



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Implicació de la calmodulina en la progressió a través de la fase G₁ del cicle cel·lular

Marta Taulés i Marín

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat de Barcelona

**IMPLICACIÓ DE LA CALMODULINA EN LA PROGRESSIÓ A
TRAVÉS DE LA FASE G₁ DEL CICLE CEL·LULAR**

Tesi presentada per Marta Taulés i Marín per optar al grau de doctora
en Biologia

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700920195

Barcelona, maig de 1999

α



Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. Neus Agell i Jané, al Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, maig de 1999

Índex de contingut

I INTRODUCCIÓ

1. LA CALMODULINA	25
1.1. Característiques i estructura	27
1.2 Regulació dels nivells del calci intracel·lular. El calci com a missatger i la calmodulina com a molècula efectora	29
1.3 Proteïnes acceptadores de calmodulina	33
1.3.1 Els antagonistes de la CaM	34
2. CICLE CEL·LULAR	36
2.1 Definició. Factors promotors i mecanismes de vigilància o checkpoints	36
2.2 La maquinària del cicle cel·lular: kinases depenents de ciclins (cdk)	42
2.2.1 Nivells de regulació de les cdk	43
2.3 Regulació del cicle cel·lular	43
2.3.1 Punt de restricció Rb i proteïna del retinoblastoma (pRb)	43
2.4 Cicle cel·lular i calmodulina	46
3.2 Complex del porus nuclear (CPN): estructura i funcions	49
3.2 Importació-exportació de proteïnes cap al nucli	
3.2.1 Model d'importació i exportació de proteïnes portadores de senyals clàssics de localització nuclear (NLS)	51
3.2.2 El transport <i>per piggy back</i>	56
3.2.3 Altres tipus de senyals de transport nuclear	56
3.2.4 <i>Chaperones</i>	57
3.2.5 Factors de retenció citoplasmàtics i emmascarament del senyal	57
3.2.6 Els senyals d'exportació nuclears (<i>nuclear exportation signals</i> ; NES) i regulació	60
3.2.7 Paper de la CaM en el transport nuclear	62

II OBJECTIUS

III MATERIALS I MÈTODES

1. MODELS CEL·LULARS	71
1.1 Rutina de cultiu i subcultiu de cèl·lules	71
1.2 Congelació i descongelació de cèl·lules	72
1.3 Sincronització de cèl·lules en fase G_0	75
1.4 Aplicació de les drogues anticalmodulina	76
1.5 Mesura de la síntesi <i>in vivo</i> de DNA	76

Índex de contingut

2. TÈCNiques ELECTROFORÈTIQUES	77
2.1 Electroforesi en una dimensió	77
2.2 Tenyiment de blau de <i>Coomassie</i> per a 1D	79
2.3 Electroforesi bidimensional (2D-PAGE)	79
2.3.1 Preparació dels gels	81
2.3.2 Preparació del suport i <i>prerunning</i>	82
2.3.3 Preparació de la mostra	82
2.3.4 IEF i conservació dels gels	82
2.4 Determinació de la concentració de proteïna	84
2.5 Transferència a membranes	86
3. PURIFICACIÓ DE LA CALMODULINA	88
4. ACOBLAMENT DE LA CALMODULINA A SEPHAROSE 4B	90
5. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ GST	92
6. IMMUNODETECCIÓ	92
6.1 Aplicacions de la utilització d'anticossos en el reconeixement de proteïnes	92
6.2 Western blot (WB)	94
6.3 Immunoprecipitacions (IP) i assaig kinasa	94
6.4 Immunocitoquímica per a l'observació amb microscopi òptic o confocal	97
6.5 Immunocitoquímica per a l'observació amb microscopi electrònic	100
6.5.1 Preparació de les cèl·lules per aplicar la immunocitoquímica per microscòpia electrònica	100
6.5.1.a Englobació en Lowicryl K4M	103
6.5.1.b Mètode de <i>slam freezing</i>	103
6.5.2 Doble immunocitoquímica per a microscòpia electrònica	104
7. CROMATOGRÀFIA D'AFINITAT A LA CALMODULINA-SEPHAROSE®	105
8 <i>PULL DOWN</i> EN COLUMNES DE CALMODULINA	107
8.1 Mitjançant proteïnes purificades i fusionades amb -GST	107
8.2 A partir d'un lisat	107
9. MICROINJECCIÓ	108
10. CONJUGACIÓ DE PROTEÏNES AMB FLUOROCROMS	109

Índex de contingut

10.1 Conjugació amb derivats de l'isotiocianat	109
10.1.1 FITC	110
10.1.2 TRITC	110
10.1.3 Conjugació de proteïnes amb B-ficoeritrina (BP)	111

11. ASSAIG <i>IN VITRO</i> D'IMPORTACIÓ NUCLEAR EN CÈL·LULES PERMEABILITZADES AMB DIGITONINA	112
--	-----

IV RESULTATS

1. LA CALMODULINA ÉS ESSENCIAL PER A L'ACTIVACIÓ DE LA KINASA 4 DEPENDENT DE LA CICLINA (CDK4) I PER A L'ACUMULACIÓ NUCLEAR DE LA CICLINA D1 I LA CDK4 DURANT LA FASE G ₁	121
--	-----

1.1 L'aturada del cicle cel·lular a la fase G ₁ produïda per la inhibició de la calmodulina és reversible	122
--	-----

1.2 La inactivació de la calmodulina durant la primera part de la fase G ₁ evita la fosforilació de pRb i l'activació de la cdk4 i la cdk2	124
---	-----

1.3 Efecte de la inhibició de la calmodulina sobre els nivells totals de les ciclines i de les kinases dependents de ciclines (cdk)	126
---	-----

1.4 Efecte de la inhibició de la calmodulina sobre les quantitats de p21 ^{CIP1} i p27 ^{KIP1}	127
--	-----

1.5 La inactivació de la calmodulina no afecta el patró electroforètic bidimensional de la cdk4	129
---	-----

1.6 Efecte de la inhibició de la calmodulina sobre la formació dels complexos cdk4/cicD1	131
--	-----

1.7 Paper de la CaMKII i la calcineurina en l'acumulació de la cdk4 al nucli	139
--	-----

1.8 Estudi de la possible interacció de la cicD1 i cdk4 amb la calmodulina	140
--	-----

2. LA CALMODULINA S'UNEIX A LA P21 ^{CIP1} I REGULA LA SEVA TRANSLOCACIÓ AL NUCLI	145
---	-----

2.1 La p21 ^{CIP1} coimmunoprecipita amb la calmodulina	155
---	-----

2.2 La p21 ^{CIP1} s'uneix <i>in vitro</i> a la calmodulina	155
---	-----

2.3 La cdk4, la cicD1 i la p21 ^{CIP1} col·localitzen amb la calmodulina per microscòpia electrònica	159
--	-----

2.4 La localització nuclear de la p21 ^{CIP1} és dependent de CaM	153
---	-----

2.4.1 Les drogues anti-CaM inhibeixen l'acumulació nuclear de la p21 ^{CIP1}	153
--	-----

2.4.2 La p21 ^{CIP1} es transporta al nucli de manera dependent de CaM en cèl·lules Hela permeabilitzades amb digitonina	157
--	-----

V DISCUSSIÓ

VI CONCLUSIONS

VII ÍNDEX ALFABÈTIC

Introducció

1. La calmodulina

1.1. Característiques i estructura

La calmodulina (CaM) és una proteïna àcida, té un punt isoelèctric de 5 i un pes molecular de 16 kDa. S'ha conservat molt al llarg de l'evolució dels eucariotes, sobretot a vertebrats, on és codificada per tres gens diferents: CaMI, CaMII i CaM III (125) (124) (126) (165). Funciona com la principal proteïna acceptadora de Ca^{2+} a les cèl·lules eucariotes, tret de les musculars llises.

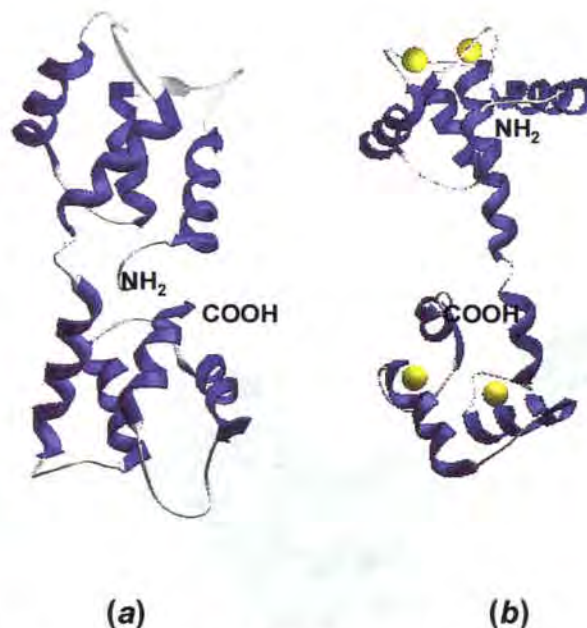


Figura 1. Estructura de l'esquelet α -carboni de la CaM sense Ca^{2+} (apoCaM) (a) (88) i unida a quatre ions Ca^{2+} (en groc) (b) (184).

La forma cristal·litzada de la CaM quan és unida al Ca^{2+} es caracteritza per tenir dos lòbuls en configuració trans: un situat a l'extrem N-terminal i l'altra a l'extrem C-terminal, ambdós estan separats per una hèlix- α (de color lila a la figura 1) que confereix a la molècula molta flexibilitat. Cada lòbul conté dos motius *helix-loop-helix*, també anomenats *EF-hands*. Per aquesta raó s'engloba la CaM dintre de la família de proteïnes *EF-hand* (114) (117), però hem de tenir en compte que no totes les proteïnes acceptadores de calci interaccionen amb aquest ió pel mateix domini (194).

El Ca^{2+} té més afinitat pels motius *EF-hand* situats al lòbul carboxi-terminal (III i IV) amb una K_d de 10^{-7} M i menys afinitat pels llocs (I, II) situats a l'extrem amino-terminal, amb una K_d de 10^{-6} M.

A l'interior de les cèl·lules la concentració de Ca^{2+} és de l'ordre de 10^{-7} . És per això que s'ocuparan primer els llocs d'alta afinitat i els llocs d'unió per al Ca^{2+} situats a l'extrem amino, de baixa afinitat, són els sensors de Ca^{2+} . La unió del Ca^{2+} a la CaM indueix un canvi conformacional llavors queden exposades dues zones hidrofòbiques a la meitat de la proteïna, les quals interaccionaran amb les CaMBP (*CaM binding proteins* o proteïnes acceptadores de CaM, que es tractaran en detall en l'apartat 1.3). A la figura 2 es pot comparar la configuració de la CaM unida a Ca^{2+} , en groc, (a) o quan s'hi ha unit una CaMBP.

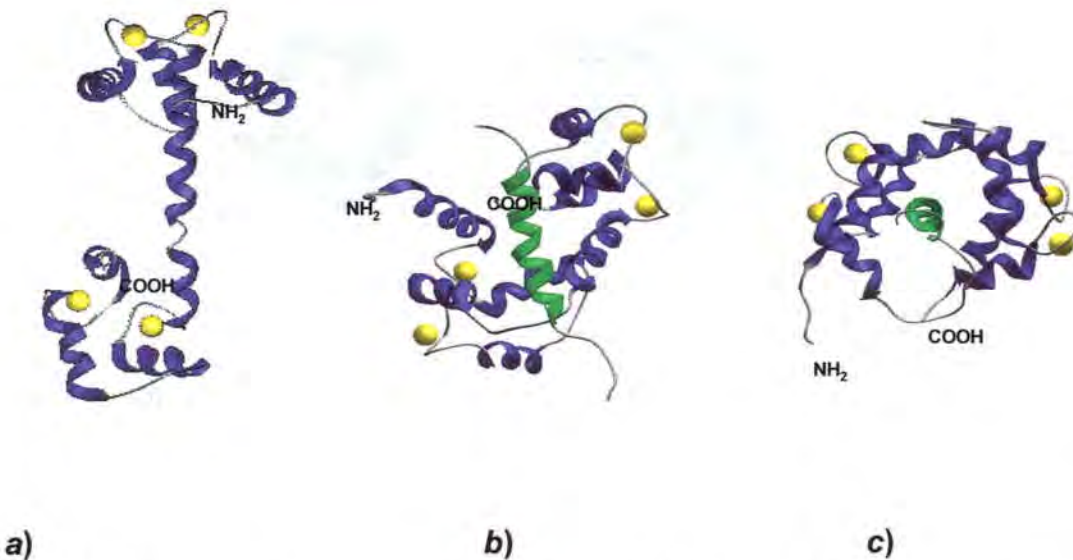


Figura 2. Diferents conformacions adoptades per la CaM (a) unida a Ca^{2+} , (b) i (c) associada a un pèptid que mimetitza el domini d'unió de la MLCK a la CaM (en verd es representa un fragment de la MLCK).

1.2 Regulació dels nivells del calci intracel·lular. El calci com a missatger i la calmodulina com a molècula efectora

Un dels requisits perquè un element funcioni com un bon transductor del senyal és que sigui capaç d'unir-se amb gran afinitat i especificitat a les seves molècules acceptadores. El Ca^{2+} compleix aquests requeriments. Altres ions són presents a fluids biològics (com ara el Cl^- i el K^+) però tenen el radi massa gran i és impossible trobar-los units de manera estable a proteïnes. Els ions poliatòmics com ara el fosfat i el bicarbonat són molt més grossos i tampoc poden formar complexos estables amb les proteïnes. El radi iònic del Na^+ és similar al del Ca^{2+} , però com que té només una càrrega, la unió a les proteïnes és més dèbil. El Mg^{2+} i el Ca^{2+} són capaços d'interaccionar amb 4-12 àtoms d'oxigen, però normalment ho fan amb 6 o 8 (107). El Ca^{2+} s'uneix a les proteïnes acceptadores amb més afinitat i especificitat que el Mg^{2+} perquè és capaç d'unir 6 àtoms d'oxigen provinents de residus de glutamat i aspartat (45), a diferència del Mg^{2+} , que no pot fer-ho, i substitueix aquests aminoàcids per aigua o oxígens, cosa que fa la unió més dèbil i inespecífica (6). Tot això fa del Ca^{2+} un dels elements clau en el sistema de transducció de senyal.

La concentració intracel·lular de Ca^{2+} lliure és molt baixa (10^{-8} - 10^{-7}) enfront la que hi ha al medi extracel·lular (10^{-3} M). Una de les raons per les quals la cèl·lula ha de mantenir baixa la concentració de Ca^{2+} al citoplasma és evitar que precipiti en forma de fosfat, principal font d'energia de la cèl·lula que deixaria d'estar disponible. També convé que les concentracions de Ca^{2+} al citosol siguin baixes per regular els mecanismes que actuen a través de la ruta de la senyalització del Ca^{2+} .

Les cèl·lules segueixen dues estratègies per mantenir els nivells baixos de Ca^{2+} al citosol: d'una banda, l'existència de proteïnes que uneixen i l'ajuden a tamponar i, de l'altra, la presència de bombes de Ca^{2+} dependents d'ATP (presentes tant a la membrana plasmàtica com a la del reticle), que dirigeixen l'excés de Ca^{2+} cap als orgànuls especialitzats (reticle endoplasmàtic i, en condicions extremes, cap als mitocondris) o cap al medi extracel·lular. Hi ha diferències entre la velocitat de regulació del nivell del Ca^{2+} nuclear i el citoplasmàtic, i la davallada del Ca^{2+} lliure

del citoplasma és més ràpida que la del nucli. Aquest fet suggereix que el reservori de Ca^{2+} nuclear podria allargar el senyal de Ca^{2+} inicial de manera independent a la del citosol (70) (73).

Les cèl·lules poden integrar els senyals externs, principalment, a partir de dos tipus diferents de receptors: els units a proteïnes G, que rebran senyals inflamatoris i neurotransmissors, i altres de tipus tirosina kinasa que tradueixen la resposta de factors de creixement (14). Ambdós convergiran en la formació de segons missatgers: l'inositol (1,4,5)-trifosfat (IP_3) o el diacilglicerol (DAG) derivats de la hidròlisi d'un lípid precursor (fosfatidilinositol 4,5-bifosfat, PIP_2) per acció de la fosfolipasa C- β ($\text{PLC}\beta$) o la $\text{PLC}\gamma$, segons el tipus de receptor que s'hagi estimulat. Tant a la membrana del reticle com a la de l'embolcall nuclear hi ha receptors d' IP_3 que en activar-se podran alliberar el Ca^{2+} dels magatzems intracel·lulars, sigui cap al citosol o cap al nucleoplasma, segons les necessitats cel·lulars.

La idea clàssica que no hi havia barreres per a la lliure difusió del Ca^{2+} entre el nucli i el citoplasma, i que aquests nivells es podien arribar a equilibrar, es contraposa amb estudis recents que descriuen una regulació específica dels nivells del Ca^{2+} al nucli. Aquests canvis en la concentració de Ca^{2+} tant al nucli com al citoplasma suggereixen que l'entrada d'aquest ió al nucli es pot produir a partir del Ca^{2+} citosòlic a través del porus nuclear o de l'emmagatzemat a l'espai perinuclear.

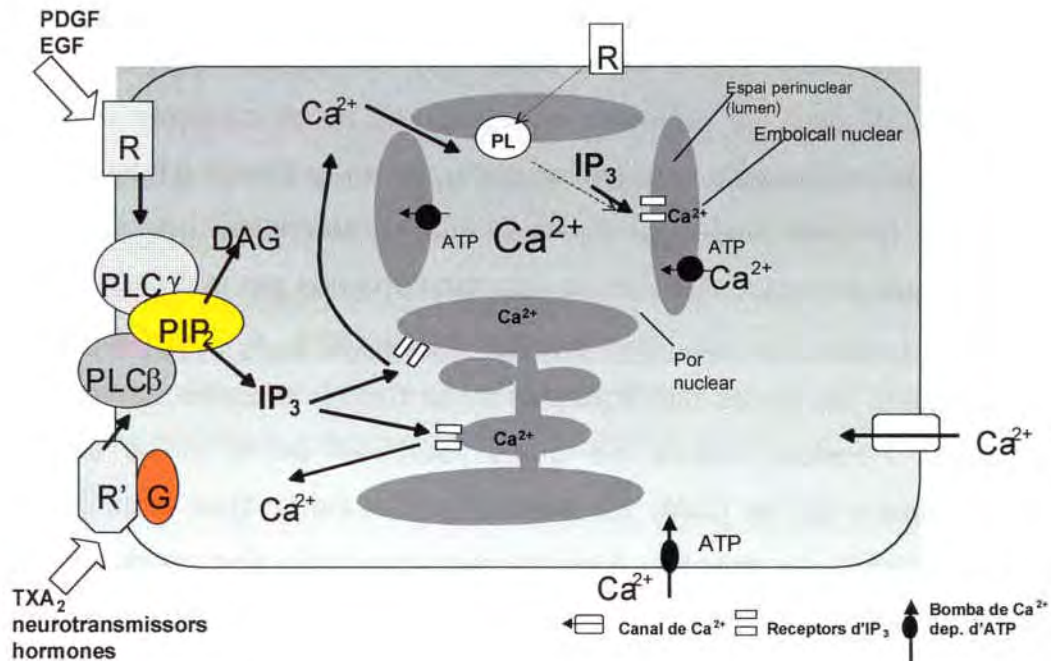


Figura 3. Diferents vies d'integració de senyals que provoquen la mobilització del Ca^{2+} .

Les darreres tendències donen suport a la idea que el cicle de l'inositol al citoplasma és regulat de manera independent al del nucli. La formació d' IP_3 nuclear és regulada positivament per estímuls extracel·lulars com ara el de l'*Insulin growth factor like-1* (IGF-1) (39) (104). Les accions del Ca^{2+} es duen a terme mitjançant proteïnes que tenen la capacitat d'unir-lo específicament i de manera estable. La CaM és una bona candidata per ser efectora del Ca^{2+} , perquè es troba tant al citoplasma com al nucleoplasma i està associada tant a la cromatina com als nuclèols o a la matriu nuclear. A més, pot integrar el senyal del Ca^{2+} i regular diferents funcions cel·lulars.

1.3 Proteïnes acceptadores de calmodulina

La interacció del Ca^{2+} amb la CaM indueix un canvi conformacional en aquesta i deixa exposades les zones hidrofòbiques de la CaM. Les proteïnes acceptadores de CaM (*CaM binding proteins*, CaMBP) s'uniran a aquests dominis hidrofòbics, i duran a terme les funcions de la CaM.

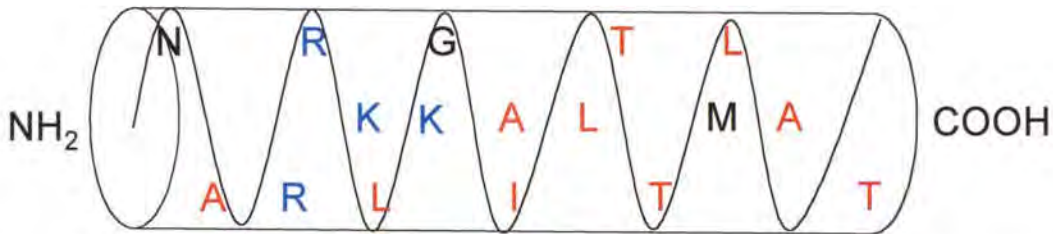


Figura 5. Zones d'interacció entre la CaM i la CaMKII. Els residus bàsics de l'extrem amino-terminal del domini d'unió a la CaM, interaccionen amb forces iòniques amb els residus de glutamat de la CaM. Mentre que l'extrem carboxi-terminal (sense residus bàsics) del domini d'unió a la CaM de la CaMKII interacciona amb el lòbul amino-terminal de la CaM a través d'unions hidrofòbiques.

Són múltiples les CaMBP que ha estat descrites fins ara. Han estat detectades per assajos amb CaM marcada amb $^{125}\text{-I}$ (*overlay*) o per columnes d'afinitat.

El mecanisme de la interacció entre la CaM i les CaMBP per mitjà de les quals actua, ha estat estudiat principalment en proteïnes com ara la *CaM-dependent protein kinase II* (CaMKII) i la *myosin light chain kinase* (MLCK). Tots aquests enzims presenten un domini autoinhibitori que interacciona amb el llocs actius dels enzims. Aquest domini autoinhibitori coincideix, en part, amb el domini d'unió d'aquestes proteïnes a la CaM. El mecanisme d'activació mitjançat per la CaM consisteix a provocar un canvi conformacional que allibera la regió autoinhibitòria del lloc actiu de l'enzim.

Entre les CaMBP més conegudes podem esmetar les que regulen els nivells de nucleòtids cíclics per activació de la producció del GMP cíclic (GMPc) i de l'AMP cíclic (AMPc), via la guanilat ciclase (en el cas del GMPc) o l'adenilat ciclase (en el cas de l'AMPc) dependents de la CaM. Tanmateix, la CaM pot contribuir a la davallada d'aquests nucleòtids cíclics activant la fosfodiesterasa dependent de CaM. La CaM també regula la ruta de l'òxid nítric, ja que activa la NO sintasa. La CaM té un paper molt important en el trànsit de vesícules com ara la fusió d'endosomes (24).

La fosforilació de proteïnes cel·lulars pot estar regulada per la CaM mitjançant l'activació de diferents kinases: la MLCK (kinasa de les cadenes lleugeres de la miosina), les *CaM-dependent protein kinase* (CaMK I, II, III, IV i V). La CaMK II i la

IV fosforilen factors de transcripció (CREB). Només s'ha descrit una CaMBP que sigui fosfatasa, és el cas de la calcineurina que està implicada en la regulació de l'activitat de factors de transcripció, model que s'explicarà més endavant (apartat 3.2.5, figura 13).

Algunes CaMBP també poden tenir un paper estabilitzador d'altres proteïnes, és el cas de la família de les *heat shock proteins* (112) (193) .

La CaM també té una funció estructural ja que regula diferents aspectes del citoesquelet. S'ha vist que sobreexpressant-la s'obté una morfologia alterada de la cèl·lula com també una organització anormal dels microfilaments. Intervé en la unió dels microtúbuls a la proteïna associada als mateixos *MAP2* i *tau*.

La CaM pot regular el sistema contràctil actina-miosina per mitjà de l'associació a tres CaMBP: α -espectrina, MLCK, i *caldesmon* (8). La MLCK i la *caldesmon* són les que conjuntament amb l'actina i la miosina formen part del sistema contràctil dependent de Ca^{2+} /CaM en cèl·lules no musculars.

El fet d'haver trobat CaM associada a la matriu nuclear fa pensar que podria estar implicada en l'organització de la cromatina, en la duplicació i reparació del DNA, i en l'apoptosi, com també en la regulació de l'expressió de determinats gens. Un gran nombre de CaMBP nuclears han estat descrites, les que destaquen més són les compostes per factors de transcripció que pertanyen al grup *basic-helix-loop-helix* (bHLH, com per exemple, l'SRF-1 humà i els E2A i Max murins), que s'uneixen a les *E-boxes* reguladores de diferents gens (29). Aquesta unió serà inhibida per la interacció de la CaM amb els factors de transcripció bHLH. Altres CaMBP estan associades a les ribonucleoproteïnes (hnRNP: com ara l'A2 i la C) implicades en el processament de l'RNA. L'autoantigen La/SSB (21) és una CaMBP que forma part del complex de l'espliceosoma.

Per tal d'ampliar l'estudi de les funcions de la CaM, com també d'identificar noves proteïnes que hi interaccionin s'han dissenyat compostos que mimetitzin la unió de les CaMBP a la CaM. En l'apartat següent es tracta la manera d'aconseguir la inactivació de la CaM.

1.3.1 Els antagonistes de la CaM

El coneixement dels dominis per on les CaMBP interaccionen amb la CaM fa que es puguin reproduir totalment o parcialment sintetitzant pèptids que mimetitzin aquests dominis i que s'uneixin de manera específica a la CaM. Igualment, s'han sintetitzat drogues dirigides a ocupar els dominis hidrofòbics de la CaM, que interactuarien amb les proteïnes acceptadores (CaMBP), aconseguint així inactivar la CaM.

Podem diferenciar diferents antagonistes de la CaM:

-Família de les sulfonamides:

W13 (*N*-(4-aminobutyl)-5-chloro-2-naphtalenesulfonamide) (72)

W7 (*N*-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide) (71)

J8 (*N*-(8-Amino-octyl)-5-iodo-1-naphthalenesulfonamide) (30)

D'aquesta família els més emprats són el W13 i el W7. Els seus controls respectius, molècules de poca afinitat amb la CaM, són el W12 (71) i el W5, respectivament.

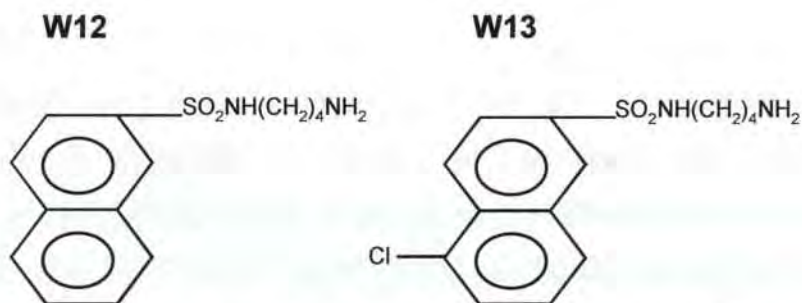


Figura 6. Fòrmula del W12 (molècula de control) i del W13 (antagonista de la CaM)

-Família dels imidazols: Calmidazolium (CMZ) (48)

-Família de les trifluoroperacines (TFP) (30)

-Família de les arilalquilamines: KHL-8430 (131)

-Pèptids que mimetitzen els dominis de les CaMBP que interaccionen amb la CaM, i que estableixen una competència; per exemple, el corresponent al fragment 290-309 de la CaMKII.

Recentment s'ha determinat per espectroscòpia multidimensional (NMR) l'estructura que adopta la CaM quan s'uneix a la molècula de W-7. L'anell

cloronaftalè del W-7 interacciona amb quatre metilmethionines i amb residus aromàtics en una zona hidrofòbica que seria la responsable d'interaccionar amb les CaMBP, i s'estableix una competència entre la droga i les proteïnes efectores per mitjà de les quals actuaria la CaM (132).

2. Cicle cel·lular

2.1 Definició. Factors promotors i mecanismes de vigilància o checkpoints

La vida i la mort són dos temes que sempre han preocupat la humanitat. Van ser els grecs els que van buscar unitats bàsiques i forces vitals per explicar la natura de la vida.

Una idea clàssica de cicle cel·lular engloba el conjunt d'esdeveniments que han de succeir a una cèl·lula perquè es coordinin els processos que es produeixen tant al citoplasma com al nucli fins a arribar a donar les cèl·lules filles. A la dècada dels vuitanta es va definir com a cicle cel·lular el seguit d'esdeveniments regulars que succeeixen a les cèl·lules mentre es van dividint o creixent. Els processos de creixement i de divisió no han d'anar necessàriament lligats. Per exemple, en els primers estadis de l'embriogènesi, durant la segmentació, les cèl·lules es divideixen sense créixer. No va ser fins a la dècada dels noranta que no es van començar a perfilar les diferències que hi havia entre les cèl·lules que es dividien i les que no. A la figura 7 es mostren les principals etapes del cicle cel·lular, en què es diferencia una fase S que correspon a la replicació del DNA i una etapa de segregació dels cromosomes o mitosi (M); els espais temporals o *gaps* que separen la mitosi (M) de la fase S es defineixen com G_1 i G_2 . El conjunt de les fases G_1 , S i G_2 s'anomena interfase. S'hi pot afegir el punt de restricció \textcircled{R} , del qual es parlarà en l'apartat de senyals externs, que té lloc cap a la fi de la fase G_1 , i que subdivideix aquesta fase G_1 en primerenca/mitjana i G_1 tardana (136) (200). La durada del cicle cel·lular varia segons el tipus cel·lular. Els embrions de mosca tenen un cicle cel·lular curt (8 h), mentre que la majoria de cèl·lules somàtiques dels mamífers completen el cicle en 24 h.

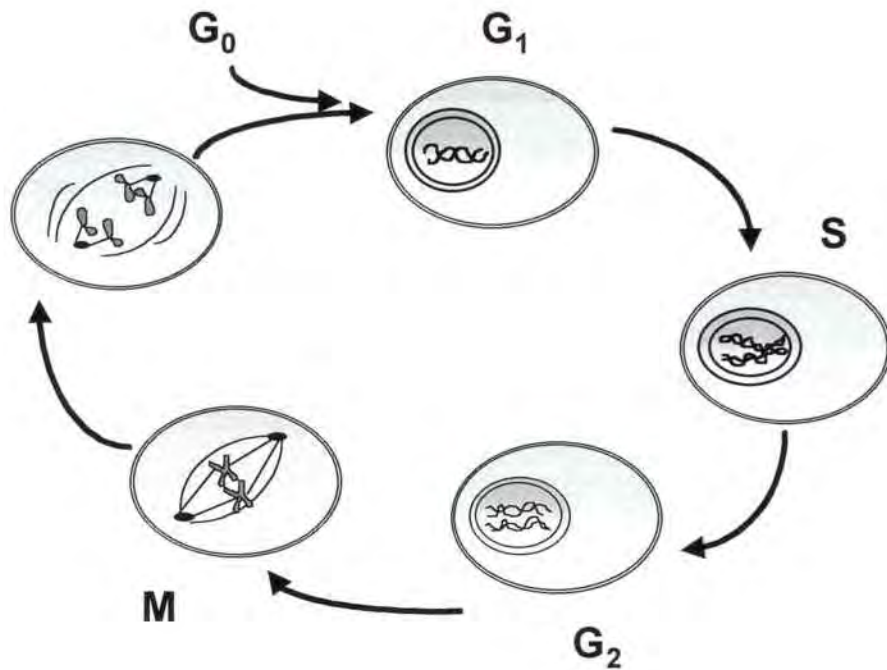


Figura 7. Cicle cel·lular en mamífers.

En les dècades dels seixanta i dels setanta es va començar a introduir el concepte de quiescència (G_0), estat durant el qual la cèl·lula és fora del cicle cel·lular i no augmenta la seva massa. A la fase G_0 les cèl·lules romanen estables i metabòlicament actives, i llur entrada al cicle depèn de l'existència d'uns factors externs. *In vivo*, la quiescència és l'estat natural de les cèl·lules diferenciades que formen part d'un teixit d'un organisme adult. Els hepatòcits d'un organisme adult només es dividiran com a resposta a estímuls externs, com poden ser els provocats per una pèrdua de massa o un dany al teixit (75). El sistema de control del cicle cel·lular s'ha conservat molt al llarg de l'evolució, és per això que podem fer estudis en nombrosos models.

L'estudi del cicle cel·lular en diferents eucariotes, des dels més senzills unicel·lulars (*Saccharomyces*, *Aspergillus*), invertebrats marins (estrelles de mar) i mosques, fins als vertebrats (*Xenopus*), ratolins i humans, ha contribuït a incrementar el grau de coneixement sobre la regulació dels processos que s'hi

donen, i s'han observat elements comuns. Aquests elements comuns, descrits com els motors del cicle cel·lular eucariota són les cdk (kinases dependents de ciclins). A més a més, hi ha un mecanisme d'alerta (o *checkpoint*) que vetlla perquè el metabolisme cel·lular sigui el correcte, perquè el genoma estigui intacte i perquè els passos previs al punt on és s'hagin dut a terme adequadament. En cas de detecció d'alguna anomalia, el cicle s'aturaria per intentar reparar el dany i, en cas que no fos possible la reparació, es donaria una mort per apoptosi.

2.2 La maquinària del cicle cel·lular: kinases depenents de ciclins (cdk)

Les cdk són la subunitat catalítica d'un heterodímer. L'activació depèn de l'associació de la cdk amb la seva subunitat reguladora, la ciclina. La primera ciclina descrita va ser la ciclina B (cicB) dels ous d'ericons de mar. Aquesta proteïna s'acumula durant la interfase i es degrada específicament al final de la mitosi. Les ciclins tenen una mida i una estructura heterogènia i s'expressen seqüencialment durant les diferents etapes del cicle cel·lular. L'estructura de les ciclins es caracteritza per tenir dos dominis clarament marcats, cadascun està format per cinc hèlix- α connectades entre elles per pèptids curts. El primer domini és el que interaccionarà directament amb la cdk. Les cdk presenten un domini situat a la meitat de l'extrem N-terminal anomenat PSTAIRE (41) (42), molt conservat entre la cdc2, cdk2 i cdk3 d'unió a la ciclina.

En eucariotes superiors, cada etapa del cicle cel·lular es caracteritza per l'activació transitòria d'unes cdk específiques associades a la seva subunitat reguladora o ciclina. Les combinacions i associacions de les kinases amb les ciclins són múltiples: als humans, la cdk2 es pot associar al menys amb tres ciclins, A, D, i E. La cicA pot associar-se amb la cdk1 o la cdk2. La cicD pot associar-se al menys amb quatre cdk diferents: cdk2, cdk4, cdk5 i cdk6.

Complex	Moment	Possible funció
Cdk4/cicD	G ₁	Progressió a través de la fase primerenca o mitjana del G ₁
Cdk6/cicD	G ₁	Progressió a través de la fase G ₁
Cdk2/cicE	G ₁ /S	Final G ₁ , progressió i inici de la síntesi del DNA.
Cdk2/cicA	S	Inici i finalització de la síntesi del DNA
Cdc2/cicB	G ₂ /M	Iniciació i manteniment de la fase M

Taula 1. Els diferents complexos cdk/cic que actuen en moments concrets del cicle cel·lular.

2.2.1 Nivells de regulació de les cdk

La regulació de l'activació de les cdk és molt complex. Es poden definir diferents nivells en la regulació de l'activitat de les cdk

a) Un primer nivell de regulació seria la formació o no del complex (cdk-cic). Aquest punt es veurà afectat tant per la síntesi com per la degradació de la subunitat reguladora (ciclina). La síntesi de la cicD és dependent de factors de creixement (167), mentre que la degradació es fa per reconeixement de la seqüència PEST. Així doncs, la cicD és una proteïna molt làbil (105), la seva degradació està regulada per fosforilació i és dependent d'ubiquïtina (37). La cicA i la cicB contenen la *destruction box* propera a l'extrem N-terminal, que serà el lloc d'ubiquïtinització al final de la mitosi (44) (198) (195) (87). En el cas de la cdk4/cicD s'ha descrit la implicació d'un possible factor que facilitaria l'acoblament del complex (106) (90) (27).

b) La presència de proteïnes inhibidores es poden englobar en dues famílies:

b.1) INK4s: p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D} que reconeixen la cdk4 i la cdk6 lliures (166)

b.2) CIP/KIP: p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, que s'uneixen als complexos cdk2-cicE, cdk2-cicA i cdk4/6-cicD i els inhibeixen, efecte mitjançat per un domini homòleg a totes les CKI d'aquesta família, situat a l'extrem amino.

Inicialment, la funció principal atribuïda a la p21^{CIP1} va ser la d'inhibidora del cicle cel·lular, acció que duria a terme per mitjà de dos mecanismes diferents: de manera indirecta actuant sobre les cdk pròpies de la fase G₁/S (26) o directament

per unió al PCNA (cofactor de la polimerasa δ) fet que impediria la replicació del DNA (101) (189) (94).

Estudis posteriors (90) (106) van ampliar el ventall de les funcions de les proteïnes de la família CIP/KIP. Tindrien la capacitat de promoure la formació dels complexos cdk4/cicD tant *in vivo* com *in vitro* en funció de la concentració de la p21^{CIP1} present. A baixes concentracions de p21^{CIP1} actuarien com a molècula adaptadora del complex actiu cdk4/cicD. Mentre que a altes concentracions inhibirien l'activitat. Com que els llocs d'unió de la p21^{CIP1} als complexos cdk4/cicD són a l'extrem N-terminal i el senyal NLS al C-terminal, s'ha vist en estudis de cotransfecció que la p21^{CIP1} podria facilitar el transport de la cdk4/cicD cap al nucli (90). La perspectiva més recent la dóna el treball (27) on es presenta la p21^{CIP1} i la p27^{KIP1} com a elements clau en la formació del complex cdk4/cicD, a la vegada que confereixen estabilitat dels complexos al nucli, fet que deixa el tema obert a nous estudis.

Un dels mecanismes de resposta al dany del DNA durant la fase G₁ és l'activació del factor de transcripció p53, que regula el gen que codifica la p21^{CIP1} (188). Els ratolins *knockout* per la p21^{CIP1} es desenvolupen normalment, però no responen al dany al DNA durant la fase G₁ (34). A més a més, s'ha vist que l'expressió de p21^{CIP1} també es pot regular independentment de la de p53 (199).

La p27^{KIP1} pot actuar com a tamponadora evitant l'activació prematura de les cdk/cic corresponents a la fase G₁ fins que els nivells dels complexos siguin molt més elevats que els de p27^{KIP1} o fins que els nivells de p27^{KIP1} disminueixin. En mamífers, la p27^{KIP1} i la p21^{CIP1} tenen un 42% d'homologia a l'extrem amino. Aquesta gran similitud fa pensar que tinguin una actuació semblant sobre les cdk, tot i que s'han trobat diferències.

La p27^{KIP1} *in vitro* interacciona amb diferents cdk/cic (cdk1, cdk4, cdk2 i cdk6) i les inactiva. La p27^{KIP1} és un inhibidor més fort per a la cdk2/cicE que per a la cdk2/cicA. Té més afinitat per la cdk4 que per la cdk2 (145) a diferència de la p21^{CIP1}, que té més afinitat per la cdk2, però sembla que no és un bon inhibidor del complex cdk4/cicD (144)

La forma cristal·logràfica del complex ternari cdk2/cicA/p27^{KIP1} suggereix que una sola molècula de la p27 podria inhibir el complex cdk/cic a diferència del que succeiria amb la p21^{CIP1}, cas en el què farien falta més molècules per inactivar el complex (68).

En un gran ventall de tipus cel·lulars (*HeLa*, fibroblasts HS68, HL60), el poder inhibitori de la p27^{KIP1} fluctua, i és al màxim durant la fase G₁ moment en el qual els nivells totals de p27^{KIP1} són màxims. La quantitat de p27^{KIP1} va baixant quant s'entra a la fase S. En altres tipus cel·lulars (entre els quals hi ha les Swiss 3T3), els nivells de p27^{KIP1} varien molt poc durant el cicle cel·lular. A diferència de la p21^{CIP1}, la p27^{KIP1}, generalment, no es controla a la transcripció, sinó que el control es produeix a nivell traduccional i de degradació (via ubiquitina/proteasoma).

Un altre membre de la família CIP/KIP és la p57^{KIP2}. S'ha demostrat que és capaç d'unir-se a la cdk2, cdk3, cdk4 (93) de manera dependent de ciclina i inhibir les activitats. La funció biològica de la p57^{KIP2} és encara desconeguda. S'ha vist que sobreproduint-la en cèl·lules com ara les SAOS-2 i R-1B/L17 el cicle cel·lular s'atura a l'entrada de la fase G₁.

Tots els membres de la família INK4 provoquen aturada del cicle, però ho fan en condicions fisiològiques diferents, en resposta a estímuls variats. Com a membre principal de la família INK4 es pot destacar la p16^(INK4a) (166) (149). La p16^(INK4a) es pot unir *in vitro* a la cdk4 i a la cdk6, però no a la cdk2, ni a la cdc2, cdk5 o al PCNA, i arriba a desplaçar la cicD (166). Com que l'únic substrat conegut de la cdk4 i de la cdk6 és la pRb (proteïna del retinoblastoma), s'entén que la p16^(INK4a) és com un element clau per mantenir la pRb hipofosforilada i, per tant, funcional (veure apartat 2.3.1). S'han descrit mutacions puntuals de p16^(INK4a) a diferents tipus de tumors. Un altre membre de la família INK4 és la p15^{INK4B}, que igual que la p16^(INK4a) té quatre motius anquirina i només és capaç d'unir-se a la cdk4 i cdk6. La seqüència de la p15 i la p16 té un 44% d'homologia en els 50 primers aminoàcids i un 97% en els 81 aminoàcids següents.

L'expressió de la p15^{INK4B} es veu incrementada 30 vegades pel TGF-β a queratinòcits humans. Aquesta propietat també la té la p27^{KIP1}.

c) Fosforilació-defosforilació:

-Fosforilacions activadores. El residu susceptible de ser fosforilat és la Thr 161, descrita a la cdc2 humana. Quan aquest residu es fosforila, la unió a la cicB s'estabilitza. A la cdk2, el residu és la Thr 160 i, a la cdk4, la Thr 172. La defosforilació d'aquest residu, *in vitro*, pot inactivar les cdk. La kinasa responsable d'aquestes fosforilacions en mamífers és la CAK (*cdk activating kinase*) (174) (173), la qual està composta per la cdk7 i la subunitat reguladora cicH (51). Els nivells de la cdk7 són constants durant el cicle cel·lular. La defosforilació de la Thr160-161 pot ser catalitzada *in vitro* per la fosfatasa 2A (PP2A) o per la fosfatasa associada a la cdk (KAP) (146).

-Fosforilacions inhibidores. Les fosforilacions de la Thr 14 i la Tyr 15 (de la cdc2 i cdk2 humanes) tenen una funció inhibidora. La Thr 14 és un lloc exclusiu i típic dels eucariotes superiors, mentre que la Tyr 15 es troba també fosforilada en llevats. Les kinases responsables de fosforilar aquests residus són la Wee1 i la Mik1.

La fosfatasa cdc25 actua defosforilant la Thr14 i la Tyr15 i aconsegueix activar les cdk (només es tenen evidències clares per a la cdk2 i la cdc2). En humans, la cdc25 és codificada per una família de multigens, la cdc25A, la cdc25B i la cdc25C. Actuen en diferents moments del cicle cel·lular; la cdc25A té un paper molt important en la transició G₁/S, podria ser la responsable de l'activació de la cdk4; la cdc25B apareix durant la fase G₁ tardana i té el pic màxim durant la fase S; mentre que la cdc25C està involucrada en la defosforilació i activació de les kinases mitòtiques (cdc2/cicB). Recentment s'ha descrit en humans una kinasa, la Chk1, que fosforila la Ser216 de la cdc25C i la inactiva com a resposta de dany al DNA (161).

Aquestes fosfatases semblen ser un punt clau en el funcionament dels mecanismes d'alerta del cicle cel·lular.

