

DOKTORI (Ph.D) – Tézisek

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

Készítette:

Dr. Nagy Tamás

Témavezetők:

Dr. Kellermayer Miklós

Dr. Miseta Attila

Dr. John C. Chatham

Dr. Richard B. Marchase

Programvezető:

Dr. Kellermayer Miklós

Doktori Iskola vezetője:

Dr. Nagy Judit

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécs

2006.

Tartalomjegyzék

Bevezető.....	3
A glükóz főbb metabolikus útvonalai.....	4
Diabeteses pathomechanizmusok.....	5
Glükóz szerepe stressz-válaszban.....	6
Hexózamin-út.....	7
Ca ²⁺ szabályozás.....	9
Foszfoglükomutáz.....	14
Kérdésfelvetés.....	16
Anyag és módszer.....	18
Eredmények és megbeszélés.....	25
Glükózamin moduláló hatása AngII kiváltotta stresszben.....	28
O-glikoziláció moduláló hatása AngII kiváltotta stresszben.....	30
További eredmények.....	34
Új eredmények tételes összefoglalása.....	38
Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények.....	40
A témához kapcsolódó egyéb publikáció, előadás.....	40
Egyéb publikáció.....	41
Rövidítések.....	42
Köszönetnyilvánítás.....	44
Irodalomjegyzék.....	45

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

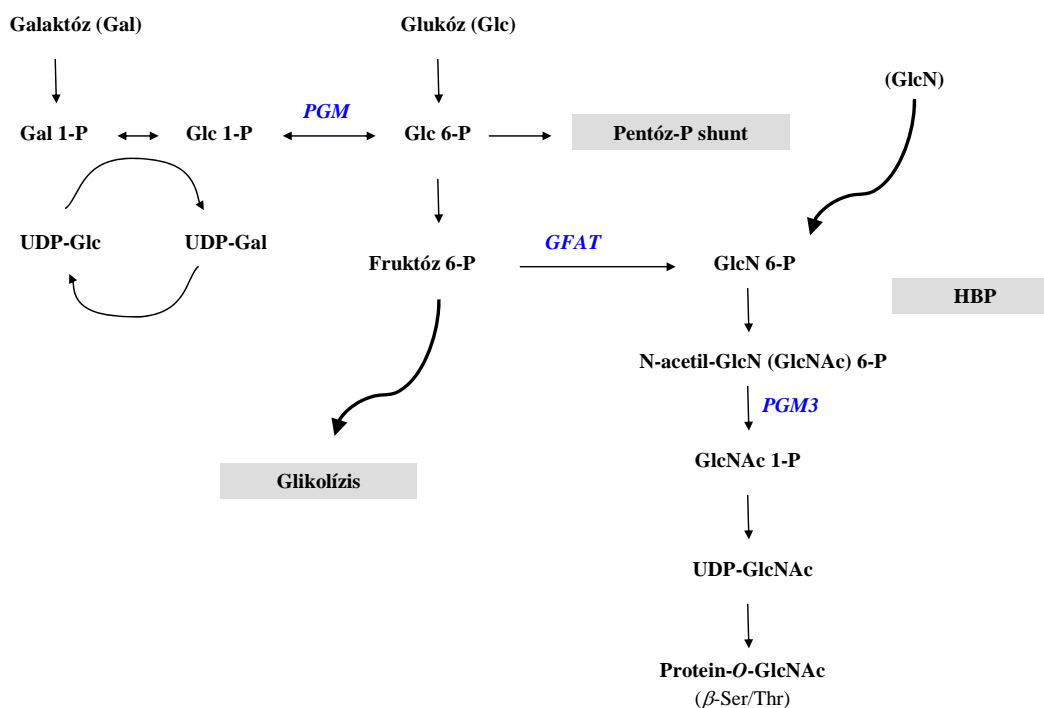
Bevezető

A glükóz elsősorban mint táplálékforrás ismert, az élő sejtben ~90%-a a glikolízisen és a citrát-körön keresztül metabolizálódik, a felszabaduló energiát pedig ATP szintézisére használja fel a sejt. Azonban a glükóz, nemcsak mint energia-raktár hasznosítható, hanem számos egyéb fiziológias és patofiziológias intracelluláris folyamatnak részese, mint például a tápláltsági fok (nutrient sensing) szabályozása [1], diabéteszes komplikációk [2], stressz válasz [3], vagy fehérjék poszt-transzlációs módosítása [4]. Így tehát a glükóz sorsa a sejtekben, szervezetben azért is fontos, mivel az extracelluláris (és a következményes intracelluláris) glükóz koncentrációjának változása - vagyis egy viszonylag egyszerű történés – bonyolult, összefüggő sejtéleti folyamatokat befolyásol, és ezeknek komoly kihatása van a sejtek életére, legyen az akár akut, vagy krónikus esemény.

Ezen hatásokat specifikus és nem specifikus mechanizmusok is mediálhatják: nem-specifikus reakcióra jó példa az AGE-képzés (advanced glycation end-products) [5], specifikus szabályozásra a fehérjék glikozilációja (N- és O-linked N-acetil-glükózamin) [4,6-8]. Kevésbé „szokványos” mechanizmusok is felvetődtek, mint pl. a glikolízis kulcsenzime, a GAPDH RNS kötő kapacitása [9], vagy a glükóz metabolitok szerepe az intracelluláris Ca^{2+} raktározásban [10]. 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 **foszfoglukomutáz enzim** jelátviteli folyamatokban játszott szerepét.

A glükóz főbb metabolikus útvonalai

A glükóz két úton lép a sejt anyagcseréjébe, vagy az extracelluláris térből, glükóz-transzporterek segítségével, vagy pedig endogén glikogén forrásból. Az exogén glükóz sejten belül glükóz-6-P -tá alakul, mely kiindulási pontja egyrészt a glikolízisnek, másrészt a pentóz-foszfát ciklusnak. A glikolízis első lépését a glükóz-6-P izomeráz katalizálja, fruktóz-6-P keletkezik, mely metabolit egy kisebb része belép a hexózámin út-ba (lásd alább), ennek kulcsenzime a glutamin - fruktóz-6P aminosztransferáz (GFAT), nagyobb hányada pedig tovább halad a glikolízisen [11].



1. ábra: Intracelluláris glükóz metabolizmus fontosabb lépései

A glikogén lebomlásakor glükóz-1-P (glc-1P) keletkezik, melynek hasznosításához a *foszfo-glükomutáz* (PGM) enzim jelenléte szükséges, hogy glükóz-6-P-tá (glc-6P) konvertálja. Abban az esetben is szükség van erre az enzimre, ha a táplálékforrás nem glükóz, hanem galaktóz, mivel a galaktóz, galaktóz-1-P-on (gal-1P), majd glc-1-P -on

keresztül lép be a glikolízisbe. A gal-1P és glc-1-P átalakulást hexóz-1-P-uridiltranszferáz végzi, a reakcióhoz szükség van UDP-glükózra, mely UDP-galaktózzá alakul. Mindkét utóbbi metabolit fontos résztvevője a fehérjék poszt-transzlációs, N-típusú módosulásának (1. ábra).

Diabeteses pathomechanizmusok

A tartósan magas vércukorszint elsősorban káros hatásairól ismert, melynek közvetítésében 4 főbb molekuláris mechanizmust tesznek felelőssé, a **poliol utat**, az **AGE-képzést**, a **hexózamin-utat** és a **Protein kináz C (PKC)** aktivációt [2].

- A poliol út feltételezhetően a fokozott oxidatív stressz következtében fejt ki káros hatását, ugyanis az aldóz reduktáz, mely a glükózt szorbitollá alakítja, depletálja a sejt NADPH tartalmát, s ezen keresztül a redukált glutathiont is, így az egyensúly az oxidatív irányba mozdul el.

- Az AGE képzés mind sejten belül, mind extracellulárisan olyan nem-specifikus glikált fehérjéket eredményez, melyek közvetlenül vagy közvetve, jelátviteli folyamatokat beindítva járnak káros következményekkel.

- A glükóz úgyszintén növeli, *de novo* a diacil-glicerol (DAG) szintjét, mely a PKC aktiválásához vezet. A PKC számos folyamat beindítója, csak néhányat felsorolva: csökkenti az endotheliális nitrogén monoxid-szintetáz (eNOS) aktivitását, növekedési faktorok termelődését serkenti (VEGF, TGF- β), NAD(P)H oxidázon keresztül növeli a szabadgyökök (reactive oxygen species - ROS) mennyiségét.

A negyedik mechanizmus az úgynevezett hexózamin-bioszintézis út, mely fő témáját képezi tézisemnek. A bevezetőben röviden ismertette; a glükóz egy kisebb hányada a fruktóz-6-P-on, majd további metabolitokon keresztül, proteinek specifikus O-glikozilációjára használandó fel. Ezek a proteinek funkcionalitásukban szinte a teljes lehetséges palettát lefedik, így jelátviteli útvonalak széles spektrumában is képviseltek

[7]. Tartósan magas glükóz-expozíció az egyensúlyt a fokozott glikoziláció irányába tolja el, és vezet megváltozott, valószínűleg káros folyamatok beindításához (plazminogén aktivátor inhibitor-1(PAI-1) aktiválás, PKC aktiválás, eNOS inhibíció, stb.) [2]. A hexózamin-út valószínűleg az inzulin-rezisztencia kialakulásában is fontos szerepet játszik.

Régóta ismert, és széles körben vizsgált a diabetes hatása az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázisra. Az emelkedett glükóz az intracelluláris Ca^{2+} szabályozásában csökkent szenzitivitást okoz, azaz agonista hatásra a kiváltott Ca^{2+} jel amplitúdója kisebb, szívizomsejtek esetén pl. a szisztolés Ca^{2+} szint alacsonyabb [12-14]. A jelenség magyarázatára számos mechanizmus felmerült (L-típusú csatorna, mitokondriális Ca^{2+} raktározás, Na^+/Ca^{2+} exchanger, SERCA, PKC, stb.), melyek valószínűleg sejttípustól is függően, eltérő mértékben vehetnek részt a folyamatban. A protein O-glikoziláció szerepe szintén felmerült [15-16].

Glükóz szerepe stressz-válaszban

A tartósan magas glükóz-koncentráció káros hatásaival szemben, talán kevésbé köztudott, hogy bizonyos esetekben a magasabb glükóz-szint hasznos, a sejtek túlélése szempontjából előnyös is lehet. Néhány példa:

- Állatmodellekben rövid tartamú hyperglükémia védő hatású ischaemia indukálta arrhythmia kialakulásában, illetőleg az ischaemiát követő apoptózis is csökkent mértékű [17].

- Hyperglükémia úgyszintén protektív hatású ischaemia/reperfúziós kísérletekben, gátolja a Ca-overload kialakulását [18,19,20].

- Intenzív terápiás intézetekben jól ismert az ún. GIK infúzió – azaz **G**lükóz – **I**nzulin – **K**álium -, melynek protektív hatását figyelték meg az akut miokardiális infarktuszok terápiájában [21].

Közelebbről, a hexózamin útra fókuszálva, azt találjuk, hogy a rövid tartamú hyperglükémiához nagyon hasonló hatást fejt ki glükózamin adása: az ischaemiás károsodást csökkentheti, Ca-paradox kialakulását és a kapacitatív Ca^{2+} influxot (CCE- Capacitative calcium Entry) gátolja [20]. (*Ca-paradox*: izolált szív-preparátumban Ca^{2+} mentes pufferrel perfundálva, majd újra Ca^{2+} -ot tartalmazó puffert adva, irreverzibilis károsodás zajlik le, mind funkcionálisan, mind strukturális protein-vesztésben; Ca^{2+} *overload*: az intracelluláris Ca^{2+} túlzott megemelkedése, melyet a sejt nem tud kezelni, és ezért abnormális sejtfunkciókhoz vezet; CCE: lásd alább)

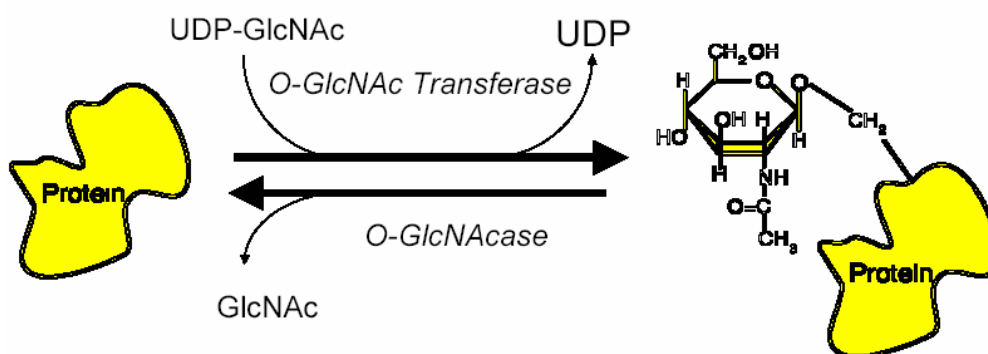
Stressz esetén, vagyis egy olyan állapotban, amikor a sejtek, élőlények számára fokozott igénybevétel, megterhelés lép fel, a rendszer megpróbál kompenzálni és ezért intracelluláris, vagy extracelluláris raktárakból felszabadít glükózt. A fenti példák is alátámasztják azt a logikus elgondolást, hogy a glükóz emelkedése nem csupán a glikolízisen és citrátkörön keresztüli energiatermelésre fordítódik, hanem egyéb mechanizmusokon keresztül, a jelátviteli utakat oly módon befolyásolja, hogy azok összességében a sejt túlélési esélyeit, alkalmazkodóképességét növeljék.

