

## ORIGINALES

*Caracterización de lípido metiltransferasa(s) en túbulos de corteza renal*

F. Manzano \*, P. Esbrit \*, C. López-Arrabe \*\*, A. Tejedor \*\* y J. M. López-Novoa \*\*

\* Laboratorio de la Unidad Metabólica. \*\* Laboratorio de Fisiología Renal.  
Fundación Jiménez Díaz. Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid.

## RESUMEN

Hemos estudiado las características básicas de la metilación de lípidos en túbulos permeabilizados de corteza renal canina. Utilizando como donante de grupos metilo la S-adenosil-L-(<sup>3</sup>H-metil)metionina, hemos encontrado mayor actividad a pH 9 que a pH 7. La actividad enzimática mostraba una K<sub>m</sub> para la S-adenosil-L-metionina de 16 μM a pH 9. A los treinta minutos de reacción a este pH, los principales productos eran la fosfatidilcolina y un lípido no polar. La actividad enzimática no se modificó por la adición al medio de incubación de Ca<sup>++</sup> o Mg<sup>++</sup> a ninguno de los pHs estudiados. La preincubación de los túbulos intactos con dosis elevadas de angiotensina II, parathormona o vasopresina tampoco alteró la metilación de lípidos. Estos resultados sugieren que esta actividad no está regulada, al menos «in vitro», por ninguno de estos agonistas relacionados con el transporte iónico en el túbulo renal.

Palabras clave: **Lípidos. Metiltransferasa. Angiotensina. Parathormona. Vasopresina. Túbulo renal.**

## CHARACTERIZATION OF LIPID METHYLTRANSFERASE (S) IN TUBULES OF RENAL CORTEX

## SUMMARY

The basic characteristics of lipid methylation reactions have been studied in canine renal tubules. Incorporation of (<sup>3</sup>H)methyl groups from S-adenosyl-L-(<sup>3</sup>H-methyl) methionine into lipids of permeabilized tubules, was higher at pH 9 than at pH 7. Measurements performed at increasing concentrations of the methyl donor yielded a K<sub>m</sub> for S-adenosyl-L-methionine close to 16 μM. Labeled phosphatidylcholine and a non-polar lipid fraction represented 60 % of the total labeled lipids generated over 30 min. incubation at pH 9. Lipid methylation activity was not modified by Ca<sup>++</sup> or Mg<sup>++</sup> at either pH studied. The activity was also unchanged after treatment of tubules with high doses of angiotensin II, parathormone or vasopressin. These results suggest that lipid methylation is not regulated, at least «in vitro», by any of these agonists related to the ion transport in the renal tubule.

Key words: **Lipids. Methyltransferase. Angiotensin. Parathormone. Vasopressin. Renal tubule.**

Correspondencia: Dr. P. Esbrit.  
Laboratorio de la Unidad Metabólica.  
Fundación Jiménez Díaz.  
Avda. Reyes Católicos, 2.  
28040 Madrid.

Recibido: 29-VII-1985.  
En forma definitiva: 10-IX-1985.  
Aceptado: 11-IX-1985.

## Introducción

La biosíntesis de fosfatidilcolina por metilaciones sucesivas de la fosfatidiletanolamina es un proceso metabólico implicado en los mecanismos de transmisión de señales en diversos tipos de células<sup>1-4</sup>. Estos mecanismos incluyen: alteraciones en la concentración de Ca<sup>++</sup> intracelular, en la fluidez y en la actividad de enzimas de la membrana y/o la liberación de ácido araquidónico<sup>4-7</sup>. Algunos estudios recientes sugieren que esta ruta de síntesis de fosfatidilcolina, aunque minoritaria en el riñón, podría estar implicada en la regulación de algunos procesos de transporte iónico<sup>8-10</sup>.

En este trabajo hemos estudiado la metilación de lípidos en túbulos permeabilizados, aislados a partir de corteza renal canina. Hemos encontrado que esta actividad no es modulada, al menos «in vitro», por Ca<sup>++</sup> o Mg<sup>++</sup>, ni por parathormona (PTH), angiotensina II o vasopresina, hormonas relacionadas con la regulación del transporte iónico renal.

