

O-TÍPUSÚ FEHÉRJE GLIKOZILÁCIÓ SZEREPE AZ ÉLŐ SEJTEK STRESSZVÁLASZÁBAN

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Kátai Emese

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskolavezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Programvezető: Prof. Dr. Miseta Attila

Témavezető:

Dr. Nagy Tamás, Laboratóriumi Medicina Intézet



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

PÉCS

2018

ÖSSZEFOGLALÁS

Az O-glikoziláció egy dinamikus, reverzibilis, a sejtek metabolikus állapotát közvetítő fehérje poszt-transzlációs módosulás. Szabályozó szerepe ismert az acetilációval, metilációval, ubikvitinációval, nitrozilációval kapcsolatban is, de legrészletesebben vizsgált a foszforilációval való kompetíció. Az utóbbi időkben felmerült az O-glikoziláció stressz adaptációban illetve prekondicionálásban betöltött jelátvivő szerepe is.

Dolgozatom alapját képező munka első felében az O-glikoziláció dinamikáját, tau foszforilációval való kapcsolatát vizsgáltuk akut oxidatív stressz hatására különböző regenerációs időpontokban humán neuroblasztóma sejtvonalon (SH-SY5Y). Western blot módszerrel kimutattuk, hogy rövid ideig oxidatív stressznek kitett sejtek szintjén az intracelluláris fehérjék O-glikozilációjának mértéke hirtelen emelkedett, majd közel a kiindulási szintre tért vissza a regenerációs periódus végére. Az O-glikoziláció szabályozásában résztvevő főbb enzimek expressziós szintjénél is hasonló kinetikát tapasztaltunk. A tau foszforiláció esetében az O-glikozilációval ellentétes változásokat észleltünk. Eredményeink azt mutatják, hogy az O-glikoziláció fontos szerepet játszik a stressz adaptációban, valamint a tau foszforilációval való kapcsolatának ismerete hozzájárulhat az Alzheimer kór patofiziológiájának pontosabb megértéséhez.

A munka második felében az O-glikoziláció változását vizsgáltuk egyszeri fizikai aktivitáson részt vett önkéntesek vérmintáiból izolált fehérvérsejteken. Kísérleteink során nem csak az összfehérvérsejtek O-glikoziláltsági állapotára voltunk kíváncsiak, hanem az azt alkotó alpopulációkat is megvizsgáltuk áramlási citométer segítségével. Eredményeink azt mutatták, hogy fizikai aktivitás hatására az összfehérvérsejtekben szignifikáns O-glikozilációs változás figyelhető meg a nyugalmi periódusban gyűjtött mintákhoz képest. Fehérvérsejt alpopulációk szintjén főként a limfociták és monociták csoportjában volt kifejezett az O-glikozilációs változás. Bár ennek a komplex funkciónak a megértése további vizsgálatokat igényel, a mechanizmus ismeretétől függetlenül az O-glikoziláció mérése humán mintákban hasznos kiegészítője lehet a laboratóriumi diagnosztikának; például alkalmas lehet sportolók fizikai állapotfelmérésére, metabolikus szindrómás betegek szűrésére.

BEVEZETÉS

A sejtek a külső környezeti behatásokkal szemben intracelluláris homeosztázisuk fenntartására törekednek. A különböző mikrokörnyezeti stresszorok, mint a hősök, oxidatív stressz, mérgező anyagok, ozmotikus sokk különböző celluláris stresszválaszokat indukálhatnak, amelyek vagy a sejtek aktuális tolerancia szintjét emelve hozzájárulnak a sejtek túlélőképességéhez, vagy sejthalált indukálnak.

Prekondicionálás során a stresszhatások stresszfehérjéket aktiválhatnak, amelyek általános sejtvédő tulajdonságuknak köszönhetően a sejteket ellenállóbbá teszik a stresszorokkal szemben. A leggyakrabban tanulmányozott prekondicionálási mechanizmusok az iszkémiás valamint a fizikai aktivitás általi prekondicionálás. Mindkét mechanizmus kritikus fontosságú a fellépő gyulladási folyamatok, valamint oxidatív stressz és károsodás enyhítésében. Az általuk indukált sejtes stresszválaszokat különböző genomikai, transzkripció, transláció és poszt-transzlációs folyamatok aktiválják és szabályozzák. Míg a transzkripció gén-indukció a sejt stressz-tűrőképességét meghaladó nagyfokú stresszrel szemben fellépő válaszreakció, addig a poszt-transzlációs módosulás akut vagy krónikus, bizonyos küszöbértéket nem meghaladó stresszre adott gyors válasz. A sejt integritásának megőrzése céljából a poszt-transzlációs módosulások reverzibilis vagy irreverzibilis fehérje szerkezeti, stabilitási és funkció változásokat képesek előidézni.

Az O-glikoziláció egy olyan dinamikus és reverzibilis poszt-transzlációs módosulás, mely során citoplazmatikus, nukleáris valamint mitokondriális fehérjék szerin (Ser) és treonin (Thr) oldalláncainak hidroxilcsoportjához egy cukormolekula, az O- β -N-acetilglükózamin (O-GlcNAc) kapcsolódik. A napjainkban egyre javuló technikai feltételeknek köszönhetően több mint 3000 O-glikozilált fehérje került leírásra, melyek a génexpresszióban, translációban, szignál transzdukcióban, sejtciklus szabályozásában és a celluláris stresszválaszban játszanak szerepet.

