

Záró beszámoló

Korábbi jelentéseink a 2010-es évig bezárólag számoltak be kutatási projektünk előrehaladásáról. Záró beszámolónkban az utolsó év eredményeit, illetve összefoglalva a teljes kutatás eredményeit, összefüggéseit ismertetjük.

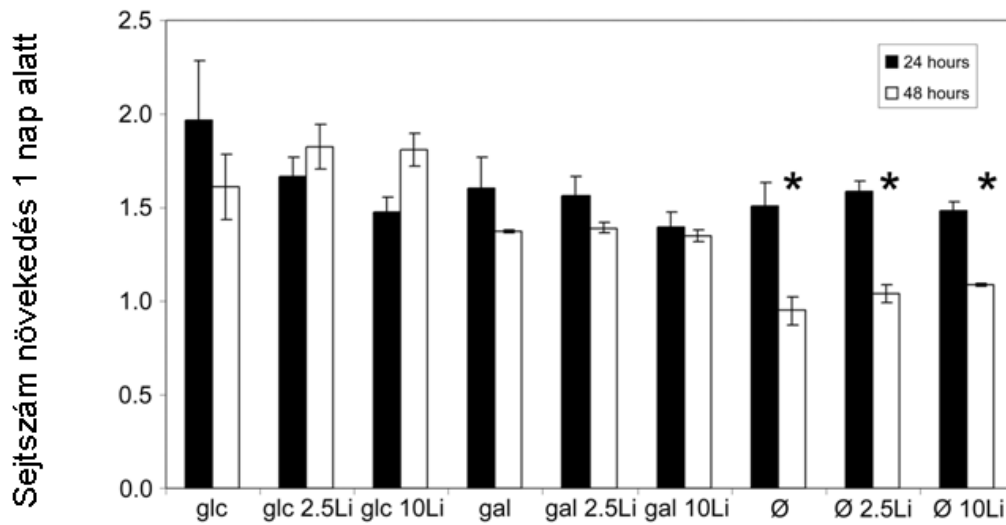
Korábbi beszámolónkban leírtuk, hogy a galaktózon és lítiumon tartott Jurkat sejtek a glükóz deprimált sejtektől eltérően viselkedtek; magasabb ATP/ADP+AMP arány, glikogén szint, nagyjából a kontroll, glükózon tartott sejteknek megfelelő sejt-ciklus arányok és sejt-osztódás. Ugyanakkor, bár dinamikájában eltérő, de mintázatában nagyon hasonló O-glikozilációs szinteket találtunk hypoglikémiás és, galaktóz/lítium kezelt sejteken. Ezen ellentmondás feloldására jó ideig nem találtunk megoldást, s ez publikációs lehetőségeinket is valamelyest behatárolta.

Két tényező lendített át bennünket a holtpontra;

Unfolding protein response (UPR) méréseink alapján, valamint a kalcium reguláció már ismert változásai alapján jó okunk volt feltételezni, hogy az endoplazmás retikulum és ezen belül a fehérjék poszt-transzlációs módosulása komoly szerepet játszhat a galaktóz metabolizmus által befolyásolt sejtelettani folyamatokban. Továbbá, egy 2011 márciusában megjelent publikációban szerepelt egy figyelemreméltó felfedezés: az eddig specifikusnak gondolt és széles körben alkalmazott, ún. CTD110.6, O-Glikoziláció ellenes antitest keresztreakciót adott bizonyos, nem O-, hanem N-típusú glikoproteinekkal is. Ez a felfedezés első pillantásra meglehetősen elbizonytalanított minket és a kutatásunk irányát is kétségessé tette, hiszen az egyébként számos helyen leírt, stressz-folyamatokban fontos szerepet játszó O-Glikoziláció részvételét, legalábbis egyelőre ki kellett zárunk. Amint az azonban az alábbiakból ki fog derülni, végül e nem tervezett fordulatra visszatekintve, ha nem is rövidtávon, de a helyes irányba terelte kutatásunkat. Legújabb eredményeink alapján sokkal jelentősebb lépést tettünk előre, mint azt előre sejtettük, és felfedezéseinknek fontos kihatása lehet számos élettani, de még inkább patológias állapot megértésében, valamint terápiás vonatkozásai is lehetnek.