## Material y métodos

**Aislamiento de túbulos renales:** Se utilizaron perros alimentados con una dieta estándar. Una vez anestesiados con pentobarbital i.v., se les practicó una nefrectomía por incisión en la línea media. Los túbulos se obtuvieron por una modificación del método de Vinay y cols.<sup>11</sup>. El riñón, inmediatamente después de extraído, se perfundió a través de la arteria renal con tampón de Krebs-Henseleit con glucosa 5 mM (KHG), pH 7,4, saturado con O<sub>2</sub> 95 por 100, CO<sub>2</sub> 5 por 100, a 4° C. Una vez decapsulado, se obtuvieron rebanadas de corteza de 0,2-0,3 mm. de espesor con un microtomo de Stadie-Riggs. Los fragmentos de corteza se incubaron con 1 mg/ml de colagenasa en KHG conteniendo 0,25 por 100 (w/v) de albúmina bovina, durante cincuenta minutos, a 37° C. A continuación, la suspensión se filtró a través de una gasa cuádruple y se diluyó hasta 50 ml con KHG frío. La suspensión resultante se centrifugó a 60 g durante 30 s y los túbulos del sedimento se lavaron tres veces más con KHG. Después del último lavado, los túbulos se resuspendieron en KHG y se mantuvieron a 4° C hasta realizar los experimentos.

La estimulación de los túbulos con las diferentes hormonas se efectuó de la siguiente manera: Los túbulos (4 mg proteína) en KHG gaseado con carbógeno fueron estimulados con el agente agonista después de una preincubación de treinta minutos a 37° C. La angiotensina II y la vasopresina se disolvieron en suero salino con 0,1 por 100 de albúmina bovina deslipidizada. La PTH se disolvió en ácido acético 10 mM. Después de la incubación, la suspensión de túbulos se centrifugó a 10.000 g durante cinco a siete segundos. Después de eliminar el so-

brenadante, el sedimento se resuspendió en tampón de Tris-acetato 50 mM, pH 9. Los túbulos se permeabilizaron por congelación rápida en hielo seco/acetona y posterior descongelación.

Para estudiar el efecto del Ca<sup>++</sup> y del Mg<sup>++</sup> sobre la metilación de lípidos, los túbulos se lavaron en KHG con EDTA 5 mM antes de la permeabilización, manteniéndose una concentración final del agente quelante de 0,5 mM durante el ensayo de metilación.

**Metilación de lípidos:** Los túbulos permeabilizados (1 mg. proteína) se incubaron a 37° C en Tris-acetato 50 mM (pH 9 ó 7) con 100 µM de S-adenosil-L-(<sup>3</sup>H-metil) metionina (1 µCi) en un volumen total de 0,5 ml. La reacción se detuvo pipeteando la mezcla de incubación en 20 vol. de cloroformo/metanol/HCl 2N (6:3:1, v/v) para extraer los lípidos. La fase clorofórmica se lavó tres veces con 1 ml de KCl 0,5 M en metanol al 50 por 100. A continuación, la fase clorofórmica se secó en N<sub>2</sub>, se disolvió en 10 ml de líquido centelleador con Tritón X-100 y se contó su radiactividad en un contador de radiación β. Los diferentes fosfolípidos marcados se separaron por cromatografía en placas de gel de sílice G, desarrolladas en ácido propiónico/alcohol n-propílico/cloroformo/agua (2:2:1:1, v/v)<sup>12</sup>. Después de la cromatografía, la sílice correspondiente a la posición de los diferentes lípidos se raspó y se contó su radiactividad. Las proteínas se determinaron por el método de Bradford<sup>13</sup>.

La colagenasa y la S-adenosil-L-metionina se obtuvieron de Boehringer Mannheim (República Federal Alemana). La angiotensina II era de Ciba (Hypertensin, Basel, Suiza). La arginina-vasopresina se obtuvo de Sigma (St. Louis, EE. UU.). La PTH 1-34 humana fue un donativo del Revlon Health Care Group (New York, EE. UU.). La S-adenosil-L-(<sup>3</sup>H-metil) metionina (5-15 Ci/mmol.) era de New England Nuclear (Boston, EE. UU.). Todos los reactivos eran de grado analítico.