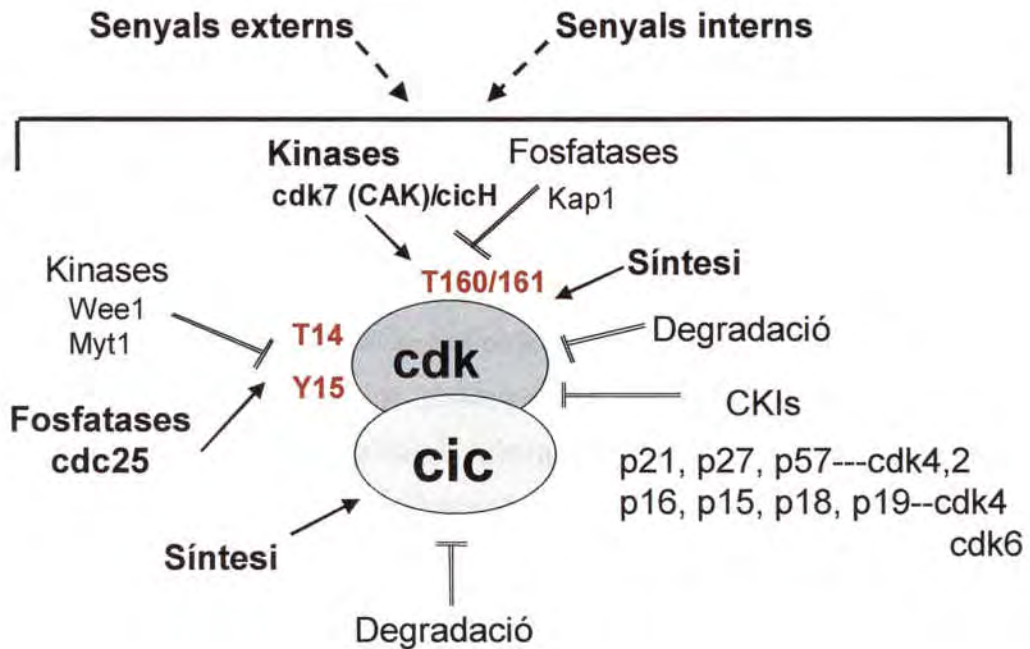


Figura 8. Diferents nivells de regulació de l'activitat kinasa.

d) Altres nivells: localització intracel·lular i associació a proteïnes desconegudes. Atesa la complexitat de la regulació de l'activitat kinasa, segurament queden altres nivells de regulació no ben definits. Alguns autors suggereixen que la localització cel·lular de les cdk i ciclines podria estar regulada per fosforilacions i per l'associació a p21^{CIP1}, p27^{KIP1} (27) i a la p57^{KIP2} (90). En veure que els complexos cdk/cic tenien un pes molecular molt elevat, es va afegir la possibilitat que altres proteïnes poguessin formar part del complex regulant-ne l'activitat (102).

2.3 Regulació del cicle cel·lular

El concepte de punt de restricció va ser definit per Arthur Pardee (11), que va determinar el període abans del punt de restricció com el temps durant el qual el creixement d'una cèl·lula depèn de la presència de factors mitogènics en el medi de cultiu. Va demostrar que aquesta dependència només té lloc en les primeres hores de la fase G_1 i abans del punt de restricció \otimes . Passat el punt \otimes , la cèl·lula és capaç de continuar tot el cicle en absència de sèrum. Aquesta independència respecte dels senyals externs no vol dir que el cicle continuï d'una manera automàtica, ja que hi ha mecanismes d'alerta (*checkpoints*) (12) que vetllen per controlar la integritat del material genètic de la cèl·lula. Els senyals mitogènics solubles promouen la progressió a través de la fase G_1 activant el complex cicD-cdk4/6 i cicE-cdk2, sigui per increment de la cicD o per la inhibició de l'expressió de les proteïnes inhibidores de les kinases (CKI). El paper de la $p21^{CIP1}$ al llarg del cicle cel·lular pot semblar contradictori, ja que els nivells d'aquesta proteïna varien molt; és inexistent en cèl·lules quiescents i augmenta durant el cicle. És per això que la funció inhibidora és cada vegada més discutida.

L'adhesió de les cèl·lules a un substrat és un requisit en la majoria de les cèl·lules (excepte en algunes línies hematopoètiques) perquè es produeixi la progressió de la fase G_1 a la S. En concret, l'adhesió cel·lular és requerida per a la inducció de la cicD1 i per a l'activació de manera indirecta del complex cicE-cdk2, durant la part inicial i mitjana de la fase G_1 (43), mitjançant la regulació negativa dels inhibidors $p21^{CIP1}$ i $p27^{KIP1}$ (201). Per exemple, les cèl·lules de teixits sòlids que es fan créixer en absència de substrat es caracteritzen per tenir concentracions altes de $p27^{KIP1}$, baixos nivells de cicD, així com una disminució en la fosforilació activadora de la T160 de la cdk2 (43), i per la presència de complexos cdk2/cicE inactius (154).

Unes de les molècules importants en la recepció de senyals emesos per factors insolubles ubicats a la matriu extracel·lular (74) (86) són les integrines que interaccionen amb la col·làgena, la fibronectina i la vitronectina. Per això és important la integritat del citosquelet en la progressió del cicle cel·lular (15).

El contacte cèl·lula-cèl·lula també regula la progressió a través de la fase G_1 . Es va veure que si hi havia inhibició per contacte o per haver tractat les cèl·lules amb TGF- β , el cultiu no progressava a través de la fase G_1 . Això es pot deure a un increment de la p15^{INK4B} que s'uneix a la cdk4 i a una major associació de la p27^{KIP1} amb la cdk2/cicE (145) (144), fet que produeix una inhibició de les dues kinases del G_1 .

2.3.1 Punt de restricció $\text{\textcircled{R}}$ i proteïna del retinoblastoma (pRb)

A nivell molecular es creu que el punt de restricció correspon al moment de la fosforilació de la proteïna del retinoblastoma (pRb). La forma hipofosforilada de pRb fa que hi hagi una inhibició del creixement, ja que segresta els factors de transcripció de gens de la fase S i n'evita així l'expressió i, per tant, la progressió a través de la fase S. La pRb inicialment es fosforila per l'acció dels complexos de la cdk4-6 amb la cicD1, D2 o D3. Recentment, s'ha suggerit que aquests complexos només iniciarien la fosforilació. La cdk2/cicE seria el complex que s'activaria durant el pas a través del punt de restricció i més endavant. La durada de l'interval de temps que hi ha fins que s'arriba al punt de restricció dependrà de la capacitat de la cèl·lula per activar la cdk4/cicD i la cdk2/cicE. Això depèn d'estímuls externs, els quals són capaços d'estimular per vies diferents aquestes kinases.

2.4 Cicle cel·lular i calmodulina

Les primeres evidències que la CaM regulava l'inici de la duplicació del DNA es van obtenir a partir d'assajos fets amb inhibidors com ara el W-7, el W-13, el calmidazolium i la trifluoperazina, que fan que el cicle de cèl·lules proliferants s'aturi a l'entrada de la fase S (99), i a l'entrada i la sortida de la mitosi. També s'ha comprovat per transfecció cèl·lules amb vectors que codifiquen per l'mRNA antisentit de la CaM, que la CaM és essencial per a la progressió amb normalitat a través de la transició G_1/S , G_2/M (152) i per la sortida de la mitosi.

S'ha proposat que la CaM afecta l'activitat polimerasa mitjançant una proteïna acceptadora de CaM que activaria la polimerasa α (153). Una altra possible explicació deriva de la relació en la CaM i la regulació l'expressió del *proliferating*

cell nuclear antigen (PCNA), el qual és necessari per a l'activació de la DNA polimerasa δ (97) (98) (99). Fets que ens van fer pensar que la CaM podria regular l'expressió de gens de fase S (amb promotors dependents d'E2F), per mitjà d'un mecanisme general.

L'efecte de la CaM sobre la sortida de la mitosi és mitjançat per una kinasa dependent de CaM, la CaM kinasa II (CaMKII) (10). En la transició de la metafase a l'anafase és necessària la inactivació del complex MPF (*mitosis promoting factor*) format per p34^{cdc2} i ciclina B. La CaMKII regularia la degradació de la cicB (100) i, per tant, la inactivació del complex MPF. Ha estat important la troballa d'una proteïna (p62) acceptadora de CaM, de funció desconeguda, però que és reconeguda per anticossos anti-caldesmon i que pertany a la matriu nuclear d'hepatòcits i astròcits, on forma agregats amb la cromatina condensada i amb la CaM, aquests complexos es difuminen durant la mitosi. Aquests fets han permès pensar que la CaM i la p62 podrien estar implicades en processos de condensació de la cromatina durant la mitosi (147).

També s'ha implicat la CaM en la regulació de la reparació del DNA. Això s'ha estudiat tractant les cèl·lules amb agents que causen dany al DNA com ara la bleomicina (65). S'ha vist que la viabilitat de les cèl·lules tractades amb aquesta droga disminueix quan la CaM és inactiva (23). Altres estudis fets irradiant les cèl·lules amb rajos ultraviolats han suggerit que hi podria haver una activitat endonucleàsica dependent de CaM que seria la responsable de la primera fase en la reparació del DNA (25).

3. El Nucli

Una teoria sobre l'evolució del reticle endoplasmàtic i el nucli es basa en el fet que alguns bacteris tenen el DNA unit a una invaginació de la membrana (o mesosoma). Una formació d'aquest tipus podria haver donat lloc a una cèl·lula eucariota a partir d'una de procariota ancestral. Quan observem una cèl·lula eucariota al microscopi òptic de contrast de fases es poden diferenciar clarament els dos compartiments que la caracteritzen: el nucli i el citoplasma. El límit entre ambdós està delimitat per l'embolcall nuclear. Sovint, a l'interior del nucli podem diferenciar els nuclèols.

El coneixement sobre la ultraestructura cel·lular va donar un gran pas quan s'establiren els fonaments de l'òptica electrònica. Es va demostrar que era possible enfocar un feix d'electrons utilitzant una lent magnètica cilíndrica. Aplicant les noves tecnologies a la preparació del material prèviament a l'observació, es va arribar a conèixer la ultraestructura cel·lular. Si observem una cèl·lula eucariota, degudament tractada i contrastada, al microscopi electrònic (figura 9), podem diferenciar clarament a l'interior del nucli unes zones de cromatina condensada properes a l'embolcall nuclear i unes zones de contingut més esponjós que corresponen a la cromatina descondesada. Fins i tot podem diferenciar que la doble membrana de l'embolcall nuclear presenta unes discontinuïtats, els porus nuclears. La cara externa de la membrana nuclear és una continuació de la del reticle endoplasmàtic. La membrana nuclear interna conté proteïnes específiques que actuen com llocs d'unió a la làmina nuclear, formada per una xarxa de filaments intermedis. L'espai delimitat per ambdues membranes s'anomena lumen o espai perinuclear.

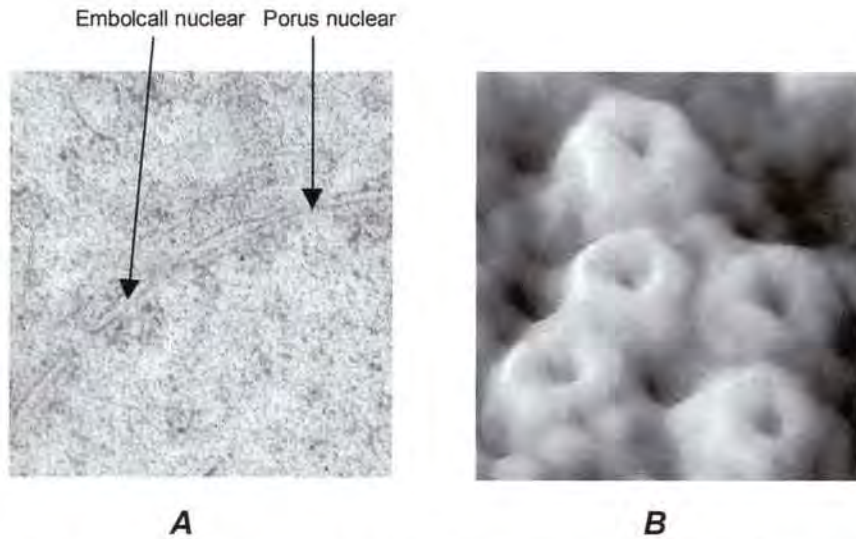


Figura 9. A. Imatge de cèl·lules NRK obtinguda per microscòpia electrònica de transmissió. B. Imatge de porus nuclears de cèl·lules de ronyó de rata, obtingudes mitjançant el microscopi de forma atòmica (151).

Per obtenir una imatge tridimensional del porus nuclear s'han observat els nuclis amb el microscopi de força atòmica, i s'han obtingut unes imatges del porus nuclear en relleu (fig. 9) (151).

3.2 Complex del porus nuclear (CPN): estructura i funcions

Cada porus nuclear està constituït per una gran estructura discoïdal de 125 nm de diàmetre de simetria octagonal, coneguda com a *complex del porus nuclear* (CPN). Experiments fets amb embolcalls nuclears aïllats dels oòcits de *Xenopus laevis* indiquen que l'estructura del CPN canvia moltíssim en resposta a l'ATP i al Ca^{2+} (151). El CPN és una estructura molt dinàmica, el nombre de porus d'un nucli pot variar segons l'estat de la cèl·lula (entre 10^2 i 5×10^7 CPN per nucli). Per exemple, en un oòcit inactiu hi hauria 3 CPN/ μm^2 a l'embolcall nuclear, mentre que en una cèl·lula sòmica diferenciada hi hauria de l'ordre de 15-20 CPN/ μm^2 . L'estat del CPN pot estar regulat hormonalment; per exemple, l'aldosterona pot conduir el CPN a un estat actiu (129).

Malgrat la gran diversitat de proteïnes que formen el complex del porus nuclear, han estat molt poques les que s'han caracteritzat a nivell molecular. S'han descrit

algunes proteïnes integrals de membrana que uneixen el complex del porus a la membrana nuclear. A més a més hi ha proteïnes perifèriques o nucleoporines que representen el 15% de la massa del porus (13) (133). Aquestes es classifiquen en dos grups segons quina és la seqüència d'aminoàcids repetits que tenen: X-F-X-F i les del grup G-L-F-G (X representa qualsevol aminoàcid).

Un model adaptat (fig. 10) a partir del que va ser proposat per Agutter et al. (4) descriu l'existència de tres tipus de components diferents en el CPN:

— Un anell central o porus (*plug o transporter*, de 12 MDa) a través del qual es fa el transport de molècules i on es diferencien tres tipus de subunitats protèiques:

- Subunitat columnar, que constitueix la paret protèica longitudinal del porus i els seus components s'agrupen formant un octàmer.
- Subunitat anular, a partir del qual surten vuit radis que estan units per un extrem als components de la subunitat columnar i que per l'altre estan dirigits cap al centre del porus.
- Un component luminal format per vuit radis que travessen la membrana nuclear. S'ha de destacar la glicoproteïna de transmembrana gp210, que ocupa gran part d'aquesta zona i que es creu que té un paper molt important en l'ancoratge del complex a la membrana nuclear. Té la major part de la massa a l'espai perinuclear i només presenta un únic domini transmembrànic i un domini C-terminal molt curt que forma part de la subunitat columnar.

— Anells perifèrics:

- N'hi ha un de citoplasmàtic que està unit a la subunitat columnar del component central del porus. També està constituït per vuit subunitats (32 MDa) de composició i funció desconeguda.
- N'hi ha un altre de nuclear, de composició semblant al citoplasmàtic, però que està format per un nombre menor de proteïnes i és més sensible a la proteòlisi.
- També s'ha d'assenyalar l'existència d'unes fibrilles (135) que sobresurten de l'anell nuclear i del citoplasmàtic, que defineixen a la cara nuclear unes cistelles que tenen una composició que és semblant a la dels filaments intermedis. Les

fibriles estan constituïdes per algunes nucleoporines (la Nup180 i la Nup 124) i es creu que s'uneixen a filaments del citoesquelet.

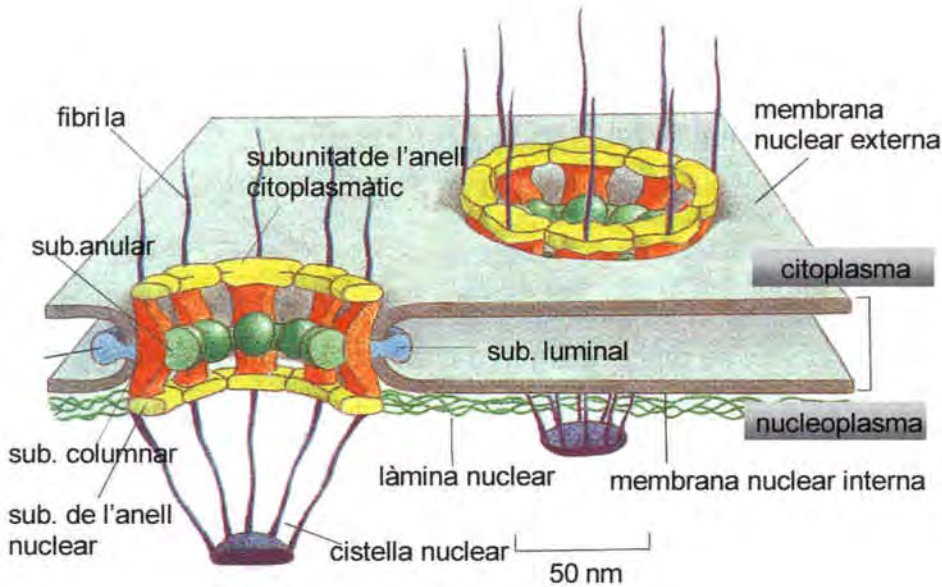


Figura 10. Adaptació dels components de complex del porus nuclear (CPN) feta a partir de B. Alberts: *Biología Molecular de la Célula*.

A més a més de tots aquests complexos proteics, el CPN presentaria uns canals perifèrics situats entre els braços radials de la subunitat luminal i la columnar. Evidències experimentals suggereixen que aquests canals perifèrics són la ruta de difusió de les molècules o dels ions del citoplasma al nucli i viceversa. Estudis electrofisiològics (*patch-clamp*) (19) han demostrat que el flux d'ions com ara el Ca^{2+} s'atura i que la conductància és menyspreable durant la translocació de macromolècules, factors de transcripció, l'mRNA i altres partícules de dimensions majors que les susceptibles de passar de manera passiva a través del CPN. Això dóna suport a la idea que el transport a través del porus nuclear no és indiscriminat.

En el model del CPN proposat per Panté (figura 11) es classifiquen cinc epítops de nucleoporines diferents: CAN/Nup214/p250, Trp/p265, i RanBP2/Nup358, epítops presents als filaments de la part citoplasmàtica, mentre que la Nup153

exhibeix un epítip prop de l'anell terminal del cistell nuclear i que s'uneix al cistell però no als filaments. La Nup153 conté motius *zinc-fingers* que s'uneixen *in vitro* al DNA de manera dependent de zinc. No es coneix si *in vivo* passa el mateix, però aquesta observació suggereix que el porus nuclear podria organitzar el DNA. La nucleoporina p62 està localitzada tant a la cara nuclear com a la citoplasmàtica. Quatre d'aquests polipèptids (p62, Nup 153, CAN/Nup214/p250 i Ran BP2) són membres de la família *O-linked glycoprotein* i tenen modificats més de 10-20 llocs amb *O-linked N-acetyl-glucosamine* (GlcNac) que poden unir la *lectin wheat germ agglutinin* (WGA).

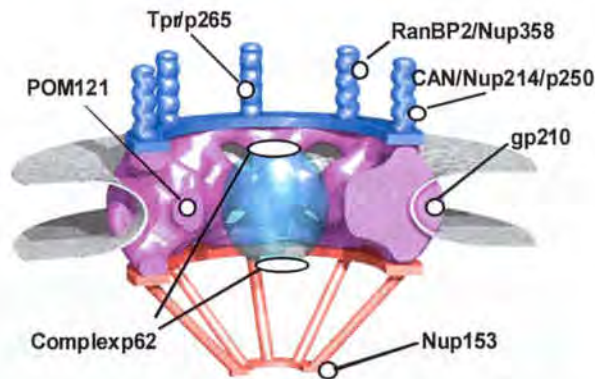


Figura 11. Ultraestructura del complex del por nuclear. Adaptació feta per N. Panté a partir de (133) (134).

3.2 Importació-exportació de proteïnes cap al nucli

A les cèl·lules eucariotes la duplicació del DNA i la biogènesi de l'RNA té lloc al nucli, mentre que la síntesi de proteïnes s'esdevé al citoplasma. Com que la transcripció i la traducció tenen lloc a compartiments diferents, hi haurà d'haver un transport específic i bidireccional a través del complex del porus nuclear (CPN). Així doncs, totes les proteïnes nuclears seran importades des del citoplasma (on es produeixen) fins al nucli (on tenen la seva funció).

No s'ha descrit cap senyal d'exportació per als RNA que sigui semblant als NLS, però es coneix que hi estan implicades partícules anomenades ribonucleoproteïnes (RNP). Aquestes RNP en continu moviment (entre nucli i citoplasma) són bones candidates per actuar de mitjançadores en l'exportació de

l'RNA. Els diferents tipus de RNA (mRNA, tRNA) hauran d'anar del nucli al citoplasma (119) perquè puguin ser traduïts a proteïna.

D'altra banda, la unió dels ribosomes als nuclèols requereix la importació de les proteïnes ribosòmiques des del citoplasma, la seva incorporació a les subunitats ribosòmiques i la reexportació cap al citoplasma.

D'ençà que es va descriure que la localització intracel·lular de factors de transcripció (169) (54), morfogens (177) (158) i productes d'oncogens (64) estava vinculada als canvis intrínsecs de la diferenciació i a altres estats metabòlics de la cèl·lula eucariota, es va considerar que la importació de proteïnes cap al nucli era un element clau en la regulació de l'expressió de gens i de la transducció de senyal (78). S'ha demostrat la importància que té el contingut cel·lular de Ca^{2+} sobre la regulació del transport. El tractament amb ionòfors o inhibidors de la bomba de Ca^{2+} fa que s'aturi el transport passiu a través del porus nuclear (62); això demostra la importància d'aquest ió en el transport nuclear.

L'establiment d'uns cànons per al transport de molècules a través del complex del porus nuclear és motiu de controvèrsia (66) (178) (4) (58) (122). Molècules més petites de 40-45 kDa es poden difondre lliurement, independentment de l'energia i de la temperatura, i ho faran utilitzant els canals aquosos perifèrics d'uns 9 nm de diàmetre; les molècules així transportades podran ser retingudes al nucli per components nuclears insolubles. D'altra banda, proteïnes més grans de 45 kD requereixen d'un senyal de localització nuclear (NLS, *nuclear localization signal*) (82) (92) (163), que es caracteritza per tenir una o dues cadenes curtes d'aminoàcids bàsics (38). Aquest tipus de transport és dependent d'ATP i sensible a la temperatura (156) (121). L'existència d'un senyal d'exportació nuclear (NES) regula la sortida de les proteïnes que la presenten des del nucli cap al citoplasma.

3.2.1 Model d'importació i exportació de proteïnes portadores de senyals clàssics de localització nuclear (NLS)

Les proteïnes destinades a ser importades cap al nucli (proteïnes cariofílques) contenen una seqüència NLS. Malgrat que no hi ha una seqüència *consensus* per a les NLS (38), les podem agrupar en 2 classes:

— La primera classe consisteix en una sèrie curta d'aminoàcids bàsics (82) (81). L'exemple típic és l'antigen T del virus SV40 (PKKKRKV¹³²), que està molt ben caracteritzat. Se sap que una simple substitució per una N o T en el residu K¹²⁸ fa que la localització sigui citoplasmàtica. Atesa la impossibilitat d'establir una seqüència *consensus*, s'han fet estudis d'estructura secundària (92), i s'ha trobat que la conformació és clau per a l'accessibilitat del senyal NLS.

— Les seqüència *bipartites*, descrites a la nucleoplasmina (157). Formada per dos grups de residus bàsics separats per uns 10-12 aminoàcids (38). En aquests tipus de senyals la conformació o la hidrofobicitat és molt important perquè puguin ser reconeguts els dos braços del NLS.

També han estat descrites altres seqüències NLS molt més llargues i complicades (se'n parlarà més endavant (171) (83) (84) en l'apartat 3.2.3)

La importació de proteïnes portadores d'un senyal NLS es du a terme en dues etapes principals: la primera té lloc al citoplasma i és independent de l'energia i la temperatura mentre que el pas a través del por nuclear és dependent d'energia (ATP) i de temperatura. Ambdues etapes requereixen factors citoplasmàtics específics per a cada pas, els quals poden ser separats bioquímicament en fraccions diferents (115).

A la figura 12 es descriuen tots els passos proposats per al transport de proteïnes amb NLS. Un primer esdeveniment citoplasmàtic és el reconeixement i unió de la importina- α a la seqüència NLS (1). Aquest complex, conjuntament amb la importina- β , podrà traspasar el porus nuclear. Hi ha casos en els quals el paper de la importina α no és imprescindible, ja que el substrat es pot unir directament a la importina β (59) (191). La importina- β presenta el domini IBB, que és el responsable de la unió amb la importina- α i amb altres proteïnes que poden ser transportades cap al nucli directament unides a la importina- β . Això fa pensar que

evolutivament la importina- β devia ser el transportador original per a proteïnes portadores de seqüències que reconeguessin al domini IBB de la importina- β . L'aparició de les subunitats- α amplia el ventall de proteïnes susceptibles de ser transportades cap al nucli. En tot cas, el pas del trímer (substrat/importina- α /importina- β) a través del CPN és dependent d'energia i requereix la hidròlisi del GTP per part de Ran (108). Una vegada el substrat és a l'interior del nucli, es reciclaran els factors solubles que l'han acompanyat per poder tornar a començar un altra volta d'importació. La dissociació del trímer a l'interior del nucli té lloc mercès a la unió del RanGTP a la importina- β (155) (28) (60). La importina β és probablement exportada cap el citoplasma formant complex amb el RanGTP, fet que evita que s'exporti la importina- α (77). Una vegada al citoplasma, el RanGTP és alliberat de la importina- β amb l'ajuda del RanBP1, el RanGAP1 (proteïna que activa a la GTPasa) i la importina- α . D'altra banda, l'exportació de la importina- α requereix un receptor específic nuclear, anomenat CAS (89). La importina- α unida al RanGTP té més afinitat pel CAS que per la importina- β .

La asimetria en les formes RanGTP/RanGDP (més RanGTP al nucli que al citoplasma) determina que hi hagi una unió molt forta entre la importina- α i la β al citoplasma, però al nucli la importina- α tindrà més afinitat pel CAS. Una vegada format, el trímer RanGTP/CAS/importina- α probablement es transferirà directament al citoplasma. Al citoplasma, el RanBP1 provoca la dissociació del RanGTP del complex importina- α /CAS/RanGTP, i ho fa de manera irreversible mercès a la hidròlisi del GTP per part del RanGAP1. La forma de CAS sense Ran té baixa afinitat per la importina- α , l'allibera i aquesta pot formar un complex amb la importina- β , que pot així restablir el trímer i tornar a participar en una volta d'importació. L'exportació de la importina- β requereix que estigui formant complex amb el RanGTP, i la seva separació (al citoplasma) és dependent de RanBP1, de Ran GAP1 i de la importina- α . Sembla que, per cicle, s'exporten dues molècules de Ran, però encara es desconeix com es restableixen els nivells de Ran al nucli. La direccionalitat en el transport està determinada en gran part, com ja s'ha esmentat abans, pel cicle de la Ran GTPasa i, a més a més, per la localització

cel·lular dels reguladors: l'RCC1 (factor bescanviador dels guanin nucleòtids) és exclusivament nuclear, mentre que la RanGAP1 és majoritàriament citoplasmàtica. Així doncs, al citoplasma, la forma que hi haurà serà la Ran-GDP, mentre que al nucli hi haurà la forma Ran-GTP, la qual permetrà que s'alliberi la proteïna que carregava al nucleoplasma per dissociació del complex.

La translocació del trímer substrat-NLS/importina- α /importina- β pot ser inhibida tant per la *lectin wheat-germ agglutinin* (WGA) (1) (47) (32) (111) com per anticossos contra el motiu X-F-X-F o G-L-F-G de les proteïnes del complex del porus nuclear (nucleoporines) (9) (31) (46) (61). Aquest fet indica que el CPN és l'única via que tenen les proteïnes d'entrar al nucli i que les nucleoporines són imprescindibles perquè es produeixi el transport, a més a més dels components citoplasmàtics esmentats. La nomenclatura d'aquests factors solubles (170) pot ser ambigua, és per això que es recomana consultar la taula 2.

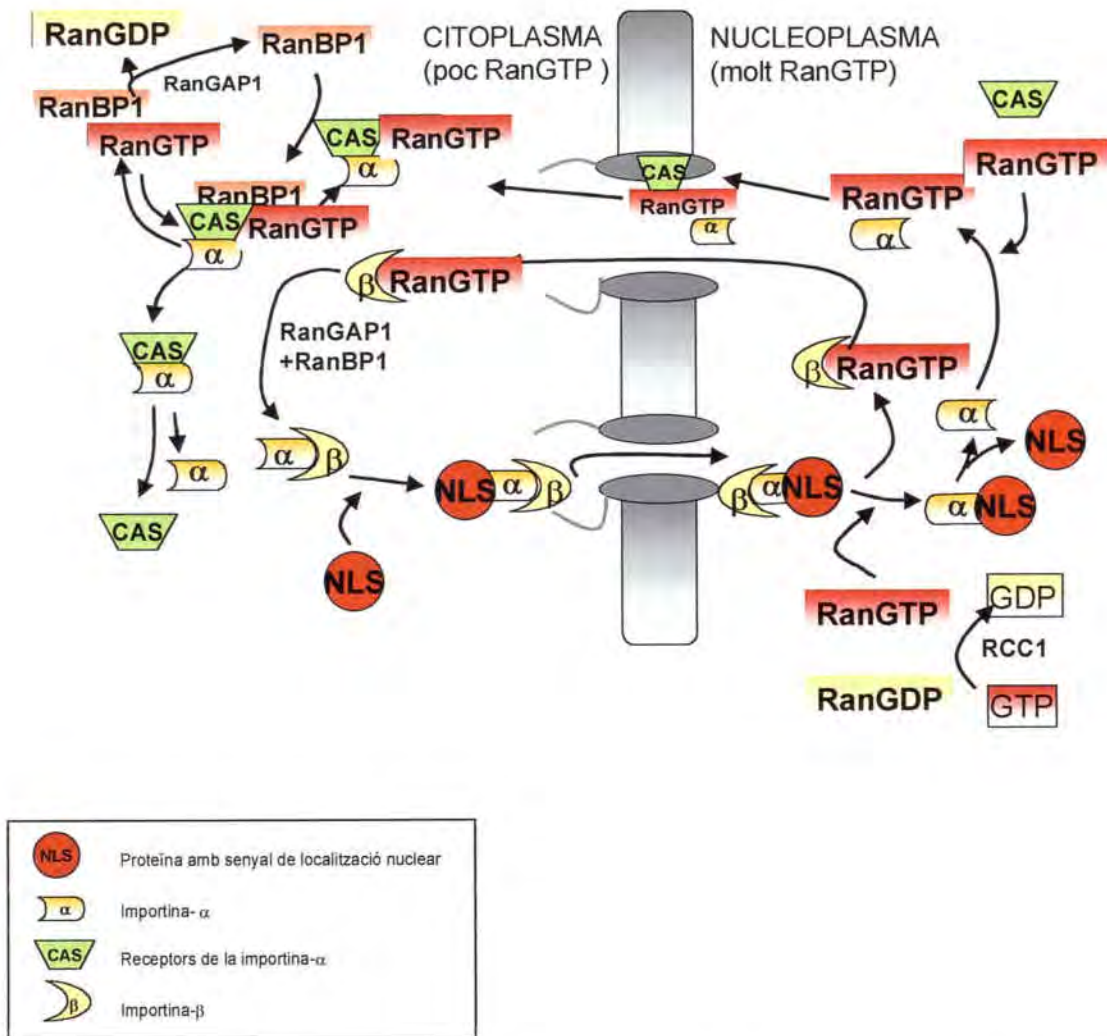


Figura 12. Model de transport de proteïnes amb senyal NLS, adaptat a partir de D. Görlich (1998): *EMBO J.*, 17:2721-2727(58)

Sistema Ran

Nom, homòlegs a diferents sp.	Localització cel·lular	Efectes sobre la RanGTPasa	Efecte sobre la importació
Ran (vert.) Gsp1p (II)	Principalment nuclear També trobada al NPC i al citoplasma	-	<i>In vivo</i> i <i>in vitro</i> és essencial. Proporciona l'energia per a la translocació; regula la interacció entre la importina- α i la β
RCC1(vert.) Prp20p (II)	Nuclear, unit a cromatina	Factor intercanviador GDP/GTP. Estimula l'intercanvi de nucleòtids $\times 10^5$ cops	<i>In vivo</i> és essencial. <i>In vitro</i> no cal perquè no es perd en cèl·lules permeabilitzades. Genera gradients de Ran-GTP a través de l'NE.
RanGAP1(vert.) Rna1p (II)	Soluble al citoplasma i unit als filaments de l'NPC	Activa la RanGTPasa $\times 10^5$ cops, converteix Ran-GTP en Ran-GDP	És essencial <i>in vivo</i> ; és estimulador <i>in vitro</i> (no es perd del tot a les cèl·lules permeabilitzades). Genera gradient de Ran-GTP a través de l'embolcall nuclear i a partir del Ran-GTP del citoplasma.
RanBP1 (vert.) Yrb 1 p	Citoplasmàtic. Exclòs del nucli per un senyal d'exportació i per retenció citoplasmàtica	S'uneix específicament a Ran-GTP, $K_D = 0,3nM$ bloqueja l'intercanvi de nucleòtids; estimula $\times 10$ cops l'activació de GTPasa per RanGAP1	<i>In vivo</i> és essencial i estimulador <i>in vitro</i> . Contribueix al gradient de Ran-GTP a través de l'NE.
Ran BP2(vert.)	A l'extrem dels filaments citoplasmàtics de l'NPC	Conté quatre dominis d'homologia de RanBP1 que es comporten com RanBP1	Podria constituir un lloc d'ancoratge per al complex NLS-receptor. Probablement és funcional lligat amb RanBP1. No és equivalent a Sc
Importina- β , p97, PTAC 97 (m) Kap95p (II)	NPC; entra i surt del nucli al citoplasma	S'uneix específicament a Ran-GTP ($K_D = 1 nM$); bloqueja l'intercanvi de nucleòtids; inhibeix l'ATPasa intrínseca; evita l'activació de la GTPasa per RanGAP1. Pot formar un trimer importina β -RanGTP-RanBP1	Mitjançador clau per la importació de proteïnes amb NLS; essencial tant <i>in vivo</i> com <i>in vitro</i> . Interacciona amb el GTP per acabar la importació
NTF2 (vert., II.)	Soluble i a l'NPC	No té un efecte obvi sobre la RanGTPasa	Normalment és essencial <i>in vivo</i> . <i>In vitro</i> és estimulador

Taula 2. modificació de (57) (vert.): vertebrats; (II): llevat; (D): *Drosophila*; (m): mamífers; (h): humans.

3.2.2 *Piggy back*

Hi ha un gran nombre de proteïnes més grans de 45 kDa que malgrat no tenir una NLS funcional són nuclears. Ho aconseguen sent cotransportades per a proteïnes amb NLS. És el cas de la cdc2, que forma complex amb la cicB que té tres possibles seqüències NLS: PKKRHA⁶¹, SKKRRQP¹¹⁷ i PKKLKKD¹⁶⁰. La possibilitat de les cdk per formar complexos amb factors nuclears com ara la p107^{Rb}, la cicA, i l'E2F facilita la variabilitat en les diferents maneres de ser transportats cap al nucli (12). També s'ha demostrat el procés invers: proteïnes que presenten NLS però que són retingudes al citoplasma per associació a proteïnes citoplasmàtiques.

3.2.3 Altres tipus de senyals de transport nuclear

Estudis recents posen de manifest l'existència d'altres tipus de senyals que determinen la direccionalitat en el transport actiu d'una proteïna. Es va veure que la importació de les U snRNP (110) (49) i algunes glicoproteïnes no competia amb el de proteïnes que contenen un senyal NLS clàssic, però el factor involucrat no va ser caracteritzat. També es va estudiar el transport intracel·lular de la família de les ribonucleoproteïnes (hnRNP), les quals s'uneixen als transcrits naixents de l'RNA polimerasa II i influencien sobre el metabolisme d'aquests RNA. En vertebrats hi ha més de 20 tipus diferents de hnRNP (de l'A a la U), molt abundants al nucli (40). Els grups més ben estudiats són els hnRNP C1, C2 i U, de localització nuclear; es va descriure un factor de retenció nuclear per a la C1 (118) capaç de retenir proteïnes al nucli que normalment serien exportades cap al citoplasma. Un altre grup de proteïnes que tant es troben al nucli com al citoplasma, en continu moviment d'un compartiment a l'altre, són les hnRNP A1, A2, i K, que tenen un paper important en l'exportació cap al citoplasma de l'mRNA (142). Va ser en aquest grup, concretament en la hnRNPA1, que es va descriure un nou tipus de senyal que intervenia tant en la importació (171) (190) com en l'exportació (109). El domini compost per 38 aminoàcids i proper a l'extrem carboxi terminal va ser anomenat M9. Es diferencia de la clàssica NLS en el fet que no té residus bàsics i que tampoc necessita la importina- α . Es va trobar un

receptor (la transportina) que s'uneix específicament amb el senyal M9, i no pas amb el NLS.

La transportina té un 35% d'homologia amb la proteïna del llevat YBR0224, i ambdues són un 25% homòlogues amb la importina- β . Així doncs, la importina- β i la transportina podrien tenir un paper similar en el transport de les proteïnes portadores de senyals (NLS o M9, respectivament) cap al nucli.

La transportina pot funcionar com a exportadora o com a importadora segon quines siguin les molècules reguladores en el nucli i el citoplasma.

3.2.4 Chaperones

Les *chaperones* són aquelles proteïnes que formen complexos amb d'altres durant els canvis conformacionals, només són necessàries per a la unió i el replegament, però no formen part de l'estructura madura. Actuen com a molècules estabilitzadores, preveuen possibles errors en la conformació i la seva actuació representa una despesa d'energia. Les *chaperones* són necessàries durant el transport de proteïnes pels diferents compartiments cel·lulars, és per això que s'han fet grans esforços en la identificació de proteïnes unides al senyal NLS (NLSBP).

Diferents treballs (197) (130) (150) parlen de la possible implicació en el transport cap al nucli d'unes proteïnes de la família de les d'estrès HSP 70, les quals són capaces d'unir-se directament a la seqüència NLS.

3.2.5 Factors de retenció citoplasmàtics i emmascarament del senyal

A part dels senyals intrínsecs a una proteïna s'han de tenir en compte els provinents de l'exterior. La cèl·lula induirà a transportar uns determinats tipus de proteïnes cap el nucli, principalment factors de transcripció, quan rebi els estímuls necessaris, com poden ser els hormonals. S'ha descrit retenció citoplasmàtica per a c-fos (159) i per al receptor dels glucocorticoides. En absència de l'hormona (glucocorticoide) la *heat shock protein* Hsp90 retindrà al citoplasma el receptor de glucocorticoides (56) (139) (140). També s'ha descrit la retenció citoplasmàtica

per a la cicB, la qual és capaç de translocar al nucli al final de la fase G₂ (141), però les darreres tendències parlen més de regulació de l'exportació (196) (185).

Un altre aspecte que cal tenir en compte és l'emascament de senyals NLS. Per exemple, la fosforilació per part de la cdc2 a la Thr¹²⁴ adjacent a el NLS del T-Ag fa que es redueixi el transport cap al nucli malgrat tenir el NLS. Com s'ha esmentat abans, l'accessibilitat del senyal és un factor clau en la funcionalitat dels senyals de transport nuclear. El grau d'accessibilitat pot estar alterat per la interacció amb altres proteïnes i per fosforilacions que també podrien afectar a la funcionalitat, en alguns casos estimulants el transport de proteïnes cap al nucli i en d'altres inhibint-lo.

Un altre exemple, esquematitzat a la figura 13, és el cas de l'NF-AT, que quan és al citoplasma presenta un senyal NLS críptic. Mercès a l'actuació del Ca²⁺/CaM que activa a la calcineurina (CnA i CnB), les serines presents a l'extrem N-terminal de l'NF-AT es defosforilen i s'arriba a exposar el NLS. Aquesta forma defosforilada es transportarà al nucli, on se sotmetrà a l'acció d'una kinasa (la kinasa NF-AT4), així tornarà a emascarar el NLS i deixarà exposada la NES (168) (162). D'aquesta manera és com l'NF-AT tornarà cap al citoplasma. La unió i l'acció continuada de la calcineurina, permet que l'NF-AT romanguí al nucli durant més temps.

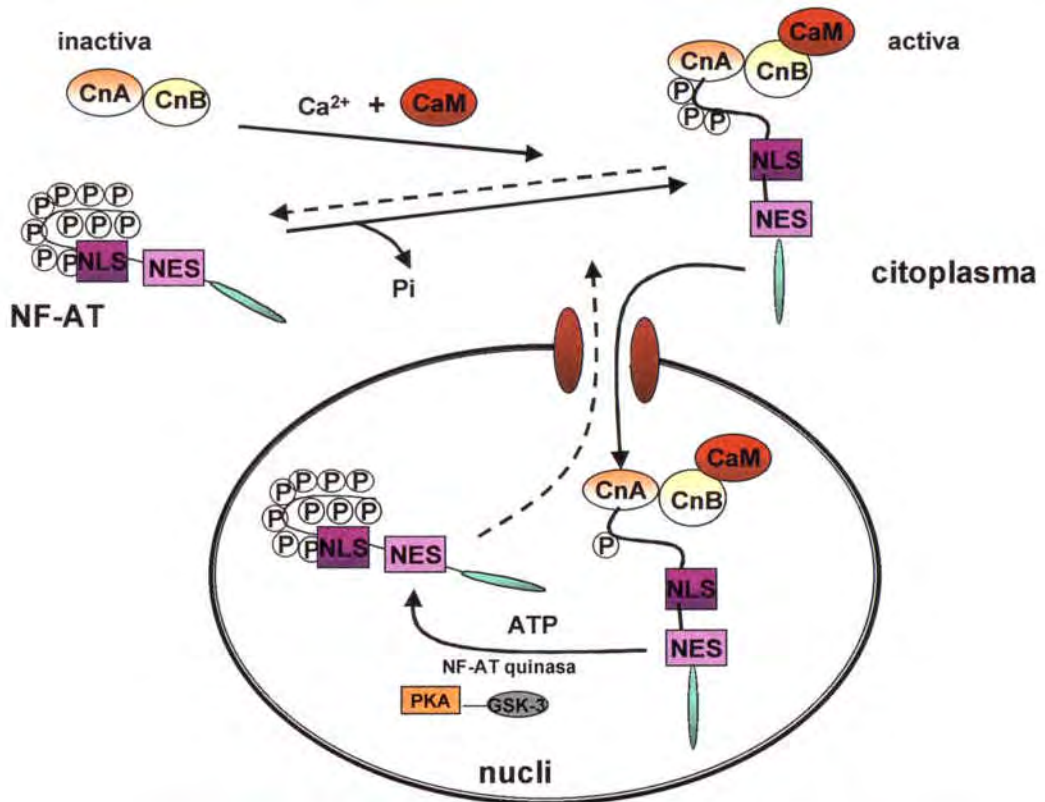


Figura 13. Model d'activació i emmascarament del senyal NLS de l'NF-AT modulats per la CaM.

3.2.6 Els senyals d'exportació nuclears (*nuclear exportation signals: NES*) i regulació

Les primeres evidències que les proteïnes podien sortir del nucli es van trobar estudiant proteïnes marcades radioactivament en nuclis d'amebes. Quan aquests eren trasplantats a amebes no marcades es podia veure que la marca apareixia a la cèl·lula receptora. Actualment, tècniques com ara la injecció d'oòcits de *Xenopus*, la microinjecció de nuclis de cèl·lules somàtiques i assajos amb heterocarions han permès estudiar l'exportació de proteïnes des del nucli cap al citoplasma i s'ha caracteritzat com a actiu i dependent de temperatura. D'altra banda, la major part de l'RNA que se sintetitza al nucli té la seva funció al citoplasma (com, per exemple, l'mRNA, l'rRNA, l'tRNA) o ha de madurar al citoplasma abans que sigui reimportat al nucli (l'snRNA-*small nuclear-* de l'esplíceosoma és exportat com un complex de proteïna-RNA o RNP).

