

**Az O-glikoziláció szerepe diabeteszben és diabeteszes  
cardiomyopathiában és nephropathiában.**

**Ph.D tézis**

**Dr. Fülöp Norbert**



Mentorok:

**Prof. Dr. Wittmann István, Ph.D.**

**Prof. John C. Chatham D.Phil.**

Doktori Iskola vezetője:

**Prof. Dr. Nagy Judit, Ph.D.**

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrologiai Centrum  
Pécs, Magyarország**

**University of Alabama at Birmingham  
Department of Medicine, Division of Cardiovascular Disease  
Birmingham, Alabama, USA**

**Pécs, 2008**

## Rövidítések:

**ACC:** acetyl-CoA karboxiláz

**AD:** Alzheimer disease/kór

**AGE:** advanced glycation endproduct, késői glikációs végtermékek

**AMPK:** AMP-aktiválta protein kináz

**DNP:** diabetic nephropathy, diabeteszes nephropathia

**EC:** excitation-contraction coupling, excitáció-kontrakció kapcsolás

**EDP:** end-diastolic pressure, végdiasztolés nyomás

**ERK:** extracellularis-szignál regulálta kináz

**FFA:** free fatty acid, szabad zsírsav

**Fru-6-P:** fruktóz-6- foszfát

**GFAT:** Glutamin: fruktóz-6- foszfát amidotranszferáz

**Glc-6-P:** glukóz-6-foszfát

**GlcN:** glukózamin

**GlcNAc:** N-acetilglukózamin

**GlcNAc-6-P:** N-acetilglukózamin -6-foszfát

**GlcNH<sub>2</sub>-6-P:** glukózamin -6-foszfát

**HBP:** hexosamine biosynthesis pathway, hexózamin anyagcsereút

**LFI:** low flow ischemia, alacsony perfúziójú ischemia

**MAPK:** mitogen aktiválta protein kináz

**OGA:** N-acetilglukózaminidáz, O-GlcNAc-ase

**O-GlcNAc:** O-glikoziláció

**OGT:** O-glucoronil transzferáz, O-GlcNAc transzferáz

**PKC:** protein kináz C

**TCA:** trikarboxilsav

**TG:** triglicerid

**UDP-GlcNAc:** Uridine difoszfo- N-acetilglukózamin

**ZDF:** Zucker Diabetic Fatty

## Bevezetés:

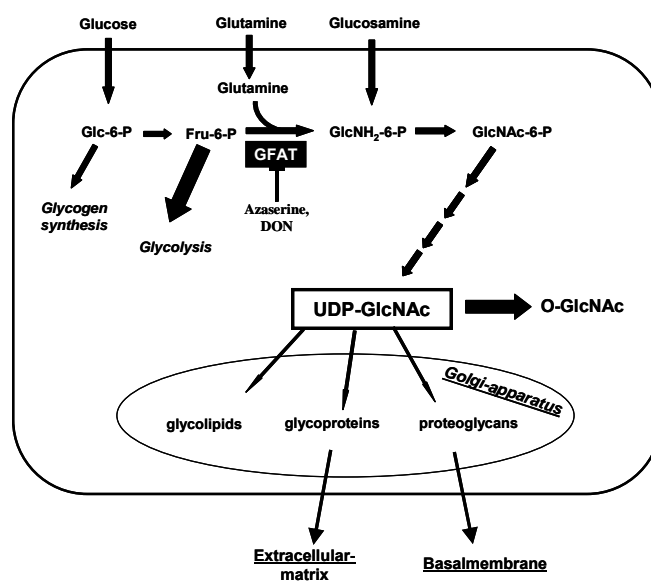
### **Diabetes mellitus:**

A 2-es típusú diabetes mellitus mind a fejlődő, mind a fejlett országokban növekvő problémát jelent. A diabetes incidenciája növekszik, Magyarországon becslések szerint a diabetes prevalencia 10% felett van (11,2%).

Inzulin rezisztencia, hyperglycaemia, és dyslipidaemia jellemzi a 2-es típusú diabetest. Annak ellenére, hogy a diabetes kialakulásának a mechanizmusa nem teljesen ismert négy különböző mechanizmust tartanak felelősnek a krónikus hyperglycaemia káros hatásaiért, többek közt a fokozott poliol anyagcsereútat, a késői glikációs végtermékek képződésének fokozódását, megnövekedett protein kináz C aktivációt és fokozott hexózamin anyagcsereútat és/vagy a megnövekedett O-glikozilációt.

### **Hexózamin anyagcsereút:**

A sejtekbe felvett glukóz kis százaléka (2-5%) halad át a hexózamin anyagcsereúton uridin-difoszfo-N-acetilglukózaminná alakulva (UDP-GlcNAc) (1 ábra). A fő reguláló enzim a glutamin: fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz (GFAT). Az anyagcsereút végterméke az uridin 5'-difoszfo-N-acetilglukózamin, mely szubsztrátként szolgál egyetlen N-acetilglukózamin kapcsolódásához, mind a sejtmagban mind a citoszolban található fehérjék szerin, vagy treonin aminosavaihoz (O-glikoziláció, O-GlcNAc).



1 Ábra.: A hexózamin anyagcsereút

### **O-glikoziláció:**

Az O-glikoziláció egy olyan poszttranszlációs módosulása a sejtmembrán és a citoszol fehérjéinek, melyet egyre inkább elfogadnak a jelátviteli mechanizmusnak fontos szabályzójaként. Az O-glikoziláció a sejtmembránban és a citoszolban történik, nem a Golgi-ban és az endoplazmatikus reticulumban, két enzim szabályozza; az uridin-difoszfó-N-acetilglukózamin: polipeptid  $\beta$ -N-acetilglukózaminiltransferáz (O-GlcNAc transferáz; OGT) – mely az N-acetilglukózamin fehérjékhez való kapcsolódását szabályozza, és az N-acetilglukózaminidáz (O-GlcNAcase, OGA) – mely a cukoregység fehérjéről való eltávolításáért felelős.

Fehérjék széles köre O-glikozilált, többek közt kinázok, foszfatázok, transzkripciós faktorok, metabolikus enzimek, chaperonok és citoszkeleton fehérjék. Az O-glikoziláció igazoltan befolyásolja a fehérjék DNS kötő kapacitását, enzimaktivitásukat, fehérje-fehérje közti kapcsolat erősségét, fehérjék féléletidejét és a sejten belüli elhelyezkedésüket.