A galaktóz metabolizmusában kulcsfontosságú enzim, a foszfo-glükomutáz gátlhatósága lítiummal régóta ismert. Mi magunk is leírtuk korábban ennek hatását élesztő sejtekben a kalcium-regulációra, valamint olyan kísérleti eredményeink is születtek, mely szerint galaktózon növesztett, lítiummal kezelt sejtekben UPR fokozódás következett be. Azt

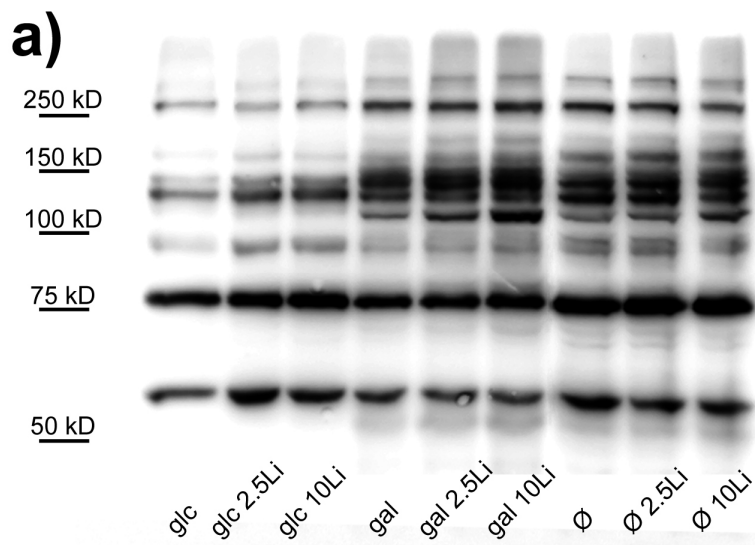
azonban eddig senki nem vizsgálta, mennyiben tudható be ezen hatás egy relatív hypoglikémiának. Ezért összehasonlításképpen kontrol (glükózzal táplált), galaktózzal táplált illetve éheztetett sejtek életképességét vizsgáltuk, lítium jelenlétében.



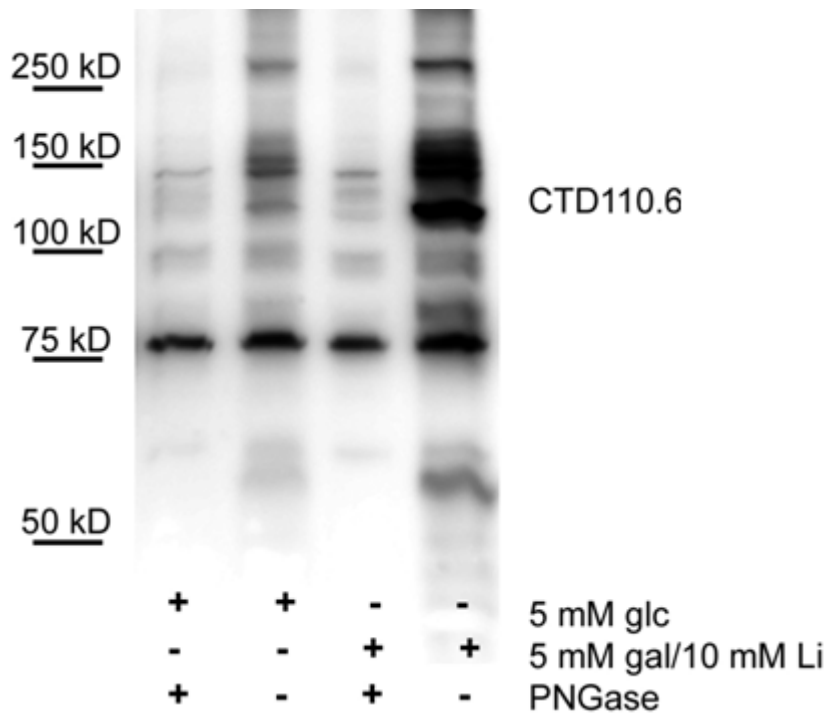
Amint a fenti ábrán is látszik, amint a sejtek kezdeti raktáiraikat felhasználták (éheztetett sejtek esetén), azonnal lemaradtak a mitózisban. Azonban galaktózon növesztett sejteknél ezt nem tapasztaltuk; valamelyest lassabban ugyan, mint a kontrol sejtek, de egyenletes növekedést, osztódást mutattak. Megvizsgálva a sejtciklus arányait, éheztetett sejtekben nem volt sejt G2 fázisban, míg galaktózon tartott sejtek normál eloszlást mutattak. Ezt alátámasztják korábbi HPLC méréseink, melyek megtartott mennyiségű, sőt lítiumos kezelés esetén emelkedett mennyiségű UDP-hexóz szinteket detektáltak galaktózon növesztett sejtekben, míg szinte nem volt detektálható éheztetett sejtekben.

Paradox módon viszont az UPR mérésekben mást tapasztaltunk. Éheztetett sejtekben, várható módon, fokozódott UPR-t mértünk, azonban galaktózon tartott, és különösen a galaktóz + lítiummal kezelt sejtekben az éheztetett sejtekét jóval meghaladó UPR-t tapasztaltunk. Szintén

hasonlóan érdekes eredményt kaptunk a celluláris stresszt jelző O-Glikoziláció analizálásakor.



