

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie



Bc. Kateřina Bittenglová

**Studium vybraných aspektů modifikace proteinů
pomocí β -N-acetylglukosaminu
Study of selected aspects of protein modification
by β -N-acetylglucosamine**

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Hansíková, CSc.

magisterský studijní program Biochemie

**Pracoviště: Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch,
KDDL 1. LF UK a VFN**

Praha, 2019

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Hany Hansíkové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

Místo a datum:

Podpis:

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za možnost realizace mé diplomové práce v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch a za její cenné rady a připomínky. Poděkování patří také RNDr. Václavu Čapkovi, PhD. za pomoc při vytváření statistické analýzy. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Křížové a RNDr. Nině Ondruškové, PhD. za výborné zaučení do dané problematiky a za jejich bystré postřehy. Má vděčnost patří i celému kolektivu laboratoře za vytváření přátelského prostředí a ochotu podat vždy pomocnou ruku. Závěrem děkuji rodině i přátelům za dobrovolnou účast v praktické části výzkumu, jakožto i za jejich podporu při vzniku této práce.

Tato práce byla podporována grantovými projekty: AZV MZ 16-31932A,
RVO-VFN64165 a SVV-UK260367

Abstrakt

O-glykosylace pomocí β -N-acetylglukosaminu (O-GlcNAc) je posttranslační modifikace proteinů, regulovaná β -N-acetylglukosaminyltransferasou (OGT) a β -N-acetylglukosaminidasou (OGA). Tato intracelulární glykosylace se podstatně liší od ostatních typů, je dynamicky regulována podobně jako fosforylace, β -N-acetylglukosamin hraje roli výživového a stresového senzoru v buňce. Chronicky dysregulovaná O-GlcNAcylyace je spojována s patogenezi řady chorob, jako je např. diabetes mellitus II. typu, onkologická a neurodegenerativní onemocnění. Expresi enzymů OGT i OGA je velmi citlivá na změny v homeostáze GlcNAc, který je syntetizován z glukosy prostřednictvím hexosaminové biosyntetické dráhy. Změny v expresi enzymů OGT a OGA by mohly být využity jako potenciální krevní markery např. pro časný diabetes.

Cílem diplomové práce bylo studovat změny v expresi genů kódujících enzymy OGT i OGA v souboru pacientů s obezitou ve srovnání s kontrolami a porovnat stav před a po úpravě životního stylu (redukci váhy). Analyzovaný soubor tvořilo 34 vzorků izolovaných lymfocytů z periferní krve od obézních dospívajících a 80 vzorků od dospělých pacientů. RNA byla izolována pomocí TriReagentu, kvantifikace exprese mRNA byla provedena metodou qPCR.

Analýza dat v souboru obézních dospívajících pacientů neprokázala signifikantní rozdíl relativní genové exprese *OGT* v porovnání s kontrolami. Po úpravě životního stylu v testované skupině obézních dospívajících byl pozorován klesající trend exprese genu pro OGT v čase. Studium propojení O-GlcNAcylyace s definovanými metabolickými stavy by mohlo usnadnit nalezení diagnostických a monitorovacích markerů a rozšířit naše znalosti o patofyziologii chronických onemocněních.

Klíčová slova: β -N-acetylglukosamin, β -N-acetylglukosaminyltransferasa, β -N-acetylglukosaminidasa, diabetes, výživa

Abstract

Glycosylation O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is post-translational modification of proteins, regulated by β -N-acetylglucosaminyltransferase (OGT) and β -N-acetylglucosaminidase (OGA). This intracellular glycosylation differs from the other glycosylation types – it is dynamically regulated, similarly to phosphorylation, β -N-acetylglucosamine serves as a nutrient and stress sensor in cell. Chronically dysregulated O-linked glycosylation by GlcNAc is associated with pathology of various diseases, such as diabetes mellitus type II, oncological and neurodegenerative diseases. Expression of enzymes OGT and OGA is very sensitive for homeostasis of GlcNAc, which is the product of hexosamine biosynthetic pathway. Changes in expressions of these enzymes could be used as a potential blood marker, e.g. in early stage of diabetes.

The aim of this master thesis was to study changes in expression of genes encoding enzymes OGT and OGA in cohort of obese patients in comparison with healthy controls and also to compare the state before and after change of lifestyle (loosing weight). Analysed cohort comprised of 34 samples of isolated lymphocytes from peripheral blood from obese adolescent patients and 80 samples of adults patients. RNA was isolated by TriReagent, quantification of the expression of mRNA was measured by qPCR.

Analysis of relative gene expression of *OGT* in obese adolescent cohort did not revealed any significant diferencies in comparison with controls. There was seen descending trend in expression of *OGT* during the time in obese adolescent group after change of healthy lifestyle. Study of connection of O-GlcNAc glycosylation with defined metabolic state could simplify finding of diagnostic and monitoring markers and also broaden our knowledge about pathophysiology of chronical diseases.

Key words: β -N-acetylglucosamin, β -N-acetylglucosaminyltransferase, β -N-acetylglucosaminidase, diabetes, nutrition

Obsah

1. Teoretický úvod.....	14
1.1 Charakterizace O-glykosylace pomocí β -N-acetylglukosaminu	14
1.2 N-acetylglukosamin.....	16
1.3 Charakterizace klíčových enzymů	19
1.3.1 N-acetylglukosaminyltransferasa	19
1.3.2 β -N-acetylglukosaminidasa	20
1.4.1 Vztahy mezi glykosylací pomocí O-GlcNAc a fosforylací.....	21
1.4.2 Komplex OGT s fosfatasou	22
1.5 Patologie O-GlcNAc glykosylace.....	23
1.5.1 Alzheimerova choroba.....	24
1.5.2 Působení stresových faktorů	24
1.5.3 Diabetes mellitus II. typu	25
1.5.3.1 Signální kaskáda inzulinu	26
1.5.4 Testování úrovně glykosylace pomocí O-GlcNAc jakožto potenciálního markeru u diagnostiky Diebetu mellitu 2. typu	30
2. Cíle práce	32
3. Experimentální část	33
3.1 Materiál.....	33
3.1.1 Přístroje.....	33
3.1.2 Chemikálie.....	34
3.1.3 Soubor a biologický materiál.....	35
3.2.1 Izolace lymfocytů z periferní krve	37
3.2.2 Izolace RNA z lymfocytů	37
3.2.3 Měření koncentrace RNA.....	38
3.2.4 Ošetření DNAsou	38
3.2.5 Měření koncentrace RNA.....	39
3.2.6 Reverzní transkripce	39
3.2.7 qPCR.....	40
3.2.8. Vyhodnocení.....	41

3.2.9 Statistické vyhodnocení	41
4. Výsledky.....	42
<i>4.1 Měření koncentrace RNA</i>	<i>45</i>
<i>4.2 Hodnoty Ct a relativní genová exprese</i>	<i>50</i>
<i>4.3 Statistické zpracování souboru vzorků od dospívajících obézních pacientů</i>	<i>62</i>
5. Diskuse	65
6. Souhrn.....	69
Literatura	70
Příloha.....	79
<i>Prezentace na konferencích</i>	<i>79</i>

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Přehled analyzovaného souboru	35
Tabulka č. 2: Počty odběrů v jednotlivých časových bodech.....	36
Tabulka č. 3: Vstupní klinická data souboru dospívajících obézních.....	36
Tabulka č. 3: Naměřené koncentrace a čistoty RNA izolované z lymfocytů a po ošetření DNasou pro všechny vzorky	45
Tabulka č. 4: Naměřené hodnoty Ct a relativní genová exprese pro jednotlivé geny u dospělých pacientů a kontrol	52
Tabulka č. 5: hodnoty Ct a relativní genová exprese pro jednotlivé geny u dospívajících obézních pacientů a kontrol.....	55
Tabulka č. 7: Antropometrická analýza vybraných parametrů u 2 vybraných pacientů	64

Seznam obrázků a grafů

Obrázek č. 1: Schéma cyklické biosyntézy a hydrolytického rozpadu O-GlcNAc glykoproteinu.	15
Obrázek č. 2: Biosyntéza N-acetylglukosaminu hexosaminovou dráhou.	18
Obrázek č. 3: Schéma vzájemného působení mezi O-GlcNAc glykosylací a fosforylací...23	
Obrázek č. 4: Ovlivnění signální kaskády inzulinu zvýšenou glykosylací O-GlcNAc na příkladu tukové tkáně.....	29
Obrázek č. 5: Časová osa odběrů.....	36
Graf č. 1: Ukázka kalibrační křivky pro sledovaný <i>OGT</i> (A) a referenční gen <i>PSMB6</i> (B) závislost rozdílu fluorescence na cyklu	50
Graf č. 2: Kalibrační křivka genu sledovaného genu <i>MGEA5</i> (A) a referenčního genu <i>HPRT1</i> (B) závislost rozdílu fluorescence na cyklu	51
Graf č. 3: Relativní genová exprese <i>OGT</i> u dospělých pacientů a kontrol.....	57
Graf č. 4: Relativní genová exprese <i>MGEA5</i> u dospělých pacientů a kontrol.....	58
Graf č. 5: Relativní genová exprese <i>OGT</i> (A), resp. <i>MGEA5</i> (B) dospívajících obézních pacientů a kontrol.....	59
Graf č. 6: Ukázka exprese genů <i>OGT</i> a <i>PSMB6</i> pro vybraného pacienta a kontroly	60
Graf č. 7: Ukázka exprese genů <i>MGEA5</i> a <i>HPRT1</i> pro vybraného pacienta a kontroly	61
Graf č. 8: Relativní genová exprese <i>OGT</i> v souboru dospívajících obézních a kontrol.....	62
Graf č. 9: Relativní genová exprese <i>MGEA5</i> v souboru dospívajících obézních a kontrol	62
Graf č. 10: Relativní genová exprese <i>OGT</i> dospívajících obézních pacientů v čase.....	63
Graf č. 11: Relativní genová exprese <i>MGEA5</i> dospívajících obézních pacientů v čase.....	63

Seznam zkratek

A-M0	obézní dospívající při první návštěvě lékaře
A-M6	obézní dospívající 6 měsíců po první návštěvě lékaře
A-M12	obézní dospívající 12 měsíců po první návštěvě lékaře
Acetyl CoA	acetylkoenzym A
AK	dospívající kontrola
AKT	proteinkinasa B
ATP	adenosintrifosfát
BMI	index tělesné hmotnosti, z angl. „body mass index“
BSA	hovězí sérový albumin, z angl. „bovine serine albumin“
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
Ct	cyklus, kdy hodnota fluorescence překročí práh pozadí, z angl. „cycle of threshold“
CTD	C-terminální doména
DMII	diabetes mellitus 2. typu
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Fruc-6-P	fruktosa-6-fosfát
FSB	pufr pro reverzní transkripci, z angl. „frozen storage buffer“
G6PI	glukosa-6-fosfátisomerasa
GAPDH	glyceraldehyd-3-P-dehydrogenasa

GFAT	glutamin:fruktosa-6-P-aminotransferasa
GK	N-acetylglukosaminkinasa
Glc	glukosa
GlcNAc	N-acetylglukosamin
GlcNAc-1-P	N-acetylglukosamin-1-fosfát
GlcNAc-6-P	N-acetylglukosamin-6-fosfát
GlcN-6-P	glukosamin-6-fosfát
Glc-6-P	glukosa-6-fosfát
GLUT4	glukosový transporter 4
GS	glykogensyntasa
GSK3β	podjednotka beta glykogensyntasykinasy
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HBP	hexosaminová biosyntetická dráha
HDL	vysokohustotní lipoprotein, z angl. „high density lipoprotein“
HK	hexokinasa
<i>HPRT1</i>	gen pro hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasu 1
HSP	protein teplotního šoku, z angl. „heat shock protein“
IR	receptory pro inzulin
IRS	receptory inzulinového substrátu
K	dospělá kontrola
<i>MGEA5</i>	gen pro N-acetylglukosaminidasu, z angl. „meningioma-expressed antigen 5“
nd	nebylo odebíráno

O-M0	obézní dospělý po redukci váhy, první návštěva lékaře
O-M6	obézní dospělý, druhá návštěva lékaře, 6 měsíců po úpravě životního stylu
O-M12	obézní dospělý 12 měsíců po úpravě životního stylu
O-MX	obézní dospělý při první návštěvě s maximální tělesnou hmotností
OGA	N-acetylglukosaminidasa
O-GlcNAc	O-glykosylace přes N-acetylglukosamin
OGT	N-acetylglukosaminyltransferasa
p85	regulační podjednotka fosfatidylnositol-3-kinasy
p110	katalytická podjednotka fosfatidylnositol-3-kinasy
PBS	fosfátový pufr, z anl. „phosphate buffered saline“
PDK	proteindependentní kinasa
PGM3	fosfoglukomutasa 3
PI3K	fosfatidylnositol-3-kinasa
PP1β	beta isoforma fosfatasy 1
PP1γ	gama isoforma fosfatasy 1
Pro	prolin
PSMB6	gen pro podjednotku beta proteasomu 20S, z angl. „proteasome subunit beta type 6“
PUGNAc	O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosylidin)amino-N-fenylkarbamát
qPCR	polymerasová řetězová reakce, z angl. „qantitative polymerase chain reaction“
Rn	normalizovaná fluorescence

RNA	ribonukleová kyselina
Ser	serin
SNP	(jednonukleotidový polymorfismus, z angl. „single-nucleotide polymorphism“)
STAT	protein signální transdukce a aktivátor transkripce 5
TBP	gen pro TATA-Box vázající protein, z angl. „TATA-Box binding protein“
TGA	triacylglyceroly
Thr	threonin
UDP-β-N-acetylglukosamin	uridintrifosfát- β -N-acetylglukosamin
UTP	uridintrifosfát
UGPi	UDP-GlcNAc-pyrofosforylase

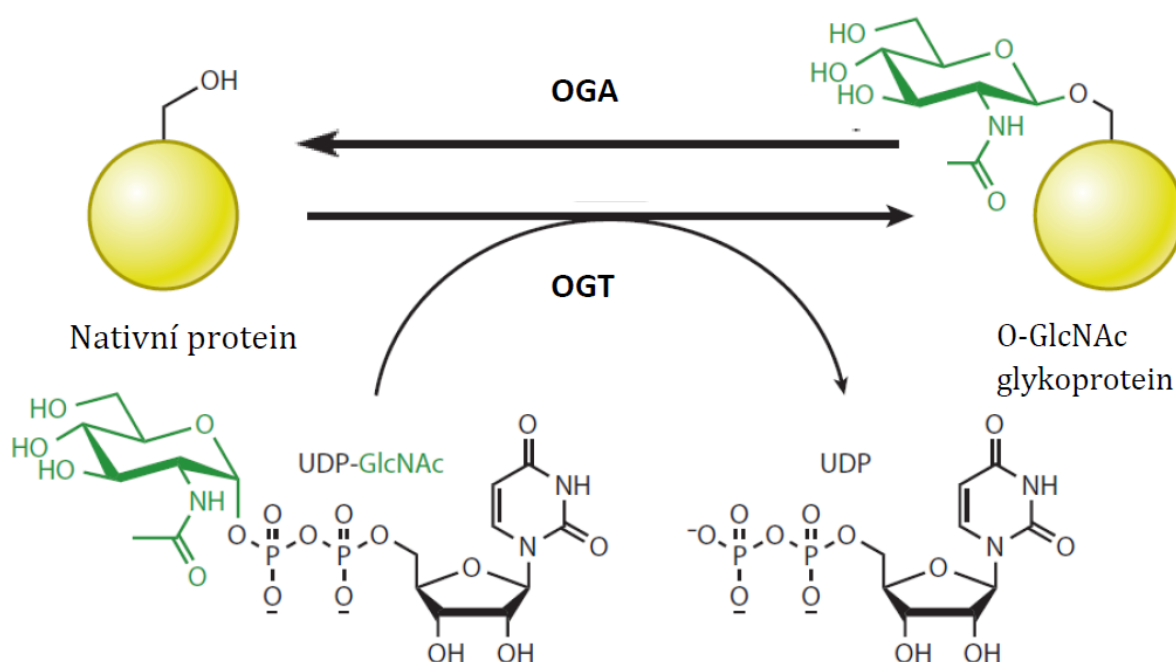
1. Literární úvod

1.1 Charakterizace O-glykosylace pomocí β -N-acetylglukosaminu

Posttranslační modifikace proteinů vzniklá kovalentní vazbou mezi N-acetylglukosaminem (GlcNAc) a jednou z aminokyselin s hydroxylovým zbytkem, serinem nebo threoninem, se zkráceně nazývá O-GlcNAc (z angl. “O-GlcNAcylation”) a patří do skupiny O-glykosylací. Takto vzniklé glykoproteiny se nacházejí primárně v cytosolu, specifikem tohoto typu je lokalizace také v jádře a mitochondriích [1]. Tato modifikace byla objevena před více než 30 lety a její objev způsobil narušení dosud uznávaného dogmatu, podle kterého lokalizace glykoproteinů byla omezena pouze na lumenární prostor sekrečních organel, buněčný povrch a na extracelulární matrix [2]. U savčích eukaryot bylo dosud objeveno více než 500 proteinů glykosylovaných vazbou přes N-acetylglukosamin a dá se očekávat, že jejich seznam dále rapidně poroste. Pyšní se mnoha rozmanitými funkcemi zahrnujícími většinu procesů buněčného metabolismu. Účastní se při syntéze proteinů včetně transkripce v jádře či translace na ribozomech, pohybu cytoskeletálních filament, jako jsou aktin a myosin, při degradaci proteinů, signální transdukcii, podílí se na mitochondriální bioenergetice jako kinasy a různé metabolické enzymy, dále na procesech v průběhu buněčného cyklu a buněčné lokalizace. Mimo lidské buňky se mohou vyskytovat jako součást virových a parazitních proteinů [1,3–5].

Dalším specifikem tohoto typu glykosylace je skutečnost, že k polypeptidickému řetězci je připojována pouze jedna monosacharidová jednotka, N-acetylglukosamin. Tím se výrazně odlišuje od ostatních glykosylací, kdy je protein modifikován větším počtem monosacharidů, které mohou vytvářet složitější větvené struktury. Třetím charakteristickým znakem této glykosylace je přísná regulace biosyntézy glykoproteinu, která je umožněna pouze pomocí dvou enzymů. N-acetylglukosamin je během života proteinu mnohokrát připojován a odpojován v závislosti na stavu, ve kterém se daná buňka nachází [1]. Z tohoto pohledu se O-GlcNAc modifikace více podobá fosforylaci než ostatním typům glykosylací. V některých případech spolu tyto dvě posttranslační modifikace mohou soutěžit o jedno vazebné místo na polypeptidu [6,7]. Cyklická biosyntéza a degradace vzniklého glykoproteinu probíhá dynamicky řízením N-acetylglukosaminyltransferasy (OGT), která katalyzuje vznik glykoproteinu, a N-acetylglukosaminasy (OGA), katalyzující hydrolytickou degradaci [1]. Tyto dva děje

jsou znázorněny na obr. č. 1, strana 15. Výsledný glykoprotein má navázaný N-acetylglukosamin v poloze β , to znamená, že poloacetálový hydroxyl v poloze C1 směřuje nahoru [8]. OGT je invertní enzym, to znamená, že nezachovává původní konformaci na C1 monosacharidu, přeměňuje tak α polohu hydroxylové skupiny na vazbu β , kterou je vázán polypeptidický řetězec [9]. Aby mohla vzniknout kovalentní vazba β -N-acetylglukosaminu na serin nebo threonin proteinu, musí být monosacharid nejprve aktivovaný nukleotidem. Výsledný substrát pro OGT je ve formě vysokoenergetického UDP- α -GlcNAc [1].



Obrázek č. 1: Schéma cyklické biosyntézy a hydrolytického rozpadu O-GlcNAc glykoproteinů. Převzato a upraveno z [9]

Nativní protein může být v cytoplasmě, v jádře nebo mitochondriích glykosylován N-acetylglukosaminem v poloze hydroxyskupiny serinu nebo threoninu. Reakci katalyzuje enzym N-acetylglukosaminyltransferasa, jehož substrátem je aktivovaný monosacharid. Hydrolytický rozpad glykoproteinů katalyzuje N-acetylglukosaminidasa.

Zkratky: OGT – N-acetylglukosaminyltransferasa, OGA – N-acetylglukosaminidasa, UDP-GlcNAc – uridindifosfát-N-acetylglukosamin, UDP – uridindifosfát

Dosud bylo rozklíčováno přibližně 50 glykosylačních motivů. Mezi dva nejčastější motivy patří sekvence aminokyselin v pořadí Pro-Val-Ser, která se vyskytuje u 50 % O-GlcNAc glykoproteinů. Tento motiv rozpoznává také prolin specifická kinasa [3]. Další

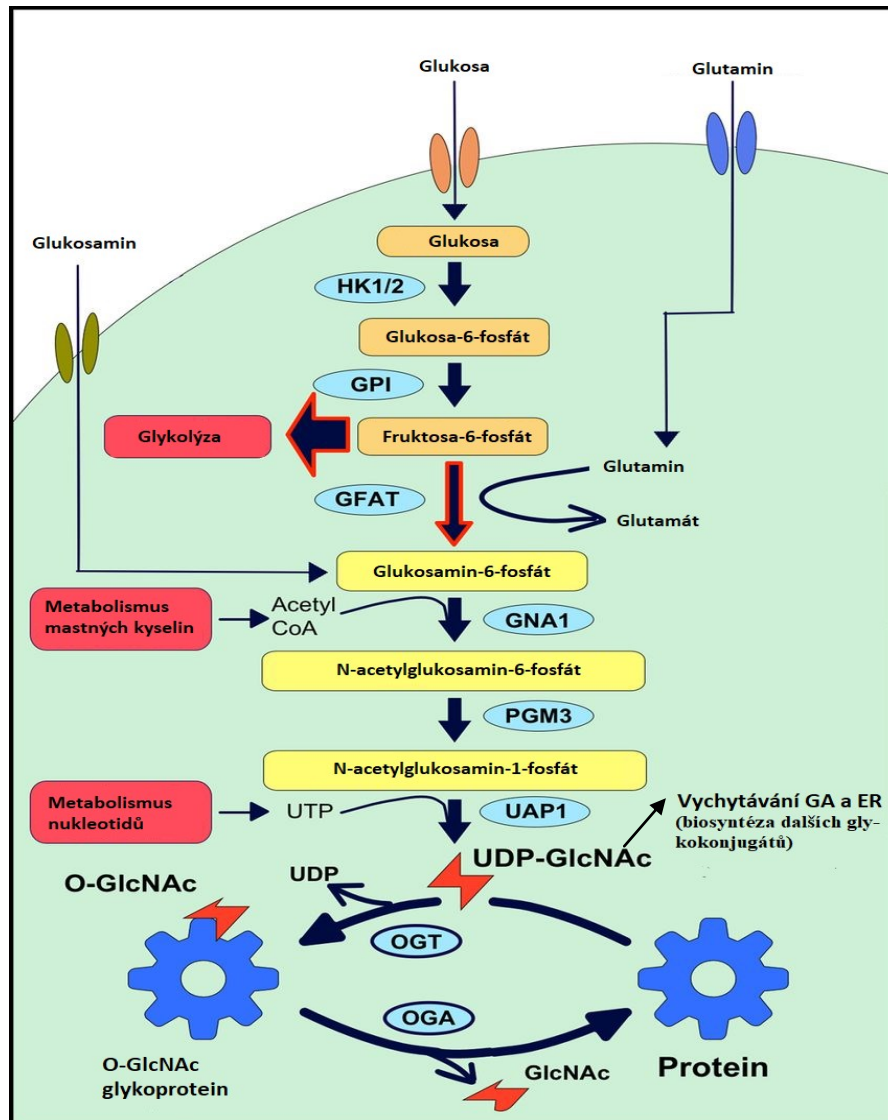
častý aminokyselinový motiv tvoří sekvence označována jako „PEST“, v pořadí aminokyselin Pro-Glu-Ser-Thr, která je často spojována s degradací proteinu. Nabízí se hypotéza, že glykosylace má zde funkci ochrany před degradací proteinu nebo jejímu zpomalení [10].

