

Caracterització parcial de les glicoproteïnes dels diferents dominis funcionals de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit: variacions a la regeneració hepàtica

C. Enrich, M.J. Coll, O.Bachs, J.Serratosa, M. Soriano i J. Domingo  
Departament d'Histologia i Biologia Cel.lular, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Casanova 143, Barcelona - 36.

Abstract

Partial characterization of the plasma membrane glycoproteins from the three functional domains of the hepatocyte: alterations in liver regeneration

The plasma membrane of most animal cells is mainly composed by proteins and phospholipids but it also contains a small amount of carbohydrates covalently - bound to those molecules (glycoproteins and glycolipids). The polarity of the hepatocyte plasma membrane is reflected by the heterogeneity of its surface membrane. The three plasma membrane domains differ characteristically in composition, morphology and enzymatic endowment. Furthermore it has been demonstrated that the plasma membrane is very sensible to physiologic, pathologic or/and experimental changes displaying a set of specific alterations sometimes difficult to explain.

In such a complex models like this is extremely advantageous to have available specific methods that simplify and reduce the number of variables. In this article we have developed highly resolutive methods for study the plasma membrane glycoproteins of the three functional domains of the hepatocyte besides we initiate the investigation of the molecular changes at the plasma membrane during the pre-replicative phase of liver regeneration. The results show that there is a different sialoglycoprotein composition in the three functional domains of the hepatocyte: The components GP250 and GP90 are specific of the sinusoidal face; the GP170 was only found at the canalicular domain and the GP200, GP180 and GP60 were found at the lateral surface. At six hours after partial hepatectomy quantitative changes relative to sialoglycoproteins and galactoproteins were detected.

Introducció

La membrana plasmàtica de la major part de les cèl.lules està constituïda essencialment per proteïnes i fosfolípids, però també s'hi troben aproximadament un 5% de sucres covalentment lligats a aquelles molècules (glicoproteïnes i glicolípid). A l'hepatòcit, la membrana plasmàtica té una estructura i una composició molt complexa; la seva activitat metabòlica així com la polaritat funcional són les principals raons d'aquesta complexitat molecular. A més, s'ha pogut constatar que la membrana plasmàtica és sensible a canvis fisiològics, patològics i experimentals responen amb modificacions específiques que actualment són difícilment explicables.

A la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial també hem trobat una serie de canvis que afecten principalment a la composició i a l'activitat de la membrana plasmàtica (Bachs, 1983 i Enrich, 1983).

Als models tan complexes com aquest, representa una gran aventatge disposar de mètodes experimentals adequats que simplifiquin el nombre de variables i que permetin l'aproximació clara i sencilla. En aquest treball hem desenvolupat unes tècniques específiques per l'estudi de les glicoproteïnes de la membrana plasmàtica: marcatge radiactiu dels restes glicídics terminals i la cromatografia d'afinitat amb diverses lectines (WGA, RCA i LCA). Aixó ens ha permès caracteritzar parcialment les poblacions de glicoproteïnes de les tres diferents àrees funcionals de l'hepatòcit. A més, hem iniciat, mitjançant aquesta metodologia l'estudi de les alteracions moleculars a la membrana plasmàtica durant la fase pre-replicativa de la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial.

#### Material i mètodes

A tots els experiments s'han utilitzat rates mascles Sprague -Dawley de dos mesos d'edat amb un pes aproximat de 300 gr. L'hepatectomia parcial (70%) s'ha realitzat, segons el mètode descrit per Higgins i Andersson (1931).

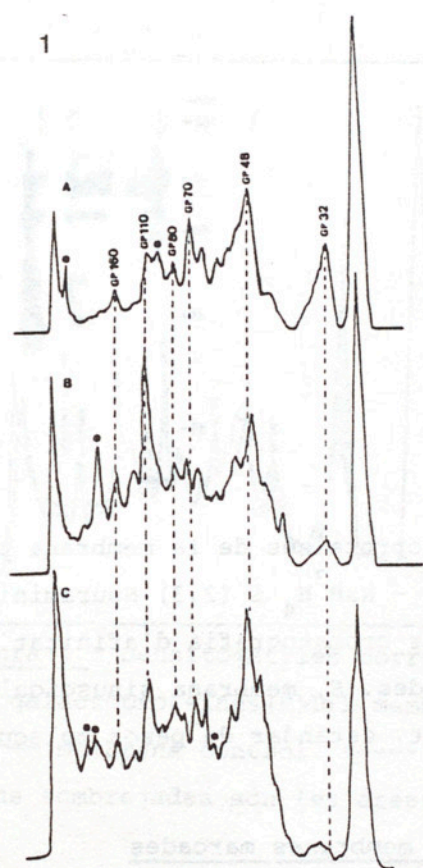
Les diferents subfraccions de la membrana plasmàtica van ésser aïllades mitjançant la tècnica descrita per Wisher i Evans (1975). L'electroforèsi en gels d'acrilamida en presència de SDS s'ha fet d'acord amb el mètode de Laemmli (1970) utilitzant gels del 8% de concentració final. El tractament fluorogràfic s'ha realitzat segons Laskey i Hills (1975).

