

Calmodulina i receptors de la calmodulina en el nucli dels hepatòcits durant la regeneració hepàtica

Oriol Bachs, Maria Jesus Pujol, Joan Serratosa (\*), Ricard Bastos i Rosa Aligué

Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal s/n, 08028-Barcelona. (\*)

Departament de Farmacologia i Toxicologia, CSIC, Barcelona.

Abstract

We have studied the distribution and measured the concentration of calmodulin in liver cells nuclei from normal and regenerating rats. Results we have obtained indicate that at 24 hours after a partial hepatectomy there is a six-fold increase in nuclear calmodulin. Measurements of calmodulin concentration in three nuclear subfractions indicated that in regenerating rats calmodulin is mainly associated to nuclear matrix and that this association is resistant to 1.6 M NaCl. When normal nuclei were incubated with 5 mM  $Ca_2Cl$ , calmodulin moved to nuclear matrix showing a pattern similar to that observed in regenerating rats. These results suggest that a wave of intranuclear calcium is produced during liver regeneration. We have also identified 8 calmodulin binding proteins in liver cells nuclei, two of them can be extracted with nucleases, one with 1.6 M NaCl and five remain associated to the nuclear matrix. At 24 hours after hepatectomy we found that three of the calmodulin-binding proteins present in the nuclear matrix are significantly decreased.

Introducció

La calmodulina és el mediador més important de l'acció del calci a les cèl·lules no musculars (Means et al., 1982). Es conegut que els complexos calci-calmodulina intervenen en la regulació d'un gran nombre de funcions cel·lulars tals com el metabolisme dels nucleòtids cíclics, l'organització del citoesquelet, la secreció cel·lular, la proliferació cel·lular, etc, etc (Klee i Vanaman, 1982).

La calmodulina presenta quatre llocs d'unió per el calci. Quan aquest ió s'uneix a la calmodulina, aquesta exposa regions altament hidrofòbiques que són reconegudes per receptors específics que s'uneixen a la calmodulina i modifiquen la seva activitat per efectes d'aquesta unió (Dedman, 1984).



S'han descrit un nombre considerable de proteïnes amb activitats regulables per la calmodulina. Aquestes proteïnes es localitzen preferentment al citoplasma y a la membrana plasmàtica i presenten un ampli espectre d'activitats funcionals : protein quinasa, protein fosfatasa, fosfodiesterasa, adenilat ciclasa, bomba de calci, unió d'actina, unió de queratina etc etc (Klee i Vanaman, 1982).

Curiosament, no es coneix pràcticament res de les concentracions de calmodulina en el nucli ni tampoc dels seus possibles receptors nuclears malgrat hi ha evidències experimentals indirectes que indiquen que els complexos calci-calmodulina regulen funcions tan importants com la replicació de l'ADN, la reparació de l'ADN i l'expressió d'alguns gens. En cèl.lules CH3, la presència d'inhibidors específics de la calmodulina en el medi de cultiu impedeix l'inducció de l'expressió del gen de la prolactina produïda per l'EGF (Factor de creixement epidèrmic) (White, 1985). La supervivència de cèl.lules d'ovari d'hamster (CHO) tractades amb Bleomicina (agent que trenca les cadenes d'ADN) es troba dràsticament disminuïda quan en el medi de cultiu s'afegeixen inhibidors de la calmodulina, suggerint l'implicació de la calmodulina en els mecanismes de reparació de l'ADN (Chafouleas et al., 1984). Boynton et al. (1980) varen descriure que la droga anticalmodulina Trifluoperazina inhibeix la síntesi d'ADN en les cèl.lules hepàtiques de la línia T51B quan aquestes estan proliferativament activades. L'efecte inhibitori de la trifluoperazina pot ésser revertit afegint calmodulina en el medi de cultiu. L'intervenció de la calmodulina en el desencadenament de la síntesi d'ADN en les cèl.lules hepàtiques també queda evidenciada per experiments realitzats "in vivo" en els que s'injecta trifluoperazina a rates sotmeses a una hepatectomia parcial. Després d'una hepatectomia parcial els hepatòcits del fetge remanent inicien un procés de proliferació relativament sincrònic que condueix a una ona de síntesi d'ADN que comença a les 16-18 hores i manifesta un màxim a les 24 hores després de l'intervenció quirúrgica. Previa a l'ona de síntesi d'ADN s'observa una ona de calmodulina citosòlica entre les 6 i 14 hores



post-hepatectomia. L'injecció de trifluoperazina retrasa 10-12 hores l'ona de calmodulina així com la síntesi d'ADN (Soriano et al., 1985).

