

Efecto del calcio, la glucosa y la trifluoperazina sobre la carboxilmetilación de proteínas en islotes pancreáticos de rata

P. Mena*, C. Barriga y J. E. Campillo

Departamento de Fisiología
Universidad de Extremadura
06071 Badajoz (España)

(Recibido el 10 de octubre de 1987)

P. MENA, C. BARRIGA and J. E. CAMPILLO. *Effect of Calcium, Glucose and Trifluoperazine on Carboxymethylation of Proteins in Rat Pancreatic Islets*. Rev. esp. Fisiol., 44 (2), 211-214, 1988.

In the isolated pancreatic islets incubated *in vitro*, carboxymethylation increases following stimulation with 20 mM glucose. This increase is dependent on extracellular calcium concentration and is suppressed in the presence of trifluoperazine, a calmodulin inhibitor. In conclusion, the increase in carboxymethylation induced by 20 mM glucose seems to be a calcium-dependent process and it is probably mediated by calmodulin.

Key words: Calcium, Calmodulin, Islets of Langerhans, Carboxymethylation.

La carboxilmetilación es una modificación covalente de proteínas que juega un importante papel en numerosos procesos reguladores (8). Diversos estudios han sugerido que la enzima proteín-carboxilmetilasa (PCM; EC 2.1.1.24) puede estar implicada en el acoplamiento entre estímulo y secreción. Así, en diversos tejidos secretorios como la glándula parótida (10), la médula adrenal (4), el páncreas exocrino (9), los islotes de Langerhans (1), las plaquetas (3) y los sinaptosomas (5), se han obtenido resultados que apoyan esta hipótesis.

El mecanismo(s) mediante el cual la

carboxilmetilación de proteínas puede actuar en la regulación de la secreción celular no ha sido aclarado. Ya que se ha demostrado que la calmodulina es un excelente sustrato para la carboxilmetilación (6) y que la actividad de la PCM es dependiente de calcio (3), la carboxilmetilación puede relacionarse con la secreción vía mecanismos que impliquen al calcio y la calmodulina.

El presente trabajo estudia si las hipótesis anteriormente expuestas son aplicables a la carboxilmetilación de proteínas en islotes pancreáticos de rata incubados *in vitro* bajo condiciones basales y estimulantes, baja y alta concentración de glucosa respectivamente.

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

Material y Métodos

Los islotes pancreáticos se obtenían de páncreas de ratas machos Wistar, de 250 g aproximadamente, mediante digestión con colagenasa (Sigma) siguiendo el método de COLL-GARCÍA y GILL (2).

Grupos de 25 islotes recién obtenidos se preincubaban a 37° C durante 30 min en tubos de plástico de 1 ml de capacidad con 0,1 ml de medio Krebs-Henseleit bicarbonato, pH 7,4, equilibrado con 95 % O₂ y 5 % CO₂, conteniendo 1,3 [H-metil]-metionina de 80 Ci/mmol de actividad específica (New England Nuclear) 1,3 μM, glucosa 3,3 mM y 2 mg/ml de dextrano (PM 70000, Sigma). Después de la preincubación, la concentración de glucosa en el medio se incrementaba a 20 mM mediante la adición de 10 μl de medio conteniendo una glucosa concentrada. A los tubos control se les añadían 10 μl de medio conteniendo 3,3 mM glucosa. Finalmente se incuban en baño a 37° C.

A los tiempos indicados en los resultados, la incubación se detenía mediante la adición de 1 ml de ácido tricloroacético al 10 % (p/v) y se centrifugaba durante 3 min a 12.000 × g. Las últimas dos operaciones se repiten tres veces hasta obtener un completo lavado del precipitado.

Los niveles de carboxilmetilésteres en el precipitado se determinaban siguiendo el método descrito por CAMPILLO y ASHCROFT (1), contándose finalmente el metanol radiactivo mediante espectrometría de centelleo líquido.

De forma similar se realizaron experimentos de incubación de islotes pancreáticos tanto en condiciones basales (glucosa 3,3 mM) como en condiciones estimulantes (glucosa 20 mM) utilizando un medio Krebs-Henseleit bicarbonato con una concentración de calcio de 4 mM. Al estimular con glucosa 20 mM, el mayor incremento en la carboxilmetilación se producía a los 10 min de incubación (tabla I), por lo que se la detenía a ese

tiempo para medir los niveles de carboxilmetilación.

