

INDUCCIO DEL SISTEMA A DE TRANSPORT D'AMINOACIDS NEUTRES DURANT LA REGENERACIO HEPATICA

Joan Vicenç Martínez Mas, Bonaventura Ruiz Montasell, Antonio Felipe,
F.Javier Casado i Marçal Pastor Anglada

Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular. Departament de Bioquímica i Fisiologia.
Universitat de Barcelona

RESUM

- 1.-A les sis hores d'haver realitzat una hepatectomia del 70% en rata, s'observa un increment en l'activitat del sistema A de transport d'aminoàcids neutres. La inducció és estable i persistent en preparacions de membrana plasmàtica.
- 2.-La inducció no depèn de canvis en el gradient electroquímic de sodi i, per tant, és compatible amb la síntesi de nous transportadors.
- 3.-L'activitat induïda presenta sensibilitat a la N-etilmaleimida (NEM) similar a l'activitat basal.
- 4.-Existeix coinducció amb altres transportadors dependents de sodi com el transportador hepàtic de nucleòsids i la Na,K-ATPasa.
- 5.-Es conclou que en la fase pre-replicative post-hepatectomia s'indueixen coordinadament diferents sistemes de transport dependents de sodi que permetran incrementar l'assequibilitat de substrats indispensables per a la proliferació cel·lular.

INTRODUCCIO

Les cèl·lules de mamífers capten aminoàcids neutres mitjançant un sistema ubic conegut com a sistema A. Aquest transportador és concentratiu, utilitza sodi com a cosubstrat i es troba fortament regulat tant pel context hormonal com per l'assequibilitat de substrats (Kilberg i Häussinger, 1992). La manca d'aminoàcids al medi de cultiu induïx l'activitat A mitjançant un mecanisme dependent de transcripció gènica i síntesi de glicoproteïnes (Kilberg, 1986; Englesberg i Moffett, 1986; Felipe et al., 1992). Aquesta resposta és un exemple clàssic de desrepressió gènica modulada per la presència d'aminoàcids específics i sembla ser compartida per altres transportadors, com la subunitat α de la Na,K-ATPasa (Qian et al., 1991). L'activitat d'aquest transportador és també dependent de cicle cel·lular, tot i induïnt-se en la transició a fase S (Leister et al. 1989). Per al cas del fetge, s'ha demostrat la inducció d'una component de transport d'alta afinitat (assimilable a sistema A) en hepatòcits aïllats procedents d'animals hepatectomitzats (Le Cam et al., 1979; Leffert et al., 1988). De fet, en molts models fisiològics o fisiopatològics associats a hipertròfia i/o hiperplàsia hepàtica (gestació, alletament, obesitat genètica, desenvolupament), hem pogut demostrar la inducció selectiva d'aquesta activitat de transport (Pastor-Anglada et al., 1987; Casado et al., 1987a,b; Ruiz et al., 1991; Felipe et al., 1993; Martínez-Mas et al., 1993). En el present treball pretenem esbrinar les bases bioquímiques responsables de l'increment en l'activitat del sistema A que s'esdevé immediatament després de l'hepatectomia parcial. En concret volem estudiar: a) Si la component d'alta afinitat realment es correspon amb activitat A. b) Si la inducció del sistema A és estable. c) Si depèn de canvis en la velocitat de desaparició del gradient electroquímic de sodi. d) Si l'activitat induïda té un nivell de sensibilitat a reactius modificadors de grups -SH similar a l'activitat basal o, pel contrari, similar a la pròpia de cèl·lules transformades. e) Volem establir si existeix coinducció amb la Na,K-ATPasa.

MATERIALS I METODES

Animals. Els animals (rates Wistar mascles, 200-230g) foren anestesiats amb pentobarbital (60mg/kg.p.c.) i s'els va realitzar una hepatectomia del 70% (Higgins i Anderson, 1936). Un segon grup d'animals patiren el mateix procediment quirúrgic sens que els fós estirpat cap lòbul hepàtic. Aquest grup era considerat el control.

