

ANALISIS CEL.LULAR PER HIBRIDACIO 'IN SITU' E IMMUNOCALITZACIO
DE L'EXPRESSIO I DISTRIBUCIO DE LA LIPOPROTEINA LIPASA EN OVARI
DE CONILL D'INDIES

Laura Camps; Manuel Reina; Miquel Llobera i Senén Vilaró

Unitats de Biologia Cel.lular i de Bioquímica i Biologia
Molecular; Dept. Bioquímica i Fisiologia. Universitat de
Barcelona. Avda. Diagonal 645, 08028-Barcelona.

CELLULAR ANALYSIS BY "IN SITU HYBRIDIZATION AND
IMMUNOCALIZATION OF EXPRESSION AND DISTRIBUTION OF LIPOPROTEIN
LIPASE IN GUINEA PIG OVARY

ABSTRACT

An important ovarian function is the synthesis of steroid hormones for menstrual cycle regulation. Blood substrate for these hormones are large lipoprotein complex, unable to cross the cellular membrane without previous hydrolysis to fatty acids. The question is what are the mechanisms that aid the lipid uptake by the ovary?. In this work we study the presence of the lipoprotein lipase (LPL) which is the enzyme responsible of the hydrolysis of lipoproteins in other tissues like heart or adipose tissue. In the present work we use "in situ" hybridization and immunolocalization to know the cellular types which synthesized LPL and where the protein is located within the ovary.

In "situ" hybridization showed LPL mRNA in cells of the follicular wall of the cortex, and in granulosa and theca lutein cells of the mature corpus luteum. By immunolocalization LPL was visualized at the vascular endothelium of capillaries and large vessels of the cortical region as well capillaries in the stroma of corpus luteum. These result suggest that in the guinea pig LPL has an important function for delivery of lipids from lipoproteins to ovarian cells.

Key words: Lipoprotein lipase; Ovary; "in situ" hybridization;
immunolocalization; steroid hormones.

INTRODUCCIO

Una de les funcions importants de l'ovari és la síntesi i alliberació d'hormones esteroides (estrògens i progesterona) per la regulació del cicle menstrual. Els substrats per aquestes hormones circula per la sang en forma de lipoproteïnes (complexes que per la seva grandaria impossibilita la captació directa per la cèl.lula). Una qüestió, avui per avui, encara per resoldre es el coneixement dels mecanismes responsables de aquesta captació en l'ovari.

En el metabolisme lipoproteic si troben implicades dues lipases, la lipoproteïna lipasa (LPL) i la lipasa hepàtica (HL). Les seves respectives estructures es coneixen a partir de la seqüència de cDNA (Wion i col., 1987; Komaromy i Schotz, 1987) i, és clar que ambdues procedeixen d'un gen ancestral comú, però que és diferenciën tenint un paper complementari en el metabolisme lipoproteic. La LPL actua sobre les lipoproteïnes riques en triacilglicèrids i es troba en teixits amb altes necessitats de àcids grassos (vegeu per revisió Borensztajn, 1987). La lipasa hepàtica actua principalment en lipoproteïnes de mida més petita, com les HDL i també romanents de VLDL i quilomicros (Jansen i Hülsmann, 1980; Bamberger i col., 1985).

En l'actualitat hom coneix que la lipoproteïna lipasa és una proteïna sintetitzada per les cèl.lules parenquimàtiques dels teixits on es presenta i posteriorment es alliberada a l'espai extracel.lular, unint-se a la membrana luminal de la cèl.lula endotelial (vegeu Borensztjan, 1987 per revisió). Es precisament en aquest lloc on actua sobre els lípids de les lipoproteïnes alliberant els àcids grassos, que així poden atravesar la membrana plasmàtica i esser metabolitzats per la cèl.lula.

En aquest treball estudiem la possible presència de la lipoproteïna lipasa (LPL) que és l'enzim responsable de la captació de lipoproteïnes en altres teixits. Per això utilitzem tècniques de immunolocalització per tal de conèixer la distribució de la proteïna i de hibridació "in situ" per conèixer els tipus cel.lulars responsables de la seva síntesi a l'ovari de conills d'índies.

MATERIALS I METODES

Hibridació "in situ".

Hem utilitzat la cadena sense sentit del RNA per la LPL, produït i marcat amb S^{35} per transcripció amb la T7 RNA polimerasa a partir de DNA. Aquest era derivat per inserció d'un fragment de 2,2 Kb del cDNA de la LPL (descriu per Enerback i col., 1988) al lloc Eco R1 d'un plàsmid PGEM^R 3Zf (-) (Promega). Aquest fragment es troba en la seqüència codificant del mRNA per la LPL, corresponent a la meitat C-terminal de la proteïna madura. Els plàsmids van ésser linealitzats amb SmaI. Les reaccions de marcatge es varen realitzar amb el kit "Paired-promotor SP6 an T7 systems" de Amersham. La longitud mitja de la sonda utilitzada va ésser de 400 bp, amb una activitat específica de $2 \cdot 10^8$ cmp/ μ g. Com a control negatiu i per tal de conèixer els nivells de marcatge inespecífic es va utilitzar la cadena amb sentit de RNA, marcada amb el mateix sistema i la mateixa activitat específica.