Hexózamin-út

A sejtek által felvett glükóz kb. 2-4%-a lép be a hexózamin útba, a glutamin-fruktóz-6P aminotranszferáz (GFAT) hatására *glükózamin-6P* (glcN-6P) képződik, majd *N-Acetil-D-glükózamin-6P* (glcNAc-6P) és *N-Acetil-D-glükózamin-1P* (glcNAc-1P) – on keresztül *UDP-N-acetil-D-glucózamin-ná* (UDP-glcNAc) alakul [11]. 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 (1. ábra). Az UDP-glcNAc, amellett, hogy szubsztrátját képezi a membránprotein / extracelluláris célra termelődött fehérjék N-típusú glikozilálásának [22], a fehérjék O-típusú glikozilálásának is szükséges alapanyaga [23]. Ez utóbbi poszt-transzlációs módosulás

egyre nagyobb figyelmet kap az irodalomban és a kutatásokban, ugyanis nagyban hasonlít a foszforiláció-defoszforilációs mechanizmushoz, azonkívül egyre nyilvánvalóbbá válik, hogy a jelátviteli folyamatokban a foszforilációhoz hasonlóan nagyon fontos szerepet játszik [6].

Az O-glikoziláció a szerin, threonin aminosavak OH csoportján történik és számos fehérje esetében kompetícióba lép a foszforilációval, vagyis ugyanazon a lokáción vagy foszforilált, vagy O-glikozilált lehet a fehérje. Szintén hasonlít a foszforilációhoz abban, hogy reverzibilis folyamat, továbbá, dinamikusan változó, azaz gyorsan reagál a környezeti változásokra, jelekre. (Pl. 5-10 perces glükózamin kezelés emelkedett O-glikozilációval jár, de hasonló választ okoz stressz, illetve amint a stressz-hatás megszűnik, a sejt regenerálódásával párhuzamosan az O-glikoziláció is visszatér eredeti szintjére [8]).



2. ábra: protein O-glikoziláció; dinamikus, reverzibilis, foszforilációval rokon folyamat

A glikozilációt az O-glcNAc transzferáz (OGT), a de-glikozilációt az O-glcNAc-áz végzi el (2. ábra). Az O-glikozilációt mitogének, növekedési faktorok, a sejtciklus aktuális állapota, sejt-differenciáció befolyásolhatja, ezenkívül akut stressz, és természetesen extracellulárisan megemelkedett glükóz vagy éppen glükózamin [8,24-25]. O-glikoziláció gyakorlatilag elengedhetetlen a sejtek normális működéséhez, az OGT enzimet nélkülöző mutáns egér életképtelen, embrionálisan elhal, de pl. a glükózamin-6P-

acetiltranszferáz (glcN6P → glcNAc6P) hiánya szintén letális, embrionális szövetekből izolált sejtvonalak proliferációja nagyfokban lelassult [26].

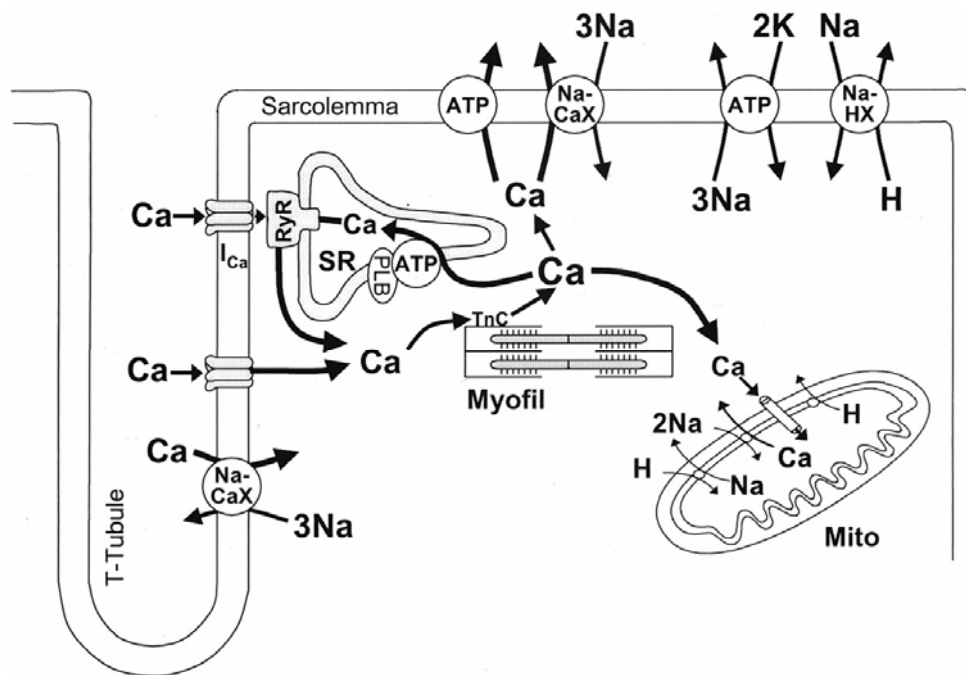
Egyre több fehérjéről fedezik fel, hogy alanya lehet az O-glikozilációnak, így pl. mitogének, növekedési faktorok, sejtciklus és sejt-differenciációt szabályozó fehérjék, stb. Érdekes módon maga az OGT enzim is az O-glikoziláltak közé tartozik [27.]. Csak néhány példa felsorolásszerűen: NF-κB, Annexin, eNOS, αβ-Crystallin, OGT, α-Tubulin, c-myc, HSP70. Az interneten külön predikciós szerver üzemel, ahol a kérdéses fehérje Swissprot azonosítóját, vagy szekvenciáját megadva kiszámolja a fehérje O-glikozilációjának valószínűségét, és ezt a foszforilációval is összehasonlítja [28].

Ca²⁺ szabályozás

Mivel a Ca²⁺ szabályozás megismerése fontos szerepet játszott munkám során, ezért ehelyütt bemutatom a Ca²⁺ sorsát, dinamikáját sejten belül, illetve azokat a szabályozó folyamatokat, melyekben részt vesz. Publikált munkámban bizonyítottuk, hogy az O-glikoziláció szerepet játszhat az izolált szívizomsejtek Ca²⁺ szabályozásában [29], ezért az excitábilis sejtek Ca²⁺ szabályozásáról is szót kell ejtenem.

Lángfotometriásan mérve, azt kapjuk, hogy kb. 1-2 mM-os Ca²⁺ koncentráció található intracellulárisan. Azonban ennek a mennyiségnek elenyésző része található szabadon, 99%-a fehérjékhez kötött, raktárakban helyezkedik el, elsősorban a szarko- vagy endoplazmás retikulumban, másodsorban a mitokondriumokban [30]. ~ 100 nM-os nagyságrendű a bazális, szabad Ca²⁺ szintje, ez az, amit intracelluláris fluoreszcens festékekkel meg lehet mérni élő sejtben (Az ún. Fura2 fluoreszcens festék a legismertebb, ennek általában az –AM, azaz acetoxymetilészter változatát szokták alkalmazni, mely lipidoldékony, bejut a sejtbe és sejten belül észterázok segítségével az AM csoport lehasad és az aktív festék felszabadul. A Fura2 nagy előnye, hogy ratiometrikus, a Ca²⁺ kötött és a szabad állapota más-más hullámhosszon gerjesztődik,

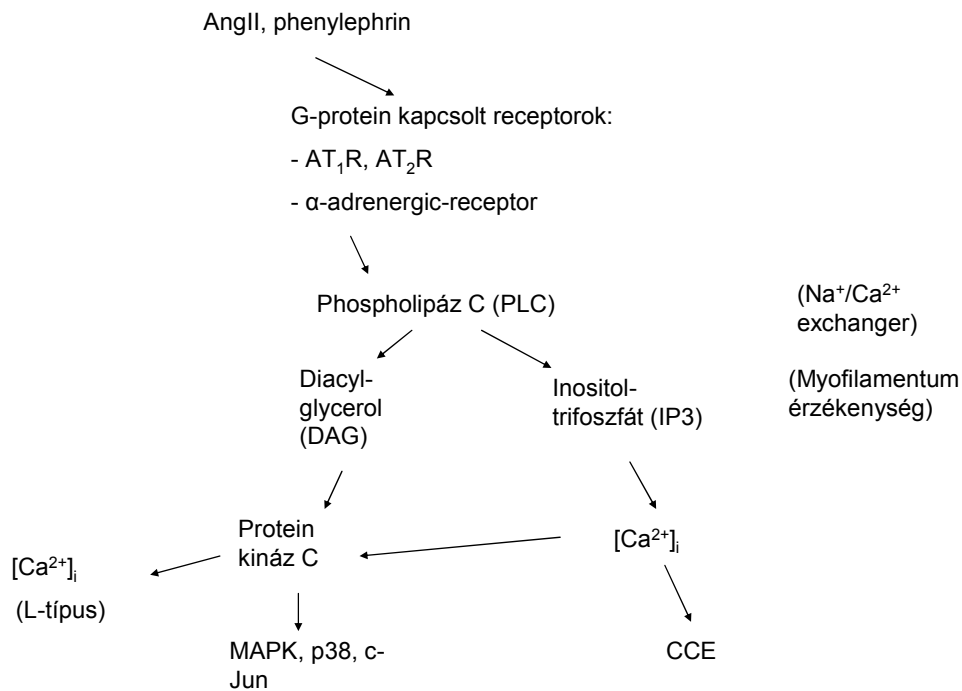
így ezek aránya megadja a Ca^{2+} koncentrációt, és így nem zavar a mérésben a festék koncentrációja). Stimulus hatására körülbelül 1-2 μM -ra emelkedhet a szabad Ca^{2+} . Érdekesség, hogy pl. az excitábilis szívizomsejtek esetén ennél nagyságrendileg több Ca^{2+} jut be egy-egy kontrakciós periódus alatt, de ennek nagy része kötött állapotba kerül (myofibrillumok), a festék számára láthatatlan [30].



3. ábra: Ca^{2+} - szintet szabályozó folyamatok szívizomsejtben. (Forrás: Bers DM.: Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. Circ Res. 87:275-81, 2000.)

Ingerlékeny sejtekben az ún. feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákon áramlik be iniciálisan a Ca^{2+} , majd ezt követően a Ryanodin receptorok közreműködésével a szarkoplazmás retikulum szabadít fel nagyobb mennyiségű Ca^{2+} -ot. Kisebb szerepe van a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger-nek. A citoplazmába bejutó Ca^{2+} elsősorban a myofilamentumokhoz kötődik, melynek eredménye a sejt összehúzódása. A ciklus végén, a Ca^{2+} egyrészt a SERCA (szarko- és endoplazmás retikulum Calcium ATPáz) segítségével visszakerül a szarkoplazmás retikulumba, kisebb részben eltávolítása a

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangeren át az extracelluláris térbe, illetve a mitokondriumokba történik (3. ábra).

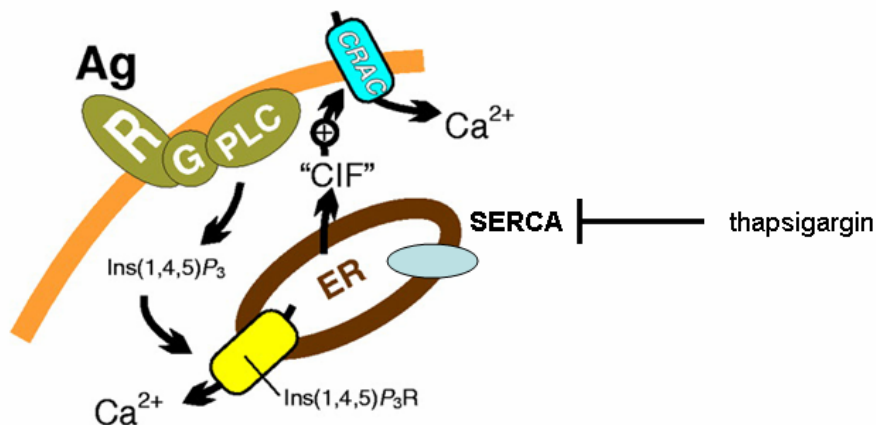


4. ábra: pozitív inotróp agonista által közvetített jelátviteli utak.

Szívizomsejteken is, akár csak más, nem ingerelhető sejteken, megtalálható a receptor közvetítette Ca^{2+} szabályozás (4.ábra). Erre jellemző példa a pozitív inotróp hatású Fenilefrin, illetve az Angiotenzin II, melyek G-protein kapcsolt receptoron keresztül hatnak (α -adrenerg receptor, és AT_1R , AT_2R (Angiotenzin 1-2 receptor)) [31]. A stimulus hatására, a receptor, és G_q protein közvetítésével aktiválódik a foszfolipáz C (PLC), majd diacil-glicerol (DAG) és inozitol-trifoszfát (IP_3) szabadul fel. A DAG aktiválja a protein kináz C-t (PKC), mely számos fehérjén keresztül fejthet ki hatást, elsősorban ezeknek a transzkripcióban betöltött szerepe ismert. Azonban a PKC az L-típusú, feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákra is hat, nem teljesen tisztázott mechanizmussal, így a Ca^{2+} szabályozásban is részt vesz. A másik oldalon, az IP_3 , direkt kapcsolatban van a Ca^{2+} szinttel; a szarkoplazmás retikulumból, IP_3 -receptorok közvetítésével Ca^{2+} -ot szabadít fel [32]. A képet tovább bonyolítja, hogy a 2 út nem független, ugyanis a PKC is

Ca^{2+} függő, így pl. az IP_3 kiváltotta Ca^{2+} emelkedés PKC aktivitás fokozódással is járhat [33].