Aïllament de vesícules de membrana plasmàtica. A les sis hores d'haver-se realitzat la intervenció quirúrgica, els animals hepatectomitzats i llurs respectius controls foren sacrificats per decapitació i s'aïllaren vesícules de membrana plasmàtica (Pastor-Anglada et al., 1987). Aquesta tècnica permet obtenir considerables quantitats de membrana cel·lular, la qual reté bona part de llurs capacitats de transport d'aminoàcids neutres (sistemes A, ASC i N) (Pastor-Anglada et al., 1987; Casado et al., 1988; Ruiz et al., 1991), àcids monocarboxílics (Quintana et al., 1988) i nucleòsids (Ruiz-Montasell et al., 1992). Les preparacions procedents d'ambdós grups experimentals, rates hepatectomitzades i controls, presenten volums vesiculars similars, així com perfils proteïcs idèntics (Ruiz-Montasell et al., 1993).

Mesures de transport. Les taxes de captació de substrats foren quantificades segons ha estat descrit prèviament

(Pastor-Anglada et al., 1987), en presència (NaSCN 100mM) o absència (KSCN 100mM) de sodi, amb els substrats tritiats a les concentracions indicades. L'activitat del sistema A corresponia a la fracció del transport dependent de sodi de L-alanina inhibible per l'anàleg α -metilaminoisobutirat. Els estudis amb el ionòfor monensina es realitzaren sota condicions prèviament descrites (Ruiz-Montasell et al., 1993). L'efecte de la N-etilmaleimida (NEM) sobre el transport de L-alanina fou estudiat tal com ha estat descrit prèviament (Chiles i Kilberg, 1986).

Estudi de la coinducció amb la Na,K-ATPasa. Extractes crus de membrana foren utilitzats per a la separació electroforètica de proteïnes en gels de SDS-poliacrilamida i la posterior transferència a filtres (Immobilón-P) per tal de procedir a l'anàlisi de tipus Western, tot i utilitzant anticossos policlonals específics de la subunitat α_1 de la Na,K-ATPasa.

RESULTATS

L'hepatectomia parcial induïx un fort increment en les taxes de transport de L-alanina mitjançant el sistema A (Taula 1), tot i que també es detecten increments significatius en l'activitat no inhibible per MeAIB (sistema ASC). Tanmateix, en el rang de concentracions de substrat assajades, la contribució relativa del sistema ASC al transport total dependent de sodi de l'aminoàcid és clarament minoritària. Quan s'analitza la captació d'altres substrats (Taula 2), s'observà que la captació d'uridina també es troba incrementada a les 6 hores post-hepatectomia. Això està d'acord amb observacions recents del nostre grup de treball, on clarament s'observava una inducció d'aquesta activitat de transport després d'hepatectomia parcial (Ruiz-Montasell et al., 1993). Tanmateix, el transport d'aminoàcids per sistemes de difusió facilitada (no dependents de sodi), com el sistema L, no es veu modificat, ja que les taxes de captació de L-leucina són idèntiques en ambdós tipus de preparació. Tampoc s'observaren canvis significatius en les taxes de captació de glucosa. Per tant, sembla ser que en la fase pre-replicative del procés de regeneració hepàtica hi ha una inducció selectiva d'activitats de transport que tenen en comú el fet d'utilitzar sodi com a cosubstrat i, per tant, ser concentratives. Aquesta coincidència podria implicar que les nostres observacions són la conseqüència de modificacions en la velocitat de desaparició del gradient electroquímic de sodi, la qual cosa podria induir efectes similars sobre tots aquells sistemes de transport que depenen d'aquest catió. Tanmateix i a l'igual que passava amb el transportador hepàtic de nucleòsids (Ruiz-Montasell et al., 1993), quan fèiem desaparèixer el gradient de sodi mitjançant un tractament amb el ionòfor monensina (Taula 3), les diferències entre ambdues situacions experimentals es mantenen, la qual cosa suggeria un efecte lligat a la pròpia activitat de transport.