Több tanulmány kimutatta, hogy a fokozott hexózamin anyagcsereút és a megnövekedett O-glikoziláció fontos szerepet játszik az inzulinrezisztencia és a diabetes kialakulásában.

### **Diabeteszes cardiomyopathia:**

Diabetes részben a sejtmembrán folyamatok befolyásolásával vezet a diabeteszes cardiomyopathia kialakulásához. Sejtkultúrában és állatkísérletes modellekben a magas glukóz vagy a glukózamin kezelés fokozza az O-glikozilációt és szívizomsejt-működés károsodásához vezet, megváltoztatva a  $Ca^{2+}$  háztartást.

Egy másik lehetséges mechanizmus, mely felelős lehet a cardiomyopathia kialakításáért, a megváltozott anyagcsere. Diabeteszes szívben csökken a szénhidrát felhasználás csökken, míg a palmitát oxidáció nő. A fokozott O-glikoziláció hatása, legalábbis részben, két metabolizmust szabályzó kulcsenzim; az AMP-regulálta protein kináz (AMPK) és a Acetil-CoA karboxiláz (ACC) megváltozott aktivitásának következménye.

### **Diabeteszes nephropathia:**

A korai diabeteszes nephropathia (DNP) legfőbb jellegzetességei az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjéinek, mint a laminin, fibronectin vagy a IV-es típusú kollagén felszaporodása, valamint a vese sejtjeinek hypertrophiája. Kimutatásra került, hogy a fokozott hexózamin anyagcsereút az ECM fehérjéinek felszaporodásához vezet. Nerlich és munkatársai kimutatták, hogy a GFAT jelen van az emberi vesében és diabeteszesben a GFAT expressziója fokozódott. Viszont kevés információ áll rendelkezésünkre az O-glikozilációról a vesében. Patkány

mesangiumsejtekben a glukózamin, mely fokozza a hexózamin anyagcseréjét és az O-glikozilációt, sejtciklus arrestet és sejthypertrophiát indukál.

### **Sejt-túlélés:**

Stressz stimulusokról kimutatták, hogy fokozzák az O-glikozilációt. Ezen válasz gátlása megnövelte a sejtek érzékenységét a stresszhatásra, amíg az O-glikoziláció fokozása megemelte a stressz toleranciát és javította a sejtek túlélését.

Az O-glikoziláció ugyancsak szerepet játszik daganatos megbetegedések pathogenesisében és az O-glikoziláció változása fontos szerepet töltenek be a neurodegeneratív betegségek kialakulásában, mint amilyen az Alzheimer kór (Alzheimer's disease, AD).

Zachara és Hart vetette fel, hogy ezen anyagcserék akut aktivációja védő hatású, belső stresszválaszként működve, addig az O-glikoziláció krónikus fokozása vezet a betegségek kialakulásához.

### **Mitogen aktiválta protein kinázok (MAPK) és cardioprotekció:**

A szív ischaemiára adott válaszait részben az extracellularis-szignál regulálta kináz (ERK) és a p38 Mitogen aktiválta protein kináz (MAPK) és az Akt szabályozzák. A p38 szerepe a szív ischaemiás károsodásra adott válaszában ellentmondásos. A tartós p38 aktiváció káros. Ezzel szemben, az ischaemiát megelőző rövid p38 aktivációja összefüggést mutat az ischaemiás prekondicionálással/cardioprotekcióval. Az ERK fontos az inzulin és az ischaemiás prekondicionálással összefüggésbe hozható cardioprotekció szabályzásában. Az Akt szintén leírták, hogy védelmet nyújt a szív ischaemia/reperfúziós károsodásával szemben.

A hexózamin anyagcseréjének fokozása és a megnövekedett O-glikoziláció igazoltan módosítja a MAPK aktivitást. Összefoglalva ezen tanulmányok alapján felmerül, hogy az ischaemiás cardioprotekcióban részt vevő főbb kinázokat befolyásolhatják a hexózamin anyagcseréjében és az O-glikozilációban létrejövő változások.

## **Célkitűzések:**

### **1. A stressz, valamint az öregedés és a hexózamin anyagcsereút, valamint az O-glikoziláció kapcsolata – akut vs. krónikus aktiváció.**

- 1.1. Megvizsgálni a stressz hatását a hexózamin anyagcsereútra és az O-glikozilációra patkányszívben.
- 1.2. Igazolni, hogy az O-glikoziláció akut fokozása glukózamin adagolással megvédi a szíveket az ischemia/reperfúziós károsodástól.
- 1.3. Meghatározni az öregedés hatását a HBP-re és az O-glikozilációra.

### **2. A hexózamin anyagcsereút és az O-glikoziláció szerepe diabeteszes cardiomiopathiában, állatmodellekben.**

- 2.1. Vizsgálni a 2-es típusú diabetes kialakulásának hatását az O-glikozilációra és a HBP-re szívben.
- 2.2. Vizsgálni a fokozott O-glikoziláció hatását az excitáció-kontrakció kapcsolásra izolált szívműködéseken.
- 2.3. Meghatározni, hogy a fokozott HBP és O-glikoziláció hasonló elváltozásokat okoz-e a szívműködés anyagcseréjében, mint a 2-es típusú diabetes és vajon ez összefüggésben van-e az ACC, vagy AMPK aktivációjának változásával.

### **3. O-glikoziláció és diabeteszes nephropathia.**

- 3.1. Igazolni, hogy az O-glikoziláció jelen van emberi vesebiopsziás mintákban.
- 3.2. O-glikozilációban különbséget kimutatni a diabeteszes és nem diabeteszes betegek vesemintái közt.

## **Eredmények és módszerek:**

### **1.1. Stressz hatásai a hexózamin anyagcsereútra és az O-glikozilációra a szívben.**

Célként tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az ischaemia, ischaemia/reperfúzió hatását a hexózamin anyagcsereútra és az O-glikozilációra szívben. Ehhez izolált, perfundált patkányszíveket tettünk ki alacsony perfúziójú ischaemianak (low flow ischemia, LFI) (0, 5, 10, 30 perc) vagy 30 perc LFI-nek és 60 perc reperfúzióknak. Az O-glikozilációt Western blottal értékeltük, míg a szöveti UDP-GlcNAc tartalmat HPLC-vel határoztuk meg.

