Ekspresija glikoziltransferaza u leukocitima bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

Hadžibegović, Irzal

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:974643

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository



Središnja medicinska knjižnica

Hadžibegović, Irzal (2013) ***Ekspresija glikoziltransferaza u leukocitima bolesnika s akutnim koronarnim sindromom [Expression of glycosyltransferases in leukocytes of patients with acute coronary syndrome].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/1881

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Irzal Hadžibegović

Ekspresija glikoziltransferaza u leukocitima bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

DISERTACIJA

Zagreb, 2013.

Disertacija je izrađena u Odjelu za unutarnje bolesti Opće bolnice „dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu i Laboratoriju za DNA analizu Zavoda za biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Istraživanje za ovu disertacija provedeno je u okviru projekta “Glikozilacija proteina i humani lektini u zdravlju i bolesti” (0219041) i “Glikoproteomika stresa i bolesti povezanih sa stresom” (0219-0061194-2023).

Voditelj rada: prof. dr. sc. Gordan Lauc

Isprva, hvala mojoj obitelji – onoj koja je bila, koja jest i koja će biti i bez koje sve ovo ne bi dovoljno vrijedilo. Zahvaljujem se voditelju rada na ideji, vođenju i podršci, a posebna zahvala ide onima bez kojih izrada ovog istraživanja ne bi bila moguća: Goranu Ćuriću i ostalim zaposlenicima Laboratorija za DNA analizu Zavoda za biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

SADRŽAJ: STRANICA

1. UVOD 1

1.1. Patofiziologija ateroskleroze 2

1.2. Razvoj ateroma i komplikacije 4

1.3. Klinički sindromi ateroskleroze 6

1.4. Akutni koronarni sindrom 7

1.5. Glikozilacija proteina 8

1.6. Genetički aspekti glikozilacije 13

1.7. Molekularna biologija glikozilacije i uloga glikana 14

1.7.1. N-glikani 18

1.7.2. O-glikani 20

1.7.3. Glikosfingolipidi i gangliozidi 22

1.7.4. Sijalinske kiseline 25

1.8. Klasifikacije glikoziltransferaza 26

1.8.1. Fukoziltransferaze 26

1.8.2. Sijaliltransferaze 31

2. HIPOTEZA 38

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 39

4. ISPITANICI I METODE 40

4.1. Ispitanici 40

4.1.1. Bolesnici s akutnim koronarnim sindromom 40

4.1.2. Kontrolna skupina 41

4.1.3. Isključujući kriteriji 41

4.1.4. Postupanje s ispitanicima 42

4.2. Metode 43

4.2.1. Izolacija RNA i sinteza cDNA 43

4.2.2. Analiza ekspresija gena 43

4.3. Statistička analiza 47

5. REZULTATI 48

5.1. Značajke ispitivanih skupina 48

5.2. Relativne vrijednosti genske ekspresije glikoziltransferaza 51

6. RASPRAVA 64

6.1. Genska ekspresija glikoziltransferaza u akutnoj koronarnoj bolesti 64

6.2. Genska ekspresija fukoziltransferaza 65

6.3. Genska ekspresija sijaliltransferaza 71

6.4. Ograničenja istraživanja i prijedlozi budućih istraživanja 77

7. ZAKLJUČAK 80

8. SAŽETAK 82

9. SUMMARY 84

10. LITERATURA 86

11. ŽIVOTOPIS 100

KRATICE

ADCC	staničnu citotoksičnost ovisna o protutijelima, prema eng. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*
AKS	Akutni koronarni sindrom
Asn	asparagin
ECM	Izvanstanični matriks
EKG	Elektrokardiogram
ER	Endoplazmatska mrežica (rER – hrapavi, sER – glatki)
Fuc	fukoza
FucT	fukoziltransferaza
FUT1	fukoziltransferaza 1
FUT10	fukoziltransferaza 10
FUT2	fukoziltransferaza 2
FUT3	fukoziltransferaza 3
FUT4	fukoziltransferaza 4
FUT5	fukoziltransferaza 5
FUT6	fukoziltransferaza 6
FUT7	fukoziltransferaza 7
FUT8	fukoziltransferaza 8
FUT9	fukoziltransferaza 9
Gal	galaktoza
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
GDP-fukoza	Gvanozin difosfat-fukoza
Glc	Glukoza
GlcNAc	N-acetilglukozamin
GM3s	Gangliozid GM3 sintaza

Golgi	Golgijev kompleks
GSL	glikosfingolipid
GT	glikoziltransferaza
IL	interleukin
KO	Isključen gen - *knocked out gene*
Man	manoza
NeuNAc	N-acetilneuraminat
NeuNGlc	N-glikolilneuraminat
NSTE-AKS	Akutni koronarni sindrom bez perzistentne elevacije ST segmenta
PDGF	Čimbenik rasta podrijetlom iz trombocita
RT-PCR	Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu
Sia	Sijalinska kiselina
SiaT	sijaliltransferaza
Siat9	Gen koj kodira gangliozid GM3 sintazu (ili *GM3s*)
ST3Gal1	ST3 beta-galaktozid α-2,3-sijaliltransferaza 1
ST3Gal2	ST3 beta-galaktozid α-2,3-sijaliltransferaza 2
ST3Gal3	ST3 beta-galaktozid α-2,3-sijaliltransferaza 3
ST3Gal4	ST3 beta-galaktozid α-2,3-sijaliltransferaza 4
ST3Gal6	ST3 beta-galaktozid α-2,3-sijaliltransferaza 6
ST6Gal1	ST6 β-galaktozamid α-2,6-sijaliltransferaza 1
ST6Gal2	ST6 β-galaktozamid α-2,6-sijaliltransferaza 2
ST6GalNAc1	ST6-(α-N-acetil-neuraminil-2,3-β-galaktozil-1,3)-N-acetilgalaktozaminid α-2,6- sijaliltransferaza 1
ST6GalNAc2	ST6-(α-N-acetil-neuraminil-2,3-β-galaktozil-1,3)-N-acetilgalaktozaminid α-2,6- sijaliltransferaza 2

ST6GalNAc3	ST6-(α-N-acetil-neuraminil-2,3-β-galaktozil-1,3)-N-acetilgalaktozaminid α-2,6- sijaliltransferaza 3
ST6GalNAc4	ST6-(α-N-acetil-neuraminil-2,3-β-galaktozil-1,3)-N-acetilgalaktozaminid α-2,6- sijaliltransferaza 4
STEMI	Infarkt miokarda s elevacijom ST segmenta
SŽS	Središnji živčani sustav
TNFα	faktor nekroze tumora alfa

POPIS SLIKA STRANICA

Slika 1.1. Adhezijske molekule na površini endotelnih stanica uključene u migraciju i privlačenje leukocita u stijenku arterija u aterosklerozi 3

Slika 1.2. Razvoj i progresija ateroskleroze 5

Slika 1.3. Shematski prikaz glikozilacije proteina i lipida 9

Slika 1.4. Shematski prikaz struktura i enzima uključenih u glikozilaciju 15

Slika 1.5. N-glikozilacija u hrapavoj endoplazmatskoj mrežici 18

Slika 5.2.1. Razlike u prosječnim relativnim razinama ekspresije FucT prema GAPDH između prvog uzorkovanja u akutnoj i drugog uzorkovanja u kroničnoj fazi u bolesnika s AKS 53

Slika 5.2.2. Razlike u prosječnim relativnim razinama ekspresije FucT prema beta aktinu između prvog uzorkovanja u akutnoj i drugog uzorkovanja u kroničnoj fazi u bolesnika s AKS 53

Slika 5.2.3. Razlike u prosječnim relativnim razinama ekspresije SiaT prema GAPDH između prvog uzorkovanja u akutnoj i drugog uzorkovanja u kroničnoj fazi u bolesnika s AKS 54

Slika 5.2.4. Razlike u prosječnim relativnim razinama ekspresije SiaT prema beta aktinu između prvog uzorkovanja u akutnoj i drugog uzorkovanja u kroničnoj fazi u bolesnika s AKS 54

Slika 5.2.5. Značajna razlika u relativnoj ekspresiji FUT5 prema GAPDH između bolesnika sa STEMI i NSTE-AKS u akutnoj fazi bolesti 57

Slika 5.2.6. Značajna razlika u relativnoj ekspresiji FUT5 prema beta-aktinu između bolesnika sa STEMI i NSTE-AKS u akutnoj fazi bolesti 57

Slika 5.2.7. Značajna razlika u relativnoj ekspresiji FUT5 prema GAPDH između bolesnika sa STEMI i NSTE-AKS u kroničnoj fazi bolesti 58

Slika 5.2.8. Značajna razlika u relativnoj ekspresiji FUT5 prema beta aktinu između bolesnika sa STEMI i NSTE-AKS u kroničnoj fazi bolesti 58

Slika 5.2.9. Značajno niža relativna ekspresija FUT7 prema GAPDH u osoba koje su

uzimale statine 60

Slika 5.2.10. Značajno niža relativna ekspresija FUT7 prema beta aktinu u osoba koje su uzimale statine 60

Slika 5.2.11. Značajno niža relativna ekspresija ST6GalNac3 prema GAPDH u osoba koje su uzimale statine 61

Slika 5.2.12. Značajno niža relativna ekspresija ST6GalNac3 prema beta aktinu u osoba koje su uzimale statine 61

Slika 5.2.13. Značajno niža relativna ekspresija FUT7 prema GAPDH u osoba koje su uzimale acetilsalicilnu kiselinu 62

Slika 5.2.14. Značajno niža relativna ekspresija FUT7 prema beta aktinu u osoba koje su uzimale acetilsalicilnu kiselinu 62

Slika 5.2.15. Značajno više relativne ekspresije gena FUT10, ST6GalNac1 i ST6Gal1 u odnosu na GAPDH u osoba koje su uzimale benzodiazepine 63

Slika 5.2.16. Značajno više relativne ekspresije gena FUT10, ST6GalNac1 i ST6Gal1 u odnosu na beta aktin u osoba koje su uzimale benzodiazepine 63

Slika 6.1. Shematski prikaz razvoja ateroskleroze i moguće uloge analiziranih glikoziltransferaza za koje su dobivene značajne razlike između skupina 78

POPIS TABLICA STRANICA

Tablica 1.1. Fukoziltransferaze 27
Tablica 1.2. Sijaliltransferaze 33
Tablica 4.1. Sljedovi nukleotida početnica gena glikoziltransferaza 45
Tablica 5.1.1. Demografske i kliničke značajke ispitivanih skupina 48
Tablica 5.1.2. Lijekovi koje su ispitanici uzimali tijekom uzimanja uzoraka krvi za analizu 50
Tablica 5.2.1 Razlike relativnih ekspresija za 11 gena između bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u prvom uzorkovanju u akutnoj fazi bolesti i kontrolne skupine 52
Tablica 5.2.2 Razlike relativnih ekspresija za 11 gena između bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u drugom uzorkovanju u kroničnoj fazi bolesti i kontrolne skupine 56

1. UVOD

Dovršenjem projekta ljudskog genoma pozornost biomedicinske znanosti usmjerena je na posttranslacijske modifikacije sintetiziranih proteina. Glikozilacija, enzimsko dodavanje šećernih lanaca (glikana) na sintetizirane proteine, jedan je od najčešćih i najvarijabilnijih posttranslacijskih procesa modifikacije proteina, za što su odgovorni membranski enzimi glikoziltransferaze (1, 2). Procijenjeno je da se više od pola svih proteina sisavaca glikozilira u hrapavom endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu prije nego postanu potpuno funkcionalni zreli proteini (3). Glikani dodani na proteine razlikuju se u strukturi i duljini ovisno o vrsti, stupnju razvoja, diferencijacije, maligne transformacije stanice ili izloženosti stanice različitim štetnim čimbenicima. Ovisno o strukturi glikana i vrsti proteina na koji su dodani, glikani imaju različite funkcije: migracija proteina, funkcija proteinske osnove, zaštita od proteaza i mnoge druge. Poznato je više od 300 različitih glikoziltransferaza, koje prema nedavnim istraživanjima često formiraju enzimske komplekse koje zajednički prenose šećerne lance (4). Do 2000. godine dovršeno je kloniranje većine glikoziltransferaza, čime je tek nedavno omogućen brz razvoj istraživanja promjena glikozilacije u različitim patofiziološkim procesima (5, 6).

Studije genske regulacije glikozilacije proteina u upalnom odgovoru pokazale su značajne promjene ekpresije glikoziltranferaza. Aktivacija ljudskih endotelnih stanica promotorima upalnog odgovora (TNF-alfa, interleukini) dovodi do značajnih promjena genske ekspresije glikoziltransferaza što rezultira važnim funkcionalnim promjenama na površini membrane endotelnih stanica tijekom upale (7). Endotel ima značajnu ulogu u upalnom odgovoru dopuštajući migraciju i ekstravazaciju leukocita, te kontrolirajući protok krvnih žila i homeostazu koagulacije. Migracija i ekstravazacija leukocita odvija se uz pomoć interakcija između šećernih lanaca i njihovih receptora, selektina, eksprimiranih na površinama endotelnih stanica i leukocita (8, 9). Podatci objavljeni 2006. godine o značajnim promjenama razine ekspresije 74 gena povezanih s glikozilacijom (od čega 59 glikoziltransferaza) u ljudskim endotelnim stanicama tretiranim TNF-alfa bili su temelji su za buduća istraživanja regulacije glikozilacije u endotelnim i krvnim stanicama tijekom začetka upale (10).

Aterosklerotska bolest, najraširenija kronična nezarazna bolest današnjice s najvećim udjelom u pobolu i smrtnosti u svijetu, tek je nedavno shvaćena kao bolest u kojoj glavnu

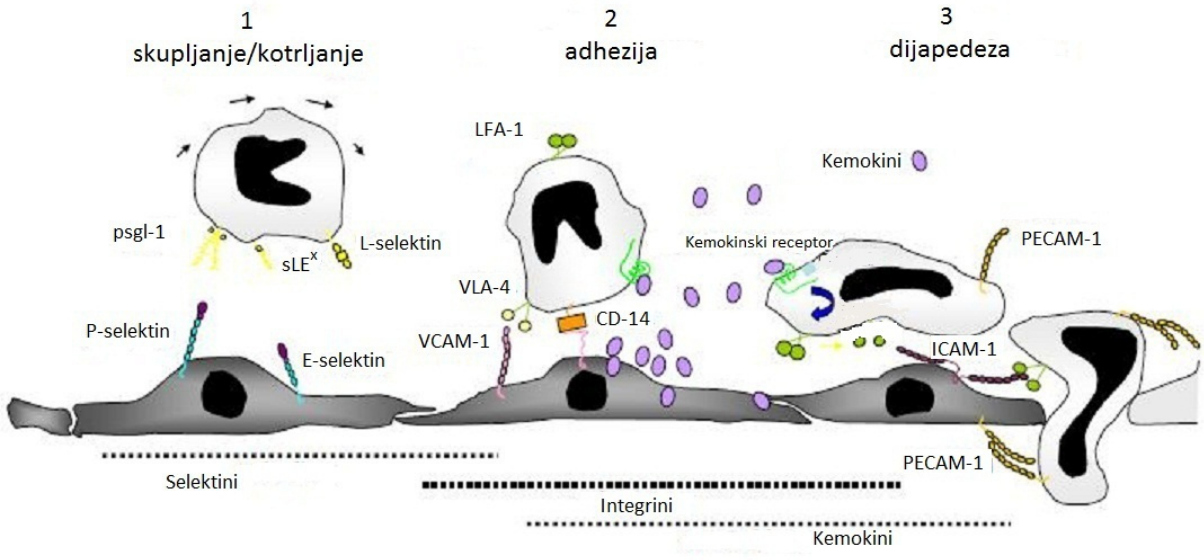
ulogu igraju upalne stanice i živo i dinamično tkivo stijenki arterija (11). Ateroskleroza koronarnih arterija dovodi do akutnog koronarnog sindroma, u čijoj patofiziologiji također sudjeluju aktivirane upalne stanice i njihovi stanični proizvodi (12). Iako su znanja o epidemiologiji, patofiziologiji, liječenju i rehabilitaciji akutnog koronarnog sindroma vrlo raširena, neke od njegovih temeljnih značajki još uvijek nisu potpuno objašnjene. Moguće je da dio tih neotkivenih tajni leži u staničnoj membrani, točnije njezinim glikoliziranim domenama koje su ključni čimbenici stanične signalizacije, aktivacije i migracije.

1.1. Patofiziologija ateroskleroze

Mnoštvo rezultata životinjskih eksperimentalnih modela i temeljnih istraživanja ateroskleroze u ljudi upućuju na „masnu prugu“ kao početno aterosklerotsko oštećenje arterije (13). Ova početna oštećenja najčešće nastaju zbog žarišnog povećanja količine lipoproteina u dijelovima intime – unutarnjeg sloja stijenke arterija. Nakupljanje lipoproteina u intimi arterija nije jednostavno rezultat povećane propusnosti predležećeg endotela, već povećane sklonosti lipoproteina da se vežu za sastavnice ekstracelularnog matriksa i tako značajno produže svoje vrijeme provedeno u stijenci arterije. Lipoproteini zadržani u ekstracelularnom prostoru intime najčešće međudjeluju i vežu se s proteoglikanima iz ekstracelularnog matriksa arterije što dovodi do usporenog izlaska lipoproteina iz intime (13). Lipoproteini zadržani u intimi i vezani za makromolekule matriksa skloni su kemijskim promjenama poput oksidacije i glikacije. Postoji moštvo studija o povećanoj sklonosti sekvestriranih lipoproteina oksidativnim procesima, a glikacija je istraživana samo na nenezimatskoj razini, i to prvenstveno u bolesnika sa šećernom bolesti (14). Podataka o ulozi enzimatske glikacije proteina i lipida gotovo da i nema, iako kontrolirana posttranslacijska glikanska modifikacija vjerojatno ima važnu ulogu u navedenim procesima.

Nakon akumulacije lipidnih struktura u ekstracelularnom matriksu stijenke arterija, drugi važan korak u nastanku masne pruge je migracija i okupljanje leukocita u intimi arterija. Leukociti nađeni u rastućim ateromima gotovo su uvijek stanice mononuklearne loze: monociti i limfociti. Velik broj adhezijskih molekula, poput selektina i integrina i receptora za mononukleane stanice eksprimirano je na površini endotelnih stanica i odgovorne su za privlačenje, nakupljanje i aktivaciju mononuklearnih stanica u „masnoj prugi“ (15). Važan čimbenik koji utječe na ekspresiju adhezijskih molekula na površini endotelnih stanica je

normalni laminarni protok kroz arterije, koji putem oslobođenog dušičnog oksida dovodi do smanjenja ekspresije adhezijskih molekula (16). Lako se da zaključiti kako je pri poremećenom laminarnom protoku, odnosno turbulentnom protoku i nepovoljnim hemodinamskim silama na stijenci arterije povećana ekspresije adhezijskih molekula i tako olakšano stvaranje i povećanje početnih lezija arterije. Također, dokazano je već brojnim istraživanjima kako oksidacija lipoproteina i neenzimatska glikacija povećavaju izražajnost adhezijskih molekula na stanicama endotela, dok podataka o izravnom utjecaju enzimatske glikozilacije koja je genski fino regulirana ima vrlo malo. U tim studijama analizirane su promjene genske ekspresije enzima uključenih u stvaranje selektina pri izlaganju oksidaciji (17).



Slika 1.1. Adhezijske molekule na površini endotelnih stanica uključene u migraciju i privlačenje leukocita u stijenku arterija u aterosklerozi (preuzeto i modificirano od: EAJ van Wanrooij, 2007.)

Kao što je prikazano na slici 1.1. (18), leukociti bivaju isprva privučeni na endotel stijenke arterije putem djelovanja slabih adhezijskih sila uvjetovanih aktivnošću triju molekula iz selektinske obitelji: E-selektina kojeg eksprimiraju endotelne stanice, P-selektina kojeg eksprimiraju endotel i trombociti i L-selektina kojeg eksprimiraju leukociti. Slabe adhezijske sile koje nastaju između selektina i njihovih pripadajućih receptora dovode do ključnog trenutka inicijacije upalne reakcije – skupljanja leukocita u blizini endotelnih stanica. Leukociti privučeni u blizinu endotelnih stanica bivaju aktivirani citokinima proizvedenim u endotelu (poput TNF-α ili IL-1), što dovodi do povećane proizvodnje integrina. Integrini, proizvedeni od strane aktiviranih leukocita i endotelnih receptora, stvaraju

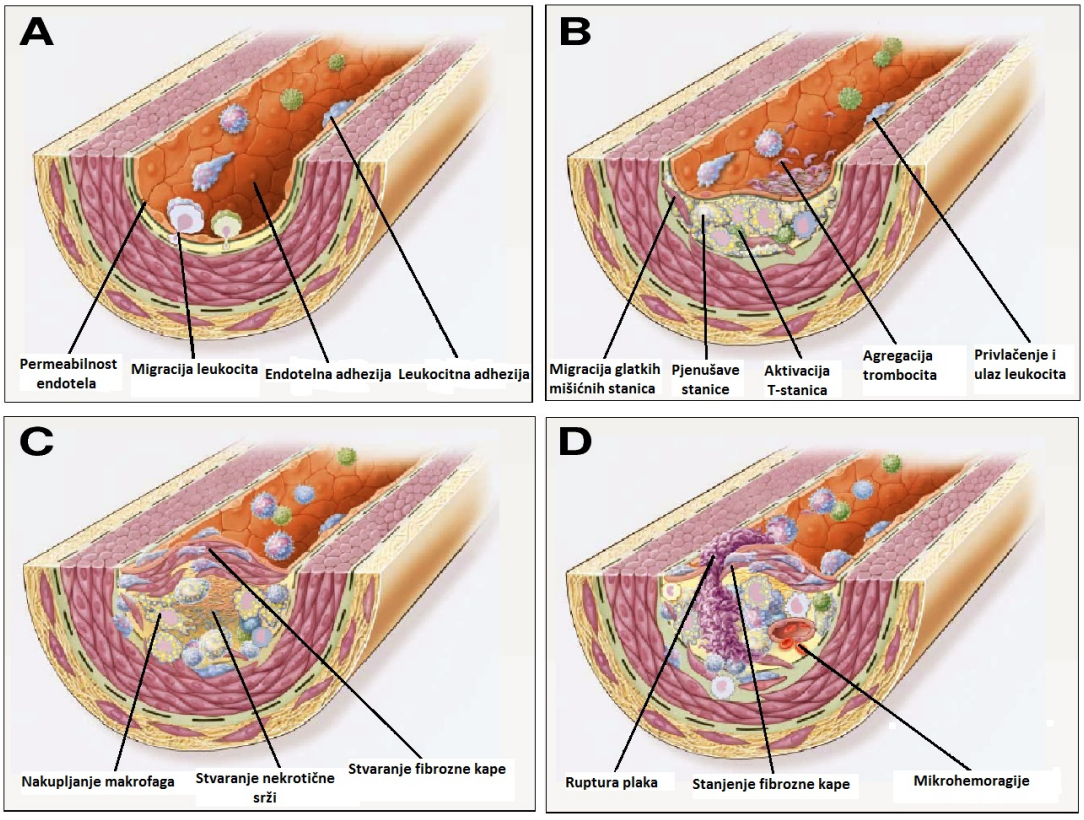
čvrste adhezijske sile te tako leukociti probijaju endotel i smještaju se u intimi. S druge strane, na mogućnost probijanja endotela i smještanja u intimu značajno utječu kemoatraktivni citokini poput PECAM-1, čija je ekspresija pojačana nakon aktivacije integrina. Mononuklearne stanice koje se probiju do intime tamo diferenciraju u makrofage i preobražavaju se u lipidima nakrcane pjenušave stanice. Aktivnost tih pjenušavih stanica vrlo vjerojatno određuje budućnost aterosklerotske lezije. Naime, makrofagi nakupljaju lipoproteine uz pomoć receptorski uvjetovane fagocitoze. Tako nakrcani makrofagi mogu uz pomoć adhezijskih molekula i „čistačkih" receptora izaći iz intime i tako usporiti progresiju masne pruge i formaciju aterosklerotskog plaka. Neki će makrofagi jednostavno nestati, a neki će doživjeti programiranu smrt stanice – apoptozu. Vjeruje se kako programirana smrt takvih pjenušavih makrofaga dovodi do formiranja nekrotične srži aterosklerotskog plaka, koji tako postaje nestabilan i sklon pucanju. Pjenušave stanice također mogu „glumiti" intrinzičke stanice arterijske stijenke te proizvoditi citokine i faktore rasta koji dovode do proliferacije glatkih mišićnih stanica i proizvodnje ekstracelularnog matriksa te posljedično do povećanja aterosklerotskog plaka ili remodelacije stijenke arterije (19). Svi ti primjeri ilustriraju značajnu ulogu upalnih i endotelnih stanica i ekspresije signalnih molekula na njihovoj površini u nastanku i razvoju ateroma u stijenci arterija.

1.2. Razvoj ateroma i komplikacije

Već je spomenuto kako pjenušave stanice u stijenci arterija mogu proizvoditi citokine i faktore rasta te tako dovesti do proliferacije glatkih mišićnih stanica i fibroblasta u ateromu. Smatra se da je to jedno od ključnih mjesta moguće tranzicije početnog oštećenja stijenke arterije akumulacijom pjenušavih stanica u fibrotski-masnu rastuću i potencijalno nestabilnu leziju (19). Na primjer, aktivirane endotelne stanice mogu proizvoditi faktor rasta podrijetlom iz trombocita (PDGF) koji stimulira migraciju glatkih mišićnih stanica iz medije u intimu i tako dovodi do progresije plaka. Osim proizvedenih staničnih medijatora, destabilizaciji plaka u nastajanju pridonosi proizvodnja i matriks metaloproteinaza (enzima koji dodatno destabiliziraju plak i razgrađuju njegov fibrozni pokrov) i aktivacija trombocita koja dovodi do sklonosti trombozi. Sklonost trombozi povećana je i zbog stvaranja mikrocirkulacije unutar ateroma jer su te novostvorene krvne žile mjesta mogućih lokalnih mikrohemoragija koje aktiviraju čimbenike kolagulacije. Razvijeni ateromi često sadrže fibrin i hemosiderin koji su dokaz uloge mikrohemoragije u progresiji i destabilizaciji aterosklerotskog plaka (20).

Mikrocirkulacija u ateromu također doprinosi već spomenutim procesima mobilizacije leukocita jer služi kao izvrsna komunikacijska površina između ateroma i glavne arterijske cirkulacije. Tijekom daljnjeg napredovanja, aterosklerotski plakovi nakupljaju kalcij, a mineralizacija plaka po mnogočemu podsjeća na tijek stvaranja kostiju. To potvrđuju i dokazi o prisutnosti osteokalcina, osteopontina i koštanih morfogetentskih proteina u aterosklerotskom plaku (21).

Kao što je prikazano na slici 1.2. (22), budućnost i razvoj aterosklerotskog plaka iz početnog oštećenja arterije („masne pruge“) ovise o složenoj ravnoteži između ulaska i izlaska leukocita i lipoproteina (slika 1.2.A), njihove aktivacije i modifikacije (slika 1.2.B), stanične proliferacije i stanične smrti (slika 1.2.C), proizvodnje ekstracelularnog matriksa, neovaskularizacije i kalcifikacije, te sklonosti rupturi (slika 1.2.D). Mnogostruki su čimbenici koji utječu na ove raznolike događaje u stijenci arterija, ali u posljednje vrijeme sve se više cijene znanja o promjenama „ponašanja“ i interakciji endotelnih stanica i privučenih leukocita.



Slika 1.2. Razvoj i progresija ateroskleroze (preuzeto i modificirano od: AL Mowbray, 2008.)

1.3. Klinički sindromi ateroskleroze

Ateroskleroza je kronična progresivna bolest povezana sa starenjem, te kod mnogih ljudi predstavlja stanje koje ne izaziva nikakve simptome ili kliničke manifestacije. Mnogi bolesnici visoke dobi umiru od drugih nepovezanih bolesti s uznapredovalim stupnjem ateroskleroze koja nikad nije bila značajno klinički ispoljena. S druge strane, mnogi bolesnici doživjeli su potencijalno smrtne akutne kliničke manifestacije ateroskleroze dok je ona bila još u samom početku razvoja. Kako objasniti ovakve različitosti u kliničkoj izražajnosti ateroskleroze?

Remodelacija arterija tijekom formiranja aterosklerotskog plaka značajna je odlika progresije arterijske lezije koja bi mogla dati odgovor na to pitanje. Naime, arterije zahvaćene aterogenezom imaju sklonost povećanju vanjskog promjera u početnim fazama razvoja ateroma što je općepoznato kao „kompenzacijsko proširenje“. Rastući aterom ne suzuje značajno lumen arterije sve dok ne dosegne oko 40% površine koju tvori interna elastična lamina. Proces dosezanja takve površine dugotrajan je, tako da većina ateroma tijekom svog životnog vijeka neće značajno sužavati lumen arterije ni uzrokovati značajno smanjenje perfuzije pripadajućeg tkiva. Suženja koja remete normalni protok i perfuziju tkiva nastaju mnogo kasnije u životu ateroma. Tako u slučaju koronarnih arterija, sporoprogredirajući ateromi postupno dovode do razvoja stabilnog sindroma zahtijevajuće ishemije srčanog mišića, poznatog kao stabilna angina pektoris. U takvim situacijama čak i postupni razvoj potpune opstrukcije koronarne arterije ne dovodi do srčanog infarkta zbog stvaranja kolateralne cirkulacije u miokardu, koja umanjuje učinke potpunog prestanka perfuzije.

S druge strane, mikroanatomske analize aterosklerotskih plakova koji ne izazivaju hemodinamski kritičnu stenozu, a skloni su nestabilnosti i rupturi otkrivaju nekoliko specifičnih odlika. Plakovi skloni rupturi imaju tanke fibrozne kape, relativno velik udio aktiviranih lipoproteina te velik udio pjenušavih makrofaga. Morfometrijske studije lezija koronarnih arterija odgovornih za nastanak rupture plaka i tromboze koronarne arterije otkrile su kako makrofagi i T stanice dominiraju na mjestima rupture i vrlo su aktivni u proizvodnji čimbenika upale poput TNFα ili IL-1. Ti proupalni citokini, između ostalog mogu dovesti i do povećane ekspresije gena odgovornih za sintezu proteolitičkih enzima, poput matriks metaloproteinaza, koje degradiraju ekstracelularni matriks i stanjuju fibroznu kapu plaka. Takva destabilizacija plaka u koronarnoj arteriji može dovesti do rupture plaka koja se onda klinički manifestira kao akutni koronarni sindrom (23, 24).

1.4. Akutni koronarni sindrom

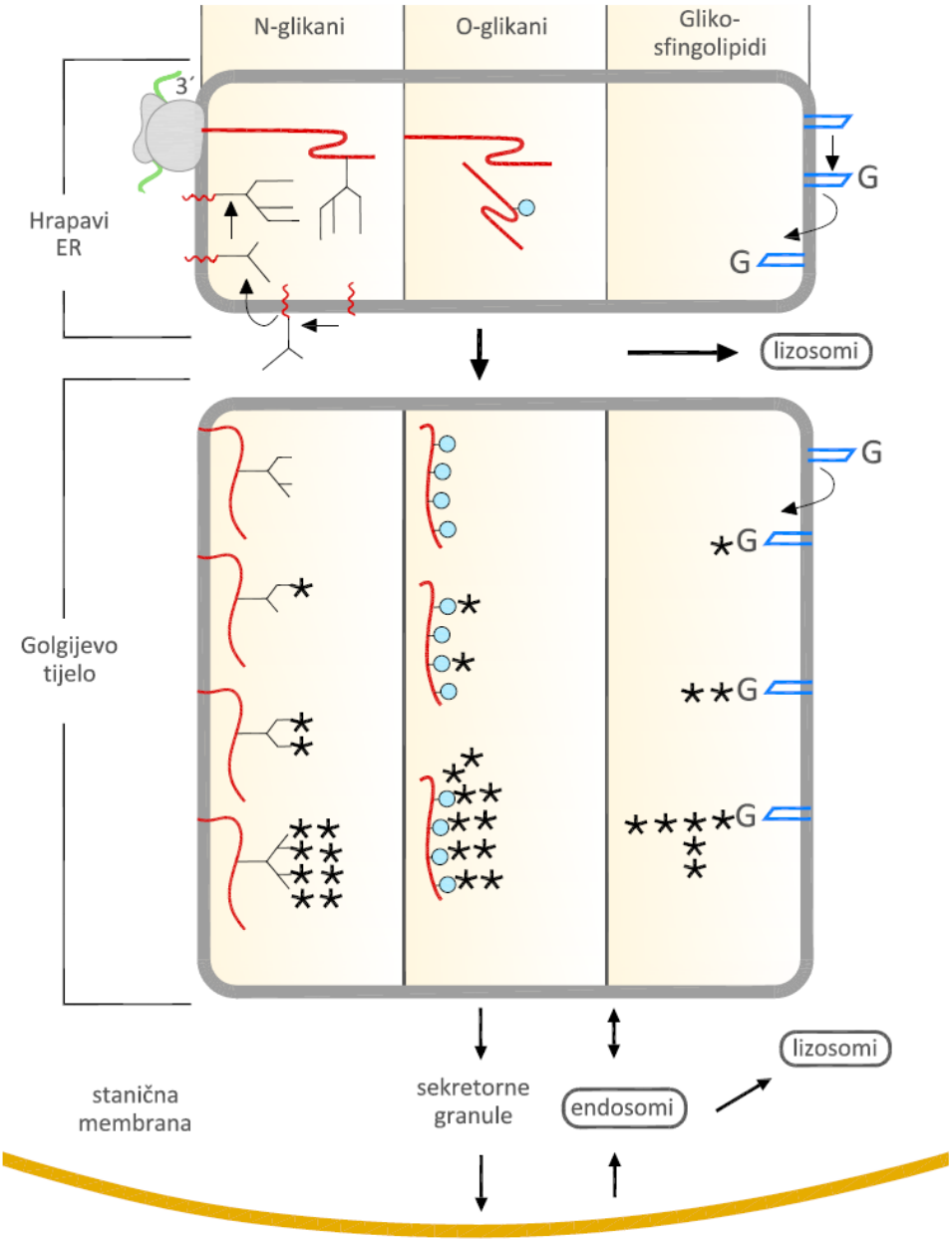
Akutni koronarni sindrom predstavlja klinički spektar akutne koronarne bolesti srca koji čine akutni infarkt miokarda s elevacijom ST segmenta (transmuralni ili infarkt miokarda s Q zubcem), akutni infarkt miokarda bez elevacije ST segmenta (netransmuralni ili non-Q zubac infarkt miokarda), te nestabilna angina pektoris (protrahirana ishemijska bol u prsima) za koje su prema dosadašnjim svjetskim smjernicama kreirani različiti terapijski pristupi i algoritmi (25, 26). Etiopatogenetski gledano, sva su tri sastavna dijela akutnog koronarnog sindroma gotovo jednaka, a razlike postaju važne u kliničkoj prezentaciji koje onda vode i do različitih strategija liječenja. U bolesnika s akutnim infarktom s elevacijom ST segmenta dolazi do akutne i potpune okluzije koronarnog protoka svježe formiranim ugruškom sastavljenim od agregiranih trombocita i fibrina. Brzo dolazi do transmuralne ishemije miokarda distalno od mjesta okluzije što se na EKG zapisu očituje elevacijom ST segmenta. Kod takvih bolesnika cilj je što brži oporavak protoka kroz koronarnu arteriju mehaničkim uklanjanjem ugruška perkutanom koronarnom intervencijom ili pak farmakološki „otapanjem“ fibrinskog dijela ugruška fibrinolitičkom terapijom (25). U bolesnika s infarktom miokarda bez elevacije ST segmenta ili s nestabilnom anginom pektoris također se usljed rupture plaka poremeti protok formiranjem ugruška, ali spontani fibrinolitički procesi dovedu do parcijalne rekanalizacije ugruška, koji je bogat agregiranim trombocitima, a ne fibrinom. Temelj terapije je antitromobocitna, odnosno, antiagregacijska terapija i antikoagulacijska terapija, uz pravovremenu perkutanu koronarnu intervenciju u svrhu potpune stabilizacije protoka (26).