Régóta ismert jelenség a kapacitív calcium influx (CCE), az irodalomban SOC-nak, store operated Ca^{2+} -entry-nek is nevezik. A jelenség lényege, hogy egy kezdeti, IP_3 kiváltotta Ca^{2+} emelkedés, mely a sejt saját raktáraiból származik, kiegészül egy második, nagyobb Ca^{2+} emelkedéssel, mely extracelluláris térből érkezik [34] (5. ábra). A CCE jól modellezhető kísérletesen a thapsigargin nevű molekula segítségével, mely szelektíven bénítja a SERCA-t, így az nem képes felvenni a citoplazmából a Ca^{2+} -ot, így fokozatos nettó Ca^{2+} emelkedést okozva (az ER valószínűleg folyamatosan 'veszít' Ca^{2+} -ot, mellyel normálisan a SERCA tart egyensúlyt), amely szimulálja az IP_3 kiváltotta kezdeti Ca^{2+} emelkedést CCE esetén.

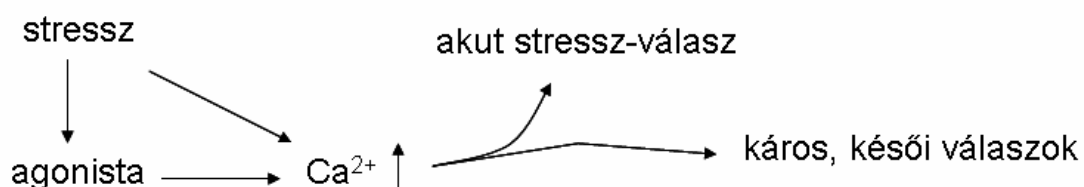


5. ábra: Capacitív Ca^{2+} entry feltételezett mechanizmusa 'CIF' messenger molekula közvetítésével (Forrás: Putney JW Jr, Broad LM, Braun FJ, Lievreumont JP, Bird GSJ.: Mechanisms of capacitative calcium entry. J Cell Sci 114: 2223–2229, 2001.)

Bár a jelenség jól ismert (nem-excitábilis sejtekben az egyik fő folyamat, mely a Ca^{2+} emelkedésért felelős, de újabban ingerelhető sejtekben is leírták meglétét [35-36]), sem a szignál eljutása az ER-ből a plazmamembránig, sem pedig a Ca^{2+} beáramlásáért felelős Ca^{2+} csatorna kiléte nem kellőképpen feltárt. 4 elképzelés alakult ki jelenleg a magyarázatra, ehelyütt röviden csak a calcium influx faktort ismertetném, melynek

vizsgálatával magam is foglalkoztam (5. ábra). Az elmélet lényege, hogy az IP₃, receptorán keresztül, stimulálja az endoplazmás retikulumot, mely egy szolúbilis, kis mólsúlyú molekulát bocsátana ki (calcium influx faktor), és ez az anyag közvetítené a szignált, és aktiválná a plazmamembránban található Ca²⁺ csatornákat [37]. A mai elképzelés szerint ezek a csatornák valószínűleg a TRPC (transient receptor potential channel) családba tartoznak [38].

Mint a fentiekből is kiderül, a Ca²⁺ szabályozása meglehetősen összetett és bonyolult szabályozási folyamat. Ennek fontossága azért is olyan nagy, mivel a Ca²⁺ szerepe nem merül ki abban, hogy részt vesz az excitációs-kontrakciós mechanizmusban, hanem számos egyéb intracelluláris Ca²⁺ függő folyamat létezik. Közvetíti az akut inotróp választ, génexpressziós változásokat indukál, apoptózist, hipertrófiát okozhat magas szintje, sejtproliferációt szabályozza, metabolikus enzimeket befolyásol. Néhány molekuláris célpontja a Ca²⁺-nak: kalmodulin és kalmodulin regulálta kinázok [39], calcineurin [40], PKC és MAP kinázok [41], cPLA2 [42], proteázok, kaszpázok [43].



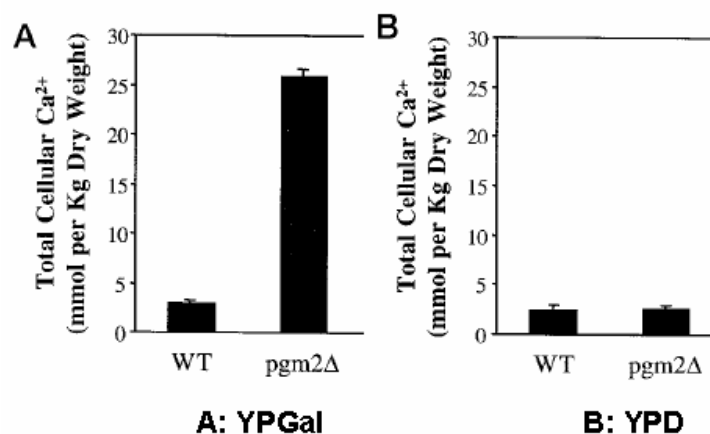
6. ábra

A stressz okozta Ca²⁺ hatást leegyszerűsítve a 6. ábra mutatja be szemléletesen: akut stressz hatására, közvetlenül, vagy agonistákon keresztül közvetve, intracelluláris Ca²⁺ emelkedés keletkezik, mely kezdetben természetesen szükséges és hasznos, hisz a sejt ezáltal képes lesz megfelelni a fokozott igényeknek. Azonban, ha akár a stressz, akár a Ca²⁺ emelkedés tartósan magas lesz, kialakulnak a Ca²⁺ által közvetített, fent említett káros folyamatok (apoptózis, hipertrófia, stb.). Munkám során arra kerestem a

választ, hogy a fenti bonyolult Ca^{2+} szabályozási folyamatokra, kiemelten stressz állapotban, van-e befolyása a glükóz metabolizmusnak, és ha igen, hogyan, milyen útvonalakon keresztül teszi ezt.

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 [44-45] (7. ábra).



7. ábra: intracelluláris Ca^{2+} felszaporodás *pgm2* (a PGM aktivitás 90%-áért felelős izoforma) deletált élesztőben, kizárólagosan galaktózból származó táplálékforrás esetén. (Forrás: Tokes-Fuzesi M et al.: Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component *Mid1p* are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 44:1299-308, 2002.)

Fontosságát jelzi az is, hogy míg a galaktóz metabolizmus legtöbb enzime aránylag alacsony kópiaszámban van jelen, s transzkripció aktiválásuk csak galaktózra jön létre, addig a PGM csak csekély mértékben indukálható [46], de állandóan, viszonylag magas

kópiaszámban van jelen. Ugyancsak jellemző, hogy míg a galaktóz metabolizmusában jelentős galaktokináz, epimeráz és dehidrogenáz enzimek defektusai a galaktozémia ismert formáihoz vezetnek, addig PGM estében csak sporadikus közlemények vannak arról, hogy mutációja az aktivitás csökkenésén át megbetegedéshez vezethet [47-48]. Ennek oka lehet az, hogy a legtöbb fajban több mint egy PGM izoenzim létezik. Ezeknek az együttes sérülése viszont letális következményű [49-50]. 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 [51]. Ez valószínűleg a PGM3 izoenzim aktivitásának is köszönhető. A PGM3, másnéven foszfoacetilglükózamin-mutáz egyrészt rendelkezik klasszikus PGM aktivitással, másrészt az $\text{glcNAc-6P} \rightarrow \text{glcNAc-1P}$ átalakulást katalizálja (1. ábra), ami a hexózamin út fontos lépése [52]. A PGM3 nagyfokú szekvencia homológiát mutat a PGM-el, azonkívül akárcsak a PGM, működéséhez Mg^{2+} -t igényel [53].

Irodalomban ismert, hogy Li^+ hatására a foszfoglükomutáz enzim gátlódik [54]. 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.

További kutatásaink elsődleges célja annak felderítése, hogy akár a hexózamin-út, akár a foszfoglükomutáz aktivitás változásai miként vezetnek megváltozott Ca^{2+} jelátvitelhez. Egy további vetülete a Li^+ kutatásban való felhasználásának a fent említett hexózamin-út befolyásolása. A PGM3 enzim nemcsak, hogy nagyfokú szekvencia homológiát mutat a foszfoglükomutázzal [52], de egyben Mg^{2+} kötőhellyel is rendelkezik, s mivel feltehetőleg a Mg^{2+} - Li^+ kompetíció okozza a Li^+ gátló hatását foszfoglükomutázon, ezen enzim is célpontja lehet a Li^+ -nak.

Kérdésfelvetés

Munkánk során a következő fő kérdésekre kerestük a választ:

a.)

1. 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?

2. 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.

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

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

b.)

1. Lehetséges-e Li^+ segítségével a PGM enzim-aktivitást blokkolni in vivo?

2. Li^+ - mal kezelt betegekben megfigyelhető-e PGM aktivitás változás?

3. 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 állatok dekapitálása után a feltárt mellkasból eltávolítottuk a szívet, ügyelve arra, hogy főként a szív apex-e kerüljön megtartásra, az érképletek és a pitvarok eltávolításával. A szíveket $\sim 1 \text{ mm}^3$ darabokra aprítottuk, majd 0,012%-os kollagenáz (Worthington, Type II) oldatba helyeztük és 37%-os vízfürdőben inkubáltuk. Az első 15 perces inkubálást követően a szupernatánst eldobtuk, és friss, 0,025%-os kollagenáz oldattal pótoltuk. A következő 15 perces inkubálás végén a sejtszuspenziót centrifugacsőbe gyűjtöttük, üleptítettük és a sejteket FBS-ben reszuszpendáltuk. A visszamaradó szívizmot további kollagenáz emésztésnek vetettük alá. Ezt a lépést körülbelül 3-4-szer ismételtük meg. Az így izolált sejtszuspenziót 1 közös pool-ba gyűjtöttük, újabb centrifugálás és egy $70 \mu\text{m}$ -es pórusméretű szűrőn való filtrálás után ún. 'overnight médiumban' reszuszpendáltuk (DMEM:M199 (4:1) + 15% FBS + penicillin (100 U/mL) + streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$) + arabinose C (10 μM)). A tervezett kísérlettől függően, kollagénnel fedett petri-csészékbe vagy olyan fedőlemezekre öntöttük a sejtszuspenziót, melyekre kamrákat helyeztek el (chambered coverslips). A sejtsűrűség $\sim 1 \cdot 10^6/\text{mL}$ -on volt, $\sim 80\text{-}90\%$ élő sejttel. Ez a sejtsűrűség elegendő volt ahhoz, hogy a kitapadó cardiomyocyta összefüggő hálózatot alkossanak és spontán, ritmusosan kontraháljanak. 24 óra múltán, a médiumot lecseréltük szérumentes médiumra, mely azonban tartalmazott 2% Nutridoma (Roche) szérumhelyettesítő oldatot. Általában a primer cardiomyocyta kultúra 1 hét-10 napig volt fenntartható, másnaponként friss médium cseréjével.

A **Jurkat** sejtvonalat (forrás: PTE Immunológiai és Biotechnológiai Intézet) glükózmentes RPMI-1640 médiumban tenyésztettük, a kísérleti körülményektől függően 5-10 mM glükózzal vagy galaktózzal egészítettük ki, illetve 1-4 mM LiCl –dal vagy MgCl₂ –vel. A médium szintén tartalmazott 7,5% fetal bovine szérumot, és penicillint (100 U/mL), streptomycint (100 µg/mL). Az ionmérések előtt a médiumot lecseréltük szérummentes RPMI-re, hogy a szérum ionkoncentrációi ne zavarjanak a mérési eredményekben (pl.: Mg²⁺).

Állatkísérletek:

140–160g-os hím Whistar patkányokat használtunk, az állatok normál táplálékot kaptak. 1-1 kísérleti kondíciót legalább 4 állat reprezentált. A Li⁺ -kezelt állatok 2 héten keresztül 20 mM LiCl-ot kaptak, az ivóvizükben adagolva. A kezelés végén, éteres altatást követően a leölt állatokból perifériás vért, szív-, izom-, máj- és agyszövetet izoláltunk. A szöveteket folyékony N₂-ben fagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk felhasználásig, vagy azonnal feldolgozásra kerültek.

Humán minták:

Fehérvérsejteket gyűjtöttünk önkéntes egészségesektől, és bipoláris betegek két csoportjától (Li⁺ -mal legalább 1 évig kezelt vagy nem kezelt). Random módon választottunk ki 6 alanyt minden csoportból.

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. Az inkubálás végén, a felesleges, extracelluláris fluoreszcens festék eltávolítása érdekében 3-szoros mosás

következett. A végső puffer szintén HBSS volt, 1.2 mM CaCl_2 -ot és 1.0 mM MgSO_4 -ot tartalmazott. Ezen pufferbe adagoltuk az egyes kísérleteknek megfelelően a glükóزامint vagy egyéb inhibitorokat, reagenseket.

A fluoreszcens fényképek 37 °C-on, egy Olympus IX70 invertált mikroszkóp segítségével készültek. Az alkalmazott excitációs hullámhossz 488 nm míg az emissziós filter 524 nm-es volt. Annak érdekében, hogy gyors, Ca^{2+} eseményeket, változásokat is láthassunk, 100 miliszekundumos sorozat-felvételek készültek, összesen 30 másodperces időtartamig. A fluoreszcens intenzitást, mivel a festék nem ratiometrikus, normalizálni kellett, ezt a kezdeti, "diasztolés" értékre vonatkoztattuk, így a fluoreszcenciát F/F_0 értékben fejeztük ki. Az adatok és képek kinyerésére és értékelésére IPLab (v3.6 Scanalytics) és ImageJ (v1.29, NIH) szoftvereket használtunk.