Ismert, hogy az O-glikoziláció képes a fehérjék szabályozásában oly módon is részt venni, hogy közvetlen illetve közvetett módon befolyásol más poszt-transzlációs módosulásokat. Ennek fényében az O-glikoziláció kölcsönhatását vizsgálták már acetilációval, metilációval, ubikvitinációval, nitrozilációval kapcsolatban is, de leggyakrabban és legrészletesebben vizsgált kapcsolata a foszforilációval való kompetíció, mely létrejöhet azonos Ser és Thr helyekért, de egymáshoz közeli módosítási helyeket is befolyásolhatnak. Ez a fajta kölcsönhatás az O-glikoziláció és foszforiláció között számos fehérje funkció szabályozás terén megfigyelhető (például ismert proto-onkogének, neurofilamentumok,

citoszkeletális fehérjék esetén), és fontos szerepet is játszhat olyan krónikus betegségek etiológiájában, mint a diabétesz, neurodegeneratív betegségek és a tumorképződés. A közelmúltban neuronális szövetekben lévő számos fehérje jelentős mértékű O-glikoziláltságát írták le. Ismert, hogy a tau fehérje foszforilációja és O-glikozilációja közötti megbomlott egyensúlyi állapot következtében hiperfoszforilált tau fehérjék keletkeznek, melyek aggregálódva az Alzheimer-kór patofiziológiájának fő elemeit, a neurofibrilláris kötegeket képezik. Számos kutatócsoport vizsgálta az O-glikoziláció és tau foszforiláció közötti kapcsolatot, megállapítva, hogy O- β -N-acetilglükózaminidáz (OGA) akut vagy hosszú távú gátlása révén erőteljes tau O-glikozilációs emelkedés következik be valamint O-glikoziláció helyspecifikus módon szabályozza a tau foszforilációt.

Az O-glikozilációnak celluláris stresszválaszban betöltött jelentőségét számos irodalmi adat alátámasztja. O-glikoziláció emelkedést figyeltek meg hőstressz, oxidatív stressz, DNS károsodási stressz (doxorubicin, UV sugárzás), hipoxia, ER stressz (tunikamicin) iszkémia/reperfúzió sérülés vagy traumás vérzés okozta celluláris stresszválaszban. Azon jelátviteli mechanizmusok, amelyek O-glikoziláció emelkedést eredményeznek, növelik a stresszel szembeni toleranciát és ezáltal javítják a sejtek túlélését. Főként patkány szívizomsejteken végzett kísérletekben kimutatták, hogy az O-glikozilációnak egyfajta közvetítő szerepe is van az iszkémiás prekondicionálási folyamatokban kardioprotektív hatása révén. Fizikai aktivitás általi prekondicionálás és O-glikoziláció kapcsolatát csak korlátozott számú állatmodellben tanulmányozták ellentmondásos eredményekkel. Míg Peternelj és mtsai emelkedett O-glikozilációs szinteket mutattak ki a patkány vázizomban akut edzést követően (Peternelj et al. 2014), addig ezzel szemben Medford és kutatócsoportja egerek szívizomszövetét vizsgálva 15 perces futópados edzés után az O-glikoziláció szintjének csökkenését találták, míg félórás edzés után nem tapasztaltak szignifikáns változást (Medford et al. 2013). Az eddigi eredményekből kitűnik, hogy a pontos mechanizmus, mely magyarázná a prekondicionálás és emelkedett O-glikoziláció közötti kapcsolatot további kísérletek végzését teszi szükségessé.

A glikozilációnak a kórokozók felismerésében, gyulladási folyamatokban, veleszületett és szerzett immunválaszokban és a daganatos megbetegedésekben való relevanciájáról számos irodalmi adat tesz említést. Az O-glikozilációnak immunrendszerben betöltött szerepét főként limfocita sejtekben vizsgálták. Kearsé és Hart kimutatták az O-glikoziláció szabályozó szerepét a T-limfocita aktiválás korai stádiumában (Kearsé és Hart 1991). Több, az aktivált T-sejtek magjában elhelyezkedő illetve a B-sejtek újra-programozásában részt

vevő transzkripció faktorról is igazolódott, hogy tartalmaz O-glikozilációs módosulási helyeket.

A fizikai aktivitás immunrendszerre gyakorolt hatása széles körben tanulmányozott terület. Mérsékelt intenzitású testmozgásról bebizonyosodott, hogy fokozza az immunrendszer működését, míg a hosszabb ideig végzett megerőltető testmozgás az immunrendszer működésének átmeneti depressziójához vezethet. A fizikai aktivitással szembeni sejtválasz a természetes ölüsejt (NK-sejt) aktivitás, a neutrofil funkció és a limfocita válasz révén figyelhető meg.

Bár jól látszik, hogy számos tanulmány foglalkozik az immunrendszer és O-glikoziláció valamint az immunrendszer és fizikai aktivitás kapcsolatával, arra vonatkozó adatokat ezidáig nem találtunk, ahol az immunrendszer, az O-glikoziláció és a fizikai aktivitás kapcsolatát egységesen tárgyalnák.

CÉLKITŰZÉSEK

A munka célja volt az O-glikoziláció akut stresszben betöltött szerepének tanulmányozása kétféle modellben.

1. Első lépésben humán neuroblasztóma sejtvonalon akut stresszként hidrogén-peroxidos kezelést alkalmazva a következőket vizsgáltuk:

- *Rövid ideig oxidatív stressznek kitett humán neuroblasztóma sejtekben az O-glikoziláció dinamikájának követése különböző regenerációs periódusokban.*
- *O-glikoziláció és tau foszforiláció közötti kölcsönhatás vizsgálata akut stresszt követően.*
- *O-glikoziláció folyamatában szerepet játszó főbb enzimek mRNS expressziós szintjének meghatározása.*

2. Második lépésben rövid ideig tartó fizikai aktivitás és O-glikoziláció hatását vizsgáltuk humán vérmintákon. Ennek céljából a következő lépéseket végeztük:

- *Testedzés során szignifikáns eltérést mutató biokémiai anyagok detektálása.*
- *Humán vérmintából izolált fehérvérsejtek O-glikozilációs státuszának változása akut testedzést követően.*
- *Fehérvérsejt alpopulációk O-glikozilációs módosulásának detektálása.*

ANYAG ÉS MÓDSZER

1. Sejtkultúrák, kezelési módok

Kísérleteinkhez kitapadó SH-SY5Y (ATCC CRL-2266 humán neuroblasztóma) és szuszpenzióban lévő Jurkat (ATCC TIB-152 humán T-sejt leukémia sejtek) sejtvonalakat használtunk (forrás PTE Immunológiai és Biotechnológia Intézet).