Vidljivo je kako je akutni koronarni sindrom spektar različitih kliničkih manifestacija jednog krvožilnog događaja: rupture visokorizičnog aterosklerotskog plaka na površini koronarne arterije i disfunkcija koronarnog endotela koji zatim dovode do agregacije trombocita, formiranja tromba te ishemije srčanog mišića različitog stupnja. Etiopatogeneza progresije i destabilizacije aterosklerotskih plakova proučavana je na različitim modelima, a osnovna saznanja navedena su ranije u tekstu. Oksidacija lipoproteina zadržanih u ekstracelularnom matriksu, ekpresija HLA-DR antigena na aktiviranim makrofagima, produkcija proupalnih citokina i neenzimatska glikacija lipoproteina naveliko su istraživane, dok podataka o genski kontroliranoj enzimatskoj glikozilaciji endotelnih i upalnih stanica nema mnogo (27).

Dosadašnje studije promjena enzimatske glikozilacije u aterosklerotskim bolestima uglavnom su se bavile analizama razina koncentracije i aktivnosti različitih glikoproteinskih struktura, poput sijalinske kiseline i sijalidaza, u različitim kardiovaskularnim bolestima (28). Ponavljane studije na životnjama utvrdile su regulirajuću ulogu fukoziltransferaza IV i VII (skupina glikoziltransferaza) u sintezi P i E selektina, adhezijskih glikoproteina čija ekspresija na površini endotelnih stanica i leukocita kontrolira migraciju i ekstravazaciju leukocita tijekom upale (29-31). Takvi podatci potvrđeni su i u nedavnim studijama uloge ljudskih fukoziltransferaza u istim procesima (32). Međutim, znanja o povezanosti akutnog koronarnog sindroma i glikozilacije proteina oskudna su (33, 34), a do sada nije provedena studija analize promjena razine genske ekspresije glikoziltransferaza ili ekspresije njihovih produkata u akutnom koronarnom sindromu. U ovom istraživanju mjerit će se ekpresija dostupnih sijaliltransferaza i fukoziltransferaza u leukocitima bolesnika s akutnim koronarnim sindromom, te tako dobiti novi podatci o promjenama genske regulacije glikozilacije u upalnim stanicama. Budući da akutni koronarni sindrom predstavlja tipični upalni proces, u kojem važnu ulogu ima aktivacija i migracija leukocita proupalnim citokinima, istraživanje ekspresije glikoziltransferaza u leukocitima bolesnika s različitom kliničkom prezentacijom u okviru akutnog koronarnog sindroma moglo bi dovesti do važnih novih dijagnostičkih i prognostičkih spoznaja o akutnim koronarnim sindromima. Te nove spoznaje mogle bi pridonijeti ranijem otkrivanju bolesnika s rizikom za razvoj akutnog koronarnog sindroma, koji je značajan uzrok morbiditeta, invaliditeta i mortaliteta danas, a u budućnosti pridonijeti i razvoju novih *ciljanih* lijekova u liječenju bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (35, 36)

1.5. Glikozilacija proteina

Glikozilacija je najčešća i najsloženija posttranslacijska modifikacija proteina i lipida te ima važnu ulogu u usklađivanju različitih funkcija viših organizama, a može rezultirati značajnim strukturnim promjenama proteina. Važnost glikozilacije očituje se u činjenici kako je većina proteina složenih organizama glikolizirana (3). Površina svih stanica pokrivena je oligosaharidnim strukturama koje su kovalentno vezane za membranske proteine i lipide u obliku glikoproteina i glikolipida (Slika1.3).



Slika 1.3. Shematski prikaz glikozilacije proteina i lipida (preuzeto od, G. Ćurić, 2011. g.)

Glikozilacija bitno utječe na funkciju pojedinih proteina tako što mijenja osobine proteina mijenjajući im stabilnost, topljivost i fizički izgled, a ugljikohidratne podjedinice mogu biti signal prepoznavanja, što je važno u razvrstavanju proteina i staničnom prepoznavanju. Velik broj specifičnih enzima i drugih proteina uključeno je u sintezu složenih glikana kovalentno vezanih na proteinsku osnovu (37). Neki od ovih proteina vrlo su specifični i pridonose sintezi ograničenog broja struktura na malom broju proteina (38), dok drugi (poput glikoziltransferaza uključenih u sintezu N-glikana, proteina uključenih u putove

sinteze šećernih nukleotida) utječu na tisuće različitih proteina. Ugljikohidratni dijelovi glikokonjugata, tzv. glikani, razgranate su strukture, izgrađene najčešće od 10 do 15 monosaharida. Dva ili više takvih glikana povezani su na proteinsku bazu prosječnog glikoproteina, no kako ne postoji genetički kalup za glikane, njihova točna struktura mijenja se ovisno o trenutnoj razni ekspresije i unutarstaničnoj lokalizaciji biosintetičkih i kataboličkih enzima - glikoziltransferaza i glikozidaza (glikozilacijski fenotip).

Temeljna razlika između proteina i na njih vezanih oligosaharida jest u činjenici da ugljikohidratni dio nije kodiran u genima. Geni definiraju strukturu proteina, dok za vezane oligosaharide ne postoji odgovarajući genski kalup. Suprotno određenosti jednim genom, glikanske strukture kodirane su mrežom stotina glikoziltransferaza (do sada ih je identificirano oko 200), glikozidaza, prijenosnika, transkripcijskih faktora i drugih proteina. To ih čini posebno osjetljivim na različite promjene unutar stanice. Sve glikanske strukture koje u danom trenutku nastaju u stanici odražavaju ustvari sva prethodna važna zbivanja u stanici, poput svojevrsne 'gliko-memorije'. Zakonitosti pomoću kojih će se objasniti međuovisnost ekspresije i lokalizacije predmetom su interesa mnogih istraživanja (39).

Evolucija proteina strogo zadanih u genetskom kodu relativno je spora u usporedbi s razvojem i evolucijom ugljikohidratnih struktura, te se često zbog značajno bržeg razvoja glikanskih promjena u različitim vrstama živih bića viđaju znatne razlike u pogledu ugljikohidratnih struktura koje su vezane na gotovo identične proteinske ili lipidne osnovice. Raznolikost načina glikozilacije i općenito proširenje učestalosti glikozilacije proteina povezano je s pojavom višestaničnih oblika života, a čini se da skoro sve interakcije između stanica i njihove okoline uključuju prepoznavanje između ugljikohidrata i proteina.

Otkriće glikozilacije tako je označilo otkriće značajanog evolucijskog pomaka jer se promjenom ugljikohidratnog izražaja stanica mogu stvoriti nove strukture mijenjanjem ekspresije gena, unutarstaničnog smještaja i aktivnosti putova sinteze enzima odgovornih za glikozilaciju. Činjenica da su gotovo svi proteini koji su se pojavili nakon pojave višestaničnih organizama glikozilirani upućuje na važnost glikozilacije u složenih organizama, a možda nije pretjerana ni tvrdnja kako je upravo glikozilacija omogućila razvoj složenih višestaničnih organizama. Glikozilacija je svakako evolucijski vrlo uspješan mehanizam jer je danas poznato kako su gotovo svi važni membranski i izvanstanični proteini glikozilirani (3).

Procjenjuje se da je oko 80% proteina stanične membrane glikozilirano, tako da su stanice složenih organizama prekrivene gustim slojem glikokonjugata (glikokaliks), koji je

odgovoran za komunikaciju s vanjskim svijetom. Složena građa, funkcionalnost i dinamičke osobitosti glikana omogućuju ovim molekulama da funkcioniraju u međumolekulskim interakcijama. Prepoznavanja ugljikohidrata sastavni su dio normalnog biološkog razvoja (40) i imunološke obrane protiv patogena identifikacijom egzogenih ugljikohidrata (41). Mnogi bakterijski i virusni patogene isprva se prianjaju na tkiva domaćina specifično se vezujući na ugljikohidrate površine stanica domaćina (42), stoga mijenjanje glikanskih struktura predstavlja jedno od važnijih načina obrane viših organizama od brzo razvijajućih patogena. Prijelaz sa života u obliku jedne stanice na višestanične organizme zahtijevao je pronalazak brojnih novim molekula i mehanizama neophodnih za održavanje i kontrolu interakcija između pojedinih stanica i njihovog okružja, drugih stanica, izvanstanične tvari i patogena. Evolucijski procesi dali su važnost varijabilnostima koje nudi glikozilacija, što je rezultiralo u iznimnoj složenosti glikanskih struktura koju se susreće u današnjim višestaničnim organizmima.

Glikozilacijski fenotip oblik je stanične memorije kroz koji prethodni događaji u stanici određuju strukturu molekula koje se u nekom trenutku proizvode. Glikoproteini s drugim molekulama stupaju u interakciju kao jedinstvene molekule (43). Velik broj proteina donekle funkcionira i bez svog glikanskog dijela (3, 4, 44), no za razumijevanje zbivanja na molekularnoj razini, moraju se razumjeti i funkcije glikanskih dijelova glikokonjugata (45). Usprkos činjenici da ugljikohidratni i proteinski dijelovi glikoproteina nastaju na različit način, jednom sintetizirana molekula glikoproteina funkcionira kao integralna cjelina, gdje nije više važno koji atomi i kemijske skupine potječu od glikana, a koji od polipeptida. Iako je udio šećerne sastavnice glikoproteina često malen (5–10%), zbog puno manje gustoće ugljikohidrata u odnosu na proteine, oni uvijek predstavljaju značajan dio hidrodinamičkog volumena glikoproteina. Strukturne i konformacijske osobitosti glikana su vrlo složene (46) te mala promjena u glikanskoj strukturi ima značajnu funkcionalnu posljedicu. Usprkos razlikama u podrijetlu i biosintetskim putovima ugljikohidrata i proteina glikoproteini funkcioniraju poput jedne molekule te u međudjelovanju s drugim molekulama nije moguće utvrditi događaju li se ta međudjelovanja s glikanskim ili proteinskim dijelom (4).

Temeljita analiza proteina iz stanica i tkiva najbolji je način proučavanja ekspresije pojedinog proteina u određenim patološkim stanjima. No, analiza proteina bez identifikacije glikanske komponente ne pruža cjeloviti uvid u strukturu nekog staničnog produkta. Za shvaćanje funkcije glikokonjugata nužno je odrediti i strukturu i građu njegove glikanske sastavnice. Nažalost, zbog velike složenosti razgranatih glikanskih struktura (47, 48), razina

znanja o strukturi i funkciji glikanskih dijelova molekule daleko zaostaje za razinom znanja o njihovim polipeptidnim okosnicama ili o DNA.

Identifikaciju šećernih struktura omogućuju metode poput PAS (periodic acid-Schiff) reakcije, lektinske analize ili radionuklidnog označavanja određenih šećera, no one pružaju samo strukturalnu, ne i funkcionalnu karakterizaciju šećernih struktura. Funkcionalna glikomika obećavajući je pristup koji ujedinjuje identifikaciju glikanskih struktura i karakterizaciju funkcionalnih uloga. Radi utvrđivanja funkcionalne veze između proteina i njegovog glikana, stvaraju se stanice i tkiva s isključenim (*knocked out* – KO), sniženim (interferencija s RNA – RNAi) ili pretjerano eksprimiranim genima za glikoziltransferaze, te se potom proučava promjena funkcije uzrokovana nedostatkom ili suviškom određene šećerne strukture.

Primjeri u kojima su detaljno istražene uloge glikana u glikoproteinima pokazali su da oni osim strukturne, u velikom broju molekula imaju i regulatornu ulogu, te da moduliraju mnoge fiziološke i patofiziološke procese. Glikozilacija proizvedenim proteinima može omogućiti topljivost, hidrofilnost i negativan naboj te na taj način smanjiti neželjene nespecifične međumolekularne interakcije u izvanstaničnom prostoru i zaštititi ih od proteolize. Još jedna pretpostavljena funkcija je vezivanje patogena koji inače prepoznaju glikane stanične površine i tako započinju svoje patološko djelovanje na stanicu.

Poremećaji koji onemogućuju rane faze sinteze glikokonjugata nespojivi su s višestaničnim životom, dok promjene u glikoziltransferazama koje obavljaju završne modifikacije oligosaharida rezultiraju specifičnim fiziološkim posljedicama (49, 50). Zavisno o strukturi glikana i proteina na koji je glikan dodan, glikani imaju mnogobrojne funkcije: mogu biti neophodni za pravilno smatanje, mogu regulirati funkciju proteinske okosnice, strateškim smještajem mogu štititi od proteolitičkog cijepanja, mogu biti mjesto prepoznavanja lektina (51) i utjecati na interakcije među stanicama, omogućiti proteinima i lipidima 'prebacivanje' između stanica te druge, uglavnom slabo proučene funkcije.

1.6. Genetički aspekti glikozilacije

Glikom obuhvaća sve glikanske strukture koje mogu biti sintetizirane od strane organizma. Glikom je analogan genomu (svi geni), transkriptomu (svi transkripti) ili pak proteomu (svi proteini) određenog organizma. Stanice različitih vrsta sintetizirat će određeni

segment glikoma ovisno o njihovoj diferencijaciji i njihovom fiziološkom miljeu. Ljudski i mišji glikomi dijele mnoge glikanske strukture, ali također sadrže i glikane koji su jedinstveni ili imaju divergentne funkcionalne značajke.

Genom kodira sve enzime, transportere i druge strukture potrebne za izgradnju glikoma nekog organizma. Trenutno je u potpunosti poznato više od 650 potpunih genoma. Isto tako, broj glikoziltransferaza s poznatim trodimenzionalnim strukturama također je velik, te je do 2007. porastao do gotovo 30. Veliki porast u broju strukturnih podataka doveo je do pojave nekoliko baza podataka za usporedbu genomske i strukturne informacije. U vrijeme prije dešifriranja kompletnog genoma glikobiologija sisavaca, beskralješnjaka, biljaka, bakterija i virusa gotovo da se nije preklapala pa napredak u jednoj domeni nije koristila u istraživanju drugih domena. Usporedno sa stalnim porastom poznatih genoma, nastala je i zajednička evolucijska povijest sekvenci glikoziltransferaza. Ispitivanje 650 potpuno sekvencioniranih organizama navedenih u CAZy bazi podataka (Carbohydrate activated enzymes ili ugljikohidratima aktivirani enzimi; www.cazy.org) dovelo je do spoznaje kako oko 5% genoma kodira enzime koji su uključeni u sintezu glikana (52). Također, poznato je kako 1-2% svih gena jednog organizma kodira kalup proizvodnje glikoziltransferaza – enzima koji kataliziraju proces glikozilacije. Osim glikoziltransferaza, brojni drugi proteini, poput transkripcijskih faktora, prijenosnika i Golgi-organizatora, uključeni su u glikozilaciju proteina i lipida.

Broj funkcionalnih polimorfizama u genima koji kodiraju za glikoziltransferaze čini se da je limitiran, pošto svaka promjena u njima utječe na tisuće proteina i ima značajan učinak na preživljavanje (53). Velika količina energije i broj gena koji su uključeni u sintezu glikana upućuje na vrlo važnu ulogu glikozilacije u životu stanice. Tako važna evolucijska uloga glikozilcije može se objasniti novijim istraživanjima koja na prvo mjesto po važnosti u životu i funkcioniranju stanice stavljaju membranu preko koje se odvija gotovo sva stanična komunikacija i signalizacija. S obzirom na činjenicu da je preko 80% proteina stanične membrane glikolizirano genetika i moleklarna biologija glikozilacije zasigurno predstavlja novu metu znanstvenih istraživanja, kako je i predloženo u zadnjem izvješću Nacionalnog znanstvenog vijeća Sjedinjenih američkih država, koje promovira istraživanja podcijenjenih šećernih struktura. Ta znanja mogla bi rasvijetliti mnoge biološke, patofiziološke i medicinske nepoznanice (54).

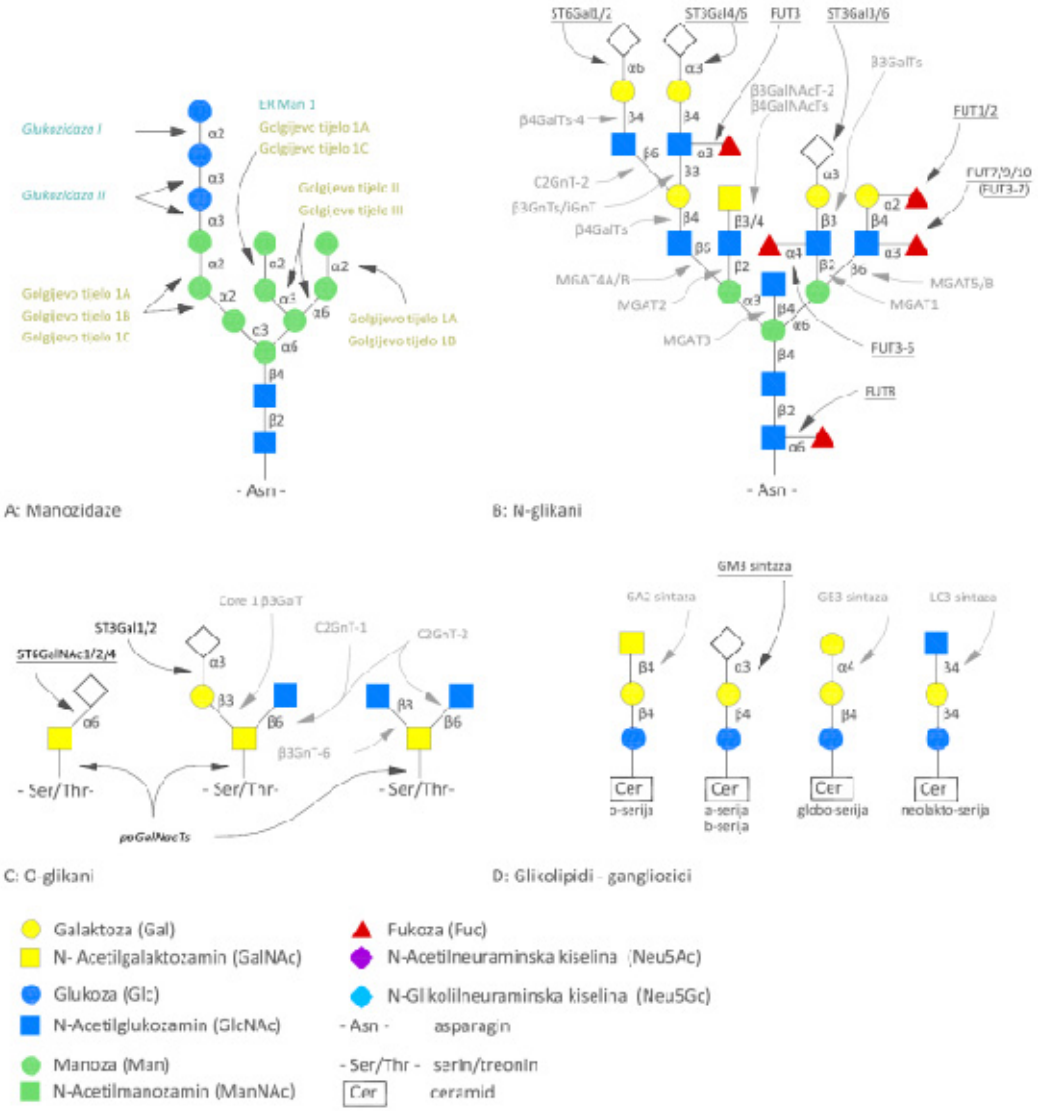
1.7. Molekularna biologija glikozilacije i uloga glikana

Izvanredna je činjenica da je svaka živa stanica u višestaničnih organizama prekrivena gustim i složenim slojem glikana. Evolucija je glikane izabrala kao molekule na granici između stanica i izvanstaničnog miljea zbog njihove fleksibilnosti i raznolikosti. Zanimljivo je kako fleksibilnost glikana dopušta stanici domaćina raznolike promjene glikanskog sastava u svrhu ublažavanja ili eliminiranja djelovanja patogena bez štetnih učinaka na funkcioniranje stanice.

Kao i membranski proteini, sekretorni proteini u eukariotskim stanicama obično prolaze kroz kompleks endoplazmatskog retikuluma (ER) i Golgijevog tijela - staničnog sustava u kojem se događa većina procesa glikozilacije.

Endoplazmatska mrežica (ER) eukariotska je organela koju čini povezana mreža kanalića (tubula), mješinica (vakuola) i cisterni. Hrapava endoplazmatska mrežica (rER) stvara proteine, dok se u glatkoj endoplazmatskoj mrežici (sER) stvaraju lipidi i steroidi, metaboliziraju šećeri i steroidi, a služi i u regulaciji homeostaze kalcija i detoksikaciji lijekova. Površina rER prepuna je ribosoma (organela koje sintetiziraju proteine), iako oni nisu sastavni dio membrane rER. RER je u bliskom kontaktu s Golgijevim tijelom, no oni nisu spojeni, već 'komuniciraju' preko mješinica. RER ima nekoliko ključnih funkcija: sinteza sekretornih, integralnih membranskih i proteina organela, te početna N-glikozilacija proteina.

Golgijevo tijelo je organela u citoplazmi eukariotske stanice, sačinjena od spljoštenih, membranom odijeljenih mjehurića bez ribosoma na svojoj površini. Membranski mjehurići su organizirani u više ili manje pravilnih nakupina u blizini jezgre te su kupolastog izgleda, vrška okrenutog prema membrani (izlazni dio Golgija). U stanicama sisavaca obično je jedno Golgijevo tijelo. U njemu se obrađuju proteini nastali na ribosomima rER, što uključuje modificiranje sržnih oligosaharida glikoproteina, razdvajanje i pripremu proteina za različite stanične i izvanstanične svrhe.



Slika 1.4. Shematski prikaz struktura i enzima uključenih u glikozilaciju

Objašnjenje: **A** – prikaz obrade oligosaharida prenesnog s dolikola (plavozeleni tekst – ER enzimi, žutozeleni tekst – Golgi enzimi. **B** – Enzimi koji kataliziraju N-glikozilaciju. **C** – Enzimi koji sudjeluju pri O-glikozilaciji. **D** – prikaz početnog koraka sinteze gangliozida, s enzimima. Podcrtani enzimi obrađeni su u ovoj studiji. (Preuzeto i modificirano od: G. Ćurić, 2011.).

Bez obzira na mjesto gdje se glikozilacija događa, većina reakcija koristi aktivirane oblike monosaharida (najčešće nukleotidni šećeri) kao donatore za reakcije koje su katalizirane enzimima glikoziltransferazama (Slika 1.4) (55). Glikoziltransferaze djeluju u slijedu, tako da svaki enzim prenosi specifični monosaharid na specifični akceptor,

pridonoseći konačnoj glikanskoj strukturi. Iako su reakcije koje kataliziraju kemijski slične, većina je katalizirana specifičnim enzimom. U stvaranje konačne strukture oligosaharida sudjeluje mnoštvo glikoziltransferaza, koje dodaju različite šećerne ostatke na različita mjesta u oligosaharidu, te razne glikozidaze, koje odcjepljuju ranije dodane šećerne strukture. Procjenjuje se da je više od tri stotine specifičnih enzima (glikozidaza i glikoziltransferaza) uključeno u sintezu ugljikohidratnih struktura na glikokonjugatima te da je cijeli proces vrlo složen i energetski zahtjevan.

Gotovo svi donori šećernih struktura za reakcije glikozilacije sintetiziraju se u citoplazmi iz endogenih prekursora. Većina se donora u eukariota aktivnim transportom prenosi u rER i Golgi. Sve poznate glikoziltransferaze koje djeluju na sekretornim proteinima su integralni membranski proteini, s aktivnim mjestom u lumenom organela. Dio molekule novonastalog glikokonjugata unutar lumena ER ili Golgi naposljetku završi s vanjske strane stanične membrane ili unutar sekretorne granule ili lizosoma. Međutim, nisu svi glikani i glikokonjugati okupljeni u kompleks ER-Golgijevo tijelo. Na primjer, neki citoplazmatski i nuklearni proteini sadrže O-vezane šećerne strukture poput fukoze i galakoze, a te se izmjene javljaju u citoplazmi. Hijaluronan i hitin pojavljuju se, naprimjer, u staničnoj membrani, s izravnim istiskivanjem u izvanstanični matriks. Mnogo je truda uloženo u razumijevanje mehanizama glikozilacije i izmjene glikana unutar ER i Golgijevog aparata te je jasno da postoji niz međusobno isključujućih čimbenika koji određuju konačni ishod reakcije. Popularan je model prema kojem su enzimi glikoziltransferaza uredno postrojeni na putu ER-Golgijevo tijelo i uredno obavljaju svoje zadaće kao na pokretnoj traci. U stvari, postoji znatno preklapanje djelovanja enzima diljem ER-Golgijevog kompleksa i stvarna raspodjela aktivnosti određenog enzima ovisi o vrstama stanica i njihovoj ulozi u organizmu (56).

Glikoziltransferaze koje djeluju u rER uglavnom su transmembranski proteini ugrađeni u membranu ER, dok su one u Golgi uglavnom proteini s malenim amino-krajem u citoplazmi, jednom transmembranskom domenom i velikom globularnom katalitičkom domenom u lumenu Golgi (tip 2 membranskog proteina). Luminalni dio ima dugu osnovu, koja može biti pocijepana, pri čemu katalitička domena biva oslobođena u lumen, što omogućuje njenu sekreciju izvan stanice. Zna se za slobodne glikozikltransferaze u tkivima i serumu, a proizvode ih stanice poput hepatocita, endotela i leukocita. Koncentracija slobodnih glikoziltransferaza može biti povišena u određenim uvjetima, kao što je npr. upala. Smatra se da njihova uloga nije prijenos šećera, zbog nedovoljne količine donora šećera izvan stanice te je biološki značaj slobodnih glikoziltransferaza još uvijek nepoznanica. Moguće uloge su

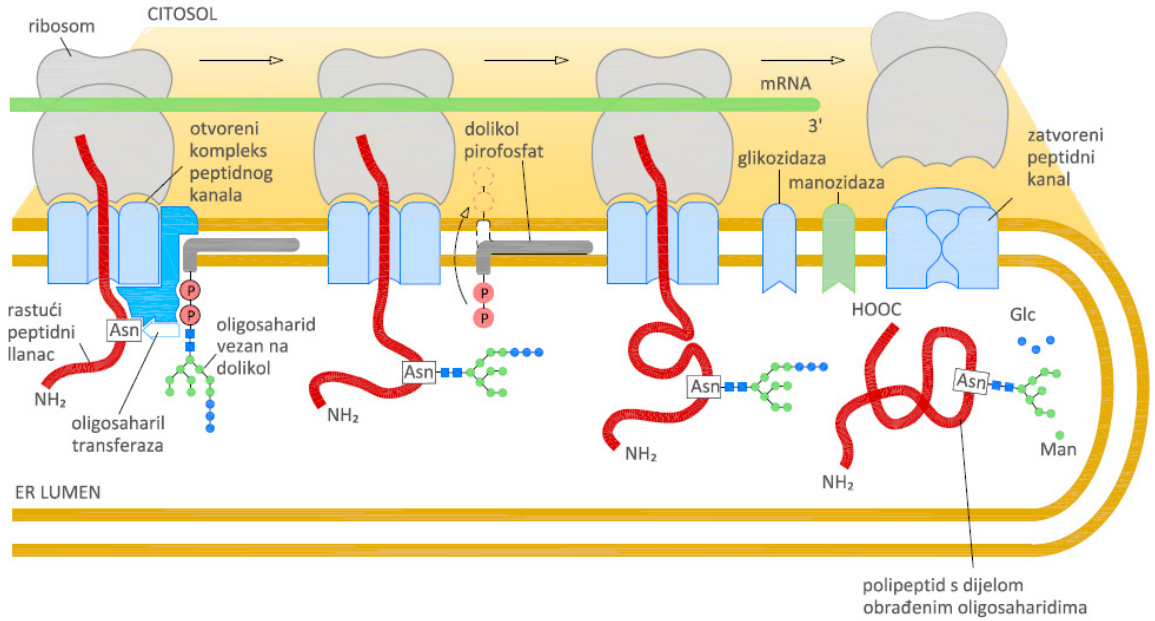
prepoznavanje njihovih liganda (lektinima-slična aktivnost) ili hvatanje malih količina cirkulirajućih nukleotidnih šećera, koji bi inače bili dostupni, naprimjer, patogenim mikroorganizmima (55).

Kako oligosaharidne strukture nisu kodirane genima, krajnji sastav glikana određen je trenutnim stanjem ekspresije glikoziltransferaza neke stanice. Ekspresija, unutarstanična lokalizacija i regulacija specifičnih glikoziltransferaza i glikozidaza obično se naziva glikozilacijski fenotip. Glikoziltransferaze kataliziraju prijenos šećera s aktivirane donorske molekule na specifičnu akceptorsku molekulu, uz nastanak glikozidne veze. U sisavaca se kao donori za takvu reakciju pojavljuje samo 9 šećernih struktura: glukoza (Glc), galaktoza (Gal), N-acetilglukozamin (GlcNAc), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), glukuronska kiselina (GlcA), ksiloza (Xyl), manoza (Man), fukoza (Fuc) i sijalinska kiselina (Sia). Za dodavanje monosaharida pri glikozilaciji potrebne su aktivirane preteče gore navedenih šećera s mukleotidima: UDP-uridin difosfat, GDP- gvanozin-difosfat, CMP- citidin-difosfat. U ljudi su glikani najčešće vezani na proteine u dva oblika: N i O-vezani. N-vezani glikani nastaju stvaranjem dušične glikozidne veze između GlcNAc i aminokiselinskog ostataka asparagina (Asn) u proteinu. O-vezani glikani se vežu glikozidnom vezom s kisikom, najčešće na serin (Ser) ili treonin (Thr), preko GalNAc, ili mnogo rjeđe GlcNAc, manoze ili fukoze. Oligosaharidne strukture ovih dvaju vrsta glikoproteinima vrlo su različite. Glavnina glikoziltransferaza može dodavati monosaharide samo na O-glikane ili N-glikane, dok jedan dio nije tako specifičan. S druge strane, neke glikoziltransferaze dodaju monosaharide isključivo na glikolipide ili glikoproteine, dok ih dio ima preklapajuću supstratnu specifičnost (2).

Glikozilacija i obrada oligosaharida ima nezamjenjivu ulogu u razvrstavanju i raspoređivanju u odgovarajuće stanične lokalizacije proteina predviđenih za sekreciju, ugradnju u membrane ili ulazak u pojedine organele. Iako većina citosolnih i jezgrinih proteina nije glikozilirana, mora se spomenuti kako postoje istraživanja u kojima se spominju nepotpuni dokazi o gangliozidima u mitohondrijima i N-glikanima u jezgri (57). Također je važno naglasiti da su mnoge glikoziltransferaze sisavaca i same glikozilirane, posebice N-glikozilacijom.

1.7.1. N-glikani

Biokemijska analiza visoko zastupljenih serumskih glikoproteina, poput imunoglobulina otkrila je predominantu vezu N-glikana i asparagina. N-glikozilacija je zanimljiva zbog kompleksnog procesa nastanka i vezanja N-glikana, a važnost razumijevanja puteva N-glikozilacije proizlazi iz činjenice da N-glikani utječu na mnoge ključne značajke glikoproteina poput konformacije, topljivosti i prepoznavanja putem glikanski vezanih proteina. U eukariota se N-glikozilacija odvija na način da se blok od 14 šećera (dolikol fosfatni preteča) kotranslacijski prenosi na specifične asparaginske (Asn) ostatke nastajućeg polipeptida u rER (Slika 1.5.) (55).