En aquest treball describim la presència de calmodulina en els nuclis dels hepatòcits mitjançant tècniques immunohistoquímiques i l'hem quantificat tant en els nuclis sencers com a tres fraccions nuclears: la S1 o fracció soluble obtinguda després de la digestió dels nuclis amb nucleases, la S2 o fracció soluble obtinguda amb un tractament posterior amb 1.6 M NaCl i la matriu nuclear. També hem identificat els receptors de la calmodulina a cadascuna d'aquestes fraccions nuclears mitjançant tècniques d'"overlay" i finalment hem estudiat la concentració de calmodulina i la presència de receptors nuclears durant la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial.

#### Material i mètodes

Els nuclis s'han aïllat a partir de rates Sprague-Dawley de 200-250 g de pes segons el mètode descrit per Kaufman i Shaper (1984) i resuspesos amb tampó 250 mM Sacarosa, 5 mM Mg SO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF i 50 mM Tris-HCl pH 7.4 contenint 250 ug/ml de DNasa I i 250 ug/ml de RNasa A. Després d'una hora d'incubació es centrifuguen a 800 x g durant 10 min. El sobrenadant representa la fracció anomenada S1. El sediment s'incuba amb 0.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1.6 M NaCl i 1 mM PMSF durant 15 min i posteriorment es centrifuga a 5000 x g durant 20 min. El sobrenadant es recull (fracció S2) i el sediment es tracta de la mateixa manera una altra vegada. El sediment obtingut es la matriu nuclear.

Les hepatectomies parcials s'han realitzat segons el mètode de Higgins i Anderson (1931).

La detecció de la calmodulina mitjançant immunohistoquímica s'ha realitzat en nuclis aïllats i fixats amb acetona a -20°C. Després del bloqueig amb serum de conill, els nuclis s'han incubat



amb anticòs anticalmodulina durant tota la nit a 4°C a una concentració de 100 µg/ml. La detecció de l'anticòs s'ha realitzat amb segon anticòs conjugat amb peroxidasa i s'ha revelat amb aminobenzidina.

La concentració de calmodulina a les diferents fraccions nuclears s'ha mesurat segons el mètode descrit per Sharma i Wang (1978), després de bullir les mostres amb tampó 80 mM Tris-HCl, pH 7.8 contenint 80 mM Imidazol, 6 mM MgCl<sub>2</sub> i 0.2 mM CaCl<sub>2</sub> durant 3 min.

La detecció histoquímica dels receptors de la calmodulina s'ha realitzat emprant calmodulina marcada amb rodamina segons el mètode descrit per Welsh et al. (1982).

L'identificació dels receptors de la calmodulina s'ha realitzat mitjançant tècniques d'"overlay" d'acord al mètode descrit per Bachs i Carafoli (1987). La purificació dels receptors nuclears de la calmodulina s'ha realitzat mitjançant cromatografia d'afinitat emprant una columna de calmodulina-sepharosa 4B segons s'ha descrit previament (Bachs i Carafoli, 1987).

### Resultats

Utilitzant tècniques immunohistoquímiques hem detectat la presència de calmodulina en fraccions purificades de nuclis d'hepatòcits. Tal com es pot veure a la figura 1 en els nuclis dels animals control (no hepatectomitzats) la calmodulina nuclear presenta un patró difús i a més formant agregats associats als nucleòls. En alguns casos també és pot observar una xarxa intranuclear que en determinades imatges sembla que s'estableixin entre els agregats.