Sovint es classifiquen els senyals d'exportació nuclear (NES) en tres tipus:

— Els senyals rics en leucines: seqüència inicialment identificada en l'inhibidor de la proteïna kinasa A i en la proteïna Rev del virus HIV-1 (69). Per analogia amb els senyals NLS, el transport de les proteïnes amb aquest tipus de senyal és saturable (50), això indica que hi ha receptors específics (transportines) que reconeixen aquestes seqüències NES. Una d'aquestes transportines és la proteïna anomenada CRM1 (52) (120) (5).

HIV-1 Rev	73	L Q L P P L E R L T L	83
PKI	37	L A L K - L A G L D L	46

La cicB1 i la cdc25 són exemples de proteïnes amb aquest tipus de senyals de gran implicació en la regulació del cycle cel·lular.

La cicB1 s'acumula al citoplasma durant la transició G₂/M i transloca al nucli durant la profase (185). El tractament de cèl·lules *HeLa* amb drogues que inhibeixen directament el receptor del senyal NES, com ara la leptomicina B (LMB), fa que la cicB1 s'acumuli al nucli durant la fase G₂.

La *cdc25*, a *S. pombe*, és exportada del nucli en resposta al dany ocasionat al DNA. La kinasa Chk1 s'activa i defosforila la *cdc25*, i li facilita la unió a la Rad 24, que serà la responsable de l'exportació de la *cdc25* al citoplasma. El complex *cicB/cdc2* (ubicat al nucli) romandrà en la forma inactiva (fosforilada) i les cèl·lules no podran entrar en mitosi fins que el dany al DNA hagi estat reparat (96).

Recentment (179) s'ha postulat un model sobre la regulació de la localització subcel·lular de la p53. Es basa en la capacitat que té la p53 de formar monòmers, dímers i tetràmers i en l'emascament dels senyals NES. Els subtrats òptims per ser transportats al citoplasma són els monòmers o els dímers, mentre que els senyals d'estrès faciliten la formació dels tetràmers, i el senyal NES queda amagat amb la consegüent retenció de la p53 al nucli. L'existència d'una proteïna amb senyal NES que s'uneix a la p53, la MDM2 podria facilitar l'exportació de la p53 al citoplasma.

— La seqüència M9 de hnRNP A1 (introduïda en l'apartat 3.2.3) (109). La transportina també és una bona candidata per fer de receptor a aquest tipus de proteïnes :

HnRNPA1: 268 NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY 305

L'exportació de proteïnes amb senyal M9 es bloca a 4°C, malgrat produir-se la interacció proteïna-receptor però es bloqueja el pas del complex a través del CPN. Aquest fet indica que M9 podria servir com senyal en el transport facilitat de macromolècules. Podent mitjançar tant l'exportació com la importació.

— Els 24 aminoàcids trobats en hnRNP K anomenats KNS (119) (55)

hnRNP K 338 GFSADETWDS AIDTWSPSEWQMAY 361

3.2.7 Paper de la CaM en el transport nuclear

La detecció de CaMBP implicada en el sistema contràctil actina-miosina al nucli, i el fet que utilitzant anticossos contra l'actina s'arribava a blocar el transport *in vitro* de proteïnes cap al nucli, suggereix que aquest sistema contràctil pot intervenir en processos de transport nucli-citoplasma.

Treballs de transport *in vitro* mitjançant la permeabilització selectiva de la membrana citoplasmàtica utilitzant digitonina, i introduint un substracte marcat fluorescentment i amb un seguiment posterior per microscòpia, ha permès proposar la hipòtesi següent sobre dues possibles vies d'entrada al nucli de les proteïnes amb un senyal clàssic de localització nuclear (NLS) (vegeu la figura 14).

— En una situació de quiescència, amb el reservori de Ca^{2+} perinuclear intacte i una concentració baixa de Ca^{2+} al citoplasma, el transport que s'activarà és el clàssic (no dependent de CaM i dependent de GTP). La asimetria en el contingut de GTP, baix al citoplasma i alt contingut de GTP al nucli, és fonamental a l'hora que es produeixi el transport.

— En cèl·lules activades per proliferar, el reservori de Ca^{2+} del *lumen* de l'embolcall nuclear s'allibera al citoplasma i s'activa el transport dependent de Ca^{2+} /CaM i no dependent de GTP.

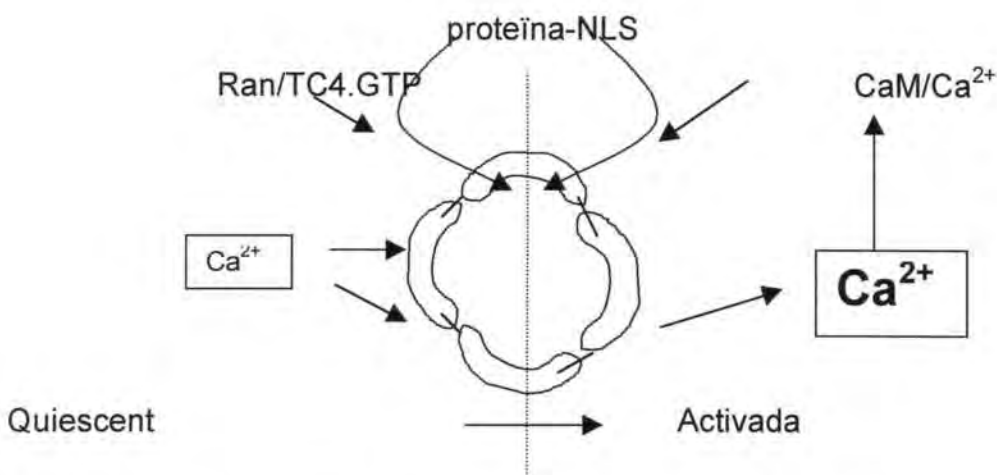


Figura 14. Model de transport nuclear de senyals NLS, postulat per T.D Sweitzer 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:14574-14579 (180)

El fet que la CaM/Ca²⁺ fos necessària per a l'activació de diversos enzims replicatius com, per exemple, la DNA pol α , DNA pol δ i l'expressió d'altres proteïnes implicades en la replicació com ara el PCNA (vegeu la tesi de la Dra. Antònia López Girona) ens va fer plantejar la hipòtesi de treball que la CaM estava implicada en la progressió a través de la fase G₁ del cicle cel·lular i en la transició de la fase G₁ a la S. Aquest paper regulador de la CaM/Ca²⁺ s'integraria en l'actuació d'un mecanisme motor del cicle cel·lular.

Per tant, ens vam proposar estudiar:

- i) Si la CaM/Ca²⁺ era necessària per a l'activació de les kinases depenents de ciclina durant la fase G₁.

En el cas que el punt (i) fos cert, es procediria a estudiar:

- ii) Per quin mecanisme tindria lloc aquesta regulació.
- iii) Quina o quines eren les CaMBP implicades.



1. Models cel·lulars

La gran majoria de línies cel·lulars que s'han utilitzat en aquest estudi s'han obtingut de la col·lecció ATCC :

- i) NRK-49F (*normal rat kidney*). Línia immortalitzada de fibroblasts obtinguts a partir de ronyó de rata.
- ii) Hela 229 CCL-2: cèl·lules aneuploides de morfologia epitelial derivades de teixit humà i mantingudes en subcultius. Derivades d'un carcinoma de cèrvix.
- iii) Namalwa: línia limfoblastoide derivada de limfòcits B humans

També s'ha fet servir un cultiu primari:

- iv) Fibroblasts humans.

1.1 Rutina de cultiu i subcultiu de cèl·lules

Tot el material que s'utilitza ha de ser estèril. Les dissolucions s'han de pre-escalfar a 37°C abans de ser emprades.

Les cèl·lules NRK s'han de mantenir subconfluentes, en cas contrari arribarien a transformar-se. Es fan créixer en un incubador amb un 5% de CO₂ i a 37°C.

El medi utilitzat pel cultiu de les cèl·lules NRK i Hela va ser el Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biological Industries) per les NRK i, el MEM (Modified Essential Medium, Biological Industries) per a les Hela; ambdós suplementats amb:

2 mM de L-glutamina (MERCK)

1% d'àminoàcids no essencials (*Biological Industries*)

5% de sèrum fetal boví (*foetal calf serum*, FCS, de Biological Industries)

antibiòtics (penicil·lina:estreptomocina, 1:1, de Biological Industries).

1 mM d'àcid pirúvic (SIGMA)

El FCS s'emmagatzema congelat i abans d'utilitzar-lo s'ha de desactivar durant 20-30 min a 56°C.

Les Namalwa creixen en suspensió (1×10^6 cèl·lules/ml) en el medi RPMI 1640 (Flow Laboratories) suplementat amb 10% de FCS (Biological Industries), 2 mM de L-glutamina i 50 µg/ml de gentamicina (Biological Industries).

El subcultiu de la línia limfoblastoide és molt més simple que les que creixen adherides a un substrat. Tan sols s'ha de procedir a una dilució del cultiu original. La tècnica emprada per desengaxar les cèl·lules que creixen adherides a un substrat es detalla a continuació:

— Tripsinització: aquest mètode de disgregació cel·lular mitjançant agents químics com ara la Tripsina-EDTA (Gibco BRL) s'utilitza per desenganxar les cèl·lules del substrat al qual creixen adherides i poder procedir a subcultivar-les.

- Els cultius subconfluents es tripsinitzen posant un volum de la solució 1x de tripsina que cobreixi la superfície del flascó o de la placa.

- S'incuba a l'interior de l'estufa de cultius fins que les cèl·lules s'alliberin del substrat.

- S'inactiva la tripsina mitjançant FCS. S'ha d'afegir la mateixa quantitat de medi suplementat amb el doble de FCS (respecte el percentatge de FCS que s'utilitzi per fer créixer les cèl·lules) que de tripsina.

- S'aplica la dilució que haguem calculat com l'adequada per al subcultiu o per a l'experiment. Normalment, les NRK se subcultiven en una dilució 1:6.

També es van utilitzar com a cèl·lules de control els fibroblasts normals obtinguts de pell humana. Aquestes cèl·lules es tracten de la mateixa manera que les NRK.

1.2 Congelació i descongelació de cèl·lules

Les cèl·lules que s'hagin de congelar es fan créixer fins el 50% de confluència.

— Es tripsinitzen (en el cas que creixin adherides al substrat, tal com s'ha descrit en l'apartat anterior) i es compta el nombre de cèl·lules en una cambra de Neubaer. Se'n pren el volum necessari per congelar-ne $1,5 \times 10^6$ cèl·lules/criotub de 2 ml.

- Se centrifuguen a 2.000 rpm a 20°C durant 5 min

— S'afegeixen 200 µl de DMSO al 50% més 800 µl de medi al 10% de FCS. La quantitat de FCS i DMSO pot variar segons el tipus cel·lular que es pretengui congelar, sempre s'ha d'arribar a un compromís entre la toxicitat del DMSO i la seva funció crioprotectora. En el cas de les Namalwa la proporció és de 0,5 ml de DMSO al 20% i 0,5 ml de FCS.

- A continuació es congelen en neu carbònica i es posen els tubs a -80°C on es mantenen durant 2 dies, després ja es poden emmagatzemar en N_2 líquid fins que s'hagin de descongelar.

- La descongelació ha de ser gradual. Després d'haver tret els criotubs que contenen les cèl·lules de l' N_2 líquid es posen en neu carbònica.

Per descongelar les cèl·lules NRK i Hela, es prepara DMEM 10% FCS a 37°C que s'anirà afegint gota a gota sobre les cèl·lules congelades, i es barreja bé traspasant-ho a un falcon de 15 ml.

- Se centrifuguen a 2.000 rpm a temperatura ambient, durant 5 min

- Es treu el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb DMEM amb un 10% de FCS per eliminar les restes de DMSO, que és molt tòxic.

- Es deixen reposar les cèl·lules en una placa de 60 mm a l'incubador, a 37°C i amb un 5% de CO_2 fins que estiguin a un 75% de confluència, moment en el qual les diluïrem i les mantindrem en DMEM 5% de FCS.

El procediment de la descongelació de cèl·lules pot tenir variants; per exemple, els limfòcits es descongelen aplicant al contingut del criotub una dissolució de 50 ml d'un 20% de FCS en PBS. Es fan 2 rentatges del mateix volum i finalment es resuspenen les cèl·lules amb el medi adient.

1.3 Sincronització de cèl·lules en fase G_0

Per dur a terme estudis fisiològics i bioquímics és important tenir la població cel·lular tan homogènia com sigui possible.

Poder aturar a la nostra conveniència la divisió cel·lular és de gran ajuda. Els fibroblasts no transformats establerts en un substrat sòlid deixen de créixer quan arriben a la confluència. Aquesta inhibició per contacte (175) els du a la fase G_0 . Un altre factor que cal tenir en compte per aconseguir que les NRK arribin a aquesta fase G_0 és suprimir l'aportació de factors de creixement (en els marges permissius de viabilitat cel·lular). Per aquest motiu, les NRK es mantenen en confluència durant 3 dies en DMEM suplementat només amb un 0,5% de FCS.

Perquè tornessin a entrar en el cicle cel·lular es van reactivar diluint-les (1:3) en medi fresc suplementat amb un 5% de FCS.

La dilució (1:3) es va fer per tripsinització del cultiu tal com s'ha explicat en l'apartat anterior. Es va comprovar que el cultiu era sincrònic mesurant la incorporació de timidina tritiada tal com es descriu en l'apartat 5 i quantificant l'activitat de la polimerasa α (99) (fig. 15).

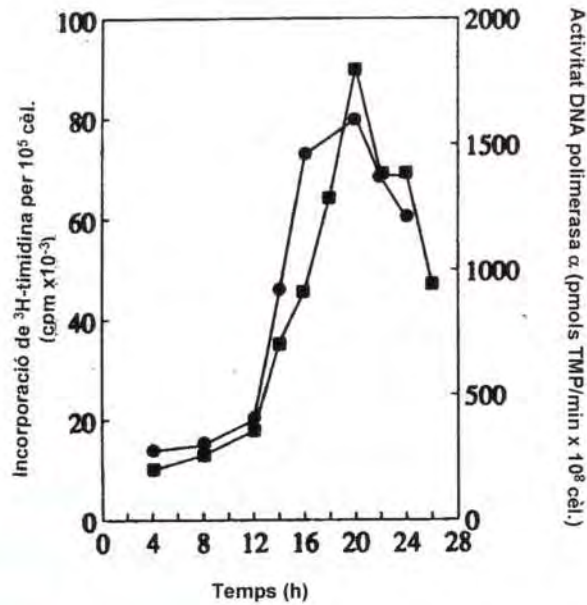


Figura 15. Síntesi de DNA *in vivo* (quadrats) i activitat polimerasa α (rodones) en cèl·lules NRK després de la reactivació del cicle cel·lular. La desviació estàndard era menor que un 10% de les mitjanes.

1.4 Aplicació de les drogues anti-calmodulina

Les drogues anti-CaM es van subministrar a les 5 h perquè dades obtingudes per López-Girona et al. (99) van demostrar que, a les 5 h després de l'activació, hi havia el moment en el qual l'aplicació de la droga anti-CaM (W13) tenia el màxim efecte sobre la disminució de la síntesi del DNA (a les 18 h després de l'activació) (fig.16). Normalment, les cèl·lules es van recollir a les 7 h per tal de dur a terme diferents estudis (nivells totals de proteïnes, immunoprecipitacions, immunofluorescència).

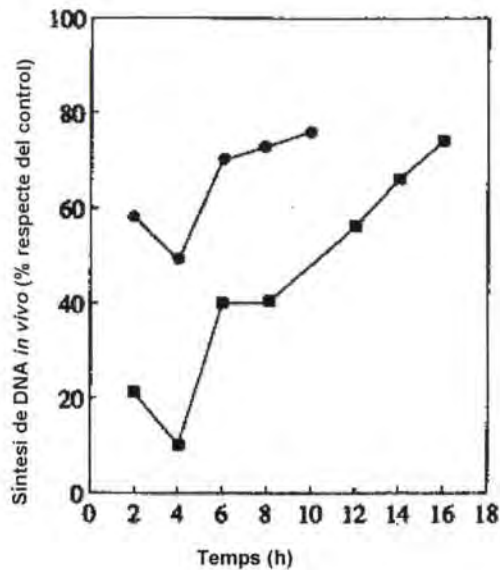


Figura 16. Inhibició de la síntesi del DNA per efecte de les drogues anti-CaM. La síntesi de DNA es va mesurar a les 20 h. En rodones es representa el percentatge de síntesi de DNA *in vivo* sota el tractament amb 7,5 μ M de TFP respecte les cèl·lules no tractades. Els quadrats representen el % de síntesi de DNA sota l'efecte del W13 respecte del tractament control amb W12. La dosi de W12 i W13 va ser de 10 μ g/ml. Cada punt representa la mitjana dels valors de tres plaques diferents. La desviació estàndard era menor que un 10% de les mitjanes.

En la figura 17 es detalla el protocol habitual de treball en el subministrament de les drogues.

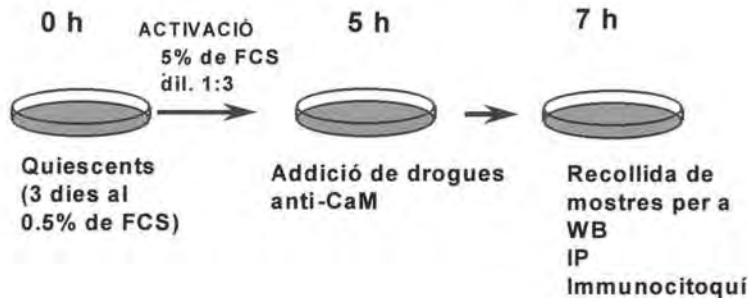


Figura 17. Aplicació de drogues anti-CaM en el moment de màxim efecte i finalitat de la recollida de les cèl·lules.

1.5 Mesura de la síntesi *in vivo* de DNA

La síntesi de DNA *in vivo* va ser mesurada per la incorporació de [³H] timidina a la cèl·lula. Les cèl·lules NRK (10⁵ cèl·lules per placa de 35 mm) van ser sotmeses a polsos d'una hora amb [metil-³H] timidina (5 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech) a 4 μCi/ml en DMEM amb un 5% de FCS. La precipitació i la solubilització de la radioactivitat incorporada es detalla a continuació:

- Es renta el cultiu dues vegades amb PBS fred.
- S'afegeix un 5% de tricloracètic (TCA) per un 1% de pirofosfat sòdic (PpiNa) per precipitar totes les macromolècules. Es deixa 2h o tota la nit.
- Es renta amb PBS fred.
- S'asseca a 37°C durant 2 h.
- Se solubilitzen les cèl·lules amb 700 μl de 0,3 M NaOH fred durant 1 h.
- S'agafen 500 μl i s'hi afegeixen 100 μl de HCl 1,5 M i 5 ml de líquid d'escintil·lació i es procedeix al comptatge de la radioactivitat.

2. Tècniques electroforètiques

2.1 Electroforesi en una dimensió

La separació de proteïnes segons la mida es du a terme mitjançant gels de SDS-poliacrilamida.

L'SDS és un detergent que es posa tant en el tampó de mostres on se solubilitzen les proteïnes com en el gel (matriu inert d'acrilamida, de tamany de porus variable segons les necessitats) on es fan córrer les proteïnes. L'SDS confereix càrrega negativa a totes les proteïnes, i fa que aquestes migrin cap el pol positiu quan són sotmeses a una diferència de potencial elèctric. Així s'aconsegueixen separar les proteïnes, teòricament, en funció d'una sola variable: la seva mida.

Els gels utilitzats consten de dues parts, la part superior o gel concentrador conté poca concentració d'acrilamida (4%) i té un pH àcid (6,8). Aquest gel fa que les proteïnes s'empaquetin. La part inferior, o gel separador, amb la concentració d'acrilamida desitjada per poder separar les proteïnes (del 6 fins al 20%) té el pH més bàsic (pH 8,8). La velocitat de migració de les proteïnes en aquests gels és inversament proporcional a la seva grandària.

— Solució 1
0,75 M de Tris-HCl pH 8.8
0,29% de SDS

— Solució 3
0,25 M de Tris-HCl, pH 6,8
0.2% de SDS

— Solució 2
30% d'acrilamida
0.8% de bis-acrilamida

— Tampó electròlit
25 mM de Tris HCl, pH 8,3
192 mM de glicina
0,1% de SDS

— Tampó de mostres x4 (*Laemmli*)
40 mM de NaP_i, pH 6,8
40% de glicerol
9% de SDS
2 mg/ml de DTT
0,5 mg/ml de blau de bromofenol

El gel separador és el que està situat a la part inferior i el que es fa primer. S'afegeixen les solucions segons la taula següent, tenint present que el persulfat amònic (PSA) és l'agent polimeritzador i que el TEMED és el catalitzador de la reacció. Dependent del tipus d'aparell que es faci servir i dels separadors, el volum final variarà. En el cas dels minigels de Bio-Rad, i utilitzant els separadors d'1,5 cm, les relacions que cal tenir en compte són les que es detallen a la taula 3.

	% Acrilamida				
	7%	8%	10%	12%	15%
Solució 1 (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Solució 2 (ml)	1	1,4	1,7	2	2,5
H ₂ O (ml)	1,5	1,1	0,8	0,5	-
TEMED(μl)	7	7	7	7	7
13% PSA (μl)	25	25	25	25	25
TOTAL	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

Taula 3. Relació entre els components per a la polimerització de gels de SDS.

Una vegada barrejats els components, la solució resolutive es col·loca entre els vidres del muntatge. Per sobre del gel resolutive, s'hi apliquen unes gotes d'aigua o d'isopropanol, per impedir el contacte del gel amb l'O₂, que dificulta la polimerització del gel.

Una vegada polimeritzat i abans de preparar el gel empaquetador, es decanta l'aigua o l'isopropanol.

Quan s'hagi polimeritzat el gel resolutive, es prepara el gel empaquetador i s'aplica sobre l'altre:

Empaquetador	
Solució 3 (ml)	2
Solució 2 (ml)	0,48
H ₂ O (ml)	1,6
TEMED (μl)	10
13% PSA (μl)	40
TOTAL	4 ml

Taula 4. Proporcions del diferents components del gel empaquetador

Abans que es polimeritzi el gel empaquetador, es col·loca una pinta amb pous que ens permetrà carregar la mostra. Una vegada aplicada la mostra (uns 30-60 μg) de proteïna total per WB i en presència de 1x de tampó de mostres, se sotmet al camp elèctric en presència del tampó electròlit.

Les proteïnes s'empaqueten aplicant un camp elèctric de 100 V fins que el front ha creuat el gel empaquetador. Després, les proteïnes se separen amb un voltatge de 150 V.

2.2 Tenyiment de blau de *Coomassie* per a 1D

Després de separar les proteïnes els gels es tenyeixen amb una solució de Coomassie Brilliant Blue G 250. El procediment consisteix a mantenir el gel amb el colorant amb agitació suau durant 10-20 min i després decolorar el gel amb el destenyidor.

— Solució de tenyiment

50% de metanol.
2,5 mg/ml de Coomassie G 250.
10% d'àcid acètic.

— Solució destenyidora

50% de metanol
10% d'àcid acètic.

2.3 Electroforesi bidimensional (2D-PAGE)

Adaptació feta a partir d'O'Farrell et al. (1975; 1977) (127) (128).

L'aparell utilitzat va ser el Mini-protean II 2-D de Bio-Rad. Aquesta tècnica permet separar les proteïnes segons dues propietats: el pes molecular (PM) i el seu punt isoelèctric (pI). Combinant aquestes propietats es pot aconseguir identificar proteïnes diferents però de pes molecular igual o modificacions posttraduccional d'una mateixa proteïna, la qual cosa no s'aconsegueix aplicant els gels convecionals en una dimensió.

Es poden diferenciar dues etapes:

— una primera dimensió o isoelectroenfocament (IEF)

— una segona dimensió, electroforesi SDS/acrilamida a partir de la primera dimensió.

En la primera dimensió (IEF) se separen les proteïnes segons els seu punt isoelèctric.

Es va utilitzar aquesta tècnica perquè permet separar proteïnes d'un pl entre 4 i 7. Els tampons necessaris per preparar els gels en la primera dimensió es detallen a continuació:

— Solució de lisi

9.8 M d'urea
2% de NP40 (v/v)
2% d'amfòlits pH 7-9 (Serva/Bio-Rad)
100 mM de DTT

— Solució d'acrilamida

28,38% d'acrilamida
1,62% de bisacrilamida

— Solució de recobriment

8M d'urea
1% d'amfòlits pH 7-9
5% de Nonidet P-40
100 mM de DTT

— Solució NP40

10% NP40 en H₂O

— Tampó de mostres

2% de SDS
0.5mM de MgCl₂
50mM de Tris-HCl pH 6.8
10% de glicerol
0.625M de Tris-HCl pH 6.8

— Tampó electròlit superior (-)

20 mM de NaOH

— Tampó electròlit inferior (+)

10 mM de H₃PO₄

Ambdues solucions s'han de desgasificar

—Tampó d'equilibratge

0,625M de Tris-HCL pH 6,8
2.3% de SDS
10% de glicerol
10 mM de DTT

2.3.1. Preparació dels gels

Els gels es fan polimeritzar en tubs de 15 cm de llarg i 6 mm de diàmetre. El gel representa 13 cm del tub i a la part superior es carrega una sola mostra; per tant, s'han de preparar tants gels com mostres tinguem.

Es dissolen els components següents en un erlenmeier de 25 ml, evitant que quedin restes de la solució a les parets:

- 5,5 gr d'urea (Bio-Rad), representen un concentració final de 9.2M
- 1,98 ml d'aigua milliQ
- 2 ml de Nonidet al 10 % (SIGMA), concentració final: 2%
- 1,33 ml de solució fresca d'acrilamida (28,38% d'acrilamida, 1,62% de bisacrilamida) (Bio-Rad).

Una vegada s'ha dissolt el gel (a temperatura inferior de 60°C i evitant la formació de bombolles) s'han d'afegir:

- 500 µl d'amfòlits (Serva, pH 3-10), concentració final: 2%
- 10 µl de TEMED (Bio-Rad)
- 15µl de PSA (MERCK)

Es disposen els capil·lars en el suport de polimerització, s'omplen 2/3 parts del suport amb la solució del gel (evitant la formació de bombolles) i es deixa polimeritzar durant 1 h a temperatura ambient.

L'elecció dels amfòlits dependrà del pl de la proteïna que es vulgui investigar. Els amfòlits 3-10, serveixen per obtenir mapes generals del patró proteic de les mostres.

Quan ja veiem que el gel s'ha polimeritzat a l'interior dels capil·lars s'ha de procedir a retirar-los del suport, es netegen amb aigua destil·lada eliminant les restes d'acrilamida, es prepara el sistema del capilar i es col·loquen a la gradeta on es resoldrà l'electroforesi.

2.3.2 Preparació del suport i “pre-running”

Una vegada s'han preparat els capil·lars a sobre del suport, es va omplint la part de sota de cada capil·lar amb una gota de solució inferior amb l'ajuda d'una pipeta Hamilton i, per la part superior (per sobre del gel), ho farem amb la solució superior. Seguidament s'ha d'omplir la cubeta amb solució inferior, introduir el suport evitant la formació de bombolles i omplir-lo amb la solució superior. Tot

seguit s'han de connectar els elèctrodes i fer el *pre-run* de 10 min a 200 V, 15 min a 300 V, i de 15 min a 400 V. Un cop fet el pre-running se substitueixen les solucions superior i inferior de la cubeta, i del suport com la de l'interior dels capil·lars.

2.3.3 Preparació de la mostra

La mostra s'ha de barrejar amb la solució de lisi en una proporció 1:1 i s'escalfa 2 min a 100°C. Es carreguen els capil·lars i perquè la mostra no estigui en contacte directe amb el tampó electròlit superior, s'afegeixen 25 µl de la solució de recobriment sobre cadascuna de les mostres (a l'interior del tap perforat, però sense arribar al coll del capil·lar).

2.3.4 IEF i conservació dels gels

Una vegada les mostres s'han carregat, connectarem els elèctrodes a 500 V durant 10 min, i de 2 a 3 h a 750 V. Passat aquest temps, es treu el gel de dins del capil·lar, es diposita sobre un parafilm i se submergeix en el tampó d'equilibratge durant 10 min a temperatura ambient.

Els gels així tractats es podran resoldre en la segona dimensió (tal com s'ha descrit en l'apartat d'electroforèsi en 1D) o emmagatzemar-se a -80°C. L'única diferència és que, si procedim a aplicar l'electroforèsi en la segona dimensió, no posarem cap pinta en el gel empaquetador ja que es diposita directament el gel (en forma de cilindre) a sobre del vidre, fixant-lo amb una solució d'agarosa l'1% i al 0,002% de blau de bromofenol en tampó d'equilibratge. El blau de bromofenol ens assenyalrà el front quan el gel estigui sotmès al camp elèctric.

2.4 Determinació de la concentració de proteïna

La concentració de proteïnes solubilitzades en tampons sense SDS (i altres agents que distorsionin la valoració) es du a terme pel mètode de Bradford.

La solució de Bradford reacciona amb les proteïnes i dóna una coloració que és mesurable a 595 nm. Es pren com referència (estàndard, STD) la concentració coneguda d'una proteïna (BSA) s'extrapola i així podem determinar la concentració proteica de les mostres.

Es pipetegen les quantitats de BSA o mostra, aigua i reactiu de Bradford en tubs de 3 ml. Després s'esperen 10 min a temperatura ambient i ho llegim en un espectrofotòmetre a 595 nm.

STD	BSA (0,1 mg/ml) en μ l	H ₂ O (μ l)	Solució de Bradford en μ l
0 μ g	0	800	200
1 μ g	10	790	200
2 μ g	20	780	200
4 μ g	40	760	200
8 μ g	80	720	200
16 μ g	160	640	200
mostra	x	800 - x	200

Taula 5. Corba estàndard per al mètode de Bradford

El mètode de Bradford resulta molt pràctic per la brevetat i per la gran sensibilitat en la detecció de proteïnes. Tanmateix es pot optar per altres procediments en la quantificació de proteïna; el més emprat per nosaltres, si la mostra conté SDS, és la valoració mitjançant el Lowry:

Abans de procedir a la quantificació se sotmet la mostra a una sonicació (en fred) per disminuir la viscositat conferida pel DNA .

— Reactius de Lowry

— Solució 1
2% de Na₂CO₃ en 0,1N NaOH

— Solució 2
0,5% de CuSO₄

— Solució 3
1% de tartrat de sodi i potasi

— Solució 4
Reactiu de fenol (Folin-Ciocalteu)

— Solució 5
Estàndard de BSA

— SOLUCIONS de treball

— Solució A: Cal mesclar en la proporció (1:48:1) les Solucions 3, 1 i 2, respectivament. Cal tenir en compte que calen 2,5 ml per mostra.

— Solució B: dilució Folin (1:1) amb H₂O MilliQ

— PROCEDIMENT (per duplicat):

- Es fa la corba estàndard amb BSA (0,1 µg/µl).

STD	BSA (0,1 mg/ml) en µl	H ₂ O (µl)	Tampó de lisi (µl)
0 µg/ml	0	490	10
5 µg/ml	50	440	10
10 µg/ml	100	390	10
20 µg/ml	200	290	10
40 µg/ml	400	90	10
Mostra	x	500 - x	10

Taula 6. Corba estàndard pel *Lowry*.

- S'agafa un volum prudent (segons com sospitem que estigui de concentrada la mostra, serà de 5 a 20 µl) i s'hi afegeix H₂O MilliQ fins a 500 µl.
- S'hi afegeixen 2,5 ml de solució A. Fer vòrtex. S'ha d'incubar durant 10 min a temperatura ambient.
- S'hi afegeixen 0,25 ml de solució B. Fer vòrtex. Incubar a temperatura ambient durant 30 min
- Es llegeix l'absorbància a 750.

2.5 Tranferència a membranes

— Tampons

— Tampó de Transferència
25 mM de Tris HCl pH 8.3
192 mM de glicina
0,1 % de SDS
10 % de metanol

— Tampó TBST
0,05 % de Tween en TBS
Tampó TBS :
50 mM de Tris HCl pH 7,4
200 mM de NaCl

— Solució de blocatge
5 % de llet en pols desnatada
en TBST

— Solució d'incubació dels anticossos
1 % de BSA en TBST
0,5 % de llet en pols desnatada
0,1 % d'azida sòdica

— CDS

100 mM de Tris HCl pH 9,5

100 mM de NaCl

5 mM de $MgCl_2$

Els gels que contenen les mostres (tant si són procedents d'1D com de 2D) se sotmeten a un camp elèctric perquè les proteïnes quedin immobilitzades en una membrana, que podrà ser tractada posteriorment amb els anticossos dirigits a les proteïnes susceptibles de ser detectades.

El suport on es transfereixen les proteïnes provinents d'una electroforesi (SDS-PAGE) solen ser de material hidrofòbic. Nosaltres vam utilitzar les membranes de PVDF, altrament dit Immobilon (Millipore), les quals s'han d'hidratar amb metanol.

- S'incuba amb tampó de transferència la membrana prèviament hidratada amb metanol, i el gel SDS-PAGE on s'han separat les proteïnes
- Es disposa l'aparell d'immunotransferència com s'indica a la figura 18.
- Es transfereix aplicant un camp elèctric de 60 V durant 2 h. El temps i el voltatge pot variar segons la concentració d'acrilamida del gel i de les característiques de la proteïna.
- Una vegada transferides les proteïnes, s'asseca la membrana i s'incuba amb un 20% de metanol per poder visualitzar-les. Per hidratar-la es torna a aplicar el procediment inicial (només en les PVDF).

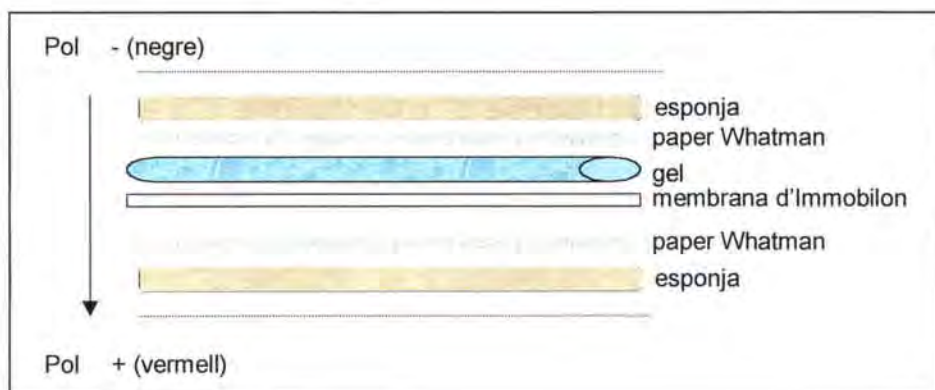


Figura 18. Ordre que cal tenir present en la transferència.

3. Purificació de la calmodulina

Hem de partir d'una font rica en CaM com ara el cervell de vaca o bou.

— SOLUCIONS:

Reïnes:

— DEAE cel·lulosa

— Phenyl Sepharose®

— Solució mare de CaCl_2 0,1M

— Solució 2 mM d'EGTA

— Tampó de descongelació (D)
0.9% de NaCl

— Tampó d'homogenització (H)
50 mM de TrisHCl pH 7,4
2,5 mM d'EGTA
0,5 mM de PMSF

— Tampó d'equilibratge (E)
50 mM de Tris-HCl pH 7,4
50 mM de NaCl

— Tampó de rentat (R)
50 mM de Tris-HCl pH 7,4
150mM de NaCl

— Tampó d'extracció de CaM (T)
50 mM de Tris-HCl pH 7,4
600 mM de NaCl

— Tampó de resuspensió 1 de CaM (C)
10 mM de bicarbonat amònic
50 μM de CaCl_2

— Solució de resuspensió 2 (A)
10 mM de bicarbonat amònic

— Solució de rentat de la columna de
Phenyl Sepharose® (P)
8M d'urea

— Tampó d'equilibrament 2 (Q)
50mM d'Hepes, pH 7,1
0,1mM de CaCl_2
1 mM de β -mercaptoetanol
500 mM NaCl

— Tampó d'equilibrament 3 (S)
50 mM d'Hepes pH 7,1
0,1 mM de CaCl_2
1 mM de β -mercaptoetanol

- Es descongelen els cervells de vaca (obtinguts de l'escorxador just després d'haver sacrificat l'animal) en presència de 0,9% NaCl (tampó D).
- Es talla el cervell en trossos petits.
- S'homogeneïtza el cervell amb 1 l de tampó H durant 1 o 2 min
- Es centrifuga durant 30 min a 12.500 rpm.
- Es recull el sobrenedant i el sediment es resuspèn amb el mateix tampó H i es torna a homogeneïtzar durant 1 o 2 min. Es torna a centrifugar a 12.500 rpm, durant 30 min
- Es recol·lecta aquest segon sobrenedant i s'ajunta al primer. El sediment es llença.

- Els sobrenedants es filtren fent servir quatre capes de gasa i es posen a l'interior d'un got de precipitat de 2 l a on havíem posat DEAE-cel·lulosa prèviament equilibrada amb tampó E. Abans d'afegir el sobrenedant, la cel·lulosa s'ha de filtrar per eliminar el tampó E. Després d'afegir el sobrenedant s'ha de mesurar el pH i ajustar-lo a 7,4.
- La barreja es remena suament amb l'ajuda d'una cullera durant 30 min
- Es filtra i es renta diverses vegades amb el tampó E fins que veiem que ha desaparegut el color vermell de l'hemoglobina, o sigui, fins que tinguem una solució transparent.
- Es renta dues vegades la reïna (que té retinguda la CaM), cada cop amb 1 l de solució R.
- Es posen 700 ml de tampó T i es filtra. El filtratge s'ha de guardar perquè conté la CaM.
- Es repeteix l'extracció amb 700 ml de tampó T i es torna a filtrar i a recollir.
- Ambdós filtratges s'ajunten en un got de precipitats de 2 l. (El volum recollit és d'1,4 l.)
- Es pesen 351 g de sulfat amònic per litre de solució filtrada i recollida. Amb l'ajuda d'un morter es desfan els grumolls. Es va afegint a poc a poc sobre la mostra mentre es va agitant.
- Es deixa 1 h en agitació.
- Es centrifuga durant 30 min a 12.500 rpm.
- Es recullen els sobrenedants i s'hi addicionen 472 g de sulfat amònic.
- Es deixa en agitació durant 1 h.
- Es centrifuga la mostra durant 30 min a 12.500 rpm.
- El sediment, que conté la CaM, es resuspèn en poc volum de tampó C (menys de 100 ml), es diposita en una bossa de diàlisi (de mida de por adequat, de 3500) i es dialitza amb 5l de tampó C durant tota la nit.
- Es canvia la solució de diàlisi per una que contingui únicament bicarbonat amònic a 10 mM (solució A) i es deixa 4 h més.

- Es recol·lecta el contingut de la bossa de diàlisi, que es pot congelar a -80°C o es liofilitza durant tota una nit.
- Mentrestant es prepara la columna de Phenyl-Sepharose® (2,5 x 15 cm). La columna s'ha de netejar amb 100 ml 8 M d'urea (solució P). i després s'ha d'equilibrar amb tampó Q.
- El liofilitzat es dissol amb el tampó Q, utilitzant el menor volum possible. La solubilització és lenta. Una vegada dissolt, s'afegeixen 50 μl de 500 mM CaCl_2 .
- A continuació es carrega la columna amb la mostra (que s'aspira amb l'ajuda d'una bomba peristàltica). Després de la mostra s'afegeix tampó Q. Separem 100-200 μl de mostra per fer una electroforesi.
- S'esperen 15 min i es comença a detectar amb el col·lector la sortida de proteïnes. Quan el pic gran de proteïnes ja ha baixat, es canvia el tampó per un altre d'igual però que conté 500 mM de NaCl (tampó S) i es deixa eluir tota la nit (60 de la bomba). Així s'eliminen les proteïnes que s'hagin unit per forces electrostàtiques a la reïna.
- L'elució de la CaM es fa aplicant 2mM EGTA.

4. Acoblament de la calmodulina a Sepharose 4B

Procediment s'ha extret de V, Niggli et al. (1979) (123). Aquesta tècnica s'aplica per identificar possibles CaMBP o altres proteïnes que s'unirien directament o indirectament a la que s'hagi immobilitzat covalentment a la reïna.

—SOLUCIONS

—Tampó d'unió (Borat per la CaM)

0,1M d'àcid bòric pH 8,2 (temperatura ambient)
 0,4M de NaCl
 0,05mM de CaCl₂

—Solució d'activació de la Sepharose4B

1 mM de HCl

—Tampó àcid

0,1M d'acetat sòdic (pH 4)
 0,5 M de NaCl

—Solució de saturació

1 M de Tris HCl, pH 8,0

—Tampó bàsic

100 mM de Tris HCl pH 8,0
 500 mM de NaCl
 1 mM de MgCl₂

—PROCEDIMENT

- Es pesa la quantitat de reïna seca necessària per unir la proteïna, tenint en compte que 1 g de reïna seca equival a 3,5 ml de reïna inflada, i que a 1 ml de reïna inflada s'hi pot unir 1 mg de proteïna.

La Sepharose® 4B-CNBr activada és un gel subministrat per Pharmacia Biotech on s'ha aconseguit immobilitzar lligands amb amines primàries utilitzant el mètode de *Bromide cyanogen*.

- Es pesa la quantitat de reïna necessària per unir la concentració de proteïna que desitgem fer servir, respectant els marges recomenats.

- La proteïna que pretenem unir ha d'estar dissolta en un tampó bàsic adequat, que no presenti cap component amb grups amino susceptibles d'unir-se a la reïna. Així doncs, el tampó més adequat en el cas de la CaM és el borat, però per a altres proteïnes podria ser el tampó bicarbonat (0,1M de NaHCO₃, pH 8,3 amb 0,5 M de NaCl). La presència d'una alta concentració de sals en el tampó d'acoblament evita la formació d'agregats.

- Es renta la reïna durant 15 min amb 1 mM de HCl (pH 2-3), l'excés de clorhídric s'elimina per filtració en un Buchner connectat al buit. Aquesta reïna es resuspèn en tampó borat pH 8,2, a temperatura ambient tenint en compte la relació entre la reïna inflada d'aquesta manera i el contingut de proteïna (1 mg de proteïna per 1ml de reïna inflada).
- S'incuba la reïna amb la proteïna durant 2 h a temperatura ambient, en agitació molt suau.
- La reïna es renta amb tampó borat (fent servir un volum 10 vegades superior a la quantitat de reïna emprada).
- Es resuspèn en 2 volums de Tris, pH 8,2 (temperatura ambient), respecte dels utilitzats de reïna per bloquejar els grups actius remanents.
- S'incuba la barreja durant 16 h a 4°C en agitació suau.
- S'aplica a la reïna una sèrie de rentatges (4 voltes), alternant el tampó acetat a 0,1M (pH 4) seguit d'un rentatge amb tampó Tris-HCl (pH 8), ambdós tampons han de tenir NaCl a 0,5 M. Aquests rentatges cíclics de pH diferent asseguren que no romangui cap lligand lliure unit iònicament al lligand unit covalentment a la reïna.

5. Expressió i purificació de proteïnes de fusió GST

Procediment extret de D.B. Smith, D.B. et al. (1988). Ref.(172); WG-Kaelin (1991) ref. (80); J.V. Frangioni (1993) ref (53).

— SOLUCIONS

— NETN

20 mM de Tris pH 8
100 mM de NaCl
1 mM d'EDTA
0,5% de Nonidet P-40

— Tampó d'elució

50 mM de Tris pH 9,6
120 mM de NaCl
20 mM de glutatió reduït

— PROCEDIMENT

- Per tal d'estudiar *in vitro* possibles interaccions proteïna-proteïna i d'identificar a CaMBP, es va procedir a expressar en plàsmides d'expressió procariota pGEX-KG les principals proteïnes reguladores de la transició G₁/S, i així es van poder

aplicar sobre una columna de Sepharose a on se li havia unit CaM bovina (purificada, segons es detalla a l'apartat 3.)

- Les proteïnes recombinants fusionades a GST (*glutathion S transferasa*) van ser la p21^{Cip1}, la ciclina D1, la cdk4, la p27^{KIP1} i la pRb.
- El primer pas que cal fer és la clonació del cDNA emprant el vector d'expressió procariota pGEX-KG. La GST té la particularitat d'unir-se a la glutatió reduïda, fet que ens permet utilitzar aquesta propietat per poder purificar per cromatografia d'afinitat aquelles proteïnes recombinants amb GST.

