

ЕРИТРОЦИТИТЕ ИЗПОЛЗВАТ РАЗЛИЧНИ КЛЕТЪЧНИ СИГНАЛИ ЗА РЕГУЛАЦИЯ НА ГЛИКОЛИЗАТА И ЙОННИЯ ТРАНСПОРТ

Ана Манева * , Борислава Талева**, Лилия Манева -Радичева**

*Department of Biochemistry, Pharmaceutical Faculty, Medical University of Plovdiv,
15 A Vasil Aprilov str., 4002 Plovdiv, Bulgaria a_maneva@gbg.bg

**Department of Biochemistry, Medical Faculty, Medical University of Sofia, Zdrave 2 Str., 1431
Sofia, Bulgaria

ERYTHROCYTES USE DIFFERENT CELL SIGNALING TO REGULATE GLYCOLYSIS AND ION TRANSPORT

Ana Maneva*, Borislav Taleva**, Lilia Maneva-Radicheva**

* Department of Biochemistry, Pharmaceutical Faculty, Medical University of Plovdiv,
15 A Vasil Aprilov str., 4002 Plovdiv, Bulgaria a_maneva@gbg.bg

** Department of Biochemistry, Medical Faculty, Medical University of Sofia, Zdrave 2 str., 1431
Sofia, Bulgaria

ABSTRACT

Modulation of cellular signal transduction from various agents is a leading approach in pharmacology. The aim of this study is to compare the effects of one and the same modulators of phosphorylation and ion transport both on erythrocyte glycolysis and Na⁺/K⁺-ATP-ase. The results indicate that erythrocytes using different cell signal molecules in the regulation of glycolysis and activity of the sodium pump: 1) different classes PKA are probably involved in the glycolysis regulation, and Na⁺/K⁺-ATPase, 2) protein phosphatase inhibitors demonstrated opposite effects on the control of glycolysis and sodium pump, 3) caffeine and W-7 have a reliable effect of stimulation on glycolysis, but not on sodium pump.

Key words: erythrocytes, glycolysis, Na⁺/K⁺-ATP-ase, signal transduction

Еритроцитната мембрана съдържа повечето молекули, участващи в началото на сигналната трансдукция (Minetti и Low, 1997), които могат да пренасят регулаторни стимули. Модулацията на клетъчните сигнали от различни агенти е водещ подход във фармакологията за изработване на терапевтична стратегия при множество заболявания. Важно практическо значение има дали определени агенти имат еднопосочен или противоположен ефект върху основни клетъчни функции.

Еритроцитните мембранни ензими СК2 (казеин киназа 2) и PKD (протеин киназа D) са асоциирани в COP9 сигналозома (Uhe и съавт. 2003). Гликолитичните ензими алдолаза, фосфофруктокиназа и глицералдехид-3ф-дехидрогеназа образуват мембранен комплекс с band 3 върху вътрешната страна на еритроцитната мембрана (Low и съавт. 1987; Low и съавт.1993), но пируват киназата (PK) и лактат дехидрогеназата не се свързват с band 3 (Chu и Low, 2006). Асоциирането на гликолитичните ензими с band 3 се регулира от процеси на фосфорилиране с нерцепторните протеин тирозин кинази Syk и Lyn (Maccaglia и съавт. 2003) и дефосфорилиране с протеин тирозин фосфатазите PTP1B и SHPTP-2 (Zipser и съавт. 1997).

Пируват киназата (PK) е един от регулаторните ензими на гликолизата, чиято активност се регулира с фосфорилиране/дефосфорилиране (Fjii и съавт. 1984; Kiener и Westhead , 1980). PK може да бъде фосфорилирана от протеин киназа А (PKA) (Portela и съавт. 2002), Ca²⁺/CaM-зависима протеин киназа (Nakashima и съавт. 1982), фосфатидилинозитол 3 киназа (PI3K) и MAPK (Garrillo и съавт. 2000).

Наши предишни изследвания показват, че лактоферинът и флавонови съединения са стимулатори на еритроцитната гликолиза и натриева помпа (Maneva и Taleva, 2008)

Еритроцитната мембрана опосредства връзката между йонния транспорт и гликолизата в еритроцита: глицералдехид 3ф дехидрогеназата взаимодейства с цитоплазмената повърхност на Na^+/K^+ АТФ-азата и това взаимодействие се инхибира от оубаин (Fosset и Solomon, 1978). α -субединицата на Na^+/K^+ АТФ-аза и band 3 образуват хетеродимерна структура (Martin и Sachs, 1992). Подобна структурна интеграция позволява споделен контрол между гликолизата и йонния транспорт (Fosset и Solomon, 1978).

