

Deksametazon uygulanmış Balb/c fare timuslarında glikozilasyon değişikliklerinin lektin blotting yöntemi ile belirlenmesi

Determination of glycosylation changes in thymus of dexamethasone-treated Balb/c mice by lectin blotting method

Erdal BALCAN

Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa

Özet

Amaç:İntratimik gelişim sırasında kemik iliği kaynaklı immatür timositler doğru fenotipik ve fonksiyonel özelliklerini kazanmak için bir dizi seleksiyon ve farklılaşma sürecine girerler. İmmatür timositlerin fonksiyonel olabilmesi büyük ölçüde hücre yüzey glikoproteinlerinin glikozilasyon değişimlerine bağlıdır. Bu çalışmanın öncelikli amacı, deksametazonun timik glikan profili üzerine etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma 65 adet 8 haftalık erkek Balb/c türü fare ile gerçekleştirildi. Deksametazon uygulanmış grup ile kontrol grubu farelerden elde edilen timik proteinlerin glikan profilleri farklı glikanlara spesifite gösteren farklı bitki lektinleri (*Maackia amurensis* agglutinin, *Sambucus nigra* agglutinin, peanut agglutinin, concanavalin A ve wheat germ agglutinin) kullanılarak lektin blotting yöntemiyle karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Lektin blotting çalışmaları deksametazon uygulaması ile *Maackia amurensis* agglutinin, *Sambucus nigra* agglutinin, peanut agglutinin reaktivitelerinin genel olarak azaldığını, concanavalin A ve wheat germ agglutinin reaktivitelerinin ise artış gösterdiğini ortaya koymuştur.

Sonuç:Bu bulgular, deksametazonun timik dokularda glikozilasyon motiflerinin değişimi açısından önemli bir faktör olabileceğini ortaya koymuştur.

Pam Tıp Derg 2018;11(1):1-9

Anahtar sözcükler:Timus, glikozilasyon, lektin, deksametazon

Abstract

Purpose: During the intrathymic development, bone marrow derived immature thymocytes undergo a series of selection and differentiation processes for their proper phenotypical and functional characteristics. The functional fate of immature thymocytes depends largely on the glycosylation changes in cell surface glycoproteins. The primary goal of this study is to examine the effects of dexamethasone upon the thymic glycan profile.

Materials and Methods: The study was carried out with 8-week old 65 Balb/c mice. The glycan profiles of thymic proteins from dexamethasone-treated group and control mice were compared by lectin blotting using different specific plant lectins including *Maackia amurensis* agglutinin, *Sambucus nigra* agglutinin, peanut agglutinin, concanavalin A and wheat germ agglutinin.

Results: Lectin blotting studies revealed that the *Maackia amurensis* agglutinin, *Sambucus nigra* agglutinin and peanut agglutinin reactivities were loosely decreased upon the dexamethasone treatment. However, dexamethasone administration increased the binding affinity to concanavalin A and wheat germ agglutinin lectins.

Conclusion: These results suggest that dexamethasone is a potent factor for the alteration of glycosylation motifs in thymic tissue.

Pam Med J 2018;11(1):1-9

Key words:Thymus, glycosylation, lectin, dexamethasone

Erdal Balcan

Yazışma Adresi: Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa.

e-mail: erdal.balcan@cbu.edu.tr

Gönderilme tarihi: 22.03.2017

Kabul tarihi: 14.08.2017

Giriş

Olgunlaşmamış timositlerin yabancı uyarılara yanıt verebilme yeteneğine sahip T hücrelerine dönüşümü bir dizi farklılaşma ve seçim süreçlerine gereksinim duyar. Bu süreçlerdeki en önemli olay, timositlerin glikozilasyon içeriklerinde görülen değişikliklerdir [1, 2]. Hücre yüzey glukokonjugatlarının yapısında yer alan karbohidrat molekülleri, özellikle negatif yüklü bir uç şeker ailesi olan sialik asitler, hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matris etkileşimlerinde tanıma molekülleri olarak önemli roller içermektedir [3-5]. İntratimik gelişim sırasında hücre yüzey glikan motiflerinin sializasyon biçimleri timosit-lenfoid stroma etkileşimlerinin düzenlenmesi açısından son derece önemli olmaktadır [6]. Önceki çalışmalarda intratimik gelişim sırasında glikozilasyon yapısındaki değişiklikler, karbohidrata özgüllüğü gösteren bölgeler içeren proteinler olan ve glikobiyoloji çalışmalarında yoğun bir biçimde kullanılan lektinler aracılığı ile ortaya konmuştur [6-9].

Glukokortikoidlerin güçlü anti-inflamatuvar etkileri olduğu bilinmesine [10] karşın hücreyel farklılaşma süreçlerinin yoğun olarak yaşandığı timusta timosit glikozilasyonu üzerine etkileri konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma T hücresi gelişimi sırasında eksojen bir kortikosteroid olan deksametazonun timik mikroçevredeki glikozilasyon değişikliklerine etkisini değerlendirmek üzerine kurulmuştur.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmadaki tüm deneyler Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun onayı doğrultusunda gerçekleştirildi. Sekiz haftalık 65 erkek Balb/c türü fare 22 °C sabit sıcaklık ve 12 saat aydınlık/karanlık periyotlarında sınırsız yem ve kaynatılmış musluk suyu ile barındırıldı. Deksametazon 35 hayvana tek doz 7.5 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak verildi. Kontrol amaçlı olarak 30 hayvan aynı oranda %0.9'luk NaCl izotonik aldı. Uygulamadan 24 saat sonra fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek timüs dokuları hızlı biçimde çıkartıldı.