**Tabla I.** Efectos del pH e iones divalentes sobre la metilación de lípidos en túbulos renales permeabilizados. La reacción se efectuó a pH 9 con 100 µM de S-adenosil-L-metionina. Los resultados son la media ± DE de dos experimentos en duplicado.

	p moles metilo incorporado × min <sup>-1</sup> × mg. proteína <sup>-1</sup>	
	pH 7	pH 9
Control .....	6,4 ± 1,6	10,2 ± 2,0
Ca <sup>++</sup> (2,5 mM) .....	6,1 ± 1,6	9,6 ± 1,2
Mg <sup>++</sup> (5 mM) .....	6,1 ± 0,1	9,6 ± 1,8

## Resultados y discusión

Hemos estudiado la incorporación de grupos ( $^3\text{H}$ )metilo en lípidos del túbulo renal cortical a dos pHs diferentes, con o sin  $\text{Ca}^{++}$  o  $\text{Mg}^{++}$  (tabla I). Observamos una mayor incorporación de ( $^3\text{H}$ )radiactividad a pH 9 que a pH 7, aunque mucho menor que la encontrada en hepatocitos<sup>1</sup>. La actividad de metiltransferasa(s) no se modificó significativamente por la presencia de  $\text{Ca}^{++}$  o de  $\text{Mg}^{++}$  a ninguno de los pHs estudiados. Un resultado similar, aunque con valores más bajos, se obtuvo utilizando una concentración menor de S-adenosil-L-metionina

A pH 9, utilizando 100  $\mu\text{M}$  de S-adenosil-L-metionina, la reacción fue lineal hasta treinta minutos de incubación y hasta 2 mg. de proteínas del túbulo. A este pH hemos encontrado una  $K_m$  de 16  $\mu\text{M}$  para la S-adenosil-L-metionina, un valor muy por debajo de su concentración renal (50-100  $\mu\text{M}$ )<sup>14</sup>. En estas condiciones, la mayoría de la ( $^3\text{H}$ )radiactividad se encontraba asociada a fosfatidilcolina y a una fracción lipídica no polar que migraba con el frente del solvente, de tal modo que a los treinta minutos de reacción ambas fracciones constituían el 60 por 100 del total de los lípidos marcados (fig. 1). Una fracción similar, constituida por ésteres metílicos de ácidos grasos, se ha descrito que aparece como producto de metilación en microsomas de varios tejidos, fundamentalmente procedentes de órganos con actividad exocrina<sup>15</sup>. La metilación de ácidos grasos y derivados podría jugar un papel en la regulación de ciertas funciones de la membrana en estos tejidos<sup>15, 16</sup>.

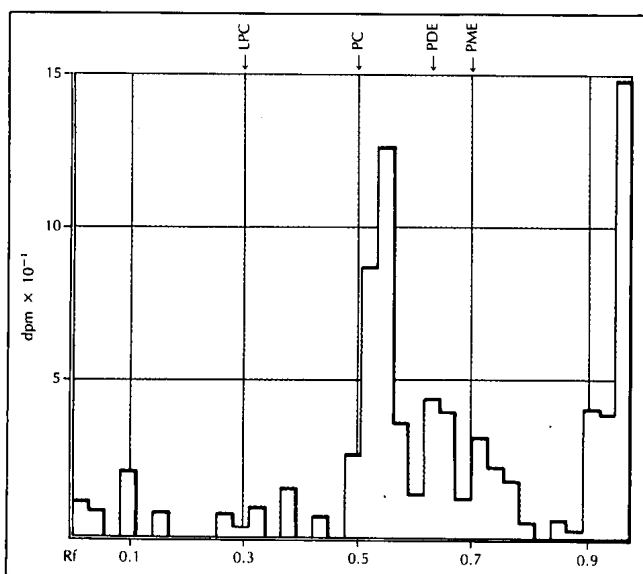


Fig. 1.—Separación de lípidos metilados en túbulos de corteza renal a los quince minutos de reacción, a pH 9. LPC, lisofosfatidilcolina; PC, fosfatidilcolina; PDE, fosfatidil-N, N-dimetiletanolamina; PME, fosfatidil-N-monometiletanolamina.

**Tabla II.** Efectos de varias hormonas sobre la metilación de lípidos en túbulos renales permeabilizados. Los túbulos se preincubaron durante veinte minutos con el agonista antes de la permeabilización. La metilación se realizó a pH 9 con 100  $\mu\text{M}$  de S-adenosil-L-metionina. Los resultados son la media  $\pm$  DE de dos experimentos en duplicado.

	Actividad enzimática
Control .....	100
Angiotensina II ( $10^{-7}$ M) .....	98 $\pm$ 6
PTH ( $10^{-6}$ M) .....	93 $\pm$ 3
Vasopresina ( $10^{-7}$ M) .....	96 $\pm$ 6

100 por 100 de actividad corresponde a 14,3  $\pm$  2,0 pmoles metilo incorporado/ $\text{min}^{-1}/\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>.