El plàsmide d'expressió utilitzat va ser el pGEX-KG. Mitjançant tècniques de biologia molecular, es clona el fragment que s'ha d'expressar en *frame* amb la proteïna GST.

- Es transforma la línia bacteriana BL 21-Lys E

0,5 µg de DNA plasmídic s'incuben 30 min a 4°C amb 100 µl de bacteris competents de la soca *E coli* BL 21-LysE.

La internalització del DNA es fa per xoc tèrmic a 42 °C durant 45 segons.

- Després es mantenen els bacteris en un medi ric durant 1 h a 37°C.
- Se sembren els bacteris en plaques LB suplementades amb l'antibiòtic corresponent (50 µg/ml d'ampicil·lina i/o 10 µg/ml de cloramfenicol) i es deixen tota la nit.
- Una de les colònies es fa créixer en medi LB + 50 µg/ml d'ampicil·lina + 10 µg/ml cloramfenicol tota la nit a 37°C i amb agitació (200 rpm).
- Es dilueix 1:100 amb el mateix medi i es fa créixer fins a saturació.
- S'afegeix 0,5 mM d'IPTG i es deixa 16 h a 37°C amb agitació. A les 4 h es pot afegir una altra vegada 0,5 mM d'IPTG.
- Es recullen els bacteris centrifugant 10 min a 3.000 x g i es resuspenen amb tampó NETN amb inhibidors de proteases (1 mM de PMSF, 1 µg/ml d'aprotinina).
- Se sonica 3 x 10 segons per trencar els bacteris, tot i que aquesta soca presenta els plàsmides Lys que li impedeixen formar una paret bacteriana normal i es poden trencar per congelació i descongelació.

- Se centrifuga durant 20 min en un rotor SS-34 a 15.000 rpm durant 20min i guardem el sobrenedant. Segons el sediment que quedi, es pot fer una altra extracció amb NETN afegint un 0,5 % de sarcosyl.
- Els sobrenedant es fa servir per aïllar les proteïnes GST recombinants, emprant la seva capacitat d'unir-se a la glutatió. S'afegeix un 0,5 % de llet en pols en NETN a les boles de Sepharose 4-B-glutaciona i s'incuba amb l'extracte obtingut dels bacteris durant 15 min a 4°C.
- Es fan tres rentatges amb tampó NETN (50 ml cada un) i s'elueix amb 5 ml de tampó d'elució incubant-ho durant 5 o 10 min a 4°C en rotació. A partir d'aquí se sol dialitzar la proteïna amb el tampó que es vulgui i es congela a -80°C.

6. IMMUNODETECCIÓ

6.1 Aplicacions de la utilització d'anticossos en el reconeixement de proteïnes

La detecció de proteïnes es fa emprant les propietats que tenen els anticossos.

Els anticossos van ser descoberts per Emil von Behring i Shibasaburo Kitazato el 1890, però no va ser fins al 1960 que no se'n va determinar l'estructura. Els estudis estructurals iniciats per Gerald M. Edelman i R. R. Porter van fer que guanyessin el premi Nobel el 1972.

La majoria d'anticossos que s'utilitzen per detectar proteïnes són immunoglobulines de tipus G (IgG) i, menys freqüentment, de tipus IgM. Les molècules d'IgG tenen un pes molecular de 160.000 D. Interaccionen amb l'antigen pels llocs Fab (part variable) composta per una cadena lleugera (C_L) i una de pesada (C_H). El fragment Fc només està format per cadenes pesades i no té capacitat d'unió als antigens, però sí a altres molècules (proteïna A, complement).

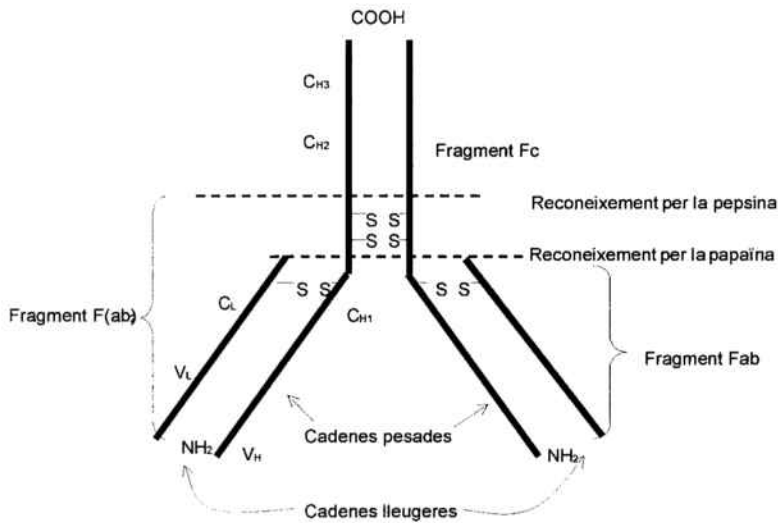


Figura 19. Estructura de les IgG

El primer factor que cal tenir en compte per tenir èxit en la detecció d'un antigen és l'especificitat de l'anticòs.

Els anticossos primaris poden ser monoclonals en cultiu, líquid ascític o purificats; policlonals en sèrum o purificats. S'aconsella purificar les IgG amb proteïna A-Sepharose o, per afinitat, amb l'antigen, ja que d'aquesta manera s'eliminen els enzims sèrics i les proteïnes que poden produir soroll de fons.

El sistema de marcatge que s'ha utilitzat és l'indirecte, que es fonamenta en el fet que l'anticòs primari reconeixerà l'antigen contra el qual ha estat dirigit i serà reconegut per un de secundari (després de la incubació amb l'anticòs primari), específic contra les immunoglobulines de l'espècie en la que s'ha obtingut l'anticòs primari i desenvolupat en una espècie diferent que la que s'ha utilitzat per obtenir el primari. L'anticòs secundari pot estar acoblat a un enzim (és el cas de la peroxidasa i la fosfatasa) o a un fluorocrom (FITC, TRITC). Els anticossos conjugats amb peroxidasa o fosfatasa necessiten la presència d'un substrat específic perquè es produeixi la reacció colorimètrica que ens permetrà localitzar indirectament a l'antigen. Els marcats amb fluorescència s'utilitzen per a immunocitoquímiques.

6.2 Western blot (WB)

Aquest mètode s'aplica a la membrana procedent de la transferència d'un gel SDS-PAGE (1D o 2D), en què s'ha resolt un lisat cel·lular per esbrinar l'existència o no d'una proteïna.

— PROCEDIMENT

- S'ocupen els llocs d'unió inespecífica de la membrana aplicant una solució de blocatge (5% de llet desnatada en pols en TBST), durant 1 h a temperatura ambient, per impedir la unió no específica dels anticossos a la membrana.
- S'incuba durant 1 h el primer anticòs a la dilució adequada en solució d'incubació.
- Es fan tres rentatges de 10 min amb TBST.
- S'incuba durant 1 h amb el segon anticòs que reconeix el primer (anticonill, porc, cabra o be) en la dilució en solució d'incubació. Normalment s'ha fet servir la fosfatasa alcalina, però també se'n poden utilitzar que estiguin lligats amb peroxidasa.
- Es fan tres rentatges de 10 min amb TBST.
- Es revela per detectar l'activitat fosfatàsica alcalina amb 5 ml de CDS afegint-hi 33 µl de NBT i 16,5 µl de BCIP (*nitroblue tetrazodium* 50 mg/ml) (5-bromo, 4-cloro-3 indonyl phosphate 50 mg/ml) o ECL (Amersham) en el cas que l'anticòs secundari estigui conjugat amb peroxidasa.
- S'atura la reacció amb H₂O.

A les taules 13 i 14 es detallen les referències dels diferents anticossos emprats i també les dilucions o concentracions de treball.

6.3 Immunoprecipitacions (IP) i assaig kinasa

La coimmunoprecipitació es basa en la capacitat que té un anticòs per reconèixer un antigen en el qual romanen en complexos les proteïnes associades. Les condicions d'incubació hauran de ser prou permissives per evitar trencar els possibles complexos proteics. L'immunoprecipitat pot ser sotmès a un assaig d'activitat kinasa tal com es descriurà a continuació.

— SOLUCIONS

— Solució C (tampó de lisi general):

50 mM	de Tris-HCl, pH 7,4
0.1%	de Tritó X-100
5 mM	d'EDTA
250 mM	de NaCl
50 mM	de NaF
0,1 mM	de Na ₃ VO ₄ ,
1 mM	de PMSF
10 µg/ml	de leupeptina
10 µg/ml	d'aprotinina

— Solució D (tampó de lisi adaptat per a la detecció de complexos associats a la CaM)

50 mM	de Tris-HCl, pH 7,4
100 mM	de NaCl
1%	de Tritó X-100
0,1 mM	de CaCl ₂
5 mM	de NaF
0,1mM	de Na ₃ VO ₄ ,
1 mM	de PMSF
10 µg/ml	de leupeptina
10 µg/ml	d'aprotinina

— Tampó kinasa (1)10x

200 mM	d'HEPES, pH 7.4
100 mM	de clorur de magnesi
10 mM	de DTT
200 µM	d'ATP
100 mM	de β-glicerolfosfat

— PROCEDIMENT:

- Les cèl·lules (5-10 x 10⁷) es lisen amb 1 ml de solució C.
- Es sonica dues vegades el lisat (mantingut en gel) durant 10 segons.
- Se centrifuga 10 min a 10.000 rpm i a 4°C.
- Es pren el sobrenedant i es valora la quantitat de proteïna (mitjançant el mètode de Bradford, vegeu apartat 2.4)

- S'incuben de 3 a 5 mg de proteïna obtinguda del lisat amb l'anticòs dirigit contra la proteïna problema o amb 0.5 μ l de sèrum normal de conill (fet servir de control) durant 2 h a 4°C.
- Se segresten els immunocomplexos afegint 15 μ l de proteïna A-Sepharose® (Pierce), si l'anticòs és un anti-conill o amb proteïna G-Sepharose® (SIGMA) si l'anticòs emprat és monoclonal, durant 1h a 4°C.

Espècie	Afinitat per la proteïna A	Afinitat per la proteïna G
Humana	++++	++++
Cavall	++	++++
Vaca	++	++++
Porc	+++	+++
Ovella	+/-	++
Cabra	-	+++
Conill	++++	+
Pollastre	-	++
Hàmster	+	++
Conillet d'Índies	++++	++
Rata	+/-	++
Ratolí	++	++

Taula 7. Afinitat de la proteïna A/G pels anticossos obtinguts a diferents espècies (extret de *Antibodies. A laboratory Manual*, Ed. Harlow & David Lane)

- Es recol·lecta la reïna per centrifugació (pols curt).
 - S'apliquen dos rentatges amb el tampó C.
 - Per alliberar els complexos formats de la Sepharose®, s'apliquen 30 μ l de tampó de mostres amb DTT, dues vegades concentrat i es bullen durant 3 min
- Les proteïnes així immunoprecipitades són sotmeses a una electroforesi i transferides a una membrana d'Immobilon-P (Millipore) seguida de transferència *Western*. Paral·lelament es córrer un lisat total de cèl·lules NRK per fer-lo servir com a control de mobilitat de cadascuna de les proteïnes.
- Per estudiar si la CaM coimmunoprecipita amb la cdk4 i la cicD1 s'ha d'adaptar la composició del tampó de lisi C, s'ha d'utilitzar la solució D. Es bloca la proteïna A-Sepharose® amb albúmina procedent de sèrum boví (2mg/ml de BSA en tampó B).

Per dur a terme l'assaig kinasa, les immunoprecipitacions es fan de la mateixa manera que s'acaba de descriure, però s'utilitzen 5×10^6 cèl·lules per assaig, i el lisat es preadsorbeix amb 30 μ l de NRS (sèrum normal de conill) i 50 μ l de proteïna A-Sepharose®.

Els immunoprecipitats es renten amb tampó kinasa x1 i seguidament són incubats amb tampó kinasa amb 20 μ M de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($2\text{-}4 \times 10^4$ cpm/pmol) i 2,5 μ g d'histona H1 (per a la cdk2), o 1 μ g de la proteïna pRb fusionada amb GST (GST-pRb (379-792)) en el cas de la cdk4 durant 20 min a 30°C, en un volum final de 35 μ l (106). La GST-pRb (379-792), l'expressió i la purificació d'aquestes construccions s'ha detallat en l'apartat 5 .

6.4 Immunocitoquímica per a l'observació amb microscopi òptic o confocal

Engloba l'estudi de la localització intracel·lular de proteïnes. S'han d'analitzar un seguit de factors crítics per al resultat de la immunocitoquímica.

Per preservar i estabilitzar l'estructura cel·lular, i evitar que els antígens difonguin del seu lloc original, s'ha de procedir a aplicar la fixació de les cèl·lules. La fixació que s'utilitzi haurà d'arribar a tenir un compromís entre l'estabilització de les estructures i la conservació de l'antigenicitat. Els agents químics més utilitzats com a fixadors han estat els aldehids de cadena curta que reaccionen amb les proteïnes, principalment amb els grups ϵ i α amino dels aminoàcids que les integren (l'utilitzat per nosaltres és el 3% paraformaldehid en PBS). Hi ha epítops que són malmesos o emmascarats pel paraformaldehid, llavors hem optat per altres fixadors com ara el metanol prèviament refredat a -20°C (l'aplicació es fa sobre gel), que, a més a més de fixar, permeabilitza les membranes.

— SOLUCIONS:

— Fixador: Metanol fred o 3% paraformaldehyd en PBS

— PBS (pH 7,2)

140 mM de NaCl
5mM de Na₂HPO₄
1,5 mM de KH₂PO₄

— Solució de permeabilització

0, 2% de tritó X-100 en PBS

— Solució de blocatge

1% d'ovoalbúmina en PBS

S'han d'utilitzar tant anticossos secundaris conjugats amb fluorescència com amb peroxidasa. En el cas d'utilitzar peroxidasa, l'observació es farà en un microscopi òptic convencional. Cal dir que es va optar per la peroxidasa en els casos en què preteníem fer un estudi quantitatiu, ja que la fluorescència s'esvaeix a mesura que s'irradien les preparacions.

A la pàgina següent es detallen els dos procediments d'immunocitoquímica.

En ambdós casos les cèl·lules es fan créixer sobre cobreobjectes de vidre i es processen amb molta cura per no confondre la cara on hi ha les cèl·lules adherides.

Immunofluorescència

- 3x rentatges dels cobreobjectes amb PBS
- Fixació (segons taula 8)
- 2 rentatges de 10 min amb PBS
- Permeabilització (per a la fixació amb PF, consulteu-ne el tipus a la taula 8)
- Blocatge dels llocs d'unió inespecífics amb 1% ovoalbúmina en PBS durant 10 min a T^a ambient

- 3 rentatges amb PBS
- Incubació durant 1 h a 37°C amb una dilució d'anticòs primari (consulteu la dilució a la taula) en cambra humificada
- 2 rentatges amb PBS de 10 min
- Incubació amb la dilució de l'anticòs secundari (diluït 1:100) durant 45 min (protegit de la llum) i en una cambra humidificada
- 2 rentatges amb PBS de 10 min cadascun
- Muntatge amb *Mowiol*
- Observació al microscopi de fluorescència

Immunoperoxidasa

- 3 rentatges dels cobreobjectes amb PBS
- Fixació (segons taula 8)
- 2 rentatges de 10 min amb PBS
- Permeabilització (consulteu-ne el tipus a la taula 8)
- Blocatge dels llocs d'unió inespecífics amb un 1% d'ovoal-búmina en PBS durant 15 min a temperatura ambient
- Eliminació o blocatge de la peroxidasa endògena amb un 2% de H₂O₂ en PBS durant 20-30 min
- 3 rentatges amb PBS
- Incubació durant 1 h a 37°C amb una dilució d'anticòs primari (consulteu-ne la dilució a la taula) en cambra humificada.
- 2 rentatges amb PBS de 10 min
- Incubació amb la dilució de l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa (diluït 1:250) durant 45 min en una cambra humidificada
- 2 rentatges amb PBS de 10 min
- Revelatge amb 0,25 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) + 0,1% H₂O₂ (cal anar molt en compte amb el DAB que és molt tòxic).
- 1 rentatge breu amb H₂O MilliQ.
- Muntatge en mitjà aquós i observació al microscopi òptic

Anticòs	Fixació	Permeabilització
cdk4 (Sta. Cruz)	MetOH -20°C, 2 min sobre gel	No
cicD1 (UBI)	MetOH -20°C, 2 min sobre gel	No
p21 ^{CIP} (St. Cruz)	3% PF/PBS, 20 min a temperatura ambient	0,2% tritó X-100/PBS, 10 min, T° ambient
Nucleolina	3% PF/PBS, 20 min a temperatura ambient	0,2% tritó X-100/PBS, 10 min, a temperatura ambient
hnRNPA2 (A2)	3% PF/PBS, 20 min a temperatura ambient	0,2% tritó X-100/PBS, 10 min, a temperatura ambient

Taula 8. Tractament de fixació i permeabilització aplicat a les IC (immunocitoquímiques).

Quan s'utilitza la fixació amb paraformaldehid, s'han d'afegir a totes les dissolucions 10 mM de glicina per evitar que les restes de càrregues negatives del fixador puguin facilitar el marcatge inespecífic.

6.4.1 Quantificació del marcatge obtingut per immunoperoxidasa

Les preparacions destinades a la quantificació del marcatge nuclear es van processar al mateix temps.

L'absorbància de l'àrea total corresponent al nucli va ser mesurada amb un analitzador d'imatges (KS 100 Kontron Imaging System software). Els nuclis es van considerar positius quan la relació entre l'absorbància i l'àrea era major de 0,1. Aquest valor era el corresponent al marcatge que hi havia al citoplasma. És a dir, només es van considerar positives aquelles cèl·lules que presentaven el nucli més intens que el valor del citoplasma.

6.5 Immunocitoquímica per a l'observació amb microscopi electrònic

6.5.1 Preparació de les cèl·lules per aplicar la immunocitoquímica per microscòpia electrònica

6.5.1.a Englobació en Lowicryl K4M

Es va aplicar aquesta tècnica per tal de detectar la possible col·localització entre cdk4/cicD1 en cèl·lules activades i a les 7 h després de l'activació. Prèviament a l'englobació amb Lowicryl es va procedir a la *fixació* de les cèl·lules.

— SOLUCIONS

— Fixació: 3% Paraformaldehid + 0.1% de glutaraldehid en 0,1 M de tampó fosfat.

— Tampó fosfat: 0.1M de HNa_2OPO_4 , afegint la quantitat necessària de $0.1\text{MH}_2\text{NaPO}_4$ fins que el pH sigui de 7,4

— PROCEDIMENT:

- Es van fer 2 rentatges amb PBS.
- Fixació amb 3% de paraformaldehid i 0,1% de glutaraldehid en 0,1 M de tampó fosfat durant 1 h a temperatura ambient.
- 2 rentatges amb PBS
- Cal alliberar les cèl·lules de la placa, rasant-les.
- Centrifugar-ho a 2.500 g durant 15 min a temperatura ambient.

— *Inclusió en Lowicryl*

Una vegada fixada la mostra s'ha de procedir a deshidratar-la: deshidratació a baixa temperatura (PLT, *progressive lowering of temperature technique*) (113).

Aquesta tècnica es basa en la relació inversament proporcional entre l'agent deshidratant i la temperatura. Tant en la deshidratació com a la inclusió s'ha de treballar sota una campana d'extracció de gasos, ja que els vapors que es desprenen són molt tòxics, també s'ha de tenir la precaució de treballar amb guants.

Es van aplicar els passos que s'indiquen a la taula 7, en agitació constant.

Etanol (vol %)	Temperatura (°C)	Temps (min)
30%	4°	15
50%	-20°	30
70%	-35°	30
95%	-35°	60
100%	-35°	30
100%	-35°	30

Taula 9. Passos que cal seguir en la deshidratació de les mostres (PLT).

— Preparació de la reïna i infiltració

• Composició

El Lowicryl K4M consta de 3 components:

Components		
Crosslinker A	2.70 (casa comercial)	3.6 g
Monòmer B	17.30 (casa comercial)	16.4 g
Iniciador C*	0.10 g	0.10 g

Taula 10. Proporció en la preparació del Lowicryl K4M. Si es treballa a temperatura ambient, l'iniciador ha de ser substituït per la mateixa quantitat de *benzoin ethylether*.

L'oxigen dificulta la polimerització de la reïna, per això s'ha d'anar en compte a no formar bombolles. A més a més, aplicarem N_2 (gas) amb una pipeta Pasteur.

• Infiltració

Una vegada s'ha preparat la reïna s'ha de posar a -35°C .

Els passos que cal seguir es detallen a continuació (taula 9)

Reïna:etanol (vol. : vol.)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Temps (min)
1:3	-35	60
2:2	-35	60
3:1	-35	60
Reïna pura	-35	Tota la nit

Taula 11. Procediment de la inclusió de la mostra amb la reïna, segons el tipus de mostra els temps podran variar.

• Polimerització

La polimerització es du a terme en el mateix receptacle on s'ha fet la infiltració. Per fer els blocs s'utilitzen càpsules de gelatina.

• S'omplen les càpsules fins dalt de tot amb la reïna (evitant que quedi aire). Es transfereixen les mostres amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur (prèviament refredades) i es tanquen les càpsules. S'esperen de 15 a 30 min i es connecta el llum ultraviolat durant un mínim de 24 h per tal de facilitar la polimerització.

• Es treuen les mostres del congelador i es continua la polimerització amb el llum ultraviolat durant 2-3 dies a temperatura ambient. A partir d'aquest moment els blocs queden a punt per obtenir-ne talls semi i ultrafins sobre reixetes d'or i per a l'aplicació posterior de la immunocitoquímica.

Una vegada feta la immunocitoquímica es procedeix a fer el *contrast* amb acetat d'uranil.

6.5.1.b Mètode de *Slam Freezing*

Per preservar l'antigenicitat màxima i la ultraestructura de les cèl·lules NRK a l'hora d'estudiar la possible col·localització entre la CaM i la p21^{CIP} es va aplicar la tècnica de la criofixació pel mètode de *Slam Freezing* (186). Els avantatges d'aquesta tècnica és que preserva molt l'antigenicitat i les membranes queden intactes.

Les cèl·lules NRK es van fer créixer sobre *transwells* (posant 2 ml de medi al receptacle inferior i 0.5 ml al superior) i es van portar a la quiescència tant per supressió de factors de creixement com per inhibició per contacte. Les NRK, que es pretenien recol·lectar a les 7h després de l'activació, es van sincronitzar (en quiescència) en flascons i, posteriorment, es van reactivar i es van traslladadar sobre *transwells*, on es van fixar a les 7 h després de la reactivació de la proliferació.

Les etapes del processament de les mostres es detallen a continuació:

- Criofixació: que es basa en la projecció de la mostra contra un bloc de coure refredat per N₂ líquid (a -196°C) en un *cryovacuumblock* (Reichert-Jung). A continuació es procedeix a la criosubstitució.
- Criosubstitució en acetona i 0,5% d'acetat d'uranil a -90°C durant 3 dies.
- Infiltració i inclusió en Lowicryl HM20 a -50°C.
- Polimerització sota el llum ultraviolat durant 10 dies a -50°C.
- Talls ultrafins sobre reixetes d'or amb membrana de *formvar*.

A partir d'aquest moment ja es pot aplicar el protocol d'immunocitoquímica convencional que detallo a continuació, tenint en compte que el contrastat es farà amb acetat d'uranil al 2% en aigua durant 30 min

6.5.2 Doble immunocitoquímica per a microscòpia electrònica

Per estudiar la possible col·localització entre dues proteïnes es va procedir a aplicar la immunodetecció per microscòpia electrònica. Aquesta tècnica deriva de la convencional per a microscòpia òptica amb un seguit d'adaptacions.

És important preservar la ultraestructura, evitar la desaparició o difusió dels antígens, i el marcador ha de ser dens als electrons.

El procediment que es va aplicar sobre les reixetes que contenien els talls ultrafins de les cèl·lules que s'havien d'estudiar va ser el següent:

- Tant els rentatges com les incubacions es fan sobre gotes de la solució adient que es dipositen sobre un *parafilm*, tal com s'indica a la figura. 18. S'ha de vigilar en tot moment no perdre l'orientació de la reixeta.

—SOLUCIONS

—Solució de blocatge

0,02M de glicina
0,1% de BSA
0,1% de Tween
en PBS

—PBS (pH 7,2)

140 mM de NaCl
5 mM de Na₂HPO₄
5 mM de Na₂HPO₄
1.5 mM KH₂PO₄

—Solució dels anticossos

0,02 M de glicina
0,1% de Tween

—Solució de rentatge (R)

0,1% de BSA en PBS pH
7,2

- Cal fer un rentatge de 10 min amb PBS a temperatura ambient.

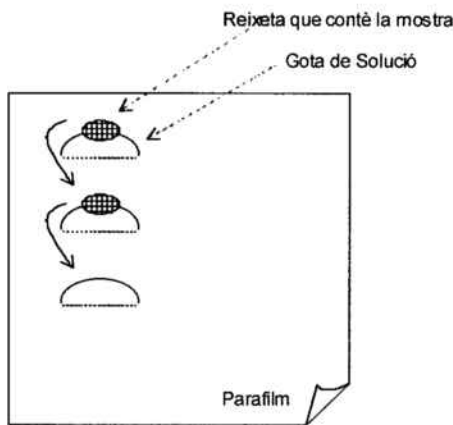


Figura 20. Disposició de les gotes i reixetes en les incubacions.

- S'incuba amb la dissolució de blocatge per tapar als possibles llocs d'unió inespecífics durant 5 min a temperatura ambient.
- Es preparen les dilucions dels anticossos utilitzant la solució dels anticossos. Per facilitar el procediment d'una immunocitoquímica doble, i sempre que es pugui segons la disponibilitat, és recomenable escollir un anticòs monoclonal i un altre de policlonal per minimitzar les reaccions creuades. La incubació dels dos anticossos primaris (un de monoclonal i l'altre de policlonal) es farà conjunta a la dilució adequada (vegeu la taula 13) en tampó de blocatge durant 1 h a temperatura ambient.
- S'apliquen 4 rentatges amb solució R de 5 min cadascun.
- S'incuben conjuntament els dos anticossos secundaris conjugats amb or coloidal de diferents mides (combinacions de 5 –10 nm o 15 – 5 nm).
- Es renta amb solució R durant 10 min. Es renta 4 vegades durant 5 min amb PBS. Es renta durant 30 min amb H₂O MilliQ.
- *Jet-Wash*: s'aplica un rentatge amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur, deixant anar el raig directament sobre la reixeta.

7. Cromatografia d'afinitat a la calmodulina-Sepharose®

El fet de tenir unida de manera covalent la CaM a un suport com ara la reïna de Sepharose® i el gran coneixement de les condicions que afavoreixen la unió de les CaMBP a la CaM (presència de Ca²⁺, que fa exposar els dominis hidrofòbics

de la CaM) ens facilita l'estudi de les possibles proteïnes acceptadores de CaM. Les elucions de les fraccions unides a la CaM es fan per aplicació de rentatges en presència d'EGTA (que provoca un canvi conformacional de la CaM i arriba a alliberar les proteïnes que hi tenia unides).

- A partir d'un lisat total de cèl·lules NRK
- Eliminació de la CaM endògena: per evitar que la CaM endògena tregui rendiment a la columna de CaM-Sepharose® es procedeix a eliminar la CaM endògena del lisat.

— SOLUCIONS:

— Tampó E

50 mM	de Tris-HCl, pH 7,5
1% tritó	de X-100
1 mM	de DTT
200mM	de Na ₃ VO ₄
0,1 mM	de PMSF
1,5 µM	de pepstatina
2 µg/ml	de leupeptina
4 µg/ml	d'aprotinina
5 mM	d'EGTA

Es lisen 2×10^7 cèl·lules en 500 µl de tampó E. Les proteïnes així solubilitzades (1 mg) s'apliquen sobre 300 µl de columna DEAE-Sepharcel preequilibrada amb tampó E. La fracció que no s'hi uneix es recol·lecta i s'hi aplica el WB (α -cdk4), mentre que la CaM endògena del lisat està unida a la columna de DEAE-Sepharcel.

— Cromatografia d'afinitat a la CaM. A la fracció que conté la cdk4, s'hi afegeix el volum adient de 100 mM de CaCl₂ perquè quedi una concentració final de CaCl₂ de 7mM, seguidament es posa en contacte amb 300 µl de CaM-Sepharose® preequilibrada amb solució E conjuntament amb 2 mM de CaCl₂. La columna es renta tres vegades amb el tampó E i finalment s'elueixen les CaMBP aplicant el tampó E amb 5 mM d'EGTA. Les fraccions així eluïdes se sotmeten a una electroforesi i una transferència *Western* posterior.

8 Pull down en columnes de calmodulina

Aquests experiments tenen els mateixos principis bàsics que les columnes d'afinitat, amb la diferència que ja en la incubació es facilita la unió específica a la CaM per la presència de Ca^{2+} , i paral·lelament s'incuba en presència d'EGTA (control). A més es recupera totalment la fracció unida a la CaM, ja que es fa per aplicació de tampó de mostres amb SDS (Laemmli) directament a la columna de CaM.

8.1 Mitjançant proteïnes purificades i fusionades amb –GST

— SOLUCIONS

—Tampó de columna (amb Ca^{2+})

50 mM	de Tris-HCl pH=7.4
100 mM	de NaCl
1%	Tritó X-100
1 mM	de CaCl_2

—Tampó de columna (amb EGTA)

50mM	de Tris-HCl pH=7,4
100mM	de NaCl
1%	de Tritó X-100
5 mM	d'EGTA

Els experiments de *pull down* es van dur a terme tal com es descriu a continuació:

- Es preincuba la columna CaM-Sepharose® amb tampó de columna \pm EGTA durant 10 min a 4°C.
- Es posa en contacte 1 μg de cadascuna de les proteïnes de fusió amb GST amb 20 μl de la columna de CaM-Sepharose® (1:1, proporció de reïna seca i de tampó) en presència o no de Ca^{2+} .
- S'incuba en agitació suau durant 2 h a 4°C.
- Es recol·lecta la fracció no unida a la columna.
- Es fan 2 rentatges de 1ml en tampó de columna \pm EGTA
- S'aplica tampó de mostres amb SDS per alliberar la fracció que s'havia unit a la columna.
- Es carrega la fracció unida i la no unida (sobrenedant) sobre un gel d'acrilamida i se sotmet a una electroforesi.

8.2 A partir d'un lisat

El procediment que cal seguir és el mateix que el descrit a l'apartat anterior (8.1), però en lloc de posar en contacte les proteïnes purificades amb la CaM, s'incuba

un lisat total en presència de Ca^{2+} o EGTA i s'elueix amb tampó de mostres Laemmli.

9. Microinjecció

Aquesta metodologia es va aplicar per corroborar els resultats obtinguts en l'aplicació de drogues anti-CaM sobre la localització subcel·lular de la cdk4. En aquest cas es va utilitzar el pèptid sintètic corresponent al domini d'unió a la CaM de la CaMKII (aminoàcids 290-309). Microinjectant aquest pèptid al citoplasma de les cèl·lules NRK a les 5-8h després de la reactivació a proliferar, s'ocupen els llocs hidrofòbics de la CaM que reconeixen les CaMBP per mitjà de les quals actua. Una vegada finalitzada la microinjecció i després d'esperar el temps prudencial perquè el pèptid interacció amb la CaM, es procedeix a l'estudi de la localització de la cdk4 mitjançant la immunocitoquímica.

L'equip que es va utilitzar per dur a terme les microinjeccions citoplasmàtiques va ser el de la marca Zeiss (AIS) acoblat a una bomba Eppendorf 5246 tranjector. El fragment de la CaMKII corresponent als aminoàcids 290-309 (137) en solució aquosa es barreja amb dextrà de 155.000 D conjugat amb rodamina (SIGMA) en PBS per fer-lo servir com a marcador de microinjecció. La concentració final de pèptid utilitzada per microinjectar va ser de 240 μM i 1% de dextrà conjugat amb la rodamina. Per les cèl·lules control, la solució injectada constava únicament d'un 1% de dextrà conjugat amb la rodamina.

Les cèl·lules NRK utilitzades per microinjectar procedien d'un cultiu sincrònic i quiescent reactivat sobre cobreobjectes de vidre.

Els cobreobjectes es transfereixen, just abans de la microinjecció (5-8 h després de l'activació proliferativa), a DMEM modificat amb HEPES (SIGMA) suplementat amb un 5% de FCS.

Una vegada finalitzada la microinjecció, els cobreobjectes es transfereixen i s'incuben en un medi nou (DMEM 5% de FCS) durant 1 h (en una atmòsfera al 5% de CO_2 i a 37°C), abans de ser fixats continuar amb la immunocitoquímica i per detectar si el marcatge nuclear de la cdk4 estava alterat. Per detectar si s'estava inhibint la síntesi de DNA es van incubar les cèl·lules fins a les 21h

postactivació. La fixació i la immunocitoquímica per detectar la cdk4 es va realitzar com s'ha explicat a l'apartat 6.3.

El control de que realment s'estava inhibint la síntesi del DNA per efecte de la inhibició de la CaM, es va realitzar mesurant l'índex de marcatge obtingut de la immunocitoquímica bromodeoxiuridina (α -BrdU). El comptatge de nuclis marcats que corresponien als positius per immunocitoquímica α -BrdU a les 21h després de l'activació.

— PROCEDIMENT

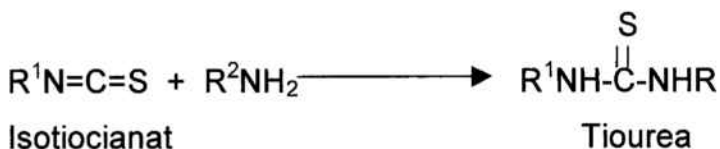
- S'afegeix al medi BrdU (3 μ g/ml) a les 19 h després de l'activació proliferativa.
- S'incuba durant 2 h.
- Es fixen les cèl·lules durant 30 min en presència d'etanol i acètic (95:5). La BrdU es detecta amb un anticòs primari contra la bromodesoxiuridina (Amersham Pharmacia Biotech), l'anticòs secundari que s'utilitza és monoclonal i està conjugat amb fluoresceïna (1:100, Boehringer Mannheim).
- La quantificació del marcatge nuclear per la cdk4 es va valorar utilitzant la càmera Zeiss ZVS-47DE CCD i es va utilitzar el software KS 100 Kontron Imaging System. La *meangreen* (mitjana del valor densitomètric del canal verd) superior a 100 unitats era considerada com a marcatge positiu.

10. Conjugació de proteïnes amb fluorocroms

10.1 Conjugació amb derivats de l'isotiocianat

Els fluorocroms que deriven de l'isotiocianat tenen la particularitat de establir enllaços covalents amb els grups amino de les proteïnes amb les quals poden conjuguar-se.

La reacció que té lloc s'especifica a continuació:



10.1.1 FITC

Aquest fluorocrom és un derivat de la fluoresceïna (Fluoresceïna isotiocianat) (FITC). El FITC té un pes molecular de 531,7 i una absorbància màxima a 492 nm i l'emissió és màxima a 513 nm.

—Reactius

CALBIOCHEM® FITC Labeling Kit # 343210

Aquest *kit* conté:

FITC	5 x 0,85mg
Dissolvent (DMF)	4 ml
Tampó carbonat (100x)	100 ml
PBS (10x + 1% de NaN ₃)	100 ml

La reconstitució del FITC es fa amb 850 µl del dissolvent per vial de FITC. La concentració del FITC així obtinguda és d'1mg/ml.

Els passos que cal seguir són els següents:

- Cal tenir la proteïna que s'ha de marcar dissolta en tampó carbonat, això es pot fer dialitzant-la enfront d'aquest tampó en un sac de diàlisi de mida de por adequat. Per al marcatge de la cicD-GST, la cdk-GST i la nucleoplasmina es van utilitzar els de SIGMA D-9277.
- S'ha de portar la proteïna a una concentració de 2 mg/ml.
- Es reconstitueix al FITC fins a 1 mg/ml
- S'ha de barrejar la proteïna amb el FITC. La relació ha de ser 2,5 mg de proteïna per 500 µl de FITC (1 mg/ml) . Es fa un vòrtex durant uns instants i es deixa incubar-ho a temperatura ambient durant 2 h en un rotor.
- Cal dialitzar-ho en PBS durant 2 dies a 4°C, per eliminar el FITC lliure.
- S'emmagatzema a 4°C i preservat de la llum.

10.1.2 TRITC

El TRITC (Tetrametilrodamina Isotiocianat; CALBIOCHEM #588406) és un derivat de la rodamina, té un pes molecular de 443,5 D. Una excitació màxima a 554 nm i una emissió màxima a 573 nm.

—PROCEDIMENT

- Cal dialitzar la proteïna (1-2 mg) en tampó borat o carbonat.

- Es dissolen 3 mg de TRITC en 1 ml de DMSO i s'afegeixen 100 ml de tampó borat.
- Es dialitza la proteïna en aquesta dissolució de TRITC durant tota una nit a 4°C.
- Es fan varis canvis del tampó borat durant 2 dies.
- S'emmagatzema a 4°C i preservat de la llum.

10.1.3 Conjugació de proteïnes amb B-ficoeritrina (BP)

Aquest tipus de fluorocrom es caracteritza per la seva mida gran (PM 240.000 D) i per tenir una absorbància màxima a 546 nm i una emissió màxima a 576 nm. S'uneix a la proteïna problema mitjançant una molècula que fa de pont o *crosslinker* (sulfo-SIAB). El fet d'escollir aquest fluorocrom va ser perquè el tipus de conjugació preservava molt més l'estructura de la proteïna que s'havia de marcar.

— MATERIAL

<i>B-Phycoerythrin</i>	Molecular Probes #P-800
Sulfo-SIAB	Pierce #22327G
PBS	
Columnes PD-10	Pharmacia #17-0851-01
Centricon	Amicon (que dicriminini bé la proteïna que s'ha de marcar).

El protocol que s'ha d'aplicar és el següent:

- Es preequilibren amb 50 ml de PBS dues columnes PD-10 per a cada marcatge que es vulgui dur a terme.
- S'apliquen 300 µl de BP a una columna PD-10 i es renta amb PBS per eliminar el dissolvent.
- Es recull directament amb un centricon el que surt de la columna (color rosa).
- Es centrifuga a 3.000 rpm a 4°C durant 25 min en un rotor fix Sorvall.
- S'inverteix el tub i es torna a centrifugar per recollir el que s'ha retingut.
- Es transfereix a un tub i s'afegeixen 8 µg/ml de sulfo-SIAB (preparat del dia). La reacció és òptima a pH 7, però ens convé mantenir-la a 8 per afavorir els passos següents.
- Es fa rodar (tapat de la llum) durant 2 h a 25°C.

Després de l'experiència obtinguda fent els assajos de transport *in vitro*, es recomana marcar la proteïna problema amb dos tipus de fluorocroms diferents i aplicar el procediment que es descriu per al sistema de transport *in vitro*. Confrontant els resultats obtinguts emprant un marcatge o un altre sabrem si el fluorocrom interfereix el transport o no i si el marcatge és específic. Una altra precaució que s'ha de tenir és passar la proteïna conjugada amb el fluorocrom per una PD-10 (Pharmacia) per tal d'eliminar la fluorescència lliure, que podria donar un marcatge inespecífic. • Es purifica en una PD-10 i es concentra tal com s'ha fet abans.

- Es transfereix al tub que contingui la proteïna que s'ha diluït prèviament amb 400 µl aproximadament de PBS (el pH ha de ser de 8,3).

- Es deixa rodar tota la nit a 4°C, preservat de la llum.

A l'endemà:

- Es preequilibra amb 50 ml de PBS, una PD-10 per a cada conjugació que es vulgui fer.

- Se centrifuga el conjugat proteïna-BP, es concentra en un centricon i es dilueix amb 200 µl de PBS.

- S'aplica el conjugat sobre una columna PD-10 i es renta amb PBS (s'ha d'intentar que el PBS no dilueixi directament la mostra).

- Es recull directament el pic de color en un centricon.

- Es quantifica tot fent una dilució 1:100 en PBS i llegint l'absorbància a 568

$$(A_{568}) \times (100)/(9.65) = \text{mg/ml}$$

$$(\text{mg/ml}) \times (1000)/(240) = \mu\text{M conjugat}$$

11. Assaig *in vitro* d'importació nuclear en cèl·lules permeabilitzades amb digitonina

Protocol modificat a partir d'Adam et al. (1990; 1992) (2) (3).

L'objectiu d'aquesta tècnica és veure si una proteïna problema afegida exògenament i marcada fluorescentment pot ser transportada al nucli en cèl·lules permeabilitzades amb digitonina.

Les cèl·lules es tracten amb digitonina, detergent selectiu que provoca porus únicament en aquelles membranes riques en contingut de colesterol com ara la membrana plasmàtica. D'aquesta manera, obtindrem cèl·lules amb el contingut nuclear intacte. Aquest sistema ens permetrà estudiar la regulació de la importació cap al nucli d'una proteïna exògena degudament marcada amb un fluorocrom.

—Tampons

—Tampó A (10x)

Reactiu	Concentració mare	Concentració a l'assaig
HEPES, pH 7,3	200 mM	20 mM
Acetat de potasi	1,1 M	110 mM
Acetat de sodi	50 mM	5 mM
Acetat de magnesi	20 mM	2 mM

Taula 12. Composició del tampó A (concentrat 10 vegades).

—Tampó B (10x)

140 μ l de DTT
 70 μ l d'inhibidors de proteases I
 70 μ l d'inhibidors de proteases II
 6720 μ l d'H₂O MilliQ

—Tampó de rentatge

5 ml de tampó A
 5 ml de tampó B
 40 ml d'H₂O MilliQ

—Tampó de permeabilització

500 μ l de tampó B 10x
 500 μ l de digitonina
 3.990 μ l de H₂O MilliQ

— Fosfat de creatina (100x)

500 mM de fosfat de creatina (CALBIOCHEM®) en H₂O MilliQ

— Creatina kinasa (10x)

200U/ml en 10 mM de glicina, pH 8,9, 25% de glicerol (CALBIOCHEM®)

— Solució de BSA al 10% en H₂O

— Solució de Digitonina (500x)

20 mg/ml de digitonina en DMSO (CALBIOCHEM®)

—Solució de GTP

100 mM en H₂O, pH 7 (SIGMA)

—Solució DTT (500x)

1 M dithiothreitol/ en H₂O
 MgATP-EGTA
 100 mM de magnesium ATP
 50 mM d'EGTA

—Inhibidors de proteases I (1000x en H₂O)

1mg/ml de leupeptina
 1mg/ml d'aprotinina

— Inhibidors de proteases II (1000x en DMSO)

1 mg/ml pepstatina

— Tampó de fixació

300 μ l de tampó A 10x
300 μ l de tampó B 10x
1,4 ml de H₂O
1 ml de 20% de formaldehid (de bona qualitat)

— Extractes citoplasmàtics d'Hela

- Es rasquen les cèl·lules (per acció mecànica amb l'ajuda d'un scrapper) de la placa de cultiu on estaven creixent fent servir tampó de rentatge.
- Se sonica en fred.
- Se centrifuga a 4°C a la ultracentrífuga de sobretaula a 100.000 rpm durant 15 min.
- Es recull el sobrenedant que correspon a la fracció citoplasmàtica.

— Tampó d'importació

100 μ l de tampó A
100 μ l de tampó B
100 μ l de creatina kinasa
100 μ l de BSA 10%
10 μ l de creatina fosfat
10 μ l de MgATP-EGTA
10 μ l de solució de GTP
10 μ l d'extractes citoplasmàtics d'Hela
x μ l de W13 o W12
x μ l de proteïna problema conjugada amb el fluorocrom
x μ l d'H₂O fins a arribar a 550 μ l

— DROGUES: W13 i W12 (SIGMA)

Concentració mare W13 i W12 = 10 mg/ml (28.6 mM)
Concentració de treball = 30 - 50 μ M

Thapsigargin (SIGMA)

Concentració mare = 1 mM
Concentració de treball = 10 μ M

— PROCEDIMENT

Les cèl·lules es van fer créixer sobre cobreobjectes de vidre fins a un 60% de confluència durant 48 h abans de l'experiment.

- S'aplica 1 ml de tampó de rentatge fred, 3 vegades.
- S'incuba cada cobreobjectes (en un placa de 24 pous) amb 400 μ l de tampó de permeabilització a temperatura ambient
- Es fan 4 rentatges (d'1 ml cadascun) amb el tampó de rentatge.
- S'incuba cada cobreobjecte (cara amunt) amb 25 μ l de tampó d'importació en una cambra humidificada (protegida de la llum) a 37°C, durant 30 min.
- Es decanta el líquid de sobre els cobreobjectes.
- Se submergeixen els cobreobjectes durant 10 s a l'interior de la solució de fixació.
- Es disposen els cobreobjectes sobre un portaobjectes aplicant 3 μ l de mowiol.