Protein Elektrofrez: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) için protein örneklerini hazırlamak amacıyla timik dokular RIPA tamponunda (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) parçalandı ve mekanik olarak homojenize edildi. Fenil metil sulfonil florit (PMSF) ve proteaz inhibitör kokteyl (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ile inkübe edilen örnekler iki kez +4 °C'de 20 dakika 8000xg'de santrifüjlendi. İkinci santrifüjlemenin ardından timik proteinleri içeren süpernatantlar 20 µl'lik hacimlerde toplandı ve bikinkoninikası (BCA) kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, ABD) kullanılarak protein yoğunlukları ölçüldü. Poliakrilamid jele yüklenen 30 µg'luk protein örnekleri standart prosedüre [11] uygun olarak ayrıştırıldı.

Lektin Blotting: SDS-PAGE sonrası jeller poliviniliden florit (PVDF) membranlara aktarıldı [12]. Ardından membranlar blokama tamponunda [%5 (ağırlık/hacim) *non-fat dried milk*, *tris buffered saline* (TBS)/%0.05 Tween 20 (TBS-T), pH 7.6 (%0.1 hacim/hacim)] 37 °C'de 30 dakika bloklandı. Kontrol ve deksametazon uygulanmış timik dokulardaki glikozilasyon paternlerini belirlemek amacıyla membranlar digoksisijenin işaretli (Roche Applied Sciences, Mannheim, Almanya) ve peroksidaz bağlı bitki lektinleri (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ile blotlandı (13-17) (Tablo 1). Kabaca, membranlar TBS ve *buffer 1* çözeltisi (1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, TBS, pH 7.5) ile yıkandı ve *Maackia amurensis* agglutinin (MAA, 5 µg/ml), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA, 1 µg/ml), peanut agglutinin (PNA, 10 µg/ml), concanavalin A (ConA, 10 µg/ml) ve wheat germ agglutinin (WGA, 10 µg/ml) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Ardından, digoksisijenin işaretli membranlar TBS ile yıkandı ve anti-digoksisijenin-alkalin fosfataz (Roche Applied Sciences; Mannheim, Almanya) (1 µl/ml TBS) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerek 3 kez 10'ar dakikalık aralıklarda TBS ile yıkandı. Glikan profillerinin görünürlüğü için membranlar 4-nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP, Roche Applied Sciences; Mannheim, Almanya) içeren *buffer 2* çözeltisi (0,1 M Tris-HCl, 0.05 M MgCl₂, 0.1 M NaCl, pH 9.5) ile 3-5 dakika inkübe edildi. Peroksidaz bağlı lektinler için peroksidaz aktivitesi 3,3'-diaminobenzidin (DAB; Roche Applied Sciences, Mannheim, Almanya) ile gerçekleştirildi.

Negatif ve Pozitif Kontroller: Negatif lektin blotting kontrolü için sialillenmiş ve desialillenmiş glikoproteinler (Roche Applied Sciences, Mannheim, Almanya) kullanıldı. Fetuin (25 µg/ml), asialofetuin (50 µg/ml) ve transferrin (25 µg/ml) sırasıyla digoksisijenin-ışaretli MAA, PNA ve SNA lektinleri ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Pre-inkübasyon periyodunun ardından

Tablo 1. Çalışmada kullanılan bitki lektinleri, bağlanma özgülükleri ve konsantrasyonları

Lektin	Bağlanma özgülüğü	Konsantrasyon	Kaynak
Maackia amurensis agglutinin (MAA) ¹	SAa2,3Gal	5 mg/ml	[13]
Peanut agglutinin (PNA) ¹	Galβ1,3GalNAc	10 mg/ml	[14]
Sambucus nigra agglutinin (SNA) ¹	SAa2,6Gal ya da GalNAc	1 mg/ml	[15]
Concanavalin A (ConA) ²	a-mannozil ya da a-glikozil grupları	10 mg/ml	[16]
Wheat germ agglutinin (WGA) ²	GlcNAc, SA	10 mg/ml	[17]

¹Digoksinin işaretli; ²Peroksidaz işaretli; SA: sialik asit; Gal: galaktoz; GalNAc: N-asetilgalaktozamin; GlcNAc: N-asetilglukozamin

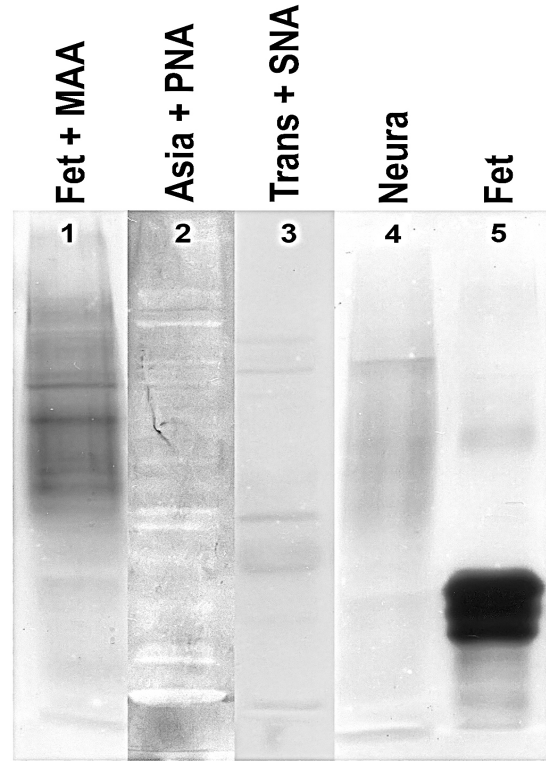
timik glikoproteinleri içeren membranlar yukarıda özetlendiği şekilde lektin-glikoprotein karışımı, anti-digoksinin-alkalin fosfat (1 µl/ml TBS) ve NBT/BCIP ile inkübe edildi. Diğer yandan sialik asidin negatif kontrolü için bazı doku ekstraktları uç sialik asidin α2,3-; α2,6- ve α2,8- bağlarını kırma yeteneğine sahip bir enzim olan Tip X *Clostridium perfringens* nöraminidaz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD; 1 U/ml) ile 38 °C'de 45 dakika inkübe edildi [18] ve lektin blotting protokolü sadece MAA için uygulandı. Pozitif kontrol için fetuin substrat olarak kullanıldı ve MAA ile problandı (Şekil 1).

