

Identificazione di segnali di precursori della glicosilazione in spettri di risonanza magnetica di cellule tumorali: differenze fra linee cellulari di carcinoma e di glioblastoma.

Sveva GRANDE, Alessandra PALMA, Antonella ROSI, Anna Maria LUCIANI, Laura GUIDONI, Vincenza VITI

Dipartimento di Tecnologie e Salute e INFN Gruppo Collegato Sanità, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Alterazioni nel metabolismo dei glicani sono risultate associate a diverse patologie umane, inclusi il diabete mellito e processi neurodegenerativi. Accanto a disordini congeniti delle vie metaboliche della glicosilazione, sembra che alcuni particolari aspetti del metabolismo degli zuccheri siano coinvolti nello sviluppo e progressione tumorale. Le catene di carboidrati nei polipeptidi giocano un importante ruolo sia nel *folding* proteico e nel mantenimento della struttura terziaria, sia riguardo le proprietà funzionali delle glicoproteine (secrezione, immunogenicità, etc). La glicosilazione delle proteine è specie- e cellula-specifica ed è determinata dallo scheletro della proteina e dal sito di legame dello zucchero.

Le variazioni dei livelli di glicosilazione, come risposta a stimoli extracellulari, suggeriscono un ruolo chiave dei processi di risposta allo *stress*, con importanti risvolti sulla vita della cellula (1).

Le UDP-esosammine sono precursori del *pathway* biosintetico di glicosilazione. In particolare, la UDP- N- acetilglucosammina (UDP- GlcNAc) svolge il ruolo di substrato nella sintesi degli oligosaccaridi "O-linked" ed "N-linked" nelle glicoproteine. La conversione da glucosio a UDP-GlcNAc è mediata dal cammino biosintetico delle esosammine (HBP, "hexosamine biosynthetic pathway"); l'UDP- GlcNAc viene infine impiegata per produrre glicosaminoglicani, proteoglicani e glicolipidi.

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare del protone (^1H MRS) è una tecnica non distruttiva in grado di osservare i metaboliti cellulari direttamente nelle cellule intatte, sia "in vitro" che "in vivo". Tuttavia, questa tecnica non è stata ancora ampiamente sfruttata per lo studio del metabolismo dei carboidrati in sistemi viventi, a causa della difficoltà di individuazione dei relativi segnali in regioni spettroscopiche particolarmente affollate.

Nel presente lavoro, partendo dall'osservazione della regione a basso campo di spettri ^1H MR di diverse linee cellulari tumorali (MCF-7 di carcinoma mammario, HeLa di carcinoma della cervice, A172 e T98G di glioma), è stato possibile identificare diversi segnali spettroscopici originanti da precursori della glicosilazione quali UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc e GalNAc (acetilgalattosammina).

Materiali e metodi

Tutte le cellule sono state cresciute adese, secondo quanto descritto in un precedente lavoro (2).

Le cellule sono state trattate con NH_4Cl 20 mM per 24 ore, prima dell'esperimento NMR.

Gli esperimenti ^1H NMR sono stati effettuati a 400.14 MHz su uno spettrometro digitale Avance (Bruker, AG, Darmstadt, Germany) dotato di un *microprobe* da 1 mm. I segnali sono stati acquisiti con un impulso a radiofrequenza di 90° ed una *sweep width* di 4006.4 Hz. La soppressione dell'acqua è stata ottenuta irraggiando selettivamente il segnale.

Risultati e discussione

Gli spettri ^1H NMR di cellule umane di adenocarcinoma mammario (MCF-7) e di glioma (T98G)

sono stati confrontati con le soluzioni di UDP-N-acetilglucosammina (UDP-GlcNAc) e UDP-N-acetilgalattosammina (UDP-GalNAc). La Figura 1 mostra la regione spettrale in cui risuonano i protoni dei gruppi ammidici. Il segnale del protone ammidico dell'N-acetilglucosammina è presente nello spettro a 8.35 ppm, mentre il protone ammidico dell' N-acetilgalattosammina risuona a campi leggermente più alti e non è facilmente assegnabile negli spettri 1D. Questi segnali sono accoppiati con il protone dello zucchero esoso a 3.99 ppm e 4.22 ppm rispettivamente.

Tramite il confronto con gli spettri 2D COSY, è stato possibile assegnare il segnale a 8.35 ppm all'UDP-GlcNAc. I segnali a 8.00 ppm e 5.90 ppm provengono dall'anello dell'uridina. Le cellule HeLa (da adenocarcinoma della cervice uterina) e le cellule A172 da glioma mostrano spettri simili (dati non presentati) a quelli osservati per le altre due linee cellulari.

