

Integrines al fetge de rata: caracterització, producció d'anticossos i immunolocalització.

C. Pujades, S. Johansson* i C. Enrich.

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.

*Department of Medical and Physiological Chemistry. University of Uppsala, Sweden.

Abstract

A cell-surface fibronectin receptor and a cell-surface laminin receptor have been isolated from rat liver by affinity chromatography on Sepharose conjugated with the cell-binding domain of fibronectin (105 kd), and with laminin respectively. The eluted material migrated under non-reducing conditions in SDS-PAGE as two bands in both cases. In the first one, the α - and β -components had apparent mol.wt. of 155 and 115 kd respectively. After reduction the 155 kd component gave rise to two peptides of 145 kd and 20 kd, while the 115 kd shifted migration to a mol.wt. of 130 kd. In the second one, the α - and β -components show a doublet of 175-185 kd while the 115 kd shifted migration to 130 kd mol. wt. too. The results suggest that fibronectin and laminin receptors have the same β -component but differ in the α -component. In the fibronectin receptor that one would be the α_3 subunit and the laminin receptor would be the α_1 subunit.

Introducció.

Les integrines són receptors de proteïnes de la matriu extracel·lular tal com la fibronectina, laminina, col·làgena i vitronectina entre altres. Les característiques d'aquests receptors és que són heterodímers formats per dues proteïnes transmembrana unides no covalentment que presenten un domini extracel·lular gran pel que s'unirien a les proteïnes de la matriu extracel·lular i un domini intracel·lular curt per on estarien en contacte amb les proteïnes del citoesquelet (Burrige et al, 1987). Aquestes dues glicoproteïnes presenten uns pesos moleculars de 95-130 kd en el cas de la subunitat curta, i un pes molecular de 130-210 kd en el cas de la subunitat llarga, diferint segons el tipus cel·lular i el receptor del que es tracti. La subunitat més petita té una mobilitat electroforètica més gran sota condicions no reductores, el que suggereix la presència d'una gran quantitat de ponts disulfur intracatenaris degut a residus cisteïna. En molts casos, però no en tots, la subunitat

més gran presenta un comportament contrari migrant més ràpid en condicions reductores. Això és degut a que consten d'una cadena pesada i d'una lleugera unides per un pont disulfur (Hynes, 1987; Ruoslhati i Pierschbacher, 1987).

Adoptant la nomenclatura utilitzada pels antigens descrits en cèl.lules limfoides i mieloides, ens referirem com a subunitat β a la més curta rica en ponts disulfur, i com subunitat α a la més llarga.

S'han descrit canvis d'aquests receptors en cèl.lules transformades (Plantefaber i Hynes, 1989; Hynes, 1981), en processos de migració cel.lular i durant el desenvolupament embrionari (Broner i Fraser, 1985). Això ens ha portat a pensar en l'existència de canvis en aquests receptors durant processos de proliferació cel.lular tal com és la regeneració hepàtica.

Es per això que en aquest treball es descriu l'aïllament i la parcial caracterització de dos d'aquests receptors, a fi de que propers estudis ens permetin conèixer el comportament d'aquestes integrines tant a partir de la seva expressió i localització, com de modificacions estructurals que puguin tenir durant la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial.

Material i mètodes.

Mascles Sprague-Dawley de 200 gr de pes, sotmesos a intervals de claror-fosc de 12 h, alimentats amb dieta estandard varen ésser utilitzats en tots els experiments.

L'aïllament de membranes plasmàtiques de cèl.lules hepàtiques es va fer segons el mètode de Bachmann et al, 1977. Les electroforeri es van realitzar en gels d'acrilamida del 7% i 8% en presència de SDS segons el mètode de Blobel i

Dobberstein, 1975. Els immunoblots es van fer a partir de gels de SDS-PAGE transferits a paper de nitrocel.lulosa segons Burnette, 1981. El paper de nitrocel.lulosa es va incubar amb IgG 0.2 mg/ml i els anticossos unit es van fer reaccionar amb ^{125}I -proteïna A (LKB-Pharmacia). Els antigens reconeguts es varen visualitzar per autoradiografia.

Anticossos: l'antiserum contra la subunitat β de les integrines d'hepatòcit de rata es va obtenir segons Woods et al (comunicació personal). La fracció IgG del sèrum es va aïllar per cromatografia d'afinitat amb proteïna A- Sepharosa.