El marcatge dels restes d'àcid siàlic mitjançant el mètode del metaperiodat sòdic i del Boro-hidrur de sodi tritiat ( $\text{NaB}^3\text{H}_4$ ) i dels restes galactosil amb Galactosa oxidasa i el  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  s'ha realitzat segons el mètode descrit per Gahmberg i Andersson (1977). Les membranes marcades mitjançant aquests procediments varen ser solubilitzades amb l'1% de Triton X-100 i sotmeses a cromatografia d'afinitat amb diferents lectines (Gahmberg et al., 1980): WGA (Wheat germ agglutinin), RCA (Ricinus comunis) i LCA (Lens culinaris). Les diferents fraccions eluïdes específicament (N-acetil glucosamina, Galactosa i alfa metil manòsid respectivament) varen ésser recollides, dialitzades i liofilitzades i finalment separades per electroforesi en presència de SDS. La quantitat de proteïnes a la fracció de membranes s'ha mesurat amb el mètode de Lowry et al. (1951)

#### Resultats i Discussió

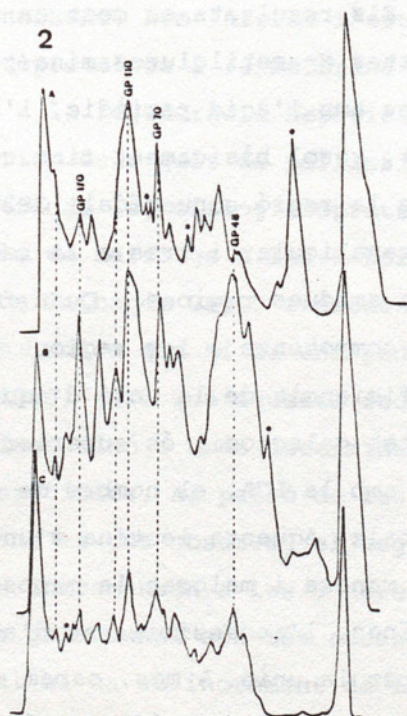
##### Marcatge radiactiu dels restes glicídics terminals de les glicoproteïnes de la membrana plasmàtica

En primer lloc, les diferents subfraccions de la membrana plasmàtica varen ésser marcades mitjançant la tècnica del  $\text{NaIO}_4 - \text{NaB}^3\text{H}_4$  per tal d'obte-



**Figura 1.-** Densitometries dels patrons de les sialoglicoproteïnes de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit. (A) Membrana sinusoïdal; (B) Membrana canalicular; (C) Membrana lateral. (\*) Sialoglicoproteïnes característiques d'una àrea específica.

**Figura 2.-** Densitometries dels patrons de les galactoproteïnes de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit. (A) Membrana sinusoïdal; (B) Membrana canalicular; (C) Membrana lateral. (\*) Galactoproteïnes característiques d'una àrea específica.



nir el patró de les sialoglicoproteïnes. La comparació densitomètrica dels gels a les tres àrees de l'hepatòcit mostra que, malgrat hi ha una serie de glicoproteïnes comuns, també i trobem certs components que només es localitzen a una àrea específica. GP250 i GP90 només es troben a la regió sinusoïdal (fig. 1); GP170 només es localitza a la regió canalicular i GP200, GP180 i GP60 que es troben exclusivament a la membrana plasmàtica de la regió lateral.

Quan varem marcar les membranes mitjançant el mètode de la galactosa oxidasa i el  $\text{NaB}^3\text{H}_4$ , obtenim el patró de les galactoproteïnes (es marquen selectivament els restes galactosa i N-acetilgalactosamina). En aquestes condicions varem obtenir els patrons de la figura 2, on es demostra que les bandes GP160, GP90 i GP60 només es troben a la regió sinusoïdal, la GP40 es troba únicament a la regió canalicular i la GP 180 només apareix a la membrana plasmàtica de l'àrea lateral.