Akut oxidatív stresszállapot szimulálására 0,5 mM H₂O₂-dal 30 percig való kezelést alkalmaztunk, az azutáni regeneráció vizsgálata céljából az oxidatív kezelésen átesett SH-SY5Y sejteket komplett médiumba helyeztük vissza és különböző időpontokig inkubáltuk: 0, 30, 60 percig, 2, 4, 24, 48 és 72 óráig. Kontroll mintában lévő sejtek nem kaptak kezelést.

EMEM és Ham's F12 médiumban tenyésztett Jurkat sejteket az alábbi kezeléseknél vetettük alá: 1 órán át: *a*) edzés előtti és edzés utáni humán szérummal, *b*) 5, 10, 20 mM tejsavval (PTE Gyógyszertár), valamint *c*) 1 µM, és 100 µM epinefrinnel. Citokinek közül az IL-6 3, 5, 50, 100, 1000 pg/ml koncentrációjú inkubációját végeztük 1 és 6 órán át. Az inkubációs idők lejártá után a sejteket PBS oldatos mosást követően pelletként -76°C-on tároltuk.

2. Kísérleti edzés, humán vérminták feldolgoása

A kísérletben olyan egészséges férfi önkéntesek vettek részt, akik a 2 mérföldes távot az Egyesült Államok Hadseregének Fizikai Alkalmassági Teszt leírásának megfelelően teljesítették. A kísérletet két részre osztottuk: 1. *nyugalmi periódus* és 2. *testedzés*. A két rész között 3 hét telt el. Mindkét esetben az önkéntesek 12 órás éhgyomri vérvételen vettek részt, illetve tilos volt bármilyen megerőltető testmozgás 48 órával a vérvétel előtt. A *nyugalmi periódus*ban a standard reggeli (600kcal, 80% szénhidrát) elfogyasztása után 3 órával az önkéntesek fizikai aktivitás nélkül egy második vérvételen vettek részt. A *testedzési rész*ben az önkénteseknek a reggeli elfogyasztása után 3 órával 2 mérföldes futó gyakorlatot kellett teljesíteniük minél rövidebb idő alatt, megállás nélkül, melyet egy újabb vérvétel követett.

Az önkéntesek vérmintáit géltartalmú natív, kálium- etiléndiamin-tetraecetsavval (K-EDTA) valamint nátrium-fluoriddal (NaF) ellátott vákuum-csövekbe gyűjtöttük. K-EDTA alvadásgátló csövekből végeztük a vérkép meghatározást Cell-Dyn 3700 hematológiai automatán (Abbott Diagnostics), valamint a fehérvérsejtek izolálását. Glükóz és laktát meghatározására NaF-t tartalmazó csöveket használtunk. Géltartalmú natív csövekből történt az ionháztartás, vese és májfunkciós paraméterek, anyagcsere és szövetkárosodási folyamatok meghatározása. A levett vérmintákat 10 percig szobahőmérsékleten 1500 rcf-n centrifugáltuk. A vizsgált paramétereket Cobas 8000 Modular készüléken mértük (Roche Diagnostics).

Mononukleáris sejtek izolálására megközelítőleg 2,5 ml K-EDTA-val antikoagulált teljes vért használtunk, amelyet gyűjtés után rögtön Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) oldatra rétegeztünk. Izopiknikus grádiens centrifugálás (20 percig, szobahőmérsékleten, 500 rcf-n) után a mononukleáris sejteket a plazma és Histopaque-1077 határfelületről gyűjtöttük össze és jéghideg PBS oldatos mosást követően pelletként a felhasználásig -76°C-on tároltuk.

3. Western blot

Western blot vizsgálatainkhoz előkezelt SH-SY5Y és Jurkat sejteket, valamint izolált humán mononukleáris sejteket felolvasztás után jégen tartott módosított RIPA pufferben tártuk fel. A mintákat 30 perces inkubálást követően 10 percig, 4°C-on 3000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk. A felülúszó protein koncentrációjának meghatározását a Bio-RAD DC Protein Assay Kit-jével végeztük, majd a lizátumokat Laemmli-pufferrel kiegészítve 5 percig forraltuk.

Elektroforetikus elválasztásra 8% SDS-PAGE gélt használtunk, majd a mintákat PVDF membránra (Millipore) blottoltuk. A minták egyenlő mennyiségű protein tartalmát SYPRO Ruby Protein Blot Stain Kit-jével (Bio-Rad) ellenőriztük. A membránokat O-glikozilált fehérjékre specifikus CTD110.6 és RL2 antitesttel jelöltük. A tau fehérjék kimutatására foszfospecifikus [Ps¹⁹⁹] és [Ps²⁶²], valamint PHF1 antitesteket használtunk a gyártók által javasolt protokoll szerint. A mononukleáris sejtek illetve Jurkat sejtek esetében belső kontrollnak anti-aktin IgG antitestet használtunk. Végül a membránokat a megfelelő, tormagyökér peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Femto kemilumineszcens szubsztráttal végeztük az előhívást, a jeleket Kodak Image Station 2000R-rel detektáltuk. A sávok intenzitásának elemzését Kodak 1D és ImageJ elemző szoftverrel végeztük.