Anticòs primari.	Font	WB	IP	Immunocitoquímica (IC)	
				Òptica	electrònica
cdk2	UBI (C) #06-505	3 µg/ml	-	-	-
cdc2	UBI (C) #06-194	3 µg/ml	-	-	-
cdk4	Trans. Lab (M) #C-18720 (0,25mg/ml)	-	-	Dil (1:20)	-
cdk4	Clontech (R) #3516-1	100µg/ml	-	-	-
cdk4	Santa Cruz #sc-260-R	0,5 µg/ml	4 µg	20 µg	40 µg
cicA	UBI # 06-138	7 µg/ml	-	-	-
cicE	Santa Cruz # sc-198	1 µg/ml	-	-	-
cicD1	UBI (C) # 06-137	0,2 µg/ml	4 µg	Dil. (1:50)	Dil. (1:100)
pRb	Santa Cruz (C) #sc-50	2 µg/ml	-	-	-
p21 ^{CIP1}	Calbiochem (M) # 0P64	-	5 µg	-	-
p21 ^{CIP1}	Santa Cruz #sc-397	2µg/ml	5 µg	20 µg	-
p27 ^{KIP1}	Dr. J. Massagué (C)	Dil. (1:500)	-	-	-
CaM	UBI (M) # 05-173 (1,2µg/µl)	Dil. (1:2000)	-	-	-
CaM	Dr. Sacks (M) (1.9 mg/ml)	0,25 µg/ml	5 µg	-	Dil. (1:250)
Hsp90	StressGen # SPA-830 (M) (80 µg/ml)	Dil (1:500)	4 µg	-	-
Nucleolina	Dr. L. Ghisolfi-Nieto	-	Dil. (1:200)	-	-

Taula 13. Relació d'anticossos primaris utilitzats per IP, WB i IC.; UBI = Upstate Biotechnology; (C) = policlonal α -conill; (M) = monoclonal, α -ratolí; Dil. = dilució utilitzada.

Anticòs secundari	Font	WB i IP	Immunocitoquímica	
			Òptica	electrònica
α -conill-PA	Promega #	1:10.000	Dil (1:250)	-
α -conill-HRP	Bio-Rad	1:2000	-	-
α -conill-FITC	SIGMA # F-1262	-	Dil. (1:100)	-
α -mouse-TRITC	BM	-	Dil. (1:100)	-
α -(C)-(G)	Biol. Ind.	-	-	1:25
α -(M)-(G)	Biol. Ind.	-	-	1:25

Taula 14. Relació d'anticossos secundaris utilitzats per WP, IP i IC.

PA = conjugat amb fosfatasa
 HRP = conjugat amb peroxidasa
 BM = Boehringer Mannheim
 (G) = conjugat amb or de 10 nm o de 5 nm
 Biol. Ind. = Biological Industries

IV. Resultats



1. La calmodulina és essencial per a l'activació de la kinasa 4 depenent de la ciclina (cdk4) i per a l'acumulació nuclear de la ciclina D1 i la cdk4 durant la fase G₁

El cicle cel·lular de les cèl·lules NRK va ser caracteritzat per López-Girona et al. (99) (17). Es va observar que un cultiu sincrònic de NRK que s'havia activat a proliferar a partir de la quiescència, començava a sintetitzar el DNA a les 12 h després de la reactivació i arribava al màxim a les 18-20 h. Estudis posteriors van demostrar que aplicant drogues anti-CaM 5 h després de l'activació (primera meitat de la fase G₁) es provocava una aturada del cicle abans de la fase S a causa de la inhibició de la DNA polimerasa α i δ i de la inhibició de l'expressió de l'antigen de proliferació nuclear (PCNA, cofactor de la DNA pol δ) (99) (97) (98). Es va comprovar que l'addició de les drogues en estadis més avançats de la G₁ tenia menys efecte sobre la inhibició de la síntesi del DNA. La droga anti-CaM que es va utilitzar en aquest estudi va ser el W13, la qual ha estat molt emprada tant per la seva gran especificitat en les dosi emprades (22) (99) (97) (98) com per l'existència d'una molècula de control, el W12, de natura similar al W13 però amb molta menys afinitat per la CaM.

Aquests estudis previs ens han permès plantejar-nos noves hipòtesis de treball, com ara que la CaM podia ser essencial durant la fase G₁ perquè tingués lloc un esdeveniment comú en l'expressió de diferents gens de la fase S. Tal com s'ha explicat en la introducció, un fet essencial per a l'expressió dels gens de fase S és l'activació de la cdk4, de la cdk2 i la fosforilació de la proteïna del retinoblastoma. Els resultats que s'exposen a continuació ens van permetre confirmar aquesta hipòtesi i revelar els nivells sobre els quals la CaM regulava l'entrada i la progressió de la fase G₁.

1.1 L'aturada del cicle cel·lular a la fase G₁ produïda per la inhibició de la calmodulina és reversible

El fet d'haver utilitzat drogues anti-CaM per a l'estudi de la implicació d'aquesta sobre el cicle cel·lular, ens va dur a fer els controls per assegurar-nos que no s'estava causant a les cèl·lules un dany irreversible.

Tal com s'ha detallat en l'apartat "Materials i mètodes", les cèl·lules NRK es van sincronitzar per supressió parcial dels factors de creixement (es van fer créixer en DMEM al 0,5% durant 3 dies) i per inhibició per contacte (cultiu confluent).

Les concentracions de W12 i W13 utilitzades en aquest estudi van ser de 15 µg/ml (28,6 µM) i es van afegir al medi de cultiu a les 5 h d'haver reactivat les cèl·lules a partir de la quiescència. Per veure que l'efecte de la droga era reversible es van tractar les cèl·lules durant 2 h amb W13 o W12 (control). Trascorregut aquest període de temps es va fer un canvi de medi, substituint-lo per medi nou amb un 5% FCS. Es va mesurar la incorporació de timidina tritiada durant 1 h subministrant polsos a diferents temps (a les 18 h, 20 h, 22 h i 24 h) sobre les cèl·lules tractades amb W13, amb W12 i cèl·lules sense tractar. Tant les cèl·lules de control (no tractades) com les tractades amb la droga de control (W12) presentaven un màxim d'incorporació de timidina a les 20 h, mentre que les cèl·lules tractades amb W13 assolien el mateix màxim a les 22 h (fig. 21). Això demostrava que l'aplicació de la droga durant 2 h provocava l'aturada del cicle cel·lular abans de la fase S, i que era susceptible de ser revertit, perquè canviant el medi es veia que les cèl·lules entraven sincrònicament a la fase S amb un retard de 2 h respecte de les control i de les no tractades. El fet que l'endarreriment coincidís amb el temps de tractament indicava que la droga no feia retornar les cèl·lules a la quiescència (G₀) sinó que només hi havia un retard en l'assoliment del màxim en la síntesi del DNA.

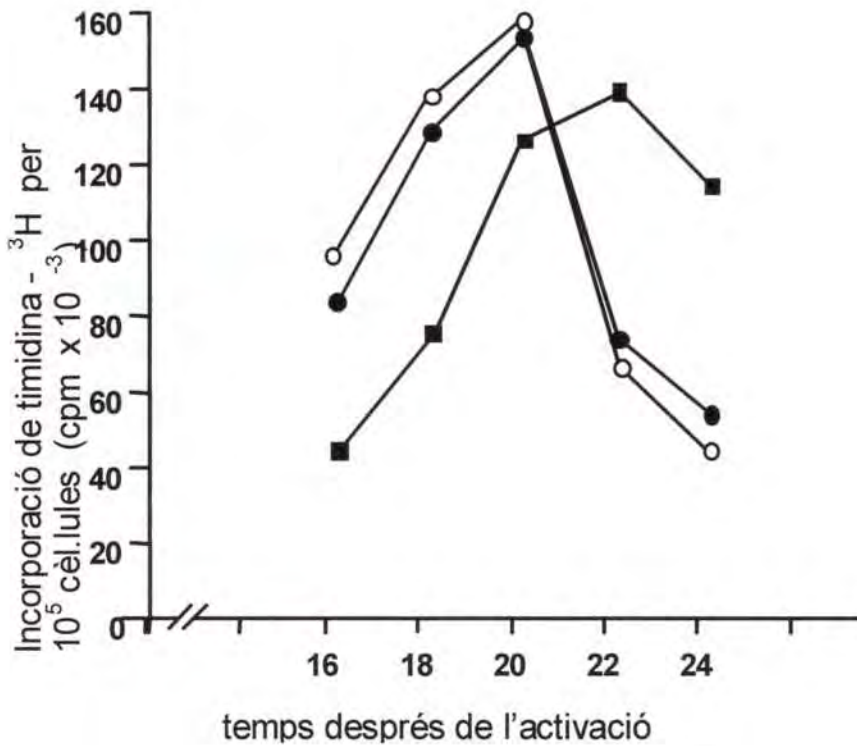


Figura 21. La inhibició de la CaM provoca una aturada reversible en la fase G₁. Es va mesurar la incorporació al DNA de la timidina-³H que tenia lloc durant 1 h. Les mesures es van prendre a les 16, 18, 20, 22 i 24 h després d'haver reactivat les cèl·lules NRK (tal com s'explica a "Materials i mètodes"). Les rodones buides representen la incorporació de timidina-³H en cèl·lules de control. Les rodones plenes representen les tractades amb W12 i els quadrats les tractades amb W13 que van ser afegides (15 µg/ml) 5 h després de l'activació proliferativa, 2 h després es va substituir per medi sense drogues (DMEM al 5% de FCS).

1.2 La inactivació de la calmodulina durant la primera part de la fase G₁ evita la fosforilació de pRb i l'activació de la cdk4 i la cdk2

Un dels esdeveniments clau en la progressió de la fase G₁ a la S és l'activació de la cdk4 i de la cdk2 i la consegüent hiperfosforilació de la pRb. És per això que a continuació es va analitzar l'estat de fosforilació de pRb sota els efectes de la droga anti-CaM. La droga va ser suministrada a les 5 h després de l'activació proliferativa del cultiu. La forma hiperfosforilada de la pRb (pRb-P) té menys mobilitat en un gel de poliacrilamida-SDS (18), i es pot diferenciar així de la hipofosforilada (més lleugera). A les cèl·lules quiescents, la pRb estava hipofosforilada. A les 5 h ja es posava de manifest la forma fosforilada i a les 20 h la forma majoritària a les cèl·lules de control era la hiperfosforilada; mentre que a les cèl·lules tractades amb W13, la forma més abundant a les 20 h era la hipofosforilada, (vegeu fig. 22A). Això ens indicava que la inhibició de la CaM evitava la fosforilació de la proteïna Rb.

Com que la pRb és el substrat de la cdk4 i cdk2, es va estudiar si el W13 estava afectant l'activitat d'aquestes kinases. Les cèl·lules quiescents no presentaven ni activitat cdk4 ni cdk2. La cdk4 estava activada a les 5 h després de l'estimulació proliferativa de les cèl·lules i romania alta durant la fase G₁ (més enllà de les 10 h). La cdk2 s'activava més tard que la cdk4: a les 5 h l'activitat de la cdk2 era baixa, s'incrementava a les 7 h i era alta a les 15 h (fase S). A les cèl·lules tractades amb W13 es va trobar que tant l'activitat de la cdk4 com la de la cdk2 estava clarament inhibida en tots el temps estudiats, si bé hi havia una certa reversió de l'activitat de la cdk2 amb temps llargs.

Tal com s'ha explicat en la introducció, l'activitat de les kinases pot ser regulada a diferents nivells. És per això que a continuació es mostra l'efecte de la inhibició de la CaM sobre els principals punts susceptibles de ser regulats.

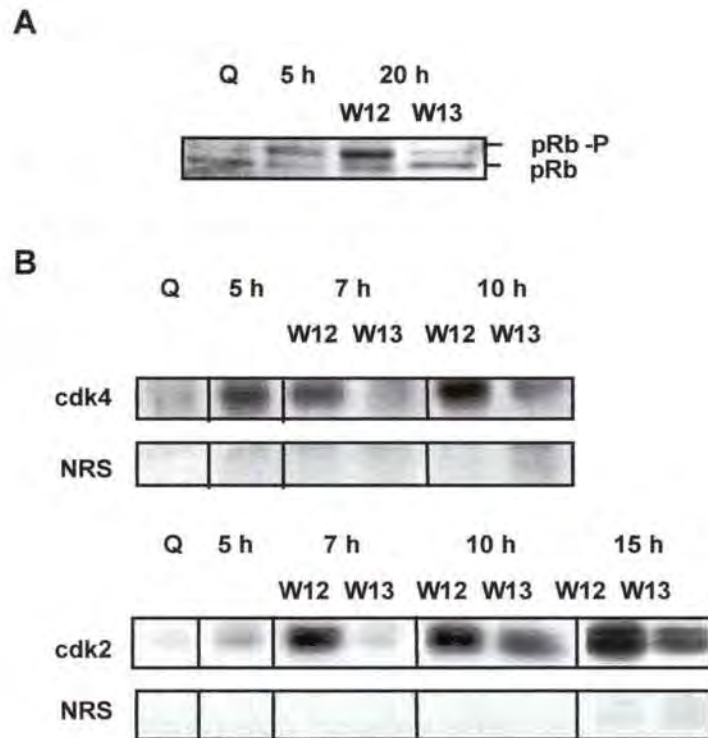


Figura 22: Efecte del W13 sobre la fosforilació de la pRb i de l'activitat de les cdk. A. Efecte del W13 sobre la fosforilació de la pRb. Es van lissar cèl·lules quiescents (Q) o cèl·lules activades proliferativament a diferents temps (5 h i 20 h) després de l'addició del sèrum. Les cèl·lules recollides a les 15 h havien estat tractades a les 5 h (després de l'activació) amb W12 o W13 en una concentració de 15 $\mu\text{g/ml}$. 50 μg de proteïna procedent del lisat va ser sotmesa a una electroforesi en un gel de 6% SDS-poliacrilamida, electrotransferit i sotmès a una transferència *Western* (tal com s'explica a "Materials i mètodes"). L'anticòs que es va utilitzar, anti-pRb, reconeixia tant la forma hipofosforilada (pRb) com la hiperfosforilada (pRb-P).

B. Efecte del W13 sobre l'activitat de les cdk. Cèl·lules NRK quiescents (Q) van ser activades proliferativament i es van lissar en els temps que s'indiquen a la figura. Les cèl·lules recollides a les 7, 10 i 15 h s'havien tractat a les 5 h després de la reactivació amb 15 $\mu\text{g/ml}$ de W12 o W13. Els lisats cel·lulars van ser immunoprecipitats amb anticossos contra la cdk4 i la cdk2. Com a controls es van utilitzar les immunoprecipitacions fetes amb sèrum normal de conill (NRS). Després de la immunoprecipitació, es va procedir a dur a terme l'assaig de cinasa (tal com s'ha explicat a "Materials i mètodes"). Per analitzar l'activitat de la cdk4 es va afegir un fragment de pRb com a substrat; i per detectar l'activitat de la cdk2 es va fer servir a la histona H1 com a substrat.

1.3 Efecte de la inhibició de la calmodulina sobre els nivells totals de les ciclines i de les kinases dependents de ciclins (cdk)

Per estudiar com la CaM regulava l'activitat de les cdk, es va analitzar amb transferència *Western* la quantitat total de les cdk i ciclins tant en extractes totals de cèl·lules quiescents com de cèl·lules proliferants tractades amb el W13 i el W12 (control) a les 5 h després de l'activació. En les cèl·lules quiescents ja es detectaven nivells considerables de cdk4 i cdk2. Després de l'activació, els nivells de cdk4 romanien constants mentre que els de la cdk2 s'incrementaven a les 5 h i es mantenien fins a les 20 h. Així doncs, l'addició del W13 als cultius a les 5 h després de l'activació no afectava els nivells totals ni de cdk4 ni de cdk2. (vegeu fig. 23).

La *cdc2* no s'expressava en cèl·lules quiescents i els seus nivells eren menyspreables fins al voltant de les 10 h (fig. 22). L'addició del W13 a les 5 h de la reactivació provocava una disminució dels nivells de la *cdc2* a les 15 i 20 h, respecte a les cèl·lules de control.

La *cicE* i la *cicA* no es van detectar en les cèl·lules quiescents. Els nivells màxims de *cicE* es van observar a les 10 i 15 h, corresponents al final de la fase G₁ i al principi de la fase S; tanmateix, els nivells de *cicA* s'incrementaven a les 15-20 h. El tractament amb W13 no afectava la *cicE*, però sí que provocava una disminució en la quantitat de *cicA* (fig. 23). Així doncs, el tractament dels cultius amb el W13 a les 5 h de l'activació induïa un decrement de la *cicA* i de la *cdc2*, mentre que els nivells de la *cicE*, la *cdk4* i la *cdk2* no quedaven afectats. La davallada de la *cicA* podria ser la responsable de la disminució de l'activitat de la *cdk2* observada a les 15 h en les cèl·lules tractades amb el W13. Per tant, d'acord amb els resultats de fosforilació de la pRb, els nivells de les proteïnes que eren codificades pels gens dependents d'E2F (*cicA* i *cdc2*) eren baixos. En estar la CaM inactiva, l'E2F estaria segregat per la forma hipofosforilada de la pRb, que impediria d'aquesta manera l'estimulació dels promotors dels gens dependents del factor de transcripció E2F.

1.4 Efecte de la inhibició de la calmodulina sobre les quantitats de p21^{CIP1} i p27^{KIP1}

Les cèl·lules responen a estímuls negatius incrementant la quantitat de proteïnes inhibidores associades a les cdk (per exemple, p21^{CIP1} i p27^{KIP1}) i poden arribar a inhibir l'activat (85). Per aquest motiu es va analitzar si la inactivació de la CaM podria afectar els nivells totals de p21^{CIP1} i p27^{KIP1}. Es va observar que els nivells de p21^{CIP1} eren baixos en cèl·lules quiescents i que augmentaven després de l'addició del sèrum; els nivells romanien constants fins a les 5 h-15 h d'haver fet l'activació. La quantitat de p27^{KIP1} a les cèl·lules quiescents era alta i disminuïa després d'haver afegit el sèrum. D'altra banda, el tractament amb W13 no alterava ni els nivells de p21^{CIP1} ni de p27^{KIP1}.

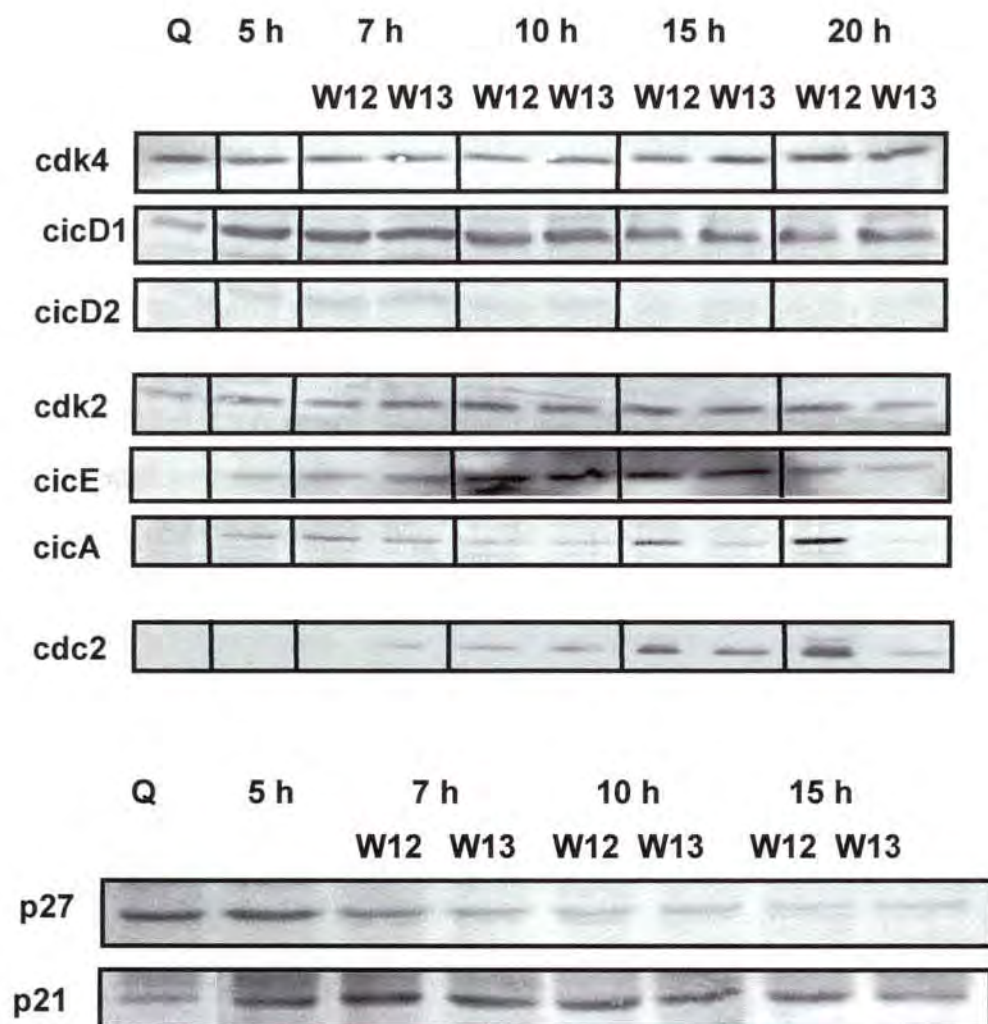


Figura 23: Efecte de la droga anti-CaM sobre els nivells de les cdk, les ciclines, i les CKI. Les cèl·lules NRK quiescents (Q) van ser activades proliferativament per l'addició de sèrum i en els temps que s'indiquen a la figura es van lissar per poder ser sotmeses a una transferència *Western* (tal com s'ha detallat a "Materials i mètodes"). La droga anti-CaM, el W13, i el seu control W12, van ser afegides en una concentració de 15 $\mu\text{g/ml}$ a les 5 h després de l'activació proliferativa. 30 μg de proteïna de cadascun dels lisats es va sotmetre a una electroforesi en un gel de SDS-poliacrilamida. Per a l'anàlisi de la cdk4, la cdk2, la cdc2, la cicD1 i la cicD2 els gels que es van utilitzar eren al 10% de SDS-poliacrilamida, mentre que per a la detecció de la cicE, cicA es van resoldre les proteïnes en un gel del 8%; per a la detecció de p27^{KIP1} (p27) i p21^{CIP1} (p21) es va fer servir un gel al 12% de SDS-poliacrilamida. Una vegada acabada l'electroforesi es va procedir a transferir-ho tot a membranes (tal com s'ha descrit a "Materials i mètodes"). Aquestes membranes es van incubar amb les dilucions adjacents dels anticossos indicats a la figura 23 (tècnica de transferència *Western* detallada a "Materials i mètodes").

1.5 La inactivació de la calmodulina no afecta el patró electroforètic bidimensional de la cdk4

El patró bidimensional de la cdk4 obtingut de l'electroforesi en dues dimensions i *Western blot* posterior α -cdk4 de les mostres procedents de cèl·lules quiescents, de les recollides a les 5 h i a les 7 h de l'activació (tractades amb W13 o W12, a les 5 h després de l'activació), posava de manifest algunes marques (pl 5,3-5,9) (fig. 24). La variabilitat en la mobilitat de la cdk4 es podria de a diferents graus de fosforilació.

Els canvis d'intensitat de les marques només es produïen entre les corresponents a les 5 h i 7 h després de l'activació proliferativa, sense trobar diferències significatives entre les corresponents a les obtingudes amb el tractament amb W12 i W13.

Per tant, s'observava que en activar les cèl·lules a proliferativament hi havia un canvi en el patró de mobilitat electroforètica de la cdk4, i probablement en el seu estat de fosforilació. Tanmateix, la inhibició de la CaM no provocava cap canvi en aquest patró.

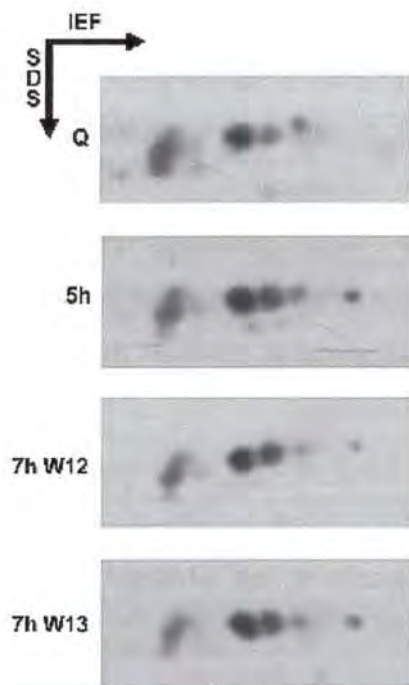


Figura 24: Patró electroforètic bidimensional de la cdk4

Es van lissar cèl·lules quiescents (Q), cèl·lules a les 5 h d'haver estat activades proliferativament i les cèl·lules tractades amb W12 i W13 a les 5 h (després de l'activació) i recollides a les 7 h (després de l'activació). Aquests lisats es van sotmetre a un isoelectroenfocament (IEF). Després es van resoldre en un gel al 10% de SDS-poliacrilamida i es van transferir a membranes (tal com s'explica a "Materials i mètodes"). Les membranes van ser incubades amb dilucions adients d'anticòs anti-cdk4.

1.6 Efecte de la inhibició de la calmodulina sobre la formació dels complexos cdk4/cicD1

Es va analitzar la possibilitat que la CaM estigués involucrada en la formació dels complexos cdk4/cicD1. Els lisats cel·lulars es van immunoprecipitar amb cicD1 i es van sotmetre a electroforesi seguida de l'immunotransferència contra cicD1, cdk4, p21^{CIP1} i p27^{KIP1}. Tal com es mostra a la figura 25, la cicD1 ja es va trobar formant complexos amb la cdk4 en les cèl·lules quiescents conjuntament amb una gran quantitat de p27^{KIP1} i uns nivells menyspreables de p21^{CIP1}. A les 7 h de l'activació es van trobar nivells molt més alts de cdk4 i cicD1, i la quantitat de p21^{CIP1} associada a la cicD1 augmentava mentre que la p27^{KIP1} associada anava disminuint. En les mostres tractades amb W13 o W12 a les 5h després de l'activació i que van ser recollides a les 7 h no es van detectar canvis en la formació dels complexos quan es va immunoprecipitar en ambdós sentits: utilitzant anticossos contra la cdk4 (dades no mostrades) o contra la cicD1 (fig. 25).

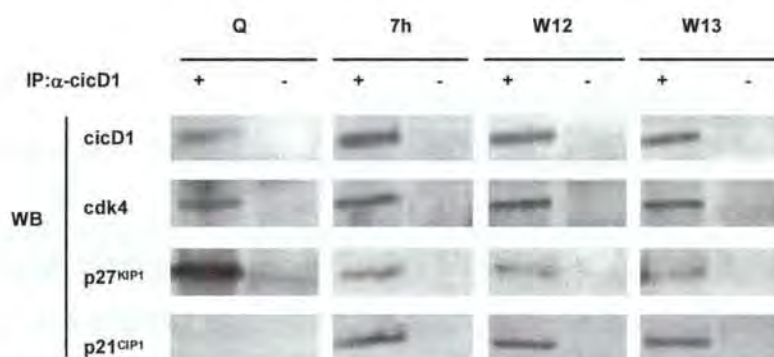


Figura 25. Efecte del W13 en l'associació de la cdk4, la p21^{CIP1}, la p27^{KIP1} a la cicD1.

Cèl·lules NRK quiescents (Q) es van activar proliferativament i a les 5 h es va afegir al medi de cultiu la droga anti-CaM, W13 a 15 µg/ml, i el control W12 en la mateixa concentració; també es van cultivar cèl·lules NRK sense cap tractament de drogues i es van recollir a les 7 h després d'haver-les reactivat. Totes les cèl·lules corresponents a diferents temps o tractaments (Q, 7h, W12 i W13) es van processar per dur a terme les immunoprecipitacions contra la cicD1 (+) o amb sèrum normal de conill com a control (-) seguint el protocol detallat a "Materials i mètodes". Els immunoprecipitats es van sotmetre a una electroforesi en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%, i es van transferir a membranes. Les membranes van ser incubades amb les dilucions adients dels anticossos dirigits contra la cicD1, la cdk4, la p27^{KIP1}; la p21^{CIP1}.

1.7 La calmodulina és essencial per a l'acumulació nuclear de la cdk4 i de la cicD1

Tant la cdk4 com la cicD1 s'han descrit com a nuclears durant la fase G₁ (11), coincidint amb la localització nuclear de la pRb, que és el principal substrat conegut de la cdk4. L'anàlisi immunocitoquímica va posar de manifest que la proporció de cèl·lules quiescents amb marcatge nuclear de la cdk4 i de la cicD1 era molt baixa (corroborant el que es descriu en la referència (11)). El percentatge de nuclis marcats era més alt a les 5 h després de l'activació proliferativa, arribant a ser a les cèl·lules de control (W12 i cèl·lules sense cap tractament) quasi la totalitat dels nuclis positius. Després del tractament amb W13, el percentatge de cèl·lules amb marcatge nuclear de la cdk4 i la cicD1 a les 7 h va disminuir dràsticament fins a assolir pràcticament els nivells de les cèl·lules quiescents (fig. 26A).

La davallada del marcatge nuclear per a la cdk4 i la cicD1 estava correlacionada amb un increment de marcatge citoplasmàtic en ambdós casos (fig. 27), fet que suggeria que la CaM era essencial per a l'acumulació de la cdk4 i la cicD1 a l'interior del nucli. Els mateixos resultats es van obtenir utilitzant altres anticossos contra la cdk4 i altres tipus cel·lulars com ara els fibroblasts normals obtinguts de pell humana.

L'efecte de la droga anti-CaM sobre l'acumulació de la cdk4 i la cicD1 al nucli era reversible, ja que se substituïa el medi que contenia la droga després de 2 h d'haver-lo deixat actuar per un de normal s'observava que la cdk4 tornava a ser nuclear (el 90% del nuclis presentaven una relació d'absorbància respecte de l'àrea $\geq 0,1$). Altres drogues anti-CaM es van ser assajar per tal assegurar que l'efecte era específic. Tal com es mostra a la figura 26B es van utilitzar quatre drogues: el W13, el W7, el J8 i el calmidazolium (CMZ), les quals induïen una disminució (depenent de la dosi) del marcatge nuclear de la cdk4.

També es va estudiar l'efecte del tractament amb W13 sobre la localització intracel·lular de la nucleolina (143) i la hnRNPA2. Ambdues proteïnes són conegudes per la seva alta mobilitat entre nucli i citoplasma (16) (142) i, tal com

es mostra a la figura 24, la inhibició de la CaM provocada pel tractament amb el W13 no afectava la localització nuclear ni de la nucleolina ni de la hnRNP2.

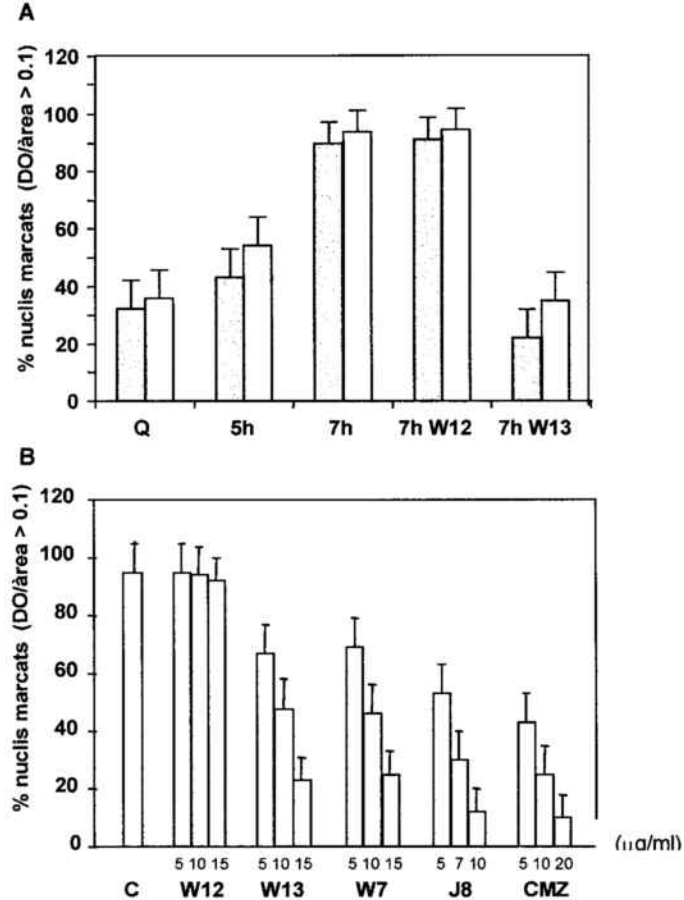


Figura 26: Efecte del tractament amb drogues anti-CaM sobre la localització de la cdk4 i la cicD1. Es van subcultivar cèl·lules NRK quiescents (Q) sobre cobreobjectes i es van activar proliferativament per l'addició de sèrum al mateix temps. A les 5 h de l'activació, es van aplicar les diferents drogues anti-CaM, i a les 7 h les cèl·lules es van fixar per dur a terme les immunocitoquímiques anti-cdk4 i anti-cicD1 utilitzant anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa, el procediment s'explica a "Materials i mètodes". Les quantificacions es van dur a terme fent servir un equip Olympus d'anàlisi d'imatge. Es van considerar positius els nuclis que tenien una relació entre la densitat òptica i l'àrea $\geq 0,1$. Els resultats presentats aquí són la mitjana de tres experiments diferents. Per a cadascun dels experiments es van comptar més de 200 nuclis. A. Les barres plenes indiquen el percentatge de nuclis positius per a la cicD1, i les barres buides indiquen el percentatge de nuclis positius per la cdk4. La concentració final de W12 i W13 va ser de 15 $\mu\text{g/ml}$. B. Representa el percentatge de nuclis marcats per la cdk4 després de l'addició de W12, W13, J8 i calmidazolium (CMZ) a les concentracions que s'indiquen o sense haver fet cap tractament de drogues (C).

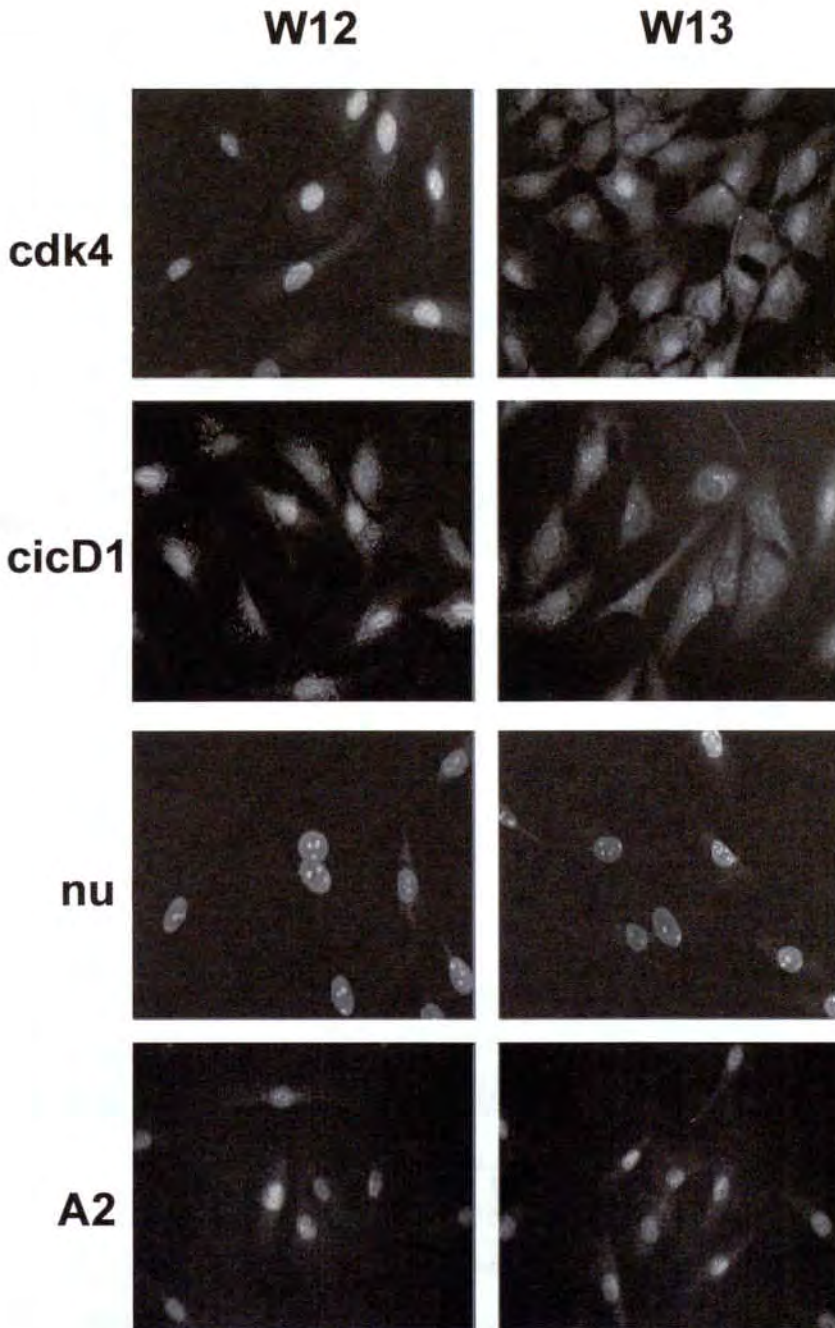


Figura 27. Efecte del W13 sobre la distribució de la cdk4 i cicD1. Es van subcultivar cèl·lules quiescents sobre cobreobjectes i es van reactivar proliferativament al mateix temps amb l'addició de sèrum. A les 5 h després de l'activació es va afegir al cultiu 15 $\mu\text{g/ml}$ de W12 (control) o W13; 2 h més tard les cèl·lules es van fixar i es van fer diferents immunocitoquímiques dirigides contra la cdk4, la cicD1, la nucleolina (nu), i la hnRNPA₂ (A₂) seguint el procediment explicat a "Materials i mètodes". L'anticòs secundari utilitzat en tots els casos estava conjugat amb fluoresceïna.

Ja s'havia descrit (164) la importància de la integritat del citosquelet perquè es produís el transport al nucli de la kinasa C que no conté un senyal clàssic de localització nuclear. També és conegut que la CaM pot regular les proteïnes del citosquelet, és per això que es va trobar adient valorar l'efecte de drogues capaces d'afectar l'organització dels filaments d'actina i microtúbuls sobre la localització de la cdk4 i de la cicD. Aplicant citocalasina D (1 µg/ml) o nocadazol (1 µg/ml) a les 5 h de l'activació proliferativa es va veure que no s'afectava gens a la localització nuclear de la cdk4 (dades no mostrades).

El resultat d'analitzar la quantitat de cdk4 i cicD1 present en una fracció de nuclis purificats no va ser positiu. Tots els mètodes provats (tant utilitzant tampons sense detergents com fent servir tampons hipotònics) no van ser capaços de retenir aquestes proteïnes a la fracció nuclear. Més del 70% d'ambdues proteïnes es van trobar fora del nucli, en la fracció soluble. Aquest problema tècnic va impossibilitar l'estudi per fraccionament cel·lular de l'efecte de la inhibició de la CaM sobre l'acumulació nuclear de la cdk4 i cicD1.

Per corroborar els resultat obtinguts mitjançant la utilització de drogues anti-CaM sobre la diferent localització de la cdk4, es va procedir a fer estudis utilitzant la tècnica de microinjecció d'un pèptid anti-CaM.

Tal com ja s'ha esmentat en la introducció, la CaM executa les seves funcions d'una manera indirecta. Ho fa a través de proteïnes que s'hi uneixen (CaMBP). La utilització de pèptids sintètics corresponents als dominis d'unió a la CaM de les CaMBP fa que s'estableixi una competència pels llocs hidrofòbics de la CaM de manera específica. El pèptid que es va escollir per ser microinjectat va ser el corresponent al domini d'unió a la CaM de la CaMKII (pèptid que comprèn de l'aminoàcid 290 al 309). Aquest pèptid es va barrejar amb dextrà conjugat amb un fluorocrom (TRITC) per poder identificar les cèl·lules que s'havien microinjectat. D'aquesta manera es podia estudiar si el tractament tenia un efecte sobre la localització subcel·lular de la cdk4 i sobre la síntesi del DNA. Es va tenir la precaució de fer els controls que ens van permetre assegurar que s'estava inhibint la CaM. Aquests controls es basaven en

comprovar que cèl·lules que s'havien microinjectat amb el pèptid tenien la síntesi del DNA inhibida. La quantificació de la síntesi del DNA es va determinar fent un recompte de les cèl·lules microinjectades que incorporaven BrdU a les 18-20 h després de l'activació proliferativa. Els nuclis positius per la síntesi de DNA van ser detectats per immunofluorecència posterior a la incorporació de BrdU. Els anticossos secundaris que es van emprar per a la detecció de la cdk4 i la BrdU estaven conjugats amb FITC, per distingir les cèl·lules microinjectades (pèptid + dextrà-TRITC) de les que donaven positiu a la immunocitoquímica (α -cdk4 o α -BrdU)

Les microinjeccions van ser dutes a terme sobre cèl·lules reactivades (5-8 h després de l'activació) tal com s'indica a material i mètodes.

Els resultats que es mostren a continuació (taula 15) representen la mitjana d'un mínim de dos experiments independents. Un mínim de 80 cèl·lules van ser comptades per quantificar l'efecte del pèptid sobre la localització de la cdk4 i un mínim de 40 cèl·lules per a les microinjectades amb dextrà sol com a control.

	Microinjecció pèptid CaMKII²⁹⁰⁻³⁰⁹	Microinjecció Dextrà-TRITC (control)
α-BrdU	21 \pm 7%	50 \pm 2%
α-cdk4	42 \pm 10%	85 \pm 3%

Taula 15. Efecte de la microinjecció citoplasmàtica de la CaMKII²⁹⁰⁻³⁰⁹ sobre la localització nuclear de la cdk4 (valorada per immunocitoquímica α -cdk4) i la síntesi de DNA (valorada per incorporació de BrdU i posterior immunocitoquímica α -BrdU). Van ser considerats com a nuclis positius pel marcatge amb anticossos contra la cdk4 els que tenien una *meangreen* \geq 100 (mitjana del valor densitomètric del canal verd).

Els resultats van demostrar una clara inhibició de la síntesi del DNA, reflectit en una disminució de l'índex de marcatge nuclear (α -BrdU) després d'haver microinjectat el pèptid de la CaMKII⁽²⁹⁰⁻³⁰⁹⁾ (resultats mostrats a la taula 15). Es va trobar que el 21 \pm 7% de les cèl·lules microinjectades amb el pèptid CaMKII⁽²⁹⁰⁻³⁰⁹⁾ eren positives a l'hora d'aplicar un assaig d'incorporació de BrdU, respecte del 50 \pm 2% de les cèl·lules de control. Per tant hi havia de l'ordre d'un 53% d'inhibició en

el nombre de cèl·lules que sintetitzaven DNA sota els efectes de la microinjecció del pèptid anti-CaM.

D'altra banda, i sota les mateixes condicions, es va procedir a microinjectar al citoplasma el pèptid anti-CaM i, amb una immunocitoquímica α -cdk4 posterior es va estudiar l'efecte que tenia sobre la localització subcel·lular d'aquesta proteïna 2 h després de la microinjecció. Tal com es mostra a la taula 15 es va trobar un $42 \pm 10\%$ de les cèl·lules microinjectades amb el pèptid de la CaMKII⁽²⁹⁰⁻³⁰⁹⁾ que presentaven la cdk4 nuclear (*meangreen* ≥ 100) respecte del $85 \pm 3\%$ de les cèl·lules de control. Així doncs, la inhibició en el marcatge nuclear de la cdk4 era del 50% després d'haver microinjectat el pèptid anti-CaM.

