

DOKTORI (Ph.D) – Tézisek

Glükóz metabolizmus szerepének vizsgálata az intracelluláris Ca^{2+} jelátviteli folyamatokban

Dr. Nagy Tamás



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Laboratóriumi Medicina Intézet
Pécs
2006.

DOKTORI (Ph.D) – Tézisek

Glükóz metabolizmus szerepének vizsgálata az intracelluláris Ca²⁺ jelátviteli folyamatokban

Készítette:
Dr. Nagy Tamás

Témavezetők:
Dr. Miseta Attila
Dr. John C. Chatham

Programvezető:
Dr. Kellermayer Miklós
Doktori Iskola vezetője:
Dr. Nagy Judit

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Laboratóriumi Medicina Intézet
Pécs
2006.

„Glükóz metabolizmus szerepének vizsgálata az intracelluláris Ca^{2+} jelátviteli folyamatokban”

Bevezető

A glükóz a sejtek számára nemcsak mint energia hasznosítható, hanem számos egyéb fiziológiás és patofiziológiás intracelluláris folyamatnak részese, például a tápláltsági fok szabályozása, diabéteszes komplikációk, stressz válasz, vagy fehérjék poszt-transzlációs módosítása. Tézisem a glükóz által befolyásolt folyamatok 2 szűkebb területét tárgyalja. Egyrészt a hexózamin-út és az ún. protein asszociált O-glcNAc szerepét intracelluláris Ca^{2+} - jelátvitelben, másrészt a glükóz – galaktóz metabolizmus és a foszfoglükomutáz enzim jelátviteli folyamatokban játszott szerepét.

A tartósan magas glükóz-koncentráció káros hatásaival ellentétben, talán kevésbé köztudott, hogy bizonyos esetekben a magasabb glükóz-szint hasznos, a sejtek túlélése szempontjából előnyös is lehet. Példa erre az intenzív terápiás intézetekben jól ismert GIK infúzió – azaz Glükóz – Inzulin – Kálium -, melynek protektív hatását figyelték meg az akut miokardiális infarktusok terápiájában. Stressz esetén, a sejt megpróbál kompenzálni, a glükóz nem csupán energiaforrásként szolgálhat, hanem egyéb mechanizmusokon keresztül, a jelátviteli utakat is befolyásolhatja. Ennek egyik legfontosabb eleme a $[Ca^{2+}]_i$ homeosztázis, és annak kapcsolata a glükóz metabolizmussal szerepelt kutatásom középpontjában.

A 4 fő (elsősorban diabéteszben vizsgált) glükóz-asszociált mechanizmus közül a hexózamin utat választottam kutatásom célpontjának. A sejtek által felvett glükóz kb. 2-4%-a lép be a hexózamin útba, a glutamin-fruktóz-6P aminoszferáz (GFAT) a kulcsenzim, hatására *glukózamin-6P* (glcN-6P) képződik. Ha glükózamint adunk a sejtekhez, hexokináz, illetve glükózamin-kináz segítségével glükózamin-6P-tá alakul, így a GFAT-et megkerülve, direkt tudjuk a hexózamin-utat stimulálni. A hexózamin-út utolsó metabolitja, az UDP-glcNAc, többek között a fehérjék O-típusú glikozilálásának is szükséges alapanyaga. Ez utóbbi poszt-transzlációs módosulás egyre nagyobb figyelmet kap az irodalomban és a kutatásokban, ugyanis mechanizmusában nagyban hasonlít a foszforiláció-defoszforilációhoz, azonkívül egyre nyilvánvalóbbá válik, hogy a jelátviteli folyamatokban a foszforilációhoz hasonlóan nagyon fontos szerepet játszik.

Az O-glikoziláció a szerin, threonin aminosavak OH csoportján történik és számos fehérje esetében kompetícióba lép a foszforilációval, vagyis ugyanazon a lokáción foszforilált, vagy O-glikozilált is lehet egy fehérje. Reverzibilis folyamat, továbbá dinamikusan változó, azaz gyorsan reagál a környezeti változásokra, jelekre. Az O-glikozilációt mitogének, növekedési faktorok, a sejtciklus aktuális állapota, sejt-differenciáció befolyásolhatja, ezenkívül akut stressz, és természetesen extracellulárisan megemelkedett glükóz vagy éppen glükózamin. Egyre több fehérjéről fedezik fel, hogy alanya lehet az O-glikozilációnak, így pl. mitogének, növekedési faktorok, sejtciklus és sejt-differenciációt szabályozó fehérjék, stb. Azon megfigyelések, melyek a hyperglükémia és Ca^{2+} szabályozás kapcsolatát írják le, valamint az O-glikoziláció ilyen széles spektruma előre vetíti, hogy a hexózamin út szintén szerepet játszhat a Ca^{2+} homeosztázisban.

Szívizomsejteken is, akárcsak más, nem ingerelhető sejteken, megtalálható a receptor közvetítette Ca^{2+} szabályozás. Erre jellemző példa a pozitív inotróp hatású Fenilefrin, illetve az Angiotenzin II. A stimulus hatására aktiválódik a foszfolipáz C (PLC), majd diacil-glicerol (DAG) és inozitol-trifoszfát (IP_3) szabadul fel. Az IP_3 , direkt kapcsolatban van a Ca^{2+} szinttel; a szarkoplazmás retikulumból, IP_3 -receptorok közvetítésével Ca^{2+} -ot szabadít fel. Az IP_3 kiváltotta Ca^{2+} emelkedés csak egy része származik a szarkoplazmás retikulumból; az ún. CCE – capacitative calcium entry – során a kezdeti, IP_3 indukálta Ca^{2+} emelkedést egy második, extracelluláris térből származó Ca^{2+} beáramlás követ. A Ca^{2+} amellet, hogy

közvetíti az akut inotróp választ, génextpressziós változásokat indukál, megemelkedése apoptózist, hipertrófiát okozhat, szabályozza a sejtproliferációt, metabolikus enzimeket befolyásol. Néhány molekuláris célpontja a Ca^{2+} -nak: kalmodulin és kalmodulin regulálta kinázok, kalcineurin, PKC és MAP kinázok, cPLA₂, proteázok, kaszpázok.