Az LFI kezdete a kontraktilis funkció gyors csökkenéséhez és az end végdiasztolés nyomás (EDP, end diastolic pressure) fokozatos emelkedéséhez vezetett. 5 perc ischaemia szignifikánsan megemelte az UDP-GlcNAc koncentrációt, és a hosszabb időtartamú ischaemia (10 és 30 perc) tovább növelte azt. 60 perc reperfúziót követően az UDP-GlcNAc visszatért a normoxiás szintre.

Az ischaemia következtében az O-glikoziláció megnövekedett, 10 perc ischaemiát követően a normoxiás szint közel 1,5-szeresére emelkedett az O-glikoziláció. Azonban, ellentétben az UDP-GlcNAc szinttel, az O-glikoziláció 10 és 30 perces ischaemia közt csökkent, és a reperfúzió végére szignifikánsan alacsonyabb volt a normoxiás értéknél.

### **1.2. Az O-glikoziláció glukózaminnal való akut fokozása megvédi a szíveket az ischaemia/reperfúziós károsodástól.**

Megvizsgáltuk, vajon a glukózamin kezeléssel megnövelt O-glikoziláció megvédi-e a szíveket az ischaemia/reperfúziótól és megvizsgáltuk a GlcN hatását a stressz jelátviteliutakra., melyek hozzájárulhatnak a GlcN cardioprotektív hatásához. Az előző kísérletsorozat szíveit használtuk kontrollként és további állatokat perfundáltunk 5 mM glukózaminnal azonos körülmények közt. Western blot Analízist alkalmaztunk a fehérje expresszió, O-glikoziláció és foszforiláció mérésére. ATP és UDP-GlcNAc szinteket HPLC módszerrel mértük.

Nem volt lényeges különbség a kontraktilis funkcióban a GlcN és a kontroll csoport közt az ischaemiát megelőzően. Az LFI végére az EDP szignifikánsan mérsékelte volt a GlcN csoportban. A 30 perc LFI-t és a 60 perces reperfúziót követően a funkció visszatérése szignifikánsan magasabb volt a glukózamin csoportban.

A GlcN majdnem kétszeresére emelte az UDP-GlcNAc szintet. Hasonlóan a kontroll csoporthoz ischaemia hatására az UDP-GlcNAc szint szignifikánsan

megemelkedett. Az ischaemia nem változtatta meg az O-glikozilációt a glukózámmal kezelt csoportban. A GlcN minden időpontban szignifikánsan, legalább 60%-kal megemelte az O-glikozilációt a control csoporthoz képest.

Amint azt vártuk mind a kontroll, mind a glukózámmal kezelt csoportban lecsökkent az ATP szint az ischaemia alatt. Azonban, az ischaemiás kontrakció csökkenés és a reperfúzió végébe javult funkcionális visszatérés ellenére, a glukózamin kezelés nem mérsékelte az ischaemia alatti ATP vesztést és nem emelte a reperfúzió végére az ATP szinteket.

A glukózamin kezelés nem volt hatással sem az ERK sem az Akt foszforilációra a kontrollokkal összehasonlítva semelyik körülmény közt. A glukózamin normoxiában, valamint 5 és 10 perces LFI-t követően nem változtatta meg a p38 foszforilációját., azonban az LFI végére a p38 foszforiláció szignifikánsan mérséklődött a glukózámmal kezelt csoportban. Ezzel szemben a reperfúzió végére a p38 foszforilációja nőtt a glukózamin csoportban.

### **1.3. Az öregedés hatása a hexózamin anyagcsereútra és az O-glikozilációra.**

Megvizsgáltuk, van-e különbség O-glikozilációban és/vagy a hexózamin anyagcsereútban a fiatal felnőtt és a agg állatok különböző szövetei közt. 5 és 24 hónapos Brown Norway patkányok szív, aorta, harántcsíkoltizom és agyszövetét gyűjtöttük össze. Szérumból glukóz, inzulin, zsírok és szabad zsírsav (FFA, free fatty acid) koncentrációt mértünk. Real-time RT-PCR-t használtunk a GFAT, OGT és OGA mRNS méréséhez. HPLC mérésekkel értékeltük az UDP-GlcNAc szinteket és Western blottal hasonlítottuk össze az O-glikozilációt és az OGT expressziót.

A testsúly, szív súlya és a szérum inzulin szintek szignifikánsan megemelkedtek a 24 hónapos csoportban. A szív-/testsúly arányban nem volt különbség. Nem találtunk eltérést a kor váltoásával a koleszterin, HDL, FFA szintekben sem.

Az agg állatok szívében, aortájában, agyában és a simaizmában megemelkedett az O-glikoziláció. A szívben, agyban és a simaizmóban az O-glikozilált fehérjék mintázata is változott korrallal.

A szívben korrallal szignifikánsan nőtt az OGA mRNS szint, míg az OGT mRNS szint változatlan maradt. Nem volt változás sem az OGT sem az OGA mRNS-ben az agyban és a simaizmóban sem a kor változásával. Az OGT fehérje szintje szignifikánsan csökkent korrallal a szívben, aortában és az agyban, és nem változott a simaizmóban.

A szív GFAT1 és GFAT2 mRNS szintje kimutathatóan nőtt a korrallal, habár a GFAT1 növekedése nem bizonyult szignifikánsnak. A GFAT mRNS és O-



glikozilációs szintek növekedésével megegyezően a 24 hónapos patkányok szívében az UDP-GlcNAc szint is szignifikánsan magasabb volt. A simaizomban és az agyban nem volt különbség a GFAT1, GFAT2 vagy az UDP-GlcNAc szintben az 5 és a 24 hónapos csoport közt.

## **2.1. A 2-es típusú diabetes hatása a hexózamin anyagcsereútra és a szív O-glikozilációjára.**

Ebben a tanulmányban megvizsgáltuk, hogy a szívben a 2-es típusú diabetes kialakulása milyen hatással van a hexózamin anyagcsereútra és az O-glikozilációra Zucker Diabetic Fatty (ZDF) patkányokban. 6 és 22 hetes állatok szívét perfundáltuk. Meghatároztuk a szérum cukor, inzulin és leptinszinteket. Western blotot és HPLC méréseket végeztünk az O-glikoziláció az OGT és az UDP-GlcNAc szintek méréséhez.

A 6 hetes ZDF (kövér) patkányok inzulin-, mind a leptin rezisztensek voltak, azonban normoglycaemiásak, miközben 22 hetes korukra az inzulin szintjük lecsökkent és hyperglycaemiássá váltak. Habár a leptin szintek szignifikánsan megnöttek a sovány állatokban 22 hetes korukra, azonban még mindig alacsonyabbak voltak, mint az azonos korú ZDF állatokban.

