

IV-DISCUSSIÓ

La nucleoplasmina (NP) és una proteïna àcida que es troba en forma de pentàmer i té funció de xaperona molecular. La NP interacciona amb les histones i altres proteïnes bàsiques i participa en la remodelació de la cromatina durant la fecundació i l'embriogènesi primerenca a *Xenopus laevis* (Laskey et al., 1978).

La seqüència codificant per a la nucleoplasmina (Bürglin et al., 1987; Dingwall et al., 1987) ha permès l'obtenció de NP recombinant mitjançant la seva expressió en bacteris, així com la manipulació i obtenció de formes mutants de NP que han obert nous camins per a l'estudi estructural i funcional d'aquesta molècula.

1. Caracterització de nucleoplasmines recombinants

Durant el decurs d'aquest treball s'ha continuat portant a terme la caracterització de les diferents formes de nucleoplasmina recombinant: r-NP, r-NP142, r-NP121 i les diferents variants obtingudes a partir d'aquestes tres formes principals. Recordem que r-NP correspon a la forma de nucleoplasmina completa (expressada a partir del clon de Bürglin et al, 1987), amb els tres trams àcids A1, A2 i A3 i el senyal de localització nuclear (sln) (v. fig. I.10). D'altra banda, r-NP142 i r-NP121 representen dues formes amb delecions a partir de l'aminoàcid 143 i 122, respectivament (v. fig. I.10). Per tant, r-NP142 conserva els trams àcids A1 i A2 (aquest últim pràcticament a l'extrem C-terminal de la molècula) però ha perdut el tram A3 i l'sln, i r-NP121 conserva només el tram àcid A1, situat a la part amino terminal (nucli o *core*) de la molècula.

1.1 Estabilitat de les diferents formes de NP

La NP és una proteïna particularment estable, molt resistent tant a la desnaturalització química com a la tèrmica (Laskey et al., 1978). Es creu que aquesta elevada estabilitat és deguda a la presència d'un cinturó hidrofòbic en les regions de contacte entre monòmers del pentàmer de NP. Aquesta característica podria estar conservada en aquelles proteïnes que presenten homologia de seqüència amb la NP. La presència de ponts d'hidrogen també afavoriria l'estabilitat del pentàmer (Dutta, 2001; Dutta et al., 2001; Akey i Luger, 2003).

Malgrat això, es va veure en nombroses ocasions al llarg del present treball que la forma r-NP142 es mostrava menys estable. Això es tradueix en la presència de pentàmers poc estables comparats amb els de les formes r-NP i r-NP121. Aquest comportament es podria explicar pel fet que r-NP142 presenta un llarg tram àcid (l'A2) pràcticament al final de la molècula. La presència d'aquest llarg tram carregat podria implicar forces de repulsió electrostàtica que dificultessin la pentamerització. Aquests resultats concorden amb els obtinguts pel grup del Dr. Arturo Muga amb un mutant equivalent al r-NP142 però obtingut a partir del clon de Dingwall (Hiero, 2002; Hierro et al., 2002). Aquests autors observen, mitjançant calorimetria, que la

forma r-NP142 és la menys estable però que en augmentar la força iònica s'afavoreix l'estabilització de la proteïna. En el mateix treball es proposa un model en el qual la cua C-terminal bàsica de la NP seria flexible i contribuiria a la neutralització de la càrrega negativa de la regió de poliglutàmics (A2), cosa que afavoriria una major estabilitat de la molècula.

La tendència a la monomerització de r-NP142 es va observar en treballar amb la forma amb etiquetes d'histidines a l'extrem C-terminal. La utilització de cromatografia de quelació amb metalls i elució de la mostra amb imidazole provoca la monomerització de bona part de la proteïna. Aquesta tècnica, també denominada IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*), tot i ser d'ús molt estès per a la purificació de proteïnes recombinants, presenta alguns problemes a vegades poc coneguts (revisat a Gaber-Porekar i Menart, 2001). Així, s'han descrit casos d'oxidacions parcials de la molècula purificada (Ramage et al., 2002). D'altra banda, la presència d'etiquetes d'histidines pot provocar l'agregació de la proteïna (Saperas et al., 1999; Prieto et al., 2002; Ramage et al., 2002). El fet que només la forma r-NP142+His C-t (i no r-NP+His C-t ni r-NP121+His C-t) veïés afectada la pentamerització en purificar-la mitjançant IMAC en presència d'imidazole podria explicar-se per la major inestabilitat d'aquesta molècula. L'imidazole provocaria la desestabilització o desestructuració de la proteïna r-NP142+His C-t, fet que permetria la formació de ponts disofre inespecífics que en dificultarien la pentamerització i n'afavoririen la monomerització. Aquesta possibilitat pren força si es considera el fet que les incubacions amb DTT (20 mM) retornen la capacitat de pentamerització a la proteïna.