Na příkladu proteinu Stat5 - z rodiny STAT proteinů (signální transdukce a aktivátory transkripce) byl popsán vliv glykosylace pomocí O-GlcNAc na regulaci signálních kaskád. Tyto cytosolární proteiny zprostředkovávají buněčnou odpověď po vazbě ligandu, kterým mohou být hormony, cytokiny, nebo růstové faktory. Po vazbě hormonu na receptor je Stat5 aktivován fosforylací tyrosinu, dimerizuje a je translokován do jádra, kde se váže na DNA promotorové elementy a indukuje tak genovou transkripci. Protein je glykosylován po vstupu do jádra, musí mít však zároveň fosforylovaný tyrosin. Pouze tak může být Stat5 protein navázán na koaktivátor transkripce. V případě, kdy protein postrádá glykosylaci v daném místě, nemůže pak proběhnout interakce s koaktivátorem transkripce [11].

1.2 N-acetylglukosamin

Hladina substrátu, UDP-N-acetylglukosaminu, určuje, zda je aktivována OGT, a probíhá tak syntetická dráha, nebo zda je aktivována dráha degradační pomocí enzymu OGA [1]. Koncentrace N-acetylglukosaminu je ovlivňována mnoha faktory, působí na ni stresové situace, důležitý faktor hraje stravování a různé environmentální faktory. V porovnání s ostatními aktivovanými monosacharidy se jeho hladina výrazně mění v závislosti na stavu, ve kterém se daná buňka nachází [12]. N-acetylglukosamin působí tedy jako nutriční a stresový senzor v buňce [5]. N-acetylglukosamin je výsledkem syntézy hexosaminové biosyntetické dráhy (HBP, znázorněna na obr. č. 2, strana 18), na jejímž počátku stojí glukosa, dusíkatá část pochází z amidové skupiny glutaminu a acetyl z acetylkoenzymu A. Jeho zdrojem jsou všechny základní složky lidské stravy, jako jsou proteiny, které jsou rozštěpeny v trávicím traktu na jednotlivé aminokyseliny včetně glutaminu, lipidy, z jejichž konce mastných kyselin se postupně uvolňují jednotlivé acetylové skupiny ve formě acetylkoenzymu A, a konečně sacharidy, jejichž základní jednotku tvoří glukosa [8,13].

Hexosaminová dráha má společné počáteční kroky s glykolýzou, začíná vstupem šestiuhlíkatého monosacharidu - glukosy do buňky přes glukosový transporter, který je specifický pro jednotlivé typy tkání. GLUT4 je specifický pro tukovou a svalovou tkáň [14]. Přenáší glukosu do buňky, kde je následně fosforylována a přesmykem vzniká fruktosa-6-P. V tomto bodě může být fruktosa-6-P dále přeměněna dalšími glykolytickými reakcemi až na pyruvát, nebo může pokračovat syntéza hexosaminů [15]. Tato biosyntetická dráha je aktivována ve 2-3 % z celkového příjmu glukosy buňkou [16]. Zde podobnost s glykolýzou končí a následuje transaminační reakce s glutaminem katalyzovaná enzymem glutamin:fruktosa-6-P-aminotransferasou. Vzniklý glutamin-6-P reaguje s acetylkoenzymem A za vzniku N-acetylglukosamin-6-P, ten se přesmykuje na epimer N-acetylglukosamin-1-P, který je následně aktivován nukleotidem UTP. Vzniká substrát pro OGT – UDP-N-acetylglukosamin [17]. Z této dráhy je patrné, že s rostoucím množstvím glukosy roste i hladina N-acetylglukosaminu, který je doprovázen zvýšenou frekvencí glykosylace pomocí O-Glc-NAc a následně vzniklým glykoproteinem. OGT je tedy silně závislá na koncentraci substrátu, která se pohybuje v rozsahu koncentrací od jednotek nM po 50 mM. Při reakci UDP-N-acetylglukosaminu a hydroxyskupiny polypeptidického řetězce, katalyzované OGT, se UDP odpojí a funguje jako zpětný inhibitor OGT [1]. Osud UDP-N-acetylglukosaminu v cytosolu může být spojen se syntézou N-glykoproteinů, kdy jsou tyto aktivované monosacharidy přenášeny prostřednictvím svých transporterů směrem do lumen endoplazmatického retikula, nebo do Golgiho aparátu a následně se napojují buď na dolicholfosfát, nebo na již vzniklý sacharidový řetězec [12,18].



Obrázek č. 2: Biosyntéza N-acetylglukosaminu hexosaminovou dráhou. Převzato a upraveno z [15]

Biosyntetická dráha hexosaminů sdílí s glykolýzou první dva kroky. Přibližně 2-3 % fruktosy-6-P putuje do tohoto cyklu, zbylých 97-98 % do glykolýzy. Výsledný metabolit, UDP-N-acetylglukosamin, postupně vzniká z glukosy, části glutaminu, acetylkoenzymu A a UTP. Je zároveň substrátem pro OGT, která jím dynamicky modifikuje nativní protein. Hydrolytickým enzymem je pak OGA.

Zkratky: HK - hexokinasa, GPI - glukosa-6-fosfátisomerasa, GFAT - glutamin:fruktosa-6-P-aminotransferasa, Acetyl CoA - acetylkoenzym A, GNA1 - glukosamin-6-fosfát-N-acetyltransferasa, PGM3 - fosfoglukomutasa 3, UAP1 - UDP-N-acetylglukosamin-pyrofosforylaza, UTP - uridintrifosfát, UDP - uridindifosfát, UDP-GlcNAc - uridindifosfát-N-acetylglukosamin, OGT - N-acetylglukosaminyltransferasa, OGA - N-acetylglukosaminidasa, GlcNAc - N-acetylglukosamin, GA - Golgiho aparát, ER - endoplazmatické retikulum

1.3 Charakterizace klíčových enzymů

1.3.1 N-acetylglukosaminyltransferasa

OGT, systematickým názvem uridindifosfo-N-acetylglukosamin:polypeptid- β -N-acetylglucosaminyltransferasa je zodpovědná za připojení UDP-GlcNAc na cílový protein prostřednictvím hydroxyskupiny serinu nebo threoninu [12]. Poprvé byla izolována z potkaních jater [19]. Lidský gen pro OGT je lokalizován v genomu v pozici Xq13.1 [20]. Enzym je vysoce konzervovaný u všech doposud studovaných metazoi [21,22]. Je tak pravděpodobně doménou pouze mnohobuněčných organismů. Doposud byly objeveny tři isoformy OGT. Nukleocytoplazmatická forma (ncOGT) je se svou velikostí 115 kDa největší. Dále se v buňkách vyskytuje nejkratší varianta (sOGT) se 75 kDa a alternativně sestřížená mitochondriální isoforma (mOGT), která má velikost přibližně 103 kDa. Nejvyšší podíl exprese OGT byl zaznamenán ve slinivce břišní [22].

Všechny isoformy jsou složeny z katalytické C-terminální a z N-terminální domény, která je zodpovědná za proteinové interakce. Zajišťuje substrátovou specifitu mezi enzymem a proteinem, obsahuje motiv opakujících se tetra-trikopeptidů. V závislosti na jednotlivých isoformách je složena z různého počtu tetra-trikopeptidů. Samotný enzym OGT je glykosylován N-acetylglukosaminem na dvou místech aminokyselinové sekvence v rámci katalytické domény, zda má tato modifikace vliv na enzymatickou aktivitu zatím není známo [21,22]. OGT je také modifikována na několika místech fosforylací, což vede k hypotéze, že OGT může být regulována skrze fosforylační signální transdukcí. Další možnost regulace OGT je skrze tetra-trikopeptidovou doménu, která by mohla interagovat pomocí interakcí protein-protein inter- i intracelulárně, a vytvářet tak regulační komplex. Interakční proteiny by tak mohly regulovat její aktivitu či specifitu [1,21,22]. V rámci cirkadiálních hodin glykogensyntasakinas 3 β fosforyluje OGT v pozici Ser3 nebo 4, čímž aktivuje OGT [23]. Vliv posttranslační modifikace na aktivitu OGT se také uplatňuje při imunitní odpovědi. OGT je v makrofágních buňkách S-nitrosylována, čímž je katalytická aktivita enzymu potlačena. Naopak když jsou makrofágní buňky stimulovány lipopolysacharidem, je OGT aktivována de-nitrosylací [24]. *In vitro* pokusy naznačují, že ve svalové buňce, postrádající glukosu, fosforylace threoninu v poloze 444 pomocí aktivované proteinkinasy zvyšuje jadernou lokalizaci OGT [25].

Vzhledem k tomu, že OGT musí být aktivní hlavně v cytoplazmě, kde je nízká koncentrace UDP-N-acetylglukosaminu, je její hodnota K_m o mnoho nižší v porovnání s ostatními glykosyltransferasami [22]. Ostatní glykosyltransferasy jsou monomery vázané většinou na membránu s aktivitou v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu [19,26]. Mezi OGT a ostatními glykosyltransferasami nebyla pozorována žádná sekvenční ani strukturní homologie [27]. Rozdíl mezi hodnotou K_m pro OGT a specifické transportéry k jejich společnému substrátu, UDP-N-acetylglukosaminu, je přibližně 10x větší ve prospěch OGT (hodnota K_m pro OGT činí přibližně 545 nM, pro transportéry v rozsahu 1-3 mM) [19,28,29]. To dává OGT a následné syntéze O-GlcNAc glykoproteinů jistou kompetitivní výhodu v porovnání se syntézou N-glykoproteinů [19,26]. OGT se pravděpodobně vyskytuje jako jedinečný enzym, který není členem rodiny příbuzných enzymů. Zůstává tak záhadou, jak může jediný enzym specificky glykosylovat tak velké množství proteinů s různými aminokyselinovými motivy [21].

1.3.2 β -N-acetylglukosaminidasa

Degradační roli glykoproteinů modifikovaných pomocí glykosylace O-GlcNAc hraje hydrolytický enzym OGA, celým názvem β -N-acetylglukosaminidasa [1]. Je kódovaný genem s názvem *MGEA5* s lokalizací na chromozomu 10q24.1–24.3 [30]. Shoduje se s vlastnostmi lidské hexosaminidasy C [31]. Tento protein s převážně nukleocytoplazmatickou lokalizací má pH optimum v neutrální oblasti a je specifický pouze pro osamoceně navázaný N-acetylglukosamin, nikoliv pro N-acetylgalaktosamin. Většina ostatních hexosaminidas se nachází v lysozomu, jejich hodnota pH optima leží v kyselé oblasti a jsou specifické jak pro N-acetylglukosamin, tak i N-acetylgalaktosamin. Poprvé byla OGA izolována z hovězího mozku v těsném komplexu s několika dalšími asociovanými proteiny [31,32]. OGA se skládá ze dvou rozlišitelných domén, N-terminální konec je slabě homologní s bakteriální hyaluronidasou, zatímco C-terminální se podobá proteinům rodiny příbuzné s acetyltransferasami [30,33]. OGA se v lidském těle vyskytuje ve dvou isoformách, první tvoří 130 kDa protein vyskytující se v cytoplazmě, jádře i mitochondriích, druhá isoforma o hmotnosti 75 kDa je alternativně sestřižený protein (*MGEA5s*) s jadernou lokalizací [30,32,34,35]. Tato menší isoforma postrádá acetyltransferasovou aktivitu, mohla by tak sloužit jako negativní regulátor OGAsové acetyltransferasové aktivity. Mezi těmito dvěma koncovými doménami se nachází štěpící

místo pro kaspasu 3 [35]. V případě apoptosy kaspasa 3 rozštěpí OGA tak, že enzymu zůstane jeho β -N-acetylglukosaminidasová aktivita zachována. Mechanismus regulace tohoto enzymu zůstává nejasný, možným scénářem může být zachovalá schopnost β -N-acetylglukosaminidasové domény odstraňovat GlcNAc a N-acetyltransferasová doména může být translokována do jádra, kde buď může acetylovat proteiny, nebo interferovat s proteiny z rodiny příbuzné s acetyltransferasami [17,33]. O regulaci OGA je známo jen velmi málo, kromě štěpícího místa pro kaspasu 3 je OGA také glykosylovaná pomocí O-GlcNAc. Vliv této modifikace na lokalizaci nebo aktivitu enzymu doposud nebyl pozorován. Zatím zůstává nejasné, zda všechny typy tkání a buněk reagují na stres podobným mechanismem za přítomnosti kooperace, nebo zda na různé typy stresů reagují různé buněčné typy a tkáně rozdílně [36,37].

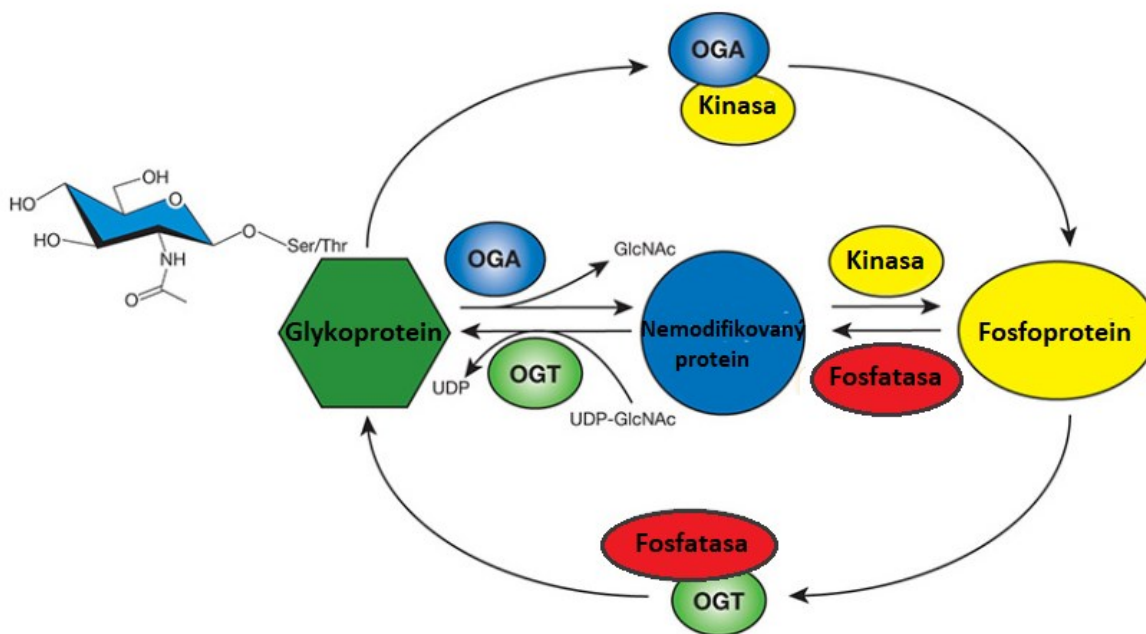
1.4.1 Vztahy mezi glykosylací pomocí O-GlcNAc a fosforylací

O-GlcNAc glykosylace peptidu nebo proteinu se v mnohém podobá další posttranslační modifikaci, a to fosforylací. Obě modifikace cílí na stejné aminokyseliny, které modifikují (Ser a Thr). Zároveň bylo objeveno několik fosforylačních míst, které jsou společné i pro tento typ glykosylace [6]. Fosforylace může probíhat také na tyrosinu, u této aminokyseliny modifikace pomocí O-GlcNAc zatím nebyla objevena [11]. V některých případech spolu tyto dvě modifikace soutěží o jedno vazebné místo proteinu. Enzymaticky katalyzované přidání i hydrolýza β -N-acetylglukosaminu a fosfátové skupiny na protein probíhá dynamicky v závislosti na odpovědi buněčných signálů. Obě zároveň ovlivňují funkci a asociaci modifikovaného proteinu. Tento reciproční vztah mezi fosforylací a glykosylací O-GlcNAc bývá označován jako „yin-yang“ [6,7]. O-GlcNAc glykosylace může probíhat jen za určitých podmínek v závislosti na ostatních posttranslačních modifikacích proteinového substrátu. Na příkladě RNA polymerasy II byly studovány vztahy mezi fosforylací a O-GlcNAc glykosylací. Na základě *in vitro* studování C-terminální domény (CTD) RNA polymerasy II byla pozorována reciproční aktivita OGT a CTD kinasy, kdy polymerasa nemohla být glykosylována OGT v případě, kdy dekamer CTD podléhal fosforylací CTD kinasou. Naopak fosforylace nemohla probíhat, jestliže byl pentamer CTD glykosylován na threoninu v poloze 4 na každé CTD podjednotce. Fosforylace CTD je potřeba v elongační fázi transkripce. Nemožnost jedné či druhé posttranslační modifikace pravděpodobně není spojena s obsazeností daných

hydroxylových zbytků, ale v případě glykoproteinu s narušením fyzických interakcí kinasy s peptidem, jelikož hlavní fosforylační místa RNA polymerasy II se nachází na serinu v poloze 2 a 4 každé CTD podjednotky [38]. Serin nebo threonin těchto proteinů se tedy mohou vyskytovat ve třech možných stavech – glykosylovaný, fosforylovaný, nebo v nemodifikované formě s volnými hydroxyskupinami.

1.4.2 Komplex OGT s fosfatasou

Bylo popsáno, že transferasa OGT interaguje s isoformami fosfatasy PP1 β a PP1 γ . Pro potvrzení přítomnosti fosfatasy byl použit fosforylovaný protein, jehož fosforylační místo je zároveň shodné i pro modifikace pomocí O-GlcNAc. Protein byl pomocí komplexu fosfatasy s OGT defosforylován a následně glykosylován. V přítomnosti kyseliny okadaové, inhibitoru fosfatasy PP1 a PP2A, defosforylace ani glykosylace komplexem OGT v místě fosforylace neproběhla, u volných hydroxyskupin však glykosylace proběhla nezávisle na přítomnosti inhibitoru fosfatasy. Fosforylovaný protein musí být nejprve defosforylován fosfatasou v komplexu s OGT, aby následně mohla OGT připojit N-acetylglukosamin k hydroxyskupině serinu nebo threoninu [39]. Analogicky se nabízí předpoklad spojení hydrolytického enzymu OGA s fosforylační kinasou, které by mohly působit proti komplexu OGT s fosfatasami. Tato hypotéza je předmětem bádání, doposud tento komplex objeven nebyl [39]. Souhrnné schéma znázorňující vztahy mezi fosforylací a glykosylací proteinů je znázorněno na obrázku č. 3, strana 23.



Obrázek č. 3: Schéma vzájemného působení mezi O-GlcNAc glykosylací a fosforylací.

Převzato a upraveno z [1].

Fosforylace a glykosylace pomocí O-GlcNAc serinu nebo threoninu může u některých proteinů cílit na stejné místo. Tuto kompetici může vyhrát pouze jedna z postranstranlačních modifikací. V případě, kdy je protein fosforylován, může být protein defosforylován fosfatásou 1 β nebo γ , se kterou se OGT vyskytuje v komplexu. Komplex hydrolytického enzymu OGA s kinasou zatím objeven nebyl.

Zkratky: UDP-GlcNAc – uridintrifosfát-N-acetylglukosamin, UDP – uridindifosfát OGT – N-acetylglukosaminyltransferasa, OGA – N-acetylglukosaminidasa, GlcNAc – N-acetylglukosamin, Ser – serin, Thr - threonin

1.5 Patologie O-GlcNAc glykosylace

Zvýšená aktivita hexosaminové syntetické dráhy způsobená nadměrným příjmem potravy a/nebo také buněčným stresem může vyústit v pozměněnou úroveň glykosylace pomocí O-GlcNAc, a může tak přispívat ke vzniku patologických stavů. Tyto změny spojené s metabolismem glukosy byly pozorovány u některých zdánlivě nesouvisejících onemocnění. Zvýšená glykosylace je spojována s onemocněním diabetes mellitus II. typu (DMII) a stresem indukovanou srdeční ischemií. Naopak u neurodegenerativní

Alzheimerovy choroby se objevuje patologický projev související s úbytkem glykosylace tohoto typu. Nedávné studie také naznačují souvislost zvýšené úrovně této glykosylace s Warburgovým efektem (preference anaerobního zpracování glukosy před mitochondriální oxidativní fosforylací), který je typický pro karcinogenní tkáň [1,3].

1.5.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění mozku, při kterém dochází k poškození mozkových funkcí, rozvoji demence, biochemicky je charakterizována agregací proteinu Tau. Tento protein hraje důležitou roli při polymerizaci mikrotubulů a při stabilitě neuronu. U zdravých jedinců je Tau protein glykosylován na 12 místech. Při Alzheimerově chorobě dochází k celkově snížené úrovni glykosylace O-GlcNAc, jejímž výsledkem je potlačená glykosylace proteinu Tau [40]. Neuronální protein Tau je při této chorobě v důsledku hypoglykosylace hyperfosforylovaný. V souvislosti s hyperfosforylací se Tau proteiny agregují do helikálních filament a formují tzv. neurofibrilární košíčky, které vytváří plak [39]. O-GlcNAc glykosylace pravděpodobně fyziologicky brání hyperfosforylaci a agregaci proteinu Tau. Ta může být výsledkem snížené úrovně O-GlcNAc glykosylace Tau proteinu v důsledku snížení dostupnosti substrátu pro OGT, UDP-N-acetylglukosaminu, nebo sníženou aktivitou komplexu „yin-yang“, způsobenou represí transkripce fosfatasy PP1 β . Snížená hladina intracelulárního UDP-N-acetylglukosaminu může být spojena s narůstajícím věkem a klesající schopností neuronu zpracovávat glukosu [41]. Cílená delece OGT u myších modelů prokázala, že glykosylace O-GlcNAc je nezbytná pro funkci neuronů a jejich přežití. V důsledku snížení této posttranslační modifikace může docházet k neurodegenerativním patologiím [42].

1.5.2 Působení stresových faktorů

Jedna z prvotních odpovědí na buněčný stres u všech savčích organismů je nárůst glykosylace pomocí O-GlcNAc [43]. Zvýšená glykosylace se projevuje u heat shock proteinů (HSP), může stabilizovat jejich proteinovou strukturu, pozměňovat jejich aktivitu nebo lokalizaci a také zabraňuje jejich agregaci [44]. Dalším příkladem je pozorování

zvýšené glykosylace při *in vitro* pokusech u těchto druhů stresu: stres z teplotních šoků, ethanolický stres, UV, hypoxie/reoxygenace, redukční, oxidativní a osmotický stres. U *in vivo* pokusů pak působení při srdečních ischemiích [1]. Na modelech srdce byl při ošetření glukosaminem pozorován snížený přísun vápníku při reperfuzovaných ischemiích. Naopak při použití nesespecifického inhibitoru pro OGT se objevoval vyšší přísun vápníku do srdeční tkáně. To je další příklad, kdy se zvýšená glykosylace O-GlcNAc projevuje jako ochranný mechanismus [5]. Stresové situace jsou důkazem dynamiky této glykosylace, do fyziologické hladiny se úroveň glykosylace vrací po 24-48 hodinách. Tato krátkodobá buněčná odpověď je pravděpodobně jeden z klíčových mechanismů, díky kterým buňka přežívá v těchto situacích a odolává tak poškození. Experimentální zvýšení OGT nebo celkové úrovně glykosylace pomocí O-GlcNAc vede ke zvýšené schopnosti buněk odolávat stresu, jejich snížení naopak způsobuje menší odolnost [5,43].