4. Sejtviabilitás

SH-SY5Y sejteket a kezelési és a regenerációs időpontok lejárta után 0,25%-os tripszinnel a tenyésztő flaskákról enzimatikusan eltávolítottuk. Kétszeri jéghideg PBS-sel mosott, körülbelül 10⁶ sejtet tartalmazó mintákat propidium-jodiddal és Annexin V-FITC-vel festettük a gyártó utasításai szerint (BD Pharmingen). Az így kapott fluoreszcens jeleket Cytomic FC 500 áramlási citométerrel (Beckman Coulter) detektáltuk. Az elpusztult (propidium-jodidra pozitív és Annexin V-FITC negatív vagy pozitív sejtek) illetve az élő sejtek (propidium-jodid és Annexin V-FITC negatív) kapuzásának beállítása kontroll mintákon történt, majd ezeket a határokat alkalmaztuk minden egyes mintánál.

5. Immunfluoreszcencia

SH-SY5Y sejteket fedőlemezeken tenyésztettünk. Oxidatív kezelést követően a sejtet tartalmazó fedőlemezeket kétszer mostuk jéghideg PBS oldatban, majd 10%-os formaldehid tartalmú PBS-ben fixáltuk 30 percig szobahőmérsékleten. Formaldehid okozta autofluoreszcencia elkerülésére a sejteket 50 mM ammónium-kloriddal kezeltük 10 percig, majd a sejteket 0,1% Triton-X 100 oldattal permeabilizáltuk. 5%-os marha szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS oldattal történő blokkolás után az elsődleges ellenanyaggal való jelölés CTD110.6 (1:200) 2 órán át, szobahőmérsékleten történt. Háromszori PBS-sel történő öblítés után a mintákat Alexa Fluor 594 kecske anti-egér IgM másodlagos antitesttel jelöltük 30 percig sötétben. A magvak láthatóvá tételére Hoechst festést alkalmaztunk. A fedőlemezeket Vectashield fedőoldattal zártuk. A képeket Zeiss Axiovert 35 inverz fluoreszcens mikroszkóppal készítettük, a képelemzést CellID szoftverrel végeztük.

6. Valós idejű polimeráz láncreakció

Hidrogén-peroxiddal kezelt SH-SY5Y neuroblasztóma sejtekből totál RNS-t izoláltunk RNeasy Mini Kit segítségével a gyártó utasításait követve. Előretervezett Taq-Man próbát alkalmaztunk a humán O- β -N-acetilglükózamin transzferáz (OGT) és L-glutamin-D-fruktóz 6-foszfát amidotranszferáz (GFAT) mRNS expressziós szintjeinek meghatározására. Referencia génként humán porfobilinogén deamináz (PBGD) használtunk. A méréseket LightCycler II Thermal Cycler (Roche Applied Science) készülékkel végeztük. A relatív génexpresszió meghatározásához a 2DDCt (Livak) módszert használtuk. Minden esetben a vizsgált gén expressziós szintjét összehasonlítottuk a referencia gén expressziós szintjével.

7. Áramlási citometria

K-EDTA-val antikoagulált teljes vért, fehérvérsejtek kinyerése végett, egyidőben Lyse/Fix pufferrel (BD Biosciences) lizáltuk és fixáltuk a gyártó utasításai szerint. A fixált fehérvérsejteket PBS oldatos mosás után 0,5% Triton-X 100/PBS oldattal permeabilizáltuk. Az 5% BSA/PBS oldatos blokkolás után a sejteket RL2 elsődleges antitesttel inkubáltuk 37°C-on 30 percig, majd PBS-es mosást követően fluoreszceinnel konjugált kecske anti-egér IgG másodlagos antitesttel jelöltük, majd a mosási lépések után mérés előtt a sejteket PBS oldatba újra szuszpendáltuk. A sejtek előre- (FSc) és oldalirányú (SSc) fényszóródását valamint a fluoreszcens intenzitását Cytomics FC 500 áramlási citométerrel mértük. A

különböző fehérvérsejt alpopuláció régiók és az adatok mennyiségi meghatározása FlowJo szoftver alkalmazásával történt.

8. Statisztikai elemzés

Az ábrázolt értékeket átlag +/- standard szórással (SD) illetve az átlag +/- standard hiba (SEM) formájában tüntettük fel. A statisztikai elemzést Student-féle T-próbával, az összehasonlításokat egyutas ANOVA-t követő Bonferroni poszt-hoc teszttel végeztük. Minden esetben $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Akut stressz hatása az O-glikozilációra neuroblasztóma sejtvonalon

Eredmények

1. Oxidatív kezelés hatása az SH-SY5Y sejtek viabilitására

Akut oxidatív stressz és azt követő regeneráció szimulálására a 30 percig 0,5 mM H₂O₂ kezelésnek kitett neuroblasztóma sejteket a szer alapos kimosása után komplett médiumba helyeztük vissza regeneráció céljából. Az oxidatív stressz okozta károsodás főként a kezelés utáni 24 óra elteltével volt kifejezett (az elpusztult sejtek aránya a kontroll mintában lévő elpusztult sejtekhez képest 6,3%-ról 22,6%-ra emelkedett). Ez az arány 48 illetve 72 óra elteltével nem emelkedett tovább szignifikánsan.

