

Efecte de la calmodulina sobre el metabolisme de l'àcid siàlic durant la regeneració hepàtica

M^a Josep Coll, Oriol Bachs i Carles Enrich.

Departament de Biologia cel·lular. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. Diagonal s/n. Anexe Facultat de Farmàcia. 08028 Barcelona.

Abstract

Calmodulin effect on sialic acid metabolism during liver regeneration

The activity of UDP N-Acetyl D-Glucosamine 2'epimerase (a key enzyme of the biosynthetic pathway of sialic acids) is decreased between 6 and 20 hours after a partial hepatectomy. This decrease correlates very well with the desialylation of sinusoidal region of hepatocytes plasma membrane occurring during the same period of time.

Knowing that at 6-12 hours after a partial hepatectomy a cytosolic surge of calmodulin it is also produced and that the anticamodulin drug: trifluoperazine, injected 4 hours after rats operation, produces a 10-12 hours delay in this calmodulin surge, in the initiation of DNA synthesis and also in plasma membrane desialylation, we have studied the possibility that 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 prereplicativa 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

necessaris al final de la fase G_1 del cicle cel.lular per tal d'iniciar la replicació del material genètic en cèl.lules neoplàssiques i no neoplàssiques tant in vivo com in vitro (Whitfield et al, 1980). Tanmateix, també es coneix que el paper del calci en la iniciació de la síntesi d'ADN en cèl.lules hepàtiques in vitro es veu mediatitzat per la formació de complexos calci-calmodulina (Boynton et al, 1980).

Després de practicar una hepatectomia parcial a la rata, es pot observar l'aparició d'una ona de calmodulina citosòlica que comença a les 4 hores i que es fa màxima a les 8-12 hores post operació (Mac Manus et al, 1981). Un augment de calmodulina també es produeix en certes línies de cèl.lules transformades i en alguns tumors del fetge (Mac Manus et al, 1981). Per tant, sembla que seria necessari un augment de la concentració citosòlica de calmodulina per tal d'iniciar la síntesi d'ADN durant un procés proliferatiu.

D'altra banda, treballs anteriors (Enrich et al, 1984) mostren que durant el mateix període de temps en el qual es produeix l'ona de calmodulina, a la membrana plasmàtica té lloc una desialització de les glicoproteïnes i dels glicolípid. Aquest fet també es produeix en cèl.lules provinents de càncer de pulmó de ratolí (Vilaren et al, 1981), en cèl.lules d'adenocarcinoma mamari de rata (Howard et al, 1981), en cèl.lules de fetge de rata actives a proliferar mitjançant una injecció intravenosa d'una solució formada per triiodetironina, aminoacids, glucagó i heparina (T.A.G.H.) (Coll et al. 1985), etc.

Així , pensant en que la desialització podria també ser un esdeveniment relacionat amb la proliferació hepatocel.lular, hem estudiat per quín mecanisme es pot produir. Coneixent que l'activitat sialidasa a les 0, 2, 6 i 12 hores de la regeneració hepàtica no presenta canvis significatius (Coll et al, 1985), hem pensat en una disminució en la síntesi de molècules precursors, la qual cosa ha fet que estudiéssim l'activitat de la UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa, enzim fonamental i regulador de la biosíntesi dels àcids siàlics (Schauer et al. 1982).

Altrament, coneixent que la injecció intraperitoneal de la droga anti-calmodulina trifluoperazina (TFP) 4 hores post hepatectomia parcial produeix un retard de 10-12 hores en l'inici de l'ona citosòlica de calmodulina, en la síntesi d'ADN (Soriano et al, 1985a) i en la desialització de la regió sinusoïdal de la membrana plasmàtica (Soriano et al 1985b), hem estudiat amb més profunditat els possibles lligams entre l'ona de calmodulina citosòlica i la desialització de la membrana plasmàtica.

Material i mètodes

Animals: S'han utilitzat rates Sprague Dawley d'un pes entre 200-250 g mantingudes amb una dieta ad libitum fins 12 hores abans de ser utilitzades, moment en que se'les retira el menjar.

Tractament dels animals: L'heoatectomia parcial s'ha realitzat seguint el mètode descrit per Higgins i Anderson (1931). Totes les operacions s'han realitzat entre les 8-10 hores del matí per tal de mantenir els ritmes circadians constants.