1.5.3 Diabetes mellitus II. typu

Jak již bylo zmíněno výše, N-acetylglukosamin zastává roli stresového a nutričního senzoru v každé buňce. 2-5 % přijaté glukosy je přeměněno právě na N-acetylglukosamin, při zvýšeném příjmu potravy nebo při buněčném stresu roste i hladina UDP-GlcNAc prostřednictvím hexosaminové syntetické dráhy, na kterou je citlivý syntetický enzym OGT [12,16,22]. Počátek vzniku DMII je spojován se zvýšenou glykosylací pomocí O-GlcNAc v souvislosti se zvýšeným energetickým příjmem [17]. DMII je charakterizován sníženou citlivostí cílových tkání na inzulín a také nižší sekrecí tohoto hormonu [45]. Vznik inzulínové rezistence byl pozorován na kultivovaných adipocytech po zvýšeném vychytávání glukosy buňkou nebo po ošetření N-acetylglukosaminem. Také na myších modelech byl zaznamenán vznik inzulínové rezistence po infuzi inzulínu a N-acetylglukosaminu, v kosterním svalstvu byla pak sledována zvýšená úroveň glykosylace tohoto typu [46]. Limitním enzymem hexosaminové dráhy je glutamin:fruktosa-6-fosfát-aminotransferasa. Po indukované inhibici tohoto enzymu azaserinem v důsledku ošetření glukosou byl také pozorován vznik inzulínové rezistence. Zvýšená glykosylace je tak pravděpodobně asociovaná s inzulínovou rezistencí v důsledku zvýšeného příjmu glukosy [16]. Glykosylace O-GlcNAc pravděpodobně také sekundárně přispívá ke vzniku inzulínové rezistence. Na příkladu signální dráhy inzulínu (viz obr. č. 4,

strana 29), která zprostředkovává vstup glukosy do cílové buňky, je možné demonstrovat zvýšenou koncentraci glykosylace a následnou sníženou účinnost této signální kaskády hned na několika úrovních [1,47].

1.5.3.1 Signální kaskáda inzulinu

Signální kaskáda inzulinu je sled několika reakcí, jejichž aktivace jednotlivých komponent – proteinů je spojena s fosforylací. Zvýšená úroveň glykosylace může soutěžit o stejné vazebné místo s fosforylací, a může tak bránit enzymatické aktivaci [48]. Narušení této signální kaskády způsobuje, že se glukosa nedostává k cílovým tkáním, jejichž buňky mají narušenou schopnost aktivně vychytávat glukosu z extracelulárního prostředí [47]. Cílové tkáně potřebující ke svému životu glukosu jsou hlavně svalová tkáň, tuková tkáň [45]. Vhodným modelem pro studování inzulinové resistance jsou diferencované adipocyty 3T3-L1, které exprimují GLUT4 [48]. Inzulinovou rezistenci a následné zhoršené vychytávání glukosy cílovými tkáněmi na těchto modelech je možné způsobit buďto inhibicí hydrolytické OGA pomocí PUGNAc (*O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosylidín)amino-*N*-fenyلكarbamát) nebo ošetřením *N*-acetylglukosaminem ve spojení s inzulinem [47]. Zvýšená úroveň glykosylace brání fosforylaci a následné aktivaci proteinkinasy B (AKT). Tato snížená aktivace AKT je pravděpodobně částečně způsobena zvýšenou glykosylací substrátu inzulinového receptoru 1 (IRS-1) a β -kateninu, dvou důležitých účastníků této kaskády. Substrát pro inzulinový receptor 2 glykosylací ovlivněn nebyl, protože u něho probíhá fosforylace na tyrosinu [47,49]. Fosforylovaná AKT za fyziologických podmínek fosforyluje GLUT4, zvýšená úroveň glykosylace může jednak znemožňovat aktivaci AKT, ale také fosforylaci transporteru pomocí AKT [47,49]. Podobné výsledky byly pozorovány i ve svalových buňkách [50]. Navíc některé proteiny účastníci se transportu GLUT4 na membránu jsou také modifikovány glykosylací O-GlcNAc [51]. Výsledkem neefektivnosti této kaskády je snížená schopnost translokace GLUT4 na membránu [49]. Není tak jasné, která z těchto tří abnormalit je důvodem snížené schopnosti translokace GLUT4 na membránu [51].

Na inzulinovou kaskádu je také napojena aktivace syntézy glykogenu. Fosfatidylinositol-3-kinasa společně s AKT inhibují glykogen syntasu kinasu 3 beta (GS3K 3β) a zároveň je fosfatasou 1 defosforylována glykogensyntasa (GS), která katalyzuje přeměnu glykogenu. Tímto způsobem je glykogensyntasa aktivována a zvyšuje

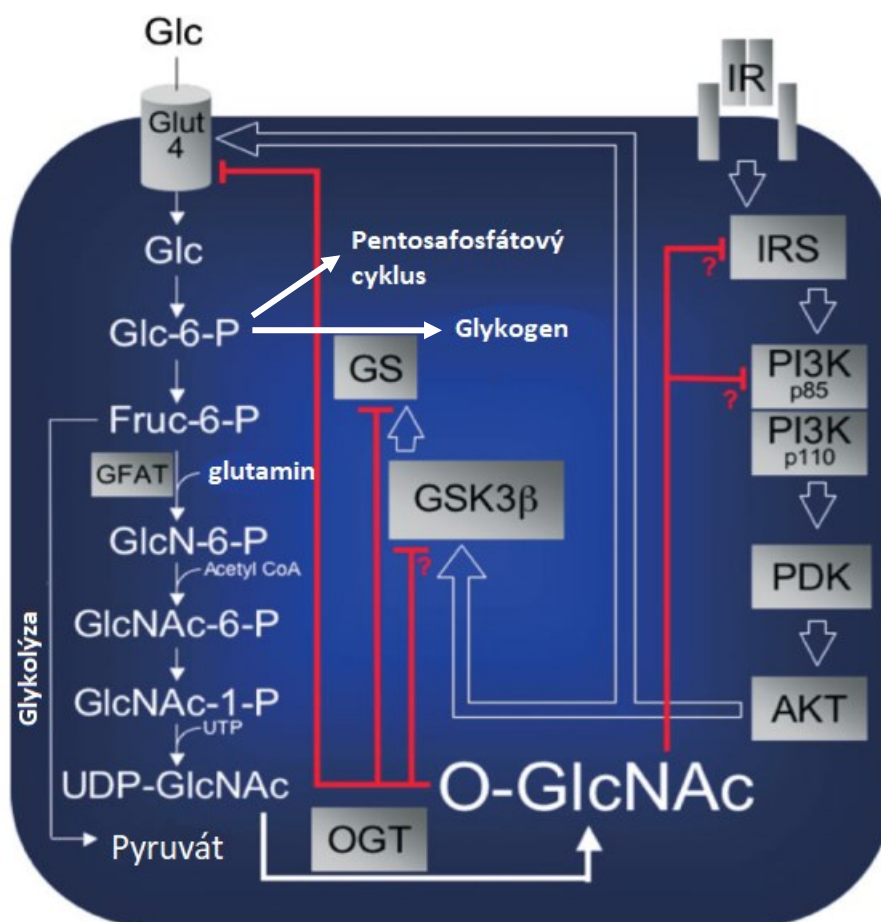
se tak její citlivost k substrátu, glukose-6-P. Glykogensyntasa v NIH 3T3-L1 adipocytech je dalším enzymem modifikovaným glykosylací O-GlcNAc. Při ošetření glukosou a N-acetylglukosaminem byla pozorována snížená katalytická aktivita tohoto enzymu. Dále byla pozorována i snížená bazální aktivita tohoto enzymu, zároveň se objevovala i nižší úroveň inhibiční fosforylace. To bylo dokázáno pomocí experimentu, kdy po indukci inzulinové rezistence pomocí Glc a GlcNAc následné použití fosfatasy nevedlo k výraznému zvýšení aktivity GS. Ovšem po ošetření OGA působení fosfatasy indukovalo významnou aktivaci GS. Zvýšená úroveň glykosylace působí tedy inhibičně i v případě syntézy glykogenu. Pravděpodobně je to však jen jeden ze zatím více neobjasněných mechanismů. Jako další možný mechanismus se naskýtá nepřímé ovlivnění fosforylace GS pomocí glykosylace, která může ovlivňovat její afinitu a substrátovou specifitu ke kinasám a fosfatasám [47,52]. Navíc je známo, že substrátem pro OGT je i fosforylační glykogensyntasa kinasa 3β . Nabízí se hypotéza, že i v tomto případě může mít zvýšená glykosylace tohoto enzymu vliv na zhoršenou aktivitu glykogensyntasy [53]. Poruchy v chování metabolismu glykogenu mají vliv na intracelulární zpracovávání glukosy, a pravděpodobně tak zvyšují její přeměnu směrem k syntéze hexosaminů nebo k její přeměně na mastné kyseliny [17,52].

Transgenní myši s nadexpresí OGT cílenou na adipocyty, buňky svalové a srdeční prokazovaly sníženou citlivost na inzulin. Svalová i tuková tkáň se vyznačovala inzulinovou rezistencí a prokazovala znaky hyperleptinemie [54]. Také kardiomyocyty myší, u kterých byl streptomycinem vyvolaný diabetes, prokazují zvýšenou glykosylaci pomocí O-GlcNAc a mají zhoršené srdeční funkce. Po ošetření adenovirem produkujícím OGA se srdeční funkce zlepšily, změnily se také hodnoty intracelulárního vápníku, koncentrace vápníku v sarkoplazmatickém retikulu. Při izolaci perfuzovaného srdce byly pozorovány změny kontraktilní funkce, které byly spojeny s alterací exrese proteinů účastnících se hospodaření s vápníkem [55].

Zvýšená koncentrace glukosy může mít negativní vliv i na cévní systém. Cévní endoteliální buňky jsou poškozeny v důsledku inhibice endoteliální NO syntasy, která je inhibována díky zvýšené úrovni glykosylace pomocí O-GlcNAc [56]. Endoteliální NO je důležitý vasodilatátor, inhibuje agregaci krevních destiček a proliferaci hladkého svalstva cév. Dále také participuje na snížení úrovně oxidace LDL na proatherogenní formu a snižuje permeabilitu cévního systému [57]. NO syntasa je aktivovaná fosforylací protein kinasou B, v důsledku zvýšené úrovně glykosylace však tato aktivace není možná nebo je

snížena. Inhibice tohoto důležitého vazodilatátoru může mít při diabetu život ohrožující následky, jako poškození cév, jež může vést až k infarktu myokardu nebo selhání srdce [56].

Pro správnou regulaci glykosylace pomocí O-GlcNAc je důležitá exprese hydrolytického enzymu OGA. Americká studie provedená na souboru pacientů specificky z oblasti Mexika ukázala, že úroveň exprese OGA s věkem klesá. Nabízí se tedy další možný aspekt související s počátkem vzniku diabetu. S rostoucím věkem byl pozorován SNP (jednonukleotidový polymorfismus, z angl. „single-nucleotide polymorphism“) lokalizovaný na chromozomu 10q, který obsahuje alternativní stopkodon a může vést ke snížené expresi 130 kDa isoformy OGA, která je zodpovědná za katalytickou aktivitu enzymu [58,59]. V případě ztráty katalytické domény OGT u *C. elegans* byla pozorována nulová intracelulární glykosylace O-GlcNAc, ale i tak tyto organismy byly schopné života. Měly výrazně pozměněné hospodaření se sacharidy s nárůstem glykogenu a zásobou threhalosy. Hladina neutrálních lipidů byla snížena o 70 %. Tato data naznačují, že OGT může potlačovat správnou funkci inzulinu u *C. elegans*. Výzkumy na tkáňových kulturách a savčích buňkách podporují hypotézu, že změny v signální kaskádě inzulinu způsobené zvýšenou úrovní glykosylace O-GlcNAc mohou být zodpovědné za zhoršenou schopnost buněk odpovídat na zvýšenou koncentraci extracelulární glukosy, a mohou tak přispívat k počátku DMII [60]. Enzymatickým odstraněním N-acetylglukosaminu je možné dostáhnout návratu k fyziologickým funkcím buněk navzdory zvýšené extracelulární koncentraci glukosy. Z toho lze vyvozovat, že enzym OGA může působit jako ochrana proti poškození buněčných funkcí při vystavení hyperglykémii [52,58].



Obrázek č. 4: Ovlivnění signální kaskády inzulinu zvýšenou glykosylací O-GlcNAc na příkladu tukové tkáně. Převzato a upraveno z [17]

Zvýšená aktivita HBP vede ke zvýšení koncentrace substrátu pro OGT, UDP-GlcNAc. Zvýšená úroveň glykosylace ovlivňuje buněčné hospodaření s glukosou na několika úrovních. Jednak glykosylace GS snižuje tvorbu zásoby glykogenu, zvýšená úroveň glykosylace má vliv na několik enzymů participujících v inzulinové kaskádě, potlačuje aktivitu AKT a jí zprostředkovanou aktivaci GLUT4, s jehož pomocí je glukosa přenášena do buňky.

Zkratky: HBP – hexosaminová biosyntetická dráha, IR – inzulinový receptor, IRS - substrát inzulinového receptoru, PI3K - fosfatidylnositol-3-kinasa, p85 – regulační podjednotka PI3K, p110 – katalytická podjednotka PI3K, PDK - proteindependentní kinasa, AKT - proteinkinasa B, GLUT4 – glukosový transporter 4, Glc – glukosa, Glc-6-P - glukosa-6-fosfát, Fruc-6-P - fruktosa-6-fosfát, GFAT - glutamin:fruktosa-6-P-aminotransferasa, GlcN-6-P - glukosamin-6-fosfát, GlcNAc-6-P - N-acetylglukosamin-6-fosfát, acetyl CoA - acetylkoenzym A, GlcNAc-6-P - N-acetylglukosamin-6-fosfát, GlcNAc-1-P - N-acetylglukosamin-1-fosfát, OGT - N-acetylglukosaminyltransferasa, GS – glykogensyntasa, GSK3β – podjednotka beta glykogensyntasykinasy, UDP-GlcNAc - uridintrifosfát-N-acetylglukosamin, UTP – uridintrifosfát, O-GlcNAc – glykosylace pomocí N-acetylglukosaminu

1.5.4 Testování úrovně glykosylace pomocí O-GlcNAc jakožto potenciálního markeru u diagnostiky Diebetu mellitu 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu je civilizační onemocnění, kterým v současnosti celosvětově trpí přibližně 500 milionů populace [61]. Řadí se mezi aktuální řešené metabolické poruchy, postupně může rozvíjet řadu dalších komplikací, které mohou vést až k metabolickému syndromu. Pozdější komplikace diabetu můžeme rozdělit na mikro- a makrovaskulární. Mikrovaskulární ovlivňují malé krevní cévy způsobující retinopatii, nefropatii a neuropatii. Makrovaskulární pak působí na velké orgány, jako jsou srdce a mozek [62]. Ačkoliv bývá DMII diagnostikován v dospělém věku, narušení metabolických procesů a následný počátek vývoje této nemoci sahá do dětských let [63]. Počátky vzniku DMII sahají do doby minimálně 4-7 let před diagnostikou DMII. V době diagnostiky se tak již mohou objevovat mikro- a makrovaskulární komplikace [64]. V současné době se k diagnostice DMII využívá orální glukosový toleranční test a stanovení glukosy na lačno. Dále se používá glykovaný hemoglobin (HbA1c), který je využíván spíše během monitorování průběhu DMII a také k predikci rizik diabetických komplikací [65]. Aktuálně se objevují snahy o objevení biomarkeru, který by byl citlivý i vůči prediabetickým stádiím DMII. Bylo dokázáno, že HbA1c vůči tomuto stádiu není citlivým biomarkerem [66]. V souvislosti se zvýšenou úrovní glykosylace pomocí O-GlcNAc doprovázející inzulínovou rezistenci, hyperglykémii a metabolickou dysfunkci se nabízí její možné využití jakožto potenciálního biomarkeru při diagnostice prediabetického stádia [67,68]. Je možné sledovat přímo úroveň této glykosylace v krvi, nebo úroveň exprese enzymů, které tuto glykosylaci regulují, tedy enzymů OGT a OGA. Nabízí se sledování těchto změn pomocí analýzy glykosylovaných krevních elementů, jako jsou červené nebo bílé krvinky [67–70].

Na souboru mladých a zdravých mužů byly sledovány úrovně exprese glykosylace pomocí O-GlcNAc a enzymu OGT. Výsledky stanovené pomocí imunoanalýzy ukázaly na vyšší citlivost glykosylace pomocí O-GlcNAc v porovnání se standardně využívaným biomarkerem HbA1c. Změny v úrovni glykosylace korelovaly se změnami v procentu tělesného tuku, množstvím triglyceridů a cirkulujícím inzulinem v krvi u sledovaných jedinců. Úroveň proteinové exprese OGT nevykazovala žádné významné změny, jednalo se však o relativně malou skupinu [69]. Další studie se detailněji zabývala leukocyty, sledovala rozdílnou úroveň glykosylace a participujících enzymů mezi granulocyty

a lymfocyty pomocí průtokové cytometrie. Granulocyty vykazovaly výraznější signál úrovně glykosylace v porovnání s lymfocyty, byl pozorován významný rozdíl mezi kontrolami a osobami v prediabetickém stádiu a mezi kontrolami a osobami s plně rozvinutým diabetem, nicméně rozdíl mezi prediabetickým a diabetickým stádiem nebyl statisticky významný. Expresí enzymu OGA byla srovnatelná pro oba typy bílých krvinek, statistický rozdíl byl pozorován mezi skupinou prediabetickou a diabetickou a také mezi kontrolní a diabetickou. Nebylo však možné rozlišení mezi těmito třemi skupinami [70].

Další výzkum se zabýval sledováním změn v glykosylaci pomocí O-GlcNAc na červených krvinkách, které jsou ve velké míře glykosylovány [68]. Zde se potvrdila zvýšená úroveň glykosylace i zvýšená exprese enzymu OGA u pacientů v prediabetickém i diabetickém stádiu. Zvýšení exprese enzymu OGT nedosahovalo statisticky významných hodnot. HbA1c dosahoval také mírného zvýšení u prediabetiků, nikoliv však statisticky významného v porovnání s OGA [67]. Jak již bylo zmíněno výše, buňka se po vystavení stresu vrací po stabilizaci do fyziologického stavu, s tím souvisí hypotéza, že zvýšená úroveň exprese OGA je projev adaptace na zvýšenou úroveň glykosylace v závislosti na hyperglykémii [67,70]. Je tedy možné, že OGA reaguje na buněčný stres v ranějším stádiu nemoci. Erytrocyty po maturaci nesyntetizují nové proteiny, tato adaptace pravděpodobně nastává v průběhu krvetvorby a pokračuje, dokud retikulocyty nedokončí jejich diferenciaci [67].

Všechny doposud prováděné experimenty dávající si za cíl objevení a uvedení do praxe nového biomarkeru, který by diagnostikoval DMII v raném (prediabetickém) stádiu, naznačují silný potenciál využití červených i bílých krvinek. Všechny tyto analýzy byly prováděny na relativně malém souboru, nejčastěji metodou Western blot nebo průtokovou cytometrií. Potenciál těchto biomarkerů bude nutné otestovat na větším souboru jedinců a zaměřit se také na glykosylující enzym OGT, který doposud ve většině studiích nezaznamenal statisticky významné rozdíly, ačkoliv jeho potenciál je neoddiskutovatelný [67,70]. Tato diplomová práce si dala za cíl provést analýzu genové exprese enzymů OGT a OGA z lymfocytů izolovaných z periferní krve na rozsáhlé skupině obézních jedinců, u nichž lze s vysokou pravděpodobností očekávat pozdější vývoj DMII. Současně byla provedena pracovníky laboratoře analýza proteinové exprese metodou Western blot a také základní antropometrická a biochemická měření.

2. Cíle práce

β -N-acetylglukosamin hraje roli výživového a stresového senzoru v buňce. Glykosylace pomocí β -N-acetylglukosaminu je posttranslační modifikace proteinů, regulovaná β -N-acetylglukosaminyltransferasou (OGT) a β -N-acetylglukosaminidasou (OGA).

Cílem diplomové práce bylo:

1. Studovat změny v expresi zodpovědných genů pro enzymy OGT i OGA (kódovaný genem *MGEA5*) v souboru dospělých pacientů s extrémní obezitou a ve skupině dospívajících obézních pacientů a kontrol.

V tomto souboru dílčími cíli bylo: izolovat lymfocyty z periferní krve, z izolovaných lymfocytů připravit RNA a analyzovat expresi genů *OGT* a *MGEA5* a dvou referenčních genů *PSMB6* a *HPRT1* pomocí qPCR.

2. V souboru obézních dospívajících podrobněji analyzovat změny exprese studovaných genů po úpravě životního stylu a porovnat výsledky obézních dospívajících s kontrolní skupinou.

3. Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Přístroje

Centrifugy:

Hettich Rotanta 460R - Hettich Zentrifugen (Německo), Hettich Mikro 200 - Hettich Zentrifugen (Německo), Heraeus Multifuge X1R Centrifuge – Thermo Scientific (USA), Heraeus BIOFUGE STRATOS Centrifuge - Thermo Scientific (USA), Centrifuge CM-GMT – Unimed (ČR), Centrifuga Univerzal 320R – Schoeller (Německo), Centrifuga Mikro 200 – Schoeller (Německo), Stolní centrifuga E - Centrifuge – Wealtec (USA), „Vortex“ – P - Lab (ČR)

Pipety:

Automatické: Nichipet Ex - Nichiryo (USA), Gilson (Francie)

Digitální: Finnpiquette – Thermo electron corporation (USA)

Minitřepačka Vortex 1 – IKA (Německo)

Spektrofotometr NanoDrop – 2000 Spectrophotometer – Thermo Scientific (USA)

Termoblok LABNet D1200 – LABNet International (USA)

PCR destička Micro Amp Optical 96 – Well Reaction – Applied biosystems (USA)

Film na pokrytí PCR destičky Optical Adhesive Film – Applied biosystems (USA)

7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA)

RNA box DNA/RNA UV-cleaner UVC/IT-AR – Biosan (Litva)

PCR box Holten PCR Mini LaminAir – Holten (Dánsko)

PCR cycler DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler – Bio-Rad (USA)

3.1.2 Chemikálie

Chlorid sodný – Penta (ČR)

Chlorid draselný - Penta (ČR)

Hydrogenfosforečnan sodný heptahydrát - Penta (ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný - Penta (ČR)

Histopaque – Sigma (USA)

TriReagent RNA/DNA Protein Isolation Reagent – Applied Biosystems (USA)

Chloroform - Penta (ČR)

Isopropylalkohol - Penta (ČR)

Ethanol - Penta (ČR)

Superdestilovaná voda Milli-Q voda - Millipore (USA)

Guanidin hydrochlorid – CN Biomedicals (Německo)

Glycerol - Penta (ČR)

SDS – Sigma (USA)

BSA – Sigma (USA)

Comaissie brilliant blue G250 – Sigma (USA)

DNasa – Turbo DNase free – Ambion (USA)

Pufr pro DNasu 10X DNase Buffer – Ambion (USA)

Inativátor DNasy DNase Inactivation reagent – Ambion (USA)

RNase-free voda - Top-Bio (ČR)

Primery pro reverzní transkripci Oligo dT20 primer – Promega (Velká Británie)

Deoxynukleotidy dNTP Mix – Sigma (USA)

Pufr pro reverzní transkripci Fast System Buffer (FSB) - Invitrogen (USA)

DTT - Invitrogen (USA)

RNAsin – Promega (Velká Británie)

Reverzní transkriptasa Super Script - Invitrogen (USA)

Primery pro qPCR Master Mix: HPRT1 HS02800695_M1, PMSB6 HS00382586_M1, OGT HS002692228_M1, MGEA5 HS00201970_M1 - vše Thermofisher Scientific (USA)
TagMan Gene Expression Master Mix – Applied Biosystems (USA)

3.1.3 Soubor a biologický materiál

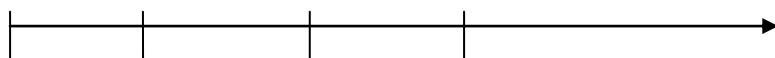
Studie se zúčastnilo celkem 70 obézních pacientů a 51 zdravých kontrol. Skupina byla rozdělena podle věku na dospívající (do 18 let) a dospělé pacienty, viz tabulka č. 1. Vstupním materiálem byla periferních krev (7 ml periferní krve v EDTA). Celkově bylo zpracováno 51 vzorků od zdravých kontrol a 114 vzorků od obézních pacientů, 19 vzorků od kontrol bylo použito na vnitřní standard, využívaný ke kontrole jednotného průběhu qPCR. U obézních dospívajících byly odběry prováděny v čase 0, 6 měsíců a u některých 12 měsíců (označení A-M0, A-M6, A-M12 respektive) po úpravě životního stylu. Ve skupině dospělých obézních pacientů byly odběry prováděny při první návštěvě lékaře při maximální hodnotě tělesné hmotnosti (označení O-MX) nebo po určitém snížení tělesné hmotnosti (označení O-M0), druhý odběr následoval po 6 měsících po redukci váhy nebo bariatrickém výkonu (O-M6) a u některých i po 12 měsících (O-M12). Schéma odběrů je znázorněno na obrázku č. 5, strana 36, počty jednotlivých odběrů v tabulce č. 2, strana 36. V této diplomové práci byla podrobněji statisticky vyhodnocována skupina dospívajících. Vstupní klinická data pro tento soubor, naměřena lékaři z VFN v Praze, jsou uvedena v tabulce č. 3.