Western blot:

Szuszpenzióba hozott (ún. cell-scrapet-rel, vagy tripszin-EDTA-val) cardiomyocytákat vagy Jurkat sejteket jéghideg PBS-ben mostunk majd egy módosított RIPA pufferben (10 mM Tris (pH=7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate) 5% protease inhibitor cocktail-t (Sigma) tartalmaz) feltártunk. A feltárás ugyancsak 0 °C-on, 30 percig tartott, 5 percenként vortexelve. A feltárás végén egy 10 perces, 14000g-s centrifugálással elválasztottuk a felülúszót, míg a pelletet eldobtuk. A Protein koncentrációkat a Bio-Rad Dc Protein Assay Kit-jével mértük meg. Elektroforetikus elválasztásra 7.5% SDS-PAGE gélt használtunk, majd PVDF membránra (Millipore) transzferáltuk a mintákat. A transzfer előtt, a minták egyenlő mennyiségű feltöltését a Bio-Rad Zink staining kit-jével ellenőriztük, mellyel reverzibilisen lehet festeni géleket, ezáltal nem volt szükség külön, párhuzamos futtatásra. A PVDF membránra transzferált mintákat ún. CTD110.6, monoklonális egér IgM antitesttel jelöltük, mely antitest specifikus az O-glikozilált

proteinekre, kazein blocking pufferben. A CTD jelölés vizualizálására másodlagos, HRP konjugált anti egér IgM ellenanyaggal jelöltük meg a blottot. Pico chemiluminescent szubsztrát (Pierce) segítségével, UVP BioChemi System (UVP) géldokumentációs rendszerrel detektáltuk és analizáltuk a lumineszcens jeleket.

Immunfluoreszcens mikroszkópia:

A fent említett fedőlemezekre kitapadt sejtek, mosást és különböző kísérleti követelményeknek megfelelő kezeléseket követően 3% formaldehid/PBS –ben, 45 percig fixálódtak, majd újabb PBS-es mosást követően 0.5% Triton X-100/PBS –ben, 2 percig permeabilizáltuk. Rövid PBS-s mosás után 5% BSA/PBS -ben 5 percig blokkoltuk, majd 1:200 hígítású CTD110.6 antitesttel inkubáltuk, szintén 5% BSA/PBS jelenlétében, 30 percen át, 37 °C-on. Újabb mosást követően, szintén 1: 200 hígítású másodlagos antitesttel való inkubálás következett (Alexa-fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgM (Molecular Probes)) 5% BSA/PBS-ben, 30 percen át, 37 °C-on. Végül, a fedőlemezek, a felesleges másodlagos antitest lemosása után egy tárgylemezre lettek rögzítve, 9:1 glycerol/PBS oldatban. Az adatok és képek kinyerésére és értékelésére szintén IPLab (v3.6 Scanalytics) és ImageJ (v1.29, NIH) szoftvereket használtunk.

HPLC mérések:

Körülbelül $1-2 \cdot 10^6$ cardiomyocytá sejtet használtunk fel mérésenként. Miután szuszpendáltuk, jéghideg PBS-ben mostuk, majd a sejteket precipitáltuk 0.3 M-os perklórsavban (PCA). Alapos vortexelés és centrifugálás után (a szupernatánst vittük tovább), a PCA extrahálására kétszeres térfogatú, 1:4 arányú trioktilamin:freon keveréket használtunk. Ez egy igen egyszerű és gyors procedúra, mivel a PCA az apoláris fázisban koncentrálnak, így a vizes fázist pipettával óvatosan leszívva, a minták készek a HPLC-oszlopra való injektálásra (illetőleg egy 0,2 µm-es pórusátmérőjű

filtrálás szükséges az oszlop védelme érdekében). A mintákat egy 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 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ koncentráció és párhuzamos 2.8 - 3.7-es pH grádiens). Ezzel a módszerrel a nagyon hasonló UDP-glcNAc és az UDP-N-acetyl galactosamine (UDP-GalNAc) nem választható teljesen szét, ezért az eredményeket UDP-hexNAc formájában fejeztük ki, mely az összege az UDP-glcNAc-nak és az UDP-galNAc-nak. Cardiomyocytákban az UDP-glcNAc / UDP-galNAc arány körülbelül 3:1.

Adatelemzés:

Az adatok átlagokban lettek kifejezve, a mérési hibát standard error formájában tüntettük fel. Összehasonlító elemzéseket Students T-teszttel végeztünk és statisztikailag szignifikáns eltéréseket $P < 0.05$ esetén fogadtunk el.

Szérum- és szöveti ionok mérése:

A szövetek nedves súlyának lemérése után, súlyállandóságig szárítottuk vákuum alatt, és a száraz súlyt is lemértük. Ezután 1 M sósav, 1:4 térfogatarányú hozzáadásával tártuk fel a mintákat, majd 24 órás inkubálás után a lecentrifugált minta felülúszójából Li^+ , Mg^{2+} , és Ca^{2+} ionkoncentrációkat mértünk. A mérést Varian AA-20 atomabszorpciós spektrofotométeren végeztük Li^+ és Mg^{2+} -ra, míg a Ca^{2+} -ot Eppendorf Efox 5053 lángfotométeren mértük. Az ionkoncentrációkat mmol/ kg sejtvíz –ben adtuk meg.

Intracelluláris szabad Mg^{2+} szint mérése:

Jurkat sejteket 24 óráig RPMI-1640 médiumban, 0-4 mM LiCl vagy MgCl_2 hozzáadásával 24 óráig inkubáltunk. HBSS mosást követően, a sejtek mag-Fura2-AM

(Molecular Probes) fluoreszcens Mg^{2+} indikátor-festékekkel lettek feltöltve 30 percen át. Az ionkoncentrációk mind a mosási, mind a festék-feltöltési fázisban végig állandóak maradtak, az adott kísérleti kondícióknak megfelelően. Perkin-Elmer fluoreszcens spektrofotométeren mértük meg az intracelluláris szabad Mg^{2+} koncentrációt, 37°C-on. A Mg^{2+} koncentráció a következő egyenlettel számoltuk ki: szabad Mg^{2+} koncentráció = $K_d \cdot (F_{min}(L2)/F_{max}(L2)) \cdot [(R-R_{min})/(R_{max}-R)]$.

Glc-6-P és Glc-1-P szintek mérése:

Kb. 0,25 - 0,5g, folyékony N_2 -ben fagyasztott szöveti mintákat 1 mL 4% -os perklórsavban homogenizáltunk. A homogenizátumot 10 perces, 15000 g centrifugálással üleptítettük, 0,2 mL felülúszót kivettünk, és 1 N -os KOH- val neutralizáltuk. A Glc-6-P és Glc-1-P mérések Bergmayer [55] szerint történtek. Mivel sok minta tartalmazott Li^+ -ot, a Mg^{2+} koncentrációt megemeltük 5 mM- ra. Azt találtuk, ezen feltétel mellett a mintákban található legmagasabb Li^+ koncentrációk sem zavarták szignifikánsan a Glc-6-P, Glc-1-P méréseket.

PGM aktivitás mérés:

A szöveti mintákat 5 mL homogenizáló pufferben (20 mM MES-TRIS pH 6.5, 140 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM PMSF), 0 °C -on késes homogenizátorral feltártuk. A humán fehérvérsejteket perifériás vérből, Percoll-lal izoláltuk, majd 1 mL homogenizáló pufferben Dounce homogenizálóval tártuk fel.

A mintákat lecentrifugáltuk (10,000 x g, 0 °C, 10 perc), majd a szupernatáns protein koncentrációját Bradford szerint megmértük. A PGM aktivitás [55] meghatározása a következő reakciós elegy segítségével történt: 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM NADP, 0.7 μ l Glc-6-P-dehidrogenáz (350 U/ml), 5 μ l minta. A reakciót 12.5 mM Glc-1-P hozzáadásával indítottuk be. A minták 200-szoros végső hígítása gondoskodott arról, hogy a Li^+

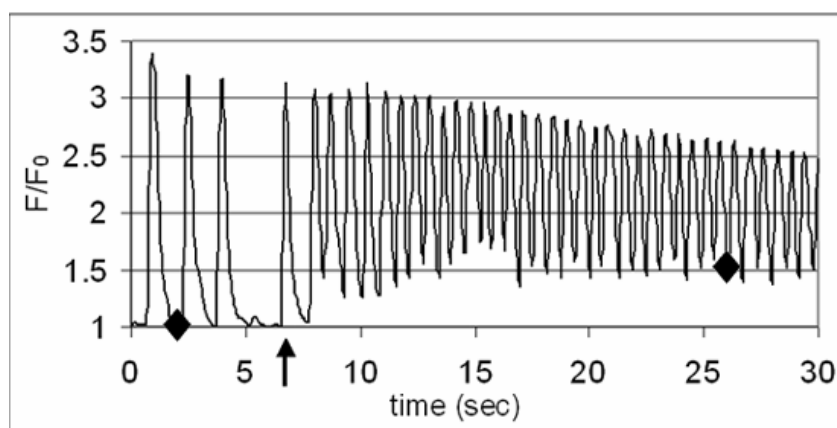
reverzibilis gátlása alól felszabaduljon a PGM enzim. Az aktivitást PGM U/g protein egységben fejeztük ki.

PGM mRNS expresszió meghatározása:

Real-time **relatív** polimeráz lánc-reakció (PCR) esszé-t használtunk a humán fehérvérsejtek PGM mRNS szintjeinek mérésére. Az RNS extrakció QIAamp RNA Blood Mini Kit-tel (Qiagen) történt, majd AMV reverz transzkriptáz (Roche)-zal cDNS-ra írtuk át a mintát, melyet azután Real-time PCR (Roche LightCycler) során amplifikáltunk és detektáltunk. A génszakasz, melyet amplifikáltunk: 262-bázispár, humán PGM1 gén (GenBank accession number: XM_001442), a következő primereket használtuk: forward: 5'-AGATCGTGACAGTTAAG-3'; reverse: 5'-TGTCGGATAACCAAGC-3'. Fluoreszcens detektálás 2 szekvencia-specifikus hibridizációs próbával történt, ún. FRET –azaz fluoreszcencia rezonancia energia transzfer módszerrel: 5'-CGGGTGAAGGTGTTCCAGAG-(fluorescein)-3' és 5'-(LC-Red-640) GCGCCAACTA CGCGGA-(phosphate)-3'. Referencia géneként a humán porfobilinogén deamináz (PBGD) mRNS használtuk, parallel a PGM meghatározással. 20 µl reakciós térfogatban, 0.3 µmol/l primer és 0.2 µmol/l fluoreszcens próba –koncentrációkat alkalmaztunk. A reakciót 40 ciklus után állítottuk le. Relatív kvantifikációt a PGM mRNS / PBGD mRNS arány felhasználásával adtuk meg.

Eredmények és megbeszélés

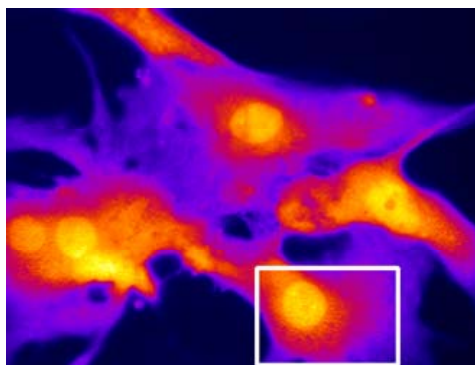
A bevezetőben említett korábbi eredmények és mások publikációi alapján joggal feltételeztük, hogy a hexózamin út befolyásolja a sejt stressz állapotának kimenetelét, ezért megvizsgáltuk egyrészt a Ca^{2+} -homeosztázisban betöltött szerepét, másrészt, a hexózamin úton belül, az O-glikoziláció $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -szabályzásban való részvételére fókuszáltunk. Ennek érdekében stressz szignál kiváltására az Angiotensin II –t használtuk. Az Angiotensin II pozitív inotróp hatású, azonkívül hipertrófiát és apoptózist is indukálhat. A két utóbbi hatása viszonylag könnyen érthető, hiszen mind az AngII által okozott magasabb Ca^{2+} , mind a PKC aktiválás indukálhat génexpressziós változásokat. A pozitív inotróp hatás kevésbé egyértelmű, egyrészt lehet az IP_3 okozta Ca^{2+} emelkedés, de felmerült a Na^+/H^+ és $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, azonkívül a PKC –függő, L-típusú – feszültségfüggő – Ca^{2+} csatornák szerepe is [56-58] (4. ábra). Valószínűleg az egyes folyamatok kontribúciója más és más különböző fajok esetén [30], sőt izolált szívizomsejtek esetén az állat kora (újszülött vs. felnőtt) és a sejt kultúrában az idő előrehaladtával bekövetkező morfológiai változások is befolyásolhatják az egyes mechanizmusok szerepvállalását [59].



8. ábra: Jellegzetes intracelluláris Ca^{2+} oszcilláció izolált szívizomsejtkben és fokozódása $1 \mu\text{M}$ AngII agonista (\uparrow) hatására.

