UNIVERSITAT DE BARCELONA

CARACTERITZACIÓ D'UNA PROTEÏNA DE 55 KDA ASSOCIADA A LA MATRIU NUCLEAR DURANT LA PROLIFERACIÓ CEL.LULAR

Tesi doctoral presentada per Rosa Maria Aligué i Alemany per obtar al grau de Doctora en Biologia

Barcelona, octubre de 1991

4. RESULTATS

.

4.1.- IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA P55 EN TEIXIT HEPÀTIC.

4.1.1.- ANÀLISI ELECTROFORÈTICA DE LA MATRIU NUCLEAR DURANT L'ACTIVACIÓ PROLIFERATIVA DELS HEPATÒCITS.

4.1.1.1.- Anàlisi unidimensional en gels SDS-poliacrilamida.

En els gels obtinguts amb les mostres de matriu nuclear de fetges de rata normal i regenerants a diferents hores després de l'hepatectomia parcial (purificades tal com s'ha descrit a l'apartat 3.2.1.1.), s'observa un increment progressiu d'una proteïna de pes molecular de 55 KDa, des de les 12 h fins a les 24 h post-hepatectomia (fig.14).







Figura 15.- Scaner densitomètric de les línies 1 i 5 de la figura 1, realitzat amb un densitometre Hoefer. (-) línia 1 (matriu nuclear normal, de rates no hepatectomitzades), (--) línia 5 (matriu nuclear 24 h regenerant, post-hepatectomia parcial).

L'anàlisi densitomètrica, de les mostres 1 (matriu normal) i 5 (matriu 24 h regenerant) del gel de la fig.1., confirma el gran increment d'aquesta proteïna a les 24 de regeneració (fig.15).

L'increment d'aquesta proteïna de 55 KDa (p55) coincideix amb l'inici de la síntesi d'ADN durant la regeneració hepàtica, que comença a les 12 h i presenta un màxim a les 24 h de la regeneració. Aquest fet suggeria que l'increment de la p55 podria estar implicat amb l'inici de la replicació de l'ADN. Per aquest motiu i seguint el propòsit inicial, d'identificació de proteïnes involucrades amb la replicació de l'ADN es va seguir amb la caracterització de la p55.

4.1.1.2.- Anàlisi bidimensional en gels de SDS-poliacrilamida (IEF).

Per tal d'obtenir més informació del patró electroforètic d'aquesta proteïna de 55 KDa s'han realitzat electroforesi bidimensionals de la fracció de matriu nuclear 24 h regenerant i matriu normal (fig.16).



Figura 16 - Electroforesi bidimensional (2D-PAGE IEF) de proteines de la matriu nuclear (A) Matriu nuclear normal o de fetges no hepatectomitzats (B) Matriu nuclear de fetges de 24 h de regeneració hepàtica. Els gels s'han carregat amb 200 µg de proteina. La fletxa de l'esquerra indica l'increment de la proteina de 55 KDa

L'anàlisi dels gels bidimesionals indica que la proteïna de 55 KDa presenta un punt isoelètric (pl) de 6.2. i que esta formada per distintes isoformes de mateix pes molecular.

4.1.2.- PURIFICACIÓ DE LA P55.

Els estudis de caracterització de la p55, s'han iniciat purificant la p55 a partir de gels SDS-poliacrilamida unidimensional de mostres de matriu nuclear 24 h regenerants. S'ha tallat la banda corresponent a 55 KDa i s'ha electroeluit obtenint la p55 purificada, tal com s'ha descrit a l'apartat 3.4.1.

Aquest mètode de purificació ha estat seleccionat donat la fàcil identificació de la p55 en les mostres de matriu nuclear regenerant, on es troba molt incrementada, i degut a la insolubilitat que presenta la fracció de matriu nuclear, característica que fa bastant difícil la purificació de proteïnes mitjançant columnes cromatogràfiques.

S'ha comprovat la purificació de la p55 en gels bidimensionals (2D-PAGE IEF) (fig.17). S'observa que la p55 purificada esta formada per una proteïna principal i per una o dues isoformes d'igual pes molecular, tal com s'observava en les mostres de matriu nuclear regenerant, i a la vegada es comprova que aquesta proteïna és l'única que apareix a nivell de 55 KDa de pes molecular.



Figura 17.- Gel bidimensional (2D-PAGE IEF) de la p55 purificada.

4.1.3.- OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS POLICLONALS ANTI-P55.

Utilitzant la p55 purificada per electroelució com antigen, s'han produït anticossos policionals anti-p55 en conills immunitzats segons la pauta descrita en els materials i mètodes.

L'especificitat dels anticossos obtinguts s'ha comprovat mitjançant immunotransferències a partir de gels de SDS-poliacrilamida amb les mostres de matriu nuclear i la proteïna purificada com a control (fig.18).



La immunotransferència s'ha realitzat seguint els passos de l'apartat 3.6., utilitzant l'anticòs anti-p55 diluït 1/500.

Els resultats ens mostren una clara especificitat de l'anticòs per la p55 i tal com s'observava en gels tenyits amb coomassie blue de les mateixes mostres (fig.14), la p55 incrementa en les fraccions de matrius nuclears regenerants.

Els anticossos contra la p55 s'han obtingut a partir de dos conills diferents, però en ambdós casos l'especificitat per a l'antigen és la mateixa, l'única diferència ha estat el títol de reacció antigen/anticòs.

4.1.4.- IMMUNOLOCALITZACIÓ DE LA P55 EN FRACCIONS SUBCEL.LULARS.

Obtinguts els anticossos contra la p55 i comprovada la seva especificitat s'han realitzat estudis per determinar la localització de la p55 en diferents fraccions cel.lulars.

A part de la distribució cel.lular exacta de la p55, el motiu d'aquest anàlisi està basat en el fet de comprovar si l'increment de la p55 a la matriu nuclear regenerant és degut, a un increment de proteïna en aquesta fracció, o a una translocació de p55 existent en altres fraccions cel.lulars. Aquesta hipòtesi es fonamenta amb el treball descrit per J. Serratosa, M.J. Pujol i O. Bachs (1988), on es troba que el nivell de calmodulina incrementa en el citosol durant la fase pre-replicativa de la regeneració hepàtica translocant-se al nucli posteriorment i associant-se concretament a la fracció de matriu nuclear durant la replicació de l'ADN.

L'estudi de la distribució de la p55, s'ha realitzat mitjançant immunotransferència de distintes fraccions cel.lulars d'hepatòcits normals (no regenerants) i hepatòcits 24 h regenerants. Els nuclis i les diferents subfraccions nuclears s'han obtingut tal com s'ha descrit en l'apartat 3.2.1.1., el citosol i les distintes fraccions de membrana plasmàtica s'han purificat segons el mètode descrit per Sikorska i al. (1983) i Wisher i al. (1975), respectivament.

Els resultats obtinguts (fig.19), indiquen que la p55 es troba localitzada únicament al nucli i dins del nucli es troba concretament a la fracció de matriu nuclear.

Els resultats de la immunotransferència de les mateixes fraccions obtingudes però, a partir de fetges no hepatectomitzats, han estat exactament igual, la p55 es troba localitzada al nucli i dins del nucli a la fracció de matriu nuclear.

No es detecta cap canvi en la distribució de la p55 depenent de les fases de cicle cel.lular, a diferència del que s'observava amb la calmodulina.

123456789

Figura 19.- Immunotransferència de distintes subfraccions cel.lulars: (1) nuclis, (2) fracció nuclear S1, (3) fracció nuclear S2, (4) fracció matriu nuclear, (5) citosol, (6) membrana plasmàtica sinusoïdal, (7) membrana plasmàtica lateral, (8) membrana plasmàtica canalicular i (9) membrana plasmàtica total, de fetges 24 h regenerants post-hepatectomia parcial. Utilitzant l'anticòs anti-p55 diluït 1/500.

4.1.5.- IMMUNOCITOQUÍMICA EN NUCLIS AÏLLATS AMB L'ANTICÓS ANTI-P55.

En l'estudi de la localització intranuclear de la p55 mitjançant tècniques immunocitoquímiques aplicades a nuclis aïllats de rates normals i regenerants, s'observa que a les 24 h post-hepatectomia parcial, quan una part important de nuclis es troba en fase S, els nuclis presenten una acumulació d'aquesta proteïna al voltant de la coberta nuclear i als nucleols. La distribució interna de la p55 és difosa però molt abundant (fig.20b). Els nuclis de rates normals (no hepatectomitzades) presenten una distribució interna de la p55 igual que els nuclis 24 h regenerants però molt menys intensa i no s'observa cap acumulació al voltant de la coberta nuclear ni als nucleols (fig.20a).

L'especificitat de la reacció es demostra amb l'absència de marcatge, en els mateixos nuclis incubats amb el sèrum pre-immune, dels conills a partir dels quals s'ha obtingut l'anticòs anti-p55 (fig.20c,20d).

Figura 20.- Immunocitoquímica de nuclis aïllats de rates normals (no hepatectomitzades), incubats amb l'anticòs anti-p55 diluït 1/100 (a) i incubats amb el sèrum pre-immune a la mateixa dilució (c).*Nuclis aïllats de rates hepatectomitzades (24 h), incubats amb l'anticòs anti-p55 diluït 1/100 (b) i amb el sèrum pre-immune a la mateixa dilució (d).





4.1.6.- IMMUNOCITOQUÍMICA EN TEIXIT HEPÀTIC AMB L'ANTICÒS ANTI-P55.

L'estudi del patró de distribució de la p55 en teixit hepàtic i emprant l'anticòs antip55, s'ha realitzat mitjançant seccions de fetge de rata normal i 24 h regenerant fixades amb paraformaldehid i incloses en parafina (tal com s'ha descrit a l'apartat 3.13.1.1).

Els resultats obtinguts (fig.21.) indiquen que, en el teixit hepàtic normal (no regenerant) la reacció de l'anticòs és pàl.lida i es troba localitzada únicament en el nucli. El reconeixement intranuclear no es uniforme, hi han àrees d'intensitat més alta que altres i s'observa que el nucleol no presenta marcatge. També s'ha de senyalar que no en tots els hepatòcits quiescents està present la proteïna.

En les seccions de fetge 24 h regenerants, el patró de distribució de la p55 és essencialment el mateix que en les hepatòcits normals, la diferencia està en l'increment d'intensitat de reacció dels hepatòcits marcats.

L'especificitat de la immunolocalització es demostra amb l'absència de reacció, en seccions de les mateixes mostres incubades amb el sèrum pre-immune dels conills

a partir dels quals s'ha obtingut l'anticòs anti-p55 (fig.21b i d).



Figura 21.- Immunocitoquímica de seccions de fetge normals i 24 h regenerants. Seccions de fetge 24 h regenterants incubades amb l'anticòs anti-p55 diluït 1/100 (a) i incubades amb el sèrum pre-immune a la mateixa dilució (b). Seccions de fetge normal incubades amb l'anticòs anti-p55 diluït 1/100 (c) i amb el sèrum preimmune a la mateixa dilució (d).

El percentatge de cèl.lules marcades amb l'anticòs en les seccions de fetge 24 h regenerant s'ha calculat al voltant de 36%. Aquesta dada no coincideix exactament amb el percentatge de cèl.lules que es troben en fase S durant les 24 h de regeneració hepàtica post-hepatectòmia, que està descrit, per en Joan Serratosa en la seva tesi doctoral, al voltant d'un 28-29%.

Per tal d'aclarir la correlació entre l'increment de la p55 i la síntesi d'ADN, s'han realitzat experiments combinant estudis immunocitoquímics i els autoradiogràfics.

4.1.7.- IMMUNOCITOQUÍMICA AMB L'ANTICÒS ANTI-P55 COMBINADA AMB AUTORADIOGRAFIA.

La combinació de les tècniques immunocitoquímiques i autoradiogràfiques s'ha realitzat tal com s'ha descrit a l'apartat 3.15. i 3.13.1.1., injectant a les rates 24 h regenerants timidina tritiada 1 h abans de sacrificar-les, processant les mostres per immunocitoquímica i aplicant posteriorment la tècnica autoradiogràfica.

El marcatge de les cèl.lules en fase S es detecta en forma de puntejat nuclear donat pel grau d'incorporació de timidina(H³). La presencia de la p55 es detecta mitjançant l'anticòs anti-p55 tal com s'ha observat a la figura 21.

Els resultats que mostren la figura 22, indiquen que no totes les cèl.lules que incorporen timidina(H³) presenten marcatge amb l'anticòs anti-p55. Hi han cèl.lules en fase S que presenten increment de p55 (representat amb una punta de fletxa), cèl.lules en fase S que no presenten p55 i cèl.lules que presenten increment de p55 i no es troben en fase S (representat per una fletxa).



Figura 22.- Immunocitoquímica i autoradiogràfia en seccions de fetge de rata 24 h regenerants. S'ha utilitzat l'anticòs p55 diluït 1/100.

Aquests resultats expliquen les diferències de percentatges obtinguts, entre cèl.lules que presenten increment de p55 i cèl.lules en fase S.

Les dades obtingudes fins aquest punt indiquen que l'increment de la p55 és paral.lel a la síntesi d'ADN però no està directament relacionat, tal com es suposava inicialment. Per altra banda, hi ha la possibilitat de que l'increment de la p55 estigués relacionat amb altres fases del cicle cel.lular. Així doncs, s'ha intentat associar l'increment de la p55 a la fase de mitosi.

4.1.8.- IMMUNOCITOQUÍMICA AMB L'ANTICÒS ANTI-P55 EN CÈL.LULES HEPÀTIQUES EN MITOSI.

Donat que el pic màxim de mitosi durant la regeneració hepàtica es presenta a les 28 h post-hepatectomia parcial, s'han analitzat seccions de fetge d'aquest temps post-hepatectomia, processades seguint el mètode immunocitoquímic descrit en l'apartat 3.13.1.1.

La p55 en cèl.lules mitòtiques, segons es desprèn de la figura 23, presenta un marcatge que exclou els cromosomes però localitzat al voltant d'aquests en distintes fases de mitosi, anafase (fig. 23a i b) i metafase (fig.23c). En alguns casos també s'observa el marcatge associat a filaments units als cromosomes (fig.23b). En la darrera fase de la mitosi, la telofase, on les cèl.lules ja presenten el nucli embolcallat per la membrana nuclear, la distribució de la p55 torna a ésser la mateixa que en les cèl.lules en fase S. El marcatge es presenta dispers dins del nucli (fig.23d).

Figura 23.- Immunocitoquímica de cèl.lules mitòtiques de fetge, emprant l'anticòs anti-p55 diluït 1/100. (a) Cèl.lula en anafase: la punta de fletxa indica la localització dels cromosomes no marcats. (b) Cèl.lula en anafase: en aquest cas la fletxa senyala filaments marcats per l'anticòs. (c) Cèl.lula en metafase, la fletxa senyala l'alta concentració de p55 localitzada al voltant dels cromosomes. (d) Cèl.lula en telofase.



Així doncs, pel que fa als resultats obtinguts fins aquest punt, s'observa que a partir de les 12 h de regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial es presenta l'increment d'una proteïna de 55 KDa, p55, localitzada al nucli, associada a la fracció de matriu nuclear, no relacionada directament amb la fase S, però possiblement implicada en la mitosi, en la separació dels cromosomes.

Aquesta darrera hipòtesi estaria recolzada pels resultats de la figura 23, on s'observa marcatge de la p55 en filaments associats als cromosomes.

4.1.9.- IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES ACCEPTORES D'ADN.

Per tal de comprovar si la p55 podria unir-se a l'ADN, es varen realitzar experiments de binding amb l'ADN marcat radioactivament.

La identificació de proteïnes que s'uneixen a l'ADN, s'ha portat a terme tal com s'ha descrit a l'apartat 3.10, utilitzant les mostres de matriu nuclear normal, matriu nuclear 24 h regenerant i la p55 purificada.

Els resultats d'aquest estudi han estat negatius respecte la p55. No es manifesta una unió directa de la p55 amb l'ADN (resultats no presentats).

4.1.10.- EFECTE DELS ANTAGONISTES ADRENERGICS SOBRE L'EXPRESSIÓ DE LA P55.

Amb el propòsit d'obtenir més informació de la p55 per esbrinar el paper que desenvolupa durant el cicle cel.lular, s'han realitzat estudis de la possible relació o regulació de la p55, d'altres factors dels quals es tenen evidències concretes de llur actuació en l'activació proliferativa, com la calmodulina (CaM), el Ca⁺⁺ i AMPc,.

El paper de la calmodulina i dels receptors de la calmodulina en el nucli durant la regeneració hepàtica ha estat i és un línia àmpliament estudiada en el Departament on s'ha realitzat aquesta tesi. Inhibidors de la calmodulina bloquegen la transició entre la fase G1 i S del cicle cel.lular (M.Soriano i al. 1985). Tal com s'ha esmentat anteriorment els nivells de calmodulina augmenten durant la regeneració hepàtica en el citosol translocant-se posteriorment al nucli on s'associa a la matriu nuclear (J. Serratosa i al. 1988). S'ha descrit la identificació de 5 receptors de la calmodulina en la fracció de matriu nuclear normal i 24 h regenerant i la p55 no forma part d'aquests receptors (O. Bachs i al. 1987, O. Bachs i al. 1990). Per altra banda, l'associació de proteïnes a la matriu nuclear, com la calmodulina, s'ha demostrat que es depenent dels nivells de calci al nucli. Mitjançant inhibidors alfaadrenèrgics, que regulen l'alliberament de calci al nucli a través del reticle endoplasmàtic, s'observa la calmodulina acumulada en el nucli però no associada a la matriu nuclear (M.J.Pujol i al. 1991). També s'ha descrit un increment d'AMPc durant les primeres hores de regeneració hepàtica i la seva implicació amb la regulació de l'expressió de la calmodulina (M.Soriano i al. 1988) i amb altres processos de cicle cel.lular (Whitfiled i al. 1985).