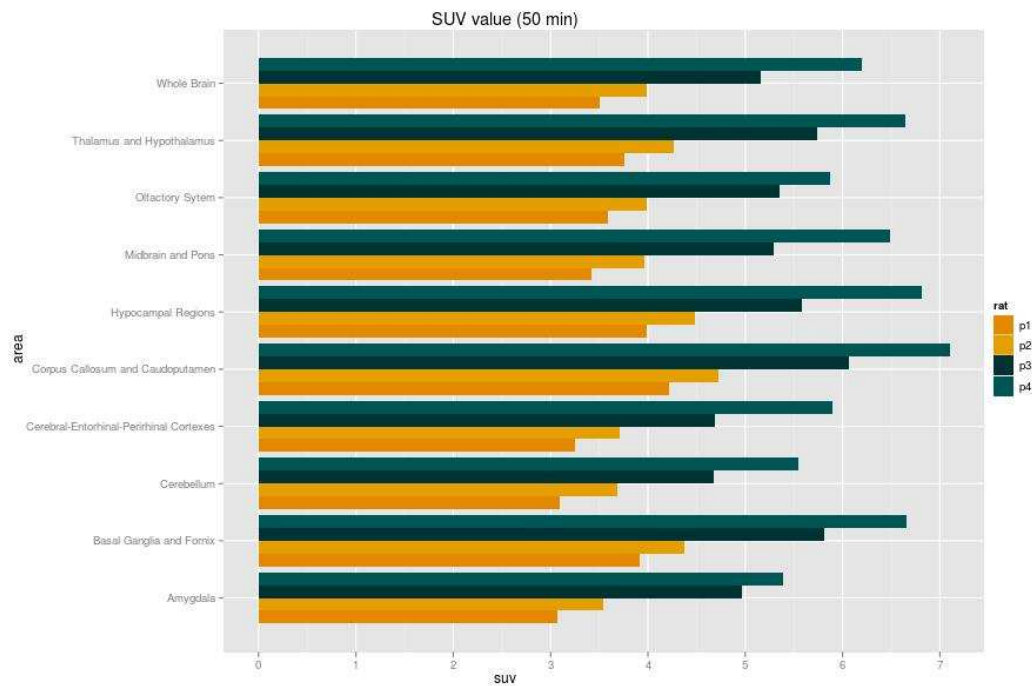
Mi okozhatja ezt a látszólagos diszkrepanciát az éheztetett sejtek és a galaktóz/lítium kezelt sejtek között? Mivel a lítium gátolja a foszfoglükomutázt, a galaktóznak más útvonalon kell eljutnia a glikolízisbe, hogy energiát szolgáltatson a sejtnek. Ennek egyik módja lehet az UDP-galaktóz-UDP-glükóz átalakulás, valamint a glikogén szintézis, melynek eredményeként glükóz szabadul fel. Szintén jelentős forrásokat szabadíthat fel a sejt a poszt-transzlációs módosulások átszervezésével. Egyrészt maga a protein folding is rendkívül energiaigényes, másrészt a felhasználásra kerülő szaccharidok is potenciális glükóz metabolitok. Isono T 2011-es cikkében (Isono T. PLoS One. 2011 Apr 19;6(4):e18959.) rávilágított arra, hogy a korábban mások által O-Glikozilációnak gondolt fehérje módosulás hypoglikémiás sejtekben valójában jórészt N-GlcNAc₂, azaz a szokásos N-glikán oldalláncot tartalmazó fehérje helyett csak 2 darab N-acetil-glükózamint tartalmazó fehérjék kerülnek ki az ER-ből. Nem tartjuk kizártnak, hogy az O-Glikoziláció az ER-stresszhez hasonlóan valóban fokozódik, azonban a mintáinkat PNGase F-vel kezelve, -mely enzim specifikusan az N-típusú oligoszaccharidokat távolítja el a fehérjéktől- a korábbi O-Glikozilációs jel töredékét kaptuk:



Véleményünk szerint ez a hypoglikémiához hasonló, de mégis túlélő állapot magyarázhatja a korábban tapasztaltakat. A kóros N-GlcNAc₂ szerkezetű oligoszaccharidok felszaporodása ER-stresszhez vezet, annak következményeivel; fokozódás UPR és kalcium tárolás. Ugyanakkor az így „megspórolt” szénhidrát metabolitok, illetve a kerülő utakon metabolizálódó galaktóz elegendő tápanyagot szolgáltat a sejtek túléléséhez.

Kísérleti modellünknek, illetve a fent vázolt mechanizmusnak több hasznosulása is lehetséges: egyrészt eszközt ad azon kutatók kezébe, akik a hypoglikémiával kapcsolatos specifikus stressz-reakciókat szeretnék tanulmányozni. Másrészt, a bipoláris betegségen túl, melynek kezelésére a lítiumot évtizedek óta alkalmazzák, további betegségek patomechanizmusának megértésében is alkalmazható, hiszen N-glikán szintézis zavarai fellépnek autoimmun-betegségben, galaktozémiában, Alzheimer-kórban, stb. is.