2. O-glikoziláció dinamikájának változása immunfluoreszcenciával akut oxidatív stresszben

Az O-glikoziláció dinamikájának vizsgálata céljából a fedőlemezen tenyésztett kontroll valamint 0,5 mM H₂O₂-vel 30 percig kezelt SH-SY5Y sejteket a különböző regenerációs periódusok után formalinban rögzítettük, majd CTD110.6 (anti-O-glikozilációs monoklonális) antitesttel jelöltük. A másodlagos immunfluoreszcens jelölés után a neuroblasztóma sejtek citoplazmája diffúzan, bőséges szemcsés O-glikozilációs pozitivitást mutatott. Bár oxidatív stressz hatására minden sejtben emelkedett az O-glikoziláció szintje, szignifikáns változásokat a 0 perces és 2 órás regenerációs időpont közt találtunk.

3. O-glikoziláció és foszforiláció kapcsolatának vizsgálata SH-SY5Y neuroblasztóma sejteken

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy az immunfluoreszcenciával bemutatott dinamikus O-glikozilációs változás Western blottal is igazolható-e. A fehérjéket CTD110.6

anti-O-glikozilációs antitesttel jelölve szignifikánsan emelkedett O-glikoziláció intenzitást találtunk 2-4 órával az oxidatív stresszt követően, mely 24-48 óra elteltével közel normál szintre tért vissza.

Az O-glikoziláció és foszforiláció kapcsolatának vizsgálata céljából az eltérő regenerációs periódusokban gyűjtött előzetesen hidrogén-peroxiddal kezelt neuroblasztóma sejtekből nyert fehérjéket foszfospecifikus [Ps¹⁹⁹] és [Ps²⁶²], valamint PHF1 antitestekkel jelöltük. A foszfospecifikus [Ps¹⁹⁹] és PHF1 tau fehérje szintek jelentősen csökkentek az oxidatív stressz után, az O-glikozilációval ellentétes dinamikát mutatva. Másrészt a foszfospecifikus [Ps²⁶²] tau fehérjék szintje az O-glikozilációval párhuzamos dinamikát követett.

4. GFAT és OGT mRNS expressziójának változása oxidatív stressz hatására

Kísérleteinkben az O-glikozilációt katalizáló OGT valamint a HBP fő szabályozó enzimének a GFAT-nek az mRNS expressziós szintjeit is megvizsgáltuk H₂O₂-vel kiváltott oxidatív stressz után. Oxidatív stressz hatására a GFAT és OGT mRNS expressziós szintje a normál expresszió kb. háromszorosára emelkedett, a 4 órás regenerációs időpontnál tetőzve, majd az expressziós szintek fokozatos csökkenést mutattak, a regeneráció 3 napjában megközelítve a kiindulási szinteket.

Megbeszélés

A dolgozat első felében az O-glikoziláció dinamikáját és foszforilációval való kapcsolatát vizsgáltuk akut stressz hatására. Az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalon a 30 percig tartó 0,5 mM H₂O₂ kezelésnek, mint akut oxidatív stressznek, illetve a regenerációnak az O-glikoziláció dinamikájában való hatását vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a fehérjék O-glikozilációs módosulása illetve az O-glikoziláció folyamatában résztvevő kulcsfontosságú enzimek, OGT és GFAT mRNS expressziós szintje hasonló időbeli változást mutat. Kísérleteink során szignifikánsan emelkedett O-glikozilációs és enzim mRNS expressziós szinteket találtunk 2-4 órával a stressz utáni állapotban, melyek – körülbelül 24-72 óra elteltével – a stressz előtti normál szintre tértek vissza. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az O-glikozilációs módosulás a celluláris stresszválasz érzékeny és dinamikus markere.

Számos közlemény megemlíti az O-glikoziláció intracelluláris folyamatokban betöltött szabályozó szerepét, mint a sejtciklusban, epigenetikában, stressz adaptációban, Ca²⁺ jelátviteli mechanizmusokban vagy foszforilációban.

Az O-glikoziláció jelentősége a celluláris adaptációban egy intenzíven tanulmányozott terület. Főként állati szívizom- és vázizomsejtekben vizsgálták az O-glikoziláció módosulását hipoxiával illetve oxidatív stresszel szemben, melynek eredményeként globális O-glikoziláció emelkedés következik be általában röviddel a stressz után. Szívizomszövetben a megemelkedett O-glikozilációnak egyfajta védő szerepet is tulajdonítanak, mivel ezáltal javult a szívizom kontraktilitása és csökkent az infarktus mértéke is. Az O-glikoziláció védő szerepét számos elmélet magyarázza, mint például hősokkfehérjék aktivációja vagy a Ca^{2+} jelátvitel módosulása, de az O-glikoziláció sokrétű túlélési mechanizmusa továbbra is tisztázásra vár.

Kísérleteink során tapasztalt akut stressz hatására bekövetkező O-glikozilációs módosulás a szívizomsejtekben leírtakhoz hasonlóan változott a neuroblasztóma sejtekben is. Eredményeink bizonyítják, hogy az O-glikoziláció oxidatív stressz hatására bekövetkező emelkedése az idegsejtekben is egy aktívan szabályozott folyamat, de ugyanakkor felmerül az O-glikoziláció védő szerepe is. Jól ismert, hogy az O-glikozilációs módosulás preventív szerepe nem csak iszkémia-reperfúzióban jelentős, hanem az Alzheimer kórban is. Ugyanis Alzheimer betegségben az O-glikoziláció és foszforiláció közti egyensúlyi állapot megbomlása a foszforiláció javára hiperfoszforilált tau fehérjék képződéséhez vezet, melyek aggregálódva neurofibrilláris kötegeket alkotnak. Bizonyított ugyanakkor, hogy az emelkedett O-glikozilációs szintek képesek megakadályozni a tau fehérjék hiperfoszforilációját. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a 30 perces 0,5 mM H_2O_2 -al kiváltott oxidatív stressz hatására a foszforilált tau fehérjék egy része az O-glikozilációval ellentétesen viselkedve csökkenést mutatott, míg bizonyos tau fehérjék esetében a foszforilációs mintázat megegyezett az O-glikoziláció mintázatával. Magyarozatként szolgálhat, hogy az O-glikozilációnak és foszforilációnak nem csak ugyanazon Ser/Thr helyekért való versengése ismert, hanem egymáshoz közeli módosítási helyeket is képesek befolyásolni ("proximal site effect").