Slika 1.5. N-glikozilacija u hrapavoj endoplazmatskoj mrežici (preuzeto od G. Ćurić, 2011.)

N-vezani glikoproteini stvaraju se u rER i dalje obrađuju u Golgiju. Novonastali N-glikan značajno se mijenja na putu kroz rER i Golgijevo tijelo prema različitim unutar- ili izvanstaničnim odredištima (58). Sinteza njihovog šećernog ostatka odvija se u 4 faze: sinteza oligosaharidnog prekursora vezanog na lipid, prijenos prekursora na NH_2 skupinu asparaginskog ostatka rastućeg polipeptida, uklanjanje dijela šećernih ostataka prekursora i dodavanje šećernih ostataka preostaloj oligosaharidnoj jezgri.

Isprva su N-vezani oligosaharidi sintetizirani kao preteče vezane na lipidu dolikolu. Dolikoli su dugolančani poliizoprenoli (imaju u sasatavu 17-21 C_5 jedinicu izoprena - *2-metil-1,3-butadiena*), na koji je pirofosfatnom vezom vezan oligosaharidni prekursor. Dolikol

ujedno služi i kao sidro za membranu rER. Monosaharide na rastući glikolipid postupno dodaju specifične glikoziltransferaze te u konačnici tvore oligosaharidnu jezgru sastava $(GlcNAc)_2(Man)_9(Glc)_3$, koja je zajednička svim N-glikanima. Rastući lanac glikolipida (dolikol fosfatni prekursor) počinje sintezu s citosolne strane ER, no tijekom sinteze biva prebačen kroz membranu rER, tako da se konačni glikolipid nalazi unutar lumena rER. Prijenos cijelog oligosaharida s lipida na polipeptidni lanac zbiva se dok translacija još traje, uz oligosaharil transferazu, a energiju za ovaj prijenos daju fosfoanhidridne veze koje vežu ugljikohidrat s dolikolom. Oligosaharil transferaza je svojim citosolnim dijelom čvrsto vezana uz veliku podjedinicu ribosoma i na unutrašnju membranu rER, dok intraluminalni dio prepoznaje Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr slijed na nastajućem polipeptidu. N-glikozilacija je moguća samo na tim asparaginskim ostatcima, pri čemu X može biti bilo koji aminokiselinski ostatak. Otprilike je trećina takvih mjesta glikozilirana. Iz aminokiselinskog slijeda moguće je otkriti potencijalna mjesta N-glikozilacije, no koje od njih je doista i glikozilirano ovisi o mnogim drugim osobitostima, poput strukture proteina, tipa stanica, ili glikozilacijskog fenotipa (55).

Početak obrade prenesenog oligosaharidnog prekursora zbiva se u rER (Slika 1.5) (55), uz dvije glikozidaze i manozidazu. Ova de-glikozilacija vezana je uz smatanje glikoproteina i odluku nastavlja li glikoprotein prema Golgiju u daljnju izgradnju ili prema lizosomu prema putu razgradnje. Ukoliko glikoprotein prođe kroz kontrolne točke rER prema Golgiju, napušta ga u vakuolama s glikanom sastava $(GlcNAc)_2(Man)_8$. Vakuole iz rER stapaju se s membranama Golgi bliže jezgri gdje se zbiva daljnja obrada. Za većinu N-vezanih glikana u Golgiju prvo uslijedi daljnje cijepanje Golgi manozidazama, pri čemu nastaje glikan građe $Man_5GlcNAc_2Asn$. Djelovanjem N-acetilglukozaminiltransferaza 1 (GlcNAcT-1) na $Man_5GlcNAc_2Asn$ nastaje prvo grananje N-glikana, a u istom segmentu α-manozidaza II cjepa 2 vanjske Man. Tako nastaje supstrat na koji djeluje N-acetilglukozaminiltransferaza 2 (GlcNAcT2), uz nastanak drugog grananja N-glikana. Na razgranati N-glikan se katalitičkom aktivnošću raznih Golgi glikoziltransferaza dodaju nove monosaharidne jedinice. U Golgiju se najčešće dodaju GlcNAc, Gal, Fuc i Sia, a radi iste ishodišne molekule svi N-vezani oligosaharidi imaju zajedničku pentasaharidnu srž. Tijekom obrade glikoprotein (često vezan za membranu) putuje kroz Golgijeve membrane prema perifernom segmentu Golgija (2).

N-glikozilacija je neophodna za višestanični život i njezino potpuno isključivanje dovodi do smrti u embrionalnoj fazi (59). Genski defekti koji pogađaju glikozilaciju proteina važni su za ljudsko zdravlje te uzrokuju brojne i različite ljudske bolesti (53, 60). Suprotno

sržnim glikanima, za koje se čini da imaju esencijalnu funkciju za mnoge glikoproteine, varijabilnost u monosaharidima krajeva glikanskih lanaca je uobičajena (npr. AB0 krvne grupe). Ova strukturna različitost glikana doprinosi heterogenosti glikoproteina u populaciji, koja može biti prednost pred mikroorganizmima i u prilagodbi mijenjajućem okolišu (61). Primjer detaljno proučenih strukturalnih i funkcionalnih aspekata N-glikozilacije je imunoglobulin G (IgG). IgG protutijelo ima 2 mjesta N-glikozilacije na svojoj Fc regiji, a glikanske strukture vezane na ostatak Asn297 (Fc N-glikan) u konstantnoj domeni (CH2) IgG su ključne za održavanje strukture i funkcije molekule (62). IgG je uključen i u pro- i protuupalne aktivnosti, preko interakcije njegovog Fc fragmenta s raznim receptorima. Ove različite osobine Fc IgG-a su posljedica različite glikozilacije (63). IgG poprima protuupalna svojstva sijalizacijom Fc fragmenta, koja se smanjuje pokretanjem antigen-specifičnog imunološkog odgovora. Ova različita sijalizacija može služiti poput sklopke, od prirođene protuupalne aktivnosti u stacionarnom stanju do proupalnih učinaka po antigenoj stimulaciji (64). Glikozilacija IgG također igra važnu ulogu u staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima (ADCC - *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* – lički napad limfocita na stanice obilježene protutijelom) nakon primjene terapijskih protutijela te je taj učinak usko vezan s kliničkim učincima protutumorskih lijekova. Manjak fukoze (Fuc) u jezgri glikana vezanih na Fc regiju protutijela pospješuje vezanje Fc na receptor na limfocitima, omogućujući protutijelima da značajno pojačaju efektorsku ulogu u ADCC (65).

1.7.2. O-glikani

Istraživanja glikoproteina i njihove uloge u ljudskim prirođenim bolestima isprva je bilo usmjereno na N-vezane glikane koji dijele zajednički put sinteze u ranoj fazi svog nastanka. Glikoproteini koji su predominantno O-glikozilirani nazivaju se još i mucini i njihovo otkriće dovelo je do detaljnijih saznanja o O-glikozilaciji. Mucini su široko rasprostranjeni u viših organizama i proizvod su najčešće epitelnih stanica mukoznih membrana i žlijezda slinovnica (66).

O-glikani temelje se na različitim vezama glikana i proteina i imaju različite strukture. O-vezani oligosaharidi stvaraju se u Golgi, serijskim dodavanjem monosaharidnih jedinica na završen polipeptidni lanac. (Slika 1.3). Sinteza počinje dodavanjem GalNAc na Ser ili Thr, katalizirano GalNAc transferazom lokaliziranom u Golgiju, a potom se dodaju ostaci Gal, Sia, GlcNAc i Fuc na mjesta određena sekundarnom ili tercijarnom strukturom polipeptida.

Sinteza O-glikana u viših organizama obično se završava dodavanjem dvije sijalinske kiselina (NeuNAc) sijaliltransferazama u Golgiju.

O-glikozilacija zasigurno je bitan proces, jer sve vrste stanica sisavaca koje su proučavane do danas eksprimiraju gen zadužen za dodavanje GalNacT na Ser ili Thr. Međutim, zanimljivo je da nakon isključivanja gena u miševa nije bilo značajnih strukturnih promjena organizma, vjerojatno zbog činjenice da postoje geni koji zamjenjuju primarni gen zadužen za početnu fazu O-glikozilacije (67). U izlučenim mucinima stanica dišnog, gastrointestinalnog i genitourinarnog trakta, kao i onih u očima, O-GalNAc glikani glikoproteina neophodni su za njihovu sposobnost hidracije i zaštite temeljnog epitela. O-glikani su hidrofilni i obično negativno nabijeni, te promicanjem vezivanja vode i soli uglavnom doprinose viskoznosti i ljepljivosti sluzi, koja čini fizičku barijeru između lumena i epitela. Uklanjanje mikroorganizama zarobljenih u sluzi važan je fiziološki proces. Također, mucini štite od bakterija i putem specifičnih receptorskih mjesta unutar O-glikana (68). U bolestima poput cistične fibroze, genska greška dovodi do poremećaja u stvaranju sluzi i nenormalno visoke viskoznosti sluzi, što dovodi do potencijalno letalne opstrukcije dišnog i gastrointestinalnog sustava. O-GalNAc glikani, osobito u visoko glikoziliranim mucinima, imaju značajan učinak na konformaciju proteina. Ovisno o volumenu O-glikana, temeljni peptidni epitop može biti različito prepoznat od strane antitijela. O-glikozilacija štiti mucine od litičkih aktivnosti proteaza, a moguće je da rijetka O-glikozilacija nekih glikoproteina, poput jednog O-GalNAc glikana dodanog na interleukin-2, ima sličnu zaštitnu ulogu.

O-GalNAc glikani značajno se mijenjaju tijekom aktivacije limfocita i nenormalni su u leukemičnim stanicama u kojima je smanjen udio sržnih O-glikana. Ligandi za selektinski posredovane interakcije između endotelnih stanica i leukocita najčešće se temelje na sijalil-Lewis^x (sLe^x) epitopu priključenom na sržnu O-GalNAc glikana. Ova vrsta selektin-glikanske interakcije važna je za pričvršćivanje leukocita za kapilarni endotel tijekom nakupljanja i ekstravazacije limfocita u upalnom odgovoru (69). Uklanjanje sržnog O-GalNAc glikana eliminiranjem pripadajućeg gena u miševa rezultiralo je teškim nedostatcima imunološkog sustava, posebno u selektinski uvjetovanim funkcijama leukocita. Stanice raka često izražavaju sLe^x epitop i tako koriste selektinski uvjetovana svojstva stanične površine kao mehanizam invazije okolnog tkiva i rasapa. Uloga O-glikana u ovom procesu istraživana je u staničnim linijama tretiranim s inhibitorom produženja O-glikana benzil-α-GalNAc. Taj spoj djeluje kao natjecateljski supstrat za sintezu sržnih O-glikana u stanicama i tako uzrokuje smanjenje sinteze razgranatih O-GalNAc glikana. Posljedično, mucini nose veći broj

nepromijenjenih N-acetylgalactosamine ostataka i nerazgranate krajeve O-GalNAc glikana. Stanice tretirane s benzil-α-GalNAc gube sposobnost da se vežu na E-selektin i endotelne stanice in vitro, što predstavlja značajan iskorak u istraživanju značajki invazije i rasapa zloćudnih stanica (70).

Promjene O-glikana u bolesti mogu biti posljedica djelovanja citokina ili faktora rasta koji utječu na rast stanica, diferencijaciju ili staničnu smrt i mijenjaju ekspresiju gena glikoziltransferaza. Iako se te promjene glikozilacije mogu smatrati "nuspojavom" patološkog stanja, one također mogu značajno doprinijeti konačnom razumijevanju patologije i tijeka bolesti. U zloćudnim bolestima, biosinteza O-GalNAc glikana često je nenormalna bilo zbog smanjene ili povećane ekspresije i aktivnosti pojedinih glikoziltransferaza (71). Promjene glikokaliksa na površini zloćudnih stanica mogu onda značajno utjecati na biološke značajke tih stanica, te na njihovu sposobnost opstanka, invazije ili udaljenog rasapa.

1.7.3. Glikosfingolipidi i gangliozidi

Glikolipidi složeni su lipidi na koje su dodani glikani. Sfingolipidi u osnovnoj građi imaju sfingozin, dugolančani (18-atoma ugljika) alifatski amino-alkohol. Ceramidi imaju amidnom vezom vezanu masnu kiselinu na sfingozinu. Glikosfingolipidi (GSL) su ceramidi s jednim ili više šećera β-glikozidnom vezom na 1-hidroksilnoj skupini. Specifične sržne glikoziltransferaze koje dodaju šećerne strukture na laktozilceramid (Gal-Glc-Cer) stvaraju preteče 3 glavne skupine gangliozida: (1) ganglio- i izoganglio-, (2) globo- i izoglobo- te (3) lakto- i izolakto- serije gangliozida (72). Gangliozidi su vrlo slični globozidima, a razlika je što gangliozidi imaju različit sadržaj N-acetilneuraminata (NeuNAc).

GSL se nalaze samo na vanjskim površinama membrana gotovo svih stanica u sisavaca, a osobito su zastupljeni u membranama neurona. GSL se prvenstveno nalaze u lipidnom dvosloju stanične membrane u vrlo stabilnoj strukturi, koja u fiziološkim temperaturama omogućuje znatnu lateralnu pokretljivost lipidnih dugolančanih molekula. Sastavni dijelovi stanične membrane stvaraju nehomogena područja membrane zvana domene, s visoko diferenciranim molekularnim sastavom i supramolekularnom arhitekturom. Membranskim makrodomenama se smatraju veće regije unutar membrane, karakterizirane prisutnošću specifičnih skupina proteina (proteinski kompleksi). Dio proteina prolazno je vezan u manje domene – mikrodomene, koje karakterizira lipidni sastav drukčiji od sastava okolne membrane, zbog čega se još nazivaju i lipidne mikrodomene ili lipidne splavi (*lipid*

rafts). Ove lipidne splavi sadrže i do 50 % više kolesterola i sfingolipida, nauštrb fosfatidilkolina. Smatra se da je kolesterol 'ljepilo' koje stabilizira splavi i ispunjava praznine među ostalim sastavnicama (55). Dugo se smatralo da su interakcije protein-protein ključne za stabilizaciju makro i mikrodomena, no unazad desetak godina i za membranske se lipide zna da imaju bitnu ulogu u lateralnoj organizaciji u membrani, a osobito se značenje pridaje GSL, za koje se utvrdilo da imaju visok potencijal za stvaranje reda u biološkim membranama (73). Sklonost GSL da stvaraju domene unutar stanične membrane veća je od sklonosti sfingolipida, a razlika zasigurno doprinosi i glomazni hidrofilni oligosaharid GSL s vanjske strane membrane, radi kojeg je i volumen GSL puno veći od volumena sfingolipida. Osim lipidnih splavi, za GSL je dokazano udruživanje u posebnu podvrstu mikrodomena koje ne sadrže kolesterol, a nazvane su glikosignalne domene ili glikosinapse.

Gangliozidi su najsloženiji sfingolipidi, u kojima je oligosaharidni lanac vezan na ceramid sadrži barem jedan ostatak kiselih šećera, koji se nazivaju sijalinske kiseline. Izgradnja gangliozida je stupnjevita, te se postupno dodaju šećerni ostatci na ceramid. Struktura konačnoj gangliozida ovisi o specifičnosti i dostupnosti glikoziltransferaza u stanici, a do sada je opisano preko 60 različitih gangliozida. Osobito su zastupljeni u SŽS, gdje su važni za razvoj, funkciju i diferencijaciju mozga, pamćenje, ssignalizaciju i sinaptičko starenje te općenito održavanje funkcije SŽS. Postoji mnogo dokaza koji pokazuju kako je njihova uloga dijelom ostvarena putem interakcija s proteinima uključenim u prijenos signala preko membrane u membranskim mikrodomenama (74, 75).

Gangliozidi su glavni glikokonjugati na membranama neurona, čine oko 25% svih glikokonjugata u SŽS sisavaca te sadrže glavninu sijalinske kiseline prisutne u mozgu. Oligosaharidni lanci na gangliozidima nastaju dodavanjem monosaharida djelovanjem nekoliko glikoziltransferaza. GSL se sintetiziraju u sER, odakle vakuolama putuju prema Golgiju i konačno do stanične membrane. Njihova građa stoga ovisi o regulaciji biosintetskog puta, ali i lokalnoj modulaciji u samoj membrani, gdje je dokazano postojanje sfingomijelin sintaze, specifičnih sijalidaza, sijaliltransferaza i drugih enzima uključenih u glikozilaciju i de-glikozilaciju.

Identificirano je mnogo gangliozida, no gangliozidi najzastupljeniji u SŽS viših kralježnjaka čine 80-90% svih gangliozida SŽS. Za njihovu sintezu ključna su 3 enzima – GM3 sintaza (kodirana *GM3s* ili *Siat9, ST3Gal5*), GD3 sintaza (ili *Siat8a*) i GM2 sintaza (GM2/GD2 sintaza, kodirana *Galgt1*). GM3s je ubikvitarno eksprimirana glikoziltransferaza, osobito zastupljen u SŽS, a djeluje na ključnom mjestu biosintetskog puta gangliozida jer

prenosi sijalinsku kiselinu (2,3-sijalinsku kiselinu) na laktozilceramid, pri čemu nastaje jednostavni gangliozid GM3, ishodišna molekula za sintezu složenih gangliozida (55).

Glavne su funkcije GSL međustanična interakcija putem vezivanja na komplementarne molekule u obližnjoj staničnoj membrani (trans-prepoznavanje) i promjene aktivnosti proteina u vlastitoj staničnoj membrani (cis-regulacija). Biokemijske, molekularne i odnedavno genetičke studije otkrivaju sve više različitih uloga ovih glikolipida. Na razini jedne stanice, glikosfingolipidi nisu esencijalni za život. Stanice u kojima su specifičnim kemijskim inhibitorima i genetičkom ablacijom isključeni putevi proizvodnje GSL preživljavaju, proliferiraju te se čak i diferenciraju. Međutim, na razini cijelog organizma GSL su nužni za normalni razvoj. Miševi kod kojih je eksperimentalno isključen gen za GlcCer sintezu ne uspijevaju se razviti nakon gestacije i odumiru u fazi gastrulacije zbog opsežne apoptoze unutar embrija (76). GSL u mozgu potječu od oligodendrocita, stanica koje stvaraju mijelin – izolacijski omotač oko aksona koji je nužan za pravilno provođenje živčanih impulsa. Vjeruje se kako GalCer čini 20% mijelina i esencijalni je dio mijelinske strukture. Miševi kojima nedostaje gen za sintezu GalCer ne proizvode taj glikoprotein, ali stvaraju mijelin koji na prvi pogled nema značajnih promjena u strukturi. Međutim, pažljiva mikroanaliza mijelinizacije aksona u takvih knock-out miševa pokazala je grešku u mijelinizaciji na razini Ranvierovih čvorića koji su odogvorni za brzo (preskačuće) provođenje živčanog impulsa. Greška u mijelinizaciji u području Ranvierovih čvorića dovodi do neuroloških ispada poput ataksije, tremora, sporog provođenja impulsa i ranije smrti (77, 78).

Značajna uloga GSL u trans-prepoznavanju očituje se interakcijom leukocita s površinom krvnih žila tijekom upale. Kako je već ranije objašnjeno u poglavlju 1.1 (slika 1.1.), prvi korak u procesu upale je okupljanje, kotrljanje i vezivanje leukocita na aktivirane endotelne stanice krvnih žila u blizini patološkog procesa. Ova stanična interakcija započinje kada se glikoproteini iz selektinske obitelji, eksprimirani na površini aktiviranih endotelnih stanica, vezuju s komplementarnim glikanima na površini obližnjih leukocita. Jedan od selektina, E- selektin, veže se na još neutvrđeno mjesto na ljudskim leukocitima. Taj neutvrđeni receptor otporan je na proteaze, što upućuje kako bi se moglo raditi o GSL. Potencijalno nova klasa GSL pronađena je na površini leukocita i karakterizirana je dugačkim šećernim lancima koji su terminalno sijalizirani i fukozilirani na jednom ili više N-GlcNac ostataka. Nazvani su mijeloglikanima i njihova uloga u procesu upale ostaje još uvijek nerazjašnjena, te je moguće kako se radi upravo o receptorima za vezivanje E-selektina (79).

1.7.4. Sijalinske kiseline

Ovi monosaharidi imaju značajnu ulogu u ostvarivanju velikih bioloških raznolikosti i obično predstavljaju završne ogranke kompleksnih struktura N-glikana, O-glikana i gangliozida. Prekursori za sintezu sijalinskih kiselina (Sia) u viših organizama uvijek su 5-acetil-neuraminična kiselina i 2-keto-3-deoksinonična kiselina, a nakon sinteze postaju supstrat za biosintezu složenih glikana tek nakon prelaska u aktivni nukleotidni oblik CMP-Sia. Aktivacija u nukleotidni oblik događa se u jezgri stanice, nakon čega se aktivirani oblici transportiraju u Golgijevo tijelo gdje se uz pomoć enzima sijaliltransferaza dodaju na novostvorene glikokonjugate.

Visoka razina ekspresije sijalinskih kiselina na vanjskoj strani stanične membrane (npr. više od 10 milijuna molekula na jednom eritrocitu), unutarnjoj strani membrane lizosoma ili na izlučenim glikoproteinima (poput mucina) upućuje na njihovu važnu ulogu u stabilizaciji molekula i membrana te modulaciji međudjelovanja stanica s okolišem. Neke funkcije proizlaze iz relativno jakog negativnog naboja sijalinskih kiselina, poput vezanja i prijenosa iona i lijekova, stabilizacije proteina i enzima te povećanja viskoznosti mucina. Sijalinske kiseline štite stanice od proteaza i glikozidaza i tako im produžuju životni vijek i vremenski raspon djelovanja. Nadalje, reguliraju afinitet receptora i sudjeluju u membranskoj signalizaciji, oplodnji, rastu i diferencijaciji. Nedavno su objavljeni podatci o ulozi sijalinskih kiselina u neutraliziranju slobodnih radikala u sklopu antioksidativnog djelovanja što može posebno biti važno za endotel krvnih žila (80). Promjene u ekspresiji sijalinskih kiselina nađene su i u kronično-progresivnim sistemskim degenerativnim bolestima poput ateroskleroze, šećerne bolesti i Alzheimerove bolesti, ali i alkoholizma. Mucini moraju biti propisno i visoko sijalizirani kako bi ispunili svoje fiziološke zadaće lubrikacije i urođene imunosti. Selektini prepoznaju sLe^x glikane koji na terminalnim granama imaju sijalinsku kiselinu, tako da su i sijalinske strukture uključene u kotrljanje i nakupljanje leukocita uz aktivirani endotel tijekom upale. Predmet nedavnih istraživanja su spojevi proizvedeni iz sLe^x koji se natječu sa selektinima tijekom procesa upale, reperfuzijske ozljede ili rasapa tumorskih stanica (81). Protuprijanjajuće sijalizirane molekule mogle bi potencijalno koristiti i u liječenju bakterijskih i virusnih infekcija, s obzirom da je poznato kako sijalizirani glikodendrimeri inhibiraju vezivanje hemaglutinina virusa gripe. Sijalizirani mliječni oligosaharidi nalaze se u sluznici želuca i crijeva te pridonose u zaštiti od Helicobacter pylori infekcije. Terapijska primjena sijalinskih kiselina očituje se i u primjeru razvoja cjepiva

bogatih sijaloglikokonjugatima protiv melanoma ili polijasijalinskih cjepiva modificiranih sa sintetiziranom Sia protiv različitih tipova karcinoma (81).

1.8. Klasifikacije glikoziltransferaza

Glikoziltransferaze se klasificiraju prema više kriterija. Najjednostavnija klasifikacija temeljena je na supstratnoj specifičnosti i predstavlja nomenklaturu Međunarodnog udruženja biokemije i molekularne biologije (IUBMB - *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), koji svakom enzimu dodjeljuje EC broj (EC broj - *The Enzyme Commission number*). To je brojčana klasifikacijska shema enzima temeljena na kemijskoj reakciji koju kataliziraju. Glikoziltransferaze su opisane kao EC 2.4.y.z, gdje *y* definira da li je preneseni šećer heksoza ili pentoza, dok *z* opisuje supstratnu specifičnost.

Drugi način klasifikacije je na temelju sličnosti proteinskog slijeda, bez obzira na aktivnosti i supstratnu specifičnost. Na ovaj su način glikoziltransferaze svrstane u preko 90 obitelji, a njihova klasifikacija dostupna je preko Internetske platforme CAZy (*Carbohydrate Active enZyme database* (82)). Sličan trodimenzionalni izgled je predmnijevan za sve glikozltransferaze unutar obitelji, iako je pojava višestruke specifičnost (enzimi s različitim donorom i/ili akceptorom su u istoj obitelji) česta.

Imenovanje glikoziltransferaza temeljeno je na shemi 'donor-akceptor grupa-transferaza', dok su uobičajena imena temeljena na shemi ' akceptor grupa-transferaza'. Predmet interesa ovog istraživanju su fukoziltranferaze i sijaliltransferaze (82).

1.8.1. Fukoziltransferaze

Fukoziltransferaze kataliziraju prijenos L-fukoze s GDP-fukoze na ugljikohidrat (poput središnjeg GlcNAc pri N-glikozilaciji), protein (poput O-fukoziltransferaze kod O-glikozilacije), glikoprotein, glikolipid ili slobodni oligosaharid. Fukoziltransferaze su globularni, transmembranski proteini tipa II. Većina ih se nalazi u Golgi, dok se O-fukoziltransferaze nalaze u rER. Fukoziltransferaze proučavane u ovoj studiji navedene su u Tablici 1.1.

Fukozilacija je uključena u različite biološke procese, poput leukocitno-endotelnog prijanjanja putem selektina, usmjeravanja limfocita, histokompatibilnosti ABO krvnih grupa,

embrionalnog razvoja ili interakcija domaćina i patogena.

Ostaci fukoze nalaze se vezani na oligosaharidni akceptor u α1,2 (FUT1, FUT2), α1,3/4 (FUT3–FUT7 i FUT9-FUT11) i α1,6 orijentaciji (Slika 1.4), ili direktno vezani na serin ili treonin kod O-fukozilacije.

Tablica 1.1. Fukoziltransferaze (preuzeto i modificirano od: G. Ćurić, 2011. (55))

Skupina	Gen	GeneID	EC broj	Službeni simbol	Službeno ime proteina (engleski)	Drugo ime (engleski)
α1,2	*FUT1*	2523	EC 2.4.1.69	FUT1	fucosyltransferase 1 (galactoside 2-α-L-fucosyltransferase, H blood group)	galactoside 2-α-L-fucosyltransferase
α1,3/4	*FUT3*	2525	EC 2.4.1.65	FUT3	fucosyltransferase 3 (galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase, Lewis blood group)	3-galactosyl-N-acetylglucosaminide 4-α-L-fucosyltransferase
	FUT4	2526	EC 2.4.1.152	FUT4	fucosyltransferase 4 (α (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)	4-galactosyl-N-acetylglucosaminide 3-α-L-fucosyltransferase
	FUT5	2527	EC 2.4.1.65	FUT5	fucosyltransferase 5 (α (1,3) fucosyltransferase)	
	FUT6	2528		FUT6	fucosyltransferase 6 (α (1,3) fucosyltransferase)	
	FUT7	2529		FUT7	fucosyltransferase 7 (α (1,3) fucosyltransferase)	
	FUT10	84750		FUT10	fucosyltransferase 10 (α(1,3) fucosyltransferase)	
α1,6	*FUT8*	2530	EC 2.4.1.68	FUT8	fucosyltransferase 8 (α (1,6) fucosyltransferase)	glycoprotein 6-α-L-fucosyltransferase

α2-fukoziltransferaze (FUT1 i FUT2)

α1,2 fukoziltransferaze proizvodi su dvaju monoegzonskih gena nastalih duplikacijom. Ljudske FUT1 i FUT2 α2-fukoziltransferaze prenose Fuc u α1,2 vezi na terminalnu galaktozu laktozamina.

Uloga im je prvo utvrđena u eritrocitima, pri čemu FUT1 kodira H enzim, a FUT2 Se enzim, tako da osobe krvne grupe 0 eksprimiraju antigen H na eritrocitima i endotelu pod utjecajem *FUT1* gena, te antigen H pod kontrolom *FUT2* u egzokrinim lučevinama. Dva su glavna produkta djelovanja ovih dvaju α2-fukoziltransferaza – H tip 1 i H tip 2, a oni su prirodni supstrati za A (αGlcNAc transferaza) i B (αGAL transferaza) enzime, tako da je H antigen fukozilirani prekursor A i B oligosaharidnih struktura AB0 sustava krvnih grupa. Tip 2 ABH glikoproteina stvara FUT1 i intrinzični su antigeni eritrocita, dok tip 1ABH glikolipida stvara FUT2, te oni bivaju adsorbirani na površinu eritrocita iz plazme.

α1,3/4-fukoziltransferaza (FUT3, Lewis enzim)

α1,3/4-fukoziltransferaza prenosi Fuc s GDP-Fuc na GlcNAc ostatak uz stvaranje α1,3-veze, ili stvaranje α1,4-veze, pri čemu je katalitička aktivnost α1,4-veze prevladavajuća. Utvrđena je specifičnost za različite oligosaharide i N-glikane na glikoproteinima. Ovaj enzim odgovoran je za sintezu svih Lewis antigena (Le^a, Le^b, sLe^a, Le^x, Le^y i sLe^x) - antigena Lewis krvnih grupa, ali i prisutnog na različitim drugim stanicama (uglavnom probavnog trakta). Sve dosadašnje studije genske ekspresije glikoziltransferaza nisu potvrdile ekspresiju *FUT3* u leukocitima, no obilno je eksprimiran u epitelnim stanicama probavnog trakta. Eritrociti adsorbiraju Lewis glikolipidne antigene na svoju površinu.

Sekvenca FUT3 je vrlo homologna onoj od FUT5 i FUT6. Oni su i vrlo blisko smješteni na kromosomu te su najvjerojatnije nastali duplikacijom gena. Općenito FUT3-7 imaju dosta istovjetnosti u sekvencama, dok FUT9-11 tvore drugu skupinu gena α1,3-fukoziltransferaza. Supstratna specifičnost tih dvaju skupina ima nekih posebnosti, tako FUT3-6 dodaju Fuc na unutrašnji GlcNAc, dok FUT7, FUT9-11 preferiraju dodavanje Fuc na vanjski GlcNAc.

α1,3-fukoziltransferaze

α3-fukoziltransferaza 4

Ova α1,3-fukoziltransferaze ubikvitarno je eksprimirana u mnogim tkivima, osobito obilno u mijeloidnim tkivima zbog čega se i naziva mijeloidni tip α1,3-fukoziltransferaze).

Leukociti eksprimiraju 3 α3-fukoziltransferaze – FUT4, FUT7 i FUT9. FUT4 i FUT7 su eksprimirani u svim subpopulacijama leukocita, dok je FUT9 karakterističan za neke subpopulacije, poput granulocita, NK stanica i B stanica. FUT4 i FUT7 u dosadašnjim istraživanjima su se pokazali kao najizgledniji kandidati za fukozilaciju i sintezu E i P-selektin liganda. Većina studija okupljanja, kotrljanja i adhezije leukocita po endotelnim stanicama *in vivo* identificirala je upravo FUT4 i FUT7 kao jedine glikoziltransferaze iz obitelji α1,3-fukoziltransferaza čija aktivnost značajno utječe na selektin ligand-receptor povezivanje (83). Studije na FUT4($^{-/-}$) miševima pokazale da takvi miševi izgledaju zdravo, imaju normalne vrijednosti leukocita u perifernoj krvi, ali za razliku od normalnih miševa, imaju izrazito povećane brzine kotrljanja leukocita po endotelu, što dokazuje ulogu FUT4 u E-selektinski ovisnom prikupljanju i kotrljanju leukocita u upali (84). Također, u pokusima s isključivanjem FUT4 gena u miševa s isključenim apolipoprotein E genom nađena je zajednička uloga FUT4 i FUT7 u supresiji razvoja ateroskleroze putem regulacije selektin-receptor aktivnosti (29). Za sada nije objavljenja studija mjerenja mRNA ekspresije ovog gena u bolesnika s aterosklerozom ili akutnim koronarnim sindromom *in vivo*.

α3-fukoziltransferaza 5 (FUT5)

FUT5 dijeli većinu homologije aminokiselinskog slijeda s FUT3, a enzim, kao i α1,3/4-fukoziltransferaza, ima i α1,3 i α1,4 aktivnost, s tom razlikom da kod FUT5 prevladava α1,3 katalitička aktivnost. Ima 2 N-glikozilacijska mjesta u svojem aminokiselinskom slijedu, koja su neophodna za enzimsku aktivnost. To je vrlo slabo eksprimiran gen, dokazan u nekim tkivima, i vrlo slabo eksprimiran u mijeloidnim stanicama (među njima i leukocitima i T-limfocitima, a o njegovoj fiziološkoj ulozi se vrlo malo zna.

α3-fukoziltransferaza 6 (FUT6)

FUT6 je po slijedu aminokiselina vrlo sličan FUT3 i FUT5, a kodira enzim koji se naziva još i plazmatski tip α3-fukoziltransferaze. Zna se da je odgovoran za sintezu Lewis X (Le^x) antigena prisutnog na plazmatskim proteinima, epitelnim i zloćudnim stanicama te se smatra važnim za metastaziranje. MRNA FUT6 gena utvrđena je u raznim organima, a enzim je pronađen u raznim tjelesnim tekućinama.

Sijalil Lewis X antigen (sLe^x) prisutan je na selektinima i proteinima akutne faze, pri čemu je antigen uglavnom rezultat sinteze jetrenom α1,3-fukoziltransferazom 6. Smatra se da porast plazmatskih proteina koji nose sijalil sLe^x u pacijenata s upalnim bolestima ima regulacijsku ulogu u kemotaksiji leukocita (85). Porast plazmatske aktivnosti utvrđen je i kod

teških alkoholičara (86), a sniženje aktivnosti u pacijenata sa shizofrenijom (87). Niska ekspresija FUT6 je utvrđena i u leukocita, no smatra se da su sijalil Lewis X antigeni na leukocitima produkt katalitičke aktivnosti FUT7 (88).