L'antisèrum contra la subunitat α del receptor de la fibronectina (α_5) d'hepatòcit de rata es va obtenir injectant la subunitat α_5 a conills i la fracció IgG del sèrum es va aïllar utilitzant el mateix mètode que en el cas anterior.

L'antisèrum contra la subunitat α del receptor de la laminina (α_1) d'hepatòcit de rata es va obtenir injectant la subunitat α_1 a conills i la fracció IgG del sèrum es va obtenir igual que abans.

El receptor de la fibronectina es va aïllar a partir de fetge de rata solubilitzat amb 10 mM Tris/HCl pH 7.5 que contenia 2% TX-100 (w/v) 2mM MgCl_2 , 2mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina A i homogenitzat en un Potter. Després de centrifugar 30 min. a 25.000g el sobrenadant es va passar per una columna de WGA-Sepharosa. Aquesta es va rentar amb 0.2% TX-100, 2mM MnCl_2/TBS pH 7.5 i es va eluir amb el mateix tampó més 0.3 M N-acetilglucosamina. Les proteïnes eluides es van aplicar directament a una columna de 105 kd (fracció de la fibronectina que conté el domini d'unió cel.lular) i la columna s'elueix amb 0.2% TX-100, 10 mM EDTA/TBS pH 7.5 després de rentar amb tampó d'equilibri. En tots els tampons es van posar inhibidors de proteases.

El receptor de la laminina es va aïllar utilitzant la fracció de mostra que no s'havia enganxat a la columna de 105 kd-Sepharosa. Aquesta mostra es va passar per una columna de laminina-Sepharosa, i després de rentar amb 0.2% TX-100, 10 mM EDTA/TBS pH 7.5.

El fragment de la fibronectina que presenta el domini d'unió a la cèl.lula (105 kd) es va obtenir segon Johansson, 1985.

Resultats.

1. Aïllament del receptor de la fibronectina a partir de fetge de rata.

Per aquest es va utilitzar un procediment anàleg a l'utilitzat en l'aïllament d'integrines en altres tipus cel.lulars. Aquest inclou la solubilització del teixit hepàtic previament homogenitzat amb TX-100 i una cromatografia de les WGA-binding proteïns en una columna de 105 kd-Sepharosa en presència de 2mM $MnCl_2$ en condicions fisiològiques de força iònica i pH, i l'elució de la columna amb 10 mM EDTA. L'eluit de la columna amb EDTA presenta dos components majoritaris que es poden visualitzar amb Coomassie Blue. Aquestes proteïnes d'un pes molecular de 165 i 115 kd en condicions no reductores i de 145 i 130 kd en condicions reductores en gels de SDS-PAGE (Fig. 1).

En assajos de Western-blot la bande de 115-130 kd, però no la band de 165-145 kd reacciona amb anticossos específics per la subunitat β_1 del receptor de la fibronectina (Fig. 2). En canvi quan s'utilitzen anticossos contra la subunitat α del receptor, tant la banda de 115-130 kd com la de 165-130 kd reaccionen (Fig.3). Malgrat tot, si aquests anticossos s'adsorbeixen en una columna de β_1 -Sepharosa, el marcatge en la banda de 115-130 kd s'elimina (resultats no presentats), el que ens corrobora que es tracta de la subunitat α_5 del receptor.

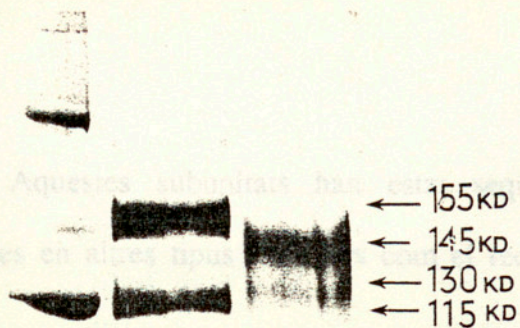


Fig. 1.- 7% SDS-PAGE i posterior tinció amb plata del receptor de la fibronectina en condicions no reductores (carril 1) i reductores (carril 2)

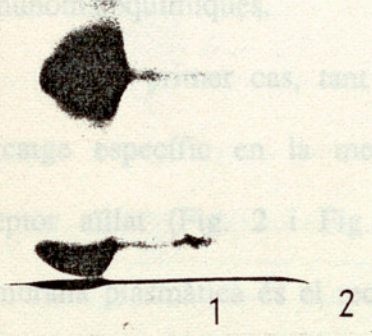


Fig. 2.- Immunoblot amb l'anticòs anti- β_1 . Les mostres analitzades han estat: receptor de la laminina (carril 1) membrana plasmàtica (carril 2) i receptor de la fibronectina (carril 3).