Lektin Blotting Uygulamasının Kantitatif

Analizi: Lektin blotting sonrası elde edilen membranlar standart tarayıcıda taranarak 2272x1704 piksellik JPEG formatında görüntüleri alındı. Daha sonra bu görüntüler ImageJ yazılımına (versiyon 1.46c, NIH, Bethesda, MD, ABD, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) aktarıldı. Image J programı içerisinde 8 bit gri forma dönüştürülen (*image>type>8-bit*) imajlarda yer alan kontrol ve uygulama gruplarına ait her bir lektin blotting sütunu araç çubuğunda bulunan "dikdörtgen seçeneği" (*rectangular selection*) kullanılarak numaralandırıldı (*ctrl-1,2* ya da *Analyze>Gels>Select First Lane* ya da *Select Next Lane*). Ardından *ctrl-3* ya da *Analyze>Gels>plot lanes* komutu kullanılarak membranlardaki lektin boyanma yoğunlukları grafiğe döküldü. Oluşan her bir pikin başlangıç ve bitiş noktaları araç çubuğunda bulunan "çizgi seçeneği" (*straight selection*) yardımı ile birleştirildi ve "sihirbaz aracı" (*wand-tracing-tool*) ile işaretlenerek bandın reaksiyon yoğunluğu "alan" olarak hesaplandı. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz: Çalışma bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi için SPSS yazılımı kullanıldı (versiyon 21.0; SPSS Inc., Chicago, IL, ABD). Kontrol ve uygulama

gruplarına ait örnekler arasındaki lektin boyanma yoğunlukları Student's *t* testi kullanılarak karşılaştırıldı. Elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları ve standart hataları hesaplandı. *p* değerinin 0.05'ten küçük olması gruplar arasında fark anlamlı olarak değerlendirildi.



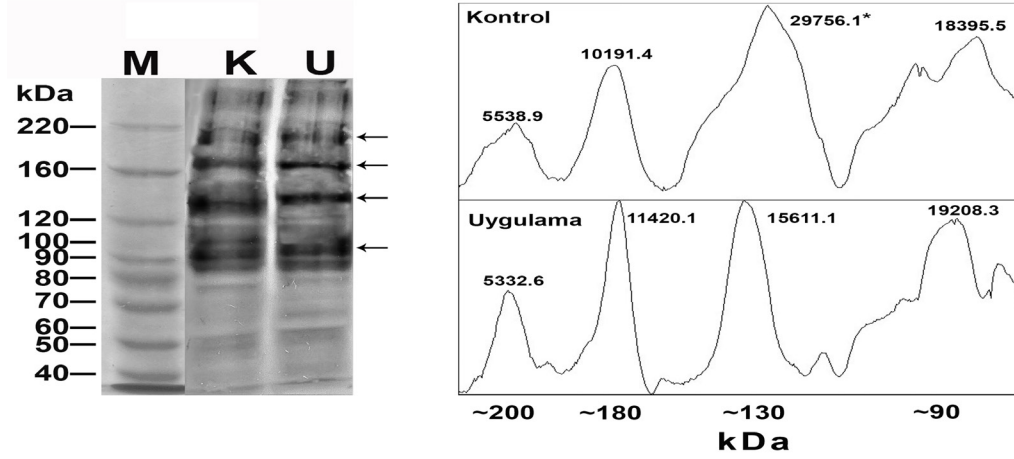
Şekil 1. Lektin blotting uygulamasının negatif (sütun 1-4) ve pozitif kontrolleri (sütun 5). Timik doku ekstraktlarının lektin-glikoprotein karışımlarıyla reaksiyonlarında önemli azalmalar göze çarpmaktadır (sütun 1-3). Doku ekstraktları nöraminidaz ile muamele edildiğinde MAA reaksiyonunun tamamen ortadan kalktığı görülmektedir (sütun 4). Lektin blotting uygulamasının pozitif kontrolünde fetuin içeren membran yoğun bir MAA sinyali vermiştir (sütun 5). Fet: fetuin, Asia: asialofetuin, Trans: transferin, Neura: Tip X *Clostridium perfringens* nöraminidaz.