Biologický materiál byl odebrán po informovaném souhlasu. Studie byla schválena etickou komisí VFN v Praze.

Tabulka č. 1: Přehled analyzovaného souboru

	Počet účastníku studie
Dospívající kontroly	6
Dospělé kontroly	45
Dospívající obézní pacienti	20
Dospělí obézní pacienti	50

MX nebo M0 M6 M12



Obrázek č. 5: Časová osa odběrů

MX – pacient s maximální tělesnou hmotností, první odběr

M0 – pacient po redukci váhy způsobené změnou životního stylu, první odběr

M6 – pacient 6 měsíců po změně životního stylu, 2. odběr

M12 – pacient 12 měsíců po změně životního stylu, 3. odběr

Tabulka č. 2: Počty odběrů v jednotlivých časových bodech

Odběr	M0	MX	M6	M12
Dospělý	26	24	17	13
Dospívající	20	nd	12	2

Zkratky: M0 - obézní pacient po redukci váhy, první návštěva lékaře, MX - obézní dospělý s maximální tělesnou hmotností, první návštěva lékaře, M6 - obézní pacient 6 měsíců po změně stravovacího režimu, M12 - obézní 12 měsíců po změně stravovacího režimu, nd – nebylo odebráno

Tabulka č. 3: Vstupní klinická data souboru dospívajících obézních

Soubor obézních dospívajících	n = 20
Věk [roky] - průměr (rozmezí)	15,57 (13 – 18)
BMI [kg/m ²] - průměr (rozmezí)	35,87 (24,5 – 51,5)
Obvod pasu [cm] - průměr (rozmezí)	100,18 (74 - 140)
Pas/výška průměr - (rozmezí)	0,58 (0,47 – 0,76)
Pohlaví	Muži: 15, Ženy:5

Zkratky: BMI – index tělesné hmotnosti, n – počet jednotlivců v souboru

3.2 Metody

3.2.1 Izolace lymfocytů z periferní krve

Do zkumavek byly nakapány 3 ml histopaque, který byl předem zahřátý na pokojovou teplotu. Histopaque nesměl ulpívat na stěnách, jinak se musel stočit. Histopaque byl převrstven 7 ml nesrážlivé krve, do které byla přidána EDTA. Následovala diferenční centrifugace za podmínek 700 g, po dobu 30 minut, při teplotě 22 °C, s brzdou na 0 (Hettich Rotanta 460R - Hettich Zentrifugen). Byl připraven roztok PBS, obsahoval 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 1,5mM KH₂PO₄, pH=7,4. Po centrifugaci byla odsáta plazma a do nové zkumavky byl přepipetován bílý prsteneček lymfocytů s trochou histopaque. Lymfocyty byly promývány 1x 10 ml PBS, následovala další centrifugace 700 g, po dobu 20 minut, teplotě 22 °C, s brzdou na 3 (Hettich Rotanta 460R - Hettich Zentrifugen). Po centrifugaci byl slit supernatant a zkumavka byla vysušena překlopením od přebytečného pufru. Poté byly lymfocyty rozsuspendovány v 1 ml 1x PBS a opět promyty v 10 ml PBS. Následovala centrifugace za stejných podmínek jako v předchozím promývání. Po odstranění supernatantu byla peleta lymfocytů přepipetována do Eppendorf zkumavky a rozsuspendována v 1 ml PBS a centrifugována 9000 g po dobu 3 minut, při laboratorní teplotě (Hettich Mikro 200 - Hettich Zentrifugen). Supernatant byl poté opět odstraněn. Peleta lymfocytů byla důkladně resuspendována v 1 ml TriReagentu a promícháním na Vortexu. Izolované lymfocyty byly zamrazeny v -80 °C. Takto připravované vzorky jsou dále označovány jako suspenze, malé množství vzorků s peletou lymfocytů bylo uchováváno bez TriReagentu, toto činidlo k nim bylo přidáváno až při izolaci RNA.

3.2.2 Izolace RNA z lymfocytů

Rozpuštěné lymfocyty v 1 ml TriReagentu byly po rozmrazení z -80 °C důkladně propipetovány a promíchány na Vortexu. Celý proces izolace RNA probíhal na ledu při 4 °C a v UV světle vysvíceném RNA boxu. Následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 5 minut, kdy probíhala disociace nukleoproteinových komplexů. K vzorku lymfocytů bylo přidáno 200 µl chloroformu a po dobu 15 sekund byl obsah zkumavky otáčením promícháván a následně 2-3 minuty inkubován při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace za podmínek 12 000 g, 15 minut, 4 °C, s brzdou 0 (Heraeus

Multifuge X1R Centrifuge – Thermo Scientific). Ve zkumavce vznikly 3 okem pozorovatelné fáze složené z horní vodné fáze s rozpuštěnou RNA, spodní fenol-chloroformové s rozpuštěnou proteinovou frakcí a interfáze s DNA mezi vodnými fázemi. Horní vodná fáze s RNA byla přenesena do nové zkumavky, dosahovala objemu přibližně 500 μl , k ní bylo přidáno 500 μl ledového isopropylalkoholu, následovalo jemné otáčení zkumavky pro lepší centrifugaci RNA a 10 minutová inkubace při laboratorní teplotě. Poté byl vzorek RNA centrifugován za podmínek 12 000g, po dobu 10 minut, za teploty 4 °C, s brzdou na 9 (Heraeus Multifuge X1R Centrifuge – Thermo Scientific). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, drobný pelet RNA usazený na dně byl promyt 1 ml 75% ethanolem, následovala centrifugace 10 000 g, po dobu 10 minut a za teploty 4 °C, s brzdou na 9 (Heraeus Multifuge X1R Centrifuge – Thermo Scientific). Poté byl supernatant odsán a RNA byla znovu zcentrifugována po dobu 1 minuty, 5 000 g, při teplotě 4 °C (Centrifuga Mikro 200 – Schoeller). Po stočení RNA byl důkladně odebrán všechn ethanol a RNA byla ponechána k vysoušení v otevřené zkumavce cca 3 minuty, doba vysoušení závisela na velikosti pelety RNA, maximálně však 5 minut. Poté byla RNA rozpuštěna ve 30 μl RNase-free vody, opět v závislosti na velikosti pelety, některé menší pelety RNA byly rozpuštěny v menším objemu. Vzorky RNA byly rozpipetovány na dva aliquoty po 15 μl a byla změřena koncentrace RNA u jednotlivých vzorků.

3.2.3 Měření koncentrace RNA

Koncentrace rozpuštěné RNA byla změřena na přístroji NanoDrop (NanoDrop – 2000 Spectrophotometer – Thermo Scientific). Koncentrace byla měřena při vlnových délkách 260, 230 a 280 nm. Jako blank bylo použito 1,5 μl RNase-free vody, vzorku RNA bylo poté přidáno vždy 1 μl . Naměřené výsledky jsou zaznamenány v tabulce č. 4 (str. 45-49). Takto izolované RNA byly uchovávány v -80 °C.

3.2.4 Ošetření DNasou

Celý tento krok probíhal opět na ledu a v UV světlem vysvíceném RNA boxu. Podle naměřené koncentrace RNA byly vzorky zpracovány TURBO DNA-Free Kitem Ambion (USA), který obsahoval všechny použité chemikálie. Vzorky do koncentrace RNA 200 ng/ μl byly ošetřeny 1 μl DNasy, vzorky do koncentrace 500 ng/ μl 2 μl DNasy.

V případě vyšší koncentrace byly vzorky adekvátně naředěny. Vzorky o koncentraci RNA do 280 ng/μl byly ošetřeny v poměru 7 μl RNA a 1 μl DNasy a 1 μl pufru. Vzorky o koncentraci RNA 280 - 500 ng/μl byly ošetřeny v poměru 6 μl RNA a 1 μl pufru. V případě vyšší koncentrace byly vzorky adekvátně naředěny. Takto připravené vzorky byly promíchány a inkubovány 30 minut v 37 °C (Termoblok LABNet D1200 – LABNet International). Poté byly přidány vždy 2 μl inaktivačního činidla pro DNasu a následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 2 minut za občasného míchání. Následovala centrifugace 10 000 g po dobu 1,5 minuty za laboratorní teploty (Centrifuga Univerzal 320R – Schoeller). Poté byl přenesen supernatant s čistou RNA (přibližně 8 μl) do čistých zkumavek a byla změřena koncentrace RNA na NanoDropu.

3.2.5 Měření koncentrace RNA

Koncentrace ošetřené RNA byla změřena na přístroji NanoDrop (NanoDrop – 2000 Spectrophotometer – Thermo Scientific). Koncentrace byla měřena při vlnových délkách 260, 230 a 280 nm. Naměřené výsledky jsou zaznamenány v tabulce č. 4 (str. 45-49). Takto izolované a ošetřené vzorky RNA byly uchovávány v -80 °C.

3.2.6 Reverzní transkripce

Podle naměřené koncentrace RNA po ošetření DNasou byly naředěny vzorky tak, aby v každé zkumavce bylo 500 ng RNA v 8 μl RNase-free vody. Ke každému vzorku byl pipetován 1 μl 50 μM Oligo dT15 primeru a 1 μl 10 mM dNTP mixu. Celkový objem tvořil 10 μl. Tato směs byla inkubována při 65 °C po dobu 5 minut, následovalo ochlazení na 45 °C (PCR cycler DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler – Bio - Rad). Poté byly vzorky přemístěny na led, ke kterým bylo pipetováno 10 μl mixu, který byl složen z 3 μl PCR vody, 4 μl FSB pufru, 1 μl 0,1M DTT, 1 μl 40 U/μl RNAsinu a 1 μl reverzní transkriptasy SuperScript III o koncentraci 200 U/μl. Každý vzorek byl důkladně promíchán. Pro každou sérii vzorků byla vždy připravena negativní kontrola, která obsahovala RNA a všechny reagenty kromě enzymu reverzní transkriptasy, místo ní byla pipetována voda. Takto připravené směsi o objemu 20 μl byly inkubovány při 50 °C po dobu 50 minut, následně byly inaktivovány 15 minut při 70 °C a poté zchlazeny na 4 °C (PCR cycler DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler – Bio-Rad). Pro další použití byla

vzniklá cDNA rozpipetována na aliquoty po 10 μ l a uchována v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takto vzniklá cDNA může být rozmrazena maximálně 2-3krát.

3.2.7 qPCR

Pro každý vzorek cDNA kontrol i pacientů byla měřena genové exprese pro sledované geny *OGT*, *MGEA5* a pro kontrolní geny *HPRT1* a *PSMB6*. Optimalizace metody proběhla částečně v rámci bakalářské práce, kde byly testovány referenční geny *HPRT1* a *GAPDH* [71]. U genové exprese *GAPDH* byly zaznamenány velké výkyvy v hodnotách Ct, a proto byl gen určen jako nevyhovující v tomto experimentu. Dále byl společně s geny *PMSB6* a *HPRT1* testován gen *TBP*, první dva jmenované geny byly softwarem geNorm – PrimerDesign (Velká Británie) vyhodnoceny jako uniformnější. qPCR bylo prováděno v 96 jamkových qPCR destičkách a každý vzorek s jednotlivými geny byl kvantifikován v duplikátu. Každá prováděná série po 30 vzorcích obsahovala kromě pacientů a kontrol, kontrolu z reverzní transkripce, blank a tzv. vnitřní standard, který byl připraven směsí 19 vzorků kontrol, a sloužil ke sledování případných změn na jednotlivých PCR destičkách. Pro každou sérii byla kalibrační řada složená ze všech 30 vzorků s dvojkovým ředěním. Každý vzorek byl pipetován 2x25 μ l do jamek na PCR destičku. Jedna jamka obsahovala vždy 1 μ l cDNA templátu, 12,5 μ l master mixu, 1,25 μ l fluorescenční sondy TaqMan a 10,25 μ l RNase-free vody. Výsledný objem v jedné jamce byl 25 μ l.

Jamky byly pečlivě uzavřeny folií a centrifugovány po dobu 1 minuty, 500 g na Centrifuge CM-GMT – Unimed (ČR). Destička se vzorky byla ponechána v přístroji pro PCR, za teplotních podmínek 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 minuty, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 minut a za cyklických podmínek 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 sekund a 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 minutu (7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem), který v průběhu celého procesu zaznamenával průběh reakce. Celé PCR trvalo přibližně 120 minut, během kterých proběhlo celkem 40 cyklů. Podmínky qPCR byly optimalizovány v rámci bakalářské práce [71].

3.2.8. Vyhodnocení

Z kalibračních křivek byla pro každý gen odečtena hodnota „baseline“ a hodnota „thresholdu“, s nimiž byly poté vyexportovány jednotlivé vzorky. Naměřené hodnoty Ct duplikátů byly zprůměrovány a vyhodnoceny softwarem GenEx (Multid, Švédsko). Z kalibračních křivek jednotlivých genů byla odečtena účinnost reakce, která byla jednotně použita pro všechny vzorky. Relativní hodnota exprese sledovaných genů byla pro jednotlivé vzorky normalizována na geometrický průměr hodnot Ct dvou referenčních genů. Výsledné hodnoty relativní exprese sledovaných genů byly normalizovány na průměrnou hodnotu všech použitých vnitřních standardů, která byla stanovena jako 100 %. Neměřené hodnoty Ct a relativní genové exprese jsou zaznamenány v tabulkách č. 5 a 6 (strana 52-54, resp. 55, 56)

3.2.9 Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena ve spolupráci s RNDr. Václavem Čapkem, PhD. Rozdíly mezi kontrolami a pacienty na začátku sledování (v nultém měsíci) byly analyzovány pomocí Mann-Whitneyho U-testu. Rozdíly mezi pacienty v nultém a šestém měsíci byly porovnávány s použitím párového t-testu. Za statisticky významné byly považovány dosažené hladiny testů menší než 5 % [72]. Analýzy byly provedeny ve statistickém balíku R verze 3.4.4 (R Core Team, 2018).

4. Výsledky

Byly izolovány lymfocyty odebrané ze 7 ml periferní krve u celkem 188 vzorků. Celkový počet kontrolních vzorků čítal celkem 51, z nichž 6 patřilo dospívajícím kontrolám a 45 dospělým kontrolám. Vzorků pacientů bylo celkem 114, z nichž 34 vzorků patřilo dospívajícím obézním pacientům a 80 dospělým pacientům, 4 odběry od pacientů byly z důvodu vysokých hodnot Ct referenčních hodnot zopakovány. Celkový počet dospělých pacientů byl 50, projektu se účastnili celkem 4 pacienti se dvěma odběry, se třemi odběry celkem 13 pacientů. Dospívajících obézních pacientů bylo dohromady 20, z nichž 10 pacientů mělo 2 odběry a 2 pacienti tři odběry. 19 vzorků zdravých jedinců bylo použito na vnitřní standard. K většině izolovaných lymfocytů bylo přidáno činidlo TriReagent, které by mělo zamezit degradaci RNA při dlouhodobém uchovávání lymfocytů a s jehož pomocí lze izolovat RNA, DNA i proteinovou frakci současně. Ke vzorkům lymfocytů, které nebyly rozpuštěny v TriReagentu, bylo činidlo přidáno až při izolaci RNA. Po izolaci RNA byla změřena koncentrace a čistota jednotlivých vzorků, rozsah koncentrací byl od 18,7 ng/μl, tento vzorek byl pro další použití vyřazen z důvodu nízkého výtěžku RNA, nejnižší výtěžek v použitém souboru tak činil 47,6 ng/μl, nejvyšší 1195,3 ng/μl. Rozsah poměru absorbancí při vlnové délce 260 nm ku 280 nm byl v rozmezí 1,50 až 2,01, poměr absorbancí při 260 nm ku 230 nm pak 0,22 - 2,36. Dále byly vzorky ošetřeny DNasou, po které byla opět změřena koncentrace RNA. Rozsah výtěžků RNA ošetřené DNasou byl naměřen v rozmezí od 24,5 ng/μl – 356,7 ng/μl, poměr A260/280 v rozmezí 1,52 – 2 a poměr A260/230 v rozsahu od 0,2 do 1,81. Naměřené hodnoty absorbancí RNA z izolovaných lymfocytů a po ošetření DNasou jsou zaznamenány v tabulce č. 4 (strana 45-49). RNA byla následně přepsána do cDNA pomocí reverzní transkripce a celý experiment byl zakončen qPCR, získaná data byla vyhodnocena softwarem GenEx (Multid, Švédsko). Výsledné hodnoty Ct a relativní exprese sledovaných genů jsou zaznamenány pro dospělý soubor v tabulce č. 5 (strana 52-54) a pro adolescentní soubor v tabulce č. 6 (strana 55-56). Graficky znázorněné relativní exprese sledovaných genů souboru dospělých vzorků jsou zaznamenány v grafu č. 3 a 4 (strana 57, resp. 58), pro soubor vzorků dospívajícího souboru pak v grafu č. 5 (strana 59). Pro kontrolu průběhu exprese genů v jednotlivých sériích měření byl použit vnitřní standard složený ze směsi 19 zdravých kontrol (vzorky č. 85-103), který byl pipetován na každou PCR destičku. Naměřené hodnoty Ct ukazují, že rozdíl mezi vnitřními standardy v jednotlivých

destičkách není více než půl cyklu, a dovolují tak srovnávání genových expresí z různých PCR destiček mezi sebou. Pro každou sérii vzorků, která byla složena přibližně z 30 vzorků, byla zhotovena série kalibračních křivek, z jejichž dat získaných pomocí qPCR byla odečítána hodnota „baseline“ a hodnota „threshold“, které byly přiřazovány jednotlivým vzorkům. Softwarem GenEx (Multid, Švédsko) byla z kalibračních křivek odečtena hodnota účinnosti jednotlivých genů, která byla určena jako jednotná pro všechny série za účelem relevantnějšího srovnávání vzorků mezi sebou. Účinnost použitých genů byla určena: pro *OGT* 92,48 %, *MGEA5* 87,97 %, *PSMB6* 85,96 % a *HPRT1* 91,16 %. Ukázkové kalibrační křivky genu *OGT* a *PSMB6* jsou znázorněny v grafu č. 1 a v grafu č. 2 pro *MGEA5* a *HPRT1* (strana 50, resp. 51).

Statistické vyhodnocení naměřených výsledků v této práci bylo zaměřeno pouze na soubor dospívajících pacientů, viz grafy č. 8-11, strana 62,63. Z grafů relativních genových expresí je u dospívajících pacientů patrná vyšší relativní genová exprese genu *OGT* v porovnání s kontrolami přibližně o 40 %, nicméně tento rozdíl není statisticky významný. Podobný trend je možné pozorovat i u úrovně exprese *MGEA5*, rozdíl je v tomto případě menší než u *OGT*. Dále byly porovnány změny relativní genové exprese v čase v důsledku úpravy stravy a přechodu na zdravý životní styl v časovém odstupu 6-12 měsíců. U většiny dospívajících pacientů je možné pozorovat pokles exprese genu *OGT* (asi o 20 %) a kompenzačně také *MGEA5* (graf č. 5 A, B, strana 59). Ze statistického zpracování všech dospívajících obézních pacientů však vyplývá mírný (nevýznamný) nárůst *MGEA5* v čase, viz graf č. 11, strana 62. Zároveň bylo u většiny pacientů možné pozorovat podobný trend v chování obou sledovaných genů, nejvíce patrné z grafů č. 5 A, B, strana 59. U dospělého souboru je možné tyto závěry konstatovat pouze u minoritního množství sledovaných pacientů (grafy č. 3 a 4, strana 57,58)

Izolace RNA byla opakována u 4 vzorků pacientů s více odběry z důvodu vysokých hodnot Ct referenčních genů (vzorek č. 75 byl zopakován jako vzorek s č. 183, vzorek č. 74 jako č. 184, vzorek č. 67 jako č. 182 a vzorek č. 150 jako č. 175), vzorky č. 22, 34, 151, 164 byly z důvodů nízkých výtěžků izolované RNA vyřazeny a nebyly již dále ošetřovány DNasou. Kontrolní vzorky č. 6, 15, 16, 17 byly z důvodů vysokých hodnot Ct referenčních genů z analýzy softwarem GenEx (Multid, Švédsko) vyřazeny.

U pacientů byly odebírány také biochemické a antropometrické markery, jejichž změny by mohly mít souvislost se změnami v expresi genů *OGT* a *MGEA5*. Pro sledování korelací byli vybráni 2 reprezentativní pacienti (tabulka č. 8, strana 64). U obou vybraných

pacientů je možné pozorovat korelaci mezi poklesem relativní exprese *OGT* a úbytkem váhy a také poklesem tělesného tuku. U pacienta P1 byl zaznamenán nárůst relativní exprese genu *MGEA5* v čase, naopak u pacienta P2 byl pozorován pokles exprese tohoto genu po 6 měsících a výrazném úbytku váhy, po opětovném růstu tělesné hmotnosti úroveň exprese *MGEA5* opět vzrostla. U tohoto pacienta koreluje nárůst/úbytek tělesné hmotnosti se změnami v genové expresi obou sledovaných genů.

