

Transport de calci a les diferents regions de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit durant l'activació proliferativa

O. Bachs, M.R. Piñol, M. Soriano, C. Enrich, E. Rius i J. Domingo

Departament d'Histologia i Biologia Cel·lular, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Casanova 143, Barcelona - 36

Abstract

Calcium transport at the different domains of hepatocyte plasma membrane during proliferative activation

Partial hepatectomy induces liver cells to enter cell cycle. In the remaining liver tissue after partial hepatectomy in the rat, proliferative activation triggers a wave of DNA synthesis starting at 16 hours and peaking at 24 hours after surgery. Several lines of evidence suggest that calcium ions are involved in triggering DNA synthesis on liver cells in vivo after partial hepatectomy as it is observed in vitro.

In order to study if changes in calcium fluxes occur during the pre-replicative phase of liver regeneration, we have isolated three liver plasma membrane subfractions derived from the three major domains of the hepatocyte surface and studied the activity of the high affinity Ca^{2+} ATPase, the calcium transport and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange system in each fraction in normal and hepatectomized rats. Results have shown that the calcium stimulated ATPase and the calcium transport are exclusively located in the bile canalicular region of the plasma membrane indicating that the most important part of the calcium extruded is pumped out into the bile. 12 hours after partial hepatectomy we have observed an increase of passive calcium fluxes in the sinusoidal region but no modification of active calcium transport was detected. No $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity at any domain of the hepatocyte plasma membrane was found.

Introducció

Les cèl·lules hepàtiques dels mamífers adults formen poblacions cel·lulars quiescents. Diferents estímuls, entre ells l'hepatectomia parcial, poden però, provocar l'activació proliferativa dels hepatòcits induint la replicació del DNA i posteriorment la mitosi (Grisham, 1962).

Els mecanismes que regulen aquesta transició de les cèl·lules hepàtiques des de l'estat quiescent al proliferatiu, són força desconeguts, malgrat es coneixen una serie de factors, entre ells el calci, que intervenen en el desencadenament de la resposta proliferativa (Leffert et al., 1978).

S'ha proposat que el paper del calci en el control de la biosíntesi del DNA, que a les rates s'inicia 16 hores després de l'hepatectomia parcial, es concreta en la necessitat d'una acumulació intracel·lular d'aquest ió entre les 10 i les 15 hores després de la intervenció quirúrgica (Gillies, 1982). L'increment de la concentració intracel·lular de calci dispararia tota una serie de reaccions que finalitzaria amb la iniciació de la replicació del DNA.

Fins el moment actual, no s'han descrit evidències experimental directes d'increments de la concentració cel.lular de calci durant la regeneració hepàtica, degut sobre tot a que la medició directe de les concentracions intracel.lulars d'aquest ió són experimentalment molt difícils de realitzar.

Nosaltres ens hem plantejat estudiar les possibles modificacions de la concentració intracel.lular de calci estudiant els mecanismes implicats en la regulació dels fluxes d'entrada i de sortida d'aquest ió durant la regeneració hepàtica.

Actualment s'admet l'existència de tres mecanismes principals de transport de calci a través de la membrana plasmàtica de les cèl.lules eucariotes, que en definitiva regulen la concentració intracel.lular d'aquest ió. Aquests mecanismes són: 1) Els canals calci, 2) El sistema de co-transport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ i 3) El transport de calci depenent d'ATP.

L'entrada de calci a les cèl.lules es produeix a través dels canals calci i del sistema de bescanvi $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, mentre que la sortida es realitza mitjançant el transport depenent d'ATP així com a través del bescanvi $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ja que aquest últim sistema de transport funciona en els dos sentits, depenent dels gradients iònics.

Per estudiar el transport de calci a la membrana plasmàtica de les cèl.lules hepàtiques, cal tenir en compte que l'hepatòcit és una cèl.lula que presenta tres regions funcionalment diferents a la seva membrana plasmàtica: La regió sinusoïdal, en contacte amb la sang, la regió canalicular, en contacte amb la bilis i entre ambdues regions, la zona lateral que estableix contacte amb les cèl.lules veïnes.