Bulgular

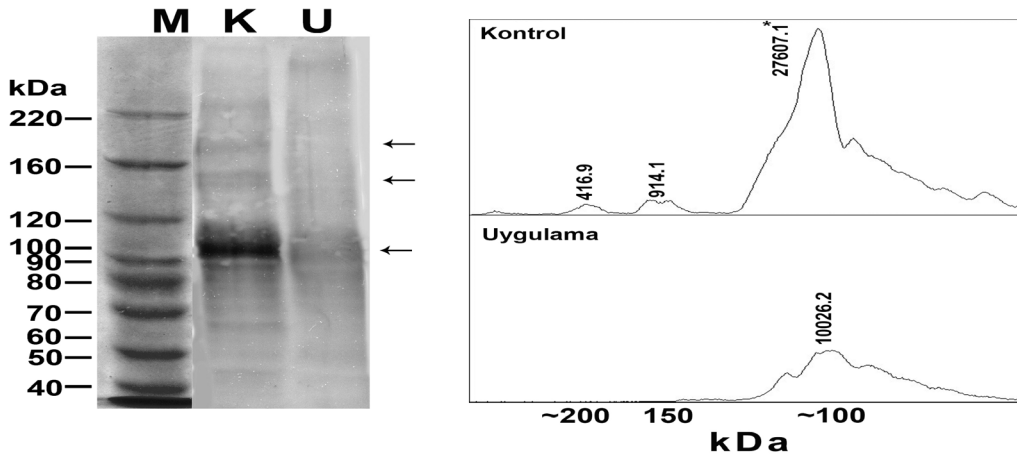
MAA: MAA, galaktoz gruplarına α 2,3- ile bağlı uç sialik asitleri özgün olarak tanıma yeteneğine sahip bir lektindir. Timik doku ekstraktlarının MAA lektin blotting paternleri kontrol ve deksametazon uygulanmış grup arasında farklılık gösterdiği belirlendi. Kontrol grubunda MAA ile reaksiyon veren ve molekül ağırlıkları ~90, ~130, ~180 ve ~200 kDa olan dört farklı bant görüldü. Deksametazon uygulanan grupta ise ~200 kDa'luk bantta herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Buna karşın, ~100 ve ~180 kDa'luk bantlarda hafif bir artış, ~130 kDa'luk bantta ise önemli bir azalma görüldü ($p < 0.05$) (Şekil 2).

PNA: Lektin blotting sonuçları kontrol grubunda β -D-Gal1,3-D-GalNAc yapılarına özgün olan PNA ile reaksiyon veren ~100 kDa'luk baskın bir bant ile 150 ve ~200 kDa'luk iki zayıf bantın varlığını gösterdi. Deksametazon uygulaması sonrasında ~100 kDa'luk banttaki reaksiyon büyük ölçüde azalırken ($p < 0,05$) diğer bantlar görülmedi (Şekil 3).

SNA: Bu lektin galaktoz ya da GalNAc yapılarına α 2,6-glikosidik bağlarla bağlanmış olan sialik asitleri tanımaktadır. Kontrol grubunda SNA-reaktivitesine sahip molekül ağırlığı ~40 ile 200 kDa arasında değişen 8 farklı banda rastlandı. Deksametazon uygulanmış grupta ise SNA ile reaksiyon veren tüm bantların



Şekil 2. Kontrol (K) ve uygulama (U) grubuna ait timik doku ekstraktlarının MAA reaktiviteleri. Uygulama sonrası ~90 ve ~180 kDa'luk bantlarda hafif bir artış görülürken ~130 kDa'luk glikoproteininin α 2,3 sializasyon paterni önemli bir azalma gösterdi. *: $p < 0.05$, M: marker, oklar MAA-pozitif bantları göstermektedir.

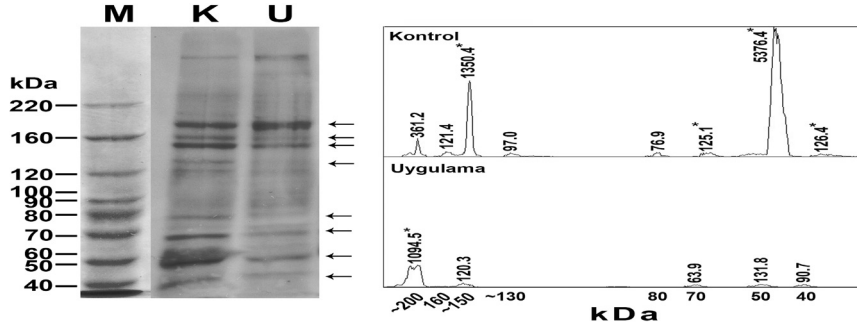


Şekil 3. Kontrol grubunda (K) görülen PNA-reaktif core-1 yapılarının boyanma yoğunluğu uygulama grubunda (U) büyük ölçüde azalmaktadır. *: $p < 0.05$, M: marker, oklar PNA-pozitif bantları göstermektedir.

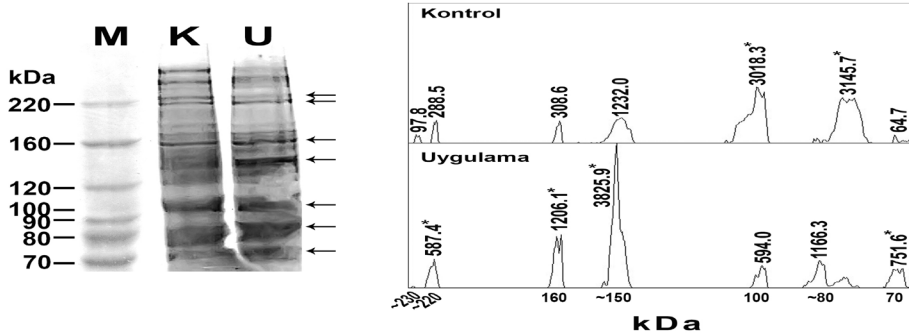
yoğunluğunda büyük oranda azalma görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 4).

ConA: Kontrol grubunda ~70 ila ~230 kDa arasında 7 farklı bant terminal α -D-mannozil ve α -D-glikozil gruplarına özgün olan ConA lektin ile reaksiyon verirken deksametazon uygulanmış grupta ConA sinyallerinde büyük ölçüde artış olduğu saptandı ($p < 0,05$) (Şekil 5).