Munkám során arra kerestem a választ, hogy a Ca^{2+} szabályozási folyamatokra, kiemelten stressz -állapotban, van-e befolyása a glükóz metabolizmusnak, és ha igen, hogyan, milyen útvonalakon keresztül teszi ezt. Angiotensin II által kiváltott Ca^{2+} stressz hatását - pusztán az O-glikoziláció változtatásával – modulálni, változtatni lehet. Glükózamin emeli a protein asszociált O-glcNAc-et, az intracelluláris, AngII kiváltotta Ca^{2+} emelkedésre pedig gátló hatása van. Ez az észlelet azt sugallja, hogy nem közvetlenül a metabolitok, hanem valamely O-glikozilált fehérje, vagy fehérjék mediálják a gátlást. Munkám során azt találtam, hogy a CCE-re az O-glikoziláció hatást gyakorol, s ezen CCE szintén részt vállal a sejtek stressz válaszában. További kutatás célja ezen fehérjék felkutatása.

Foszfoglükomutáz

A glükóz metabolizmus egy másik „oldalága” szintén kapcsolatban áll az intracelluláris Ca^{2+} szabályozással. A foszfoglükomutáz enzim, mely a glükóz-6P - glükóz-1P átalakulást katalizálja, egyrészt a galaktóz,- másrészt a glikogén metabolizmust kapcsolja össze a glükóz metabolizmussal. Ezen enzim deléciója, munkacsoportunk korábbi eredményei alapján, glükóz helyett *galaktózon* növesztett élesztőben magas Ca^{2+} - tartalmat eredményez, sőt a Ca^{2+} - jelátvitel is zavart szenved.

Míg a galaktóz metabolizmusában jelentős galaktokináz, epimeráz és dehidrogenáz enzimek defektusai a galaktózémia ismert formáihoz vezetnek, addig PGM estében csak sporadikus közlemények vannak arról, hogy mutációja az aktivitás csökkenésén át megbetegedéshez vezethet. Ennek oka lehet az, hogy a legtöbb fajban több mint egy PGM izoenzim létezik. Ezeknek az együttes sérülése viszont letális következményű. Emberben a klasszikus PGM aktivitás (Glc-1-P – Glc-6-P konverzió) mellett egy olyan PGM aktivitása is mérhető, amely az 5 és 6 szénatomos cukrokat egyaránt szubsztrátnak ismeri fel. Ez valószínűleg a PGM3 izoenzim aktivitásának is köszönhető. A PGM3, másnéven foszfoacetilglükózamin-mutáz egyrészt rendelkezik klasszikus PGM aktivitással, másrészt az glcNAc-6P → glcNAc-1P átalakulást katalizálja, ami a hexózamin út fontos lépése. A PGM3 nagyfokú szekvencia homológiát mutat a PGM-el, azonkívül akárcsak a PGM, működéséhez Mg^{2+} -t igényel.

Irodalomban ismert, hogy Li^+ hatására a foszfoglükomutáz enzim gátlódik. Ez valószínűleg a Mg^{2+} kompetitív leszorítása révén következik be. Mivel a Li^+ -ot mániás-depressziós betegek mániás szakaszában a terápiában is alkalmazzák, s mivel a hatásmechanizmusa máig nem tisztázott, a Li^+ a foszfoglükomutáz enzim gátlásán keresztül kifejtett hatásvizsgálata nemcsak az intracelluláris Ca^{2+} változások elemzésére adhat lehetőséget, hanem a terápiás hatás molekuláris okára is fényt deríthet.

Célkitűzések

- Mivel a glükóz anyagcsere feltehetően kapcsolatban van az intracelluláris Ca^{2+} szabályozással, ezért arra kerestük a választ, vajon a hexózamin útnak szerepe van-e ebben a szabályozásban?

- Amennyiben a hexózamin út befolyásolja az intracelluláris Ca^{2+} szintet, melyik eleme felelős ezért? Feltételeztük, hogy a protein O-glikoziláció involvált, ez azonban bizonyításra szorult.

- Melyek azok a Ca^{2+} szintet növelő folyamatok, melyeket a glükóz anyagcsere módosítani képes? Kapcsolatba hozható-e a CCE-vel?

- Választ kerestünk arra, vajon azonosítható-e konkrét fehérje, mely a fenti folyamatok közvetítésében részt vesz?

- Kiváltható-e Li^+ hatására változás a hexózamin út-ban, tekintettel arra, hogy a PGM3 aktivitása szükséges a hexózamin út egyik metabolikus lépésének megfelelő lebonyolításához?

Anyag és módszer

Sejtkultúrák:

Neonatalis szívizomsejt izolálás (neonatal rat ventricular myocytes - NRVM): 2-5 napos újszülött patkányokat használtunk erre a célra. Az eltávolított patkány szíveket kollagenáz emésztésnek vetettük alá. Az így izolált sejtszuspenziót 1 közös pool-ba gyűjtöttük, ún. 'overnight médiumban' reszuszpendáltuk (DMEM:M199 (4:1) + 15% FBS + penicillin (100 U/mL) + streptomycin (100 µg/mL) + arabinose C (10 µM)). Kollagénnel fedett petri-csészékbe vagy ún. 'chambered coverslip'-re öntöttük a sejtszuspenziót. A sejtsűrűség ~1*10⁶/mL volt, ez elegendő volt ahhoz, hogy a kitapadó cardiomyocyták összefüggő hálózatot alkossanak és spontán, ritmusosan kontraháljanak.