Bizonyított, hogy az O-glikoziláció és a sejt szénhidrát anyagcseréje szorosan összefügg, azonban a cukorbetegség és az Alzheimer kór közötti molekuláris mechanizmusok illetve az O-glikoziláció szerepe ezekben a folyamatokban továbbra is kérdéses. Ismert, hogy az Alzheimer kór kialakulásában a cukorbetegség illetve az inzulinrezisztencia is rizikófaktorként szerepet játszhat, növelve a ROS képződését. Az O-glikoziláció szerepének tisztázása ezekben a folyamatokban, további kutatások tárgyát képezi.

Dolgozatomnak ebben a részében sikerült bizonyítani, hogy 30 percig tartó 0,5 mM H_2O_2 -os kezelés indukálta oxidatív stressz egy gyors és ideiglenes O-glikozilációs emelkedést

okoz SH-SY5Y neuroblasztóma sejtekben. Kimutattuk, hogy a fehérjék O-glikozilációs módosulásának dinamikus változásával ellentétes módon viselkedik a foszforilált tau fehérjék egy része az oxidatív stressz hatására. Összegezve, kísérleteink során arra a következtetésre jutottunk, hogy az O-glikoziláció és a tau foszforiláció párhuzamos tanulmányozása oxidatív stressznek kitett idegsejteken hozzájárulhat az Alzheimer kór patofiziológiájának pontosabb megértéséhez.

O-glikoziláció módosulása humán fehérvérsejtekben akut testedzést követően

Eredmények

1. Testedzés hatása a humán vérmintákból mért klinikai paraméterekre

Önkéntesektől vett vérmintákból számos biokémiai paramétert analizáltunk. A reggeli, éhgyomri vérvételi mintákból mért összes paramétert normál tartományon belül találtuk. A nyugalmi periódus, és a testedzés előtti mintákból mért paraméterek egyikében sem volt szignifikáns különbség. Akut testedzést követően a két vérvételből mért értékek között számos szignifikánsan emelkedett paramétert találtunk: emelkedett a foszfát, laktát, kreatinin, laktát-dehidrogenáz (LDH), albumin szint illetve fehérvérsejtszám, limfocita és trombocitaszám. A napi ingadozások és a posztprandiális hatások kizárása érdekében a napközbeni változásokat összehasonlítottuk a nyugalmi periódusban és a testedzési részben tapasztalt napközbeni változásokkal.

2. Izolált mononukleáris sejtek O-glikozilációs mintázata testedzés után

Az önkénteseinek K-EDTA-val antikoagulált vérmintáiból Histopaque-1077 oldattal mononukleáris sejteket izoláltunk. Western blot módszerrel a mintákból az O-glikozilált fehérjék mennyiségét és mintázatát vizsgáltuk CTD110.6 és RL2 anti-O-glikozilációs antitestek segítségével. A várakozásoknak megfelelően nem találtunk szignifikáns eltérést a nyugalmi periódusokban, ellenben 2 mérföldes futást követően szignifikáns O-glikoziláció növekedést találtunk az edzés előtt gyűjtött mintákhoz képest.

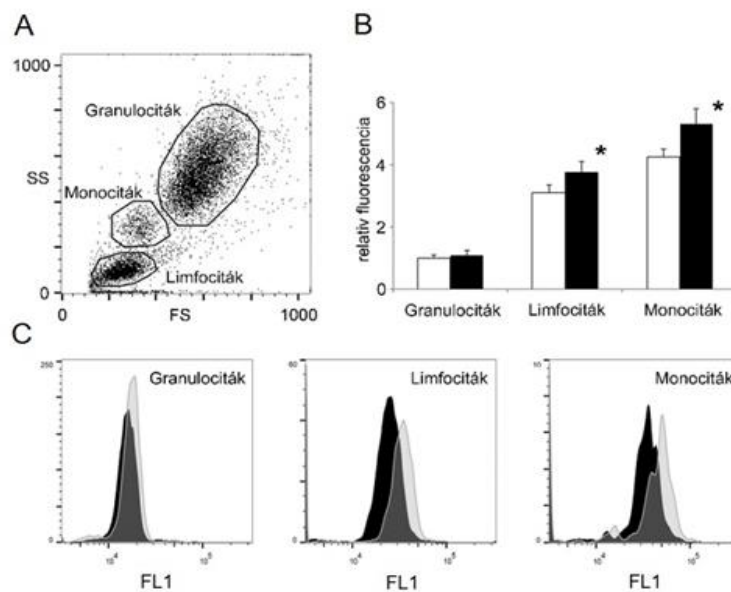
3. O-glikoziláció vizsgálata Jurkat sejtekben különböző kezeléseket követően

Jurkat sejteket önkéntesek testedzés előtti és utáni összegyűjtött humán szérumával, különböző koncentrációjú tejsavval és epinefrinnel inkubáltuk 1 órán át illetve IL-6-al 1 és 6 órán keresztül. A kezelt sejtekben feltárás után western blot módszerrel a fehérjék O-

glikoziláltságát CTD110.6 antitesttel vizsgáltuk. Bár szignifikáns eltérést egyik esetben sem találtunk, diszkrét O-glikoziláció emelkedés volt megfigyelhető a humán testedzés utáni szérumok alkalmazása esetén.