Per tal d'esbrinar si l'increment de la p55 està modulat o associat per algun d'aquests factors, s'han plantejat els estudis que es presenten a continuació.

S'han analitzat mostres de matriu i nuclis 24 h regenerants després d'administrar a les rates antagonistes α - i β -adrenèrgics, tal com s'ha descrit a l'apartat 3.1.3.

Els antagonistes utilitzats ha estat la fentolamina (α_1 - i α_2 -adrenèrgic), el prazosin (α_1 -adrenèrgic) i el dl-propanolol (β -adrenèrgic). La fentolamia és un antagonista que actua a traves dels receptors α_1 ó α_2 . El prazosin actua específicament a traves dels receptors α_1 . Els agonistes α_1 -adrenèrgics estan implicats en la síntesi d'inositol 1,4,5.trifosfat el qual indueix una sortida de calci del reticle endoplasmàtic (Reinhart i al. 1984, Altin i al. 1985). El dl-propanolol és un antagonista que actua inhibint l'adenil ciclasa, enzim responsable de la transformació de ATP en AMPc, el qual actua com a segon missatger (Stiles i al. 1984, Pritchard i al. 1985).

Els resultats obtinguts (fig.24) indiquen una disminució dels nivells de p55 en les mostres tractades amb fentolamina i prazosin (antagonistes α -adrenèrgics), en canvi no s'observen diferencies en els nivells de p55 de les mostres tractades amb d-l-propanolol (antagonista β -adrenèrgic) respecte les mostres 24 h regenerants sense cap tractament.



Figura 24.- Mostres de matriu nuclear 24 h regenerant tractades amb distints antagonistes α - i β -adrenèrgics. Matriu nuclear 24 h regenerant tractada amb dl-propanolol (1), fentolamina (2) i prazisin (3). Matriu nuclear normal (5) i 24 h regenerant (4), sense cap tractament.

Els resultats descrits en aquest apartat indiquen per un cantó: que els nivells d'AMPc no afecten l'increment de p55 i suggereixen que els nivells de p55 podrien

estar regulats per els nivells de Ca⁺⁺.

4.1.11.- FOSFORIL.LACIÓ IN VITRO DE PROTEÏNES DE LA MATRIU NUCLEAR.

Les proves de fosforil.lació, amb EGTA, Ca⁺⁺/CaM, CaM o AMPc, s'han realitzat tal com s'ha descrit a material i mètodes, mitjançant electroforèsis en una o dues dimensions. En les mostres de matriu nuclear normal s'observa una fosforil.lació lleugera i generalitzada a gran nombre de proteïnes que formen aquesta fracció (fig. 25a i 26a). En canvi en el patró de fosforil.lació de les mostres de matriu nuclear 24 h regenerants s'observa, quasi exclusivament, la fosforil.lació de dues proteïnes, de 55 KDa i 45 KDa (fig.25b i 26b). Els resultats de fosforil.lació en presencia d'EGTA, Ca⁺⁺, Ca⁺⁺/CaM o AMPc han estat els mateixos, no s'observen diferències significatives tret d'alguna proteïna de baix pes molecular, que presenta fosforil.lació depenent de calci.

Aquests resultats ens indiquen, tant en el cas de la matriu normal com 24 h regenerant, que les fosforil.lacions que s'observen es porten a terme per quinases independents de calci, calmodulina i AMPc.

L'anàlisi bidimensional de la matriu nuclear 24 h regenerant (fig.13b) indica que la proteïna de 55 KDa, de les dues majoritàriament fosforil.lades d'aquesta fracció, és la p55.

Al comparar el patró de fosforil.lació de la p55 amb el patró que presenta en els gels bidimensionals tenyits en coomassie blue (fig.16B), s'observa que la forma majoritària de la p55 no es presenta fosforil.lada, i que les isoformes minoritàries, són degudes als diferents graus de fosforil.lació (fig.26b, representat per fletxes).

Figura 25.- Patró de fosforil.lació de proteïnes de la matriu nuclear, mitjançant gels unidimensionals del 10% SDS-poliacrilamida. (a) matriu nuclear normal, (b) matriu nuclear 24 h regenerant.

Figura 26.- Patró de fosforil.lació de proteïnes de la matriu nuclear, mitjançant gels bidimensionals IEF. (a) matriu nuclear normal, (b) matriu nuclear 24 h regenerant (les fletxes senyalen les distintes isoformes fosforil.lades de la p55).







Al tractar-se d'un assaig de fosforil.lació *in vitro*, la diferencia entre el nombre de proteïnes fosforil.lades de la matriu normal i regenerant s'explicaria tenint en compte que, durant la fase pre-replicativa i replicativa és el moment de màxima activitat de les proteïnes quinases. Així doncs, moltes proteïnes de la matriu nuclear ja es troben fosforil.lades a l'obtenir aquesta fracció i per tant no incorporen el p³² exogen.

L'increment de fosforil.lació de la p55, que s'observa en la matriu nuclear 24 h regenerant, coincideix amb l'increment de proteïna que es presenta en aquesta fracció durant la regeneració, per tant, això indica que el nivell de fosforil.lació de la proteïna és similar en les cèl.lules quiescents i activades.

Un cop les mostres fosforil.lades, separades en gels electroforètics i abans d'exposar-los a plaques autoradiogràfiques, s'ha aplicat un mètode senzill de desfosforil.lació per veure si els residus fosforil.lats són fosfoserines o fosfotirosines. Les proteïnes fosforilades en residus de serina, són resistents als tractaments amb àlcalis, en canvi els grups fosfat s'eliminen fàcilment dels residus tirosina al tractar amb solucions alcalines. En base a aquesta propietat, s'han tractat els gels amb les mostres fosforil.lades, amb KOH 1N durant 2 h. Després s'han incubat 30 min amb 10% àcid acètic i finalment amb 10% metanol durant 1 h.

No s'han observat canvis en el patró de fosforil.lació de la p55. Això suggereix que la fosforil.lació de la p55 es dona en els residus de serina.

Malgrat l'extensa utilització d'aquest mètode, per a la identificació dels residus fosforil.lats de proteïnes en gels electroforètics, no es tracta d'un mètode molt precís ni específic. Els resultats són indicatius i s'haurien de comprovar amb mètodes més específics com, la utilització de fosfatases específiques i posterior anàlisi d'aminoàcids (mapatge fosfopeptídic).

4.1.12.- ANÀLISI DE LA SEQÜÈNCIA D'AMINOÀCIDS.

Paral.lelament als assatjos anteriors s'ha analitzat la seqüència d'aminoàcids de la p55 purificada. S'han obtingut tres seqüències parcials (31 aminoàcids), que presenten entre un 70 i 90 % d'homologia amb fragments de queratina nº 8 de distintes espècies.

La figura 27 mostra les tres sequències parcials de la p55 comparades amb els fragment de queratina nº 8 de les distintes espècies amb les que presenta

homologia.

KKDVDEAY KVELESR ENEFLI I P55 LENEFVLLKKDVDEAYMNKVQLEARLEAL XEN 196 MENEFVLI KKDVDEAYMNKVELES RLEGL MOU 192 MENEFVII KKDVDEAYMNKVELES RLEGL BOV 88 MNKVELESRLEGL HUM 1 ARQLREYQEL P55 DMSRQLRDYQELMN XEN 373 DMARQLREYQELMN MOU 369 DMARQLREYQELMN BOV 265 DMARQLREYQELMN HUM 173

Figura 27.- Seqüència parcial de la p55, obtinguda tal com s'ha descrit a l'apartat 3.11. Comparació de la seqüència parcial de la p55 amb fragments de la queratina Endo A de ratolí (MOU), de la queratina nº 8 bovina (BOV), de la queratina nº 8 humana (HUM) i la queratina nº 8 de Xenopus (XEN).

Els fragments de p55 obtinguts presenten una homologia del 90% amb la queratina nº8 de ratolí (també anomenada endo A), del 88% amb la queratina nº 8 bovina, del 85% amb la queratina nº 8 humana i del 70% amb la queratina nº 8 de *Xenopus*.

Aquests resultats suggereixen que la p55 identificada en la matriu nuclear 24 h regenerant es tracta de la queratina nº 8.

Les queratines formen part de la gran família de filaments intermedis (IF), components del citoesquelet cel.lular. Els filaments intermedis són una classe de filaments citoplasmàtics molt insolubles amb diàmetre comprés, entre els 25 nm de diàmetre dels microtubuls i els 7 nm de diàmetre dels microfilaments. D'ací el nom de filaments intermedis (IF) o filaments de 10 nm.

Els filaments intermédis estan formats per una família multigènica que constitueix el grup més gran de proteïnes estructurals.

Segons les diferències en la sequència i composició d'aminoàcids, es defineixen sis tipus de filaments intermedis: queratines acídiques (tipus I), queratines bàsiques o neutres (tipus II), desmina, vimentina, proteïna acídica fibrilar glial i periferina (tipus III), triplet de neurofilaments (tipus IV), llamines nuclears (tipus V) i nestin (tipus VI) (Steinert P. i al. 1988, Lendahl U. i al. 1990).

Els components que formen els filaments intermedis s'expressen especifivcament en els distints teixits i organs.

El grup majoritari de filaments intermedis el formen les queratines, dividides en dos tipus: de tipus I, menors, acídiques i constituides per les queratines del nº 9 al 20; i de tipus II, més grans, neutres o bàsiques i constituïdes per les queratines del nº 1 fins el 8.

Totes les proteïnes de la família dels filaments intermedis comparteixen la mateixa forma estructural formada per un llarg domini α -helicoidal, el qual dimeritza per formar una espiral arrollada (*coiled coil*) de 50 nm de llarg. La regió α -helicoidal està flanquejada pels dominis amino- i carboxi-terminals no helicoidals. L'especificitat d'expressió dels distints tipus de filaments intermedis, en els diferents teixits, s'associa als dominis terminals, ja que presenten més variabilitat de seqüència i tamany, així com semblen mostrar seqüències característiques d'acord amb el teixit en el qual s'expressen, inclús dintra dels components individuals de cadascun dels tipus de filaments intermedis (Jorcano i al. 1984, McCormick M.B. i al. 1991).

La majoria de filaments intermedis, concretament els de tipus III, formen filaments homodimers (Steinert P. al. 1981), en canvi les queratines, en condicions normals formen filaments heterodimers, constituïts pels dos tipus de queratines (I i II) (Coulombe i al. 1990, Hatzfeld i al. 1990, Steinert i al. 1990).

Els filaments de queratina i els filaments intermedis en general, es distribueixen a través del citoplasma (Franke W. i al. 1978, Jones J.C.R. i al. 1985, Wang E. i al 1985), unint-se per l'extrem carboxi-terminal al nucli, concretament a les llamines nuclears (Goldman R. i al. 1985, Jones J.C.R. i al. 1982, Georgatos i al. 1987, 1987a) i per l'extrem amino-terminal a proteïnes específiques de la membrana plasmàtica (Arnn J. i al. 1981, Jones J.C.R. i al. 1985, Kartenbeck i al. 1984, Georgatos i al. 1987a).

Els filaments intermedis, incloses les queratines, són components relativament estables del citoesquelet de les cèl.lules en interfase (Miller R.K. i al. 1991, Bloemendal H. i al. 1989), en canvi, evidències experimentals indiquen que els filaments intermedis són components dinàmics respecte llur desassamblatge i conseqüent reassamblatge, durant la mitosi (Horwitz B. i al. 1981, Lane E.B. i al.

129

1982, Celis J.E. i al. 1983, Fey S.J. i al. 1983, Eckert B.S. i al. 1985, Jones J.C.R. i al. 1985a, Chou Y. i al. 1989). El desassamblatge i posterior assamblatge dels filaments intermedis durant la mitosi, s'ha descrit associat a processos de fosforil.lació. Estudis recents impliquen a la quinasa reguladora del cicle cel.lular, p34^{cdc2}, en la fosforil.lació, i per tant desassamblatge, dels filaments intermadis de tipus III (vimentina i desmina) i tipus IV (llamines nuclears) durant la mitosi (Peter M. i al. 1990, Chou Y.H. i al. 1990, Enoch T. i al. 1991, Peter M. i al. 1991).

Tal com s'ha indicat amb la seqüència parcial d'aminoàcids de la proteïna de 55 KDa, els pèptids obtinguts presenten gran homologia amb fragments de la citoqueratina nº8. Després d'analitzar aquesta homologia, s'ha vist que els fragments obtinguts estan localitzats específicament en la regió del domini central α -helicoïdal. Aquest fet junt amb la coincidència dels resultats obtinguts en els estudis bioquímics de la p55 com són, el pes molecular, punt isoelèctric, les isoformes fosforil.lades i la seva presencia en el teixit hepàtic, portarien a la conclusió de que la p55, sens dubte, és la citoqueratina nº 8 si no fos per la discrepància que es desprèn dels estudis de localització immunocitoquímica. La citoqueratina nº 8 és, tal com s'ha descrit anteriorment, una proteïna que es presenta en forma de filaments de localització citoplasmàtica, en canvi la p55 s'ha trobat localitzada quassi o majoritàriament al nucli i de forma dispersa (no s'ha observat estructures filamentoses definides).

Aquesta important diferència a portat a comprovar si els mètodes utilitzats en els estudis de localització de la p55 són artefactuals o no i, a intentar esbrinar si es tracta d'un a proteïna diferent a la citoqueratina nº 8 però molt propera a la família de filaments intermedis.

S'ha observar, que en molts treballs i revisions, els estudis de localització cel.lular de citoqueratines en teixit hepàtic es realitzen quasi sempre emprant altres mètodes, de tractament de les mostres i de fixació del teixit, distins als emprats en els estudis que s'han descrit als apartats 5, 6, 7 i 8 de resultats.

Per tant s'han analitzat distints mètodes de fixació per tal de comprovar si aquests afecten al patró immunocitoquímic.

.

4.1.13.-IMMUNOCITOQUÍMICA EN TEIXIT HEPÀTIC CONGELAT AMB ANTI-P55 I ANTI-CITOQUERATINES EMPRANT DISTINS FIXADORS.

El mètode de processament del teixit hepàtic, emprat en els estudis d'immunolocalització de la p55, ha estat fins aquest apartat, fixació *in vivo* del fetge amb paraformaldehid i inclusió en parafina.

Aquest mètode proporciona una bona conservació de l'estructura del teixit, però en alguns casos pot afectar l'antigenicitat, tal com s'ha descrit a l'apartat 3.13.1.1.

Hi han evidències que indiquen que la fixació amb aldehids afecta la immunoreactivitat de proteïnes del citoesquelet i filaments intermedis, reduint l'antigenicitat i provocant canvis de conformació (B. M. Riederer, 1989).

Per aquest motiu s'han realitzat estudis immunocitoquímics de teixit hepàtic sense fixar o emprant distins fixadors, i comprovar l'efecte d'aquests en la localització de la p55 comparada amb la de les citoqueratines.

S'han emprat seccions de teixit hepàtic congelat sense fixar, fixades amb acetona (-20°C), acetona:metanol (-20°C), metanol (-20°C) i 3% paraformaldehid en PBS. En qualsevol d'aquests casos, al realitzar la detecció immunocitoquímica emprant l'anticòs anti-p55 tal com s'ha descrit en l'apartat 3.13.1.2., els resultats han estat una tinció específicament localitzada en el nucli (fig.28).

S'ha realitzat l'estudi immunocitoquímic en seccions de fetge fixades o no fixades, en les mateixes condicions però emprant un anticòs anti-queratines K_G8.13 (*K*, *keratine; G, general; mouse No. 8; clone No. 13.* Anticòs comercial monoclonal, caracteritzat per Gigi i al., 1982, que reconeix les queratines nº 1, 5, 6, 7, i 8 de la família de queratines bàsiques i les queratines 10, 11 i 18 de la família de queratines àcides). El resultat obtingut en aquest cas (fig. 29), ha estat una tinció citoplasmatica i al voltant de la membrana plasmàtica, tal com estava descrit en treballs anteriors (Franke i al. 1981; Gigi i al. 1982).

Com a controls de reacció s'ha utilitzat en el cas de la p55, l'anticòs anti-p55 preadsorbit amb l'antigen purificat (p55) i en el cas de les citoqueratines, al ser un anticòs monoclonal comercial, s'ha utilitzat PBS per tal de tenir un control del segon anticòs. Aquests resultats indiquen que l'antigenicitat de la p55 no sembla ésser afectada per la utilització d'aldehids com a fixadors, es demostra que la localització nuclear de la p55 observada no és artefactual i no depèn del tipus de mètode immunocitoquímic emprat.