1.2 El paper de les cisteïnes en la pentamerització de la NP

Experiments de reducció (amb DTT) i alquilació (amb iodoacetamida) de r-NP142 semblaven indicar la possibilitat que hi hagués ponts disofre implicats en la pentamerització de la proteïna. La NP té tres Cys a la seva seqüència, concretament en les posicions 15, 35 i 45, totes elles dins de la part nucli (*core*) de la molècula. Per estudiar la possible presència de ponts disofre a la NP es va decidir utilitzar la tècnica de mutagènesi dirigida per substituir les cisteïnes per serines. La Ser és un aminoàcid molt similar a la Cys però amb un grup hidroxil (OH) en comptes del sulfhidril (SH). En una primera instància es van obtenir, doncs, tres mutants a partir de r-NP142: el mutant r-NP142 C15S, el C35S i el C45S. Es va observar que el mutant r-NP142 C45S perdia de forma pràcticament total la capacitat de pentamerització. Les mutacions de les altres dues cisteïnes, en canvi, no afectaven la pentamerització. D'aquests resultats es va deduir que no hi hauria cap pont disofre intramolecular en els monòmers (ja que en aquest cas s'hauria d'observar el mateix efecte en mutar una altra cisteïna), però que podrien haver-n'hi d'intermoleculars. En altres paraules, era possible que hi hagués ponts disofre entre alguns dels monòmers de la NP. Per confirmar aquests resultats, es van mutar a continuació les tres cisteïnes de les formes r-NP i r-NP121 per obtenir-ne també els mutants C15S, C35S i C45S. En aquest cas, cap de les mutacions afectava la pentamerització de la molècula.

En vista d'aquests resultats, cal dir que no hi ha cap pont disofre a la NP, ni dins de la molècula ni entre els monòmers. El fet que el mutant r-NP142 C45S presentés un comportament monomèric segurament és fruit, altre cop, de la inestabilitat de la forma r-NP142 (veure apartat anterior). De fet, l'estructura del pentàmer de la NP resolta per Dutta i col·laboradors (Dutta et al., 2001) mostra com la Cys 45 està situada en una regió de contacte entre monòmers i és possible que l'alteració d'aquest aminoàcid provoqui la desestructuració d'r-NP142, una molècula per si mateixa inestable.

De fet, la desestructuració de la forma r-NP142 C45S afecta també l'estructura secundària de la proteïna, tal i com demostren els espectres de dicroisme circular, on apareix plegada a l'atzar (*random coil*). L'augment de la força iònica, la presència de tampó Hepes i la presència de DTT afavoreixen lleugerament la reestructuració d'aquest mutant (v. apartat III-6.1.2). D'altra banda, els estudis de velocitat de sedimentació a la ultracentrifuga analítica van confirmar l'absència de pentàmers en solució en aquesta forma. Podria ser que aquesta mutació causés per si mateixa la desestructuració del monòmer, però també hi hauria la possibilitat que l'estructura del monòmer de la NP només fos estable dins del pentàmer. De fet, tots els estudis estructurals s'han dut a terme amb el pentàmer. No existeix fins avui cap estudi on s'hagi observat un monòmer aïllat de nucleoplasmina que presenti una forma estructurada.

És també molt important destacar que el mutant r-NP142 C45S es mostra molt menys actiu des del punt de vista funcional. Així, mentre que r-NP142 és capaç de descondensar ràpidament els nuclis espermàtics de *Dicentrarchus labrax* (compactats per protamina), el mutant r-NP142 C45S té poca activitat descondensadora fins i tot utilitzant temps d'incubació més llargs, la qual cosa evidencia la importància que l'estructura tridimensional de la molècula ha de tenir a l'hora d'exercir aquesta funció. En aquest sentit, factors com l'àcid poliglutàmic i altres polianions, tot i que també poden descondensar la cromatina espermàtica es mostren molt menys eficients que la NP en condicions fisiològiques (Stein et al., 1979).