A **Jurkat** sejtvonalat glükózmentes RPMI-1640 médiumban tenyésztettük, a kísérleti körülményektől függően 5-10 mM glükózzal vagy galaktózzal kiegészítve, illetve 1-4 mM LiCl -dal vagy MgCl₂ -vel.

Mikroszkópos Ca²⁺ mérések:

A spontán kontraháló cardiomyocyták Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) -val lettek mosva, majd friss HBSS-ben, 3 µM Fluo3-AM (Molecular Probes) és 1% bovin szérum albumin (BSA) jelenlétében 45 percig, 37°C -on inkubáltuk. Mosás után, a végső puffer szintén HBSS volt, 1,2 mM CaCl₂-ot és 1.0 mM MgSO₄-ot tartalmazott. A fluoreszcens fényképek 37 °C-on, egy Olympus IX70 invertált mikroszkóp segítségével készültek.

Western blot:

Cardiomyocytákat vagy Jurkat sejteket jéghideg PBS-ben mostunk majd RIPA pufferben feltártunk. Elektroforetikus elválasztásra 7.5% SDS-PAGE gélt használtunk, majd PVDF membránra (Millipore) transzferáltuk a mintákat. A PVDF membránra transzferált mintákat ún. CTD110.6, monoklonális egér IgM antitesttel jelöltük, mely antitest specifikus az O-glikozilált proteinekre. A CTD jelölés vizualizálására másodlagos, HRP konjugált anti egér IgM ellenanyaggal jelöltük meg a blottot.

Immunfluoreszcens mikroszkópia:

A fedőlemezekre kitapadt sejtek, 3% formaldehid/PBS -ben fixálódtak, majd permeabilizálás és PBS-s mosás után 5% BSA/PBS -ben 5 percig blokkoltuk. CTD110.6 elsődleges antitesttel, ill. mosás után másodlagos, fluoreszcens antitesttel való inkubálás következett.

HPLC mérések:

A sejteket 0.3 M-os perklórsavban (PCA) precipitáltuk. Vortexelés és centrifugálás után a PCA extrahálására 1:4 arányú trioktilamin:freon keveréket használtunk. A vizes fázist pipettával óvatosan leszívva, a minták készek a HPLC-oszlopra való injektálásra. A mintákat anion-cserélő HPLC oszlopra (Partisil 10 SAX, Beckman) töltöttük fel és a nukleotid-cukrokat 262 nm-en detektáltuk, 2 mL/perces átáramlást használva. Lineáris só és pH gradienst alkalmaztunk: 5 - 750 mM -os (NH₄)H₂PO₄ koncentráció és párhuzamos 2.8 - 3.7-es pH grádiens).

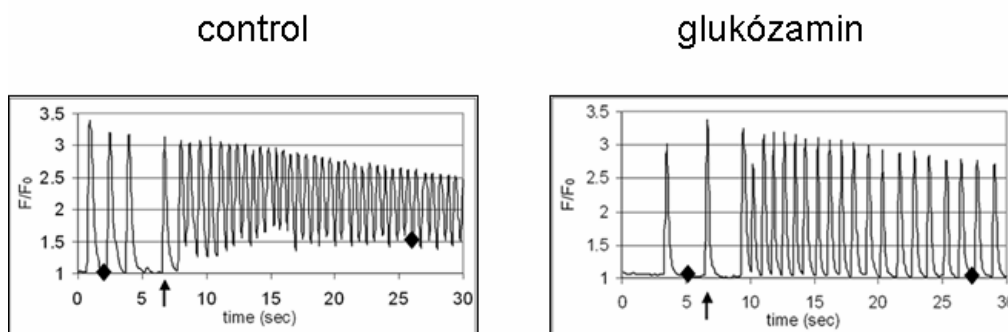
Eredmények és megbeszélés

Mivel feltételeztük, hogy a hexózamin út befolyásolja a sejt stressz állapotának kimenetelét, ezért megvizsgáltuk egyrészt a Ca^{2+} -homeosztázisban betöltött szerepét, másrészt, a hexózamin úton belül, az O-glikoziláció $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -szabályzásban való részvételére fókuszáltunk. Stresszorként AngII agonistát használtunk. Az AngII pozitív inotróp hatású, azonkívül hipertrófiát és apoptózist is indukálhat. Elsősorban az AngII kiváltotta bazális (vagy 'diasztolés') Ca^{2+} emelkedésre fókuszáltam (1. ábra), melyet az AngII IP_3 -on keresztül indukál.

Glükózamin moduláló hatása AngII kiváltotta stresszben:

A glükózamin a GFAT-et megkerülve, direkt lép be a hexózamin-metabolizmusba, emeli az intracelluláris UDP-glcNAc szintjét és ezáltal a protein asszociált O-glcNAc-et is. Ennek bizonyítására, izolált szívizomsejtekből HPLC-vel UDP-glcNAc -et, illetve western blot és immunfluoreszcencia segítségével a fehérjék O-glcNAc szintjét tudjuk megállapítani. Kiderült, hogy egy viszonylag rövid, 5-10 perces glükózamin kezelés is megemeli az UDP-glcNAc szintjét, és feltehetőleg az UDP-glcNAc, feleslegben jelenlevő szubsztrátként, az OGT fokozott aktivitásával, következményesen magasabb protein asszociált O-glcNAc szinttel jár (2. ábra).