1.7 Paper de la CaMKII i la calcineurina en l'acumulació de la cdk4 al nucli

Un altre abordatge per esbrinar possibles factors implicats en la localització diferencial de la cdk4 i la cicD1 al nucli va ser veure si l'efecte de la CaM sobre la ubicació d'aquestes proteïnes era mitjançat per una CaMBP coneguda. Com que en algunes proteïnes se sabia que la fosforilació podia regular el transport de proteïnes cap al nucli, vam pensar en dues possibles candidates: la calcineurina (fosfatasa) i la CaMKII (kinasa). Subministrant ciclosporina A (0,6-2,4 $\mu\text{g/ml}$) a les 5 h després de l'activació proliferativa, s'inhibia la calcineurina; o aplicant en aquest mateix moment el KN93 (5-10 μM) s'inactivava la CaMKII (com a control de la darrera es va utilitzar el KN92 en la mateixa dosi que el KN93). Es va observar que el tractament amb aquestes drogues anti calcineurina i anti-CaMKII no afectava la localització nuclear de la cdk4 ni de la cicD1 (dades no presentades). Això indicava que aquestes CaMBP no estaven implicades en l'acumulació nuclear de la cicD1 ni de la cdk4 durant la fase G₁.

1.8 Estudi de la possible interacció de la cicD1 i cdk4 amb la calmodulina

Per estudiar si l'efecte de la CaM sobre la localització nuclear de la cicD1 i la cdk4 era mitjançada per una CaMBP associada al complex, es va estudiar l'afinitat de la cdk4 i la cicD1 a una columna de CaM. Es va eliminar la CaM endògena dels lisats procedents d'un cultiu ciclant de cèl·lules NRK, passant-los en presència d'EGTA per una columna de DEAE-Sephacel. La cdk4 apareixia en la fracció no unida a la DEAE-Sephacel, i la CaM s'el·luïa amb 600 mM de sal (dades no mostrades). Després d'haver afegit Ca^{2+} a la fracció no unida a la DEAE-Sephacel es va barrejar amb una reïna de CaM-Sepharose®. Tal com es mostra a la figura 28A, la cdk4 i la cicD1 s'unien a la CaM-Sepharose® en presència de Ca^{2+} i s'el·luïen específicament quan s'afegia EGTA a la columna. També es va detectar en l'elució amb EGTA de la columna de CaM-Sepharose® una CaMBP; era la Hsp90, la qual s'ha descrit recentment (33) (112) (176) que està associada a la cdk4. Cap de les proteïnes s'unia a la columna de control de Sepharose®.

Vam procedir també a fer experiments de *pull down* (fig. 28B). La fracció lliure de CaM endògena que corresponia a la que no s'havia unit a la columna de DEAE-Sephacel (en un tampó amb 5mM EGTA) va ser dividida per tal de afegir-hi Ca^{2+} o EGTA, i a continuació es va afegir 20 μl de CaM-Sepharose®. Després de 2 h d'incubació es va centrifugar i recol·lectar la fracció no unida (sobrenedant). Es va rentar la reïna amb el mateix tampó de lisi (en presència de Ca^{2+} o EGTA). Les proteïnes que s'hi van unir van ser eluïdes directament amb tampó de mostres (que contenia SDS). Una rèplica de la mostra va ser posada en contacte amb Sepharose® de control. Tal com es mostra a la figura. 28B, la unió de la cdk4 i la cicD1 a la CaM-Sepharose® era més gran en presència de Ca^{2+} que en presència d'EGTA. No hi va haver unió de cap de les proteïnes a la reïna de control.

Aquestes evidències sobre la interacció entre la cdk4, la cicD1 i la CaM ens van portar a fer coimmunoprecipitacions per veure si interaccionaven en condicions semblants a les condicions que es donen *in vivo*. Es va observar que la CaM coimmunoprecipitava amb la cdk4 i la cicD1 (fig. 28C).

D'altra banda, es va comprovar que a les cèl·lules NRK també hi havia coimmunoprecipitació de la cdk4 i la Hsp90 (fig. 28C).

Tal com es va descriure per Pratt et al. (148), la Hsp90 podria estar regulant el transport intracel·lular d'algunes proteïnes estabilitzant-les en moments primerencs de la seva traducció. Per tant, era una bona candidata a ser la CaMBP implicada en el transport dels complexos cdk4/cicD1 al nucli.

Es van tractar les cèl·lules amb la geldanamicina, un antibiòtic que inactiva la Hsp90, i es va veure que tenia el mateix efecte sobre la localització de la cdk4 i la cicD1 que quan s'inhibia la CaM. Subministrant la geldanamicina (GA) (2 μ M) a les cèl·lules NRK a les 5 h després de l'activació proliferativa durant un període de 2 h produïa una clara reducció en el marcatge nuclear de la cicD1 i de la cdk4 (fig. 29), sense alterar gens la quantitat total de cdk4 (dada no mostrada).

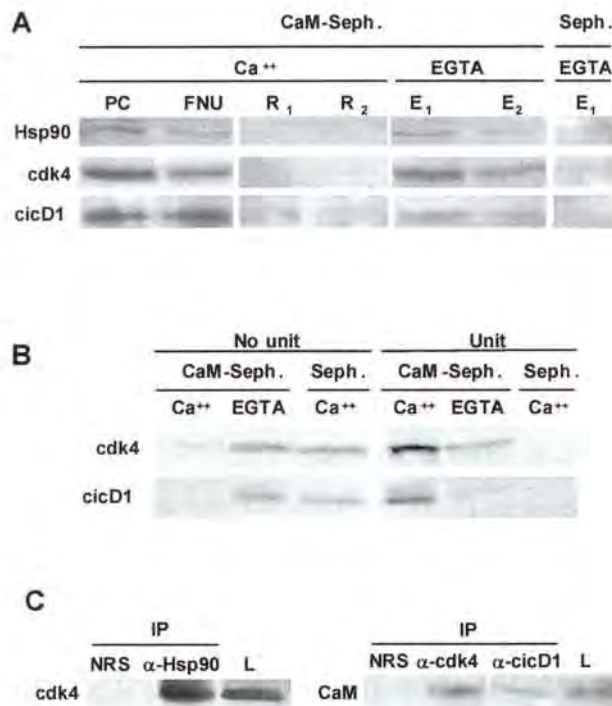


Figura 28. Interacció de la cdk4 i la cicD1 amb la CaM.

A. Unió de la cicD1-cdk4 a una columna d'afinitat de CaM. Es van passar els extractes cel·lulars per una columna de DEAE-Sepharose (per treure la CaM endògena de la mostra, vegeu "Materials i mètodes"), i la fracció no unida es va aplicar a una columna de CaM-Sepharose (CaM-Seph) o a Sepharose (Seph., control) en presència de Ca²⁺ lliure. Després d'aplicar-hi rentatges (en presència de Ca²⁺), es van eluir les proteïnes unides específicament amb EGTA. volums equivalents de totes les fraccions es van sotmetre a un gel al 10% de SDS-poliacrilamida i es van analitzar amb transferència *Western* fent servir anticossos dirigits contra la cdk4, cicD1, i Hsp90. PC, precolumna; FNU, fracció no unida; R₁ i R₂ dos darrers rentatges; E₁ i E₂ les dues primeres elucions específiques amb EGTA.

B. *Pull down* amb CaM-Sepharose (CaM-Seph.) o Sepharose (Seph., com a control) de la fracció no unida a la columna de DEAE dut a terme en presència o absència de Ca²⁺ lliure. Les proteïnes no unides (sobrenedant) i les unides (eluides amb tampó de mostres amb SDS) van ser resoltes per una electroforesi en un gel de SDS-poliacrilamida. La presència de cdk4 i cicD1 es va analitzar amb transferència *Western*.

C. Els lisats procedents de cèl·lules NRK ciclants (asincròniques) van ser immunoprecipitats (tal com s'indica a "Materials i mètodes") utilitzant anticossos dirigits contra la Hsp90, la cdk4, la cicD1, o sèrum normal de conill (NRS) com a control. La presència de cdk4 i de Hsp90 va ser analitzada amb transferència *Western*. També es van analitzar en el gel els lisats totals (L) corresponents a les mostres abans de la immunoprecipitació.

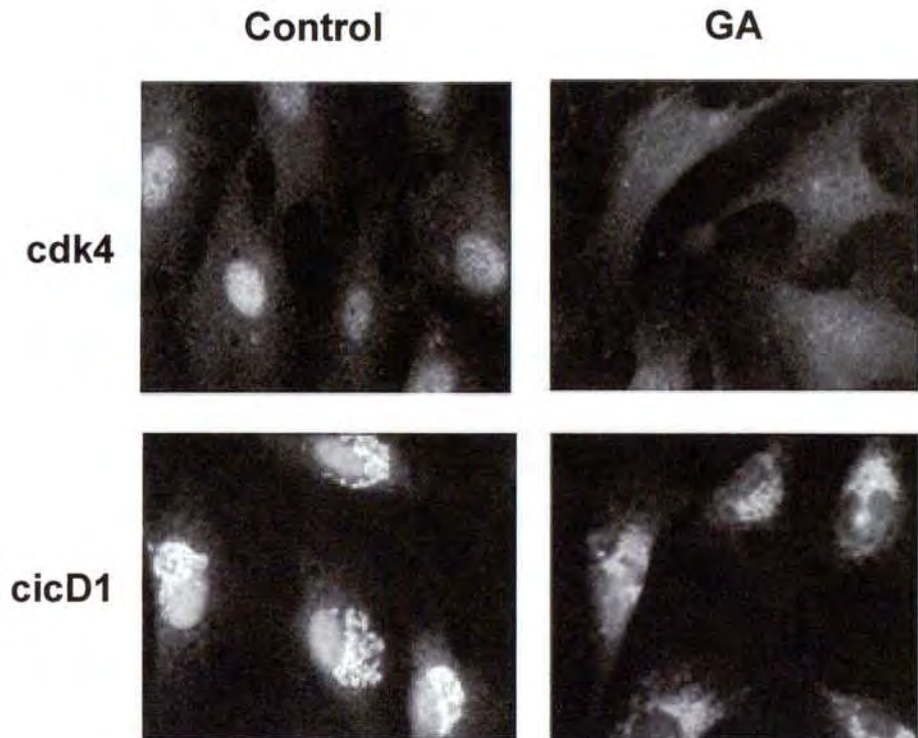


Figura 29. Immunolocalització de la cdk4 i la cicD1 després del tractament amb geldanamicina. Cèl·lules NRK quiescents es van fer créixer sobre cobreobjectes de vidre i van ser activades a proliferativament per l'addició de sèrum. Després de 5 h de l'activació, es van afegir 2 μ M de geldanamicina (GA) dissolta amb Me₂SO (DMSO) o 0,1% de Me₂SO (control); 2 h més tard es van fixar les cèl·lules i es va aplicar la immunocitoquímica anti-cdk4 (cdk4) o anti-cicD1.

2. La calmodulina s'uneix a la p21^{CIP1} i regula la seva translocació al nucli

Fruit de la recerca sobre el paper de la CaM en la regulació de la transició G₁/S del cicle cel·lular, s'ha descrit en l'apartat anterior la importància que té la CaM sobre l'activitat i localització subcel·lular de la cdk4 i la cicD1. El fet d'haver observat, mitjançant cromatografia d'afinitat a partir d'un lisat, que tant la cdk4 com la cicD1 estaven unides a la CaM de manera dependent de Ca²⁺ ens va portar a aprofundir l'estudi sobre quina altra proteïna o proteïnes feia de pont. La Hsp90 al fer de medidora en el transport de la cdk4 i la cicD1 en el seu camí cap al nucli, però en nombrosos estudis s'ha descrit aquesta proteïna com un element estabilitzador de la cdk4 just després de la seva traducció. Una vegada format el complex cdk4/cicD1, la Hsp90 s'alliberaria de la cdk4.

En aquest segon bloc de resultats ens vam plantejar estudiar si alguna de les proteïnes conegudes presents al complex cdk4/cicD1 podria fer d'intermediària en la unió a la CaM.

2.1 La p21^{CIP1} coimmunoprecipita amb la calmodulina

Per analitzar si la p21^{CIP1} coimmunoprecipitava amb la CaM, es van fer immunoprecipitacions utilitzant cèl·lules Namalwa. Es va procedir a fer les coimmunoprecipitacions utilitzant l'anticòs α -CaM (anticòs cedit pel Dr. Sacks), el resultat es va transferir i la membrana es va sotmetre a una transferència *Western* (WB) per detectar tant la p21^{CIP1} (fig. 30) com la CaM (dada no mostrada).

La coimmunoprecipitació en sentit contrari es va aplicar utilitzant un anticòs monoclonal dirigit contra la p21^{CIP1} (Calbiochem) i es va analitzar per WB amb α -p21^{CIP1} (dada no mostrada) o α -CaM (fig. 30). Es va observar que la CaM i la p21^{CIP1} formaven part del mateix complex (fig. 30); mentre que quan es feia la immunoprecipitació utilitzant un anticòs policlonal dirigit contra l'extrem carboxi de la p21^{CIP1} no es detectava la CaM (dades no mostrades). Aquest fet ens va suggerir una possible zona d'interacció entre la p21^{CIP1} i la CaM. A l'apartat 3 s'estudien més detalladament els possibles dominis d'interacció.



Figura 30. La p21^{CIP1} i la CaM coimmunoprecipiten en ambdós sentits. Lisats de cèl·lules Namalwa ciclants es van immunoprecipitar (IP) (segons es descriu a "Materials i mètodes") utilitzant un anticòs monoclonal contra la p21^{CIP1} i la CaM. El resultat de la immunoprecipitació va ser sotmès a una electroforesi en gels de SDS-poliacrilamida. Es van transferir a membranes i es van sotmetre a una transferència *Western* per detectar la CaM i la p21^{CIP1}. El resultat de la IP contra p21^{CIP1} es va carregar en un gel al 15% de poliactilamida-SDS per poder-hi detectar la CaM; mentre que el fruit de la IP contra la CaM es va carregar en un gel al 12% de poliactilamida-SDS, per poder-hi detectar la p21^{CIP1}.

2.2 La p21^{CIP1} s'uneix *in vitro* a la calmodulina

Es va analitzar, mitjançant experiments de *pull down*, si les proteïnes conegudes que havíem trobat que coimmunoprecipitaven amb la cdk4 i la cicD1 (fig. 25) podien unir-se directament a la CaM-Sepharose. Per aquest motiu es va procedir a fusionar-les amb GST, i a expressar i purificar la cdk4-GST, la cicD1-GST, p21^{CIP1}-GST i la p27^{KIP1}-GST.

Fent un recordatori del fonament dels experiments de *pull down* (per a més detalls, vegeu l'apartat "Materials i mètodes") cal dir que és una tècnica que ens permet veure interaccions directes entre proteïnes (en el cas que s'utilitzin proteïnes purificades) i possibles interaccions directes o no (en el cas que es parteixi d'un lisat total de cèl·lules).

Per resoldre la hipòtesi que alguna de les proteïnes que coimmunoprecipitaven amb la cdk4/cicD1 podia estar interaccionant directament amb la CaM, es van incubar per separat amb la CaM-Sepharose i amb Sepharose sola (com a control) cadascuna de les proteïnes purificades en presència de Ca²⁺ o EGTA. Transcorregut el període d'incubació es van centrifugar els tubs i es va recol·lectar la fracció no unida (sobrenedant). A la resta es van aplicar dos rentatges amb el tampó corresponent (amb Ca²⁺ o EGTA) i finalment es va eluir la fracció unida a la CaM-Sepharose amb un tampó que contenia SDS. El resultat obtingut, després d'haver sotmès a totes les fraccions a una electroforesi en un gel d'acrilamida i a

una posterior tinció amb blau de Coomassie o a un transferència *Western* per cadascuna de les proteïnes que preteníem detectar, va ser contundent.

Ni la p27^{KIP1} ni la cicD1 s'unien de manera directa a la CaM-Sepharose, només ho feia una petita fracció de la cdk4, mentre que la majoria de la p21^{CIP1} s'unia específicament a la CaM-Sepharose de manera dependent de Ca²⁺. A la figura 31 es pot veure com la p21^{CIP1} és present en el sobrenedant de la mostra que prové de la incubació amb EGTA i en la fracció eluïda amb tampó de mostres de la mostra incubada en presència de Ca²⁺, fet que indica que la p21^{CIP1} s'havia unit a la columna de CaM de manera dependent de Ca²⁺.

A més a més es van fer estudis de l'especificitat de la unió de la p21^{CIP1} a la CaM-Sepharose. Es van dur a terme experiments de *pull down* en presència de Ca²⁺ però preincubant 20 µl de reïna (CaM-Sepharose 1:1) amb diferents dosi del pèptid corresponent al fragment 290-309 de la CaMKII. La quantitat de reïna que es va utilitzar, diluïda en tampó de lisi (1:1), corresponia a 3-5 nmols de CaM, la qual es va posar en contacte amb amb diferents dosi (4-15 nmols) del pèptid esmentat. Finalitzada la incubació de la CaM-Sepharose amb les diferents dosis de pèptid, es va afegir 1 µg de p21^{CIP1}-GST purificada (0,025 nmols), es va analitzar la quantitat de p21^{CIP1} unida i no unida a la CaM-Sepharose i es va comparar amb la no preincubada amb el pèptid (fig.32).

Es va corroborar, amb aquest altre sistema, que la unió de p21^{CIP1} era específica, ja que les mostres procedents de la preincubació de la CaM amb el pèptid i la posterior incubació amb la CaM-Sepharose en presència de Ca²⁺ tenien la major part de p21^{CIP1} al sobrenedant (en ambdues concentracions de pèptid provades); és a dir, que el pèptid estava competint amb la p21^{CIP1} pels llocs hidrofòbics d'unió a la CaM.

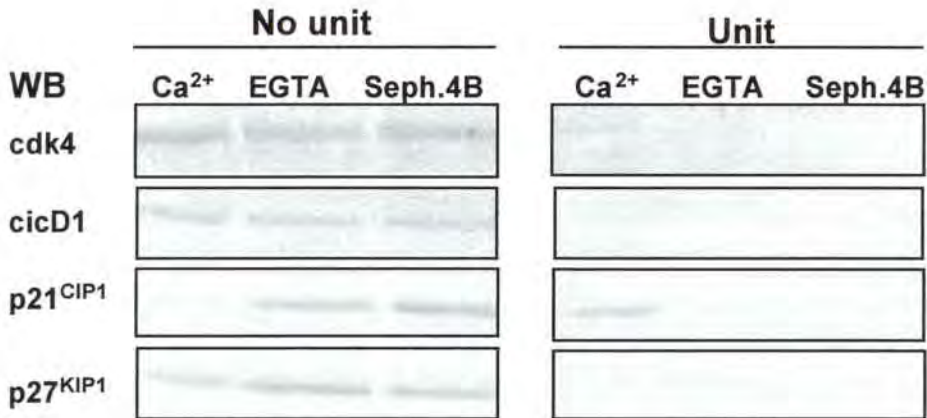


Figura 31. Anàlisi de la unió *in vitro* de la cdk4, cicD1, p21^{CIP1} i p27^{KIP1} a la CaM-Sepharose. *Pull down* amb CaM-Sepharose de cdk4-GST, cicD1-GST, p21^{CIP1}-GST, p27^{KIP1}-GST. Les proteïnes cdk4-GST, cicD1-GST, p21^{CIP1}-GST, p27^{KIP1}-GST van ser expressades en bacteris i purificades; es van incubar en presència de Ca²⁺ o EGTA amb la CaM-Sepharose o amb Sepharose-4B sola (Seph.4B) com a control. Tant la fracció no unida (sobrenedant) com la unida (eluída amb tampó de mostres Laemmli) van ser sotmeses a una electroforesi en un gel al 12% poliacrilamida-SDS. El gel va ser tenyit amb balu de Coomassie.


FNU	Fraccions unides a la CaM-Seph.							CaMKII ²⁹⁰⁻³⁰⁹
	EGTA	Ca ²⁺	Pèptid II (nmols)			Pèptid III (nmols)		
				2	4	10	2	4
								

Figura 32: La p21^{CIP1} purificada s'uneix *in vitro* a la CaM-Sephrose. Es preincuba en presència de Ca²⁺ la CaM-Sephrose amb diferents dosis dels pèptids II i III i el de la CaMKII²⁹⁰⁻³⁰⁹. A continuació, es va afegir 1µg de p21^{CIP1}-GST a la CaM-Sephrose (CaM-Seph.) preincubada. El control per veure que la unió de la p21^{CIP1} a la CaM era dependent de Ca²⁺ es va fer incubant la p21^{CIP1} amb la CaM-Seph. en presència de Ca²⁺ (fraccions unides a la CaM-Sephrose). La fracció de p21^{CIP1} no unida (FNU, sobrenedant) es va obtenir de la incubació d'aquesta proteïna en presència d'EGTA amb la CaM-Sephrose. Les proteïnes unides a la CaM-Sephrose es van eluir amb tampó de mostra, i es van resoldre electroforèticament. La quantitat de p21^{CIP1} va ser analitzada amb transferència *Western*.

2.3 La cdk4, la cicD1 i la p21^{CIP1} col·localitzen amb la calmodulina per microscòpia electrònica

Per donar cabuda al possible paper fisiològic de les interaccions descrites fins ara entre la cdk4, la cicD1, la p21^{CIP1} i la CaM es va procedir a fer dobles immunocitoquímiques en cèl·lules NRK ciclants i a les 7 h després de l'activació proliferativa. Es van preparar les mostres aplicant les deshidratacions prèvies a la inclusió de les cèl·lules en reïna Lowicryl (en el cas de la detecció de la cdk4/CaM i cicD1/CaM). La criosubstitució (*slam freezing*) va ser la tècnica de preparació escollida en el cas de l'estudi de la localització de la p21^{CIP1}/CaM.

Es van trobar nombrosos complexos nuclears de cdk4/CaM, cicD1/CaM a cèl·lules NRK ciclants, i a les 7h de l'activació proliferativa (fig. 33). Els complexos de p21^{CIP1}/CaM es trobaven tant al nucli com al citoplasma en cèl·lules ciclants o en cèl·lules fixades a les 7 h després de la reactivació (fig. 33 i 34).

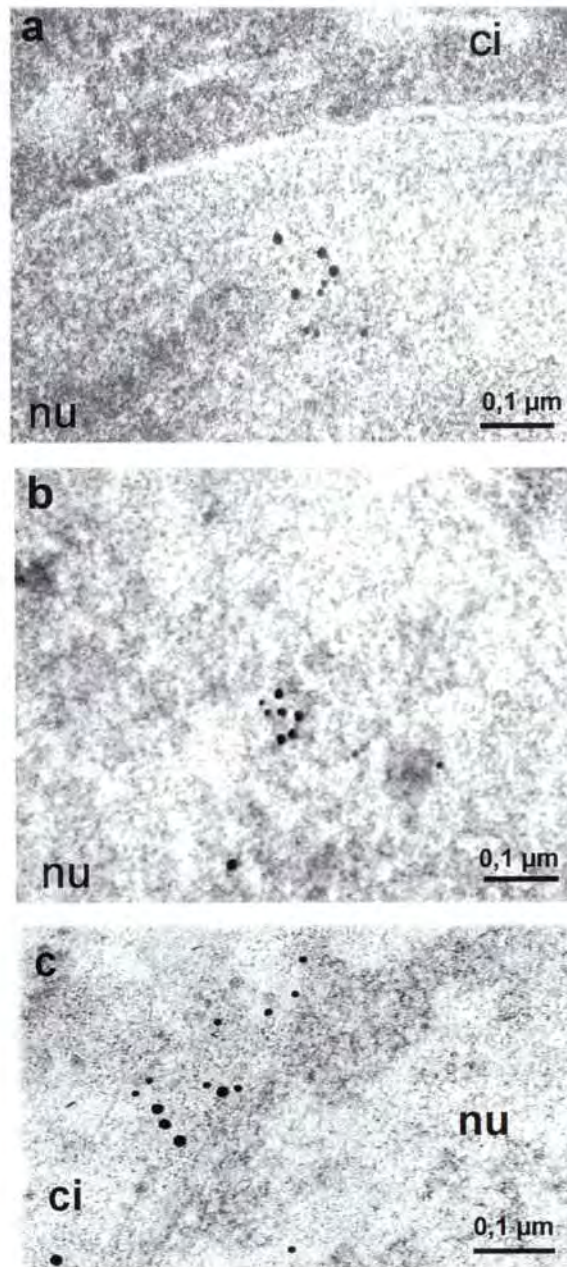


Figura 33. Col·localització tant al nucli (nu) com al citoplasma (ci) per microscòpia electrònica en cèl·lules NRK a les 7 h després de l'activació proliferativa. a. Englobació en Lowicryl, per a la detecció de cdk4/CaM i b, cicD1/CaM; c. Criosubstitució (*slam freezing*), per a la detecció de la p21^{CIP1}/CaM. La CaM correspon al tamany d'or més gran (10nm), la cdk4, la cicD1 i la p21^{CIP1} correspon al de 5 nm.

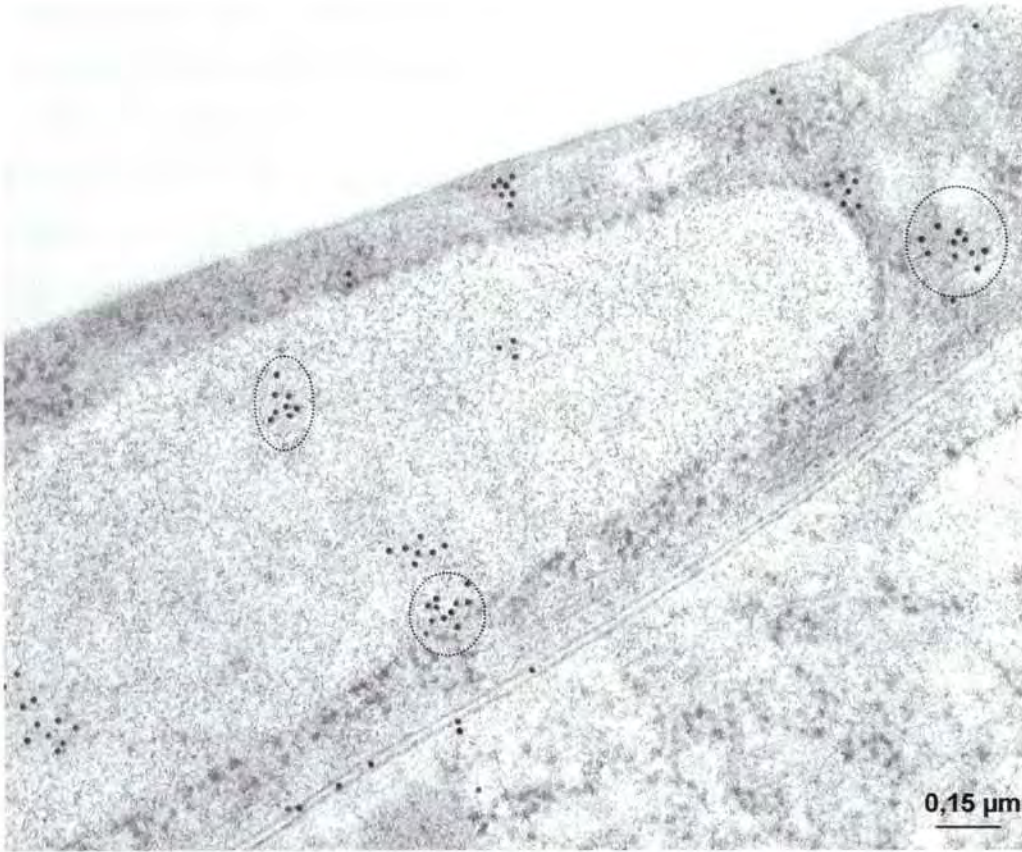


Figura 34. Colocalització per microscòpia electrònica de la CaM/p21^{CIP1} a les 7 h després de l'activació proliferativa. La mostra va ser sotmesa a l'*slam freezing*. Es representen amb un cercle de línia discontinua les zones on hi ha col-localització entre la CaM (15 nm) i la p21^{CIP1} (10 nm).

2.4 La localització nuclear de la p21^{CIP1} és dependent de CaM

2.4.1 Les drogues anti-CaM inhibeixen l'acumulació nuclear de la p21^{CIP1}

Al primer bloc de resultats s'exposa el paper essencial de la CaM en el transport de la cdk4 i la cicD1 al nucli. I després d'haver trobat una interacció tant de manera indirecta com directa de la p21^{CIP1} amb la CaM, es va estudiar l'efecte de les drogues anti-CaM, subministrades a les 5 h després de l'activació, sobre la localització subcel·lular de la p21^{CIP1} a les 7 h després de la reactivació de les cèl·lules NRK.

Es va trobar una clara disminució en el marcatge nuclear per la p21^{CIP1} en les cèl·lules que havien estat tractades a les 5 h amb W13 (15 µg/ml), calmidazolium (CMZ) (5 µM), W7 (10 µg/ml) , i J8 (7 µg/ml) i que s'havien fixat a les 7h. A la figura 35 es mostren els resultats obtinguts pel tractament amb W12 (control), W13 i CMZ. Amb la resta de les drogues el patró de marcatge obtingut va ser similar al del W13 (dades no mostrades). Paral·lelament es va posar de manifest un augment del marcatge al citoplasma.

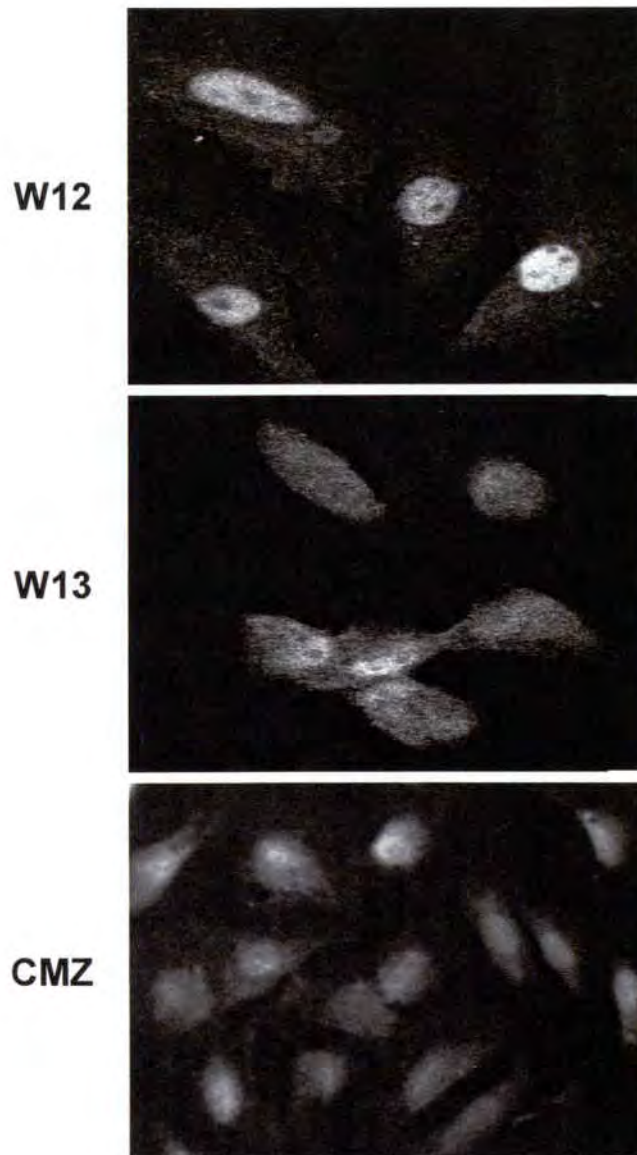


Figura 35. Distribució del la p21^{CIP1} sota els efectes de la CaM inhibida. Es va activar proliferaivament un cultiu quiescent (sincrònic) de cèl·lules NRK a prolifera sobre cobreobjectes. A les 5 h (després de la reactivació) es van aplicar les drogues W12 (control), W13 (15 μg/ml) i calmidazolium (CMZ, 5 μM). Passades 2h (a les 7 h després de l'activació) es van fixar les cèl·lules i es va procedir a aplicar la immunocitoquímica anti-p21^{CIP1}. L'anticòs secundari utilitzat estava conjugat amb fluoresceïna (vegeu taules 13 i 14). L'observació de les preparacions es va fer al microscopi confocal en el cas del W12 i W13 i al microscopi òptic de fluorescència per al CMZ.

2.4.2 La p21^{CIP1} es transporta al nucli de manera dependent de CaM en cèl·lules Hela permeabilitzades amb digitonina

Estudis previs fets pel grup del Dr. Hanover (NIH a Bethesda) utilitzant un sistema de transport *in vitro* en cèl·lules Hela permeabilitzades amb digitonina, va permetre postular l'existència de dues vies d'entrada al nucli d'un pèptid amb NLS (fig. 14). Una via d'entrada dependent de CaM, funcional a altes concentracions de Ca²⁺ citoplasmàtiques i independent de GTP, i una altra via activa a baixes concentracions de Ca²⁺ al citoplasma (característica de cèl·lules quiescents), independent de CaM i dependent de GTP.

Nosaltres vam aplicar aquest model de transport *in vitro* per estudiar quina de les proteïnes expressades (cdk4-GST, cicD1-GST, p21^{CIP1}-GST) i afegides exògenament a cèl·lules Hela permeabilitzades amb digitonina era capaç, en presència d'un extracte citoplasmàtic, de translocar-se al nucli, i com s'afectava el transport d'alguna d'elles sota la presència durant l'assaig de drogues anti-CaM.

En un principi es va marcar la cicD1 amb FITC i la cdk4 amb TRITC. En fer els assajos de transport *in vitro* cap de les dues es translocaven al nucli. A voltes apareixia una marca als nuclèols, senyal inespecífic que es va eliminar en passar les proteïnes marcades per una columna PD-10. Aquest tipus de columnes són molt útils per eliminar les restes de fluorocrom lliure. Es va pensar que el tipus d'enllaç covalent que s'estava establint entre el fluorocrom i aquestes proteïnes purificades podia estar dificultant el reconeixement o l'associació amb altres proteïnes que farien de cotransportadores. Per aquest motiu es va decidir conjuguar la cicD1 i la p21^{CIP1} amb la B-ficoeritrina (BP). Sota aquestes condicions, ambdues proteïnes eren capaces de translocar-se al nucli (fig. 36). El transport al nucli de la cicD1 i la p21^{CIP1} era dependent de la temperatura, que s'inhibeix totalment a 4°C.

Paral·lelament a cada assaig dut a terme amb les proteïnes problema, es va realitzar un altre amb les proteïnes control nucleoplasmínia-FITC (dades no mostrades) i SV40-BP, que posseeixen un senyal clar de localització nuclear (NLS) i els respectius controls a 4°C (fig. 37).

2.4.2 La p21^{CIP1} es transporta al nucli de manera dependent de CaM en cèl·lules Hela permeabilitzades amb digitonina

Estudis previs fets pel grup del Dr. Hanover (NIH a Bethesda) utilitzant un sistema de transport *in vitro* en cèl·lules Hela permeabilitzades amb digitonina, va permetre postular l'existència de dues vies d'entrada al nucli d'un pèptid amb NLS (fig. 14). Una via d'entrada dependent de CaM, funcional a altes concentracions de Ca²⁺ citoplasmàtiques i independent de GTP, i una altra via activa a baixes concentracions de Ca²⁺ al citoplasma (característica de cèl·lules quiescents), independent de CaM i dependent de GTP.

Nosaltres vam aplicar aquest model de transport *in vitro* per estudiar quina de les proteïnes expressades (cdk4-GST, cicD1-GST, p21^{CIP1}-GST) i afegides exògenament a cèl·lules Hela permeabilitzades amb digitonina era capaç, en presència d'un extracte citoplasmàtic, de translocar-se al nucli, i com s'afectava el transport d'alguna d'elles sota la presència durant l'assaig de drogues anti-CaM.

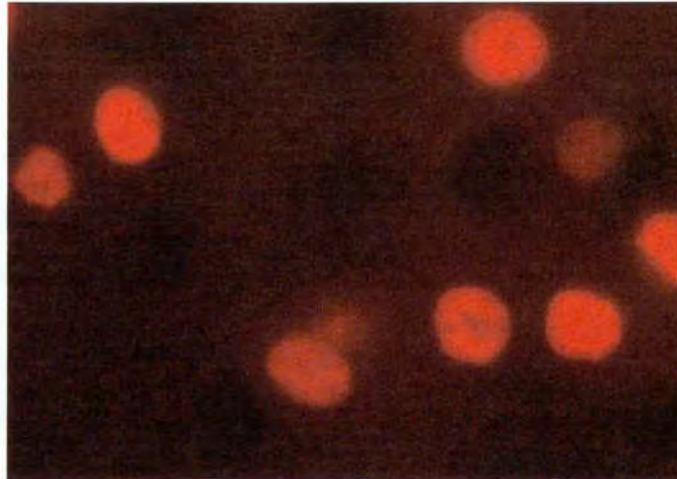
En un principi es va marcar la cicD1 amb FITC i la cdk4 amb TRITC. En fer els assajos de transport *in vitro* cap de les dues es translocaven al nucli. A voltes apareixia una marca als nuclèols, senyal inespecífic que es va eliminar en passar les proteïnes marcades per una columna PD-10. Aquest tipus de columnes són molt útils per eliminar les restes de fluorocrom lliure. Es va pensar que el tipus d'enllaç covalent que s'estava establint entre el fluorocrom i aquestes proteïnes purificades podia estar dificultant el reconeixement o l'associació amb altres proteïnes que farien de cotransportadores. Per aquest motiu es va decidir conjuguar la cicD1 i la p21^{CIP1} amb la B-ficoeritrina (BP). Sota aquestes condicions, ambdues proteïnes eren capaces de translocar-se al nucli (fig. 36). El transport al nucli de la cicD1 i la p21^{CIP1} era dependent de la temperatura, que s'inhibeix totalment a 4°C.

Paral·lelament a cada assaig dut a terme amb les proteïnes problema, es va realitzar un altre amb les proteïnes control nucleoplasmina-FITC (dades no mostrades) i SV40-BP, que posseeixen un senyal clar de localització nuclear (NLS) i els respectius controls a 4°C (fig. 37).

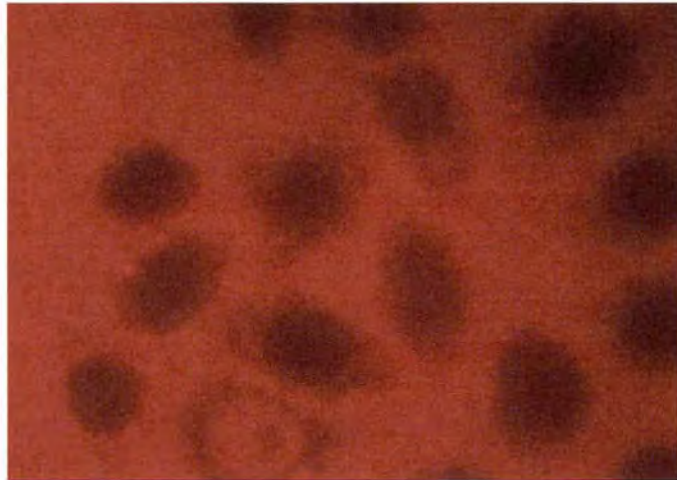
Tal com ja s'ha esmentat abans, el marcatge amb FITC podria interferir el reconeixement de la zona crítica per al transport de les proteïnes (evitant-ne l'associació amb d'altres). Per això, després d'analitzar els resultats preliminars es va decidir fer la resta de l'estudi amb proteïnes conjugades amb BP. D'altra banda, entre la cdk4, la cicD1 i la p21^{CIP1}, aquesta última és la que presenta uns motius NLS més ben definits. Per aquest motiu es va continuar la resta de l'estudi del transport amb l'esmentada proteïna.

Es va analitzar l'efecte del W13 sobre el transport de la p21^{CIP1} al nucli i es va observar que tant en presència d'una concentració alta de Ca²⁺ (100 mM durant l'assaig) com baixa (1 mM) el W13 era capaç d'inhibir la translocació de la p21^{CIP1} al nucli (fig. 38). Es va observar que en els assajos de control (utilitzant W12) el transport al nucli de la p21^{CIP1} era del 70%, mentre que els assajos realitzats amb W13 (15 µg/ml final) hi havia un 27% de transport. Així doncs, el transport de la p21^{CIP1} al nucli era dependent de CaM, fins i tot en les condicions clàssiques d'assaig (1 mM CaCl₂).

SV40-BP
37°C



SV40-BP
4°C



SV40-BP
4°C
(CF)



Figura 36. Transport *in vitro* del pèptid fet servir com a control de senyal de localització nuclear (NLS) corresponent a un fragment del braç llarg del virus SV40, que va ser conjugat amb B-ficoeritrina (BP). Els assajos es van fer en paral·lel amb els de les proteïnes problema a 37°C i a 4°C (control)

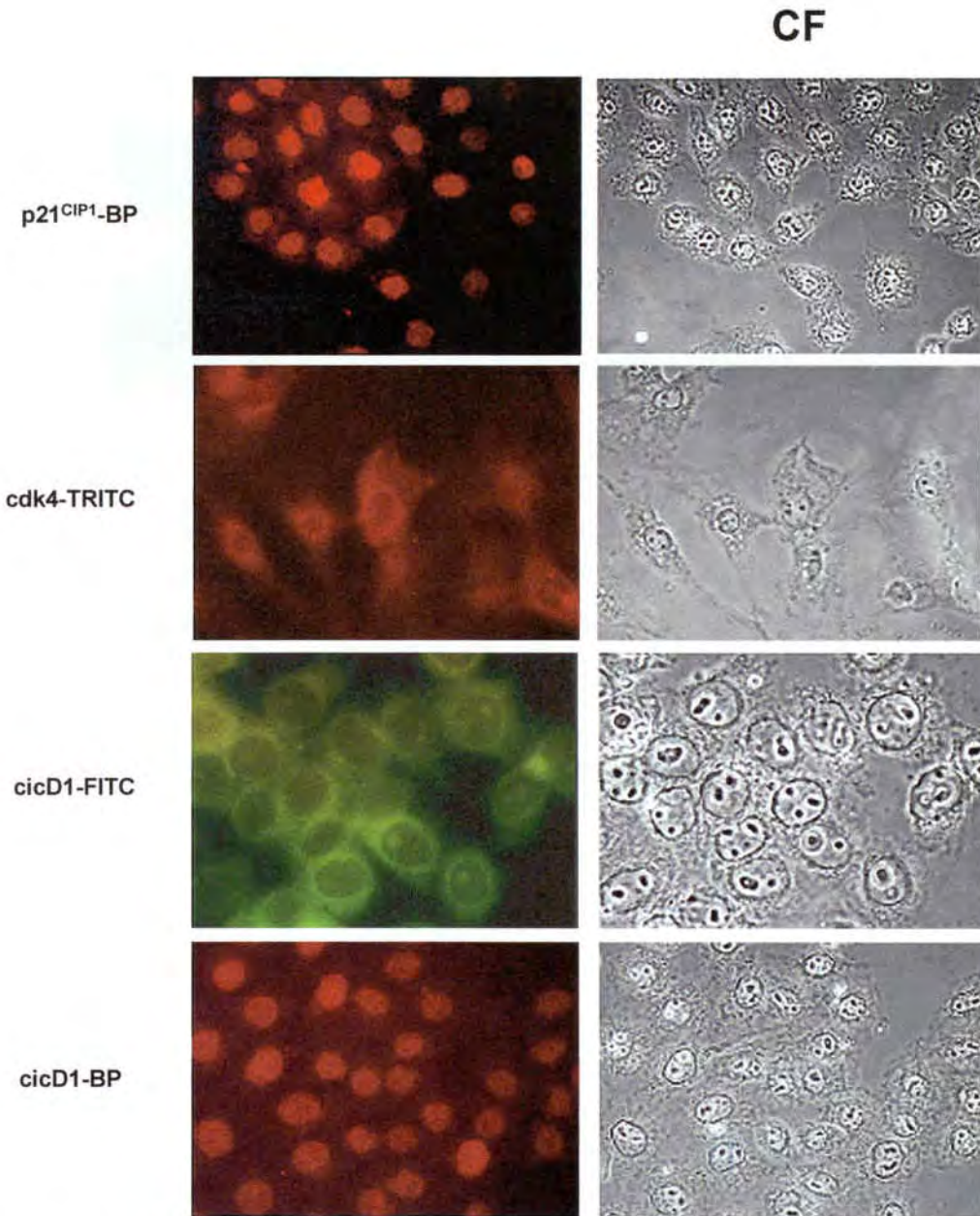


Figura 37. Assaig de transport *in vitro* per a la cdk4-TRITC, la cicD1-FITC, la cicD1-BP i la p21^{CIP1}-BP. En el cas de la cicD1 el marcatge amb FITC interferia el transport. A la columna de la dreta (CF) es mostren els mateixos camps en contrast de fase.