Целта на настоящата работа е да сравним ефекта на едни и същи модулатори на фосфорилирането и йонния транспорт върху двете основни функции на еритроцита – енергопродукция (гликолиза), оценявана по образуване на крайния продукт лактат и йонния транспорт, определян чрез активността на Na^+/K^+ -АТФ-аза.

МЕТОДИ И РЕАГЕНТИ

Еритроцити се получават от хепаринизирана кръв на здрави дарители по метода на Cohen и съавт. (1976).

Еритроцитни мембрани се получават от 5 ml. еритроцити, които се смесват с 15 ml леден PBS, pH 7.4 и центрофугират при 5900 g за 10 min, 4°C, промиват при същите условия и ресуспендират в 5 ml от 5 mM Na_2HPO_4 , pH 8.0, за хипотонична клетъчна хемоллиза. Лизиралите клетки се центрофугират при 25 000 g за 15 min, 4°C и получените мембрани се промиват 4-5 пъти с 5 mM Na_2HPO_4 докато станат бели (индикация за отстраняването на хемоглобина) и мембраните се използват за по-нататъшни експерименти (Vásárhelyi и съавт. 1997).

Мембраният белтък е определен по метода на Bradford (1976) с човешки серумен албумин като калибратор. Получените мембрани се разреждат с PBS до белтъчна концентрация 1.5 g/l.

Хемоглобинът (Hb) е определен по метода на Beutler (1975)

Лактат в еритроцити е изследван съгласно тест за определяне на лактат на "SigmaDiagnostics" (St. Louis, USA). Резултатите се представени като μmol лактат/g Hb.

Еритроцитна мембранна Na^+/K^+ АТФ-азна активност. Използван е ензимен кинетичен метод (Vásárhelyi и съавт. 1997). Резултатите се представят като U/g белтък.

Модулатори на фосфорилирането са доставени от „Sigma”, St.Louis, MO, USA. Използвани са G06976 (50 nM) и G06983 (50 nM) като инхибитори на РКС; Окадаева киселина (OK) - 20 nM и Calyculin A (50 nM), като инхибитори на серин/треонинови фосфатази; W-7 [*N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfonamide] - 30 μM , като антагонист на калмодулина (CaM).

Резултатите са обработени статистически с метода на вариационния анализ и групите са сравнени с теста *t* (Student-Fisher).

РЕЗУЛТАТИ

Инхибиторите на РКС (G06876 и G06983), протеин фосфатазните инхибитори (OK и каликулин А), кофеинът и W-7 повишават достоверно образуването на лактат (табл.1) От изследваните модулатори, единствено G06976 и G06983, които са инхибитори на РКС, стимулират достоверно Na^+/K^+ -АТФ-аза, със 194 и 84%, респ. (табл.2).

Табл.1 Ефект на модулатори на фосфорилирането върху образуването на лактат

Агенти (n = 6)	Лактат $\mu\text{mol} / \text{g.Hb}$ $\bar{x} \pm \text{SD}$	p	Разлики с контролата (%)
Без агенти	5.15 ± 0.19	-	-
Go6976	8.23 ± 0.63	<0.001	+ 60
Go6983	8.21 ± 3.24	<0.05	+59
Кофеин	8.07 ± 0.65	<0.001	+57
OK	7.84 ± 1.45	<0.001	+52
Calyculin A	7.23 ± 0.37	<0.001	+40
W-7	11.12 ± 0.30	<0.001	+116

Табл.2. Ефект на модулатори на фосфорилирането върху Na^+/K^+ - АТФ-аза

Агенти (n = 6)	Na^+/K^+ ATPase [U/g. Protein]	p	Разлики с контролата (%)
Без агенти (контрола)	4.44 ± 0.98	-	-
Go6976	13.04 ± 2.11	<0.001	+194
Go6983	8.18 ± 3.24	<0.05	+84
Кофеин	5.68 ± 1.57	>0.1	+17
OK	5.18 ± 0.61	>0.1	+ 14
Calyculin A	2.71 ± 0.98	<0.02	- 39
W-7	4.81 ± 0.86	>0.1	+8

ДИСКУСИЯ

Ефект на инхибитори на РКС

Установени са 4 изоформи на РКС в еритроцитите: α , ζ , ι и μ (PKD). Еритроцитната РКС фосфорилира серинови остатъци в band 3, band 4.1 и band 4.8 (Govekar и Zingle, 2001). Go6976 и Go6983 се използват за да се изключи участие на PKD в клетъчни сигнали. Go6976 инхибира класическите изоформи на РКС и PKD, а Go6983 инхибира само класическите изоформи. Отсъствието на разлики в ефекта на Go6976 и Go6983 върху образуването на лактат (табл.1) изключват участието на PKD в контрола на гликолизата и вероятно означават участие на класическата РКС α като отрицателен регулатор на гликолизата. Беше доказано, че РКС \square се транслоцира от вътрешността на еритроцита към мембраната му в резултат на различни стимули (Govekar и Zingle, 2001).