α3-fukoziltransferaza 7 (FUT7)

Produkt reakcije dodavanja Fuc na vanjski GlcNAc N- i O-glikana je antigen nazvan sLe^x epitop (jedan iz skupine Lewis antigena), koji je ligand E- i P-selektina. Prema studijama, ekspresija α3-fukoziltransferaze 7 ograničena je na leukocite i venule visokog endotela, te se enzim pokazao ključnim za sintezu liganda za E-, L- i P-selektina. Ekspresija FUT7 direktno je povezana s aktivnošću vezivanja E- selektina, a u FUT7 ($^{-/-}$) miševa dokazana je deficijencija prianjanja leukocita, usljed nedostatka liganda E- i P-selektina na leukocitima te dramatična deficijencija liganda L-selektina na venulama visokog endotela (89). Zanimljivo je kako su FUT7 ($^{-/-}$) miševi u studijama progresije ateroskleroze zajedno s isključenjem apolipoprotein-E gena imali značajno smanjenje veličine aterosklerotske lezije u odnosu na FUT7 ($^{+/+}$) miševe. Takav rezultat objašnjen je P-selektinski ovisnoj adheziji monocita iz periferne krvi za endotelne stanice (29). Defekt sinteze sLe^x ima za posljedicu jedan oblik imunodeficijencije u ljudi (Deficijencija leukocitne adhezije tip 2), koja može biti uzrokovana nedostatnom fukozilacijom GSL (90).

U T-limofocitima ($CD4^+$) je pokazano da interleukin 12 povisuje, a interleukin 4 snižava ekspresiju FUT7, s posljedičnom promjenom aktivnosti vezanja E- i P-selektina. Među pacijentima s kroničnom upalom pronađene su i osobe s mutiranim genima za FUT7 (91), no mutirani geni FUT7 su u populaciji vrlo rijetki, u usporedbi s mutiranim FUT3 i FUT6, vjerojatno stoga što je FUT7 ključan za održavanje zdravlja. Do sada nisu objavljeni rezultati utjecaja određenih lijekova na gensku ekspresiju fukoziltransferaza iz ove obitelji.

α1,3-fukoziltransferaza 10

Fukoziltransferaza 10 otkrivena je prije manje od 10 godina, iako je evolucijski najstarija među α-(1,3)-fukoziltransferazama. Istraživanja i saznanja o genu FUT10 i o fukoziltransferazi 10 vrlo su oskudna (92). Tkivna specifična ekspresija (*Northern-blot*) u mišjim tkivima pokazala je zastupljenost FUT10 mRNA u svim tkivima, no znatno povišene razine u jetri i timusu. Druge su studije pokazale (92) prisutnost Fut10 I Fut11 mRNA u mišjem mozgu, a *in situ* hibridizacijom je ekspresija lokalizirana u odraslom malom mozgu, gdje su već prije bile dokazne ekspresije FUT9 i FUT4. Najviša je ekspresija dokazana u

unutrašnjem zrnatom sloju malog mozga (92). Za sada nema dokaza o ulozi ovog enzima iz obitelji α-(1,3)-fukoziltransferaza u selektinski uvjetovanom vezanju leukocita u upali.

α1,6-fukoziltransferaza 8

Dok su gore navedene α1,2 i α 1,3/4 fukoziltransferaze transkripti dvije skupine monoegzonskih gena nastalih duplikacijom, a enzimi su uključeni u terminalnu fukozilaciju, α1,6-fukoziltransferaza 8 nastaje transkripcijom *FUT8*, a dodaje fukozu na prvi (sržni) GlCNAc.

Za FUT8 nije utvrđena homologija s preostalim fukoziltransferazama koje tvore obitelj glikoziltransferaza (izuzev slijeda od 9 aminokiselina), te je to i evolucijski najstariji gen. Dokazano je postojanje više izoenzima, kao rezultat alternativnog prekrajanja mRNA. U sekvenci aminokiselina fukoziltransferaze 8 nije utvrđeno mjesto moguće N-glikozilacije. α1,6-fukoziltransferaza 8 prenosi Fuc na N-vezane složene glikoproteine. α1,6-fukozilirani N-glikani se nalaze u mnogim glikoproteinima, a osobito su zastupljeni u moždanom tkivu. Zna se nekih 20-ak jako fukoziliranih glikoproteina, a među njima je i α5β1-integrin, čija je funkcija reducirana fukozilacijom. FUT8 je eksprimiran u mnogim tkivima sisavaca, a osobito ima visoku ekspresiju tijekom fetalnog razvoja. Ekspresija FUT8 je povišena kod kroničnih bolesti jetre (hepatitis i ciroza) i raka jetre (gdje je povezan s jakom fukozilacijom glikana na transferinu i α-fetoproteinu - markeru hepatocelularnog karcinoma (HCC) i u tumorima jetre (93). Za povišenu ekspresiju FUT8 je dokazano da može doprinijeti zloćudnosti, invazivnim i metastatskim osobinama stanica raka. Pokazano je i da je njegova povišena ekspresija povezana s razvojem otpornosti stanične linije HCC na kemoterapiju (93).

1.8.2. Sijaliltransferaze

Sijaliltransferaze su enzimi koji N- i O-vezom dodaju sijalinsku kiselinu na oligosaharide, glikolipide (gangliozide) ili glikoproteine. Smještene su u Golgi (membranski protein tip 2), a kao donor rabe nukleotidni saharid CMP-Sia. Sijalinske kiseline su velika skupina različitih spojeva koji nastaju iz dvije ishodišne molekule, NeuNAc i NeuNGlc (N-acetilneuraminat-Neu5Ac i N-glikolilneuraminat), a kod ljudi je prisutna samo NeuNAc.

Otprilike se zna za 15 sijaliltransferaza u ljudi. S obzirom na supstratnu specifičnost dodavanja NeuNAc, dijele se na α2,3 i α2,6 (Tablica 1.2.).

α2,3 sijaliltransferaze

ST3Gal1

ST3Gal1 je jedna od 6 poznatih α2,3 sijaliltransferaza te je jedna od nekoliko sijaliltransferaza s relativno striktnom akceptorskom specifičnošću – prenosi NeuAc na (*core1*) O-glikan Galβ1-3GalNAc-Ser/Thr. Produkt može biti dalje sijaliziran nekim α2,6 sijaliltransferazama. Ovaj se enzim natječe s (*core 2*) β1,6-N-acetilglukozaminiltransferazom za supstrat, što utječe na strukturalne osobine O-glikana koji nastaju u stanici (55).

Za ST3Gal1 je u ljudi utvrđena visoka ekspresija u različitim unutrašnjim organima i leukocitima, a kod miševa s manjkom tog enzima utvrđen je poremećaj funkcije $CD8^+$ T-limfocita (76).

Tablica 1.2. Sijaliltransferaze (preuzeto i modificirano od: G. Ćurić, 2011. (55))

Skupina	Gen	GeneID	EC broj	Službeni simbol	Službeno ime proteina (engleski)	Drugo ime (engleski)
α2,3	*ST3Gal1*	6482	EC 2.4.99.4	ST3GAL1	ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 1	β-galactoside α-2,3-sialyltransferase
	ST3Gal4	6484		ST3GAL4	ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 4	
	GM3 Synthase	8869	EC 2.4.99.9	ST3GAL5	ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 5	lactosylceramide α-2,3-sialyltransferase
	ST3Gal6	10402	EC 2.4.99.6	ST3GAL6	ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 6	
α2,6	*ST6Gal1*	6480	EC 2.4.99.1	ST6GAL1	ST6 β-galactosamide α-2,6-sialyltranferase 1	β-galactoside α-2,6-sialyltransferase
	ST6Gal2	84620	EC 2.4.99.6	ST6GAL2	ST6 β-galactosamide α-2,6-sialyltranferase 2	β-galactoside α-2,6-sialyltransferase 2
	ST6GalNAc1	55808	EC 2.4.99.3	ST6GALNAC1	ST6 (α-N-acetyl-neuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide α-2,6-sialyltransferase 1	α-N-acetylgalactosaminide α-2,6-sialyltransferase
	ST6GalNAc2	10610		ST6GALNAC2	ST6 (α-N-acetyl-neuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide α-2,6-sialyltransferase 2	
	ST6GalNAc3	256435		ST6GALNAC3	ST6 (α-N-acetyl-neuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide α-2,6-sialyltransferase 3	α-N-acetylneuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3-N-acetyl-galactosaminide 6-α-sialyltransferase
	ST6GalNAc4	27090	EC 2.4.99.7	ST6GALNAC4	ST6(αNacetylneuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminideα-2,6-sialyltransferase 4	

ST3Gal4

Spoznaje o ovom *ST3Gal4* (u literaturi zvan još i *Siat4c*) i enzimu su dosta oskudne, a zna se da katalizira sijalizaciju N-glikana sa slijedom tip 2 (Galβ1-4GlcNAc). ST3Gal4 je eksprimirana u različitim tkivima, bez utvrđene razvojne regulacije.

ST3Gal5 ili GM3 sintaza

GM3 sintaza je produkt ekspresije gena *GM3s* zvanog i *Siat9*. GM3 sintaza je jedinstven enzim među svim sijaliltransferazama i primarno regulira količinu gangliozida GM3. To je ključan enzim u metaboličkom putu sinteze GSL. Enzim se nalazi u Golgi, iako je dokazan u manjoj mjeri i u sER. To je ubikvitarno zastupljen enzim, a razine ekspresije pokazuju tkivnu specifičnost. U ljudi je ekspresija najviša u mozgu, skeletnim mišićima i testisu, dok su niske razine ekspresije u jetri i bubregu. U ljudi je opisano nekoliko članova proširene obitelji s homozigotnom mutacijom gena za GM3s (77), a fenotip je uključivao simptomatični epileptički sindrom, koji se javio unutar prve godine života, zastoj u rastu i sljepoću. Napredak u proučavanju uloge gangliozida omogućio je i razvoj miševa s isključenim genima koji kodiraju početne korake sinteze složenih gangliozida (*Siat9, Siat8a* i *Galgt1*), pri čemu je spriječen nastanak složenih gangliozida (94). U životinja s isključenim jednim od spomenutih gena, ili *Siat9,* ili *Galgt1*, djelomično je spriječena sinteza složenih gangliozida te su fenotipske promjene uglavnom blaže naravi, uslijed redundancije rezidualnih gangliozidnih struktura. Tek je u miševa s dvostruko isključenim ključnim genima sinteze gangliozida (*Siat9*, koji kodira GM3s, i *Galgt1*, koji kodira GM2/GD2 sintazu) dobiven fenotip koji djelomično odgovara fenotipu homozigotne mutacije *Siat9* u ljudi (78). Iako bi iz poznatog biosintetskog puta gangliozida bilo za očekivati da bi isključivanje *Siat9* trebalo u miševa imati slične posljedice kao i u ljudi, ne zna se točan razloga izostanka pojave fenotipa obilježenog epileptičkim napadima. Pretpostavlja se da su posrijedi razlike u biosintetskom putu gangliozida miša i čovjeka, ili posljedica učinka nekih dodatnih modulacijskih gena (77). Visoke razine ekspresije gangliozida GM3 nađene su *in vivo* u aterosklerotskim plakovima ljudske aorte, a dokazano je kako su stvorene od strane aktiviranih makrofaga smještenih unutar samog plaka. To ukazuje na ulogu gangliozida u napredovanju aterosklerotskih oštećenja ljudskih arterija (95).

ST3Gal6

ST3Gal6 je nedavno otkriven enzim, službenog imena ST3 β-galaktozid α-2,3-sijaliltransferaza 6, a po reakciji koju katalizira svrstan je u skupinu sa ST3Gal3.

α2,6 sijaliltransferaze

ST6Gal1

ST6Gal1 ili ST6 β-galaktozamid α-2,6-sijaliltransferaza 1 katalizira ugradnju sijalinske kiseline na krajeve glikana, uz stvaranje NeuAcα2-6-Gal veze, odnosno Siaα2-6-Gal veze. Nalazi se u Golgi, a njeni su supstrati prvenstveno N-vezani oligosaharidi, dok je takav tip veze rjeđe nađen u O-vezanim glikanima i GSL. Enzim se normalno nalazi u trans-Golgi (96-98), kao membranski protein II tipa, no proteolitičkim procesiranjem nastaje topljivi oblik enzima, a za jetrenu ST6Gal1 je dokazano da je glavnina cijepana i izlučena u serum (99), gdje pojačava sijalizaciju topljivih glikoproteina. ST6Gal1 je u Golgijevom tijelu supstrat cijepanja sekretaze, a njena je ekspresija dokazana u leukocitima (100). Nađena je promjena ekspresije u malignim stanicama pa stanična razina ST6Gal1u utječe na sijalizaciju integrina na stanicama mijenjajući njegovu sposobnost vezivanja s fibronektinom, ključnim sastojkom EC. Dokazano je kako smanjenje sijalizacije integrina dovodi do pojačane adhezije stanica za fibronektin u ekstracelularnom matriksu (ECM) (101). Stupanj stanične adhezije za sastavnice ECM ključan je čimbenik u regulaciji stupnja stanične migracije.

Za manjak ST6Gal1 uzrokuje poremećaj imunoreaktivnosti B-limfocita (102), što djelomično može biti objašnjeno dokazanom endocitozom IgM antigenskog receptora u odsutnosti imune stimulacije kod deficijencije ST6Gal I (103, 104). *ST6Gal1* KO miševi su sposobni za život, no izrazito su imunosuprimirani, imaju snižen serumski imunoglobulin M te oštećen odgovor B-limfocita na aktivaciju. Također, dokazano je da dugotrajna izloženost etanolu uzrokuje sniženje ekspresije *ST6Gal1* (105, 106), što za posljedicu ima manjkavu glikozilaciju brojnih glikoproteina, uključujući apolipoprotein E (ApoE) i apolipoprotein J (ApoJ), uz pojavu asijalokonjugata u krvi, kako u pokusnih životinja, tako i u ovisnika o alkoholu. Nađeni su direktni dokazi da bi sam alkohol mogao biti uzrokom smanjene ekspresije *ST6Gal1*, s posljedičnom sniženom aktivnošću enzima ST6Gal1 (106). Razina *ST6Gal1*mRNA je bila snižena za 50% u umjerenih, i 70% u teških konzumenata i osoba s alkoholnom bolešću jetre, u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok razina mRNA nije bila promijenjena u osoba s bolestima jetre uzrokovanima drugim čimbenicima, a ne izloženosti

alkoholu. Također su utvrdili snažnu negativnu korelaciju razine mRNA *ST6Gal1* i količine depozita lipida u jetrenim stanicama. Gong i suradnici (106) su zaključili da bi alkoholom uzrokovana snižena ekspresija *ST6Gal1* (zbog smanjene stabilnosti mRNA) vodila slaboj glikozilaciji apolipoproteina (poput ApoE i ApoJ), što bi rezultiralo defektnim untarstaničnim transportom lipida i lipoproteina, što u konačnici doprinosi razvoju alkoholne masne promjene jetre. Ista skupina autora (107) je na staničnim linijama ljudske jetre pokazala da je *ST6Gal1* jako osjetljiv na učinak alkohola, bilo preko njegovog oksidacijskog produkta acetaldehida, ili preko reaktivnih kisikovih spojeva. Izlaganje staničnih linija alkoholu je već za nekoliko dana uzrokovalo sniženu ekspresiju *ST6Gal1*. Gong i suradnici (106) su na kadaveričnim uzorcima jetre osoba koje ne konzumiraju alkohol, umjerenih konzumenata i teških konzumenata potvrdili da je razina *ST6Gal1* mRNA progresivno padala s učestalošću konzumacije alkohola; kod umjerenih konzumenata za 49%, a kod teških konzumenata za 69% (u usporedbi s osobama koje nisu konzumirale alkohol). Dokazom enzima ST6Gal1 (*Western blot*) pokazali su neznatan pad količine proteina u umjerenih konzumenata i 30% manju količinu enzima u teških konzumenata.

ST6Gal2

ST6Gal2 ili ST6 β-galaktozamid α-2,6-sijaliltransferaza 2 je nedavno otkriven enzim, a po reakciji koju katalizira vrlo je sličan ST6Gal1.

ST6GalNAc1 i ST6GalNAc2

Ove dvije sijaliltransferaze nastaju ekspresijom *ST6GalNAc1* (ili *Siat7a*) i *ST6GalNAc2* (*Siat7b*), dvaju gena slične strukture, no različitog uzorka ekspresije. Oba enzima pokazuju relativno široku supstratnu specifičnost, a prenose CMP-NeuAc na GalNAc. N-vezani oligosaharidi i GSL im ne služe kao supstrati.

Smatra se da su ova dva enzima odgovorna za sintezu sijalil-Tn antigena povezanog s rakom debelog crijeva i želuca, pri čemu je njegova povišena ekspresija povezana sa slabijom prognozom (108). Ekspresija *ST6GalNAc1* je ograničena na nekoliko tkiva (slinovnice, mliječna žlijezda, debelo crijevo), dok je *ST6GalNAc2* visoko eksprimiran u mliječnoj žlijezdi i testisu, a nisko u ostalim tkivima. Smatra se da je postojanje dvaju enzima vrlo slične supstratne specifičnosti važno za preciznu kontrolu ekspresije O-glikana, s razvojnim i tkivnim osobitostima.

ST6GalNAc3 i ST6GalNAc4

Ove dvije sijaliltransferaze nastaju ekspresijom *ST6GalNAc3* (ili *Siat7c*) i *ST6GalNAc4* (*Siat7d*) te se neke njihove enzimske karakteristike preklapaju, uz nastanak NeuAcα2-3 Galβ1-3(NeuAc2-6)GalNAc strukture. ST6GalNAc3 (ali i ST6GalNAc5 i 6) preferiraju glikolipide kao supstrate, dok ST6GalNAc4 preferira O-glikane.

ST6GalNAc3 je eksprimirana u mišjem mozgu, plućima i srcu, a niže razine u još nekim organima. Katalizira pretvorbu gangliozida GM1b u GD1α te se smatra da je to njena glavna biološka funkcija u eksprimiranim tkivima. Smatra se da NeuAcα2-3 Galβ1-3(NeuAc2-6) GalNAc strukture na O-vezanim glikanima na glikoproteinima nastaju uglavnom uslijed katalitičke aktivnosti ST6GalNAc4. U *in vivo* pokusima na miševima je dokazano da ekspresija ST6GalNAc4 značajno i brzo raste u aktiviranim CD8 limfocitima, dok se razine mRNA ostalih sijaliltransferaza ne mijenjaju. Porast ekspresije je dokazan i pri aktivaciji B- i T-limfocita *in vitro*, tako da se ST6GalNAc4 smatra važnim u ranim promjenama sijalizacije molekula stanične površine aktiviranih limfocita (109).

2. HIPOTEZA

Primarna hipoteza ovog istraživanja jest da je genska ekspresija glikoziltransferaza značajno različita između bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i ispitanika sličnih demografskih i kliničkih karakteristika koji dokazano nemaju akutni koronarni sindrom, ni koronarnu bolest srca.

Istraživanje je provedeno i u svrhu testiranja hipoteze kako se genska ekspresija glikoziltransferaza značajno mijenja u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u vremenskom razdoblju između inicijalne prezentacije bolesnika u akutnoj fazi i otpusta bolesnika u kroničnoj fazi bolesti te je značajno različita među bolesnicima s različitim oblikom akutnog koronarnog sindroma i različitim stupnjem oštećenja srčanog mišića.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

S obzirom na nedostatan broj relevantnih znanstvenih i kliničkih podataka o ulozi i promjenama genske ekspresije glikoziltransferaza u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom ovo istraživanje ima prvenstveno znanstveni, ali i potencijalni dijagnostički, preventivni i terapijski smisao.

Cilj istraživanja je po prvi put izmjeriti razinu ekspresije gena uključenih u glikozilaciju staničnih proteina i lipida u leukocitima bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u akutnoj i kroničnoj fazi bolesti. Istraženi su geni za N-fukoziltransferaze (8 od ukupno 11 poznatih fukoziltransferaza u trenutku planiranja studije) te relevantne N-sijaliltransferaze (10 gena sijaliltransferaza).

Dobivene razine genske ekpresije glikoziltransferaza u bolesnika u akutnoj fazi akutnog koronarnog sindroma uspoređene su s razinama ekspresije istih gena u demografski i klinički usporedivoj kontrolnoj skupini bolesnika koji dokazano nemaju akutni koronarni sindrom ni aterosklerotsku koronarnu bolest.

Uspoređene su razine ekspresije glikoziltransferaza u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u akutnoj i kroničnoj fazi bolesti te među bolesnicima različitog oblika akutnog koronarnog sindroma i stupnja oštećenja srčanog mišića u svrhu identificiranja promjena ekspresije glikoziltransferaza koje bi mogle biti rezultat tijeka i liječenja bolesti.

Promjene u ekspresiji glikoziltransferaza zbog genetičke predispozicije povezane s polimorfizmom gena za glikoziltransferaze mogle bi objasniti sklonost akutnom koronarnom sindromu u nekih bolesnika s aterosklerotskom bolesti koronarnih arterija. Identifikacija i razumijevanje specifičnih molekularnih mehanizama uključenih u taj proces nude potencijalne nove dijagnostičke mogućnosti u boljem i preciznijem predviđanju rizika za razvoj akutnog koronarnog sindroma. Također, može se predpostaviti i buduća mogućnost razvoja ciljane genetičke terapije za promjenu ekpresijskog profila gena povezanih s glikozilacijom u akutnoj koronarnoj bolesti.

4. ISPITANICI I METODE

Znanstveno istraživanje za doktorsku disertaciju je temeljno, opažajno, presječno istraživanje skupine bolesnika i zdravih ispitanika.

4.1. Ispitanici

4.1.1. Bolesnici s akutnim koronarnim sindromom

Obuhvaćeno je ukupno 52 bolesnika s akutnim koronarnim sindromom liječenih od prosinca 2008. godine do prosinca 2009. godine na Odjelu za unutarnje bolesti Opće bolnice „dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. Za uključenje bolesnika u istraživanje bilo je potrebno sljedeće: prisutna bar dva od tri standardna klinička kriterija za potvrdu akutnog koronarnog sindroma prema smjernicama Europskog kardiološkog društva (25, 26), mogućnost uključenja u istraživanje unutar 24 sata od prve pojave simptoma bolesti te nepostojanje bilo kojeg od isključujućih kriterija.

Klinički kriteriji za potvrdu akutnog koronarnog sindroma bili su: ishemična bol u prsima u mirovanju ili ekvivalent ishemične boli u prsima trajanja više od 10 minuta, značajne promjene repolarizacijskog (ST) segmenta u EKG (elevacija ST segementa ili denivelacija ST segementa za više od 1 mm u dva srodna odvoda) i značajan porast kardiospecifičnih enzima (kreatin kinaza, MB-frakcija kreatin kinaze) ili biomarkera (troponin-I) za više od pet puta od referentne vrijednosti određene za laboratorij ustanove u kojoj je provođeno istraživanje. Kriterij ishemične boli u prsima bio je obvezan, uz bar još jedan od bilo koja dva ostala navedena kriterija.

Bolesnici s akutnim koronarnim sindromom podijeljeni su u dvije skupine: bolesnici s akutnim transmuralnim infarktom miokarda sa ST elevacijom (STEMI) koji su imali uvijek zadovoljena sva tri kriterija za uključivanje i bolesnici s akutnim infarktom miokarda bez ST elevacije ili nestabilnom anginom pektoris (NSTE-AKS) koji su imali uglavnom dva od tri potrebna uključujuća kriterija.

Analizirani su demografski podatci, prisutnost uobičajenih čimbenika rizika za aterosklerotsku koronarnu bolest, podatci o lijekovima koje su bolesnici uzimali neposredno prije početka bolesti i tijekom liječenja bolesti kao i rutinski laboratorijski nalazi učinjeni tijekom liječenja bolesti.

4.1.2. Kontrolna skupina

U kontrolnu skupinu uključene su 32 osobe primljene radi prethodno planirane elektivne invazivne kardiološke obrade (koronarografije) na Odjel za unutarnje bolesti Opće bolnice „dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu u istom razdoblju kod kojih je koronarografski isključena koronarna bolest srca. Ispitanici u kontrolnoj skupini ranije nisu bili liječeni ili promatrani zbog potvrđenog ili sumnjivog akutnog koronarnog sindroma ili ishemične bolesti srca sa zatajenjem srca te nisu imali ni jedan isključujući kriterij.

Analizirani su demografski podatci, prisutnost uobičajenih čimbenika rizika za aterosklerotsku koronarnu bolest i podatci o lijekovima koje su pripadnici kontrolne skupine redovito uzimali prije uključenja u istraživanje.

4.1.3. Isključujući kriteriji

Isključujući kriteriji za obje skupine bolesnika bili su: dob manja od 18 godina i veća od 75 godina, dokazana šećerna bolest na terapiji inzulinom ili peroralnim hipoglikemicima, dokazana maligna bolest ili aktivna autoimuna bolest, ranije preboljeli akutni koronarni sindrom s dokazanom ishemijom srčanog mišića, dokazani i liječeni posttraumatski stresni poremećaj, liječenje oralnim kontraceptivima, akutni pankreatitis, akutni kolecistitis ili hepatitis, akutna sustavna upala infektivne etiologije ili sepsa u trenutku primanja na odjel.

Za sva navedena stanja postoje dokazi o značajnim promjenama glikozilacije *per se*, te se isključenjem takvih ispitanika smanjila mogućnost utjecaja drugih aktivnih patofizioloških procesa na glikozilaciju.

4.1.4. Postupanje s ispitanicima

Nakon informiranja o istraživanju i potpisa suglasnosti za sudjelovanje, objema skupinama izuzeti su uzorci krvi od strane medicinskog osoblja u prostorima Opće bolnice „dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. Ispitanicima u ispitivanoj skupini krv je izuzeta u dva navrata: u akutnoj fazi bolesti neposredno po prijemu u bolnicu nakon potvrde dijagnoze akutnog koronarnog sindroma i u kroničnoj fazi bolesti neposredno pri otpustu iz bolnice između 8:00 i 10:00 sati, ali ne prije trećeg dana od početka bolesti. Ispitanicima u kontrolnoj skupini krv je izuzeta u jednom navratu, u jutarnjim satima između 8:00 i 10:00 sati, sljedećeg dana nakon učinjene koronarografije. Odmah po izuzimanju uzoraka isti su bili šifrirani i ime ispitanika nikada nije bilo otkriveno. Izuzeti uzorci krvi i RNA/cDNA bolesnika i kontrola su jednako tretirani tijekom cijele studije. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Opće bolnice „dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom istraživanja poštovani su svi etički principi navedeni u relevantnim smjernicama (Kodeks etike i deontologije HLK, WMA Helsinške deklaracije i UNESCO *Universal Declaration on Human Genome and Human Rights*).

4.2. Metode

4.2.1. Izolacija RNA i sinteza cDNA

Krv volumena do 2.5 ml uzeta je punkcijom periferne vene u specijalnu tubu (PAXgene Blood RNA tube, PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland) s otopinom koja stabilizira RNA. Krv je bila pohranjena na -20°C do daljnje laboratorijske obrade.

Izolacija RNA učinjena je u DNA laboratoriju Kliničkog bolničkog centra u Osijeku PAXgene Blood RNA Kitom (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland), prema uputama proizvođača. Tijekom izolacije RNA primijenjena je DNaza (RNase-Free DNase I). Izolirana je ukupna RNA (ukupni prinos bio je >3 μg za >95% uzoraka), te je reverznom transkripcijom prepisana u komplementarnu DNA (cDNA), primjenom High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), prema uputama proizvođača. Reverzna transkripcija je enzimski proces u kojem se jednolančana RNA prepisuje u jednolančanu cDNA, koja je supstrat za lančanu reakciju polimerazom. Protokol reverzne transkripcije bio je slijedeći: 25°C kroz 10 min, 37°C kroz 120 min, i 85°C kroz 5 min. Ukupni volumen dobivene otopine cDNA bio je 40 μL, čemu je dodano 160 μL ultra čiste vode, a zatim je ukupni volumen od oko 200 μL pohranjen na -20°C.

4.2.2. Analiza ekspresija gena

Genetički pristup odabran je zbog toga što ekspresijski profil gena povezanih s glikozilacijom uglavnom predviđa ugljikohidratni repertoar stanice koji ima jednu od glavnih uloga u staničnoj signalizaciji i aktivaciji – procesima ključnim u nastanku akutnog koronarnog sindroma. Ekspresijski profil gena odgovornih za sintezu glikana proučavan je na leukocitima iz pune krvi, koje su glavne imunološke stanicama tijela i to metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu metoda je pomoću koje se mogu detektirati specifične sekvence DNA (produkti umnažanja s odgovarajućim početnicama), u

'pravom vremenu', tj. njihovo nagomilavanje tijekom procesa umnažanja i kvantificirati količinu supstrata koja je bila prisutna prije početka PCR reakcije. Prednost real-time PCR je kontinuirana analiza produkata lančane reakcije polimeraze te što nakon završetka reakcije nije potrebna daljnja obrada (poput gel elektroforeze), kao što je to slučaj kod konvencionalne PCR metode (110, 111).

Dobivena cDNA upotrijebljena je za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR), uz upotrebu specifičnih početnica odabranih gena za glikoziltransferaze i house keeping gena (Tablica 4.1.) te reakcijsku smjesu iTaq Fast Sybr Green Supermix with Rox (Biorad, Hercules, CA, USA). Analizirana je razina mRNA dva *housekeeping* gena - endogena referentna gena, prema kojima su normalizirane vrijednosti ekspresije gena glikoziltransferaza, tako da su dobivene relativne vrijednosti ekspresije pojedinog gena za svakog ispitanika. β-aktin i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH), odabrani su kao referentni geni jer su se u većini prijašnjih istraživanja pokazali kao stabilni i najprikladniji geni za endogenu kontrolu. Početnice su dizajnirane uz upotrebu programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Specifičnost oligonukleotida testirana je internetskom platformom BLAST (NCBI - National Center for Biotechnology Information, USA), traženjem homologije sekvence u cijelom ljudskom genomu, a kasnije je potvrđena analizom krivulje mekšanja (*dissociation curve analysis*). Sve početnice sintetizirala je tvrtka Metabion (Martinsried, Germany), bile su neoznačene, duge 17-22 pb, a sljedovi njihovih nukleotida prikazani su u Tablici 4.1.

Tablica 4.1. Sljedovi nukleotida početnica gena glikoziltransferaza

Gen (mRNA)	ID gena	Početnica 1 - Forward (5'-3')	Početnica 1 - Reverse (5'-3')
FUT1	2523	GCAGGCCATGGACTGGTT	CCTGGGAGGTGTCGATGTTT
FUT3	2525	CCAGTGGGTCCTCCCGA	GCCATGTCCATAGCAGGATCA
FUT4	2526	GAGCTACGCTGTCCACATCACC	CAGCTGGCCAAGTTCCGTATG
FUT5	2527	GTCCCGAGACGATGCCACT	CCGGTGACAGGTTCCACTG
FUT6	2528	ATCCCACTGTGTACCCTAATGG	TGCCAGGCACCATCTCTGAG
FUT7	2529	TCCGCGTGCGACTGTTC	ACCCTCAAGGTCCTCATAGACTTG
FUT8	2530	TCTTCATCCCCGTCCTCCA	GAGACACCCACCACACTGCA
FUT10	84750	TGGGAGGTTAGGCCAATGTG	TCCGGTTGATGGTGAAGAAAC
ST3Gal1	6482	GGGCAGACAGCAAAGGGAA	GGCCGTCACGTTAGACTCAAA
ST3Gal4	6484	GGAAGTGAGGAAAGGCAACCAG	CCGGGAGTAGTTGCCAAAGAGC
GM3 sintaza	8869	ATCGGTGTCATTGCCGTTGT	TTCATAGCAGCCATGCATTGA
ST3Gal6	10402	GGCCATATTCCTGAGTGCTGTC	AGCTGGCTTTGATAAACAAGGC
ST6Gal1	6480	CATCCAAGCGCAAGACTGACG	TGTGCCCTGGTTGAGATGCTTC
ST6Gal2	84620	AGAGGTGCACGTGTATGAATATATCC	CGTCGTAGTACAGCTCGTGGTAGT
ST6GalNAc1	55808	ACATGGGCCAGGAGATAGACA	ATGAGAGCTCCGCTCAATCG
ST6GalNAc2	10610	TCACCAAGTCATCGCCTCC	TTGGCACTCTCTGAGCCGT
ST6GalNAc3	256435	CATGATTCGAGTTGTGTCCCA	TCATATTGCGGAAAGGTCCC
ST6GalNAc4	27090	GTTCACCATGATCCTCGCG	TGACACTCATCTAGCCGGCC
Beta-actin	60	GCTCCTCCTGAGCGCAAG	CCTCGCCTTTGCCGA
GAPDH	2597	CCATGTTCGTCATGGGTGTG	GGTGCTAAGCAGTTGGTGGTG

Reakcijska smjesa za praćenje umnažanja DNA u stvarnom vremenu sadržavala je fluorescentnu boju SYBR Green I, koja se veže za DNA te emitira 1000 jači signal kada je vezana za dvolančanu DNA. I-Taq Fast Sybr Green Supermix with Rox optimiziran je za real-time-PCR, te osim navedene boje sadrži i DNA polimerazu, 4 deoksi nukleotida (dNTPs), pasivnu referencu (Passive Reference I), koja je neophodna za normalizaciju signala u svim reakcijama sa SYBR® Green bojom, te odgovarajući pufer. Reakcija umnažanja se odvijala na stroju ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Reakcijska smjesa sastojala se od 4 μL od iTaq Fast Sybr Green Supermixa, 2 μL otopine obaju oligonukleotidnih početnica (10 pmol) te 2 μL razrijeđene cDNA (1:4). Sve reakcije su učinjene u triplikatu. Za referentne gene su sve reakcije učinjene u kvadruplikatu. Reakcijski uvjeti bili su sljedeći: 50°C kroz 2 min, 95°C kroz 10 min, 40 ciklusa na 95°C kroz 15 s i 60°C kroz 60 s. Kontrolni uzorak, bez kalupa DNA u reakcijskoj smjesi, korišten je u svakoj RT-PCR analizi da bi se utvrdila eventualna kontaminacija upotrijebljenih reagensa.