En el cas dels nuclis procedents dels animals hepatectomitzats (24 hores) (figura 1) es poden observar dues variacions importants : en primer lloc, la concentració general de calmodulina sembla ser



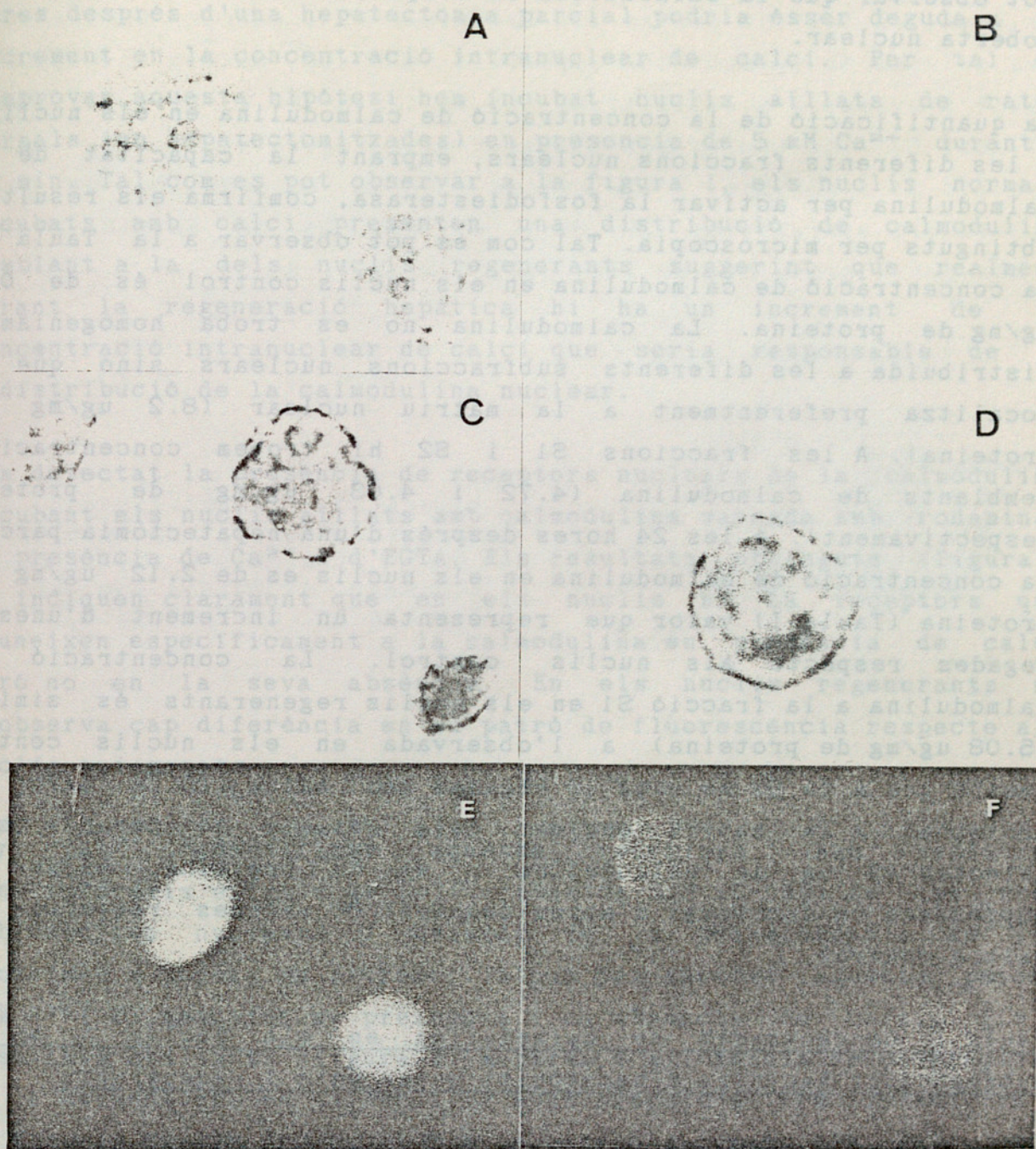


Figura 1.- A) nuclis control (no-hepatectomitzats) amb anticalmodulina. B) Nuclis control amb anticalmodulina, en presència de calmodulina exògena. C) Nuclis regenerants (24 hores post-hepatectomia) amb anticalmodulina. D) Nuclis control incubats durant 30 min amb 5 mM  $\text{CaCl}_2$  abans de ser tractats amb anticalmodulina. E) Nuclis control incubats amb calmodulina-rodamina en presència de  $\text{Ca}^{2+}$ . F) Nuclis control incubats amb calmodulina-rodamina en presència d'EGTA. Augments microscòpics : A-D x 1000; E i F x 500



més gran ja que s'observa una intensitat major en la tinció. En segón lloc la distribució de la calmodulina es diferent, ja que es pot observar que la calmodulina es desplaça clarament cap a la coberta nuclear.