Go6976 (инхибитор на класическите изоформи и PKD), и също “изключващият” PKD инхибитор Go6983, активират достоверно АТФ-азната активност. Това представя РКС като

отрицателен регулатор на Na^+/K^+ АТФ-аза. Понижението в активността на натриевата помпа би могло да бъде последица от инхибиращия ефект на РКС върху Na^+/H^+ антипорт, доказано в други клетки (Haworth и съавт. 1999).

Ефектът на стимулация с Gо6976 е почти двойно по-висок от стимулацията с Gо6986 (Табл.2). Това вероятно означава специфична функция на РКD като инхибитор на Na^+/K^+ АТФ-аза. РКD има каталитичен домен, който показва повече подобие с СаМ-зависимите кинази, отколкото с изоформите на РКС. РКD ефективно фосфорилира синтетични субстрати на Ca^{2+} /СаМ-зависимата киназа II, но не катализира фосфорилирането на субстрати, типични за РКС (Ron и съавт., 1999). СаМ инхибира натриевата помпа в еритроцита (Okafor и съавт. 1997; Vingst и съавт. 1992), и поради приликите с ефектите на СаМ, би могло да се очаква участие на еритроцитната РКD във фосфорилиране, водещо до понижение в активността Na^+/K^+ АТФ-аза.

Ефект на кофеин

Механизмите, по които кофеинът стимулира еритроцитната гликолиза (табл.1), могат да включват модулация на еритроцитното белтъчно фосфорилиране (Biovin и съавт. 1988) или промени в конформацията на белтъци от еритроцитната мембрана, които улесняват достъпа на ензимите, фосфорилиращи band 3 (Sato и съавт. 1990). Известно е, че метилксантините са способни да инхибират зависимите от цикличните нуклеотиди протеин кинази, намиращи се в цитозола и еритроцитната мембрана (Biovin и съавт. 1988). Това инхибиране може да се дължи на конкуренция за АТР (Biovin и съавт. 1988) и може да бъде включено в регулацията на РК, чиято активна форма е дефосфорилираната (Kiener и Weathad, 1980; Garrillo и съавт., 2000; Nakashima и съавт., 1982). Кофеинът може да упражнява индиректен ефект върху образуването на лактат в еритроцита чрез стимулация на Na^+/K^+ АТФ-аза (Gusev и съавт. 2000), но нашите резултати показват, че кофеинът няма достоверен ефект върху активността на еритроцитната Na^+/K^+ АТФ-аза (табл.2). Установените различия могат да бъдат поради факта, че в цитираната статия са изследвани еритроцити от *Rana temporaria* (Gusev и съавт., 2000).

Ефект на протеин фосфатазни инхибитори

Окадаевата киселина (ОК) е инхибитор на серин/треонинови фосфатази (Bordin и съавт. 1993). Стимулиращият ефект на ОА върху гликолизата (табл.1) може да бъде индиректен, като последица от стимулация върху MAPK път, повишаващ Na^+/H^+ - антипорта (Sartoli и съавт. 1999). Известно е, че един от механизмите за стимулация на гликолизата е активиране на протонния експорт чрез този антипорт (Madshus, 1988). Интересен факт е, че ОА и различни растежни фактори (РФ), напр. TGF и EGF, упражняват стимулиращ ефект върху Na^+/H^+ - антипорта (NHE-1), фосфорилирайки идентични серинови остатъци в неговата молекула (Sardet и съавт. 1991). Calyculin A и ОА вероятно причиняват стимулация на гликолизата по пътища с участието на различни протеин фосфатази. Протеин фосфатазата тип I (PP1) е силно чувствителна към calyculin A (CalA), но не и към ОК. Протеин фосфатазата тип II (PP2A) е високо чувствителна и към двата инхибитора, CalA и ОА (Bize и съавт. 1999).