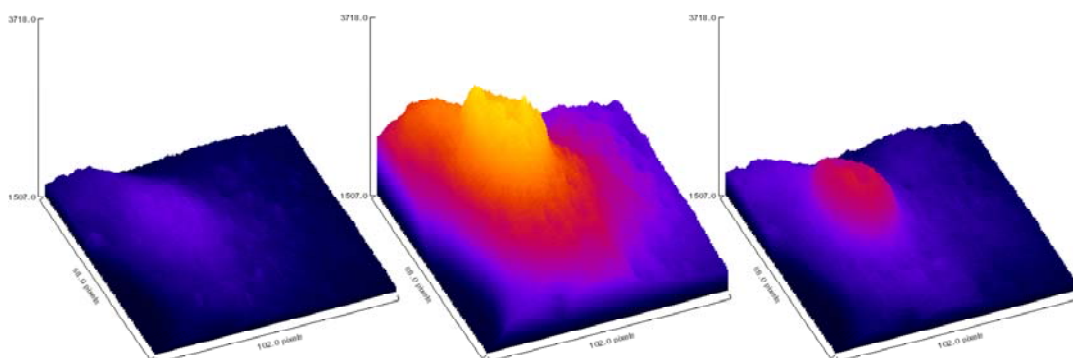
A folyamat bonyolultsága miatt ezért elsősorban az AngII kiváltotta bazális (vagy 'diasztolés') Ca^{2+} emelkedésre fókuszáltam (8.ábra), mely leginkább tekinthető IP_3 hatásnak, és a pozitív inotróp hatást csak abból a szempontból vettem figyelembe, hogy a glükózaminnak vagy egyéb inhibitornak van-e a 'szisztolés' Ca^{2+} -csúcsra vagy az AngII frekvencianövelő hatására befolyása.

Bár nem tartozik szorosan a témához, egy érdekes megfigyelést is tettem kísérleteim során: a sejtmag, térfogatához képest diasztolében feltűnően kevés Ca^{2+} -ot tartalmaz (a mikroszkópos képen nem különül el, holott egyenletes Ca^{2+} és festékeloszlást feltételezve, nagyobb keresztmetszete miatt erősebb jelet kellene adjon). Azonban, az excitációs – kontrakciós ciklus beindulásakor a sejtmag „feltöltődik”, élesen elkülönül a citoplazmától, diasztolé alatt pedig valamelyest késéssel ürül ki, a sejt többi részéhez képest (9. ábra).



Ca^{2+} intracelluláris eloszlása szívizomsejtekben:

1. Diasztole,
2. Szisztole,
3. Diasztole AngII kezelés után

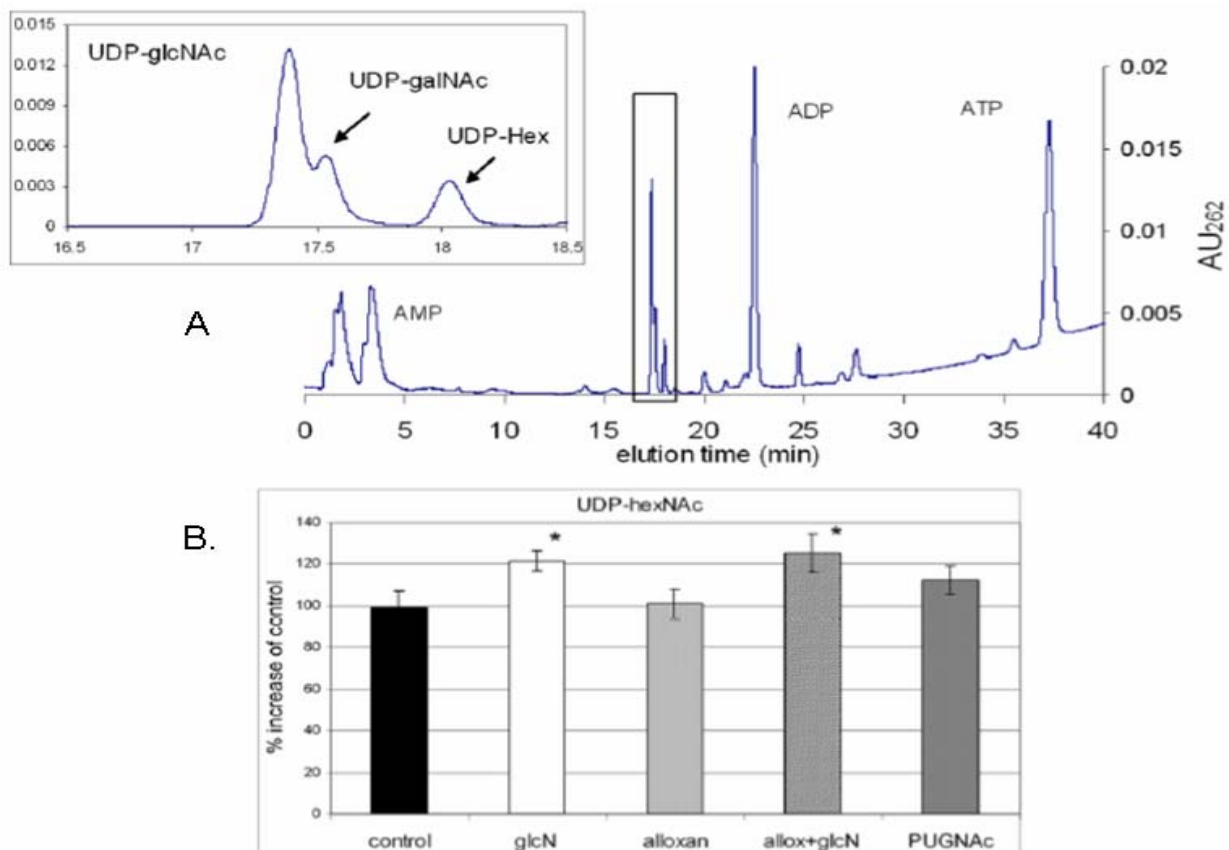


9. ábra: Ca^{2+} koncentráció lokális eloszlása és dinamikája izolált szívizomsejtekben. Diasztolében a nucleus nem elkülöníthető, relatíve alacsony Ca^{2+} koncentrációt tartalmaz, szisztolé, vagy agonista indukálta aktiváció esetén, azonban Ca^{2+} szintje megemelkedik.

Ugyancsak megfigyelhető egy relatíve magasabb diasztolés szint AngII adása után. Tehát a magasabb nukleáris Ca^{2+} , mely, mint fent részleteztem - számos jelátviteli utat és génexpressziót befolyásol, ily módon is kifejtheti hatását. Néhány irodalmi hivatkozást találtam csak, mely hasonló jelenséggel foglalkozna, ezekben elsősorban a perinukleáris Ca^{2+} raktárakat, és azok IP₃ receptor lokalizációját vizsgálták [60-61]. Magam sajnos nem rendelkezem elegendő adattal, hogy akár csak becslést is adhassak, milyen mértékben felel a magasabb Ca^{2+} -ért a fokozott frekvencia következtében jobban érvényesülő, lassú sejtmag-relaxáció, és milyen mértékben az IP₃ okozta bazális Ca^{2+} -szint emelkedés, vagy éppen ezek egymásrahatása, az azonban figyelemreméltó, hogy elsősorban glükózamin előkezelt sejtekben láttam feltűnően alacsony diasztolés nukleáris Ca^{2+} szinteket.

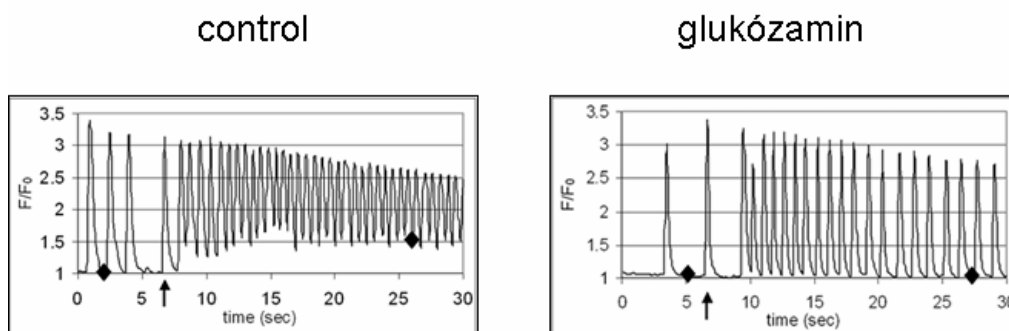
Glükózamin moduláló hatása AngII kiváltotta stresszben:

A hexózamin út vizsgálatára az egyik legegyszerűbb eszköz, ha a sejtekhez glükózamint adunk. 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. **Viszonylag rövid, 5-10 perces glükózaminkezelés megemeli az UDP-glcNAc szintjét (10. ábra). Az UDP-glcNAc pedig, feltehetően feleslegben levő szubsztrátként együtt jár az OGT fokozott aktivitásával és az ennek következtében kialakuló magasabb protein asszociált O-glcNAc szinttel (15. ábra).**



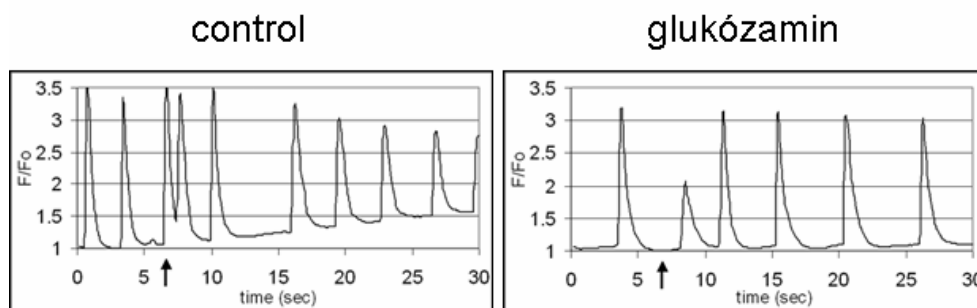
10. ábra: UDP-hexNAc mérése HPLC-vel. A: Szívizomsejtekből perklórsavval extrahált minta kromatogramja, 262 nm-es abszorpciós hullámhosszon detektálva. B: Szívizomsejtek UDP-hexNAc (UDP-glcNAc + UDP-galNAc) szintjei. glcN: 10 perces, 5 mM glükózamin kezelés, alloxan: 45 perces, 2.5 μ M alloxán kezelés, allox+glcN: 45 perces alloxán kezelés, az utolsó 5 percben glükózaminnal is kiegészítve, PUGNAc: 45 perces, 100 μ M PUGNAc kezelés.

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 (ha nem is kontrahált alaphelyzetben a szívizomsejt, AngII hatására beindult), másrészt enyhe szisztolés emelkedés, harmadrészt pedig szignifikáns diasztolés Ca^{2+} emelkedés zajlott le. Glükózamin elsősorban a bazális Ca^{2+} emelkedést akadályozta meg, szignifikánsan (11. ábra).



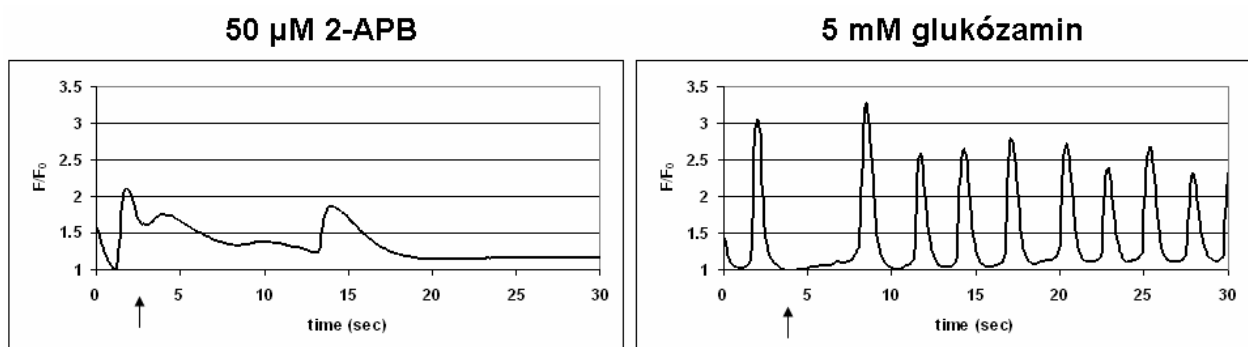
11. ábra: 10 perces glükózamin előkezelés megakadályozza az AngII diasztolés Ca^{2+} emelő hatását.

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 úgyszintén, meglehetősen hatékonysággal blokkolta (12. ábra).



12. ábra: 10 perces glükózamin előkezelés megakadályozza a Thapsigargin diasztolés Ca^{2+} emelő hatását.

Nem zárhatjuk ki, hogy a glükózamin más útvonalon is módosítaná a Ca^{2+} választ, az azonban valószínűnek tűnik, hogy a CCE-t blokkolja, anélkül, hogy az L-típusú csatornákat gátolná. Összehasonlításképp, az ún. 2-APB-t, mely többé-kevésbé specifikus CCE inhibitornak lett elfogadva [62], nem tudtam olyan effektív koncentrációban alkalmazni, hogy a spontán excitációt szintén ne blokkolta volna. Ezzel szemben a glükózamin szemmel látható változást nem okozott a sejtek kontrakciós képességében (13. ábra).