Per altra banda, l'anticòs anti-p55 emprat per a la immunolocalització cel.lular de la p55 és un anticòs policional. Això suggereix la possibilitat de que el marcatge nuclear detectat fos degut a altres IgGs alienes a la p55 o a reaccions creuades amb proteïnes solubles del sèrum. Per tal de descartar aquesta possibilitat o si mes no reduir-la, s'ha purificat l'anticòs policional anti-p55 per cromatografia d'afinitat (p55 purificada acoblada a columnes de CNBr-Sepharose 4B activada, apartat 3.4.4.).

S'ha comprovat la purificació de l'anticòs per immunotransferència de les mostres de matriu nuclear 24 h regenerant i la p55 purificada. L'anticòs purificat reconeix una única banda en la mostra de matriu nuclear 24 h regenerant i aquesta és la p55 (fig.30).

∽_p55

Figura 30.-Immunotransferència de la fracció de matriu nuclear 24 h regenerant (50 µg), emprant l'anticòs anti-p55 purificat per cromatogràfia d'afinitat.

Comprovada la purificació de l'anticòs, s'han repetit els estudis d'immunocitoquímics, sota les mateixes condicions descrites anteriorment (en seccions de fetge regenerant congelat sense fixar i fixat amb distins fixadors), i el resultat obtingut ha estat el mateix. S'observa un marcatge específicament nuclear (resultats no presentats).

4.1.14.- PURIFICACIÓ DE FILAMENTS INTERMEDIS DE FETGE DE RATA.

S'ha purificat la fracció cel.lular corresponent als filaments intermedis de fetge de rata normal (no hepatectomitzades) i de rates 24 h regenerants (després d'una hepatectomia parcial) seguint el protocol descrit a l'apartat 3.2.1.2.

En el patró electroforètic de la fracció de filaments intermedis purificats, s'observa la presencia majoritària de dues proteïnes de 55 i 45 KDa (fig.31). Aquestes dues proteïnes corresponen a la citoqueratina nº8 i la nº18, respectivament, components específics dels filaments intermedis del fetge, tal com s'havia descrit anteriorment.

L'anàlisi mitjançant gels bidimensionals tenyits amb coomassie blue de la fracció de filaments intermedis comparada amb la de la matriu nuclear (fig.32) indica que el patró de la citoqueratina nº8 dels filaments intermedis (fig.32a) i la p55 de la matriu nuclear 24 h regenerant (fig.32b), és exactament igual. Està formada per una forma majoritària i dues isoformes minoritàries (representat per fletxes en la fig.21).

Figura 31.- Patró electroforètic de les proteïnes dels filaments intermedis (IF), separades en un gel del 8% SDS-poliacrilamida.

Figura 32.- Patró electroforètic bidimensional (2D-PAGE IEF) de les proteïnes dels filaments intermedis de rates 24 h regenerants (a), de matriu nuclear 24 h regenerant (b) i de matriu nuclear normal (c). Les fletxes representen en (a) la citoqueratina nº 8 i en (c) i (b) la p55.



f19.32

4.1.15.- IMMUNOTRANSFERÈNCIA DE DISTINTES FRACCIONS CEL.LULARS EMPRAN ELS ANTICOSSOS ANTI-P55 I ANTI-CITOQUERATINA.

Les mostres estudiades en aquest apartat han estat: filaments intermedis purificats de fetge de rates normals i de rates 24 h regenerants, matriu nuclear normal, matriu nuclear 24 h regenerant, p55 purificada i citoqueratina nº 8 comercial (Boehringer, citoqueratina nº 8 purificada de fetge boví de 52.5 KDa de pes molecular i punt isoelèctric de 6.4).

Les mostres s'han transferit de gels del 8% SDS-poliacrilamida a filtres de nitrocel.lulosa, i s'ha estudiat per separat els anticossos anti-p55 i K_{g} 8.13.

L'anticòs K_g8.13 reacciona, tant en les mostres de matriu nuclear com en les de filaments intermedis, marcant dues bandes de 55 i 45 KDa i també reconeix la citoqueratina n^o8 i la p55 purificada (fig.33). Aquest resultat indica que la proteïna de 55 KDa és la citoqueratina n^o 8 i la de 45 KDa la citoqueratina n^o 18.

S'ha de senyalar que, malgrat la concentració de la citoqueratina nº 8 comercial i la p55 purificada és la mateixa, la intensitat del marcatge és superior en el cas de la queratina nº 8 que amb la p55.

En la fracció de filaments intermedis, l'anticòs K_g8.13 reconeix, a més a més de la queratina nº8 i nº 18, una banda d'uns 62 Kda. Tal com s'ha esmentat a l'apartat 4.1.13, l'anticòs K_g8.13 és un anticòs monoclonal que reconeix distintes queratines, això suggereix que es tracta d'un anticòs produït contra alguna regió altament conservada entre les queratines, com podria ésser la regió α -helicoïdal. Aquest suposició i donat que el fetge només presenta dos tipus de queratines (nº8 i 18) ha fet pensar, que l'anticòs està reconeixent alguna proteïna que presenta homologia amb la regió de reacció.



Figura 33.- Immunotransferència de mostres de filaments intermedis i matriu nuclear, emprant l'anticòs $K_{g}8.13$ diluït 1/2500. (1) Citoqueratina nº8 comercial (6 µg), (2) p55 purificada (6 µg), (3) filaments intermedis (30 µg) i (4) matriu nuclear (60 µg) de rates 24 h regenerants.

En la immunotransferència emprant l'anticòs anti-p55 s'observa, en totes les fraccions, marcatge de la banda de 55 KDa i en les fraccions de filaments intermedis també apareix marcada la banda de 45 KDa (fig.34). En aquest cas el resultat indica que l'anticòs anti-p55 reconeix específicament la citoqueratina nº 8 i en les fraccions de filaments intermedis, on es troba molt enriquida la citoqueratina nº18, també la reconeix.



Figura 34.- Immunotransferència de mostres de filaments intermedis i matriu nuclear normals (rates no hepatectomitzades) i regenerants (de rates 24 h regenerants post-hepatectomia parcial), emprant l'anticòs anti-p55 diluït 1/500. Mostres de (1) filaments intermedis normals (30 μ g), (2) filaments intermedis 24 h regenerants (30 μ g), (3) matriu nuclear normal (60 μ g) i (4) matriu nuclear 24 h regenerant (60 μ g).

Donat que amb l'anticòs K_{g} 8.13 la intensitat de reconeixement de les proteïnes purificades ha estat diferent (fig.33), s'ha realitzat immunotransferència amb la mateixa concentració de citoqueratina nº 8 comercial i p55 purificada, emprant l'anticòs anti-p55 (fig.35).

Figura 35.- Immunotransferència de les proteïnes purificades, emprant l'anticòs anti-p55 diluït 1/500. (1) Citoqueratina nº8 comercial (10 µg) i (2) p55 purificada (10 µg).



Al contrari que s'observava amb l'anticòs K_{g} 8.13, l'anti-p55 presenta més afinitat per la p55 purificada que per la citoqueratina nº8.

Malgrat els resultats obtinguts en les anteriors immunotransferències, semblen constatar que la proteïna de 55 KDa identificada és la citoqueratina nº 8, continua sense resoldre's la diferent localització observada en els estudis immunocitoquímics.

A continuació s'han realitzat immunotranferències de distintes mostres emprant, per una banda l'anticòs anti-p55 prèviament pre-absorbit amb la mostra de matriu nuclear 24 h regenerant (no desnaturalitzada) i per altra banda l'anticòs anti-p55 prèviament pre-absorbit amb la mostra de filaments intermedis (no desnaturalitzats). Ja que, hi ha la possibilitat de que l'anticòs anti-p55 produït contra la p55 purificada desnaturalitzada, sigui capaç de reconèixer molt be la p55 o queratina nº 8 en els estudis d'immunotransferència, on es presenten les proteïnes de les mostres desnaturalitzades, i que no reconegui la p55 en estat natiu en els estudis immunocitoquímics. Tal com s'ha descrit a l'apartat 3.4, aquest és un dels

138

problemes que presenta, en algunes ocasions l'obtenció d'anticossos a partir de proteïnes purificades de gels SDS-poliacrilamida.

En aquest cas, el marcatge nuclear seria degut al reconeixement de qualsevol altra proteïna.

Tant per immunotransferència com per immunocitoquímica s'ha vist que l'anticòs anti-p55 és específic contra la p55, doncs a l'absorbir-lo amb la p55 purificada desapareix el marcatge en ambdós casos.

El resultat obtingut en les immunotransferències de les mostres de matriu nuclear i filaments intermedis, de fetges normals i 24 h regenerants, i emprant l'anticòs antip55 pre-absorbit amb matriu nuclear o filaments intermedis, ha estat en ambdós casos l'absència de marcatge en totes les fraccions analitzades (motiu pel qual no es mostra la figura).

El control positiu de la reacció és el presentat en la figura 34, ja que s'han emprat les mateixes mostres, la mateixa dilució d'anticòs i les mateixes condicions d'immunotransferència.

Aquest resultat indica que l'anticòs anti-p55 reconeix la p55 o citoqueratina nº 8 en estat natiu.

4.1.16.- IMMUNOTRANSFERÈNCIES BIDIMENSIONALS DE LES FRACCIONS MATRIU NUCLEAR I FILAMENTS INTERMEDIS EMPRAN L'ANTICÒS ANTI-P55.

La immunotransferència de gels bidimensionals de les mostres de matriu nuclear i dels filaments intermedis, 24 h regenerants, emprant l'anticòs anti-p55 dona com a resultat un marcatge idèntic. L'anticòs anti-p55 reconeix en les dues mostres, exclusivament les isoformes que constitueixen la p55 o citoqueratina nº8 (fig.36a i b).

Figura 36.- Imunotransferència de gels bidimensionals (2D-PAGE IEF) de les mostres de filaments intermedis (a) i matriu nuclear (b), de rates regenerants (24 h post-hepatectomia parcial), emprant l'anticòs anti-p55 diluït 1/500.

fig.36

Α

Aquest resultat indica que l'anticòs anti-p55 està reconeixen en les dues mostres, únicament una proteïna de 55 KDa constituïda per diferents isoformes i aquesta proteïna és la citoqueratina nº 8.

B

4.1.17.- MAPATGE PEPTÍDIC DE LA P55 I LA CITOQUERATINA No. 8.

Per tal d'analitzar, si les distintes intensitats de marcatge de les proteïnes purificades (p55 i citoqueratina nº 8 comercial) pels dos anticossos emprats (anti-55 i K_g8.13), eren degudes a que els anticossos reconeixen pèptids distins, s'ha realitzat el mapatge peptídic de les dues proteïnes i s'ha analitzat per immunotransferència emprant els anticossos anti-p55 (fig.37) i K_g8.13 (fig.38). El mapatge peptídic s'ha portat a terme tal com s'ha descrit a l'apartat 3.12, mitjançant la proteasa V8. Els resultats que es presenten s'han obtingut després de 30 min. de digestió.

L'anticòs anti-p55 reconeix, en la p55 digerida (fig.37, línia 2), majoritàriament dos pèptids d'uns 14 i 26 KDa i no s'observa cap pèptid marcat en la citoqueratina nº8 digerida (fig.37, línia 4). Això podria ésser degut a la baixa afinitat de l'anticòs antip55 per la citoqueratina nº8 que s'està emprant. Al comparar els resultat de la figura 37 amb la figura 38, observen que l'anticòs $K_g 8.13$ presenta molta afinitat pels pèptids obtinguts de la citoqueratina nº 8 i malgrat la baixa afinitat que presenta per la p55, reconeix també el pèptid de 26 KDa però no el de 14 KDa.

Aquests resultats són indicatius però no concloents. S'ha repetit el mateix experiment variant les condicions i concentracions de la mostra però no s'ha pogut obtenir resultats més clars. Per altra banda, s'ha d'esmentar que donat que l'origen de les dues proteïnes no és el mateix, el resultat de la digestió pot ésser diferent i no comparable.

4.1.18.- IMMUNOCITOQUÍMICA DE TEIXIT HEPÀTIC PER A MICROSCOPIA ELECTRÒNICA.

Per tal de determinar més específicament la localització intranuclear del marcatge amb l'anticòs anti-p55, s'ha realitzat l'estudi immunocitoquímic ultraestructural en teixit hepàtic, emprant l'anticòs anti-p55.

Les mostres de teixit hepàtic normal i regenerant, s'han processat aplicant les tècniques de post-inclusió en Lowicryl 4KM (apartat 3.14.1.1). La immunodetecció s'ha realitzat emprant l'anticòs anti-p55 i com a segon anticòs, proteïna A conjugada amb partícules d'or de 10 nm. Els resultats obtinguts no han estat massa específics, ja que s'ha observat una distribució de la p55 molt dispersa per tot el nucli en les seccions de fetge 24 h regenerant, representada per poques partícules d'or (quan s'elimina el marcatge de fons) (resultats no presentats).

Així doncs, per tal de disminuir la manipulació del teixit (deguda als processos d'inclusió), mantenir al màxim les proteïnes en l'estat natiu i d'augmentar la penetrabilitat de les partícules d'or, s'han emprat tècniques de crioultramicrotomia (apartat 3.14.2.1.) i s'ha utilitzat un segon anticòs conjugat a partícules d'or de 1 nm.

El resultat obtingut en ultracrioseccions de fetge 24 h regenerant ha estat, un marcatge específicament nuclear i distribuït de forma heterogènia (fig.39a). En ocasions s'identifiquen acumulacions de marcatge associades a la membrana o llàmines nuclears. En les seccions de fetge normal, també s'observa marcatge específicament nuclear, però significativament menor respecte les seccions de fetge 24 h regenerant (fig.39b).

4.2.- IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA P55 EN DISTINTS TEIXITS DE RATA.

4.2.1.- DETECTECCIÓ DE LA P55 EN DIFERENTS TEIXITS DE RATA MITJANÇANT IMMUNOTRANSFERÈCIA.

La detecció de la p55 en diferents teixits de rata, s'ha realitzant mitjançant immunotransferència de mostres d'homogenats de cor, pulmó, timus, pàncreas, ronyó, testicles i múscul, emprant com anticòs l'anti-p55.

Els resultats obtinguts indiquen, la presència de la p55 en ronyó, pàncreas i timus (fig.40). També s'identifiquen bandes adicionals de baix pes molecular reconegudes per l'anticòs en aquestes mostres, però s'associen a productes de degradació. En múscul i cor, l'anticòs anti-p55 no reconeix cap banda. En testicles no es detecta la p55 però es detecta específicament una banda d'uns 92 KDa i en pulmó es reconeix lleugerament la p55, però majoritàriament una banda de 40 KDa de pes molecular.

En apartats anteriors s'han presentat evidències de l'homologia que existeix entre la p55 i la citoqueratina nº 8. Així doncs, s'han volgut correlacionar els resultats presentats en la figura 40 amb el tipus de filaments intermedis que presenten els teixits estudiats. Donat que la composició del tipus de filaments intermedis en diferents teixits i línies cel.lulars en cultiu, ha estat àmpliament estudiada per distints autors (Lazarides, E. 1980; Moll i al. 1982; Gigi i al. 1982; Tseng i al. 1982).



Figura 40.- Immunotransferència d'homogenats de diferents teixits de rata: Cor (1), múscul (2), testicles (3), ronyó (4), timus (5), pàncreas (6), pulmó (7), fetge (8) i matriu nuclear (9) de rates 24 h regenerants. Aquestes dues darreres mostres han estat el control positiu de reacció. L'anticòs anti-p55 s'ha emprat diluït 1/500 i s'ha detectat amb proteïna A marcada amb I¹²⁵.

La taula I mostra la composició de filaments intermedis d'alguns tipus cel.lulars.

De la taula I es despren que hi ha una correlació entre la classe de filaments intermedis present en un determinat tipus cel.lular i el seu origen.

Comparant els resultats obtinguts amb l'anticòs anti-p55 (fig.40) amb les dades de la taula I, s'observa que l'anticòs anti-p55 reconeix la p55 en pàncreas, timus, ronyó i fetge, teixits composats majoritàriament per cèl.lules d'origen epitelial, que presenten exclusivament queratines com a components dels filaments intermedis i entre elles la queratina nº 8. L'anti-p55 no reconeix cap banda en teixits musculars (cor i múscul esqueslètic), els quals no presenten queratines, si no vimentina i desmina. En el treball de Tseng i al. (1982), es descriu la presencia d'una queratina de 40 KDa a l'epiteli pulmonar, aquesta sembla ésser reconeguda per l'anticòs antip55. En els testicles s'ha observat el marcatge específic d'una banda de 92 KDa, de la qual no s'ha trobat informació. Sols es sap, segons la taula I, que les cèl.lules de sertoli presenten vimentina (57 KDa), i aquesta no es reconeguda per l'anticòs anti-p55.

Per altra banda, estudis realitzats en nuclis purificats de neurona i glia de cervell de rata, mitjançant immunotransferència i emprant l'anticòs anti-p55, mostren la identificació d'una banda específica de 85 KDa, d'intensitat superior en els nuclis de neurona que en els de glia (fig.41).

Aquesta banda de 85 KDa no correspon a cap dels filaments intermedis típics de les neurones i cèl.lules glials com són, els neurofilaments (en les neurones) i els GFAP, filaments glials (en les cèl.lules glials).