La quantificació de la concentració de calmodulina en els nuclis i a les diferents fraccions nuclears, emprant la capacitat de la calmodulina per activar la fosfodiesterasa, confirma els resultats obtinguts per microscopia. Tal com es pot observar a la Taula I, la concentració de calmodulina en els nuclis control és de 0.35 ug/mg de proteïna. La calmodulina no es troba homogeniament distribuïda a les diferents subfraccions nuclears sino que es localitza preferentment a la matriu nuclear (8.2 ug/mg de proteïna). A les fraccions S1 i S2 hi trobem concentracions semblants de calmodulina (4.72 i 4.03 ug/mg de proteïna respectivament). A les 24 hores després d'una hepatectomia parcial la concentració de calmodulina en els nuclis es de 2.12 ug/mg de proteïna (Taula I) valor que representa un increment d'unes 6 vegades respecte als nuclis control. La concentració de calmodulina a la fracció S1 en els nuclis regenerants és similar (5.08 ug/mg de proteïna) a l'observada en els nuclis control mentre que a la S2 és unes 16 vegades més baixa (0.24 ug/mg de proteïna). A la matriu nuclear dels animals regenerants s'hi detecten 45 ug de calmodulina / mg de proteïna, valor que representa un increment d'aproximadament 6 vegades respecte als valors control.

Taula I. Concentració de calmodulina en els nuclis i a les subfraccions nuclears d'hepatòcits quiescents i regenerants.

	Control	Regenerants (24 hores)
Nuclis	0.35 ± 0.26	2.10 ± 0.84
S1	4.72 ± 2.10	5.08 ± 1.92
S2	4.03 ± 1.99	0.24 ± 0.10
Matriu nuclear	8.20 ± 1.44	45.00 ± 9.28



Degut que l'unió de la calmodulina amb els seus receptors és dependent de la concentració de calci hem plantejat l'hipòtesi que la redistribució de la calmodulina nuclear observada a les 24 hores després d'una hepatectomia parcial podria ésser deguda a un increment en la concentració intranuclear de calci. Per tal de comprovar aquesta hipòtesi hem incubat nuclis aïllats de rates normals (no hepatectomitzades) en presència de 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  durant 30 min. Tal com es pot observar a la figura 1, els nuclis normals incubats amb calci presenten una distribució de calmodulina semblant a la dels nuclis regenerants suggerint que realment durant la regeneració hepàtica hi ha un increment de la concentració intranuclear de calci que seria responsable de la redistribució de la calmodulina nuclear.

Hem detectat la presència de receptors nuclears de la calmodulina incubant els nuclis aïllats amb calmodulina marcada amb rodamina, en presència de  $\text{Ca}^{2+}$  o d'EGTA. Els resultats obtinguts (figura 1) indiquen clarament que en els nuclis hi ha receptors que s'uneixen específicament a la calmodulina en presència de calci però no en la seva absència. En els nuclis regenerants no s'observa cap diferència en el patró de fluorescència respecte als nuclis quiescents .

Per tal d'identificar aquests receptors, hem realitzat electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS (5-15%) de les tres subfraccions nuclears i després de la transferència de les proteïnes a papers de nitrocel.lulosa hem incubat aquests papers amb  $^{125}\text{I}$ -Calmodulina en presència i en absència de calci. Els resultats obtinguts (figura 2) mostren l'existència de 8 receptors de la calmodulina en el nucli, 2 a la fracció S1 (PM 120 Kd), un a la fracció S2 (PM 120 Kd) i 5 a la matriu nuclear (PM 240, 150, 120, 70 i 64 Kd). A les 24 hores post-hepatectomia parcial, no s'observen canvis dels receptors a les fraccions S1 i S2 però, a la matriu nuclear s'observa que els receptors de 120, 70 i 64 disminueixen significativament (figura 3).

Quan s'observen els patrons electroforètics de les subfraccions nuclears es pot veure que mentre que no hi ha diferències entre les fraccions S1 i S2 normals i regenerants a la matriu nuclear dels nuclis regenerants s'observa l'increment de dues bandes de



pesos moleculars aparents de 56 i 42 Kd (figura 4).