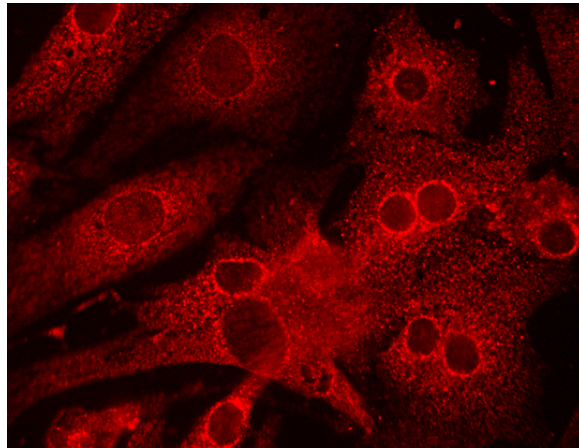


13. ábra: *Glükózamin nem befolyásolja az L-típusú, feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák működését. ↑: 2-APB, illetve glükózamin adásának pillanata.*

O-glikoziláció moduláló hatása Angli kiváltotta stresszben:

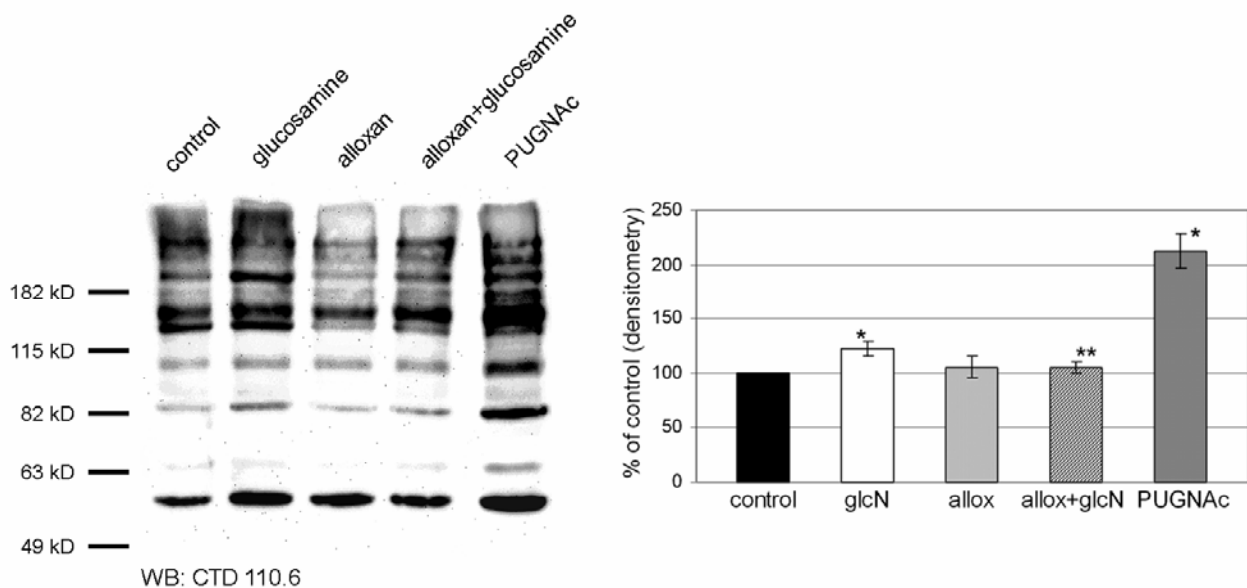
Fenti eredmények alapján a glükózamin, azaz a hexózamin út szerepét a Ca^{2+} szabályozásban megalapozottnak találtuk, de felmerült a kérdés, vajon hogyan és melyik eleme felelős a szabályozásért. Rövid, 5-10 perces glükózamin kezelést követően megemelkedik a hexózamin metabolitok szintje, a glcN-6P [63], az UDP-glcNAc (10. ábra B) és az O-glikoziláció. Az O-glikoziláció-t közelebbről megvizsgálva, azt találtam, hogy cardiomyocytákban is jelentős mennyiség van jelen alapállapotban is, immunfluoreszcens képre jellemző a granuláris elrendezettség, perinukleárisan magasabb intenzitással, és ami más sejtektől eltér: nukleárisan alig látható O-glcNAc

asszociált protein (14. ábra). Ez utóbbi magyarázata talán az lehet, hogy normál sejt kultúráktól eltérően, a cardiomyocyták osztódásra képtelen sejtek.



14. ábra: Izolált szívizomsejtek CTD110.6 (O-glcNAc ellenes) antitesttel jelölt, jellegzetes morfológiájú immunhisztológiai képe.

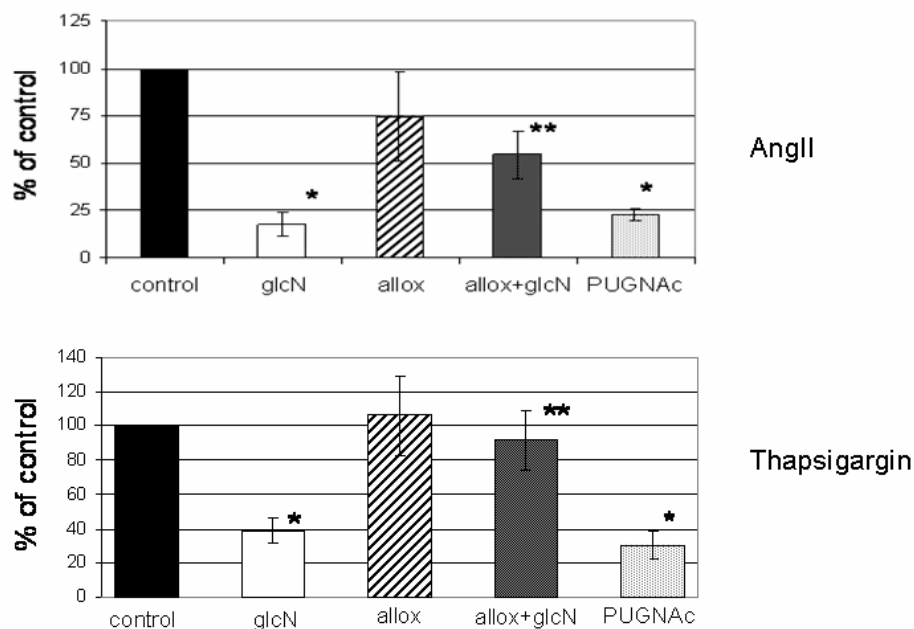
Western-blottal szignifikánsan magasabb O-glikozilációt mértünk, 5 mM-os, 10 perces glükózamin kezelés után (15. ábra). Számos protein bizonyult O-glcNAc asszociáltnak, melyek legtöbbször O-glikoziláltsági foka szignifikánsan emelkedett glükózamin adását követően.



15. 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. * : szignifikáns különbség a kontrolhoz képest ($p < 0,05$) ** : szignifikáns különbség a glcN-nal kezelthez képest ($p < 0,05$)

Azt bizonyítandó, hogy az O-glikoziláció direkt hatása felelős a glükózamin Ca^{2+} homeosztázis modulálásáért, specifikus inhibitorokat használtunk. Az alloxán az OGT enzimatis aktivitását gátolja [64], a PUGNAc (O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)-amino-N-phenylcarbamate) pedig az O-glcNAc-át **gátolja** (15. ábra) [65]. 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; a 10/B. ábrán látható, hogy nem okozott szignifikáns eltérést egyik inhibitor sem. Így elmondhatjuk, hogy amennyiben az AngII hatást módosítani képesek, az elsősorban a specifikus O-glikoziláción keresztül érvényesül.

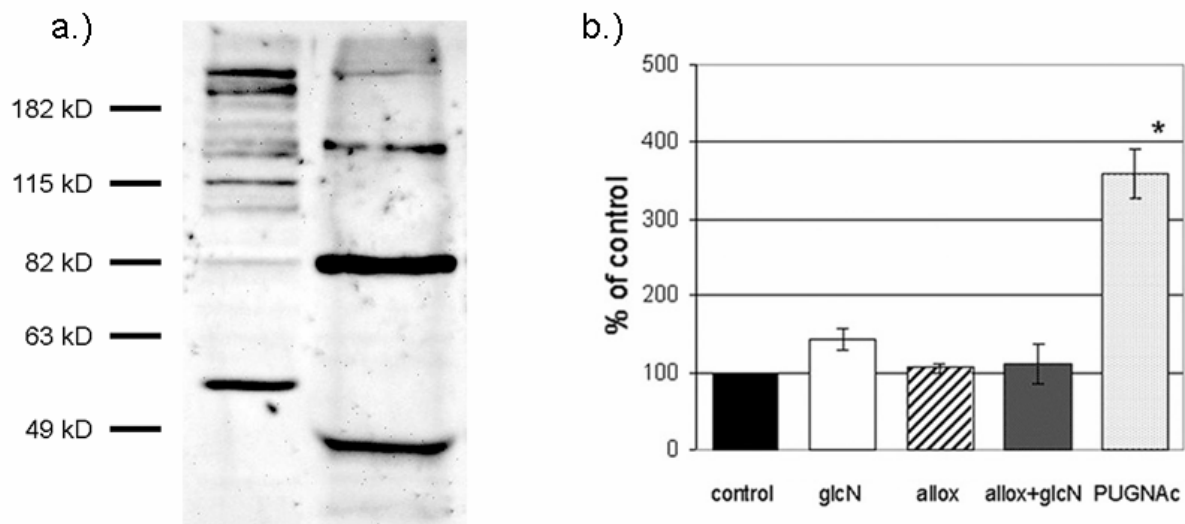


16. ábra: Relatív diasztolés $[Ca^{2+}]_i$ - szint emelkedés, (a kontrol AngII vagy Thapsigargin kiváltotta Ca^{2+} -szint emelkedése 100%). AngII illetve Thapsigargin a Ca^{2+} megemelkedését okozta, melyet mind glükózamin, mind PUGNAc előkezelés meggátolt. Alloxán kivédte a glükózamin hatását. * :

szignifikáns különbség a kontrolhoz képest ($p < 0,05$) ** : szignifikáns különbség a glcN-nal kezelthez képest ($p < 0,05$)

Az előzetesen alloxánnal kezelt sejtek hasonlóan reagáltak AngII-re a normál kezeletlen szívizomsejtekhez képest, illetőleg ha az alloxán kezelés megelőzte a glükózamint, akkor az jelentősen visszafordította a glükózamin hatást. A PUGNAc, éppen ellenkezőleg, a glükózamin hatását utánozta: csökkent az AngII kiváltotta bazális Ca^{2+} szint emelkedés (16. ábra). 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 (16. ábra).

Az O-glikoziláció 'célpontjai', a fehérjék, mint a bevezetőben is említettem, sokfélék lehetnek, úgymint transzkripciós faktorok, citoskeleton fehérjék, membránproteinek, kinázok, stb. Feltehetőleg az O-glikoziláció Ca^{2+} -ra gyakorolt hatása sem 1 kitüntetett fehérje izolált hatása, hanem több, összetett folyamat eredőjeként alakulhat ki. Azonban, a szekvenciája ismeretében, pl. a TRPC1 fehérje jó eséllyel rendelkezhet O-glcNAc predilekciós helyekkel [28]. Ez a membránfehérje tagja annak a proteincsaládnak, amely az egyik esélyes jelölt a régóta keresett CCE csatorna-protein szerepére [38]. Magam megpróbálkoztam a TRPC1 fehérje, specifikus antitesttel való immunprecipitációs dúsításával, majd az így dúsított mintát CTD110.6 Western blottal vizsgálva, 82 kD molekulasúlynak megfelelően (TRPC1: 87618Da – a naszcens protein molekulasúlya) egy erős pozitív jelet kaptam (17. ábra).



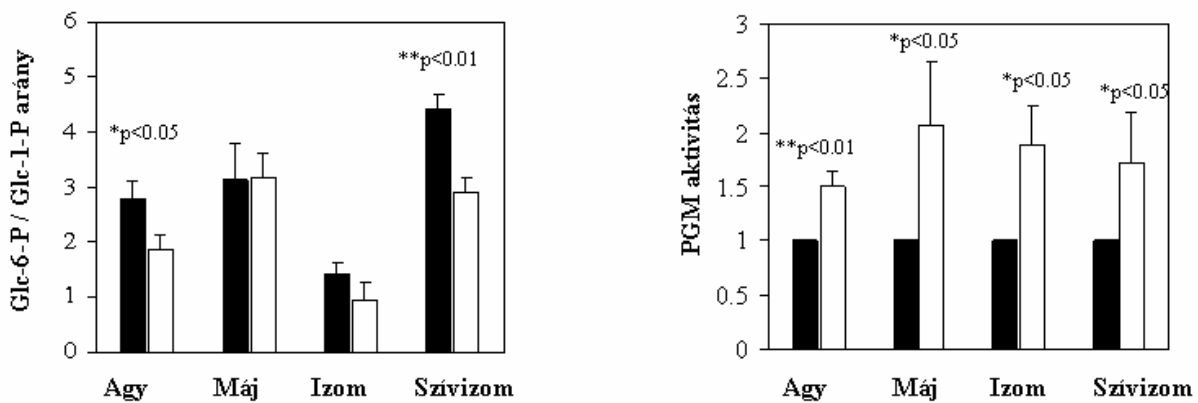
17. ábra: A.) CTD110.6 western-blot. Bal oldalt: normál, **nem immunprecipitált** sejt-extraktum, jobb oldalt: TRPC-1 ellenes antitesttel (Santa-Cruz®) immunprecipitált sejt-extraktum. B.) A 80 kD magasságnak megfelelő protein-sáv denzitometriája glükózamin, alloxán ill. PUGNAc kezelést követően (normál sejtextraktum).

Mivel a TRPC1 membránprotein, jelentős mennyiségű apoláris oldallánccal rendelkezik, ezért 2D elektroforézissel igazolni az O-glikozilációját meglehetősen nehéz feladatnak ígérkezik, ezért sajnos egyelőre a biztató eredmények ellenére sem bizonyított, hogy valóban közvetítheti a glükózamin-hatást.