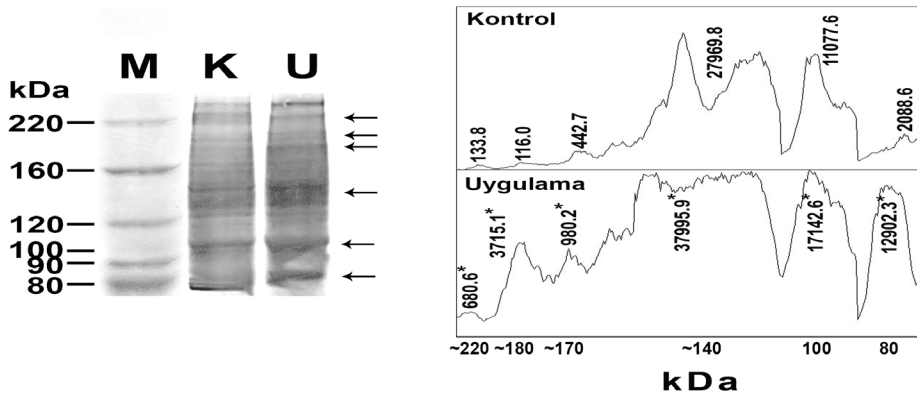
WGA: Terminal sialik asit ve GlcNAc gruplarına bağlanma yeteneği gösteren WGA'nın, kontrol ve uygulama gruplarına ait timik ekstraktlarda molekül ağırlıkları ~80 ila ~200 kDa arasında değişen 6 farklı glikoprotein molekülü ile reaksiyon verdiği belirlendi. Deksametazon uygulaması sonucunda WGA sinyallerinin belirlenen tüm bantlarda büyük ölçüde arttığı belirlendi ($p < 0,05$) (Şekil 6).



Şekil 4. Kontrol grubuna (K) ait timik doku ekstraktları molekül ağırlığı ~40 ile 200 kDa arasında değişen 8 SNA-pozitif glikoprotein içerirken uygulama grubunda (U) bu glikoproteinlerin SNA afinitelerinde önemli bir azalma saptandı. *: $p < 0,05$, M: marker, oklar SNA-pozitif bantları göstermektedir.



Şekil 5. Kontrol grubu (K) ile karşılaştırıldığında deksametazon uygulanmış grupta (U) ConA reaktivitesinin büyük oranda arttığı görüldü. *: $p < 0,05$, M: marker, oklar ConA-pozitif bantları göstermektedir.



Şekil 6. Kontrol grubunda (K) görülen WGA-pozitif bantların yoğunluğu uygulama grubunda (U) önemli ölçüde artmaktadır. *: $p < 0,05$, M: marker, oklar ConA-pozitif bantları göstermektedir.

Tartışma

Memelilerde kemik iliği ile birlikte primer bir lenfoid organ olan timus bezinin öncelikli görevi, bağışıklık gözetiminde en önemli hücre grubu olan T hücrelerinin olgunlaştığı, otoimmün bozukluklara yol açabilecek otoreaktif hücrelerin bir dizi seçim mekanizması ile ortadan kaldırıldığı bir ortamı oluşturmaktır. Fonksiyonel ve histolojik olarak timus bezi subkapsular bölge, korteks, kortikomedullar kavşak ve medulladan oluşur [19, 20].

Timus bezinin seçim mekanizmaları aracılığı ile self-toleran ve antijene yanıt verebilecek etkin bir T hücresi kütlesi oluşturmasında timik epitelyal hücreler ve timositler arasındaki etkileşimler büyük önem taşımaktadır. Tüm memeli hücrelerinin yüzeylerinde bulunan sialik asitlerin [21, 22] T hücresi olgunlaşmasında önemli olduğu uzun yıllardır bilinmektedir [23-26]. Timusta sialillenmiş core-1 (Gal β 1,3GalNAc; T antijen) yapısı CD4⁺CD8⁻ immatür subkapsular timositlerde ve matür CD4⁺ ya da CD8⁺ medullar timositlerde bulunurken sialillenmemiş core-1 ve core-2 [GlcNAc β 1,6(Gal β 1,3)GalNAc] yapıları CD4⁺CD8⁺ immatür kortikal timositlerde görülür [23, 27]. İmmatür kortikal timositler PNA ile pozitif reaksiyon verirken matür medullar hücreler PNA-negatiftir [28]. Bu fenotipik değişikliğin temelinde kortikal immatür timositlerin medullar bölgeye göçleri sırasında yüzeylerindeki PNA-spesifik core-1 yapısına α 2,3-bağlı sialik asitlerin eklenmesi yer almaktadır. Olgun medullar timositlerde core-1 yapısının α 2,3- bağli sialik asitler ile maskelenmesi, PNA lektin bağlanmasının gelişimsel olarak engellenmesine neden olmaktadır [1, 23, 25, 26, 29, 30]. Bununla birlikte, matür medullar timositler sırasıyla α 2,3- ve α 2,6- bağli sialik asitleri tanıyan MAA ve SNA ile pozitif reaksiyon vermektedirler [6, 8]. Çalışmamızda kontrol grubuna ait örneklerde PNA, MAA ve SNA reaksiyonlarının genel olarak farklı moleküler ağırlıkta bantlara karşılık gelmesi timik mikroçevrede farklı glikoproteinlerin farklı sializasyon paternleri gösterdiğini ortaya koymuştur.