4.1 Měření koncentrace RNA

Tabulka č. 4: Naměřené koncentrace a čistoty RNA izolované z lymfocytů a po ošetření DNasou pro všechny vzorky

Tabulka shrnuje naměřené koncentrace a čistoty RNA izolované z lymfocytů periferní krve pomocí TriReagentu a po ošetření RNA DNasou. Vzorky jsou zobrazeny v pořadí, v jakém byly zpracovány. Měření probíhalo na přístroji Spektrofotometr NanoDrop – 2000 Spectrophotometer – Thermo Scientific (USA). Celkový soubor čítá 188 vzorků, 19 bylo použito na vnitřní standard (č. 85-103), izolace RNA byla opakována u 4 vzorků pacientů s více odběry z důvodu vysokých hodnot Ct referenčních genů (vzorek č. 75 byl zopakován jako vzorek s č. 183, vzorek č. 74 jako č. 184, vzorek č. 67 jako č. 182 a vzorek č. 150 jako č. 175)

Číslo vzorku	Skladování lymfocytů	Odběr	Izolovaná RNA z lymfocytů			RNA po ošetření DNasou		
			C_{RNA} [ng/μl]	Poměr $A_{260/280}$	Poměr $A_{260/230}$	C_{RNA} [ng/μl]	Poměr $A_{260/280}$	Poměr $A_{260/230}$
6**	suspenze	K	125,5	1,98	0,79	84,9	1,88	0,68
7	suspenze	K	477,7	1,98	1,00	260,4	1,92	0,98
10	suspenze	O-MX	966,4	1,96	2,11	218,7	1,94	1,65
12	suspenze	O-MX	381,6	1,96	1,81	202,4	1,92	1,47
13	suspenze	O-MX	512,7	1,93	0,94	275,9	1,90	0,92
14	suspenze	O-MX	311,6	1,91	2,26	140,1	1,91	1,56
15**	peleta	K	350,0	1,81	1,55	179,7	1,89	1,30
16**	peleta	K	221,5	1,74	0,95	108,0	1,82	0,72
17**	peleta	K	425,7	1,75	0,92	194,6	1,77	0,76
18	suspenze	K	212,9	1,80	1,85	82,3	1,93	1,30
19	suspenze	K	107,9	1,73	1,95	53,2	1,93	0,77
20	suspenze	K	518,0	1,91	2,21	286,5	1,97	1,81
21	suspenze	K	553,3	1,89	1,58	224,0	1,95	1,62
22*	suspenze	K	59,4	1,82	0,50	nd		
23	suspenze	A-M6	290,5	1,79	1,94	133,9	1,77	0,92
24	suspenze	O-M6	251,9	1,79	1,90	94,4	1,98	1,46
25	suspenze	K	562,2	1,94	2,06	258,2	1,97	1,70
26	suspenze	A-M0	238,9	1,79	1,92	104,1	1,91	1,22
27	suspenze	O-MX	291,0	1,77	2,09	132,5	1,94	1,54
28	suspenze	A-M0	229,2	1,73	2,18	92,1	1,91	1,50
29	suspenze	O-M6	357,2	1,78	2,04	162,4	1,91	1,36
31	suspenze	O-MX	355,5	1,79	1,95	153,6	1,93	1,49
32	suspenze	O-M6	145,4	1,70	0,53	65,8	1,80	0,38
33	suspenze	O-MX	299,2	1,66	0,62	69,9	1,52	0,32
34*	suspenze	O-MX	18,7	1,65	0,22	nd		

Pokračování tabulky č. 4

35	suspenze	O-M0	304,4	1,95	1,95	137,8	1,93	1,35
36	suspenze	O-M0	660,7	1,83	1,82	86,7	1,87	0,87
37	suspenze	A-M0	260,0	1,95	1,25	234,3	1,90	1,43
39	suspenze	O-M6	459,8	1,94	1,80	222,1	1,95	1,46
40	suspenze	O-M0	342,4	1,92	2,01	149,7	1,95	1,52
41	suspenze	A-M6	326,6	1,90	2,26	139,5	1,94	1,67
42	suspenze	O-M0	295,0	1,93	2,07	129,1	1,96	1,49
43	suspenze	A-M0	566,7	1,82	1,74	166,1	1,88	1,24
44	suspenze	O-M0	223,2	1,93	1,64	99,0	1,89	1,14
45	suspenze	A-M6	260,6	1,92	1,98	150,0	1,83	0,98
46	suspenze	O-M0	375,3	1,94	1,47	178,7	1,93	1,28
47	suspenze	K	271,6	1,78	1,58	126,8	1,83	1,05
48	suspenze	O-MX	200,6	1,92	1,63	93,5	1,94	1,23
49	suspenze	A-M0	342,6	1,96	1,91	162,0	1,93	1,35
50	suspenze	K	138,1	1,71	0,99	113,1	1,84	0,80
51	suspenze	K	363,6	1,94	1,86	185,1	1,92	1,48
52	suspenze	K	312,9	1,79	1,54	169,7	1,88	1,27
53	suspenze	K	280,3	1,78	1,45	134,0	1,84	1,09
54	suspenze	K	426,5	1,80	1,92	201,7	1,88	1,46
55	suspenze	K	229,3	1,78	1,62	108,2	1,83	1,14
56	suspenze	K	287,6	1,78	1,52	145,8	1,87	1,20
57	suspenze	K	210,8	1,78	1,54	106,9	1,85	1,15
58	suspenze	K	225,6	1,75	0,84	121,9	1,80	0,63
59	suspenze	O-M0	465,6	1,79	1,53	228,4	1,87	1,31
60	suspenze	O-MX	256,8	1,75	1,03	130,7	1,81	0,88
61	suspenze	O-MX	296,7	1,77	1,63	176,8	1,81	1,07
63	suspenze	O-M12	155,9	1,77	1,25	99,5	1,84	0,96
67	suspenze	O-M0	124,8	1,59	1,24	73,6	1,52	0,20
74	suspenze	O-M0	364,7	1,95	2,02	195,6	1,92	1,53
75	suspenze	O-M0	350,0	1,95	1,91	123,9	1,83	1,10
76	suspenze	O-MX	135,5	1,89	0,99	85,5	1,87	0,81
77	suspenze	O-M6	407,3	1,80	1,68	171,5	1,91	1,44
78	suspenze	O-MX	314,3	1,80	1,46	156,5	1,87	1,17
79	suspenze	O-M6	248,6	1,78	2,04	157,5	1,77	1,05
81	suspenze	O-MX	155,0	1,87	1,74	94,4	1,93	1,21
104	suspenze	O-M12	209,4	1,79	2,06	101,9	1,85	1,32
105	suspenze	O-M12	232,5	1,79	2,04	121,9	1,88	1,44
106	suspenze	O-M12	283,8	1,82	2,17	138,7	1,88	1,36
85	suspenze	K	342,8	1,84	1,59	150,5	1,86	1,21
86	suspenze	K	176,0	1,79	1,47	105,5	1,83	0,97
87	suspenze	K	441,2	1,80	2,15	216,8	1,91	1,65
88	suspenze	K	393,4	1,77	1,47	165,6	1,86	1,14
89	suspenze	K	330,2	1,81	1,96	151,0	1,89	1,42
90	suspenze	K	469,5	1,81	2,05	206,4	1,88	1,53

Pokračování tabulky č. 4

91	suspenze	K	213,9	1,80	2,07	102,1	1,85	1,26
92	suspenze	K	319,9	1,81	2,16	139,4	1,87	1,44
93	suspenze	K	165,1	1,81	1,38	96,3	1,86	0,99
94	suspenze	K	148,2	1,79	1,82	83,2	1,85	1,13
95	suspenze	K	372,3	1,83	2,11	185,8	1,89	1,53
96	suspenze	K	143,4	1,81	1,98	82,5	1,87	1,04
97	suspenze	K	215,4	1,82	1,61	101,0	1,85	1,06
98	suspenze	K	283,1	1,78	2,36	124,7	1,84	1,33
99	suspenze	K	271,9	1,78	1,96	133,3	1,84	1,21
100	suspenze	K	220,6	1,77	0,93	109,3	1,81	0,71
101	suspenze	K	92,2	1,77	0,60	85,7	1,72	0,52
102	suspenze	K	144,1	1,82	1,42	83,6	1,86	1,07
103	suspenze	K	110,7	1,79	1,91	62,6	1,83	1,07
68	suspenze	O-M6	490,0	1,75	0,73	196,4	1,83	0,56
82	suspenze	O-MX	533,5	1,95	2,09	289,2	1,97	1,60
83	suspenze	O-M0	325,2	1,93	1,90	164,2	1,97	1,51
84	suspenze	O-MX	450,3	1,95	1,49	216,3	1,97	1,43
107	suspenze	O-MX	400,0	1,81	1,99	196,3	1,97	1,63
108	suspenze	O-M0	239,1	1,81	1,91	164,8	1,88	1,24
109	suspenze	O-MX	298,3	1,82	1,86	151,6	1,92	1,41
111	suspenze	O-M12	266,1	1,78	2,16	154,6	1,97	1,75
112	suspenze	O-M0	293,1	1,94	2,11	141,1	1,96	1,65
113	suspenze	O-M12	180,0	1,80	1,78	100,1	1,93	1,35
114	suspenze	O-MX	125,9	1,89	1,82	66,6	1,96	1,28
115	suspenze	O-MX	250,6	1,90	2,05	141,8	2,00	1,65
116	suspenze	O-M0	94,0	1,83	1,90	48,2	1,91	1,14
117	suspenze	O-MX	62,7	1,85	1,58	33,6	1,87	0,89
118	suspenze	O-M0	47,6	1,80	1,40	24,5	1,81	0,78
119	suspenze	O-M0	312,2	1,92	2,09	117,2	1,94	1,22
120	suspenze	O-MX	349,3	1,92	2,03	167,2	1,98	1,63
121	suspenze	O-M12	431,8	1,80	1,63	225,9	1,95	1,42
122	suspenze	K	421,3	1,80	1,84	229,8	1,92	1,36
123	suspenze	K	302,9	1,79	2,00	140,2	1,96	1,56
124	suspenze	K	343,7	1,80	1,70	164,3	1,93	1,38
125	suspenze	K	132,8	1,75	1,89	67,7	1,94	1,28
126	suspenze	K	265,9	1,77	2,09	147,3	1,96	1,60
127	suspenze	K	50,0	1,74	1,63	141,7	1,96	1,54
128	suspenze	K	244,2	1,79	1,97	128,2	1,95	1,48
129	suspenze	K	227,6	1,80	1,92	204,4	1,95	1,59
130	suspenze	K	386,2	1,81	1,99	106,7	1,95	1,35
131	suspenze	O-M0	180,6	1,92	1,88	154,4	1,97	1,46
132	suspenze	O-MX	386,2	1,81	1,99	176,8	1,96	1,57
66	suspenze	A-M0	63,7	1,79	1,38	38,3	1,77	0,81
69	suspenze	AK	390,1	1,78	1,05	195,6	1,86	0,96

Pokračování tabulky č. 4

80	suspenze	A-M6	225,5	1,80	1,85	128,9	1,94	1,31
133	suspenze	AK	189,5	1,76	2,22	105,0	1,90	1,54
134	suspenze	AK	378,9	1,78	1,66	183,5	1,89	1,30
135	suspenze	AK	229,7	1,77	1,70	131,5	1,89	1,26
136	suspenze	AK	241,1	1,77	1,99	132,5	1,89	1,41
137	suspenze	A-M0	368,5	1,79	1,87	179,3	1,89	1,48
138	suspenze	A-M0	301,3	1,78	1,76	144,9	1,89	1,38
139	suspenze	A-M0	153,5	1,91	1,80	85,7	1,90	1,24
140	suspenze	A-M0	322,9	1,96	1,94	157,8	1,91	1,53
141	suspenze	A-M0	417,3	1,97	1,78	223,6	1,94	1,56
142	suspenze	A-M0	243,7	1,93	1,38	148,8	1,91	1,17
143	suspenze	A-M0	143,7	1,89	2,06	82,0	1,88	1,34
144	suspenze	A-M6	326,1	1,97	2,07	167,2	1,93	1,55
145	peleta	A-M0	271,3	1,82	1,68	140,0	1,88	1,27
146	suspenze	A-M6	231,1	1,66	1,50	120,2	1,88	1,22
147	suspenze	A-M0	392,5	1,81	2,08	194,4	1,90	1,67
148	suspenze	A-M6	352,2	1,81	2,16	177,8	1,90	1,61
149	suspenze	A-M0	286,0	1,82	1,97	131,9	1,88	1,43
150	suspenze	A-M0	100,4	1,74	1,35	60,5	1,83	0,91
38	suspenze	A-M6	361,5	1,90	2,26	192,2	1,93	1,42
3	suspenze	A-M0	433,3	1,92	0,69	234,6	1,84	0,61
151*	suspenze	O-M0	28,8	1,69	0,79	nd		
153	suspenze	O-M6	83,4	1,68	1,14	51,7	1,68	0,67
156	suspenze	O-M0	196,2	1,77	1,38	57,8	1,69	0,69
157	suspenze	O-M0	325,1	1,81	1,71	168,8	1,86	1,36
158	suspenze	A-M0	266,6	1,80	1,94	152	1,86	1,32
159	suspenze	O-M12	291,1	1,80	1,75	176,8	1,96	1,57
160	suspenze	O-M0	354,4	1,94	2,10	174,5	1,89	1,56
161	suspenze	O-MX	298,6	1,79	2,11	144	1,85	1,44
162	suspenze	K	437,2	1,83	1,60	234,9	1,88	1,37
163	suspenze	K	239,2	1,82	1,83	175,1	1,89	1,42
164*	suspenze	K	47,7	1,74	1,04	nd		
165	suspenze	K	371,9	1,80	1,72	196,2	1,88	1,40
166	suspenze	K	341,5	1,81	1,72	175,3	1,87	1,39
167	suspenze	K	261,6	1,82	2,15	157,4	1,88	1,48
168	suspenze	K	117,8	1,78	1,19	73,5	1,79	0,85
169	suspenze	A-M0	325,1	1,79	2,07	182	1,89	1,56
171	suspenze	K	259,2	1,78	2,03	149,1	1,87	1,40
172	suspenze	K	306,1	1,80	1,87	154,9	1,86	1,39
174	peleta	K	356,9	1,81	2,14	184,8	1,88	1,61
181	peleta	O-M0	255,9	1,92	2,12	144,2	1,96	1,59
180	suspenze	A-M12	357,9	1,82	1,87	185,3	1,90	1,53
183	peleta	O-M0	323,9	1,95	2,00	177,0	1,87	1,28
5	suspenze	O-M6	548,4	1,99	1,95	296,3	1,93	1,63
72	suspenze	O-M12	289,1	1,77	1,01	170,5	1,85	0,89

Pokračování tabulky č. 4

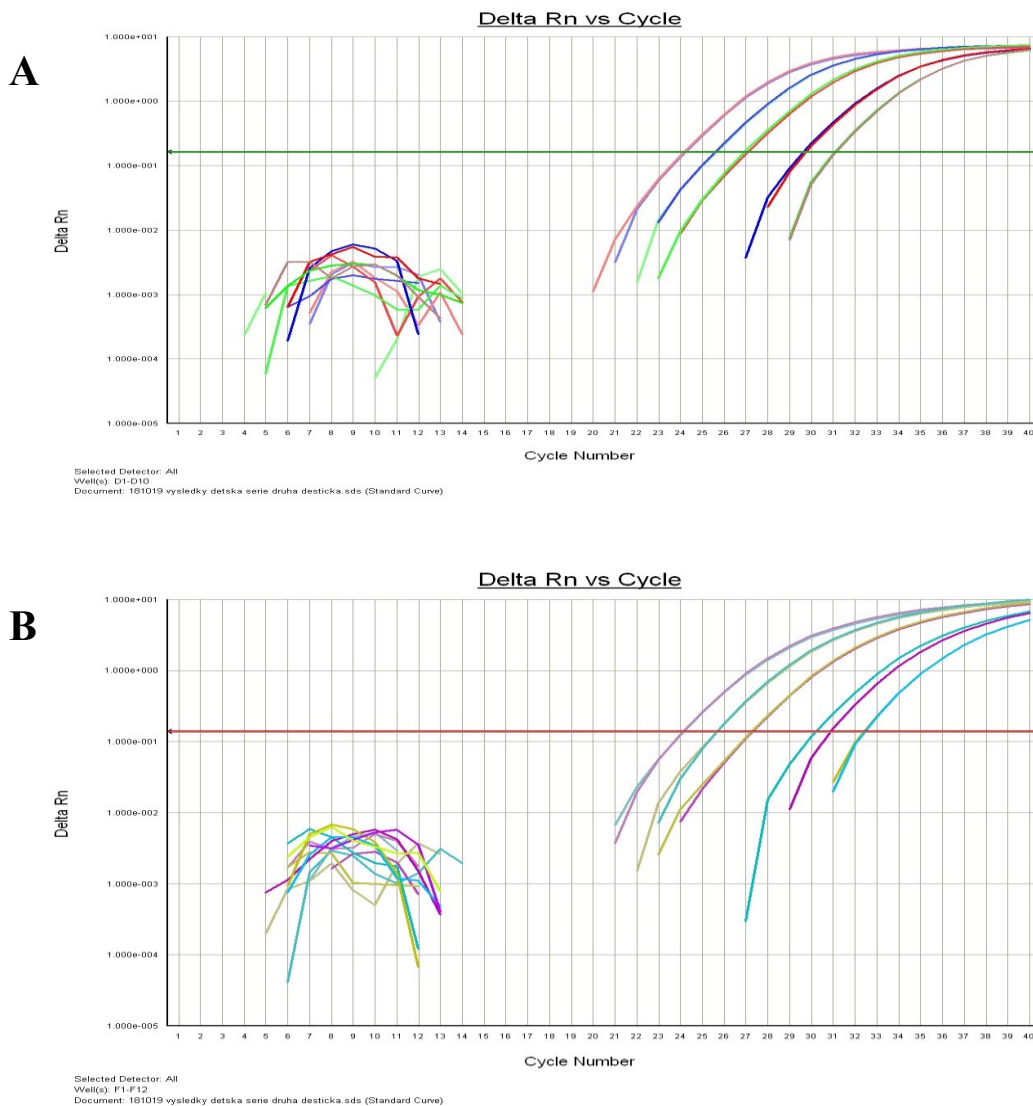
184	peleta	O-M0	437,0	1,93	2,24	230,8	1,94	1,78
8	suspenze	O-M6	1195,3	2,01	1,82	199,1	1,93	1,40
71	suspenze	O-M12	385,2	1,79	1,50	194,3	1,89	1,31
65	suspenze	O-M0	299,4	1,94	1,76	104,9	1,84	1,07
9	suspenze	O-M6	299,4	1,94	1,76	129,7	1,86	1,31
154	suspenze	O-M12	239,6	1,77	1,61	142,3	1,87	1,25
73	suspenze	O-M0	226,8	1,59	0,82	104,2	1,88	1,16
11	suspenze	O-M6	667,4	1,91	1,32	356,7	1,89	0,98
70	suspenze	O-M12	363,1	1,50	0,75	52,5	1,55	0,27
178	suspenze	O-M6	251,1	1,80	2,01	166,6	1,89	1,42
186	peleta	A-M6	330,8	1,95	1,90	239,5	1,89	1,27
182	peleta	O-M0	258,5	1,86	1,85	155,2	1,92	1,49
30	suspenze	O-M6	524,9	1,78	1,77	268,6	1,90	1,48
106	suspenze	O-M12	283,8	1,82	2,17	132,5	1,85	1,50
170	suspenze	A-M12	393,2	1,79	2,03	200,0	1,88	1,58
152	suspenze	O-M0	487,2	1,77	2,09	254,3	1,88	1,57
62	suspenze	O-M6	550,7	1,87	1,26	265,7	1,56	0,38
155	suspenze	O-M12	328,5	1,78	1,83	164,1	1,86	1,41
110	suspenze	O-M0	252,7	1,78	2,13	146,0	1,90	1,48
179	suspenze	O-M6	358,3	1,81	1,92	183,9	1,89	1,50
177	suspenze	A-M6	393,6	1,97	1,70	214,5	1,93	1,47
175	peleta	A-M0	232,5	1,81	1,37	142,6	1,89	1,13
176	suspenze	A-M6	370,1	1,81	1,72	191,1	1,87	1,40
173	suspenze	O-MX	169,6	1,78	2,03	95,3	1,88	1,41
185	suspenze	O-M6	388,7	1,80	1,69	201,0	1,88	1,39
187	suspenze	K	163,9	1,7	1,36	101,8	1,71	1,33
188	suspenze	K	374,9	1,82	2,18	201,2	1,88	1,48
189	suspenze	K	213,2	1,8	1,18	129,3	1,85	0,95
190	suspenze	A-M0	276,7	1,97	1,18	157,5	1,87	0,98
191	suspenze	K	113,5	1,96	1,24	73,6	1,87	1,17
192	suspenze	K	331,1	1,81	1,47	194,7	1,88	1,51

* takto označené vzorky byly pro nízké výtěžky izolované RNA vyřazeny (vzorky č. 34, 151, 164)

** takto označené vzorky kontrol byly z důvodů vysokých hodnot Ct referenčních genů z analýzy softwarem GenEx (Multid, Švédsko) vyřazeny (vzorky č. 6, 14, 15, 16)

Zkratky: O-M0 - obézní dospělý po redukci váhy, první návštěva, O-MX - obézní dospělý s maximální tělesnou hmotností, první odběr, O-M6 - obézní dospělý 6 měsíců po změně stravovacího režimu, O-M12 - obézní dospělý 12 měsíců po změně stravovacího režimu, K – dospělá kontrola, A-M0 - obézní dospívající při první návštěvě, A-M6 - obézní dospívající 6 měsíců po první návštěvě po změně stravovacího režimu A-M12 - obézní dospívající 12 měsíců po změně stravovacího režimu, AK – dospívající kontrola, peleta – izolované lymfocyty uchovávané bez TriReagentu, suspenze – lymfocyty rozpuštěné a uchovávané v TriReagentu, C_{RNA} – koncentrace RNA, A – absorbance, nd – nebylo provedeno, nd – nebylo odebíráno

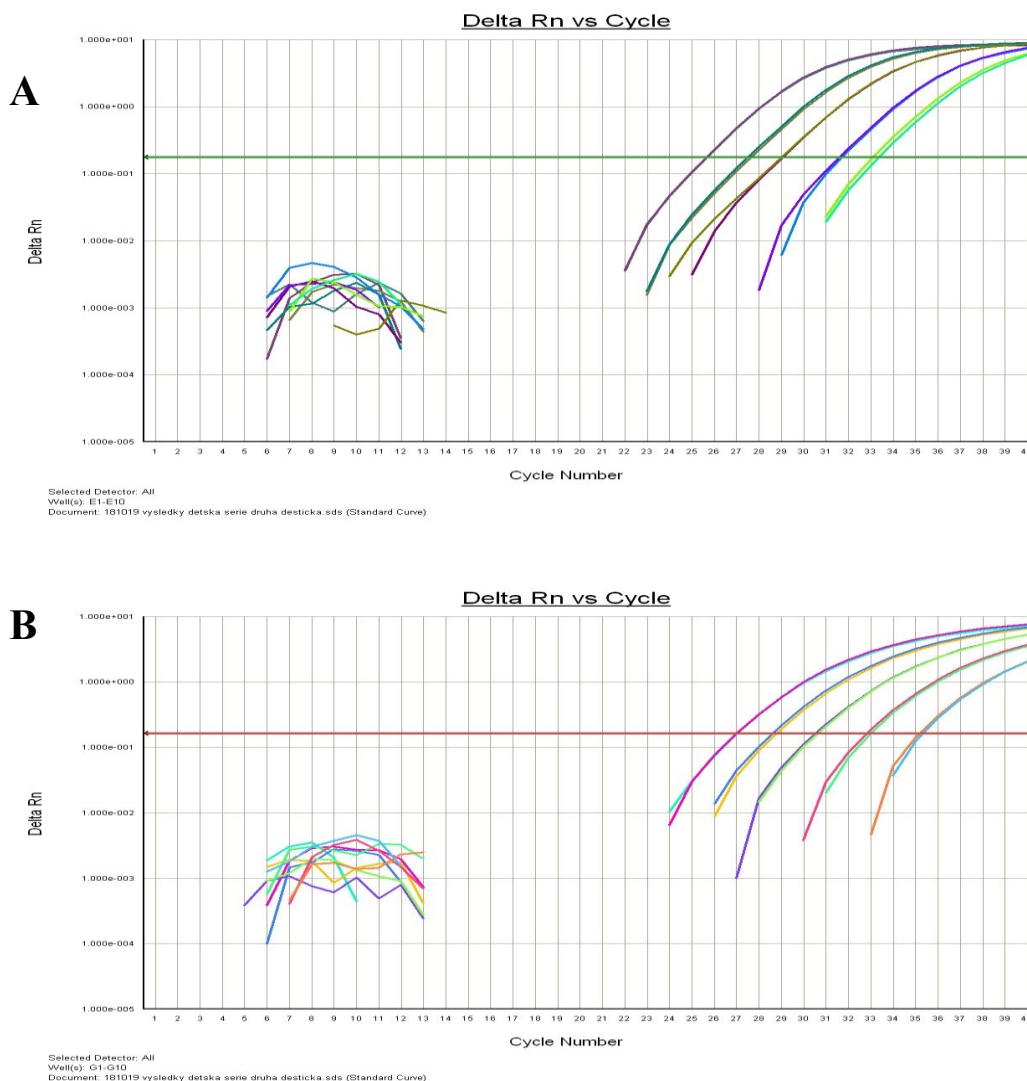
4.2 Hodnoty Ct a relativní genová exprese



Graf č. 1: Ukázka kalibrační křivky pro sledovaný *OGT* (A) a referenční gen *PSMB6* (B) závislost rozdílu fluorescence na cyklu

Ukázka kalibrační křivky exprese genu *OGT* složené ze vzorků dospívajících pacientů i kontrol vzniklá dvojkovou ředící řadou. Každá křivka (vždy v duplikátu), která má unikátní barvu, znázorňuje poloviční zředění oproti předchozímu vzorku. Z každé řady kalibračních křivek pro jednotlivé geny byly odečteny hodnoty „baseline“ a „thresholdu“, které byly přiřazeny jednotlivým vzorkům v sérii. Softwarem GenEx (Multid, Švédsko) byla pak určena účinnost reakce pro každý gen. Měřeno na přístroji 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), zobrazeno v softwaru 7300 System SDS Software - Applied Biosystems (USA)

Zkratky: *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu, *PSMB6* - gen pro podjednotku beta proteasomu 20S, Rn – normalizovaná fluorescence



Graf č. 2: Kalibrační křivka genu sledovaného genu *MGEA5* (A) a referenčního genu *HPRT1* (B) závislost rozdílu fluorescence na cyklu

Ukázka kalibrační křivky exprese genu *MGEA5*, resp. *HPRT1* složená ze vzorků dospívajících pacientů i kontrol vzniklá dvojkovou ředící řadou. Každá křivka (vždy v duplikátu), která má unikátní barvu, znázorňuje poloviční zředění oproti předchozímu vzorku. Z každé řady kalibračních křivek pro jednotlivé geny byly odečteny hodnoty „baseline“ a „thresholdu“, které byly přiřazeny jednotlivým vzorkům v sérii. Softwarem GenEx (Multid, Švédsko) byla pak určena účinnost reakce pro každý gen. Měřeno na přístroji 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), zobrazeno v softwaru 7300 System SDS Software - Applied Biosystems (USA) Zkratky: *HPRT1* – gen pro hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasu 1, *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu, Rn - normalizovaná fluorescence

Tabulka č. 5: Naměřené hodnoty Ct a relativní genová exprese pro jednotlivé geny u dospělých pacientů a kontrol

Tabulka znázorňuje naměřené hodnoty Ct genových expresí vzorků od dospělých účastníků studie, které byly změřeny přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA). Relativní genové exprese sledovaných genů byly vypočteny softwarem GenEx (Multid, Švédsko) a pro přehlednost byly přepočteny na hodnotu vnitřního standardu, který činil 100 %. Barevně rozlišené odběry odpovídají grafu č. 3 a 4: pacienti s více odběry jsou znázorněni vždy jednou barvou, modrá barva znázorňuje pacienty pouze s jedním odběrem, kontrolní vzorky jsou znázorněny šedě.