Vrijednost Ct definirana je kao ciklus u kojem je količina DNA dosegla razinu zadanog praga na stroju za RT-PCR (ABI 7000 Sequence Detection System), i iznosila je 0.3 relativne jedinice fluorescencije. Razina praga je bila ista za sve analizirane uzorke, a odgovara logaritmu linearnog dijela krivulje umnažanja DNA.

Za izračunavanje i normalizaciju vrijednosti relativne ekspresije korištena je $2^{-\Delta Ct}$ metoda (112), pri tome je od srednje vrijednosti Ct pojedinog gena od interesa (srednja vrijednost Ct tri reakcije) oduzimana srednje vrijednosti Ct svakog od referentnih gena. Ovaj način računanja relativne razine ekspresije pretpostavlja da su uspješnosti reakcije umnažanja otprilike jednake. Dobivena vrijednost pomnožena je s faktorom 1000 zbog značajno izraženije ekspresije endogenih referentnih gena i jasnijeg prikaza i lakše evaluacije rezultata.

4.3. Statistička analiza

Kategoričke varijable prikazane su deskriptivno i testirane chi-kvadrat testom za procjenu razlika među skupinama.

Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testom ispitana je normalnost raspodjele rezultata svih numeričkih kontinuiranih varijabli.

Numeričke varijable s normalnom raspodjelom prikazane su prosječnom vrijednošću i standardnom devijacijom, a razlike među pojedinim skupinama ispitane su Student t-testom.

Numeričke varijable s nenormalnom raspodjelom prikazane su medijanom vrijednosti, uz 25. i 75. percentilu za procjenu raspršenja. Razlike među pojedinim skupinama ispitane su Mann-Whiney testom za neovisne uzorke i Wilcoxon *signed rank* testom za međusobno ovisne uzorke (npr. dva mjerenja u istog ispitanika u dva različita vremena).

Korelacije između numeričkih varijabli s nenormalnom raspodjelom testirane su Spearmannovim testom korelacije.

Razina značajnosti podešena je na $P<0,05$.

Za statističku analizu korišten je statistički paket *SPSS for Windows* 11.0.3. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. REZULTATI

5.1. Značajke ispitivanih skupina

Ispitivanjem su obuhvaćena 52 bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i 32 ispitanika u kontrolnoj skupini s isključenom koronarnom bolesti. Njihove demografske i kliničke značajke prikazane su u tablici 5.1.1. Vidljivo je kako nije bilo značajnih razlika između dvije istraživane skupine po dobi i spolu i većini prisutnih čimbenika rizika, iako je udio ispitanika koji su pušili bio značajno veći u ispitivanoj skupini (chi kvadrat, $P<0,05$).

Tablica 5.1.1. Demografske i kliničke značajke ispitivanih skupina

Značajka	AKS	Kontrola	P
Dob, mean±SD	59,2±9,9	56,2±7,6	0,105
Spol, muški (%)	73,1	57,7	0,149
Hipertenzija (%)	46,2	57,7	0,198
Dislipidemija (%)	58,5	69,2	0,173
Pušenje (%)	42,3	26,9	0,021*
Pozitivna OA† (%)	23,1	38,5	0,130
KBZ‡ (%)	8,7	7,7	0,846

*chi kvadrat, $P<0,05$; †Obiteljska anamneza; ‡Kronično bubrežno zatajenje

Među bolesnicima s akutnim koronarnim sindromom bilo je 30 bolesnika sa STEMI i 22 bolesnika NSTE-AKS. Među svim bolesnicima s akutnim koronarnim sindromom medijan vremena od početka bolesti do prvog medicinskog kontakta bio je 2 sata (minimalno 1, maksimalno 22 sata), a medijan vremena od početka bolesti do inicijalnog izuzimanja uzorka krvi za analizu ekspresije gena bio je 12 sati (minimalno 1, maksimalno 22 sata). Medijan vremena od početka bolesti do drugog uzorkovanja krvi u kroničnoj fazi bolesti bio je 8 dana

(minimalno 7, maksimalno 14 dana). Nije bilo značajnih razlika u vremenu od početka bolesti do vađenja krvi u obje faze bolesti između bolesnika sa STEMI i NSTE-AKS (Mann-Whitney test, $P>0,05$).

Podatci o uzimanju različitih lijekova analizirani su u obje ispitivane skupine, uz napomenu različitog statusa uzimanja lijekova u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u trenutku inicijalnog izuzimanja krvi za analizu u akutnoj fazi i drugog uzimanja uzorka u kroničnoj fazi bolesti (tablica 5.1.2.). Podatci o uzimanju klopidogrela nisu posebno istaknuti s obzirom na činjenicu da su svi analizirani bolesnici s akutnim koronarnim sindromom primali redovito taj lijek nakon prijema u bolnicu, a među kontrolnom skupinom postotak onih koji su ga uzimali bio je zanemariv (6%). Značajno je porastao udio bolesnika koji su uzimali statine, acetilsalicilnu kiselinu, ACE-inhibitore i beta blokatore (chi kvadrat, $P<0,05$) među bolesnicima s akutnim koronarnim sindromom između dva uzorkovanja. Značajne razlike između bolesnika i kontrolne skupine prikazane su u tablici 5.1.2.

Tablica 5.1.2. Lijekovi koje su ispitanici uzimali tijekom uzimanja uzoraka krvi za analizu

Lijek	Ispitanici koji su uzimali lijek (%)		
	AKS 1. uzorkovanje	AKS 2. uzorkovanje	Kontrola
Statin	11,5*	76,9*	50,0
Acetilsalicilna kiselina	9,6*	100*	57,7
ACE-inhibitor	34,6	69,2	46,2
Kalcijski antagonist	34,0	26,7	23,1
Beta blokator	11,5*	38,5	61,5
Diuretik	4,3	6,7	12,5
Benzodiazepin	6,4*	11,5	23,1
NSAIL	3,8	9,8	11,5
Inhibitor prot. pumpe	9,8	22,8	15,0

*Značajno različito od kontrole, chi kvadrat, $P<0,05$

5.2. Relativne vrijednosti genske ekspresije glikoziltransferaza

Preliminarnom analizom prvih 8 uzoraka uočeno je 7 glikoziltransferaza čije su razine genske ekspresije bile preniske za daljnje analize i usporedbe (detekcijska granica metode RT-PCR Ct >35). Navedene glikoziltransferaze isključene su iz daljnjeg istraživanja i detaljnih analiza i usporedbi: fukoziltransferaze FUT 1, FUT 3 i FUT 6 i sijaliltransferaze ST3Gal 1, ST3Gal4, ST3Gal6 i ST6Gal2.

Razine genske ekspresije preostalih 11 glikoziltransferaza: fukoziltransferaza FUT 4, 5, 7, 8 i 10 i sijaliltransferaza ST6Gal1, ST6GalNac 1, ST6GalNac 2, ST6GalNac 3, ST6GalNac 4 i GM3 izmjerene su u obje ispitivane skupine sukladno protokolu i prikazane kao razine relativnih ekspresija prema dva endogena referentna gena.

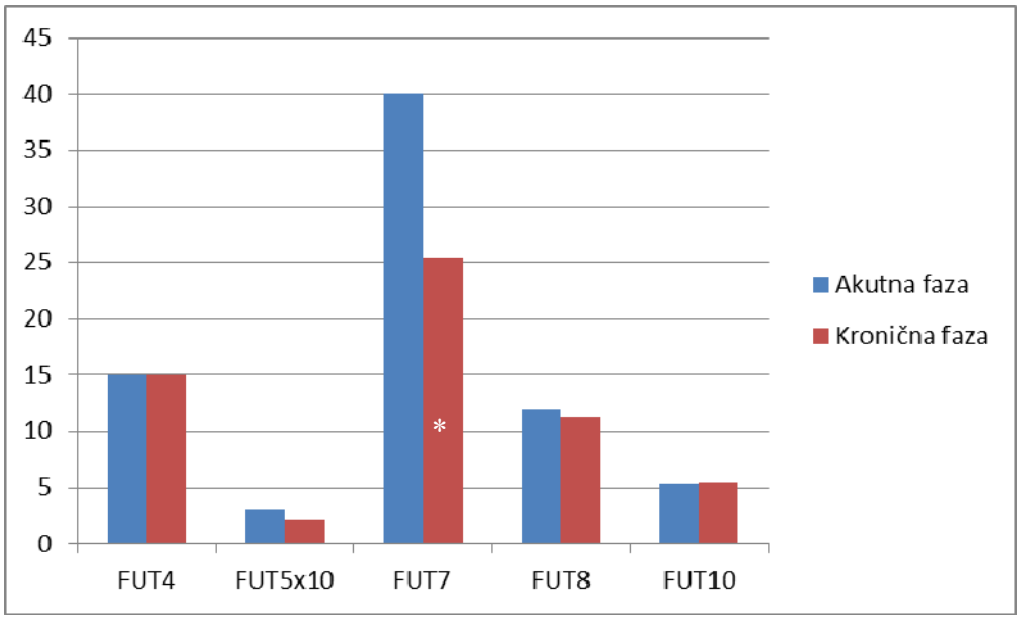
Usporedbom vrijednosti relativnih ekspresija između bolesnika s akutnim koronarnim sindromom pri prvom uzorkovanju u akutnoj fazi bolesti i kontrolne skupine nađena je značajno niža ekspresija gena FUT 4, FUT 7, ST6GalNac 1, ST6GalNac 4, ST6Gal1 i GM3 sintaze u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (Tablica 5.2.1.). Za gene FUT4, ST6GalNac 4 i GM3 sinatazu značajno niža ekspresija nađena je u odnosu na oba referentna endogena gena, dok je za ostale gene ekspresija bila niža samo u odnosu beta aktin. Ekspresija gena ST6GalNac 2 bila je značajno viša u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom, ali samo u odnosu na GAPDH, dok je veća relativna ekspresija u odnosu na beta aktin bila statistički neznačajna (Tablica 5.2.1.).

Usporedbom vrijednosti relativnih ekspresija u istih bolesnika s akutnim koronarnim sindromom između prvog uzorkovanja u akutnoj fazi i drugog uzorkovanja u kroničnoj fazi bolesti nađeno je značajno sniženje relativne ekspresije FUT 7 , ST6GalNac 2 i ST6GalNac 3 u odnosu na oba referentna gena u drugom uzorkovanju u kroničnoj fazi bolesti (Slike 5.2.1., 5.2.2., 5.2.3. i 5.2.4.). Značajno je porasla relativna ekspresija gena ST6GalNac 1 u drugom uzorkovanju u odnosu na oba referentna gena, a značajan porast ST6Gal 1 zabilježen je samo u odnosu na GAPDH (Slike 5.2.3. i 5.2.4.).

Tablica 5.2.1. Razlike relativnih ekspresija za 11 gena između bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u prvom uzorkovanju u akutnoj fazi bolesti i kontrolne skupine

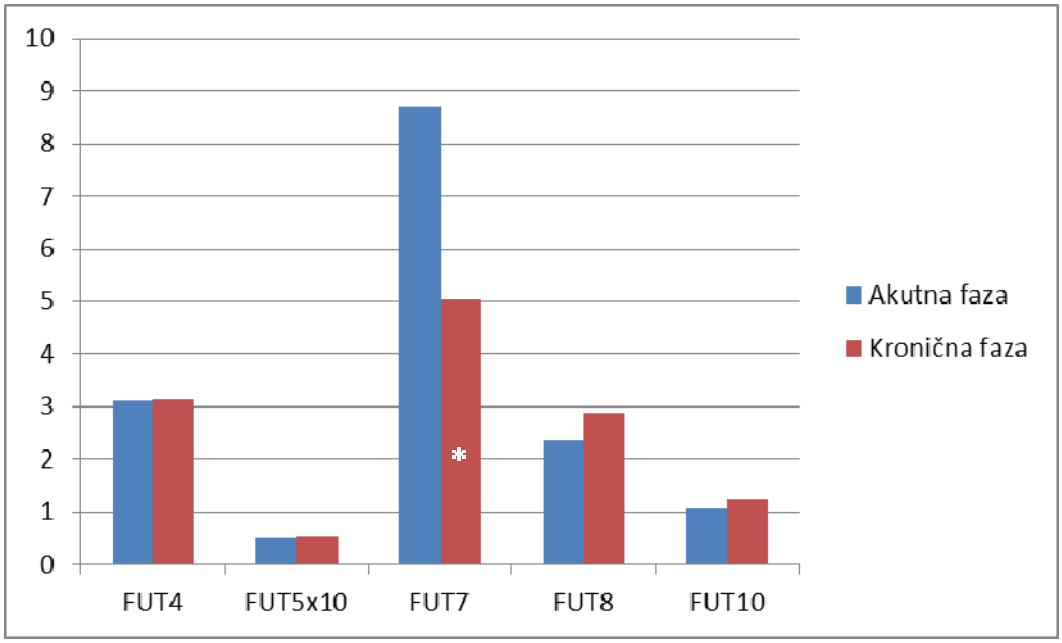
Gen	Skupina	GAPHD (1000x vrijednost)				beta aktin (1000x vrijednost)			
		median	0,25 perc.	0,75 perc.	P vrijednost Mann-Whitney	median	0,25 perc.	0,75 perc.	P vrijednost Mann-Whitney
FUT4	AKS	14,964	13,185	16,573	**<0,001**	3,105	1,987	5,083	**0,001**
	kontrola	17,918	15,940	22,367		4,735	3,813	5,795	
FUT5	AKS	0,312	0,105	0,527	0,050	0,049	0,025	0,134	0,198
	kontrola	0,151	0,123	0,262		0,043	0,324	0,599	
FUT7	AKS	40,039	28,067	51,296	0,149	8,709	5,719	13,276	**0,022**
	kontrola	47,122	30,473	60,719		11,864	6,237	19,987	
FUT8	AKS	11,980	7,4167	18,646	0,805	2,376	1,256	4,792	0,193
	kontrola	12,913	9,324	16,569		3,028	1,920	4,699	
FUT10	AKS	5,328	3,472	8,881	0,252	1,065	0,859	1,893	0,576
	kontrola	4,981	3,333	6,976		1,176	0,837	1,686	
ST6GNac1	AKS	0,675	0,247	1,289	0,252	0,134	0,067	0,265	**0,031**
	kontrola	0,760	0,474	1,108		0,205	0,103	0,341	
ST6GNac2	AKS	14,554	9,005	20,546	**0,009**	3,493	1,867	5,154	0,110
	kontrola	10,525	7,433	13,915		2,835	2,028	3,920	
ST6GNac3	AKS	12,690	6,502	28,956	0,398	2,766	1,022	7,520	0,917
	kontrola	10,457	8,711	13,196		2,367	1,693	4,714	
ST6GNac4	AKS	36,160	26,369	48,529	**0,006**	7,748	4,876	12,691	**<0,001**
	kontrola	52,744	34,108	68,576		11,821	9,277	17,265	
ST6Gal1	AKS	92,462	62,183	149,593	0,069	20,193	14,198	31,631	**0,001**
	kontrola	121,161	83,333	155,595		26,097	21,566	47,203	
GM3	AKS	17,158	10,202	21,642	**<0,001**	3,479	1,785	5,486	**<0,001**
	kontrola	24,358	19,287	32,946		5,822	4,389	8,036	

Podvučene su i podebljane statistički značajne razlike relativnih ekspresija gena između ispitivanih skupina
Crvenom bojom označene su dodatno statistički značajne razlike s obzirom na oba referentna endogena gena



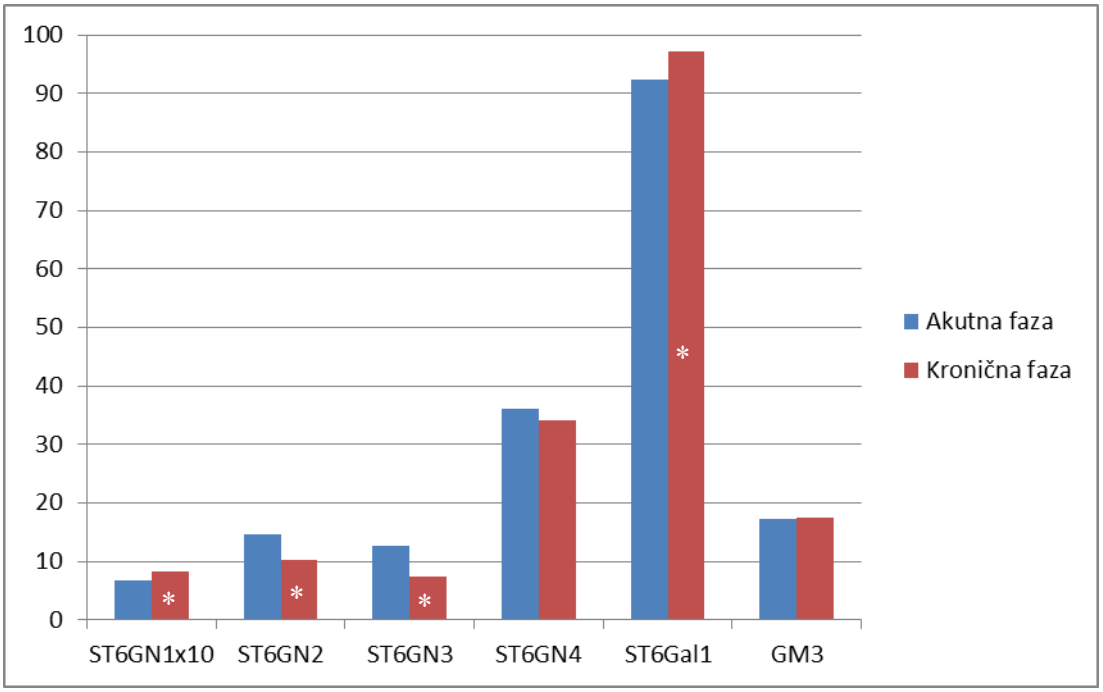
* Značajno manja vrijednost, Wilcoxon Signed Rank test, P<0,05.

Slika 5.2.1. Razlike u prosječnim relativnim razinama ekspresije FucT prema GAPDH između prvog uzorkovanja u akutnoj i drugog uzorkovanja u kroničnoj fazi u bolesnika s AKS



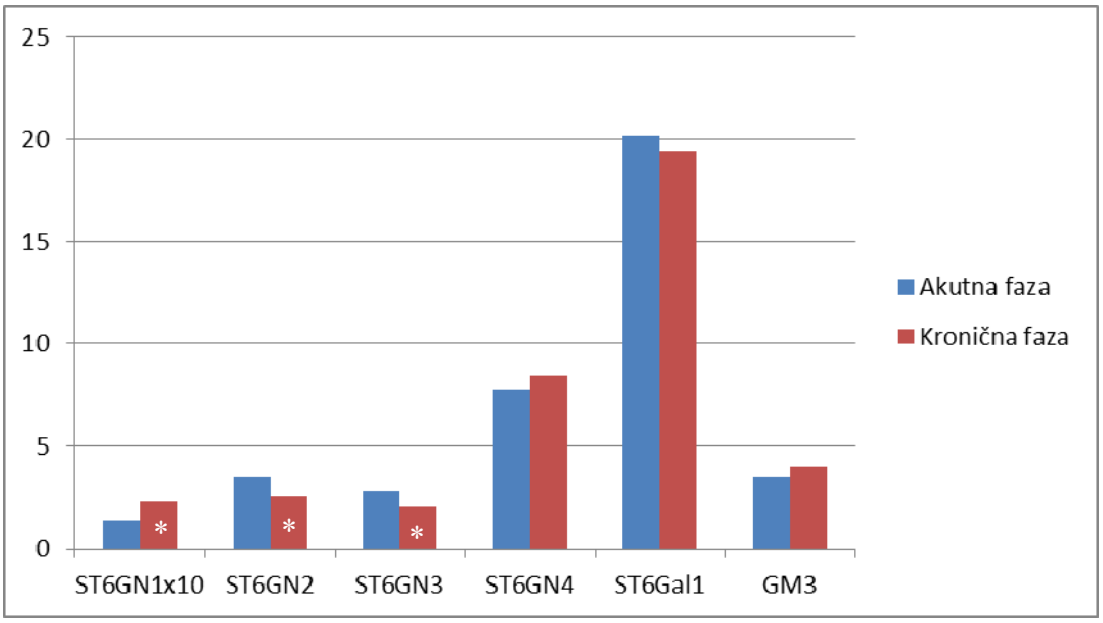
* Značajno manja vrijednost, Wilcoxon Signed Rank test, P<0,05

Slika 5.2.2. Razlike u prosječnim relativnim razinama ekspresije FucT prema beta aktinu između prvog uzorkovanja u akutnoj i drugog uzorkovanja u kroničnoj fazi u bolesnika s AKS



* Značajno različita vrijednost, Wilcoxon Signed Rank test, P<0,05

Slika 5.2.3. Razlike u prosječnim relativnim razinama ekspresije SiaT prema GAPDH između prvog uzorkovanja u akutnoj i drugog uzorkovanja u kroničnoj fazi u bolesnika s AKS



* Značajno različita vrijednost, Wilcoxon Signed Rank test, P<0,05

Slika 5.2.4. Razlike u prosječnim relativnim razinama ekspresije SiaT prema beta aktinu između prvog uzorkovanja u akutnoj i drugog uzorkovanja u kroničnoj fazi u bolesnika s AKS

Uspoređene su relativne ekspresije gena dobivene drugim uzorkovanjem u kroničnoj fazi bolesti bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i u kontrolnoj skupini. Relativna ekspresija FUT 4, ST6GalNac 4 i GM3 sintaze ostala je značajno niža u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u odnosu na oba referentna gena, a relativna ekspresija gena ST6Gal1 postala je značajno niža u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom također za oba referentna gena (Tablica 5.2.2.). Značajno sniženje relativne ekspresije FUT 7 i ST6GalNac 3 zabilježeno između dva uzorkovanja u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom rezultiralo je značajno nižom relativnom ekpresijom tih gena prema oba referentna gena u bolesnika u kroničnoj fazi u usporedbi s kontrolnom skupinom koja nije bila prisutna u akutnoj fazi bolesti (Tablice 5.2.1. i 5.2.2.). Relativna ekspresija gena ST6GalNac 2 dobivena drugim uzorkovanjem u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom bila je značajno niža nego pri prvom uzorkovanju i nije se značajno razlikovala od vrijednosti kontrolne skupine (Tablice 5.2.1. i 5.2.2.).

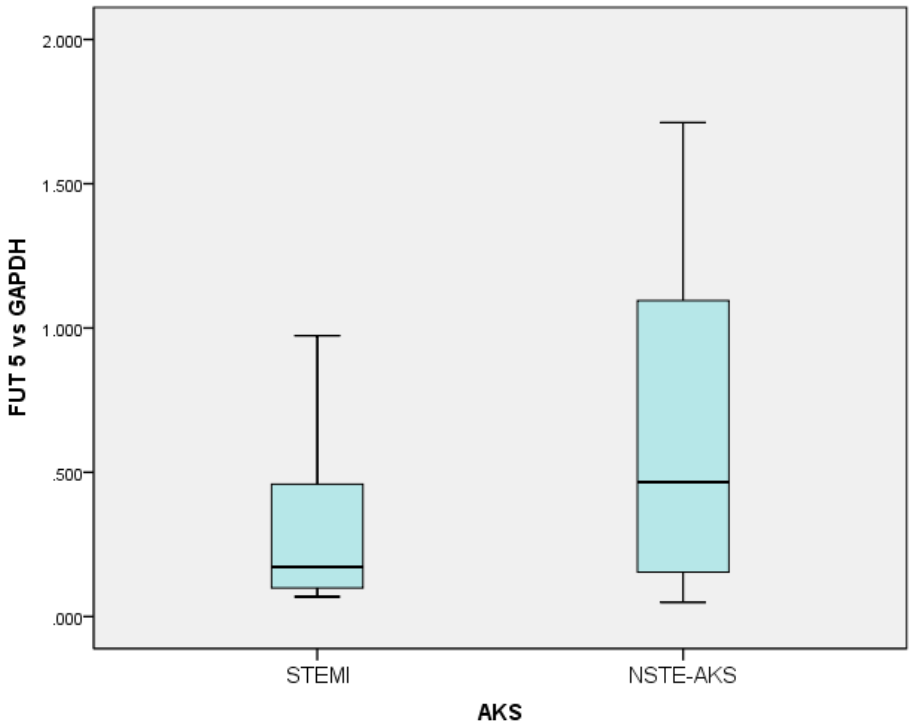
Usporedbom relativnih ekspresija gena između bolesnika s dva različita oblika akutnog koronarnog sindroma nađeno je kako su bolesnici sa STEMI imali značajno nižu relativnu ekspresiju gena FUT 5 u odnosu oba referentna gena od bolesnika s NSTE-AKS i u akutnoj i u kroničnoj fazi bolesti. (Slike 5.2.5. do 5.2.8.). Nije bilo značajnih razlika između STEMi i NSTE-AKS bolesnika u odnosu na relativne ekspresije ostalih gena.

Učinjen je Spearmanov test korelacija relativnih ekspresija gena s dobi bolesnika i vrijednosti rutinskih laboratorijskih nalaza. Nije nađena značajna korelacija između dobi i relativne ekspresije ni jednog analiziranog gena. Dobivena je statistički značajna negativna korelacija između maksimalno zabilježene vrijednosti kreatin kinaze i relativne ekspresije gena FUT 5 (Spearmanov rho -0,686; $P<0,001$ za GAPDH i -0,807; $P<0,001$ za beta aktin) i FUT 10 (Spearmanov rho -0,413; $P=0,023$ za GAPDH i -0,393; $P=0,032$ za beta aktin). Također je nađena statistički značajna negativna korelacija između maksimalno zabilježene vrijednosti troponina-I i relativne ekspresije gena FUT 5 (Spearmanov rho -0,630; $P=0,005$ za GAPDH i -0,661; $P=0,003$ za beta aktin), FUT 8 (Spearmanov rho -0,603; $P=0,008$ za GAPDH i -0,644; $P=0,004$ za beta aktin) i FUT 10 (Spearmanov rho -0,866; $P<0,001$ za GAPDH i -0,845; $P<0,001$ za beta aktin). Prosječne maksimalne vrijednosti kreatin kinaze i troponina-I bile su značajno više u bolesnika sa STEMI u odnosu na bolesnike s NSTE-AKS (medijan 2960 vs 280 i medijan 22,78 vs 4,165; Mann Whitney test, $P<0,001$ i $P=0,002$, tim redosljedom).

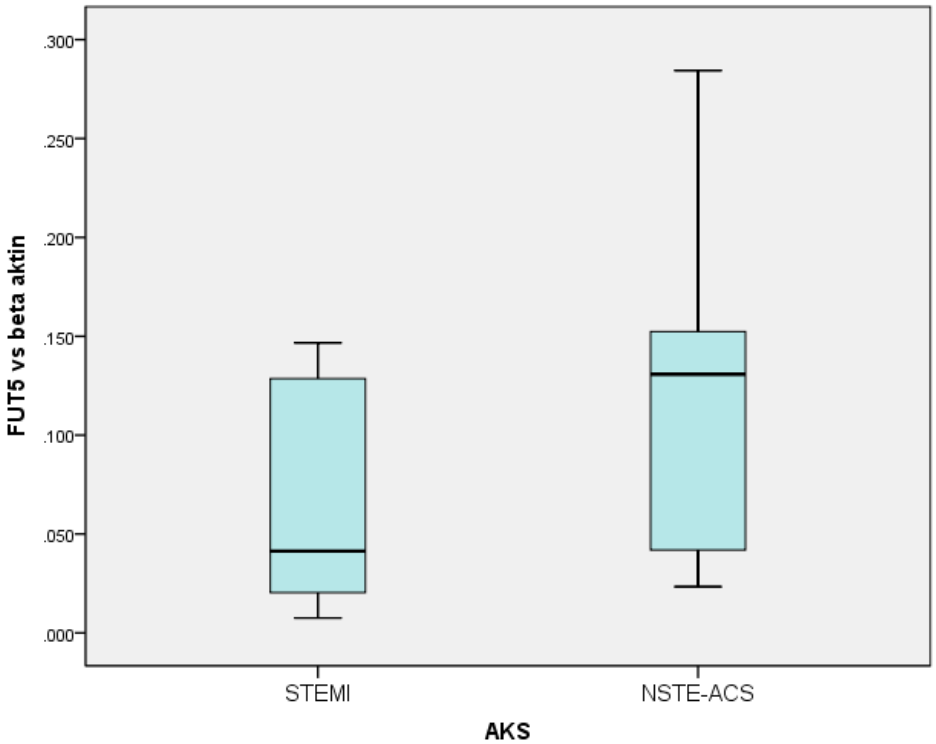
Tablica 5.2.2. Razlike relativnih ekspresija za 11 gena između bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u drugom uzorkovanju u kroničnoj fazi bolesti i kontrolne skupine

Gen	Skupina	GAPHD (1000x vrijednost)				beta aktin (1000x vrijednost)			
		median	0,25 perc.	0,75 perc.	P vrijednost Mann-Whitney	median	0,25 perc.	0,75 perc.	P vrijednost Mann-Whitney
FUT4	AKS	15,041	11,770	19,522	**0,001**	3,157	2,736	5,075	**0,002**
	kontrola	17,918	15,940	22,367		4,735	3,813	5,795	
FUT5	AKS	0,213	0,120	0,336	0,132	0,052	0,035	0,070	0,136
	kontrola	0,151	0,123	0,262		0,043	0,324	0,599	
FUT7	AKS	25,405	19,071	35,904	**<0,001**	5,049	3,404	11,538	**<0,001**
	kontrola	47,122	30,473	60,719		11,864	6,237	19,987	
FUT8	AKS	11,222	7,690	17,755	0,679	2,869	1,930	3,697	0,195
	kontrola	12,913	9,324	16,569		3,028	1,920	4,699	
FUT10	AKS	5,525	2,880	8,319	0,600	1,258	0,648	2,003	0,901
	kontrola	4,981	3,333	6,976		1,176	0,837	1,686	
ST6GNac1	AKS	0,824	0,431	1,584	0,619	0,233	0,127	0,346	0,659
	kontrola	0,760	0,474	1,108		0,205	0,103	0,341	
ST6GNac2	AKS	10,273	5,221	17,800	1,000	2,584	1,529	4,347	0,901
	kontrola	10,525	7,433	13,915		2,835	2,028	3,920	
ST6GNac3	AKS	7,483	5,346	10,757	**<0,001**	2,082	1,372	2,796	**0,004**
	kontrola	10,457	8,711	13,196		2,367	1,693	4,714	
ST6GNac4	AKS	34,196	24,202	59,656	**0,015**	8,446	4,826	14,297	**0,003**
	kontrola	52,744	34,108	68,576		11,821	9,277	17,265	
ST6Gal1	AKS	97,230	74,306	116,453	**0,006**	19,370	14,566	30,854	**0,001**
	kontrola	121,161	83,333	155,595		26,097	21,566	47,203	
GM3	AKS	17,549	11,713	22,288	**<0,001**	4,016	2,402	5,870	**<0,001**
	kontrola	24,358	19,287	32,946		5,822	4,389	8,036	

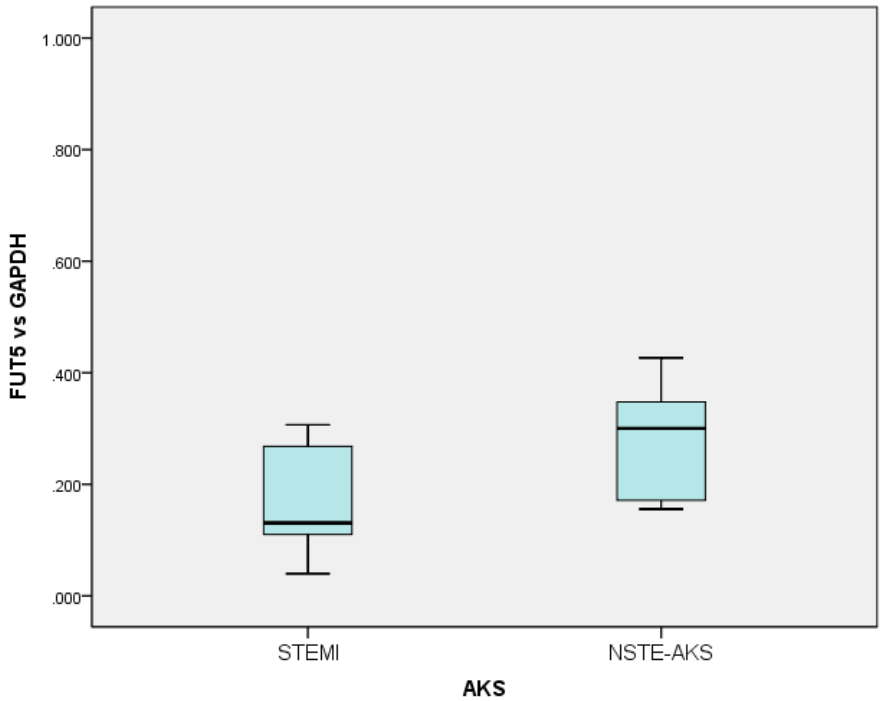
Podvučene su i podebljane statistički značajne razlike relativnih ekspresija gena između ispitivanih skupina. Crvenom bojom označene su dodatno statistički značajne razlike s obzirom na oba referentna endogena gena.