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

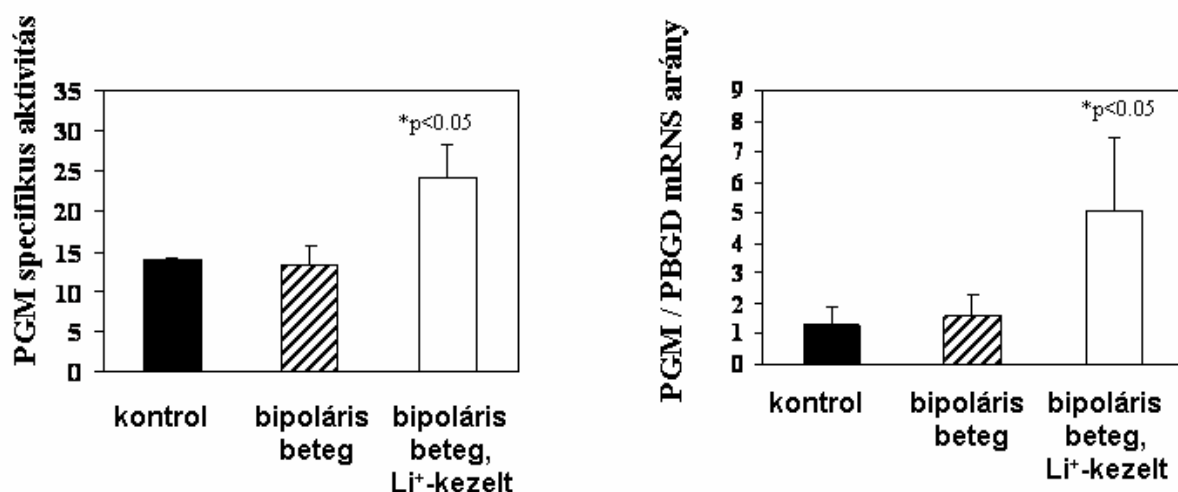
A foszfo-glükomutáz aktivitás, korábbi eredmények szerint szoros kapcsolatban áll a Ca^{2+} homeosztázissal. A PGM-mutáns, genetikailag deletált *S. cerevisiae* törzseken kívül, a Li^+ -ion PGM-et gátló hatását kihasználva, számos kísérleti lehetőség tárul fel a jelenség tanulmányozására. A PGM –et effektíven gátolja a Li^+ *S. cerevisiae*-ben és ezáltal szignifikáns intracelluláris Ca^{2+} változásokat okoz [54]. Wistar patkány ivóvizébe 20 mM LiCl-ot adagolva, a kísérleti állatokat 2 hétig ezen a diétán tartva azt találtuk, hogy a Li^+ hatására a kontroll állatokhoz hasonlítva, számos szövetben jelentősen eltolódott a Glc-6-P / Glc-1-P arány a Glc-1-P javára. A PGM aktivitásokat vizsgálva a

Li⁺ -mal kezelt állatokban magasabb aktivitásokat mértünk [66]. Ez azzal magyarázható, hogy a Li⁺ egyrészt reverzibilis, ezért kimosódik a mintából a mérés során, tehát nem akadályozza az aktivitásmérést, így az a PGM koncentrációtól függ elsősorban. Másrészt, a megemelkedett aktivitás nagy valószínűséggel annak a következménye, hogy az állatok folyamatos Li⁺ kezelés alatt, fokozott PGM expresszióra kényszerültek, a Li⁺ inhibíció miatt kiesett aktivitást kompenzáló (18. ábra). Figyelemreméltó, hogy habár a Li⁺ önmagában az intracelluláris Mg²⁺ koncentrációt nem változtatja meg [66], a Li⁺/Mg²⁺ arálynak szerepe lehet a PGM gátlás hatékonyságára. Más szövetekkel összehasonlítva, az agyban és szívizomban relatíve magasabb ez az arány, ami magyarázhatja a Li⁺ mellékhatásainak gyakoribb előfordulását ezeken a területeken.



18. ábra: Glucose-6P / glucose-1P arány és PGM aktivitás patkányszövetekben. ■: Kontroll, □: 20 mM LiCl tartalmú ivóvízzel itatott patkányok.

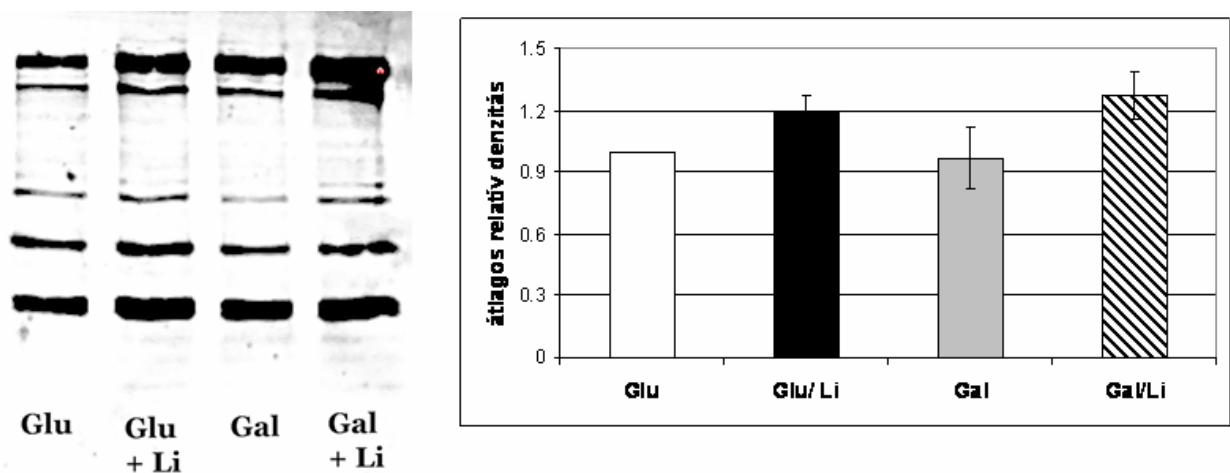
Intézetünk abban a szerencsés helyzetben van, hogy rutinszerűen kap vérmintákat és mér Li⁺ koncentrációt Li⁺ -kezelt bipoláris betegektől. Ezáltal lehetőség nyílik arra, hogy humán mintákból is végezhesünk méréseket. Mivel a humán minta perifériás vér, ezért az ebből izolált fehérvérsejtek voltak kísérleteink alanyai. Nagyon hasonlóan az állatkísérletekhez, ezekben a sejtekben is (feltehetőleg kompenzatórikusan) megemelkedett PGM aktivitást találtunk, és ezt alátámasztandó, a PGM mRNS szintézis fokozódását is észleltük (19. ábra).



19. ábra: PGM specifikus aktivitás (U/g protein) és PGM mRNS expressziós szintek mérése izolált fehérvérsejtekből. Csoportonként 6 minta átlaga került feltüntetésre. Control: egészséges egyének, Non-Li-treated patient: bipoláris betegek, nem részesültek Li⁺ kezelésben, Li-treated patient: Li⁺ kezelt bipoláris betegek.

Mindezidáig a PGM aktivitása és a Ca²⁺ homeosztázist összekötő kapocs nem ismert részleteiben, habár a Glc-1-P és Glc-6-P metabolitok szerepe felmerült, a modell még messze nem teljes. Jelen dolgozatomban szeretném felvetni annak a lehetőségét, hogy a PGM és a Ca²⁺ szabályozás közötti egyik lehetséges hiányzó láncszem az O-glikoziláció lenne. Mire alapozom ezt? A PGM3, mint említettem, fontos elem a hexózamin útvonalon, azonkívül nagyfokú szekvencia-azonossággal rendelkezik a PGM-mel. A PGM3, bár kevésbé specifikus, de rendelkezik Glc-1-P → Glc-6-P aktivitással, szemben a PGM-mel, mely nem rendelkezik GlcNAc-6-P → GlcNAc-1-P aktivitással [52], azaz ha egy PGM-et nélküli mutáns élesztőben a fő táplálékforrást galaktózra cseréljük, logikusnak tűnik a felvetés, hogy a Glc-1-P → Glc-6-P aktivitást a sejt fokozott PGM3 expresszióval igyekszik kompenzálni, mely át tudja venni a kiesett PGM funkcióját. Valószínűsíthető, hogy ezzel párhuzamosan a megemelkedett PGM3 szint miatt, a PGM3 elsődleges funkciója (GlcNAc-6-P → GlcNAc-1-P) is megnő, s ennek következtében az UDP-glcNAc és az O-glikoziláció is. A Li⁺, mely, mint a fenti

eredményekből is látszik, jó inhibitora a PGM aktivitásnak. A Li^+ több lehetséges módon is beavatkozhat a PGM3 működésébe. Mivel a PGM3 Mg^{2+} kötő protein, ezért a Li^+ kompetícióba léphet és erről az enzimről is leszoríthatja a Mg^{2+} -ot, blokkolva a PGM3 működését. Azonban a teljes genetikai delécióval ellentétben, a Li^+ inhibíció nem totális PGM esetében sem, illetve jelenleg nem tudjuk, hogy a Li^+ valójában mennyire határos PGM3-ra. Az azonban 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 24 óráig, majd megmértem a sejtek O-glikozilációs szintjét. Azt kaptam, hogy Li^+ hatására emelkedett az O-glcNAc asszociált protein mennyisége (20. ábra). A jelenség természetesen további vizsgálatot igényel, azonban joggal feltételezhető, hogy a PGM és a PGM3 egymástól nem függetlenek, funkciójuk és változásaik hatással vannak egymásra.



20. ábra: Jurkat sejtek CTD110.6 western-blot-ja, 24 órás, 2 mM-os Li^+ kezelést követően számos fehérje O-glikozilációja ~ 20%-os emelkedést mutat.

Új eredmények tételes összefoglalása

a.)

1. Glükózamin hatására szignifikánsan csökkent az AngII agonista hatása, a Ca^{2+} bazális szintjének megemelkedését megakadályozta izolált szívizomsejtekben.

2. Rövid glükózamin kezelés hatására az ún. 'downstream' metabolitok szintje megemelkedett (UDP-glcNAc), ezzel párhuzamosan a protein O-glikoziláció is fokozódott. A glükózaminnal megegyező Ca^{2+} -hatást váltott ki az O-glcNAc –áz specifikus gátlása, illetve a OGT gátlásával kivédhető volt a glükózamin hatása. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a glükózamin a proteinek O-glikozilációján keresztül hat a Ca^{2+} -szabályozásra.

3. Thapsigargin, egy specifikus CCE kiváltó ágens segítségével igazoltuk, hogy a glükózamin és a protein O-glikoziláció hatással van a CCE-re, gátolja azt.

4. TRPC1 – a CCE-ért felelősnek tartott membránprotein-család tagja – ellenes antitesttel dúsított extraktum jelentős O-glcNAc pozitivitással rendelkező ~ 80 kD molekulásúlyú proteint tartalmaz, **melynek molekulatömege hasonló a TRPC1-éhez.**

b.)

1. Li^+ kezelés kísérletes patkányokban a Glc-6-P / Glc-1-P arányt a Glc-1-P javára tolta el, azonkívül a PGM expresszió kompenzatórikusan emelkedett, tehát a Li^+ in vivo sikeresen gátolja a PGM aktivitását, továbbá;

2. Li^+ terápia a Pszichiátriai Klinikán kezelt betegek leukocytaiban kompenzatórius PGM expresszió fokozódást váltott ki.

3. Li^+ expozíció Jurkat sejtekben a protein O-glikoziláció fokozódását váltotta ki.

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, 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.

Rövidítések

AGE: Advanced glycation endproducts

2-APB: 2-aminoethoxydiphenyl-borate

AngII: Angiotensin II

ATP: Adenozin-trifoszfát

CCE: Capacitative Calcium Entry

cPLA2: Ca²⁺ függő foszfolipáz A2

DAG: Diacilglicerol

DMEM: Dulbecco`s modified eagle medium

eNOS: Endothelial nitric oxide synthase

ER/SR: Endoplazmatikus retikulum/Szarkoplazmatikus retikulum

FBS: Fetal bovine serum

GAPDH: Gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz

GFAT: Glutamin - fruktóz-6P aminotranszferáz

Glc: Glükóz

GlcNAc: N-acetil-glükózamin

Gal: Galaktóz

HBSS: Hank`s buffered salt solution

HPLC: High performance liquid chromatography

HSP70: Heat shock protein 70

IP3: Inozitol-1,4,5-trifoszfát

MAP: Mitogen activated protein

NADPH: Nikotinamid-adenin-dinukleotid

NF-κB: Nuclear Factor kappa B

NRVM: Neonatal rat ventricular myocyte

O-glcNAc -áz: O-glcNAc hexóزامinidáz (Swissprot: EC 3.2.1.52)

OGT: UDP-glcNAc-polipeptid O- β -N-acetilglukózaminiltranszferáz (EC2.4.1.94)

PBGD: Porfobilinogén deamináz

PBS: Phosphate buffered saline

PGM: Foszfoglükomutáz

PKC: Protein kináz C

PLC: Foszfolipáz C

PUGNAc: O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate

SERCA: ER/SR Ca²⁺-ATP-áz

TRPC: Transient receptor potential channel

UDP: Uridin 5'-trifoszfát

UDP-galNAc: UDP-N-acetilgalaktózamin

UDP-glcNAc: UDP-N-acetilglukózamin

UDP-Hex: UDP-hexóz

UDP-HexNAc: UDP-N-acetilhexózamin

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindazoknak, akik segítettek munkámban. Mindenekelőtt témavezetőimnek, **Dr. Kellermayer Miklósnak** és **Dr. Miseta Attilának** a PTE Laboratóriumi Medicina Intézetből, valamint **Dr. Richard B. Marchase**-nek és **John C. Chatham**-nek a University of Alabama at Birmingham, Cell Biology Dept.-ből szeretném megköszönni mindazt a segítséget, támogatást, türelmet, kreativitást, példamutató kutatói magatartást, amivel munkám során elláttak.