D'altra banda, els assajos colorimètrics d'Ellman indiquen que el pentàmer de NP té aproximadament 5 cisteïnes lliures (una per monòmer), coincidint amb els resultats determinats per la NP de Dingwall (Hiero, 2002). Els resultats obtinguts amb els mutants C15S, C35S i C45S indiquen que la Cys en posició 35 seria la més exposada al medi mentre que les Cys 15 i 45 estarien situades a l'interior de la molècula (pentàmer) i per tant serien menys accessibles al reactiu DTNB. Aquest resultat estaria d'acord amb la localització de les Cys a l'estructura cristal·logràfica de Dutta et al. (2001) en la qual mostren que les Cys 15 i 45 es troben en posicions internes mentre que no poden localitzar la Cys 35, que és propera a la regió àcida A1, desordenada i presumiblement exposada al medi.

1.3 Conformació de la nucleoplasmina

Durant la realització del present treball es va publicar l'estructura cristal·logràfica del nucli (*core*) resistent a quimotripsina de la NP del clon de Dingwall

(aminoàcids 11-124) (v. fig. I.9) (Dutta et al., 2001). En aquesta estructura es mostra l'elevat component de làmina beta present en aquesta part de la molècula, resultats que coincideixen amb els obtinguts per diferents autors mitjançant estudis de dicroisme circular (Hierro et al., 2002; Prieto et al., 2002; el present treball). Referent a la NP complexada amb protamina, els resultats obtinguts en aquesta tesi semblen indicar un cert canvi en l'estructura secundària de la NP o de la protamina traduït en un increment aparent de la quantitat global d'hèlix alfa.

Quant a l'estructura terciària, s'han posat a punt les condicions per a la cristal·lització de la forma més petita de NP de què disposem, la r-NP121 expressada a partir del clon de Bürglin (Bürglin et al., 1987). Així s'han obtingut diversos cristalls de tipus romboïdal (v. apartat III-9) d'entre 50 i 80 µm de llargada. Aquests cristalls, però, són massa petits per determinar-ne el patró de difracció a partir de fonts convencionals de raigs X al sincrotró. S'està pendent en aquests moments de poder difractar aquests cristalls amb una font més potent.

D'altra banda, i pel que fa als estudis sobre l'estructura quaternària, a partir dels resultats obtinguts amb la ultracentrifuga analítica i els paràmetres conformationals s'ha pogut modelar la NP com un el·lipsoide oblat (veure fig. III.38). Les tres formes de NP (r-NP, r-NP142 i r-NP121) presentarien aproximadament la mateixa alçada (27 Å) i petites variacions en el diàmetre (108,4 Å la r-NP, 95 Å la r-NP142, i 83,6 Å la r-NP121). El fet que el diàmetre variï relativament poc entre les formes r-NP i r-NP121, tot i la diferència d'uns 80 aminoàcids que presenten, es deu presumiblement al fet que les parts C-terminals de cada monòmer estarien plegades sobre si mateixes (veure també Hierro et al. 2002) de manera que no suposarien un increment notable de diàmetre. El diàmetre obtingut en els models conformationals per r-NP121 és similar al mesurat a partir de les observacions per microscòpia electrònica realitzades tant en aquest treball amb la mateixa forma (70 Å) (v. apartat III-8) com en anteriors treballs en què s'utilitzava la NP nativa obtinguda de *X. laevis* (75 Å) (Earnshaw et al., 1980). En ambdós casos la NP s'observa com un disc amb una zona central electrodensa. El fet que les mesures obtingudes tant amb la forma r-NP121 com amb la r-NP sencera donin valors similars reforçaria la idea que la part C-terminal no estaria tan estructurada com la part nucli (*core*) de la molècula i resultaria, per tant, invisible per microscòpia electrònica. D'altra banda, segons les dades cristal·logràfiques, el pentàmer de la regió nucli (*core*) tindria un diàmetre mitjà de 60 Å i una alçada de 40 Å.