ОК няма ефект върху еритроцитната натриева помпа (табл.2), което вероятно означава, че фосфатазата тип II (PP2) не участва в клетъчни сигнали, ангажирани с контрола на Na^+/K^+ - АТФ-аза, но Calyculin A инхибира достоверно (с около 40%) активността на помпата, което може да се дължи на участие на PP1 в клетъчни сигнали, водещи до активиране Na^+/K^+ -АТФ-аза (табл.2).

Ефект на W-7

Като антагонист на калмодулина W-7 възстановява понижена физиологична способност на еритроцитите да променят тяхната форма при натоварване с Ca^{2+} (Murakami и сътр. 1986) и също така има вазодилатиращ ефект (Bereseviz, 1989). Благоприятният ефект

на W-7 върху еритроцитната реология може да се дължи на неговият стимулиращ ефект върху гликолизата и подобряване на еритроцитната биоенергетика (табл.1).

W-7 няма достоверен ефект върху Na^+/K^+ -АТФ-аза (табл.2). В литературата има данни за инхибиращ ефект на калмодулина върху еритроцитната Na^+/K^+ -АТФ-аза (Yingst и съавт. 1992). Различието може да касае специфични условия на експеримента, които изискват за проява на инхибиращия ефект на калмодулина $2 \mu\text{M}$ свободен Ca^{2+} в инкубационната среда (Yingst и съавт. 1992).

ИЗВОДИ

Еритроцитът използва различни клетъчни сигнали при регулация на гликолизата и активността на натриевата помпа. Получените резултати показват, че вероятно различни класове РКС се включват в регулацията на гликолизата и Na^+/K^+ -АТФ-аза. Протеин фосфатазните инхибитори имат противоположни ефекти при контрола на гликолизата и натриевата помпа, което показва участие на различни протеин фосфатази в клетъчните сигнали, контролиращи енергообмена и йонния транспорт. Кофеинът и W-7 имат достоверен ефект на стимулация върху гликолизата, но не и върху натриевата помпа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beresewiz A., 1989. Anti-ischemic and membrane stabilizing activity of calmodulin inhibitors. *Basic Res.Cardiol.*, 84, 631-645
2. Beutler E., 1975. Hemoglobin estimation. In: *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. Basic techniques and equipment.* 2-nd Ed. (Grune and Stratton, ed.), New York, pp.112-114
3. Bize I., B. Güvenç, A. Robb, G. Buchbinder. and C. Brugnara., 1999. Serine/ threonine protein phosphatases and regulation of K-Cl cotransport in human erythrocytes. *Am. J. Physiol.*, 277: C926-C936.
4. Bordin, L., G.Clari, M. Bellato, C. Tessarin, V. Moret, 1993. Effect of okadaic acid on membrane protein phosphorylation in human erythrocytes. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 195, 723-729
5. Bovin, P., M. Garbartz, C. Galand., 1980. Casein kinase from human erythrocyte membrane, purification, characterization and comparisson with cytosolic enzyme. *Int.J.Biochem.*, 12, 445-449
6. Bradford M.,1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein-binding. *Anal.Biochem.*, 72, 248-254
7. Chu H. and P.S Low., 2006..Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3. *Biochem .J.*, 400, 143-151
8. Cohen M.S., J. Mao, J. Rasmussen, J.C Serody.and B.E. Britigan,1976. Biochemical characterisation of density-separated human erythrocytes. *Biochim.Biophys.Acta*, 419, 229-237
9. Fjii S., K. Nakashima, K Shinohara.and T. Kaneko,1984. Cyclic AMP-dependent phosphorylationof erythrocyte variant pyruvate kinase. *Biochem. Med.* 31, 47-53
10. Fossel E.T. and A.K. Solomon (1978). Ouabain-sensitive interaction between human red cell membrane and glycolytic enzyme complex in cytosol. *Biochim.Biophys.Acta*, 510, 99-111
11. Garrillo J.J., B. Ibares, A.Esteban-Gamboa and J.E. Felin, 2000. Involvement of both phosphatidylinositol 3-kinase and p44/p42 mitogen-activated protein kinase pathways in the short-term regulation of pyruvate kinase L by insulin. *Endocrinology*, 142, 1057-1064
12. Govekar R.B.and S.M. Zingde, 2001.. Protein kinase C isoforms in human erythrocytes. *Ann. Hematol.*, 80, 531-534
13. Gusev G.P. and N.I. Agalakova, 2000. Na, K-Pump activation by isoproterenol, methylxanthines, and iodoacetate in erythrocytes of the frog *Rana temporaria*. *Zh Evol Biokhim Fiziol.*, 36, 106-111
14. Haworth R.S., J.S. Sinnett-Smith, E. Rozengurt and M. Avkiran, 1999. Protein kinase D inhibits plasma membrane Na^+/H^+ exchanger activity. *Am. J. Physiol.*, 277, C1202- C1209