Els resultats de l'anàlisi dels diferents teixits amb l'anticòs anti-p55 indiquen, la presència de la p55 en teixits típicament epitelials, en els quals la p55 correspondria a la citoqueratina nº 8. També s'identifiquen específicament dues proteïnes de 92 i 85 KDa en testicles i cervell respectivament, que no corresponen a les subunitat de filaments intermedis descrits en aquests teixits.

Per tal d'obtenir més informació de les proteïnes de 92 i 85 KDa, s'han realitzat estudis de localització cel.lular mitjançant immunocitoquímica en testicles i cervell de rata.

4.2.2.- ESTUDI IMMUNOCITOQUÍMIC EN TESTICLE I CERVELL DE RATA EMPRANT L'ANTICÒS ANTI-P55.

Els testicles s'han processat mitjançant fixació *in vivo* amb 3% paraformaldehid i inclusió amb parafina (apartat 3.13.1.1).

El resultat de l'estudi immunocitoquímic ha estat una tinció específicament nuclear en les cèl.lules que formen l'epiteli extern dels tubs seminífers i en les cèl.lules germinals dels primers estadis (espermatogònies i espermatòcits primaris) (fig.42).

S'ha realitzat el mateix estudi en seccions de cervell de rata i s'ha observat que l'anticòs anti-p55 reacciona també, específicament en els nuclis de les neurones i les cèl.lules glials. Coincidint amb les dades obtingudes en l'estudi bioquímic (fig.31), la intensitat del marcatge ha estat superior en les neurones que en les cèl.lules glials (resultats no presentats).

D'aquests estudis immunocitoquímics és conclou que les proteïnes de 92 i 85 KDa, són proteïnes de localització nuclear, característica comú amb la p55 identificada en el teixit hepàtic regenerant.



Figura 32 - Immunolocalització de l'anticòs anti-p55 en seccions de testicles de rata (a) Anti-p55 diluit 1/100. (b) Detall a més augment de la figura a

4.3.- IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA P55 EN DISTINTES CÈL.LULES EN CULTIU.

4.3.1.- DETECIÓ IMMUNOCITOQUÍMICA DE LA P55 EN CÈL.LULES NRK 44F.

Les cèl.lules NRK 44F (*normal rat kidney cells*, cèl.lules normals de ronyó de rata no epitelials), representen una línia cel.lular fàcilment sincronitzable tal com s'ha descrit a l'apartat 3.1.5. Aquest característica, a portat a la utilització de les cèl.lules NRK com a model cel.lular *in vitro* d'activació proliferativa, paral.lel al de la regeneració hepàtica.

Per tal de caracteritzar la presència de la p55 en les cèl.lules NRK en distintes fases del cicle cel.lular, s'han realitzat estudis d'immunolocalització de la p55, en cèl.lules NRK en fase G_0 (cèl.lules abans d'ésser activades, mitjançant l'adició de sèrum fetal), en fase G_1 (cèl.lules a les 6 h després de l'activació) i en fase S (cèl.lules a les 20 h després de l'activació, temps en el qual es dona el pic màxim de síntesi d'ADN). Aquesta determinació de la distribució de la p55 s'ha portat a terme aplicant les tècniques immunocitoquímiques descrites a l'apartat 3.13.3., emprant l'anticòs anti-p55 i detectant la reacció de l'anticòs per immunofluorescència o immunoperoxidasa.

En les cèl.lules NRK 20 h després de l'activació proliferativa, s'observa una intensa reacció de l'anticòs localitzada concretament en el nucli. En ocasions també s'observa una lleugera tinció citoplasmàtica que sembla definir filaments (fig. 43). En les cèl.lules en fase G₁ (6 h després d'activar-les), l'anticòs anti-p55 manifesta una reacció contraria a l'observada en les cèl.lules en fase S. No es detecta marcatge al nucli i en canvi s'observa un lleuger marcatge citoplasmàtic (fig.44). Les cèl.lules en fase G₀, cèl.lules NRK quiescents que s'han mantingut en medi amb 0.5% de sèrum fetal, presenten un marcatge degut a l'anticòs anti-p55 idèntic al presentat en les cèl.lules en fase G₁.

Els controls de reacció han estat, cèl.lules NRK en fase S incubades amb l'anticòs anti-p55 prèviament pre-absorbit amb l'antigen, p55. En els controls, s'observa l'absència de marcatge en el nucli de les cèl.lules NRK (fig.45). Aquest resultat suggereix que el marcatge nuclear observat en les cèl.lules NRK S, és específic de l'anticòs.

Figura 43.- Immunolocalització de la p55 en cèl.lules NRK en fase S (20 h després d'activar-les). Anàlisi realitzada per immunofluorescència (b) i immunoperoxidasa (c). Les cèl.lules han estat fixades amb 3% paraformaldehid i s'ha emprat l'anticòs anti-p55 diluït 1/400 (b) i 1/100 (c). (a) Imatge per contrast de fase de la figura b.

Figura 44.- Immunolocalització de la p55 en cèl.lules en fase G1 (6 h després d'activar-les). Anàlisi realitzada per: (a) immunofluorescència (anti-p55 diluït 1/400) i (b) per immunoperoxidasa (anti-p55 diluït 1/100). El tipus de fixació emprada ha estat 3% paraformaldehid.

Figura 45.- Controls immunocitoquímics. Cèl.lules NRK en fase S, incubades amb l'anticòs anti-p55, diluït 1/100 per immunoperoxidasa (a) i 1/400 per immunofluorescència (b), pre-adsorbit amb l'antigen, p55.











A més dels experiments mencionats, s'han realitzat proves immunocitoquímiques en paral.lel, en les quals s'han analitzat diferents fixadors: metanol (3 minuts a -20°C) i metanol:acetona (3 minuts a -20°C), a part de la fixació amb 3% paraformaldehid. El resultat en tots els casos ha estat essencialment el mateix. Es interessant remarcar que, malgrat el metanol i l'acetona fixen i permeabilitzen a la vegada, el temps òptim de fixació no és suficient per a permeabilitzar la membrana nuclear. Es necessari una segona permeabilització per tal d'aconseguir la detecció d'antigens nuclears. (Aquest requisit no fora necessari per estudis d'antigens citoplasmàtics).

Aquesta evidència s'ha observat al comparar els resultats obtinguts en les proves immunocitoquímiques en cèl.lules NRK en fase S, permeabilitzades amb trito X-100 i no premeabilitzades després de la fixació amb metanol:acetona (3 min a -20°C), emprant l'anticòs anti-p55. En el cas de permeabilitzar les cèl.lules després de fixar, l'anticòs presenta reacció localitzada en el nucli, tal com s'ha observat en la figura 33. Contràriament, si no es permeabilitza, l'anticòs no presenta cap tipus de reacció nuclear en les mateixes cèl.lules.

Els resultats obtinguts en aquest apartat indiquen que la p55 es troba localitzada majoritàriament en el nucli de les cèl.lules NRK i que llur presència depèn de la fase del cicle cel.lular.

4.3.2.- DETECCIÓ DE LA P55 EN CÈL.LULES NRK MITJANÇANT IMMUNOTRANSFERÈNCIA.

Per tal d'identificar si el marcatge nuclear detectat en els nuclis de les cèl.lules NRK correspon a la p55, s'ha realitzat experiments d'immunotransferència de mostres de nuclis purificats (apartat 3.2.2.1.) i homogenats de cèl.lules NRK en fase S, emprant l'anticòs anti-p55.

En la figura 46 es pot observar que l'anticòs p55 detecta una banda de 62 KDa tant en homogenats com en nuclis purificats.



Figura 46.- Immunotransferència de proteïnes de mostres de cèl.lules NRK en fase S, separades en gels unidimensionals del 8% SDS-poliacrilamida: (2) nuclis purificats i (3) homogenat. (1) citoqueratina nº 8 comercial, (4) matriu nuclear i (5) p55 purificada de matriu nuclear de fetges 24 h regenerants, que serveixen com a controls de reacció. Anticòs antip55 diluït 1/100.

4.3.3.- ANÀLISI BIDIMENSIONAL DE LA P55 DE LES CÈL.LULES NRK.

Per tal de determinat el patró electroforètic bidimensional de proteïnes de les cèl.lules NRK en fase G_1 i en fase S, s'han marcat les cèl.lules amb metionina-S³⁵ segons l'apartat 3.1.6.

Comparant el patró electroforètic de les cèl.lules en fase S i en fase G_1 (fig.47), s'observa que s'hi ha un increment notable de la síntesi proteica, des de l'inici de l'activació proliferativa (cèl.lules NRK en fase G_1) fins el punt màxim de síntesi d'ADN (cèl.lules NRK en fase S).



Figura 47.- Gel bidimensional (2D-PAGE IEF) de les cèl.lules NRK. (a) Homogenat de cèl.lules NRK en fase G₁, incubades amb metionina-S³⁵ durant 3 h abans d'aturar-les i (b) homogenat de cèl.lules NRK en fase S, incubades amb metionina-S³⁵ durant 17 h abans d'aturar-les. Marcafge amplificat per fluorografia (apartat 3.5.3.3.).

S'ha realitzat l'anàlisi bidimensional de la p55 de les cèl.lules NRK en fase G₁ i en fase S, mitjançant immunotransferència emprant l'anticòs anti-p55 (fig.48). El resultat ha estat la identificació de la proteïna de 62 KDa (p62), formada per una forma majoritària i distintes isoformes d'igual pes molecular i diferent punt isoelèctric. S'ha detectat la p62, tant en les cèl.lules NRK en fase G₁ com en fase S. Aquest fet no es correlaciona amb els resultats obtinguts en els estudis immunocitoquímics, en els quals s'observava la presència de la proteïna detectada per l'anticòs anti-p55 en les cèl.lules NRK, depenent de la fase del cicle cel.lular. Per tant aquests resultats es poden interpretar en el sentit que, la manifestació de la p62 en les cèl.lules NRK depén de la fase del cicle cel.lular però no la seva presència.

Figura 48.- Immunotransferència de les proteïnes de les cèl.lules NRK en fase S, separades en gels bidimensionals, emprant l'anticòs anti-p55 diluït 1/500. La imatge de la immunotransferència de les cèl.ules NRK en fase G₁, emprant l'anticòs anti-p55, ha estat exactament la mateixa.

14 V

Analitzant les dades obtingudes en les cèl.lules NRK s'observa, que l'anticòs antip55 reconeix una proteïna de 62 KDa (fig.36), aquesta presenta un patró bidimensional format per diferents isoformes d'igual pes molecular però distins punt isoelèctric (fig.38) i localitzada específicament al nucli en les cèl.lules en fase S (fig.33). Aquestes dades coincideixen amb les dades obtingudes en el fetge a l'emprar l'anticòs anti-p55 i indiquen que la p62 detectada en les cèl.lules NRK presenta característiques comuns a la p55 detectada en el fetge. Per altra banda, és interessant remarcar que la correlació que existeix entre la p55 i la citoqueratina nº 8 en el fetge, no es pot donar en les cèl.lules NRK 44F, ja que aquestes presenten com a component dels filaments intermedis la vimentina, i per tant no presenten cap tipus de queratines.

Aquestes dades indiquen, que la p62 identificada en aquestes cèl.lules, no es tracta d'una queratina, si no d'alguna altra proteïna propera a la família dels filaments intermedis.

4.3.4.- DETECCIÓ IMMUNOCITOQUÍMICA DE LA VIMENTINA I CITOKERATINA EN LES CÈL.LULES NRK.

Existeixen evidències experimentals que indiquen, que en ocasions, tipus cel.lulars que presenten un sol tipus de filaments intermedis, a l'establir-se com a línia cel.lular en cultiu, desenvolupen altres tipus de filaments intermedis coexistens amb els inicials. Per aquest motiu i mitjançant estudis immunocitoquímics aplicats a les cèl.lules NRK, s'ha visualitzat el patró de distribució dels filaments intermedis formats per vimentina i s'ha comprovat l'absència de queratines en aquesta línia cel.lular.

La figura 49, mostra el marcatge típic de filaments citoplasmàtics obtinguts a l'emprar un anticòs anti-vimentina monoclonal (anticòs comercial obtingut contra vimentina bovina) en les cèl.lules NRK 44F. Cal destacar que la distribució de la vimentina en les cèl.lules NRK en les diferents fases del cicle cel.lular ha estat la mateixa, es a dir, no s'observa cap canvi o increment (fig.39a i 39b). A l'emprar l'anticòs anti-queratines, K_g8.13, el resultat obtingut ha estat absolutament negatiu, es a dir, no s'ha observat cap tipus de marcatge.





fig.49

Figura 39.- Patró de distribució de la vimentina en les cèl.lules NRK. (1) Detecció de la reacció de l'anticòs anti-vimentina per immunofluorescència, (a) cèl.lules NRK en fase G_1 i (b cèl.lules NRK en fase S. (2) Detecció de la reacció de l'anticòs anti-vimentina per immunoperoxidasa, (a) cèl.lules NRK en fase G_1 i (b) cèl.lules NRK en fase S.

4.3.5.- DETECCIÓ DE VIMENTINA I CITOQUERATINA EN MOSTRES DE CÈL.LULES NRK PER IMMUNOTRANSFERÈNCIA.

S'ha analitzat per immunotransferència la presència de vimentina i citoqueratines en mostres de cèl.lules NRK, emprant els anticossos anti-vimentina i anti-queratina (K_{g} 8.13). L'estudi s'ha realitzat en homogenats, nuclis purificats i la fracció filaments intermedis-matriu nuclear (FI-MN), de les cèl.lules NRK.

La fracció FI-MN de les cèl.lules NRK s'ha obtingut a partir dels nuclis purificats (apartat 3.2.2.1) i aplicant posteriorment el mètode descrit en l'apartat 3.2.1.1., per a l'obtenció de matriu nuclear de cèl.lules de teixit hepàtic.

El resultat de la immunotransferència emprant l'anticòs anti-vimentina, ha estat la identificació de la banda de 57 KDa que correspon a la vimentina, en les mostres de les cèl.lules NRK (fig.50). S'observa, tal com s'esperava que la banda de vimentina incrementa en la fracció FI-MN, ja que en aquesta fracció es troba enriquida l'estructura de filaments intermedis (fig.50, línia 4).

Les mostres de p55 purificada i citoqueratina nº 8 comercial (fig.50, línies 1 i 5), no presenten marcatge amb l'anticòs anti-vimentina. Aquest resultat indica que l'anticòs monoclonal anti-vimentina reacciona contra un epítop exclusivament de la vimentina.

La immunotransferècia emprant l'anticòs anti-queratina (K_g8.13) s'ha realitzat comparant les mostres de les cèl.lules NRK amb les mostres de nuclis purificats i matriu nuclear, de fetge 24 h regenerant. El resultat ha estat, negatiu en les mostres de les cèl.lules NRK enfront a les dues bandes de 45 i 55 KDa presents en les mostres de fetge regenerant, que tal com s'ha descrit en apartats anteriors corresponen a la citoqueratina nº 18 i nº 8, respectivament (fig.51).







Figura 50.- Immunotransferència de mostres de cèl.lules NRK, emprant l'anticòs antivimentina diluït 1/100. (1) p55 purificada, (2) extracte total de cèl.lules NRK, (3) nuclis purificats de cèl.lules NRK, (4) fracció FI-MN de cèl.lules NRK i (5) citoqueratina 8 comercial.

Figura 51.- Immunotransferència de mostres de cèl.lules NRK i fetge 24 h regenerant, emprant l'anticòs K_{g} 8.13 diluït 1/2500. (1) citoqueratina 8 comercial, (2) homogenat cèl.lules NRK, (3) nuclis purificats cèl.lules NRK, (4) fracció matriu nuclear-filaments intermedis cèl.lules NRK, (5) p55 purificada i (6) matriu nuclear de fetge 24 h regenerant.

Els resultats obtinguts en aquest apartat, indiquen que les cèl.lules NRK contenen exclusivament vimentina com a component dels filaments intermedis, tal com s'havia observat en els estudis immunocitoquímics. Aquesta evidència demostra que no existeix en les cèl.lules NRK una correlació entre la presència de la proteïna detectada per l'anticòs anti-p55 i la citoqueratina nº 8, tal com s'observava en el teixit Lhepàtic.

4.3.6.- ANÀLISI BIDIMENSIONAL DE LA VIMENTINA EN LES CÈL.LULES NRK PER IMMUNOTRANSFERÈNCIA.

Donat que la p55 i la vimentina presenten pesos molecular molt pròxims (55 i 57 KDa, respectivament), s'ha plantejat la possibilitat de que l'anticòs anti-p55 detecti la vimentina, en les cèl.lules NRK. En la figura 38, s'observava el patró bidimensional de la proteïna de 55 KDa i 6.1 de punt isoelèctric, identificada per l'anticòs anti-p55 en les cèl.lules NRK. Aquestes dades no corresponen amb les de la vimentina que presenta 57 KDa de pes molecular, punt isoelèctric 5.3 i un patró bidimensional format per una sola forma majoritària en estat no fosforil.lat (en fase no mitòtica). Així doncs, per tal de comprovar que amb el mètode emprat el patró de la vimentina correspon al descrit en la bibliografia i no coincideix amb el patró observat de la p55, s'ha realitzat immunotransferència de mostres de cèl.lules NRK, separades en gels bidimensionals, emprant l'anticòs anti-vimentina i anti-p55 en les mateixes condicions.