4. O-glikoziláció módosulásának vizsgálata fehérvérsejt alpopulációkban áramlási citométerrel

Fehérvérsejt alpopulációk O-glikoziláltságának megállapítása céljából önkénteseinek testedzés előtti illetve utáni izolált és fixált fehérvérsejtjeit fluoreszcens RL2 anti-O-glikozilációs antitesttel jelöltük és áramlási citométerrel vizsgáltuk. A FSc illetve SSc segítségével a sejteket méretük és szemcsézettségük alapján három különböző csoportba soroltuk, *granulocitákat*, *limfocitákat* és *monocitákat* különítve el. Így a 3 sejtpopulációban az O-glikozilációs szinteket külön-külön is tudtuk elemezni a FL1 fluoreszcens csatorna segítségével. A granulocita sejtcsoportokon hasonló O-glikozilációs szinteket mértünk testedzés előtt illetve után, míg a limfociták és monociták esetében szignifikáns jobbra tolódást detektáltunk testedzés után.



Áramlási citométerrel detektált O-glikoziláció változás a fehérvérsejt alpopulációkban testedzés után. **A.** ábra. FSc (x tengely) és SSc (y tengely) függvény alapján granulociták, limfociták és monociták besorolása. **B.** ábra. Az O-glikozilált sejtek relatív FL1 fluoreszcens szintjei, nyitott oszlop a testmozgás előtti, míg a fekete oszlop a testmozgás utáni állapotot mutatja. Az adatok az átlaga \pm SD, * $p < 0,05$ testedzés előttihez képest. **C.** ábra. A fehérvérsejtek 3 alpopulációjának O-glikozilációs festésének ábrázolása egyenként külön-külön hisztogramon. A testedzés előtti sejtek eloszlását sötét hisztogramok, a testedzés utáni eloszlást világos hisztogramok ábrázolják.

Megbeszélés

Dolgozatom második felében az O-glikoziláció és az önkéntesek vérmintáiból izolált humán leukociták kapcsolatát tanulmányoztuk egyszeri fizikai aktivitást követően. A levett vérmintákból továbbá vizsgáltuk a fizikai aktivitás hatását különböző laboratóriumi markerek esetében is. A nyugalmi periódusban, valamint testedzés előtt és után gyűjtött vérmintákból mért egyes markerek esetében emelkedést találtunk a testedzést követően.

Izolált fehérvérsejtekben az O-glikozilációs változásokat detektáltuk testmozgás előtt és után összehasonlítva a nyugalmi periódussal. Vizsgálatainkban igazoltuk, hogy a fizikai aktivitás az önkéntesek fehérvérsejtjeiben mérhető változást indukált, mely főként a limfocitákat, kis mértékben a monocitákat érintette. Neutrofil granulociták esetében nem találtunk változást.

Mint tudjuk, az O-glikozilációnak védő szerepe több különböző típusú stresszorról szemben is ismert, illetve a prekondicionálási folyamatokban is részt vesz. A legtöbb ilyen irányú kutatást főként rágszálók szívizomszöveteiben végezték, az immunrendszer sejtjeit ezidáig nem vizsgálták. Mivel a testedzés, fizikai aktivitás kihat az immunrendszer működésére is, fontos lenne tudni, hogy a háttérben milyen molekuláris mechanizmusok zajlanak. A testedzés immunmoduláló hatását befolyásolhatja a testedzés hossza, intenzitása, aerob vagy anaerob jellege és a korábbi edzettségi állapot. Bizonyított, hogy a megerőltető gyakorlatok végzése immunszuppresszióhoz vezethet, míg a mérsékelt testedzés előnyös az immunrendszer számára és csökkenti a fertőzések előfordulását. Az egyik kulcsfontosságú jelátviteli eleme az immunválasznak a NF- κ B, amely O-glikozilációs módosulási helyeket is tartalmaz, bizonyítva így a kapcsolatot O-glikoziláció és immunválasz között.

Az O-glikoziláció UDP- GlcNAc révén közvetlen kapcsolatban áll a metabolizmussal, ezért a metabolizmust érintő változások (akár stressz, akár prekondicionálás) közvetítésében logikus választásnak tűnt. További kérdésként felmerült, hogy a testmozgás során bekövetkező változások (hipoxia, emelkedett glükóz szint, acidózis, miokinek, IL-6) közül, melyek okozhatják az O-glikoziláció emelkedést.

Az O-glikozilációs emelkedés közvetlen aktivátora kísérleti beállításainkból sem derült ki. Előzetesen ugyanis külön vizsgáltuk Jurkat sejtekben az egyes komponensek (tejsav, epinefrin, IL-6) O-glikozilációra kifejtett hatását, azonban szignifikáns eltéréseket egyik esetben sem észleltünk. Így arra a következtésre jutottunk, hogy több fizikai és biokémiai tényező együttes hatása szükséges az O-glikoziláció jelentős emelkedéséhez a fehérvérsejtekben.

Összefoglalva, munkánk második felében sikerült kimutatni, hogy egyszeri testmozgás megemeli a fehérjék O-glikozilációs szintjét fehérvérsejtekben is. Azt is igazoltuk, hogy a változás nagy része a limfocitákat, monocitákat érinti. Bár a leukocitákban az O-glikoziláció komplex folyamatának megértése további vizsgálatokat igényel, eredményeink segíthetnek az O-glikoziláció stressz adaptációs mechanizmusokban betöltött szerepének tisztázásában is. Ugyanakkor úgy véljük, hogy, akár a mechanizmus ismeretétől függetlenül, az O-glikoziláció mérésének humán mintákban gyakorlati haszna lehet olyan új diagnosztikának módszerek kifejlesztésében, amely a sportorvoslásban, szív-érrendszeri vagy metabolikus szindrómás betegek diagnosztikájában segíthetne.

ÚJ EREDMÉNYEK TÉTELES ÖSSZEFOGLALÁSA

Kutatómunkám során az O-glikoziláció és akut stressz kapcsolatát vizsgáltuk sejt kultúrákban illetve izolált humán leukocitákban.