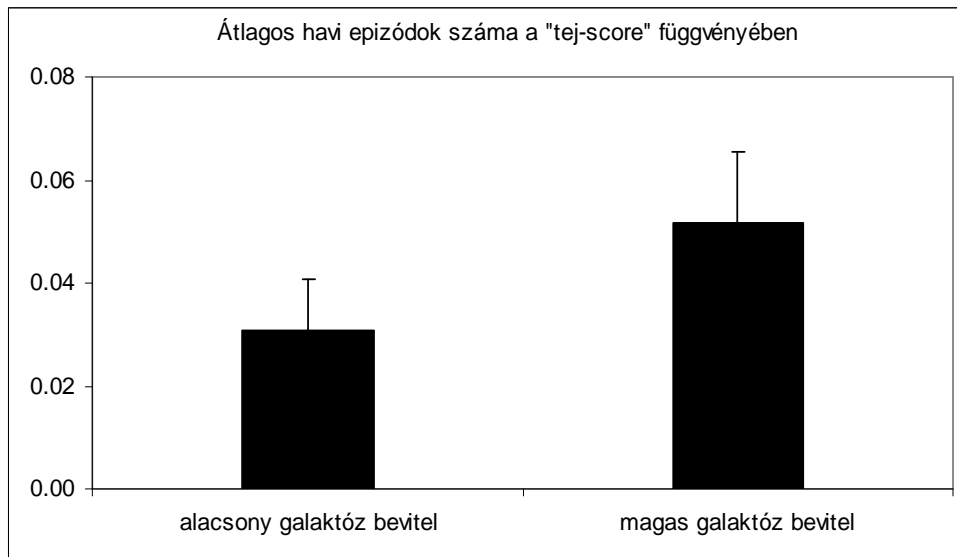
Részben, de nem egészben a jelen OTKA pályázatnak köszönhetően beindult egy ígéretes együttműködés kutatócsoportunk, a Pécsi Diagnosztikai Központ valamint a Debreceni Egyetem Nukleáris Medicina Intézet között. Ennek keretében lítiummal kezelt, valamint kontrol kísérleti patkányok agyi glükóz-felvételét (FDG) vizsgálatuk MiniPET/CT Tomográf illetve MRI készülékkel.



A kontroll állatok zölddel, a lítiummal kezelték sárga színnel jelöltek, az ábrán különböző agyi területek FDG felvétele, vagyis glükóz-felhasználása látható.

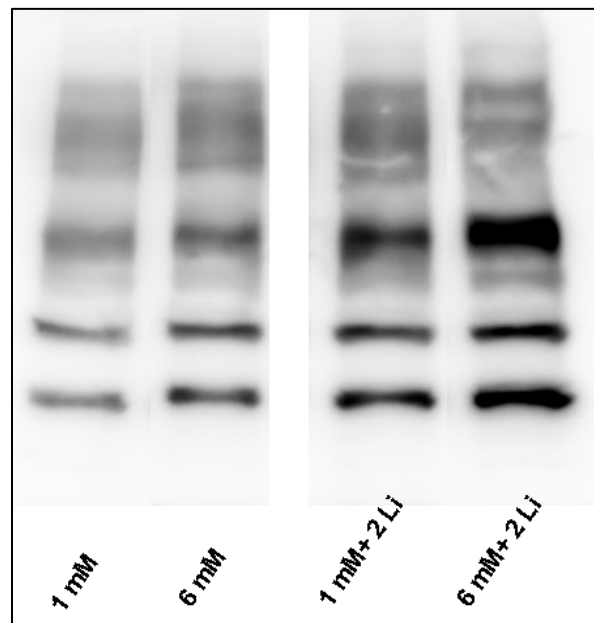
Az eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy a lítium lassítja az FDG akkumulációt. Ígéretes kísérleti eredményeink okot adnak arra, hogy a meglehetősen költséges méréseket kiterjesztett, összetettebb kísérleteinkben is megismételjük, azaz tovább növeljük az esetszámot és a csoportok számát (különböző időtartamú kezelések, galaktóz- vagy glükóz gazdag táplálás, stb.). További „mellékterméke” ezen méréseinknek a 3T-s MRI patkányagy felvételek, amiből egy közös agyatlaszt készítenek a képalkotó intézetek munkatársai.