4.3.7.- IMMUNOCITOQUÍCA DE LA P55 EN ALTRES TIPUS CEL.LULARS EN CULTIU.

L'estudi de la p55 en les cèl.lules NRK ha suggerit que la proteïna detectada per l'anticòs anti-p55 no es correlaciona directament amb la citoqueratina nº 8 i que la localització nuclear sembla ésser un fet general. Per tal d'evidenciar aquestes hipòtesis s'han realitzat estudis de la localització de la p55 en distins tipus cel.lulars dels que es coneix llur composició de filaments intermedis.

Les distintes línies cel.lulars estudiades ha estat les següents:

- Fibroblasts 3T3 (NIH) de ratolí.

- Cèl.lules HeLa, cèl.lules d'adenocarcinoma cervical humà.

- Cèl.lules BRL, cèl.lules d'hepatocarcinoma de rata.

- Cèl.lules MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*), cèl.lules epitelials de ronyó de gos.

La localització de la p55 en aquestes cèl.lules, s'ha portat a terme mitjançant tècniques immunocitoquímiques (apartat 3.13.3.) en les que s'ha emprat paraformaldehid al 3% com a fixador i la detecció de la reacció amb l'anticòs antip55 ha estat per immunofluorescència o immunoperoxidasa. El resultat ha estat en tots els tipus de cèl.lules, un marcatge essencialment nuclear (fig.53), independentment de la composició de filaments intermedis que presentin les cèl.lules. Les cèl.lules HeLa i BRL, presenten distins tipus de queratines i coexpresen vimentina. Les cèl.lules MDCK, presenten solament queratines i els fibroblasts 3T3 NIH de ratolí sols presenten vimentina.

En les cèl.lules HeLa (fig.53a) a més del marcatge nuclear s'observa marcatge citoplasmàtic. Aquest marcatge citoplasmàtic, si s'accepta l'homologia entre la p55 i la queratina nº 8, podria ésser marcatge de queratines per part de l'anticòs antip55. Aquesta explicació no es pot considerar una hipòtesi general ja que aquest marcatge citoplasmàtic no s'ha observat en els estudis d'altres tipus de cèl.lules que també contenen queratines.

Figura 53.- Localització de la p55 en diferents tipus de cèl.lules en cultiu fixades en 3% paraformaldehid i emprant l'anticòs anti-p55: cèl.lules HeLa (a), cèl.lules MDCK (b), cèl.lules 3T3 NIH (c) i cèl.lules BRL. Detecció de la reacció de l'anticòs anti-p55 diluït diluït 1/400 per immunofluorescència (a,b,c,d). Contrast de fase (à, b').

























L'estudi de la localització de la p55 en distins tipus de cèl.lules també s'ha realitzat emprant diferents fixadors com són, l'acetona:metanol (-20°C) i metanol (-20°C). En totes les cèl.lules i amb qualsevol dels fixadors emprats, el resultat ha estat sempre, una reacció específicament nuclear de l'anticòs anti-p55. Cal destacar, però, que quan s'ha utilitzat metanol i/o acetona com a fixadors el marcatge nuclear no ha estat tant contrastat com quan s'ha emprat paraformaldehid. Aquesta característica és contraria en el cas dels estudis immunocitoquímics per a queratines, en els quals el marcatge es veu afectat amb la utilització d'aldehids com a fixadors.

4.3.8.- DETECCIÓ PER IMMUNOTRANSFERÈNCIA DE LES PROTEÏNES RECONEGUDES PER A L'ANTICÒS ANTI-P55 EN DISTINTES LÍNIES CEL.LULARS.

Per tal de detectar les proteïnes reconegudes per a l'anticòs anti-p55, que presenten localització nuclear en els estudis immunocitoquímics de l'apartat anterior, s'han realitzat immunotransferències de les proteïnes de les distintes línies cel.lulars estudiades.

Les línies cel.lulars emprades en aquest apartat han estat: cèl.lules MDCK, cèl.lules 3T3 NIH, cèl.lules HeLa i cèl.lules AMA. Les cèl.lules AMA, són cèl.lules amniòtiques transformades humanes que contenen com a components dels filaments intermedis, quatre tipus de queratines i també coexpresen vimentina.

S'ha estudiat la reacció de l'anticòs anti-p55 en mostres de proteïnes, previament separades en gels del 8% SDS-poliacrilamida i transferides a filtres de nitrocel.lulosa, d'homogenats de cèl.lules MDCK, HeLa i 3T3 NIH.

En les cèl.lules MDCK, l'anticòs reconeix una banda de 55 KDa (fig.54).

En les cèl.lules HeLa, l'anticòs també reconeix únicament una banda de 55 KDa (fig. 55).En canvi, en les cèl.lules 3T3 NIH, l'anticòs reconeix una sola banda, però en aquest cas no és de 55 KDa si no de 60 KDa (fig.45).

Figura 54.- Immunotransferència emprant l'anticòs anti-p55 en homogenat de cèl.lules MDCK (2). La p55 purificada (1), serveix com a control de reacció. Anticòs anti-p55 diluït 1/100.

Figura 55.- Immunotransferència emprant l'anticòs anti-p55 en homogenats de cèl.lules HeLa (2) i 3T3 NIH (3). (1) p55 purificada. Anticòs anti-p55 diluït 1/100.



En les cèl.lules AMA l'anàlisi mitjançant immunotransferència emprant l'anticòs anti-p55, s'ha realitzat a partir de mostres de proteïnes d'homogenat de cèl.lules AMA, separades en gels bidimensional (2D-PAGE IEF). La figura 56, mostra el patró electroforètic de proteïnes de les cèl.lules AMA (fig.56A) i el resultat de la immunotransferència emprant l'anticòs anti-p55 (fig.56B). S'observa que l'anticòs reacciona amb una única proteïna de 55 KDa que presenta una forma majoritària i dues isoformes minoritàries d'igual pes molecular i distin punt isoelèctric (fig.56B). Aquest patró bidimensional és essencialment el mateix que s'ha observat en el teixit hepàtic i en les cèl.lules NRK.

Figura 56.- Anàlisi bidimensional de les proteïnes de les cèl.lules AMA. (A) Patró electroforètic 2D-PAGE IEF (cèl.lules marcades amb metionina-S³⁵). (B) Immunotransferència de les proteïnes de (A), emprant l'anticòs anti-p55 diluït 1/500.



*

Analitzant els resultat obtinguts en aquest apartat, aquests indiquen que en les cèl.lules HeLa, MDCK i AMA, la proteïna de 55 KDa que s'identifica podria correspondre a la citoqueratina nº 8 igual que en el fetge 24 h regenerant, ja que els tres tipus de cèl.lules contenen citoqueratina nº 8. Però igual que el fetge regenerant, la proteïna identificada presenta localització nuclear. Les cèl.lules 3T3 NIH, són equivalents a les cèl.lules NRK, en quan a la composició de filaments intermedis, ja que sols presenten vimentina. I en aquest cas, igual que les cèl.lules NRK, la proteïna que s'identifica es localitza al nucli però no és de 55 KDa, si no d'uns 60 KDa.

4.3.9.- ESTUDIS DE LOCALITZACIÓ DE LA P55 EN L'ESTRUCTURA MATRIU NUCLEAR-FILAMENTS INTERMEDIS DE DISTINTES LÍNIES CEL.LULARS EN CULTIU.

Per tal de comprovar si les proteïnes identificades per l'anticòs anti-p55 en les distintes línies cel.lulars, es troben localitzades en l'estructura de matriu nuclear igual que la p55 identificada en el fetge, s'ha emprat la tècnica de purificació de la matriu nuclear *in situ* i s'ha realitzat la immunolocalització amb l'anticòs anti-p55. La purificació de la matriu nuclear *in situ* s'ha realitzat tal com s'ha descrit a l'apartat 3.2.2.2., eliminant tots els components cel.lulars solubles, tant citoplasmàtics com nuclears. Per tant finalment s'obté, l'estructura insoluble citoplasmàtica formada pels filaments intermedis i l'estructura insoluble nuclear, formada pels components de la matriu nuclear (filaments intermedis-matriu nuclear, FI-MN).

S'ha analitzat la localització de la p55 en l'estructura FI-MN de les cèl.lules NRK (en fase G_1 i S), en les cèl.lules HeLa i les cèl.lules 3T3 NIH. El resultat ha estat en tots els casos una forta i específica tinció nuclear, es a dir en l'estructura de matriu nuclear (fig.57).

Figura 57.- Immunolocalització de la p55 en l'estructura FI-MN de distintes cèl.lules en cultiu, emprant l'anticòs anti-p55 (dilució 1/500). (a) Cèl.lules NRK en fase S, (b) cèl.lules NRK en fase G₁, (c) cèl.lules HeLa i (c) cèl.lules 3T3 NIH. Imatge en contrast de fase (à, d').













Dels resultats de la figura 57, és interessant remarcar dues observacions:

1- No s'observa cap diferència en la localització de la p55 entre les cèl.lules NRK en fase S i en fase G_1 , després d'obtenir l'estructura FI-MN (fig. 57a i 57b). Aquest resultat és contrari a l'observat en les cèl.lules NRK senceres en fase S i en fase G_1 , en les quals es detectava la p55 al nucli solament en la fase S, es a dir la localització depenia de la fase del cicle cel.lular (fig.43 i 44).

Hi han evidències que indiquen que amb l'obtenció de l'estructura FI-MN s'identifiquen proteïnes de la matriu nuclear difícils de detectar quan estan presents tots els components nuclears (Fey E.G. i al. 1985). Aquestes evidències explicarien els resultats obtinguts en la figura 57a i 57b. I permeten suggerir que la p55 es troba present tant en les cèl.lules NRK en fase S com en G₁, però només és detecta en les cèl.lules NRK en fase S, degut a canvis conformacionals de proteïnes en els nucli.

Per altra banda, la presència de la p55, tant en cèl.lules NRK en fase S com en fase G_1 , explicaria els resultats de l'apartat 4.2.5, figura 48, en la qual es detectava per immunotransferència la proteïna p55, sense cap diferència, tant en les cèl.lules NRK en fase G_1 com en fase S.

2- En les cèl.lules HeLa (fig.57c), després d'obtenir l'estructura FI-MN, el marcatge amb l'anticòs anti-p55 sols es localitza en el nucli, no s'observa marcatge citoplasmàtic. Aquesta observació descarta la hipòtesi descrita a partir del resultat obtingut en la immunolocalització de la p55 en les cèl.lules HeLa senceres, en les que es detectava un lleuger marcatge citoplasmàtic i aquest s'associava al marcatge de la citoqueratina nº8 per part de l'anticòs anti-p55 (fig.53a). Aquest resultat ens indica que el marcatge citoplasmàtic observat en la figura 43d no és degut a la detecció de la citoqueratina nº 8, ja que aquesta es troba totalment present en l'estructura FI-MN, si no a la reacció inespecífica de l'anticòs amb algunes proteïnes solubles.

4.3.10.- ANÀLISI DE LA LOCALITZACIÓ DE LA P55 EN LES CÈL.LULES NRK MITJANÇANT MICROSCOPIA CONFOCAL.

Tal com s'ha esmentat a l'apartat de material i mètodes, la utilització de la microscopia confocal permet analitzar el marcatge immunocitoquímic que s'observa en un mateix pla en la microscopia òptica convencional, desdoblat en distins plans successius de 1 μ m de gruix i obtenir finalment la composició tridimensional del marcatge.

S'han analitzat mitjançant microscopia confocal, cèl.lules NRK en fase S incubades amb l'anticòs anti-p55 i el resultat obtingut ha estat el que presenta la figura 58. S'observa que la p55 es troba distribuïda per tot el nucli de forma no homogènia, hi han zones més denses que altres, però no es defineix cap estructura.

Aquest resultat indica clarament que la reacció amb l'anticòs anti-p55, és intranuclear i dona més informació respecte a la distribució, ja que per microscopia òptica s'observava un marcatge totalment homogeni per tot el nucli (fig.43).

4.3.11.- IMMUNOLOCALITZACIÓ DE LA P55 EN CÈL.LULES NRK PER MICROSCOPIA ELECTRÒNICA.

Per tal d'observar en detall la distribució de la p55 en el nucli de les cèl.lules NRK, s'han realitzat estudis immunocitoquímics emprant el mètode de pre-inclusió (apartat 3.14.2.2), en cèl.lules NRK en fase G_1 i en fase S, després d'haver purificat *in situ* l'estructura filaments intermedis-matriu nuclear (FI-MN) tal com s'ha descrit a l'apartat 3.2.2.2.

El resultat ha estat una distribució dispersa per tot el nucli (fig.59). Malgrat l'augment de la figura 59 no es suficientment gran per veure definida l'estructura filamentosa que forma part de la matriu nuclear, no sembla que la p55 estigui associada exclusivament a aquests filaments. També s'observa que no hi ha diferència de marcatge en l'estructura FI-MN de les cèl.lules NRK en fase G₁ o fase S (fig.59a i 59b). Aquesta observació s'ha comprovat calculant el nombre de partícules d'or per 0.25 μ m² en els dos tipus de cèl.lules i el resultat representat en la taula II, indica que no hi han diferències significatives entre el marcatge de cèl.lules NRK en fase G₁ i fase S.

Figura 58 - Anàlisi de la localització de la p55, mitjançant microscopia confocal, en cèl lules NRK en fase S (a) Plans successius de 1 μ m, d'una mateixa cèl lula (b) composició tridimensional dels marcatge analitzat en distins plans successius en una cèl lula L'anticòs anti-p55 s'ha emprat diluit 1/400



а



d

5. DISCUSSIÓ

.

.

•

Tal com s'ha descrit a la introducció la matriu nuclear és l'estructura a la qual s'associen els complexes multienzimàtics replicatius o replisomes, necessaris per a la síntesi d'ADN, i per tant és on es produeix el procés de replicació de l'ADN. Aquest esdeveniment és consequència del conjunt de senyals i canvis desencadenats durant el període pre-replicatiu de l'activació proliferativa dels hepatòcits, englobat en tres fases seqüencialment separades però estretament relacionades i confluents en el procés de síntesi de l'ADN i posterior progressió del cicle cel.lular.

Tenint en compte la sequència d'esdeveniments que activen la proliferació cel.lular però centrant-nos en la matriu nuclear, cal destacar que, la importància dels esdeveniments associats a la matriu nuclear a portat a l'estudi de la composició d'aquesta estructura. Les dades obtingudes fins l'actualitat indiquen que la matriu nuclear està formada per un conjunt de proteïnes altament insolubles composades per les làmines nuclears, proteïnes que formen una xarxa fibrosa delimitant internament el nucli, i per altra banda per residus del complex por nuclear i una xarxa interna fibro-granular.

Així com les làmines nuclears (components majoritaris de la matriu nuclear), han estat àmpliament caracteritzades, no succeeix el mateix amb la xarxa interna fibrogranular, de la qual es té escassa informació del paper que desenvolupa durant les diferents fases del cicle cel.lular.

L'objectiu inicial d'aquest treball ha estat la identificació i caracterització de proteïnes de la matriu nuclear implicades en el desencadenament de la síntesi d'ADN.

Amb aquesta finalitat, s'ha estudiat:

a) Els canvis en la composició proteica de la matriu nuclear durant la fase prereplicativa i replicativa de la proliferació cel.lular dels hepatòcits.

b) La identificació i caracterització de les proteïnes que varien durant el periòde esmentat.

c) Detecció d'aquestes proteïnes en altres models cel.lulars.

Caracterització de proteïnes de la matriu nuclear durant la fase replicativa de l'activació proliferativa de fetge de rata:

Identificació de la p55.

Els resultats exposats inicialment, mostren l'anàlisi comparatiu de les proteïnes de la matriu nuclear dels hepatòcits normals (quiescents) i dels hepatòcits 24 h regenerants, període en que es troben en la fase de màxima síntesi d'ADN. El resultat d'aquest anàlisi ens indica l'increment d'una proteïna de 55 KDa (p55) en els hepatòcits 24 h regenerants.

El fet de que l'increment de la p55, identificada en la matriu nuclear, coincidís amb l'inici de la síntesi de l'ADN, suggeria que podria ésser una proteïna implicada en el desencadenament de la replicació. Així doncs, resultava interessant caracteritzar la p55, per tal d'esbrinar llur funció, regulació, així com per aportar més informació sobre la composició de les proteïnes que formen la matriu nuclear, durant la fase replicativa del cicle cel.lular.

Els estudis immunocitoquímics realitzats en teixit hepàtic normal i i 24 h regenerant, emprant l'anticòs policional anti-p55, obtingut immunitzant conills amb la proteïna purificada, mostren que la p55 es troba localitzada en el nucli dels hepatòcits 24 h regenerants.

Els resultats immunocitoquímics coincideixen amb els obtinguts en l'anàlisi per immunotransferència realitzat amb distintes subfraccions cel.lulars de fetge normal i 24 h regenerants, emprant l'anticòs anti-p55. La p55 també es troba localitzada exclusivament en el nucli i dins de les diferents subfraccions nuclears concretament en la fracció de matriu nuclear.