Timosit gelişiminde iki T hücresi yüzey glikoproteininin (CD43 ve CD45) glikozilasyon durumunun timosit gelişiminde önemli olduğu bilinmektedir [31]. CD45, eritrosit ve plateletler dışında tüm hematopoiyetik hücrelerin yüzeylerinde bulunan özel bir transmembran

proteinidir. Bu molekülün 180-235 kDa arasında farklı ve hücre tipine özgün izoformları bulunmaktadır [32]. CD45'in glikozilasyon durumu, bulunduğu hücre tipine ve izoformuna göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, CD4⁺CD8⁻ olgun ve olgun olmayan "tek pozitif" (single positive-SP) timositler CD45'in sialillenmiş core-1 yapısı içeren sırasıyla CD45RA/RBC/RB ve CD45RB/RBC izoformlarına sahiptir. Oysa CD4⁺CD8⁺ immatür timositler asialo-core 1 ve core-2 O-bağli glikanları içeren düşük molekül ağırlıklı izoformları (CD45RO) eksprese ederler [33-36].

İnatimik gelişim sırasında timositlerde eksprese edilen bir diğer glikoprotein olan CD43'ün 115 ve 130 kDa'luk iki izoformu bulunmaktadır. Core-1 glikanları içeren 115 kDa'luk glikoform olgun ve olgun olmayan timositlerde bulunur. 130 kDa'luk izoform ise dallanmış core-2 yapısı içerir ve CD4⁺CD8⁺ immatür timositlerde yer alır [37].

Çalışmamızda PNA ile major reaksiyon veren ~100 kDa'luk bant büyük olasılıkla core-1 içeren CD43 molekülüdür. Bunun yanında, CD43 molekülünün 95 kDa'luk bir bant verdiği yönünde bulgular vardır [38]. MAA lektin blotting sonuçları incelendiğinde ~100 kDa'da reaksiyon veren bandın sialillenmiş core-1 yapısı içerdiği düşünülebilir. Ancak, MAA lektininin sialillenmiş core-1 O-glikanlara bağlanamadığı ileri sürülmüştür [39]. Bulgularımızda MAA ile reaksiyon veren 130 kDa'luk bant CD43 molekülünün core-2 içeren glikoformudur. Öte yandan, CD45 molekülünün core-2 glikanları eksprese eden düşük molekül ağırlıklı formu (CD45RO) MAA ile 180 kDa'da belirlenirken SNA ile 200 kDa'da reaksiyon veren bant CD45'in α 2,6-bağli sialik asitleri içeren N-glikanların eksprese olduğu yüksek molekül ağırlıklı izoformu olarak gözükmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar medullar timositlerde bulunan ve α 2,6-sialillenmiş N-glikanları içeren [27, 31] CD45RA glikoproteininin SNA reseptörü olduğunu göstermiştir [6]. Timositlerdeki bu glikofenotipik değişikliklerin olgunlaşma sürecinde önemli bir adım olan seçim mekanizmalarında belirleyici bir rol üstlendiği bilinmektedir [40-42]. Örneğin, β -galaktozid bağlayan bir protein olan galektin-1 molekülü immatür timositlerde core-2 glikan içeren CD43 ve CD45 molekülleri ile etkileşerek bu hücrelerin negatif seçilimine neden olmaktadır

[43, 44]. Ancak matür medullar hücrelerde özgün sialiltransferaz enzimlerinin aktivasyonu ile görülen α 2,6-sializasyon artışı galektin-1 bağlanmasına ve dolayısıyla matür hücrelerin apoptozisine engel olmaktadır [43]. Yapılan çalışmalar CD45RO içeren immatür kortikal timositlerin galektin-1 molekülünün ana hedefi olduğunu ve SNA ile reaksiyon vermediklerini, CD45RA içeren medullar timositlerin ise galektin-1 aracılı apoptozisten muaf olduklarını göstermiştir [45, 46]. Çalışmamızda 180 kDa'luk bandın MAA ile reaksiyon verirken SNA-negatif olması bu bulguyu desteklemektedir.

Deksametazon uygulanması sonucunda PNA, MAA ve SNA reaksiyonlarında değişiklikler görülmüştür. Deksametazon O-glikozilasyon mekanizmasında serin ve treonin gruplarına GalNAc ekleyen *N*-asetil-galaktozaminiltransferaz enzimi aktivitesini azaltmaktadır [47]. Her ne kadar bu çalışmada *N*-asetil-galaktozaminiltransferaz aktivitesi çalışılmamış olsa da bu enzimin azalan aktivitesi ile CD43 ve CD45 gibi timik glikoproteinlerin glikozilasyon durumları ve spesifik lektinlere bağlanma afiniteleri arasında bir ilişki olabileceği düşünülebilir.

Uygulama gruplarında PNA, MAA ve SNA reaktivitelerinde görülen değişikliklerin olası nedenlerinden bir tanesi de deksametazonun sializasyon üzerine yaptığı etkiler olabilir. Bu konuda çelişkili bulgular vardır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Chinese Hamster Ovary hücrelerinde α 2,3-sialiltransferaz ve β 1,4-galaktoziltransferaz enzim ekspresyonlarının ve sialik asit düzeylerinin deksametazon uygulamasıyla artış gösterdiği ortaya konulmuştur [48]. Oysa daha önce yapılan çalışmalarda deksametazonun α 2,6-sialiltransferaz ekspresyonlarını arttırdığı [49], α 2,3-sialiltransferaz ekspresyonlarına ise herhangi bir etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür [50]. Gerek MAA, gerekse SNA O-bağlı glikanlar ile birlikte *N*-bağlı sialik asitleri de tanıma yeteneğine sahiptir [6, 15, 51, 52]. Dolayısıyla deksametazon hem O- hem de *N*-glikozilasyon üzerine etki etmektedir.