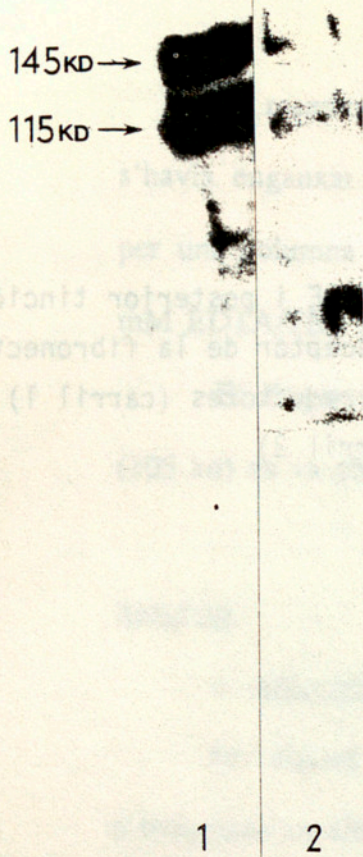


Fig. 3.- Immunoblot amb l'anticòs anti- α_5 . Les mostres analitzades han estat: receptor de la fibronectina (carril 1), membrana plasmàtica (carril 2).

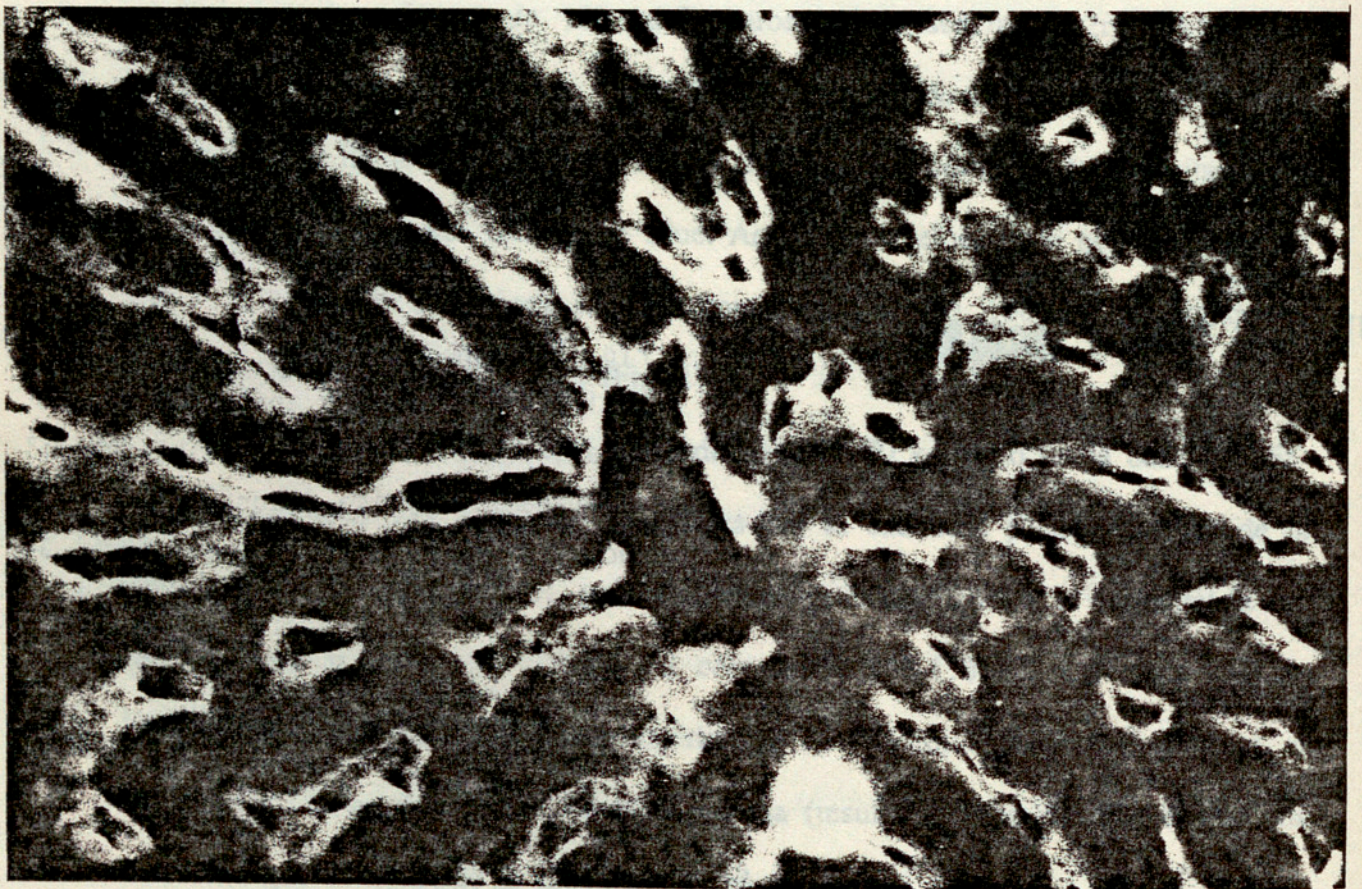


Fig. 4.- Immunohistoquímica a partir de talls de fetge amb anticòs anti- β_1 .

Aquestes subunitats han estat seqüenciades i corresponen a la α_5 i β_1 descrites en altres tipus cel·lulars com el receptor de la fibronectina.

2. Localització del receptor de la fibronectina.

Aquest receptor com totes les altres integrines es troba a la superfície cel·lular. Per a demostrar la presència d'aquestes proteïnes en la membrana plasmàtica de les cèl·lules hepàtiques, s'han fet assatjos d'immunoblot i tincions immunohistoquímiques.

En el primer cas, tant els immunoblots amb β_1 com amb α_5 ens donen un marcatge específic en la membrana plasmàtica, igual a l'obtingut en el cas del receptor aïllat (Fig. 2 i Fig. 3). Això ens indica que el receptor present en la membrana plasmàtica és el receptor previament aïllat a partir de fetge total.

Quan fem les tincions immunohistoquímiques amb anticossos anti- β_1 , s'obté un clar patró de marcatge en la membrana plasmàtica de la regió sinusoidal dels hepatòcits (Fig.4) el que demostra clarament que aquest receptor es localitza només a la superfície cel·lular.

3. Aïllament del receptor de la laminina.