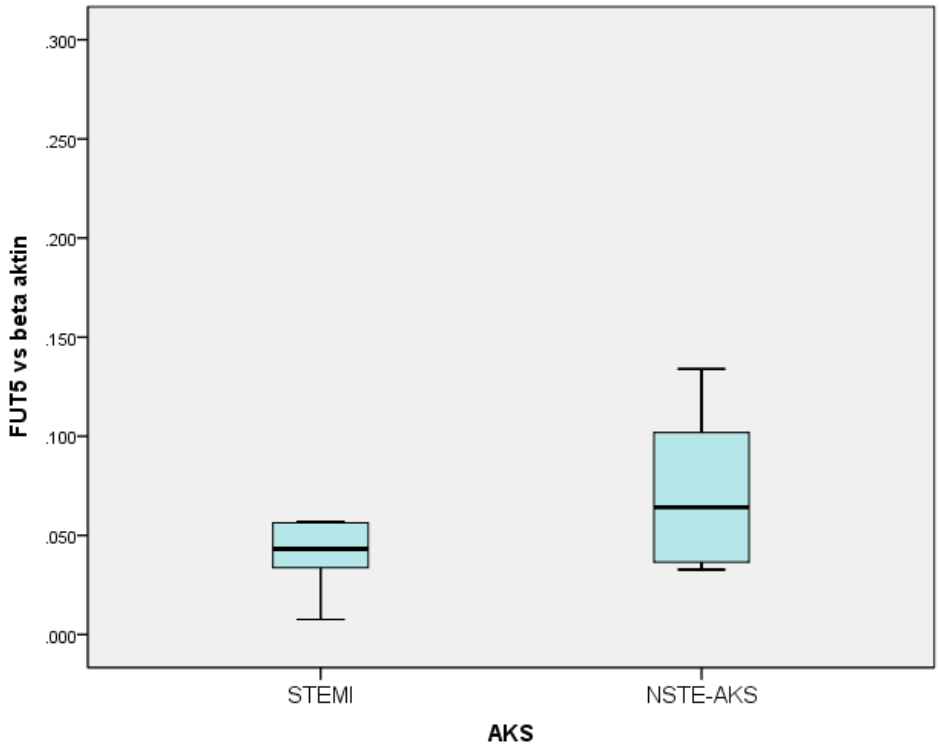
Slika 5.2.5. Značajna razlika u relativnoj ekspresiji FUT5 prema GAPDH između bolesnika sa STEMI i NSTE-AKS u akutnoj fazi bolesti (Mann-Whitney, P<0,05).



Slika 5.2.6. Značajna razlika u relativnoj ekspresiji FUT5 prema beta aktinu između bolesnika sa STEMI i NSTE-AKS u akutnoj fazi bolesti (Mann-Whitney, P<0,05).



Slika 5.2.7. Značajna razlika u relativnoj ekspresiji FUT5 prema GAPDH između bolesnika sa STEMI i NSTE-AKS u kroničnoj fazi bolesti (Mann-Whitney, P<0,05).



Slika 5.2.8. Značajna razlika u relativnoj ekspresiji fukoziltransferaze 5 prema beta aktinu između bolesnika sa STEMI i NSTE-AKS u kroničnoj fazi bolesti (Mann-Whitney, P<0,05).

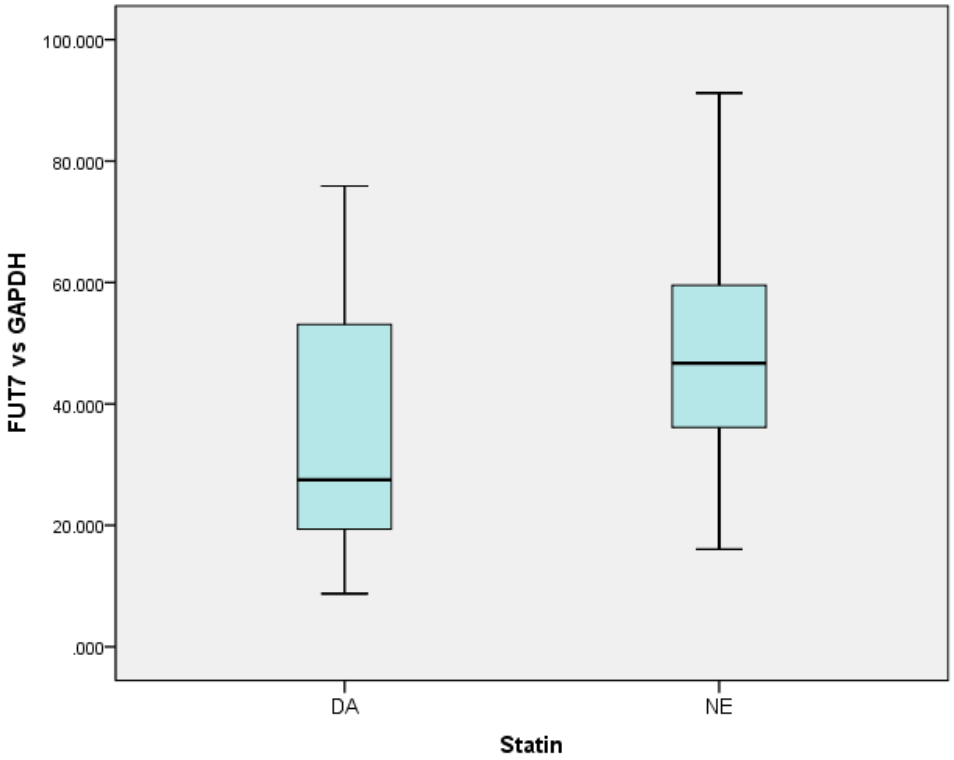
Mann-Whitneyevim testom uspoređeni su medijani vrijednosti relativnih ekspresija analiziranih gena svih ispitanika (bolesnika i kontrola) između onih koji su uzimali određeni lijek i onih koji nisu u svrhu analize utjecaja uzimanja lijekova na ekspresiju. Analizirani su najčešće zastupnjeni lijekovi navedeni u tablici 5.1.2. S obzirom na značajnu promjenu statusa uzimanja nekih od navedenih lijekova između dva uzorkovanja u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom za ove usporedbe odabrane su vrijednosti ekspresija gena dobivene drugim uzorokovanjem u kroničnoj fazi bolesti. Na taj način osigurana je vjerodostojnost podatka o uzimanju lijekova s obzirom da su ih ti bolesnici dobivali u kontroliranim uvjetima od strane medicinskog osoblja u prosječnom trajanju od 8 dana (medijan vremena od početka bolesti do drugog uzorkovanja).

U osoba koje su redovito uzimale statine nađena je značajno niža relativna ekspresija gena FUT 7 (medijan 27,489 vs 46,714 u odnosu na GAPDH i 8,402 vs 12,691 u odnosu na beta aktin, Mann-Whitney test, $p < 0,05$) u usporedbi s osobama koje nisu uzimale statine (slike 5.2.9. i 5.2.10). Ta značajna razlika u relativnim ekspresijama između osoba koje su uzimale statin i onih koje nisu nađena je i neovisno o prisutnosti akutnog koronarnog sindroma. Također je nađena značajno niža relativna ekspresija gena ST6GalNac3 u osoba koje su uzimale statin u usporedbi s osobama koje nisu uzimale statine (medijan 8,490 vs 11,841 u odnosu na GAPDH i 2,190 vs 2,595 u odnosu na beta aktin, Mann Whitney test, $p < 0,05$, slike 5.2.11. i 5.2.12.).

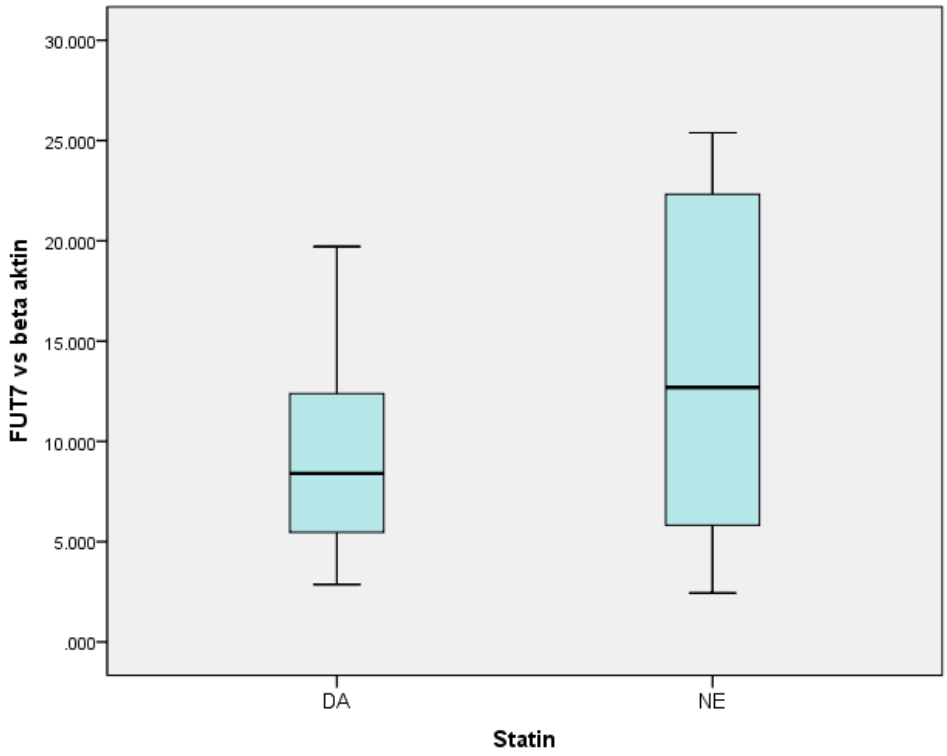
U osoba koje su redovito uzimale acetilsalicilnu kiselinu nađena je značajno niža ekspresija gena FUT 7 (medijan 29,564 vs 51,119 u odnosu na GAPDH i 6,236 vs 18,775 u odnosu na beta aktin, Mann-Whitney test, $p < 0,05$) u usporedbi s osobama koje nisu uzimale taj lijek (slike 5.2.13. i 5.2.14.). Ta razlika međutim nije bila značajna ukoliko su relativne ekspresije uspoređivane neovisno o prisutnosti akutnog koronarnog sindroma.

Relativne ekspresije gena FUT 10, ST6GalNac1 i ST6Gal1 bile su značajno više u bolesnika koji su uzimali benzodiazepine u odnosu na one koji nisu (slika 5.2.15 i 5.2.16.), a ta razlika nađena je neovisno o prisutnosti akutnog koronarnog sindroma.

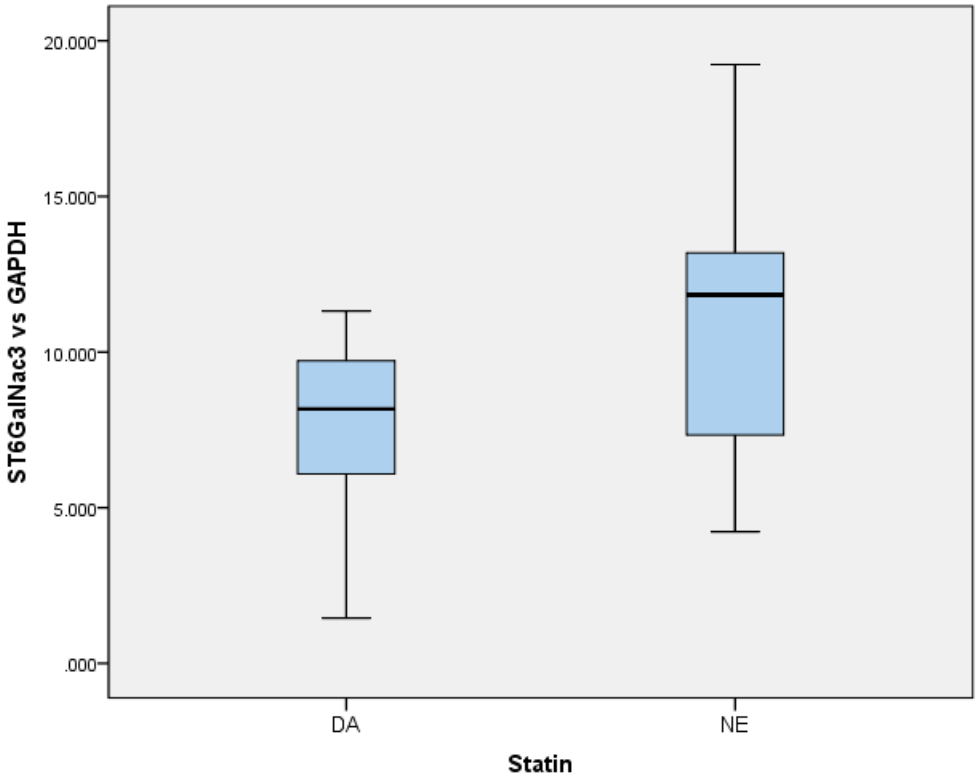
Nije nađeno značajnih razlika u ekspresijama analiziranih gena u odnosu na status uzimanja ostalih lijekova, kao ni u odnosu na prisutnost uobičajenih faktora rizika iz tablice 5.1.1.



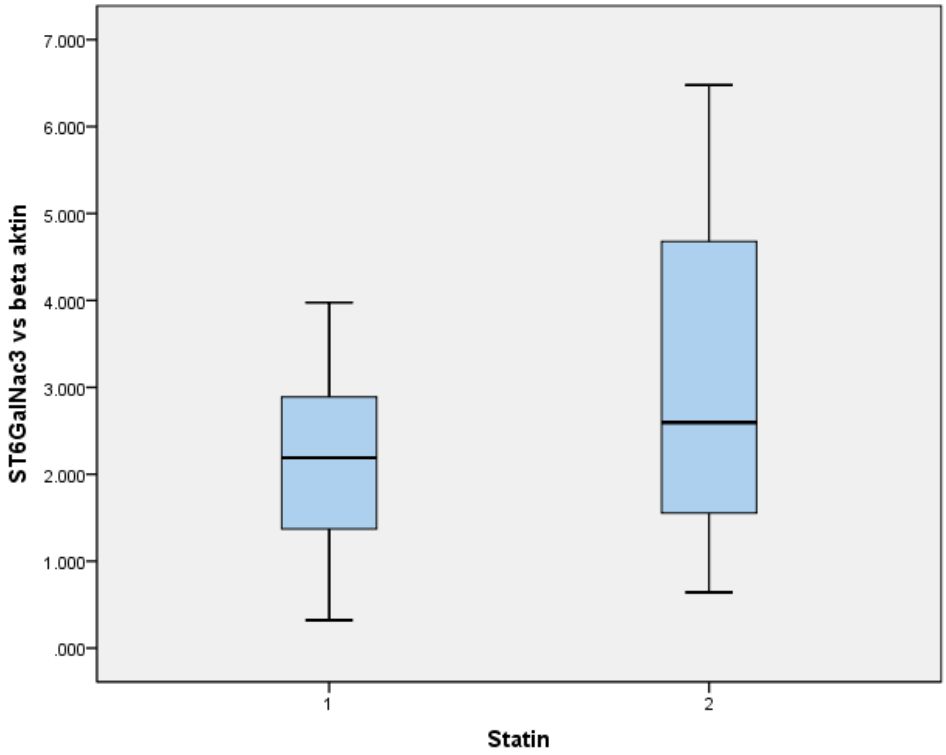
Slika 5.2.9. Značajno niža relativna ekspresija FUT7 prema GAPDH u osoba koje su uzimale statine (Mann-Whitney, P=0,008)



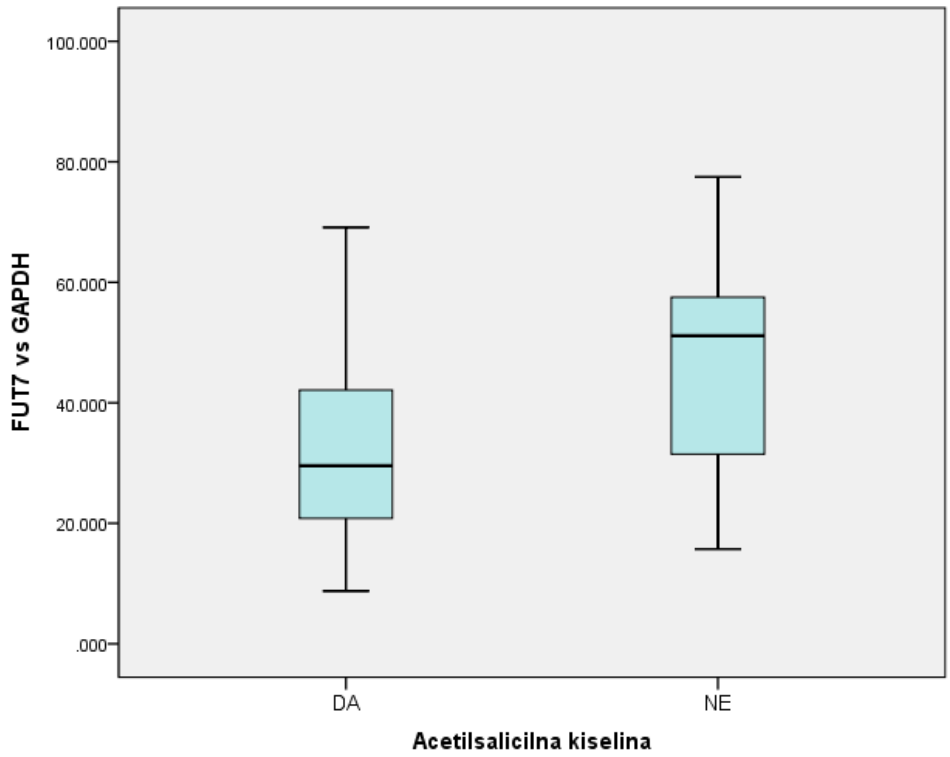
Slika 5.2.10. Značajno niža relativna ekspresija fukoziltransferaze 7 prema beta aktinu u osoba koje su uzimale statine (Mann-Whitney, P=0,016)



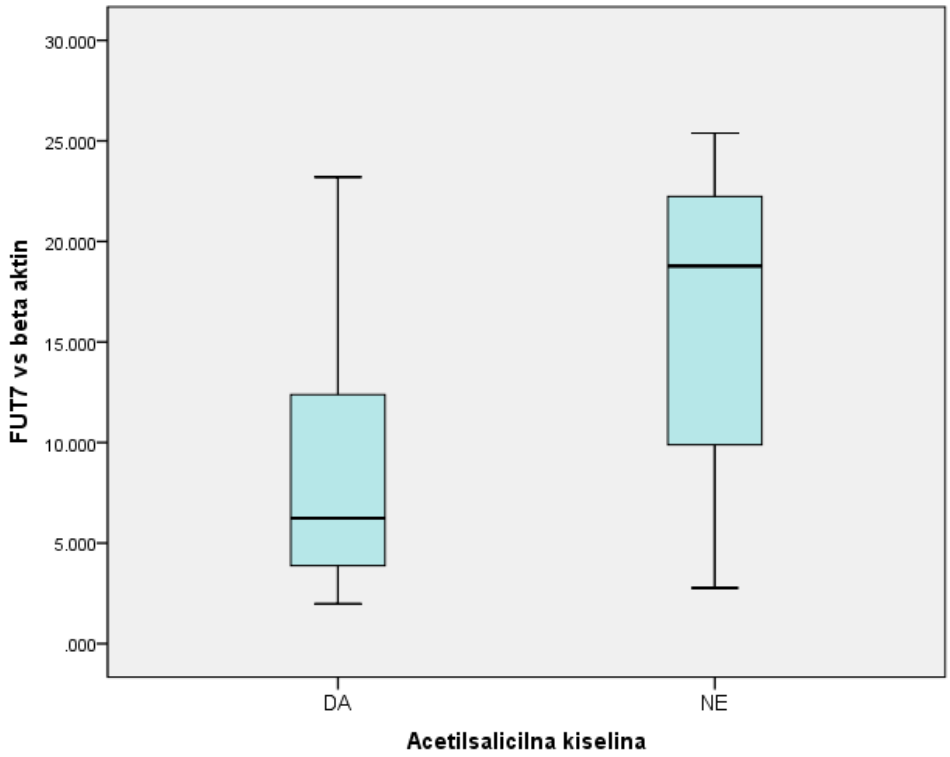
Slika 5.2.11. Značajno niža relativna ekspresija ST6GalNac3 prema GAPDH u osoba koje su uzimale statine (Mann-Whitney, P=0,006)



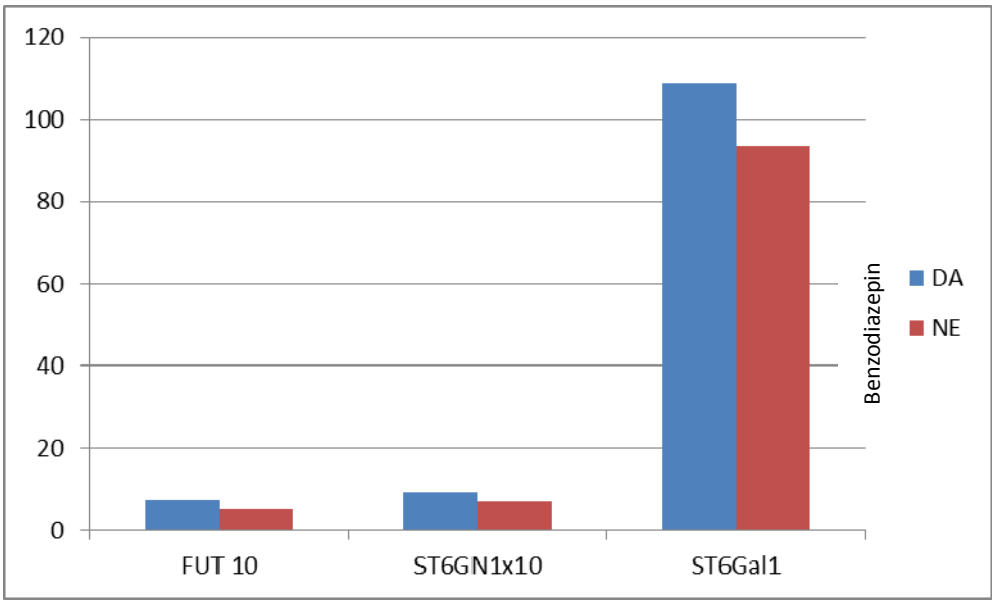
Slika 5.2.12. Značajno niža relativna ekspresija ST6GalNac3 prema beta aktinu u osoba koje su uzimale statine (Mann-Whitney, P=0,048)



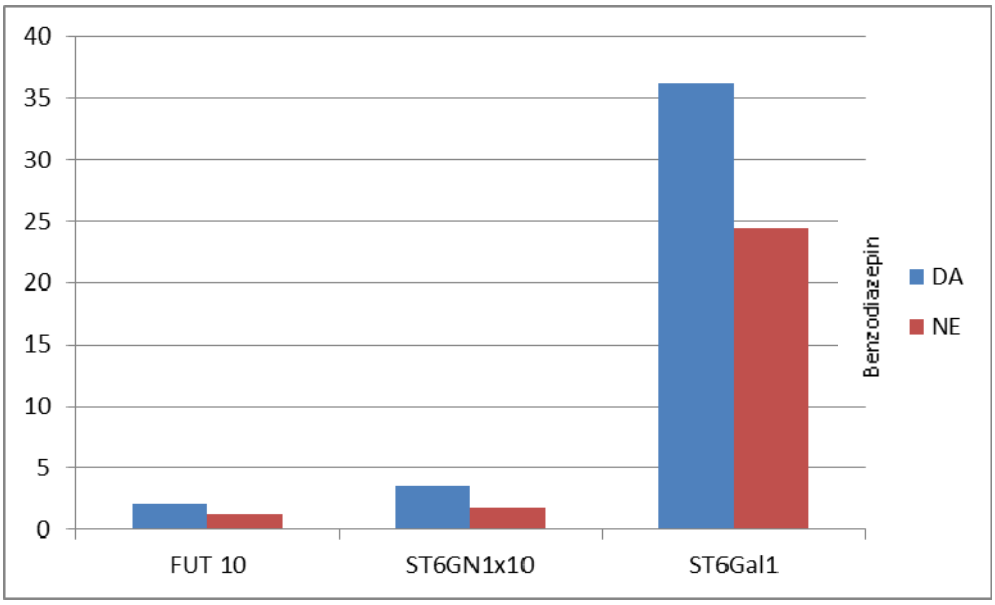
Slika 5.2.13. Značajno niža relativna ekspresija FUT7 prema GAPDH u osoba koje su uzimale acetilsalicilnu kiselinu (Mann-Whitney, P=0,022)



Slika 5.2.14. Značajno niža relativna ekspresija FUT7 prema beta aktinu u osoba koje su uzimale acetilsalicilnu kiselinu (Mann-Whitney, P=0,004)



Slika 5.2.15. Značajno više relativne ekspresije gena FUT10, ST6GalNac1 i ST6Gal1 u odnosu na GAPDH u osoba koje su uzimale benzodiazepine (Mann Whitney, $p<0,05$)



Slika 5.2.16. Značajno više relativne ekspresije gena FUT10, ST6GalNac1 i ST6Gal1 u odnosu na beta aktin u osoba koje su uzimale benzodiazepine (Mann Whitney, $p<0,05$)

6. RASPRAVA

6.1. Genska ekspresija glikoziltransferaza u akutnoj koronarnoj bolesti

U ovom istraživanju prvi put su izmjerene razine ekspresije gena povezanih s glikozilacijom u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i uspoređene s ekspresijom gena u kontrolnoj skupini koja dokazano nema aterosklerotsku koronarnu bolest.

Već u inicijalnoj fazi istraživanja primijećeno je kako su neki geni vrlo nisko eksprimirani te nisu bili dalje analizirani, a niska ekspresija navedenih gena potvrđena je i u drugim sličnim istraživanjima. Naime, nije potpuno jasno dovode li transkripti vrlo nisko eksprimiranih glikoziltransferaza do bilo kakve promjene koncentracije enzima u stanicama, te je njihov značaj upitan, a uloga u staničnim procesima nepotpuno je razjašnjena. Ekspresija gena fukoziltransferaza FUT 1, 3 i 6 te sijaliltransferaza ST3Gal 2, 3 i 6 i ST6Gal2 je i ranijim sličnim istraživanjima bila niska, što je potvrđeno i ovim istraživanjem.

Razine genske ekspresije prikazane su relativno u odnosu na 2 referentna endogena gena (GAPDH i beta aktin), a zbog relativno niske ekspresije u odnosu na te referentne gene rezultati su bili pomnoženi s faktorom 1000 radi zornijeg prikaza. Geni glikoziltransferaza inače spadaju u skupinu nisko eksprimiranih gena, što se vidi i iz ovdje prikazanih rezultata. Također je jasno vidljivo kako su sijaliltransferaze općenito više eksprimirane od fukoziltransferaza relativno prema oba referentna gena što je već i potvrđeno u ranijim istraživanjima. Relativno najjače eksprimirane fukoziltransferaze u analiziranim skupinama bile su FUT7, FUT4 i FUT8, a najjače eksprimirane sijaliltransferaze bile su ST6GalNac4 i ST6Gal1. Najniže eksprimirani gen među fukoziltransferazama bio je FUT5 čija je razina ekpresije nakon normalizacije s ekspresijom gena za beta aktin bila oko 100 puta manja u odnosu na ostale fukoziltransferaze. Među analiziranim sijaliltransferazama najslabije eksprimirani gen bio je ST6GalNac1, čija je relativna razina ekspresije nakon normalizacije s GAPDH i beta aktinom bila oko 20 puta manja u odnosu na ostale sijaliltransferaze.

Razine ekspresija uspoređene su između dviju gotovo uniformnih skupina, a jedino ograničenje istraživanja u smislu uniformiranosti skupina je podatak o značajno većoj zastupljenosti pušača među bolesnicima s akutnim koronarnim sindromom (tablica 5.1.1). Do sada nema relevantnih studija o utjecaju pušenja na promjenu genske ekspresije

glikoziltransferaza u upalnom odgovoru, ali objavljeno je kako pušenje smanjuje razine enzima povezanih s N-glikozilacijom u bolesnika s karcinomom pluća (113). Također, razine genske ekspresije u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom određene su u dva navrata – u akutnoj fazi bolesti i u kroničnoj fazi bolesti (medijan vremena od početka bolesti do drugog mjerenja bio je 8 dana) radi procjene mogućeg utjecaja tijeka i liječenja bolesti na ekspresiju, ali i radi procjene konzistentnosti metode. Iz slika 5.2.1. do 5.2.4. vidljivo je kako su rezultati dobiveni drugim uzorkovanjem konzistentni i bez ekstremnih odstupanja između 2 mjerenja u istih bolesnika među gotovo svim analiziranim genima. Zabilježene značajne promjene ekspresije određenih gena (npr. FUT 7) bilo je moguće objasniti tijekom i liječenjem bolesti i najvjerojatnije nisu posljedica nekonzistentnosti metode ili laboratorijske pogreške.

6.2. Genska ekspresija fukoziltransferaza

α3-fukoziltransferaza 4 (FUT4) i α3-fukoziltransferaza 7 (FUT7)

FUT4 i FUT 7 ubikvitarno su eksprimirane u svim subpopulacijama leukocita i igraju važnu ulogu u sintezi adhezijskih molekula, što ih čini jednim od najzanimljivijih gena za ovo istraživanje. FUT4 i FUT7 bile su najobilnije eksprimirane α1,3 fukoziltransferaze (tablice 5.2.1. i 5.2.2.) u obje analizirane skupine ispitanika. FUT4 i FUT7, kojima se po obilnosti ekpresije mRNA pridružila i FUT8 činile su tako više od tri četvrtine molekula mRNA FucT izoliranih iz leukocita u obje skupine.

FUT 4 gen bio je značajno niže eksprimiran među bolesnicima s akutnim koronarnim sindromom, a ta značajna razlika u ekspresiji, u odnosu na kontrolnu skupinu, ostala je ista tijekom liječenja bolesti i nakon prelaska u kroničnu fazu koronarne bolesti. Enzim za koji kodira gen FUT 4 - α1,3 fukoziltransferaza-4 glavni je enzim koji sudjeluje u stvaranju Lewis X antigena (LE^x) poznatog kao selektinski ligand i sijaliziranog Lewis antigena (sLE^x), odgovornih za sintezu liganda adhezijskih molekula P-, L- i E-selektina i P-selektin glikoprotein liganda. Te adhezijske molekule značajno utječu na prijanjanje neutrofila za endotel i mogle bi biti jedan od ključnih elemenata za razvoj nestabilnosti i vulnerabilnosti aterosklerotskog plaka na koronarnim arterijama. Do sada se znalo malo o ulozi genske ekspresije enzima odgovornih za sintezu adhezijskih molekula na leukocitima i endotelnim

stanicama. In-vitro studije promjena genske ekpresije FUT4 i FUT7 na makrofagima tijekom laboratorijski kontroliranog pretvaranja makrofaga u pjenušave stanice pokazale su sniženje genske ekspresije FUT 4 i FUT 7 tijekom tog procesa (114). S obzirom da je dokazano kako povećanje ekspresije selektinskih liganda na makrofagima tijekom njihove pretvorbe u pjenušave stanice dovodi do otpuštanja pjenušavih stanica iz aterosklerotskog plaka u cirkulaciju u svrhu stabilizacije plaka i usporavanja njegove progresije, sniženje ekspresije gena FUT 4 i FUT 7 moglo bi biti jedan od čimbenika brže progresije i nestabilnosti plaka. Naime, snižena ekspresija tih gena smanjila bi ekspresiju selektinskih liganda, usporila izbacivanje pjenušavih stanica iz plaka i tako dovela do njegove progresije i nestabilnosti. Navedene studije bile su učinjene prije razvoja metode lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu. Novije studije koje su koristile metodu lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu pokazale su da endotelne stanice izložene TNFα pokazuju povišenje genske ekspresije FUT4 što govori u prilog tome da upalni proces povećava proizvodnju LE^X antigena te tako dovodi do povećanje ekspresije selektina koji igraju ključnu ulogu u ekstravazaciji leukocita i upalnoj reakciji. Tako bi se smanjenje ekspresije moglo objasniti kao regulirajući mehanizam kontrole upalne reakcije i „kontrole štete“.

S obzirom da su bolesnici s akutnim koronarnim sindromom u ovom istraživanju imali u obje faze bolesti značajno nižu gensku ekspresiju FUT 4 u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu može se pretpostaviti kako je ta snižena genska ekspresija povezana sa sniženjem ekspresije selektinskih liganda na pjenušavim stanicama aterosklerotskog plaka i tako objašnjava sklonost tih bolesnika akutnom koronarnom sindromu. S druge strane, to je možda zaštitni mehanizam koji smanjuje ekspresiju adhezijskih molekula i tako ograničava upalni proces. S obzirom da su takve vrijednosti geneske ekspresije bile prisutne već u akutnoj fazi bolesti, te ostale niže i pri prelasku u kroničnu fazu, mjerenje genske ekspresije FUT4 u bolesnika s rizikom za akutni koronarni sindrom u budućnosti može imati dobru dijagnostičku i prognostičku vrijednost i predstavlja temelj za buduća istraživanja glikozilacije u aterosklerotskoj bolesti.

FUT 7 kodira za enzim α3-fukoziltransferaze-7, koji je glavni čimbenik u stvaranju sijaličnog Lewis X antigena (sLE^x) i njezina mRNA bila je najobilnije eksprimirana od svih analiziranih fukoziltransferaza. Genska ekspresija FUT 7 u akutnoj fazi bolesti nije se značajno razlikovala između dviju skupina u donosu na GAPDH, a u donosu na beta aktin pokazalo se kako postoji statistički značajna (iako slaba s P=0,022) niža ekspresija FUT 7 u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. Zanimljivo je međutim kako je u prosječnom

vremenskom razdoblju od 8 dana genska ekspresija FUT 7 značajno (za oko 50%) pala u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i postala značajno niža nego u kontrolnoj skupini i to u odnosu na oba referentna gena. In-vitro studije genske ekspresije FUT 7 pokazale su kako ekspresija tog gena značajno pada u makrofagima koji se transformiraju u pjenušave stanice, i poput FUT 4 utječe na stvaranje selektina uključenih u povećanje brzina „kotrljanja" leukocita po upalom aktiviranim stanicama endotela.