Cal destacar que l'increment de la p55 en la fracció de matriu nuclear durant la fase replicativa no és degut a la translocació de la p55 existent en altres compartiments cel.lulars, ja que, en teixit hepàtic normal la p55 també es troba localitzada en el nucli però a nivells significativament inferiors.

Conegut el patró electroforètic tant en una com en dues dimensions, l'anàlisi d'immunotransferència i la localització intracel.lular de la p55; els posteriors estudis han estat centrats en la regulació de l'expressió de la p55 i en la comprovar la correlació de l'increment de la p55 amb la síntesi d'ADN.

S'ha observat que la p55 malgrat incrementar paral.lelament amb l'inici de la síntesi d'ADN, la correlació no és exacta. Els estudis de correlació entre l'expessió de la p55 i la incorporació de timidina en les cèl.lules hepàtiques activades a

proliferar indiquen que algunes cèl.lules amb alt contingut de p55 no sintetitzen ADN i a l'inrevés. Per altra banda, els resultats obtinguts a l'estudiar la p55 en cèl.lules hepàtiques en mitosi, mostren la presència de la p55 localitzada al voltant dels cromosomes i en ocasions sembla estar associada al fus mitòtic, suggerint la possible implicació de la p55 durant la mitosi. Aquesta hipòtesi no es contraria als resultats obtinguts per immunotransferència de mostres de matriu nuclear de distintes hores de regeneració, emprant l'anticòs anti-p55, ja que la p55 assoleix l'increment màxim a les 24 h de regeneració hepàtica però aquest es manté a les 28 h, temps de regeneració en que es dona el màxim de mitosi. Per tant podríem dir, que la p55 apareix paral.lelament a la síntesi d'ADN però podria desenvolupar un paper important en etapes posteriors del cicle cel.lular, com és la mitosi.

Els experiments realitzats no són suficients per reforçar aquesta hipòtesi, però existeixen evidències experimentals que indiquen la importancia de la matriu nuclear durant la mitosi, com són:

- els treballs descrits per Chaly N. i al. (1984), on es descriuen els canvis de distribució d'alguns antígens de la matriu nuclear durant la mitosi. Mitjançant anticossos monoclonals s'observa que proteïnes específiques de la matriu nuclear, associades a la membrana nuclear o a les làmines nuclears, es troben disperses pels citoplasma durant la mitosi. En canvi altres antigens localitzats de forma dispersa per la xarxa interna de la matriu nuclear durant la interfase, es troben associades al voltant dels cromosomes o als pols del fus mitòtic durant la mitosi, suggerint llur possible funció en l'ordenació espaial dels cromosomes. Aquestes evidències s'acoblen perfectament a les observades amb la p55 en les cèl.lules hepàtiques en mitosi.

- Henry S.M. i col.laboradors (1983), descriuen un increment de fosforil.lació de proteïnes específiques de la matriu nuclear durant la fase pre-mitòtica, i l'associen als canvis nuclears que desencadenen la posterior fase mitòtica, com són entre altres, la disolució de la membrana i làmines nuclears. Esdeveniments descrits depenents de processos de fosforil.lació i defosforil.lació.

Resulta interessant senyalar que en el patró de proteïnes específicament fosforil.lades durant la mitosi, descrites en aquest treball, apareix una proteïna de 55 KDa que podría ésser la mateixa que es descriu en el nostre treball.

- també s'observa en les evidències descrites per Rapco D.G. i al. (1983), que durant les primeres fases de la mitosi, quan la membrana i làmines nuclears

desapareixen, la xarxa dels citoesquelet i la matriu nuclear, apareix com una xarxa contínua, que sembla ésser responsable del moviment dels cromosomes abans de la formació del fus mitòtic.

- finalment cal considerar les evidències experimentals que indiquen que la composició de la matriu nuclear és similar a la composició de l'esquelet cromosòmic encarregat, durant la mitosi, de la condensació dels cromosomes (Pieck A.C.M. i al. 1985, 1987). S'han descrit proteïnes comuns entre la matriu nuclear i l'esquelet cromosòmic, concretament dues proteïnes de 47 i 53 KDa (Pieck A.C.M. i al. 1987). Aquestes proteïnes es consideren com components essencials de les dues estructures, a les quals s'uneix l'ADN tant durant la interfase com durant la mitosi.

Els estudis d'unió d'ADN marcat, a proteïnes de la matriu nuclear 24 h regenerants, ens han indicat que la p55 no s'uneix específicament a l'ADN. Així doncs, la p55 no forma part de les regions SARs, regions de la matriu nuclear que s'uneixen específicament a l'ADN. No obstant, no es pot descartar la implicació de la p55 durant la mitosi, donades les dades que existeixen respecte el paper que desenvolupen les proteïnes de la matriu nuclear durant la fase mitòtica, a més a més, de la correlació observada entre la p55 i els treballs descrits anteriorment.

Caracterització de la p55.

L'anàlisi de la seqüència parcial d'aminoàcids desvetlla l'alta homologia de la p55 amb la queratina nº 8.

Les queratines són proteïnes que han estat àmpliament estudiades. Formen part de la família multigènica de filaments intermedis (FI), components del citoesquelet citoplasmàtic.

Els IF es classifiquen, segons les diferències de seqüència que presenten, en sis tipus (Lazarides, E. 1980; Steinert, P.M. 1981; Steinert, P.M. 1985; Lazarides, E. 1982; Steinert, P.M. i al. 1988, Lendahl U. i al. 1990):

- IF de tipus I: formats per queratines acídiques (40-60 KDa) presents en teíxits cèl.lules epitelials;

- IF de tipus II: formats per queratines neutres o bàsiques (50-70 KDa) també presents en teixits o cèl.lules epitelials;
- If de tipus III: formats bàsicament per tres proteïnes, la vimentina (54 KDa) present en cèl.lules mesenquimals i molts cultius cel.lulars, la desmina (53 KDa) típica de cèl.lules musculars, i per la proteïna acídica fibrilar glial (51 KDa) present en cèl.lules glials i astròcits;
- IF de tipus IV: formats per tres neurofilaments típics del sistema nerviós, NF-L (60-70 KDa), NF-M (105-110), NF-H (135-150) i possiblement una proteïna de 57 KDa localitzada a la perifèria de les neurones;
- IF de tipus V: sembla ésser el grup original ancestralment dels filament intermedis (Franke W.W. 1987). Està format per les llàmines nuclears, 4 proteïnes de 60-70 KDa localitzades a la part interna de la membrana nuclear i un dels components del nucleoesquelet (Franke W.W., 1987; Aebi i al., 1986; Gerace L., 1986);
- IF de tipus VI: darrer grup recentment identificat, el qual s'expressa específicament en les cèl.lules primordials neuroepitelials (Lendahl U. i al. 1990).

Els filaments intermedis es caracteritzen per la seva estructura secundaria formada per un domini central α -helical rod altament conservat entre els diferents tipus de IF i entre les distintes espècies. Està format per 310-315 aminoàcids en els filaments intermedis de tipus I al IV i per 356 en els de tipus V. Aquest domini central està flanquejat pels extrems amino- i carboxi-terminal. Els dominis terminals són els que defineixen la diversitat funcional dels filaments intermedis, ja que presenten distintes seqüències d'aminoàcids, grandària i propietats químiques, entre els diferents tipus de IF i les distintes espècies (Fig.60) (Steinert, P.M. 1982; Steinert, P.M. 1985; Steinert i al. 1985a; Steinert i al. 1988)



Figura 60.- Estructura dels filaments intermedis. Totes les cadenes proteiques de filaments intermedis contenen un domini central comú (α -*helix rod domain*), flanquejat per dominis terminals variables en cadascun dels tipus de IF. Aquests dominis terminals estan dividits en subdominis basats en l'homologia (H), variabilitat (V) i posició final (E), que presenten les seqüències.

Una altra característica general dels filaments intermedis és llur fosforil.lació, observada tant *in vivo* com *in vitro* (Lazarides, E. 1982) i detectada, majoritàriament en els residus de serina (Steinert i al. 1982a). La fosforil.lació dels filaments intermedis s'associa a la fase mitòtica. Durant la mitosi, te lloc la reorganització i desassamblatge dels filaments intermedis lligada a un procés d'hiperfosforil.lació dels mateixos (Fey i al. 1983; Celis i al. 1983; Chou i al. 1989). Cal esmentar que el desassamblatge dels filaments intermedis de tipus V, les llàmines nuclears, també s'ha descrit associat a una hiperfosforil.lació de les mateixes (Ottaviano i al. 1985; Gerace i al. 1980; Heald i al. 1990). Així doncs, els processos de fosforil.lació *i* desfosforil.lació regularien els canvis conformacionals dels sistemes de filaments intermedis citoplasmàtics i nuclears durant la mitosi.

Respecte a les quinases que intervenen en la fosforil.lació, s'han identificat les proteïnes quinases A i C (Ando i al. 1989; Geisler i al. 1989). Treballs recents descriuen la fosforil.lació dels filaments intermedis citoplasmàtics i nuclears deguda

a la quinasa p34^{cdc2} (Peter i al. 1990; Ward i al. 1990; Chou i al. 1990, Enoch i al. 1991, Peter i al. 1991). La intervenció d'aquests distints tipus de quinases no és incompatible ja que, en els filaments de vimentina s'ha demostrat que els llocs de fosforil.lació per la p34^{cdc2} són diferents dels llocs de fosforil.lació per les proteïnes quinases A i C (Chou i al. 1990).

En quan a l'organització intracel.lular dels filaments intermedis, aquests estan connectats amb el nucli i s'estenen a través del citoplasma fins la membrana plasmàtica (Wang E. i al. 1985). Els filaments de vimentina i desmina s'uneixen a través de l'extrem amino-terminal directament a una proteïna de la membrana plasmàtica, l'anquirina (Georgatos i al. 1985; Georgatos i al. 1987a) i a través de l'extrem carboxi-terminal directament a la llàmina B (Georgatos i al. 1987; Georgatos i al. 1987a). Les queratines de teixits epitelials estratificats s'han vist associades a través de l'extrem amino-terminal a les desmoplaquines, proteïnes components dels desmosomes (Kartenbeck i al. 1984).

Les citoqueratines són el grup més ampli de filament intermedis. Està constituït per uns 20 polipèptids distins descrits en teixit humà per Moll i al. 1982, i per un nombre similar amb les mateixos patrons, en altres espècies de mamífers (Franke i al. 1981; Schiller i al. 1982; Tseng i al. 1982). Els 20 polipèptids descrits han estan totalment caracteritzats electroforèticament en gels bidimensionals (fig. 61). A partir d'aquesta caracterització s'ha pogut diferenciar els pesos moleculars dels polipèptids que formen cadascun dels dos tipus de citoqueratines i els seus punts isoelèctrics (referits a polipèptids solubilitzats en tampons que contenen Urea 9.5 M).

Figura 61.- Classificació dels dos tipus de polipèptids de citoqueratines, segons llur pes molecular (determinat en gels SDS-poliacrilamida) i punt isoelèctric (determinat en gels bidimensionals IEF i NEPHGE). Les distintes citoqueratines s'han designat per números. Les sèries de punts horitzontals, representen les distintes isoformes d'un mateix polipèptid. Els punts més grans, indiquen la forma majoritària que normalment és la més bàsica i no està fosforil.Iada. Els punts buits, són isoformes que no s'han trobat en tots els tipus cel.lulars. PGK: 3-fosfoglicerol quinasa. BSA: albúmina de sèrum boví. A: α -actina de conill. V: vimentina humana.

Els filaments de citoqueratines es caracteritzen per la seva composició heteropolimèrica (tetra heterodímers). Es requereix un dímer de queratina tipus I i un altre dímer de queratina tipus II per copolimeritzar i formar filaments, tant *in vivo* con *in vitro* (Franke i al. 1981; Quinlan i al. 1984; Steinert P.M. 1990; Hatzfeld i al. 1990). En contrast, els filaments intermedis de tipus III formen generalment homopolímers, encara que s'ha descrit la seva capacitat facultativa per formar heteropolímers amb altres cadenes de tipus III (Steinert i al. 1981a; Quinlan i al. 1982; Quinlan i al. 1983).

La presència d'un o més tipus de filaments intermedis és molt específica en els diferents tipus cel.lulars i es conserva en les distintes espècies.

Els filaments intermedis del teixit hepàtic estan formats, quassi exclusivament per dos citoqueratines, la citoqueratina nº 8 de tipus II i la citoqueratina nº 18 de tipus I, de 55 i 49 KDa de pes molecular i 6.4 i 5.4 punt isoelèctric, respectivament (Franke i al. 1981a). Les dues citoqueratines copolimeritzen formant filaments heteropolímers. L'anàlisi electroforètic d'ambdues queratines indica que estan formades per diferents isoformes (Quinlan i al. 1984) les quals representen diferents graus de fosforil.lació, tal com indiquen els estudis de fosforil.lació descrits per Franke i al. 1981.

L'anàlisi comparatiu dels resultats obtinguts en l'estudi de la p55 identificada en teixit hepàtic regenerant, amb les dades que es tenen sobre les queratines, en resum ens indica que la p55 presenta un pes molecular, punt isoelèctric, patró electrofòretic, patró de fosforil.lació, seqüència parcial d'aminoàcids, igual que la citoqueratina nº8. Aquestes evidències queden reforçades pel fet de que la queratina nº8 és una de les queratines majoritàries dels fetge.

La p55 presenta un pes molecular de 55 KDa. A través del patró electroforètic en dues dimensions s'observa la p55 constituïda per una forma majoritària amb un punt isoelèctric de 6.4 i distintes isoformes d'igual pes molecular corresponents a diferents estats de fosforil.lació de la p55 (patró idèntic al descrit per a la citoqueratina nº8). Els diferents estats de fosforil.lació, s'han comprovat amb els assajos de fosforil.lació *in vitro* realitzats amb les mostres de matriu nuclear 24 h regenerant. Els resultats d'aquests assaigs ens mostren que la p55 està formada per diferents isoformes fosforil.lacis, tal com es deduía de l'anàlisi proteic per comassie blue. D'aquests assaigs també es desprèn que la p55 no presenta canvis en llur estat fosforil.lat, durant la fase S respecte la fase quiescent. Ja que,

l'augment de fosforil.lació observat en les mostres de matriu nuclear 24h regenerants és degut, tal com s'ha indicat en l'apartat de resultats, a l'increment de proteïna p55.

Els estudis inicials realitzats per tal d'esbrinar quins residus de la p55 es fosforil.len, indiquen que la fosforil.lació de la p55 es dona en els residus de serina. Aquesta dada concorda amb els estudis de fosforil.lació de la queratina nº 8, i de les queratines en general, en els quals es descriu una fosforil.lació majoritària en els residus de serina.

També s'ha observat que l'autofosforil.lació de la p55 durant la fase S, té lloc a través de quinases independents de Ca²⁺, CaM i AMPc. No es tenen suficients dades experimentals per poder suggerir quines quinases intervenen.

Aquests fets no es desdiuen amb l'estat de fosforil.lació de les queratines durant el cicle cel.lular, però per acabar d'establir una perfecta correlació entre els estudis de fosforil.lació de la p55 i els de la queratina nº8, hagués resultat interessant realitzar experiments de fosforil.lació *in vivo* durant la fase mitòtica, per tal de veure si es dona una hiperfosforil.lació de les isoformes fosforil.lades de la p55. Tal com s'ha esmentat, l'estructura fribrilar formada per les queratines sofreix una desorganització i desassamblatge durant la fase mitòtica, mitjançant fosforil.lacions associades a la proteïna quinasa C i cdc2, i localitzades en l'extrem amino terminal no helicoïdal (Chou Y. i al. 1989).

Respecte a la regulació de l'expressió de la p55 durant la fase pre-replicativa fins el període de màxima síntesi d'ADN, s'observa que és depenent de la presència de Ca²⁺. La utilització d'antogonistes α -adrenèrgics, els quals inhibeixen l'alliberament de Ca²⁺ dels compartiments intracel.lulars, mostren una disminució dels nivells de p55, quasi fins nivells comparables als observats en la matriu nuclear dels hepatòcits normals (no regenerants). Les proves realitzades amb antagonistes β -adrenèrgics, inhibidors d'AMPc via adenil ciclasa, indiquen que l'expressió de la p55 no està regulada pels nivells d'AMPc.

L'anticòs obtingut contra la p55 també sembla reafirmar l'homologia entre la p55 i la citoqueratina nº 8. Els estudis de immunotransferència de mostres de matriu nuclear normal i 24 h regenerant, i mostres de filaments intermedis en les quals es troba enriquida la queratina nº8 i nº 18, tipíques dels fetge, realitzats emprant l'anticòs anti-p55 i anti-queratines, ens mostren la identificació d'una mateixa banda de 55 KDa en totes les fraccions i amb ambdós anticossos. Es a dir, l'anticos reacciona contra la la proteïna de 55 KDa considerada la queratina nº 8. Les característiques observades fins aquest punt entre la p55 i la citoqueratina, semblen indicar una clara homologia entre ambdues proteïnes, i condueixen a la conclusió de que la p55 és tracta de la citoqueratina nº 8, si no fos pels resultats immunocitoquímics realitzats en teixit hepàtic normal i 24 h regenerant, emprant l'anticòs anti p55.