Amb l'objectiu de purificar els receptors nuclears de la calmodulina hem fet passar les fraccions S1 i matriu nuclear per una columna de calmodulina-sepharosa 4B. La matriu nuclear ha estat previamente solubilitzada amb triton X-100 2 %, 0.3 M KCl (figura 5). Tal com es pot observar a la figura 6 a partir de la fracció S1 s'obtenen 3 receptors de la calmodulina de pesos moleculars aparents de 120, 46 i 41 Kd. De la matriu nuclear s'obtenen 5 proteïnes de 240, 150, 120, 70 i 64 Kd.

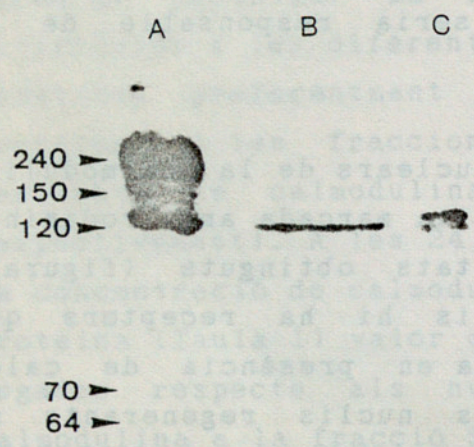


Figura 2.- Identificació dels receptors de la calmodulina a les diferents subfraccions nuclears. A) Matriu nuclear. B) Fracció S2. C) Fracció S1

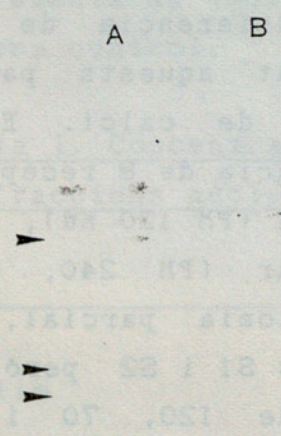


Figura 3.- Receptors de la calmodulina a la matriu nuclear. A) Matriu nuclear control (rates no-hepatectomitzades). B) Matriu nuclear de rates regenerants (24 hores post-hepatectomia).



Discussió

En aquest treball s'ha presentat evidència de la presència de calmodulina i de receptors per aquesta proteïna en els nuclis dels hepatòcits. Aquests resultats reforcen l'idea que calmodulina té funcions nuclears regulades per la calmodulina. Aquests resultats s'obtenen a partir de fraccions nuclears preparades a partir de hepatòcits de ratolí i de fraccions nuclears preparades a partir de hepatòcits de ratolí regenerants 24 hores post-hepatectomia. Els resultats obtinguts en aquest treball són semblants als obtinguts en un treball anterior (1) i en un treball més recent (2). Degut a la translocació de la calmodulina citosòlica al nucli, també s'ha observat que a les 6 i 14 hores post-hepatectomia hi ha un increment de la concentració citosòlica de calmodulina, és probable que aquest increment sigui degut a la translocació de la calmodulina citosòlica al nucli. També s'ha observat que a les 6 i 14 hores post-hepatectomia hi ha un increment de la concentració nuclear de calmodulina, en el sentit que a les 6 i 14 hores post-hepatectomia hi ha un increment de la concentració nuclear de calmodulina. Degut a aquestes dades, es pot dir que a les 6 i 14 hores post-hepatectomia hi ha un increment de la concentració nuclear de calmodulina. Degut a aquestes dades, es pot dir que a les 6 i 14 hores post-hepatectomia hi ha un increment de la concentració nuclear de calmodulina.