Per la hibridació hem utilitzat el protocol descrit per Shivers i col. (1986) amb algunes modificacions. Breument, els ovaris i peces de cor es varen fixar amb 4 % de paraformaldehid en 0.1 M de tampó fosfats salí (PBS) a 4°C durant 12 hores, rentat dos cops en PBS durant una hora i immersos en 30 % de sucrosa en PBS a 4°C durant dues hores, congelats i tallats en un criostat Reichert-Jung. Les seccions obtingudes (de 8-10 μ m de gruix) varen montar-se en portes previament gelatinats i foren conservades a 30°C fins la seva utilització. El dia del experiment les seccions varen calentar-se a 37°C durant 10 min, hidratades amb 0.1 M de glicina en PBS durant 20 min, desproteïnitades amb 0,2 M HCl durant 10 min; postfixades amb 4% de paraformaldehid en PBS durant 20 min, rentades amb 0.1 M de glicina en PBS i acetilades en acètic anhidre/trietanolamina, pH: 8.0 durant 10 min. Posteriorment, es varen incubar en presència de la solució de prehibridació (1,2 M NaCl, 20 mM tris-HCl, 2x de la solució Denhardt's, 2 mM EDTA, 0.1 % RNA de llevat, 0.01% tRNA de Escherichia Coli, 0.1% pirofosfat inorgànic, 20 mM dietilpirocarbonat, 20 mM L-metionina, 0.04% DNA de salmó i 50% de formamida) en una cambra d'humitat a 48°C durant 2 hores. Per el pas d'hibridació, la sonda de RNA- S^{35} es va afegir a una solució idèntica complementada amb 20% de dextra sulfat. La barreja de tampó/sonda es va aplicar a les seccions, que es varen cobrir, segellar amb laca i incubar durant 12 hores a 48°C en una cambra d'humitat. Cada porta objectes va rebre 40 μ l del tampó de hibridació presentant 2×10^6 cpm de la sonda sense sentit (LPL5) o amb sentit (LPL3). Sempre es varen utilitzar seccions consecutives per cada sonda, per tal de que els resultats fosin el màxim de comparables. Després de la hibridació les seccions varen rentar-se tres vegades durant 60 min amb 0.1 x SSC, 0.05 % de pirofosfat sòdic inorgànic, 30 % de formamida a 42°C. Posteriorment es varen tractar amb ribonucleasa A (20 μ g/ml) durant 30 min a temperatura ambient i es varen rentar tres vegades amb les mateixes condicions anteriors. Després d'això les

seccions es varen hidratar amb 0.03 M d'acetat amònic en etanol i varen assecar-se al aire. Per l'autorradiografia els porta objectes es varen sucocar en l'emulsió Ilford G5, previament diluida 1:1 en aigua, assecar a l'aire i guardar a 4° C de 5 a 20 dies. Les autorradiografies es varen revelar am Kodak D-19 i tenyir amb hematoxilina-eosina. La visualització del senyal autorradiogràfic es va fer amb microscopia de camp clar i fosc en un microscopi Leits (Dialux). Les fotografies dels resultats obtinguts es presenten en camp clar, per tal de visualitzar l'estructura i distribució dels tipus cel.lulars del teixit i la mateixa àrea amb camp fosc per tal de observar la distribució del senyal autorradiogràfic.

Immunolocalització de la lipoproteïna lipasa

Per la immunolocalització s'han utilitzat anticossos policlonals obtinguts en conill, a partir de LPL purificada de llet de conill d'indies. Aquests anticossos identifiquen una banda senzilla per Western Blot en homogenats de teixit adipós i han estat previament utilitzats en immunoprecipitació per tal de estudiar la síntesi de LPL (Semb i Olivecrona, 1987) i per identificar clons que presenten síntesis de LPL en una llibreria genòmica de cDNA (Enerback i col., 1988).

Per tal de que els resultats obtinguts en la hibridació "in situ" i l'immunolocalització fossin el màxim comparables, aquesta es va realitzar en seccions consecutives a les utilitzades per la hibridació. Per la localització de la proteïna es va utilitzar immunofluorescència indirecta (Vilaró i col., 1988). Les seccions es varen hidratar amb 0.1 M glicina en PBS, permeabilitzar en 1 % de tritó X-100 en 0.1 M glicina en PBS, rentar amb 0.1 % tritó X-100 en 0.1 M de glicina en PBS (tampó A), incubades amb anti-LPL o serum control en presència de 1 % de BSA durant 2 hores a temperatura ambient. Aleshores les seccions varen rentar-se amb tampó A i incubar amb IgG de cabra anti-conill conjugades amb FTIC en 1% de BSA en tampó A durant 2 hores a temperatura ambient. Després es varen rentar i el montatge es va fer amb 5% de n-propil galleate en 70 % de glicerol tamponat. La immunotinció es va visualitzar i fotografiar en microscopi Zeiss Axioplan.

Figura 1.

Hibridació "in situ" amb la cadena marcada amb S³⁵ del R A sense sentit (A i B) i amb sentit (C) en crioseccions de cor de conill d'indies.

Els panels A (camp clar) i B (camp fosc), mostren que el senyal autorradiogràfic (punts brillants en B) es localitza en l'endocardi. El senyal es troba concentrat sobre el citoplasma dels miocits (fletxes).

El panel C (camp fosc), mostra la hibridació obtinguda amb la cadena amb sentit. El marcatge obtingut és baix i homogeni i cal interpretar-lo com no específic.