Humán mintákon végzett méréseinket, illetve klinikai adatgyűjtésünket követően eredményeinket összegezve - habár konklúzív eredményt a relatíve csekély esetszám, valamint a dolog jellegéből adódó variabilitás (pl. beteg compliance, kérdőív szubjektív kitöltése) miatt nem volt leszűrhető - néhány, további kutatásra érdemes következtetés levonható volt. Mivel a táplálékunkban található galaktóz majdnem kizárólag csak tej és tejtermékekben található meg, tejfogyasztási szokásaik alapján rangsoroltuk a lítiumot tartósan szedő bipoláris betegeinket. Mint az alábbi ábrán látható, a tejet nem, vagy csak alig fogyasztó betegek (klinikai kezelést igénylő) epizódjai, szemben a sok tejet fogyasztó betegekkel, valamelyest ritkábban fordulnak elő. Ezen észlelet azonban mindenképpen további kutatást igényel.



Az eredeti kutatási tervben nem szerepelt, de mindenképpen megemlítenénk egy további fontos, a lítiummal és a galaktóz metabolizmussal szorosan összefüggő kutatásunk fejleményeit. Újabban felmerült annak a lehetősége, hogy hatásmechanizmusának tanulmányozása elvezethet az Alzheimer-kór jobb kezeléséhez, hatásos gyógyszerek kifejlesztéséhez is. Ismert, hogy a lítium gátolja a GSK-3-at. Mivel Alzheimerben a Tau

fehérje kóros foszforilációja vezet a kórkép kialakulásához, a lítium egyrészt gátolhatja a GSK-3-at, másrészt a foszforilációval kompetícióban lévő O-Glikozilációt serkentheti, így megvédve a Tau fehérjét a kóros foszforilációtól. Ugyan az O-Glikoziláció változásait Jurkat sejt kísérleti modellünkben elnyomja az N-glikán változás (legalábbis a jelenleg elfogadott detekciós markerrel vizsgálva), mégis, megfelelően megválasztott enyhe, de hosszan tartó kezelés sejt kultúrákon szimulálhatja az Alzheimer



betegség jelen tudásunk szerint legelfogadottabb oki hipotézisét, az életkorral fokozatosan csökkenő agyi glükóz hozzáférést. Irodalomból az is ismert, hogy az N-glikán szintézis zavarai (melyeket okozhat hypoglikémia) hozzájárulhatnak az Alzheimer kóros amiloid-béta, illetve hiperfoszforillált tau kialakulásához. Mi magunk egy neuroblasztóma sejt vonalat (SHSY5Y) felhasználva, részleges, 1 hétig fenntartott hypoglikémiát alkalmazva azt találtuk,

hogy az lítium képes visszafordítani az O-Glikoziláció csökkenését (*ábra*). Annak feltárása, hogy ez valódi O-GlcNAc vagy egyéb nem-specifikus fehérjéhez kapcsolt oligoszaccharid, jelenleg is zajlik.

UPR munkacsoportunk eredményeit az alábbiakban ismertetjük:

Alapkérdések: Az RNase L inhibitor fehérjének, amely egy citoszolikus vas-kén fehérje van-e szerepe az UPR aktiválódás folyamatában? A kérdésfelvetést az előzte meg, hogy az IRE1, amely az endoplazmatikus retikulum egyik UPR szenzor fehérjéje, kináz és RNáz doménjében nagyfokú hasonlóságot mutat az RNáz L fehérjéhez. Az UPR aktiválódás folyamata hasonló-e májsejtekben és neuronális sejtekben?

Májsejtekben

Megvizsgáltuk, hogy vas adására, vas megvonásra, illetve glutation depléció hatására változik-e az RNáz L inhibitor (Rli) expressziója.

Vas adására duplájára nőtt, míg vasmegvonásra felére, glutation depléciót követően negyedére csökkent az Rli expressziója (mRNS szint, real time PCR segítségével).

HeLa sejtekben

Itt magasabb az Rli expresszió alapszinten is.

Az UPR aktiválását előidéző ágensek hatása: DTT és thapsigargin egyaránt az XBP mRNS szintet másfélszeresére, a hasított XBP mRNS szintet kb. 10-szeresére emelte. Ezzel párhuzamosan a Bip fehérje mRNS szintje is közel 10-szeresére emelkedett. Mindez igazolja, hogy mindkét kezeléssel (más-más támadáspont) sikerült aktiválni HeLa sejtekben az UPR folyamatát.

Az Rli fehérje szintjének csökkentése előidézi-e az UPR aktiválódását.

Az Rli szintjét sikerült csökkentenünk HeLa sejtekben, antiszensz plazmid transzfektálásával és dicer technikával egyaránt (mRNS és fehérje szinten is). Mindkét esetben az XBP és a hasított XBP mRNS szintek, akárcsak a Bip szintje hasonlóan növekedett az előző, UPR aktiváló kezelésekhez képest. Ennek alapján azt mondhatjuk, hogy HeLa sejtekben az Rli szintjének csökkenése az UPR aktivációhoz hasonló folyamatot indít el.