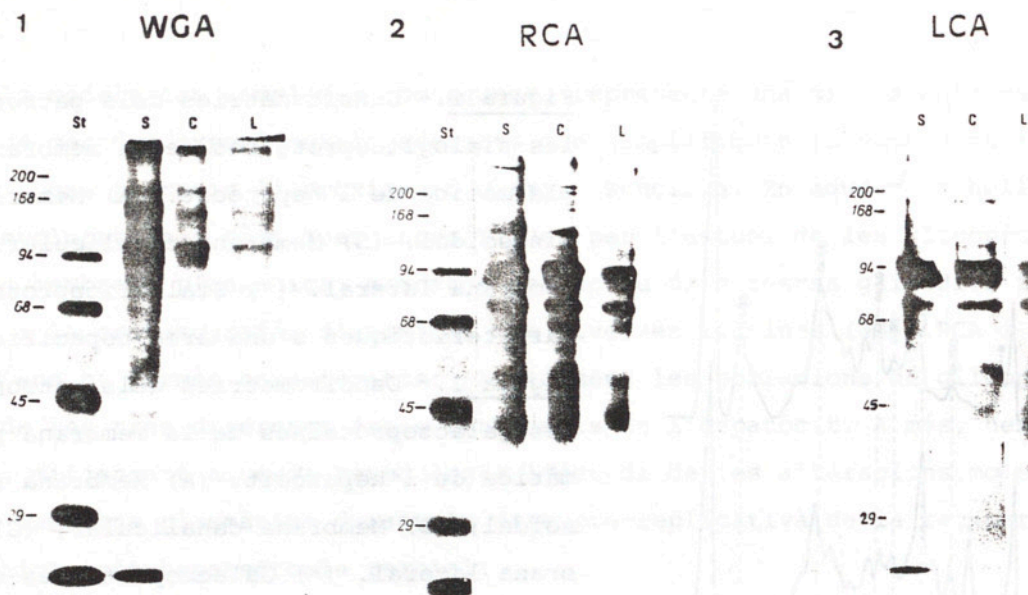


Figura 3.- Patrons fluorogràfics de les glicoproteïnes de la membrana plasmàtica de l'hepatòcit marcades amb (1)  $\text{NaIO}_4 - \text{NaB}^3\text{H}_4$  i (2,3) Neuraminidasa-Galactosa oxidasa -  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  i resoltes per cromatografia d'afinitat amb Sepharosa 4B i les diferents lectines acoplades. S, membrana sinusoïdal; C, membrana canalicular; L, membrana lateral. St, estandar de pesos moleculars.

#### Cromatografia d'afinitat amb lectines de les membranes marcades

Una vegada marcades les diferents fraccions de membrana plasmàtica, es solubilitzen amb l'1% de Triton X-100 i la fracció soluble es sotmet a una cromatografia d'afinitat amb WGA, RCA i LCA. Els resultats es mostren a la figura 3. La WGA, lectina que s'uneix als restes N-acetilglucosamina (però que quan les glicoproteïnes han estat oxidades amb l'àcid periòdic, l'afinitat màxima d'unió esdevé per l'àcid siàlic), resol bàsicament cinc components majoritaris a la membrana plasmàtica de la regió sinusoïdal: GP250, GP170, GP160, GP110 i GP90; tres a la regió canalicular i tres a la regió lateral: GP170, GP150 i GP110. (les mateixes a ambdues regions). Quan fem servir la RCA, trobem un nombre superior de components a les regions sinusoïdal i canalicular, fet que indica que l'eficiència de la unió d'aquesta lectina i per tant l'accessibilitat dels restes galactosil és superior. Per altre banda, quan realitzem la cromatografia amb la LCA, el nombre de glicoproteïnes associades a la columna és molt baix. Aquesta lectina s'uneix essencialment a glico-conjugats que contenen manosa i malgrat la manosa és un component molt important a les glicoproteïnes, l'accessibilitat d'aquests restes per la lectina juga un paper decisiu per la unió. A més, sabem que l'afinitat no vé donada per un determinat monosacàrid específic sinó per una seqüència, és a dir, per un oligosacàrid, on el tipus d'enllaç entre ells pot ésser determinant.