Determinació de l'activitat UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa: L'activitat d'aquest enzim s'ha determinat en mostres de citosol obtingudes d'acord al mètode descrit per Okamoto i Akamatsu (1980). Els fetges han sigut homogenitzats en 9 volums de 10 mM tampó fosfat potàsic (pH=7.6) el qual conté 154 mM KCl, 5 mM EDTA i 2 mM dithiothreitol dins d'un homogenitzador Potter-Elvehjem. L'homogenitzat obtingut s'ha centrifugat a 10.000 x g durant 10 min. i el sobrenadant obtingut, de nou a 105.000 x g durant 1 hora. El sobrenadant obtingut d'aquesta segona centrifugació s'ha utilitzat com a extracte citosòlic.

L'activitat de l'enzim s'ha mesurat d'acord al mètode d'Spivak i Roseman (1966) amb petites modificacions introduïdes per Okamoto i Akamatsu (1980). El mètode fonamentalment consisteix en: 700 µg de proteïna citosòlica s'afegeixen a un medi d'incubació el qual conté: 200 mM Tris-ClH (pH=7,5), 2 mM UDP N-Acetyl D-Glucosamina i 50 mM MgSO₄ en un volum final de 0,4 ml. Passats 30 min. d'incubació, la reacció es para calentant 2 min. la barreja a 100°C. Després d'afegir 200 mg de resina Ag 1x8 i 600 µl d'aigua per tub, les mostres es deixen durant 5 min. a t^a ambient. Després de 10 min. de centrifugació la N-Acetyl D-Manosamina localitzada al sobrenadant es determina per el mètode de Reissig et al. (1955) utilitzant N-Acetyl D- Manosamina com standard.

Determinació de proteïnes: La proteïna citosòlica ha sigut determinada seguint el mètode de Lowry et al (1951) utilitzant albúmina de serum boví com standard.

Resultats

Activitat de la N Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa durant les 24 primeres hores de la regeneració hepàtica

Per tal d'esbrinar si la desialització de les glicoproteïnes i glicolí-

pids de la membrana plasmàtica és conseqüència d'un descens de l'activitat biossintètica de l'àcid siàlic s'ha estudiat l'activitat de la UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa, enzim que catalitza l'epimerització de la UDP N-Acetyl D-Glucosamina a N-Acetyl D-Manosamina i l'alliberament d'UDP. La figura 1 mostra els resultats obtinguts de l'activitat específica d'aquest enzim durant les 24 primeres hores que segueixen a l'hepatectomia parcial. Tal i com es pot veure, a les 6, 12, 16 i 20 hores, l'activitat específica es troba disminuïda respecte als valors obtinguts amb rates control. Aquesta disminució es correlaciona molt bé amb els resultats obtinguts amb el contingut d'àcid siàlic de la regió sinusoïdal de la membrana plasmàtica durant el mateix període de temps (Enrich et al. 1984).