15. Kiener P.A. and E.W. Westhead, 1980. Dephosphorylation and reactivation of phosphorylated pyruvate kinase by a cytosolic phosphoprotein phosphatase from human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96, 551-557
16. Low, P.S., D.P. Allen, T.F. Zionchek, et al., 1987. Tyrosine phosphorylation of band 3 inhibits peripheral protein binding. *J. Biol. Chem.*, 262, 4592-4598
17. Low P.S., P. Rathinavelu and M. L. Harrison, 1993. Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein, band 3. *J. Biol. Chem.*, 268, 14627-14631
18. Maccaglia A., C. Mallozzi and M. Minetti, 2003. Differential effects of quercetin and resveratrol on Band 3 tyrosine phosphorylation signalling of red blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 541-547
19. Madshus I.H., 1988. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J.* Feb 15, 250, 1-8
20. Maneva A, B. Taleva, 2008. Effect of some flavonic compounds and ascorbic acid on lactoferrin stimulation of erythrocyte glycolysis and Na⁺/K⁺-atpase activity. *Z Naturforsch C.*, 63, 773-779
21. Martin D.W. and J.R. Sachs, 1992. Cross-linking of the erythrocyte (Na⁺, K⁺) –ATPase. Chemical cross-linkers induce α -subunit-band 3 heterodimers and do not induce α -subunit homodimers. *J. Biol. Chem.*, 267, 23922-23929
22. Minetti G., and P.S Low, 1997. Erythrocyte signal transduction pathways and their possible functions. *Current Opinion in Hematology*, 4, 116-121
23. Murakami, J., N. Maeda, K. Kon and T. Shiga, 1986. A contribution of calmodulin to cellular deformability of calcium-loaded human erythrocytes. *BBA*, 863, 23-32
24. Nakashima K., Fujii S., Kaku K., and Kaneko T. (1982). Calcium-calmodulin dependent phosphorylation of erythrocyte pyruvate kinase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 96, 551-557
25. Okafor M.C., R.J. Schiebinger and D.R. Yingst, 1997. Evidence for a calmodulin-dependent phospholipase A2 that inhibits Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol.*, 272; C1365-C1372
26. Portela, P., S. Howell, S. Moreno, and S. Rossi, 2002. In vivo and in vitro phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A. *J. Biol. Chem.*, 277, 30477-30487
27. Sato, Y, T. Miura, and Y. Suzuki, 1990. Interaction of pentoxifylline with human erythrocytes. I. Interaction of xanthine derivatives with human erythrocyte ghosts. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 38, 552-554
28. Sardet C., P. Farounoux and J. Poreysseger, 1991. Alpha-thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE-1, phosphorylating a set of common sites. *J. Biol. Chem.*, 266, 19166-19171
29. Sartori M., G. Ceolotto and A. Semplicini, 1999. MAPKinase and regulation of the sodium-proton exchanger in human red blood cell. *Biochim. Biophys. Acta*, 1421, 140-148
30. Uhe S., O. Medalia, R. Waldron., R. Dumdey, P. Henklein, D. Bech-Otschir, X. Huang, M. Berse, J. Sperling, R. Schade., and W. Dubiel, 2003. Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *The EMBO Journal*, 22, 1302-1312
31. Vászrhelyi B., T. Szabó, Á. Vér and T. Tulassay, 1997. Measurement of Na⁺/K⁺-ATPase activity with an automated analyzer. *Clinical Chemistry*, 43, 1986-1987
32. Vingst, D.R., J. Ye-Hu, H. Chen, and V. Barrett, 1992. Calmodulin increases Ca²⁺-dependent inhibition of Na,K-ATPase in human red blood cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 295: 49-54
33. Yingst DR, J. Ye-Hu, H. Chen, V. Barrett, 1992. Calmodulin increases Ca-dependent inhibition of the Na,K-ATPase in human red blood cells. *Arch Biochem Biophys.* 295,1, 49-54.
34. Zipser, Y., A. Plade, N.S. Kosower, 1997. Erythrocyte thiol status regulates band phosphotyrosine level via oxidation/reduction of band 3 associated phosphotyrosine phosphatase. *FEBS Lett.*, 406, 126-130