

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 illetően 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).

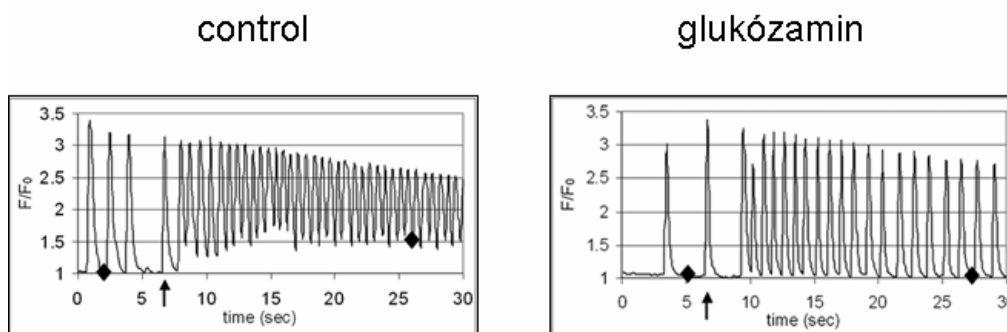
Eredmények és megbeszélés

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).



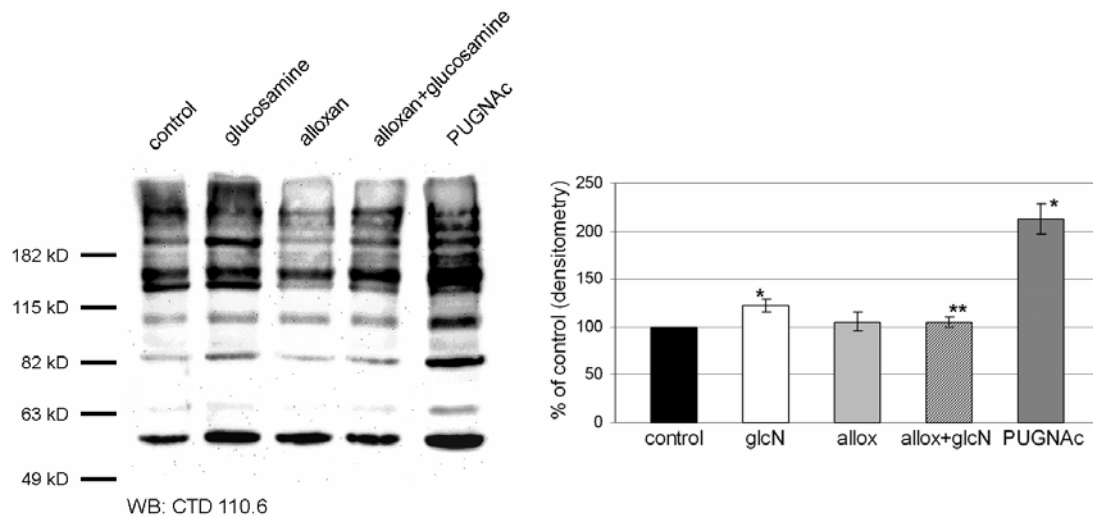
1. ábra: 10 perces glükózamin előkezelés megakadályozza az AngII diasztolés Ca^{2+} emelő hatását.

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-áz 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 glükózamin hatását, 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, Csutóra 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.