Una altra qüestió important respecte l'estructura quaternària de la NP és la possible associació de dos pentàmers per formar un decàmer de NP. Aquesta possibilitat s'ha descrit arran de l'estructura cristal·logràfica publicada per Dutta et al. (2001) que troben la presència d'un decàmer al cristall i proposen que un decàmer de NP podria unir-se a 5 octàmers d'histones. Els mateixos autors donen altres arguments experimentals per justificar el decàmer. Mitjançant experiments de filtració en gel, la NP s'elueix amb un pes molecular compatible amb el decàmer. Cal tenir en compte, però, que l'elució de proteïnes en aquest tipus de columna depèn del radi hidrodinàmic de la molècula. Així, la presència de determinats dominis flexibles podria incrementar el radi aparent i contribuir a una estimació errònia del pes molecular de la proteïna. Les proves fetes amb PAGE nativa van revelar que la major part de la proteïna es

trobava en forma pentamèrica. Els autors proposen un equilibri pentàmer/decàmer que estaria desplaçat cap a la forma pentamèrica en solució. L'entrecruament químic amb glutaraldeid tampoc mostra de manera clara la formació de decàmers. D'altra banda, ni aquests autors ni treballs realitzats en el nostre grup (Prieto et al., 2002; el present treball) han pogut constatar la presència d'un decàmer de NP en solució utilitzant les tècniques d'ultracentrifugació analítica. El que sí que és cert és que l'estequiometria observada per Prieto et al. (2002) en treballs realitzats amb NP i protamina de *D. labrax* (2,5 mols de protamina per mol de NP pentàmer) podrien ser compatibles amb un model en què 5 protamines s'unissin a un decàmer de NP. Sobre aquesta qüestió, estudis preliminars mitjançant ultracentrifuga analítica (no mostrats) en què s'analitzen barreges de NP més protamina, no mostren un canvi en el coeficient de sedimentació que indiqui la formació d'un decàmer de NP en presència de protamina.

2. Interacció de la NP amb les histones del nucli nucleosòmic

La NP és capaç de descondensar la cromatina espermàtica i reorganitzar-la en forma de nucleosomes perquè torni a adoptar la conformació somàtica activa en la transcripció. A *X. laevis* aquestes funcions serien exercides pels complexos formats per la NP unida a les histones H2A i H2B i la proteïna N1/N2 unida a les histones H3 i H4 (Dilworth et al., 1987). D'altra banda, en altres treballs s'ha determinat que la NP pot unir els quatre tipus d'histones del nucli del nucleosoma *in vitro* i reconstituir nucleosomes (Laskey et al., 1978; Earnshaw et al., 1980). Tradicionalment, i a causa de la gran proporció d'aminoàcids àcids de la molècula, s'assumia que la interacció establerta tant entre NP i histones com entre NP i proteïnes espermàtiques bàsiques era de naturalesa electrostàtica. Concretament, diversos autors havien proposat el tram acídic principal de la molècula (el tram poliglutàmic A2) com el principal candidat per a aquestes interaccions. Així, Dingwall et al. (1987) proposen que la NP formaria una mena d'urpa de cinc dits en la qual les regions poliacídiques de cada monòmer actuarien conjuntament per unir una o dues molècules d'histones.

Últimament, però, s'han publicat alguns treballs que qüestionarien la naturalesa electrostàtica de les interaccions NP-histones i NP-protamines. Concretament, Akey i col·laboradors (Dutta et al., 2001) van determinar que la regió nucli (*core*) de la NP era suficient per mediatitzar l'acoblament dels octàmers d'histones. Així, els trams acídics A2 i A3 no serien necessaris per a la unió a histones. Aquests autors van proposar un model en el qual la NP en forma de decàmer (2 pentàmers) interaccionava amb 5 octàmers d'histones, o dit altrament: un pentàmer de NP interaccionaria amb 2,5 mols d'octàmers d'histones. Aquest valor coincideix amb el que es va obtenir en els estudis d'interacció de la NP amb la protamina de *D. labrax* on es va determinar que 1 pentàmer de NP uniria 2,5 mols de protamina (Prieto et al., 2002). Aquesta estequiometria també es mantenia per a la forma r-NP121 malgrat no presentar el tram acídic principal A2. En aquesta mateixa línia, s'ha descrit que la proteïna NAP-1 no requereix el tram acídic principal de la molècula per exercir la seva funció d'acoblament de nucleosomes (Fuji-Nakata et al., 1992).

Dins d'aquest marc, es va creure interessant estudiar millor la naturalesa de la interacció que s'establia entre la NP i les histones per tal d'adquirir un millor coneixement dels mecanismes implicats en l'acoblament de nucleosomes.