En aquest treball presentem els resultats obtinguts en el estudi dels diferents sistemes de transport de calci a les tres subfraccions de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit a les rates normals i a les rates sotmeses a una hepatectomia parcial.

Material i mètodes

El treball experimental s'ha realitzat utilitzant rates Wistar famelles d'un pes entre 200 i 250 gr.

L'hepatectomia parcial s'ha realitzat segons el mètode descrit per Higgins i Anderson (1931) emprant eter com agent anestèsic.

Les subfraccions de membrana plasmàtica canalicular, sinusoïdal i lateral s'han purificat emprant la tècnica descrita per Wisner i Evans (1975).

L'activitat de la Ca^{2+} ATPasa s'ha mesurat segons el mètode descrit per Lotersztajn et al. (1981).

El transport de calci s'ha determinat emprant la tècnica Millipore segons

han descrit Kraus-Friedmann et al. (1982).

La determinació de la captació de calci dependent de Na^+ s'ha realitzat emprant la tècnica descrita per Caroni i Carafoli (1983).

El contingut proteic de les fraccions purificades de membrana plasmàtica s'ha determinat mitjançant el mètode descrit per Lowry et al. (1951).

Resultats

Determinació de l'activitat Ca^{2+} ATPasa a les tres subfraccions de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit

La Ca^{2+} ATPasa és un enzim vinculat al transport actiu de calci. Tal com es pot observar a la taula I, l'activitat d'aquest enzim es troba localitzada preferentment a la regió canalicular de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit. L'activitat de l'enzim a aquesta regió és aproximadament vuit vegades superior a la observada a la regió sinusoïdal i quatre vegades superior a la de la regió lateral.

Per tal de discriminar si la diferencia d'activitat observada a les tres subfraccions és deguda a diferències de la proporció de vesícules "right side out" (que no manifesten activitat de l'enzim degut que el centre actiu queda a l'interior de les vesícules) varem estudiar l'activitat de l'enzim en presència de diferents concentracions de detergent (Triton X-100) per tal de solubilitzar les membranes i aconseguir evidenciar l'activitat latent.

Els resultats obtinguts indiquen que quan la proporció detergent/Proteïna és 0.4/1, s'observa un increment de l'activitat de l'enzim que permet calcular l'activitat amagada corresponent a les poblacions de vesícules "right side out". Els percentatges obtinguts són del 10% a les fraccions de membrana canalicular, del 24% a les de membrana lateral i del 27% a les fraccions de membrana sinusoïdal. Tal com es pot veure a la Taula I, aquest increment d'activitat pràcticament no afecta a la distribució de l'activitat de l'enzim a les diferents subfraccions i, per tant, es pot concloure que la Ca^{2+} ATPasa està bàsicament localitzat a la regió canalicular de la membrana plasmàtica.

Taula I: Activitat de la Ca^{2+} ATPasa a les tres subfraccions de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit en presència i absència de Triton X-100

Subfracció de membrana plasmàtica	sense detergent	amb detergent
	nmols/mg prot/min	nmols/mg prot/min
CANALICULAR	807	897
LATERAL	227	299
SINUSOIDAL	106	146

Estudi de la captació de calci a les tres subfraccions de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit

L'estudi de la captació de calci a les tres subfraccions de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit mostra, tal com es pot observar a la figura 1, que la captació passiva és més o menys similar a les tres regions (3-4 nmols de Ca^{2+} /mg prot.), mentre que el transport dependent d'ATP és clarament superior a la regió canalicular (A) (12 nmols de Ca^{2+} /mg prot.). Els valors d'aquest tipus de transport observats a la regions lateral (B) i sinusoïdal (C) són dues vegades inferiors (6 nmols de Ca^{2+} /mg prot.) als obtinguts a la regió canalicular.