Per aïllar aquesta integrina es va utilitzar un procediment molt semblant al de l'aïllament del receptor de la fibronectina. Es va solubilitzar el teixit hepàtic previament homogenitzat amb TX-100 i les WGA-binding proteïnes es van cromatografiar en una columna de laminina-Sepharosa en presència de 2 mM $MnCl_2$ en condicions de força iònica i pH, eluint-se amb 10 mM EDTA.

Es va fer una electroforesi d'aquest eluit i es va veure l'existència de dos components que sota condicions no reductores presenten uns pesos moleculars de

180 i 115 i en condicions reductores els pesos moleculars són de 175-185 i 130 kd respectivament en SDS-PAGE. Malgrat no està clar la causa de la seva heterogeneïtat, el doblet de 175-185 kd obtingut en condicions reductores es presenta en la majoria de preparacions (Fig. 5).

En els immunoblots només la banda de 115 kd reacciona amb els anticossos específics per a la subunitat β_1 del receptor de la fibronectina (Fig.2), el que ens indica que els dos receptors tenen una subunitat β_1 . El més segur és que la proteïna de 180 kd representi la subunitat α de la família de les integrines que junt amb la subunitat β_1 constitueixen el receptor de la laminina. Es sap que aquest receptor no s'uneix al fragment de 105 kd de la fibronectina, doncs per cromatografia d'afinitat s'ha vist que cada receptor s'uneix només a la columna que conté el seu lligam.

En el cas dels immunoblots amb anticossos obtinguts contra la subunitat α es presenta el mateix problema que amb el receptor de la fibronectina. Aquests reaccionen contra les dues subunitats però una vegada adsorbits la reacció contra la subunitat α desapareix.