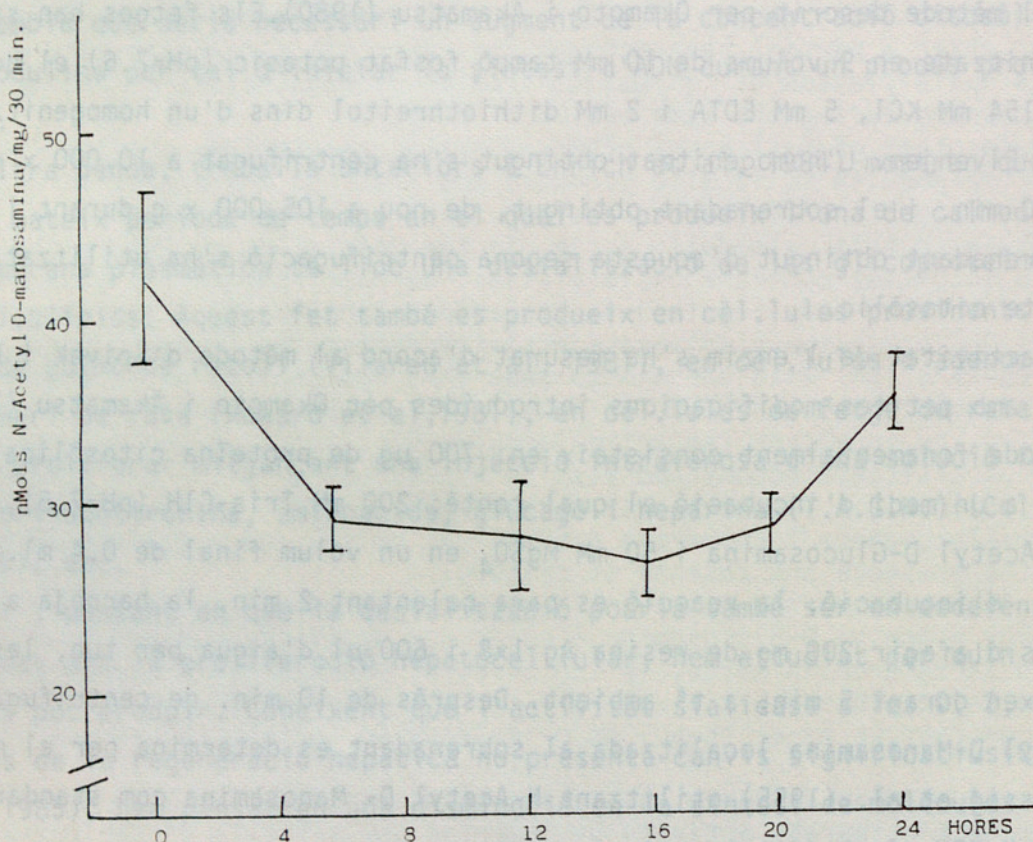


Figura 1: Activitat UDP-N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa durant les 24 primeres hores de la regeneració hepàtica. L'activitat específica està expressada amb nMols d'N-Acetyl D-Manosamina/mg prot./30 min. Cada valor representa la mitja \pm S.D. de més de 4 experiments per punt.

Efecte de la injecció intraperitoneal de trifluoperazina sobre l'activitat UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa

Estudis previs realitzats en el nostre laboratori han demostrat que la injecció de trifluoperazina (TFP) injectada 4 hores post hepatectomia parcial, produeix un retard de 10-12 hores en l'inici de la síntesi d'ADN, en l'ona citosòlica de calmodulina (Soriano et al. 1985) i en el contingut d'àcid siàlic de la membrana plasmàtica (Coll et al. 1985).

En aquest treball hem estudiat l'efecte de la TFP sobre l'activitat de la UDP N-Acetyl D- Glucosamina 2'epimerasa durant la regeneració hepàtica. Tal i com es mostra a la taula I, a les 12 i 16 hores després de practicar una hepatectomia parcial, les activitats específiques de l'enzim es troben significativament disminuïdes. No obstant, després de la injecció de TFP 4 hores post intervenció quirúrgica, es pot veure que les 12 hores de la regeneració hepàtica l'activitat de l'enzim es manté a valors control, mentre que a les 16 hores ja es troba disminuïda. Per tant aquests resultats indiquen que un cop més la injecció de TFP produeix un retard de 10 hores en l'activitat de la UDP N-Acetyl D-Glucosamina.

- Taula I- Efecte de l'injecció de TFP sobre l'activitat UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa durant la regeneració hepàtica

Temps després de l'hepa- tectomy parcial	Activitat enzimàtica
control (rates no operades)	43.21 \pm 4.27
12 hores	31.47 \pm 3.19 *
12 hores (rates inject. amb TFP)	38.04 \pm 1.31
16 hores	27.35 \pm 2.90 *
16 hores (rates inject. amb TFP)	29.91 \pm 0,43 *

Taula I : L'activitat específica s'ha mesurat en mostres de citosol. La TFP (60 mg /Kg de pes corporal) s'ha injectat per via intraperitoneal 4 hores post hepatectomia parcial. Els resultats s'expressen en n mols de N Acetyl D manosamina/mg prot/30 min. Cada valor representa la mitja \pm S.D. de \geq 5 experiments.

* $p \leq 0.01$ aplicant el test de la "t d'student".

Efecte de la calmodulina sobre l'activitat UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2' epimerasa

Coneixent que la injecció de TFP produeix un retard de 10-12 hores en tots els esdeveniments mencionats a l'apartat anterior i que durant el mateix període de temps en que es produeix l'ona citosòlica de calmodulina, es produeix un descens del contingut d'àcid siàlic a la regió sinusoïdal de la membrana plasmàtica, hem plantejat la hipòtesi de que la calmodulina podria ser responsable de regular el contingut d'àcid siàlic de la membrana plasmàtica inhibint l'activitat específica de la UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa durant les 20-24 primeres hores post hepatectomia parcial. Així, amb la finalitat de provar aquesta hipòtesi s'ha estudiat directament in vitro l'efecte de la calmodulina sobre l'activitat d'aquest enzim regulador de la biosíntesi de l'àcid siàlic. Els resultats es presenten en la taula II, en la qual es pot veure que concentracions de calmodulina compreses entre 10 i 50 nM, no tenen efecte sobre l'activitat de l'enzim. No obstant, concentracions superiors a 50 nM inhibeixen significativament l'activitat específica de l'UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa en un 30% aproximadament.

