ve lokalizasyonlarında görülen değişkenlik ve bir çok patolojik olayda farklı şekilde ifade edilmeleri bu moleküllerin sayısız biyolojik olayda anahtar rolü oynadıklarını düşündürmektedir (3-5). Fetal evrede hücre ve dokulardaki aktivasyon (hücre-hücre ve hücre ekstrasellüler matriks etkileşimleri, hücre içi ve hücreler arası molekül transportları vs.) maksimum düzeydedir.

Proteinlerin (lektinlerin) fonksiyonlarının anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalar için hücrelerin sürekli bir değişim içerisinde olduğu bu dönem en uygun zaman olarak kabul edilmektedir (6).

Önceleri L 14-I, galaptin ve IML-1 olarak da bilinen galectin-1 134 amino asitten oluşan 14 kD moleküler ağırlığında ve aralarında kovalent olmayan bağlarla bağlanmış bir homodimerdir (7-9). Bu protein sialik asidini yitiren glikokonjugatların (glikoproteinler, glikolipitler, proteoglikanlar ve lipopolisakkaritler) ucunda bulunan β -1,4 bağları içeren galaktoz kalıntılarında ve N-asetilaktosamine bağlanabilir ve bunun için diğer bazı lektinlerin (C-tip) aksine Ca^{2+} iyonlarına ihtiyaç duymaz (10-14). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda yalnız hücre yüzeyinde değil sitoplazma ve nukleus

membranında da lokalize olduğu, hücre-hücre, hücre-substrat ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerinde, adezyonda, apoptoziste, hücre siklusu regülasyonunda, büyümesinde ve göçünde, neoplastik dönüşümde, yangıda ve tümör metastazında rol oynadığı bildirilmiştir (15-20).

Bu çalışmada galectin-1 ve bunun için spesifik olan bağlantı yerlerinin fetal ve erişkin inek böbreküstü bezlerindeki varlık ve lokalizasyonlarının tespiti ve bu moleküllerin böbreküstü bezlerinin gelişimi sırasındaki olası rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için, önce diyaliz, affinite kromatografi, SDS-PAGE ve immunblot teknikleri birlikte kullanılarak galectin-1'in varlığı saptandı. Bütün gelişim evrelerinde bulunduğu belirlenen galectin-1'in lokalizasyonu yine bu araştırma sırasında üretilen antikorlar kullanılarak immunhistokimyasal olarak ışık mikroskop düzeyinde gösterildi.

Materyal ve Metot

Çalışma materyalini Münih/Almanya mezbahasına kesim için getirilen ve klinik olarak sağlıklı görünümüne sahip erişkin ineklerden ve bunların fötuslarından alınan adrenal bezler oluşturdu. Fötuslar büyüklüklerine göre F₁ (5-12 cm), F₂ (13-24 cm) ve F₃ (25-40 cm) olmak üzere üç gruba ayrıldı ve her gruptan üç farklı numune ile çalışıldı. Numunelerin bir kısmı SDS-PAGE ve immunblot çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de dondurulurken bir kısmı da immunhistokimyasal çalışmalar için tespit edildi. Tespit çözeltisinden kaynaklanabilecek olası maskeleyen olaylarını minimuma indirmek için üç farklı fikzatif kullanıldı. Fikzatif olarak % 4'lük paraformaldehid, asetik asidin metanol içerisindeki % 30'luk çözeltisi ve Bouin çözeltisi (15:5:1 oranlarında pikrik asit, formol ve asetik asit) seçildi. 24 saat +4 °C'de tespit edilen numuneler ardından yine 24 saat süre ile oda ısısında % 70'lik etanol içerisinde bekletildi. Sonra, sırasıyla % 80, % 96, % 100'lük etil alkol ve parafin içeren otomatik doku takipleme makinesinde 24 saat süreyle dehidre edilip parafin dispenser cihazında parafin bloklar hazırlandı.