En aquest cas encara no s'ha seqüenciat la subunitat α del receptor de la laminina, però hi ha fortes evidències de que es tracta de la subunitat α_1 ja que no és RGD dependent i com s'ha esmentat abans el receptor de la laminina no s'uneix a la fibronectina.

Discussió.

En aquest estudi s'ha aïllat i identificat dos membres de la família de les integrines (receptors d'adhesió cel.lular) que s'expressen en cèl.lules hepàtiques. Aquests són el receptor de la fibronectina i de la laminina.

L'aïllament s'ha fet a partir de tècniques convencionals per a la purificació d'integrines, utilitzant una columna de WGA-Sepharosa que lliga les subunitats β i la posterior cromatografia de l'eluit en columnes d'afinitat del lligam específic (105 kd, laminina). Ambdós casos les columnes han unit eficientment dues proteïnes, que s'han mantingut unides després de rentats amb alta força iònica.

El receptor de la fibronectina en fetge dóna dues bandes en condicions no reductores en SDS-PAGE, com s'havia descrit en el cas dels fibroblastes (Pytela et al, 1985), cèl.lules d'osteosarcoma (Pytela et al, 1986) i hepatòcits aïllats (Johansson, 1987), amb un pes molecular de 165 (subunitat α) i de 115 kd (subunitat β) aproximadament. En condicions reductores la banda de 165 ens dóna dos pèptids de 145 i 20 kd (aquest últim només visible amb un marcatge radiactiu), mentres que la banda 115 kd migra cap a 130 kd. Aixó ens indica que el receptor de la fibronectina està format per dues subunitats, una de 165 kd formada per dos polipèptids units per un pont disulfur (145 + 20 kd) i una de 115 kd enriquida en residus de cisteïna el que fa que en condicions reductores migri més lentament.

L'anàlisi del receptor de la laminina mostra la presència de dues bandes en condicions no reductores SDS-PAGE de 180 kd (subunitat α) i de 115 kd (subunitat β) que en condicions reductores migrarien a 175-185 kd i 130 kd respectivament. Segons dades descrites anteriorment per aquest receptor es podrien trobar dos grups de receptors de la laminina segons el pes molecular de les seves subunitats en SDS-PAGE. Un grup seria el de les subunitats α descrites en plaquetes humanes (Sonnenberg et al, 1988) i cèl.lules PC 12 de rata (Tomaselli et al, 1988) que presenten un pes molecular de 140-150 kd en condicions no reductores, mentres que en condicions reductores aquests polipèptids migren més ràpid degut a la dissociació d'una cadena lleugera de 30 kd. L'altre grup seria al que presenta la subunitat α de

180-210 kd en condicions no reductores i que en condicions reductores no migra més ràpid, ja que es tracta d'una sola cadena. En aquest grup es trobaria el receptor de la laminina d'hepatòcits de rata i el de les cèl.lules B 50 Ignatius i Reichardt, 1988).

S'han obtingut anticossos contra la subunitat β de 115 kd que reaccionen tant amb el receptor de la fibronectina com amb el de la laminina. Això ens indica que els dos receptors presenten una subunitat β comú, que ha estat seqüenciada i s'ha vist que es tracta de la subunitat β_1 tal com s'esperava. Així mateix, s'ha localitzat aquest receptor en membranes plasmàtiques de cèl.lules hepàtiques a partir d'immunoblots, i concretament en la regió sinusoidal per immunohistoquímica.

Els anticossos obtinguts contra les subunitats α reaccionen també contra les subunitats β . No està clar si aquestes proteïnes presenten epitops comuns o si bé la doble reacció és deguda a la presència de la proteïna de 115 kd en l'immunogen. En qualsevol cas, el receptor funcional està compost probablement per dues subunitats diferents, com tots els receptors de la fibronectina descrits en plaquetes i fibroblastes (Gardener i Hynes, 1985; Carrel et al, 1985; Akiyama et al, 1986) i els receptors de la laminina descrits en els models cel.lulars anomenats abans. La subunitat α del receptor de la fibronectina s'ha seqüenciat i correspon a la subunitat α_5 . No així la del receptor de la laminina, malgrat que creiem que es tracta de la subunitat α_1 .

Bibliografia.

BURRIDGE, K., MOLONY, L. and KELLY, T. (1987) J. Cell Biol. Suppl. 8

211-229.

HYNES, R.O. (1987) Cell 48, 549-554.