-Taula II- Efecte de la calmodulina sobre l'activitat UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa

concentració de calmodulina	activitat enzimàtica
0 (control)	43.21 \pm 4.27
10 nM	43.01 \pm 4.67
50 nM	42.62 \pm 3.80
100 nM	30.97 \pm 1.95 *
500 nM	30.09 \pm 3.90 *
5 μ M	29.64 \pm 2.98 *

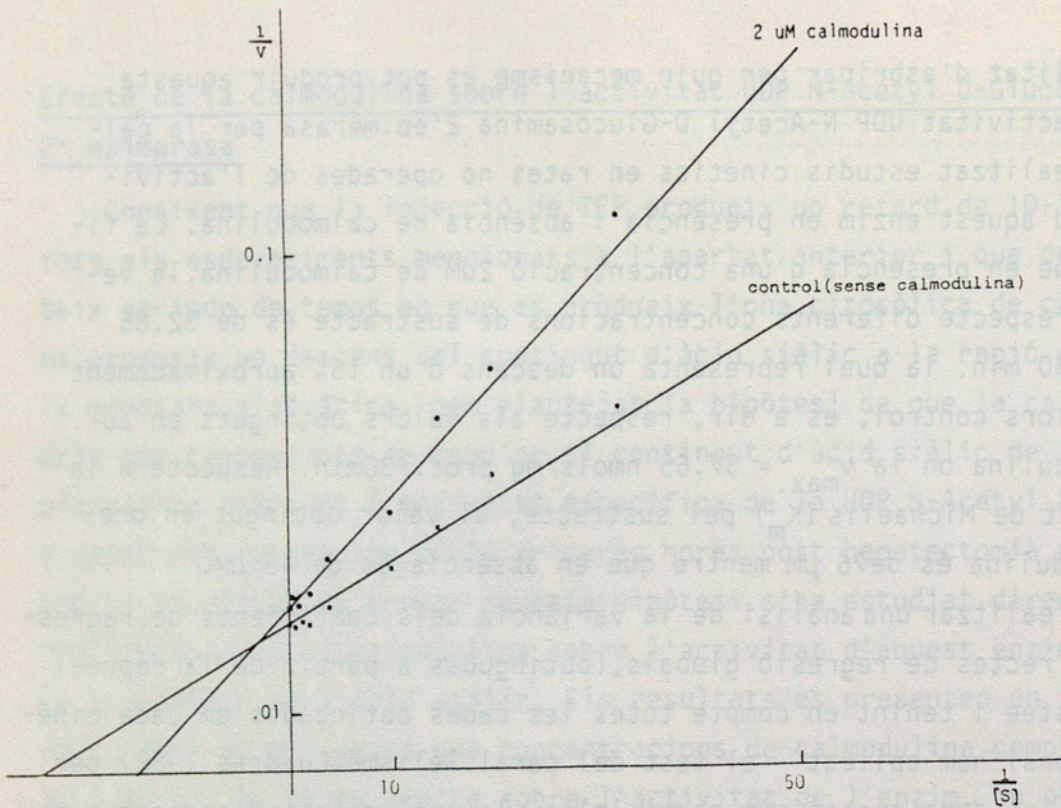
Taula II: L'activitat específica enzimàtica s'ha mesurat en mostres de citosol. Els resultats estàn expresats en nmols N-Acetyl D-manosamina/mg prot./30 min. Cada valor representa la mitja \pm \pm S.D. de \geq 5 experiments. * $p \leq 0.01$ aplicant el test de la t.

Amb la finalitat d'esbrinar per quin mecanisme es pot produir aquesta inhibició de l'activitat UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa per la calmodulina, hem realitzat estudis cinètics en rates no operades de l'activitat específica d'aquest enzim en presència i absència de calmodulina. La figura 2 mostra que en presència d'una concentració 2 μ M de calmodulina, la velocitat màxima respecte diferents concentracions de sustrate és de 32.85 nmols/mg prot./30 min. la qual representa un descens d'un 15% aproximadament respecte als valors control, es a dir, respecte als valors obtinguts en absència de calmodulina on la $v_{\max.}$ = 37.65 nmols/mg prot./30min. Respecte a la constant aparent de Michaelis (K_m) pel sustrate, el valor obtingut en presència de calmodulina és de 76 μ M mentre que en absència és de 45 μ M.