Číslo vzorku	Odběr	Hodnoty Ct dospělého souboru pro jednotlivé geny				Relativní genová exprese sledovaných genů [%]	
		<i>OGT</i>	<i>MGEA5</i>	<i>PSMB6</i>	<i>HPRT1</i>	<i>OGT</i>	<i>MGEA5</i>
183	O-M0	24,09	25,75	26,33	30,04	445	404
5	O-M6	23,73	25,03	23,78	27,19	101	114
72	O-M12	23,36	25,14	24,22	25,96	99	82
184	O-M0	24,71	26,04	28,44	31,66	964	1092
8	O-M6	22,18	23,94	23,31	25,98	163	133
71	O-M12	23,64	24,67	23,41	26,12	68	91
65	O-M0	23,10	25,23	23,65	26,24	108	71
9	O-M6	23,08	25,02	24,06	27,16	167	125
154	O-M12	22,18	23,94	23,31	25,98	163	133
73	O-M0	26,37	27,37	25,28	29,89	69	100
11	O-M6	23,24	25,01	23,41	26,43	98	81
70	O-M12	27,11	28,94	25,03	28,24	23	20
13	O-MX	23,19	25,04	24,41	26,88	159	125
178	O-M6	22,64	25,02	23,20	26,00	118	66
44	O-M0	22,76	24,90	23,32	26,86	150	97
24	O-M6	22,49	24,52	24,38	25,41	154	107
159	O-M12	22,56	23,95	23,45	25,60	118	122
36	O-M0	23,19	24,74	24,17	26,39	126	120
29	O-M6	24,21	27,89	22,73	26,83	48	12
111	O-M12	22,72	24,21	22,88	25,32	81	79
182	O-M0	25,33	26,28	28,02	30,95	447	656
30	O-M6	23,52	25,22	23,31	26,10	71	62
106	O-M12	22,95	24,52	23,11	25,60	82	77
48	O-MX	23,15	25,20	24,76	26,45	158	110
32	O-M6	23,01	24,67	24,11	26,04	124	109
63	O-M12	23,72	24,97	23,10	25,66	50	59
35	O-M0	22,99	24,79	23,99	26,03	121	98
77	O-M6	23,62	25,01	23,98	26,72	100	106
104	O-M12	25,77	26,84	23,61	26,63	21	29
112	O-M0	22,16	24,17	23,12	25,63	140	97

Pokračování tabulky č. 5

39	O-M6	23,83	25,07	25,39	27,78	189	223
113	O-M12	22,37	24,10	23,23	25,41	117	97
40	O-M0	23,01	24,92	24,46	26,75	173	132
62	O-M6	28,78	31,18	28,04	33,98	126	80
152	O-M12	22,74	24,85	23,33	25,92	111	74
42	O-M0	23,00	24,31	23,35	26,04	98	108
79	O-M6	24,06	25,85	24,35	27,55	109	91
105	O-M12	22,56	24,24	22,86	25,85	106	92
46	O-M0	22,74	24,98	23,70	26,88	172	105
68	O-M6	25,23	26,30	23,15	26,19	23	31
121	O-M12	22,83	24,20	23,44	25,55	97	102
110	O-M0	22,61	24,60	23,31	25,52	106	76
179	O-M6	22,84	24,74	23,26	25,94	103	78
173	O-MX	23,00	24,64	22,94	25,71	78	70
185	O-M6	22,96	24,84	23,31	26,08	101	78
153	O-M0	22,98	24,69	23,71	25,66	96	87
157	O-M6	25,08	26,76	25,20	27,48	69	67
10	O-MX	22,58	24,78	24,14	26,02	165	102
12	O-MX	24,11	25,95	24,70	27,23	107	86
14	O-MX	24,65	25,70	24,27	27,18	64	87
27	O-MX	23,41	25,58	23,69	26,04	84	54
31	O-MX	23,08	24,97	23,19	25,29	70	54
33	O-MX	27,44	32,18	27,50	27,52	32	4
59	O-M0	23,90	25,07	23,05	25,58	43	53
60	O-MX	24,54	25,66	23,33	26,21	38	49
61	O-MX	23,19	24,59	23,43	25,89	85	89
76	O-MX	25,18	26,21	24,75	28,67	85	118
78	O-MX	24,01	25,22	23,39	26,11	53	63
81	O-MX	23,62	24,95	23,42	26,58	80	89
82	O-MX	22,42	24,25	22,83	25,51	103	81
83	O-M0	22,82	24,43	22,84	25,34	76	69
84	O-MX	21,87	24,22	22,95	25,52	155	86
107	O-MX	23,51	24,99	22,94	25,76	57	57
108	O-M0	25,54	25,59	22,79	25,58	14	35
109	O-MX	22,61	24,09	23,49	25,97	130	128
114	O-MX	22,55	23,70	23,58	26,10	145	176
115	O-MX	23,04	23,87	23,18	25,89	87	129
116	O-M0	24,41	25,08	24,50	27,19	81	139
117	O-MX	23,82	25,13	24,30	26,95	104	117
118	O-M0	25,13	25,34	26,07	27,54	92	214
119	O-M0	22,67	23,79	23,37	25,92	119	147
120	O-MX	22,44	23,78	23,34	25,84	133	143
131	O-M0	22,67	23,97	23,59	25,54	112	124
132	O-MX	22,25	23,87	23,44	25,48	138	124

Pokračování tabulky č. 5

155	O-M0	22,18	24,06	23,43	25,92	167	126
156	O-M0	22,89	24,79	22,38	24,57	47	38
160	O-M0	22,63	24,23	23,13	24,85	77	74
161	O-M0	22,88	24,95	23,35	25,30	81	58
7	K	23,21	25,14	24,32	26,43	132	99
18a	K	23,96	25,25	23,72	25,76	54	61
19a	K	23,49	25,50	24,49	26,25	109	78
20	K	22,34	25,13	24,10	25,85	181	77
21	K	23,02	25,27	24,26	25,94	125	76
25	K	22,98	25,08	24,42	26,45	160	107
47	K	25,57	27,87	27,04	28,00	109	68
50	K	23,77	25,18	23,43	26,11	62	66
51	K	22,75	24,21	23,37	26,06	118	118
52	K	23,92	25,23	23,44	26,23	59	66
53	K	23,28	24,79	23,04	25,70	67	65
54	K	24,62	26,21	23,16	26,16	34	32
55	K	25,11	25,84	24,36	27,32	51	86
56	K	24,02	25,04	23,50	26,16	55	75
57	K	23,70	24,49	23,48	25,86	61	95
58	K	23,10	24,51	23,47	26,03	96	99
122	K	23,51	24,92	23,81	26,11	128	95
123	K	22,33	24,24	23,51	25,33	115	77
124	K	22,62	24,70	23,62	25,50	112	145
125	K	22,47	23,51	23,20	25,52	68	106
126	K	23,43	24,22	23,72	25,42	82	105
127	K	22,94	24,02	23,26	25,44	102	102
128	K	22,42	23,86	22,89	25,41	111	95
129	K	22,36	24,04	23,27	25,19	81	82
130	K	23,24	24,69	23,77	25,51	112	124
162	K	23,74	25,24	23,61	26,42	72	76
163	K	23,41	24,95	23,39	25,70	66	67
165	K	23,20	24,85	23,61	26,23	97	91
166	K	23,43	25,22	22,87	25,31	49	43
167	K	23,43	24,47	22,83	24,91	43	59
168	K	24,70	26,31	25,57	28,06	120	121
171	K	23,87	25,55	24,51	27,26	115	108
172	K	23,86	24,95	23,39	25,70	49	67
174	K	23,70	26,12	24,29	26,92	108	63
187	K	25,34	26,48	25,00	27,20	50	69
188	K	22,25	24,36	23,71	25,43	143	99
189	K	23,20	25,10	23,58	25,88	85	69
191	K	24,63	25,84	24,70	26,36	55	71
192	K	22,89	24,55	23,71	25,80	106	99

Zkratky k tabulce č. 5: O-M0 - obézní dospělý po redukci váhy, první návštěva, O-MX - obézní dospělý s maximální tělesnou hmotností, první odběr, O-M6 - obézní dospělý 6 měsíců po změně stravovacího režimu, O-M12 - obézní dospělý 12 měsíců po změně stravovacího režimu, K - dospělá kontrola, Ct - číslo cyklu, kdy hodnota exprese konkrétního genu překročí hodnotu pozadí fluorescence, *HPRT1* - gen pro hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasu 1, *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu, *OGT* - gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu, *PSMB6* - gen pro podjednotku beta proteasomu 20S

Tabulka č. 6: hodnoty Ct a relativní genová exprese pro jednotlivé geny u dospívajících obézních pacientů a kontrol

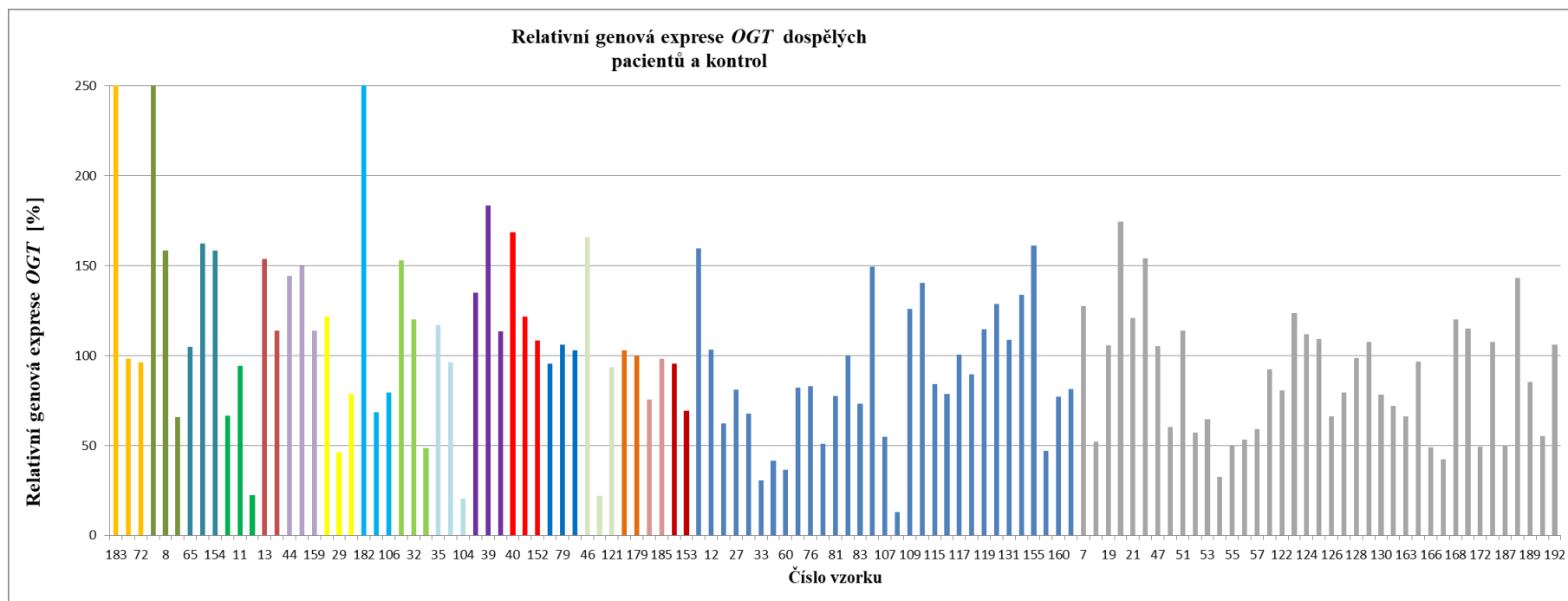
Tabulka znázorňuje naměřené hodnoty Ct genových expresí 40 vzorků dospívajícího souboru, které byly změřeny přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), relativní genové exprese sledovaných genů byly vypočteny softwarem GenEx (Multid, Švédsko) a pro přehlednost byly přepočteny na hodnotu vnitřního standardu, který činil 100 %. *barevně rozlišené odběry odpovídají grafu č. 5 A, B: pacienti s více odběry jsou znázorněni vždy jednou barvou, modrá barva znázorňuje pacienty pouze s jedním odběrem, kontrolní vzorky jsou znázorněny šedě

Číslo vzorku	Odběr	Hodnoty Ct dospívajícího souboru pro jednotlivé geny				Relativní genová exprese sledovaných genů [%]	
		<i>OGT</i>	<i>MGEA5</i>	<i>PSMB6</i>	<i>HPRT1</i>	<i>OGT</i>	<i>MGEA5</i>
181	A-M0	27,01	27,08	29,13	31,67	257	721
41	A-M6	23,36	25,65	24,94	26,88	162	103
3	A-M0	22,65	24,89	23,63	26,05	132	84
144	A-M6	25,95	26,10	23,72	27,97	29	75
180	A-M12	23,38	25,15	23,65	26,75	103	90
49	A-M0	23,75	26,07	24,94	26,94	128	80
23	A-M6	24,56	26,35	25,56	27,30	103	92
26	A-M0	24,27	25,43	23,43	26,70	53	70
186	A-M6	23,25	25,87	24,22	28,15	211	108
28	A-M0	22,64	25,46	24,86	26,23	205	91
80	A-M6	22,32	24,00	23,14	25,61	122	110
37	A-M0	23,39	25,07	24,03	27,09	128	119
138	A-M6	23,52	25,06	23,36	25,70	61	62
170	A-M12	22,40	24,15	23,34	25,51	119	103
139	A-M0	23,26	24,86	24,38	26,79	141	138
38	A-M6	26,16	27,29	24,55	28,21	35	50

Pokračování tabulky č. 6

43	A-M0	24,25	25,83	23,98	27,35	78	79
148	A-M6	23,30	25,18	23,04	25,79	66	54
66	A-M0	24,71	26,35	25,29	28,11	145	130
45	A-M6	24,14	25,91	25,90	27,20	111	110
145	A-M0	25,31	26,14	23,45	26,85	28	47
146	A-M6	24,03	25,48	23,19	25,73	42	46
149	A-M0	25,46	26,84	24,05	27,79	42	49
177	A-M6	23,41	25,13	23,83	26,96	114	104
175	A-M0	24,82	26,05	25,20	29,26	146	187
176	A-M6	23,30	25,16	23,47	26,72	102	84
140	A-M0	23,05	24,64	23,63	26,21	48	56
141	A-M0	26,30	27,05	24,18	28,47	107	104
142	A-M0	22,13	24,16	23,56	25,85	31	56
143	A-M0	22,97	24,61	23,68	26,14	170	123
147	A-M0	25,14	26,56	22,67	25,78	112	105
137	A-M0	24,01	25,36	23,16	26,15	18	20
158	A-M0	25,31	27,03	24,40	28,12	57	54
190	A-M0	23,41	25,24	23,53	26,69	95	81
169	AK	23,18	24,98	23,15	25,55	68	58
69	AK	23,89	25,45	23,37	26,09	55	55
133	AK	23,36	24,52	23,22	25,89	69	89
134	AK	24,47	25,68	24,34	27,09	70	90
135	AK	23,81	25,32	23,55	26,20	63	66
136	AK	23,87	25,69	23,29	25,96	52	45

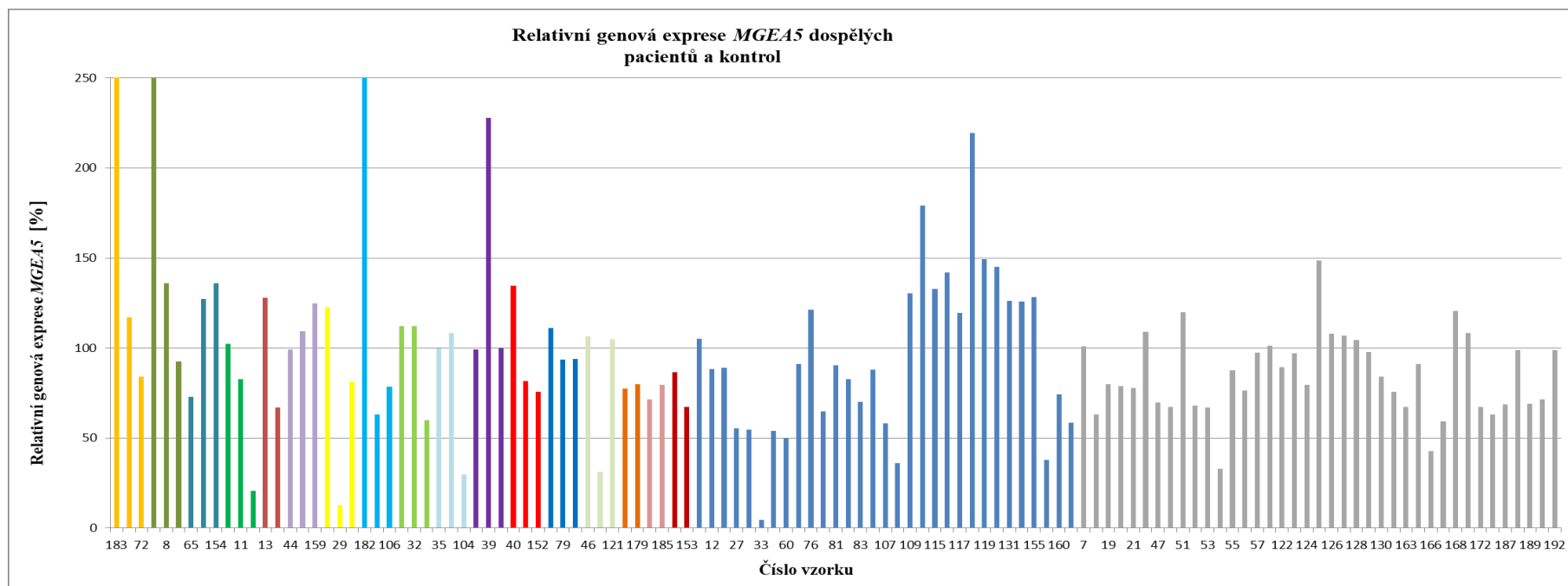
Zkratky: A-M0 - obézní adolescent při první návštěvě, A-M6 - obézní adolescent 6 měsíců po první návštěvě (po redukcí váhy), A-M12 - obézní adolescent 12 měsíců po první návštěvě, AK – adolescentní kontrola, Ct – číslo cyklu, kdy hodnota exprese konkrétního genu překročí hodnotu pozadí fluorescence, *HPRT1* – gen pro hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasu 1, *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu, *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu, *PSMB6* - gen pro podjednotku beta proteasomu 20S



Graf č. 3: Relativní genová exprese *OGT* u dospělých pacientů a kontrol

Grafické znázornění relativní exprese genu *OGT* dospělého souboru pacientů a kontrol. Jednou barvou je vždy označen pacient s více odběry, které jsou zobrazeny v chronologickém pořadí. Modře jsou znázorněni pacienti pouze s jedním odběrem, šedě pak zdravé kontroly. Expres mRNA byla naměřena přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), data byla vyhodnocována softwarem GenEx (Multid, Švédsko). $N_{M0}=25$, $N_{Mx}=23$, $N_{M6}=17$, $N_{M12}=13$, $N_k=39$