Nem találtunk különbséget az UDP-GlcNAc koncentrációban a 6 hetes ZDF és sovány patkányok közt. Habár a 22 hetes ZDF csoportban az UDP-GlcNAc szignifikánsan magasabb volt az azonos korú sovány állatokhoz képest. Az OGT expressziója nem különbözött egyik életkorban sem.

A 6 és 22 hetes csoportok O-glikozilációját összehasonlítva azt találtuk, hogy az O-GlcNAc életkorral csökken mind a ZDF, mind a sovány állatokban, mely összefüggésben volt az OGT expresszió csökkenésével.

Hogy jobban megértsük az életkor és a diabetes összesített hatását az O-glikozilációra, megmértük az egyes fehérje-sávok intenzitásának változását a sovány és a ZDF csoportban. Az O-glikozilációra specifikus antitest, a CTD110.6, 11 fehérje-sávot ismert fel minden csoportban. A sovány – kontroll- csoportban minden fehérje-sáv intenzitása csökkent korral, ellenben a ZDF állatokban találtakkal, ahol a sávok többsége nem változott, és csak 3 fehérje-sáv intenzitásának csökkenése okozta a kor növekedésével összefüggő összintenzitás változását. Egy magas molekulású fehérje-sáv intenzitása azonban szignifikánsan kb.: a háromszorosára nőtt a 22 hetes ZDF állatok szívében a 6 jhetes ZDF-ekéhez hasonlóan. Érdekes megemlíteni, hogy ugyanez a fehérje-sáv intenzitása nőtt meg a 22 hetes ZDF csoportban a 22 hetes soványakhoz hasonlóan is. Ez alapján úgy tűnik, hogy ezen fehérje-sáv intenzitása nő meg diabetes hatására függetlenül a leptin szintektől.

## **2.2. A 2-es típusú diabetes kialakulásának hatása az excitáció-kontrakció kapcsolásra izolált felnőtt szívizomsejteken.**

Célként tűztük ki, hogy igazoljuk, hogy a 2-es típusú diabetes hasonló hatással van az EC-kapcsolásra, mint az 1-es típusú diabetes, vagy a GlcN kezelés, ahogy azokat már korábban lerták. 6 és 22 hetes ZDF állatok szívéből izoláltunk felnőtt szívizomsejteket. Mechanikai tulajdonságaikat és az intracelluláris  $Ca^{2+}$  áramokat vizsgáltuk egy fluoreszcens rendszerhez kapcsolt video-alapú mikroszkóppal.

A szívizomsejtek összehúzódása és elernyedése nem különbözött 6 hetes korban összehasonlítva a sovány és a ZDF állatokat. 22 hetes korukra a hyperglycaemiás állatok sejtjeinek mind a kontrakciója, mind a relaxációja szignifikánsan károsodott a kontrollhoz képest. Korral a  $Ca^{2+}$  áramban beállt változások hasonlóak voltak a mechanikai tulajdonságokban látottakhoz; 6 hetes korban nem volt különbség a diabeteszes és kontroll csoport közt, míg 22 hetes korra a csúcs  $Ca^{2+}$  mérséklődött és a  $Ca^{2+}$  kiáramlás károsodott a diabeteszes állatokban a kontrollhoz hasonlítva.

Hogy megbecsülhessük a hyperglycaemia leptin-szintektől független hatását, összehasonlítottuk a ZDF állatok 6 és 22 hetes szívizomsejtjeinek kontrakcióját és relaxációját is. A 22 hetes ZDF csoportban szignifikánsan károsodott kontrakciót és relaxációt találtunk és meglassult  $Ca^{2+}$  kiáramlást a 6 hetes csoporthoz képest. Hasonló elváltozást találtunk a sovány – kontroll csoportban is.

## **2.3. A hexózamin anyagcsereút és az O-glikoziláció akut fokozásának hatása a szív anyagcseréjére.**

Célunk volt, hogy megmutassuk, hogy a GlcN megváltoztatja a szív energiháztartását a hexózamin anyagcsereút és az O-glikoziláció fokozásával. Ezért izolált patkányszíveket perfundáltunk  $^{13}C$ -jelölt szubsztrátokat és 0; 0,05; 0,1; 1,0; 5,0 és 10,0 mM GlcN tartalmú pufferekkel.  $^{13}C$ -izotopomer analízissel vizsgáltuk a szubsztrátok relatív arányát a trikarbixilsav ciklusba beépő teljes acetyl-CoA-ban. Western blot és HPLC méréseket használtunk az O-GlcNAc, ACC/foszfo-ACC, AMPK/foszfo-AMPK, UDP-GlcNAc és ATP méréséhez.

A szív működésére nem volt hatással a különböző koncentrációjú GlcN pufferrel történő 60 perces perfúzió. Az UDP-GlcNAc szinteket már akár az 0,05 mM-os GlcN is szignifikánsan emelte, a magasabb GlcN koncentrációk alkalmazása további növekedést okozott anélkül, hogy megváltoztatta volna a szív ATP koncentrációját. Az UDP-GlcNAc-ben látott változások jól korreláltak az O-GlcNAc-ban beállt változásokkal.

Az alacsony koncentrációjú GlcN-nal (0,05; 0,1 mM) való perfúzió szignifikáns O-GlcNAc emelkedéshez vezetett a kontroll (0 mM) szívekhez képest. Az 1,0 mM-os GlcN perfúzió további O-GlcNAc növekedést okozott és ezt tovább fokozta az 5,0 mM GlcN tartalmú puffer. Azonban a 10,0 mM GlcN tartalmú oldattal való perfúzió már nem fokozta az O-glikozilációt tovább.

Az alacsony (0,05; 0,1 mM) és a magas (5,0; 10,0 mM) koncentrációjú GlcN szív energiaháztartására való hatását vizsgálva azt találtuk, hogy a GlcN minden koncentrációban szignifikánsan megnövelte a palmitát oxidációját és csökkentette a szénhidrát felhasználást a kontroll csoporthoz hasonlítva. Már a 0,01 mM GlcN tartalmú puffer is a maximális elváltozást okozta az energiaháztartásban. A szénhidrátanyagcserében látott csökkenésért főleg a csökkent laktát oxidáció és a 0,1; 5,0 és 10,0 mM-os GlcN-nal részben a csökkent piruvát oxidáció volt felelős. A GlcN nem változtatta meg a glukóz oxidációt, vagy a laktát kiáramlását a kísérleteinkben.