Poliklonal antigalectin-1 antikorunu üretmek için gerekli olan protein mezbahadan taze olarak alınmış erişkin inek kalbinden laktoz-sefaro 4B affinite kromatografi yöntemiyle izole edildi (21). İzolasyonu gerçekleştirilen proteinin çözelti içindeki oranını artırmak amacıyla eluat 3,5 barlık azot gazı basıncı altında 3 kD'a kadar olan

proteinler için geçirgen olan YM3 membrandan (Amicon, Witten) yaklaşık 5 ml'lik bir miktar kalıncaya kadar filtre edildi.

Antikor üretimini uyarmak için galectin-1 önce 200 µg, dördüncü ve yedinci haftalarda 100'er µg Freund's adjuvanı (Sigma, Diesenhofen/Almanya) ile birlikte tavşanlara subkutan olarak enjekte edildi. IgG fraksiyonun izolasyonu son enjeksiyonu izleyen ikinci haftada 30 ml kan alınıp Sefaroz-A 4B affinite kromatografi kolonundan (Pharmacia, Freiburg) geçirilerek üretici firma tarafından tanımlandığı şekilde gerçekleştirildi. Galectin-1 epitoplarının belirlenmesinde kullanılan biotinlenmiş galectin-1 ise Andre (22) tarafından belirtilen yöntemle elde edildi.

Gerek erişkin inek kalbinden gerekse böbreküstü bezlerinden laktoz-sefaro 4 B affinite kromatografi yöntemi ile izole edilen proteinin gerçekten 14 kD moleküler ağırlığındaki galectin-1 olup olmadığı SDS-PAGE yapılarak kontrol edildi. Bunun için mini-Protean II elektroforez düzeneğinde (Bio-RAD, Münih) Laemmli (23) tekniği modifiye edilerek 5 µg protein eşit miktardaki 14,2 kD moleküler ağırlığına sahip α-laktoglobulin eşliğinde elektriksel bir ortamda yürütüldü. Jelin gümüş boyaması ise Blum ve ark. (24) tarafından tanımlanan yöntemle gerçekleştirildi.

İmmunblot çalışmaları sırasında proteinler SDS-PAGE ile ayrıştırılıp jel boyanmadan Mini-Trans-Blot Cell (Bio-RAD, Münih) düzeneğinde 0,2 µm kalınlığındaki nitrosellüloz membrana (Schleicher & Schüll, Dassel) 30 V'luk elektriksel bir akım altında 12 saat süreyle nakledildi. Galectin-1 için spesifik olan bantlar daha önce ayrıntılı olarak bildirilen yöntemle (25) primer ve peroksidaz ile işaretlenmiş ikincil antikorlar kullanılarak gösterildi.

İmmunhistokimyasal olarak galectin-1 ve buna spesifik bağlantı yerlerinin gösterilmesi için parafin bloklardan 4-6 µm kalınlığında kesitler alınıp 12 saat süre ile 37 °C'de kurutuldu ve rutin doku takibi yapıldı. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi % 3'lük H₂O₂ ile bloke edilip spesifik olmayan bağlantı yerleri normal keçi serumu ile kapatıldı. Galectin-1'e spesifik primer antikorun 15 saatlik inkübasyonundan sonra peroksidaz ile işaretlenmiş sekonder antikor kullanıldı. Kesitler streptavidin-biotin-peroksidaz kompleksiyle (Cameron, Burlingame/USA) reaksiyona sokulduktan sonra % 0,05'lik 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorit (Sigma,

Diesenhofen/Almanya) çözeltilisinde 3-5 dakika süreyle bekletildi. Kontrol grubu olarak seçilen kesitlerin bir kısmı primer antikora yerine PBS ile kaplanırken bir kısmı da galectin-1 ile preinkübe edilen primer antikora tepkimeye sokuldu.