En otra serie de experimentos se adicionó al final de la preincubación e inmediatamente antes de estimular los islotes con glucosa 20 mM, EGTA o trifluoperazina (TFP), inhibidor de la calmodulina. Las concentraciones finales de EGTA y de TFP fueron de 5 mM y 10 μM respectivamente.

Todos los resultados están expresados como la media ± el error estándar de la media. En los casos que se indican, se aplicó el test de Student para muestras no apareadas.

Resultados y Discusión

Diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han mostrado que la estimulación de diversas glándulas tiene como consecuencia un incremento rápido y reversible en los niveles de carboxilmetilación. Así, en glándulas parótidas (10), la administración de isoproterenol a ratas y la estimulación de cortes de parótidas produce un incremento de la carboxilmetilación; la utilización de un inhibidor, en este caso propranolol, inhibe dicho proceso. En páncreas exocrino (9), pancreozimina y carbacol producen secreción de amilasa pancreática asociada a un incremento transitorio en la carboxilmetilación que se suprime al incorporar EGTA al medio de incubación. Fenómenos similares ocurren en la médula adrenal (4) al estimular con acetilcolina.

En un estudio previo (1), se incubaron islotes pancreáticos intactos durante 90 minutos en presencia de glucosa 20 y 3,3 mM, no detectándose diferencias significativas en los niveles de carboxilmetilación. Debido a la naturaleza transitoria del aumento en la carboxilmetilación, era necesario estudiar este fenómeno a diferentes tiempos menores de 90 minutos.

Cuando los islotes son estimulados con altas concentraciones de glucosa, tiene lu-

Tabla I. Efecto de diferentes concentraciones de glucosa (mM) sobre los niveles de carboximetilación de proteínas en islotes pancreáticos intactos incubados in vitro a distintos tiempos.

Los resultados corresponden al metanol radiactivo liberado de los carboximetilésteres (dpm). La significación se calculó para las diferencias en los resultados de glucosa 3,3 mM frente a los de glucosa 20 mM para cada tiempo de incubación. n.s. = no significativo.

TIEMPO (min)	GLUCOSA		SIGNIFICACION
	3,3	20	
5	5793±699	7900±869	p < 0.05
10	5460±225	7756±305	p < 0.01
30	7252±729	7367±288	ns

gar un aumento significativo de más del 40 % en los niveles de carboximetilación de proteínas, dándose el máximo entre los 5 y los 10 minutos de incubación (tabla I). Este hecho concuerda con las observaciones citadas anteriormente y sugiere que la carboximetilación es un fenómeno que puede estar implicado en el acoplamiento entre estímulo y secreción.

En la figura 1 se representa los niveles de carboximetilación de proteínas en islotes pancreáticos medidos como metanol radiactivo liberado, en distintas condiciones experimentales. En abscisa se muestra en cada caso la utilización de glucosa 3,3 o 20 mM, calcio 2 ó 4 mM y la ausencia o presencia de EGTA 5 mM. Cuando se utiliza una concentración de calcio doble de la fisiológica (4 mM), el incremento en la carboximetilación al estimular con glucosa 20 mM es mucho más pronunciado (del orden del 60-70 %), mientras que la presencia de EGTA 5 mM en el medio de incubación suprime totalmente el incremento en la carboximetilación producido por la estimulación con glucosa. Como se ha demostrado para otras glándulas de secreción, en los islotes de Langerhans el incremento en la carboximetilación de proteínas parece ser un fenómeno dependiente de calcio.

Parece hoy evidente que algunos de los

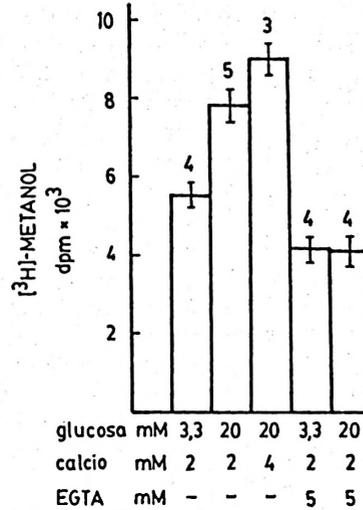


Fig. 1. Efecto de diferentes concentraciones de calcio y de EGTA en el medio extracelular sobre los niveles de carboximetilación de proteínas en islotes pancreáticos de rata intactos incubados in vitro.