- RUOSLAHTI,E and PIERSCHBACHER,M.D. (1987) *Science* 238, 491-497.
- PLANTEFABER,L.C. and HYNES,R.O. (1989) *Cell* 56, 281-290.
- HYNES,R.O.(1981) *Cell Surface Rev.* 7, 97-139.
- BRONNER-FRASER,M (1985) *J.Cell Biol.* 101, 610-617.
- BACHMANN,G.M., HARMS,E., HASSELS,E., HENNINGER,H. and REUTTER,W (1977) *Biochem.J.* 166, 455-462.
- BLOBEL,G and DOBBERSTEIN,B. (1975) *J.Cell Biol.* 67, 835-851.
- BURNATTE,W.N. (1981) *Anal.Biochem.* 112, 195-203.
- WOODS,A., JOHANSSON,S. and HOOK,M. (submitted, 1989).
- JOHANSSON,S. (1985) *J.Biol.Chem.* 260, 1557-1561.
- PYTELA,R., PIERSCHBACHER,M.D. and RUOSLAHTI,E. (1985) *Cell* 40, 191-198.
- PYTELA,R., PIERSCHBACHER,M.D., GINSBURG,M.H., PLOW,E.F. and RUOSLAHTI,E. (1986) *Science* 231, 1559-1562.
- JOHANSSON,S., FORSBERG,E. and LUNDGREN,B. (1987) *J.Biol.Chem.* 262, 7819-7824.
- SONNENBERG,A., MODDERMAN,P.W. and HOGERVOST,E. (1988) *Nature* 336, 487-489 (1988).
- TOMASELLI,K.J., DAMSKY,C.H. and REICHARDT,L.F. (1988) *J.Cell Biol.* 107, 1241-1252.
- IGNATIUS,M.J. and REICHARDT,L.F. (1988) *Neuron.* 1, 713-725.
- GARDENER,J.M. and HYNES,R.O. (1985) *Cell* 42, 439-448.
- CARREL,N.A., FITZGERALD,L.A., STEINER,B. ETICKSON,H.P. and PHILLIPS,D.R. (1985) *J.Biol. Chem.* 260, 1743-1749.

AKIYAMA,S.K., YAMADA,S.S. and YAMADA,K.M. (1986) J.Cell Biol.

102, 442-448.

A. Giménez, J. Rodés, R. Deulofeu, J. Caballeria i J. Rodés
Unitat d'Hepatologia, Hospital Clínic i Provincial, Barcelona

Abstract

The effect of Zn²⁺ on the acute liver damage caused by CCl₄ was assessed by histology as well as by measuring the specific activities of liver collagenase and prolyl-hydroxylase at 4 and 16 weeks of the treatment. The results suggest that the Zn²⁺ decrease the collagen levels by a diminution of prolyl-hydroxylase activity in the final stages of the cirrhotic induced process.

Introducció

La cirrosi hepàtica és el final del procés croni que presenten la majoria d'hepatopaties cròniques difuses. La presència de fibrosi i finalment de cirrosi determina que els malalts presentin una hipertensió portal i conseqüentment una hemorràgia digestiva per trencament de varicositat esofàgiques, àrties i cecofleques hepàtica, que són els processos evolutius finals dels pacients hepatopates (Roikind i Dun, 1979 ; Rodés i Caballeria, 1986).

En el desenvolupament de la fibrosi hepàtica intervenen múltiples mecanismes, la majoria dels quals encara són desconeguts, però sembla ben demostrat que la fibrosi hepàtica, és a dir l'acumul de col·lagen en el fetge, és el resultat de dos processos contraposats, per un costat l'augment de la síntesi de col·lagen, és a dir la fibrogènesi (Diaz de León et al., 1979), i per l'altre la disminució de la degradació del col·lagen o col·lagenolisi (Pérez-Tamayo, 1978). Estudis experimentals en rates sotmeses a un procés d'inducció de cirrosi hepàtica, han demostrat que l'administració de suplemente de zinc a la dieta endarrerix l'aparició de cirrosi i els animals presenten uns nivells de col·lagen hepàtic inferior a les no suplementades (Anttinen et al., 1984). Per tot això es va realitzar el present treball per estudiar seqüencialment el procés de fibrosi hepàtica, concretament la fibrogènesi i la col·lagenolisi en la rata sotmesa a la inducció de