Estudi del co-transport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a les diferents subfraccions de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit

L'estudi del sistema d'intercanvi $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ s'ha realitzat emprant la tècnica isotòpica (captació de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ per les vesícules de membrana pre-carregades amb ClNa) i també amb la tècnica de l'Arsenazo III (canvi de coloració

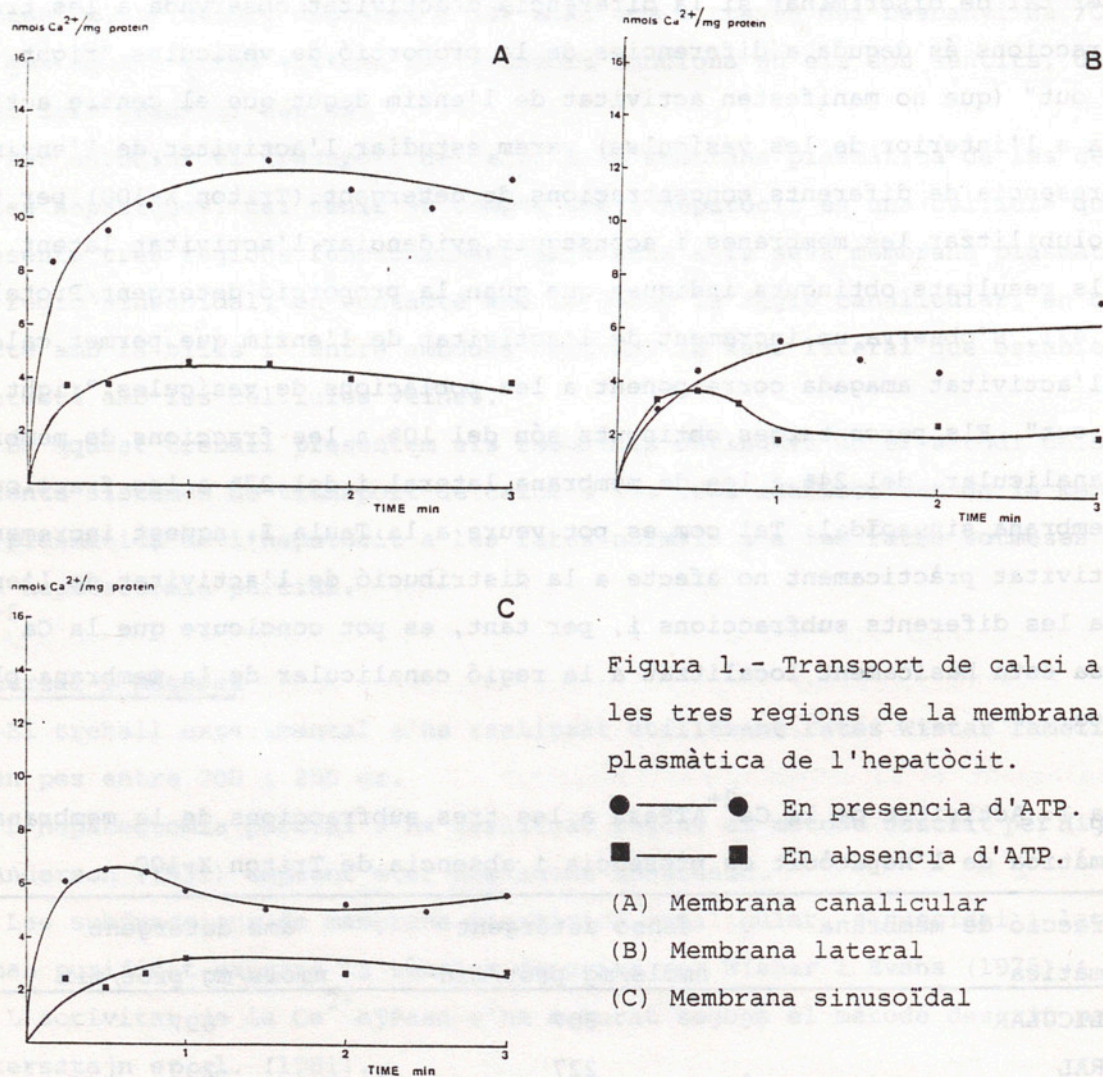


Figura 1.- Transport de calci a les tres regions de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit.