	DTT	Tg	RAS	RAS+DTT	RAS+Tg
Rli	0,45	0,88	0,1	0,09	0,1

XBP	1,66	1,5	3,6	4	4,65
XBPS	11,79	9,92	17,87	22,86	21,48
Bip	9,68	8,96	9,1	19,9	18,57

Egy reprezentatív kísérlet. Tg: thapsigargin, RAS: Rli antiszensz. A számok az adott mRNS szintjének változását mutatják a kezeletlen sejtekhez viszonyítva.

Az UPR aktiváció kivédhető-e az Rli HeLa sejtekben történő overexpressziójával.

Az Rli overexpresszió önmagában is fokozta a hasított XBP mRNS mennyiségét. Ennél jóval nagyobb mértékben aktiválódott az UPR thapsigargin adása után. Amennyiben az Rli overexpressziót követően történt a thapsigargin adása, az UPR aktiválódás mértéke kisebb volt, mint csak a thapsigargin hatására.

	Rli-vel		
	transzfektált	Rli+thapsigargin	Thapsigargin
Rli	36,5	17,63	0,57
XBP	0,48	3,38	5,42
XBPS	27,85	36,5	59,3

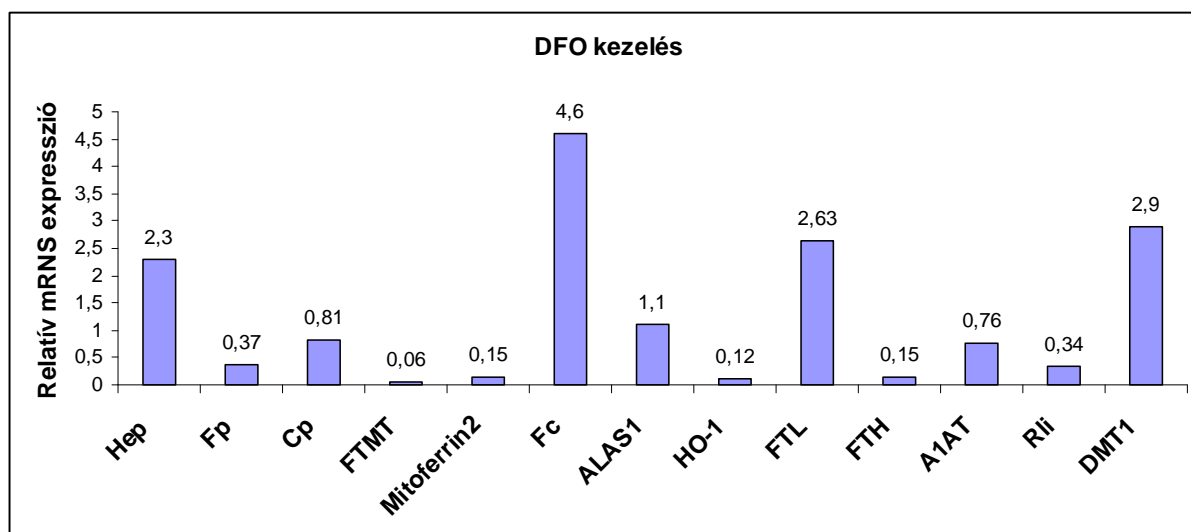
Egy reprezentatív kísérlet, a számok a kezeletlen sejtben található mRNS szintekhez viszonyított változást jelölik.

Neuroblasztóma sejtvonalakban

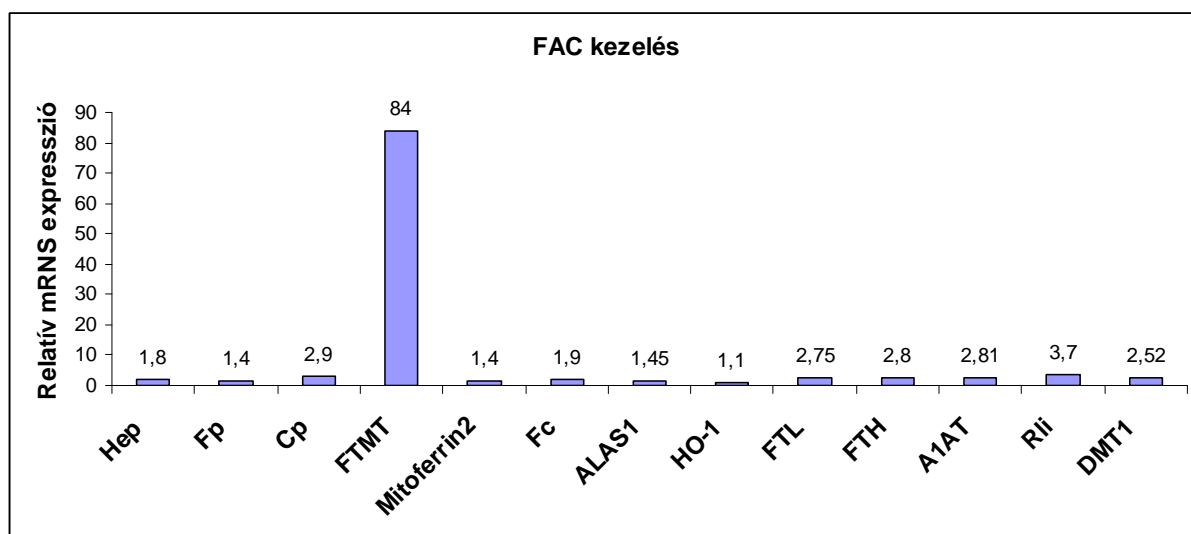
Neuroblasztóma sejtekben az Rli szintje alacsonyabb, mint a májsejtekben. Vasmegvonásra szintje csökken a kezeletlen sejthez képest, míg vas adására háromszorosára nő.