Els resultats dels estudis immunocitoquímics, tant per microscopía òptica com electrònica, mostren la localització específica de la p55 exclusivament **al nucli** dels hepàtòcits, de forma **dispersa** i incrementada en els hepatòcits 24 h regenerants. En canvi, tal com s'ha descrit anteriorment les citoqueratines són proteïnes que formen una **xarxa filamentosa** de localització **citoplasmàtica**.

La polimerització dels filaments de queratina, i dels filaments intermedis en general, és un procés espontani, que te lloc en absència de factors catalítics, proteïnes auxiliars o fonts d'energia exògenes (Renner i al. 1981, Zackroff i al. 1979). Aquest procés de polimerització s'ha descrit associat a regions del domini altament conservat, α -helicoïdal, entre les quals es formen fortes unions no-covalents que confereixen als filaments intermedis una estructura insoluble i molt estable.

Aquestes característiques dels filaments intermedis representen un altre punt de discrepància amb la p55. Segons l'anàlisi de la seqüència parcial d'aminoàcids de la p55, s'han obtingut 32 aminoàcids, dels quals 22 es troben a la regió 1B i els restans 10 aminoàcids en la regió 2B, de l' α -helix. Es a dir els aminoàcids obtinguts es troben dins del domini altament conservat α -helicoïdal dels filaments intermedis, composat per 310 aminoàcids en els filaments intermedis citoplasmàtics i 356 aminoàcids en les làmines nuclears, i presenten una homologia d'un 70-90% entre les seqüències d'aquest domini de distintes espècies. A més, els 10 aminoàcids de la p55, localitzats en la regió 2B, formen part de l'extrem carboxi-terminal del domini α -helicoïdal. Termini de l' α -helix que junt amb el domini carboxi-terminal de la cadena estan associats, segons Albers K. i col.laboradors (1989) a l'assamblatge de les queratines, ja que mutacions en aquest extrem produeixen agregats citoplasmàtics i disrupció de la xarxa fibrilar endògena de queratines.

Aquestes observacions ens indiquen la següent qüestió:

Si la p55 presenta el domini α -helicoïdal i concretament la regió carboxi-terminal d'aquest domini responsable de l'assamblatge en forma de filaments, per què la p55 no forma filaments?
S'ha d'esmentar que malgrat les evidències descrites anteriorment respecte a les regions responsables de l'assamblatge en forma de filaments, no està tant clar que aquest procés depengui exclusivament de les regions carboxi-terminals descrites. Hi han diferencies segons el tipus de filament intermedi de que es tracti. En la vimentina s'han associat fosforil.lacions *in vivo* durant la mitosi (fase en la que te lloc el desassamblatge dels filaments), exclusivament en l'extrem amino-terminal no helicoïdal, en canvi en la desmina les fosforil.lacions s'associen tant a l'extrem amino- com carboxi-terminal no-helicoïdals (Chou Y. i al. 1989).

Així doncs, malgrat la p55 sembla presentar el domini α -helix i una alta homologia amb la citoqueratina nº 8, les discrepàncies observades porten a suggerir sí la p55 es tracta d'una proteïna de la matriu nuclear distinta a la queratina nº 8 però amb característiques estructurals semblants.

Fins ara hem estat analitzant les proteïnes, p55 i queratina nº 8, sense valorar excessivament que provenen de dues fraccions distintes, la matriu nuclear i els filaments intermedis, respectivament. Que l'origen d'obtenció de les dues proteïnes sigui distint no ha estat una característica suficient per considerar la p55 i la citoqueratina nº 8 proteïnes diferents, ja que, tal con s'ha descrit en la introducció i en l'apartat anterior, la matriu nuclear i els filaments intermedis són dues fraccions cel.lulars distintes però estretament relacionades tant bioquímica com físicament. La matriu nuclear s'ha definit, com una fracció fibrogranular específicament nuclear que s'obté a l'extreure la cromatina i la major part de proteïnes solubles del nucli. Per aquestes característiques es defineix l'estructura obtinguda com, matriu nuclear o nucleoesquelet. També s'ha descrit que la matriu nuclear o nucleoesquelet forma una xarxa continua a través de la membrana nuclear amb els filaments intermedis, components del citoesquelet cel.lular. Aquesta xarxa continua presenta un punt d'unió molt ben definit, les làmines nuclears, proteïnes nuclears que també es defineixen com el cinquè tipus de filaments intermedis, i segons treballs descrits per Georgatos S.D. i al. (1985, 1987, 1987a, 1987b) són el lloc d'unió de l'extrem carboxi-terminal dels filaments intermedis, concretament la làmina B. Aquestes evidències indiquen l'estreta relació que existeix entre els components de la matriu nuclear i els filaments intermedis i per tant s'entén que sigui difícil la purificació de les dues fraccions individualment.

En termes de purificació, cal esmentar que abans de definir-se les làmines nuclears com a punt d'unió de filaments intermedis i matriu nuclear, i malgrat els treballs descrits per Penman i col.laboradors, els quals sempre han descrit els filaments intermedis, components dels citoesquelet, i la matriu nuclear o nucleoesquelet com una estructura cel.lular continua; els treballs presentats sobre filaments intermedis i matriu nuclear, descriuen mètodes de purificació de cadascuna d'aquestes dues fraccions com mètodes independents. Es a dir, no tenen en compte que, a l'emprar els mètodes descrits per a la purificació de filaments intermedis és coopurifiqui l'estructura de matriu nuclear i a l'inrevés, emprant els mètodes per a purificar la matriu nuclear es coopurifiquin els filaments intermedis, donada l'estreta relació que presenten.

Així doncs, pel fet d'emprar mètodes descrits per obtenir fraccions distintes, no podem considerar la p55 de la matriu nuclear i la citoqueratina nº 8 dels filaments intermedis proteïnes distintes, ni podem considerar que els components purificats siguin exclusivament específics de cadascuna d'aquestes fraccions.

Aquests fets estan recolzats pels resultats obtinguts en els estudis mitjançant immunotransferència de les fraccions de matriu nuclear, filaments intermedis, emprant l'anticòs anti-queratina. S'observa que la citoqueratina nº 8 es troba tant en la fracció de filaments intermedis com en la matriu nuclear, encara que en aquesta última està menys representada, però segurament aquesta diferència es deguda a l'eficiència del mètode de purificació emprat. S'ha de tenir en compte que la matriu nuclear s'obté després de purificar els nuclis per ultracentrifugació en gradients de sacarosa i en aquest pas té lloc una pèrdua de filaments intermedis. Encara que hi ha treballs que descriuen el col.lapsament dels filaments intermedis al voltant dels nuclis al purificar aquests per ultracentrifugació (Staufenbiel M. i al. 1982), s'ha de remarcar que els filaments intermedis també es troben ancorats a la membrana plàsmatica per l'extrem amino-terminal. En el procés de purificació emprat no es dona cap pas específic per la desunió dels filaments de la membrana plasmàtica i per tant en la resta de membrana plasmàtica també deuen quedar associats filaments intermedis.

Tornant a la caracterització de la p55, i concretament al principal punt de discrepància al considerar la p55 homòloga a la citoqueratina nº 8, com és la localització cel.lular d'ambdues proteïnes, s'observa que la majoria dels treballs que descriuen la localització immunocitoquímica dels filaments intermedis utilitzen altres tractaments de mostres i mètodes de fixació. Aquests són majoritàriament, la utilització de mostres congelades i post-fixades amb metanol o acetona/metanol. Els estudis immunocitoquímics inicials presentats en seccions de fetge normal i

181

regenerant, emprant l'anticòs anti-p55, es varen realitzar mitjançant fixació de les mostres *in vivo* amb paraformaldehid i inclusió en parafina, per tal d'obtenir una bona preservació de l'estructura.

Per tant aquesta diferència de metodologia plantejava la qüestió de, si els mètodes emprats per la caracterització immunocitoquímica de la p55 podien aportat alguna diferència o artefacte. Però tal com s'observa en els resultats obtinguts a l'emprar els mateixos mètodes descrits en els estudis dels filaments intermedis i la utilització d'anticossos contra queratines, paral.lelament amb l'anti-p55, s'observa que la p55 continua presentant una localització nuclear dispersa i les queratines una localització citoplasmàtica. A més, aquests resultats es confirmen i indiquen que el tipus de fixació no afecta la reacció immunològica, a l'emprar seccions de teixit congelat sense fixar i analitzant els dos tipus d'anticossos.

Així doncs els mètodes emprats en els anàlisi immunocitoquímics

no són responsables de la distinta localització de la p55 i la citoqueratina nº 8.

Una altra güestió que es planteja al realitzar l'anàlisi mitjançant immunotransfrència de les mostres matriu nuclear, filaments intermedis i les proteïnes purificades p55 i citoqueratina nº 8, emprant els anticossos anti-p55 i anti-queratines, és: perquè l'anticòs anti-p55 reconeix la queratina nº 8 per immunotransferència i no la reconeix per immunocitoquímica?. En aquests estudis s'observa que l'anticòs antip55 reconeix la p55 en les mostres de matriu nuclear, filaments intermedis i les dues proteïnes purificades, a l'igual que si s'utilitza l'anticòs anti-queratines. Aquest reconeix la mateixa banda en les mateixes mostres. Per tant mitjançant immunotransferència es pot dir que els dos anticossos reconeixen la mateixa proteïna, la queratina nº 8. En canvi en l'anàlisi immunocitoquímic sembla que cadascun dels anticossos reconeguin proteïnes diferents. Suposant que fos així, que en realitat reconeguessin proteïnes diferents i donats els resultats obtinguts per immunotransferència, seria lògic trobar recció nuclear per part de l'anticòs antiqueratina, i reacció citoplasmàtica per part de l'anticòs anti-p55. Aquest resultat no s'ha observat, per tant, i deixant de banda especulacions, arriben a la conclusió que les diferències observades entre la p55 i la gueratina nº 8 venen donades per l'anticòs anti-p55. Ja que els resultats observats a l'emprar l'anticòs anti-gueratines es confirmen amb els treballs descrits en la bibliografia, i en aquests mai s'ha trobat reacció nuclear amb anticossos contra la citoqueratina nº 8.

Així doncs, si el problema esdevé de l'anticòs anti-p55, la resposta a la qüestió plantejada podria ésser, que l'anticòs anti-p55 no reconeix la queratina nº 8 perquè no funciona per immunocitoquímica i que la proteïna nuclear amb la que reacciona

és distinta a la p55 reconeguda per immunotransferència.

Aquesta resposta és lògica si es té en compte que l'anticòs anti-p55 s'ha obtingut a partir de la proteïna p55 purificada tallant la banda corresponent de gels SDSpoliacrilamida. Es a dir s'obté a partir de la proteïna desnaturalitzada. Els anticossos obtinguts per aquest mètode en ocasions no reconeixen les proteïnes en estat natiu, com seria el cas dels estudis immunocitoquímics.

Els estudis de pre-absorció de l'anticòs anti-p55 amb l'antigen p55 ens indiquen que aquest no és el cas de l'anticòs obtingut. En els experiments immunocitoquímics realitzats en seccions de fetge 24 h regenerant i emprant l'anticòs anti-p55 amb l'antigen p55, s'observa que la reacció nuclear desapareix, indican que la reacció nuclear és específica contra la p55 purificada desnaturalitzada. Aquesta observació ens condueix a plantejar-nos que potser la p55 purificada presenta alguna proteïna minoritària, no detectada en els gels de dues dimensions, en els quals sols s'observava la proteïna definida com la queratina nº 8, i que en la producció d'anticossos les IgGs obtingudes han estat contra aquesta proteïna minoritària de localització específica nuclear.

Aquesta possibilitat, explica que les IgGs contra aquesta proteïna minoritària de l'anticòs anti-p55 són les que donen la reacció nuclear per immunocitoquímica però per altra banda. s'observa que aquestes lgGs no funcionen per immunotransferència, ja que en la immunotransferència en dues dimensions de la p55 purificada, no s'observa marcatge de cap proteïna minoritària, solament s'observa marcatge de la proteïna homòloga a la queratina nº 8. En resum aquesta possibilitat indicaria que l'anticòs anti-p55 presenta IgGs contra una proteïna minoritària que funcionen molt bé per immunocitoquímica però no per immunotransferència i per altra banda, presenta IgGs contra la queratina nº 8 o una proteïna homòloga a aquesta, que funcionen molt bé per immunotransferència però no per immunocitoquímica. Per tant, no es pot descartar aquesta possibilitat, però s'ha de tenir present que és una possibilitat poc probable. I encara menys provable, al considerar que l'anticòs anti-p55 s'ha obtingut a partir de dos conills distins i ambdós presenten el mateix patró de reacció.

Dels resultats obtinguts en la caracterització de la p55 en el fetge, no es tenen evidències contundents que recolzin la baixa probabilitat que presenta que un anticòs, en aquest cas l'anticòs anti-p55, reconegui proteïnes distintes segons la tècnica emprada o l'estat de les proteïnes (en estat natiu o desnaturalitzat), però ens podem referir a resultats contraris a aquesta hipòtesi. S'ha de considerar que la reacció detectada en el nucli dels hepatòcits presenta un increment en les mostres de 24 h de regeneració respecte a les normals, comparable a l'observat

en les electroforesi i immunotransferències de les mostres de matriu nuclear normal i 24 h regenerant. Aquest fet recolza la idea de que la proteïna detectada, en qualsevol de les tècniques, és la mateixa.

Els resultats obtinguts en les immunotransferències realitzades emprant l'anticòs anti-p55 pre-absorbit amb mostres de matriu nuclear 24 h regenerants i filaments intermedis, es a dir amb mostres que contenen les proteïnes p55 i citoqueratina nº 8 en estat natiu, mostren l'absència de reacció de l'anticòs. Aquest resultat indica detectada en les mostres desnaturalitzades la p55 mitjançant que immunotransferència per l'anticòs anti-p55, també és reconeguda en estat natiu i per tant seria possible pensar que la proteïna detectada en el nucli de les seccions de fetge és la mateixa.

Aquestes consideracions anteriorment esmentades no ens acaben d'aclarir la diferent localització del marcatge a l'emprar l'anticòs anti-queratina i anti-p55 en els estudis immunocitoquímics.

L'anàlisi mitjançant immunotransferència, del mapatge peptídic realitzat amb les proteïnes p55 i citoqueratina nº 8 purificades, tractava d'esbrinar si aquesta diferència de localització del marcatge era deguda a que ambdós anticossos reconeixen epítops distints entre ambdues proteïnes. Ja que una altra de les hipòtesis plantejades era que la p55 es tractés d'una proteïna de la família dels filaments intermedis, donada la presència de la regió α -helicoïdal característica d'aquests (detectada en l'anàlisi de la seqüència parcial d'aminoàcids), però que tingués algun domini en els extrems distin a les queratines. Així doncs, podria ésser que en condicions natives els anticossos anti-queratina i anti-p55, reconeguessin estats conformacionals diferents entre ambdues proteïnes i aquest fet expliqués la diferent localització cel.lular.

La probabilitat d'aquesta teoria és també baixa, tenint en compte que l'anticòs antip55 és un anticòs policional i per tant no és específic contra un determinat domini. A demés, l'estudi del mapatge peptídic, malgrat presentar alguna diferència en el reconeixement dels pèptids obtinguts entre ambdós anticossos, no és concloent.

Tal com s'ha senyalat en l'apartat de resultats, les proteïnes utilitzades en aquest assaig no es troben en les mateixes condicions, ni provenen de la mateixa espècie.

S'hauria d'haver purificat la citoqueratina nº 8 dels fetge de rata. Però amb els mètodes convencionals descrits per a la purificació de queratines s'obtenen també les proteïnes de la matriu nuclear, tal com s'ha descrit anteriorment en aquest apartat. L'únic mètode eficaç per separar els filaments intermedis de les proteïnes de la matriu nuclear és el descrit per Penman i col.laboradors (Fey E.G. i al. 1988).

Aquest mètode es basa en la propietat de polimerització i depolimerització dels filaments intermedis, d'aquesta forma es pot separar la matriu nuclear lliure dels filaments intermedis depolaritzats mitjançant ultracentrifugació i obtenir altra cop els filaments intermedis per un procés de repolarització. Aquest mètode no s'ha pogut aplicar ja que la seva eficàcia està descrita per cèl.lules en cultiu i no per teixit com és el nostre cas.

Per tant tampoc podem afirmar que la proteïna p55 es tracti d'una proteïna distinta a la queratina nº 8.

Per altra banda, estudis paral.lels al descrit en aquest treball, indiquen l'increment de la citoqueratina nº 18 en la matriu nuclear de fetge 24 h regenerant. Aquesta citoqueratina presenta localització citoplasmàtica en forma de filaments (tesi doctoral d'en Ricard Bastos). Fent referència a les característiques de les queratines anteriorment descrites, la citoqueratina nº 18 és una queratina del tipus I, que copolimeritza amb la queratina nº 8 (de tipus II) per formar els filaments intermedis majoritaris de les cèl.lules hepàtiques. Les queratines formen filaments heteropolimers, es a dir, per formar filaments es requereix la presència d'una queratina de tipus I i una queratina de tipus II. Existeixen evidències experimentals de la formació d'homopolímers d'un sol tipus de queratina, però no esta demostrada l'estabilitat funcional d'aquests filament (Coulombe P.A. i al. 1990, Hatzfeld M. i al. 1990, Steinert P. 1990). Per tant les evidències de l'increment de queratina nº 18 en paral.lel a l'increment de la p55, recolzen el fet de que la p55 homòloga a la queratina nº 8 sigui efectivament la queratina nº 8. Malgrat aquestes evidències semblen ésser clares, no expliquen la localització nuclear de la p55.