La preincubación de los túbulos con dosis elevadas de angiotensina II ( $10^{-7}$  M), PTH ( $10^{-6}$  M) o vasopresina ( $10^{-7}$  M) durante un tiempo máximo de veinte minutos no afectó la metilación de lípidos en los túbulos permeabilizados (tabla II). Estos resultados contrastan con otros hallazgos en hepatocitos de rata, donde dosis idénticas a las utilizadas en estos estudios, de angiotensina II y vasopresina, producen una estimulación rápida de la metilación de fosfolípidos<sup>17</sup>. Por otra parte, concentraciones elevadas de PTH similares a las nuestras estimulan el metabolismo de los fosfoinosítidos en túbulos renales «in vitro»<sup>18, 19</sup>.

Estos resultados sugieren que la metilación de lípidos no está asociada a la acción, al menos «in vitro», de angiotensina II, PTH o vasopresina, en el túbulo renal cortical.

## Bibliografía

1. Castaño JG, Alemany S, Nieto A y Mato JM: Activation of phospholipid methyltransferase by glucagon in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 255:9041-9043, 1980.
2. Ishizaka T, Hirata F, Ishizaka K y Axelrod J.: Stimulation of phospholipid methylation,  $\text{Ca}^{2+}$  influx and histamine release by bridging of IgE receptors on rat mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1903-1906, 1980.
3. Saceda M, García-Morales P, Mato JM, Malaisse WJ y Valverde I: Phospholipid methylation in pancreatic islets. *Biochem Int* 8:445-452, 1984.
4. Mato JM y Alemany S: «What is the function of phospholipid N-methylation?» *Biochem J* 213:1-10, 1983.
5. Hirata F y Axelrod J: Enzymatic methylation of phosphatidylethanolamine increases erythrocyte membrane fluidity. *Nature* 275:219-220, 1978.
6. Hirata F y Axelrod J: Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science* 209:1082-1090, 1980.
7. Mato JM y Marín-Cao D: Protein and phospholipid methylation during chemotaxis in Dictyostelium discoideum and its relationship to calcium movements. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6106-6109, 1979.

8. Chauchan VPSy Kalra BK: Effect of phospholipid methylation on calcium transport and  $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$  ATPase activity in kidney cortex basolateral membranes. *Biochim Biophys Acta* 727:185-195, 1983.
9. Yorio T y Bentley PJ: Phospholipase A and the mechanism of action of aldosterone. *Nature* 271:79-81, 1978.
10. Craven PA y Derubertis FR: Phospholipid methylation in the calcium-dependent release of arachidonate for prostaglandin synthesis in renal medulla. *J Lab Clin Med* 104:480-493, 1984.
11. Vinay P, Gougoux A y Lémieux G: Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am J Physiol* 241:F403-F411, 1981.
12. Hirata F, Strittmatter WJ y Axelrod J:  $\beta$ -adrenergic receptor agonists increase phospholipid methylation, membrane fluidity and  $\beta$ -adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:368-372, 1979.
13. Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
14. Baldessarini RJ: On the development and utilization of assays for biological transmethylation involving S-adenosyl-L-methionine. En: *Transmethylations and the central nervous system*, VM Andreoli, A Agnoli y C Fazio, ed. Springer-Verlag, pp. 31-48. Berlín, 1978.
15. Zatz M, Dudley PA, Kloog Y y Markey SP: Nonpolar lipid methylation. *J Biol Chem* 256:10028-10032, 1981.
16. Zatz M, Engelsen SJ y Markey SP: Biosynthesis of S-methyl-N-oleoylmercaptoethylamide from oleoyl coenzyme A and S-adenosylmethionine. *J Biol Chem* 257:13673-13678, 1982.
17. Alemany S, Varela I y Mato JM: Stimulation by vasopressin and angiotensin of phospholipid methyltransferase in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 135:111-114, 1981.
18. Bidot-López P, Farese RV y Sabir MA: Parathyroid hormone and adenosine-3', 5'-monophosphate acutely increase phospholipids of the phosphatidate-polyphosphoinositide pathway in rabbit kidney cortex tubules «in vitro» by a cycloheximide-sensitive process. *Endocrinology* 108:2078-2081, 1981.
19. Esbrit P y Hruska KA: Parathyroid hormone stimulates phospholipid phosphorylation and turnover in basolateral membranes of renal tubular cells in vitro. *Kidney Int* 23:98A, 1983.