Az alábbi kísérletek a neuroblasztóma sejtekben vaskezelésre és vasmegvonásra adott expressziós választ mutatja, a vasanyagcserében szerepet játszó mRNS-ek vonatkozásában.

Az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalat vaskezelésnek és vasmegvonásnak vetettük alá. A vaskezeléshez vas-ammónium citrátot 25µg/ml, a desferrioxamin vaskeláló ágenszt 100µg/ml végkoncentrációban alkalmaztuk 4×10^5 sejten 24 órán keresztül. A sejteket a kezelést követően összegyűjtöttük, majd totál RNS-t izoláltunk belőlük. Mintánként 200ng RNS-ből cDNS-t készítettünk, majd Real time PCR segítségével vizsgáltuk az egyes gének expressziós változását (1-2. ábra).



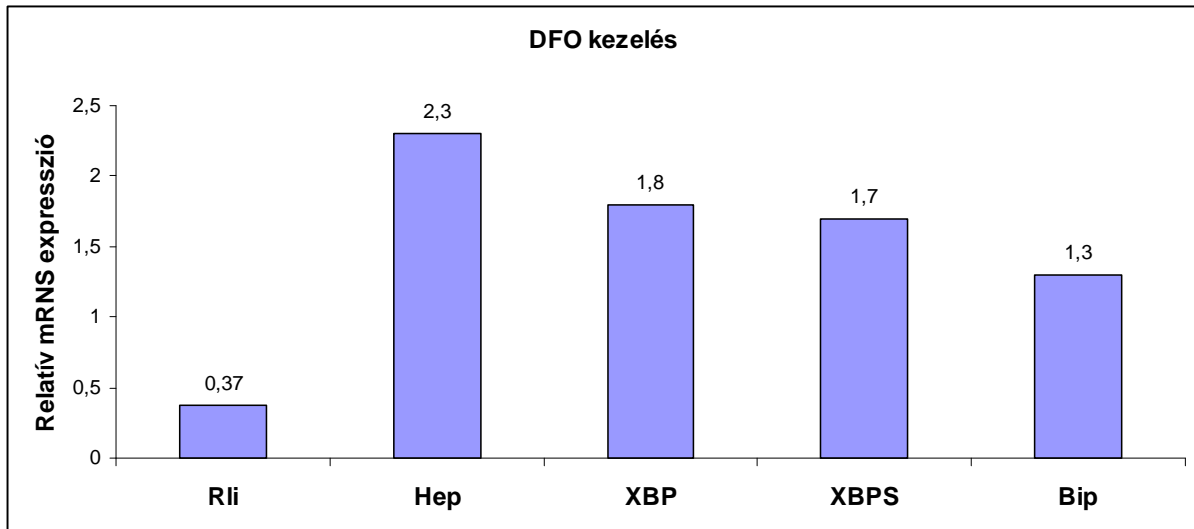
1. ábra Vasmegvonás hatására a hemszintézisben szerepet játszó ferrokelatáz (Fc) mennyisége valamint a vas felvételéért felelős divalens metál transzporter (DMT1) mRNS expressziója jelentősen növekedett. A vas leadásáért felelős ferroportin (Fp), valamint a citoszólban illetve a mitokondriumban a vas transzportért és raktározásért felelős gének expressziója csökkent.



2. ábra Vaskezelés hatására a mitokondriális vas raktározásáért felelős mitokondriális ferritin (FTMT) mennyisége jelentősen növekedett, míg a citoplazmáris vasraktározásban szerepet játszó gének (ferritin nehéz és könnyű lánc) mennyisége kisebb mértékben, de szintén megnövekedett (FTL, FTH).