Amennyiben élő, spontán 'szívverésre' képes cardiomyocytákat Ca^{2+} szenzitív festékekkel megfestünk, fluoreszcens mikroszkóp alatt megfigyelhetjük és rögzíthetjük a Ca^{2+} szintekben lejátszódó változásokat AngII hatására. Azt találtuk, hogy egyrészt prompt frekvencianövekedés, másrészt szignifikáns diasztolés Ca^{2+} emelkedés zajlott le. Glükózamin elsősorban a bazális Ca^{2+} emelkedést akadályozta meg (1. ábra).



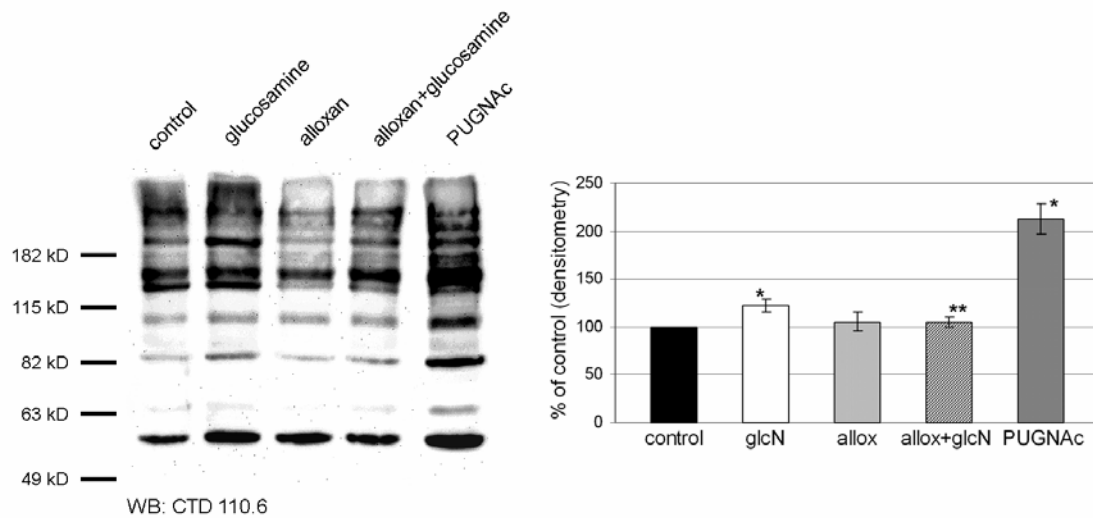
1. ábra: 10 perces glükózamin előkezelés megakadályozza az AngII diasztolés Ca^{2+} emelő hatását.

Mivel munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a CCE kiváltható neonatális patkány cardiomyocytákban, ezért választ kerestünk arra is, vajon a glükózamin a CCE-re is hatással van-e? Ha thapsigargin-nal, a SERCA specifikus inhibitorával kezeltük a sejteket, nem következett be észrevehető frekvenciaemelkedés, azonban a bazális Ca^{2+} szint, nagyon hasonlóan az AngII-höz, emelkedést mutatott. Ezt a hatást a glükózamin szintén meglehetősen hatékonysággal blokkolta.

O-glikoziláció moduláló hatása AngII kiváltotta stresszben:

Fenti eredmények alapján a glükózamin, azaz a hexózamin út szerepét a Ca^{2+} szabályzásban megalapozottnak találtuk, de felmerült a kérdés, vajon hogyan és melyik eleme felelős a szabályozásért.

Western-blottal szignifikánsan magasabb O-glikozilációt mértünk, 5 mM-os, 10 perces glükózamin kezelés után (2. ábra). Számos protein bizonyult O-glcNAc asszociáltnak, melyek legtöbbször O-glikoziláltsági foka szignifikánsan emelkedett glükózamin adását követően.



2. ábra: CTD 110.6 western-blot, jobbra 3 független kísérlet statisztikai kiértékelése. 10 perces, 5 mM glükózamin szignifikáns O-glikoziláció emelkedését okozta, melyet az alloxán eredményesen gátolt. PUGNac jelentős emelkedést okozott az O-glikozilált proteinek számában.

Azt bizonyítandó, hogy az O-glikoziláció direkt hatása felelős a glükózamin Ca^{2+} homeosztázis modulálásáért, specifikus inhibitorokat használtunk. Az alloxán az OGT enzimaktivitását gátolja, a PUGNac (O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)-amino-N-phenylcarbamate) pedig az O-glcNAc-át bénítja (2. ábra). Mivel az UDP-glcNAc csak egy része fordítódik O-glikozilációra, nagyobb részét az exportra termelt fehérjék, illetve a membránfehérjék poszt-transzlációs módosulására használja fel a sejt, ezért nem vártunk jelentős eltérést a metabolitok és az UDP-glcNAc szintekben sem alloxán, sem PUGNac esetében, nem okozott szignifikáns eltérést egyik inhibitor sem. Így elmondhatjuk, hogy amennyiben az AngII hatást módosítani képesek, az elsősorban a specifikus O-glikoziláción keresztül érvényesül.

Az AngII kiváltotta diasztolés Ca^{2+} emelkedést az O-glikoziláció a következőképpen befolyásolta: előzetesen alloxánnal kezelt sejtek hasonlóan reagáltak AngII-re a normál kezeletlen szívizomsejtekhez képest. Ha az alloxán kezelés megelőzte a glükózamint, akkor az jelentősen gátolta a glükózamin hatását. PUGNac, éppen ellenkezőleg, a glükózamin hatását utánozta; csökkent az AngII kiváltotta bazális Ca^{2+} szint emelkedés. Ezen kísérlet bizonyítja, hogy feltehetően valamely fehérje, fehérjék O-glikozilációja felelős az AngII okozta stressz, Ca^{2+} -terhelés tompítására. A thapsigargin indukálta CCE esetén is nagyon hasonló eredménnyel járt az alloxán illetve a PUGNac kezelés, azaz az O-glikoziláció nagy valószínűséggel szerepet játszik a CCE szabályozásában.