S obzirom na nedovoljno podataka o ulozi FUT 7 u aterosklerozi i akutnoj koronarnoj bolesti pokušano je nađenu značajnu promjenu ekspresije u bolesnika objasniti uzimanjem određenih lijekova tijekom liječenja bolesti. Naime, do sada je objavljeno više studija o utjecaju lijekova na gensku ekspresiju glikoziltransferaza i razinu produkata glikoziltransferaza u krvi. Tako je u velikoj „screening" studiji utjecaja protuupalnih lijekova i razina N-glikana u hrvatskoj populaciji nađeno kako su razine sLE^x niže u osoba koje uzimaju protuupalne lijekove, što se može objasniti utjecajem tih lijekova na smanjenje fukozilacije enzimom α3-fukoziltransferaza (115). U ovom istraživanju, u cjelokupnoj analiziranoj populaciji nađena je značajno niža genska ekspresija FUT 7 u osoba koje su trajno uzimale statine i acetilasalicilnu kiselinu. Bolesnici s akutnim koronarnim sindromom u akutnoj fazi imali su izrazito nisku zastupljenost navedenih lijekova u terapiji, koja je značajno porasla (do preko 75% za statine ido 100% za acetilsalicilnu kiselinu) do drugog uzorkovanja u kroničnoj fazi bolesti. Nakon učinjene usporedbe genskih ekspresija FUT 7 između osoba koje su uzimale navedene lijekove i onih koji nisu neovisno o prisutnosti akutnog koronarnog sindroma potvrđena je značajno niža ekspresija samo u slučaju statina.

Statini su lijekovi koji inhibiraju enzim 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A reduktazu u jetri i tako značajno utječu na produkciju i metabolizam lipoproteina, a o njihovom utjecaju na gensku ekspresiju enzima zaduženih za glikozilaciju za sada se ne zna gotovo ništa. Do sada je objavljeno više relevantnih studija koje su dokazale ulogu statina u regulaciji i ograničenju sustavnog i lokalnog upalnog odgovora (116), što bi se moglo povezati s nalazom i u ovom istraživanju. S obzirom da nema dostatnih podataka pomoću kojih bi se mogla povezati promjena genske ekspresije FUT 7 s prirodnim tijekom akutne koronarne bolesti iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako je dugotrajno uzimanje statina (duže od 7 dana) povezano sa smanjenjem genske ekspresije FUT 7 te tako najvjerojatnije dovodi do smanjenja stvaranja sLE^x i regulacije upalnog odgovora. Prema dosadašnjim saznanjima ovo je prva studija kojom je povezana dugotrajna terapija statinima s promjenom ekspresije gena uključenog u fukozilaciju i stvaranje selektinskog liganda koji je

vrlo značajan čimbenik u regulaciji upalnog odgovora u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. Tako bi se mogli objasniti rezultati kliničkih studija pozitivnog utjecaja visokih doza statina na ishod određenih upalnih bolesti i razvoj i ishod akutnog koronarnog sindroma. Nove in vitro i in vivo studije utjecaja statina na promjene genske ekspresije i razine produkata glikoziltransferaza, te cjelokupnog glikanskog repertoara stanica mogle bi dodatno razjasniti ulogu statina u upalnom odgovoru. Međutim, nije isključeno kako je u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom došlo do intrinzičkog smanjenja genske ekspresije FUT 7 u svrhu regulacije upalnog odgovora i ograničavanja upalnog procesa.

α3-fukoziltransferaza 5 (FUT 5)

Po slijedu u funkciji vrlo je slična FUT3 čija je razina genske ekspresije ovdje bila vrlo niska, te se zna da su to sve enzimi slabo ili neeksprimirani u hematopoetskim stanicama. FUT5 je u ovoj studiji nisko eksprimiran, te je bio najniže eskprimirani gen od svih analiziranih. Nije bilo značajnih razlika u razini genske ekspresije između bolesnika i kontrola iako su bolesnici imali više razine relativne ekspresije u odnosu na oba referentna gena. Do sada nema nikakvih podataka o ulozi FUT 5 u upalnom odgovoru ili aterosklerozi ili akutnoj koronarnoj bolesti.

U ovom istraživanju nađena je statistički značajna negativna korelacija relativne genske ekspresije FUT 5 i maksimalnih vrijednosti kardioselektivnih enzima i biomarkera. Također je nađeno kako su bolesnici s transmuralnim infarktom (STEMI) i značajno većom površinom nekrotičnog oštećenja srčanog mišića imali značajno nižu gensku ekspresiju FUT 5. Taj nalaz nije moguće komentirati u svjetlu drugih istraživanja jer se o ulozi FUT 5 vrlo malo zna. Poznato je da je povezana sa stvaranjem Lewis-a antigena (LE^a), a o njegovoj ulozi u oštećenju, cijeljenju ili ožiljavanju mišićnog tkiva nema podataka.

α1,6-fukoziltransferaza 8 (FUT 8)

Ekspresija FUT8 bila je relativno visoka u leukocitima bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i nije se značajno razlikovala od kontrola. Nije nađeno ni značajne promjene ekspresije FUT 8 između dva uzorkovanja u bolesnika, a nije nađeno ni značajnog

utjecaja najčešće administriranih lijekova na razine ekspresije tog gena. FUT 8 je zanimljiva među fukoziltransferazama jer je to jedini enzim u ljudi koji dodaje fukozu na početni GlcNAc, stvarajući tako razgranati N-glikan. α1,6-fukozilirani N-glikani često se nalaze u glikoproteinima te su osobito zastupljeni u moždanom tkivu, gdje je i utvrđena viša aktivnost FUT8 (117, 118).

FUT8 važna je za stvaranje razgranatih glikanskih struktura ključnih u regulaciji raznih bioloških funkcija, poput prijanjanja stanica i metastaziranja. Prvenstveno se radi o N-glikanima na adhezijskim molekulama integrinima i adherinima, koji igraju ključnu ulogu u interakcijama između stanica i između stanica i ECM (119). Iako u ovom istraživanju nije nađena značajnija razlika u ekspresiji FUT 8 između bolesnika s akutnom koronarnom bolesti i zdravih kontrola, u sličnim studijama genske ekspresije nađena je značajno smanjena ekspresija FUT 8 u bolesti povezanim sa stresom, poput posttraumatskog stresnog poremećaja (55).

Za utvrđivanje značaja genske ekspresije FUT8 potrebno je vjerojatno još istraživanja na većem uzorku s obzirom na njezinu evolucijsku konzerviranost i jedinstvenost (ne postoji drugi enzim za sržnu fukozilaciju) i manjak znanstvenih podataka o njezinoj ulozi.

α1,3-fukoziltransferaza 10 (FUT 10)

Osim ovog istraživanja do sada nema objavljenih studija o genskoj ekspresiji FUT 10 u humanim leukocitima u međunarodnoj literaturi. Fukoziltransferaza 10 evolucijski je najstarija među α-(1,3)-fukoziltransferazama, no relativno je nedavno otkrivena te su istraživanja i saznanja o fukoziltransferazi 10 vrlo oskudna (92).

U ovoj studiji dokazana je srednja razina ekspresije *FUT10* u leukocitima (Tablice 5.2.1. i 5.2.2.), što govori u prilog da je FUT10, nakon FUT7, glavna fukoziltransferaza koja sudjeluje u dodavanju Fuc na vanjski LN u leukocita. Razina ekspresije bila je nešto viša u bolesnika s skutnim koronarnim sindromom, ali nije se značajno razlikovala od ekspresije nađene u zdravih kontrola. Slično istraživanje o genskoj ekspresiji glikoziltransferaza u bolesnika s postraumtskim stresnim poremećajem, dosad neobjavljeno, utvrdilo je značajno sniženu ekspresiju FUT 10 u bolesnika. Pri analizi utjecaja lijekova na promjene ekspresije, nađeno je kako osobe koje su redovito uzimale benzodiazepine imaju značajno više razine genske ekspresije FUT 10. Takav nalaz trenutno nije moguće usporediti ni objasniti zbog

oskudnih znanstvenih podataka. Uloga i značaj promjena ekspresije FUT 10 na leukocitima ostaje i dalje predmet budućih istraživanja.

Zaključak o genskoj ekspresiji fukoziltransferaza

U usporedbi sa sijaliltransferazama, fukoziltransferaze slabije su genski eksprimirane u leukocitima. Prethodne studije utvrdile su da leukociti eksprimiraju 3 α1,3-fukoziltransferaze – FUT 4, FUT 7 i FUT 9; a da su FUT 4 i FUT 7 ubikvitarno eksprimirani u svim subpopulacijama leukocita, dok je FUT 9 karakterističan samo za neke subpopulacije, te je isključen iz analiza u ovom istraživanju. Rezultati ove studije potvrđuju snažnu ekspresiju FUT 7 i FUT 4. Iz dobivenih relativnih ekspresija fukozilacijskih enzima može se zaključiti da je za fukozilaciju unutrašnjeg LN prvenstveno zaslužna FUT 4, dok je glavnina fukozilacije vanjskog LN katalizirana FUT 7 te da je na svim leukocitima visoki izražaj sLe^x.

Važan nalaz je značajno snižena genska ekspresija FUT 4 u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom, koja je ostala konstantna i u kroničnoj fazi bolesti. S obzirom na rezultate in-vitro studija o utjecaju ekspresije FUT 4 na sintezu selektinskih liganda i na rezultate ovog istraživanja, FUT 4 mogla bi u budućnosti biti dodatni dijagnostički parametar u procjeni rizika za razvoj te bolesti, ali i glavni temelj za buduća istraživanja utjecaja genske ekspresije glikoziltransferaza i promjene ekspresije njihovih produkata na upalnu aktivaciju leukocita i endotelnih stanica koronarnih arterija.

FUT 7 nije bio različito eksprimiran između bolesnika i kontrola u akutnoj fazi, ali se tijekom trajanja i liječenja bolesti u leukocitima bolesnika ekspresija tog gena snizila i iznosila manje od 50% vrijednosti relativne ekspresije dobivene u kontrolnoj skupini. Iz dobivenih rezultata zaključeno je kako je ta promjena rezultat terapije statinima, koji tako vjerojatno reguliraju upalni odgovor, ali nije isključena ni važna protuupalna uloga acetilsalicilne kiseline, kao ni intrinzička regulacija upalnog odgovora.

Prema dosadašnjim saznanjima FUT 7 i FUT 10 imaju preklapajuću specifičnost te prvenstveno dodaju Fuc na vanjski LN. Pošto se čini da je FUT 7 glavna 'mijeloidna' α1,3-fukoziltransferaza, funkcija FUT 10 bi mogla biti fina regulacija takve fukozilacije ili značajniji fukozilacijski mehanizam u manjoj subpopulaciji stanica. U ovom istraživanju

ekspresija FUT 10 nije se značajno mijenjala tijekom bolesti, a nije bilo ni značajnih razlika između dvije ispitivane skupine. Povezanost FUT 7 i FUT 10 u aktivaciji i promociji upalnog procesa enditelnih stanica ostaje predmet budućih istraživanja.

Od preostalih α1,3-fukoziltransferaza eksprimiranim su se pokazale još i FUT 8 i FUT 5. Za FUT 8 nije nađeno značajnih razlika između skupina ni značajnih promjena ekspresije, te se čini kako ne igra važnu ulogu u akutnom koronarnom sindromu iako je važno napomenuti kao je njezina relativna razina ekspresije u odnosu na ostale bila visoka. Razina ekspresije FUT 5 bila je niska. Takva niska ekspresijska razina opisana je u literaturi, te ih nisu mogli dokazati *Northern blot* analizom, već isključivo RT-PCR studijama. Biološka funkcija FUT 5 i dalje je nepoznata te bi se moglo raditi o ektopičnim transkriptima, ili o vrlo specijaliziranim funkcijama u vrlo malom broju stanica, a dobiveni rezultat značajno snižene ekpresije FUT 5 u bolesnika s većom razinom oštećenja srčanog mišića mogao bi govoriti u prilog uključenosti tog enzima u procese kontrole oštećenja stanica i cijeljenja.

6.3. Genska ekspresija sijaliltransferaza

α-2,6-sijaliltransferaza 1 (ST6Gal1)

ST6Gal1 mRNA bila je najeksprimiranija od svih analiziranih glikoziltransferaza relativno prema oba referentna gena (Tablica 5.2.1.i 5.2.2.) što ukazuje na to da velika većina glikana koji nastaju u leukocitima ima na svojim krajevima lanaca sijalinsku kiselinu vezanu α-2,6 vezom. Također, relativna razina ekspresije bila je značajno niža u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom, i to samo u odnosu na beta aktin u prvom uzorkovanju, ali u drugom uzorkovanju ta je razlika bila oko 25% i bila je statistički značajna u odnosu na oba referentna gena. S obzirom da nije bilo značajnog pada razine ekspresije između 2 uzorkovanja može se zaključiti kako je relativna genska ekspresija ST6Gal1 značajno niža u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom neovisno o vremenu početka bolesti.

Produkt sijalizacije je Siaα2-6-Galβ1-4GlcNAc-R, a to je ujedno i ligand za lektin CD22 na B-limfocitima. ST6Gal1 je uključena u stvaranje ugljikohidrata stanične površine i razlikovnih antigena (HB-6, CD75, i CD76) na leukocitima, a posebice sijalizacije ključne adhezijske molekule - integrina α1. Nakon izlaganja upalnom podražaju cirkulirajući monociti postaju aktivirani i počinju preobrazbu u makrofage, a kao dio tog procesa vrlo je bitna pojava

pojačane adhezije, koja olakšava dijapedezu. Pojačana adhezija dijelom je uzrokovana pojačanom aktivacijom α4β1 integrina, koji se spajaju s endotelnim adhezijskom molekulom 1 (VCAM-1) na endotelu, a taj je proces ključan za ekstravazaciju monocita i progresiju i destabilizaciju aterosklerotskog plaka. Mehanizmi koji uzrokuju pojačanu aktivaciju α4β1 integrina su još nerazjašnjeni. Integrini su regulirani preko više mehanizama – konformacijskom promjenom pod utjecajem signalnih molekula, fosforilacijom, preoteolitičkim cijepanjem i glikozilacijom (100). ST6Gal1 bitan je enzim u sijalizaciji α1 integrina, a ekspresija slabo sijaliziranih α1 integrina povezana je sa znatno pojačanim prijanjanjem stanica na fibronektin (100). Različite su studije u laboratorijskim uvjetima pokazale da de-sijalizacija glikoproteina stanične površine pojačava prijanjanje integrina i na fibronektin i na VCAM. Svi dosadašnji rezultati upućuju na to da sijalinske kiseline direktno reguliraju funkciju integrina, a sami mehanizmi kontrole β 1,6-sijalizacije su slabo poznati (100, 120).

U ovom je istraživanju utvrđena za oko 25% niža ekspresija *ST6Gal1* u bolesnika u usporedbi sa zdravim kontrolama (Tablica 4.2), što je prema današnjim saznanjima prvi objavljeni podatak o značajno nižoj ekpresiji tog gena u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i aterosklerotskom bolesti srca uopće. S obzirom na dokaze kako smanjenje sijalizacije intergina uzrokuje pojačano prijanjanje upalnih stanica za fibronektin ovaj nalaz značajan je za daljnja istraživanja uloge ST6Gal 1 u patofiziologiji ateroskleroze i destabilizacije aterosklerotskog plaka. Također, sukladno ovim rezultatima ST6Gal 1 poput FUT 4 postaje zanimljiv i kao dijagnostički parametar za rano otkrivanje bolesnika s rizikom za razvoj akutnog koronarnog sindroma ili progresije ateroskleroze u budućnosti.

GM3 sintaza (ST3Gal 5)

Analiza relativne ekspresija mRNA GM3 sintaze u leukocitima u ovom istraživanju zanimljiva je stoga što je to glikolipidna glikoziltransferaza, a njezina ekspresija bila je srednje razine. Takva razina ekspresije u odnosu na uobičajene referentne gene već je objavljena u studijama na endotelnim stanicama tretiranim s TNFα. Naime, tretiranjem endotelnih stanica s TNFα povećava se ekspresija globo- i laktoserija glikolipida što dovodi do posljedičnog smanjenja genske ekspresije gangliozidnih glikolipidnih glikoziltransferaza, poput GM3. Podataka o genskoj ekspresiji GM3 na humanim leukocitima u in-vitro ili in-vivo

modelima ateroskleroze nema mnogo, a uglavnom su to bile analize ekspresija na leukocitima u malignim hematološkim bolestima. Bolesnici s akutnim koronarnim sindromom u ovom istraživanju imali su značajno niže vrijednosti genske ekspresije GM3, neovisno o fazi bolesti u kojoj je uzet uzorak za analizu, što odgovara rezultatima gore spomenutih studija ekspresije glikoziltransferaza na endotelnim stanicama u modelima upale.

Poznate su važne uloge gangliozida u normalnoj i abnormalnoj stanici, a neke od njih su indukcija diferencijacije stanica, modulacija proliferacije stanica, prijenos signala i stanično prijanjanje preko integrina. Tako je u bolesnika s dokazanom točkastom mutacijom u genu za gangliozid GM3 sintazu u homozigotnom obliku utvrđen simptomatični epileptički sindrom dječje dobi, a u kulturi fibroblasta je utvrđeno 93% smanjenje sadržaja gangliozida GM3, bez kompenzirane aktivacije alternativnih putova sinteze GM3 (121).

Danas je puno podataka koji upućuju da su neki učinci gangliozidi posljedica njihove interakcije s proteinima u prijenosu signala kroz membranske mikrodomene. Za glikosfingolipide dokazano je udruživanje u posebnu podvrstu mikrodomena koje ne sadrže kolesterol, a nazvane su glikosignalne domene ili glikosinapse. Te domene čine integrini, transmembranski proteini tetrespanini (proteolipid/tetraspanin CD9) i gangliozidi (122), a pokazalo se da je pokretljivost stanica jako ovisna o organizaciji i funkciji takvih mikrodomena. U studijama s tumorskim stanicama utvrđeno je da visoke razine GM3 smanjuju migracijsku sposobnost i invazivnost tumorskih stanica (122). Ukoliko se taj podatak ekstrapolira na stanice uključene u razvoj i progresiju ateroskleroze, može se pretpostaviti kako snižena ekspresija povećava migracijsku sposobnost leukocita tijekom faze nakupljanja, kotrljanja i adhezije, te tako modulira upalni odgovor. Potvrda snižene genske ekspresije GM3u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom, neovisno o fazi bolesti, bila bi tako važan dijagnostički i prognostički pokazatelj, slično genskoj ekspresiji FUT4 i FUT 7.

Također, ovdje je važno spomenuti i rezultate istraživanja skupine ruskih znanstvenika koji su u seriji radova potvrdili značajno povećanu razinu GM3 sintaze kao glavnog gangliozida u aterosklerotski izmijenjenoj stijenci aorte u uposredni s normalnom aortom. Oni su uspjeli dokazati kako je ta povećana razina GM3 sintaze rezultat pojačane proizvodnje tog enzima od strane aktiviranih stanica monofagno-makrocitnog sustava (123). Podataka o genskoj ekspresiji GM3 u takvom eksperimentacijskom modelu nema, ali moguće je pretpostaviti da je nalaz snižene ekspresije mRNA GM3 sintaze povezan s nalazom snižene ekspresije mRNA glikoziltransferaza uključenih u regulaciju adhezije stanica u upalnom odogovoru, te tako dovodi do povećanog zadržavanja upalom aktiviranih stanica u plaku, koje

dovode do destabilizacije plaka i povećane sklonosti za njegovu rupturu i nastanak oštećenja i tromboze. Svakako, takva postavka je samo teoretska i vrijedilo bi je ispitati na in-vitro i in-vivo modelima progresivne ateroskleroze i nestabilnog aterosklerotskog plaka.

ST6GalNac 1

mRNA ove sijaliltransferaze koja sudjeluje u O-glikozilaciji bila je nisko eksprimirana, bez značajnih razlika u ekspresiji između bolesnika i kontrolne skupine. Dosadašnja istraživanja pokazala su da je ovo nisko eksprimirana glikoziltransferaza i to samo u tkivima žlijezda s egzokrinim lučenjem (slinovnice, mliječne žlijezde), a dokaza o njezinoj ulozi u upalnom procesu ili nastanku ili promociji ateroskleroze nema.

ST6GalNac 2

U ovom istraživanju nađena je srednja razina relativne genske ekspresije ove sijaliltransferaze čija je uloga i zatupljenost gotovo identična ST6GalNac1. U bolesnika s akutnim koronarnim sindromom ta je vrijednost bila značajno viša nego u kontrolne skupine, ali samo u odnosu na jedan referentni gen (GAPDH). Inače je to bila jedina analizirana sijaliltransferaza čije su vrijednosti bile veće među bolesnicima nego u kontrolnoj skupini. U bolesnika je u drugom vađenju krvi u kroničnoj fazi bolesti došlo do značajnog pada te vrijednosti, i to u odnosu na oba refrentna gena, tako da između vrijednosti dobivenih u bolesnika drugim uzorkovanjem i onih u kontrolnoj skupini nije bilo značajnih razlika. Teško je objasniti takav značajan pad ekpresije tijekom liječenja bolesti jer se o njezinoj ulozi malo zna, a nije nađeno ni značajnih razlika u ekspresiji ove sijaliltrasnferaze s obzirom na uzimanje redovito administriranih lijekova u ovom istraživanju. Također nije poznata uloga ove sijaliltransferaze u upalnom odgovoru ili razvoju ateroskleroze, te njezin mogući značaj u toj bolesti tek treba biti razjašnjen.

ST6GalNac 3

ST6GalNac 3 zanimljiva je za ovo istraživanje jer je to enzim koji katalizira pretvorbu gangliozida GM1b u GD1α prvenstveno na glikolipidima. Njezina je aktivnost izmjerena u tkivu mišjeg mozga, ali i srca. Nema mnogo podataka o njezinoj genskoj ekspresiji u ljudskim leukocitima, ali s obzirom na utvrđenu srednju razinu ekspresije u ovom istraživanju čini se da u leukocitima postoji određena količina GD1a, iako se ne zna koje je značenje tog gangliozida O-ganglio serije u leukocitima. Postoji mogućnost da ona sudjeluje i u sijalizaciji O-glikana, omogućavajući finu kontrolu tkivno-specifične sijalizacije (68).

Nije bilo značajnih razlika u genskoj ekspresiji ST6GalNac 3 između bolesnika u akutnoj fazi (prvo vađenje krvi) i kontrolne skupine, ali je zabilježen značajan pad njezine ekspresije u bolesnika tijekom liječenja. Posljedično, relativne razine ekspresije mRNA bile su značajno niže u bolesnika u kroničnoj fazi nego u kontrolnoj skupini, i to za oba referentna gena. Ovdje je ponovno važan podatak o značajnom povećanju broja bolesnika koji su liječeni statinima između dva uzorkovanja, a i podanaliza utjecaja uzimanja statina na relativne ekspresije ovog gena pokazala je značajno niže vrijednosti relativne ekspresije u osoba koje su uzimale statine. Moguće je da statini na taj način utječu na finu kontrolu sijalizacije za koju kodira ovaj gen, što bi bilo zanimljivo istražiti u budućim studijama.

ST6GalNac 4

ST6GalNac 4 bio je srednje do visoko eksprimiran u leukocitima ispitanika, uz gotovo 35% manju razinu genske ekspresije u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u usporedbi s ispitanicima kontrolne skupine. Ta razlika bila je statistički značajna u odnosu na oba referentna gena, neovisno o akutnoj ili kroničnoj fazi bolesti. Nema mnogo podataka o promjenama ekspresije mRNA ovog enzima na leukocitima, ali opisan je porast ekspresije u aktiviranim CD8 limfocitima. Dokazano je da ovaj enzim također fino kontrolira sijalizaciju te tako utječe na staničnu aktivaciju koja je važan čimbenik u upali. Nalaz značajno snižene ekspresije u bolesnika ne može se trenutno objasniti zbog nedovoljnog broja relevantnih podataka u literaturi. Također je nepoznato kako lijekovi utječu na gensku ekspresiju ovog enzima. S obzirom kako je značajna razlika nađena na početku bolesti, i nije se kasnije

značajno mijenjala, ekspresija ovog gena također ima potencijalnu dijagnostičku vrijednost u rano otkrivanju bolesnika s rizikom za razvoj akutnog koronarnog sindroma.

Zaključak o genskoj ekspresiji sijaliltransferaza

Sijaliltransferaze imaju mnogo veći spektar djelovanja jer dodaju sijalinsku kiselinu na glikoproteine, N- i O-glikane i oligosaharide, a iz dobivenih rezultata vidljiva je i izraženija njihova mRNA ekspresija u usporedbi s fukoziltransferazama, što je potvrđeno i u ranijim istraživanjima. Najeksprimiranija bila je .α-2,6-sijaliltransferaza ST6Gal1 koja dodaje sijaličnu kiselinu na krajeve N-glikana, tako da se može pretpostaviti kako velika većina N-glikana na leukocitima ima slijed Siaα2-6-Gal na kraju glikanske strukture. Već je opisana njihova važna uloga u interakcijama između stanica, a visoka genska ekspresija tog enzima na leukocitima ukazuje na njegovu vjerojatno važnu ulogu u početku i poticanju upalne reakcije na endotelu arterija. Bolesnici s akutnim koronarnim sindromom imali su značajno nižu gensku ekspresiju ST6Gal 1 što bi moglo upućivati na sniženu sijalizaciju α1 integrina koja posljedično dovodi do pojačanog prijanjanja upalnih stanica za fibronektin. Fibronektin je glikoprotein ekstracelularnog matriksa koji igra značajnu ulogu u adheziji, migraciji, ali i diferencijaciji stanica, te bi ovaj nalaz mogao biti dobar temelj za daljnja istraživanja uloge promjene sijalizacije u nastanku i progresiji ateroskleroze.

Srednja razina ekspresije mRNA na leukocitima ispitanika u ovom istraživanju nađena je i u slučaju GM3 sintaze. GM3 sintaza posebno je zanimljiva jer je to glavna gangliozidna glikolipidna glikoziltransferaza čije su uloge u životu stanice mnogostruke. Ona također sudjeluje u regulaciji stanične signalizacije, što dodatno učvršćuje temelje pretpostavke kako su u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom promjene genske ekspresije glikoziltransferaza uključenih u procese stanične signalizacije zanimljiv predmet budućih istraživanja koja bi mogla dodatno rasvijetliti procese nastanka, progresije i destabilizacije aterosklerotskog plaka. Ukoliko se međutim ovi rezultati stave u kontekst istraživanja koja su potvrdila povećanu ekpresiju produkta GM3 sintaze u aterosklerotskim plakovima može se zaključiti kako su potrebna dodatna istraživanja u svrhu rasvjetljavanja odnosa genske ekspresije nekog enzima na periferiji i analize ekspresije njegovog produkta na mjestu od posebnog interesa (poput aterosklerozom zahvaćenog dijela arterije).

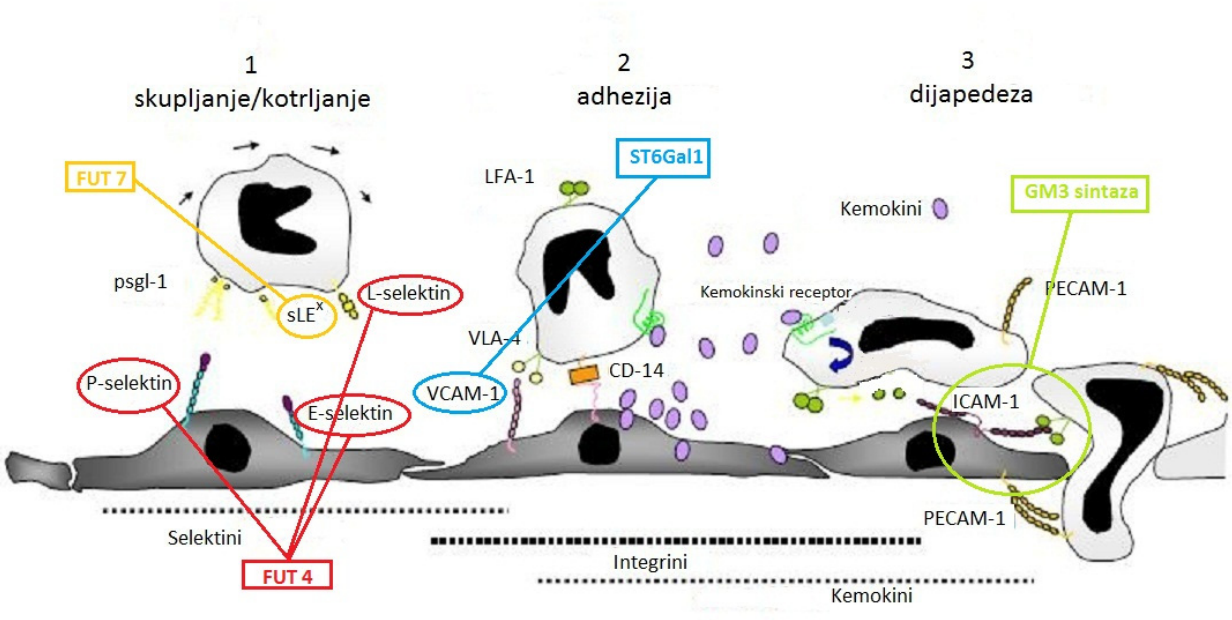
Osim stanične signalizacije i poticanja migracije i adhezije stanica, analiza ekspresije sijaliltrasnferaza koje su povezivane s promjenama aktivacije leukocita pokazala je također značajne razlike između bolesnika i kontrolne skupine. Tako je mRNA ekspresije ST6GalNac 4 bila značajno niža u bolesnika u usporedbi s kontrolnom skupinom, što dodatno učvršćuje teoriju da posttranslacijska modifikacija proteina i lipida igra važnu ulogu u upalnim procesima ateroskleroze.

6.4. Ograničenja istraživanja i prijedlozi budućih istraživanja

Kompleksnost postupka i visoka cijena analize uzoraka u svrhu dobivanja što preciznijih vrijednosti relativne ekpresije utjecala je na veličinu uzorka. Veličina uzorka bila je limitirana i strogim isključujućim kriterijima koji su morali biti postavljeni relativno rigorozno zbog mnoštva stanja koja mogu promijeniti enzimatske glikozilacijske procese. Međutim, tako je dobivena uniformirana skupina ispitanika čiji su rezultati vjerodostojni i mogu se međusobno uspoređivati.

Analizirana je genska ekspresija glikoziltransferaza u perifernoj krvi, što znači da je to velikom većinom genska ekspresija na leukocitima. Leukociti su imunološke stanice s malim vijekom trajanja u cirkulirajućoj krvi jer većinom prelaze u tkiva gdje imaju različite uloge. Teško je pretpostaviti kako se trenutno dobivene razine genske ekspresije određenih enzima na periferiji odražavaju na ulogu tih enzima u tkivima. Zbog toga prethodno navedene zaključke treba prihvatiti uz opreznu pretpostavku kako bi promjena ekspresije u imunim stanicama u krvi mogla biti dobar indirektan odraz promijenjene ekspresije glikoziltransferaza i u drugim tkivima poput endotela.

Vrijedan nalaz su značajne razlike između bolesnika i kontrolne skupine u genskoj ekspresiji glikoziltransferaza uključenih u važne procese stanične signalizacije, migracije i adhezije (slika 6.1.). Ti geni mogli bi biti temelji budućih istraživanja o ulozi enzimatske glikozilacije lipida i proteina u nastanku, progresiji i mogućoj inhibiciji ateroskleroze.



Slika 6.1. Shematski prikaz razvoja ateroskleroze i moguće uloge analiziranih glikoziltransferaza za koje su dobivene značajne razlike između skupina (preuzeto i modificirano od EAJ van Wanrooij, 2007.).

Analizirane su razine ekspresije u bolesnika u akutnoj fazi unutar 24 sata od pojave tegoba i pri ulasku u kroničnu fazu, prosječno 8 dana nakon početka bolesti. Bilo bi zanimljivo učiniti dodatnu analizu ekspresija glikoziltransferaza u bolesnika s preboljelim akutnim koronarnim sindromom i nakon nekoliko godina od akutnog incidenta, te usporediti vrijednosti između bolesnika koji su u međuvremenu ponovno bili liječeni zbog iste bolesti i onih koji su to cijelo vrijeme ostali stabilni u kroničnoj fazi.

U budućnosti, bilo bi zanimljivo proširiti analizu genske ekspresije u akutnoj koronarnoj bolesti na više glikoziltransferaza u svrhu što preciznijeg određivanja uloge glikoziliacije u tom patološkom procesu. Vrijedilo bi analizirati promjene ekspresije glikoziltransferaza i u bolesnika sa šećernom bolesti i pokušati pokazati kako šećerna bolest mijenja profil enzimatske glikozilacije, kao što je već opisano u nekim istraživanjima (124, 125). Također bi bilo vrijedno usporediti razine genske ekspresije glikoziltransferaza koje su se pokazale potenicijalno vrijednim (FUT4, FUT7, ST6Gal1, GM3) između bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (nestabilna aterosklerotska bolest) i bolesnika sa dokazanom stabilnom aterosklerotskom bolesti srca koji nikad nisu bili liječeni zbog akutnog koronarnog zbivanja. Od velikog bi značaja bilo i usporedno istraživanje ekspresije mRNA glikoziltransferaza u perifernoj krvi i sastava glikana na površini aterosklerozom zahvaćenih

arterija bilo post-mortem analizom, ili čak analizom trombotskog sadržaja i dijelova plaka dobivenih interventnim liječenjem akutnog infarkta miokarda manualnom aspiracijom specijalnim intravaskularnim kateterom.