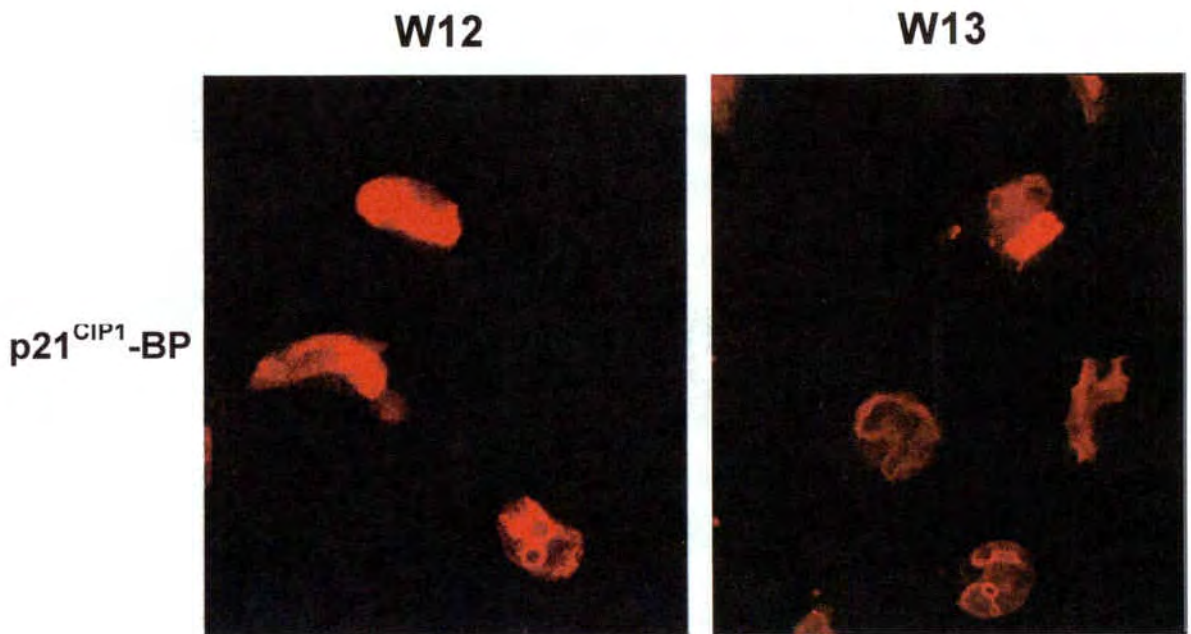


Figura 38. El W13 inhibeix el transport *in vitro* de la p21^{CIP1}-BP.

3. Estudi del domini de la p21^{CIP1} implicat en el reconeixement de la calmodulina

L'anàlisi cristal·logràfica de la cicA/cdk2/p27^{KIP1} (fig. 39) i el coneixement de les zones d'interacció entre la p21^{CIP1} i la cicA, la cdk2 i la PCNA (fig. 40) (95) ens va guiar en l'elecció del domini que cal reproduir sintèticament per a futurs estudis de competència en la interacció de la p21^{CIP1} a la CaM.

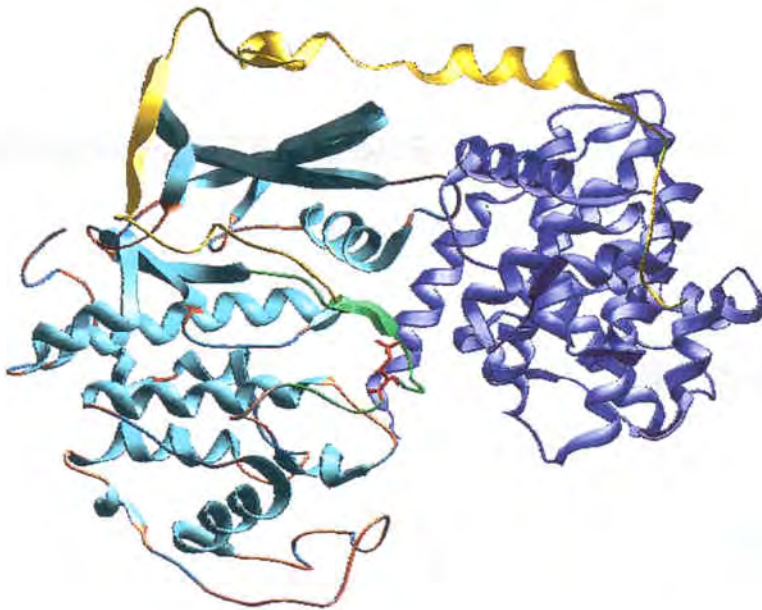


Figura 39. Estructura de la cicA i cdk2 interaccionant amb la p27^{KIP1} (aminoàcids del 25 al 93). L'associació de la p27^{KIP1} (25-93) a la cicA es produeix per l'extrem N-terminal i per la zona més C-terminal a la cdk2. La p27^{KIP1} entra al lòbul on interacciona l'ATP amb la cdk2. En groc es representa la p27^{KIP1}; en lila, la ciclina A; en blau turquesa, la cdk2.

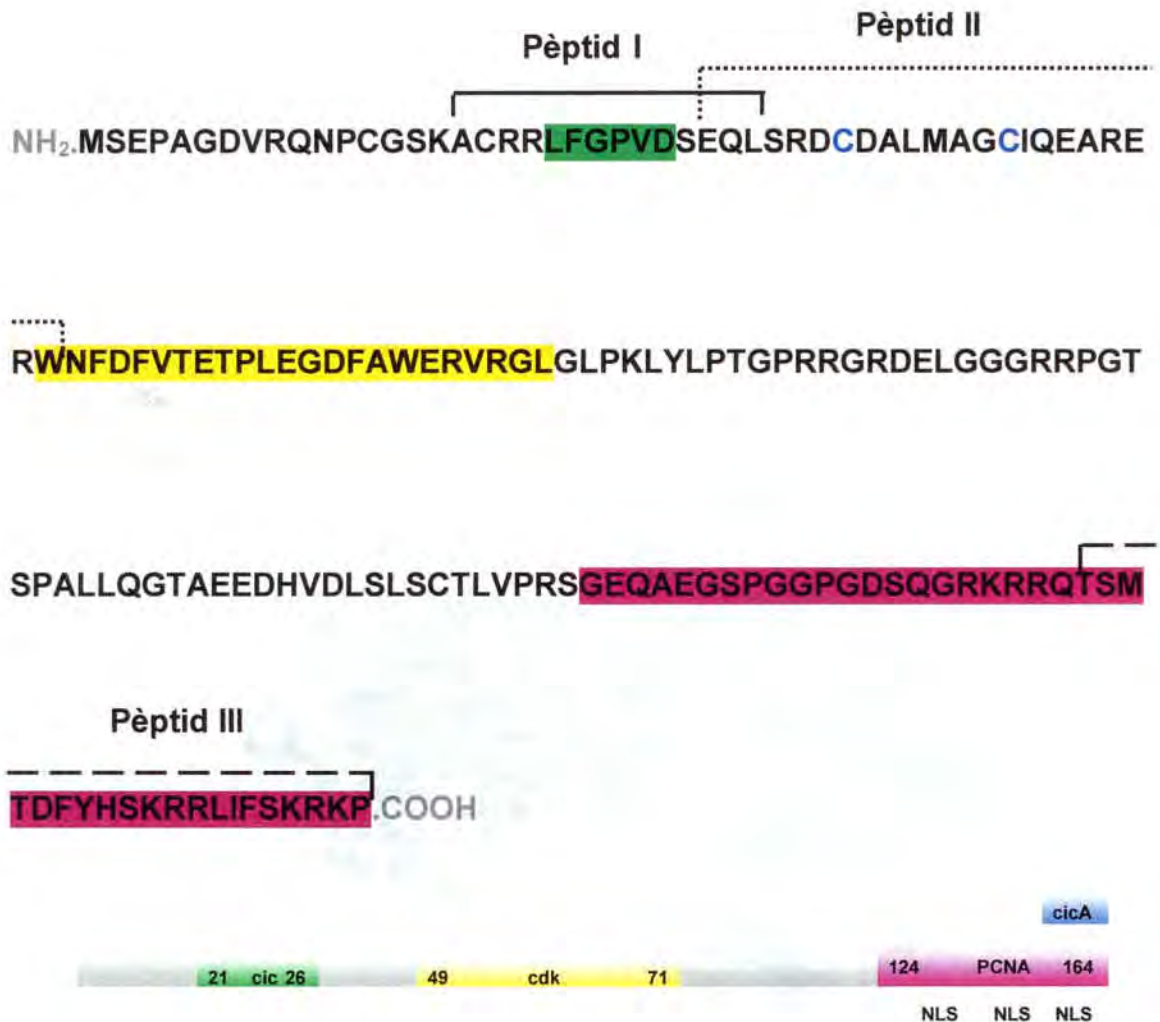


Figura 40. Seqüència de la p21^{CIP1} i diferents dominis d'interacció a la ciclina A (en verd i blau), a la cdk2 (en groc), i al PCNA (en rosa). També es detallen els diferents pèptids sintetitzats (pèptid I, pèptid II i pèptid III).

El primer pèptid que es va dissenyar (pèptid I) corresponia als aminoàcids del 17 al 30, que coincidia en part amb el domini d'unió de la p21^{CIP1} a la ciclina.

El pèptid II, que també es va dissenyar, coincideix amb els aminoàcids del 28 fins al 49, zona corresponent a un fragment de l'hèlix- α de la p21^{KIP1} que faria de pont entre la cicD1 i la cdk4. Per problemes en el procés de síntesi es van introduir unes mutacions, es van substituir les C per A (en blau).

El pèptid III correspon a l'extrem carboxi de la p21^{CIP1} (del 145 al 164) que coincidiria, en part, amb el NLS.

Es va fer una anàlisi de modulació per comprovar que aquests pèptids podien adquirir una estructura de hèlix- α . A més a més es va estudiar la segregació de les càrregues per comprovar si les hèlix- α teòriques eren amfifiliques (fig. 41). D'aquesta anàlisi es conclou que el pèptid III seria el que presenta la millor segregació entre aminoàcids hidrofòbics i la resta. La càrrega total d'aquet pèptid seria +5 (bàsic), fet que afavoriria la interacció amb la CaM. La presència de dues Lys (K) en la zona hidrofòbica del pèptid III no trenca totalment la hidrofobicitat de la zona, ja que presenten una cua hidrocarbonada considerable que interaccionaria amb la CaM.

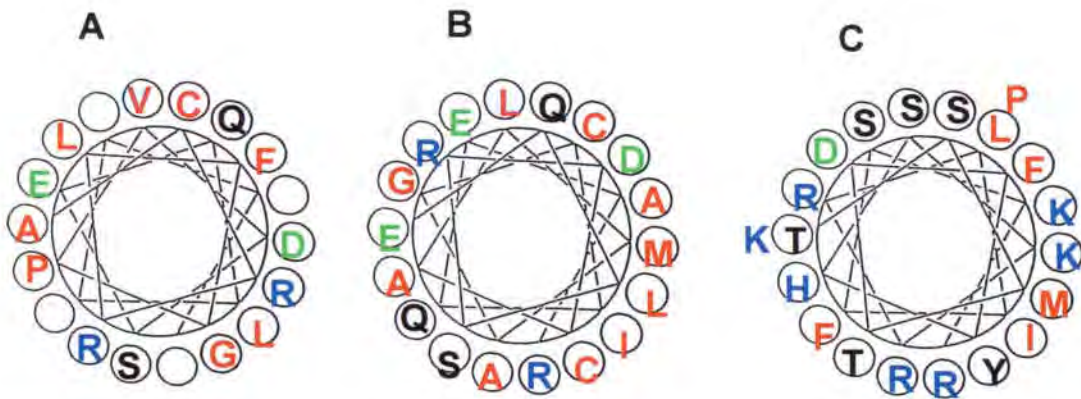


Figura 41. Aminoàcids apolars o hidrofòbics, en vermell; els bàsics en blau, els àcids en verd; els polars no carregats, en negre.

A, Pèptid I; B, Pèptid II; C, Pèptid III

Els resultats obtinguts en els experiments de competència es poden veure a la figura 32 (es va aplicar el mateix procediment de *pull down* que a l'apartat 2.2, i més detalladament a "Materials i mètodes"). El pèptid que correspon a l'extrem carboxil de la p21^{CIP1} (pèptid III) és el que competia amb la p21^{CIP1} per la unió a la CaM. La dosi més eficient era la de 4 nmols. Si més no, a dosis més baixes, 1 nmol (dada no mostrada), també hi havia competència. Aquest fet ens indica que la solubilitat del pèptid és un factor que cal tenir en compte, a concentracions altes, el pèptid podria estar agregat. Els controls utilitzats van ser la incubació de

la p21^{CIP1} amb Ca²⁺ o EGTA, que ens confirmava que la unió de la p21^{CIP1} a la CaM era dependent de Ca²⁺. Si s'observa la figura 32 (dos primers carrils) es pot veure una clara diferència entre la fracció de p21^{CIP1} unida a la CaM-Sepharose en presència de Ca²⁺ o en presència d'EGTA. L'altre control d'especificitat que es va dur a terme va ser la preincubació de la CaM amb el pèptid de la CaMKII²⁹²⁰⁻³⁰⁹. Es va veure que la fracció de p21^{CIP1} estava unida a la CaM-Sepharose era equivalent a la que es detectava en presència d'EGTA en la incubació de la p21^{CIP1} amb la CaM-Sepharose (fig.32)

Actualment s'accepta que la CaM és essencial per al transcurs de la progressió de la fase G_1 i de la transició de la fase G_1 a la S. Tot i així romanen poc clars els passos específics de la fase G_1 sobre els quals actua la CaM.

Treballs previs duts a terme pel nostre grup van demostrar que en cèl·lules NRK, la inhibició de la CaM durant la primera part de la fase G_1 provocava la inhibició de l'expressió dels enzims involucrats en la replicació del DNA (99). D'altra banda, en aquest treball demostrem, en concordància amb el publicat per Takuwa et al. (181), que té lloc també una inhibició de la fosforilació de la pRb quan s'inhibeix la CaM durant la fase G_1 primerenca. En emprar les drogues anti-CaM per l'estudi del paper d'aquesta proteïna sobre el cicle cel·lular, s'havia de tenir en compte que la inhibició de l'entrada a la fase S produïda per aquestes drogues podia ser també deguda al fet que en inhibir la CaM, hi hagués un efecte tòxic per a les cèl·lules o que les cèl·lules sortissin del cicle cel·lular (tornessin a la fase G_0). El fet que les cèl·lules es recuperessin del tractament amb les drogues anti-CaM (durant dues hores), quedava reflectit en el retardament en dues hores de la síntesi del DNA. La coincidència entre el temps de tractament i el retard en assolir el màxim de síntesi del DNA, ens demostrava que la droga no feia tornar les cèl·lules a G_0 , sinó que provocava una aturada a la fase G_1 . Així doncs, les cèl·lules continuaven el seu cicle en el punt on s'havien quedat a l'aplicar les drogues. En el cas que s'hagués produït una tornada a G_0 , el retard en l'entrada a la fase S hauria estat molt més llarg. Per tant, es va demostrar que aproximadament a les cinc hores després de la sortida de la fase G_0 (primera meitat de la fase G_1) hi havia algun esdeveniment dependent de la CaM que era essencial per a la fosforilació de la pRb i per a l'expressió d'enzims replicatius, i en conseqüència per a l'entrada a la fase S. Ens vam plantejar que la CaM podia ser essencial per a l'activitat de la maquinària de la fase G_1 del cicle cel·lular.

Per aprofundir sobre quins nivells de regulació de la maquinària motora (les cdk) del cicle cel·lular estarien afectats per la CaM, es va analitzar l'activitat de les kinases que actuen durant la transició de la fase G_1 a la S. Tant l'activitat de la cdk2 com la de la cdk4 de cèl·lules NRK sincronitzades i tractades amb els inhibidors de la CaM a les 5 h després de l'activació proliferativa i, recollides a les

7 h, estava inhibida. Això justificava que la pRb, el substrat més important de la cdk4, estigués hipofosforilat (sota les mateixes condicions de treball). La forma hipofosforilada de la pRb reté els factors de transcripció E2F i evita la progressió més enllà de la fase S del cycle cel·lular. A la figura 40 s'esquematitzen els diferents graus de fosforilació de la pRb durant el cycle cel·lular, com també les kinases que el tenen com a substrat.

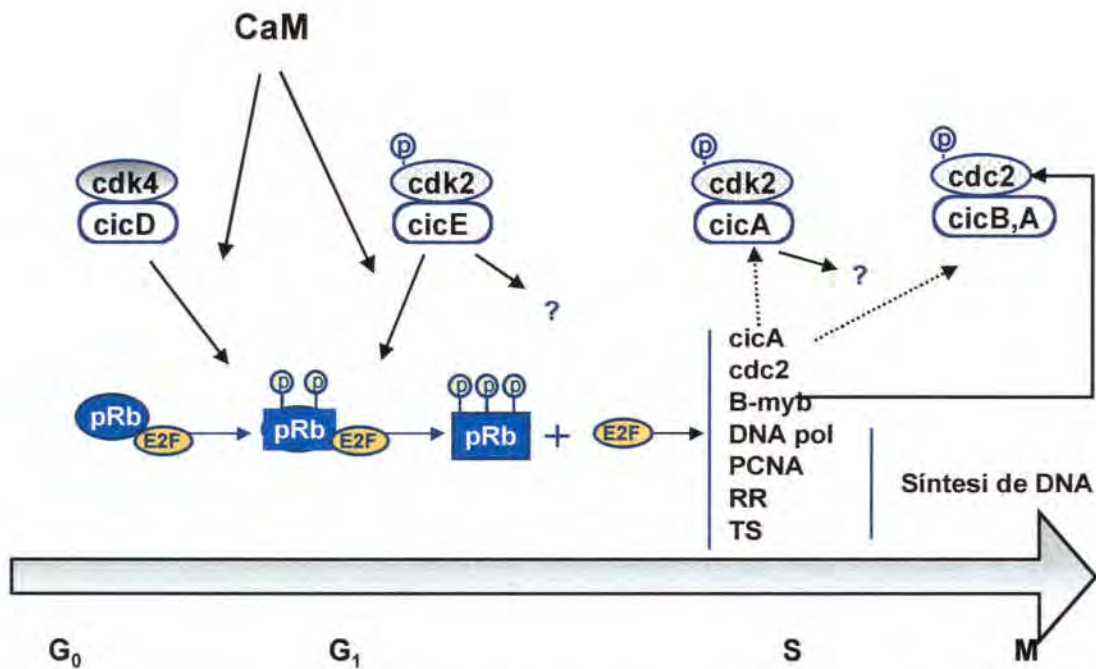


Figura 42. Estat de la pRb durant el cycle cel·lular i les kinases que la fosforilen. Quan la pRb està hiperfosforilada, els factors de transcripció són capaços d'estimular la transcripció de gens dependents d'aquest factor de transcripció.

El decrement de l'activitat cdk4 i de la cdk2 (a les 7-10 h) que es va produir en inhibir la CaM, no es justifica per una expressió menor d'aquestes proteïnes ni de les seves subunitats reguladores, i tampoc per un canvi en la quantitat de proteïnes inhibidores ($p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$). Un altre nivell de regulació de l'activitat de les kinases que pot estar afectat per la CaM és la formació de complexos. L'associació de la cdk4, la cicD1, la $p21^{CIP1}$ i la $p27^{KIP1}$ no es va veure alterada quan la CaM estava inactiva.

La inhibició de la CaM sí que provocava una disminució de l'expressió de la *cdc2* i de la *cicA*, però no de la *cicE*. L'expressió d'aquests tres gens és regulada per la unió d'E2F al seu promotor. D'aquesta manera, la inhibició de l'expressió de la *cicA* i la *cdc2* quedava justificada per la hipofosforilació de la pRb, mentre que es descrivia en aquest tipus cel·lular una nova via de regulació de l'expressió de la *cicE* no dependent d'E2F.

Per tant, la davallada de l'activitat de la *cdk2* (a les 15 h) quan la CaM està inactiva es justifica pel decrement del nivell de la *cicA*, subunitat reguladora que s'hi associa en moments tardans. L'activitat minvada de la *cdc2*, pel tractament amb W13 a les cèl·lules, quedava justificada tant per la manca de la subunitat catalítica com per la de la reguladora.

Es va pensar que l'activitat de la *cdk4* estava modulada per canvis de fosforilació com a efecte de la inhibició de la CaM. De l'estudi de la mobilitat en gels bidimensionals d'un lisat cel·lular procedent d'un cultiu quiescent, de 5 h o de 7 h (tractat o no amb W13), després de la reactivació i la posterior transferència Western contra la *cdk4*, tan sols es va detectar una nova forma que apareixia a la mostra corresponent a les 5 h després de l'activació proliferativa, però no hi havia cap canvi en el patró de la *cdk4* quan s'inhibia la CaM.

En aquest punt, el nivell de regulació sobre el qual se'n sabia més poc era el mitjançat per la localització intracel·lular diferencial de les kinases i ciclines que entraven en joc durant l'etapa que s'estudiava. Com que la proteïna del retinoblastoma és eminentment nuclear, es va considerar adient estudiar la localització de la *cdk4* i de la *cicD1* sota els efectes de la droga anti-CaM.

L'existència d'estudis previs sobre la translocació de les kinases i ciclines des del citoplasma al nucli i viceversa donava més èmfasi a la importància d'aquest nivell de regulació. Paral·lelament als estudis que dúiem a terme en cèl·lules NRK, al nostre laboratori, se'n van fer d'altres en un model diferent: el fetge normal (quiescent) o posthepatectomia (PH). (79). En aquest cas, en les cèl·lules quiescents es van trobar la *cicD3* i la *cdk4* al citoplasma, mentre que la *cicD1* era nuclear. A les cinc hores, després de l'hepatectomia parcial es va trobar que la *cicD3* i la *cdk4* ja eren al nucli, a les 13 h posthepatectomia la migració cap al

nucli era molt més considerable. Això estava demostrant l'existència d'una regulació de la translocació de les cdk i cilines cap al nucli, al llarg del cicle cel·lular.

A més a més, el treball de Depoortere et al. (35) també demostrava la importància de la localització nuclear de les cdk i cilines després de l'activació proliferativa. Descriuen dues respostes diferents en l'acumulació nuclear de la cicD1, la cicD2 i la D3 (durant la transició del G₀ fins a la fase S) segons els tipus de senyal que rebien les cèl·lules d'un cultiu primari de l'epiteli de la tiroide de gos. Els mitògens independents del cAMP com ara l'EGF més sèrum, el factor de creixement dels hepatòcits (HGF) i el 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetat (TPA) induïen l'acumulació nuclear de la cicD1 i la cicD2 i inhibien l'expressió basal de la cicD3 durant la fase prereplicativa. Mentre que si la via que s'estimulava era la de la tirotropina (TSH), l'acumulació de la cicD1 i la cicD2 no es produïa; però hi havia una acumulació nuclear de la cicD3. S'arribava a la conclusió que la cicD3 era la necessària perquè es produïx la progressió durant la fase G₁, en aquest tipus cel·lular i en resposta a la TSH. La cdk4 acabava acumulant-se al nucli independentment de quin fos l'estímul proliferatiu.

En aquest treball hem demostrat que, en cèl·lules NRK quiescents, tant la cdk4 com la cicD1 eren al citoplasma, mentre que a les 5-7 h després de l'activació proliferativa ambdues proteïnes es localitzaven al nucli. La inhibició de la CaM a les 5 h després de l'activació implicava una sortida del nucli a les 7 h després de l'activació tant de la cdk4 com de la cicD1, aquest moment correspondria a la meitat de la fase G₁; i la pRb estaria hipofosforilada. Per comprovar que la droga anti-CaM no afectava un mecanisme general de transport de proteïnes cap al nucli, es van fer immunocitoquímiques contra proteïnes que es coneix que estan en continu moviment entre el nucli i el citoplasma. A més a més, es van escollir de dos grups diferents: una que tingués el clàssic senyal NLS, la nucleolina la qual serà reconeguda per la importina; l'altra, l'hnRNPA2, com a representant del domini M9 capaç d'unir-se a un receptor, la transportina, i així entrar i sortir del nucli. No es va trobar alterat el transport d'aquestes proteïnes sota els efectes de la droga anti-CaM. Això reforçava la idea que la CaM participa en la regulació de

l'acumulació de la cdk4/cicD1 al nucli, però que no ho fa mitjançant un mecanisme general de bescanvi de proteïnes entre els dos compartiments.

El fet que la cdk4/cicD1, en inhibir la CaM, romangui al citoplasma no explica que la cdk4 estigui inactiva. Però, sí que es justifica que la pRb estigui hipofosforilada, ja que la barrera espacial entre la pRb (al nucli) i la cdk4/cicD1 (al citoplasma) impossibilita la fosforilació del seu substrat.

En definitiva, el fet de trobar que tant l'activitat de la cdk4 com la de la cdk2 disminuïda no era efecte d'un canvi en les quantitats de les kinases (cdk4, cdk2), ni de les ciclins, ni del contigut del complex, ni de les proteïnes inhibidores associades, ens fa pensar que la localització de la cdk4/cicD1 al nucli és essencial perquè la cdk4 romangui activa. Cal destacar que no es van provar les proteïnes inhibidores que actuen sobre les kinases lliures: la p16 i la p15, perquè no tenen un efecte sobre el complex cdk4/cicD1.

Una explicació als resultats obtinguts seria que, en inhibir la CaM, la cdk4 migrés al citoplasma, quedés lluny de poder ser fosforilada per la CAK (*cdk-activating kinase*) i quedés inactiva. L'estudi del patró de la mobilitat de la cdk4, en dues dimensions, no va suggerir que en inactivar la CaM hi hagués cap canvi de fosforilació en la cdk4. També s'ha de considerar la possibilitat que la fosforilació estigués regulant altres proteïnes desconegudes que formessin part del complex. Aquestes proteïnes, en forma fosforilada, serien necessàries per a l'activitat de la cdk4 al nucli i per a la seva inactivació al citoplasma. D'altra banda, Mahony et al. (102) van mostrar com els complexos actius de la cdk6 eren de manera majoritària al nucli dels limfòcits T. El pes molecular (170 kD) d'aquests complexos s'ha determinat mitjançant cromatografia de gel filtració; fet que demostra que la cicD forma part del complex conjuntament amb altres proteïnes no identificades (102).

En el moment en el que vam obtenir aquests resultats, el mecanisme de transport de les cdk i ciclins cap al nucli estava poc estudiat. Era conegut que la cdk7 (subunitat catalítica de la CAK –*cdk activating kinase*–) es translocava al nucli gràcies a la presència d'un senyal clàssic de localització nuclear (NLS) (91) (182).

D'altra banda, també s'han descrit casos com ara el de la *cicA*, que malgrat no presentar un senyal NLS es transloca al nucli quan s'associa amb la *cdk2* (103).

Tant la *cdk4* com la *cicD1* no tenen senyals clàssics NLS, però recentment s'han trobat motius bàsics (possibles NLS) per a la *cdk4* (²⁰⁹RRKP) i per a la *cicD1* (⁹³PVKKSRL). Per tant, podrien unir-se a receptors del tipus importina i ser transportades al nucli. Si més no, hi ha la possibilitat que necessitin altres proteïnes encara no conegudes.

Un trencament dels esquemes clàssics sobre les possibles funcions de les proteïnes de la família KIP/CIP es va començar a donar a (90), on es postulava que aquesta família de proteïnes reconegudes originàriament com a inhibidores podien estar implicades en la formació del complexos *cdk4/cicD* i en la seva translocació al nucli, ja que presenten senyals clàssics NLS (27) (36). Els nostres resultats demostren que no n'hi ha prou amb la formació del complex *cdk4/cicD* perquè aquest sigui transportat al nucli.

En aquest estudi es proposen dos camins per explicar com la inhibició de la CaM indueix l'alliberament de la *cdk4* i de la *cicD* del nucli:

- El complex *kinasa/ciclina* és retingut al nucli de manera dependent de la CaM (model I, figura 43).
- La *kinasa* està en moviment continu entre el nucli i el citoplasma, i la CaM és imprescindible per la seva entrada al nucli.

Respecte a la primera possibilitat, s'ha de fer èmfasi en el fet que en cèl·lules proliferants és típica la localització al nucli de moltes CaMBP, com també la presència nuclear de la CaM lliure (7). Per això, la CaM podria unir-se a través d'una CaMBP als complexos *cdk4/cicD* o podria participar en una modificació posttraduccional dels complexos (com podrien ser les fosforilacions i les desfosforilacions) que en provoqués la retenció al nucli. Un exemple molt clar d'aquest tipus de regulació per part de la CaM sobre el factor de transcripció NF-AT4 ha estat descrit per F. Shibasaki et al (168).

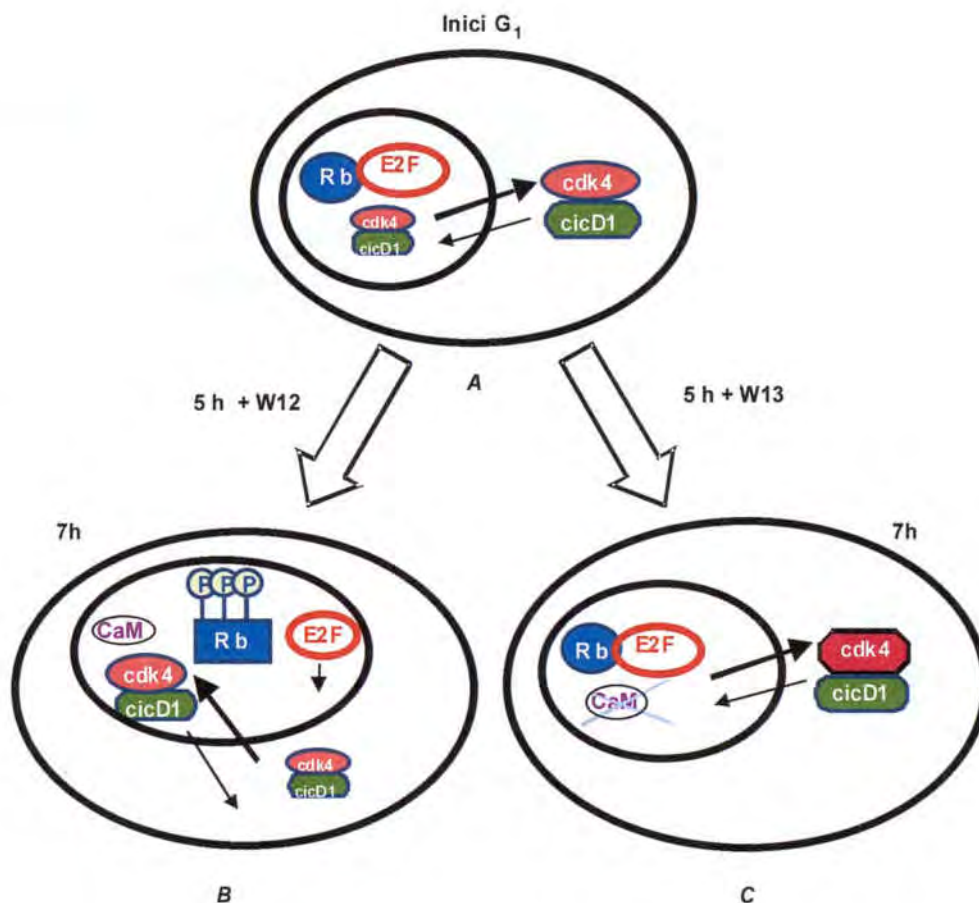


Figura 43. Model I proposat per a l'acumulació de la cdk4/cicD1 cap al nucli, de manera dependent de la CaM. En aquest model, la CaM és necessària per retenir la cdk4/cicD1 al nucli.

A. A l'inici de la fase G₁, el complex cdk4/cicD1 és majoritàriament al citoplasma; en conseqüència, la pRb roman al nucli de manera hipofosforilada.

B. A les 7 h (en les cèl·lules control), el complex es transloca al nucli, on és retingut de manera dependent de CaM.

C. A les 7 h (havent fet un tractament amb W13 a les 5 h després de l'activació) el complex és novament al citoplasma perquè la CaM està inhibida.

La presència de l'NF-AT4 al nucli depèn de la seva associació amb la calcineurina (fosfatasa dependent de la CaM). L'associació de la CaM a la calcineurina permet mantenir a l'NF-AT4 al nucli en la seva forma defosforilada. En aquesta forma, el senyal NLS queda exposat i el NES, amagat (168).

Respecte a la segona possibilitat, s'ha de recordar que Sweitzer et al. (180) van descriure un transport al nucli que era actiu en concentracions altes de calci (cèl·lules en estadi proliferatiu) i de manera dependent de CaM i independent de GTP. Així doncs, les proteïnes amb senyal NLS podrien tenir el seu transport afectat en estar inhibida la CaM. Com que el transport de la nucleolina i la hnRNPA2 no quedava afectat pel tractament amb W13, en el nostre cas el mecanisme no hauria de ser tan general.

Atès que s'ha trobat CaM coimmunoprecipitant amb la cdk4/cicD1 en un lisat cel·lular i que ni la cdk4 ni la cicD1 s'uneixen directament *in vitro* a la CaM, es va pensar en la possible implicació d'una CaMBP en la translocació de la cdk4/cicD1 al nucli. Es va provar tant una kinasa (la CaMKII) com una fosfatasa (la calcineurina), de les quals es disposa d'antagonistes: la ciclosporina A (inhibidor de la calcineurina) i el KN93 (inhibidor de la CaMKII). Cap de les dues estava implicada en el transport de la cdk4/cicD1 al nucli. S'han descrit altres CaMBP com ara la Hsp90, implicada en el tràfic de proteïnes com ara el receptor de glucocorticoides (148). La Hsp90, a més a més de ser una CaMBP, s'ha suggerit que pot estabilitzar la cdk4 just després de la seva traducció. La disponibilitat de l'antibiòtic geldanamicina, que quan se subministrava a dosis de 2 μ M durant 2 h era capaç de blocar la Hsp90 sense alterar els nivells totals de la cdk4, ens va permetre estudiar el patró de localització de la cdk4 i la cicD1. Es va observar que la localització tant de la cdk4 com de la cicD1 estava afectada pel subministrament d'aquesta droga i que coincidia amb el patró de localització observat quan s'utilitzaven les drogues anti-CaM. Per aquest motiu, vam proposar un segon model en el qual la Hsp90 feia de mediadora en el transport de la cdk4 i la cicD1 al nucli (model II, figura 43).

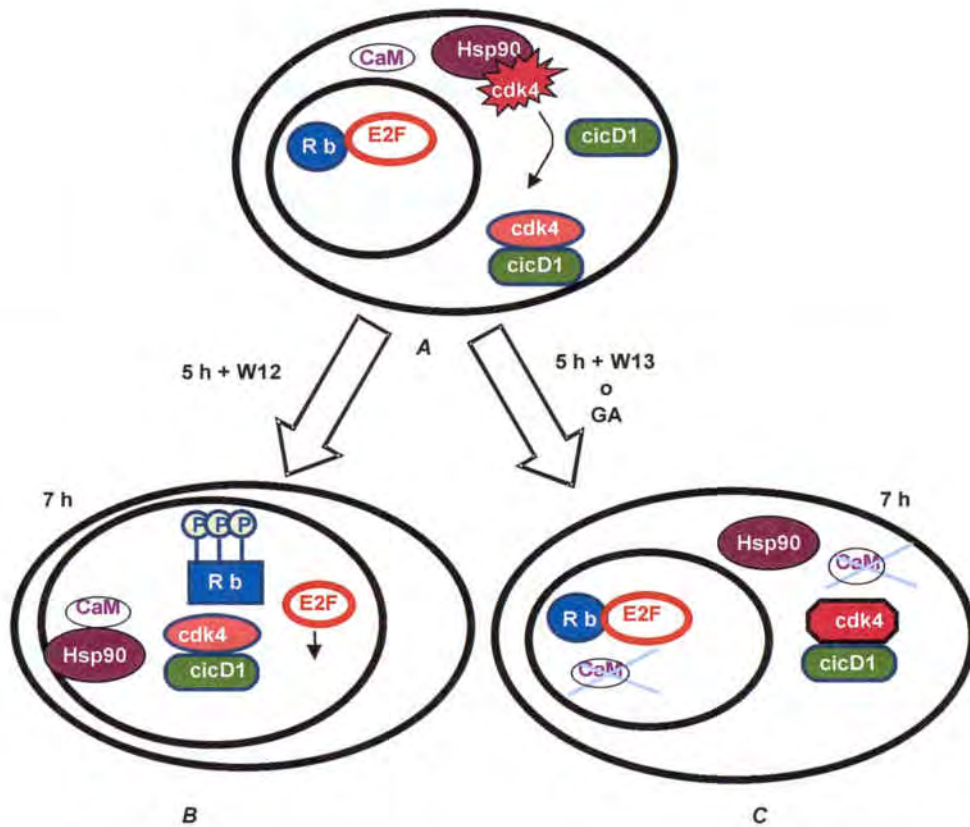


Figura 44. Model II proposat per a les cèl·lules NRK per a la translocació de la cdk4/cicD1 al nucli de manera dependent de CaM. En aquest model la CaM i la Hsp90 serien necessàries per a l'entrada al nucli del complex cdk4/cicD1.

A. En un primer pas la Hsp90 actuaria com *chaperone* sobre la cdk4 lliure, fet que permetria que la conformació d'aquesta proteïna fos l'adequada per poder formar el complex amb la cicD1 i posteriorment translocar-se al nucli.

B. A les 5 h es va afegir el W12 (droga de control) i es va estudiar el seu efecte a les 7 h. Quan la CaM és activa, el complex CaM/Hsp90/cdk4/cicD1 té la conformació adequada per a entrar al nucli i poder fosforilar a la pRb.

C. Es van tractar a les cèl·lules amb la droga anti-CaM, W13 o GA (inhibidor de la Hsp90) a les 5 h després de l'activació proliferativa i es va estudiar la localització de la cdk4 i cicD1 a les 7 h després de la reactivació a proliferar. Quan la CaM o la Hsp90 estan inactives, el complex cdk4/cicD1 no té la conformació adequada per anar al nucli.

Analitzant més profundament les diferents possibilitats, i atès que altres autors proposaven que la Hsp90 podia unir-se només a la cdk4 (estabilitzant-la i actuant com a *chaperone* per aconseguir la conformació adequada de la cdk4 perquè es produís la unió a la cicD1) i no al complex cdk4/cicD1, ens vam pensar que la Hsp90 podia ser essencial per a l'acumulació al nucli de la cdk4 en un moment anterior al que nosaltres estàvem desvetllant en aplicar les drogues anti-CaM a les 5 h. Per aquest motiu, es va continuar estudiant la possible implicació d'altres proteïnes conegudes i presents al complex cdk4/cicD1 i el seu paper sobre la translocació d'aquest complex al nucli.

El segon bloc de resultats (IV.2) són els que vinculen la p21^{CIP1} a la CaM tant d'una manera indirecta com directa. Cal recordar que la p21^{CIP1} coimmunoprecipitava amb la CaM en ambdós sentits i que, de les proteïnes conegudes que coimmunoprecipitaven amb la cicD1, només la p21^{CIP1}-GST s'unia de manera dependent de calci i directament a la CaM; la unió de la cdk4-GST era menyspreable i ni la p27^{KIP1}-GST, ni la cicD1-GST s'unien a la CaM. A més a més, es va observar que la CaM era essencial per a l'acumulació de la p21^{CIP1} al nucli en cèl·lules en estat proliferatiu, i que en presència de W13 la p21^{CIP1} conjugada amb la B-ficoeritrina (BP) *in vitro* deixava d'importar-se al nucli.

Tal com s'ha descrit en la primera part dels resultats (IV.1) es va observar que la p21^{CIP1} s'associa als complexos cdk4/cicD1, però el paper que té sobre la regulació de l'activitat de la cdk4 encara no és clar. Els primers treballs sobre el tema presenten la p21^{CIP1} com una proteïna merament inhibidora (67) (192), mentre que recentment han sorgit noves tendències que són partidàries de donar-li rellevància sobre la regulació de la formació del complex cdk4/cicD i la seva translocació al nucli (90) (27) (20). Aquesta dicotomia en la funcionalitat de la p21^{CIP1} pot ser dependent del nombre de molècules unides al complex cdk4/cicD, o de l'associació amb altres proteïnes. Atès que no s'han trobat canvis en les quantitats de proteïnes inhibidores associades al complex cdk4/cicD1, fa pensar que l'efecte de la inhibició de la CaM recau sobre passos posteriors. Una

possibilitat seria que alguna de les proteïnes (que s'havien trobat unides al complex cdk4/cicD1) tingués un paper cotransportador.

Les evidències que hem trobat que donen suport a la implicació de la p21^{CIP1} en el transport de la cdk4/cicD cap al nucli de manera dependent de CaM s'enuncien a continuació:

- La p21^{CIP1} purificada s'uneix *in vitro* a la CaM.
- La p21^{CIP1} coimmunoprecipita amb la CaM en un extracte cel·lular.
- En un sistema de transport *in vitro*, la p21^{CIP1} es transloca al nucli de manera dependent de CaM.
- S'ha detectat col·localització per microscòpia electrònica de la p21^{CIP1} amb la CaM.

D'altra banda, s'ha observat que la p27^{KIP1}, d'estructura molt semblant a la p21^{CIP1}, no s'uneix *in vitro* a la CaM. Això ens fa pensar en l'existència de dues rutes diferents de regulació per a les funcions de la p21^{CIP1} i per la p27^{KIP1}.

Els dominis d'interacció de la p21^{CIP1} amb les ciclines i cdk se situen a l'extrem a N-terminal de la molècula (els aminoàcids 21-26 serien els reconeguts per la ciclina; i del 49 al 71, per la cdk). Aquesta regió és precisament la més conservada entre la p21^{CIP1} i la p27^{KIP1}. La segona meitat de la molècula conté diferents motius de localització nuclear (NLS) (139-142, 160-163, 140-162, 141-158), també hi ha el lloc on s'uneix el PCNA (124-164) i un nou domini d'unió a la cicA (160).

Per analitzar els possibles llocs d'interacció entre la CaM i la p21^{CIP1} es van dissenyar tres pèptids diferents que mimetitzaven diverses zones de la p21^{CIP1} i es va assajar la capacitat que tenien per competir per la unió a la CaM (vegeu la figura 40). El pèptid III (145-164) va ser el que va donar millor resultat en l'estudi de competència. Aquest pèptid conté dominis bàsics i hidrofòbics (vegeu la figura 40) clarament segregats i definint una hèlix- α amfipàtica. Aquesta regió amfifílica és una bona candidata per ser el domini que s'uneix a la CaM. Aquest domini no és present a la p27^{KIP1}, resultat que està d'acord amb el fet que aquesta proteïna no s'uneixi a la CaM.

Com ja s'ha esmentat abans, és molt nova la idea del paper regulador de la p21^{CIP1} en la formació dels complexos cdk4/cicD i del seu transport al nucli (90) (27) (20). La Baer et al. (90) demostra que, quan es transfecten cèl·lules amb una p21^{CIP1} truncada que només presenta la part N-terminal, aquesta proteïna continua sent capaç de formar els complexos amb la cdk4 i la cicD1, però aquests no es troben al nucli. Aquest fet suggereix que la p21^{CIP1} facilita el transport del complex cdk4/cicD1 al nucli gràcies al senyal NLS que posseeix. En un principi semblaria contradictori el fet d'haver trobat en cèl·lules p21^{CIP1-/-} p21^{CIP1-/-} la cdk4 i la cicD1 al nucli, si més no es podria pensar en la p27^{KIP1} com la proteïna suplent que aportaria igualment el senyal NLS necessari per poder conduir al complex al nucli.

- Després de l'examinació dels resultats obtinguts en estudiar el paper de la CaM en el transport de la p21^{CIP1} i en veure que el transport cap al nucli d'aquesta proteïna era inhibida quan s'inactivava a la CaM, podem postular que la CaM és necessària per a l'exposició i la funcionalitat del senyal NLS de la p21^{CIP1}. Si integrem aquests resultats amb els obtinguts a la primera part de l'estudi, que demostren que la CaM és essencial per a la translocació i retenció del complex cdk4/cicD1 al nucli (183), es pot arribar a postular el model III que s'esquematitza a la figura 45. Aquest model ens permet tenir una visió global de la regulació del transport del complex cdk4/cicD1/p21^{CIP1} cap al nucli en resposta del senyal de Ca²⁺.