Az O-glikozilációnak számos 'célpontja' van; transzkripciófaktorok, citoskeletonfehérjék, membránproteinek, kinázok, stb. Feltehetőleg az O-glikoziláció Ca^{2+} -ra gyakorolt hatása sem 1 kitüntetett fehérje izolált hatása, hanem több, összetett folyamat eredményeként alakulhat ki. Azonban, a szekvenciája ismeretében, pl. a TRPC1 fehérje, elméleti számítások alapján jó eséllyel rendelkezhet O-glcNAc predilekciós helyekkel. Ez a membránfehérje tagja annak a proteincsaládnak, amely valószínűleg részt vesz a CCE-csatorna felépítésében.

A Li hatása a PGM-re és az O-glikozilációra:

A foszfolükomutáz aktivitás, korábbi eredmények szerint szoros kapcsolatban áll a Ca^{2+} homeosztázissal. A PGM-mutáns, genetikailag deletált *S. cerevisiae* törzseken kívül, a Li^+ -ion PGM-et gátló hatását kihasználva, számos kísérleti lehetőség tárul fel a jelenség tanulmányozására. Mindeztáig a PGM aktivitása és a Ca^{2+} homeosztázist összekötő kapocs nem ismert részleteiben. Felvetődött annak a lehetősége, hogy a PGM és a Ca^{2+} szabályozás közötti egyik lehetséges hiányzó láncszem az O-glikoziláció lenne. A PGM3, fontos elem a hexózamin útvonalon, azonkívül nagyfokú szekvencia-azonossággal rendelkezik a PGM-mel. A Li^+ inhibitora a PGM aktivitásnak. Logikusnak tűnik, hogy a Li^+ miatt kiesett PGM funkciót megemelkedett PGM3 expresszió igyekszik kompenzálni, és ezáltal közvetve a hexózamin utat is serkentheti. Ezen hipotézis tesztelésére, 2 mM Li^+ -mal kezeltem Jurkat sejteket, majd megvizsgáltam a sejtek O-glikozilációs szintjét. Azt kaptam, hogy Li^+ hatására emelkedett az O-glcNAc asszociált protein mennyisége. A jelenség természetesen további vizsgálatot igényel, az azonban joggal feltételezhető, hogy a PGM és a PGM3 egymástól nem függetlenek, funkciójuk és változásaik hatással vannak egymásra.

Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények:

Nagy T, Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC.: *Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca²⁺ elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine.*

Am J Physiol Cell Physiol. 2006 Jan;290(1):C57-65. Epub 2005 Aug 17. IF: 3.939 Független hivatkozás: 1

Csutora P, Karsai A, **Nagy T**, Vas B, L Kovacs G, Rideg O, Bogner P, Miseta A.: *Lithium induces phosphoglucomutase activity in various tissues of rats and in bipolar patients.*

Int J Neuropsychopharmacol. 2005 Nov 1;:1-7 [Epub ahead of print]. IF: 4.128

A témához kapcsolódó egyéb publikáció, előadás:

Nagy T, Marchase RB: *Inactivation of the hexosamine biosynthetic pathway alters calcium regulation.*

FASEB JOURNAL 17 (4): A44-A44 Part 1 Suppl. S, MAR 14 2003 (Poszter, Experimental Biology 2003, apr. 11-15, San Diego)

Nagy T, Marchase RB: *Glucosamine alters capacitative calcium entry in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-GlcNAc.*

FASEB JOURNAL 18 (4): A304-A304 Suppl. S MAR 23 2004 (Poszter, Experimental Biology 2004, apr. 17-21, Washington, DC)

Nagy Tamás, Voraratt Champattanachai, Richard B. Marchase, John C. Chatham: *Protein-asszociált O-glcNAc szerepe a szívizomsejt intracelluláris kalcium szabályozásában.*

Előadás - VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok Eger, 2005. április 10-12.

Nagy Tamás, Rideg Orsolya, Peti Mihály Attila, Kovács L. Gábor, Miseta Attila: *Kalcium szabályozás vizsgálata szívizomsejtek sejtmagjában.*

Poszter - 36. Membrán – Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.

Egyéb publikáció:

Rideg O, Csutora P, Magyarlaci T, Teibert A, Nagy T, Kovacs LG, Miseta A.: *Multidrug resistance: diagnostic approaches and difficulties.*

Orv Hetil. 2005 May 15;146(20):995-1001. Hungarian.

Glucose metabolism: impact and significance on intracellular Ca²⁺ regulation

Introduction

Glucose not only serves as a universal energy source for living cells, but also – and maybe this is not trivial for a lot of us - influences many intracellular signaling pathways. These pathways are involved e.g. in nutrient sensing, diabetic complications, stress response, post-translational modifications. My goal was to get a better view on the impact of glucose and its metabolites on one of the key elements of these intracellular signaling pathways: the [Ca²⁺]_i regulation.

Increased level of glucose most of the time is associated with deleterious effects. However, there are situations where high glucose and consequently high metabolite levels can be beneficial. In all probability, the same pathways that are deleterious during a long term hyperglycemia also might cause the beneficial effect in an acute stress response. Glucose-Insulin-Potassium (GIK) infusions e.g. are well known by invasive care specialists in the therapy of acute myocardial ischemia. Apart from the obvious function as ATP source, the underlining mechanism of the beneficial effect of glucose involves signaling pathways, one of them is the attenuation of the stress induced Ca²⁺ elevation.