Az ACC és AMPK foszforilációját összehasonlítva a 0 és 0,1 mM-os GlcN csoportban nem találtunk különbséget, míg a zsírsavoxidáció fokozódott a kezeléssel.

### **3.1. O-glikoziláció jelenléte human vesebiopsziás mintákban.**

Megvizsgáltuk, vajon az O-glikoziláció jelen van-e az emebri vese sejtjeiben. Immunhisztológiai módszerrel – egy O-glikozilációra specifikus antitestet (CTD110.6) használva - vizsgáltunk vesebiopsziás mintákat.

Elsőként sikerült kimutatnunk, hogy a humán vese sejtjei O-glikoziláltak. O-glikozilációra pozitív jelölést találtunk a glomerulusok podocytá sejtmagjaiban és a tubulus epithelsejtek sejtmagjaiban és citoplazmájában is.

A jelölésünk O-glikozilációra specifikusságának igazolására 20 mM N-acetilglukóزامint alkalmaztunk. Azt találtuk, hogy a 20 mM GlcNAc teljesen gátolta az antitest kötődését, ezáltal igazolva, hogy az immunjelölésünk specifikus volt.

### **3.2. O-glikoziláció és diabeteszes nephropathia.**

Feltételeztük, hogy a diabeteszes nephropathiás egyének veséjében az O-glikoziláció megemelkedett, ezért 2-2 diabeteszes és nem diabeteszes beteg vesebiopsziás mintáját hasonlítottuk össze. Korábban igazolt diabeteszes nephropathiában, vagy kontrollként - vékony bazálmembrán betegségben szenvedő egyén vesebiopsziás mintáját használva CTD110.6 immunhisztológiai vizsgálatot végeztünk.

Nem találtunk különbséget a glomerularis sejtek anti-O-GlcNAc festődés intracelluláris elhelyezkedésében a diabeteszes és nem-diabeteszes mintákat összehasonlítva. Nem volt különbség a tubulus epithelsejtek magjainak festődésében sem. Azonban szemben a nem-diabeteszes minták tubulus epithelsejtjeinek citoplazmájából hiányzó O-GlcNAc jelöléstől, a diabeteszes egyének tubulus epithelsejtjeinek citoplazmájában fokozott, granularis anti-O-GlcNAc festődést találtunk.

Azonban részletesebb vizsgálatok szükségesek, hogy az O-glikoziláció diabeteszes nephropathiában betöltött szerepére erősebb bizonyítékokat találjunk.

### **Megbeszélés:**

Egyre szélesebb körben elfogadott, hogy a jelátviteli utak egyik fontos szabályzója a citoplazma és a sejtmag fehérjék szerin és treonin aminosavainak O-glikozilációja. Korábban sejt kultúrás kísérletben igazolták, stressz hatására az O-glikoziláció megnő és ezen válasz fokozása megnöveli a stressz elleni toleranciát. Kimutattuk, hogy egy rövid ischaemiás periódus önmagában is fokozza a hexozamin anyagcserét és fokozott O-glikozilációhoz vezet izolált patkányszívben. Azonban hosszab ischaemiás epizódot követően az O-glikoziláció lecsökken és további csökkenés tapasztalható reperfúzió után.

Az szívben 50-10 perc ischaemia után nőtt az UDP-GlcNAc koncentráció. Mivel az OGT nagyon érzékeny az UDP-GlcNAc szintekre, az emelkedett UDP-GlcNAc koncentráció magyarázhatja a fokozott O-glikozilációt, habár az OGT aktivitás fokozódását sem tudjuk kizárni. A hexozamin anyagcserén átaramló glukóz mennyiségének növekedésének, és/vagy a más anyagcsereutak által csökkent felhasználásnak lehet következménye az UDP-GlcNAc szintekben látott emelkedés.

Habár az UDP-GlcNAc koncentráció tovább nő ischaemia alatt, az O-GlcNAc szint csökken a 30 perces ischaemiás periódus végére. Az UDP-GlcNAc és O-GlcNAc közti disszociáció felveti, hogy a fenntartott ischaemia gátolja az OGT-t, ami az O-glikoziláció további csökkenéséhez vezet reperfúzióban.

Az O-glikoziláció fokozása megnövelte a szív stressztűrő képességét izolált patkányszívben. A glukozamin normoxiában megemelte mind az UDP-GlcNAc, mind az O-GlcNAc szinteket, meggátolta a reperfúzió végén látható O-glikoziláció csökkenést és javította a szív ischaemia/reperfúzióját követő funkció visszatérését. Champattanachai mutatta ki, hogy az O-glikoziláció alloxánnal történő gátlása a GlcN

védőhatásának elvesztéséhez vezetett, mely megerősíti azt a nézetet, hogy a glukózamin szívvédő hatása az O-glikoziláció fokozásán alapul.

Az Akt és a MAPK jelátviteli utak, különösen a p38 MAPK és az ER1/2 aktivációja szerepet játszik a kardioprotekcióban. Kneass és Marchase igazolta, hogy sejt kultúrában az agonista indukálta MAPK válasz fokozódott az O-glikoziláció növelésének hatására. Mi azt találtuk, hogy a GlcN szignifikánsan mérsékelte a p38 MAPK ischaemia által indukálta foszforilációját, mely egybevág a korábbi közlésekkel, miszerint a p38 gátlása ischaemia alatt védő hatású. Érdekes azonban, hogy a reperfúzió végére a p38 fokozódott a GlcN kezelt csoportban. Az irodalomban fellelhető információ alapján a p38 pro-apoptotikus lehet, a caspase-3 vagy a p53 által, azonban a p38 védő hatású utakat is aktiválhat. Az  $\alpha$ -B crystallint és a HSP-27-et is szabályozza a p38, és mindkettőről igazolt, hogy szerepet játszanak az ischaemia elleni védekezésben. Kísérleteinkben a GlcN nem befolyásolta sem az ERK1/2, sem az Akt foszforilációját, egyik ischaemiás kondíció alatt sem. Ezen adatok által kizárhatjuk, hogy a GlcN védő hatása az ERK1/2, vagy az Akt jelátviteli út által lenne szabályozva. Továbbra adataink megerősítik azt az elképzelést, hogy az akut megnövelt O-glikoziláció védő hatású, és ezen hatás összefüggést mutat a p38 MAPK ischaemia/reperfúzióra adott megváltozott válaszával.