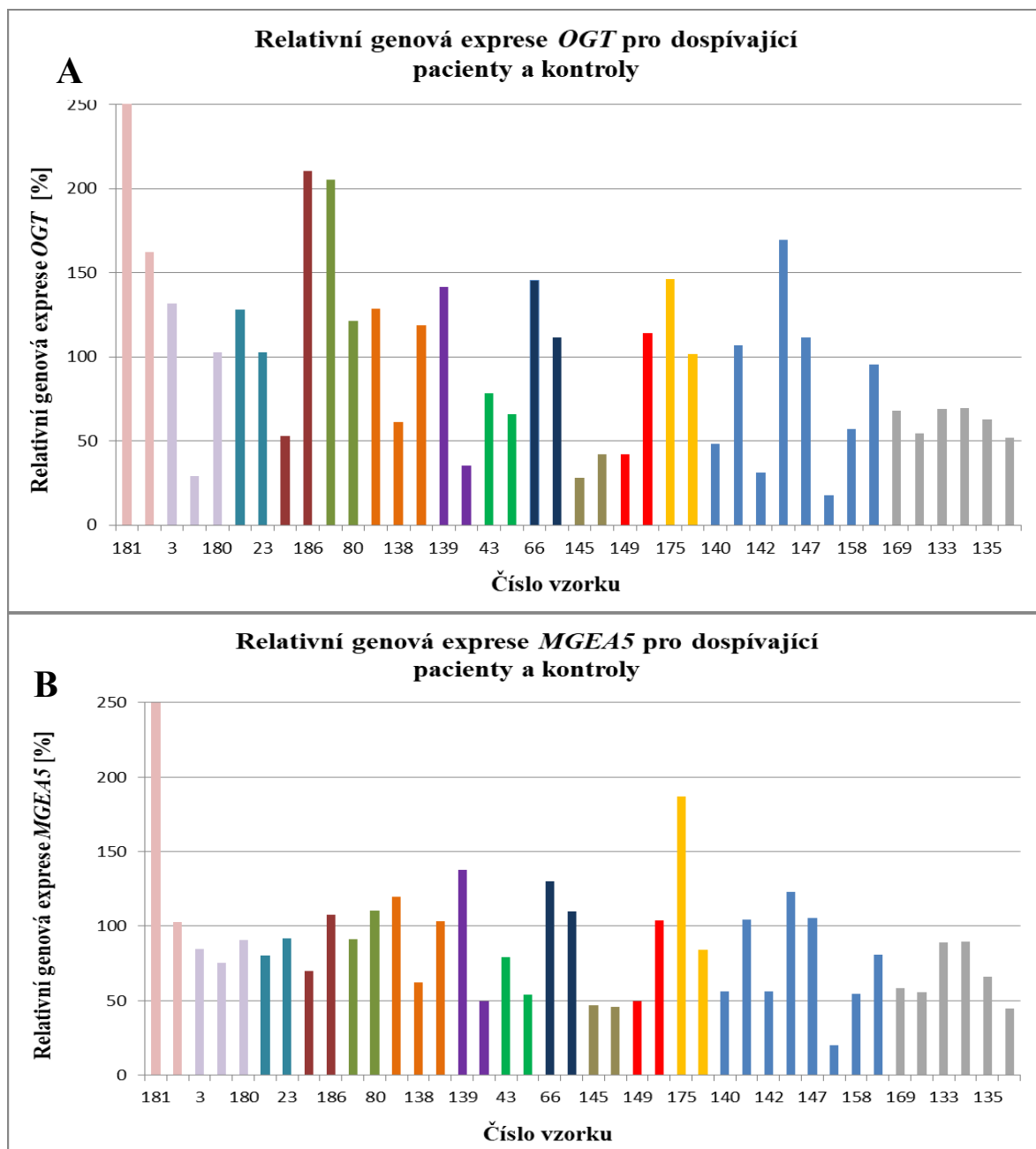
Zkratky: *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu



Graf č. 4: Relativní genová exprese *MGEA5* u dospělých pacientů a kontrol

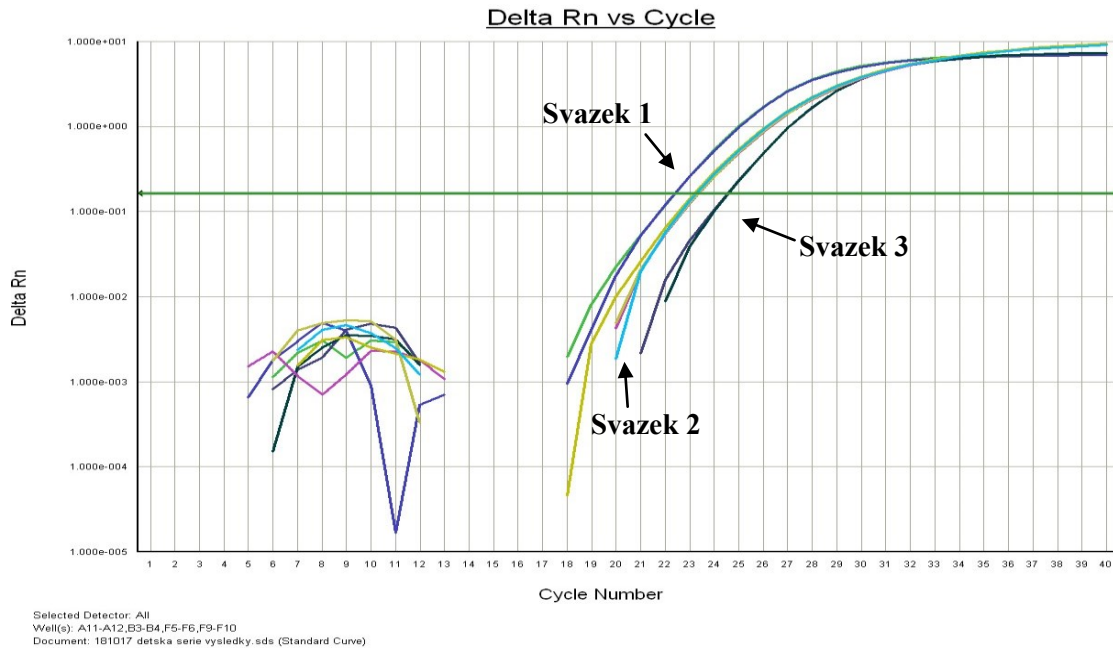
Grafické znázornění relativní exprese genu *MGEA5* dospělého souboru pacientů a zdravých kontrol. Jednou barvou je vždy znázorněn pacient s více odběry, které jsou zobrazeny v chronologickém pořadí. Modře jsou znázorněni pacienti pouze s jedním odběrem, šedě pak zdravé kontroly. Expres mRNA byla naměřena přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), data byla vyhodnocována softwarem GenEx (Multid, Švédsko). $n_{M0}=25$, $n_{Mx}=23$, $n_{M6}=17$, $n_{M12}=13$, $n_k=39$

Zkratky: *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu



Graf č. 5: Relativní genová exprese *OGT* (A), resp. *MGEA5* (B) dospívajících obézních pacientů a kontrol

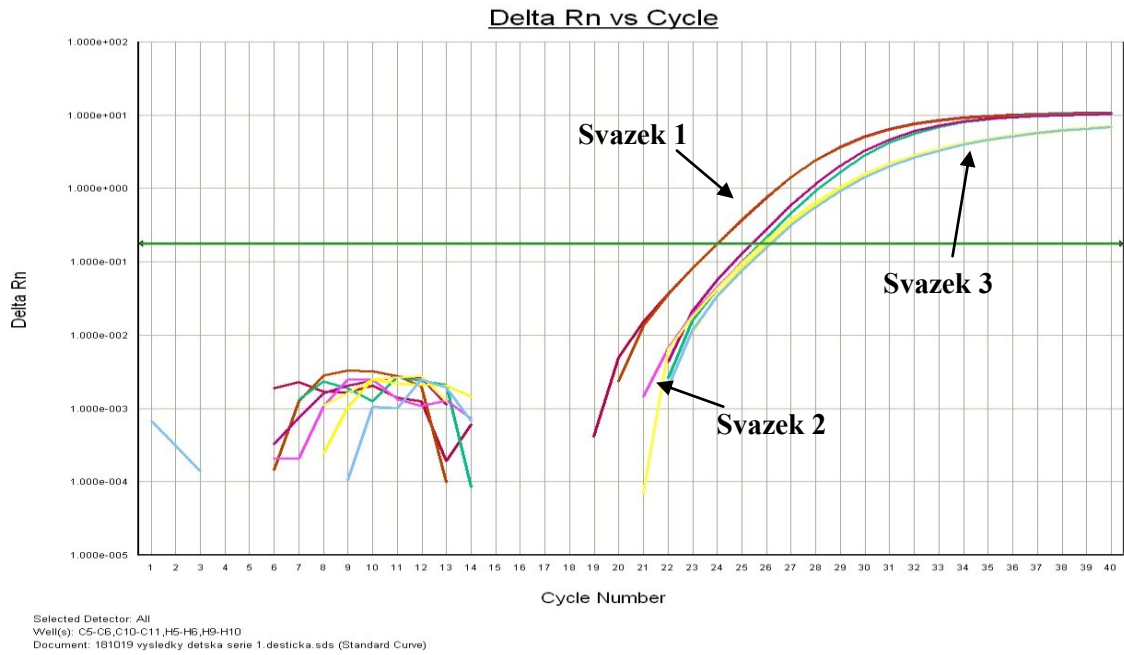
Graficky znázorněná relativní exprese genů *OGT* a *MGEA5* dospívajícího souboru pacientů a kontrol. Jednou barvou je vždy znázorněn pacient s více odběry, které jsou zobrazeny v chronologickém pořadí. Modře jsou znázorněni pacienti pouze s jedním odběrem, šedě pak zdravé kontroly. Exprese mRNA byla naměřena přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA), data byla vyhodnocována softwarem GenEx (Multid, Švédsko). $n_{M0}=20$, $n_{M6}=12$, $n_{M12}=3$, $n_k=6$ Zkratky: *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu, *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu



Graf č. 6: Ukázka exprese genů *OGT* a *PSMB6* pro vybraného pacienta a kontroly

Graf znázorňuje srovnání exprese sledovaného genu *OGT* s referenčním genem *PSMB6* u vybraného vzorku č. 80 od dospívajícího pacienta a kontroly č. 134. První svazek složený ze dvou křivek (dvě křivky vždy tvoří duplikát) značí expresi *OGT* u pacienta (vzorek č. 80). Druhý svazek znázorňuje expresi genu *PSMB6* pro oba vzorky (dohromady 4 křivky), třetí svazek pak expresi *OGT* u zdravé kontroly (vzorek č. 134). Exprese sledovaného genu dosahuje u pacienta nižších hodnot Ct a tedy vyšší genové exprese v porovnání s kontrolním vzorkem. Naproti tomu exprese referenčního genu jsou srovnatelné pro vzorek pacienta i kontroly. Křivky exprese všech genů byly naměřeny přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystems (USA) a 7300 System SDS Software - Applied Biosystems (USA)

Zkratky: Rn - normalizovaná fluorescence

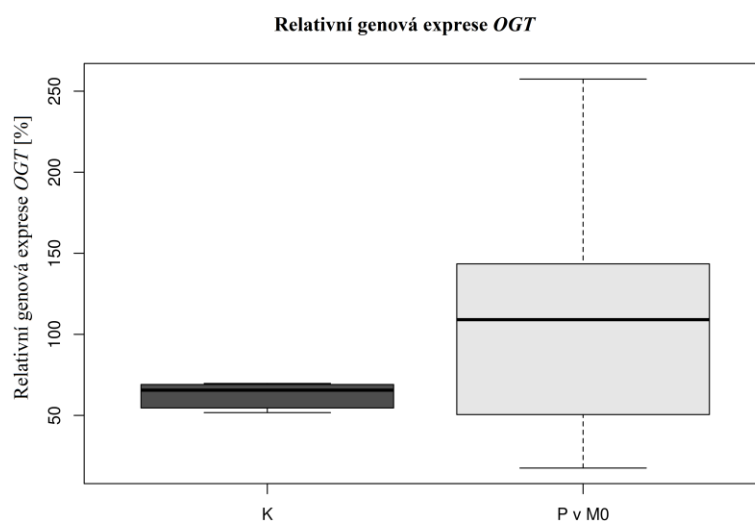


Graf č. 7: Ukázka exprese genů *MGEA5* a *HPRT1* pro vybraného pacienta a kontroly

Ukázka srovnání exprese sledovaného genu *MGEA5* s referenčním genem *HPRT1* u vybraného pacienta a kontroly. První svazek dvou křivek (dvě křivky vždy tvoří duplikát) značí expresi genu *MGEA5* u pacienta (vzorek č. 80), druhý svazek dvou křivek pak expresi zdravé kontroly (vzorek č. 134). Třetí svazek čtyř křivek znázorňuje expresi referenčního genu *HPRT1* pro oba vzorky. Exprese sledovaného genu dosahuje u pacienta nižších hodnot Ct a tedy vyšší genové exprese v porovnání s kontrolním vzorkem. Naproti tomu exprese referenčního genu jsou srovnatelné jak pro vzorek pacienta, tak pro vzorek kontroly. Křivky exprese všech genů byly naměřeny přístrojem 7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystems (USA) a zobrazeny programem 7300 System SDS Software - Applied Biosystems (USA)

Zkratky: Rn - normalizovaná fluorescence

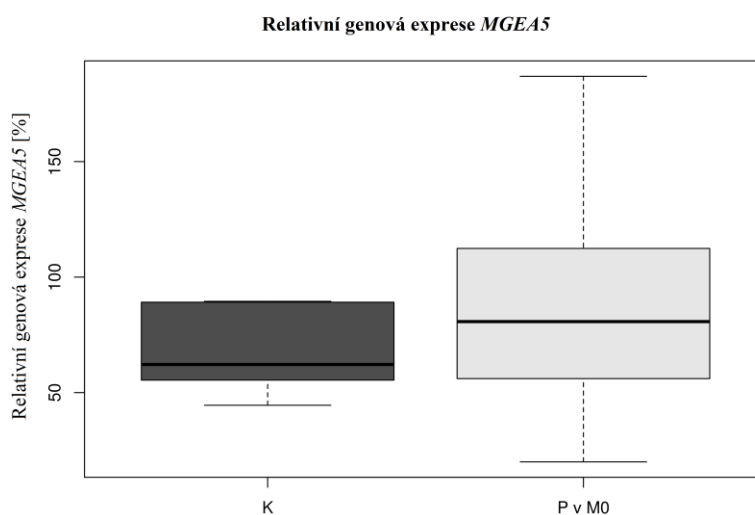
4.3 Statistické zpracování souboru vzorků od dospívajících obézních pacientů



Graf č. 8: Relativní genová exprese *OGT* v souboru dospívajících obézních a kontrol

Rozdíly mezi kontrolami a pacienty byly analyzovány pomocí Mann-Whitneyho U-testu. Za statisticky významné byly považovány dosažené hladiny testů menší než 5 %. Analýza byla provedena ve statistickém balíku R verze 3.4.4 (R Core Team, 2018). $p=0,2185$, $N_{M0}=20$, $N_k=6$

Zkratky: K – dospívající kontrola, P – dospívající obézní pacient, M0 – první odběr, *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu



Graf č. 9: Relativní genová exprese *MGEA5* v souboru dospívajících obézních a kontrol

Rozdíly mezi kontrolami a pacienty byly analyzovány pomocí Mann-Whitneyho U-testu. Za statisticky významné byly považovány dosažené hladiny testů menší než 5 %. Analýza byla provedena ve statistickém balíku R verze 3.4.4 (R Core Team, 2018). $p=0,2736$, $N_{M0}=19$, $N_k=6$

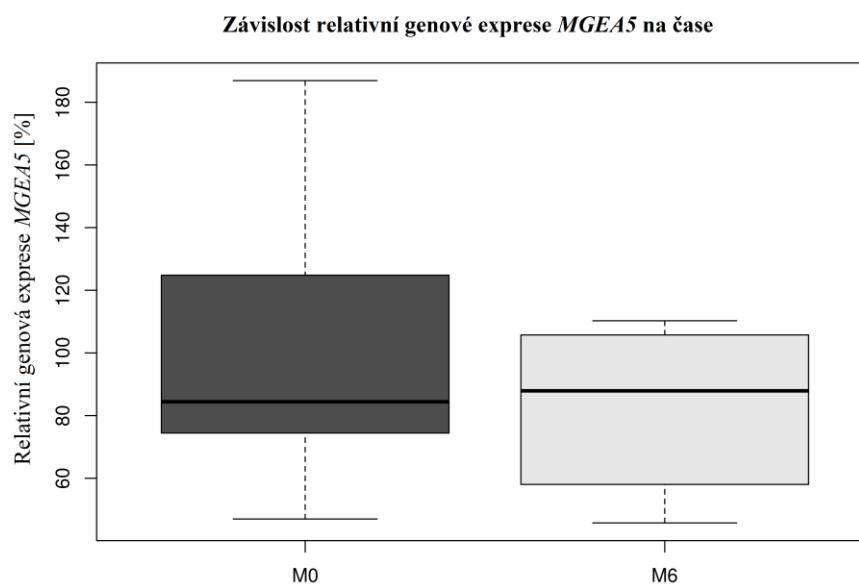
Zkratky: K – dospívající kontrola, P – dospívající obézní pacient, M0 – první odběr, *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu



Graf č. 10: Relativní genová exprese *OGT* dospívajících obézních pacientů v čase

Rozdíly mezi pacienty v nultém a šestém měsíci (po přechodu na zdravý životní styl) byly porovnávány s použitím párového t-testu. Za statisticky významné byly považovány dosažené hladiny testů menší než 5 %. Analýza byla provedena ve statistickém balíku R verze 3.4.4 (R Core Team, 2018). $p=0,7697$, $N_{M0}=20$, $N_{M6}=12$

Zkratky: M0 – první odběr, M6 – odběr po 6 měsících, *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu



Graf č. 11: Relativní genová exprese *MGEA5* dospívajících obézních pacientů v čase

Rozdíly mezi pacienty v nultém a šestém měsíci (po přechodu na zdravý životní styl) byly porovnávány s použitím párového t-testu. Za statisticky významné byly považovány dosažené hladiny testů menší než 5 %. Analýza byla provedena ve statistickém balíku R verze 3.4.4 (R Core Team, 2018). $p=0,9814$, $N_{M0}=19$, $N_{M6}=12$

Zkratky: M0 – první odběr, M6 – odběr po 6 měsících, *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu

Tabulka č. 8: Porovnání antropometrických a biochemických parametrů u 2 vybraných pacientů před a po úpravě životního stylu

Odběr [měsíce]	Pacient P1 - Muž			Pacient P2 – Žena				Standardní hodnoty
	0	6		0	6	12		
Věk [roky]	15			15				
Váha [kg]	115,5	112,2	↓	107,2	95,3	99,3	↓↑	Ž. 56,8* M. 64,2*
BMI	34,8	33,8	↓	35,5	31,2	32,3	↓↑	Ž. 20,5* M. 20,6*
Tělesný tuk [%]	40	35,6	↓	41,5	41,2	42,2	↓↑	Ž. 15,7-29,9 %** M. 10,4-20,7 %**
Glykémie [mmol/l]	5,2	5,7	↑	5,1	4,6	4,5	↓↓	1-15 let: 3,3-5,4
TGA [mmol/l]	2,3	3,2	↑	2,12	1,38	1,64	↓↑	1-15 let: 1,0-1,64
HDL chol [mmol/l]	0,92	0,93	↑	0,73	0,92	0,92	↑	>1,00
Insulin [mU/l]	24,68	26,78	↑	23,79	nd	nd		2,6–24,9
HbA1c [mmol/mol]	30	31	↑	28	27	27	↓↓	20,0-42,0
c-peptid [nmol/l]	1,23	1,24	↑	1,32	nd	nd		0,37–1,47
Relativní exprese <i>OGT</i>	128	103	↓	128	61	119	↓↑	nd
Relativní exprese <i>MGEA5</i>	80	92	↑	119	62	103	↓↑	nd

Šipka označuje trend ve změně sledovaného parametru. * data z VI. Antropologického výzkumu z roku 2001 [73], ** data z [74]

Zkratky: BMI - index tělesné hmotnosti, HbA1c - glykovaný hemoglobin, HDL - vysokohustotní lipoprotein, TGA – triacylglyceroly, nd – nebylo odebráno, *OGT* – gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu, *MGEA5* - gen pro N-acetylglukosaminidasu, Ž – ženy, M - muži

5. Diskuse

V diplomové práci byla provedena rozsáhlá analýza genové exprese enzymů OGT a OGA (odpovídající gen *MGEA5*), která navazovala na pilotní experiment bakalářské práce [71]. Celkem bylo izolováno 188 RNA vzorků od obézních dospívajících a dospělých pacientů a kontrol. Výtěžky se u většiny vzorků pohybovaly v řádu stovek, nejnižší použitá koncentrace RNA činila 47,6 ng/μl, vzorky s nižším výtěžkem byly z dalších experimentů vyřazeny. Tento vzorek měl však relativně vysoké hodnoty Ct pro referenční geny, které jsou pravděpodobně známkou příliš malého reakčního množství templátu. Minimální koncentrace doporučená výrobcem reverzní transkriptasy se pohybuje kolem koncentrace RNA 65 ng/μl. Nejnižší optimální koncentrace pro ošetření DNasou se tak pravděpodobně pohybuje v oblasti koncentrací RNA 90 ng/μl. Nejnižší použitá koncentrace RNA v této analýze je tak pravděpodobně příliš nízká. RNA byla izolována jak z lymfocytů suspendovaných a uchovávaných v TriReagent, tak z pelety lymfocytů, ke které byl TriReagent přidán až při samotné izolaci RNA. Činidlo TriReagent má stabilizační vliv na RNA, během několikaletého uchovávání lymfocytů bez tohoto činidla tak mohlo dojít k degradaci či fragmentaci RNA. Výtěžky RNA z pelety nevykazují rozdílné hodnoty oproti lymfocytům v suspenzi, nicméně hodnoty genové exprese referenčních genů u některých takto zpracovaných vzorků dosahují vysokých hodnot Ct (nad 30), které naznačují možnou fragmentaci RNA. Dále byla RNA ošetřena DNasou, která zamezila případné přítomnosti DNA ve vzorku. Výrobce doporučuje ošetření 1 μl DNasy do koncentrace RNA 200 ng/μl, nad tuto hodnotu koncentrace pak 2 μl DNasy. Během experimentů bylo zjištěno, že tato hranice leží příliš nízko, a bylo tak dosaženo příliš velkých ztrát výtěžků RNA. Proto byla hranice ošetření 2 μl DNasy určena přibližně kolem hodnoty 280 ng/μl a dále bylo využíváno tohoto experimentálního poznatku. Čistá rozpuštěná RNA má poměr absorbance 260/280 v rozmezí 1,6 – 2,0 a hodnota nekontaminované RNA se nachází přibližně kolem 2. Hodnoty tohoto poměru absorbancí, značící čistotu RNA, přesahovaly u většiny vzorků (ošetřených i neošetřených DNasou) hranici 1,6. U těchto vzorků tedy bylo dosaženo úplného rozpuštění RNA a také relativní čistoty. V případech, kdy je poměr nižší než 1,75, vzorek RNA mohl obsahovat stopy proteinů. Poměr absorbancí 260/230 by měl být v rozsahu 1,8 – 2,2. Nižší hodnota značí možnou kontaminaci rozpouštědlem, v tomto případě chloroformem nebo fenolem přítomným v činidle TriReagentu.

Analýza genové exprese sledovaných a referenčních genů byla provedena u 157 vzorků (112 vzorků pacientů a 45 kontrolních vzorků). Hodnoty genových expresí referenčních genů určovaly důvěryhodnost výsledků, genová exprese referenčních genů by měla být napříč populací poměrně uniformní. Hodnota exprese genu *PSMB6* se pohybovala v rozsahu Ct 23-25, rozmezí *HPRT1* od hodnot 25 do 28. Hodnoty Ct nad 30 bývají všeobecně označovány jako příliš vysoké a značí příliš nízkou koncentraci cDNA v reakci. Analýza některých vzorků pacientů s vysokými hodnotami Ct byla zopakována, ostatní takovéto vzorky nebyly zahrnuty do statistického vyhodnocení. U kalibračních křivek všech genů byla nejdůležitější oblast prvních tří řadění (první tři duplikáty křivek v grafech č. 1 a 2), která odpovídala hodnotám Ct jednotlivých sledovaných vzorků.

Jedním z cílů této práce bylo provést statistickou analýzu pouze v souboru dospívajících obézních pacientů a kontrol. Soubor se skládal ze 40 vzorků, z nichž počet pacientů se 2 odběry byl 10, pacientů se třemi odběry 2, 8 pacientů bylo s jedním odběrem, kontrolních neobézních vzorků bylo 6. V tomto souboru byla u pacientů pozorována významně vyšší relativní genová exprese genu *OGT* (přibližně o 40 %) v porovnání s kontrolami. Pravděpodobně z důvodu možné adaptabilní odpovědi na zvýšenou úroveň *OGT* byla zvýšena i úroveň exprese *MGEA5* (přibližně o 20 %) u většiny obézních dospívajících pacientů. Tento trend vykazovaly i již dříve zmíněné studie [69,70]. Zároveň bylo u většiny pacientů (9 pacientů z 12) možné pozorovat podobný trend v chování obou sledovaných genů, který je nejvíce patrný při pohledu na grafy č. 5 A, B, strana 59. Dále je možné sledovat změny relativní genové exprese v čase v důsledku změny životosprávy a předpokládaného váhového úbytku. Úprava životního stylu obézního adolescenta se opírá o psychoterapii (nejčastěji kognitivně behaviorální terapii), úpravu stravovacích návyků a dostatečnou pohybovou aktivitu. Kognitivně behaviorální terapie je nejpoužívanější metodou při řešení „návykových“ problémů pacienta, tedy i obezity. Podstatou je změna nevhodného myšlení a jím potencionálního chování. Úprava stravovacích návyků, tj. restrikce energetického příjmu vychází z běžných doporučení racionální zdravé stravy pro danou věkovou skupinu. Strava by měla zůstat pravidelná, pestrá a vyvážená. Přílišná restrikce energie či nevyvážený jídelníček může narušit růst a vývoj dítěte. Změna stravovacích návyků a jídelníčku musí být vždy provázena i zvýšením pohybové aktivity. Dostatečná fyzická aktivita zvyšuje energetický výdej, současně brání při redukci hmotnosti úbytku svalové hmoty [75,76].