2.1 Implicacions dels trams carregats de la NP i les histones

Els estudis de velocitat de sedimentació han mostrat que la r-NP forma complexos amb les histones del nucli del nucleosoma. Aquests complexos presenten un coeficient de sedimentació de 10 S i estan constituïts per la r-NP i els 4 tipus d'histones (H2A, H2B, H3 i H4) en quantitats estequiòmicament equivalents. Els experiments s'han realitzat sota condicions iòniques fisiològiques en les quals l'octàmer d'histones està en equilibri amb tetràmers (H3-H4)₂ i dímers H2A-H2B (Eickbush i Moudrianakis, 1978) (v. fig. IV.1a) i han permès determinar que 1 pentàmer de NP uniria 1 equivalent d'octàmer d'histones. Igualment, la forma r-NP121 (sense el tram poliglutàmic principal) interacciona amb les histones del nucli del nucleosoma amb la mateixa estequiometria que en el cas de la r-NP.

Clàssicament s'accepta que les cues bàsiques de les histones estarien implicades en la interacció amb les regions àcídiques de la NP. No obstant això, s'ha determinat que la NP uneix histones tripsinitzades (amb absència de les cues bàsiques) amb la mateixa estequiometria que per a les histones natives.

Els resultats obtinguts posen de manifest que ni les cues bàsiques de les histones són imprescindibles per a la interacció amb la NP, ni el tram àcidic A2 de la NP és essencial per a la unió a les histones. La interacció no és predominantment de naturalesa electrostàtica sinó que podrien donar-se altres tipus d'interaccions entre la regió plegada del pentàmer (Dutta et al., 2001) i la regió plegada de les histones (*histone fold*) (Luger et al., 1997).

D'altra banda, no s'ha observat cap preferència de la NP per cap de les histones del nucli del nucleosoma, les quals s'hi uneixen en quantitats estequiòmicament equivalents. Els resultats obtinguts estarien d'acord amb el fet que la NP uniria dímers H2A-H2B i tetràmers (H3-H4)₂ més que no pas tot l'octàmer sencer. El complex format entre el pentàmer de NP i les histones tripsinitzades té un coeficient de sedimentació lleugerament superior al del complex format amb les histones natives, fet que reflecteix una major simetria del primer en eliminar les cues de les histones (fig. IV.1 b-d).

El tram àcidic A2 de la NP no és, doncs, tan important en la unió a proteïnes bàsiques com es pensava en un principi. És possible, però, que es donin interaccions electrostàtiques a escala del tram àcidic A1. El tram A1 es troba en el llaç entre les làmines $\beta 2$ i $\beta 3$, en una zona poc estructurada que no ha pogut ser resolta. En experiments que s'estan realitzant actualment al nostre laboratori es veu que la mutació del tram A1 fa disminuir dràsticament la funcionalitat de la r-NP (tot i conservar els trams àcídics A2 i A3). Recentment s'ha proposat també que aquest tram

A1, juntament amb el β H (forqueta beta), podria modular la unió de la nucleoplasmina amb les histones (Akey i Luger, 2003).