Habár kimutattuk, hogy az O-glikoziláció akut változásai védő hatásúak, krónikus változásairól azonban ismert, hogy szerepet töltenek be a korrall összefüggő betegségek kialakulásában. Rex-Mathes és munkatársai írták le, hogy 3 és 13 hónapos egerek agyában az O-glikoziláció korrall összefüggésben változik. Fiala felnőtt és agy patkányokat összehasonlítva azt találtuk, hogy korrall az O-glikoziláció megnő a szívben, az aortájában, az agyban és a harántcsíkolt izomban. Ezzel ellentmondásosan, az OGT szintje - mely szabályozza az O-glikozilációt - szignifikánsan csökkent az agy állatokban. A szívben a megnövekedett O-GlcNAc összefüggést mutatott a megemelkedett GFAT2 mRNS és UDP-GlcNAc szintekkel, mely jele lehet a fokozott hexózamin anyagcserűnek. Ez alapján a szívben található O-GlcNAc növekedése a 24 hónapos csoportban, részben a fokozott HBP következménye lehet. Másrészt nem találtunk különbséget sem a GFAT mRNS, sem az UDP-GlcNAc szintekben az agyban, vagy az izomban, annak ellenére, hogy az O-glikoziláció fokozott volt a 24 hónapos állatokban.

Korrall az OGT expressziója szignifikánsan csökkent minden vizsgált szervben, kivéve a harántcsíkolt izmot. Ez ellentmondásos azzal, hogy az O-GlcNAc emelkedett korrall, habár több faktor is, mint például a csökkent OGA aktivitás is hozzájárulhat az O-glikoziláció növekedéséhez. Szintén meg kell említenünk, hogy a 24 hónapos szívekben emelkedett OGA mRNS szinteket találtunk, azonban nem

szükségszerűen tükrözi a fehérjeszintet, mint ahogy azt mi is találtuk az OGT esetében. Sajnos, tekintettel a kereskedelmi forgalomban kapható OGA antitest hiányára, nem tudtuk megmérni az OGA expresszióját.

Ismert az a tény is, hogy az O-GlcNAc szerepet játszik a neurodegeneratív betegségek, mint például az Alzheimer betegség (AD) kialakulásában is. O-glikozilált fehérjék is érintettek az AD kialakulásának patomechanismusában, mint például a tau, a  $\beta$ -amyloid prekursor és a chlatrin assembly fehérje 3 és 180. Ezáltal megállapíthatjuk, hogy az O-glikoziláció hozzájárul az AD kialakulásához.

Egy másik érdekes megfigyelésként írtuk le, hogy az agg állatok inzulin rezisztensek voltak. A fokozott hexózamin anyagcserét és a megnövekedett O-GlcNAc szintek összefüggésben állnak az inzulin rezisztenciával és a diabéteszsel. Korábbi tanulmányok már leírták a hosszabb időtartamú 1-es típusú diabétes alatt fokozott O-GlcNAc és a kontraktilis dysfunctio közti kapcsolatot. Mi kimutattuk, hogy a 22 hetes korban – mikor a ZDF patkányok már hyperglycaemiások – a ZDF patkányok szívizomsejtjei szignifikánsan károsodott relaxációt és meglassult  $Ca^{2+}$  kiáramlást mutatnak a hasonló korú sovány, és a 6 hetes – leptin rezisztens – ZDF, még nem diabéteszes állatokéhoz képest is. A 22 hetes csoportokban a károsodott relaxáció összefüggött a megemelkedett össz-O-glikozilációval. A magasabb O-GlcNAc szintek következményei lehettek a megemelkedett UDP-GlcNAc koncentrációnak anélkül, hogy az OGT expresszió megváltozott volna., ezáltal azt sugalva, hogy a fokozott HBP lehet a fő oka a megemelkedett O-GlcNAc szinteknek. A 2-es típusú diabéteszben látott fokozott hexózamin anyagcsereút nemcsak a magas glukóz koncentráció következménye lehet, hanem a a 2-es típusú diabéteszre jellemző megemelkedett lipidszintek és csökkent LDH aktivitás által megváltoztatott glukózmetabolizmusnak is.

A 6 hetes - még nem diabéteszes - ZDF állatokhoz hasonlítva is károsodott relaxációt találtunk a 22 hetes ZDF csoportban, csakúgy, mint a 22 hetes sovány állatokhoz hasonlítva. Azonban az össz-O-GlcNAc szint csökkent a 6 hetes ZDF csoporthoz viszonyítva, mintegy eredményeként a csökkent OGT expressziónak. A 6 és 22 hetes sovány csoportokat összehasonlítva csakúgyan egy össz-O-GlcNAc és OGT szint csökkenést találtunk. Mind a négy csoportot egybevetve, függetlenül a leptin-szintektől és a kortól a hyperglycaemia összefüggést mutatott a fokozott O-glikozilációval.

Habár az össz-O-GlcNAc szintben csökkenést találtunk a 6 és 22 hetes ZDF csoportok közt, a diabéteszes állatokban szignifikáns növekedés volt kimutatható egy magas molekulásúlyú fehérje-sávon (>205 kDa). Hasonló molekulásúlyú fehérjék mutattak növekedést a 22 hetes ZDF állatokban, a 22 hetes sovány állatokkal

összehasonlítva. Felvethetjük tehát, hogy a károsodott szívizomsejt funkció összefüggést mutat magas molekulásúlyú fehérjék fokozott O-glikozilációjával, melyek lehetnek struktúr fehérjék, mint a titin, dystrophin, myosin, vagy akár metabolikus enzimek, amilyen a acetyl-CoA-karboxiláz 2.

Mások már felvetették, hogy a diabeteszes szívek károsodott funkciójáért a megváltozott anyagcsere is lehet felelős. Wang és munkatársai igazolták, hogy a ZDF patkányok szívében megváltozik az anyagcsere a sovány, nem diabeteszes állatokhoz képest. Egy közleményben publikált tanulmányban McClain csoportja írta le, hogy a hosszútávú aktiválása a hexózamin anyagcsereútnak növelte a palmitát felhasználását zsírsejtekben.

A GlcN fokozza a hexózamin anyagcsereútnak – kikerülve a GFAT-ot, mely a kulcs szabályzóenzime ezen anyagcsereútnak. Kimutattuk, hogy rövid – 60 perces – GlcN kezelés dóziszfüggően megemeli az UDP-GlcNAc és O-GlcNAc szinteket. Mint ahogy azt vártuk is, ilyen rövid GlcN kezelés nem volt hatással sem a szív működésére, sem az ATP koncentrációjára.