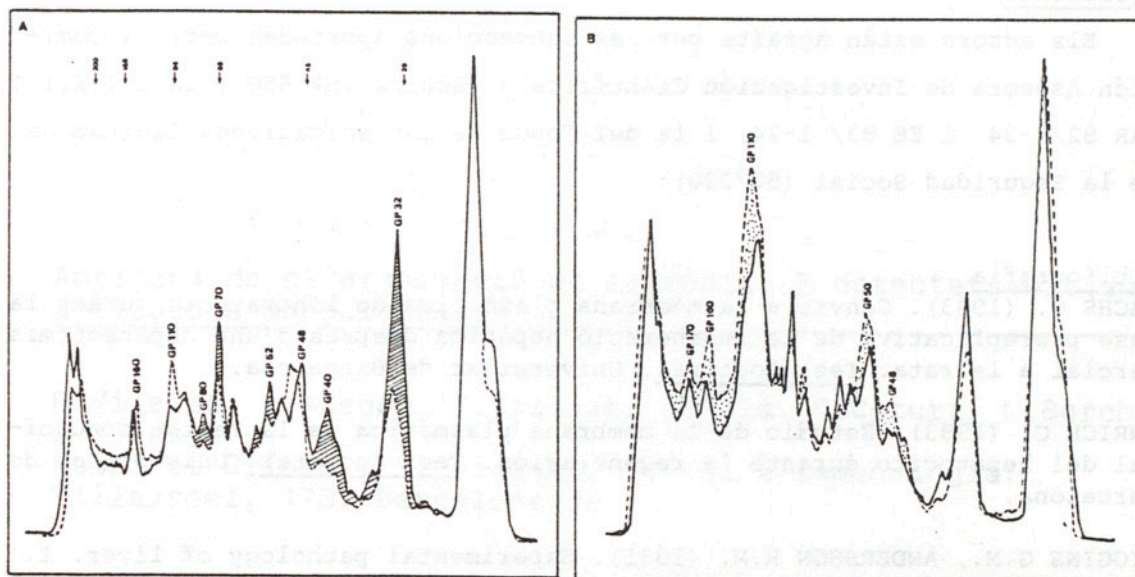


Figura 4.- Densitometries corresponents a les sialoglicoproteïnes (A) i a les galactoproteïnes (B) de la membrana plasmàtica de la regió sinusoïdal. — membrana control. - - - - membrana de 6 hores de regeneració. Les regions sombrejades són les àrees diferencials de marcatge.

#### Variacions de les sialoglicoproteïnes i galactoproteïnes a les 6 hores de la regeneració hepàtica

Finalment, hem iniciat l'estudi dels patrons de sialoglicoproteïnes i de galactoproteïnes a la membrana plasmàtica de la regió sinusoïdal de l'hepatòcit a la regeneració hepàtica; A la figura 4 es mostren els perfils densitomètrics dels gels de poliacrilamida després del tractament fluorogràfic. Al patró de les sialoglicoproteïnes és patent que hi ha una disminució dels nivells de marcatge a les 6 hores a les bandes GP70, GP52, GP40 i GP32, mentre que la banda GP110 incrementa significativament la seva intensitat. Això ens indica que hi ha una reducció del contingut d'àcid siàlic (Enrich et al., 1983) però que aquesta reducció no afecta a la totalitat de les glicoproteïnes sinó a unes determinades, fet que pot indicar processos de regulació específics. Al patró de les galactoproteïnes d'aquesta subfracció de membrana es pot observar el següent: Les bandes GP170, GP160, GP110, GP50 i GP48 incrementen a les 6 hores el nivell de marcatge, és a dir, que els restes galactosil són més accessibles o que a les 6 hores post-hepatectomia parcial hi ha un increment de la sensibilitat de la neuraminidasa per l'àcid siàlic terminal a les glicoproteïnes.

### Agraïments

Els autors estan agraïts per les subvencions aportades per: la Comisi3n Asesora de Investigaci3n Científica y T3cnica (n3 850), la C.I.R.I.T. (AR 82/2-34 i EE 83/ 1-24) i la del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (82/290).

### Bibliografia

BACHS O. (1983). Canvis a la membrana plasmàtica de l'hepatocit durant la fase prereplicativa de la regeneraci3n hepàtica després d'una hepatectomia parcial a la rata. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.

ENRICH C. (1983). Estudio de la membrana plasmàtica de la regi3n sinusoidal del hepatocito durante la regeneraci3n. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.

HIGGINS G.M., ANDERSSON R.M. (1931). Experimental pathology of liver. I. Restoration of liver rat following partial surgical removal. Arch. Pathol. (Chicago) 12, 317-322

WISHER G.M., EVANS W.H. (1975). Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. Biochem. J. 146, 375-388

LAEMMLI U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227, 680-685

LASKEY R.A., MILLS A.D. (1975). Quantitative film detection of <sup>3</sup>H and <sup>14</sup>C in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56, 335-341

GAHMBERG C.G., ANDERSSON L.C. (1977). Selective radioactive labelling of cell surface sialoglycoproteins by periodate-tritiated borohydride. J. Biol. Chem. 252, 5888-5894

GAHMBERG C.G., JOKINEN K., KARHI K.K., ANDERSSON L.C. (1980). Effect of tunicamycin on the biosynthesis of the major human red cell sialoglycoprotein, glycophorin A, in the leukemia cell line K562. J. Biol. Chem. 255, 2169-2175

LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275

ENRICH C., BACHS O., SORIANO M., PIÑOL M.R., DOMINGO J. (1983). Canvis a les glicoproteïnes de la membrana plasmàtica de l'hepat3cit a la fase prereplicativa de la regeneraci3n hepàtica. Biologia del Desenvolupament 1, 151-155