● — ● En presencia d'ATP.

■ — ■ En ausencia d'ATP.

(A) Membrana canalicular

(B) Membrana lateral

(C) Membrana sinusoïdal

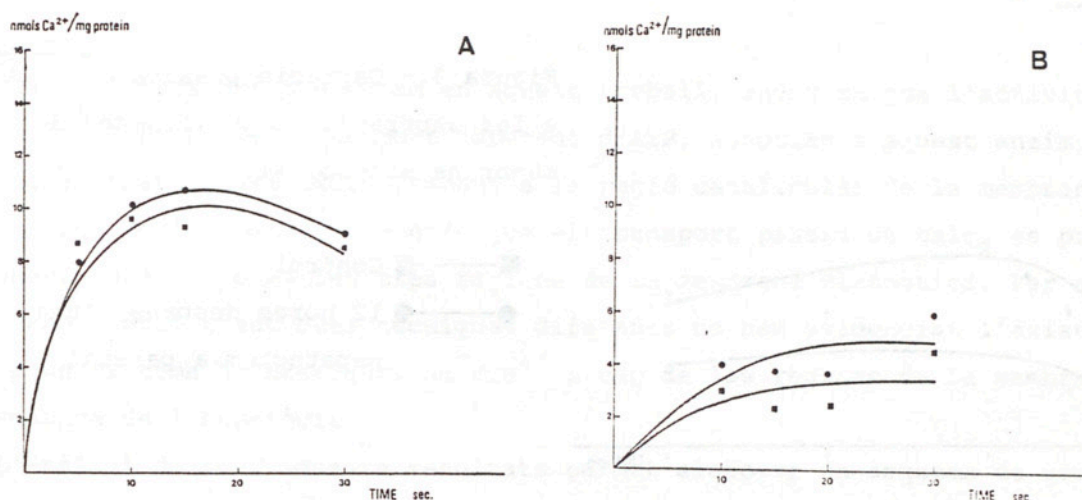


Figura 2.- Captació de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dependent de Na^+ a vesícules pre-carregades amb ClNa de les diferents subfraccions de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit. ■ — ■ Medi d'incubació amb ClNa (control). ● — ● Medi d'incubació amb CLK substituïnt al ClNa. (A) Membrana canalicular. (B) Membrana sinusoïdal.

de l'Arsenazo III al dissociar-se del calci quan aquest penetra a les vesícules pre-carregades amb ClNa):

Tal com es pot observar a la figura 2, utilitzant la tècnica isotòpica no s'observa intercanvi $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ni a la regió canalicular (A), ni a la regió sinusoïdal (B). Tampoc hem observat intercanvi $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a les subfraccions de membrana lateral (dades no presentades).

L'estudi del co-transport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a les tres subfraccions de la membrana plasmàtica, utilitzant la tècnica de l'Arsenazo III també ha donat resultats negatius a cadascuna de les tres subfraccions (dades no presentades).

Estudi del transport de calci a les tres subfraccions de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit obtingudes 12 hores després d'una hepatectomia parcial

Tal com es pot observar a la figure 3, la captació de calci independent d'ATP a les fraccions de membrana sinusoïdal obtingudes 12 hores després d'una hepatectomia parcial és dues vegades superior a la captació de calci observada a les fraccions de membrana sinusoïdal obtingudes a partir de rates control. Per el contrari, el transport de calci dependent d'ATP a aquesta regió de la membrana plasmàtica no es troba modificat després de l'hepatectomia parcial (figura 4).