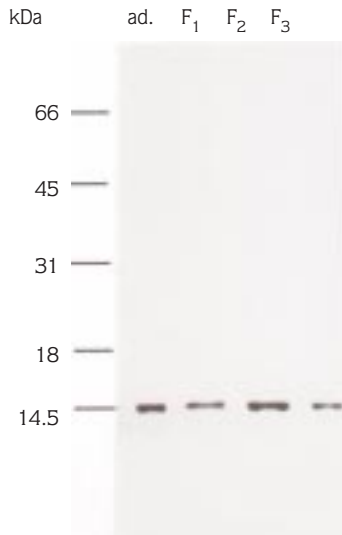
Bulgular

Sığır kalbinden affinite-kromatografi yöntemi ile izole edilen proteinin standart eşliğinde yapılan elektroforezinde ve her üç fetal evre ile erişkin adrenlerden elde edilen homejenatlarla yapılan immunblot çalışmalarında 14 kD ağırlığında tek bir bandın varlığı görüldü (Şekil 1). İmmunhistokimyasal teknikle yapılan çalışmalarda ise göç eden glia hücrelerinin erken fetal evrede (F₁) yoğun olarak galectin-1 içerdikleri, fakat göçünü tamamlamış hücrelerde ise bu proteinin bulunmadığı gözlemlendi (Şekil 2 A). Ayrıca, arterlerin Tunica muscularis hücrelerinin de bütün fetal evrelerde aralarında belirgin bir fark görülmesinin bu proteini yoğun olarak bulduklarını tespit edildi (Şekil. 2 B). Düz kas hücrelerindeki lektinin sadece sitoplazmada değil hücre çekirdeğinde de lokalize olduğu görüldü. Biotinlenmiş lektin ile yapılan çalışmalarda ise aynı hücrelerin galectin-1 için reaktif ligandları içermedikleri tespit edildi. Galectin-1 epitoplarının özellikle Zona glomerulosa hücreleriyle bazı Zona fasciculata hücrelerinde

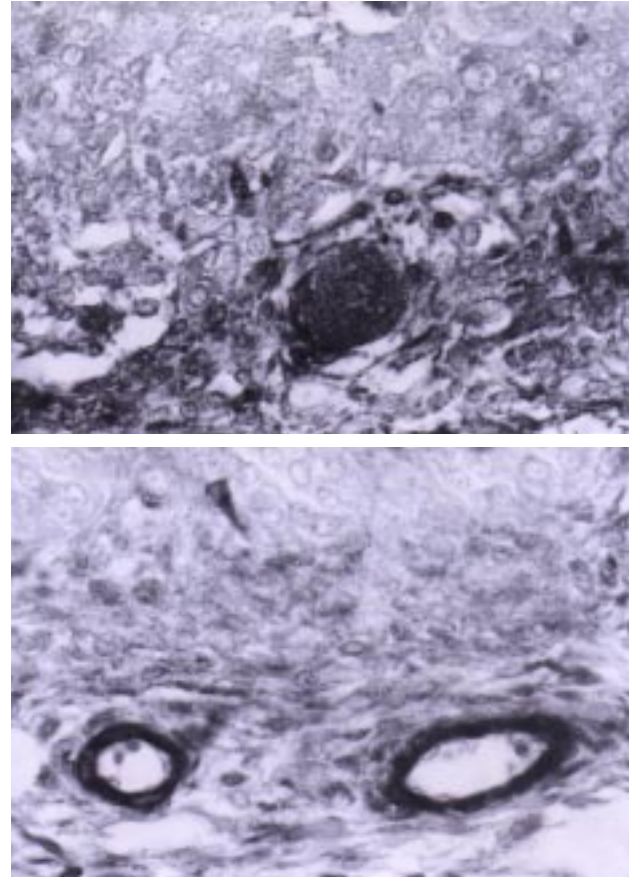
sitoplazmik olarak yerleştikleri belirlendi (Şekil 3 A). Bütün fetal evrelerde galectin-1 ve galectin-1 epitoplarının güçlü olarak tanındıkları gözlemlenirken erişkin dönemde galectin-1'in yalnız kan damarlarının Tunika muscularis ve bazı Zona hücrelerinde zayıf bir yerleşim gösterdiği tespit edildi (Şekil 3 B). Kontrol gruplarının hiç birinde herhangi bir reaksiyon görülmedi.