Es ben sabut que el sistema A és inhibible per agents modificadors de grups -SH (tipus NEM o PCMBs) i que aquesta inhibició es pot protegir per substrats del sistema (Chiles i Kilberg, 1986). Tanmateix, també s'ha fet la interessant observació que l'activitat A de cèl·lules hepàtiques transformades (línies d'hepatomes diverses) són totalment o parcialment insensibles a NEM (Dudeck et al., 1987). Per tal d'esbrinar les característiques de l'activitat induïda durant les primeres fases del procés de regeneració, vàrem procedir a analitzar la sensibilitat al NEM de la captació dependent de sodi de L-alanina a una concentració de 0.25mM, concentració a la qual el substrat és majoritàriament captat mitjançant el sistema A. Estudis de dosi dependència demostraren que a una concentració de NEM de 5mM s'assoleix la inhibició màxima (no s'inclouen les dades). Quan utilitzarem NEM 5mM en ambdues poblacions de vesícules, observàrem que en tots dos casos aquest compost era igualment eficient a l'hora d'inhibir l'activitat del transportador (Taula 4).

Finalment, hem realitzat una aproximació a l'estudi de l'eventual coinducció de la Na,K-ATPasa. En una primera fase, encara preliminar, hem determinat els nivells de subunitat α_1 . Malgrat que a les 6 hores post-hepatectomia encara no som capaços de detectar increments significatius en la quantitat d'aquesta proteïna, sí que s'observa un augment net d'aquesta subunitat a les 9 hores després de la intervenció quirúrgica (Figura 1).

DISCUSSIO

Aquest treball clarament ens mostra que el sistema A s'indueix a les 6 hores post-hepatectomia, mitjançant un mecanisme estable que no depèn del gradient electroquímic de sodi. Aquesta observació és compatible amb la possibilitat que la inducció sigui deguda a la síntesi de nous transportadors. De fet, en hepatòcits aïllats i en cultiu, hormones i factors de creixement directament implicats en el procés de regeneració són capaços d'induir l'activitat A mitjançant un mecanisme dependent de síntesi protèica (Kilberg i Häussinger, 1992). Tanmateix, alguns d'aquests pèptids, com l'EGF o el glucagó, també poden induir l'activitat A a curt termini per mecanismes lligats a canvis de polaritat de membrana. De fet, ja Leffert i col. (1988) havien suggerit que al llarg de la transició despolariació/hiperpolariació que sembla contribuir permissivament al procés de regeneració,

L-alanina mM	Captació de L-alanina (pmol/3s.mg proteïna)	
	Sensible a MeAIB (A)	Insensible a MeAIB (ASC)
	C6	R6
0.1	38±4	92±9***
0.25	62±11	154±29***
0.5	84±18	212±34**
1	289±15	447±52**
2	318±38	545±92

Taula 1.-Efecte de l'hepatectomia parcial sobre la captació de L-alanina.
L'activitat del sistema A fou mesurada en ser inhibida per concentracions saturants de MeAIB (de 20 a 200 vegades superiors a la concentració del substrat). Els resultats són la mitja±S.E.M. de 6 a 11 determinacions. Comparacions amb el test de Student (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Captació de L-alanina (pmol/3s.mg proteïna)	Situació fisiològica	
	C6	R6
Captació de L-alanina 0.25mM	72±15	192±44*
Captació d'uridina 5µM	0.69±0.05	1.82±0.11***
Captació de L-leucina 0.2mM	55±8	55±2
Captació de D-glucosa 2mM	0.44±0.8	0.55±0.5