E' stato dimostrato che un'elevata concentrazione di ammonio nel mezzo di cultura influenza il metabolismo ed il livello intracellulare di questi zuccheri (3). Le cellule sono state quindi trattate con cloruro di ammonio prima dell'esperimento NMR. E' stato osservato che 24 ore dopo il trattamento, il segnale dell'UDP-GlcNAc a 8.35 ppm aumentava in tutte le linee cellulari (dati non presentati). L'effetto era più rilevante nelle cellule MCF-7 (Fig. 2). In queste cellule il corrispondente segnale dell'UDP-GalNAc, difficilmente visibile o assente nelle cellule non trattate, diventava evidente, in seguito a trattamento, negli spettri 2D (Fig. 2) ed anche negli spettri 1D (Fig. 3).

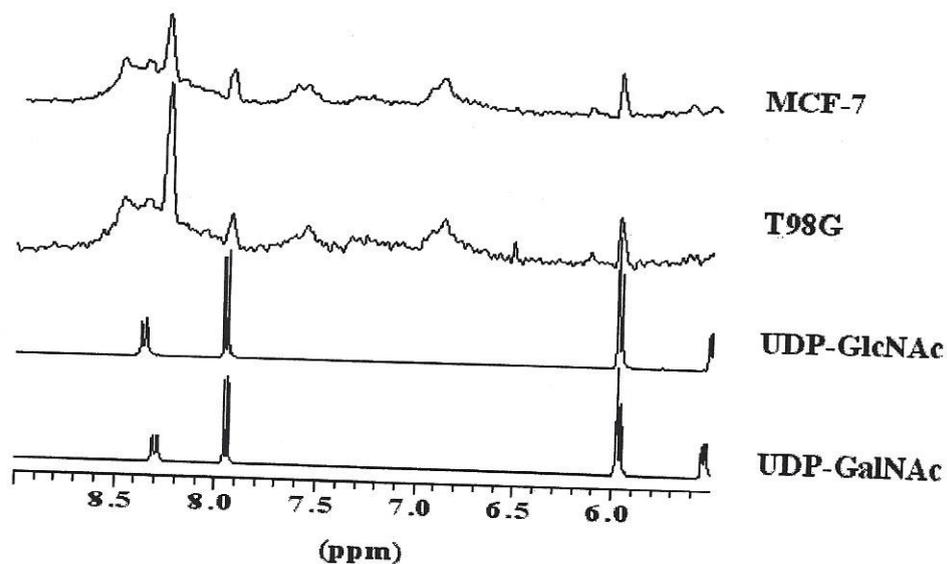


Figura 1 Regione spettrale a basso campo di spettri ^1H NMR rappresentativi delle linee cellulari MCF-7 and T98G confrontate con gli spettri di UDP-GlcNAc e UDP-GalNAc. Il 10% di D_2O è stato aggiunto per il segnale di lock.

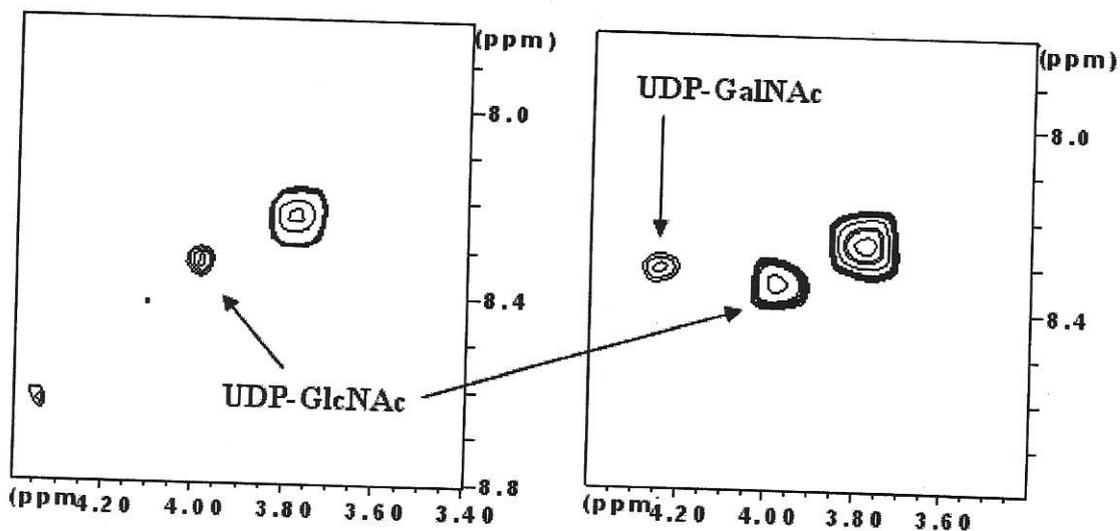


Figura 2. Spettri 2D COSY ^1H NMR di cellule MCF-7. Gli spettri si riferiscono allo stesso esperimento di Figura 1. Spettro di sinistra: campione di controllo; Spettro di destra: cellule trattate con NH_4Cl .