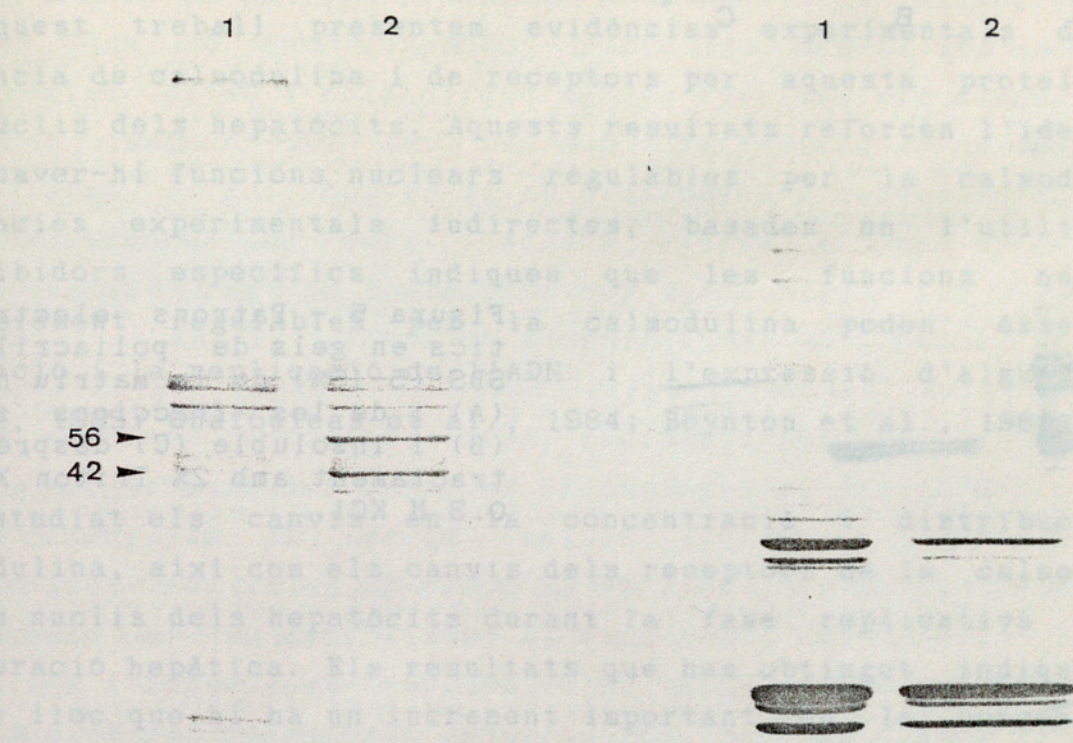


Figura 4.- Patrons electroforètics en gels de poliacrilamida - SDS (5-15%) de les tres subfraccions nuclears normals (1) i regenerants 24 hores post-hepatectomia (2). A) Matriu nuclear. B) Fracció S2. C) Fracció S1.

Recentment (Tubo and Beresney, 1987) s'ha descrit que els enzims replicatius, La ADN polimerasa alfa, la primasa, la ribonucleasa



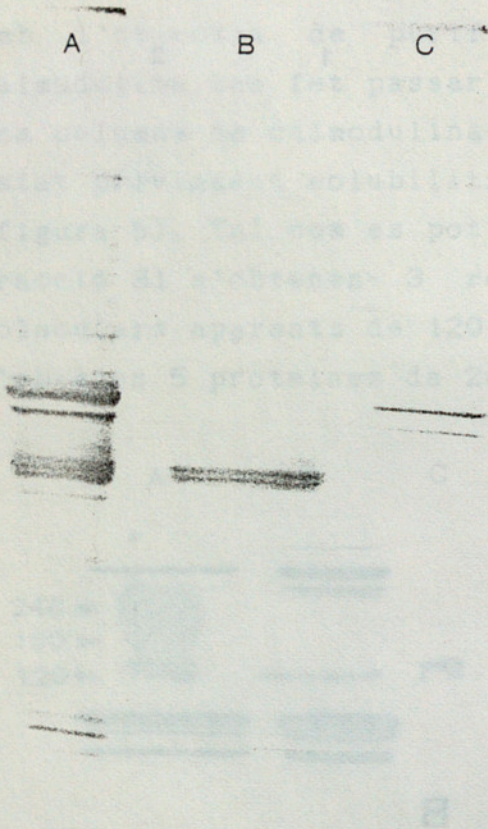


Figura 5.- Patrons electroforetics en gels de poliacrilamida-SDS (5-15%) de la matriu nuclear (A) i de les fraccions soluble (B) i insoluble (C) després del tractament amb 2% Triton X-100 i 0.3 M KCl.