Taula 2.-Taxes de captació de soluts diversos a les 6 hores post-hepatectomia.
El transport dependent de sodi de L-alanina i uridina i la captació de glucosa i L-leucina fou quantificada en vesícules de feígues regenerants (R6) i llurs respectius controls (C6). Les observacions són la mitja±S.E.M. de 3 a 8 preparacions independents. Comparacions amb el test de Student (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Medi d'incubació	Captació de L-alanina (pmol/3s.mg proteïna)	
	C6	R6
NaSCN	98±4	206±17***
NaSCN + 20µM monensina	77±8	134±8***
KSCN	39±3	61±5**
KSCN + 20µM monensina	46±4	68±2**
NaSCN + MeAIB	50±6	71±8
NaSCN + MeAIB + 20µM monensina	41±4	56±7

Taula 3.-Efecte de la monensina sobre la captació de L-alanina. El transport de 0.25 mM d'alanaína en presència o en absència de 25 mM de MeAIB es va estudiar a vesícules de feígues regenerants (R6) i controls (C6). Els resultats són la mitja±S.E.M. de 4 a 12 determinacions. Comparacions amb el test de Student (**p<0.01; ***p<0.001).

	Captació de L-alanina (pmol/3s.mg proteïna)	
	C6	R6
NaSCN	73±4	127±6***
KSCN	32±5	43±5
NaSCN+NEM	51±7#	62±7###
KSCN+NEM	47±7	41±8

Taula 4.-Efecte del fraccionament amb NEM sobre el transport dependent de sodi de L-alanina.
Les preparacions C6 i R6 foren preincubades durant 30min a 25°C amb NEM 5mM. Els controls van ser pretractats de forma similar. La comparació dels efectes induïts pel NEM (#) o per l'hepatectomia parcial (*) foren analitzats amb el test de Student (#p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001). Els resultats són la mitja±S.E.M. de 6 observacions independents.

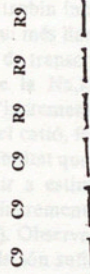


Figura 1.-Western blot de la subunitat $\alpha 1$ de la Na,K-ATPasa.
Extractes de membrana de feígues de rates que havien estat sotmeses a una hepatectomia parcial (R9) i dels seus respectius controls (C9), foren utilitzats per a la determinació de les quantitats relatives de subunitat $\alpha 1$ presents a les fraccions de membrana. Es presenten els resultats corresponents a tres preparacions independents.

s'esdevindrien canvis en l'activitat de sistemes de transport dependents de sodi, específicament el sistema A. Nosaltres més aviat creiem que la seqüència d'esdeveniments inclouria dues etapes, una primera en que moltes activitats de transport respondrien de forma inespecífica a la hiperpolarització i una segona fase en que se sintetitzarien aquells transportadors responsables de subministrar a la cèl·lula aquells substrats plàstics necessaris per a la proliferació, aminoàcids i nucleòsids. Això lliga amb la recent observació (Ruiz-Montasell et al., 1993) que el transportador concentratiu de nucleòsids també és induït a les 6 hores post-hepatectomia mitjançant mecanismes independents del gradient transmembrana de sodi. Una prova molt més directa en favor d'aquesta hipòtesi la tenim amb el fet que els nivells de subunitat $\alpha 1$ de la Na,K-ATPasa es trobin incrementats a les 9 hores post-hepatectomia. El fet que el temps per aconseguir la inducció sigui més llarg que el necessari per activar el sistema A probablement sigui explicable pel complicat procés de transcripció, traducció, acomplexament de subunitats i possibles modificacions post-traduccionals de la Na,K-ATPasa. En qualsevol cas, la coinducció d'aquestes activitats té sentit fisiològic, ja que l'increment de fluxes acoblats a sodi han de veure's compensats per una més gran eficiència d'extrusió del catió, fentòmen aquest que recauria sobre la bomba de Na,K. És interessant també considerar la possibilitat que els fluxes iònics que s'esdevenen en els primers moments post-hepatectomia puguin contribuir a estimular l'expressió d'aquestes activitats. De fet, tots dos sistemes, sistema A i Na,K-ATPasa, incrementen llur activitat en resposta a "shocks" anisotònics (Soler et al., 1993; Bowen i Bollinger, 1992). Observacions preliminars del nostre laboratori semblen suggerir que increments de 50 a 100 mosmols són suficients per fer incrementar el mRNA de la subunitat $\alpha 1$ en cultius primaris d'hepatòcits.