Tartışma

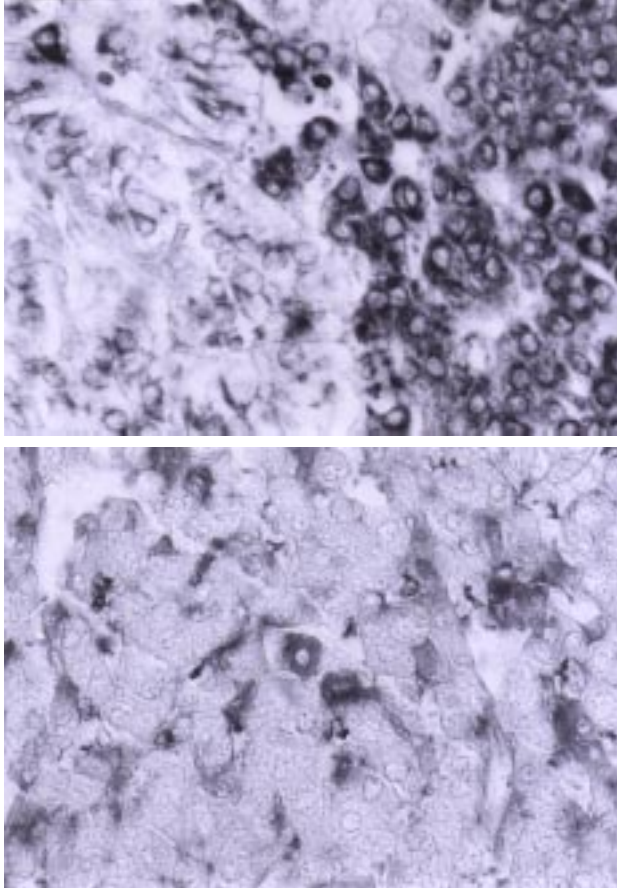
Proteinlerin biyolojik rolünün anlaşılması için bunların hangi dokuda ve ne tip hücrelerde yerleştiği ve hücrelerin neresinde lokalize olduğunun bilinmesi gerekir. Bu yönde yapılan çalışmalar lektinler üzerine yapılan araştırmaların büyük bir kısmını teşkil etmektedir. Bu çalışmada da, galectin-1'in önce SDS-PAGE ve immunblot teknikleri ile fetal ve erişkin inek adrenlerinde bulunduğu saptandı. Daha sonra hem galectin-1'in hem de bu proteine özgü bağlantı yerlerinin hangi hücrelerde ve bu hücrelerin



Şekil 1. Erişkin ve fetal adrenlerdeki galectin-1'in poliakrilamid jel elektroforezinden sonra nitroselüloz membrana nakledilip anti-galectin-1 antikoru ile gösterilmesi.



Şekil 2. Galectin-1'in erken fetal (F₁) evrede göç eden glia hücreleriyle (A, 540x), arterlerin Tunica muscularis (B, 540x) hücrelerindeki lokalizasyonları.



Şekil 3. Galectin-1 epitoplarnının fetal Zona glomerulosa ve Zona fasciculata hücrelerindeki lokalizasyonu (A, 540x) ve galectin-1'in erişkin inek adrenal hücrelerdeki zayıf sitoplazmik reaksiyonu (B, 540x).

neresinde lokalize oldukları immunhistokimyasal olarak tespit edildi. İlk kez bu çalışma sırasında galectin-1'in erken fetal evrede göç etmekte olan glia hücrelerinde yoğun olarak bulunduğu, göçünü tamamlamış glia hücrelerinin ise bu proteini içermediği görüldü. Bu veri daha önce galectin-1'in hücre göçünde rol oynadığı yönündeki yayınları destekler niteliktedir (19,20).