7. ZAKLJUČAK

Akutni koronarni sindrom bolest je koja nastaje destabilizacijom i rupturom aterosklerotskog plaka koronarne arterije u čemu glavnu ulogu igraju upalni mehanizmi koji utječu na staničnu migraciju, komunikaciju, aktivaciju i proizvodnju. Glavnina stanične komunikacije zbiva se na membrani čija je površina pokrivena oligosaharidnim strukturama koje su vezane za membranske proteine i lipide u obliku glikoproteina i glikolipida. Glikozilacija je jedina modifikacija proteina i lipida koja može rezultirati značajnim strukturalnim promjenama proteina, a zna se da ima važnu ulogu u integraciji različitih funkcija u višim organizmima.

Ovo istraživanje provedeno je u svrhu mjerenja genske ekspresije relevantnih N-fukoziltransferaza i sijaliltransferaza u leukocitima periferne krvi bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. Vrijednosti ekspresije izmjerene su relativno u odnosu na dva referentna endogena gena – GAPDH i beta aktin. Genetički pristup analizi ekspresije glikoziltransferaza odabran je zbog toga što je dokazano kako ekspresije gena povezanih s glikozilacijom najznačajnije utječu na ugljikohidratne modifikacije membrane stanica.

Sedam je glikoziltransferaza zbog preniske ekspresije isključeno iz analize, a za preostale su dobivene vrijednosti genske ekspresije i uspoređene između skupina, te ovisno o fazi akutnog koronarnog sindroma, obliku akutnog koronarnog sindroma, stupnju oštećenja srčanog mišića i statusa uzimanja lijekova.

Analizom ekspresije fukoziltransferaza među bolesnicima s akutnim koronarnim sindromom utvrđena je značajno niža vrijednost ekspresije FUT 4 u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. Vrijednost ekspresije FUT 4 nije se značajno mijenjala tijekom liječenja bolesti. FUT 4 kodira za enzim koji igra glavnu ulogu u sintezi selektina P, E i L. Također, nađeno je značajno sniženje ekspresije FUT 7 između dva mjerenja u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom, što je objašnjeno značajno visokim postotkom terapije statinima među bolesnicima. Do sada nije objavljena studija utjecaja statina na gensku ekspresiju enzima uključenih u ugljikohidratne modifikacije stanica.

Analiza ekspresije sijaliltransferaza pokazala je kako su one općenito bile više eksprimirane od fukoziltransferaza. Nađena je značajno niža ekspresija ST6Gal 1 koja dodaje sijaličnu kiselinu na α1intergin. Već je ranije dokazano kako smanjena sijalizacija integrina dovodi do pojačane adhezije upalnih stanica za endotel. Nađena je i značajno niža ekspresija

gangliozidne glikoziltransferaze GM 3 sintaze u bolesnika, što ostaje predmetom budućih istraživanja s obzirom na širok spektar djelovanja tog enzima. Sijaliltransferaze ST6GalNac 3 i ST6GalNac 4 također su bile značajno niže eksprimirane u bolesnika, a njihovu ulogu u nastanku i progresiji ateroskleroze potrebno je još razjasniti.

Ovim istraživanjem dobiven je uvid u ekspresiju mRNA relevantnih glikoziltransferaza u akutnom koronarnom sindromu, ali i u značajne promjene ekspresije određenih glikoziltransferaza u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. Zanimljiva je činjenica kako je promijenjena ekspresija tih gena nađena na samom početku bolesti, i prije nastanka infarkta miokarda, što dodatno učvršćuje vezu između glikoziltransferaza i akutnog koronarnog sindroma, čije biomarkere tek trebamo otkriti. Posebno je zanimljivo što su značajne promjene nađene upravo među onim genima koji kodiraju za proizvodnju supstrata ključnih u staničnoj signalizaciji i promociji upale koja igra jednu od glavnih uloga u patofiziologiji ateroskleroze. Ovo je istraživanje temelj za buduće studije uloge promjena ugljikohidratnog repertoara stanice u aterosklerozi i akutnoj koronarnoj bolesti koje bi mogle proširiti nove dijagnostičke, prognostičke, a možda čak i terapijske vidike.

Glikozilacija predstavlja slatku tajnu stanične signalizacije, aktivacije i proizvodnje, a svakim novim istraživanjem promjena genske ekspresije ili glikanske ekspresije u bolestima koje danas prednjače u morbiditetu i mortalitetu bliži smo otkrivanju znanja koja bi nam mogla pomoći u njihovom ranom otkrivanju, praćenju i liječenju. Ostaje za istražiti jesu li ti poremećaj glikozilacije trenutačna posljedica nekog stresnog događaja ili druge nokse koji se vremenom mijenjaju ili postoje određena stanja koja trajno mijenjaju ugljikohidratni repertoar stanica i tako nam omogućavaju rano prepoznavanje osoba sklonih određenom patofiziološkom procesu. Na nama je da utvrdimo na koji način najbolje iskoristiti znanja o toj slatkoj tajni višestaničnog života kako bi naš život bio duži i slađi.

8. SAŽETAK

Ekspresija glikoziltransferaza u leukocitima bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

Uvod i cilj istraživanja

Akutni koronarni sindrom bolest je koja nastaje destabilizacijom i rupturom aterosklerotskog plaka epikardijalne koronarne arterije u čemu glavnu ulogu igraju mehanizmi koji utječu na staničnu signalizaciju i proizvodnju čimbenika promocije upale. Glavnina stanične komunikacije zbiva se na membrani čija je površina pokrivena oligosaharidnim strukturama koje su vezane za membranske proteine i lipide u obliku glikoproteina i glikolipida. Glikozilacija je jedina modifikacija proteina i lipida koja može rezultirati značajnim strukturalnim promjenama proteina, a zna se da ima važnu ulogu u integraciji različitih funkcija u višim organizmima. Cilj istraživanja bio je odrediti gensku ekspresiju glikoziltransferaza u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i usporediti je s kontrolnom skupinom kod koje je isključena koronarna bolest.

Ispitanici i metode

U istraživanje je uključeno 52 bolesnika s akutnim koronarnim sindromom i 32 ispitanika u kontrolnoj skupini. Bolesnicima su izmjerene genske ekspresije 8 fukoziltransferaza i 10 sijaliltransferaza u dva navrata: u akutnoj fazi unutar 24 sata od početka bolesti i u kroničnoj fazi prosječno 8 dana nakon početka bolesti. Nakon obrnutog prepisivanja RNA u DNA, PCR u stvarnom vremenu učinjena je prema SYBR Green protokolu, a za analizu relativne ekspresije kao referentni geni korišteni su β-actin i GAPDH. Za statističku analizu upotrijebljen je Mann-Whitney test, Wilxocon signed rank test, Spearmanov test korelacije i chi kvadrat test. Razina značajnosti P podešena je na 0.05.

Rezultati

Nađena je značajno niža relativna ekspresija FUT 4 u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u odnosu na oba referentna gena ($P<0,001$ za GAPDH i $P<0,05$ za beta aktin). Ta značajna razlika očitovala se i u drugom uzorkovanju u bolesnika. Nije bilo značajnih razlika u ekspresiji FUT 7 između bolesnika u akutnoj fazi i kontrola. Međutim zbog gotovo 50% sniženja ekspresije FUT 7 u bolesnika u drugom uzorkovanju ta je ekspresija bila značajno

niža u bolesnika u kroničnoj fazi u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P<0,001$ za oba referentna gena). Taj učinak je pripisan terapiji statinima, s obzirom da je nađena značajno niža ekpresija FUT 7 u osoba koje su uzimale statine neovisno o prisutnosti akutnog koronarnog sindroma. Ekspresije ST6Gal1, GM3 sintaze i ST6GalNac 4 bile su značajno niže u bolesnika u oba vremena uzorkovanja i to za oba referentna gena ($P<0,05$, $P<0,001$ i $P<0,05$, tim redom). Nađena je značajno niža ekspresija ST6GalNac3 u bolesnika u drugom uzorkovanju, što je također pripisano značajno većoj zastupljenosti terapije statinima među bolesnicima.

Zaključak

Nađene su značajne razlike u genskoj ekspresiji glikoziltransferaza zaduženih za sintezu lektina, sijaliziranog antigena Lewis X i gangliozida, te sijalizaciju integrina. Sve te strukture imaju dokazano važnu ulogu u začetku, poticanju i kontroli upalne reakcije koja je prema dosadašnjim istraživanjima temelj za razvoj i progresiju ateroskleroze, te su zanimljiv predmet budućih istraživanja.

Ključne riječi: glikozilacija, glikoziltransferaze, ekspresija mRNA, ateroskleroza, akutni koronarni sindrom.

9. SUMMARY

Expression of glycosyltransferases in leukocytes of patients with acute coronary syndrome

Irzal Hadžibegović

Dissertation, 2012.

Background and aim

Acute coronary syndrome (ACS) is caused by destabilization and rupture of atherosclerotic plaque in the epicardial coronary artery. Mechanisms that affect cell signaling and production of factors promoting inflammation play the main role in that process. The majority of cellular communication takes place on the membrane whose surface is covered with oligosaccharide structures that are related to membrane proteins and lipids in the form of glycoproteins and glycolipids. Glycosylation is the only modification of proteins and lipid which can result in significant structural changes in the protein, and it is known to play an important role in the integration of different functions in higher organisms. The aim of this study was to determine the genetic expression of glycosyltransferases in patients with acute coronary syndrome and compare it with a control group of subjects that are proven to be coronary disease free.

Subjects and Methods

The study included 52 patients with acute coronary syndrome and 32 subjects in the control group. Glycosyltransferases genetic expression was measured in patients with ACS on two occasions: in the acute phase within 24 hours of acute onset of chest pain, and in chronic phase (average of 8 days after onset of illness). After reverse transcription of RNA into DNA, real-time PCR was performed by SYBR Green protocol, and relative expression was measured. Reference genes used for relative expression measurement were β-actin and GAPDH. Statistical analysis was done using Mann-Whitney test, Wilxocon signed rank test, Spearman correlation test and chi square test. The level of significance was set to $P<0.05$.

Results

There was a significantly lower relative expression of FUT 4 in patients with ACS in relation to both reference genes ($P < 0.001$ for GAPDH and $P < 0.05$ for beta-actin). This significant difference was also reflected in the second sampling in patients with ACS. There was no significant difference in FUT 7 expression between two groups in the acute phase. However, due to an almost 50% reduction in the expression of FUT 7 in patients with ACS in the second sampling, FUT7 expression in the second sampling was significantly lower when compared with the control group ($P < 0.001$ for both reference genes). This effect was attributed to statin therapy, as significant downregulation of FUT 7 was found in subjects taking statins irrespective of the presence of acute coronary syndrome. ST6Gal1, GM3 synthase and ST6GalNac 4 were significantly downregulated in patients with ACS in both stages of disease ($P < 0.05$, $P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively). There was a significantly lower expression ST6GalNac3 in ACS patients in the second sampling, which was also attributed to a significantly higher prevalence of statin therapy.

Conclusion

There were significant differences in gene expression of glycosyltransferases responsible for the synthesis of lectins, syalizated Lewis X antigen, and ganglioside and for integrins syalization. All these structures play an important role in the promotion and control of inflammatory response, which is important in the development and progression of atherosclerosis. More basic and clinical studies on glycosyltransferases and glycosilation in the pathophysiology of the ACS are mandatory.

Keywords: glycosylation, glycosyltransferases, mRNA expression, atherosclerosis, acute coronary syndrome.

10. LITERATURA

1. Lee RT, Lauc G, Lee YC. Glycoproteomics: protein modifications for versatile functions. EMBO Rep. 2005;6:1018-22.

2. Varki A, editor. Essentials of glycobiology 2nd edition. (USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

3. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. Biochim Biophys Acta. 1999;1473:4-8.

4. Lauc G. Sweet secret of multicellular life. Biochim Biophys Acta. 2006;1760:525-6.

5. Fukuda M, Bierhuizen MFA, Nakayama J. Expression cloning of glycosyltransferases. Glycobiology. 1996;6:683-9.

6. Anumula KR, Dhume ST. High resolution and high sensitivity methods for oligosaccharide mapping and characterisations by normal phase liquid chromatography following derivatisation with highly fluorescent anthranilic acid. Glycobiology. 1998;8:685-94.

7. Garcia-Vallejo JJ, Van Dijk W, Van Het Hof B, Van Die I, Gringhuis SI. Tumor Necrosis Factor-α up-regulates the expression of β1,4-galactosyltranferase I in primary human endothelial cells by mRNA stabilization. J Biol Chem. 2005;280:12676-82.

8. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell. 1994;76:301-14.

9. Lowe JB. Selectin ligands, leukcyte traficking, and fucosyltransferase genes. Kidney Int. 1997;51:1418-26.

10. Garcia-Vallejo JJ, Van Dijk W, Van Het Hof B, Van Die I, Engelse MA, Van Hinsbergh VW, Gringhuis SI. Activation of human endothelial cells by Tumor Necrosis Factor-α results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. J Cell Physiol. 2006;206:203-10.

11. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Eng J Med. 1999;340:115-26.

12. Murtagh BM, Anderson HV. Inflammation and atherosclerosis in acute coronary syndrome. J Invasive Cardiol. 2004;377-84.

13. Bisoendial RJ, Kastelein JJ, Stroes ES. C-reactive protein and atherogenesis: from fatty streak to clinical event. Atherosclerosis. 2007;195:e10-8.

14. Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. Diabetes. 2008;57:2461-9.

15. Dong ZM, Wagner DD. Leukocyte-endothelium adhesion molecules in atherosclerosis. J Lab Clin Med. 1998;132:369-75.

16. de Nigris F, Lerman LO, Ignarro SW et al. Beneficial effects of antioxidants and L-arginine on oxidation-sensitive gene expression and endothelial NO synthase activity at sites of disturbed shear stress. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:1420-5.

17. Cullen P, Mohr S, Brennhausen B, Cignarella A, Assmann G. Downregulation of the selectin ligand-producing fucosyltransferases Fuc-TIV and Fuc-TVII during foam cell formation in monocyte-derived macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17:1591-8.

18. EAJ van Wanrooij. Novel experimental therapies for atherosclerosis – a genomics approach. Dissertation. Leiden University, Leiden, NL 2007.

19. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. Prog Cardiovasc Dis. 2002;44:349-56.

20. Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijnens AP et al. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. J Am Coll Cardiol. 2009;53:1517-27.

21. Panizo S, Cardus A, Encinas M et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. Circ Res. 2009;104:1041-8.

22. Mowbray AL. The role of peroxiredoxins as mechanosensitive antioxidants in endothelial cells. Dissertation. Georgia Institute of Technology, USA. 2008.

23. Wassermann EJ, Shipley NM. Atherothrombosis in acute coronary syndromes: mechanisms, markers, and mediators of vulnerability. Mt Sinai J Med. 2006;73:431-9.

24. Lindhal B, Toss H, Seigbahn A, et al. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC study group. N Eng J Med. 2000;343:1139-47.

25. Task Force Members. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 2012;33:2569-619.

26. The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). ESC Guidelines for management of ACS in patients presenting without persistent ST-segment elevation. Eur Heart J 2011;32:2999-3054.

27. Björkbacka H, Lavant EH, Fredrikson GN et al. Weak associations between human leucocyte antigen genotype and acute myocardial infarction. J Intern Med. 2010;268:50-8.

28. Lindberg G, Eklund GA, Gullberg B, Rastam L. Serum sialic acid and cardiovascular mortality. BMJ. 1991;302:143-6.

29. Homeister JW, Daugherty A, Lowe JB. α(1,3)Fucosyltransferases FucT-IV and FucT-VII control susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:1897-1903.

30. Homeister JW, Thall AD, Petryniak B, Maly P, Rogers CE, Smith PL, Kelly RJ, Garsten KM, Askari SW, Cheng G, Smithson G, Marks RM, Misra AK, Hindsgaul O, van Andrian SW, Lowe JB. The α(1,3)Fucosyltransferases FucT-IV and FucT-VII exert collaborative control over selectin-dependent leukocyte reqruitment and lymphoctye homing. Immunity. 2001;15:115-26.

31. Maly P, Thall AD, Petryniak B, Rogers CE, Smith PL, Marks RM, Kelly RJ, Garsten KM, Cheng G, Saunders TL, Camper SA, Camphausen RT, Sullivan FX, Isogai Y, Hindsgaul O, van Andrian SW, Lowe JB. The α(1,3)Fucosyltransferases FucT-IV and FucT-VII controls leukocyte traficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. Cell. 1996;86:643-53.

32. Martinez M, Joffraud M, Giraud S, Baisse B, Bernimoulin MP, Schapira M, Spertini O. Regulation of PSGL-1 interactions with L-selectin, P-selectin, and E-selectin: role of human fucosyltransferase-IV and VII. J Biol Chem. 2005;7:5378-90.

33. Hrncir Z, Pidrman V, Tichy M, Hamet A. Serum sialic acid in acute myocardial infarction in a dynamic follow up. Vnitr Lek. 1975; 21:436-9.

34. Anttinen H, Jarvensivu PM, Savolainen ER. Serum galactosylhydroxylysyl glucosyltranferase in acute myocardial infarction and during subsequent collagen scar formation. Eur J Clin Inves. 1981;11:375-9.

35. Apple FS, Wu AHB, Mair J, Ravkilde J, Panteghini M, Tate J, Pagani F, Christenson RH, Mockel M, Danne O, Jaffe AS. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. Clin Chem. 2005;51:810-24.

36. Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. Biotecnhol Prog. 2005;21:11-6.

37. Schachter H. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. Glycoconj J. 2000;17:465-83.

38. Stanley P. Regulation of Notch signaling by glycosylation. Curr Opin Struct Biol. 2007;17:530-5.

39. Nairn AV, York WS, Harris K, Hall EM, Pierce JM, Moremen KW. Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. J Biol Chem. 2008;283:17298-313.

40. Haltiwanger RS, Lowe JB. Role of glycosylation in development. Annu Rev Biochem. 2004;73:494-537.

41. Marth JD, Grewal PK. Mammalian glycosylation in immunity. Nat Rev Immunol. 2008;8:874-87.

42. Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. J Biol Chem. 2007;282:2753-64.

43. Yamaguchi Y, Nishimura M, Nagano M, Yagi H, Sasakawa H, Uchida K i sur. Glycoform-dependent conformational alteration of the Fc region of human immunoglobulin G1 as revealed by NMR spectroscopy. Biochim Biophys Acta. 2006;1760:693-700.

44. Moloney DJ, Shair LH, Lu FM, Xia J, Locke R, Matta KL, Haltiwanger RS. Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. J Biol Chem. 2000;275:9604-11.

45. Wells L, Vosseller K, Hart GW. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O- GlcNAc. Science. 2001;291:2376-8.

46. DeMarco ML, Woods RJ. Atomic-resolution conformational analysis of the GM3 ganglioside in a lipid bilayer and its implications for ganglioside-protein recognition at membrane surfaces. Glycobiology. 2009;19(4):344-55.

47. Stratakis CA, Chrousos GP. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. Ann N Y Acad Sci. 1995;771:1-18.

48. Garcia-Vallejo JJ, Van Dijk W, Van Het Hof B, Van Die I, Joziasse DH i sur. Activation of Human Endothelial Cells by Tumor. Analytical Biochemistry.2006;329:293-9.

49. Rösner H. Developmental expression and possible roles of gangliosides in brain development. Progres in Molecular and Subcellular Biology. 2003;32:49-73.

50. Schachter H. Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins. Cell Mol Life Sci. 2001;58(8):1085-104.

51. Lauc G, Lee RT, Dumic J, Lee YC. Photoaffinity GlycoProbes - a new tool for the identification of lectins. Glycobiology. 2000;10:357-64.

52. Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. Curr. Opin. Struct. Biol. 2005;15:637–645.

53. Freeze HH. Genetic defects in the human glycome. Nat Rev Genet. 2006;7:537-51.

54. National Research Council. Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future. Washington, DC: The National Academies Press, 2012.

55. Ćurić G. Ekspresija gena povezanih s glikozilacijom u pacijenata oboljelih od postraumatskog stresnog poremećaja. Disertacija. Medicinski fakultet Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer, Osijek. 2011.

56. Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. J. Mol. Biol. 2003;328:307–317.

57. Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. Curr. Opin. Struct. Biol. 2005;15:637–645.

58. Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. Science. 2001;291(5512):2364-9.

59. Marek KW, Vijay IK, Marth JD. A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. Glycobiology. 1999;9:1263-71.

60. Jaeken J. Komrower Lecture. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's all in it! J Inherit Metab Dis. 2003;26(2-3):99-118.

61. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology. 1993;3(2):97-130.

62. Dwek RA, Lellouch AC, Wormald MR. Glycobiology: 'the function of sugar in the IgG molecule'. J Anat. 1995;187(2):279-92.

63. Albert H, Collin M, Dudziak D, Ravetch JV, Nimmerjahn F. In vivo enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(39):15005-9.

64. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. Science. 2006:4;313(5787):670-3.

65. Shibata-Koyama M, Iida S, Misaka H, Mori K, Yano K, Shitara K i sur. Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding for FcgammaRIIIb and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils. Exp Hematol. 2009;37(3):309-21.

66. Tabak LA. In defense of the oral cavity: Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. Annu Rev Physiol. 1995;57:547–564.

67. van Klinken BJW, Dekker J, Büller HA, Einerhand AWC. Mucin gene structure and expression: Protection vs. adhesion. Am J Physiol. 1995;269:G613–627.

68. Fukuda M. Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. Biochim. Biophys. Acta. 2002;1573:394–405.

69. Wandall HH, Irazoqui F, Tarp MA, Bennett EP, Mandel U, Takeuchi H, Kato K, Irimura T, Suryanarayanan G, Hollingsworth MA, Clausen H. The lectin domains of polypeptide GalNAc-transferases exhibit carbohydrate-binding specificity for GalNAc: Lectin binding to GalNAc-glycopeptide substrates is required for high density GalNAc-O-glycosylation. Glycobiology. 2007;17:374–387.

70. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: Protection and control of the cell surface. Nat. Rev. Cancer. 2004;4:45–60.

71. Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. Biochim. Biophys. Acta. 1999;1473:67–95.

72. Hakomori SI. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. Biochim Biophys Acta. 2008;1780:325-46.

73. Prinetti A, Loberto N, Chigorno V, Sonnino S. Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. Biochim Biophys Acta. 2009;1788(1):184-93.

74. Proia RL. Gangliosides help stabilize the brain. Nat Genet. 2004;36(11):1147-8.

75. Minoru F, Rutishauser U, Schnaar RL, ur. Neuroglycobiology. Oxford: Oxford University Press; 2005.

76. Proia RL. Glycosphingolipid functions: Insights from engineered mouse models. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2003;358:879–883.

77. Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Priestman DA, Neville DC, Reinkensmeier G, i sur. Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. Nat Genet. 2004;36(11):1225-9.

78. Yamashita T, Wu YP, Sandhoff R, Werth N, Mizukami H, Ellis JM i sur. Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glial interactions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(8):2725-30.

79. Schnaar RL. Glycolipid-mediated cell–cell recognition in inflammation and nerve regeneration. Arch Biochem Biophys. 2004;426:163–172.

80. Iijima R, Ichikawa T, Yamazaki M. Sialic acid attenuates the cytotoxicity of the lipid hydroperoxides HpODE and HpETE. Carbohydr Res. 2009;344:933-5.

81. Miyagi T, Wada T, Yamaguchi K, Hata K. Sialidase and malignancy: A minireview. Glycoconj J. 2004;20:189–198.

82. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic Acids Res. 2009;37:D233-8.

83. Homeister JW, Thall AD, Petryniak B et al. The alpha(1,3)fucosyltransferases FucT-IV and FucT-VII exert collaborative control over selectin-dependent leukocyte recruitment and lymphocyte homing. Immunity. 2001;15:115-26.

84. Weninger W, Ulfman LH, Cheng G et al. Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. Immunity. 2000;12:665-76.

85. Brinkman-van der Linden EC, de Haan PF, Havenaar EC, van Dijk W. Inflammation-induced expression of sialyl LewisX is not restricted to alpha1-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on alpha1-antichymotrypsin and haptoglobin. Glycoconj J. 1998;15:177-82.

86. Thompson S, Matta KL, Turner GA. Changes in fucose metabolism associated with heavy drinking and smoking: a preliminary report. Clin Chim Acta. 1991;201:59-64.

87. Yazawa S, Tanaka S, Nishimura T, Miyanga K, Kochibe N. Plasma alpha1,3-fucosyltransferase deficiency in schizophrenia. Exp Clin Immunogenet. 1999;16:125-30.

88. Lowe JB. Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. Immunol Rev. 2002;186:19-36.

89. Sperandio M. Selectin and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. FEBS J. 2006;273:4377-89.

90. Sturla L, Rampal R, Haltiwanger RS, Fruscione F, Etzioni A, Tonetti M. Differential terminal fucosylation of N-linked glycans versus protein O-fucosylation in leukocyte adhesion deficiency type II (CDG IIc). J Biol Chem. 2003;278:26727-33.

91. .Shin LM, Rauch SL, Pitman RK. Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. Ann N Y Acad Sci. 2006;1071:67-79.

92. Baboval T, Smith FI. Comparison of human and mouse Fuc-TX and Fuc-TXI genes, and expression studies in the mouse. Mamm Genome. 2002;13:538-41.

93. Orntoft TF, Vestergard EM. Clinical aspects of altered glycosilation of glycoproteins in cancer. Electrophoresis. 1999;20:362-71.

94. Yamashita T, Allende ML, Kalkofen DN, Werth N, Sandhoff K, Proia RL. Conditional LoxP-flanked glucosylceramide synthase allele controlling glycosphingolipid synthesis. Genesis. 2005;43:175-80.

95. Bobryshev YV, Golovanova NK, Tran D et al. Expression of GM3 synthase in human atherosclerotic lesions. Atherosclerosis. 2006;184:63-71.

96. Kitazume S, Oka R, Ogawa K, Futakawa S, Hagiwara Y, Takikawa H i sur. Molecular insights into beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase secretion in vivo. Glycobiology. 2009;19:479-87.

97. Weinstein J, Lee EU, McEntee K, Lai PH, Paulson JC. Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH2-terminal signal anchor. J Biol Chem. 1987;262:17735-43.

98. Colley KJ, Lee EU, Paulson JC. The signal anchor and stem regions of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase may each act to localize the enzyme to the Golgi apparatus. J Biol Chem. 1992;267:7784-93.

99. Colley KJ, Lee EU, Adler B, Browne JK, Paulson JC. Conversion of a Golgi apparatus sialyltransferase to a secretory protein by replacement of the NH2-terminal signal anchor with a signal peptide. J Biol Chem. 1989;264:17619–22.

100. Woodard-Grice AV, McBrayer AC, Wakefield JK, Zhuo Y, Bellis SL. Proteolytic shedding of ST6Gal-I by BACE1 regulates the glycosylation and function of alpha4beta1 integrins. J Biol Chem. 2008;283:26364-73.

101. Semel AC, Seales EC, Singhal A, Eklund EA, Colley KJ, Bellis SL. Hyposialylation of integrins stimulates the activity of myeloid fibronectin receptors. J Biol Chem. 2002;277:32830–36.

102. Hennet T, Chui D, Paulson JC, Marth JD. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:4504–4509.

103. Collins BE, Smith BA, Bengtson P, Paulson JC. Ablation of CD22 in ligand-deficient mice restores B cell receptor signaling. Nat Immunol. 2006;7:199–206.

104. Grewal PK, Boton M, Ramirez K, Collins BE, Saito A, Green RS I sur. ST6Gal-I restrains CD22-dependent antigen receptor endocytosis and Shp-1 recruitment in normal and pathogenic immune signaling. Mol Cell Biol. 2006;26:4970–81.

105. Garige M, Gong M, Lakshman MR. Ethanol destabilizes liver ST6Gal1 mRNA by depleting a 3′-untranslated region specific binding protein. J Pharmacol Exp Ther 2006;318:1076-82.

106. Gong M, Garige M, Hirsch K, Lakshman MR. Liver Galbeta1,4GlcNAc alpha2,6-sialyltransferase is down-regulated in human alcoholics: possible cause for the appearance of asialoconjugates. Metabolism. 2007;56(9):1241-7.

107. Garige M, Gong M, Lakshman MR. Ethanol destabilizes liver ST6Gal1 mRNA by depleting a 3′-untranslated region specific binding protein. J Pharmacol Exp Ther 2006;318:1076-82.

108. Vázquez-Martín C, Cuevas E, Gil-Martín E, Fernández-Briera A. Correlation analysis between tumor-associated antigen sialyl-Tn expression and ST6GalNAc I activity in human colon adenocarcinoma. Oncology. 2004;67:159-65.

109. Kaufmann M, Blaser C, Takashima S et al. Identification of an alpha2,6-sialyltransferase induced early after lymphocyte activation. Int Immunol. 1999;11:731-8.

110. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006;27:95-125.

111. Garcia-Vallejo JJ, Gringhuis SI, van Dijk W, van Die I. Gene expression analysis of glycosylation-related genes by real-time polymerase chain reaction. Methods Mol Biol. 2006;347:187-209.

112. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 3, 2002; RESEARCH0034.

113. Bartling B, Vanhooren V, Dewaele S et al. Altered desialylated plasma N-glycan profile in patients with non-small cell lung carcinoma. Cancer Biomark. 2011-2012;10:145-54.

114. Cullen P, Mohr S, Brennhausen B, Cignarella A, Assmann G. Downregulation of the selectin ligand-producing fucosyltransferases Fuc-TIV and Fuc-TVII during foam cell formation in monocyte-derived macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17:1591-8.

115. Saldova R, Huffman JE, Adamczyk B et al.Association of medication with the human plasma N-glycome. J Proteome Res. 2012;11:1821-31.

116. Oduncu V, Tanalp AC, Erkol A et al. Impact of chronic pre-treatment of statins on the level of systemic inflammation and myocardial perfusion in patients undergoing primary angioplasty. Am J Cardiol. 2011;107:179-85.

117. Uozumi N, Teshima T, Yamamoto T, Nishikawa A, Gao YE, Miyoshi E i sur. A fluorescent assay method for GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha 1-6fucosyltransferase activity, involving high performance liquid chromatography. J Biochem. 1996;120:385-92

118. Shimizu H, Ochiai K, Ikenaka K, Mikoshiba K, Hase S. Structures of N-linked sugar chains expressed mainly in mouse brain. J Biochem. 1993;114:334-8.

119. Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, Miyoshi E i sur. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. FEBS J. 2008;275:1939-48.

120. Pretzlaff RK, Xue VW, Rowin ME. Sialidase treatment exposes the beta1-integrin active ligand binding site on HL60 cells and increases binding to fibronectin. Cell Adhes Commun. 2000;7:491-500.

121. Miljan EA, Meuillet EJ, Mania-Farnell B, George D, Yamamoto H, Simon HG i sur. Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. J Biol Chem. 2002;277:10108-13.

122. Mitsuzuka K, Handa K, Satoh M, Arai Y, Hakomori S. A specific microdomain ("glycosynapse 3") controls phenotypic conversion and reversion of bladder cancer cells through GM3-mediated interaction of alpha3beta1 integrin with CD9. J Biol Chem. 2005;280:35545-53.

123. Gracheva EV, Samovilova NN, Golovanova NK et al Enhancing of GM3 synthase expression during differentiation of human blood monocytes into macrophages as in vitro model of GM3 accumulation in atherosclerotic lesion. Mol Cell Biochem. 2009;330:121-9.

124. Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3–L1 adipocytes. Proc Natl Acad Sci. 2002;99:5313–5318.

125. Fülöp N, Mason MM, Dutta K et al. Impact of Type 2 diabetes and aging on cardiomyocyte function and O-linked N-acetylglucosamine levels in the heart. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292:C1370-8.

11. ŽIVOTOPIS

Irzal Hadžibegović rođen je 20. travnja 1980. godine u Brčkom (Bosna i Hercegovina). Oženjen je i otac je dvije kćerke, a s obitelji živi i radi u Slavonskom Brodu.

Osnovnu školu završio je 1994. godine u Umagu, a Opću gimnaziju 1998. godine u Bujama. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1998. godine. Bio je demonstrator na Katedri za anatomiju 1999/2000. i 2000/2001. i radio je aktivno u uredništvu studentskog časopisa „Medicinar" od 2000. do 2004. g. U akademskoj godini 2002/2003. zajedno s kolegicom Anom Đanić pod mentorstvom prof. dr. Borisa Labara osvojio je Rektorovu nagradu za studentski znanstveni rad „Ne-Hodgkinovi limfomi u bolesnika starije životne dobi". Medicinski fakultet u Zagrebu završio je u lipnju 2004. godine s prosječnom ocjenom 4,56.

Liječnički staž proveo je u Općoj bolnici „dr. Josip Benčević" u Slavonskom Brodu i nakon odsluženog obveznog vojnog roka položio je pripravnički ispit u ožujku 2006. godine. Specijalizaciju iz interne medicine započeo je u rujnu 2006. godine, a specijalistički ispit položio je u rujnu 2010. godine od kada radi kao odjelni liječnik specijalist u koronarnoj jedinici Odjela za unutarnje bolesti Opće bolnice „dr. Josip Benčević" u Slavonskom Brodu i bavi se intenzivnom kardijalnom skrbi, invazivnom kardiologijom i perkutanim intervencijama u akutnom koronarnom sindromu.

Licencirani je instruktor Europskog vijeća za reanimaciju za tečajeve naprednog, neposrednog i osnovnog održavanja života odraslih. Član je upravnog odbora Hrvatskog društva za reanimatologiju Hrvatkog liječničkog zbora.

Do sada je objavio 9 znanstvenih radova u časopisima indeksiranim u relevantnim bazama podataka. Doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2006. godine. Od 2010. asistent je na Katedri za internu medicinu Medicinskog Fakulteta Sveučilišta „Josip Juraj Strossmayer" u Osijeku.