WGA, GlcNAc içeren yapılara bağlanma yeteneğine sahip bir lektindir [53, 54]. Bu lektin, aynı zamanda sialik asitlere de bir afinite duyar ancak, lektinin sialik asit bağlanma bölgeleri non-spesifiktir ve sialik aside bağlanması GlcNAc'ye bağlanmasından ¼ oranında daha

zayıftır [55]. Çalışmamızda deksametazon uygulaması ile timik mikroçevrede WGA reaktivitesinin önemli oranda artış gösterdiğini belirledik. Yapılan çalışmalar deksametazonun O-GlcNAc transferaz aktivitesini düzenleyerek [56] proteinlerdeki GlcNAc düzeyini arttırdığını ortaya koymuştur [57, 58].

Çalışmamızda deksametazon uygulamasının ConA reaktivitelerini arttırdığını belirledik. Daha önce yapılan çalışmalar deksametazonun makrofajlarda mannoz reseptörlerini arttırdığını göstermiştir [59, 60]. Dolayısıyla ConA reaktivitesindeki bu artış timik mikroçevrede yer alan hücrelerin artan mannoz bağlama kapasiteleri ile ilişkili olabilir. Öte yandan bu artışın nedeni deksametazonun O-glikozilasyon sırasında dolikol fosfata mannoz yüklemesi de olabilir [61].

Sonuç olarak, bu primitif çalışma deksametazonun timik mikroçevredeki glikan profilleri üzerine fenotipik bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Daha önce yapmış olduğumuz histokimyasal bir çalışmada [62] deksametazonun farklı timik mikroçevrelerdeki timosit gruplarında farklı fenotipik değişiklikler yaptığını ve özellikle medullar hücrelerde apoptozisi arttırdığını belirledik. Dolayısıyla, deksametazonun sadece bazı transkripsiyon faktörleri üzerinden değil, aynı zamanda hücre yüzey glikanları üzerinden de timosit matürasyonunu modüle edebilecek yeteneğe bir ajan olabileceğini düşünmek olasıdır.

Teşekkür

Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün desteği (proje no: FEF 2006-045) ve Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun onayı (protokol no: 2006/015) ile gerçekleştirilmiştir.

Çıkar İlişkisi: Yazar çıkar ilişkisi olmadığını beyan eder.

Kaynaklar

1. Wu W, Punt JA, Granger L, Sharrow SO, Kears KP. Developmentally regulated expression of peanut agglutinin (PNA)-specific glycans on murine thymocytes. *Glycobiology* 1997;7:349-356.
2. Krishna M, Varki A. 9-O-Acetylation of sialomucins: a novel marker of murine CD4 T cells that is regulated during maturation and activation. *J Exp Med* 1997;185:1997-2013.

3. Hennet T, Ellies LG. The remodeling of glycoconjugates in mice. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473:123-136.
4. Murrell MP, Yarema KJ, Levchenko A. The systems biology of glycosylation. *Chembiochem* 2004;5:1334-1347.
5. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* 2009;19:507-514.
6. Baum LG, Derbin K, Perillo NL, Wu T, Pang M, Uittenbogaart C. Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes. Correlation between lectin binding phenotype and sialyltransferase expression. *J Biol Chem* 1996;271:10793-10799.
7. Paessens LC, Garcia-Vallejo JJ, Fernandes RJ, van Kooyk Y. The glycosylation of thymic microenvironments. A microscopic study using plant lectins. *Immunol Lett* 2007;110:65-73.
8. Alvarez G, Lascurain R, Perez A, et al. Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. *Immunol Invest* 1999;28:9-18.
9. Fernandez JG, Sanchez AJ, Melcon C, Chamorro CA, Garcia C, Paz P. Development of the chick thymus microenvironment: a study by lectin histochemistry. *J Anat* 1994;184:137-145.
10. Clark AR (2007) Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol* 2007;275:79-97.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
12. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4354.
13. Kawaguchi T, Matsumoto I, Osawa T. Studies on hemagglutinins from *Maackia amurensis* seeds. *J Biol Chem* 1974;249:2786-2792.
14. Lotan R, Sharon N. Peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Methods Enzymol* 1978;50:361-367.
15. Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6) Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* 1987;262: 1596-1601.
16. Finne J, Krusius T. Preparation and fractionation of glycopeptides. *Methods Enzymol* 1982;83:269-277.
17. Gallagher JT, Morris A, Dexter TM. Identification of two binding sites for wheat germ agglutinin on polylactosamine-type oligosaccharides. *Biochem J* 1985;231:115-122.
18. Shukla AK, Schauer R. Analysis of sialidase and N-acetylneuraminidase pyruvate lyase substrate specificity by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1986;158:158-164.
19. Boyd RL, Hugo P. Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunol Today* 1991;12:71-79.
20. Guyden JC, Pezzano M. Thymic nurse cells: a microenvironment for thymocyte development and selection. *Int Rev Cytol* 2003;223:1-37.
21. Schauer R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology (Jena)* 2004;107:49-64.
22. Varki A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* 1997;11:248-255.
23. Gillespie W, Paulson JC, Kelm S, Pang M, Baum LG. Regulation of alpha 2,3 sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)+ to PNA- phenotype in developing thymocytes. *J Biol Chem* 1993;268:3801-3804.
24. Fowlkes BJ, Waxdal MJ, Sharrow SO, Thomas CA, 3rd, Asofsky R, Mathieson B.J. Differential binding of fluorescein-labeled lectins to mouse thymocytes: subsets revealed by flow microfluorometry. *J Immunol* 1980;125:623-630.
25. Reisner Y, Linker-Israeli M, Sharon N. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell Immunol* 1976;25:129-134.
26. Toporowicz A, Reisner Y. Changes in sialyltransferase activity during murine T cell differentiation. *Cell Immunol* 1986;100:10-19.
27. Earl LA, Baum LG. CD45 glycosylation controls T-cell life and death. *Immunol Cell Biol* 2008;86:608-615.
28. Amado M, Yan Q, Comelli EM, Collins BE, Paulson JC. Peanut agglutinin high phenotype of activated CD8+ T cells results from de novo synthesis of CD45 glycans. *J Biol Chem* 2004;279:36689-36697.
29. Despont JP, Abel CA, Grey HM. Sialic acids and sialyltransferases in murine lymphoid cells: indicators of T cell maturation. *Cell Immunol* 1975;17: 487-494.
30. Lefrancois L. Expression of carbohydrate differentiation antigens during ontogeny of the murine thymus. *J Immunol* 1987;139:2220-2229.
31. Clark MC, Baum LG. T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1253:58-67.
32. Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:85-116.
33. Fujii Y, Okumura M, Inada K, Nakahara K, Matsuda H. CD45 isoform expression during T cell development in the thymus. *Eur J Immunol* 1992;22:1843-1850.
34. Fukuhara K, Okumura M, Shiono H, et al. A study on CD45 isoform expression during T-cell development and selection events in the human thymus. *Hum Immunol* 2002;63:394-404.
35. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:107-137.
36. McNeill L, Cassady RL, Sarkardei S, Cooper JC, Morgan G, Alexander DR. CD45 isoforms in T cell signalling and development. *Immunol Lett* 2004;92:125-134.