A les fraccions de membrana canalicular no s'observa cap modificació

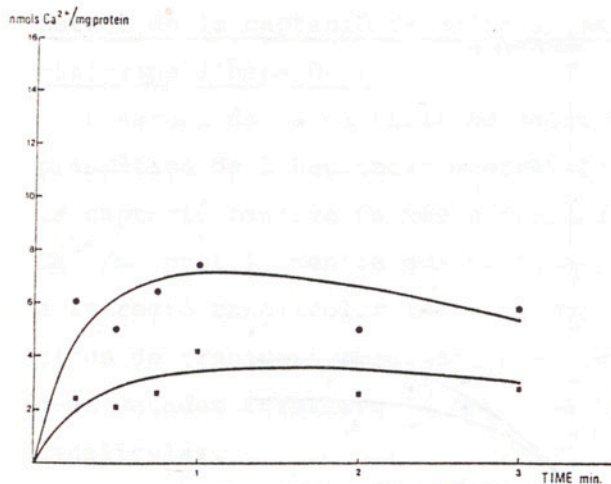


Figura 3.- Captació passiva de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a les subfraccions purificades de membrana sinusoïdal.

■ — ■ Control
● — ● 12 hores després d'una hepatectomia parcial

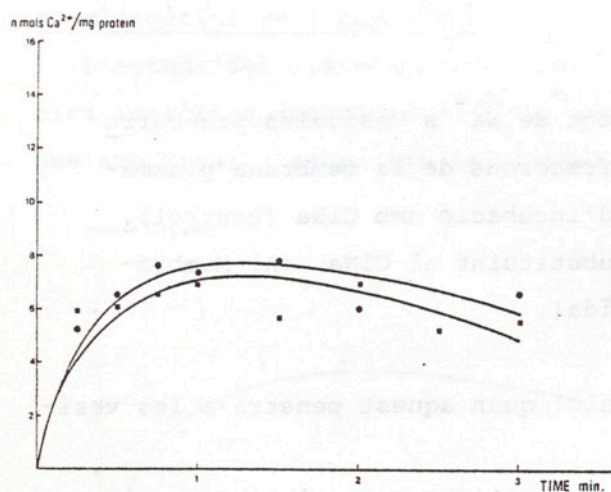


Figura 4.- Captació de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dependent d'ATP a les subfraccions purificades de membrana sinusoïdal.

■ — ■ Control
● — ● 12 hores després d'una hepatectomia parcial

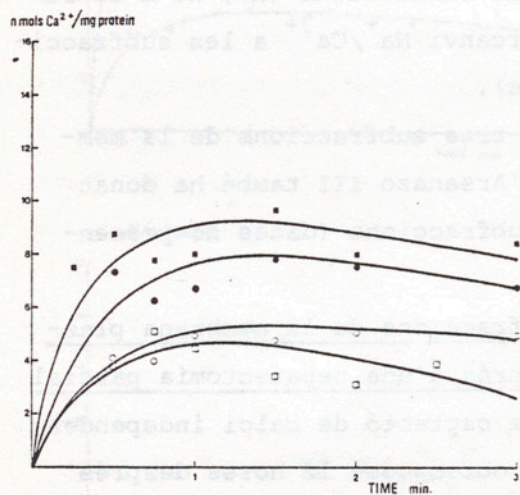


Figura 5.- Captació de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a les subfraccions purificades de membrana canalicular.

■ — ■ Captació dependent d'ATP a les rates control
● — ● Captació dependent d'ATP 12 hores post-hepatectomia
□ — □ Captació passiva a les rates control
○ — ○ Captació passiva 12 hores post-hepatectomia

del transport de calci, independent o dependent d'ATP, 12 hores després de l'hepatectomia parcial (figura 5). Tampoc s'observa cap modificació del transport passiu ni del dependent d'ATP a les subfraccions de membrana lateral 12 hores després d'una hepatectomia parcial (dades no presentades).

Discussió

Els resultats que presentem en aquest treball, indiquen que l'activitat de la Ca^{2+} ATPasa i el transport depenent d'ATP, associat a aquest enzim, es-tàn localitzats quasi exclusivament a la regió canalicular de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit, mentre que el transport passiu de calci és pràcticament igual a totes les tres regions de la membrana plasmàtica. Per altre banda, utilitzant dues tècniques diferents no hem evidenciat l'existència d'un sistema d'intercanvi $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a cap de les regions de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit.