Resulta difícil a partir dels estudis en teixit hepàtic, obtenir una explicació coherent que reuneixi tots els aspectes observats.

Identificació i caracterització de la p55 en altres teixits.

L'estudi de la p55 en distints teixits ens permet comprovar si es correspon l'homologia de la p55 amb la citoqueratina nº8.

Tal com s'ha mostrat en l'apartat de resultats, l'estudi dels distints components dels filaments intermedis en els diferents teixits i línies cel.lulars, ha estat àmpliament estudiat (Lazarides E. 1980, Moll i al 1982, GiGi i al. 1982, Tseng i al. 1982).

Així, doncs, amb les dades descrites sobre els filaments intermedis en distints teixits i els resultats obtinguts en l'estudi de la p55, és fàcil indicar que la p55 segueix la mateixa distribució que la citoqueratina nº 8. Malgrat la certesa d'aquesta evidència, s'han obtingut dades que trenquen la perfecta correlació entre la p55 i la citoqueratina nº 8, o al menys permeten l'especulació de que l'anticòs anti-p55 està reconeixent una altra proteïna nuclear.

En els estudis d'immunotransferència d'homogenats de distints teixits, s'observa que l'anticòs anti-p55 reacciona amb la proteïna de 55 KDs en els teixits bàsicament epitelials com són el pàncreas, timus, ronyó i fetge. En canvi en els teixits musculars (cor i múscul esquelètic), l'anticòs anti-p55 no reacciona amb cap proteïna específicament.

Les evidències experimentals descrites, demostren que els teixits composats majoritàriament per cèl.lules d'origen epitelial, presenten quasi exclusivament queratines com a components dels filaments intermedis, i entre elles la queratina nº 8. Així doncs, la proteïna de 55 KDs, identificada per l'anticòs en pàncreas, timus, ronyó i fetge, correspondria a la queratina nº 8 típica d'aquests teixits. La reacció negativa de l'anticòs, en els teixits musculars, recolzen el fet de que l'anticòs reconegui la queratina nº 8. Ja que el tipus de filaments intermedis característics dels teixits musculars són la vimentina i en ocasions la desmina o ambdues (Lazarides E. 1982), però no presenten queratines.

Malgrat aquestes evidències, en testicles i cervell, l'anticòs anti-p55 reacciona específicaments contra proteïnes distintes a la p55 (92 Kda en testicles, 85 Kda en cervell). A demés, tal com s'observa en els estudis immunocitoquímics realitzats en aquests dos teixits, emprant l'anticòs anti-p55, les proteïnes detectades es troben localitzades en els nucli.

Respecte la composició de proteïnes dels filaments intermedis en testicles i fetge, poden dir que en testicles només es té informació sobre les cèl.lules de sertoli, les quals contenen vimentina (52-57 KDa) (Lazarides E. 1982, Franke W.W. i al. 1979). El patró de filaments intermedis descrit en cervell és més complex. En les neurones s'expressen tres tipus de neurofilaments de 200, 150 i 68 KDa de pes molecular, els quals representen els components típics del tipus IV de la família de filaments intermedis (Steinert P.M. i al. 1988). En les cèl.lules glials presenten la proteïna acídica fibrilar glial de 50 KDa de pes molecular, component del tipus III dels filaments intermedis igual que la vimentina i la desmina (Steinert P.M. i al. 1988).

D'aquestes dades es desprèn, que les proteïnes detectades en testicles i cervell no corresponen a cap dels típics components intermedis descrits en aquests teixits.

Així doncs, ja que la proteïna de 92 KDa dels testicles i la de 85 Kda del cervell, detectades per l'anticòs anti-p55, presenten localització nuclear, igual que la p55 identificada en el fetge, podem suggerir l'existència d'alguna relació entre la p55 detectada en el fetge i les proteïnes de 92 i 85 KDa detectades en testicles i cervell.

Identificació i caracterització de la p55 en línies cel.lulars en cultiu.

L'estudi realitzat en les cèl.lules NRK (cèl.lules normals de ronyó de rata no epitelials), línia cel.lular capaç d'ésser activada i sincronitzada, ha aportat un model paral.lel al de l'hepatectomia parcial, en l'estudi de la proliferació cel.lular i concretament en els canvis que es donen en la matriu nuclear durant la replicació de l'ADN.

L'objectiu d'emprar aquest model cel.lular *in vitro*, paral.lel a l'emprat *in vivo* ha estat, intentar comprovar l'increment de la p55 durant el procés proliferatiu i generalitzar la presència de la p55 detectada en el fetge.

Dels resultats obtinguts en els primers estudis immunocitoquímics realitzats en les cèl.lules NRK en fase G_1 i en fase S, emprant l'anticòs anti-p55, es desprenen les següents evidències:

- l'anticòs anti-p55 reacciona en les cèl.lules NRK, contra una proteïna de localització nuclear.

- la presència de la proteïna detectada per l'anticòs anti-p55, coincideix amb la replicació de l'ADN. L'anticòs anti-p55 presenta marcatge en les cèl.lules NRK en fase S, en canvi la reacció en les cèl.lules en fase G₁ és nul.la.

Aquestes evidències coincideixen totalment amb les descrites en teixit hepàtic. I igualment com en el cas dels estudis immunocitoquímics realitzats en teixit hepàtic, els resultats anteriors s'han comprovar mitjançant diferents mètodes de fixació i detecció de l'anticòs. En qualsevol dels casos els resultats han estat els mateixos. De totes formes cal destacar un fet curiós. Tal com s'ha esmentat en l'apartat de

DISCUSSIO

resultats, en els estudis immunocitoquímics centrats en la localització dels filaments intermedis, s'observa una preferència en la utilització de metanol o acetona/metanol, com a fixadors, enfront al paraformaldehid. El motiu és basa en l'obtenció d'imatges del marcatge filamentós més nítides. Contràriament a aquestes característiques, a l'emprar l'anticòs anti-p55 s'observen imatges més nítides i intenses quan s'utilitza paraformaldehid com a fixador, enlloc de metanol o acetona/metanol. Aquesta observació, també es detectava en els estudis realitzats en seccions de fetge congelat a l'emprar distins fixadors, però en aquest cas, la disminució de la intensitat de marcatge de les seccions fixades amb metanol o acetona/metanol respecte a les seccions fixades amb paraformaldehid, incloses en parafina, s'associava a la disminució de la preservació de l'estructura del teixit de les mostres congelades i no a la fixació. En l'anàlisi realitzat en les cèl.lules es comprova que aquestes observacions depenen de la fixació.

Cal esmentar, que en les cèl.lules NRK, la diferència de marcatge de l'anticòs antip55 en les cèl.lules en fase S i G_1 , és més gran que en el cas del fetge normal i 24 h regenerant. En les seccions de fetge normal la p55 també es trobava localitzada en el nucli, encara que molt menys representada. En canvi, en les cèl.lules NRK en fase G_1 , la reacció de l'anticòs ha estat nul.la o en ocasions s'ha detectat un lleuger marcatge citoplasmàtic.

Curiosament aquesta diferència queda desvetllada amb l'anàlisi immunocitoquímic realitzat en les cèl.lules NRK després d'obtenir l'estructura filaments intermedismatriu nuclear *in situ*, i emprar l'anticòs anti-p55 purificat. Ja que la reacció nuclear de l'anticòs es detecta tant en les cèl.lules en fase S com en fase G₁, amb la mateixa intensitat. Aquest resultat suggereix, que la p55 està present en les cèl.lules quiescents o en fases anteriors a la replicació de l'ADN, però només és accessible a l'anticòs l'iniciar-se la fase replicativa, es a dir a l'activar la proliferació cel.lular. L'accessibilitat de la p55 pot ésser deguda a algun dels nombrosos canvis nuclears que es donen durant aquesta fase.

Penman i col.laboradors, descriuen que al realitzar l'extracció de la fracció filaments intermedis-matriu nuclear, es detecten proteïnes difícils de detectar quan es troben tots els components nuclears (Fey E.G. i al. 1985).

Aquest fet explica que en les seccions de fetge normal es detectés lleugerament la p55, i en canvi no es detectés cap marcatge en les cèl.lules sense extractar NRK en fase G_1 i G_0 . Així com, també s'explica que en els estudis de immunotransferència de les mostres NRK en fase S i G_1 , l'anticòs anti-p55 detectés una banda d'igual intensitat en ambdues mostres contràriament als estudis immunocitoquímics.

Així doncs, podem indicar que en les cèl.lules NRK la proteïna detectada per l'anticòs anti-p55 durant la fase S, no es degut a un increment o nova síntesi (com en el cas del fetge), sino a un canvi d'accessibilitat depenent del cicle cel.lular.

A part d'obtenir aquest interessant resultat, els experiments immunocitoquímics realitzats en les cèl.lules extractades *in situ*, emprant l'anticòs anti-p55, ens indiquen que la proteïna detectat està localitzada específicament en la matriu nuclear, ja que és l'única subfracció nuclear que resta després d'aplicar aquest mètode de purificació o extracció.

L'anàlisi mitjançant immunotransferència en una dimensió de mostres de cèl.lules NRK, emprant l'anticòs anti-p55, ens mostra que la proteïna detectada es tracta d'una proteïna d'uns 62 KDa.

Fent referència a les característiques de les cèl.lules NRK 44F emprades, s'ha d'indicar que són una línia cel.lular classificada com a fibroblast. Els fibroblasts, tal com ja s'ha esmentat presenten generalment vimentina, proteïna de 52-57 KDa de pes molecular i punt isoèlectric 5.3, com ha componen dels filaments intermedis.

Per tant, el resultat anterior en indica que en cèl.lules d'origen no epitelial, com és el cas de les cèl.lules NRK, testicles i cervell, l'anticòs anti-p55 reconeix proteïnes de pes molecular distin a 55 KDa. Però en qualsevol dels casos de localització nuclear i concretament en la matriu nuclear.

En el cas del fetge la p55 detectada per l'anticòs, es correlacionava amb la queratina nº 8. Es a dir l'anticòs anti-queratina reconeixia la p55 i l'anticòs anti-p55 reconeixia la queratina nº 8, inclús la queratina nº 18 encara que amb menys intensitat, mitjançant els estudis d'immunotransferència.

Però contràriament, al cas del fetge la p55 no és reconeguda per l'anticòs antivimentina, ni la vimentina és reconeguda per l'anticòs anti-p55, en els estudis d'immunotransferència realitzats en mostres de cèl.lules NRK.

Així doncs, en les cèl.lules NRK els resultats obtinguts al comparar aquest dos anticossos han estat els esperats. En cas contrari s'hagués pogut suggerir, les proteïnes detectades per l'anticòs anti-p55 com proteïnes estretament relacionades amb les proteïnes dels filaments intermedis.

Donades les evidències experimentals que demostren, la coexistència de distins tipus de filaments intermedis, sobretot en cèl.lules en cultiu (ex: cèl.lules HeLa, que presenten vimentina i queratines), i en ocasions la presencia de dos tipus de filaments no és original, si no que és deguda a l'adequació de les condicions de cultiu o en els cas d'hepatomes, als factor tumorals. Es va considerar necessari provar si les cèl.lules NRK emprades presentaven queratines. Els resultats obtinguts a l'emprar l'anticòs anti-queratina ens indiquen no hi han queratines i per tant la proteïna de 62 KDa no presenta cap relació aparent amb les queratines.

Per altra banda, l'anàlisi d'immunotransferència en dues dimensions, de cèl.lules NRK emprant l'anticòs anti-p55, en mostra que la proteïna de 62 KDa presenta un patró similar a la p55 del fetge. S'observen distins polipèptids, probablement deguts també a distintes isoformes fosforil.lades. La doble immunotransferència de dues dimensions, realitzada emprant els anticossos anti-p55 i anti-vimetina, ens afirma la diferència de patró entre la proteïna de 62 KDa i la vimentina, aquesta representada per un únic punt.

Els estudis immunocitoquímics realitzats en altres tipus de cèl.lules demostren que l'anticòs anti-p55 reconeix en qualsevol tipus cel.lular i sigui quin sigui el component de filaments intermedis que presenti, una proteïna de localització nuclear.

Per tant la presència de l'anomenada p55 es pot considerar general i no exclusiva de les cèl.lules hepàtiques.

Els estudis d'immunotransferència dels distins tipus cel.lulars estudiats, emprant l'anticòs anti-p55, també ens demostren que en les cèl.lules d'origen epitelial, com són les cèl.lules MDCK, AMA, HeLa, l'anticòs reacciona contra una proteïna de 55 KDa. En canvi en els fibroblats com són les cèl.lules 3T3 i NRK, l'anticòs reacciona contra una proteïna de 62 KDa.

Les cèl.lules MDCK, AMA i HeLa, com la majoria de cèlules d'origen epitelial presenten queratines, i entre elles la queratina nº 8. S'ha d'indicar que tant les cèl.lules HeLa com les AMA, a part de presentar queratines també contenen vimentina. La característica comú de presentar queratina nº 8, fa que sigui interessant ampliar l'estudi d'aquestes cèl.lules per tal d'esbrinar si existeix correlació entre la p55 detectada i la queratina nº 8, al igual que ocorre en el fetge.

Els fibroblasts 3T3 i NRK, no presenten queratines, solament contenen vimentina com a component dels filaments intermedis en ambdós casos l'anticòs anti-p55 detecta una proteïna de 62 KDa.

Curiosament, evidències descrites per Zackroff i al. (1984), indiquen la presència constant de polipèptids entre 60-70 KDa semblants a les queratines, en cultius de cèl.lules classificades com a fibroblasts. Aquestes proteïnes semblants a les queratines es coopurifiquen amb els filaments intermedis. A més, formen agregats o paracristalls, sota condicions en les que les proteïnes dels filaments intermedis resten formant oligòmers o protofilaments (Whitman-Aynardi M. i al. 1981).

Una altra característica interessant d'aquestes proteïnes és, que contenen la regió α -helix típica dels filaments intermedis citoplasmàtics i de les làmines nuclears. Així com, l'estructura dels paracristalls que formen es suggereix que estan composats per polipèptids de filaments intermedis.

Però contràriament als filaments intermedis, no es demostra que aquestes proteïnes estiguin organitzades en forma de filaments citoplasmàtics. En canvi les observen localitzades peirnuclearment, de forma similar a les llàmines nuclear. Per altra banda, aquests autors indiquen que emprant anticossos contra queratines, aquests reconeixen entre aquestes proteïnes semblants a les queratines, una proteïna de 70 KDa.

Com a conclusió d'aquest treball, es suggereix l'existència de proteïnes semblant a les queratines en el nucli cel.lular.

La majoria d'aquestes dades recolzen una de les inicials hipòtesi descrita per l'anticòs anti-p55, la qual suggereix que la proteïna detectada per l'anticòs anti-p55 és una proteïna semblant a les queratines o proteïnes dels filaments intermedis

Respecte a la localització cel.lular, en el treball descrit anteriorment, es comenta la localització perinuclear d'aquestes proteïnes semblants a les queratines, però no es mostren evidències experimentals. Aquest punt representaria una gran diferència amb la proteïna descrita en el nostre treball. Però caldria saber amb més detall el mètode immunocitoquímic emprat, ja que, tal com s'ha indicat en l'apartat de materials i mètodes, en les cèl.lules de cultiu s'ha de tenir en compte el pas de permeabilització de les cèl.lules. Doncs, segons el mètode i temps emprats, pot ésser que no es permeabilitzi la membrana nuclear i per tant no es pugui detectar cap marcatge nuclear, quedant aquests a nivell perinuclear. Considerant que l'estudi esmentat fa referència a la fracció de filaments intermedis com una fracció citoplasmàtica, pot ésser que no es considerin aquestes característiques metodològiques.

Per altra banda, estudis de caracterització de proteïnes de la matriu nuclear, descrits per Penman i col.laboradors (Nickerson J.A. i al. 1990), indiquen l'existència d'una proteïna de 35 Kda component de l'estructura interna de la matriu nuclear, que presenta en llur seqüència homología amb la regió α -helicoïdal de les queratines.

Així doncs, les evidències descrites per Zackroff i al. i les de Penman i col.laboradors, respecte a proteïnes que presenten la regió α -helix, distintes a les ben caracteritzades proteïnes dels filaments intermedis, indiquen l'existència de certa similitud entre els components de l'esquelet citoplasmàtic i nuclear, i recolzen els resultat presentats.

Respecte la possible funció de la proteïna p55, donat que el treball ací descrit, malgrat presentar alguns estudis per tal d'esbrinar la funció o paper que desenvolupa la proteïna detectada, dintre de la successió desdeveniments durant la fase pre-replicative, aquests han estat escassos, com a conseqüència de les controvèrsies trobades durant la caracterització de la proteïna estudiada. Així, doncs, sols es pot indicar, com hipòtesi i per paral.lelisme amb els treballs descrits, que la proteïna anomenada p55 podria intervindré en l'organització cromosòmica durant la mitosi. Per les característiques similars als filaments intermedis també poden postular que la p55 formaria part de les proteïnes estructurals de la xarxa interna de la matriu nuclear.

.