37. Jones AT, Federspiel B, Ellies LG, et al. Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. *J Immunol* 1994;153:3426-3439.
38. Pace KE, Lee C, Stewart PL, Baum LG. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol* 1999;163:3801-3811.
39. Geisler C, Jarvis DL. Effective glycoanalysis with *Maackia amurensis* lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology* 2011;21:988-993.
40. Harrington LE, Galvan M, Baum LG, Altman JD, Ahmed R. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J Exp Med* 2000;191:1241-1246.
41. Lascurain R, Porras F, Baez R, et al. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations. *Immunol Invest* 1997;26:579-587.
42. Porras F, Lascurain R, Chavez R, et al. Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine naive thymocytes. *Glycobiology* 2000;10:459-465.
43. Amano M, Galvan M, He J, Baum LG. The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *J Biol Chem* 2003;278:7469-7475.
44. Earl LA, Bi S, Baum LG. N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. *J Biol Chem* 2010;285:2232-2244.
45. Baum LG, Pang M, Perillo NL, et al. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med* 1995;181:877-887.
46. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995;378:736-739.
47. Alvarez G, Lascurain R, Hernandez-Cruz P, et al. Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:1235-1240.
48. Jing Y, Qian Y, Li ZJ. Sialylation enhancement of CTLA4-Ig fusion protein in Chinese hamster ovary cells by dexamethasone. *Biotechnol Bioeng* 2010;107:488-496.
49. Wang XC, O'Hanlon TP, Lau JT. Regulation of beta-galactoside alpha 2,6 sialyltransferase gene expression by dexamethasone. *J Biol Chem* 1989;264:1854-1859.
50. Coughlan CM, Burger PG, Berger EG, Breen KC. The biochemical consequences of alpha2,6(N) sialyltransferase induction by dexamethasone on sialoglycoprotein expression in the rat H411e hepatoma cell line. *FEBS Lett* 1997;413:389-393.
51. Bi S, Baum LG. Sialic acids in T cell development and function. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:1599-1610.
52. Wang WC, Cummings RD. The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2,3 to penultimate galactose residues. *J Biol Chem* 1988;263:4576-4585.
53. Nagata Y, Burger MM. Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem* 1974;249:3116-3122.
54. Drickamer K. Multiplicity of lectin-carbohydrate interactions. *Nat Struct Biol* 1995;2:437-439.
55. Nagata Y, Goldberg AR, Burger MM. The isolation and purification of wheat germ and other agglutinins. *Methods Enzymol* 1974;32:611-615.
56. Bond MR, Hanover JA. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol* 2015;208:869-880.
57. Li MD, Ruan HB, Singh JP, et al. O-GlcNAc transferase is involved in glucocorticoid receptor-mediated transrepression. *J Biol Chem* 2012;287:12904-12912.
58. Massaccesi L, Goi G, Tringali C, Barassi A, Venerand B, Papini N. Dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy increases O-GlcNAcylation in C2C12 Cells. *J Cell Biochem*. 2016;117:1833-1842
59. Shepherd VL, Konish MG, Stahl P. Dexamethasone increases expression of mannose receptors and decreases extracellular lysosomal enzyme accumulation in macrophages. *J Biol Chem* 1985;260:160-164.
60. Cowan HB, Vick S, Conary JT, Shepherd VL. Dexamethasone up-regulates mannose receptor activity by increasing mRNA levels. *Arch Biochem Biophys* 1992;296:314-320.
61. Sarkar M, Mookerjee S. Effect of dexamethasone on the synthesis of dolichol linked saccharides and glycoproteins in hepatocytes prepared from control and inflamed rats. *Biochem J* 1985;227:675-682.
62. Balcan E. Quantitative approach to lectin-based glycoprofiling of thymic tissues in the control- and the dexamethasone-treated mice. *Tissue Cell* 2016;48:168-182.