- Haver suggerit aquest model (fig. 45) no treu pas rellevància als resultats obtinguts de la inhibició de la Hsp90 (la CaMBP que havíem trobat associada a la cdk4). Quan se subministrava la geldanamicina (en la dosi i durant el període adequat), es va veure que la cdk4 i la cicD1 romanien al citoplasma (183). En aquest cas, la Hsp90 estaria actuant pròpiament de *chaperone* procurant que la conformació de la cdk4 fos l'adequada per poder formar el complex amb la cicD1 i la p21^{CIP1} i, com a conseqüència es donaria el transport del complex cap al nucli.

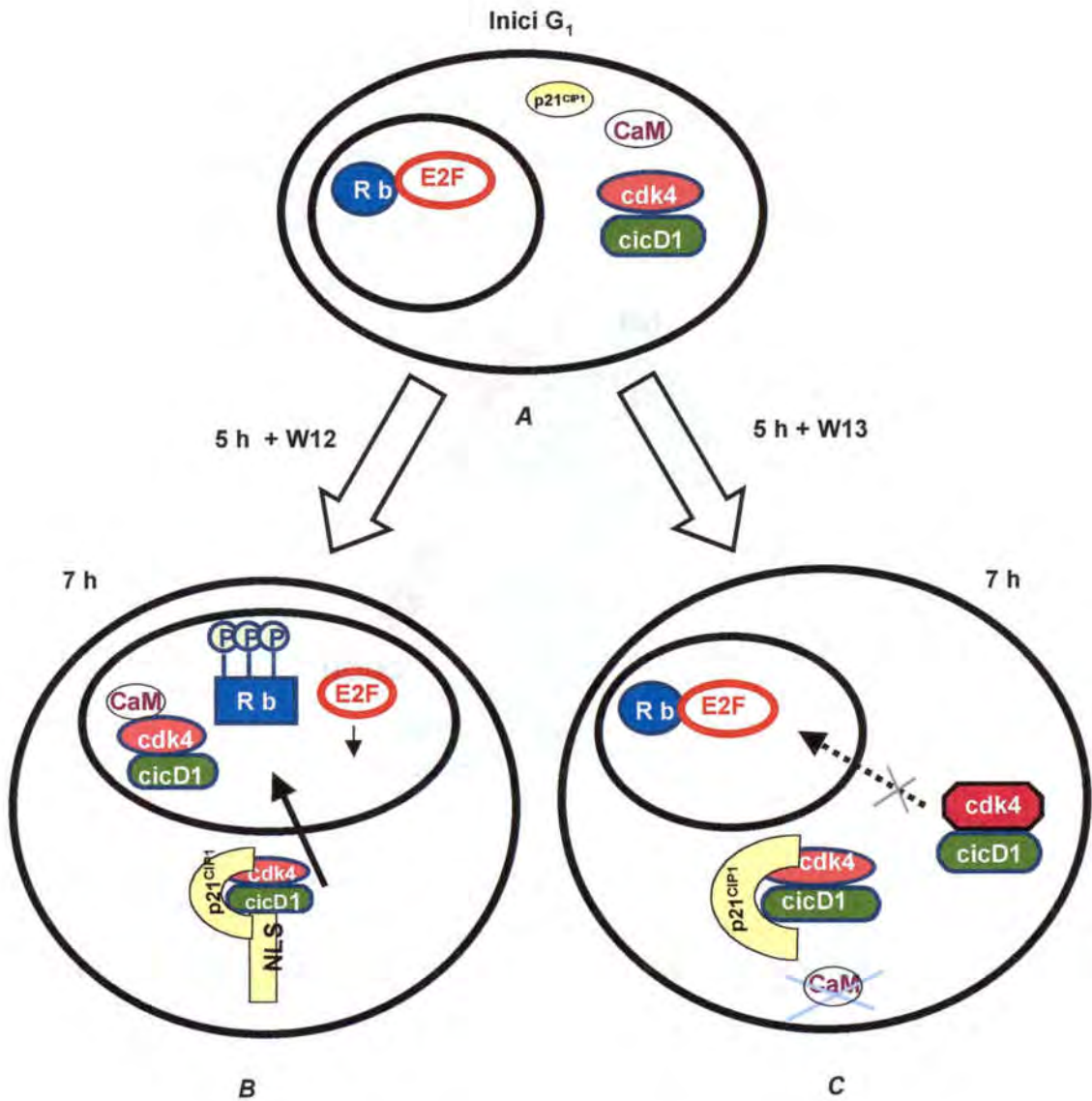


Figura 45. Model III proposat per a la translocació de la p21^{CIP1}/cdk4/ cicD1 cap al nucli, de manera dependent de la CaM.

A. A l'inici de la fase G₁ hi ha molt poca quantitat de p21^{CIP1} i aquesta roman al citoplasma conjuntament amb la cdk4 i cicD1.

B. A les 7 h després de l'activació proliferativa, les cèl·lules control ja expressen quantitats suficients de la p21^{CIP1}, la qual s'estaria unint per mitjà de la CaM al complex cdk4/cicD1. La p21^{CIP1} estaria exposant el senyal NLS, d'aquesta manera es cotransportaria el complex cdk4/cicD1/p21^{CIP1} cap al nucli.

C. En inhibir la CaM, la p21^{CIP1} no és capaç d'exposar el seu senyal NLS i s'evita així l'acumulació del complex cdk4/cicD1/p21^{CIP1} al nucli.

- Una altra explicació alternativa seria trobar la funcionalitat de la unió de la CaM a la p21^{CIP1} de manera totalment desvinculada amb el transport dels complexos cap al nucli. Els estudis de competència amb el pèptid III ens permeten suggerir la zona de la p21^{CIP1} compresa entre els aminoàcids 145 i 164 com la que s'uneix a la CaM. Se sap que aquest domini coincideix, en part, amb el d'unió al PCNA.

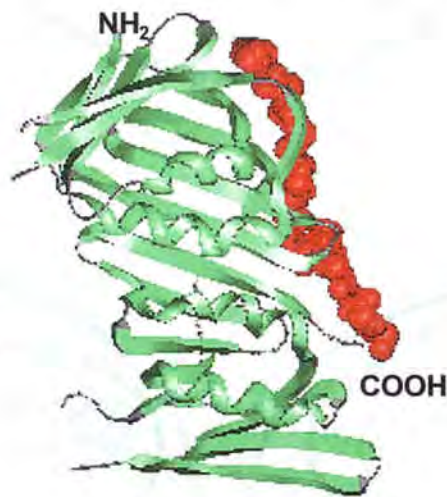


Figura 46. Conformació que adopta el PCNA (en verd) quan s'uneix a la p21^{CIP1} (en vermell, es representa un fragment). Extret de Gulbis et al., 1996 (63).

El fet que la zona candidata de la p21^{CIP1} d'unió a la CaM coincideixi amb el domini de la p21^{CIP1} que reconeix el PCNA suggereix que la CaM pugui modular la unió de la p21^{CIP1} al PCNA i, com a conseqüència pugui regular la inhibició de la síntesi del DNA.

Si més no, cal continuar aprofundint l'estudi de la unió de la CaM a la p21^{CIP1}. Els resultats que acabem d'exposar són nous en el sentit d'haver trobat la unió *in vitro* de la p21^{CIP1} a la CaM i, obren noves perspectives d'estudi sobre la funcionalitat de la p21^{CIP1} en resposta al senyal de Ca²⁺ de manera diferencial a la p27^{KIP1}.

V. Conclusions

1. L'efecte de la inhibició de la CaM sobre la inhibició de la síntesi del DNA per mitjà de l'aplicació del W13 a un cultiu sincrònic de cèl·lules NRK és reversible.
2. La proteïna del retinoblastoma es detecta hipofosforilada a les 20 h en un cultiu sincrònic de NRK que havia estat tractat amb el W13 a les 5 h de la seva reactivació proliferativa.
3. La inhibició de la CaM en un cultiu sincrònic de cèl·lules NRK a les 5 h després d'haver estat activat provoca una disminució de l'activitat kinasa de la cdk4 i de la cdk2, després de la reactivació proliferativa.
4. La inactivació de la calmodulina durant la primera part de la fase G₁ en un cultiu sincrònic de cèl·lules NRK no afecta els nivells totals de la cdk4, ni de la cdk2, ni de la cicD1, ni de la cicD2, ni de la cicE; però sí que afecta als nivells de la cdc2 i la cicA a les 15 h després de la reactivació proliferativa. Tampoc hi ha cap canvi en la quantitat de p21^{CIP1} i de p27^{KIP1}.
5. La disminució tardana de l'activitat de la cdk2 sota els efectes de la inhibició de la CaM és provocada per un nivells més baixos de la seva subunitat reguladora associada en aquest moment, la cicA.
6. L'associació de la p21^{CIP1}, de la p27^{KIP1}, de la cicD1 i de la cdk4 tant a la cicD1 com a la cdk4 no es veu afectada per la inactivació de la CaM (durant la primera part de la fase G₁) en un cultiu sincrònic de cèl·lules NRK.
7. El tractament amb el W13 a les 5 h després de la reactivació, no afecta el patró electroforètic bidimensional de la cdk4 a les 2 h després d'haver afegit la droga anti-CaM.
8. La inactivació de la CaM durant la primera meitat de la fase G₁ d'un cultiu sincrònic de cèl·lules NRK i de fibroblasts normals provoca una major retenció dels complexos cdk4/cicD1 al citoplasma a les 7 h de l'estímul proliferatiu.

9. La inactivació de la Hsp90 durant la primera meitat de la fase G₁ d'un cultiu sincrònic de cèl·lules NRK provoca una localització majoritàriament citoplasmàtica de la cdk4 i la cicD1 a les 7 h de l'estímul proliferatiu.
10. La cicD1 i la cdk4 i la p21^{CIP1} interaccionen *in vivo* amb la CaM (detectat per coimmunoprecipitació i col-localització per microscòpia electrònica).
11. La p21^{CIP1}-GST expressada en bacteris i purificada s'uneix *in vitro* a la CaM de manera dependent de calci. La cdk4-GST ho fa en poca mesura i ni la p27^{KIP1}-GST ni la cicD1-GST s'hi uneixen.
12. L'acumulació de la p21^{CIP1} al nucli és dependent de la CaM.
13. Se suggereix com un possible domini d'unió de la p21^{CIP1} a la CaM el corresponent als aminoàcids 145-164 de la p21^{CIP1}.

A partir d'aquests resultats es postula un possible paper cotransportador i dependent de CaM per part de la p21^{CIP1} sobre l'acumulació del complex cdk4/cicD1 al nucli.

Índex alfabètic

A	
Arlalquilamines	33
C	
Calci	
Calci com a missatger. Regulació dels nivells de calci intracel·lular	26
Calcineurina	
Model de transport	59
Calmodulina	
Acoblament a Sepharose-4B	88
Antagonistes de la CaM	33
Estructura	25
Gens de la Calmodulina	25
Molècula efectora	26
Purificació	86
CaMBP	
Funcions	31
<i>Chaperones</i>	57
Cicle cel·lular	
<i>Checkpoints</i>	34
Definició	34
Regulació	42
CKIs	
Família CIP/KIP	37
Família INK4	37
Complex del porus nuclear (CPN)	
Estructura i funcions	46
<i>Coomassie Blue</i>	79
Cromatografia d'afinitat	105
Cultius cel·lulars	
Congelació i descongelació de cèl·lules	72
Rutina	71
Sincronització	73
Tripsinització	72
D	
Drogues anti-CaM	33
Aplicació al cultiu cel·lular	75
E	
Electroforesi	
1-D	77
2-D PAGE	79
F	
Ficoeritrina	
Conjugació de proteïnes	111
Fluoresceïna	
Conjugació de proteïnes	109
Fluorocroms	
Ficoeritrina	111
FITC	109
TRITC	109

I	
Imidazols	33
Immunodetecció.....	92
Assaig kinasa	94
Immunocitoquímica.....	97
Immunoperoxidasa	100
Immunoprecipitació.....	94
Lowicryl K4M	100
Microscopia electrònica.....	100
Western blot	94
K	
Kinases depenents de ciclins (cdk).....	36
Regulació de la seva activitat.....	37
M	
Maquinària del cicle cel·lular	36
Microinjecció.....	108
Microscopia electrònica	
Doble immunocitoquímica.....	104
Slam Freezing.....	103
N	
Nucleoporines.....	53
Nucli	
Teoria evolutiva	45
P	
p27/cdk2/cicA	39
PEST	37
Proteïnes	
Quantificació.....	82
Proteïnes de fusió amb -GST	
Expressió i purificació	90
PSTAIRES	36
Pull down.....	107
Punt de Restricció ®	43
S	
Síntesi de DNA	
Mesura	76
Sulfonamides.....	33
T	
Transport nuclear	
Seqüència M9.....	61
Transport de proteïnes	
Senyal de localització nuclear	
NLS.....	50
Factors de retenció citoplasmàtica	57
Transport nuclear	
Altres tipus de senyals de transport nuclear	56
Assaig <i>in vitro</i>	113
Importació-exportació	49
Importines.....	51

NES. Senyals riques en leucines.....	60
Paper de la CaM.....	62
<i>Piggy back</i>	56
Senyals d'exportació nuclear	
NES.....	60
Seqüències <i>bipartites</i>	51
T RanGTP/GDP.....	52
Trifluoroperacines (TFP).....	33
W	
<i>Wheat germ agglutinin</i>	53

Referències

1. Adam, E.J. and Adam, S.A. (1994): Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J.Cell Biol.*, 125:547-555.
2. Adam, S.A., Marr, R.S., and Gerace, L. (1990): Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol.*, 111:807-816.
3. Adam, S.A., Sterne, M.R., and Gerace, L. (1992): Nuclear protein import using digitonin-permeabilized cells. *Methods Enzymol.*, 219:97-110.
4. Agutter, P.S. (1995): Intracellular structure and nucleocytoplasmic transport. *Int.Rev.Cytol.*, 162B:183-224.
5. Askjaer, P., Jensen, T.H., Nilsson, J., Englmeier, L., and Kjems, J. (1998): The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J.Biol.Chem.*, 273:33414-33422.
6. Bachs, O. and Agell, N. (1995): Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. *Molecular Biology Intelligence Unit.R.G.Landes Company.Springer-Verlag*,
7. Bachs, O., Agell, N., and Carafoli, E. (1994): Calmodulin and calmodulin-binding proteins in the nucleus. *Cell Calcium*, 16:289-296.
8. Bachs, O., Lanini, L., Serratos, J., Coll, M.J., Bastos, R., Aligue, R., Rius, E., and Carafoli, E. (1990): Calmodulin-binding proteins in the nuclei of quiescent and proliferatively activated rat liver cells. *J.Biol.Chem.*, 265:18595-18600.
9. Baglia, F.A. and Maul, G.G. (1983): Nuclear ribonucleoprotein release and nucleoside triphosphatase activity are inhibited by antibodies directed against one nuclear matrix glycoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 80:2285-2289.
10. Baitinger, C., Alderton, J., Poenie, M., Schulman, H., and Steinhardt, R.A. (1990): Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase is necessary for nuclear envelope breakdown. *J.Cell Biol.*, 111:1763-1773.
11. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M., and Draetta, G. (1993): Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.*, 7:812-821.
12. Bandara, L.R., Adamczewski, J.P., Hunt, T., and La-Thangue, N.B. (1991): Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature*, 352:249-251.
13. Bastos, R., Pante, N., and Burke, B. (1995): Nuclear pore complex proteins. *Int.Rev.Cytol.*, 162B:257-302.
14. Berridge, M.J. (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361:315-325.
15. Bohmer, R.M., Scharf, E., and Assoian, R.K. (1996): Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependent expression of cyclin D1. *Mol.Biol.Cell*, 7:101-111.

202 Referències

16. Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., and Nigg, E.A. (1989): Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 56:379-390.
17. Bosch, M., López, G.A., Bachs, O., and Agell, N. (1994): Protein kinase C regulates calmodulin expression in NRK cells activated to proliferate from quiescence. *Cell Calcium*, 16:446-454.
18. Buchkovich, K., Duffy, L.A., and Harlow, E. (1989): The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, 58:1097-1105.
19. Bustamante, J.O., Liepins, A., Prendergast, R.A., Hanover, J.A., and Oberleithner, H. (1995): Patch clamp and atomic force microscopy demonstrate TATA-binding protein (TBP) interactions with the nuclear pore complex. *J Membr.Biol*, 146:263-272.
20. Cai, K. and Dynlacht, B.D. (1998): Activity and nature of p21(WAF1) complexes during the cell cycle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95:12254-12259.
21. Castro, A., Faura, M., Agell, N., Renau-Piqueras, J., and Bachs, O. (1996): The autoantigen La/SSB is a calmodulin-binding protein. *Cell Calcium*, 20:493-500.
22. Chafouleas, J.G., Bolton, W.E., Hidaka, H., Boyd, A.E., and Means, A.R. (1982): Calmodulin and the cell cycle: involvement in regulation of cell-cycle progression. *Cell*, 28:41-50.
23. Chafouleas, J.G., Bolton, W.E., and Means, A.R. (1984): Potentiation of bleomycin lethality by anticalmodulin drugs: a role for calmodulin in DNA repair. *Science*, 224:1346-1348.
24. Chapin, S.J., Enrich, C., Aroeti, B., Havel, R.J., and Mostov, K.E. (1996): Calmodulin binds to the basolateral targeting signal of the polymeric immunoglobulin receptor. *J.Biol.Chem.*, 271:1336-1342.
25. Charp, P.A. (1987): DNA repair in human cells: methods for the determination of calmodulin involvement. *Methods Enzymol.*, 139:715-730.
26. Chen, J., Jackson, P.K., Kirschner, M.W., and Dutta, A. (1995): Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*, 374:386-388.
27. Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M., and Sherr, C.J. (1999): The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.*, 18:1571-1583.
28. Chi, N.C., Adam, E.J., Visser, G.D., and Adam, S.A. (1996): RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 nuclear protein import. *J.Cell Biol.*, 135:559-569.
29. Corneliusen, B., Holm, M., Waltersson, Y., Onions, J., Hallberg, B., Thornell, A., and Grundstrom, T. (1994): Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains. *Nature*, 368:760-764.
30. Craven, C.J., Whitehead, B., Jones, S.K., Thulin, E., Blackburn, G.M., and Waltho, J.P. (1996): Complexes formed between calmodulin and the antagonists J-8 and TFP in solution. *Biochemistry*, 35:10287-10299.
31. Dabauvalle, M.C., Benavente, R., and Chaly, N. (1988): Monoclonal antibodies to a Mr 68,000 pore complex glycoprotein interfere with nuclear protein uptake in *Xenopus* oocytes. *Chromosoma*, 97:193-197.

32. Dabauvalle, M.C., Schulz, B., Scheer, U., and Peters, R. (1988): Inhibition of nuclear accumulation of karyophilic proteins in living cells by microinjection of the lectin wheat germ agglutinin. *Exp.Cell Res.*, 174:291-296.
33. Dai, K., Kobayashi, R., and Beach, D. (1996): Physical interaction of mammalian CDC37 with CDK4. *J.Biol.Chem.*, 271:22030-22034.
34. Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995): Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, 82:675-684.
35. Depoortere, F., Van Keymeulen, A., Lukas, J., Costagliola, S., Bartkova, J., Dumont, J.E., Bartek, J., Roger, P.P., and Dremier, S. (1998): A requirement for cyclin D3-cyclin-dependent kinase (cdk)-4 assembly in the cyclic adenosine monophosphate-dependent proliferation of thyrocytes. *J.Cell Biol.*, 140:1427-1439.
36. Diehl, J.A. and Sherr, C.J. (1997): A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase. *Mol.Cell Biol.*, 17:7362-7374.
37. Diehl, J.A., Zindy, F., and Sherr, C.J. (1997): Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.*, 11:957-972.
38. Dingwall, C. and Laskey, R.A. (1991): Nuclear targeting sequences—a consensus? [see comments]. *Trends.Biochem.Sci.*, 16:478-481.
39. Divecha, N., Banfic, H., and Irvine, R.F. (1991): The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J.*, 10:3207-3214.
40. Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol, R.S., and Burd, C.G. (1993): hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu.Rev.Biochem.*, 62:289-321.
41. Ducommun, B., Brambilla, P., and Draetta, G. (1991): Mutations at sites involved in Suc1 binding inactivate Cdc2. *Mol.Cell Biol.*, 11:6177-6184.
42. Ducommun, B., Brambilla, P., Felix, M.A., Franza-BR, J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1991): cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *EMBO J.*, 10:3311-3319.
43. Fang, F., Orend, G., Watanabe, N., Hunter, T., and Ruoslahti, E. (1996): Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage. *Science*, 271:499-502.
44. Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1998): Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell*, 2:163-171.
45. Fasman GD, e. (1989): Prediction of protein structure and the principles of protein conformation. *New York: Plenum Press*,
46. Featherstone, C., Darby, M.K., and Gerace, L. (1988): A monoclonal antibody against the nuclear pore complex inhibits nucleocytoplasmic transport of protein and RNA in vivo. *J.Cell Biol.*, 107:1289-1297.

47. Finlay, D.R., Newmeyer, D.D., Price, T.M., and Forbes, D.J. (1987): Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J.Cell Biol.*, 104:189-200.
48. Fischer, T.H., Campbell, K.P., and White, G.C. (1987): An investigation of functional similarities between the sarcoplasmic reticulum and platelet calcium-dependent adenosinetriphosphatases with the inhibitors quercetin and calmidazolium. *Biochemistry*, 26:8024-8030.
49. Fischer, U., Darzynkiewicz, E., Tahara, S.M., Dathan, N.A., Luhrmann, R., and Mattaj, I.W. (1991): Diversity in the signals required for nuclear accumulation of U snRNPs and variety in the pathways of nuclear transport. *J Cell Biol.*, 113:705-714.
50. Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W., and Luhrmann, R. (1995): The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, 82:475-483.
51. Fisher, R.P. and Morgan, D.O. (1994): A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, 78:713-724.
52. Fornerod, M., van-Deursen, J., van-Baal, S., Reynolds, A., Davis, D., Murti, K.G., Fransen, J., and Grosveld, G. (1997): The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J.*, 16:807-816.
53. Frangioni, J.V. and Neel, B.G. (1993): Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal.Biochem.*, 210:179-187.
54. Ghosh, S. and Baltimore, D. (1990): Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature*, 344:678-682.
55. Giancotti, F.G. (1997): Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin.Cell Biol*, 9:691-700.
56. Godowski, P.J., Picard, D., and Yamamoto, K.R. (1988): Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science*, 241:812-816.
57. Gorlich, D. (1997): Nuclear protein import. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 9:412-419.
58. Gorlich, D. (1998): Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.*, 17:2721-2727.
59. Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R.A., and Hartmann, E. (1996): A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J.*, 15:1810-1817.
60. Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U., and Bischoff, F.R. (1996): Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.*, 15:5584-5594.
61. Greber, U.F. and Gerace, L. (1992b): Nuclear protein import is inhibited by an antibody to a luminal epitope of a nuclear pore complex glycoprotein. *J.Cell Biol.*, 116:15-30.
62. Greber, U.F. and Gerace, L. (1995a): Depletion of calcium from the lumen of endoplasmic reticulum reversibly inhibits passive diffusion and signal-mediated transport into the nucleus. *J.Cell Biol.*, 128:5-14.

-
63. Gulbis, J.M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. (1996): Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell*, 87:297-306.
 64. Gusse, M., Ghysdael, J., Evan, G., Soussi, T., and Mechali, M. (1989): Translocation of a store of maternal cytoplasmic c-myc protein into nuclei during early development. *Mol.Cell Biol.*, 9:5395-5403.
 65. Hait, W.N., Gesmonde, J.F., and Lazo, J.S. Effect of anti-calmodulin drugs on the growth and sensitivity of C6 rat glioma cells to bleomycin. *Anticancer Res 1994.Sep.-Oct.*, 14:1711-1721.
 66. Hanover, J.A. (1992): The nuclear pore: at the crossroads. *FASEB J.*, 6:2288-2295.
 67. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75:805-816.
 68. Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell, C.L., Swindell, E., and et, a. (1995): Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol.Biol.Cell*, 6:387-400.
 69. Henderson, B.R. and Percipalle, P. (1997): Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J.Mol.Biol.*, 274:693-707.
 70. Hernandez, C.A., Sala, F., and Adams, P.R. (1990): Subcellular calcium transients visualized by confocal microscopy in a voltage-clamped vertebrate neuron. *Science*, 247:858-862.
 71. Hidaka, H., Sasaki, Y., Tanaka, T., Endo, T., Ohno, S., Fujii, Y., and Nagata, T. (1981): N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 78:4354-4357.
 72. Hidaka, H. and Tanaka, T. (1983): Naphthalenesulfonamides as calmodulin antagonists. *Methods Enzymol.*, 102:185-194.
 73. Himpens, B., De-Smedt, H., and Casteels, R. (1993): Staurosporine induced Ca²⁺ increase in DDT1MF-2 smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.*, 264:C544-C551
 74. Howe, A., Aplin, A.E., Alahari, S.K., and Juliano, R.L. (1998): Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin.Cell Biol*, 10:220-231.
 75. Hunt, T. and Nasmyth, K. (1997): Cell multiplication [editorial]. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 9:765-767.
 76. Ikura, M., Barbato, G., Klee, C.B., and Bax, A. (1992): Solution structure of calmodulin and its complex with a myosin light chain kinase fragment. *Cell Calcium*, 13:391-400.
 77. Izaurralde, E., Kutay, U., von-Kobbe, C., Mattaj, I.W., and Gorlich, D. (1997): The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.*, 16:6535-6547.
 78. Jans, D.A. (1995): The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochem.J.*, 311:705-716.

79. Jaumot, M., Estanyol, J.M., Serratos, J., Agell, N., and Bachs, O. (1999): Activation of cdk4 and cdk2 during rat liver regeneration is associated with intranuclear rearrangements of cyclin-cdk complexes. *Hepatology*, 29:385-395.
80. Kaelin-WG, J., Pallas, D.C., DeCaprio, J.A., Kaye, F.J., and Livingston, D.M. (1991): Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell*, 64:521-532.
81. Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F., and Smith, A.E. (1984): Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature*, 311:33-38.
82. Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., and Smith, A.E. (1984): A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39:499-509.
83. Kambach, C. and Mattaj, I.W. (1992b): Intracellular distribution of the U1A protein depends on active transport and nuclear binding to U1 snRNA. *J Cell Biol.*, 118:11-21.
84. Kambach, C. and Mattaj, I.W. (1994a): Nuclear transport of the U2 snRNP-specific U2B" protein is mediated by both direct and indirect signalling mechanisms. *J Cell Sci.*, 107:1807-1816.
85. Kato, J.Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J., and Sherr, C.J. (1994): Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell*, 79:487-496.
86. Kaufmann, R., Weber, L., and Klein, C.E. (1990): [Integrins—new receptor molecules: their significance for the differentiation, regeneration and immune response of the skin]. *Hautarzt.*, 41:256-261.
87. Klotzbucher, A., Stewart, E., Harrison, D., and Hunt, T. (1996): The 'destruction box' of cyclin A allows B-type cyclins to be ubiquitinated, but not efficiently destroyed. *EMBO J.*, 15:3053-3064.
88. Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C.B., and Bax, A. (1995): Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat.Struct.Biol.*, 2:768-776.
89. Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., and Gorlich, D. (1997): Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor [see comments]. *Cell*, 90:1061-1071.
90. LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997): New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.*, 11:847-862.
91. Labbe, J.C., Martinez, A.M., Fesquet, D., Capony, J.P., Darbon, J.M., Derancourt, J., Devault, A., Morin, N., Cavadore, J.C., and Doree, M. (1994): p40MO15 associates with a p36 subunit and requires both nuclear translocation and Thr176 phosphorylation to generate cdk-activating kinase activity in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.*, 13:5155-5164.
92. Lanford, R.E. and Butel, J.S. (1984): Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell*, 37:801-813.
93. Lee, M.H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995): Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.*, 9:639-649.

94. Li, R., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., and Stillman, B. (1994): Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*, 371:534-537.
95. Lin, J., Reichner, C., Wu, X., and Levine, A.J. (1996): Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities. *Mol.Cell Biol.*, 16:1786-1793.
96. López-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O., and Russell, P. (1999): Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein [see comments]. *Nature*, 397:172-175.
97. López, G.A., Bachs, O., and Agell, N. (1995): Calmodulin is involved in the induction of DNA polymerases alpha and delta activities in normal rat kidney cells activated to proliferate. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 217:566-574.
98. López, G.A., Bosch, M., Bachs, O., and Agell, N. (1995): Addition of calmodulin antagonists to NRK cells during G1 inhibits proliferating cell nuclear antigen expression. *Cell Calcium*, 18:30-40.
99. López, G.A., Colomer, J., Pujol, M.J., Bachs, O., and Agell, N. (1992): Calmodulin regulates DNA polymerase alpha activity during proliferative activation of NRK cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 184:1517-1523.
100. Lorca, T., Cruzalegui, F.H., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Mery, J., Means, A., and Doree, M. (1993): Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs [see comments]. *Nature*, 366:270-273.
101. Luo, Y., Hurwitz, J., and Massague, J. (1995): Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature*, 375:159-161.
102. Mahony, D., Parry, D.A., and Lees, E. (1998): Active cdk6 complexes are predominantly nuclear and represent only a minority of the cdk6 in T cells. *Oncogene*, 16:603-611.
103. Maridor, G., Gallant, P., Golsteyn, R., and Nigg, E.A. (1993): Nuclear localization of vertebrate cyclin A correlates with its ability to form complexes with cdk catalytic subunits. *J.Cell Sci.*, 106:535-544.
104. Martelli, A.M., Gilmour, R.S., Bertagnolo, V., Neri, L.M., Manzoli, L., and Cocco, L. (1992): Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature*, 358:242-245.
105. Matsushime, H., Ewen, M.E., Strom, D.K., Kato, J.Y., Hanks, S.K., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1992): Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK- J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell*, 71:323-334.
106. Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., and Kato, J.Y. (1994): D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol.Cell Biol.*, 14:2066-2076.
107. McPhalen, C.A., Strynadka, N.C., and James, M.N. (1991): Calcium-binding sites in proteins: a structural perspective. *Adv.Protein Chem*, 42:77-144.
108. Melchior, F., Guan, T., Yokoyama, N., Nishimoto, T., and Gerace, L. (1995): GTP hydrolysis by Ran occurs at the nuclear pore complex in an early step of protein import. *J.Cell Biol.*, 131:571-581.

208 Referències

109. Michael, W.M., Siomi, H., Choi, M., Pinol, R.S., Nakielny, S., Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1995): Signal sequences that target nuclear import and nuclear export of pre-mRNA-binding proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 60:663-668.
110. Michaud, N. and Goldfarb, D.S. (1991): Multiple pathways in nuclear transport: the import of U2 snRNP occurs by a novel kinetic pathway. *J Cell Biol.*, 112:215-223.
111. Michaud, N. and Goldfarb, D.S. (1993): Most nuclear proteins are imported by a single pathway. *Exp. Cell Res.*, 208:128-136.
112. Minami, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Yahara, I. (1993): The calmodulin-binding domain of the mouse 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.*, 268:9604-9610.
113. Monaghan, P. (1991): Recent advances in electron immunocytochemistry. *Tumour. Biol.*, 12:249-253.
114. Moncrief, N.D., Kretsinger, R.H., and Goodman, M. (1990): Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *J. Mol. Evol.*, 30:522-562.
115. Moore, M.S. and Blobel, G. (1992): The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell*, 69:939-950.
116. Moore, P.B. and Dedman, J.R. (1984): Calmodulin, a calmodulin acceptor protein, and calcimedins: unique antibody localizations in hamster sperm. *J. Cell Biochem.*, 25:99-107.
117. Nakayama, S., Moncrief, N.D., and Kretsinger, R.H. (1992): Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. II. Domains of several subfamilies have diverse evolutionary histories. *J. Mol. Evol.*, 34:416-448.
118. Nakielny, S. and Dreyfuss, G. (1996): The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals. *J. Cell Biol.*, 134:1365-1373.
119. Nakielny, S. and Dreyfuss, G. (1997): Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9:420-429.
120. Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L.I., and Rosbash, M. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export.
121. Newmeyer, D.D., Lucocq, J.M., Burglin, T.R., and De-Robertis, E.M. (1986): Assembly in vitro of nuclei active in nuclear protein transport: ATP is required for nucleoplasmin accumulation. *EMBO J.*, 5:501-510.
122. Nigg, E.A. (1997): Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*, 386:779-787.
123. Niggli, V., Penniston, J.T., and Carafoli, E. (1979): Purification of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J Biol. Chem.*, 254:9955-9958.
124. Nojima, H. (1987): Molecular evolution of the calmodulin gene. *FEBS Lett.*, 217:187-190.
125. Nojima, H. and Sokabe, H. (1987): Structure of a gene for rat calmodulin. *J. Mol. Biol.*, 193:439-445.
126. Nojima, H. and Sokabe, H. (1989): Structural organization of calmodulin genes in the rat genome. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 255:223-232.

127. O'Farrell, P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol.Chem.*, 250:4007-4021.
128. O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., and O'Farrell, P.H. (1977): High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12:1133-1141.
129. Oberleithner, H., Brinckmann, E., Schwab, A., and Krohne, G. (1994): Imaging nuclear pores of aldosterone-sensitive kidney cells by atomic force microscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.*, 91:9784-9788.
130. Okuno, Y., Imamoto, N., and Yoneda, Y. (1993): 70-kDa heat-shock cognate protein colocalizes with karyophilic proteins into the nucleus during their transport in vitro. *Exp.Cell Res.*, 206:134-142.
131. Orosz, F., Telegdi, M., Liliom, K., Solti, M., Korbonits, D., and Ovadi, J. Dissimilar mechanisms of action of anticalmodulin drugs: quantitative analysis. *Mol Pharmacol.1990.Dec.*, 38:910-916.
132. Osawa, M., Swindells, M.B., Tanikawa, J., Tanaka, T., Mase, T., Furuya, T., and Ikura, M. (1998): Solution structure of calmodulin-W-7 complex: the basis of diversity in molecular recognition. *J.Mol.Biol.*, 276:165-176.
133. Pante, N. and Aebi, U. (1994): Toward the molecular details of the nuclear pore complex. *J.Struct.Biol.*, 113:179-189.
134. Pante, N. and Aebi, U. (1995): Exploring nuclear pore complex structure and function in molecular detail. *J.Cell Sci.Suppl.*, 19:1-11.
135. Pante, N. and Aebi, U. (1996): Toward the molecular dissection of protein import into nuclei. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 8:397-406.
136. Pardee, A.B. (1989): G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, 246:603-608.
137. Payne, M.E., Fong, Y.L., Ono, T., Colbran, R.J., Kemp, B.E., Soderling, T.R., and Means, A.R. (1988): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Characterization of distinct calmodulin binding and inhibitory domains. *J Biol.Chem.*, 263:7190-7195.
138. Persechini, A., Blumenthal, D.K., Jarrett, H.W., Klee, C.B., Hardy, D.O., and Kretsinger, R.H. (1989): The effects of deletions in the central helix of calmodulin on enzyme activation and peptide binding. 8052-8058.
139. Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S., and Yamamoto, K.R. (1990): Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature*, 348:166-168.
140. Picard, D. and Yamamoto, K.R. (1987): Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, 6:3333-3340.
141. Pines, J. and Hunter, T. (1994): The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J.*, 13:3772-3781.
142. Pinol, R.S. and Dreyfuss, G. (1991): Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins. *Science*, 253:312-314.
143. Pollard, V.W., Michael, W.M., Nakielnny, S., Siomi, M.C., Wang, F., and Dreyfuss, G. (1996): A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell*, 86:985-994.

210 Referències

144. Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., and Koff, A. (1994): p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.*, 8:9-22.
145. Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument, B.H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., and Massague, J. (1994): Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78:59-66.
146. Poon, R.Y. and Hunter, T. (1995): Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science*, 270:90-93.
147. Portoles, M., Faura, M., Renau-Piqueras, J., Iborra, F.J., Saez, R., Guerri, C., Serratosa, J., Rius, E., and Bachs, O. (1994): Nuclear calmodulin/62 kDa calmodulin-binding protein complexes in interphasic and mitotic cells. *J.Cell Sci.*, 107:3601-3614.
148. Pratt, W.B. (1993): The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol.Chem.*, 268:21455-21458.
149. Quelle, D.E., Ashmun, R.A., Hannon, G.J., Rehberger, P.A., Trono, D., Richter, K.H., Walker, C., Beach, D., Sherr, C.J., and Serrano, M. (1995): Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. *Oncogene*, 11:635-645.
150. Rafii, S., Mohle, R., Shapiro, F., Frey, B.M., and Moore, M.A. (1997): Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. *Leuk.Lymphoma.*, 27:375-386.
151. Rakowska, A., Danker, T., Schneider, S.W., and Oberleithner, H. (1998): ATP-induced shape change of nuclear pores visualized with the atomic force microscope. *JOURNAL.OF.MEMBRANE.BIOLOGY.*, 163:129-136.
152. Rasmussen, C.D. and Means, A.R. (1989): Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. *EMBO J.*, 8:73-82.
153. Reddy, G.P., Reed, W.C., Deacon, D.H., and Quesenberry, P.J. (1992): Growth factor-dependent proliferative stimulation of hematopoietic cells is associated with the modulation of cytoplasmic and nuclear 68- Kd calmodulin-binding protein. *Blood*, 79:1946-1955.
154. Resnitzky, D. (1997): Ectopic expression of cyclin D1 but not cyclin E induces anchorage-independent cell cycle progression. *Mol.Cell Biol.*, 17:5640-5647.
155. Rexach, M. and Blobel, G. (1995): Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, 83:683-692.
156. Richardson, W.D., Mills, A.D., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., and Dingwall, C. (1988): Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores. *Cell*, 52:655-664.
157. Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., and Dingwall, C. (1991): Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, 64:615-623.

-
158. Roth, S., Stein, D., and Nusslein, V.C. (1989): A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 59:1189-1202.
 159. Roux, P., Blanchard, J.M., Fernandez, A., Lamb, N., Jeanteur, P., and Piechaczyk, M. (1990): Nuclear localization of c-Fos, but not v-Fos proteins, is controlled by extracellular signals. *Cell*, 63:341-351.
 160. Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1996): Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat.Struct.Biol.*, 3:696-700.
 161. Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka, W.H., and Elledge, S.J. (1997): Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25 [see comments]. *Science*, 277:1497-1501.
 162. Santella, L. and Carafoli, E. (1997): Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB J*, 11:1091-1109.
 163. Schlenstedt, G. (1996): Protein import into the nucleus. *FEBS Lett.*, 389:75-79.
 164. Schmalz, D., Kalkbrenner, F., Hucho, F., and Buchner, K. (1996): Transport of protein kinase C alpha into the nucleus requires intact cytoskeleton while the transport of a protein containing a canonical nuclear localization signal does not. *J.Cell Sci.*, 109:2401-2406.
 165. SenGupta, B., Friedberg, F., and Detera-Wadleigh, S.D. (1987): Molecular analysis of human and rat calmodulin complementary DNA clones. Evidence for additional active genes in these species. *J.Biol.Chem.*, 262:16663-16670.
 166. Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 [see comments]. *Nature*, 366:704-707.
 167. Sherr, C.J. (1994): Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem.Cells (Dayt.)*, 12 Suppl 1:47-55; discussion 55-7:47-55.
 168. Shibasaki, F., Kondo, E., Akagi, T., and McKeon, F. (1997): Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature*, 386:728-731.
 169. Shirakawa, F. and Mizel, S.B. (1989): In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol.Cell Biol.*, 9:2424-2430.
 170. Simos, G. and Hurt, E.C. (1995): Nucleocytoplasmic transport: factors and mechanisms. *FEBS Lett.*, 369:107-112.
 171. Siomi, H. and Dreyfuss, G. (1995): A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol.*, 129:551-560.
 172. Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988): Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67:31-40.
 173. Solomon, M.J., Harper, J.W., and Shuttleworth, J. (1993): CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *EMBO J*, 12:3133-3142.

212 Referències

174. Solomon, M.J., Lee, T., and Kirschner, M.W. (1992): Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol.Biol.Cell*, 3:13-27.
175. Stein, G.S. and Borun, T.W. (1972): The synthesis of acidic chromosomal proteins during the cell cycle of HeLa S-3 cells. I. The accelerated accumulation of acidic residual nuclear protein before the initiation of DNA replication. *J.Cell Biol.*, 52:292-307.
176. Stepanova, L., Leng, X., Parker, S.B., and Harper, J.W. (1996): Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev.*, 10:1491-1502.
177. Steward, R. (1989): Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell*, 59:1179-1188.
178. Stochaj, U., Bossie, M.A., van Zee, K., Whalen, A.M., and Silver, P.A. (1993): Analysis of conserved binding proteins for nuclear localization sequences. *J.Cell Sci.*, 104 (Pt 1):89-95.
179. Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M. (1999): A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.*, 18:1660-1672.
180. Sweitzer, T.D. and Hanover, J.A. (1996): Calmodulin activates nuclear protein import: a link between signal transduction and nuclear transport. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93:14574-14579.
181. Takuwa, N., Zhou, W., Kumada, M., and Takuwa, Y. (1993): Ca(2+)-dependent stimulation of retinoblastoma gene product phosphorylation and p34cdc2 kinase activation in serum-stimulated human fibroblasts. *J.Biol.Chem.*, 268:138-145.
182. Tassan, J.P., Schultz, S.J., Bartek, J., and Nigg, E.A. (1994): Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J.Cell Biol.*, 127:467-478.
183. Taulés, M., Rius, E., Talaya, D., López-Girona, A., Bachs, O., and Agell, N. (1998): Calmodulin is essential for cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) activity and nuclear accumulation of cyclin D1-cdk4 during G1 [In Process Citation]. *J.Biol.Chem.*, 273:33279-33286.
184. Taylor, D.A., Sack, J.S., Maune, J.F., Beckingham, K., and Quioco, F.A. (1991): Structure of a recombinant calmodulin from *Drosophila melanogaster* refined at 2.2-Å resolution. *J.Biol.Chem.*, 266:21375-21380.
185. Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M., and Nishida, E. (1998): Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J.*, 17:2728-2735.
186. Trachtenberg, S. (1998): A fast-freezing device with a retractable environmental chamber, suitable for kinetic cryo-electron microscopy studies. *J Struct.Biol.*, 123:45-55.
187. Vorherr, T., Knopfel, L., Hofmann, F., Mollner, S., Pfeuffer, T., and Carafoli, E. (1993): The calmodulin binding domain of nitric oxide synthase and adenylyl cyclase. 32:6081-6088.
188. Waga, S., Li, R., and Stillman, B. (1997): p53-induced p21 controls DNA replication. *Leukemia*, 11 Suppl 3:321-323.

189. Waga, S. and Stillman, B. (1998): Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 modulates the DNA primer-template recognition complex. *Mol.Cell Biol.*, 18:4177-4187.
190. Weighardt, F., Biamonti, G., and Riva, S. (1995): Nucleo-cytoplasmic distribution of human hnRNP proteins: a search for the targeting domains in hnRNP A1. *J Cell Sci.*, 108:545-555.
191. Weis, K., Ryder, U., and Lamond, A.I. (1996): The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *EMBO J.*, 15:1818-1825.
192. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993): p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases [see comments]. *Nature*, 366:701-704.
193. Yahara, I., Minami, Y., and Miyata, Y. (1998): The 90-kDa stress protein, Hsp90, is a novel molecular chaperone. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 851:54-60.
194. Yamaguchi, M. (1998): Role of calcium-binding protein regucalcin in regenerating rat liver. *J Gastroenterol.Hepatol.*, 13 Suppl:S106-12:S106-S112
195. Yamano, H., Tsurumi, C., Gannon, J., and Hunt, T. (1998): The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor. *EMBO J.*, 17:5670-5678.
196. Yang, J., Bardes, E.S., Moore, J.D., Brennan, J., Powers, M.A., and Kornbluth, S. (1998): Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev.*, 12:2131-2143.
197. Yoneda, Y., Semba, T., Kaneda, Y., Noble, R.L., Matsuoka, Y., Kurihara, T., Okada, Y., and Imamoto, N. (1992): A long synthetic peptide containing a nuclear localization signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of IgM into the nucleus efficiently. *Exp.Cell Res.*, 201:313-320.
198. Yu, H., King, R.W., Peters, J.M., and Kirschner, M.W. (1996): Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. *Curr.Biol.*, 6:455-466.
199. Zeng, Y.X. and el-Deiry, W.S. (1996): Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene*, 12:1557-1564.
200. Zetterberg, A., Larsson, O., and Wiman, K.G. (1995): What is the restriction point? *Curr.Opin.Cell Biol.*, 7:835-842.
201. Zhu, X., Ohtsubo, M., Bohmer, R.M., Roberts, J.M., and Assoian, R.K. (1996): Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol.*, 133:391-403.



(043) 99
TAU