Un segon aspecte que creiem interessant de la nostra contribució és el fet que l'activitat A induïda sigui igualment sensible a la inhibició per NEM que l'activitat basal, fet que contrasta amb l'observació que totes les línies d'hepatomes fins ara estudiades són totalment o parcialment insensibles a l'inhibidor. Això suggereix implicacions estructurals que hauran de ser confirmades en un futur, quan disposem d'informació d'aquest sistema de transport a nivell molecular.

REFERENCIES

- Bowen, J.W. i Bollinger, D.W. (1991) *FASEB J.* 5:759
- Casado, J., Pastor-Anglada, M. i Remesar, X. (1987a) *Biochem.J.* 245:297-300
- Casado, J., Remesar, X. i Pastor-Anglada, M. (1987b) *Biochem.J.* 248:117-122
- Casado, J., Felipe, A., Pastor-Anglada, M. i Remesar, X. (1988) *Biochem.J.* 256, 377-381
- Dudeck, K.L., Dudenhausen, E.E., Chiles, T.C., Fournoux, P. i Kilberg, M.S. (1987) *J.Biol.Chem.* 262, 12565-12569
- Englesberg, E. i Moffett, J. (1986) *J.Membr.Biol.* 91, 199-212
- Felipe, A., Soler, C. i McGivan, J.D. (1992) *Biochem.J.* 284, 577-582
- Felipe, A., Remesar, X. i Pastor-Anglada, M. (1993) *Metabolism*, en premsa
- Kilberg, M.S. i Häussinger, D. eds. (1992) *Mammalian amino acid transport*, Plenum Press, NY
- Kilberg, M.S. (1986) *TIBS* 11, 183-186
- Le Cam, A., Rey, J.F., Fehlmann, M., Kitabgi, P. i Freychet, P. (1979) *Am.J.Physiol.* 236, E594-E602
- Leffert, H.L., Koch, K.S., Lad, P.J., Shapiro, I.P., Skelly, H. & de Hemptinne, B. (1988) a *The Liver: Biology and Pathobiology* (Arias, I.M. et al. eds.) pp.833-850, Raven Press, NY
- Leister, K.J., Schenerman, M.A. i Racker, E. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86, 783-786
- Martínez-Mas, J., Casado, J., Felipe, A., Marín, J.J.G. i Pastor-Anglada, M. (1993) *Biochem.J.*, en premsa
- Pastor-Anglada, M., Remesar, X. i Bourdel, G. (1987) *Am.J.Physiol.* 252, E408-E413
- Qian, N.X., Pastor-Anglada, M. i Englesberg, E. (1991) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88, 3416-3420
- Quintana, I., Felipe, A., Remesar, X. i Pastor-Anglada, M. (1988) *FEBS Lett.* 235, 224-228
- Ruiz, B., Felipe, A., Casado, J. i Pastor-Anglada, (1991) *Biochem.J.* 280, 367-372
- Ruiz-Montasell, B., Casado, J., Felipe, A. i Pastor-Anglada, M. (1992) *J.Membr.Biol.* 128, 227-233
- Ruiz-Montasell, B., Martínez-Mas, J.V., Enrich, C., Casado, F.J., Felipe, A. i Pastor-Anglada (1993) *FEBS Lett.* 316, 85-88
- Soler, C., Felipe, A., Casado, J., McGivan, J.D. i Pastor-Anglada, M. (1993) *Biochem.J.* 289, 653-658