Humán neuroblasztóma sejtvonalon 30 percig ható hidrogén-peroxidos kezelést követően a következőket találtuk:

- A fehérjék O-glikozilációs szintje a kezelést követő 2-4 órában szignifikánsan emelkedett, majd a regenerációs periódus végén közel a kiindulási szintre tért vissza.
- Oxidatív stressz hatására a foszfospecifikus [Ps¹⁹⁹] és PHF-1 tau fehérjék foszforilációs szintje csökkent, az O-glikozilációval ellentétes irányú dinamikát mutatva, míg [Ps²⁶²] tau fehérjék szintje az O-glikozilációval párhuzamosan emelkedett.
- Az O-glikoziláció szabályozásában résztvevő enzimek közül a GFAT és OGT mRNS expressziós szintjét vizsgálva az O-glikozilációhoz hasonló emelkedést találtunk stressz utáni regenerációs periódus 2-4 órájában.

Rövid ideig tartó fizikai aktivitás és O-glikoziláció közötti kapcsolatot tanulmányozva humán vérmintákon az alábbi eredményekre jutottunk:

- Testedzést követően mért biokémiai paraméterek közül szignifikáns változásokat találtunk a nyugalmi periódushoz viszonyítva a glükóz, laktát, foszfát, kreatinin szintekben.

- Izolált humán fehérvérsejtekben szignifikánsan emelkedett O-glikozilációs szinteket detektáltunk a testedzést követően.
- Fehérvérsejtek 3 alpopulációjának O-glikoziláltsági állapotát vizsgálva szignifikánsan emelkedett O-glikozilációt találtunk a monocitákban és limfocitákban testedzést hatására.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

- **Kátai E**, Pál J, Poór VS, Purewal R, Miseta A, Nagy T. *Oxidative stress induces transient O-GlcNAc elevation and tau dephosphorylation in SH-SY5Y cells*. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2016 Dec; 20(12): 2269–2277. IF: 4,499
- Tamás Nagy, **Emese Kátai**, Viktória Fisi, Tamás Tibor Takács, Antal Stréda, István Wittmann, Attila Miseta. *Protein O-GlcNAc Modification Increases in White Blood Cells After a Single Bout of Physical Exercise*. Front Immunol. 2018 May 3;9:970. IF: 5,511 (2017)

Összesített impakt faktor: 10,01

Egyéb eredeti közlemények

- Fisi V, **Kátai E**, Orbán J, Dossena S, Miseta A, Nagy T. *O-Linked N-Acetylglucosamine Transiently Elevates in HeLa Cells during Mitosis*. Molecules. 2018 May 26;23(6). IF: 2,861
- Tóth A, **Kátai E**, Kálmán E, Bogner P, Schwarcz A, Dóczi T, Sík A, Pál J. *In vivo detection of hyperacute neuronal compaction and recovery by MRI following electric trauma in rats*. J Magn. Reson. Imaging. 2016 Oct;44(4):814-22. IF: 3,083
- Szélig L, Kun S, Woth G, Molnár GA, Zrínyi Z, **Kátai E**, Lantos J, Wittmann I, Bogár L, Miseta A, Csontos C. *Time courses of changes of para-, meta-, and ortho-tyrosine in septic patients: A pilot study*. Redox Rep. 2016 Jul;21(4):180-9. IF: 2,07
- Fisi V, **Kátai E**, Bogner P, Miseta A, Nagy T. *Timed, sequential administration of paclitaxel improves its cytotoxic effectiveness in a cell culture model*. Cell Cycle. 2016 May 2;15(9):1227-33. IF: 3,53
- Nagy T, Frank D, **Kátai E**, Yahiro RK, Poór VS, Montskó G, Zrínyi Z, Kovács GL, Miseta A. *Lithium induces ER stress and N-glycan modification in galactose-grown Jurkat cells*. PLoS One. 2013 Jul 22;8(7):e70410. IF: 3,534

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 25,088

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Nagy Tamásnak az elmúlt években nyújtott támogatásáért és türelméért. Hálás vagyok, hogy kutatócsoportjába befogadott, szakmailag és emberileg is biztatott, hasznos tanácsai mind a kutatói munkában, mind az oktatásban értékesnek bizonyultak.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Miseta Attilának és Prof. Dr. Kovács L. Gábornak, hogy hozzájárultak a PhD értekezéséül szolgáló munkám támogatásához. A dolgozat és az abban szereplő kísérletek anyagi támogatásáért köszönet illeti a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 számú "Peptiderg szignalizáció komplexitása és szerepe szisztémás betegségek kialakulásában" című pályázatot is.

Köszönetemet fejezem ki közvetlen munkatársaimnak, akikkel a Laboratóriumi Medicina Intézetben, illetve a Szentágotthai Kutatóközpontban együtt dolgozhattam.

Nagyon köszönöm Dr. Orbán Józsefnek a konfokális mikroszkópban nyújtott segítségét. Hálás vagyok Dr. Pál Józsefnek a baráti támogatásért, építő jellegű kritikáiért, melyeket a dolgozat megírásában nyújtott.

Szívből köszönöm Dr. Fisi Viktóriának értékes szakmai tanácsait és javaslatait. Ugyanakkor köszönöm, hogy barátként is mindig számíthattam/számíthatok rá.

Végezetül, nagyon köszönöm a családomnak a támogatást, hogy lehetővé tették tanulmányaimat. Hálás vagyok a megértésükért, biztatásukért, olykor noszogatásukért, melyek nélkül a dolgozat nem készülhetett volna el. Nagyon köszönöm páromnak a sok türelmet, szeretetet és támogató hozzáállását!