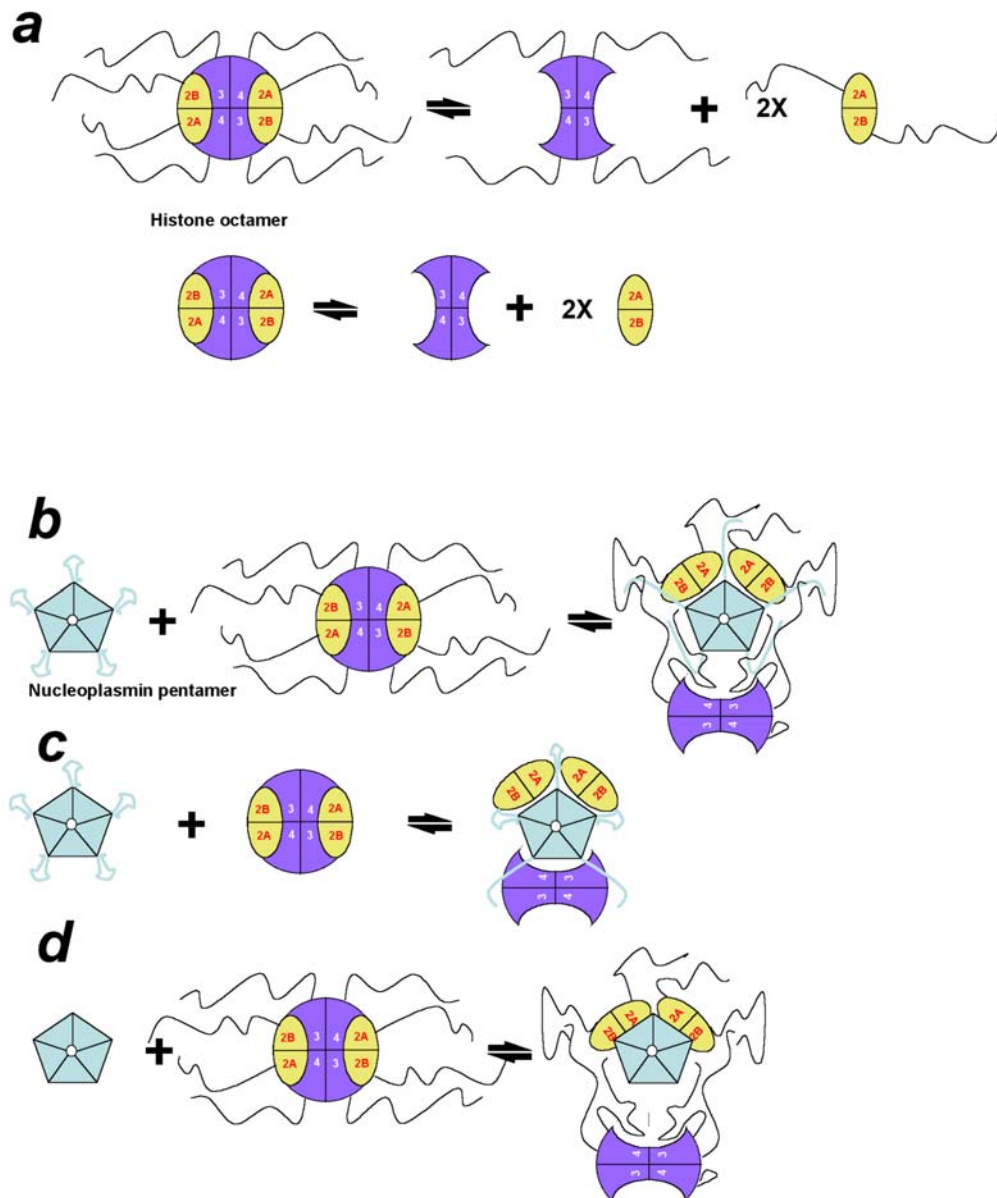


Fig. IV.1 Models d'interacció de la nucleoplasmina amb les histones del nucli del nucleosoma. **a)** Octàmers d'histones en presència i absència de les cues bàsiques (histones tripsinitzades). **b,c,d)** Models proposats per a l'associació entre les histones del nucli del nucleosoma i la nucleoplasmina en solució. **(b)** NP+histones, **(c)** NP+histones tripsinitzades, **(d)** NP (sense tram poliglutàmic C-terminal)+histones.

3. Què és una proteïna *nucleoplasmin-like* (NP-like)?

L'aplicació dels mètodes clàssics d'obtenció de NP han permès identificar una proteïna majoritària als oòcits de l'estrella de mar *Echinaster sepositus* que, igual que la NP de *Xenopus laevis*, té les propietats de ser termoestable i àcida. A més a més, és parcialment resistent a la precipitació amb sulfat amònic i sembla formar oligòmers en gels PAGE natius. D'altra banda, els anticossos anti-NP obtinguts a partir d'ous de gallina reaccionen amb aquesta proteïna.

No obstant això, aquesta proteïna no s'ha mostrat activa en els assajos de descondensació realitzats utilitzant nuclis espermàtics de *Dicentrarchus labrax* en les mateixes condicions en què la NP de *X. laevis* sí que és capaç de provocar la descondensació dels nuclis extraient-ne la protamina.

Pot ser classificada o no aquesta proteïna com a NP-like? És cert que la resposta podria ser que es necessiten més estudis per poder establir la seva naturalesa de NP-like. D'una banda no sabem si aquesta proteïna és nuclear o no, ni tampoc coneixem la seva seqüència ni a escala de proteïna ni de DNA; d'altra banda seria interessant repetir els experiments de descondensació de cromatina utilitzant els nuclis espermàtics de la mateixa espècie. Tot i així, podem trobar a la bibliografia proteïnes descrites com a NP-like pel fet que compleixen algunes de les propietats que presenta la proteïna majoritària de l'oòcit d'*E. sepositus*.

La revisió de la bibliografia respecte el tema de les NP-like posa de manifest que no hi ha hagut uns criteris clars o uniformes a l'hora de qualificar una proteïna com a NP-like. De fet, encara ara manca una definició clara del terme proteïna NP-like. Així trobem descrites com a NP-like proteïnes com la de la vesícula germinal de l'oòcit d'*Spisula solidissima* que pot ser aïllada utilitzant els mètodes de purificació de la NP de *X. laevis* i que té moltes característiques bioquímiques similars a aquesta (és termoestable, fosforilable, àcida i resistent a la precipitació amb sulfat amònic) (Herlands i Maul et al., 1994). No obstant això, no existeix cap dada funcional sobre aquesta proteïna que permeti relacionar-la amb la NP de *X. laevis*.

En altres casos trobem proteïnes nuclears classificades com a nucleoplasmines o NP-like sobre la base de criteris bàsicament immunològics (Khrone i Franke, 1980 a i b). Aquest tipus d'aproximació va ser molt usada en els inicis dels estudis sobre la NP i va col·laborar molt en la creença sobre la universalitat d'aquesta proteïna. S'ha criticat ja en alguna ocasió la fiabilitat d'aquest criteri a l'hora de relacionar inequívocament una proteïna amb l'antigen original (Laskey et al., 1993). En els primers estudis s'utilitzaven anticossos policlonals obtinguts immunitzant amb el contingut total del nucli. Així, tot i que la NP era la proteïna més abundant del nucli, no es podia concloure que el senyal obtingut en les proves immunològiques correspongués únicament a la nucleoplasmina. D'altra banda, la part N-terminal de la NP es troba molt conservada en altres proteïnes com NO38 (nucleofosmina) (Schmidt-Zachman, 1987) que també podria reaccionar amb els anticossos antinucleoplasmina. En el nostre cas cal tenir en compte que els anticossos obtinguts en ous de gallina no han resultat altament específics, ja que poden presentar reaccions encreuades amb

determinades proteïnes presents als extractes bacterians d'*E. coli* i amb el lisozim d'ou.

Hi ha també proteïnes agrupades com a *NP-like* sobre la base de similituds de seqüència tot i tenir funcions diferents de les de la NP. Uns exemples serien la proteïna nucleolar ANO39 detectada als oòcits de l'estrella de mar *Asterina pectinifera* (Nakajima et al., 2000) i la proteïna mitòtica p62 dels ous i embrions primerencs de l'eriç de mar *Strongylocentrotus purpuratus*. (Ye i Sloboda, 1997) (v. fig. I.12).

Així, mentre que idealment hauríem de tenir en compte conjuntament la localització subcel·lular de la proteïna, les propietats fisicoquímiques, la seqüència aminoacídica, la immunoreactivitat amb anticossos anti-NP i la funció en l'organització de la cromatina, aquests criteris no es compleixen de forma conjunta en la majoria de casos. És a dir:

- Proteïnes amb propietats fisicoquímiques diferents poden tenir funcions similars a les de la NP.
- Proteïnes immunoreactives amb anticossos anti-NP poden tenir funcions diferents de les de la NP i també proteïnes amb propietats i/o funcions similars a les de la NP podrien presentar diferent immunoreacció.
- Proteïnes amb seqüència similar a la NP poden tenir funcions diferents.

Una altra qüestió que ens hauríem de plantejar a l'hora de classificar una proteïna com a *NP-like* és si cal que la proteïna sigui específica dels oòcits, ous o embrions primerencs. Si seguim aquest criteri no podríem classificar dins d'aquesta família proteïnes de tipus somàtic com la NAP-1 o CAF-1 tot i que estan implicades en funcions d'acoblament de nucleosomes. D'altra banda, Khrono i Franke (1980a i b) van immunolocalitzar NP a cèl·lules somàtiques tant en amfibis com en altres grups i Cotten i Chalkley (1987) van identificar i aïllar una nucleoplasmina somàtica (nucleoplasmina S); aquestes proteïnes no podrien ser considerades com a *NP-like* seguint aquest punt de vista.

Sota un altre punt de vista, és també molt important considerar que les funcions de descondensació de cromatina espermàtica i acoblament de nucleosomes, que la NP de *X. laevis* pot realitzar de manera dual, no haurien de ser pas exercides forçosament per una mateixa proteïna en altres models. Els nuclis espermàtics són compactats per proteïnes a vegades molt diferents en les diferents espècies i per tant els mecanismes implicats en la remodelació d'aquesta cromatina podrien ser també diversos. En altres paraules, els mecanismes de remodelació de la cromatina espermàtica no serien per força universals. Així, per exemple, la NP es mostra incapaç d'extreure la proteïna espermàtica ϕ_0 d'*Holothuria tubulosa* (del Valle et al., 2003). Per tant, les proteïnes implicades en els processos de remodelació de la cromatina no compartirien sempre característiques idèntiques. En aquest sentit, els protocols d'obtenció i purificació d'aquestes proteïnes no coincidirien en tots els casos.

En relació amb el punt anterior cal també preguntar-se fins a quin punt la dualitat en les funcions exercides per la NP de *X. laevis* és accidental. És a dir, la gran quantitat de NP present als nuclis dels oòcits contrasta amb la necessària per

descondensar el nucli espermàtic de l'únic espermatozoide que penetrarà l'ou durant la fecundació. Així, potser la funció principal de la NP no és tant la descondensació del nucli espermàtic com la d'emmagatzemament d'histones i l'acoblament de nucleosomes durant les ràpides divisions cel·lulars que es donen durant les primeres etapes de l'embriogènesi. Potser evolutivament aquesta proteïna va poder ser "aprofitada" per complir ambdues funcions mentre que en altres espècies podrien dur-se a terme mitjançant proteïnes o mecanismes diferenciats.

Últimament, i arran de la resolució de l'estructura cristal·logràfica del nucli (*core*) de la NP de *Xenopus laevis* (Dutta et al., 2001) i del nucli (*core*) de la dNLP de *Drosophila melanogaster* (Namboodiri et al., 2003) s'està posant de manifest que proteïnes presents a espècies molt allunyades presenten no només un cert grau d'homologia de seqüència sinó també una estructura pentamèrica i un plegament tridimensional molt similar. Aquest fet, juntament amb l'alt grau de conservació evolutiva de les histones, fa pensar que els mecanismes d'unió a histones poden ser similars i possiblement compartits també per altres proteïnes pertanyents a la família de la nucleoplasmina. Dins d'aquesta família (sovint anomenada família de la nucleoplasmina/nucleofosmina) s'inclouen proteïnes amb una homologia de seqüència important en els seus dominis N-terminal (v. fig. I.12) (Dutta et al., 2001), les quals poden ser tant proteïnes germinals com somàtiques, de vertebrats o invertebrats, àcides i localitzades al nucli (o al nuclèol). Sobre la base de la comparació de seqüències, queden excloses d'aquesta família proteïnes com la NAP-1, CAF-1 o N1/N2 (aquesta darrera molt relacionada amb la NP).

4. Estudis estructurals sobre la proteïna ϕ_0

És sabut que el TFE, l'isopropanol i el NaClO_4 són compostos inductors d'alfa hèlix. A partir de mètodes de predicció d'estructures i dicromisme circular es va determinar que la proteïna ϕ_0 , es trobava desestructurada en solució però podia formar hèlix alfa en presència d'aquests compostos (Verdaguer et al., 1993), els quals també s'han utilitzat en les proves de cristal·lització de la proteïna. En el present treball, en presència d'aquests inductors, s'han obtingut unes estructures sòlides semi-cristal·lines de naturalesa proteica, però força irregulars i que, per tant, no són òptimes per a la difracció de raigs X.

Com a alternativa a la difícil cristal·lització de la proteïna ϕ_0 es van utilitzar tècniques de ressonància magnètica nuclear (RMN) en presència de TFE. Aquesta tècnica va posar de manifest la manca d'estructura terciària de la proteïna ϕ_0 en solució, tot i que té estructura secundària. La determinació de l'estructura secundària es preveia molt difícil a causa de la presència d'un elevat nombre d'aminoàcids repetitius a la seva seqüència.

Una opció per millorar les anàlisis de RMN seria enriquir la proteïna amb heteronuclis de ^{15}N i recollir espectres mixtos de ^1H i ^{15}N . Tot i que la tècnica podria millorar l'assignació de senyals, no s'arribarien a resoldre els problemes de solapament de senyals. L'alternativa més adequada seria obtenir pèptids sintètics de diferents regions de la molècula. Així, reduint el nombre d'aminoàcids, se simplifica l'assignació de senyals. El principal inconvenient de la tècnica és l'elevat cost que suposa la síntesi de pèptids.