Kaynaklar

1. Damjanov, I.: Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab. Invest. 1987; 57: 5-20.
2. Danguy, A., Akif, F., Pajak, B., Gabius, H.J.: Contribution of carbohydrate histochemistry to glycobiology. Histol. Histopathol. 1994; 9: 155-171.
3. Hakomori, S., Igarashi, Y.: Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signalling. J. Biochem. Tokyo 1995; 118: 1091-1101.
4. Lis, H., Sharon, N.: Protein glycosylation. Structural and functional aspects. Eur. J. Biochem. 1993; 218: 1-27.
5. Varki, A.: Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology. 1993; 3: 97-130.
6. Bourrillon, R., Aubery, M.: Cell surface glycoproteins in embryonic development. Int. Rev. Cytol. 1989; 116: 257-338.

β -D-galaktoza spesifik bu proteinin arter duvarlarındaki düz kas hücrelerinde yoğun olarak görülmesi daha önce yaptığımız bir çalışmadaki ve diğer bir çok araştırmacı tarafından bildirilen verilerle paralellik göstermektedir (26-30). Ancak, burada arter duvarı Tunica muscularis hücrelerinin bu proteini yoğun olarak içerirken vena duvarlarındaki düz kas hücrelerinin bu proteini içermemesinin nedeni bilinmemektedir.

Dokulardaki karbonhidrat ünitelerinin pasif ve stabil birer yapı değil, özellikle fetal dönemde ve diğer birçok hastalık olgusunda devamlı değişkenlik gösterdiği daha önce birçok araştırma grubu tarafından rapor edilmiştir (6,31,32). Bu çalışma sırasında da galectin-1 ligantlarını teşkil eden monosakkaritlerin fetal adrenler arasında pek belirgin olmasa da erişkin inek adrenleriyle karşılaştırıldığında çok farklı lokalize oldukları tespit edildi. Ayrıca, galectin-1'in hücrenin hemen her yerinde lokalize olabılırken buna spesifik epitoplarnın sadece sitoplazmik bir yerleşim gösterdikleri saptandı. Yine, galectin-1 ile bu proteine özgü ligandların farklı hücrelerde lokalize oldukları görüldü. Lektin ile reseptörlerinin farklı hücrelerde lokalize olmaları bu proteinin relatif olarak uzakta bulunan reseptöründeki biyolojik kodu deşifre edebildiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, galectin-1'in bütün fetal evreler ile erişkin sığır böbreküstü bezlerinde bulunması, özellikle de erken fetal evrede göç halindeki glia hücrelerinin bu proteini yoğun olarak içerirken ileri fetal dönemlerde medullada yerleşim gösteren göçünü tamamlamış glia hücrelerinin bu proteini içermemesi galectin-1'in glia hücrelerinin göçünde rol oynadıkları kanısını vermektedir. Ayrıca, galectin-1 reseptörlerinin fetal ve erişkin böbreküstü bezlerinde miktar ve lokalizasyon farklılığı göstermesi bu moleküllerin pasif birer yapı olmadığını aksine böbreküstü bezlerinin gelişimine etkin olarak katıldıklarını düşündürmektedir.