Már az akár 0,05 mM koncentrációjú GlcN rövid alkalmazása is csökkentette a szénhidrát felhasználást és növelte a zsírsav oxidációt. 0,1 mM GlcN használata tovább növelte az előbbieken leírt anyagcsere változásokat, azonban a GlcN koncentráció további emelése (1,0-10,0 mM) nem okozott további változást. Ang és munkatársai mutatták ki, hogy a 2-es típusú diabeteszben a szénhidrát felhasználás csökkenése zömében a csökkent laktát oxidáció eredménye volt, mivel a glukóz oxidáció nem változott. Mi is hasonló változásokat találtunk a szénhidrát oxidációban; a laktát és a piruvát oxidáció csökkent, míg a glukóz oxidáció nem változott.

Az AMPK központi szerepet tölt be a sejt energia és metabolikus homeosztázisának fenntartásában. Luo és munkatársai eredményei alapján krónikusan megnövelt hexózamin anyagcsereút fokozta az AMPK aktivitását és fokozott ACC foszforilációhoz vezetett, ezáltal növelve a zsírsav oxidációt. Mi szintén megvizsgáltuk az AMPK és ACC foszforilációját kontroll csoportban és 0,1 mM GlcN kezelést követően, azonban a kísérleteinkben nem volt különbség sem az AMPK sem az ACC foszforilációjában. A fentiekben leírt ellentmondásra magyarázatul szolgálhat, hogy a HBP akut és krónikus stimulációja más-más hatással bír.

Mindezen bizonyítékok alapján kijelenthetjük, hogy a megváltozott O-glikoziláció fontos szerepet játszik a diabeteszes cardiomyopathia kialakításában.

A fokozott HBP és O-glycosylatio egy másik diabeteszes szövödmény, a nephropathia, kialakulásában is részt vesz. Kimutatták, hogy a fokozott hexózamin anyagcsereút fokozott extracelluláris mátrix felszaporodáshoz és mind mesangium-, mind tubulus epithelsejt hypertrophiához vezet. Nerlich és munkatársai GFAT

pozitivitást írtak le humán autopsiás mintákból a vese tubulus epithesejtekben, valamint diabeteses mintákban fokozott GFAT jelölődés volt jelen a glomerulusok mesangium- és epithelsejtjeiben.

A rendelkezésre álló irodalom többsége a hexózamin anyagcsereút szerepét vizsgálta DNP-ben, azonban nagyon kevés információt ismerünk az O-glikozilációról a vesében.

Nekünk sikerült elsőként kimutatni, hogy humán vesebiopsziás mintákban jelen van az O-glikoziláció a glomerulusok és a tubulusok sejtjeiben is. CTD110.6 pozitív granuláris jelölést találtunk a tubulus epithelsejtek citoplazmájában. A proximális kanyarulat csatornában történik a glukóz reabszorpciója. Diabetesben a glukózuria lehet jelen, fokozódik a tubulussejtek glukóz visszaszívása, mely emelkedett intracelluláris glukóz koncentrációt okoz. A rendelkezésre álló glukóz fokozza a hexózamin anyagcsereútát – emeli az UDP-GlcNAc tartalmat – és több szubsztrátot szolgáltat az OGT-nek, így vezetve a fokozott O-glikozilációhoz a citoplazmában.

A vizsgálataink bizonyítékokat szolgáltatnak arra, hogy az O-GlcNAc fontos szerepet játszik a sejt szabályozó folyamataiban. Ezen folyamat akut aktiválása sejtvédő hatású, míg a krónikusan fokozott HBP és O-glikoziláció részt vesz az öregedéssel összefüggő betegségek, mint a diabetes és diabeteses szövődmények kialakulásában.

### **Tézisek:**

1. Anyagcsereutak aktiválódásai, melyek fokozott O-glikozilációhoz vezetnek, belső stressz reakcióként működnek, és ezen utak erősítése fokozott stressz tűrőképességhez vezet patkányszívben.
  - Izolált patkányszívben az ischémia önmagában fokozza a hexózamin anyagcsereútát és növeli az O-glikozilációt.
  - Az O-glikoziláció fokozása glukózamin használatával fokozott toleranciához vezetett ischemia/reperfúziós károsodással szemben és összefüggést mutat a módosult p38 MAPK aktivációval.
2. Patkányok agyában, harántcsíkt izomzatában, aortájában és szívében korral megnövekszik az O-glikoziláció. A fokozott O-glikoziláció nem a szabályozó enzimek (OGT, OGA) megváltozott expressziójának következménye, ellenben összefüggést mutat a GFAT fokozott expressziójával és a fokozott hexózamin anyagcsereúttal az idős patkányok szívében.



3. Összefüggést van a szívben a diabetes által fokozott O-glikoziláció és szív anyagcsereváltozásai, valamint az excitáció-kontrakció kapcsolás közt.
  - A 2-es típusú diabetes kialakulása excitáció-kontrakció kapcsolás károsodásához vezet, és ez összefüggést mutat a fokozott hexózamin anyagcsereúttal és a következményesen fokozott O-glikozilációval, különösen a magas molekulásúlyú fehérjéken.
  - Glukózamin alkalmazásával fokozva az O-glikozilációt, a szívben csökken a szénhidrát és növekszik a zsírsav felhasználás. Ezen az elváltozások hasonlóak a 2-es típusú diabeteses patányokban látottakhoz.
  - A patkányszívben látott anyagcsere elváltozások nem mutatnak összefüggést sem az AMPK, sem az ACC aktivációjával.
4. Az O-glikoziláció jelen van az emberi vesében és összefüggés volt kimutatható az fokozott O-glikoziláció és a diabeteses nephropathia közt.
  - O-glikoziláció jelen van mind a diabeteses, mind a nem diabeteses egyének vesebiopsziás mintáiban a glomerulusok és a tubulusok sejtejében.
  - A diabeteses nephropathia összefüggést mutat a glomerulusok és a tubulusok sejtejében található fokozott O-glikozilációval.