Mivel a vaskeláló kezelés hatására a RNase L inhibitor (Rli) mRNS expressziója csökkent és korábban azt tapasztaltuk, hogy a sejtekben ezáltal növekszik a preprohepcidin mRNS szintje, valamint aktiválódik az unfolded protein response (UPR), megvizsgáltuk az XBP, spliced

XBP és a Bip gének expresszióját is. Ebben az esetben azt tapasztaltuk, hogy a preprohepcidin mRNS szintje emelkedett, ugyanakkor az UPR kapcsán vizsgált gének esetében csak kismértékű az emelkedés, ami arra utalhat, hogy önmagában a Rli expressziójának csökkenése nem vált ki UPR-t, ehhez más molekuláris mechanizmusok is hozzájárulnak (3. ábra).

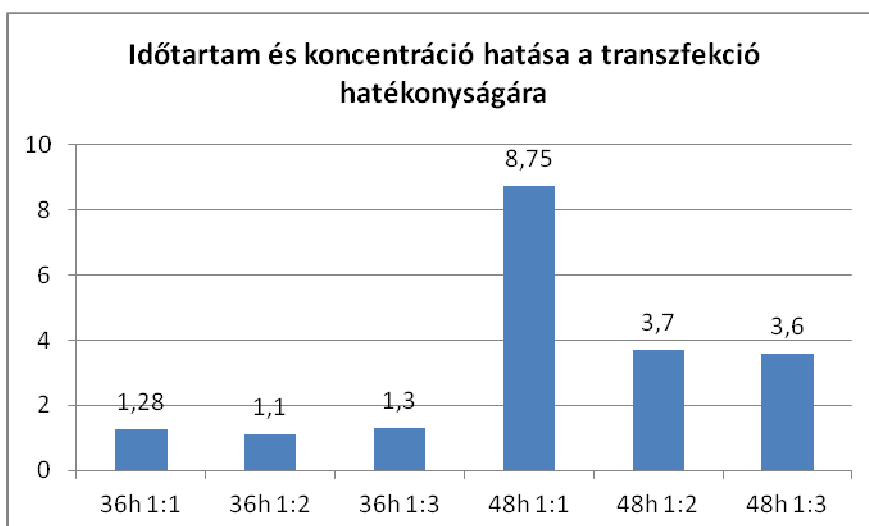


3. ábra Vasmegvonás hatására az Rli expressziója csökken, az UPR-ben szerepet játszó gének expressziója kis mértékben emelkedik.

Az Rli szintjének csökkentése neuronális sejtekben siRNA technikával jelenleg folyamatban van. A kísérletek végén láthatjuk, hogy az Rli expresszió csökkentése ezekben a sejtekben is aktiválja-e az UPR útvonalat.

Alpha synuclein expresszió neuronális sejtekben.

Optimalizáltuk a synuclein overexpresszió körülményeit. Az alábbi oszlopdiagramm foglalja össze az eredményeket:



Továbbá irányított PCR-alapú mutagenézissel előállítottuk a synuclein A53T mutánsát egy nukleotid cserével. Irodalmi adatok szerint ez a mutáns változat nagyobb valószínűséggel aggregálódik, mint a vad típus.

A mutáns synuclein overexpressziójával vizsgáljuk az UPR választ a neuronális sejtekben, valamint ennek a vasanyagcsere komponenseivel való összefüggését.

Összefoglalva, a témavezető úgy érzi, jelentős mértékben megfeleltünk a munkatervünkben leírtaknak, sikerült közelebb kerülnünk a foszfolukomutáz aktivitás és a kalcium homeosztázis közti kapcsolat megfejtéséhez. Úgyszintén jelentős felfedezéseket tettünk a fehérje szintézis/ poszt-transzlációs folyamatok terén, valamint az UPR aktivitás okának feltárásában. Külön kiemelendőnek érezzük, hogy ezen eredmények egy közös elmélettel magyarázhatóak. Ezek összefoglalása, jelenleg közlés alatt van, a PloS One folyóirathoz nyújtottuk be. Ugyancsak lényegesnek tartjuk, hogy a kísérletek újabb érdekes kérdéseket vetettek fel, melyek további vizsgálatra érdemesek. Eredményeinkről elsősorban hazai, de néhány nemzetközi tudományos konferencián is beszámoltunk. A téma anyagát részben felhasználva PhD védés is született (Dr. Nagy Judit 2012, Pandur Edina 2011), ill. újabb kettő folyamatban van. A graduális tudományos képzésben is számos sikert értünk el, a pályázat támogatásának és témájának köszönhetően. Egy első (Rupeena Purewal, 2011), egy második (Balasa Alfréd, 2008) és egy harmadik díjazott (Rikki Yahiro, 2011) TDK előadás született a helyi TDK konferencián, valamint egy jubileumi különdíjjal jutalmazott előadás is elhangzott az országos TDK konferencián (Rupeena Purewal, 2011) diákjaink által.

Befejezésül köszönjük az Országos Tudományos Alap támogatását!