Out of the 4 major known (diabetic) pathomechanisms (polyol pathway, AGE – advanced glycation endproducts, Protein kinase C activation, and hexosamine pathway) my thesis focuses on the hexosamine biosynthesis pathway (HBP). 2-4% of the glucose enters the HBP through the glutamine-fructose-6P aminotransferase (GFAT) which catalyses the L-glutamine + D-fructose 6-phosphate = L-glutamate + D-glucosamine 6-phosphate reaction. Adding glucosamine directly to the cells bypasses the GFAT and enhances the flux through the HBP. The endproduct of the HBP is UDP-glcNAc (UDP-N-acetyl-glucosamine) which among other things serves as a source of protein-O-linked N-acetylglucosamine (also called: O-glcNAc or O-GlcNAcylation).

The addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins, which is catalyzed by O-GlcNAc-transferase (OGT), is a dynamic and abundant posttranslational modification that has increasingly been recognized as an important regulatory mechanism in signal transduction and that also may be especially important in mediating the cellular stress response. O-glcNAc links to the serine, threonine OH-groups which means that on many proteins O-glcNAc competes with phosphorylation. The number of identified proteins capable of posttranslational O-glycosylation is quickly growing, including a wide range of proteins, such as NF-κB, annexin, endothelial nitric oxide synthase, αB-crystallin, OGT, α-tubulin, c-myc, and heat shock protein. Increased levels of O-glycosylation have been implicated in a range of cellular processes, including the development of insulin resistance in muscle, hyperglycemia-induced apoptosis, and impaired excitation-contraction coupling. Recently, it also was shown that increased protein O-Glc-NAcylation occurs in a range of different cells in response to stress, suggesting that activation of this pathway may be a component of an endogenous cell survival pathway.

In order to test the effect of increased HBP flux on cellular stress and on its central mediator: Ca²⁺ we applied AngII induced stress on isolated neonatal cardiomyocytes. AngII, through its receptor, couples to the Gq protein to stimulate PLC, generating two secondary messengers: diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3). The major target of DAG is PKC, whereas IP3 triggers an increase in cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) through IP3 receptors located in the sarcoplasmic reticulum. In most cell types, the IP3-generated [Ca²⁺]_i elevation is a consequence of an initial release from the endo-, sarcoplasmic reticulum followed by a subsequent influx of extracellular Ca²⁺ into the cytoplasm. This latter process is termed store-operated or capacitative Ca²⁺ entry (CCE). The intracellular targets of

$[Ca^{2+}]_i$ are numerous and include, e.g., CaM-regulated kinases, calcineurin, PKC, MAPK, cytosolic phospholipase A2, and proteases.

The goal of my study was to test the hypothesis that the impact of the HBP on the response of neonatal cardiomyocytes to the IP3-generating agonist AngII is mediated by an increase in protein O-GlcNAcylation that alters the regulation of $[Ca^{2+}]_i$. I found that glucosamine increased HBP flux in isolated neonatal cardiomyocytes, resulting in increased O-GlcNAc modification of proteins and attenuated AngII-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation and also attenuated the CCE. I also demonstrate that independent of the HBP, up- or down regulation of protein O-GlcNAcylation directly influenced $[Ca^{2+}]_i$. These data demonstrate for the first time a direct link between protein O-GlcNAcylation and cardiomyocyte Ca^{2+} homeostasis, which may represent a novel mechanism for the regulation of cardiomyocyte function under normal and stress conditions.

Phosphoglucomutase:

Phosphoglucomutase (PGM) catalyzes the reversible conversion of glucose-6-P and glucose-1-P, thus a key enzyme linking glucose and galactose metabolisms. It has been shown recently that the deletion of this enzyme causes significant changes in both the Ca^{2+} signaling and the Ca^{2+} storage in yeast. Therefore, PGM is a useful tool to understand how glucose metabolism influence $[Ca^{2+}]_i$.

There are multiple isoforms of PGM, deletion of all is lethal. In humans, beside the classical PGM activity (Glc-1-P – Glc-6-P conversion), another PGM activity can also be measured that recognizes both 5C and 6C sugars as substrates. Most probably PGM3 is responsible for this. PGM3 (also called: phosphoacetyl-glucosamine-mutase) has both classical PGM activity and also $glcNAc-6P \rightarrow glcNAc-1P$ activity, the later being part of the HBP. PGM3 has a high sequence homology with PGM1, and also needs Mg^{2+} to function.

It has been shown that Li^+ inhibits PGM. This can be explained by the competition of Mg^{2+} and Li^+ . Since Li^+ is used to treat bipolar patients but it's underlying mechanism is unknown, investigating the effect of Li^+ can not only help to understand the role of glucose metabolism in Ca^{2+} regulation but also might help to understand the molecular mechanisms involved in Li^+ treatment in maniac disorders.

Aims

- to test whether the hexosamine pathway regulates $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis
- if hexosamine pathway is involved in Ca^{2+} regulation, which participants of it is responsible?
- through which process does the HBP modify Ca^{2+} regulation? Is CCE involved?
- Can distinct proteins be identified that are both involved in Ca^{2+} regulation and influenced by HBP?
- Since PGM3 is part of the HBP and PGM3 is closely related to PGM, can the inhibition of Li^+ cause any change in HBP?

Materials and Methods

Preparation of neonatal rat ventricular myocytes (NRVM): Primary culture of NRVMs was obtained from 2-5 days old neonatal Sprague-Dawley rats and after isolation by collagenase digestion, the cell suspensions from each digestion step were combined and centrifuged. The pellets were resuspended in DMEM:M199 (4:1), supplemented with 15% FBS, penicillin (100 U/mL) streptomycin (100 µg/mL) and arabinose C (10 µM). Finally, NRVM were plated densely on 6-well plates (2*10⁶ cells/well) or on 4 chambered coverslips (0.3*10⁶ cells/chamber)

Jurkat cells: the cells were kept in glucose free RPMI-1640 supplemented with either glucose or galactose and with or w/o Li⁺.