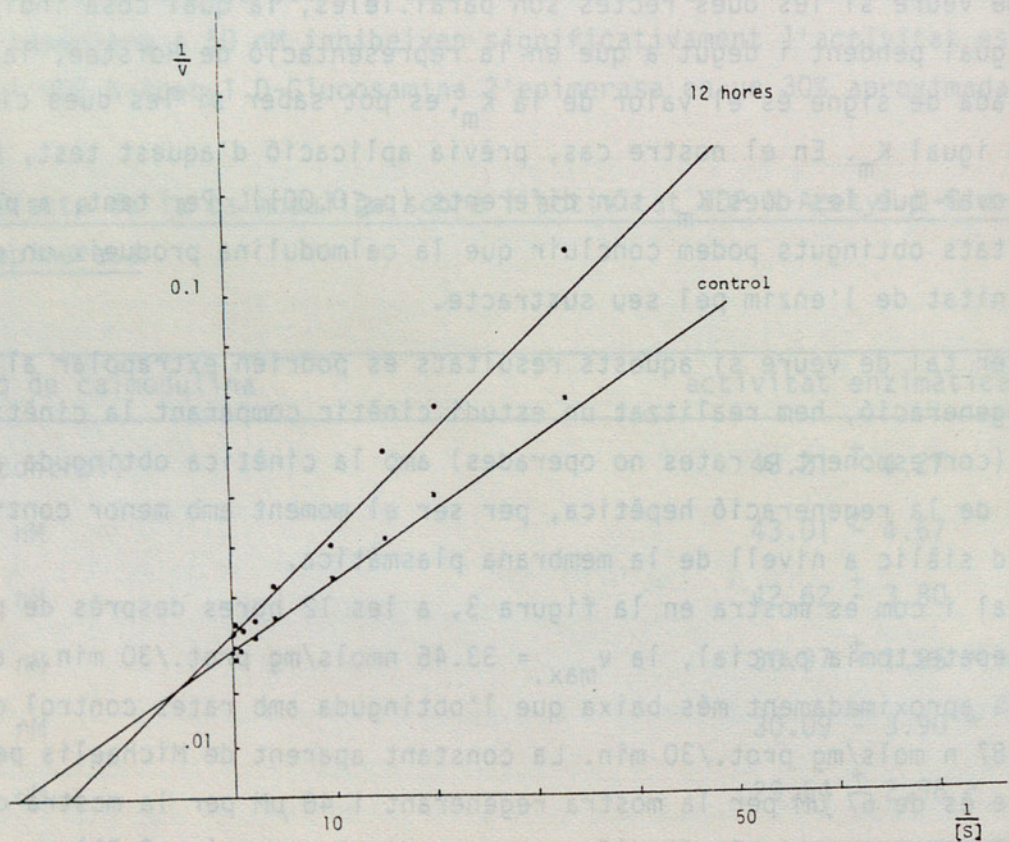
Després de realitzar una anàlisi de la variància dels coeficients de regressió de les dues rectes de regressió globals, (obtingudes a partir de la representació de Hofstee i tenint en compte totes les dades obtingudes en cada cinètica i repeticions) hem aplicat el test del paral·lelisme (Cuadras 1982) per tal de veure si les dues rectes són paral·leles, la qual cosa indicaria que tenen igual pendent i degut a que en la representació de Hofstee, la pendent canviada de signe és el valor de la K_m , es pot saber si les dues cinètiques tenen igual K_m . En el nostre cas, prèvia aplicació d'aquest test, hem pogut comprovar que les dues K_m són diferents ($p \leq 0,001$). Per tant, a partir dels resultats obtinguts podem concloure que la calmodulina produeix un descens de l'afinitat de l'enzim pel seu sustrate.

Per tal de veure si aquests resultats es podrien extrapolar al cas de la regeneració, hem realitzat un estudi cinètic comparant la cinètica control (corresponent a rates no operades) amb la cinètica obtinguda a les 12 hores de la regeneració hepètica, per ser el moment amb menor contingut d'àcid siàlic a nivell de la membrana plasmàtica.