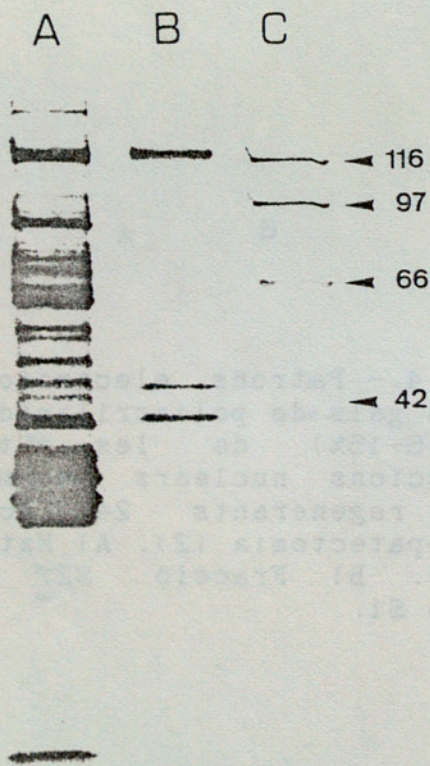


Figura 6.- Patrons electroforetics en gels de poliacrilamida-SDS (5-15%) de la fracció S1 (A) i dels receptors de la calmodulina presents en aquesta fracció purificats per afinitat (B). (C) Estandar d'alt pes molecular.



### Discussió

En aquest treball presentem evidències experimentals de la presència de calmodulina i de receptors per aquesta proteïna en els nuclis dels hepatòcits. Aquests resultats reforçen l'idea que ha d'haver-hi funcions nuclears regulables per la calmodulina. Evidències experimentals indirectes, basades en l'utilització d'inhibidors específics indiquen que les funcions nuclears possiblement regulables per la calmodulina poden ésser la reparació i la replicació de l'ADN i l'expressió d'alguns gens (White, 1985; Chafouleas et al., 1984; Boynton et al., 1980).

Hem estudiat els canvis en la concentració i distribució de calmodulina, així com els canvis dels receptors de la calmodulina en els nuclis dels hepatòcits durant la fase replicativa de la regeneració hepàtica. Els resultats que hem obtingut indiquen en primer lloc que hi ha un increment important en la concentració total de calmodulina nuclear a les 24 hores post-hepatectomia parcial. Degut que s'ha descrit que entre les 6 i les 14 hores després d'una hepatectomia es produeix un increment de la concentració citosòlica de calmodulina, es probable que l'increment nuclear sigui degut a la translocació de la calmodulina citosòlica al nucli. També hem observat que a més de l'increment de concentració hi ha una redistribució de la calmodulina nuclear, en el sentit que la calmodulina a les 24 hores post-hepatectomia es desplaça cap a la coberta nuclear, concretament a la matriu nuclear. Degut que quan s'incuben nuclis d'hepatòcits quiescents amb 5 mM  $Ca^{2+}$  s'observa una redistribució semblant de la calmodulina nuclear, postulem que el  $Ca^{2+}$  es responsable d'aquesta redistribució durant la regeneració hepàtica. Es conegut que els ions calci son necessaris per a l'iniciació de la replicació de l'ADN, per tant, cal considerar la possibilitat que durant les fases previes a l'inici de la replicació s'hagui de produir una ona intranuclear de calci que sigui un pas necessari per a la redistribució de la calmodulina i també per a l'inici de la síntesi d'ADN.

Recentment (Tubo and Berezney, 1987) s'ha descrit que els enzims replicatius : La ADN polimerasa alfa, la primasa, la ribonucleasa



H i d'altres, es comporten d'una manera similar a la calmodulina nuclear durant la regeneració hepàtica, és a dir també es redistribueixen associant-se a la matriu nuclear de manera que no poden ser alliberats per altes concentracions de NaCl. Aquest comportament similar dels enzims replicatius i de la calmodulina, fa pensar en la possibilitat que una ona intranuclear de calci pugui desencadenar l'associació de la calmodulina i dels enzims replicatius amb la matriu nuclear, lloc on suposadament es localitzen els replicons, i que això sigui un pas imprescindible per a l'iniciació de la replicació de l'ADN.

L'estudi de les modificacions dels receptors nuclears de la calmodulina durant la regeneració hepàtica demostra alguns canvis, concretament, a la matriu nuclear hi ha la disminució de 3 receptors, els de 120, 70 i 64 Kd a les 24 hores post-hepatectomia parcial. Malgrat hem aconseguit la purificació de la major part dels receptors encara no hi ha evidències experimentals sòlides de les seves possibles funcions nuclears, no obstant hem detectat que un dels receptors presenta activitat inhibidora de la fosforilació i unaltra es una endonucleasa activable per el calci. Així doncs, es necessari un estudi en profunditat per tal de caracteritzar funcionalment els receptors de la calmodulina amb l'objectiu d'aclarir definitivament quina es la seva implicació en les funcions nuclears.