Ca²⁺ imaging: Spontaneously beating NRVMs washed in HBSS and loaded with 3 µM Fluo3-AM (Molecular Probes) for 45 min at 37°C. After loading with Fluo-3, NRVMs were washed 3 times with dye-free HBSS and finally the buffer was replaced with fresh HBSS containing 1.2 mM CaCl₂ and 1.0 mM MgSO₄. Image acquisition was carried out at 37 °C on an Olympus IX70 inverted microscope.

Immunoblotting with CTD110.6: NRVMs or Jurkats were washed in ice-cold PBS, scraped and harvested in a modified RIPA buffer. Proteins were separated on 7.5% SDS-PAGE (27) and transferred to PVDF membrane. Blots were probed with CTD110.6, a monoclonal mouse IgM antibody that is highly specific for O-glycosylated proteins with no cross reactivity to similar carbohydrate antigens, in casein blocking buffer and followed with HRP conjugated mouse anti-IgM antibody. For developing, Pico chemiluminescent substrate was used.

Immunofluorescence microscopy: NRVMs were plated on coverslips as indicated above and the cells were fixed in 3% formaldehyde/PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100/PBS for 2 min. The cells were rinsed in PBS and blocked in 5% bovine serum albumin (BSA)/PBS for 5 min. and then incubated with the CTD110.6. After rinsing in PBS, the coverslips were incubated with the secondary antibody Alexa-Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgM. Image acquisition was performed with an Olympus IX70 inverted microscope.

HPLC: The cells were precipitated with ice-cold 0.3 M perchloric acid (PCA). PCA was extracted from the supernatant with 2 volumes of 1:4 trioctylamine:freon mixture. Samples were loaded on an anion exchange HPLC column (Partisil 10 SAX, Beckman) and nucleotide sugars were detected at 262 nm using 2 mL/min flow rate and linear salt and pH gradient from 5 to 750 mM (NH₄)H₂PO₄ and from pH 2.8 to 3.7, respectively.

Results and discussion

We supposed that the HBP influences the response of cells to stress, therefore we investigated the role of HBP in $[Ca^{2+}]_i$ regulation focusing on the end-product of HBP; the protein O-glcNAc. We used the agonist AngII to induce stress. AngII has positive inotropic effect, and causes hypertrophy and apoptosis. One of the most important acute effects of AngII is to increase the basal Ca^{2+} levels in cardiomyocytes.

The effect of glucosamine on AngII induced stress: Glucosamine bypasses GFAT by entering directly to HBP, increasing the levels of UDP-glcNAc and consequently protein O-glcNAc. To prove that, we measured in NRVMs the UDP-glcNAc levels by HPLC, and the O-glcNAc levels by Western blot and immunofluorescence. As it turned out, a 5-10 exposure to glucosamine was enough to increase both UDP-glcNAc and O-glcNAc significantly (Fig. 2).

Labeling NRVMs in vivo with Ca^{2+} sensitive fluorescence dye the rapid changes in Ca^{2+} caused by AngII can be observed using a fluorescence microscope. We found that AngII increased the rate of the beating, on the other hand significantly increased the basal Ca^{2+} levels (Fig 1). With glucosamine pretreatment, this increase in basal Ca^{2+} levels was inhibited.

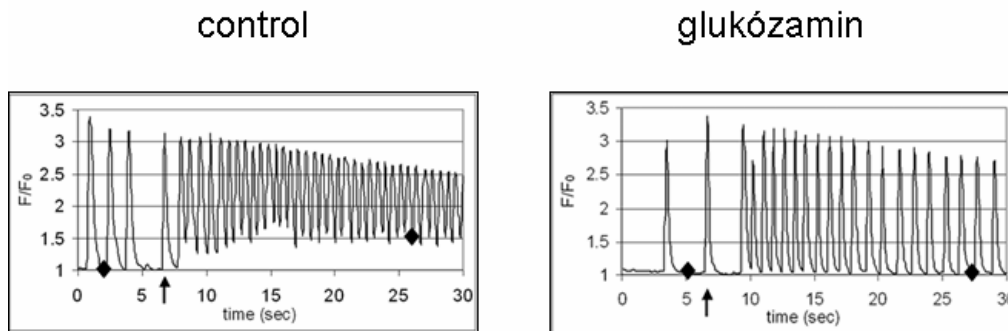


Fig. 1.: pretreatment with glucosamine for 5 min abolishes the effect of AngII (arrows) on NRVMs.

Since it was shown earlier that NRVMs exhibit CCE, we investigated whether glucosamine influences CCE. Treating NRVMs with thapsigargin (CCE-inducer drug) caused increased diastolic Ca^{2+} concentration, similarly to AngII. Pretreatment with glucosamine also blocked this thapsigargin induced increase.

The effect of O-glcNAc on AngII induced stress: Based on this result, HBP seems to be involved in Ca^{2+} regulation but the question remains which part of it is responsible? We found that glucosamine not only influenced $[Ca^{2+}]_i$ but also caused an increase in O-glcNAc. A large number of proteins were sensitive to glucosamine (Fig. 2).