L'anàlisi de tots aquests resultats permet elaborar un esquema de com es poden produir els intercanvis de calci entre les cèl.lules hepàtiques i el medi extracel.lular.

En primer lloc, podem dir que l'expulsió de calci des de l'hepatòcit a l'espai extracel.lular es produeix bàsicament per l'acció de la bomba de calci, és a dir, mitjançant el transport depenent d'ATP, ja que no es detecta l'existència de co-transport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. A més, aquest procés d'expulsió de calci es produeix exclusivament o al menys molt preferentment a través de la regió canalicular de la membrana plasmàtica cap a la bilis.

En segon lloc, també podem dir que l'entrada neta de calci a l'hepatòcit es produeix molt probablement a través de la regió sinusoïdal de la membrana plasmàtica, de manera passiva, ja que malgrat hem trobat captació passiva de calci a la regió canalicular, aquesta estarà totalment compensada per l'activitat de la bomba de calci que tal com hem esmentat anteriorment es localitza a la regió canalicular i treballa en sentit contrari al de la captació passiva. No hem considerat el transport de calci detectat a la fracció lateral, ja que aquesta fracció de membrana presenta normalment molta contaminació de membrana procedent de les regions canalicular i sinusoïdal.

Així, doncs, podem plantejar que a l'hepatòcit es produeix una circulació d'ions calci que penetren passivament a la cèl.lula des de la sang a través de la regió sinusoïdal de la membrana plasmàtica. Aquest calci és posteriorment expulsat a la bilis a través de la regió canalicular de la membrana plasmàtica, mitjançant l'acció de la bomba de calci.

Aquest treball també aporta resultats que indiquen que la necessitat de calci extracel.lular que s'observa entre les 10 i les 15 hores després de l'hepatectomia parcial, per tal que les cèl.lules hepàtiques puguin iniciar la replicació del DNA (Whitfield et al., 1980), pot concretar-se realment en un increment de la concentració intracel.lular de calci produïda per l'increment del flux passiu d'entrada a través de la membrana sinusoïdal.

Bibliografia

- * CARONI P., CARAFOLI E. (1983). The regulation of the $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger of Heart Sarcolemma. Eur. J. Biochem. 132, 451-460
- * GILLIES R.J. (1982). Calcium, calmodulin and the control of cellular proliferation. TIBS 7, 233-235
- * GRISHAM J.W. (1962). Morphologic study of deoxiribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver. Cancer Res. 22, 842-849
- * HIGGINS G.M., ANDERSON R.M. (1931). Experimental Pathology of the liver. Arch. Pathol. 12, 186-202.
- * KRAUS-FRIEDMANN N., BIBER J., MURER H., CARAFOLI E. (1982). Calcium uptake in liver plasma membrane vesicles. Eur. J. Biochem. 129, 7-12
- * LEFFERT H.L., KOCH K.S., RUBALCAVA B. SELL S., MORAN T., BOORSTEIN R. (1978) Hepatocyte growth control. In vitro approach to problems of liver regeneration and function. Natl. Cancer Inst. Monogr. 48, 87-101.
- * LOTERSZTAJN S., HANOUNE J., PECKER F. (1981). A high affinity calcium-stimulated Magnesium-dependent ATPase in rat liver plasma membranes. J. Biol. Chem. 256, 11209-11215.
- * LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 206-209
- * WHITFIELD J.F., BOYNTON A.L., MACMANUS J.P., RIXON R.M., SIKORSKA M., TSANG B., WALKER P.R. (1980). The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation. Ann. New York Acad. Sci. 339, 216-240
- * WISHER M.H., EVANS W.H. (1975). Functional polarity of the rat hepatocyte membranes. Biochem. J. 146, 375-378.