#### Agraïments

Aquest treball ha estat finançat per la Comisión Asesora de Investigación Científico y Técnica (648/84), per la CIRIT (AR 85/207) i per el Fondo de Investigaciones Sanitarias (86/935).

#### Bibliografia

- Bachs, O. and Carafoli, E. (1987) Calmodulin and calmodulin-binding proteins in liver cell nuclei. J. Biol. Chem., in press.
- Boynton, A.L., Whitfield, J.F. and MacManus, J.P. (1980) Calmodulin stimulates DNA synthesis by rat liver cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 745-749
- Chafouleas, J.G., Bolton, W.E. and Means, A.R. (1984) Potentiation of bleomycin lethality by anticalmodulin drugs: a role for calmodulin in DNA repair. Science, 224, 1346-1348



- Dedman, J.R. (1984) The role of calmodulin in the mediation of intracellular calcium. In Mechanisms of intestinal electrolyte transport and regulation by calcium, M. Donowitz i G.W.G. Sharp, ed., pp 135-146, Alan R. Liss Inc., New York
- Higgins, G.M. and Anderson, R.M. (1931) Experimental pathology of the liver. Arch. Pathol. 12, 186-196
- Kaufman, S.H. and Shaper, J.H. (1984) A subset of non-histone nuclear proteins reversibly stabilized by the sulfhydryl cross-linking reagent tetrathionate. Exp. Cell Res. 155, 477-495
- Klee, C.B. i Vanamam, T.C. (1982) Calmodulin. Advances in Protein Chemistry 35, 213-321
- Means, A.R., Tash, J.S. i Chafouleas, J.G. (1982) Physiological implications of the presence, distribution, and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. Physiol. Rev. 62, 1-39
- Sharma, R.H. and Wang, J.H. (1978) Preparation and assay of the  $Ca^{2+}$ -dependent modulator protein. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 10, 187-190
- Soriano, M., Piñol, M.R., Enrich, C. and Bachs, O. (1985) Effect of trifluoperazine on DNA synthesis during liver regeneration. Cell Tissue Kinet. 18, 475-481
- Tubo, R.A. and Berezney, R. (1987) Pre-replicative association of multiple replicative enzyme activities with nuclear matrix during rat liver regeneration. J. Biol. Chem. 262, 1148-1154
- Welsh, M.J., Aster, J.C., Ireland, M., Alcalá, J. and Maisel, H. (1982) Calmodulin binds to chick lens gap junction in a calcium-independent manner. Science, 216, 642-644
- White, B.A. (1985) Evidence for a role of calmodulin in the regulation of prolactin gene expression. J. Biol. Chem. 260, 1213-1217

Calmodulin may regulate sialic acid metabolism by inhibiting UDP-N-Acetyl D-Glucosamine 2' epimerase activity during the first 20 hours of liver regeneration. With the aim to test this hypothesis, we have studied the effect of calmodulin on UDP N-Acetyl D-Glucosamine 2' epimerase activity *in vivo*, by injecting the anticalmodulin drug trifluoperazine 4 hours after a partial hepatectomy and also *in vitro*, using different concentrations of calmodulin. We have also carried out kinetic studies of UDP N-Acetyl D-Glucosamine 2' epimerase activity in normal and regenerating rats and in the presence and absence of calmodulin.

Results obtained show that trifluoperazine produces a 10-12 hours delay on UDP N-Acetyl D-Glucosamine 2' epimerase activity, similar to that observed in calmodulin surge, in the onset of DNA synthesis and in plasma membrane desialylation.

Concentrations higher than 50nM of calmodulin inhibit the enzyme activity.

Kinetic studies indicate that calmodulin inhibits the UDP N-Acetyl D-Glucosamine 2' epimerase activity by lowering the affinity of the enzyme for its substrate.

### Introducció

La fase prè-replicativa de la regeneració hepàtica es caracteritza per una sèrie de canvis moleculars i morfològics que culminen en la iniciació de la síntesi d'ADN a les 16-18 hores i la posterior divisió a les 28-30 hores post-hepatectomia parcial (Grisham 1962, Bucher and Swaffield 1965). Malgrat no es coneixen en profunditat els esdeveniments clau per a desencadenar la síntesi d'ADN, desde fa temps es coneix que els ions calci són