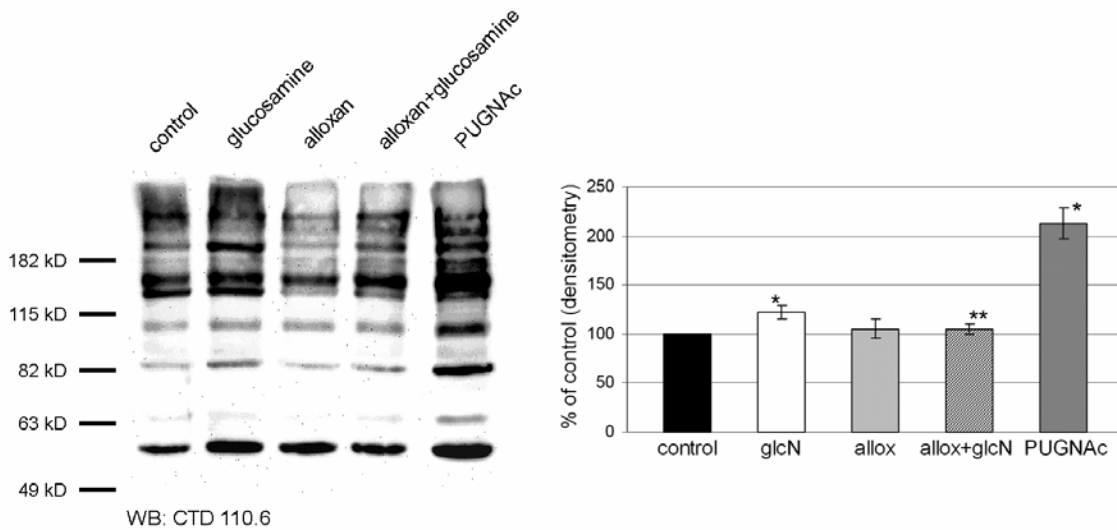


Fig. 2: left: CTD 110.6 western-blot, right: densitometry, statistical analysis of 3 independent experiments.

To prove that O-glcNAc directly influences $[Ca^{2+}]_i$ we used specific inhibitors: *PUGNac* (O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)-amino-N-phenyl-carbamate) inhibits O-glcNAcase which removes N-acetyl-glucosamine from the Ser/Thr side chains of proteins and *alloxan* which inhibits OGT. Since only a part of UDP-glcNAc is used up for O-glcNAc, we haven't seen any significant changes in UDP-glcNAc levels. On the other hand, *PUGNac* increased the O-glcNAc levels while *alloxan* prevented glucosamine to increase it. Therefore any changes seen in Ca^{2+} regulation has to be caused by O-glcNAc and not the metabolites of HBP. Pretreatment with *alloxan* didn't change the AngII caused Ca^{2+} increase, however it prevented the inhibitory effect of glucosamine. In contrast, *PUGNac* mimicked the effect of glucosamine, abolishing the AngII induced Ca^{2+} elevation. To further specify the effect of O-glcNAc on $[Ca^{2+}]_i$, we used thapsigargin to test O-glcNAc on CCE. It resulted in the same outcome, *PUGNac* prevented the CCE, whereas *alloxan* blocked the inhibitory effect of glucosamine.

The targets of O-glcNAc are numerous: transcription factors, cytoskeletal proteins, membrane proteins, kinases, etc. Supposedly the effect of O-glcNAc is not the result of the modification of one single protein but many others. However, the Trp (transient receptor potential) channel protein family, that is the prime candidate for the long sought CCE channel proteins and thus may be involved in the O-GlcNAc-mediated effects on Ca^{2+} homeostasis. Analysis of the protein sequence for Trp1, suggests a high affinity site for O-GlcNAc, close to the N-terminal region.

The effect of Li^+ on PGM and O-glcNAc: According to earlier result, PGM activity is closely related to Ca^{2+} homeostasis. Li^+ was found to effectively inhibit the activity of PGM which opens up the possibility to further investigate the link between glucose metabolism and Ca^{2+} . We propose that the missing link would be HBP and O-glcNAc. PGM3, part of the HBP pathway is a very similar protein to PGM therefore it could be either target for Li^+ , or partly overtake the function of PGM in case of an inhibition. Interestingly, treating Jurkat cells with Li^+ caused an increase in O-glcNAc. This could be related to the assumption that blocking PGM (and possibly PGM3) caused a compensatory increased PGM3 expression which in turn elevated O-glcNAc. Our plan is to further investigate this phenomenon which eventually can lead also to better understand the underlying mechanism of Li^+ treatment in bipolar patients.

Publications:

Nagy T, Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC.: *Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca²⁺ elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine.*

Am J Physiol Cell Physiol. 2006 Jan;290(1):C57-65. Epub 2005 Aug 17. IF: 3.939
Independent citations: 2

Csutora P, Karsai A, **Nagy T**, Vas B, L Kovacs G, Rideg O, Bogner P, Miseta A.: *Lithium induces phosphoglucomutase activity in various tissues of rats and in bipolar patients.*

Int J Neuropsychopharmacol. 2005 Nov 1;:1-7 [Epub ahead of print]. IF: 4.128

Abstracts:

Nagy T, Marchase RB: *Inactivation of the hexosamine biosynthetic pathway alters calcium regulation.*

FASEB JOURNAL 17 (4): A44-A44 Part 1 Suppl. S, MAR 14 2003 (Poster, Experimental Biology 2003, apr. 11-15, San Diego)

Nagy T, Marchase RB: *Glucosamine alters capacitative calcium entry in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-GlcNAc.*

FASEB JOURNAL 18 (4): A304-A304 Suppl. S MAR 23 2004 (Poster, Experimental Biology 2004, apr. 17-21, Washington, DC)

Nagy Tamás, Voraratt Champattanachai, Richard B. Marchase, John C. Chatham: *Role of Protein-associated O-glcNAc in the regulation of intracellular Ca²⁺ in cardiomyocytes.*

Presentation - VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok Eger, 2005. april 10-12.

Nagy Tamás, Rideg Orsolya, Peti Mihály Attila, Kovács L. Gábor, Miseta Attila: *Calcium regulation in the nucleus of the cardiomyocyte.*

Poster - 36. Membrán – Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. may 23-26.

Other publications:

Rideg O, Csutora P, Magyarlaki T, Teibert A, Nagy T, Kovacs LG, Miseta A.: *Multidrug resistance: diagnostic approaches and difficulties.*

Orv Hetil. 2005 May 15;146(20):995-1001. Hungarian.