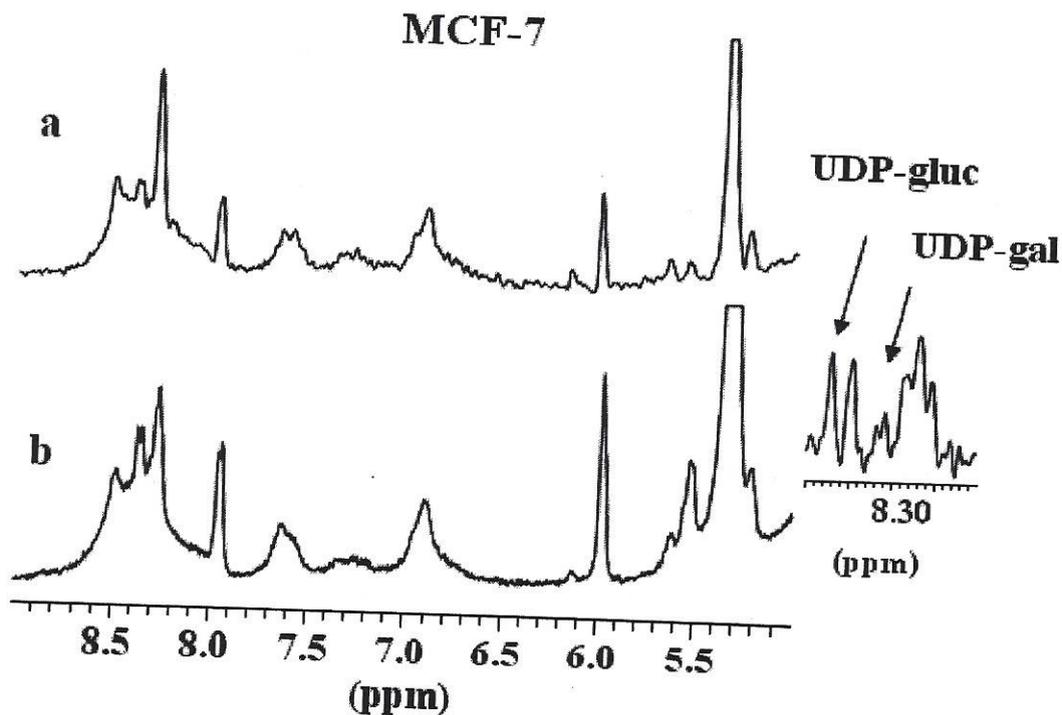


Figure 3 Spettri ^1H NMR di cellule MCF-7 : (a) controllo, (b) campione trattato per 24 ore con NH_4Cl 20 mM.

Conclusioni

Il metabolismo degli zuccheri gioca un ruolo importante nella progressione del tumore,

specialmente per quanto concerne il coinvolgimento delle UDP-esosammine, che agiscono da donatori di substrati per la glicosilazione delle proteine e dei lipidi. E' stato dimostrato che concentrazioni elevate di ammonio influenzano il metabolismo ed il livello intracellulare di questi intermedi glicosidici in cellule tumorali.

Il confronto degli spettri 1D e 2D ^1H NMR delle due linee cellulari con gli spettri dei composti in soluzione ha permesso l'assegnazione dei segnali nello spettro.

La modulazione di questi segnali attraverso il trattamento con NH_4Cl ha consentito di confermare la loro assegnazione, fornendo in questo modo un utile strumento per la quantificazione di questi metaboliti in cellule intatte. I dati qui presentati suggeriscono che questi segnali possano essere assegnati anche in biopsie o tumori *in vivo*.

Bibliografia

- [1] N.E. Zachara and G.W. Hart. *O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress*. Biochim. Biophys. Acta Vol. 1673, 2004, pp. 13-28
- [2] A. Rosi, S. Grande, A.M. Luciani, A. Palma, C. Giovannini, L. Guidoni, O. Saporà, V. Viti *Role of Glutathione in Apoptosis Induced by Radiation as Determined by ^1H MR Spectra of Cultured Tumor Cells*, Rad. Res. Vol. 167, 2007, pp. 268-282.
- [3] M. Gawlitzek D.I. Papac, M.B. Sliwkowski, T. Ryll. *Incorporation of ^{15}N from ammonium into the N-linked oligosaccharides of an immunoadhesin glycoprotein expressed in Chinese hamster ovary cells*. Glycobiology. Vol. 9, 1999, pp. 125-131.