7. Kaltner, H., Lips, K. S., Reuter, G., Lippert, S., Sinowatz, F., Gabius, H.J.: Quantitation and histochemical localization of galectin-1 and galectin-1-reactive glycoconjugates in fetal development of bovine organs. *Histol. Histopathol.* 1997; 12: 945-960.
8. Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J., Baum, L.G.: Apoptosis of T-cells mediated by GAL-1. *Nature.* 1995; 378: 736-739.
9. Rabinovich, G.A., Iglesias, M.M., Modesti, N.M., Castagna, L.F., Todel, C.W., Riera, C.M., Sotomayor, C.E.: Activated rat macrophages produce a GAL-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J. Immunol.* 1998; 160: 4831-4840.
10. Akimato, Y., Hirabayashi, J., Kasai, K., Hirano, H.: Expression of the endogenous 14-kDa β -galactoside-binding lectin galectin in normal human skin. *Cell Tissue Res.* 1995; 280: 1-10.
11. Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., Leffler, H.: Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Bio. Chem.* 1994; 19: 20807-2810.
12. Colnot, A., Ripoche, M.A., Scaerou, F., Foulis, D., Poirier, F.: Galectins in mouse embryogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 1996; 24: 141-146.
13. Siebert, H.C., Arango, R., Burchert, M., Kaltner, H., Kayser, G., Tajkhorshid, E., von der Lieth, C.W., Kaptein, R., Sharon, N., Vliegthart, J.F.G., Gabius H.J.: Involvement of laser photo-CIDNP (chemically induced dynamic polarization)-reactive amino-side chains in ligand binding by galactoside-specific lectins in solution. *Eur. J. Biochem.* 1997; 249: 27-38.
14. Seyrek, K., Özcan, A., Erbaş, H.: Histochemical study of expression of galectin -1 and its reactive carbohydrate epitopes in normal bovine embryonal and adult pancreas. *Israel J. Vet. Med.* 2001; 56, (1): 25-28.
15. Cooper, D.N.W., Barondes, S.H.: Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J. Cell Biol.* 1990; 110: 1681-1691.
16. Drickamer, K., Taylor, M.E.: Biology of animal lectins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1993; 9: 237-264.
17. Gabius, H.J., Bardosi, A.: Neoglycoproteins as tools in glycohistochemistry. *Progr. Histochem. Cytochem.* 1991; 22: 1-66.
18. Gabius, H.J.: Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* 1997; 243: 543-576.
19. Kasai, K., Hirabayashi, J.: Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J. Biochem.* 1996; 119: 1-8.
20. Raz, A., Lotan, R.: Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1987; 6: 433-452.
21. Fronstedt, N., Porath, J.: Characterization studies of a new lectin found in seeds of *Vicia ervilia*. *FEBS Lett.* 1975; 57: 187-191.
22. André, S.: Biochemische, biophysikalische und zellbiologische Untersuchungen molekularer Erkennungsprozesse am Beispiel von endogenen und pflanzlichen Lektinen sowie unterschiedlichen Klassen von Neoligandkonjugaten und ausgewählten subzellulären Folgereaktionen der Protein-Zucker-Interaktionen. Doktora Tezi, Ludwig-Maximilians Üniversitesi Biyoloji Fakültesi, Münih/Almanya, 1996.
23. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
24. Blum, H., Beier, H., Goss, H.J.: Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 1987; 8: 93-99.
25. Seyrek, K.: Expression und Lokalisation von galectin-1 und Galektin-3 sowie der histochemische Nachweis ihrer möglichen glykosylierten Bindungsstellen in fetalen und adulten Organen des Rindes. Doktora Tezi, Ludwig-Maximilians Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Münih/Almanya, 1999.
26. Cooper, D.N.W., Massa, S.M., Barondes, S.H.: Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J. Cell. Biol.* 1991; 115: 1437-1448.
27. Kaltner, H., Seyrek, K., Heck, A., Sinowatz, F., Gabius, H.-J.: Galectins-1 and -3 in fetal development of bovine respiratory and digestive tracts: Comparison of cell-type-specific expression profiles and subcellular localization. *Cell Tissue Res.* 2002; 307: 35-46.
28. Southan, C., Aitken, A., Childs, R.A., Abbott, W.M., Feizi, T.: Amino acid sequence of beta-galactoside-binding bovine heart lectin. Member of a novel class of vertebrate proteins. *FEBS Lett.* 1987; 214: 301-304.
29. Tracey, B.M., Feizi, T., Abbott, W.M., Carruthers, R.A., Green, B.N., Lawson, A.M.: Subunit molecular mass assignment of 14,564 Da to the soluble β -galactoside-binding lectin from bovine heart and demonstration of intramolecular disulfide bonding associated with oxidative inactivation. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 10342-10347.
30. Wasano, K., Hirakawa, Y., Yamamoto, T.: Immunohistochemical localization of 14 kDa β -galactoside-binding lectin in various organs of rat. *Cell Tissue Res.* 1990; 259: 43-49.
31. Mann, P.L.: Membrane oligosaccharides: structure and function during differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 1988; 112: 67-96.
32. Muramatsu, T.: Developmentally regulated expression of cell surface carbohydrates during mouse embryogenesis. *Cell. Biochem.* 1988; 36: 1-14.