Szeretnék ezenkívül köszönetet mondani családomnak, akik mindvégig bátorítottak és támogattak, türelemmel elviseltek, és mindenekelőtt biztosították azt a háttérrel, ami nélkül munkám nem készülhetett volna el.

Számos azoknak a sora, akiket köszönet illet tudásuk, ismeretanyaguk szívélyes megosztásáért, de kiemelten is hálával tartozom **Zacharias Kneass**-nek, valamint **Dr. Csutora Péternek** felbecsülhetetlen értékű tanácsaikért.

Irodalomjegyzék

1. Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM.: *Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells*. Trends Biochem Sci. 26:310-7, 2001.
2. Brownlee M.: *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature 414: 813–820, 2001.
3. Pasternak CA, Aiyathurai JE, Makinde V, Davies A, Baldwin SA, Konieczko EM, Widnell CC.: *Regulation of glucose uptake by stressed cells*. J Cell Physiol. 149:324-31, 1991.
4. Wells L, Whelan SA, Hart GW.: *O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification*. Biochem Biophys Res Commun 302:435-41, 2003.
5. Wells-Knecht, K. J., Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW.: *Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose*. Biochemistry 34:3702–3709, 1995.
6. Wells L, Vosseller K, Hart GW.: *Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc*. Science 291:2376– 2378, 2001.
7. Zachara NE Hart GW.: *O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress*. Biochim Biophys Acta 1673: 13–28, 2004.
8. Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW.: *Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress: a survival response of mammalian cells*. J Biol Chem 279: 30133–30142, 2004.
9. Nagy E, Henics T, Eckert M, Miseta A, Lightowlers RN, Kellermayer M.: *Identification of the NAD(+)-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain*. Biochem Biophys Res Commun 275:253-60, 2000.

10. Chen PY, Csutora P, Veyna-Burke NA, Marchase RB.: *Glucose-6-phosphate and Ca²⁺ sequestration are mutually enhanced in microsomes from liver, brain, and heart.* Diabetes 47:874-81, 1998.
11. KEGG PATHWAY Database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)
12. Boldizsar F, Berki T, Miseta A, Nemeth P.: *Effect of hyperglycemia on the basal cytosolic free calcium level, calcium signal and tyrosine-phosphorylation in human T-cells.* Immunol Lett 82:159-64, 2002.
13. Belke DD, Swanson EA, Dillmann WH.: *Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart.* Diabetes 53:3201-8, 2004.
14. Lagadic-Gossmann D, Buckler KJ, Le Prigent K, Feuvray D.: *Altered Ca²⁺ handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats.* Am J Physiol 270:H1529-37, 1996.
15. Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, Dillmann WH.: *Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation.* J Biol Chem 278: 44230–44237, 2003.
16. Pang Y, Bounelis P, Chatham JC, Marchase RB.: *The hexosamine pathway is responsible for the inhibition by diabetes of phenylephrine induced inotropy.* Diabetes 53: 1074–1081, 2004.
17. Schaffer SW, Croft CB, Solodushko V.: *Cardioprotective effect of chronic hyperglycemia: effect on hypoxia-induced apoptosis and necrosis.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 278:H1948-54, 2000.
18. Ravingerova T, Styk J, Pancza D, Tribulova N, Sebkova J, Volkovova K, Ziegelhoffer A, Slezak J.: *Diabetic cardiomyopathy in rats: alleviation of myocardial dysfunction caused by Ca²⁺ overload.* Diabetes Res Clin Pract 31 Suppl:S105-12, 1996.
19. Tani M, Neely JR.: *Hearts from diabetic rats are more resistant to in vitro ischemia: possible role of altered Ca²⁺ metabolism.* Circ Res 62:931-40, 1988.

20. Pang Y, Hunton DL, Bounelis P, Marchase RB.: *Hyperglycemia inhibits capacitative calcium entry and hypertrophy in neonatal cardiomyocytes*. Diabetes 51: 3461–3467, 2002.
21. Schipke JD, Friebe R, Gams E.: *Forty years of glucose-insulin-potassium (GIK) in cardiac surgery: a review of randomized, controlled trials*. Eur J Cardiothorac Surg 29:479-85, 2006.
22. Sharma CB, Lehle L, Tanner W.: *Solubilization and characterization of the initial enzymes of the dolichol pathway from yeast*. Eur J Biochem. 126:319-25, 1982.
23. Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW.: *Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine*. J Cell Biol 104:1157-64, 1987.
24. Kneass ZT, Marchase RB.: *Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in protein-associated O-GlcNAc*. J Biol Chem 279: 45759–45765, 2004.
25. Kneass ZT, Marchase RB.: *Protein O-GlcNAc modulates motility associated signaling intermediates in neutrophils*. J Biol Chem 280:14579–14585, 2005.
26. Boehmelt G, Wakeham A, Elia A, Sasaki T, Plyte S, Potter J, Yang Y, Tsang E, Ruland J, Iscove NN, Dennis JW, Mak TW.: *Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells*. EMBO J 19:5092-104, 2000.
27. Konrad RJ, Tolar JF, Hale JE, Knierman MD, Becker GW, Kudlow JE.: *Purification of the O-glycosylated protein p135 and identification as O-GlcNAc transferase*. Biochem Biophys Res Commun 288:1136-40, 2001.
28. YinOYang 1.2 Prediction Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>)
29. 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 290:C57-65, 2006. 06.
30. Bers DM.: *Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction*. Circ Res. 87:275-81, 2000.
31. Sugden PH.: *Signaling pathways activated by vasoactive peptides in the cardiac myocyte and their role in myocardial pathologies*. J Card Fail 8, Suppl 6:S359–S369, 2002.
32. Williamson JR, Cooper RH, Joseph SK, Thomas AP.: *Inositol trisphosphate and diacylglycerol as intracellular second messengers in liver*. Am J Physiol 248:C203-16, 1985.
33. Newton AC.: *Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions*. Chem Rev 101:2353-64, 2001.
34. Putney JW Jr, Broad LM, Braun FJ, Lievremont JP, Bird GSJ.: *Mechanisms of capacitative calcium entry*. J Cell Sci 114: 2223–2229, 2001.
35. Kurebayashi N, Ogawa Y.: *Depletion of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca^{2+} entry into mouse skeletal muscle fibres*. J Physiol 533: 185–199, 2001.
36. Hunton DL, Zou LY, Pang Y, Marchase RB.: *Adult rat cardiomyocytes exhibit capacitative calcium entry*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 286: H1124–H1132, 2004.
37. Csutora P, Su Z, Kim HY, Bugrim A, Cunningham KW, Nuccitelli R, Keizer JE, Hanley MR, Blalock JE, Marchase RB.: *Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores*. Proc Natl Acad Sci USA 96:121-6, 1999.

38. Sweeney M, Yu Y, Platoshyn O, Zhang S, McDaniel SS, Yuan JX.: *Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca²⁺ entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283:L144-55, 2002.
39. Zhang T, Miyamoto S, Brown JH.: *Cardiomyocyte calcium and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: friends or foes?* Recent Prog Horm Res 59: 141-168, 2004.
40. Schulz RA, Yutzey KE.: *Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development.* Dev Biol 266: 1-16, 2004.
41. Liu HR, Gao F, Tao L, Yan WL, Gao E, Christopher TA, Lopez BL, Hu A, Ma XL.: *Antiapoptotic mechanisms of benidipine in the ischemic/reperfused heart.* Br J Pharmacol 142: 627-634, 2004.
42. Pavoine C, Behforouz N, Gauthier C, Le Gouvello S, Roudot-Thoraval F, Martin CR, Pawlak A, Feral C, Defer N, Houel R, Magne S, Amadou A, Loisançe D, Duvaldestin P, Pecker F.: *beta2-Adrenergic signaling in human heart: shift from the cyclic AMP to the arachidonic acid pathway.* Molecular Pharmacology 64: 1117-1125, 2003.
43. Atsma DE, Bastiaanse EM, Jerzewski A, Van der Valk LJ, and Van der Laarse A.: *Role of calcium-activated neutral protease (calpain) in cell death in cultured neonatal rat cardiomyocytes during metabolic inhibition.* Circ Res 76: 1071-1078, 1995.
44. Fu L, Miseta A, Hunton D, Marchase RB, Bedwell DM.: *Loss of the major isoform of phosphoglucomutase results in altered calcium homeostasis in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem 275:5431-40, 2000
45. Tokes-Fuzesi M, Bedwell DM, Repa I, Sipos K, Sumegi B, Rab A, Miseta A.: *Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Microbiol. 44:1299-308, 2002.

46. Fu L, Bounelis P, Dey N, Browne BL, Marchase RB, Bedwell DM.: *The posttranslational modification of phosphoglucomutase is regulated by galactose induction and glucose repression in Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 177: 3087-3094, 1995.
47. Sugie H, Sugie Y.: *Phosphoglucomutase deficiency*. Ryoikibetsu Shokogun Shirizu 36:25-7, 2001.
48. Sugie H, Kobayashi J, Sugie Y, Ichimura M, Miyamoto R, Ito T, Shimizu K Igarashi Y.: *Infantile muscle glycogen storage disease: phosphoglucomutase deficiency with decreased muscle and serum carnitine levels*. Neurology 38:602-5, 1988.
49. Yip SP, Lovegrove JU, Rana NA, Hopkinson DA, Whitehouse DB.: *Mapping recombination hotspots in human phosphoglucomutase (PGM1)*. Hum Mol Genet 8:1699-706, 1999.
50. March RE, Putt W, Hollyoake M, Ives JH, Lovegrove JU, Hopkinson DA, Edwards YH, Whitehouse DB.: *The classical human phosphoglucomutase (PGM1) isozyme polymorphism is generated by intragenic recombination*. Proc Natl Acad Sci USA 90:10730-3, 1993.
51. Ninfali P, Accorsi A, Palma F, Fazi A, Piatti E, Chiarantini L, Fornaini G.: *Human erythrocyte phosphoglucomutase: comparison of the kinetic properties of PGM1 and PGM2 isoenzymes*. Biochimie. 66:617-23, 1984.
52. Pang H, Koda Y, Soejima M, Kimura H.: *Identification of human phosphoglucomutase 3 (PGM3) as N-acetylglucosamine-phosphate mutase (AGM1)*. Ann Hum Genet. 66:139-44, 2002.
53. UniProtKB/Swiss-Prot entry: O95394 (<http://www.expasy.org/uniprot/O95394>)
54. Masuda CA, Xavier MA, Mattos KA, Galina A, Montero-Lomeli M.: *Phosphoglucomutase is an in vivo lithium target in yeast*. J Biol Chem 276:37794-801, 2001.

55. Bergmayer HU, Bergmayer J, Grassl M.: *Methods of Enzymatic Analysis*. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (3. ed.), edited by Bergmayer HU. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 1984, p. 185-198.
56. Hunton DL, Lucchesi PA, Pang Y, Cheng X, Dell'Italia LJ, Marchase RB.: *Capacitative calcium entry contributes to nuclear factor of activated T-cells nuclear translocation and hypertrophy in cardiomyocytes*. *J Biol Chem* 277:14266–14273, 2002.
57. Fujita S, Endoh M.: *Influence of a Na⁺-H⁺ exchange inhibitor ethylisopropylamiloride, a Na⁺-Ca²⁺ exchange inhibitor KB-R7943 and their combination on the increases in contractility and Ca²⁺ transient induced by angiotensin II in isolated adult rabbit ventricular myocytes*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360:575–584, 1999.
58. Salas MA, Vila-Petroff MG, Palomeque J, Aiello EA, Mattiazzi A.: *Positive inotropic and negative lusitropic effect of angiotensin II: intracellular mechanisms and second messengers*. *J Mol Cell Cardiol* 33:1957–1971, 2001.
59. Kimura H, Takemura H, Imoto K, Furukawa K, Ohshika H, Mochizuki Y.: *Relation between spontaneous contraction and sarcoplasmic reticulum function in cultured neonatal rat cardiac myocytes*. *Cell Signal* 10:349-54, 1998.
60. Garcia KD, Shah T, Garcia J.: *Immunolocalization of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in cardiac myocytes from newborn mice*. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1048-57, 2004.
61. Abrenica B, Gilchrist JS.: *Nucleoplasmic Ca²⁺ loading is regulated by mobilization of perinuclear Ca²⁺*. *Cell Calcium*. 28:127-36, 2000.
62. Gysembergh A, Lemaire S, Piot C, Sportouch C, Richard S, Kloner RA, Przyklenk K.: *Pharmacological manipulation of Ins(1,4,5)P3 signaling mimics preconditioning in rabbit heart*. *Am J Physiol* 277:H2458-69, 1999.
63. Kneass ZT, Marchase RB.: *Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in protein-associated O-GlcNAc*. *J Biol Chem* 279:45759-65, 2004.

64. Konrad RJ, Zhang F, Hale JE, Knierman MD, Becker GW, Kudlow JE.: *Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase*. Biochem Biophys Res Commun 293:207–212, 2002.
65. Haltiwanger RS, Grove K, Philipsberg GA.: *Modulation of Olinked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc--N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate*. J Biol Chem 273:3611–3617, 1998.
66. 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]