### **Publikációk:**

1. **Fülöp N**, Marchase RB, Chatham JC: *Role of protein O-linked N-acetyl-glucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system.* Cardiovasc Res 73:288-297, 2007.
2. **Fülöp N**, Mason MM, Dutta K, Wang P, Davidoff AJ, Marchase RB, Chatham JC: *Impact of Type 2 diabetes and aging on cardiomyocyte function and O-linked N-acetylglucosamine levels in the heart.* Am J Physiol Cell Physiol 292:C1370-1378, 2007.
3. **Fülöp N**, Zhang Z, Marchase RB, Chatham JC: *Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased O-linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 292:H2227-2236, 2007.
4. Nőt LG, Marchase RB, **Fülöp N**, Brocks CA, and Chatham JC: *Glucosamine administration improves survival rate after severe hemorrhagic shock combined with trauma in rats.* Shock 28: 345-352, 2007.
5. **Fülöp N**, Chatham JC, Wittmann I: *A hexózamin anyagcsereút és az O-glikoziláció összefüggése a diabeteses anyagcserezavarral és szövődményeivel.* Diabetologia Hungarica 15(2):115-122, 2007.
6. **Fülöp N**, Degrell P, Pajor L, Chatham JC, Wittmann I: *Nephropathia diabetica és O-glikoziláció.* Hypertonia és Nephrologia 6: 320-326 , 2007
7. **Fülöp N**, Feng W, Xing D, He K, Nőt LG, Brocks CA, Miller AP, Chatham JC: *Aging leads to increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine levels in heart, aorta, brain and skeletal muscle in Brown-Norway rats.* Biogerontology 9:139-151, 2008.

8. Chatham JC, Nót LG, **Fülöp N**, and Marchase RB: *Hexosamine Biosynthesis and Protein O-Glycosylation: the First Line of Defense against Stress, Ischemia, and Trauma*. Shock 29:431-440, 2008.

### **Konferenciák:**

1. **Fülöp N**, Wang P, Marchase RB, Chatham JC: *Diabetes, the Hexosamine Biosynthesis Pathway, Protein O-glycosylation in the Heart*, XVIII. World Congress of the International Society of Heart Research, 2004 Brisbane, Australia
2. **Fülöp N**, Wang P, Marchase RB, Chatham JC: *Effects of Glucosamine on the Isolated Rat Heart*, Experimental Biology, 2005 San Diego, USA
3. **Fülöp N**, Marchase RB, Chatham JC: *Glucosamine-induced cardioprotection mediated by the hexosamine biosynthesis pathway and increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins*, 3<sup>d</sup> Annual Meeting of the Society of Heart and Vascular Metabolism, 2005 Oxford, UK
4. **Fülöp N**, Marchase RB, Chatham JC: *Glucosamine-induced cardioprotection mediated by the hexosamine biosynthesis pathway and increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine on nuclearcytoplasmic proteins*, 2<sup>nd</sup> Annual Symposium of the American Heart Association Council, 2005 Keystone, USA
5. **Fülöp N**, Davidoff A, Wang P, Marchase RB, Chatham JC: *The impact of diabetes and age on the regulation of the levels of O-linked N-acetylglucosamine in the heart*, 2006 Experimental Biology, San Francisco, USA
6. **Fülöp N**, Mason MM, Dutta K, Wang P, Davidoff AJ, Marchase RB, Chatham JC: *The impact of type-2 diabetes on cardiomyocyte function and O-linked N-acetylglucosamine modified proteins*, 4<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Heart and Vascular Metabolism, 2006 Semiahmoo, USA
7. **Fülöp N**, Nót LG, Brocks CA, Marchase RB, Chatham JC: *The impact of ageing on the hexosamine biosynthesis pathway and on O-linked N-acetylglucosamine modified proteins*, 4<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Heart and Vascular Metabolism, 2006 Semiahmoo, USA
8. **Fülöp N**, Feng W, Xing D, He K, Nót LG, Brocks CA, Miller AP, Chatham JC: *The effect of ageing on the hexosamine biosynthesis pathway and on O-linked N-acetylglucosamine levels in rats*, 2007 Experimental Biology, Washington DC, USA
9. **Fülöp N**, Onay-Besikci A, Laczy B, Marchase RB, Chatham JC: *Regulation of cardiac substrate utilization by protein O-glycosylation*, XIX. World Congress of the International Society of Heart Research, 2007 Bologna, Italy
10. Cseh J., **Fülöp N**, Degrell P, Pajor L, Chatham JC, Wittmann I: *O-glycosylation is increased in the tubuli and glomeruli of patients with diabetic nephropathy*, 2008 Experimental Biology, San Diego, USA.

### **Köszönetnyilvánítás:**

**Clarence M. Forrest**-nek ajánlom ezen munkámat, aki sajnos a közelmúltban elhagyott bennünket. Barátsága mellett kitűnő oktatója volt az állatsebészetnek és nagyszerű segítséget jelentett technikai problémáim leküzdésében is. Emlékét meleg szívvel őrzöm.

Ezúton szeretném kifejezni hálámat **Prof. Wittmann Istvánnak**, hogy befogadott a kitűnő kutatócsoportjába és támogatott mind a tudományos mind a klinikai munkámban. Segítsége nélkül nem tudtam volna elérni ezen eredményeket.

Nagyon hálás vagyok **Prof. John C. Chatham**-nek aki megadta a lehetőséget hogy az alap kutatásban dolgozhassam és köszönet a soha nem szűnő bátorításáért. A tanácsai és támogatása jelenleg is sokat jelent nekem.

Külön köszönet **Charlye A. Brocks**-nak a barátságáért és az erőfeszítése miatt, mellyel mind a munkahelyemen, mind a magánéletben kellemessé tette a birminghami tartózkodásomat.

Köszönöm **Prof. Nagy Judit**-nak és **Prof. Richard B. Marchase**-nek, hogy biztosították a körülményeket és a támogatást a tudományos munkámhoz.

Hálás vagyok továbbá barátaimnak és kollégáimnak **Sue Marsh**-nak, **Nagy Tamás**nak és **Nőt Lászlónak** a támogatásukért és a munkámhoz való hozzájárulásukért.

Köszönetet kell mondjak **társszerzőimnek** és **Zachary T. Kneass**-nek, valamint **Vorrarat Champattanachai**-nak az értékes tanácsaikért és az összes **kollégáimnak** a II.sz. Belgyógyászati Klinikán és Prof. Richard B. Marchase és Prof. John. C. Chatham laboratóriumaiban a munkámhoz való hozzájárulásukért.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm a **családomnak** és **barátimnak**, az ő folyamatos támogatásuk és bátorításuk nélkül nem lettem volna képes elérni a céljaimat.