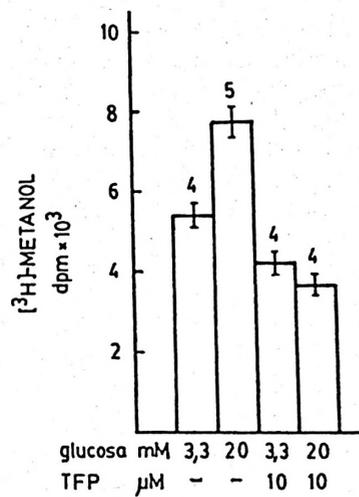


Fig. 2. Efecto de la trifluoperazina en el medio extracelular sobre los niveles de carboximetilación de proteínas en islotes pancreáticos intactos incubados in vitro.

efectos del calcio sobre los procesos secretorios están mediados por calmodulina. Así, la secreción de insulina inducida por glucosa es inhibida por la TFP (7).

En la figura 2 se representan los niveles de carboxilmetilación de proteínas en islotes pancreáticos medidos como metanol radiactivo liberado tras la hidrólisis de los carboxilmetilésteres formados durante la incubación en diferentes condiciones experimentales: glucosa (3,3 ó 20 mM) en presencia o ausencia de trifluoperazina.

En TFP 10 μ M en el medio de incubación suprime el incremento en la carboxilmetilación inducido por glucosa, lo que plantea la posibilidad de que el incremento en la carboxilmetilación transcurra por mediación de la calmodulina.

Al igual que el complejo calcio-calmodulina actúa estimulando la miosina-quinasa y la proteína-quinasa, a través de cuya acción se consigue la polimerización de los microtúbulos y la puesta en funcionamiento de los microfilamentos que conducen al movimiento del gránulo, dicho complejo podría activar a la proteína-carboxilmetilasa, produciéndose el incremento en la carboxilmetilación.

Los resultados muestran que parece existir una clara relación entre la actividad secretora de los islotes pancreáticos y la carboxilmetilación, con elementos comunes a ambos procesos como son el calcio y la calmodulina, aunque en el estado actual de estudios no se conocen aún los mecanismos íntimos que subyacen a estos fenómenos.

Resumen

Se estudia la carboxilmetilación de proteínas en islotes pancreáticos de rata incubados *in vitro*, en

presencia de diferentes concentraciones de glucosa (3,3 y 20 mM). La carboxilmetilación aumenta con glucosa 20 mM, aumento que se incrementa al duplicar la concentración de calcio extracelular y se anula cuando en el medio hay EGTA. Asimismo, el incremento se anula cuando en el medio hay trifluoperazina (10 μ M), un inhibidor de la calmodulina. Parece ser, por tanto, que el aumento en los niveles de carboxilmetilación, producido en los islotes pancreáticos tras la estimulación con glucosa, es dependiente de calcio y puede estar mediado por la calmodulina.

Palabras clave: Calcio, Calmodulina, Islotes de Langerhans, Carboxilmetilación.

Bibliografía

1. Campillo, J. E. y Ashcroft, S. H. J.: *FEBS Lett.*, 138, 71-75, 1982.
2. Coll-García, E. y Gill, J. R.: *Diabetologia*, 5, 61-66, 1969.
3. Diliberto, E. J. Jr., O'Dea, R. F. y Viveros, O. H.: En «Transmethylation» (Usdin, E., Borchardt, R. T. y Creveling, C. R. eds.). Elsevier/North Holland, Nueva York, 1979, pp. 529-538.
4. Diliberto, E. J. Jr., Viveros, O. H. y Axelrod, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 4050-4054, 1976.
5. Eiden, L. E., Borchardt, R. T. y Rutledge, C. O.: En «Transmethylation» (Usdin, E., Borchardt R. T. y Creveling, C. R. eds.). Elsevier/North Holland, Nueva York, 1979, pp. 539-546.
6. Gagnon, C., Kelly, S., Manganiello, V., Vaughn, M., O'dya, C., Strittmatter, W., Hoffman, A. y Hirata, F.: *Nature*, 291, 515-516, 1981.
7. Howell, S. L.: *Diabetologia*, 26, 319-327, 1984.
8. Koshland, D. E. Jr.: *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 765-782, 1981.
9. Povilaitis, V., Gagnon, C. y Heisler, S.: *Am. J. Physiol.*, 240, G199-G205, 1981.
10. Strittmatter, W., Gagnon, C. y Axelrod, J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 207, 419-431, 1978.