Tal i com es mostra en la figura 3, a les 12 hores després de practicar una hepatectomia parcial, la $v_{\max.}$ = 33.46 nmols/mg prot./30 min., es a dir, un 15% aproximadament més baixa que l'obtinguda amb rates control on $v_{\max.}$ = 39.87 nmols/mg prot./30 min. La constant aparent de Michaelis per el sustrate és de 67 μ M per la mostra regenerant i 46 μ M per la mostra control. Aquestes dues K_m també són diferents estadísticament ($p \leq 0,01$) quan s'aplica el test del paral·lelisme amb els mateixos criteris que en el cas anterior. Per tant, també en el cas de la regeneració existeix una pèrdua d'afinitat de l'enzim per la UDP-NAcetyl D-Glucosamina, es a dir, pel seu sustrate.



-Figura 3-



-Figures 2 i 3: Cinètiques de l'activitat UDP-N-Acetyl D-Glucosamina 2'-epimerasa a diferents concentracions de sustrate en rates control en presència i absència de calmodulina(Fig.2) i en rates control i regenerants 12 hores (Fig.3). (•) rates control, (◦) rates controlen presència de calmodulina i regenerants. $V = \text{nmols N-Acetylmanosamina/mg/30 min.}$ S en mM.

Discussió

Actualment sembla estar força clar el fet de que l'unió de les glicoproteïnes de la membrana plasmàtica amb la matriu extracel·lular està relacionada amb la regulació de la proliferació i la diferenciació cel·lulars (Watt, 1986). Ja que l'àcid siàlic normalment és el sucre terminal de les glicoproteïnes, és possible imaginar el fet de que modificacions en el seu contingut produeixi canvis d'afinitat de les glicoproteïnes de la membrana plasmàtica amb els lligands de la matriu afectant d'alguna manera a la proliferació i a la diferenciació.

Treballs anteriors nostres han demostrat que durant la proliferació hepatocel·lular existeix un descens en el contingut d'àcid siàlic de la regió sinusoïdal abans d'iniciar-se la síntesi d'ADN (Enrich et al. 1984, Coll et al 1985). Així, pensant en que la desialització és un fet relacionat amb la proliferació, s'ha estudiat per quin mecanisme es pot produir. Els resultats presentats a la figura 1, mostren que l'activitat de la UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa es troba disminuïda de les 6-20 hores post hepatectomia parcial. Per tant, el descens en el contingut d'àcid siàlic durant la proliferació hepatocel·lular pot estar produït per una disminució de la seva síntesi.

D'altra banda, diversos fets indiquen que l'ona de calmodulina citosòlica podria ser responsable de produir el descens en l'activitat de l'UDP-N-Acetyl D-Glucosamina 2' epimerasa ja que:

- 1) quan la droga anticalmodulina TFP és injectada 4 hores post hepatectomia parcial, es produeix un retard de 10-12 hores de l'ona de calmodulina citosòlica, de la síntesi d'ADN, de la desialització de la membrana plasmàtica i del descens de l'activitat específica de la UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa (taula I).
- 2) Concentracions superiors a 50 nM de calmodulina inhibeixen l'activitat de l'UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa (taula II).
- 3) Els estudis cinètics de l'UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa en funció de diferents concentracions de sustrate utilitzant 2 μ M de calmodulina, indiquen que la calmodulina fa disminuir l'afinitat de l'enzim per el seu sustrate (figura 2).
- 4) A les 12 hores de la regeneració també hi ha una pèrdua de l'afinitat de l'enzim pel seu sustrate (figura 3), la qual cosa, un cop més fa pensar que la calmodulina podria ser responsable d'aquest fet.

No obstant, ja que la K_m obtinguda a les 12 hores obtinguda a les 12 hores

és lleugerament inferior ($67 \mu\text{M}$) a l'obtinguda amb rates control utilitzant $2 \mu\text{M}$ de calmodulina ($76 \mu\text{M}$), la interpretació que ens sembla més probable és la de que durant la regeneració hepàtica la calmodulina possiblement no produeix un canvi d'afinitat del 100% de les molècules sinó d'aproximadament un 90%.

Actualment, no coneixem com pot actuar la calmodulina per tal d'inhibir l'activitat de l'UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa. Ara bé, al menys existeixen tres possibilitats diferents:

- a) per l'unió directe de la calmodulina amb l'enzim,
- b) per una fosforilació de l'enzim per acció d'una protein quinasa dependent de calmodulina,
- c) per una defosforilació de l'enzim per una protein fosfatasa dependent de calmodulina.

Per tant, la conclusió a la que arribem a partir dels resultats obtinguts en aquest treball, és la de que es pot postular el fet de que la calmodulina regula el contingut d'àcid siàlic de la membrana plasmàtica disminuint l'afinitat de l'UDP N-Acetyl D-Glucosamina 2'epimerasa per l'UDP N-Acetyl D-Glucosamina, sustrate de l'enzim i metabòlit fonamental de la biossíntesi dels diversos àcids sialics.

Bibliografia

- BOYNTON A.L., WHITFIELD J.F. i MAC MANUS J.P. (1980). Calmodulin stimulates DNA synthesis by rat liver cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 745-749.
- BUCHER N.L.R. i SWAFFIELD M.N. (1965). The rate of incorporation of labelled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regeneration rat liver in relation the amount of liver excised. Cancer Res 24, 1611-1625.
- COLL M.J., BACHS O., DOMINGO J., SERRATOSA J., i ENRICH C. Paper de l'àcid siàlic a la proliferació hepatocel.lular. Biol. Desenvolup. 3, 35-41 (1985).
- CUADRAS C.m. (1982). Analisis estadístico en regresión. En Problemas de probabilidades y estadística, vol.2: Inferencia estadística, cap.7.
- ENRICH C., BACHS O., RIUS E., SERRATOSA J. i DOMINGO J. Quantitative and qualitative changes of plasma membrane glycoproteins in the early period of liver regeneration. Cell Biochem. Funct. 2, 269-275 (1984).
- GRISHAM J.W. (1962). Morphometric study of deoxyribonuclei acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: Autoradiography with thymidine-H3. Cancer Res. 22, 842-849.
- HIGGINS G.M. i ANDERSON R.M. (1931). Experimental pathology of liver. Arch. Path. 12, 186-202.

MANEJO I ACTIVACIÓ DELS LINFOCITS T

- HOWARD S.C., SHERBLOM A.P., HIGGINS J.W., CARTHERS A., CARRAWAY C.A. i CARRAWAY K.L. (1981). Shedding of the major plasma membrane sialoglycoprotein from the surface of 13762 rat ascites mammary adenocarcinoma cells. Arch. Biochem. Biophys. 207, 40-50.
- LOWRY O.H., ROSENBERG N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Prorein measurement with the foling phenol reagent. J.Biol.Chem 193, 265-273.
- MAC MANUS J.P., BRACELAND B.M., RIXON R.H., WHITFIELD J.F. i MORRIS H.P. (1981). An increase in calmodulin during growth of normal and cancerous liver in vivo. FEBS Lett. 133, 99-102.
- REISSIG J.L., STROMINGER J.L. i LELOIR L.F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J.Biol. Chem. 217, 959-966.
- OKAMOTO Y. i AKAMATSU N. (1980). Metabolism of sialic acid in regenerating rat liver. Biochem J. 188, 905-911.
- SCHAUER R. (1982). Sialic acids. Chemistry, metabolism and function. En Cell Biology monographs 10, 263-307.
- SORIANO M., PIÑOL M.R., ENRICH C. i BACHS O. (1985). Effect of trifluoperazine on DNA synthesis during liver regeneration. Cell and Tissue Kinet 18, 475-481 (a)
- SORIANO M., PIÑOL M.R., COLL M.J., BACHS O., ENRICH C. i ESTADELLA M.D. (1984). Efecte de la trifluoperazina a la regeneració hepàtica. Biol. Desenvolup. 2, 143-148.
- SPIVAK CH.T. i ROSEMAN S. (1966). UDP N- Acetyl D-Glucosamine 2'epimerase. Methods Enzymol. 9, 612-615
- VILAREN M.J., JOUANNEAN J. i BOURRILLON R. (1981). Differences in sialic acid contents of low cancer cells, high cancer cells and normal mouse lung counterparts. Biochem. Biophys. Res. Comm. 98, 7-14.
- WATT F.M. (1986). The extracellular matrix and cell shape. TIBS 11, 482-485.
- WHITFIELD J.F., BOYNTON A.L., MAC MANUS J.P., RIXON R.M., SIKORSKA M., TSANG B. i WALKER P.R. (1980). The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation. Ann. New York Acad. Sci. 339, 216-240.