U většiny pacientů (9 pacientů z 12) je možné pozorovat pokles exprese genu *OGT* a kompenzačně také *MGEA5* (7 z 12). Ze statistického zpracování všech dospívajících obézních pacientů však vyplývá mírný (nevýznamný) nárůst *MGEA5* v čase. Pro zjištění korelace mezi antropometrickými a biochemickými markery a analýzou genové exprese sledovaných genů byli vybráni 2 reprezentativní pacienti.

Prvního pacienta P1 reprezentuje vzorek č. 49 a č. 23, druhý pacient P2 podstoupil tři odběry, s chronologickým pořadím vzorků č. 37, 138 a 170. V již zmíněné studii [69] prováděné na zdravém souboru mužů byla pozorována korelace mezi úrovní glykosylace pomocí β -N-acetylglukosaminu a markery, jako je koncentrace triacylglycerolů, cirkulujícím inzulinem v krvi a procentem tělesného tuku. U pacienta P1 byl zaznamenán pokles relativní genové exprese *OGT* o 25 %, tato změna koreluje s váhovým úbytkem (3,2 kg) i s poměrně výrazným poklesem procenta tuku v těle (o 4,4 %) a se současným nabráním svalové hmoty. Naměřená koncentrace inzulinu i signálního C-peptidu při druhém odběru naopak stoupla, tak jako u většiny sledovaných dospívajících pacientů. Také koncentrace triacylglycerolu u tohoto pacienta stoupla poměrně výrazně (o 0,9 mmol/l), u většiny ostatních pacientů koncentrace triacylglycerolů klesá s úbytkem procenta tuku v těle. Markery diagnostikující diabetes, jako hladina glykémie v krvi a koncentrace glykovaného hemoglobinu, mírně vzrostly. Úroveň relativní exprese *MGEA5* vzrostla o 12 %, tato změna koreluje se statistickým vyhodnocením, kdy byl pozorován mírný nárůst genové exprese tohoto enzymu. Zde se naopak nepotvrzuje adaptační teorie zmíněná výše, kdy se předpokládá adaptabilní odpověď *MGEA5* na sníženou expresi *OGT*. Je ale možné, že tato adaptabilní odpověď může nastat po delší době, než je námi sledovaný časový horizont. U pacienta P2 koreluje váhový úbytek (11,9 kg) s lehkým úbytkem procenta tuku v těle (0,3 %) s výrazným poklesem relativní genové exprese *OGT* i *MGEA5* po 6 měsících, po dalších 6 měsících pacient naopak zaznamenal váhový nárůst o 4 kg (% tuku vzrostlo o 1 %) s čímž opět koreluje opětovný nárůst genové exprese *OGT* i *MGEA5*. V souladu s těmito pozorování klesla i hladina triacylglycerolů po prvních 6 měsících (o 0,7 mmol/l) a po nabrání hmotnosti opět vzrostly o 0,26 mmol/l. U tohoto pacienta koreluje váhová změna se změnou procenta tuku v těle i s hladinou triacylglycerolů. Koncentrace inzulinu i C-peptidu byla naměřena jen při prvním odběru, u těchto parametrů tedy nebylo možné sledovat změny v čase.

Dále je potřeba brát v potaz i to, že samotný proces snižování tělesné hmotnosti může u pacientů způsobit stres, který také může mít pozitivní vliv na zvýšení úrovně

sledovaného typu glykosylace a s ní související úrovní exprese regulujících enzymů. V souvislosti se změnou životního stylu, která zahrnuje mimo jiné pohybovou aktivitu, byl pozorován vliv na zvýšení glykosylace bílých krvinek pomocí O-GlcNAc bezprostředně po fyzické zátěži [77]. V současné době nejsou známy žádné další aspekty ovlivňující hladinu glykosylace pomocí O-GlcNAc, nelze proto jednoznačně posoudit, zda na pozorované změny má vliv pouze úprava životního stylu nebo i jiné aspekty. Dalším možným důvodem rozdílnosti výsledků, zejména ve sledování exprese v čase, může být i fakt, že několik pacientů při naordinované změně životního stylu naopak na tělesné hmotnosti přibralo. Naopak někteří pacienti sice zaznamenali váhový úbytek, nicméně kromě tuku ztratili i svalovou hmotu. Zda má tento ne zcela efektivní styl snižování váhy vliv na naměřené výsledky, nelze zhodnotit. Dále vyvstává otázka, za jak dlouho po změně tělesné stavby se mohou tyto změny projevit na změnách v homeostáze sledovaných enzymů. Nabízí se předpoklad rozšíření současného souboru za účelem získání relevantnějších závěrů a signifikantnějších rozdílů, které by mohly vést k možnosti sledování exprese genů kódujících enzymy OGT a OGA jako biochemických markerů např. v diagnostice prediabetického stádia.

6. Souhrn

V teoretické části byla popsána posttranslační modifikace pomocí O-glykosylace s vazbou přes β -N-acetylglukosamin, dále byly shrnuty patologické situace, které jsou s abnormální hladinou této glykosylace spojovány, zejména pak onemocnění diabetes mellitus II. typu.

Cílem experimentální části bylo sledovat rozdíly ve změně genové exprese OGT a OGA, enzymů participujících na regulaci O-glykosylace pomocí β -N-acetylglukosaminu u souboru složeného z obézních dospívajících a dospělých pacientů a zdravých kontrol. Bylo izolováno 188 vzorků lymfocytů ze 7 ml periferní krve. Z lymfocytů bylo izolováno 188 vzorků RNA pomocí činidla TriReagentu, ze kterého lze izolovat RNA, DNA i proteiny současně. RNA byla ošetřena DNasou a přepsána reverzní transkripcí do cDNA. Následně byla stanovena genová exprese pro *OGT* a *MGEA5* metodou qPCR na přístroji 7300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA). Proteinová frakce bude v budoucnu použita pro stanovení proteinové exprese enzymů OGT a OGA.

Podrobnější statistická analýza dat v souboru 34 obézních dospívajících s rozmezím BMI 24,5 – 51,5 a 6 věkově odpovídajících kontrol prokázala vyšší relativní exprese *OGT* pacientů v porovnání s kontrolami, nikoliv však na statisticky významné hladině. Změny v expresi obou enzymů v čase po úpravě životního stylu nezaznamenaly statisticky významné změny. Korelace mezi změnami pozorovanými v expresi sledovaných genů a mezi antropometrickými a biochemickými markery nebyly nalezeny. Hledání biomarkerů souvisejících s O-glykosylací pomocí β -N-acetylglukosaminu má význam v oblasti prediabetického a časného stádia diabetu II. typu.

Literatura

- [1] N. Zachara, Y. Akimoto, G.W. Hart, The O-GlcNAc Modification, in: *Essent. Glycobiol.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- [2] C.R. Torres, G.W. Hart, Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes Evidence for O-linked GlcNAc, *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 3308–3317.
- [3] G.W. Hart, M.P. Housley, C. Slawson, Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins, *Nature*, 446 (2007) 1017–1022.
- [4] D.C. Love, J.A. Hanover, The hexosamine signaling pathway: deciphering the “O-GlcNAc code,” *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.*, 2005 (2005) re13.
- [5] N.E. Zachara, G.W. Hart, Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc!, *Biochim. Biophys. Acta*, 1761 (2006) 599–617.
- [6] T.Y. Chou, G.W. Hart, C.V. Dang, c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 18961–18965.
- [7] T.Y. Chou, C.V. Dang, G.W. Hart, Glycosylation of the c-Myc transactivation domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92 (1995) 4417–4421.
- [8] D. Voet, J.G. Voetová, *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha (1995).
- [9] Z.G. Levine, S. Walker, The Biochemistry of O-GlcNAc Transferase: Which Functions Make It Essential in Mammalian Cells?, *Annu. Rev. Biochem.*, 85 (2016) 631–657.
- [10] M. Rechsteiner, S.W. Rogers, PEST sequences and regulation by proteolysis, *Trends Biochem. Sci.*, 21 (1996) 267–271.
- [11] C. Gewinner, G. Hart, N. Zachara, R. Cole, C. Beisenherz-Huss, B. Groner, The Coactivator of Transcription CREB-binding Protein Interacts Preferentially with the Glycosylated Form of Stat5, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 3563–3572.

- [12] R.S. Haltiwanger, G.D. Holt, G.W. Hart, Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 2563–2568.
- [13] M.R. Bond, J.A. Hanover, O-GlcNAc Cycling: A Link Between Metabolism and Chronic Disease, *Annu. Rev. Nutr.*, 33 (2013) 205–229.
- [14] N.J. Bryant, R. Govers, D.E. James, Regulated transport of the glucose transporter GLUT4, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3 (2002) 267–277.
- [15] Z. Gurel, N. Sheibani, O-Linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification: a new pathway to decode pathogenesis of diabetic retinopathy, *Clin. Sci.*, 132 (2018) 185–198.
- [16] S. Marshall, V. Bacote, R.R. Traxinger, Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 4706–4712.
- [17] C. Slawson, M.P. Housley, G.W. Hart, O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks, *J. Cell. Biochem.*, 97 (2006) 71–83.
- [18] P. Stanley, N. Taniguchi, M. Aebi, N-Glycans, in: *Essent. Glycobiol.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- [19] R.S. Haltiwanger, M.A. Blomberg, G.W. Hart, Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 9005–9013.
- [20] A.K. Nagel, L.E. Ball, O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase: achieving target substrate specificity, *Amino Acids*, 46 (2014) 2305–2316.

- [21] L.K. Kreppel, M.A. Blomberg, G.W. Hart, Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats, *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 9308–9315.
- [22] W.A. Lubas, D.W. Frank, M. Krause, J.A. Hanover, O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats, *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 9316–9324.
- [23] E. Lee, E. Young Kim, A Role for Timely Nuclear Translocation of Clock Repressor Proteins in Setting Circadian Clock Speed, 2014.
- [24] I.H. Ryu, S.I. Do, Denitrosylation of S-nitrosylated OGT is triggered in LPS-stimulated innate immune response, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 408 (2011) 52–57.
- [25] J.W. Bullen, J.L. Balsbaugh, D. Chanda, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, D. Neumann, G.W. Hart, Cross-talk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK), *J. Biol. Chem.*, 289 (2014) 10592–10606.
- [26] J.M. Rini, J.D. Esko, Glycosyltransferases and Glycan-Processing Enzymes, in: *Essent. Glycobiol.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- [27] M.C. Field, L.J. Wainwright, Molecular cloning of eukaryotic glycoprotein and glycolipid glycosyltransferases: a survey, *Glycobiology*, 5 (1995) 463–472.
- [28] C.B. Hirschberg, M.D. Snider, Topography of Glycosylation in the Rough Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus, *Annu. Rev. Biochem.*, 56 (1987) 63–87.
- [29] M. Perez, C.B. Hirschberg, Translocation of UDP-N-acetylglucosamine into vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, *J. Biol. Chem.*, 260 (1985) 4671–4678.
- [30] D. Heckel, N. Comtesse, N. Brass, N. Blin, K.D. Zang, E. Meese, Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma, *Hum. Mol. Genet.*, 7 (1998) 1859–1872.

- [31] D.L. Dong, G.W. Hart, Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 19321–19330.
- [32] Y. Gao, L. Wells, F.I. Comer, G.J. Parker, G.W. Hart, Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 9838–9845.
- [33] J. Schultz, B. Pils, Prediction of structure and functional residues for O-GlcNAcase, a divergent homologue of acetyltransferases, *FEBS Lett.*, 529 (2002) 179–182.
- [34] P.S. Banerjee, J. Ma, G.W. Hart, Diabetes-associated dysregulation of O-GlcNAcylation in rat cardiac mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112 (2015) 6050–6055.
- [35] L. Wells, Y. Gao, J.A. Mahoney, K. Vosseller, C. Chen, A. Rosen, G.W. Hart, Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 1755–1761.
- [36] N. Khidekel, S.B. Ficarro, P.M. Clark, M.C. Bryan, D.L. Swaney, J.E. Rexach, Y.E. Sun, J.J. Coon, E.C. Peters, L.C. Hsieh-Wilson, Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics, *Nat. Chem. Biol.*, 3 (2007) 339–348.
- [37] M.R. Martinez, T.B. Dias, P.S. Natov, N.E. Zachara, Stress-induced O-GlcNAcylation: an adaptive process of injured cells, *Biochem. Soc. Trans.*, 45 (2017) 237–249.
- [38] F.I. Comer, G.W. Hart, Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II, *Biochemistry*, 40 (2001) 7845–7852.

- [39] L. Wells, L.K. Kreppel, F.I. Comer, B.E. Wadzinski, G.W. Hart, O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 38466–38470.
- [40] F. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, G.W. Hart, C.-X. Gong, O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101 (2004) 10804–10809.
- [41] S. Hoyer, The effect of age on glucose and energy metabolism in brain cortex of rats, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 4 (1985) 193–203.
- [42] N. O'Donnell, N.E. Zachara, G.W. Hart, J.D. Marth, Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability, *Mol. Cell. Biol.*, 24 (2004) 1680–1690.
- [43] N.E. Zachara, G.W. Hart, O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress, *Biochim. Biophys. Acta*, 1673 (2004) 13–28.
- [44] C. Guinez, J. Lemoine, J.-C. Michalski, T. Lefebvre, 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319 (2004) 21–26.
- [45] M. Stumvoll, B.J. Goldstein, T.W. van Haeften, Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, *Lancet Lond. Engl.*, 365 (2005) 1333–1346.
- [46] H. Yki-Järvinen, A. Virkamäki, M.C. Daniels, D. McClain, W.K. Gottschalk, Insulin and glucosamine infusions increase O-linked N-acetyl-glucosamine in skeletal muscle proteins in vivo, *Metabolism.*, 47 (1998) 449–455.
- [47] K. Vosseller, L. Wells, M.D. Lane, G.W. Hart, Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99 (2002) 5313–5318.

- [48] S.A. Whelan, W.B. Dias, L. Thiruneelakantapillai, M.D. Lane, G.W. Hart, Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.*, 285 (2010) 5204–5211.
- [49] S.Y. Park, J. Ryu, W. Lee, O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes, *Exp. Mol. Med.*, 37 (2005) 220–229.
- [50] E.B. Arias, J. Kim, G.D. Cartee, Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-Linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle, *Diabetes*, 53 (2004) 921–930.
- [51] R.N. Cole, G.W. Hart, Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals, *J. Neurochem.*, 79 (2001) 1080–1089.
- [52] G.J. Parker, K.C. Lund, R.P. Taylor, D.A. McClain, Insulin resistance of glycogen synthase mediated by o-linked N-acetylglucosamine, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 10022–10027.
- [53] G. Parker, R. Taylor, D. Jones, D. McClain, Hyperglycemia and Inhibition of Glycogen Synthase in Streptozotocin-treated Mice ROLE OF O-LINKED N-ACETYLGLUCOSAMINE, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 20636–20642.
- [54] D.A. McClain, W.A. Lubas, R.C. Cooksey, M. Hazel, G.J. Parker, D.C. Love, J.A. Hanover, Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99 (2002) 10695–10699.
- [55] Y. Hu, D. Belke, J. Suarez, E. Swanson, R. Clark, M. Hoshijima, W.H. Dillmann, Adenovirus-mediated overexpression of O-GlcNAcase improves contractile function in the diabetic heart, *Circ. Res.*, 96 (2005) 1006–1013.
- [56] X.L. Du, D. Edelstein, S. Dimmeler, Q. Ju, C. Sui, M. Brownlee, Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site, *J. Clin. Invest.*, 108 (2001) 1341–1348.

- [57] H. Li, U. Förstermann, Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease, *J. Pathol.*, 190 (2000) 244–254.
- [58] D.M. Lehman, D.-J. Fu, A.B. Freeman, K.J. Hunt, R.J. Leach, T. Johnson-Pais, J. Hamlington, T.D. Dyer, R. Arya, H. Abboud, H.H.H. Göring, R. Duggirala, J. Blangero, R.J. Konrad, M.P. Stern, A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans, *Diabetes*, 54 (2005) 1214–1221.
- [59] R. Duggirala, J. Blangero, L. Almasy, T.D. Dyer, K.L. Williams, R.J. Leach, P. O’Connell, M.P. Stern, Linkage of type 2 diabetes mellitus and of age at onset to a genetic location on chromosome 10q in Mexican Americans, *Am. J. Hum. Genet.*, 64 (1999) 1127–1140.
- [60] J.A. Hanover, M.E. Forsythe, P.T. Hennessey, T.M. Brodigan, D.C. Love, G. Ashwell, M. Krause, A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102 (2005) 11266–11271.
- [61] A.B. Kaiser, N. Zhang, W.V.D. Pluijm, Global Prevalence of Type 2 Diabetes over the Next Ten Years (2018-2028), *Diabetes*, 67 (2018) 202-LB.
- [62] M. Brownlee, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, 414 (2001) 813–820.
- [63] G.S. Berenson, S.R. Srinivasan, W. Bao, W.P. Newman, R.E. Tracy, W.A. Wattigney, Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults The Bogalusa Heart Study, *N. Engl. J. Med.*, 338 (1998) 1650–1656.
- [64] M.I. Harris, R. Klein, T.A. Welborn, M.W. Knudman, Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis, *Diabetes Care*, 15 (1992) 815–819.
- [65] A.D. Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 37 (2014) S81–S90.

- [66] A.P. Carson, K. Reynolds, V.A. Fonseca, P. Muntner, Comparison of A1C and fasting glucose criteria to diagnose diabetes among US adults, *Diabetes Care*, 33 (2010) 95–97.
- [67] K. Park, C.D. Saudek, G.W. Hart, Increased expression of beta-N-acetylglucosaminidase in erythrocytes from individuals with pre-diabetes and diabetes, *Diabetes*, 59 (2010) 1845–1850.
- [68] Z. Wang, K. Park, F. Comer, L.C. Hsieh-Wilson, C.D. Saudek, G.W. Hart, Site-specific GlcNAcylation of human erythrocyte proteins: potential biomarker(s) for diabetes, *Diabetes*, 58 (2009) 309–317.
- [69] J.P. Myslicki, J. Shearer, D.S. Hittel, C.C. Hughey, D.D. Belke, O-GlcNAc modification is associated with insulin sensitivity in the whole blood of healthy young adult males, *Diabetol. Metab. Syndr.*, 6 (2014) 96.
- [70] C. Springhorn, T.E. Matsha, R.T. Erasmus, M.F. Essop, Exploring leukocyte O-GlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 97 (2012) 4640–4649.
- [71] K. Bittenglová, Dědičné poruchy glykosylace: metody analýzy glykanů, Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, katedra biochemie, Praha (2017) 40-51.
- [72] R Core Team (2018) R A Language and Environment for Statistical Computing R Foundation for Statistical Computing, Vienna, dostupné na <https://www.R-project.org>, cit. 1. 5. 2019.
- [73] J. Vignerová, J. Riedlová, P. Bláha, Celostátní antropologický výzkum dětí a mládeže 2001, PřF UK v Praze a SZÚ, Praha (2006).
- [74] H.D. McCarthy, T.J. Cole, T. Fry, S.A. Jebb, A.M. Prentice, Body fat reference curves for children, *Int. J. Obes.*, 30 (2006) 598.
- [75] J. Kytnarová, I. Aldhoon Hainerová, J. Boženský, J. Divoká, I. Plášilová, J. Pařízková, D. Pastucha, B. Procházka, P. Tláškal, H. Zamrazilová, Obezita u dětí Standardy léčebných postupů a kvalita ve zdravotní péči, Verlag Dashöfer, Praha (2011).

- [76] I. Aldhoon Hainerová, Obezita v dětství a dospívání. In: Základy klinické obezitologie, Grada, Praha (2011).
- [77] T. Nagy, E. Kátai, V. Fisi, T.T. Takács, A. Stréda, I. Wittmann, A. Miseta, Protein O-GlcNAc Modification Increases in White Blood Cells After a Single Bout of Physical Exercise, *Front. Immunol.*, 9 (2018) 970.

Příloha

Prezentace na konferencích

Kytnarová J, Daňková M, Beránová H, Bittenglová K, Ondrušková N, Matoulek M, Hansíková H: Monitorování glykosylace proteinů jako potencionálního biomarkeru sledování nutričního stavu u adolescentů s obezitou – pilotní studie, *Obezitologie a bariatrie*, 15.-17. listopadu 2018, Parkhotel Plzeň

MUDr. Jitka Kytnarová

Monitorování glykosylace proteinů jako potencionálního biomarkeru sledování nutričního stavu u adolescentů s obezitou – pilotní studie

autoři: Kytnarová J.¹, Daňková M.^{1,2}, Beránková H.¹, Bittenglová K.¹, Ondrušková¹, Matoulek², Hansíková H.¹

¹ Klinika dětského a dorostového lékařství, 1.LF UK a VFN v Praze

² III. interní klinika, 1. LF UK a VFN v Praze

Dysregulace N- a O-glykosylace proteinů v séru u onemocnění jako je Prader-Williho syndrom, diabetes mellitus nebo metabolický syndrom se zdá být spojena s rozsahem jejich metabolické dekompenzace. Navíc se předpokládá, že modifikace proteinů pomocí O-vázaného -N-acetylglukosaminu (O-GlcNAc), katalyzované enzymy O-GlcNAc transferázou (OGT) a O-GlcNAc hydrolázou (OGA) může sloužit jako lepší potenciální biomarker v krvi pro časná stadia diabetu než převážně používaný glykovaný hemoglobin (HbA1c). Uvedené indicie naznačují komplexní dysregulaci glykosylace proteinů v séru pacientů s různými metabolickými chorobami, avšak přesné patomechanismy a souvislosti s dopadem na zdravotní stav nejsou dosud dostatečně prozkoumány. Cílem naší pilotní studie bylo monitorovat změny N- a O-glykosylace proteinů u obézních adolescentů a korelovat je s definovanými metabolickými parametry. V našem souboru jsme sledovali 14 obézních adolescentů ve věku 15-18 let s indexem tělesné hmotnosti (BMI) nad 97. percentilem ve srovnání s publikovanými standardy pro českou dětskou populaci před a po 6 měsících zásahu do životního stylu. Profil sialovaných izoform transferinu a apolipoproteinu C-III jako markerů N- a O-glykosylace v séru byl analyzován izoelektrickou fokusací s následnou imunofixací nebo Western blotem (WB). Globální hladiny modifikace proteinů pomocí O-GlcNAc a hladiny odpovídajících enzymů OGT a OGA byly analyzovány metodami SDS-PAGE a WB. Hladiny exprese mRNA OGT a OGA byly měřeny pomocí RT-PCR. Profily glykosylovaných proteinů v séru a parametry OGT, OGA v izolovaných lymfocytech byly korelovány s nepřímými antropometrickými parametry adiposity a metabolickými indikátory vývoje metabolického syndromu. Nalezení biomarkeru reagujícího na různé metabolické stavy by mohlo pomoci sledovat léčbu pacientů a zaměřit se na nové molekulární dráhy, které jsou základem patofyziologie onemocnění.

podporováno: AZV MZČR 16-31932A, RVOVFN64165

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka