

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**INVESTIGACION DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES
DE LA MATRIZ NUCLEAR
EN PLANTAS Y EUCARIOTAS INFERIORES.**

Memoria que presenta

ANA MINGUEZ GARRIDO

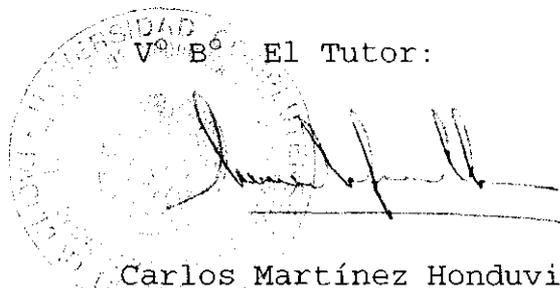
para optar al Grado de Doctor en Farmacia

Vº Bº La Directora:



Susana Moreno Diaz de la Espina
Colaborador Científico
Centro de Investigaciones
Biológicas (CSIC)

Vº Bº El Tutor:



Carlos Martínez Honduvilla
Profesor Titular
Dpto. de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Farmacia

Madrid, Febrero 1995.

A mis padres, mis
hermanas y a Pedro.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a la Dra. Susana Moreno Díaz de la Espina, bajo cuya dirección ha sido realizada esta Tesis, en el Departamento de Biología de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.), su constante dedicación y ayuda, así como sus oportunos consejos a lo largo del desarrollo de la misma.

Así mismo, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Carlos Martínez Honduvilla, Profesor Titular de la Facultad de Farmacia de la U.C.M. de Madrid, por haber aceptado ser mi tutor y ponente de esta Tesis.

Mi mas sincero agradecimiento a todos mis compañeros del laboratorio de Biología Celular y Molecular Vegetal (C.I.B./ C.S.I.C.). Dra. M^a Encarnación Fernandez Gomez por sus precisas indicaciones y críticas en la redacción del trabajo, Nieves Fonturbel por su ayuda y en especial por el excelente trabajo fotográfico, Mercedes Carnota por su constante disposición y participación en la realización del trabajo experimental, Asunción Medina por su apoyo y amistad, M^a Victoria Lafita y especialmente al Dr. Francisco Javier Medina Díaz por su colaboración en el tratamiento estadístico de los datos y su ayuda continua.

También deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Susana Franca (Instituto Nacional de Saúde. Lisboa . Portugal) por su imprescindible colaboración y consejos en el desarrollo del trabajo correspondiente a los Dinoflagelados. Así como al convenio de cooperación científica CSIC/JNICT Portugal, que ha facilitado su realización.

Quiero agradecer al Dr. Peter Shaw (John Innes Institute. Norwich. Reino Unido) y al Dr. Roel Van Driel (E.C. Slater Institute. Universidad de Amsterdam. Holanda) el haber puesto a mi disposición sus respectivos laboratorios, facilitando así la realización de parte del trabajo experimental.

También quiero dar las gracias a todos los que amablemente han cedido los anticuerpos que he utilizado en los experimentos: Dr. Reimer Stick (Göttingen. Alemania) por los antilaminas, Dr. David Fairbairn (Norwich, Reino Unido) por el AFB, MAC 322 , IFA, y JIM 63, Dr. R. Ochs (La Jolla. USA) por el anticuerpo antifibrilarina S₄, Dr. M Christensen (Kansas City. USA) por el anticuerpo antifibrilarina P2G3, Dra. Nicole Gas (Toulouse. Francia) y Dr. R. Petryshyn (Siracusa. N.Y. USA) por los anticuerpos antinucleolina. Al Dr. Roel Van Driel (Amsterdam. Holanda) por las sondas MARs.

Deseo dar las gracias a todos los que con su apoyo, consejo y amistad han contribuido a la realización de este trabajo. A Marta y Rafa, a mi familia y sobre todo a Pedro.

Gracias al Ministerio de Educación y Ciencia por haberme concedido una beca predoctoral del Programa de Formación de Personal Investigador.

Quiero dar las gracias a la casa Leica por haber concedido todo tipo de facilidades para la utilización del Microscopio Confocal TCS 4D junto con el apoyo técnico necesario.

Finalmente quiero expresar mi gratitud al Centro de Investigaciones Biológicas por haber puesto a mi disposición todos los medios necesarios para realizar esta Tesis, y a las personas de los distintos servicios que han contribuido a ello.

ABREVIATURAS

1D=monodimensional.

2D=bidimensional.

BSA=seroalbúmina bovina.

bp=par de bases.

CFs=centros fibrilares.

Chl=cloroplasto.

CHO=células de ovario de hamster chino.

Chr=masas de cromatina condensada.

Ci=curio.

cm=centímetro.

CSK=citoesqueleto.

Cyt=citoplasma.

cw=pared celular.

D=dalton.

DAPI=4',6-diamidino-2-fenilindol.

dATP=desoxiadenosina 5'-trifosfato.

DB=tampón de digestión.

dCTP=desoxicitosina 5'-trifosfato.

DFC=componente fibrilar denso.

dGTP=desoxiguanosina 5'-trifosfato.

DNA=ácido desoxirribonucleico.

DNasa=desoxirribonucleasa.

dTTP=desoxitimidina 5'-trifosfato.

DTT=ditiotreitól.

EDTA=ácido etilendiaminotetracético.

fg=flagelo.

FITC=isotiacianato de fluoresceína.

g=gramo.

GA=glutaraldehido.

GC=componente granular.

h=hora.

hnRNP=partícula ribonucleoproteica que contiene RNA heterogéneo.

hnRNA=ácido ribonucleico heterogéneo.

H₂O_{dd}=agua bidestilada.

HS=tampón de alta concentración salina.

IEF=isoelectroenfoque.

IF=filamento intermedio.

igs=gránulos intercromatínicos.

im=matriz interna.

ir=región intercromatínica.

kb=kilobase.

KD=kilodalton.

LIS=3',5'-diiodosalicilato de litio.

LM=tampón con baja concentración de magnesio.

M=molar.

mA=miliamperio.

MAR=secuencia de DNA que se une a la matriz nuclear.

mCi=milicurio.

ME=microscopio electrónico.

mg=miligramo.

min=minuto.

µg=microgramo.

mm=milímetro.

mM=milimolar.

MO=microscopio electrónico.

mRNA=ácido ribonucleico mensajero.

N=núcleo aislado.

ne=envuelta nuclear.

ng=nanogramo.

nm=nanometro.

NM=matriz nuclear.

NM+CSK=complejo formado por matriz nuclear y citoesqueleto.

NOR=*organizador nucleolar*.

np=región nucleoplásmica fibrilogramular.

NTPasa=nucleótido trifosfatasa.

Nu=nucleolo.

Num=matriz nucleolar.

PAGE=electroforesis en gel de poliacrilamida.

PBS=tampón fosfato.

PFA=paraformaldehido.

pg=picogramo.

pl=punto isoelectrico.

Pm=peso molecular.

PMSF=fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

P/V=peso/volumen.

PYR=pirenoide.

rDNA=genes que codifican para el RNA ribosómico.

RNA=ácido ribonucleico.

RNasa=ribonucleasa.

rpm=revoluciones por minuto.

rRNA=RNA ribosómico.

SDS=dodecilsulfato sódico.

sg=sgundo.

snoRNA=RNA de pequeño tamaño nucleolar.

snRNA=RNA de pequeño tamaño nuclear.

snRNP=partícula ribonucleoproteica que contiene snRNA.

TCA=tricloroacético.

TM=tampón tris magnesio.

TRA=trietanolamina.

TX-100=tritón x-100.

V=voltio.

V/V=volumen/volumen.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
1. La matriz nuclear como estructura aislada.	6
1.1. Dominios estructurales de la matriz nuclear.	7
1.2. Factores esenciales para el aislamiento de matrices nucleares. Modificaciones y resultados.	9
2. Funciones asociadas a la matriz nuclear.	12
3. Composición proteica de las matrices nucleares.	15
4. Matriz nuclear de plantas.	19
4.1. Aislamiento de la matriz nuclear.	21
4.2. Composición proteica.	23
4.2.1. Lámina.	25
4.2.2. Matriz nucleolar.	27
4.2.3. Matriz interna.	28
4.3. Secuencias MAR de plantas.	31
5. Dinoflagelados.	32
5.1. Núcleo de dinoflagelados. Composición	35
5.1.1. DNA.	35
5.1.2. Proteínas.	36
5.1.3. Metales.	37
5.1.4. RNA.	38
5.2. Posición evolutiva de los dinoflagelados.	40
OBJETIVOS.	42
MATERIAL Y METODOS.	45
I. MATERIAL.	45
1. Plantas.	45
2. Eucariotas inferiores. Dinoflagelados.	45

II. METODOS.	47
1. Fraccionamiento celular.	47
1.1. <i>Allium cepa</i>	47
1.1.1. Aislamiento de núcleos.	47
1.1.2. Aislamiento de matrices nucleares en condiciones de alta fuerza iónica	49
1.1.3. Extracción de matrices nucleares con urea.	51
1.1.4. Aislamiento de matrices nucleares por el método de LIS.	51
1.1.5. Aislamiento de nucleolos.	53
1.1.6. Extracción de matrices nucleolares.	53
1.2. Dinoflagelados.	54
1.2.1. Extracción de células enteras. Obtención de fracciones de matrices nucleares y citoesqueleto	56
1.2.2. Obtención de matrices nucleares por el método de LIS.	57
2. Análisis de proteínas.	58
2.1. Electroforesis monodimensional	58
2.2. Electroforesis bidimensional.	61
2.2.1. Isoelectroenfoque.(IEF).	61
2.2.2. SDS-PAGE.	63
2.3. Electrotransferencia.	64
2.3.1. Sistema de transferencia semiseco.	65
2.3.2. Sistema de transferencia húmedo.	65
2.4. Immunoblotting.	66
2.5. Ensayos de asociación de secuencias MAR a matrices nucleares.	69
2.6. Tinción con bismuto para proteínas fosforiladas sobre proteínas transferidas.	74
3. Procesamiento de muestras para microscopía electrónica.	75
3.1. Fijaciones.	75
3.1.1. Fijación para microscopía electrónica convencional.	75
3.1.2. Fijación para inmunocitoquímica.	77
3.1.3. Fijación para tinción con bismuto.	78
3.2. Deshidratación, infiltración e inclusión en LR White.	78
3.3. Ultramicrotomía.	79
3.4. Contrastación de los cortes: acetato de uranilo; citrato de plomo.	80

4. Técnicas citoquímicas.	81
4.1. Tinción con bismuto para proteínas fosforiladas.	81
5. Técnicas inmunocitoquímicas.	82
5.1. Inmunofluorescencia.	82
5.2. Microscopía confocal de barrido por laser.	84
5.3. Inmunomarcado con oro.	85
6. Método de cuantificación del inmunomarcado.	86
RESULTADOS	88
I. ALLIUM CEPA.	88
1. Aislamiento de matrices nucleares. Organización estructural.	88
2. Composición polipeptídica de las matrices nucleares.	89
2.1. Perfiles polipeptídicos monodimensionales.	89
2.2. Perfiles polipeptídicos bidimensionales.	91
3. Caracterización de los componentes de la lámina. Detección de laminas.	92
3.1. Inmunoblotting.	92
3.2. Inmunofluorescencia.	94
3.3. Inmunomarcado con oro.	95
4. Caracterización de los componentes de la matriz interna.	96
4.1. Detección de topoisomerasa II.	96
4.1.1. Inmunoblotting.	97
4.1.2. Inmunofluorescencia.	97
4.1.3. Inmunomarcado con oro.	98
4.2. Localización del DNA asociado a la matriz nuclear.	98

4.3. Detección de la proteína de la matriz interna homóloga a la reconocida por el anticuerpo JIM 63 en <i>Daucus carota</i>	100
4.3.1. Inmunoblotting.	100
4.3.2. Inmunofluorescencia.	101
4.3.3. Inmunomarcado con oro.	101
4.4. Detección del antígeno nuclear homólogo a una proteína componente de los gránulos intercromatínicos de células humanas.	102
4.4.1. Inmunoblotting.	103
4.4.2. Inmunomarcado con oro.	103
5. Matriz nucleolar. Aislamiento de nucleolos y matrices nucleolares.	104
5.1. Organización ultraestructural de la matriz nucleolar aislada.	106
5.2. Composición proteica de las matrices nucleolares.	107
5.2.1. Estudio de la composición polipeptídica en geles monodimensionales.	107
5.2.2. Estudio de la composición polipeptídica en geles bidimensionales.	108
6. Caracterización de las proteínas de las matrices nucleolares.	108
6.1. Localización de nucleolina en la matriz nucleolar.	109
6.1.1. Tinción con bismuto.	109
6.1.2. Inmunoblotting.	110
6.1.3. Inmunofluorescencia.	111
6.1.4. Inmunomarcado con oro.	111
6.2. Detección de fibrilarina en la matriz nucleolar.	112
6.2.1. Inmunoblotting.	113
6.2.2. Inmunofluorescencia.	113
6.2.3. Inmunomarcado con oro.	114
7. Ensayos de asociación de DNA.	115
7.1. Matrices nucleares obtenidas por el método de LIS.	115
7.2. Unión de secuencias MAR a las matrices nucleares.	116
II. DINOFLAGELADOS.	118
1. Encapsulación de las células en microbolas de agarosa.	118
2. Matriz nuclear. Organización ultraestructural.	119
3. Composición proteica del complejo matriz nuclear-citoesqueleto.	121

3.1. Detección de laminas en la matriz nuclear.	122
3.1.1. Inmunoblotting.	122
3.1.2. Inmunofluorescencia.	122
3.2. Detección de topoisomerasa II en la matriz nuclear.	123
3.2.1. Inmunoblotting.	123
3.2.2. Inmunofluorescencia.	124
4. Unión de secuencias MAR a matrices nucleares.	124
DISCUSION.	125
I. ALLIUM CEPA.	125
1. Procedimientos de extracción de elección para estudios estructurales y de análisis de proteínas, o de asociación de secuencias MAR.	125
1.1. Matrices nucleares para estudios bioquímicos y ultraestructurales.	127
1.2. Matrices nucleares para ensayos de asociación de DNA	130
2. Fraccionamiento de los componentes de la matriz nuclear.	133
2.1. Lámina.	133
2.1.1. Obtención de láminas.	135
2.1.2. Identificación de proteínas tipo lamina.	137
2.1.3. Localización topológica de las laminas.	140
2.2. Matriz interna.	143
2.2.1. Topoisomerasa II. Componente de la matriz interna.	145
2.2.2. Componentes de tipo filamento intermedio.	148
2.2.3. Gránulos intercromatínicos.	151
2.3. Matriz nucleolar.	153
2.3.1. Ultraestructura y significado estructural.	155
2.3.2. Composición proteica.	157
2.3.3. Caracterización de la nucleolina como componente de la matriz nucleolar.	159
2.3.4. Identificación de la fibrilarina como componente de la matriz nucleolar.	163
2.4. DNA y matriz nuclear.	167
2.4.1. Secuencias MAR.	169

II. DINOFLAGELADOS.	173
1. La matriz nuclear y la organización nuclear en dinoflagelados. ...	173
1.1. Ultraestructura de la matriz nuclear.	176
1.2. Proteínas de la matriz matriz nuclear.	178
CONCLUSIONES.	184
BIBLIOGRAFIA.	189
APENDICE A: TABLAS.	211
APENDICE B: SOLUCIONES.	222

RESUMEN

En plantas, como en el resto de eucariotas, el núcleo funciona como un conjunto de dominios integrados, en los que se produce la replicación, transcripción, procesamiento y transporte del RNA. La matriz nuclear constituye la estructura compleja que proporciona el soporte físico para estos procesos.

La existencia en células de *A. cepa* de una matriz nuclear formada por tres dominios morfológicos fundamentales: lámina, matriz interna y matriz nucleolar; análoga a la de otros eucariotas, nos ha llevado a intentar identificar los componentes básicos de la misma, con el fin de determinar si la organización y significado funcional de la matriz nuclear es común en eucariotas.

Las técnicas de fraccionamiento celular nos han permitido estudiar, de forma total o parcialmente independiente, los distintos dominios de la misma, y establecer sus perfiles polipeptídicos mono y bidimensionales, que muestran la complejidad de las diferentes estructuras matriciales.

Mediante anticuerpos específicos, hemos comprobado que los dos tipos de laminas de vertebrados están conservados en plantas, y presentan valores de peso molecular y punto isoeléctrico muy semejantes. La identificación de laminas en su lámina, demuestra que presenta una organización semejante a la del resto de eucariotas, y que estas proteínas están mejor conservadas que los filamentos intermedios citoplásmicos, que no forman un citoesqueleto organizado en el citoplasma de células de plantas, y apoya el origen ancestral de dichas proteínas dentro de la familia de los filamentos intermedios.

La matriz interna presenta una gran estabilidad en plantas, a diferencia de la de células animales, como demuestra su resistencia a la extracción con RNasa, tampones de alta fuerza iónica, diiodosalicilato de litio y soluciones reductoras.

La detección inmunológica de distintos componentes de la matriz interna, como la topoisomerasa II y DNA residual; antígenos presentes en los gránulos intercromatínicos, así como proteínas relacionadas con los filamentos intermedios y los ensayos de asociación de secuencias MAR heterólogas, han determinado la definición de dos subdominios estructurales dentro de la misma, uno fibrilar, que se correspondería con el nucleoesqueleto básico, contendría proteínas de tipo filamento intermedio, y sería el soporte estructural para el anclaje de los "loops" de DNA, y el otro de estructura fibrilogramular, del que forman parte los gránulos intercromatínicos, que estaría implicado en el metabolismo nuclear del RNA.

El desarrollo de un procedimiento de aislamiento de matrices nucleolares a partir de nucleolos aislados, nos ha permitido efectuar un análisis detallado de su composición proteica, y demostrar su composición compleja. Su organización estructural es semejante a la que presenta el dominio correspondiente de las matrices nucleares totales, demostrando que no son artefactos obtenidos durante el proceso de aislamiento. Su gran estabilidad frente a los distintos agentes desestabilizantes indica que su mantenimiento estructural depende, al menos parcialmente, de un esqueleto propio, y no de otros elementos matriciales. La caracterización de la nucleolina y la fibrilarina como componentes de las matrices nucleolares, y el análisis de su distribución topológica mediante microscopía confocal, demuestra que la matriz

nucleolar es el soporte nucleoesquelético de los "loops" de rDNA y de los complejos que intervienen en el procesamiento de los RNAs ribosómicos.

Por tanto, todo parece indicar que el modelo de organización y funcionalidad de la matriz nuclear de células de *A. cepa*, es semejante al descrito para otros eucariotas, si exceptuamos la alta estabilidad de la matriz interna, que parece ser una característica general de la matriz nuclear de plantas. Es por tanto una estructura altamente conservada, como demuestra a su vez el hecho, de que matrices nucleares de *A. cepa* sean capaces de ligar secuencias MAR de sistemas heterólogos.

La existencia de un grupo de organismos dentro de eucariotas, los Dinoflagelados, que carecen de nucleosomas e histonas, nos llevó a investigar si presentaban una matriz nuclear responsable de la organización supramolecular de su DNA atípico. El desarrollo de un procedimiento de extracción de células de *Amphidinium carterae*, encapsuladas en microbolas de agarosa, nos ha permitido obtener matrices nucleares "in situ", demostrándose que presentan una organización similar a la de animales y plantas superiores. La identificación de proteínas inmunológicamente relacionadas con las laminas de vertebrados en su lámina, confirma el origen ancestral de estas proteínas del grupo de los filamentos intermedios, muy conservadas a lo largo de la evolución. La presencia de un homólogo de la topoisomerasa II en ellas, unida a su capacidad de asociar específicamente secuencias MAR heterólogos, demuestra que la matriz nuclear juega un papel fundamental en la organización del DNA no nucleosómico de los dinoflagelados.

Por tanto parece que la matriz nuclear es una adquisición evolutiva temprana del núcleo eucariota, que no depende de nucleosomas e histonas, por lo que los mecanismos que controlan los dos niveles de organización de la cromatina en eucariotas, serán molecular y evolutivamente independientes.

INTRODUCCION

El núcleo celular, en el que reside la información genética de las células eucariotas, ha sido objeto de estudio a lo largo de décadas, de tal forma, que en la actualidad hay acumulada una gran cantidad de información acerca de los mecanismos moleculares implicados en la expresión génica. Sin embargo, las respuestas a como se organizan dichos procesos y su regulación dentro del núcleo todavía son muy limitadas.

Replicación, transcripción, procesamiento y transporte del RNA, son procesos complejos, resultado de la actuación coordinada de distintos factores proteicos, actividades enzimáticas y secuencias de DNA, situados mas o menos próximos a los genes sobre los que van a ejercer su acción. Por otra parte, gracias a distintos estudios bioquímicos, de microscopía electrónica, biología molecular y celular, se sabe que dichas actividades y componentes nucleares, no se encuentran de forma dispersa en el núcleo, sino que se localizan en dominios discretos dentro de sus límites. Todo ello, llevó a proponer, que dichas regiones del núcleo, donde se llevan a cabo estos procesos debían tener un soporte estructural complejo, al que se denominó matriz nuclear "in situ" (Berezney, 1984). Por tanto la matriz nuclear sería la estructura responsable de la organización topológica y coordinación de las funciones nucleares de una forma dinámica (Revisiones: De Jong y col., 1990, Van Driel y col., 1991, Jackson, 1991, Berezney, 1991, Stuurman y col., 1992a).

1.- LA MATRIZ NUCLEAR COMO ESTRUCTURA AISLADA

Desde que en los años 40 Mayer y Gulick, 1942, demostraron la existencia de una serie de proteínas nucleares resistentes a la extracción con soluciones de alta fuerza iónica, gran cantidad de estudios llevaron a confirmar que no constituían un grupo proteico aislado, sino un retículo ribonucleoproteico de fibrillas, que como toda estructura en sí, podría ser aislada (Revisión: Agutter y Richardson, 1980). Fueron Berezney y Coffey, (1974), los primeros que, basándose en todos los estudios anteriores, desarrollaron un método mediante el cual obtuvieron matrices nucleares aisladas a partir de núcleos aislados de hígado de rata.

La matriz nuclear se define como la estructura proteica residual, que se obtiene al someter núcleos interfásicos a extracciones sucesivas con detergentes no iónicos, soluciones de alta y baja fuerza iónica, y posteriores digestiones con nucleasas exógenas (Berezney y Coffey, 1974 y 1977, Comings y Okada, 1976, Agutter y Richardson, 1980).

A lo largo de las dos últimas décadas, se han podido aislar matrices nucleares de una gran variedad de células eucariotas, desde eucariotas inferiores (Herlan y col., 1979, Mitchelson y col., 1979, Waitz y Loidl, 1988, Eberharter y col., 1993), a invertebrados (Fisher y col., 1982), vertebrados (Agutter y Richardson, 1980, Berezney, 1984) y plantas (Revisión: Moreno Díaz de la Espina, 1995).

1.1.- DOMINIOS ESTRUCTURALES DE LA MATRIZ NUCLEAR

En general, independientemente de la especie, se distinguen de forma constante tres dominios fundamentales en toda matriz nuclear, la envuelta nuclear residual o complejo lámina-poros, el nucleolo residual, y la matriz interna que conecta la lámina con el nucleolo residual (Bouteille y col., 1983, Berezney, 1984, Verheijen y col., 1988).

La lámina está formada por un retículo de fibras ortogonales, en íntimo contacto con la cara interna de la envuelta nuclear a la que se asocian los poros complejos (Gerace y Burke, 1988, Nigg, 1989, Dessev, 1992). El nucleolo residual presenta una estructura fibrilar muy compacta (Berezney y Coffey, 1977, Bourgeois y col., 1987) y la matriz interna aparece como una estructura formada por fibras y gránulos, de naturaleza ribonucleoproteica (Kaufmann y Shaper, 1984, Verheijen y col., 1986, He y col., 1990, Spector, 1990).

Existe un acuerdo mas o menos unánime en cuanto a la estructura de la lámina, sin embargo no ocurre lo mismo en lo que se refiere a la matriz interna y el nucleolo residual. En la matriz interna se pueden distinguir componentes propiamente nucleoesqueléticos, que forman el complejo entramado de filamentos en torno a los cuales se organizan y ensamblan la mayor parte de las proteínas y los complejos multiméricos que componen las matrices. Dichos filamentos que constituyen el nucleoesqueleto base, quedan visibles cuando las matrices se obtienen aumentando gradualmente la fuerza iónica de las soluciones utilizadas en la extracción (He y col.,

1990, Nickerson y col., 1990).

Como era de esperar, desde los primeros estudios de aislamiento de matrices, se han generado multitud de procedimientos de obtención de las mismas, a partir de un gran número de tipos celulares diferentes. Aunque todos tienen como base la permeabilización de los núcleos aislados con detergentes, para hacerlos accesibles a la digestión con nucleasas y a la extracción con distintas soluciones, que eliminan la mayoría de los ácidos nucleicos y todos los componentes solubles o debilmente unidos, dan lugar a matrices de diferente composición, ultraestructura y con distintas actividades enzimáticas asociadas, viéndose principalmente afectado el dominio fibrilgranular que constituye la matriz interna. Parece claro que existen una serie de puntos claves en todo proceso extractivo, de los que dependen las características estructurales, composición y estabilidad de la matriz interna (Stuurman y col., 1992a). Ha sido precisamente la labilidad de la matriz interna, cuya composición y apariencia varía en función del procedimiento utilizado, unida a la dificultad inicial existente para la observación de las matrices nucleares "in situ" en células enteras, la que ha originado opiniones controvertidas acerca, por un lado, de la existencia de la matriz nuclear como estructura real y no como artefacto del proceso extractivo, y por otro, sobre cuales serían los factores responsables de su integridad estructural, en caso de que existiese como tal (Cook, 1988, Jack y Eggert, 1992, Hoffman, 1993).

1.2.- FACTORES ESENCIALES PARA EL AISLAMIENTO DE MATRICES NUCLEARES. MODIFICACIONES Y RESULTADOS

En términos generales con la variedad de procedimientos utilizados, se ha tendido, en primer lugar, a optimizar aquellos puntos del proceso considerados esenciales para la obtención final de unas matrices nucleares lo mas semejantes a las obtenidas "in situ". En segundo lugar, se ha intentado identificar los factores que mantienen la estructura como tal, y en tercer lugar, a la aplicación de distintas técnicas preparativas, con el fin de poder observar mejor al microscopio electrónico el resultado final de dichos procesos extractivos (De Jong y col., 1990).

Un paso fundamental es el aislamiento de núcleos. En general, no se utilizan soluciones en condiciones fisiológicas con el fin de evitar problemas de agregaciones entre ellos. Pero sin embargo, estas condiciones pueden dar lugar a la extracción de algunos elementos y reorganización de otros, produciendo finalmente estructuras distintas a las reales, o artefactos. Para evitarlo, Jackson y Cook, (1985), desarrollaron un método mediante el cual incluían las células en microbolitas de agarosa, de manera que posteriormente se podían someter a extracción con soluciones en condiciones mas o menos fisiológicas. En otros casos, se optó por una estabilización por calor, mediante la cual se somete a los núcleos (Gasser y Laemmli, 1986) o a las células, previamente a la extracción nuclear (Fisher y col., 1989), a temperaturas entre 37 y 42°C antes de continuar con el proceso de aislamiento. Pero existe un problema en este caso, ya que se ha comprobado que el calor, puede originar artefactos tales como un elevado contenido proteico en las matrices debido

a la asociación inespecífica de proteínas que no son componentes habituales de las mismas, redistribución de componentes proteicos, variaciones ultraestructurales e incluso de su funcionalidad (Evan y Hancock, 1985, McConnel y col., 1987, Belgrader y col., 1991b, Martelli y col., 1991b, 1992, 1994, Wachberger y Coss, 1993, Warters y col., 1993). Aunque no se sabe bien como se produce dicha estabilización, lo que parece claro es que no es debida a la formación de puentes disulfuro (Evan y Hancock, 1985, Belgrader y col., 1991b).

Una vez obtenidos los núcleos, un paso fundamental para la obtención de matrices nucleares, es la extracción de la cromatina una vez realizada la digestión con DNasa. Para ello se utilizan distintos tipos de procedimientos:

1- Por un lado están los que utilizan soluciones de alta fuerza iónica (Berezney y Coffey, 1974, Kaufmann y Shaper, 1984, Stuurman y col., 1990), o un aumento gradual de la fuerza iónica desde moderada a alta (Fey y col., 1986a, He y col., 1990). Ambos tipos de procedimientos se utilizan cuando se quieren realizar estudios ultraestructurales de las matrices. El hecho de que en algunos casos el aumento de la fuerza iónica se lleve a cabo de forma gradual se debe a que permite una preservación mejor de la ultraestructura de las muestras obtenidas.

Sin embargo utilizando procedimientos semejantes, con células del mismo origen, se obtuvieron estructuras finales diferentes (Berezney y Coffey, 1974, Aaronson y Blobel, 1975, Dwyer y Blobel, 1976), en las que se veía afectada principalmente la matriz interna, estructura mucho mas lábil que la lámina, que llegaba

2- Otro tipo de procedimientos son los que se basan en la utilización de soluciones de baja fuerza iónica, mas próxima a las condiciones fisiológicas. Se extraen las histonas con 3,5-diiodosalicilato de Li (LIS), previamente a la digestión con enzimas de restricción de los fragmentos de DNA mas debilmente unidos a las proteínas matriciales (Mirkovitch y col., 1984). La introducción de este tipo de procedimientos se debe a que la extracción con soluciones de alta fuerza iónica puede originar desplazamientos de los puntos de anclaje de los "loops" de DNA, e incluso precipitación de los complejos de transcripción en las matrices y reorganización de sus componentes. Estos procedimientos se han utilizado de manera sistemática para estudios de asociación de DNA a las matrices nucleares. El inconveniente que presentan es que se necesita, en el caso de células animales, realizar una estabilización por calor previamente a la extracción con LIS, originando, como se ha comprobado, asociación inespecífica de proteínas a la matriz (McConnell y col., 1987). En el caso de células vegetales, debido a la resistencia de su matriz interna, este paso no es necesario (Avramova y Bennetzen, 1993).

2.- FUNCIONES ASOCIADAS A LA MATRIZ NUCLEAR

Paralelamente al aislamiento de matrices nucleares, distintos experimentos han demostrado que la matriz nuclear no solo constituye el soporte esquelético del núcleo, sino que a ella se asocian la mayoría de las funciones nucleares.

Una de ellas es la organización de los "loops" de DNA, que se encuentran anclados en sus bases a la matriz (Razin, 1987, Bodnar, 1988, Getzenberg y col., 1991, Pienta y col., 1991, Jackson y col., 1992, Razin y Vassetzky, 1992), mediante secuencias denominadas "matrix associated regions" (MAR), las cuales se identificaron en gran cantidad de organismos desde levaduras, anfibios, insectos, aves, y mamíferos (Gasser y col., 1989, Gasser, 1991, Boulikas, 1993) y posteriormente en plantas (Hall y col., 1991, Slatter y col., 1991, Breyne y col., 1992, Avramova y Bennetzen, 1993, Paul y Ferl, 1993, Dietz y col., 1994). También se han caracterizado algunas de las proteínas de la matriz a las que se unen dichas secuencias (Hakes y Berezney, 1991b, Von Kries y col., 1991, 1994, Ludérus y col., 1992, 1994, Dworetzky y col., 1992).

Otra de las funciones asociadas es la replicación del DNA. Existen estudios en los que se ha determinado la asociación del DNA recién sintetizado a la matriz nuclear (Berezney y Coffey, 1975). A su vez el estudio de la distribución de los lugares de replicación, apoya la existencia de una estructura subyacente que la mantenga (Pardoll y col., 1980, Dijkwell y col., 1986, 1991, Nakayasu y Berezney, 1989, Cook, 1991, Jackson, 1991, Neri y col., 1992, Hassan y Cook, 1993, Hozák y col., 1993a y 1994b). La asociación de actividades enzimáticas como la de las polimerasas α y β , DNA primasas, y la de la topoisomerasa II, en este último caso con un papel en replicación, transcripción y estructural, ampliamente demostrado (Berrios y col., 1985, Wood y Collins, 1986, Tubo y Berezney, 1987, Kaufmann y Shaper, 1991, Anderson y Roberge, 1992, Zini y col., 1994), confirman el papel fundamental que juegan las matrices en la replicación del DNA.

Finalmente, se han acumulado abundantes datos que involucran a la matriz nuclear en la síntesis, procesamiento y transporte del RNA. Se ha comprobado que la transcripción es un proceso altamente localizado (Wansink y col., 1993), con los genes activos presentando una distribución en dominios. Por un lado se sabe que los genes con una alta actividad de transcripción se asocian a la matriz nuclear (Ciejek y col., 1983), así como el RNA que se está sintetizando (Ciejek y col., 1982), la actividad de la RNA polimerasa (Jackson y Cook, 1985) y distintos factores relacionados con la transcripción, como receptores esteroideos (Carmo- Fonseca, 1988).

Al igual que sucede con la transcripción, también se han detectado asociados a las matrices distintos factores de procesamiento del RNA (Zeitlin y col., 1989); en correspondencia con los estudios realizados por Spector (1990), que indican la existencia de un retículo, dentro del núcleo, formado por regiones ricas en snRNPs, que intervienen en el procesamiento del RNA. Sugiriendo ambos la existencia de un nucleoesqueleto como soporte físico de este proceso. Carter y col., (1991 y 1993), hablan de una distribución de RNAs poliadenilados así como de distintos factores involucrados en el procesamiento del RNA, en dominios discretos. Todos estos datos coinciden con aquellos que demuestran la existencia de snRNPs y hnRNPs, que contienen RNAs en distintas fases de procesamiento, asociados a la matriz nuclear (Verheijen y col., 1988). Además el hecho de que se desorganice la matriz interna al utilizar RNasa en el proceso de obtención de matrices, en algunos tipos celulares, apoya el papel fundamental que jugarían los componentes ribonucleoproteicos como parte integrante de ellas (Fey y col., 1986a y 1986b).

El RNA una vez procesado tiene que ser transportado al citoplasma. Lawrence y col., (1989) y Xing y Lawrence, (1993) han demostrado, que los transcritos de RNA se disponen formando cadenas altamente insolubles, desde el interior del núcleo hacia la envuelta nuclear, lo que indica que tienen que estar unidos a la matriz nuclear.

Ante tal cúmulo de evidencias, en la actualidad parece no haber dudas acerca de la existencia de una matriz nuclear responsable de la compartimentalización de los procesos de replicación, transcripción, procesamiento y transporte del RNA. Es necesaria una estructura en la que se van a concentrar por un lado el DNA para ser transcrito, junto con toda la maquinaria necesaria para la expresión génica específica de cada tejido (Nelson y col., 1986, Bodnar, 1988). (Revisiones: Cook, 1988, De Jong y col., 1990, Berezney, 1991, Jackson, 1991, Van Driel y col., 1991, Stuurman y col., 1992a, Hoffman, 1993).

3.- COMPOSICION PROTEICA DE LAS MATRICES NUCLEARES

El conocimiento de las proteínas que componen la estructura nucleoesquelética sigue siendo el punto mas oscuro en el estudio de las matrices nucleares, a pesar de todos los avances realizados.

Se sabe, que en general, las proteínas estructurales, como las del

citoesqueleto y matriz extracelular, están altamente conservadas a lo largo de la evolución. Esto ha llevado a pensar que, dada la semejanza existente en cuanto a la organización nuclear entre distintas especies, pudiera suceder algo semejante con las proteínas de la matriz nuclear. Un dato significativo es que actualmente se pueden aislar matrices nucleares de levaduras (Amati y Gasser, 1988), plantas (Moreno Díaz de la Espina y col., 1991, Krachmarov y col., 1991) y mamíferos (Berezney y Coffey, 1974).

La composición proteica de la matriz es compleja, con proteínas entre 20-200 KD (Berezney, 1984, Verheijen y col., 1988), aunque existen diferencias en lo que se refiere a los componentes mayoritarios. Así mientras en mamíferos y aves oscilan entre 45-75 KD (Revisiónes: Berezney, 1984, Kaufmann y Shaper, 1984, Verheijen y col., 1988), en eucariotas inferiores, son mas abundantes las proteínas de bajo peso molecular, entre 14 y 40 KD (Wunderlich y Herlan, 1977, Mitchelson y col., 1979), mientras que las plantas, que tienen un gran número de bandas de menos de 70 KD, presentan como mayoritarias las del rango 40-60 KD (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Cerezuela, 1991).

Lo que se ha comprobado es que la composición depende mucho del procedimiento de extracción utilizado. Está claro que la forman al menos dos estructuras, lámina y nucleoesqueleto interno, con una composición polipeptídica totalmente distinta (Kaufmann y Shaper, 1984). La lámina se encuentra bastante bien caracterizada, y se sabe que esta constituida por proteínas de tipo filamento intermedio, denominadas laminas, que están bastante bien caracterizadas (Aebi y col.,

1986, Fisher y col., 1986, Gerace, 1986, Krohne y Benavente, 1986, Franke, 1987).

La composición de la matriz interna, es la que se ve mas afectada con el método de aislamiento; hasta tal punto que en función de éste, puede haber una serie de componentes accesorios, que no son constituyentes del nucleoesqueleto básico, que aparezcan en mayor o menor proporción; de aquí la importancia de identificar las proteínas realmente estructurales de la matriz nuclear.

Mediante análisis bidimensionales, se han detectado mas de 200 proteínas como componentes de las matrices nucleares, de las cuales podemos diferenciar dos grupos, las proteínas comunes, es decir, que se encuentran en gran variedad de líneas celulares, y proteínas que dependen tanto del tipo celular, como del estado de diferenciación de éstas (Fey y Penman, 1988, Nickerson y col., 1990, Stuurman y col., 1990). Parece ser, además, que dicha variación, no depende tanto de modificaciones postranslacionales, sino mas bien de la expresión de distintos genes que codifican para proteínas matriciales, o "splicing" alternativo de un número limitado de genes de proteínas matriciales (Fey y Penman, 1988).

Por otra parte, la existencia de una serie de proteínas comunes en las matrices de células de orígenes distintos, indicaría una conservación evolutiva de las mismas, que tendrían un papel fundamentalmente estructural, o bien serían las responsables de funciones básicas nucleares independientes del estado de diferenciación o tipo celular; como es el anclaje de los "loops" de DNA, pues está demostrado que la unión de secuencias MAR es independiente del tipo celular (Gasser y Laemmli, 1986,

Ludèrus y col., 1992, 1994).

La identificación de dichas proteínas es el punto mas complicado. Hemos comentado que el estudio de las proteínas de la lámina está bastante avanzado, sin embargo existen lagunas enormes acerca de los componentes de la matriz interna. Se han identificado algunas proteínas que se asocian a ella como la topoisomerasa II (Berrios y col., 1985), proteínas reguladoras como la calmodulina (Ver: Nickerson y col., 1990), proteínas de los hnRNPs (Verheijen y col., 1988), o la fibrilarina asociada a matriz nucleolar (Ochs y Smetana, 1991).

Sin embargo en cuanto a las proteínas que constituyen por sí mismas la matriz interna, la información es mucho menor. Kaufmann y Shaper, (1984), se refieren a ellas como mucho menos estables que las del complejo lámina-poros. Constituyen un grupo muy variado, como se deduce de los estudios que se están llevando a cabo en los últimos años con anticuerpos monoclonales desarrollados contra proteínas matriciales de distintas células (Chaly y col., 1986, Lehner y col., 1986, Nicherson y col., 1990, Nakayasu y Berezney, 1991).

Los estudios de Nakayasu y Berezney (1991), en matrices de células de hígado de rata han llevado a identificar una serie de proteínas mayoritarias, 8 para ser mas exactos, las matrininas, muy distintas a las de la lámina, que forman parte de la matriz interna. Además se han estudiado sus secuencias, mostrando los característicos "dedos de zinc", secuencias específicas de unión a DNA (Belgrader y col., 1991a, Hakes y Berezney, 1991a).

Otra proteína que se ha identificado como componente del nucleoesqueleto de células de mamíferos es la NuMA (Nuclear Mitotic Aparatus Protein) (Yang y col., 1992a). El hecho de que se haya descrito la matriz interna compuesta por estructuras filamentosas, con filamentos de 10 nm (He y col., 1990) dispuestos formando un retículo semejante al de las proteínas de tipo filamento intermedio en el citoplasma (Jackson y Cook, 1988), da pie a pensar que sean proteínas con estructura semejante a los filamentos intermedios, descritas en el núcleo de células eucariotas las responsables de dicha organización. Si además tenemos en cuenta que la proteína NuMA aparece fuertemente asociada al núcleo después de extracción con 2 M ClNa y digestión con DNasa (Lyderson y Pettijohn, 1980), y que su estructura, con un dominio central en hélice sobreenrollada (coiled coil) es semejante a la de los filamentos intermedios (Yang y col., 1992a), parece indiscutible que es una de las proteínas nucleares candidatas a organizar el esqueleto nuclear, en asociación con otras proteínas, probablemente del mismo tipo (Mirzayan y col., 1992).

4.- MATRIZ NUCLEAR DE PLANTAS

Existen muchos datos que muestran la existencia de una gran similitud en la organización nuclear de células de especies de eucariotas muy diferentes (Jimenez García y col., 1989). Conforme se ha ido estudiando la organización estructural, y relaciones estructura-función en el núcleo de plantas, se ha comprobado que salvo algunas diferencias, presenta una organización básica, en lo que a sus procesos fundamentales se refiere, muy semejante a la de animales (Risueño y Moreno Díaz de la Espina, 1979, Jordan y col., 1980, Luck y Lafontaine, 1982 y 1983, Moreno Díaz

de la Espina y col., 1982 y 1992, Nagl, 1985, Risueño y Medina, 1986, Deltour y Mosen, 1987, Martín y col., 1989 y 1991, Medina y col., 1989, Medina y col., 1990, Vazquez-Nin y col., 1992). Por tanto es lógico pensar que los elementos estructurales responsables de dicha organización pueden estar también conservados.

Sin embargo, como suele suceder, los estudios en plantas se desarrollan mucho más tarde que en animales, y en la actualidad los datos de que se dispone acerca de sus matrices nucleares son más bien escasos, y generalmente dirigidos a datos muy puntuales (Tabla 1 y Moreno Díaz de la Espina, 1995). Uno de los principales problemas radica en el material de partida, que presenta muchos problemas para su procesamiento: es muy difícil obtener núcleos aislados en buenas condiciones y en cantidad suficiente de tejidos vegetales; no existen cultivos celulares desarrollados más que para un número muy limitado de especies, todas dicotiledóneas, y la metodología para la obtención de matrices nucleares "in situ" sin tener que aislar los núcleos, muy útil en el caso de células tanto animales (Jackson y Cook, 1985, y Jackson y col., 1988)) como de eucariotas inferiores (Waitz y Loidl, 1988), no es aplicable al material vegetal, debido a la existencia de la pared celular. Por lo tanto el material de partida son siempre núcleos aislados, bien sea a partir de protoplastos (Saxena y col., 1985), o de tejidos vegetales directamente (Kuehl, 1964). El aislamiento se debe realizar en unas condiciones que alteren lo menos posible la composición final de las matrices.

TABLA 1.- MATRIZ NUCLEAR DE PLANTAS. PRINCIPALES ESTUDIOS

ESTUDIO	ESPECIE	TEJIDO	REFERENCIA
Actividad transcripcional y matriz nuclear.	<i>-Zea mays</i>	-Semilla y raíz.	-Krachmarov y col., (1993)
Aislamiento de la matriz nucleolar.	<i>-Allium cepa</i>	-Meristemo radicular.	-Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, (1993d)
Análisis citológico y proteico.	<i>-Allium cepa</i>	-Raíz y bulbo.	-Gosh y Dey, (1986)
Análisis ultraestructural y proteico	<i>-Allium cepa</i>	-Meristemo radicular.	-Barthelley y Moreno Díaz de la Espina, (1984)
	<i>-Daucus carota</i>	-Células embrionarias.	-Masuda y col., (1993)
	<i>-Phaseolus vulgaris</i>	-Meristemo radicular.	-Galcheva-Gargova y col., (1988)
	<i>-Trillium kamtschaticum</i>	-Microesporocitos	-Okyama y col., (1987)

(Continúa)

ESTUDIO	ESPECIE	TEJIDO	REFERENCIA
Caracterización y localización de proteínas de la matriz nuclear:			
-Proteínas en general.	- <i>Zea mays</i>	-Semillas	-Galcheva-Gargova y col., (1988) -Ivachenco y col., (1993)
-Proteínas tipo filamento intermedio.	- <i>Daucus carota</i>	-Cultivos en suspensión -Protoplastos	-Frederick y col., (1992) -Beven y col., (1991).
	- <i>Pisum sativum</i>	-Protoplastos	-McNulty y Saunders, (1992)
-Proteínas tipo lamina.	- <i>Allium cepa</i>	-Meristemo radicular.	-Minguez y Moreno Diaz de la Espina (1993c)
	- <i>Pisum sativum</i>	-Protoplastos. -Semillas.	-McNulty y Saunders, (1992) -Li y Roux, (1992)
-Proteínas de la matriz nucleolar.	- <i>Daucus carota</i>	-Protoplastos	-Corben y col., (1989)
-Proteínas con actividad enzimática conocida.	- <i>Cucurbita pepo</i>	-Semillas	-Rzepecki y col.,(1992)
	- <i>Pisum sativum</i>	- Semillas - Semillas	-Li y Roux, (1992) -Tong y col., (1993)
DNA y matriz nuclear	- <i>Zea mays</i>	-Semillas	-Stoilov y col., (1992)

(Continúa)

ESTUDIO	ESPECIE	TEJIDO	REFERENCIA
Efectos de diferentes procedimientos de extracción sobre las matrices nucleares	<i>-Allium cepa</i>	-Meristemo radicular.	-Cerezueta y Moreno Díaz de la Espina, (1990)
Secuencias MAR y SAR.	<i>-Nicotiana tabacum</i>	-Protoplastos.	-Hall y col., (1991) -Breyne y col., (1992)
	<i>-Petunia</i>	-Brotes transformados.	-Dietz y col., (1994)
	<i>-Pisum sativum</i>	-Semillas.	-Slatter y col., (1991)
	<i>-Zea mays</i>	-Hojas. -Semillas.	-Avramova y Bennetzen, (1993) -Paul y Ferl, (1993)

4.1.- AISLAMIENTO DE LA MATRIZ NUCLEAR

Los primeros procedimientos que se desarrollaron, se basaron en el de Berezney y Coffey, (1974), incluyendo extracción con detergentes no iónicos, con soluciones de alta y baja fuerza iónica, así como digestión con nucleasas exógenas (Barthelley y Moreno Díaz de la Espina, 1984, Stolyarov, 1984, Ghosh y Dey, 1986). Aunque los primeros datos que se tienen se obtuvieron a partir de células de *A. cepa*, la utilización de los mismos protocolos para la obtención de matrices de distintas especies de dicotiledóneas (Galcheva-Gargova y col., 1988), y monocotiledóneas (Krachmarov y col., 1991) han confirmado que las plantas superiores presentan una matriz nuclear con una organización, en tres dominios perfectamente diferenciados, semejante a la de otros eucariotas (Bouteille y col., 1983, Berezney, 1984, Krohne y Benavente, 1986). La lámina, de naturaleza fibrilar con los poros complejos asociados, matriz nucleolar, y la matriz interna de naturaleza fibrillogranular, con fibras de unos 10 nm y gránulos entre 25 y 40 nm (Galcheva-Gargova y col., 1988, Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Krachmarov y col., 1991, Moreno Díaz de la Espina y col., 1991).

Un dato característico de las matrices nucleares de plantas así obtenidas, es que la matriz interna aparece como un componente constante de las mismas en todos los procedimientos de extracción utilizados. Su estabilidad es independiente de la formación de puentes disulfuro durante el proceso de extracción, la digestión con RNasa (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Krachmarov y col., 1991, Frederick y col., 1992) o la extracción con soluciones de baja fuerza iónica (Breyne

y col., 1992, Avramova y Bennetzen, 1993). Confirmando el hecho de que el aislamiento de una matriz nuclear con una matriz interna perfectamente organizada depende no solo del procedimiento de extracción utilizado, sino también del tipo celular (Verheijen y col., 1988), ya que en células animales, la matriz interna es muy lábil, y su composición depende de la mayor o menor formación de puentes disulfuro, orden de la secuencia extractiva, y uso de RNasa (Belgrader y col., 1991b, Kaufmann y col., 1991,), siendo necesario en el caso de la utilización de soluciones de baja fuerza iónica la estabilización previa por calor para que no se desorganice (Mirkovitch y col., 1984). Se ha comprobado que la presencia de cationes divalentes en el medio de aislamiento de núcleos, o en todas las soluciones del proceso extractivo, es necesaria para la obtención de matrices nucleares de células de plantas, sin los cuales se produciría una alteración de su estructura interna (Ohyama y col., 1987, Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Cerezuela, 1991)

Las matrices obtenidas mediante extracción con alta fuerza iónica, se han utilizado para estudios de ultraestructura y composición de las matrices nucleares. Para hacer estudios de secuencias de DNA asociadas a la matriz nuclear (secuencias MAR), el método de elección se basa en el uso de soluciones de baja fuerza iónica, asemejándose así a las condiciones fisiológicas, para eliminar histonas y el mayor número de proteínas solubles. Para ello se emplea un detergente no iónico, 3,5-diiodosalicilato de litio (LIS), y posteriormente se realizan las digestiones con enzimas de restricción (Mirkovitch y col., 1984, Izarraulde y col., 1988). Utilizando dicho procedimiento, se han realizado distintos ensayos de asociación de secuencias MAR en plantas, y se han caracterizado algunas en ellas (Hall y col., 1991, Slatter y col.,

1991, Breyne y col., 1992, Avramova y Bennetzen, 1993, Paul y Ferl, 1993, Mlynarova y col., 1994, Dietz y col., 1994).

En estudios del mismo tipo realizados en células animales, un requisito fundamental es la realización de una estabilización térmica de los núcleos, previamente a su puesta en contacto con la solución de LIS, sin la cual se desorganiza por completo la matriz interna perdiendo su capacidad funcional (Gasser y Laemmli, 1986, Amati y Gasser, 1988, Izarraulde y col., 1988). En plantas se ha comprobado, que dicho paso, controvertido ya que causa asociación inespecífica de proteínas a las matrices (McConnell y col., 1987) dando lugar a artefactos, se puede omitir, demostrando la mayor estabilidad de las matrices nucleares de plantas. A su vez se ha comprobado, que las matrices nucleares de plantas obtenidas por el procedimiento clásico de extracción con soluciones de alta fuerza iónica (Berezney y Coffey, 1974), son perfectamente capaces de asociar secuencias MAR, y por tanto útiles para la realización de dicho tipo de ensayos (Avramova y Benetzen, 1993).

4.2.- COMPOSICION PROTEICA

La composición polipeptídica de las matrices nucleares de plantas es compleja, con gran número de proteínas en un amplio rango de pesos moleculares, que en general son ligeramente inferiores a los de las proteínas de las de animales (Berezney, 1984, Verheijen y col., 1988), y con muchos componentes de bajo peso molecular de forma semejante a eucariotas inferiores (Herlan y col., 1979, Mitchelson y col., 1979, Waitz y Loidl, 1988). Estos datos se han obtenido de estudios

bioquímicos realizados en distintas especies como *A. cepa* (Stolyarov, 1984, Gosh y Dey, 1986, Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Moreno Díaz de la Espina y col., 1991), *Z. mays* (Galcheva-Gargova, 1988, Krachmarov y col., 1991) y *D. carota* (Beven y col., 1991, Masuda y col., 1993), siendo muy abundantes las proteínas de menos de 100 KD, sobre todo entre 50-75 KD, lo que no quiere decir que no haya de alto peso molecular, principalmente en determinadas especies y tipos celulares (Beven y col., 1991, Masuda y col., 1993). Hay que tener en cuenta que el *procedimiento de extracción utilizado produce variación en los componentes proteicos mayoritarios de las matrices* (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990).

Cuando se han hecho análisis en geles bidimensionales, se ha apreciado principalmente que presentan un amplio rango de puntos isoelectricos, aunque abundan los componentes de caracter ácido (Beven y col., 1991, Masuda y col., 1993).

En cuanto a la caracterización de los componentes de las matrices de plantas, hasta ahora existen pocos datos. En la lámina se han identificado proteínas tipo lamina A y B (Shaw y col., 1991, Li y Roux, 1992, McNulty y Saunders, 1992, Masuda y col., 1993), y asociadas a la matriz interna proteínas de tipo filamento intermedio (Frederick y col., 1992)

destinados a intentar determinar si la lámina de plantas está organizada por proteínas tipo lamina, así como su caracterización, ya que contribuirían a determinar la evolución que ha sufrido este grupo de proteínas en eucariotas.

Los datos preliminares sobre la existencia de laminas en plantas, no permitían concluir nada definitivo. Aunque estaba claro que el núcleo de plantas presentaba proteínas relacionadas con los filamentos intermedios (Galcheva-Gargova y col., 1988, Beven y col., 1991, Shaw y col., 1991, Frederick y col., 1992, Li y Roux, 1992), los valores de sus pesos moleculares eran muy variables, y no concordaban con los de células animales.

Las proteínas detectadas al hacer reaccionar anticuerpos específicos de vertebrados con matrices de plantas, presentaban pesos moleculares que oscilaban entre 50 y 92 KD, y una distribución atípica, no exclusivamente periférica como en el caso de animales. Sin embargo debido a su reactividad con dichos anticuerpos se han considerado como posibles laminas de plantas (Galcheva-Gargova y col., 1988, Beven y col., 1991, McNulty y Saunders, 1992, Ivachenco y col., 1993).

También se han identificado proteínas con propiedades enzimáticas relacionadas con las laminas en matrices nucleares de plantas. Se ha localizado y caracterizado una proteína kinasa, caseína kinasa II, asociada a la lámina de matrices nucleares de guisante, que fosforila una proteína de 46 KD tipo lamina (Li y Roux, 1992), así como la NTPasa del núcleo de guisante que presenta relación antigénica con dicho enzima de mamíferos (rata), que además podría ser un derivado de las

laminas, lo que explicaría su característica distribución en el núcleo de plantas (Tong y col., 1993).

Todos los datos apuntan a un alto grado de conservación a lo largo de la evolución, tanto de los componentes de las matrices como de los procesos metabólicos que los originarían, que por tanto serían fundamentales para el metabolismo nuclear.

4.2.2.- MATRIZ NUCLEOLAR

La información sobre las proteínas que componen el esqueleto nucleolar en eucariotas es muy escasa (Berezney y Coffey, 1976, Todorov y Hadjolv, 1979, Scheer y col., 1982, Shiomi y col., 1986, Krohne y col., 1982, Olson y col., 1986, Ochs y Smetana, 1991). El nucleolo residual presenta una composición polipeptídica característica, distinta a la de las matrices nucleares enteras, con componentes mayoritarios principalmente entre 30 y 60 KD de peso molecular (Todorov y Hadjolv, 1979, Olson y col., 1986). También se han descrito como componentes mayoritarios de matrices nucleolares de células de *Xenopus* y de rata proteínas de alto peso molecular 100-160 KD, de naturaleza ácida en muchos casos (Franke y col., 1981, Olson y Thompson, 1983, Shiomi y col., 1986). La fibrilarina se ha identificado en la matriz nucleolar de células Hela (Ochs y Smetana, 1991), cuya presencia en nucleolos residuales de células de ratón ya había sido sugerida (Shiomi y col., 1986).

También existen estudios que han demostrado la asociación de determinadas

secuencias de rDNA a matrices nucleolares de células eucariotas (Bolla y col., 1985, Stephanova y col., 1993).

En el caso de plantas, los estudios ultraestructurales de que disponemos, han demostrado la existencia de un nucleolo residual como componente constante de las matrices nucleares de *A. cepa* (Barthelley y Moreno Díaz de la Espina, 1984, Stolyarov y col., 1984, Ghosh y Dey, 1986, Moreno Díaz de la Espina y col., 1991), cuya presencia es independiente del uso de RNasa durante el procedimiento de extracción, así como de la posible formación de puentes disulfuro (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990). Matrices nucleares obtenidas de células de distintas especies de plantas, confirman dichos resultado (Beven y col., 1991, Frederick y col., 1992). Actualmente solamente se ha caracterizado una proteína de función desconocida, en el nucleolo residual de células procedentes de cultivos de zanahoria (Corben y col., 1989).

El aislamiento de nucleolos de plantas y de matrices nucleolares permitió realizar un estudio mas detallado de sus componentes.

4.2.3.- MATRIZ INTERNA

La matriz interna en células animales es una estructura relativamente sensible, de forma que digerir con RNasa, alterar el orden secuencial de la extracción, la presencia o ausencia de agentes reductores u oxidantes, producen sensibles

variaciones que afectan a su composición y características morfológicas (Kaufmann y col., 1981, Kaufmann y Shaper, 1984 y 1991, Belgrader y col., 1991b, Stuurman y col., 1992b), aunque los resultados dependen también de la especie (Berezney y Coffey, 1976, Van Eekelen y col., 1982, Berezney , 1984, Dijkwell y Wenink, 1986). Sin embargo, los estudios realizados en matrices nucleares de *A. cepa* (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990), han demostrado que su matriz interna permanece estable, independientemente del procedimiento de extracción utilizado. Mientras muchos de los procedimientos de extracción de matrices nucleares a partir de células animales, requieren una estabilización de los núcleos, en el caso de especies vegetales se ha demostrado que no es necesario (Krachmarov y col., 1991, Li y Roux, 1992, Avramova y Bennetzen, 1993, Masuda y col., 1993). Estudios realizados en células transcripcionalmente activas e inactivas, sugieren que la existencia de una matriz interna organizada depende de la actividad transcripcional de las mismas, careciendo de ella las que son inactivas (Krachmarov y col., 1991).

La matriz interna de células animales es de naturaleza fibrillogranular (Berezney y Coffey, 1976). El hecho de que se observe como una estructura fibrosa, a la que se asocian estructuras en forma de partículas mas densas, muestra claramente la semejanza de dicha estructura con algunas estructuras de la región intercromatínica de los núcleos aislados o "in situ". En apariencia está mas condensada, sin embargo tanto matriz interna como región intercromatínica presentan partículas de características morfológicas y morfométricas muy parecidas. La tinción regresiva de EDTA de Bernhard (1969), indica de forma mas definitiva la procedencia de la matriz interna a partir de las regiones intercromatínicas del núcleo, ya que existen

componentes de dichas estructuras intercromatínicas que permanecen en la matriz.

Podemos hablar de dos dominios estructurales en la matriz interna, uno formado por fibras, principalmente proteico, cuyos constituyentes son proteínas fibrilares, denominado matricina; y el otro formado por partículas ribonucleoproteicas conectadas entre sí por dicho componentes de naturaleza fibrilar (Comings y Okada, 1976, Berezney, 1984).

En cuanto a la organización estructural de la matriz interna de plantas existen pocos datos concretos. En células de *A. cepa* se ha observado que es semejante a la descrita en sistemas animales (Berezney, 1984), formada por fibras de 5-10 nm y gránulos de 20-25 nm. Es parecida al retículo ribonucleoproteico que se observa en los núcleos de cebolla teñidos con EDTA, ya que ese retículo se ha observado que permanece en las estructuras nucleares residuales teñidas de la misma manera (Moreno Díaz de la Espina y col., 1991). La tinción con oxinitrato de bismuto ha revelado que los gránulos intercromatínicos son parte integrante de la matriz interna (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990), como sucede en células animales (Kryzowska- Grucca y col., 1983).

Su composición proteica es aún si cabe mas enigmática. Desde que Chaly y col., (1986), detectaron la existencia de determinantes antigénicos semejantes en matrices nucleares de células de mamíferos, insectos y plantas, se ha intentado caracterizarlos, para determinar el grado de conservación de los mecanismos responsables de la organización nuclear en eucariotas. Se han detectado asociadas

a la matriz nuclear de plantas proteínas que presentan reactividad cruzada con proteínas del grupo de los filamentos intermedios de animales, que en algunos casos reaccionaron también con algunos anticuerpos contra diferentes laminas; pero con la diferencia, con respecto a células animales, de que su localización no quedaría restringida a la lámina como tal, sino que se asociarían también a la matriz interna (Beven y col., 1991, Frederick y col., 1992, McNulty y Saunders, 1992). El problema que ha determinado que existan tan pocos datos concluyentes en plantas, ha sido la ausencia de anticuerpos monoespecíficos. La mayoría de los estudios que se están realizando mas recientemente, empiezan por la obtención de anticuerpos contra determinantes antigénicos propios de cada especie, localización de dicho antígeno en las distintas regiones matriciales, y finalmente, intentar aislar la proteína contra la que reacciona, su secuenciación así como estudio del papel funcional que juega (Ivachenko y col., 1993, Masuda y col., 1993).

4.3.- SECUENCIAS MAR DE PLANTAS

Como se ha mencionado, una de las principales funciones de la matriz nuclear, es la organización de los "loops" de DNA (Razin, 1987, Pienta y col., 1991). Las secuencias de DNA responsables de su unión a las proteínas matriciales, tienen unas características determinadas, una localización específica con respecto a los distintos genes y se denominan secuencias MAR, las cuales se han caracterizado en gran variedad de especies eucariotas (Ver: Gasser y col., 1989). En plantas se han identificado secuencias MAR propias en distintas especies (Hall y col.,1991, Slatter y col., 1991, Breyne y col., 1992, Avramova y Benetzen, 1993, Paul y Ferl, 1993),

comprobándose además mediante ensayos de asociación, que matrices nucleares de las mismas, son capaces de ligar específicamente secuencias MAR de animales (Hall y col., 1991, Breyne y col., 1992, Mlynarova y col., 1994). También, recientemente se ha visto que dichas secuencias, de plantas, se asocian específicamente a matrices nucleares de mamíferos (Dietz y col., 1994). Todos estos estudios, parecen indicar por tanto que los mecanismos de reconocimiento DNA-proteínas están muy conservados, no solo dentro de las células animales, sino a lo largo de la evolución del núcleo en eucariotas.

5.- DINOFLAGELADOS

Los dinoflagelados constituyen un grupo tan amplio como diverso de organismos unicelulares que pertenecen al grupo de las algas y que forman parte del plancton marino. El interés que despiertan radica por un lado en su toxicidad, pudiendo producir graves problemas sanitarios y ecológicos, y por otro en sus características celulares, fundamentalmente de su núcleo, punto de vista desde el que nos interesan a nosotros.

Si bien cuando se hace un estudio de sus caracteres citoplásmicos, se observa que son típicamente eucariotas, a nivel nuclear, presentan rasgos que les hacen únicos. Tienen un gran número de cromosomas (Spector, 1984), permanentemente condensados, y unidos a la envuelta nuclear durante la división celular (Oakley y Dodge, 1974). Constituyen el único grupo dentro de eucariotas que carece de histonas (Rizzo, 1981) y nucleosomas (Herzog y Soyer, 1981, 1983, Soyer-Gobillard

y Herzog, 1985). Su DNA contiene gran proporción de 5-hidroximetiluracilo, que es una base rara en eucariotas, en sustitución de timidina (Rae, 1976, Rae y Steele, 1978, Steele y Rae, 1980). Además presentan una meiosis atípica (Himes y Beam, 1975). Aunque existen algunas excepciones dentro del grupo, lo que llama la atención es que no existen otros organismos con este conjunto de características nucleares tan peculiares (Ver: Herzog y col., 1984, Spector, 1984, Dodge, 1985, Taylor, 1987a, Rizzo, 1987, 1991).

Como consecuencia de ello, se ha especulado mucho sobre la posición que estos organismos ocuparían en la evolución. El hecho de que morfológicamente, así como bioquímicamente, sus cromosomas fuesen muy semejantes a los nucleoides bacterianos, dio lugar a que se les considerara como organismos intermedios entre procariotas y eucariotas, que habrían surgido al principio, o en la base de la evolución de los organismos eucariotas (Ver: Loeblich, 1984). Uno de los principales puntos en los que se basan los que los consideran eucariotas inferiores, es que su DNA se organiza sin la presencia de nucleosomas, que constituyen uno de los órdenes de organización del DNA eucariota (Kornberg, 1977), e intervienen en el control de la expresión génica en los diferentes tipos y estados de actividad celulares (Getzenberg y col., 1991). El DNA eucariótico tiene cuatro niveles de organización. La estructura básica de partida es la doble hélice del DNA, que se origina cuando dos cadenas de DNA antiparalelas se unen mediante puentes de hidrógeno entre sus bases e interacciones hidrofóbicas. El segundo orden lo constituye la fibra nucleosómica. Los nucleosomas al microscopio electrónico se observan como partículas de 12.5 nm de diámetro, con un núcleo proteico formado por dos copias de cada una de las histonas

H₂A, H₂B, H₃ y H₄ que interaccionan con fragmentos de DNA de 200 bp, que se enrollan alrededor de ellas formando la fibra nucleosómica de 10 nm. Todavía puede aumentar más el grado de compactación del DNA, dando lugar a la fibra nucleosómica al filamento de 30 nm, proceso en el que juega un papel fundamental la histona H₁. Estos filamentos de 30 nm son los que van a constituir los "loops" de DNA, que se encuentran anclados a la matriz nuclear y constituyen el nivel cuaternario de organización y control de la cromatina eucariótica.

Los dinoflagelados al carecer de nucleosomas, tienen que tener un modo diferente de empaquetamiento del DNA y por tanto de control de la expresión génica.

Todas estas peculiaridades, han dado lugar a que se propongan distintos modelos para explicar como se estructuran sus cromosomas (Oakley y Dodge, 1979, Spector y col., 1981, Herzog y Soyer, 1983, Herzog y col., 1984, Spector 1984, Dodge, 1985). Todas ellas parecen coincidir en que están formados por cadenas de DNA que se empaquetan superhelicoidalmente, dando lugar a una doble hélice. En dichos cromosomas se distinguen dos zonas, el cuerpo central o cromonema, que presenta DNA asociado a un componente proteico, y que sería el encargado de mantener la estructura, y la zona periférica, más difusa, en la que se localizaría el DNA que está activo en transcripción (Sigee, 1984). En ambas regiones Soyer-Gobilard y col., (1990) han localizado B-DNA y Z-DNA, formando "loops" continuos (Oakley y Dodge, 1979, Dodge, 1985).

Los estudios acerca de la estructura de su DNA, la organización de sus genes

ribosómicos, conservación de proteínas, el metabolismo del RNA, tipo de replicación etc. así como la organización de su citoplasma, han provocado que cada vez se consideren mas como eucariotas que como procariotas, al contrario de lo que se pensaba en un principio.

5.1.- NUCLEO DE DINOFLAGELADOS. COMPOSICION

5.1.1.- DNA

El alto contenido de DNA nuclear en dinoflagelados, es una característica que les aproxima más a eucariotas (Spector, 1984, Rizzo, 1987). Estudios de renaturalización del mismo, han demostrado que éste está formado por secuencias de DNA únicas, intercaladas con DNA repetitivo como sucede en eucariotas (Allen y col., 1975), cuyo contenido oscila entre un 55% y un 60% del total.

Una característica propia es que presentan grandes cantidades de 5 OH-metil uracilo en sustitución de la base timidina (Rae, 1976), sin embargo, si en un principio se pensó que podría ser responsable de la estructura poco usual de sus cromosomas, se ha demostrado que no es así (Rae y Steele, 1978). No parece que tenga actualmente ninguna función, podrían ser simplemente los restos de algún requerimiento necesario en un momento determinado, que permanece sin un significado especial.

En cuanto a la biosíntesis del DNA, que inicialmente se pensó la realizaban de

forma continua como en procariontes, se tienen evidencias, en distintas especies, de la existencia de una fase S perfectamente diferenciada, lo que constituye una característica de eucariotas (Galleron y Durrand, 1979, Spector y col., 1981).

5.1.2.- PROTEINAS

Una vez demostrada la ausencia de nucleosomas que organicen el DNA debido a la ausencia en ellos de histonas (Herzog y Soyer, 1981), distintos estudios electroforéticos de las proteínas nucleares de distintas especies de dinoflagelados, han demostrado que presentan proteínas básicas de bajo peso molecular, muy semejante al de las histonas, pero en una proporción respecto al contenido en DNA muy inferior a lo que sucede en eucariotas, en que la relación proteínas básicas-DNA es siempre superior a la unidad. Además se ha comprobado que la afinidad de dichas proteínas por el DNA es muy baja con respecto a la de las histonas (Rizzo, 1981, Rizzo y col., 1982, Vernet y col., 1990, Geraud y col., 1991, Sala Rovira y col., 1991). Estos datos están a su vez apoyados por los de Yen y col., (1978), que demuestran que solamente un 20% del DNA se encuentra en regiones protegidas cuando se hacen estudios de "crosslinking" con psoraleno, y se distribuyen en grupos de 10-15 kb separados entre sí por zonas de 30 kb no protegidas.

En cuanto al papel que jugarían estas proteínas en los cromosomas, se han detectado en los "loops" de DNA extracromosómicos, así como en la zona correspondiente al rDNA nucleolar, por lo que parecen implicadas en procesos de expresión génica tanto ribosómica como no ribosómica, además de tener un cierto

papel estructural, pues en los cromosomas en división se distribuyen de forma semejante (Geraud y col., 1991, Sala-Rovira y col., 1991).

5.1.3.- METALES

Los estudios mediante microanálisis de rayos X, del núcleo de dinoflagelados, y mas concretamente de sus cromosomas, han demostrado la presencia de niveles elevados de metales de transición como hierro, cobre, zinc y níquel como componentes de ellos (Kearns y Sigee, 1980, Sigee y Kearns, 1982), cuya presencia se ha probado que no se debe a un artefacto como consecuencia del tratamiento de los tejidos. Los metales se consideran componentes estructurales fundamentales de los cromosomas de dinoflagelados, pudiendo ocupar el puesto de las histonas, pues se ha comprobado que se asocian a los grupos fosfato del DNA. Posteriormente Herzog y Soyer, (1983), estudiando los componentes responsables del mantenimiento estructural de los cromosomas, en los que definieron hasta 6 niveles de organización de los filamentos nucleares, desde la fibra de 6 nm, hasta la de 50 nm, determinaron que el Ca^{2+} y el Mg^{2+} , eran indispensables para el mantenimiento de los mismos, llegando a definir los lugares de unión de estos. Cuando estos cationes se secuestran utilizando agentes quelantes, los cromosomas presentan una estructura mas extendida o relajada, es decir que se necesitan para mantenerlos en el estado de condensación permanente típico.

Estudios realizados en células Hela (Lewis y Laemmli, 1982), han mostrado que los cromosomas metafásicos de las mismas presentan una estructura esquelética

de naturaleza metaloproteica con calcio y cobre como componentes. Por tanto, estos resultados unidos a los obtenidos en dinoflagelados indicarían que detrás de un estado permanente de condensación de los cromosomas existiría una estructura metaloproteica, que a su vez interaccionaría con el DNA.

5.1.4.- RNA

Los dinoflagelados se caracterizan por presentar uno o varios nucleolos que permanecen organizados a lo largo de todo el ciclo celular, incluso durante la mitosis, a diferencia del nucleolo de eucariotas. Debido a que sus cromosomas se encuentran permanentemente condensados, los cromosomas del NOR se observan claramente entrando en el nucleolo, apareciendo parcialmente descondensados en su interior, (Soyer y Haapala, 1974, Spector y Triemer, 1981).

En cuanto a los rRNAs, debido a su peso molecular, coeficiente de sedimentación (S), grado de metilación de sus bases, así como estudios de secuenciación, se podrían considerar como formas primitivas de los rRNAs de eucariotas superiores (Ver: Herzog y col., 1984). Sin embargo, estudios referentes a sus snRNAs, han demostrado la gran similitud de estos con los de eucariotas superiores (Reddy y col., 1983 y 1985, Liu y col., 1984), que a su vez coinciden con los resultados de secuenciación de los 5S y 5.8S RNAs (Hinnebusch y col., 1981).

En cuanto a la estabilización de los cromosomas de los dinoflagelados, también se ha comprobado que el RNA juega un papel fundamental. Estudios de

desorganización de los cromosomas utilizando distintas nucleasas, variando las concentraciones, etc, han llevado a la conclusión de que podría existir cierta proporción de RNA estructural necesario para el mantenimiento de la organización de los mismos (Soyer-Gobillard y Herzog, 1985).

Estudios de este mismo grupo (Herzog y Soyer, 1983, Herzog y col., 1984) han llevado a definir que los nucleofilamentos cromosómicos se organizan helicoidalmente dando lugar a una estructura muy compacta, en la que se distinguen hasta 6 niveles de organización. Parece ser que el RNA estructural intervendría estabilizando el último de los niveles de organización. En cuanto a la forma en que se produce dicha estabilización existen dos posibilidades, mediante la formación de híbridos RNA-DNA, de forma que moléculas de este tipo se han estudiado en *A. carterae* (Galleron y Durrand, 1978), o bien, la otra posibilidad, que no excluye la primera, es mediante conexiones que se producirían entre zonas de DNA distantes gracias a ese RNA estructural. Dichas uniones, podrían producirse mediante interacciones metálicas entre RNA y DNA, ya que los cromosomas sufren una desorganización semejante cuando se tratan con RNasa A y con agentes quelantes (Herzog y Soyer, 1983),

Por tanto vemos que estos organismos han desarrollado un sistema de estabilización de la cromatina característico, mediante interacciones entre metales, proteínas no histónicas y RNA. La cromatina nunca pasa de forma condensada a descondensada en condiciones fisiológicas; y replicación, transcripción así como división (dando lugar a los cromosomas en forma de Y) suceden con la misma estructura.

5.2.- POSICION EVOLUTIVA DE LOS DINOFLAGELADOS

Parece cada vez mas claro, gracias a los estudios de secuenciación del rRNA 24-28S, que los dinoflagelados no son organismos tan primitivos como se pensaba en un principio, y que constituyen un grupo mas relacionado con levaduras y ciliados (Lenaers y col., 1991, Sogin, 1991).

Además de todas las características nucleares propiamente eucariotas, de las que ya hemos hablado, como son la existencia de una envuelta nuclear, uno o varios nucleolos, el huso mitótico extranuclear, una fase S perfectamente diferenciada, la presencia de DNA repetitivo, la organización en "tandem" del rDNA, así como la homología de las secuencias de los rRNAs y los snRNAs (Ver:Herzog y col., 1984); los estudios filogenéticos realizados gracias a los datos de secuenciación del 5S RNA y los snRNAs, han demostrado que se habrían separado del tronco eucariota después que los hongos, y mas aún, que la divergencia de estos se produce en el mismo punto que animales y plantas. Todo ello indica que la ausencia de nucleosomas e histonas se debería a una pérdida en algún punto de su evolución, por una pérdida del conjunto de genes de las histonas (Cavaliere-Smith, 1981), sugiriendo que sobrevivieron gracias a su mitosis característica, la cual se podría considerar como una preadaptación a dicha pérdida. Debido a la distinta organización y composición de su cromatina, sus cromosomas tendrían una estructura tan peculiar (Loeblich, 1984).

Por otra parte, si observamos su citoplasma, comprobamos que

estructuralmente presenta la complejidad del citoplasma típico eucariota, de manera que en conjunto los dinoflagelados poseen los 22 caracteres universalmente considerados como propios de eucariotas (Cavalier-Smith, 1981), a pesar de tener unas pocas características procariotas. Este hecho hace muy difícil pensar en la posibilidad de que los dinoflagelados constituyan un grupo de organismos que ha evolucionado de forma independiente a partir de organismos procariotas.

Por tanto podemos considerar a los dinoflagelados como una adaptación en la evolución de la cromatina de eucariotas, con un cromosoma característico que se ha originado como consecuencia de la necesidad de empaquetamiento de grandes cantidades de DNA, de forma alternativa a los nucleosomas.

Por todo ello el llegar a conocer la organización cuaternaria del DNA de dinoflagelados, y su organización estructural dentro del núcleo, es fundamental para determinar como han evolucionado los mecanismos que regulan la expresión génica. De aquí, que teniendo en cuenta el papel fundamental de la matriz nuclear como soporte para todos estos procesos, su estudio en dinoflagelados aportaría datos muy interesantes.

OBJETIVOS

Los estudios sobre la matriz nuclear de células vegetales realizados hasta el presente, han demostrado, que las plantas poseen una matriz nuclear de composición proteica compleja, con una organización ultraestructural semejante a la de animales. Sin embargo, existe muy poca información acerca de sus componentes específicos, y la funcionalidad de los mismos. La caracterización de los componentes proteicos de las matrices de plantas y su distribución en dominios funcionales es, sin embargo, muy importante para analizar el funcionamiento integrado de los distintos dominios nucleares en ellas, y determinar el grado de conservación de los mecanismos responsables de la organización nuclear en eucariotas.

Avanzando en esta línea consideramos muy interesante analizar la matriz nuclear del único Phylum eucariota que carece de nucleosomas e histonas, los dinoflagelados, ya que el aislamiento de una matriz nuclear en ellos, contribuiría por un lado, a determinar la organización cuaternaria de su DNA atípico, y por otro, sería un indicativo del momento evolutivo de aparición de la matriz nuclear, y de su grado de conservación en eucariotas.

Los objetivos concretos del presente trabajo son:

1.- Fraccionamiento de los componentes de las matrices nucleares de *A. cepa*, con el fin de realizar un estudio detallado de los componentes específicos de cada dominio, su organización topológica y funcionalidad.

2.- Investigar la presencia de proteínas de tipo lamina, mediante anticuerpos específicos para cada uno de los subtipos descritos en vertebrados, para conocer sus características específicas, el grado de conservación evolutiva de las mismas, así como su distribución topológica en la matriz nuclear.

3.- Determinación de la asociación de los complejos de anclaje de los "loops" de DNA a la matriz interna, mediante detección específica de algunos de sus componentes como la topoisomerasa II y el DNA residual de las matrices; así como ensayos de asociación de secuencias MAR heterólogas a las mismas. Estos estudios contribuirán a determinar el papel que juega la matriz nuclear de *A. cepa* en la organización de los loops de DNA, y que dominios están implicados en esta función.

4.- Investigar la presencia de proteínas de los gránulos intercromatínicos y su distribución en la matriz nuclear, para confirmar a dichas estructuras como componentes de la matriz de *A. cepa*, y determinar los dominios de la matriz a los que se asociarían los complejos de "splicing".

5.- Estudiar la existencia de un nucleoesqueleto interno y su relación con las proteínas de tipo filamento intermedio, en la matriz de células de *A. cepa*.

6.- Obtención de matrices nucleolares aisladas, e identificación de sus componentes en células de *A. cepa*. Investigación inmunológica de la presencia de nucleolina y fibrilarina como componentes residuales de las mismas, y análisis de su distribución topológica, que nos permitirá determinar el significado funcional de este

dominio matricial.

7.- Obtención de matrices nucleares de dinoflagelados. Análisis de sus características estructurales, estableciendo la relación con las de las matrices previamente descritas en eucariotas superiores.

8.- Identificación en la matriz nuclear de dinoflagelados, de proteínas implicadas en la formación de los "loops" de DNA en eucariotas superiores, como son la topoisomerasa II y las laminas; así como ensayos de asociación de secuencias MAR de otros eucariotas. Estos estudios nos permitirán determinar, si la matriz nuclear de dinoflagelados está implicada en la organización de su DNA no nucleosómico en "loops", y demostrar si los dos niveles de organización de la cromatina (nucleosomas y "loops") son independientes. Los resultados tendrán una gran repercusión en la posición taxonómica de este Phylum, acerca de la cual existe todavía una gran controversia, ya que confirmarían la posición claramente eucariota del mismo.

MATERIAL Y METODOS

I.- MATERIAL

1.- PLANTAS

Especie

Se han utilizado células proliferantes de meristemo radicular de *Allium cepa* L, variedad francesa, procedentes de bulbos obtenidos comercialmente.

Cultivo

Los bulbos, pelados y lavados, germinaron en tubos cilíndricos de vidrio, con agua filtrada como medio de cultivo, que se cambió cada veinticuatro horas. El proceso se efectuó a temperatura ambiente, tardando las raíces 48 h aproximadamente en alcanzar entre dos y tres centímetros de longitud.

2.- EUCARIOTAS INFERIORES. DINOFLAGELADOS

Especies

Se han utilizado tres especies de Dinoflagelados (*Dinophyceae*), de vida libre, autóctonos de las costas portuguesas, representativos de tres etapas evolutivas del Phylum; *Amphidinium carterae*, Hulburt, (*Gimnodiniales*) (Taylor, 1987b), un

dinoflagelado relativamente evolucionado; *Alexandrium lusitanicum*, Balech, (*Peridinales*) (Balech, 1985), relativamente poco evolucionado; *Gymnodinium splendens*, Labour, (*Gimnodinales*), situado en el entronque evolutivo de las especies más evolucionadas.

Cultivos

- *Amphidinium carterae*, Hulburt.

Procedencia: Faro (costa sur de Portugal).

Medio de cultivo sintético DV (Provasoli, 1968). (Apéndice B. nº 1).

- *Alexandrium lusitanicum*, Balech.

Procedencia: Laguna de Óbidos (costa oeste de Portugal).

Medio de cultivo ASP₇ (Provasoli, 1963), (Apéndice B. nº 1).

- *Gymnodinium splendens*.

Procedencia: Figueira de Foz (costa oeste de Portugal).

Medio de cultivo ASP₁+ASP₂ (1:1) (Provasoli, 1963). (Apéndice B. nº 1).

Condiciones de cultivo:

Los cultivos crecieron a temperatura constante de $19\pm 1^{\circ}\text{C}$, con ciclos de iluminación de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad, en cámaras con lámparas fluorescentes de luz blanca fría. Todos los medios llevaron mezcla antibiótica AM9 de (Provasoli, 1968), en proporción 1/100 (Apéndice B. nº 2).

Los cultivos en fase exponencial de crecimiento se transfirieron de frascos Erlenmeyer de 75 ml a otros de 1000 ml y después de 25 días, estaban en fase estacionaria temprana listos para realizar los estudios correspondientes.

La densidad y la fase concreta de los cultivos se determinaron al microscopio óptico, utilizando en el primer caso una cámara de contaje de células.

II.- METODOS

1.- FRACCIONAMIENTO CELULAR

1.1- ALLIUM CEPA

1.1.1.- Aislamiento de núcleos.

Cuando las raíces alcanzaron una longitud adecuada, se hicieron tomas de sus meristemas de unos 2 mm de longitud y se introdujeron en el medio de aislamiento de núcleos de Greimers y Deltour (1981), variación de los medios de aislamiento de Kuehl (1964) y Honda y col., (1966), (Apéndice B. nº 3).

Los núcleos se aislaron según el método descrito por Moreno Díaz de la Espina y col., (1991).

Se trocearon los meristemas en el medio de aislamiento (proporción 3/1,

medio/meristemas) y se desgasificaron durante 15 min para favorecer su penetración al interior de los mismos. Después de una noche a 4°C en el medio, se homogeneizaron con tres golpes consecutivos de 15 sg cada uno, con un homogeneizador ULTRATURRAX de alta velocidad (20.000 rpm). El homogeneizado se filtró a través de tres filtros de 30, 50 y 100 µm de luz de malla, superpuestos en orden decreciente de fuera hacia dentro.

Se repitió el proceso otras dos veces con el material retenido en los filtros, resuspendido en medio fresco.

Todos los pasos se llevaron a cabo sobre hielo.

Todo el material filtrado se sometió a un mínimo de tres centrifugaciones sucesivas en una centrífuga refrigerada SIGMA 2KD, a 2400 rpm, 4°C, 15 min. El sedimento obtenido cada vez, se resuspendió en medio fresco para obtener al final núcleos limpios.

En caso necesario, la fracción se purificó por ultracentrifugación diferencial en presencia de sacarosa según Kuehl (1964).

El grado de pureza e integridad de los núcleos se comprobó al microscopio óptico tiñéndolos con verde de metilo-pironina, contrastando el RNA de rojo y el DNA de azul. El rendimiento se estimó con una cámara de recuento de Neubauer.

1.1.2.- Aislamiento de matrices nucleares en condiciones de alta fuerza iónica.

Los núcleos se sometieron a extracciones sucesivas para eliminar la mayoría del DNA, RNA, lípidos y proteínas solubles.

El método utilizado fue el descrito por Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina (1990), que supone una inversión en el orden de las extracciones con respecto al de Berezney y Coffey (1974), adelantándose las digestiones enzimáticas a la extracción con alta fuerza iónica (2 M NaCl).

La secuencia de extracciones utilizada fue la siguiente:

1ª- Predigestión con DNasa I.

- Resuspensión de los núcleos en una solución de DNasa I en TM (Apéndice A. Tabla I), incubándolos en ella 30 min a temperatura ambiente.

- Centrifugación durante 10 min a 2500 rpm.

- Lavado con TM 10 min, 2500 rpm.

2ª- Extracción con Tritón X-100.

- Se resuspendieron los núcleos en la solución de TX-100 al 0.5% en TM donde se incubaron 15 min en hielo.

-Centrifugación a 2500 rpm durante 10 min y a 4°C.

- Lavado con TM en iguales condiciones.

3^a- Digestión con nucleasas exógenas.

- Resuspensión en una solución de DNasa I y RNasa A en TM (Apéndice A. Tabla I), incubando 1 h a temperatura ambiente.

- Centrifugación a 2500 rpm, 4°C, 10 min.
- Se lavó el sedimento con TM 10 min, a 2500 rpm.

4^a- Extracción con baja fuerza iónica.

- Resuspensión en LM (Apéndice A. Tabla I). Incubación 15 min en hielo.
- Centrifugación a 2500 rpm, 4°C, 10 min.

5^a- Extracción salina (2 M NaCl).

- Se resuspendió el sedimento en medio HS (Apéndice A. Tabla I), y se incubó 30 min en hielo.

- Centrifugación a 3000-3500 rpm, 4°C, 10 min.
- Tres lavados en TM de 10 min, 3000-3500 rpm.

Tras este último paso obtuvimos las matrices nucleares (NM). Se controlaron al microscopio óptico, tiñéndolas con rojo Ponceau 0.2% en TCA al 3%, comprobando el rendimiento con una cámara de Neubauer.

Al final se lavaron 3x10 min con Tris HCl 0.1 M.

A todas las soluciones se añadieron, en el momento de uso, 1 mM PMSF como

inhibidor de proteasas y 20 mM DTT como reductor.

1.1.3.- Extracción de matrices nucleares con urea.

Con el fin de extraer lo más posible las proteínas de la matriz interna y matriz nucleolar, se sometieron las matrices tras la extracción con HS, a extracción adicional con una solución de urea 4 M, máxima concentración posible para evitar la desorganización de las proteínas de tipo filamento intermedio. El proceso fue el siguiente:

- Resuspensión de la muestra de matrices nucleares en solución de urea 4 M (Apéndice A. Tabla I), incubándose en ella 45 min en hielo.
- Centrifugación a 3500 rpm, a 4°C, 10 min.
- Lavado con TM y con Tris 0.1 M como anteriormente.

El procedimiento completo se esquematiza en la Tabla I del apéndice A.

1.1.4.- Aislamiento de matrices nucleares por el metodo de LIS.

Nos hemos basado en el procedimiento de Mirkovitch y col., (1984).

La muestra de partida fueron núcleos aislados según se indica en el apartado 1.1.1. Estos no se estabilizaron a 42°C, paso necesario en el caso de células animales (Mirkovitch y col., 1984), ya que en otras especies vegetales se ha

comprobado que no es necesario (Avramova y Bennetzen, 1993, Stephanova y col., 1993). El proceso fue el siguiente:

1º- Predigestión con DNasa I.

- Incubación en solución de DNasa I en tampón de digestión (DB) (Apéndice A. Tabla II), 30 min a temperatura ambiente.

- Centrifugación a 2500 rpm, 10 min.

- Lavado en DB 10 min, 2500 rpm, 4°C.

2º- Extracción con solución LIS (Apéndice A. Tabla II).

- Incubación 10 min, a temperatura ambiente con solución LIS.

- Centrifugación a 2500 rpm, 10 min, a temperatura ambiente.

- Lavados 4x10 min, en DB, 2500 rpm, a temperatura ambiente.

3º- Digestión con nucleasas.

- Incubación con solución de DNasa I en DB (Apéndice A. Tabla II), 1 h 30 min a temperatura ambiente.

- Centrifugación a 2500 rpm, 10 min, a 4°C.

- Lavar 6x10 min en DB.

- Congelar las muestras a -70°C en DB con 50% de glicerol.

Todas las soluciones llevaron 1 mM PMSF, 20 mM DTT, 20 µg/ml aprotinina.

Proceso esquematizado en la Tabla II del apéndice A.

1.1.5.- Aislamiento de nucleolos.

Se partió de núcleos aislados en medio de extracción sin acetato magnésico, ya que el ión Mg^{2+} estabiliza los núcleos e interfiere con su ruptura.

El método seguido fue el descrito por Martin y col., (1992a), para aislamiento de nucleolos por sonicación.

Una vez lavados los núcleos, se resuspendieron en medio de extracción de nucleolos (Apéndice A. Tabla III).

Seguidamente se procedió a sonicarlos (amplitud 10 m), sobre hielo, controlando al microscopio óptico su ruptura. Con 10 golpes de sonicación de 15 sg cada uno se rompieron satisfactoriamente la mayoría de los núcleos de la muestra sin afectar significativamente a la morfología de los nucleolos.

Los nucleolos se purificaron centrifugándolos a través de un colchón de sacarosa 1.5 M (Apéndice A. Tabla III). Se controlaron al microscopio óptico tiñéndolos con verde de metilo-pironina.

1.1.6. Extracción de matrices nucleolares.

Los nucleolos aislados y limpios se sometieron a:

1ª- Digestión con DNasa I y RNasa A.

- Se resuspendieron los nucleolos en una solución de DNasa I y RNasa A en TM (Apéndice A. Tabla III). Se incubaron 1 h a temperatura ambiente.
- Se centrifugaron a 3000 rpm, 10 min, a 4°C.
- Se lavaron con TM, 10 min, a 4°C.

2ª- Extracción con alta fuerza iónica (2 M NaCl).

- Resuspensión en HS (Apéndice A. Tabla III), incubando 30 min en hielo.
- Centifugación a 3000 rpm, 10 min, a 4°C.
- Lavados con TM 3x10 min, 3000 rpm, 4°C.
- Finalmente lavados con Tris HCl 0.1 M 3x10 min, 4°C.

Todas las soluciones llevaron 1 mM PMSF y 20 mM DTT. (Esquema del proceso en Tabla III del apéndice A).

1.2.- DINOFLAGELADOS

Encapsulación en microbolas de agarosa.

Para preparar las matrices nucleares "in situ", se encapsularon las células de dinoflagelados en microbolas de agarosa. Los componentes estructurales quedan así inmovilizados evitándose desplazamientos y deformaciones que pudiesen dar lugar

a artefactos a lo largo de las sucesivas extracciones posteriores. La agarosa es permeable y a su través pueden pasar libremente proteínas de hasta 1.5×10^8 D de peso molecular. El método utilizado fue el de Jackson y Cook (1985), modificado.

1º- Concentración de los cultivos centrifugándolos a 500-1000 rpm, 30 min.

2º- Posteriormente se lavaron en tampón A (Apéndice A. Tabla IV), y se centrifugaron a 500-1000 rpm, 10 min a 18°C.

3º- El sedimento se resuspendió en tampón A y se procedió a la encapsulación. En un tubo de centrifuga de fondo redondo se mezclaron:

- 1 volumen de agarosa Low Melt (Bio Rad) al 2.5% en tampón A, a 25°C.

- 1 ó 2 volúmenes de células en el tampón A.

- Rápidamente se añadieron 2 volúmenes de parafina líquida por cada volumen de células en agarosa fundida, agitándose la mezcla en un vortex durante 30 sg.

Se dejó enfriar en hielo 5 min. Se añadió exceso de tampón, y se lavaron las microbolas 2 veces centrifugando 5 min, a 700 g (2500-3000 rpm). Todo el proceso a 4°C.

La preparación se controló al microscopio óptico, observándose la mayoría de los dinoflagelados en el interior de las bolas, que presentan un diámetro variable con valor medio 400 ± 170 μm .

1.2.1.- Extracción de células enteras. Obtención de fracciones de matrices nucleares y citoesqueleto.

A todos los medios se añadieron 1 mM PMSF y 20 mM DTT en el momento de uso.

1º- Lisis del citoplasma.

- Las microbolas con las células se resuspendieron en tampón B (Apéndice A. Tabla IV), con TX-100 al 3% para eliminar la mayoría de los pigmentos que contienen en el citoplasma, y se incubaron en hielo 3x20 min, centrifugando cada vez a 2500 rpm, 10 min, a 4°C.

Aquí se separó una fracción como control de núcleos sin extraer y se continuó con el resto.

2º- Predigestión con DNasa I.

- Se resuspendieron las bolas en una solución de DNasa en TM (Apéndice A. Tabla IV), incubándose 30 min a temperatura ambiente.

- Se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min y a 4°C.

3º- Extracción con LM.

- Resuspensión en solución LM (Apéndice A. Tabla IV), 15 min en hielo.

- Centrifugación 10 min a 2500 rpm y 4°C.

4º- Digestión con DNasa I y RNasa A.

- Resuspensión en la solución de DNasa I y RNasa A en TM (Apéndice A. Tabla IV), 1 h a temperatura ambiente.

- Centrifugación a 2500 rpm durante 10 min, a 4°C.

5º- Nueva extracción con LM.

- En las mismas condiciones que la realizada en el punto 3º.

6º- Extracción con HS.

- Resuspensión en solución HS (Apéndice A. Tabla IV), 45 min, en hielo.

- Centrifugación 10 min a 2500 rpm, a 4°C.

- Posteriormente se lavaron con TM 3x10 min, a 4°C y otros 3 lavados iguales con Tris HCl 0.1 M pH=7.4.

La extracción se controló al microscopio óptico en contraste de fase.

La preparación de matrices nucleares puede efectuarse sin encapsular las células, variando la velocidad de centrifugación.

El proceso experimental se esquematiza en la Tabla IV del apéndice A.

1.2.2.- Obtención de matrices nucleares por el método de LIS.

El proceso es exactamente igual al descrito en el apartado 1.1.4. para matrices

nucleares de *A. cepa* (Apéndice A. Tabla II). La única variación fue que antes de iniciar la extracción hubo que eliminar los pigmentos del citoplasma de las células de *A. carterae*, con Triton X-100 al 3% en TM, incubando durante periodos de 20 min y centrifugando después 10 min a 2000 rpm entre extracción y extracción, hasta su eliminación casi total.

2.- ANALISIS DE PROTEINAS

2.1- ELECTROFORESIS MONODIMENSIONAL

La electroforesis de proteínas se realizó en geles verticales de poliacrilamida, SDS-PAGE (Laemmli, 1970), de forma que las proteínas se separaron en función de su peso molecular.

La concentración de poliacrilamida se determinó en función del rango de peso molecular de las proteínas objeto de estudio. La más usada fue 10% para el gel de separación y 4% para el de concentración, separándose bien las proteínas en el intervalo 10-110 KD. Cuando quisimos ampliar el rango de separación hasta 220 KD, fue del 8% el de separación y 4% el de concentración.

Se utilizaron cubetas de electroforesis de dos tipos, PROTEAN II de BIO-RAD para hacer geles grandes, y la cubeta MINI-PROTEAN II de BIO-RAD para geles pequeños.

Las muestras, una vez lavadas con Tris HCl 0.1 M, se congelaron a -20°C y se liofilizaron para después valorarlas.

En el caso de las muestras de dinoflagelados, los pigmentos residuales, que interfieren con el SDS, se eliminaron con eter de petróleo (50-70°C), según Zurdo y col., (1991). Posteriormente se liofilizaron nuevamente las muestras.

Se han utilizado dos métodos de valoración de proteínas, ambos colorimétricos. El de Lowry y col., (1951), en el que se prepara una curva patrón con BSA de forma que el rango de detección queda establecido entre 30 y 300 µg.proteína/ml. El segundo está basado en el de Bradford, (1976), es el método comercial de BIO-RAD, con las ventajas sobre el anterior de ser más rápido, la absorbancia permanece estable más tiempo, y está libre de la mayoría de las interferencias del Lowry.

Una vez valoradas, las muestras se disociaron en tampón de disociación (Apéndice B. nº 4). La disolución en él se realizó 24 h antes de la electroforesis, y se facilitó con unos golpes de sonicación. Los restos sólidos que quedaron se eliminaron por centrifugación. Antes de cargar las muestras se hirvieron 10 min. La cantidad de proteína por pocillo, fue de unos 25 µg en un volumen máximo de 100 µl para geles grandes y 5 ó 10 µg en un volumen máximo de 25 µl para los pequeños.

Se utilizó tampón de electrodos de Laemmli (1970) (Apéndice B. nº 5).

Se utilizaron patrones de BIO-RAD, de alto rango de peso molecular (200 KD-

45 KD) en los geles al 8%, y de bajo rango (97 KD-14 KD) en los geles al 10%.

En la PROTEAN II, se llevó a cabo la electroforesis, con una intensidad de corriente constante de 20 mA por placa para el gel de concentración, y 40 mA por placa para el de separación. Como tiene circuito cerrado de refrigeración, se realizó a temperatura ambiente.

En la MINI-PROTEAN II, se realizó con voltaje constante de 50 V el gel de concentración y 120-150 V de separación. Al no estar refrigerada, se introdujo en hielo durante todo el proceso.

Finalizado el proceso, las proteínas de los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o alternativamente se tiñeron con azul de Coomassie (Apéndice B. nº 6), incubándolos en la solución 30 min-1 h, en agitación constante. Después se decoloraron (Apéndice B. nº 7) hasta ver las bandas. Finalmente se conservaron en metanol 10% y se fotografiaron.

En el caso de geles en que la cantidad de proteína no fue la suficiente para ser detectadas con Coomassie, se tiñeron con plata, según se describe a continuación:

- 1- Fijación en 50% etanol y 10% acético: 30 min o noche.
- 2- Incubación en 5% etanol+1% ácido acético: 15 min.
- 3- Lavar con H₂O dd: 3x5 min.
- 4- Incubación en Na₂S₂O₃·5H₂O 0.2 g/l (recién preparado): 1 min.

- 5- Lavar con H₂O dd: 3x30 sg.
- 6- Incubar en AgNO₃ 2 g/l, 37% de ácido fórmico 750 µl/l: 20 min en oscuridad.
- 7- Eliminar el exceso de AgNO₃ con H₂O dd: 2x20 sg.
- 8- Revelado, 2 ó 3 min con:

Na ₂ CO ₃	60 g/l.
HCOH	0.5 ml/l.
Na ₂ S ₂ O ₃ .H ₂ O	20 ml/l.
- 9- Parar el revelado con ácido acético 5%: máximo de 10 min, si es mas tiempo se puede producir un descenso del color de las bandas.

2.2- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Basada en la descrita por O'Farrell (1975). Las proteínas se separan dependiendo de su peso molecular y su carga. Una sola banda en un gel monodimensional puede corresponder realmente a varias proteínas de igual peso molecular pero con distinto punto isoeléctrico (pI).

Las muestras se valoraron como en el apartado (2.1).

La cubeta utilizada fue la MULTIPHOR II de PHARMACIA.

2.2.1.- Isoelectroenfoque. (IEF).

Es la primera dimensión. Las proteínas se separan en función de su carga. Los geles utilizados fueron los de PHARMACIA. Son geles de poliacrilamida que contienen

un gradiente de pH inmovilizado, en nuestro caso de 3.0-10.5, creciente desde ánodo a cátodo.

El tampón de muestra lleva Pharmalitos (Apéndice B. nº 8).

Una vez rehidratados los geles de IEF, se cargaron las muestras, 40 µg de proteína por pocillo en un volumen máximo de 40 µl. Se hizo a temperatura ambiente porque la cubeta tiene un circuito de refrigeración. Las proteínas cargadas en el ánodo migraron hasta la zona en que el pH se igualó con su pI, lugar donde su carga se hizo 0, quedando inmovilizadas.

La duración de esta primera parte fue de unas 22-24 h. El proceso queda esquematizado en la tabla que se presenta a continuación:

	V	mA	W	TIEMPO
1ª Fase	300	Max.	Max.	3 h.
2ª Fase	300-1400. Intervalos de 30 min.	Max.	Max.	4 h.
3ª Fase	1400	Max.	Max.	13 h.
4ª Fase	2000	Max.	Max.	3-4 h.

2.2.2- SDS-PAGE.

Es la segunda dimensión. Los geles se polimerizaron en las mismas condiciones que para una electroforesis SDS-PAGE monodimensional, con una concentración de acrilamida del 10% el gel de separación y 4% el de concentración.

Los patrones utilizados fueron de rango de peso molecular bajo, coloreados de BIO-RAD.

Los geles de IEF, con las proteínas separadas según su carga, se equilibraron en solución de equilibrio (Apéndice B. nº 9).

El proceso se realizó en dos fases de 10 min cada una. En la primera, las tiras se introdujeron en dicha solución con 25 mg de DTT/10 ml. En la segunda, la solución llevó 0.45 g de iodoacetamida/10 ml.

Las tiras de IEF no utilizadas inmediatamente, se guardaron en nevera a -20°C ó -80°C hasta su uso.

Una vez equilibradas las tiras de IEF se colocaron sobre el gel de concentración de la segunda dimensión. Las condiciones del proceso fueron las siguientes:

1º- 20 mA - Hasta que la muestra sale de las tiras de IEF: alrededor de 25 min.

2º- 50 mA - Hasta que la muestra entra en el gel de separación: 5 min.

3º- 50 mA - Se desplaza el buffer de ánodo al lugar en que estaba la tira de IEF: hasta el final del proceso, 1h 30 min.

El cálculo de los pesos moleculares relativos de las bandas o "spots", según se trate de electroforesis monodimensional o bidimensional, se hizo siguiendo el método de Weber y Osborn (1969), basado en la proporcionalidad directa existente en los geles de SDS-PAGE entre la movilidad electroforética y el peso molecular.

La adscripción de "spots" en los geles bidimensionales se realizó perfilándolos en hojas transparentes de acetato, a partir de fotografías de los geles correspondientes, obtenidas todas ellas a iguales aumentos. La comparación de los distintos geles se hizo manualmente, superponiendo las transparencias sobre las fotografías de las distintas fracciones, utilizando los patrones de peso molecular como referencia. Una serie de "spots" que aparecían bien preservados en las diferentes fracciones, se utilizaron como marcadores para comparar el resto de las proteínas.

2.3.- ELECTROTRANSFERENCIA

La transferencia de las proteínas de los geles a membranas de nitrocelulosa se realizó de dos formas:

2.3.1.- Sistema de transferencia semiseco.

La cubeta utilizada fue de MILLIPORE, MILIBLOT™-GRAPHITE ELECTROBLOTTER, con tampones de baja fuerza iónica (Apéndice B. nº 10)

Condiciones de transferencia:

Intensidad de corriente 2.5 mA/cm².
Voltaje 10-20 V.
Tiempo 45 min.

Las proteínas quedan adsorbidas a la membrana de nitrocelulosa con sus grupos funcionales accesibles.

La efectividad de la transferencia se observó tiñendo las membranas con rojo Ponceau 0.2% en tricloroacético al 3%, la tinción es reversible y se elimina simplemente lavando con H₂Odd.

Este sistema es parcialmente efectivo, ya que en el gel, si teñimos con Coomassie, se siguen viendo muchas bandas después de la transferencia.

2.3.2.- Sistema de transferencia húmedo.

La cubeta utilizada fue la MINI-PROTEAN II de BIO-RAD con el módulo MINI TRANS-BLOT para geles de 7.5x10 cm y para los de mayor tamaño, el standard

TRANS-BLOT. Se siguió el método descrito por Towbin y col., (1979).

El tampón de transferencia en este caso es único (Apéndice B. nº 11). Las condiciones de transferencia fueron:

Voltaje 100 V constantes.

Tiempo 1 h.

Intensidad 250-260 mA de media.

En ambos casos las membranas se guardaron a -20°C ó -80°C. hasta su uso.

2.4- INMUNOBLOTTING

Las proteínas transferidas al tener sus grupos funcionales reactivos expuestos, pueden reaccionar con anticuerpos específicos, o con antisueros. Para detectar la reacción se utilizaron anticuerpos secundarios unidos a marcadores visuales como es el caso de la peroxidasa, que se tiene que revelar mediante una reacción química. El protocolo que se siguió fue:

- Prelavado de las membranas con PBS+0.5% Tween 20: 10 min.
- Bloqueo de las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos a las membranas: incubación durante 30 min-1 h con una solución de proteínas inespecíficas, que en nuestro caso fue de leche en polvo descremada al 5% en PBS+0.5% Tween 20.
- Incubación con el anticuerpo primario diluído en solución de bloqueo

(Apéndice A. Tabla V): durante 1 h 30 min-2 h.

- Lavados con 0.5% Tween 20 en PBS: 3x10 min.

- Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, específico contra la clase de inmunoglobulina y especie del anticuerpo primario, diluido en la solución de bloqueo (Apéndice A. Tabla VI): 1 h.

- Lavados con PBS+0.5% Tween 20: 3x10 min.

Para visualizar las proteínas reconocidas se utilizaron dos métodos, cuya diferencia está en el sustrato con que se hace reaccionar a la peroxidasa, provocándose en un caso una reacción colorimétrica y en otro quimioluminiscente:

a) Después de los lavados, las membranas se incubaron con una solución formada a partir de otras dos que son:

Diaminobencidina 0.2% (P/V) en metanol.

4-Cloronaftol 0.6% (P/V) en metanol.

La solución final queda de la siguiente forma:

10% de (diaminobencidina 0.2% en metanol).

10% de (4-cloronaftol 0.6% en metanol).

0.02% de H_2O_2 .

Las bandas se observan de un color gris-violáceo al cabo de unos segundos o minutos según la intensidad de la reacción. Después de lavar con H_2O 5 min, se fijaron con H_2SO_4 10 mM unos segundos, volviéndolas a lavar con H_2O y

dejándolas secar.

b) Utilizando un sistema de detección basado en una reacción quimioluminiscente provocada por la peroxidasa:

- Se incubaron las membranas con los reactivos ECL de Amersham para Western Blotting, 1 min a temperatura ambiente.

- Una vez secas las membranas, se expusieron a una película fotográfica X-OMAT de KODAK, en un soporte para exponer autoradiografías, durante un tiempo variable según la intensidad de la reacción, de forma que la emisión luminosa impresiona la película detectándose la banda o bandas correspondientes.

Este sistema es más sensible. Mientras que el cloronaftol detecta un mínimo de 500 pg de proteína, el sistema quimioluminiscente tiene su rango por debajo de 1 pg.

En los experimentos de inmunoblotting se han realizado distintos controles: controles negativos omitiendo la incubación con el anticuerpo 1º, para comprobar la especificidad del anticuerpo 2º; controles positivos haciendo reaccionar los anticuerpos 1ºs con las proteínas contra las que se desarrollaron, o con proteínas semejantes con las que deberían reaccionar, para ver la especificidad de los anticuerpos 1ºs.

2.5- ENSAYOS DE ASOCIACION DE SECUENCIAS MAR A MATRICES NUCLEARES

Las muestras utilizadas fueron por un lado matrices nucleares obtenidas por el método de extracción con LIS siguiendo los estudios realizados por Izarraulde y col., (1988) y Ludérus y col., (1992), y por otro, matrices nucleares extraídas con HS (2 M NaCl), ya que en ensayos de este tipo llevados a cabo en otras especies de plantas (Avramova y Bennetzen 1993; Stephanova et al 1993) se ha demostrado que se comportan de forma semejante en cuanto a capacidad de ligar DNA exógeno.

Como control se han utilizado matrices nucleares de hepatocitos de rata que se sabe ligan secuencias MAR específicamente y con una gran afinidad (Ludérus y col., 1992). Dichas matrices obtenidas según Mirkovitch y col., (1984), difieren con respecto a las de *A. cepa* y *A. carterae* en que los núcleos se estabilizaron a 42°C, 20 min, no fue necesaria la predigestión con DNasa I y la digestión se llevó a cabo con enzimas de restricción (Eco RI, Hind III y Xho I), en lugar de con nucleasas (Ludérus y col., 1992).

La secuencia MAR utilizada para el estudio ha sido la del gen de las histonas de *Drosophila* (Mirkovitch y col., 1984). Los ensayos los hemos realizados según Ludérus y col., (1992).

A- Marcado de los fragmentos de DNA con [³²P]-dATP.

Los fragmentos de DNA obtenidos tras tratar el plásmido pBR322, que contenía la secuencia MAR de Drosophila, con los enzimas de restricción Hind III, Eco RI, Aco I y Pst I, se marcaron radiactivamente con [α -³²P]-dATP utilizando el fragmento Klenow de la RNA Pol I de E.coli (Maniatis y col., 1982).

Protocolo:

DNA (1 mg/ml)	10 μ l.
Tampón	1 μ l.
dATP ⁻ mezcla	1 μ l.
(dGTP, dTTP, dCTP; 0,5 mM cada uno).	
H ₂ O	6 μ l.
Fragmento Klenow	1 μ l.
[α - ³² P]-dATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	1 μ l.

- Se añadió todo menos dATP⁻ y [α -³²P]-dATP y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.
- Se añadieron los nucleótidos incubándose 30 min a temperatura ambiente.
- Se añadieron 130 μ l de tampón TE (Apéndice B. nº 12)
- Se separaron los fragmentos de DNA de los nucleótidos que no se

incorporaron mediante cromatografía con una columna Penefski (Maniatis y col., 1982):

- a- Se llenó una jeringuilla de 1 ml con Sephadex G50 disuelto en TE, habiendo colocado un trozo de algodón esteril en la base.
- b- Se introdujo en un tubo de corex de centrifuga y se centrifugó 1 min en una centrifuga Hettich a 1300 rpm.
- c- Se repitió el proceso añadiendo 150 µl de TE.
- d- Se vació el tubo de corex, y se colocó en el un eppendorf, introduciendo la jeringuilla en él.
- e- Se colocó la mezcla marcada radiactivamente en la jeringuilla (150 µl), y se centrifugó en una centrifuga de mesa Homef 15 sg en posición 7, luego 75 sg en 1.

Los nucleótidos no incorporados se quedaron en la columna, recogándose la mezcla de fragmentos de DNA marcados.

B- Preparación de las muestras.

Las matrices de *A. cepa* y *A. carterae* se lavaron con DB sin Mg^{2+} , y con 5 mM EDTA, con el fin de eliminar toda la posible DNasa que pudiera quedar, y en caso de que algo permaneciera que no actuase sobre los fragmentos de DNA.

Todas las muestras se llevaron a 100 µl finales con DB (concentración 10^6 equivalentes nucleares/100 µl), junto con la cantidad de DNA sonicado de *E. coli*,

como competidor no específico, apropiado a cada muestra, entre 0 y 100 µg.

C- Ensayo de asociación propiamente dicho.

a- A cada muestra se le añadieron 3 µl de la mezcla de DNA marcada con ³²P, incubándose a 37°C durante una noche, de forma que las secuencias MAR se asocien a las matrices desplazando a las endógenas.

b- El DNA no asociado se separó del ligado mediante centrifugación a 10000 rpm. 5 min, de forma que se recogen:

Sobrenadante=DNA sin asociarse.

Sedimento=matrices nucleares+DNA asociado.

c- Finalmente se separaron los fragmentos de DNA de ambas muestras en geles de agarosa, para lo cual hubo que precipitar los fragmentos de DNA tanto de sedimentos como de sobrenadantes:

1- Los sobrenadantes que contenían los fragmentos no unidos se trataron con 0.05 volúmenes de ácido acético y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, a -20°C. 15 min.

- Después se centrifugaron 45 min, a 4°C en una centrífuga eppendorf.

- Los precipitados se lavaron con etanol 70%, y se centrifugaron a 10.000 rpm, 10 min.

- Finalmente los precipitados de DNA se resuspendieron en tampón TE (Apéndice B. nº 12) y se les añadió tampón de muestra para la electroforesis en geles de agarosa (Apéndice B. nº 13).

2- Los sedimentos que contenían las matrices con los fragmentos de DNA que se les unieron, se trataron primero con proteinasa K (Apéndice B. nº 14) con el fin de digerir las proteínas y que quedaran solo los fragmentos de DNA. Los incubamos a 37°C, 3 h, después de los cual se centrifugaron 5 min a 10.000 rpm , de forma que no debía quedar sedimento alguno.

- Posteriormente se precipitó el DNA como en el caso de los sobrenadantes.

Una vez que se tuvieron listas las muestras de DNA, se procedió a separar los fragmentos en un gel de agarosa al 1% en TBE (Apéndice B. nº 15) previamente polimerizados.

El tampón utilizado para el proceso fue TBE.

Se colocó el gel en la cubeta, se cubrió con TBE, y se cargaron las muestras en los pocillos, contrastando siempre cada sobrenadante con su sedimento correspondiente para facilitar la comparación. Junto con las muestras se cargó un pocillo con la mezcla de todos los fragmentos que se utilizaron en el ensayo, para tener un control de los que se unieron y también para comprobar que estaba en buen estado el DNA marcado.

El proceso se realizó a 120 V.

Una vez terminada la electroforesis, se dejó secar el gel 30 min sobre papel de filtro, y ya seco, se colocó sobre papel de filtro nuevamente, se cubrió con plástico

sarangrap y se introdujo en un soporte de exposición de autoradiografías dejándolo exponer con una película durante una noche a -70°C . Al día siguiente se reveló observándose la señal.

2.6.- TINCION CON BISMUTO PARA PROTEINAS FOSFORILADAS SOBRE PROTEINAS TRANSFERIDAS

La técnica ha sido descrita por Moreno Díaz de la Espina y col., (1993b).

Se fijaron las membranas de nitrocelulosa con glutaraldehído (GA) al 6% en PBS. 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS para eliminar los restos de fijador, 3x10 min y otros 3x10 min con trietanolamina (TRA) 0.2 M pH=7. Tras los lavados se procedió a la incubación con la solución de nitrato de bismuto:

- 1 parte de una solución de 400 mg de tartrato de sodio disueltos en 10 ml de NaOH 1 N reciente, a la que se añaden lentamente 200 mg de nitrato de bismuto hasta su disolución.

- 2 partes de 0.2 M TRA pH=7.

Mezclar justo en el momento de la tinción, pH final 7-7.5.

La membrana se incubó en dicha mezcla 1 h a temperatura ambiente. Se lavó con TRA 0.2 M pH=7. El Bi que reaccionó con las proteínas se reveló con $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ al 0.5%.

El agua que se utilizó para hacer todas las soluciones fue bidestilada, hervida y enfriada justo en el momento de usarla, ya que el bismuto precipita con mucha facilidad.

3.- PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA

3.1.- FIJACIONES

El método de fijación utilizado dependió de la finalidad de la muestra.

Las muestras podían ser de dos tipos, sedimentos o muestras manejables individualmente. En el caso de los sedimentos se procedió resuspendiendo estos en los fijadores y soluciones de lavado, y recuperándolos por centrifugación. En el segundo caso las muestras se sumergieron en las soluciones, que se fueron reemplazando con pipeta.

3.1.1.- Fijación para microscopía electrónica convencional.

a- Fijación con glutaraldehído 3%

Se preparó en el momento de uso a partir de glutaraldehído (GA) comercial al 25% (TAAB), en cacodilato 0.025 M pH=7.

El protocolo de fijación fue el siguiente:

Resuspensión de los sedimentos o inmersión de las microbolas de agarosa en GA al 3%, en el último caso se desgasificaron durante 30 sg para favorecer la penetración del fijador a las células. Fijación 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con cacodilato 0.025 M 3x1 h para eliminar los restos de fijador.

En el caso de sedimentos, se pasó a preincluirlos en agar:

Se preparó agarosa al 2% en H₂Odd, calentándola para que se disolviera. Una vez disuelta se dejó enfriar, y justo antes de que solidificase, se añadió sobre el sedimento, se mezcló con una aguja enmangada, y se dejó solidificar. Una vez sólido, se sacó del eppendorf el bloque, y se troceó con una cuchilla. Las porciones se lavaron 30 min a 4°C, con PBS, para eliminar las impurezas del agar. A partir de aquí se siguió manejando cada porción como una muestra individual.

B- Postfijación con tetróxido de osmio.

El ácido ósmico se preparó 24 h antes de ser utilizado:

Se cogió una ampolla de 0.5 g de tetróxido de osmio, se introdujo en agua caliente, y luego fría para que el tetróxido de osmio cristalizase en las paredes de la ampolla, que se introdujo en mezcla crómica para limpiar el cristal.

Posteriormente se sumergió 2 h en H₂Odd para limpiarla, lavando también con ella la varilla que se va a utilizar. Pasado ese tiempo se introdujo la ampolla dentro de un

frasco topacio, se calentó la varilla al rojo vivo y se rompió la ampolla, añadiendo muy rápido 25 ml de H₂O para disolver el tetróxido de osmio. Se obtuvo así una solución de ácido ósmico al 2%. Se diluyó con tampón cacodilato 0.05M pH=7 en proporción 1:1 de forma que obtuvimos una solución al 1%.

Las muestras se sumergieron en la solución, tras desgasificar 30 sg, se incubaron en ella 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron 3x30 min con cacodilato 0.025 M pH=7.

3.1.2.- Fijación para inmunocitoquímica.

Para microscopía electrónica se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%, o bien mezclas de fijadores, PFA 4%+GA 0.25%.

Preparación de PFA al 4% en PBS pH=7.4 (Apéndice B. nº 16):

El PBS se calentó a 60°C, se añadió el PFA, de forma que se formó una suspensión. Una vez en frío se añadió NaOH 1 N gota a gota para disolver el PFA del todo. Se ajustó el pH a 7.4.

La fijación se realizó a 4°C durante 2 h. Posteriormente se lavó la muestra con PBS tres veces sucesivas de 10 min cada una.

3.1.3.- Fijación para tinción con Bismuto.

Se preparó GA al 6% en tampón cacodilato 0.025 M pH=7.2 en el momento de uso.

Se fijaron las muestras 2 h a temperatura ambiente, y se lavaron 3 veces sucesivas de 1 h cada una en el mismo tampón.

3.2.- DESHIDRATACION, INFILTRACION E INCLUSION EN LR WHITE

Deshidratación.

Todas las muestras una vez fijadas, se sometieron a deshidratación, para inclusión en resinas acrílicas, en una serie gradual de alcoholes de la siguiente forma:

Etanol al 30%	30 min	4°C.
Etanol al 50%	30 min	4°C.
Etanol al 70%	Noche	4°C.
Etanol al 90%	60 min	4°C.
Etanol 100%	30 min	4°C.
Etanol "	30 min	4°C.
Etanol "	30 min	4°C.

Infiltración e inclusión.

Se utilizó la resina comercial LR White (London Resin), que viene preparada para usarla directamente.

La infiltración se llevó a cabo en tres fases:

- Fase 1- Etanol al 100%/LR White 2/1 3 h- 4°C.
- Fase 2- Etanol al 100%/LR White 1/2 3 h- 4°C.
- Fase 3- LR White. 3-4 días, 4°C, cambiando la resina.

La inclusión se realizó utilizando cápsulas de gelatina. Las muestras se depositaron en el fondo y se cubrieron con resina hasta llenar totalmente las cápsulas. Se taparon e introdujeron en una estufa a 60°C durante 20-22 h para su polimerización.

3.3- ULTRAMICROTOMIA

En los diferentes bloques de inclusión se seleccionó la zona de interés, y se talló la pirámide, conteniendo las muestras seleccionadas al microscopio óptico, con un PYRAMITONE LKB 11.800.

Una vez talladas las piezas, se obtuvieron cortes ultrafinos con un ultramicrotomo REICHERT ULTRACUT E recogéndolos sobre rejillas de níquel, cobre u oro según su uso posterior. Los cortes se realizaron con una cuchilla de diamante

de DIATOME.

3.4.- CONTRASTACION DE LOS CORTES: ACETATO DE URANILO; CITRATO DE PLOMO

Acetato de uranilo.

Se preparó una solución de acetato de uranilo al 5% en H₂O_{dd}. Se filtró y centrifugó 15-20 min a 3000 rpm. (En oscuridad).

Protocolo de tinción:

Se flotaron las rejillas sobre gotas de acetato de uranilo, con los cortes en contacto con la solución, 20 min. en oscuridad. Al final se lavaron bien con agua bidestilada varias veces.

Citrato de plomo.

Se preparó la solución como se indica:

Citrato de plomo	0.02 g.
NaOH	0.05 ml.
H ₂ O _{dd}	5 ml.

Se hirvió 15 min un tubo de centrifuga, con unas lentejas de NaOH, en H₂O_{dd} previamente hervida y enfriada. En él se mezcló el citrato de plomo el H₂O_{dd} y NaOH

10 N. Se agitó bien y se puso parafina sobre la solución. Se centrifugó 5 min a 700 g.

Protocolo de tinción:

Las rejillas se depositaron sobre gotas de citrato de Plomo 1 min. Se realizó dentro de una cámara húmeda y en presencia de unas lentejas de NaOH para que el plomo no precipitase con el CO₂ del aire. Luego se lavaron abundantemente en H₂Odd.

4.- TECNICAS CITOQUIMICAS

4.2.- TINCION CON BISMUTO PARA PROTEINAS FOSFORILADAS

La técnica se basó en la de Puvion Dutilleil y Laithier, (1987).

Los cortes ultrafinos procedentes de bloques fijados según se indicó en el apartado (3.1.4) se recogieron sobre rejillas de cobre, se tiñeron con las soluciones que se indican en (2.4) incubando en la solución final durante 30 min. Posteriormente se lavaron con H₂O bidestilada 3x10 min.

La observación al microscopio electrónico se hizo a 60 KV, sin contrastación adicional.

5.- TECNICAS INMUNOCITOQUIMICAS

5.1.- INMUNOFLUORESCENCIA

Se partió de las muestras obtenidas en el apartado 1. Los sedimentos se fijaron con PFA 0.4% en PBS pH=7, 30 min a temperatura ambiente, se eliminó el fijador por centrifugación, y se lavaron con PBS varias veces. Seguidamente se hicieron frotis sobre portas cubiertos con una solución de Poli-L-lisina al 0.1%.

Protocolo:

Los portas se lavaron bien con alcohol al 96%, 15 min. Se secaron y se cubrieron con la solución de Poli-L-lisina al 0.1% durante 30 min en un ambiente húmedo. Se eliminó el sobrante, se lavaron con H₂Odd, y se dejaron secar a temperatura ambiente toda la noche. Hasta su utilización se guardaron en nevera a -20°C.

Antes de la reacción inmunocitoquímica se permeabilizaron los frotis con Triton X-100 1%, entre 30 min y 1 h.

Reacción inmunocitoquímica:

- Incubación en solución de bloqueo PBS+0.05% de Tween 20+2% de BSA, durante 30 min a temperatura ambiente.

- Para la incubación con el anticuerpo 1^º se siguieron dos procedimientos diferentes:

a) Incubación de los frotis con los anticuerpos 1^{ºs} diluidos en solución de

bloqueo (Apéndice A. Tabla VII), 1 h 30 min, en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

b) Utilizando microondas (Medina y col., 1994):

Se colocaron los portas en una cámara húmeda, sobre parafilm. Se añadió sobre ellos 1 ml de solución de anticuerpo 1^º y se aplicaron las microondas durante 18 sg, pasados 30 sg se les aplicó otro golpe de microondas de 18 sg, controlando siempre que la superficie tuviese líquido.

- Se lavaron después con PBS+0.05% Tween 20 en abundancia, dejando los portas cubiertos con dicha solución 2x10 min.

- Incubación con el anticuerpo 2^º conjugado con FITC, en solución de bloqueo (Apéndice A. Tabla VIII), 1 h a temperatura ambiente.

- Lavados con PBS+0.05% Tween 20 abundantemente, y 2x10 min. Lo mismo se hizo a continuación con H₂Odd.

- Para evitar que la fluorescencia decayera rápidamente se montaron las preparaciones con un medio anti-fading: 90% de glicerol (V/V) y 0.1% de p-difenilamina (P/V) en PBS, pH=9 con tampón carbonato/bicarbonato. El anti-fading llevó fluorocromo HOECHST 33342 al 15% (V/V) que se une al DNA, sirviendo como referencia para la ubicación de la reacción fluorescente.

Se hicieron controles negativos para comprobar que las reacciones no eran inespecíficas. Para ver la especificidad de los anticuerpos 2^{ºs}, los controles en lugar de incubarse con el anticuerpo 1^º se incubaron con tampón de dilución o con inmunoglobulinas de la especie productora del anticuerpo. Controles con anticuerpos

desarrollados contra proteínas no relacionadas y también controles positivos para comprobar la reactividad de los anticuerpos 1^{os}.

La reacción se observó con un microscopio de fluorescencia con un filtro cuyo margen de transmisión es de 450-490 nm. La fluorescencia del Hoechst se observó con un filtro ultravioleta, con un máximo de transmisión a 365 nm. Se tomaron fotografías de la reacción con el Hoechst, la reacción del anticuerpo con FITC, y de contraste de fase.

5.2.- MICROSCOPIA CONFOCAL DE BARRIDO POR LASER

Esta técnica presenta varias ventajas respecto a la microscopía de epifluorescencia. Además de su mayor resolución y sensibilidad, permitir efectuar secciones ópticas en diversos planos de la muestra, eliminando de esta forma la fluorescencia fuera del plano focal.

Las muestras para microscopía confocal se prepararon como las de fluorescencia convencional, excepto que las fracciones se depositaron sobre portas excavados cubiertos con polilisina, y se dejaron secar al aire para impedir su aplastamiento. Posteriormente la incubación con los anticuerpos y el montaje se hicieron según el método convencional.

Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal de barrido por laser TCS 4D de Leica, con un laser multilínea de argon/krypton de 75 mW para

488nm, 568 nm y 647 nm, equipado con un microscopio invertido Leitz DMIRB con objetivos PL Fluotar: x16 y x40; y una unidad CPU Motorola 68040. Para la observación del FITC el laser de argon/krypton se ajustó a 488 nm. Las imágenes se registraron mediante secciones ópticas de 0.8 μm de espesor y se fotografiaron directamente del monitor de color de 21" de alta resolución (1280x1024 pixels).

5.3.- INMUNOMARCADO CON ORO

Como la anterior, esta es una técnica indirecta. Se utiliza un anticuerpo primario que reconoce específicamente un epitopo en la superficie del corte, dicho anticuerpo es reconocido por un anticuerpo 2º marcado con oro coloidal.

Los cortes de las muestras procesadas según el apartado 3.1.2., se recogieron sobre rejillas de níquel.

Protocolo:

Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente y flotando las rejillas sobre las gotas de las distintas soluciones.

- Se prelavaron las muestras con PBS+0.05% Tween 20, 10 min.
- Bloqueo con PBS+0.05% Tween 20+2% de suero normal o BSA, 30 min.
- Incubación con los anticuerpos 1º diluidos en solución de bloqueo (Apéndice A. Tabla IX), 1 h 30 min-2 h.

- Lavados con PBS+0.05% Tween 20, 3x10 min.
- Incubación con los anticuerpos 2^{os} conjugados con oro coloidal diluidos en solución de bloqueo (Apéndice A. Tabla X), 30 min.
- Lavados con PBS+0.05% Tween 20, 3x10 min.
- Lavados con H₂Odd, 3x10 min.
- Los cortes se dejaron secar 5 min y se tiñeron con acetato de uranilo al 5%, en oscuridad, durante 5-10 min, lavando finalmente con H₂Odd.

Los controles negativos fueron como los de inmuno fluorescencia.

6.- METODO DE CUANTIFICACION DEL INMUNOMARCADO

Para analizar la distribución del marcado en los experimentos de inmunolocalización con oro para microscopía electrónica, se realizó un análisis cuantitativo semiautomático estudiando la densidad de partículas en cada compartimento de las matrices nucleares.

En cada caso se partió de 30 micrografías con aumentos constantes entre 10.000x-20.000x. Dichos negativos al positivarse se ampliaron por 3 sobre papel fotográfico de 18x24 cm.

El ordenador utilizado fue un TANDOM TARGET 586SX/16MHz, conectado a un tablero digitalizador SUMMAGRAPHICS SUMMASKETCH PLUS. El software lo preparó la empresa Filosoft. Para calcular el número de partículas por unidad de área,

el programa necesita que se delimite el contorno de cada estructura que interese, así como contar todas las partículas de oro micrografía por micrografía. Se puede ir siguiendo el proceso en la pantalla para evitar posibles errores. Automáticamente se asignan las partículas de oro a su compartimento correspondiente, obteniéndose para cada uno su área, número de partículas y densidad de marcado (número de partículas por unidad de area). Estos datos se procesaron matemáticamente con la hoja de cálculo SYMPHONY de LOTUS CORPORATION. Según el anticuerpo estudiado se evaluó su mayor afinidad por la matriz nucleolar, la matriz interna o la lámina.

La representación gráfica de los resultados se hizo en histogramas utilizando el programa HARVARD GRAPHICS.

RESULTADOS

I.- ALLIUM CEPA

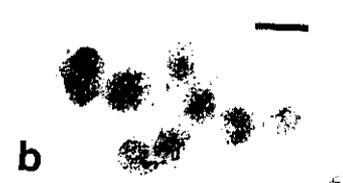
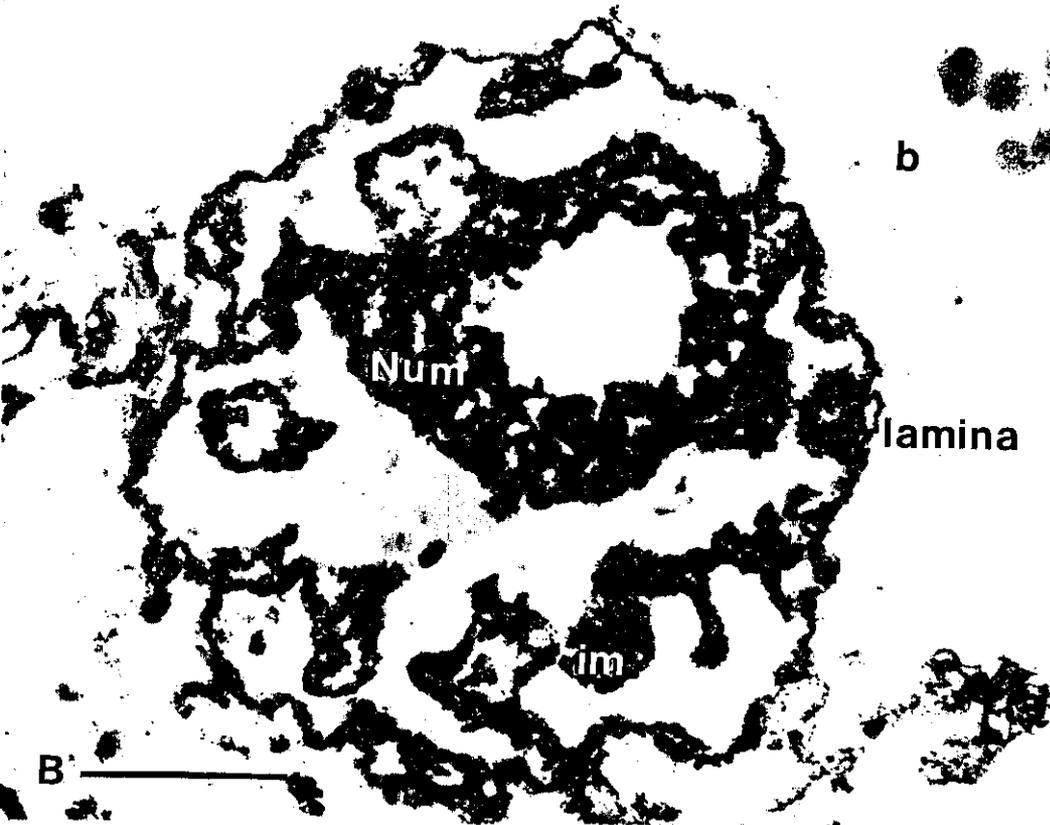
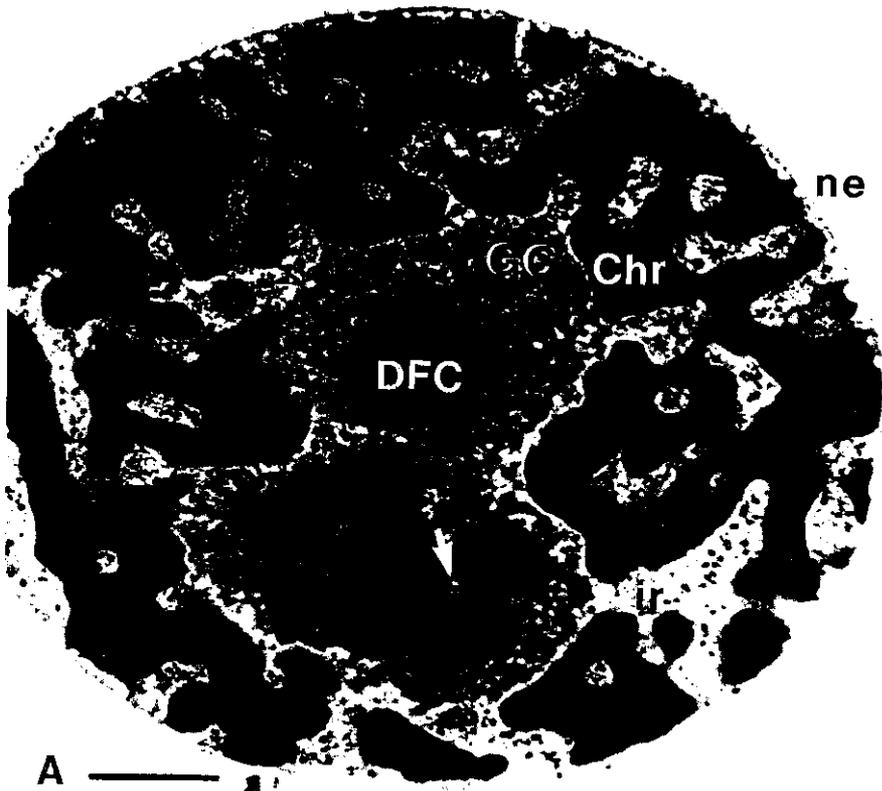
1.- AISLAMIENTO DE MATRICES NUCLEARES. ORGANIZACION ESTRUCTURAL

Las matrices nucleares se obtuvieron a partir de núcleos aislados (Apéndice A. Tabla I).

Cuando se observaron los núcleos aislados teñidos con verde de metilopironina, al microscopio óptico, se comprobó que presentaban una buena preservación estructural, distinguiéndose los nucleolos muy densos y las masas de cromatina condensada (Fig. 1 a).

En secciones ultrafinas de núcleos aislados fijados con glutaraldehído-osmio y contrastados con acetato de uranilo, se observan con detalle las masas de cromatina condensada, el nucleolo con sus componentes bien diferenciados, la envuelta nuclear y la región intercromatínica rica en fibras y gránulos (Fig. 1 A).

Una vez comprobado que los núcleos aislados conservaban las características principales de los núcleos "in situ", se sometieron a la secuencia de extracciones con soluciones de alta y baja fuerza iónica, detergentes no iónicos y nucleasas, para la obtención de matrices nucleares (Apéndice A. Tabla I).



El rendimiento de matrices nucleares recuperadas fue de un 75%-80% respecto a los núcleos de partida, dato que se determinó utilizando una cámara de NEUBAUER. Las matrices aisladas teñidas con rojo Ponceau, se observan al microscopio óptico como estructuras laxas, diferenciándose el nucleolo residual y el retículo correspondiente a la matriz interna (Fig 1 b).

A nivel de microscopía electrónica se distinguen tres componentes principales como ya había sido descrito previamente por Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina (1990), y Moreno Díaz de la Espina y col. (1991) en *A. cepa*. Una lámina, que se corresponde con los elementos residuales de la envuelta nuclear, es fibrilar, con los poros complejos asociados a ella y muestra claramente continuidad con las fibras de la matriz interna. El nucleolo residual, exclusivamente fibrilar, con fibras de 10 nm como las de la matriz interna. Finalmente la matriz interna, que conecta el nucleolo residual con la lámina, formando un retículo fibrillogranular con fibras de 10 nm y gránulos de 20-25 nm (Fig. 1 B).

2.- COMPOSICION POLIPEPTIDICA DE LAS MATRICES NUCLEARES

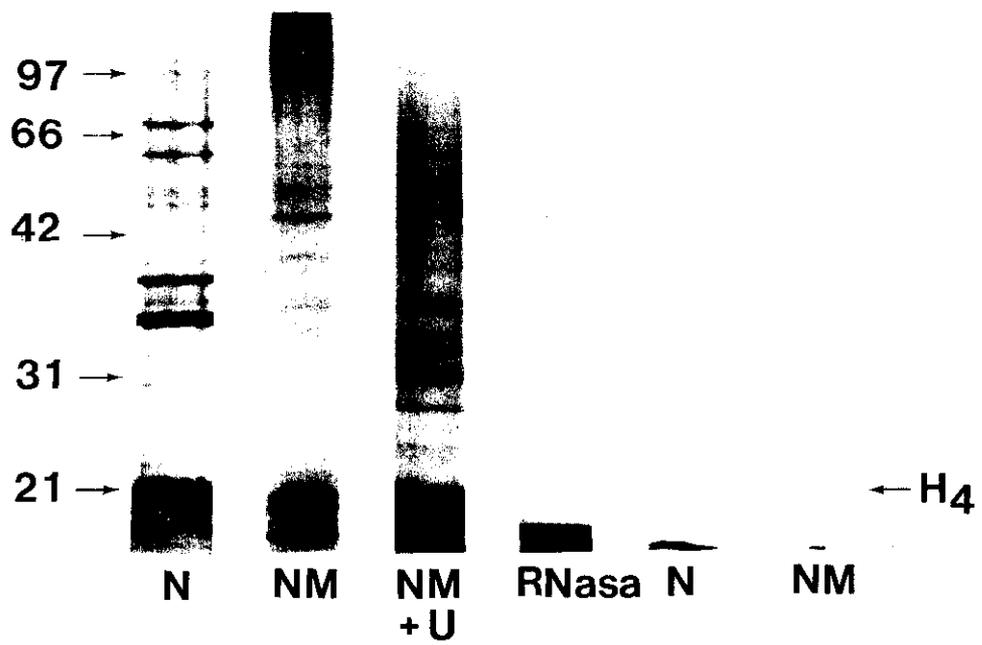
2.1.- PERFILES POLIPEPTIDICOS MONODIMENSIONALES

Las proteínas de los núcleos, matrices nucleares y matrices nucleares extraídas con urea, se separaron sometiendo las muestras a electroforesis monodimensional, en geles de poliacrilamida al 10%, siguiendo la técnica de Laemmli (1970).

Las fracciones nucleares presentan un gran número de componentes polipeptídicos distribuidos en un amplio rango de pesos moleculares. Aparecen como mayoritarias proteínas de bajo peso molecular entre 14-21 KD, correspondientes a las histonas de la zona central del nucleosoma, también las isoformas de la histona H₁ en el rango de 35-40 KD, así como proteínas alrededor de 70 KD. (Fig. 2).

Como ya se ha demostrado por Moreno Díaz de la Espina y col. (1991), en las matrices nucleares de *A. cepa* la mayoría de las bandas se sitúan en el rango entre 12 y 70 KD (Fig. 2), siendo mayoritarias las bandas entre 35-60 KD y desapareciendo en su mayoría los polipéptidos de alto peso molecular. También son componentes constantes de las matrices proteínas de bajo peso molecular en el rango de las histonas de la zona central del nucleosoma, que sin embargo no reaccionan con el anticuerpo anti-histona H₄. Parte de esos componentes de bajo peso molecular se deben a la RNasa residual que se queda asociada a las matrices nucleares después de las digestiones y que como podemos observar si corremos solo RNasa en un gel de 10% de poliacrilamida presenta alrededor de 17 KD de peso molecular (Fig. 2).

Las matrices nucleares extraídas con urea presentan un perfil distinto de las obtenidas por el procedimiento convencional. Contienen numerosas bandas ya que no se consiguen eliminar la matriz interna y la matriz nucleolar. Algunas bandas son comunes en ambos tipos de matrices, pero la extracción con urea concentra otras que no aparecen como mayoritarias antes de la extracción (Fig. 2).



2.2- PERFILES POLIPEPTIDICOS BIDIMENSIONALES

En geles bidimensionales, se aprecia claramente el número tan elevado de proteínas que componen los núcleos de células de *A. cepa*, ya que proteínas que podrían parecer la misma en geles monodimensionales, se separan en función de su pl. Se distinguen alrededor de 350 "spots", correspondientes a proteínas que se distribuyen entre 12 y 105 KD de peso molecular principalmente, con abundantes componentes de carácter ácido y neutro (Fig. 3 A).

Como se observó al comparar los perfiles monodimensionales, hay un claro descenso en el número de "spots" entre núcleos y matrices nucleares. En el caso de las matrices nucleares el descenso del número de "spots" con respecto a los núcleos enteros es considerable, distinguiéndose unos 190 con un enriquecimiento en aquellos situados dentro del rango de 35-70 KD. Los correspondientes a proteínas de bajo peso molecular son muy pocos con respecto al total, y presentan pls ácidos o neutros. De los 190 "spots" hemos identificado 50 en común con las fracciones de núcleos enteros, algunos de los cuales aparecen mas concentrados en las matrices (Fig. 3 B).

La extracción con urea 4 M elimina muchas de las proteínas presentes en las matrices nucleares totales. Sobre todo desaparecen componentes de carácter ácido. Los perfiles polipeptídicos de dichas fracciones revelan 50 "spots", de los cuales se distinguen 34 comunes a las matrices nucleares extraídas por el procedimiento convencional, en el rango de peso molecular de 30-70 KD. La mayoría de ellos son

de carácter neutro o básico, y aparecen concentrados al haber desaparecido un gran número de componentes de las matrices nucleares (Fig. 3 C).

3.- CARACTERIZACION DE LOS COMPONENTES DE LA LAMINA. DETECCION DE LAMINAS

Como ya se ha comentado anteriormente, la extracción con urea no desorganiza la matriz nuclear ni consigue extraer en su totalidad las proteínas de la matriz interna y matriz nucleolar. Sin embargo sí reduce el número de proteínas que componen las matrices y por tanto aparecerán enriquecidas las proteínas de tipo filamento intermedio que resisten esta extracción, las laminas. Por este motivo, en los experimentos de caracterización de laminas de plantas, utilizamos fracciones de matrices extraídas con urea, que fueron incubadas con anticuerpos contra filamentos intermedios y diferentes tipos de laminas de vertebrados (Tabla 2).

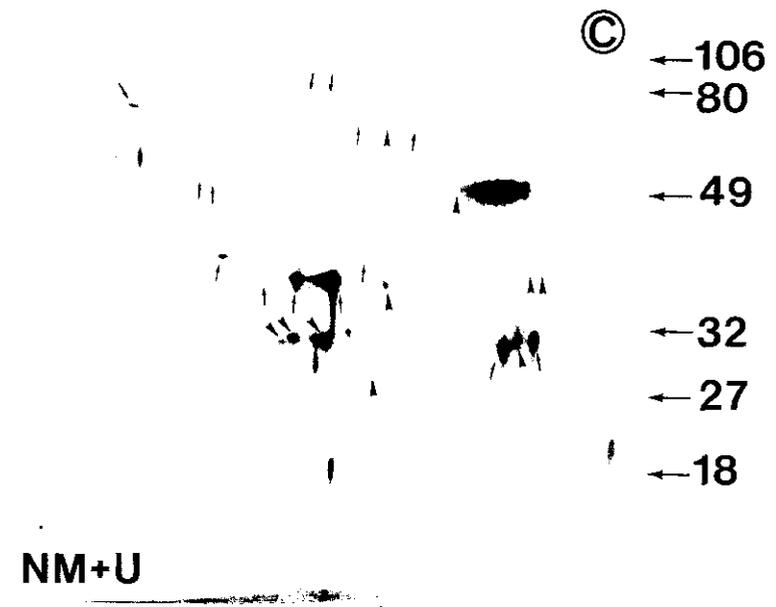
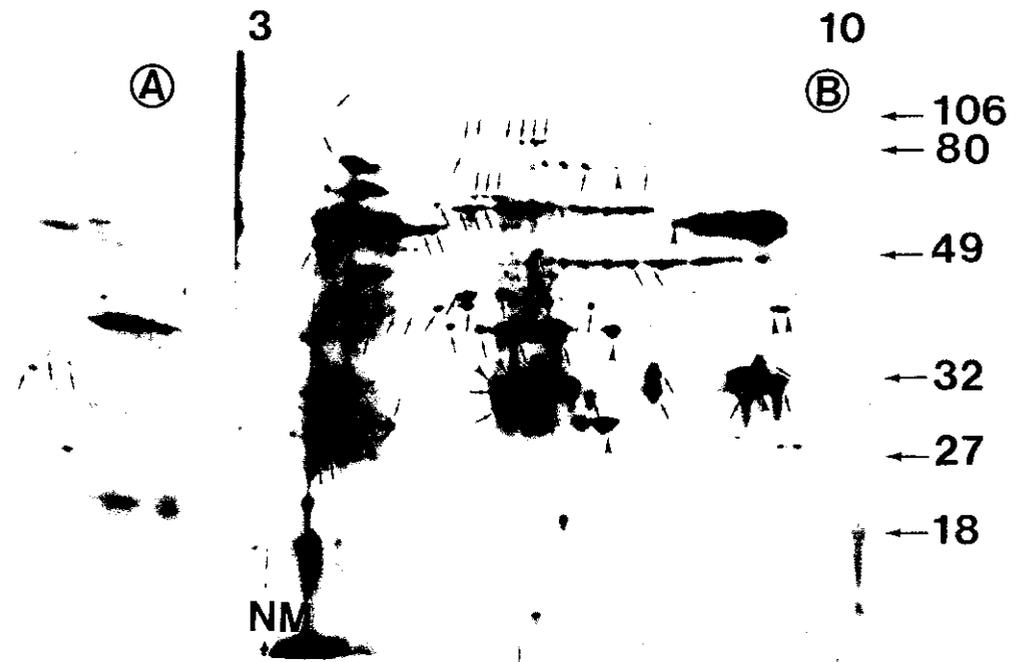
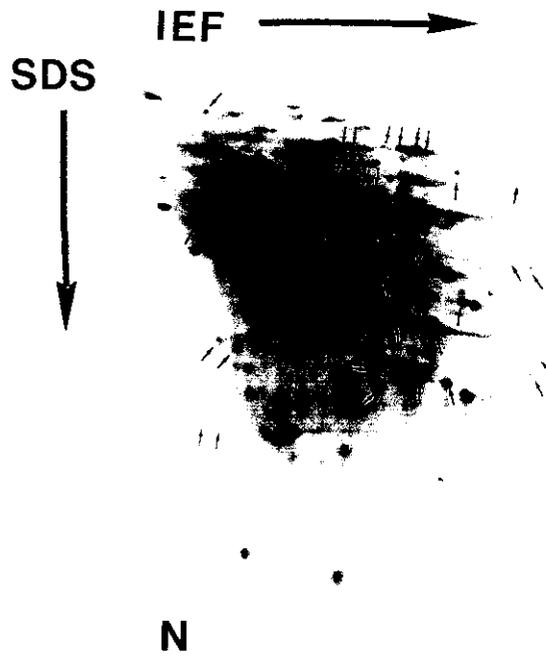
3.1.- INMUNOBLOTTING

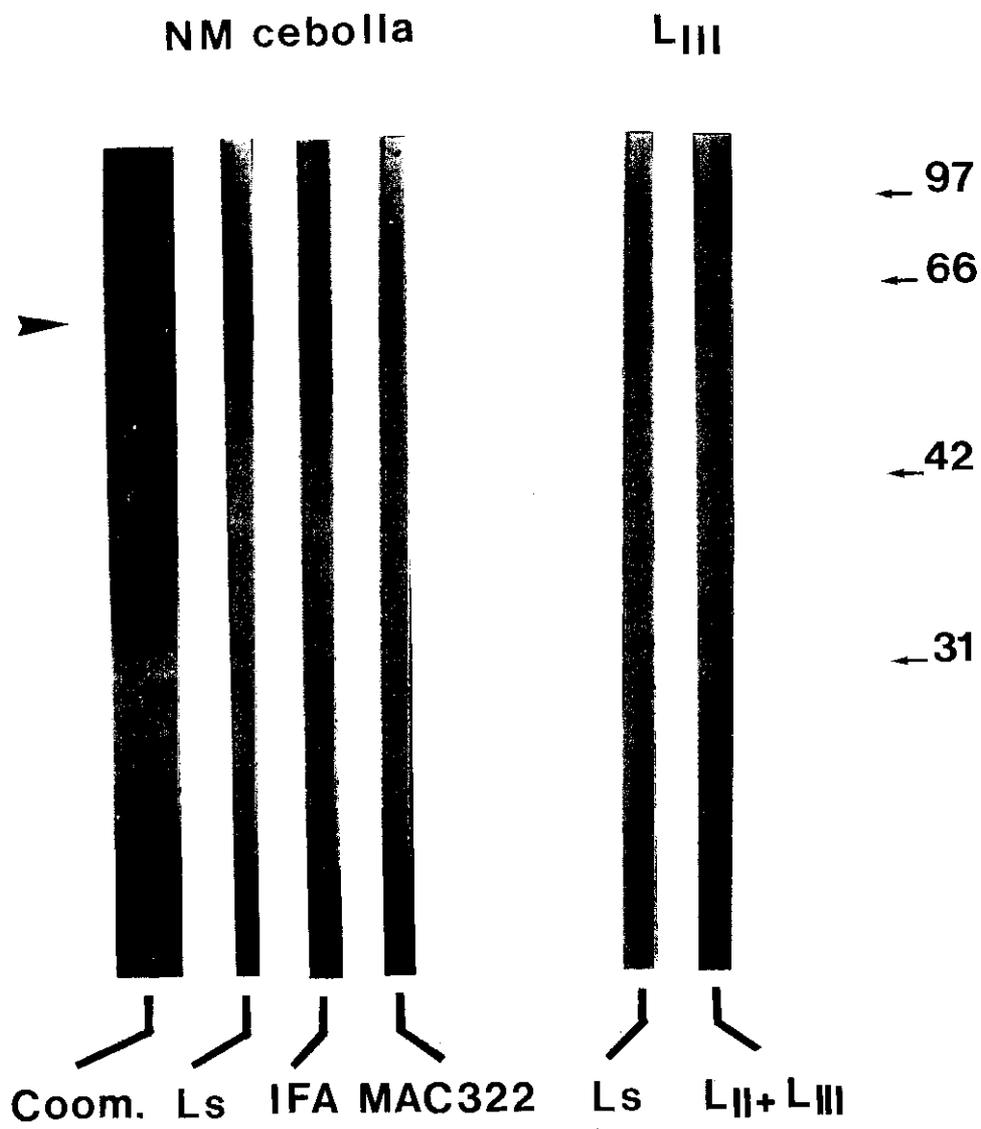
Cuando las proteínas transferidas de matrices nucleares extraídas con urea se hicieron reaccionar con el anticuerpo IFA, que reconoce un epitopo muy conservado dentro de los filamentos intermedios (Pruss y col., 1981), presente también en las laminas (Lebel y Raymond, 1987), reveló dos bandas, una de 65 KD y otra de 58 KD. Con el fin de comprobar si realmente estábamos detectando proteínas nucleares tipo filamento intermedio (IF), y nuestros resultados no se debían a contaminación de las fracciones con proteínas del grupo de los IF citoplásmicos durante la extracción,

realizamos controles con anticuerpos que reconocen determinadas proteínas de la familia de los IF y que reaccionan en plantas: anti-vimentina; AFB (Hargreaves y col., 1989a) anticuerpo que reconoce proteínas de tipo IF del citoplasma de células de zanahoria (cuyos datos no se muestran) y el anticuerpo MAC 322 que reacciona con un epitopo de IF altamente conservado entre animales y plantas (Ross y col., 1991), en ningún caso reconocieron dichas bandas (Fig. 4).

El siguiente paso consistió en la utilización de diferentes anticuerpos anti-lamina para comprobar si las proteínas reconocidas por el IFA pertenecen a este grupo y en su caso ver de que tipo son. Un anticuerpo policlonal desarrollado contra laminas de pollo (Stick y Hausen, 1980), en fracciones de matrices semejantes a las utilizadas con el IFA, reveló la banda de 65 KD reconocida por este último (Fig. 4). Para comprobar la reactividad del suero, hicimos un control positivo, de forma que cuando se le hizo reaccionar con proteínas de *E. coli*, que contenían la lamina LIII de *Xenopus* clonada, transferidas a membranas de nitrocelulosa, la banda correspondiente a la lamina LIII de *Xenopus* fue reconocida por el mismo (Fig 4), confirmando que el epitopo reconocido por el suero está muy conservado entre aves, plantas y anfibios.

Para caracterizar mejor la proteína o proteínas contenidas en la banda identificada por el suero policlonal, continuamos nuestros estudios utilizando una serie de anticuerpos monoclonales específicos contra las laminas B₂ (L3-2B8) y A (L3- 4B4) de pollo y las laminas LI (L7-4A2) y LII (L7-8C6) de *X. laevis* (Stick y col., 1988), comprobándose que reconocen todos ellos una banda más o menos intensa a la







misma altura que dicho suero policlonal (Fig. 5) por lo que se hizo necesario un estudio sobre proteínas de matrices nucleares extraídas con urea, separadas en geles bidimensionales y transferidas a membranas de nitrocelulosa, con el fin de comprobar si dicha reacción se debía a una o varias proteínas.

Atendiendo a los resultados obtenidos que se resumen en la Tabla 2, vemos que el anticuerpo IFA reconoce una serie de "spots" de los que el más abundante se corresponde con uno de 58 KD y $pI=5$, el resto son uno de 64 KD y $pI=5.75$ y tres de 65 KD y $pI= 6.5, 6.8$ y 7.1 (Fig. 6 B). Por su parte el suero policlonal contra laminas de pollo detecta un solo "spot" que aparentemente se correspondería con el reconocido por el IFA de 65 KD y $pI=6.8$ (Fig. 6 C). En cuanto a los anticuerpos monoclonales, el L7-4A2 reconoce un "spot" de 64 KD y pI más ácido 5.75 KD (Fig. 6 D), y el L3-4B4 reacciona con un "spot" grande de 65 KD, $pI=5.65$, y uno mas pequeño de igual peso molecular y $pI=6.7$, en torno al que se intuyen con mucha menor intensidad otros dos uno a cada lado que recuerdan a los reconocidos por el IFA (Fig. 6 E).

3.2.- INMUNOFLUORESCENCIA

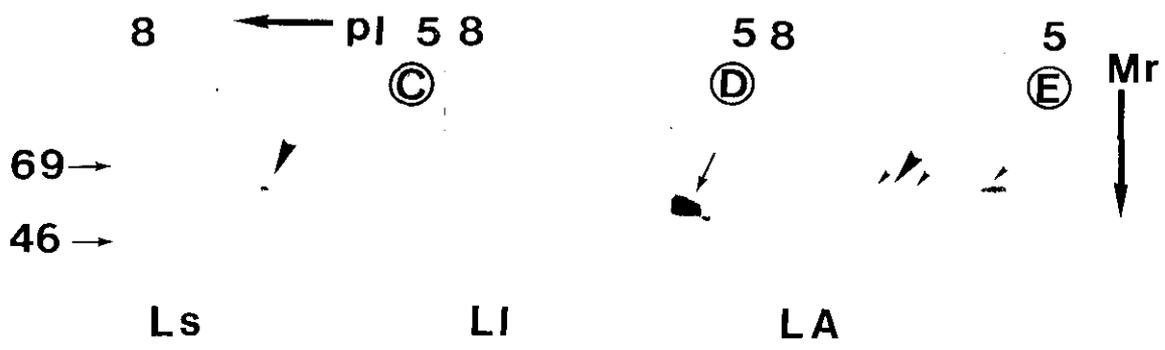
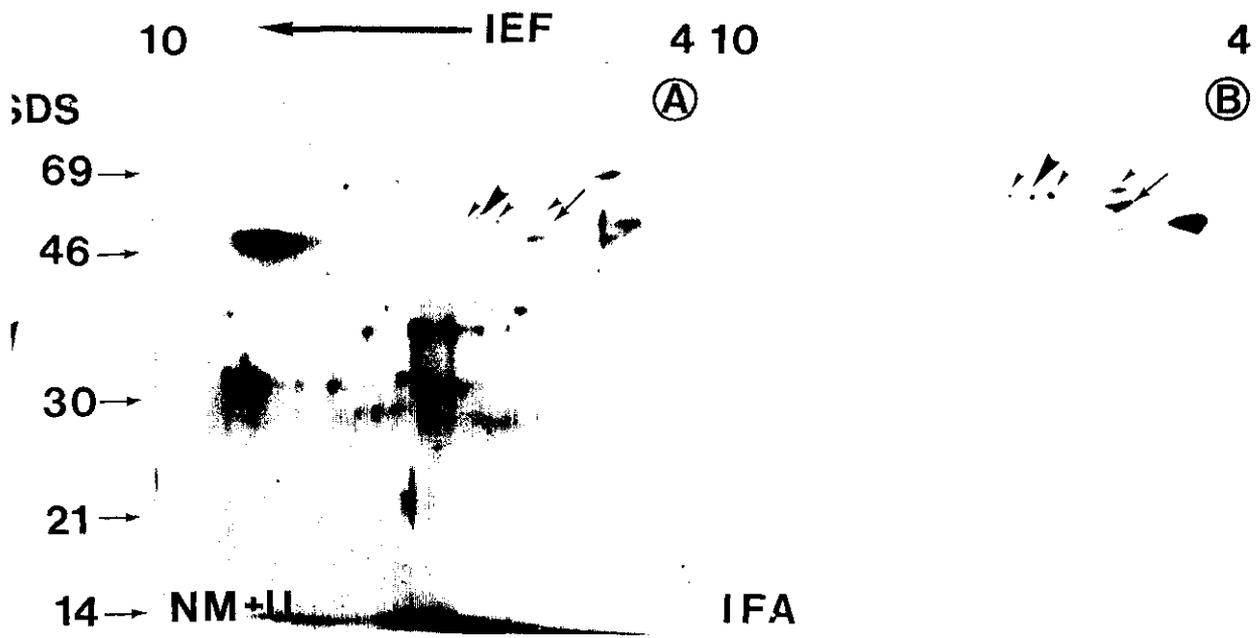
Con el suero anti-lamina de pollo, se ha realizado inmunofluorescencia sobre frotis de núcleos y matrices nucleares de forma que se detecta la fluorescencia en la periferia de los núcleos (Fig. 7 A). En las matrices nucleares, aparte de la localización periférica, la fluorescencia aparece también a modo de "spots" en su interior (Fig. 7 B). Queda descartada cualquier reacción con la matriz nucleolar, cuya ubicación se

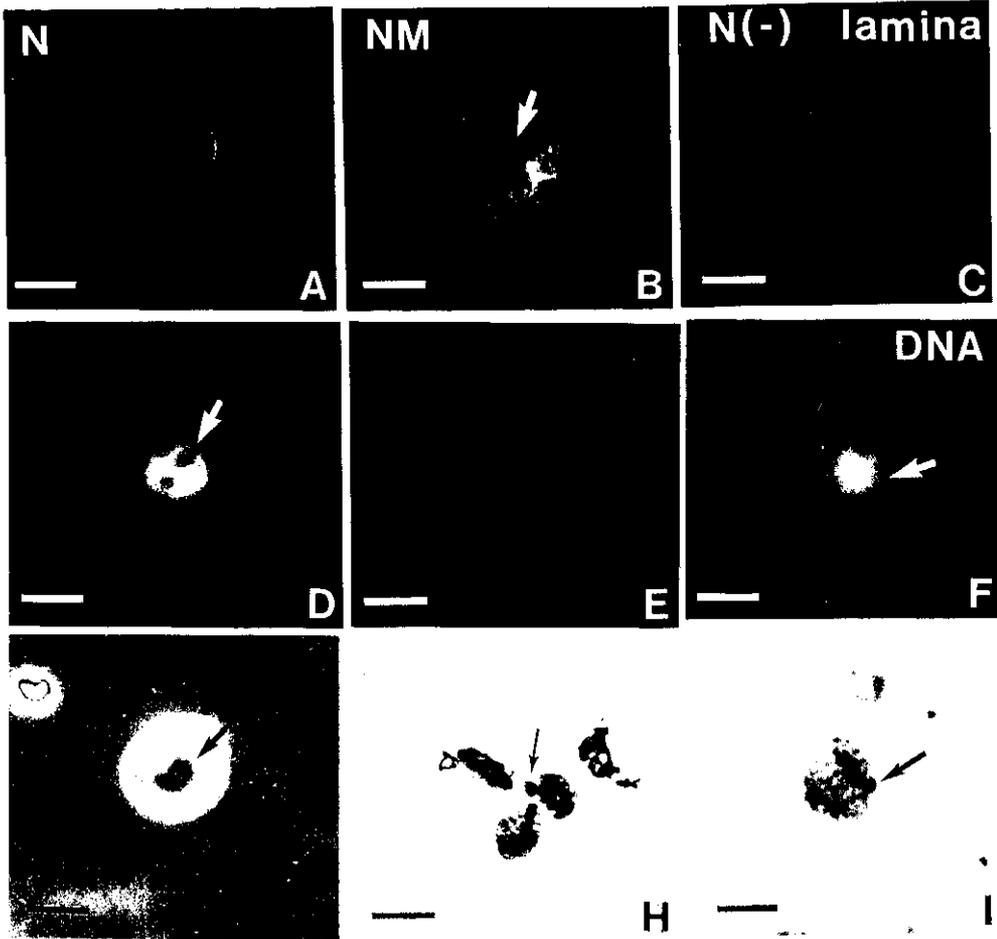
TABLA 2.- PROTEINAS RECONOCIDAS POR ANTICUERPOS ANTI-LAMINA DE DISTINTAS ESPECIES Y ANTI-FILAMENTOS INTERMEDIOS EN LAS MATRICES NUCLEARES DE *ALLIUM CEPA*.

ANTICUERPO	TIPO	1-D	2-D	SISTEMA HOMOLOGO
Laminas tipo B				
-Anti-lamina B ₂ de pollo.	M	65 (++)	sd	Lamina B ₂
-Anti-lamina LI de <i>Xenopus</i> .	M	65 (++)	64 pI 5.75 (+++)	Lamina LI
-Anti-lamina LII de <i>Xenopus</i> .	M	64 (++)	sd	Lamina LII
Laminas tipo A				
-Anti-lamina de pollo.	P	65 (+++)	65 pI 6.8 (+++)	71 y 67 KD
-Anti-lamina A de pollo	M	65 (+)	65 pI 7.0 (+) 65 pI 6.7 (++) 65 pI 6.5 (+) 65 pI 5.6(+++)	Lamina A
Filamentos intermedios				
-IFA	M	65 (+++) 58 (+++)	65 pI 7.1 (++) 65 pI 6.8 (+++) 65 pI 6.5 (+++) 65 pI 5.7 (+++) 58 pI 5.0 (+++)	Filamentos intermedios
-MAC 322	M	(-)	sd	42, 50 y 55 KD
-AFB	M	(-)	sd	38 y 62 KD
-Anti-vimentina	M	(-)	sd	Vimentina

Abreviaturas.- P: policlonal. M: monoclonal. sd: sin determinar. 1-D: blot monodimensional. 2-D: blot bidimensional. Intensidad de la reacción: fuerte (+++); intermedia (++); débil (+); sin reacción (-).

Figura 6.- Detección, mediante inmunoblotting, de proteínas tipo lamina entre las proteínas de matrices nucleares extraídas con urea, separadas en geles bidimensionales, transferidas a membranas de nitrocelulosa, utilizando anticuerpos anti-lamina de diferentes especies y el IFA. **A.-** Perfil polipeptídico bidimensional de matrices nucleares extraídas con urea (**NM+U**), teñido con plata. **B-E.-** Resultados de los inmunoblots con los anticuerpos, revelados mediante la reacción de la peroxidasa con la mezcla cloronaftol-diaminobencidina o utilizando el sistema de amplificación quimioluminiscente para anticuerpos con peroxidasa ECL (Amersham). **B.-** Anticuerpo IFA. **C.-** Suero anti-lamina de pollo. **D.-** Anti-lamina LI de *X. laevis*. **E.-** Anti-lamina A de pollo. Se observa que el anticuerpo IFA reconoce varios "spots" entre 58-65 KD, de los cuales el suero policlonal reconoce uno de 65 KD y pl=6.8. El anti-lamina LI de *X. laevis* reconoce otro mucho mas ácido con pl=5.75 y Pm=64 KD. El anti-lamina A de pollo reconoce varios de 65 KD, uno de ellos muy abundante de pl=5.65 KD, y el resto de pls=6.7-6.5, de menor intensidad.



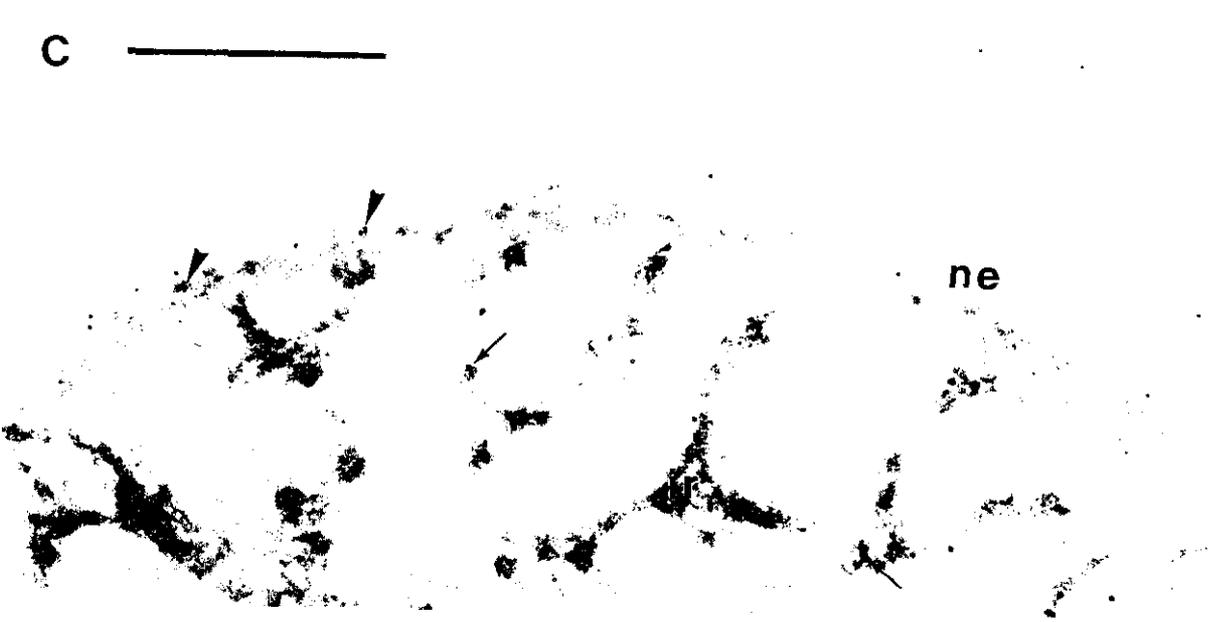


aprecia claramente en las imágenes de contraste de fase (Fig. 7 G y H), ya que en la zona correspondiente a los nucleolos y matrices nucleolares no se distingue fluorescencia. La cromatina tampoco tiene nada que ver con la reacción, como se comprueba al observar la fluorescencia de núcleos marcados con los anticuerpos y teñidos con Hoechst (Fig. 7 A, D y G). Cuando las muestras se incubaron con suero normal en lugar del anticuerpo primario, no se aprecia ninguna fluorescencia (Fig. 7 C).

3.3.- INMUNOMARCADO CON ORO

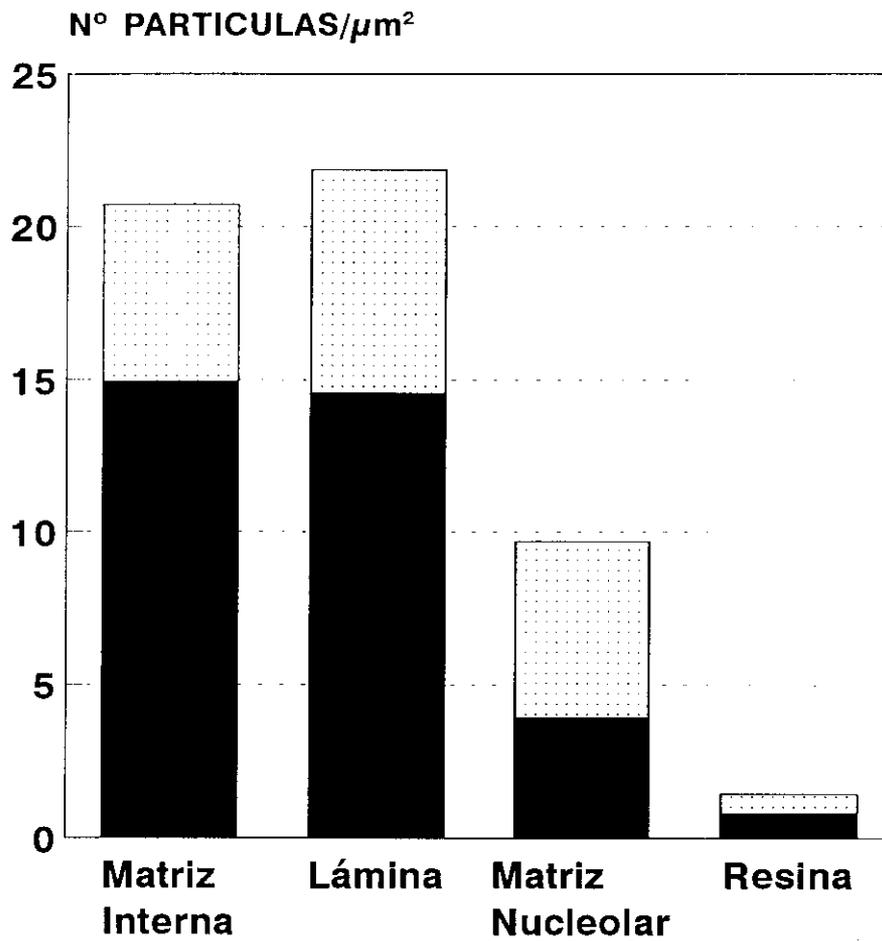
Al incubar secciones ultrafinas de matrices nucleares, incluídas en LR White, con el suero anti-lamina y posteriormente con un anticuerpo secundario marcado con oro coloidal, se observó que el marcado se distribuía por la lámina así como por la matriz interna, pero no por el nucleolo residual (Fig. 8 A). Este dato se confirma con el resultado de la cuantificación en que se ve que las partículas de oro se distribuyen aproximadamente por igual ente la matriz interna y la lámina (Fig. 9). Los controles en que se suprimió la incubación con el anticuerpo primario estaban totalmente desprovistos de marcado (Fig. 8 B).

Los datos anteriores concuerdan con los que se obtuvieron cuando se hizo reaccionar el mismo anticuerpo con núcleos aislados, en que se observan las partículas de oro en la periferia así como en las regiones intercromatínicas (Fig. 8C).



LAMINA

MARCAJE DE LA MATRIZ NUCLEAR



DOMINIOS DE LA MATRIZ

■ MEDIA ▨ +Desv. Std.

4.- CARACTERIZACION DE LOS COMPONENTES DE LA MATRIZ INTERNA

La matriz interna, de naturaleza fibrillogranular, ha sido el componente de la matriz que ha presentado mas dificultades para el estudio de sus componentes, ya que con los distintos métodos de extracción utilizados ha sido imposible obtener fracciones en que este dominio fuera mayoritario. Con el fin de caracterizar sus componentes, lo que hicimos fue investigar la presencia en ella de proteínas que se sabe son componentes de las matrices (Tabla 3).

Hemos utilizado anticuerpos contra tres tipos de proteínas. La topoisomerasa II, proteína con un papel estructural, ya que interviene en el anclaje de los "loops" de DNA a la matriz, además de ser una proteína necesaria en todos los procesos en que interviene el DNA, produciendo roturas reversibles que afectan a las dos cadenas de la doble hélice del mismo, para evitar las tensiones que se producirían al avanzar las horquillas de replicación y transcripción. También hemos investigado la presencia de una proteína de tipo filamento intermedio presente en la matriz nuclear de zanahoria, así como la presencia de un componente de los gránulos intercromatínicos de células animales. Gracias a estos estudios hemos podido definir los distintos dominios de la matriz interna en función de la distribución de sus componentes.

4.1.- DETECCION DE TOPOISOMERASA II

Hemos utilizado un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra un

TABLA 3.- PROTEINAS DE LA MATRIZ INTERNA DE ALLIUM CEPA IDENTIFICADAS MEDIANTE INMUNOBLOTTING.

ANTICUERPO	TIPO	PROTEINA	LOCALIZACION TOPOLOGICA	PROTEINA DEL SISTEMA HOMOLOGO
Anti-topoisomerasa II	P	215 KD	im (+++) lámina (++) Num (++)	175-180 KD
Anti-proteína P105 nuclear	M	(-)	im granular	105 KD
JIM 63	M	120 KD	im (+++) lámina (++) Num (+)	92 KD-zanahoria

Abreviaturas.- P: policlonal. M: monoclonal. im: matriz interna. Num: matriz nucleolar. sd: sin determinar. Intensidad de la reacción: fuerte (+++); intermedia (++); débil (+); sin reacción (-).

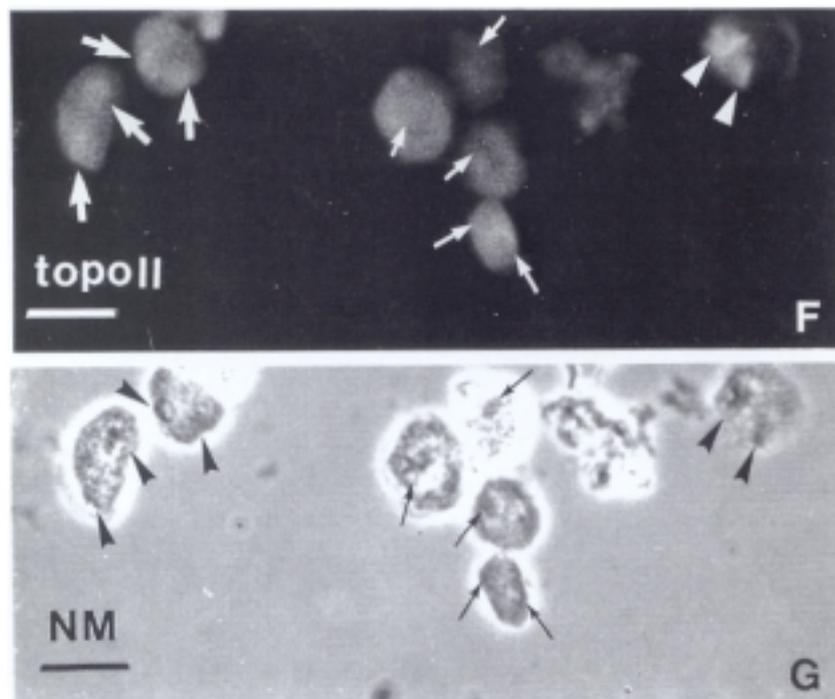
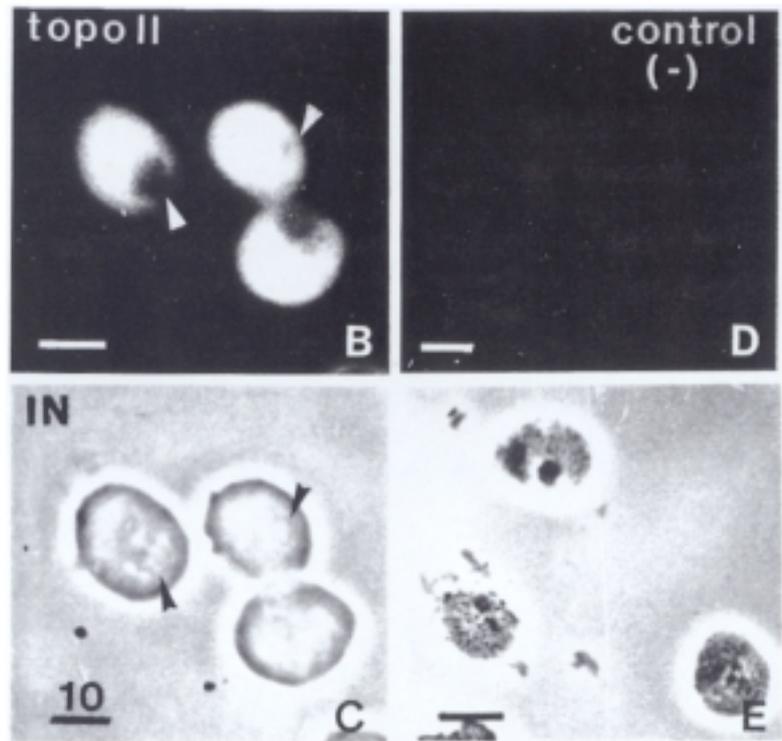
fragmento sintético de la secuencia de la topo II humana (Tsai-Pflugfelder y col., 1988) comercializado por Cambridge Research Biochemicals. Este anticuerpo, en Western blots procedentes de líneas celulares que sobreexpresan topo II reconoce una banda entre 175-180 KD (Smith y Makinson, 1989).

4.1.1.- Inmunoblotting.

Dicho anticuerpo incubado con proteínas de matrices nucleares de cebolla, separadas en geles de poliacrilamida al 8%, transferidas a membranas de nitrocelulosa, ha revelado una banda de unos 215 KD que podría ser un doblete, apareciendo a su vez otra muy tenue de 70 KD, que podría corresponder a un producto de degradación (Fig. 10 A). Este peso molecular, está en el rango descrito para la topoisomerasa II de especies vegetales.

4.1.2.- Inmunofluorescencia.

Los resultados que se obtuvieron al hacer reaccionar el anticuerpo con frotis tanto de núcleos como de matrices nucleares, muestran en el caso de los núcleos, la fluorescencia localizada en el nucleoplasma (Fig. 10 B). Sin embargo en el caso de las matrices nucleares, se observa que la reacción no es homogénea en toda la muestra. Aunque la fluorescencia se localiza en la matriz interna y nucleolar, existen matrices en las que es más intensa la correspondiente a la matriz nucleolar, en otras se sitúa, casi exclusivamente, en la zona de la matriz nucleolar, y finalmente, en otros casos, no sólo no destaca la fluorescencia de la matriz nucleolar respecto a la de la



matriz interna, sino que llega a ser menor (Fig. 10 F).

Cuando se observan las matrices nucleares en las que se ha suprimido la incubación con el anticuerpo primario, el resultado obtenido fue negativo, sin fluorescencia (Fig 10 D).

4.1.3.- Inmunomarcado con oro.

Cuando se incubaron secciones de matrices nucleares con dicho anticuerpo, al revelarse la reacción con un anticuerpo secundario conjugado con oro, se observó que las partículas de oro se distribuyen a lo largo de los tres componentes de la matriz nuclear, si bién el marcado de la lámina y matriz nucleolar se sitúa predominantemente en los puntos de contacto de la matriz interna (Fig. 11 A). Los controles se observaron desprovistos de marcado (Fig. 11 B).

Al cuantificar los resultados se observó que las partículas de oro se distribuyen por los tres componentes de la matriz, principalmente en la matriz interna, siendo considerable el marcado asociado a lámina y matriz nucleolar (Fig. 12).

4.2.- LOCALIZACION DEL DNA ASOCIADO A MATRIZ NUCLEAR

El DNA residual asociado a las matrices, debido a su baja proporción, menor del 1.9%, no se detecta mediante inmunofluorescencia con DAPI pues su límite de detección está en una concentración de DNA del 5%. Por eso hemos utilizado un

A

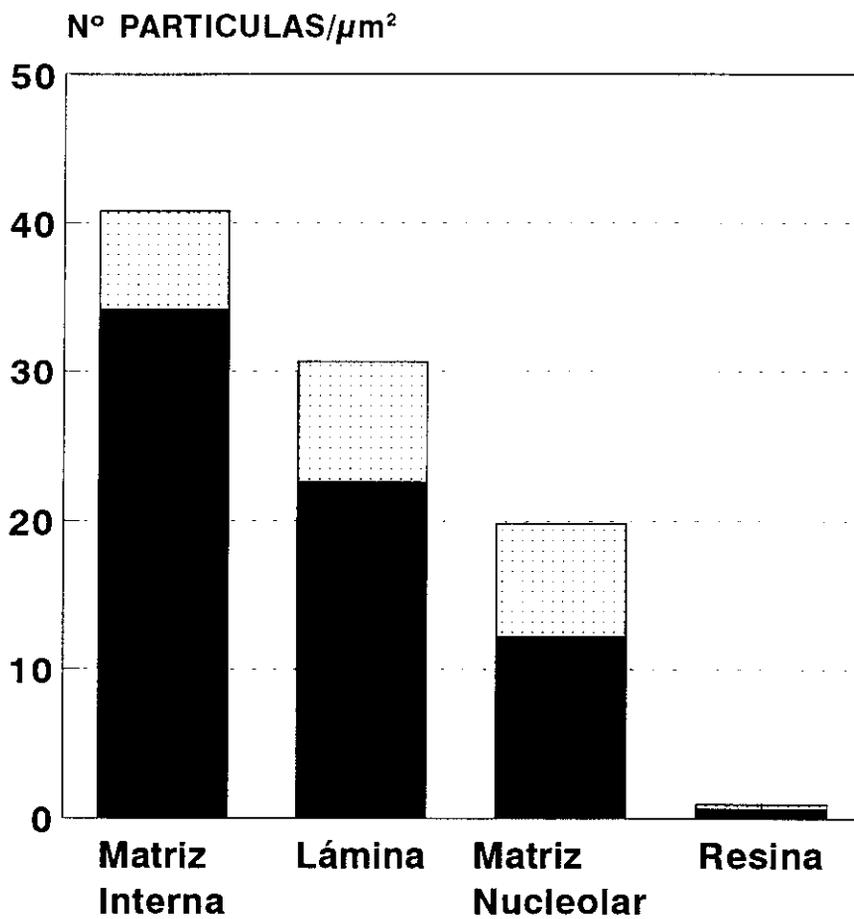


B



TOPOISOMERASA II

MARCADO DE LA MATRIZ NUCLEAR



DOMINIOS DE LA MATRIZ

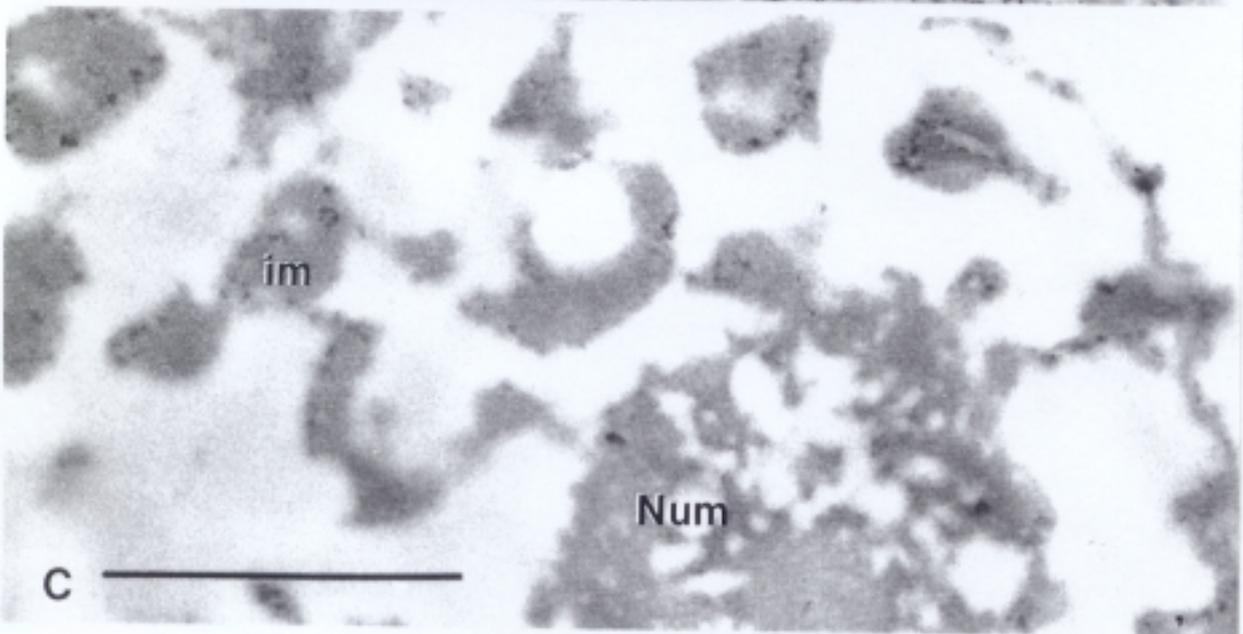
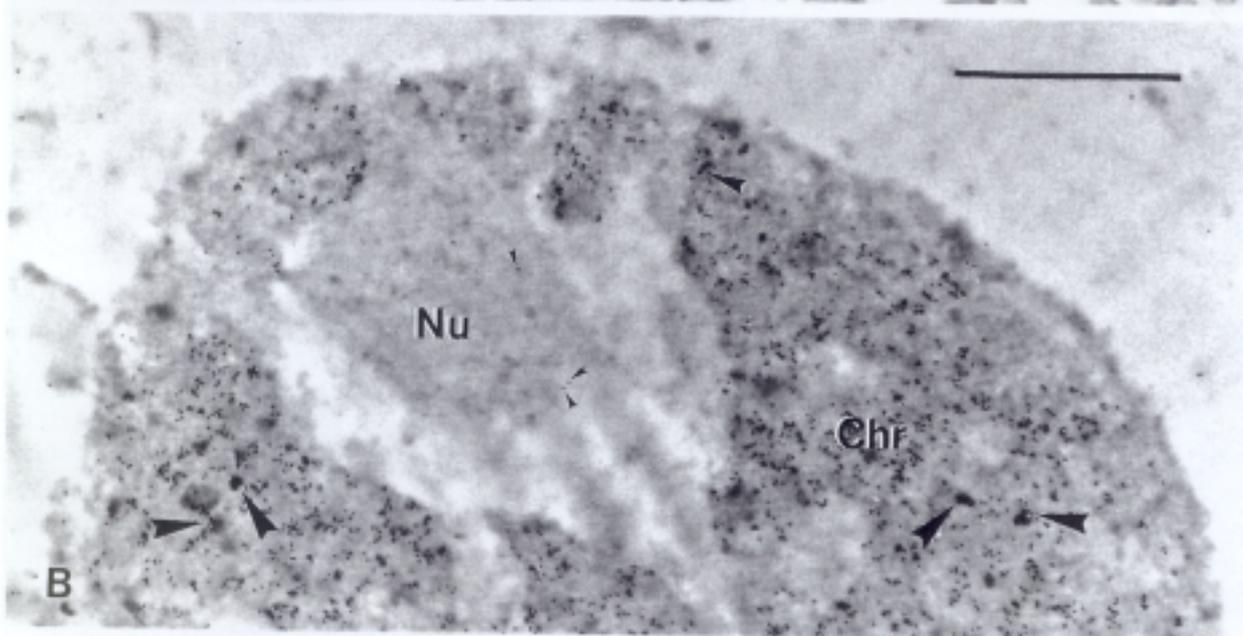
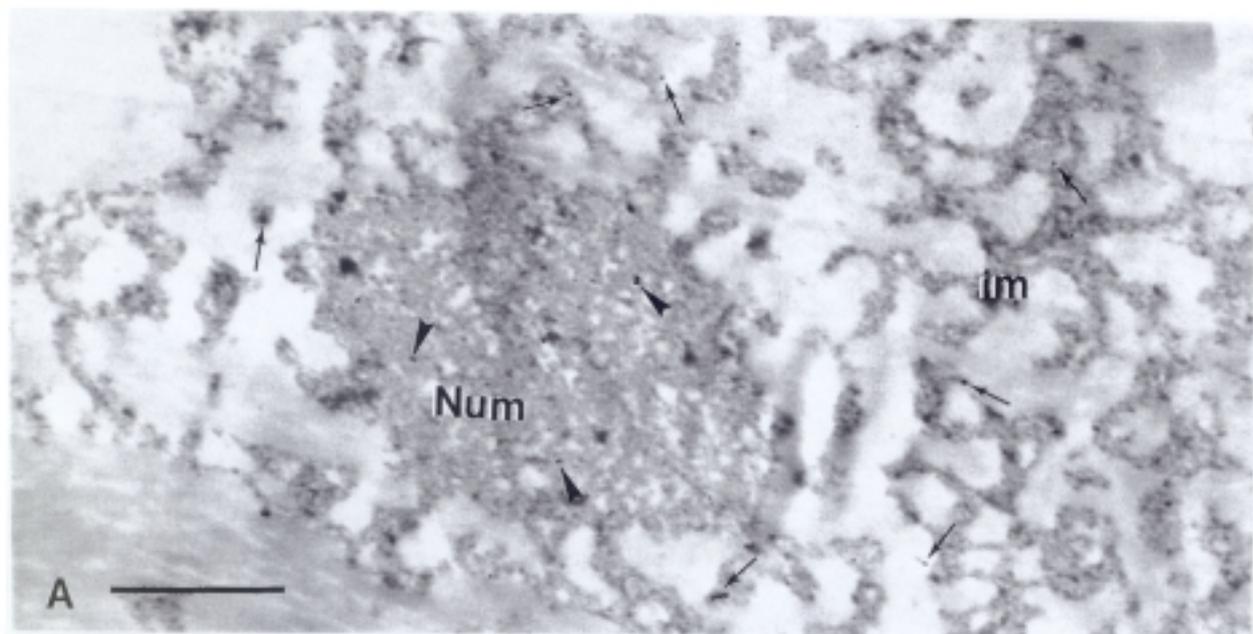
■ MEDIA ▨ +Desv. Std.

anticuerpo monoclonal anti-DNA en secciones que reconoce DNA de cadena doble y sencilla (Boehringer Mannheim), con el fin de determinar la localización topológica del DNA residual en los distintos dominios de las matrices.

Cuando utilizamos el anticuerpo combinado con uno secundario conjugado con oro, al microscopio electrónico se observó que en las matrices nucleares el marcado es muy bajo. Las partículas de oro se distribuyen por todos los componentes, aunque la mayoría se encuentran en la matriz interna, apareciendo los granos aislados, o alineados siguiendo algunas fibrillas (Fig. 13 A).

Dicho resultado contrasta fuertemente con el obtenido en núcleos aislados, en que como era de esperar el marcado es abundante y específico, concentrándose fundamentalmente sobre las masas de cromatina condensada. En cuanto al nucleolo, el marcado se sitúa en los centros fibrilares heterogéneos, careciendo totalmente de él, tanto el componente fibrilar denso como el componente granular (Fig. 13 B). Estos resultados son semejantes a los observados cuando se realizó la reacción "in situ" (Martin y col., 1989). El control negativo apareció desprovisto de marcado (Fig. 13 C).

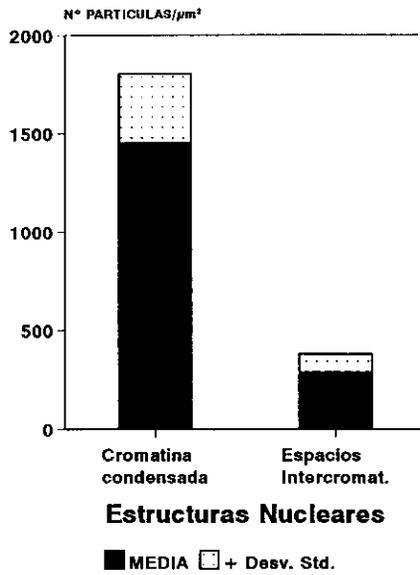
Cuando hicimos la cuantificación del marcado de DNA residual, los datos anteriores se confirmaron. La densidad de marcado es baja en los tres componentes de las matrices nucleares, con una densidad de partículas de oro ligeramente superior en la matriz interna que en la lámina y matriz nucleolar (Fig. 14 B). En contraste con los resultados obtenidos en el caso de los núcleos "in situ", en que el número de partículas en las masas de cromatina condensada es muy alto, y mucho menor las



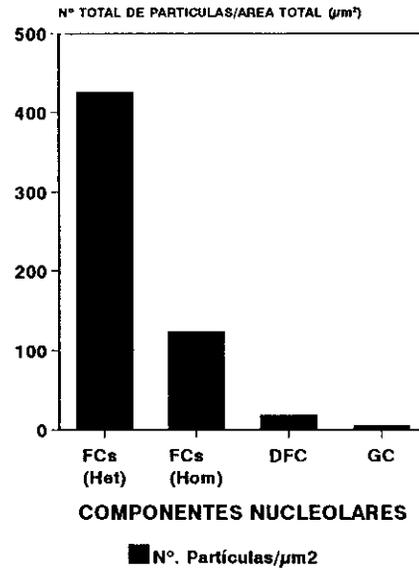
ANTI-DNA

MARCADO in situ

MARCADO EXTRANUCLEOLAR

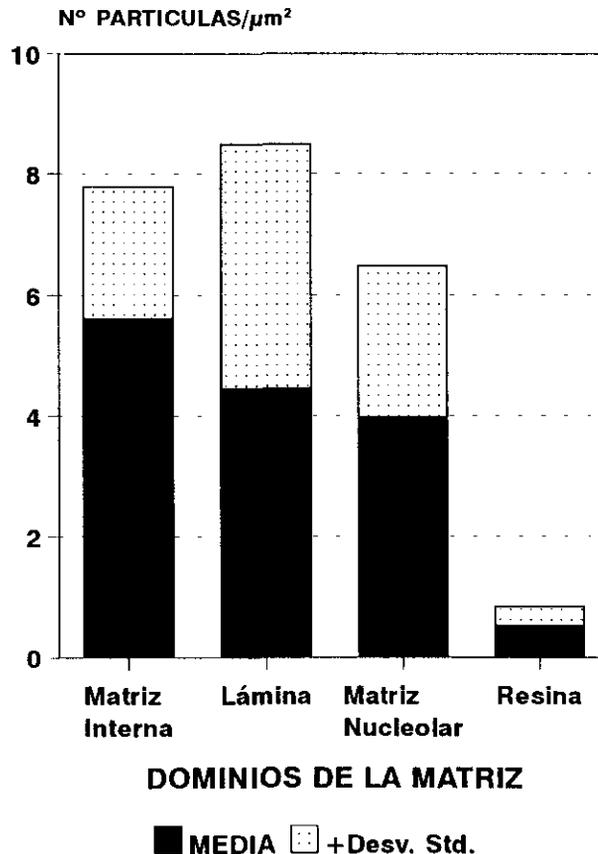


MARCADO NUCLEOLAR



(A)

MARCADO DE LA MATRIZ NUCLEAR



(B)

situadas en los espacios intercromatínicos y nucleolo, en que se observa la distribución del marcado en cada uno de sus componentes (Fig. 14 A).

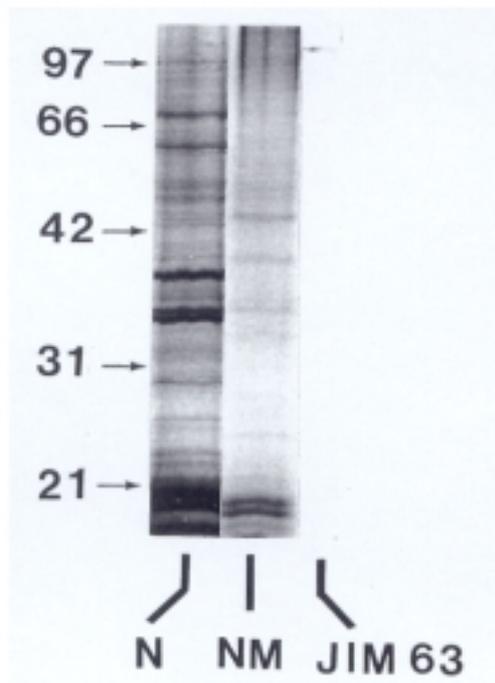
Si comparamos los datos de localización de DNA residual con los de la topoisomerasa II, parece haber una colocación de la fracción insoluble de la misma con el DNA residual en la matriz nuclear (Figs. 11-14). Por lo tanto si tenemos en cuenta el papel que juega la topoisomerasa II en el anclaje de los "loops" de DNA a las matrices, dicho DNA residual se correspondería con las secuencias correspondientes a los puntos de anclaje de los "loops" a la matriz, que quedarían protegidos de la digestión por la topoisomerasa y otras proteínas del complejo de anclaje, pero quedarían accesibles a la reacción con el anticuerpo, al quedar expuestos los epitopos en la superficie del corte.

4.3.- DETECCIÓN DE LA PROTEINA DE LA MATRIZ INTERNA HOMOLOGA A LA RECONOCIDA POR EL ANTICUERPO JIM 63 EN *DAUCUS CAROTA*

El anticuerpo JIM 63 es un monoclonal, desarrollado contra preparados protéicos de matrices nucleares de zanahoria, *Daucus carota*, que en el sistema homólogo, reconoce una proteína de 92 KD aparentemente relacionada con los filamentos intermedios, y de distribución intranuclear (Beven y col., 1991).

4.3.1.- Inmunoblotting.

Cuando se hizo reaccionar el anticuerpo con proteínas de matrices nucleares



de cebolla transferidas a membranas de nitrocelulosa, la banda reconocida fue de 120 KD (Fig. 15).

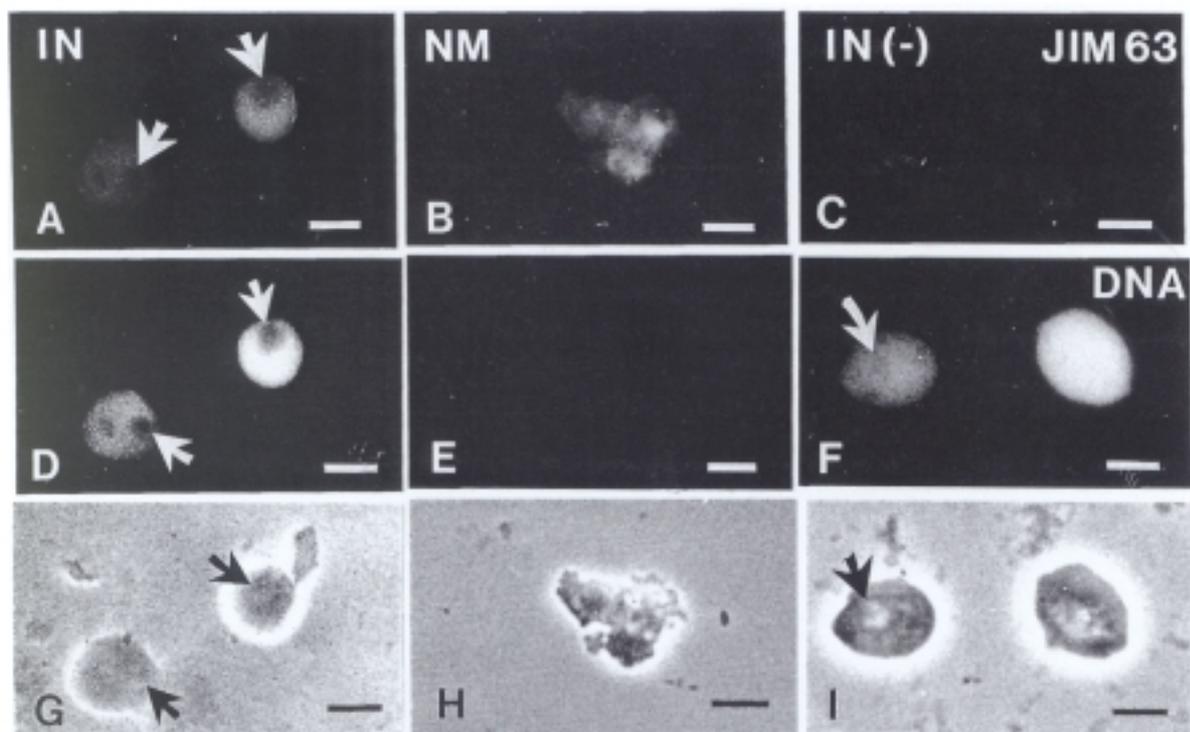
Para determinar a que compartimento de la matriz se asociaba el antígeno reconocido por dicho anticuerpo procedimos a hacer experimentos de inmunofluorescencia e inmunomarcado para microscopía electrónica.

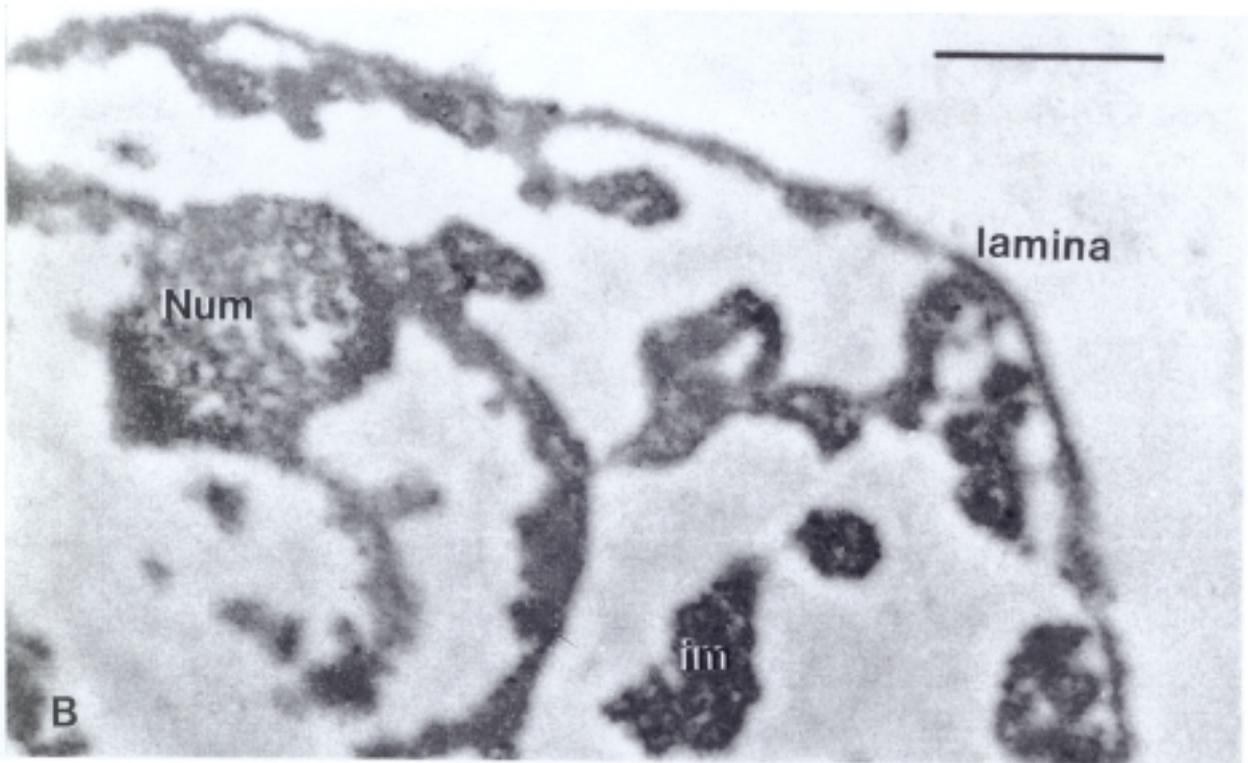
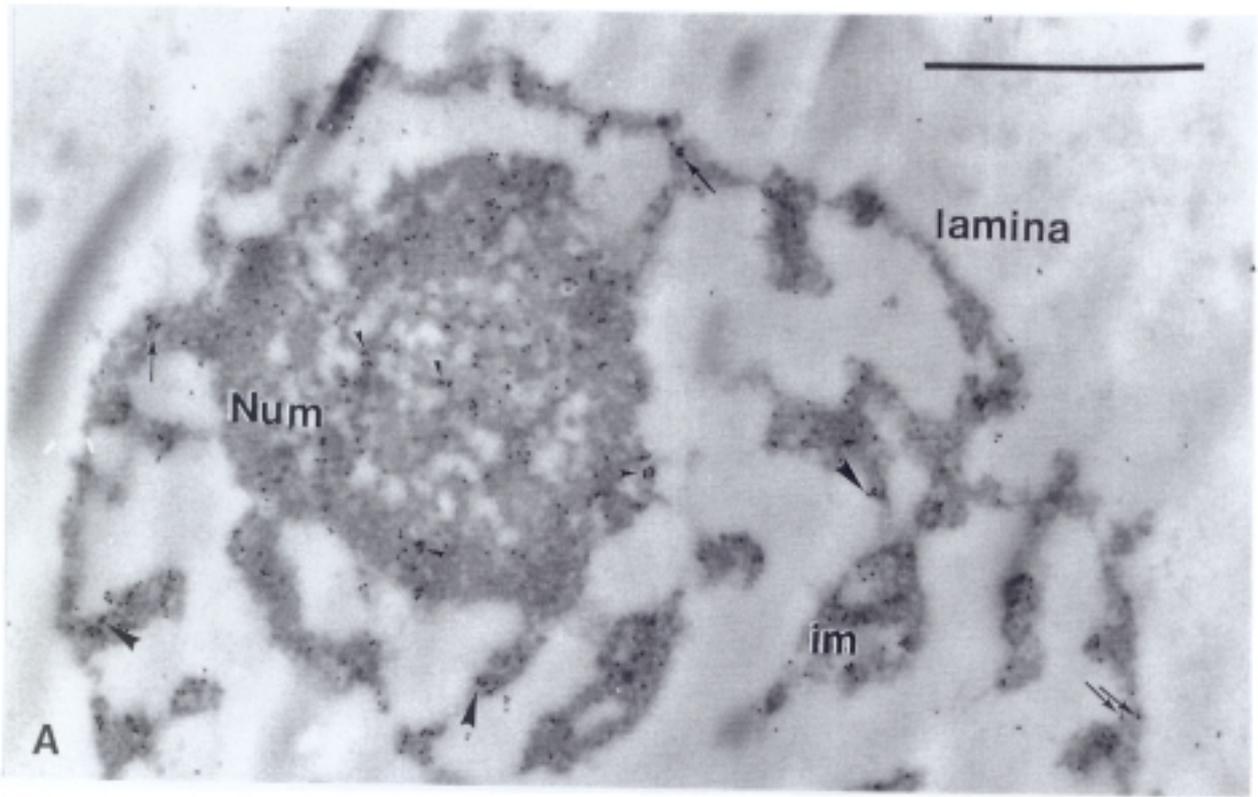
4.3.2.- Inmunofluorescencia.

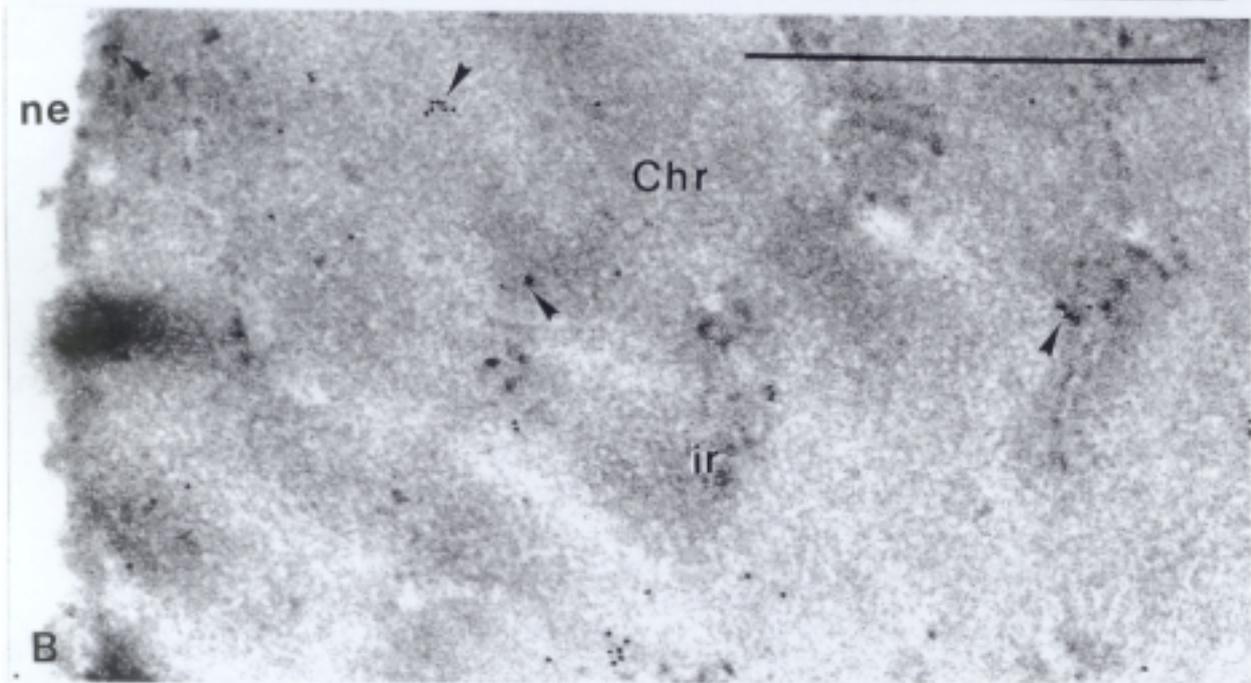
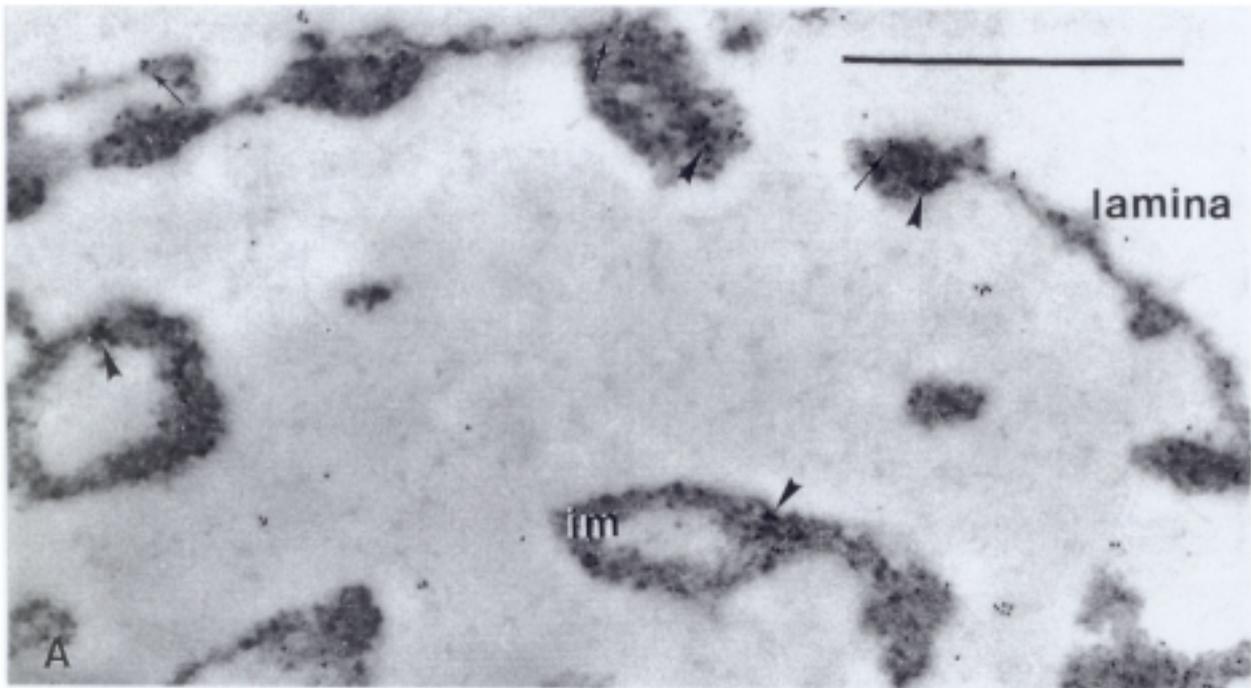
Cuando se incubaron con el anticuerpo JIM 63 frotis, tanto de núcleos como de matrices nucleares de *A. cepa*, la fluorescencia se localiza en el nucleoplasma en el caso de los núcleos (Fig. 16 A), y en los componentes internos en el caso de la matriz nuclear (Fig. 16 B). Se hicieron controles negativos incubando solamente con el anticuerpo secundario, y en ellos no se detectó ninguna fluorescencia (Fig. 16 C).

4.3.3.- Inmunomarcado con oro.

Los datos anteriores quedaron confirmados al observar la reacción del anticuerpo en secciones ultrafinas de matriz nuclear incluídas en LR White. Las partículas de oro conjugadas con el anticuerpo secundario se asocian a la matriz interna y matriz nucleolar principalmente. En cuanto al marcado en la lámina, se localiza aparentemente en los puntos de contacto de la matriz interna con ella (Fig. 17 A). En la Fig. 17 B se aprecia como el control negativo, en que se omitió la

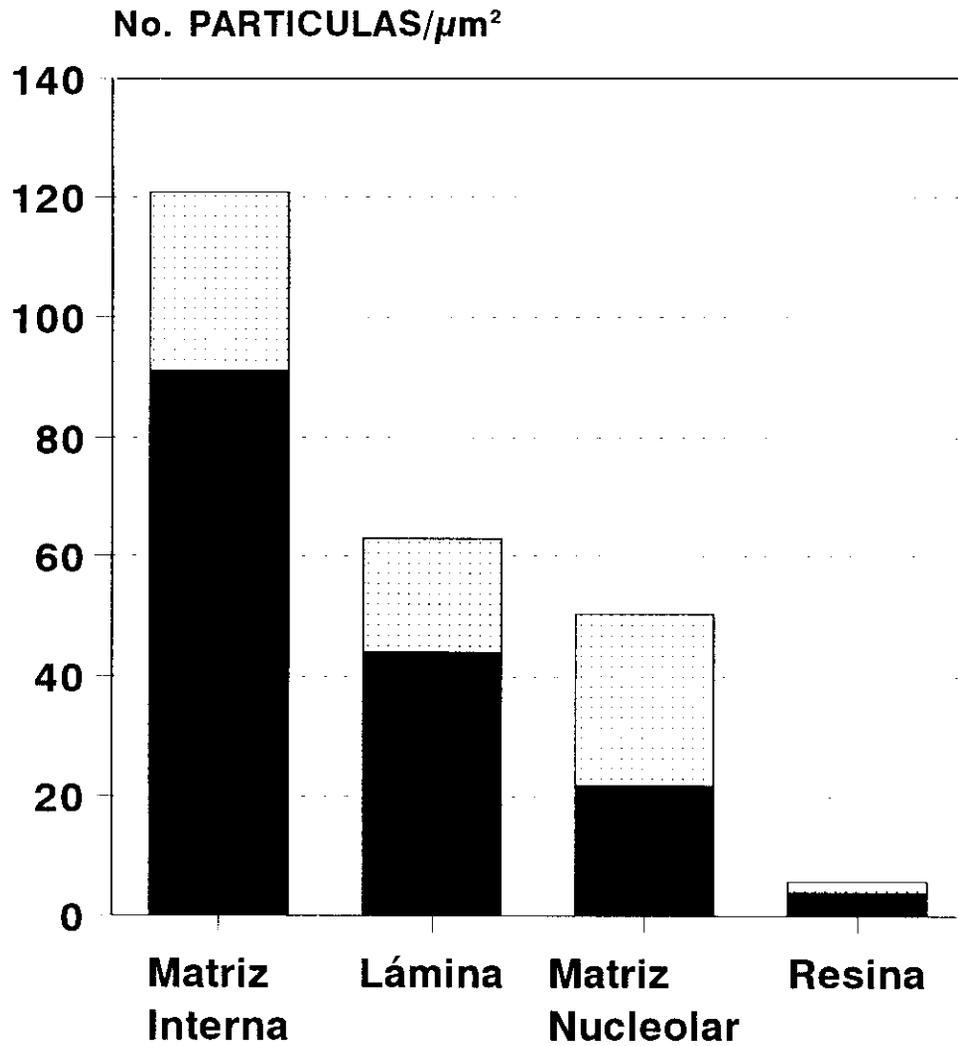






ANTICUERPO JIM63

MARCADO DE LA MATRIZ NUCLEAR



DOMINIOS DE LA MATRIZ

■ MEDIA ▨ +Desv. Std.

incubación con el anticuerpo primario, prácticamente carece de partículas de oro. A mayores aumentos se observan mas claramente los resultados (Fig. 18 A). A su vez los datos obtenidos en núcleos enteros confirman la localización intranuclear de la proteína en *A. cepa*, que se detecta en las regiones intercromatínicas de los mismos (Fig. 18 B).

El histograma, que representa los datos de la cuantificación de la reacción, confirma la distribución obtenida de los resultados anteriores, revelando la mayor densidad de marcado asociado a la matriz interna, siendo mucho menor en el resto de los componentes (Fig. 19).

4.4.- DETECCION DEL ANTIGENO NUCLEAR HOMOLOGO A UNA PROTEINA COMPONENTE DE LOS GRANULOS INTERCROMATÍNICOS DE CELULAS HUMANAS

Estudios ultraestructurales previos habían demostrado que los gránulos intercromatínicos son componentes constantes de la matriz interna de las matrices nucleares de *A. cepa* (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina 1990, Cerezuela, 1991).

Cuando utilizamos la tinción con bismuto, preferencial para determinadas proteínas fosforiladas, en las que están enriquecidos los gránulos intercromatínicos (Moreno Díaz de la Espina y col., 1993b), se observa que dentro de la matriz interna, fibrilogramular, se contrastan solamente los componentes granulares de 20-25 nm que se corresponderían con con estas estructuras (Fig. 20 B).

Sabiendo que los gránulos intercromatínicos forman parte de las matrices nucleares, el siguiente paso fue intentar identificar sus componentes, para lo cual hemos empezado a realizar estudios con anticuerpos específicos.

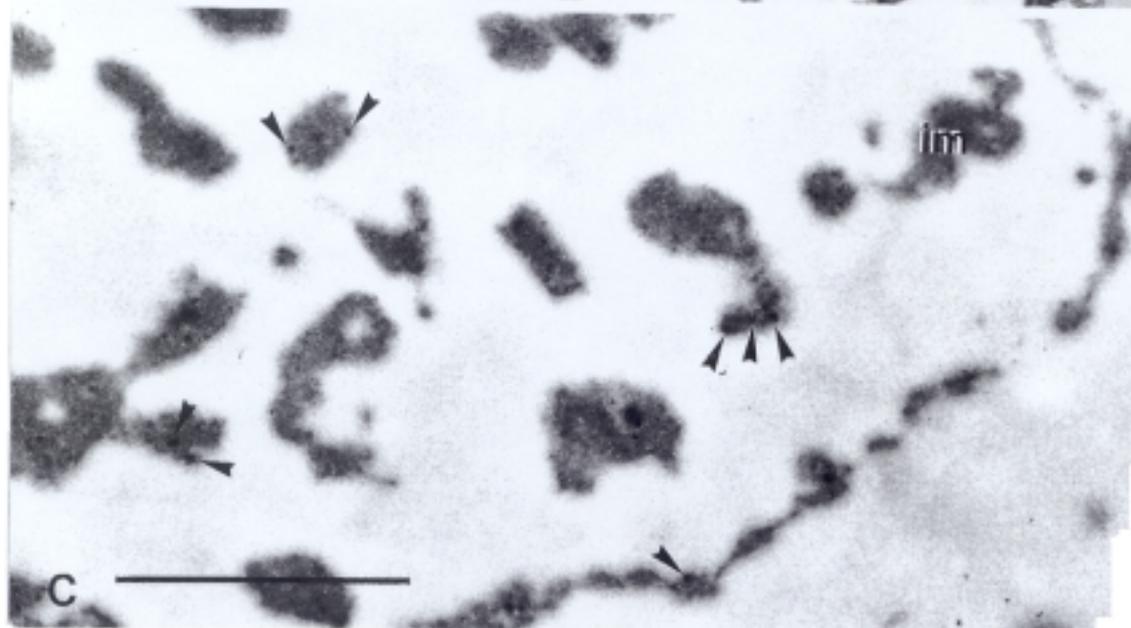
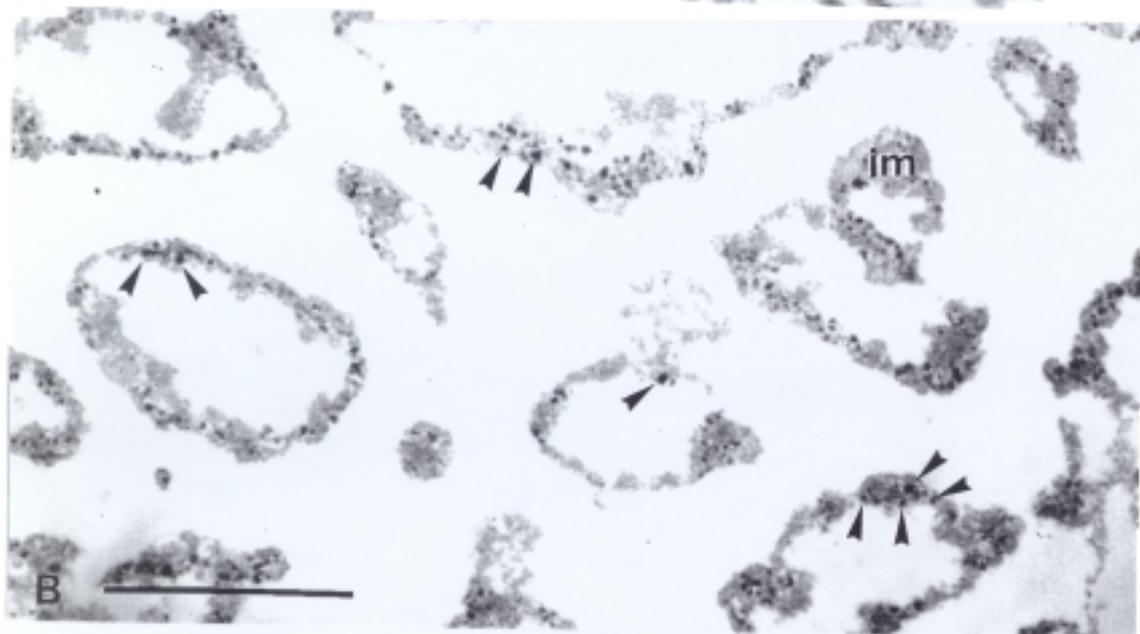
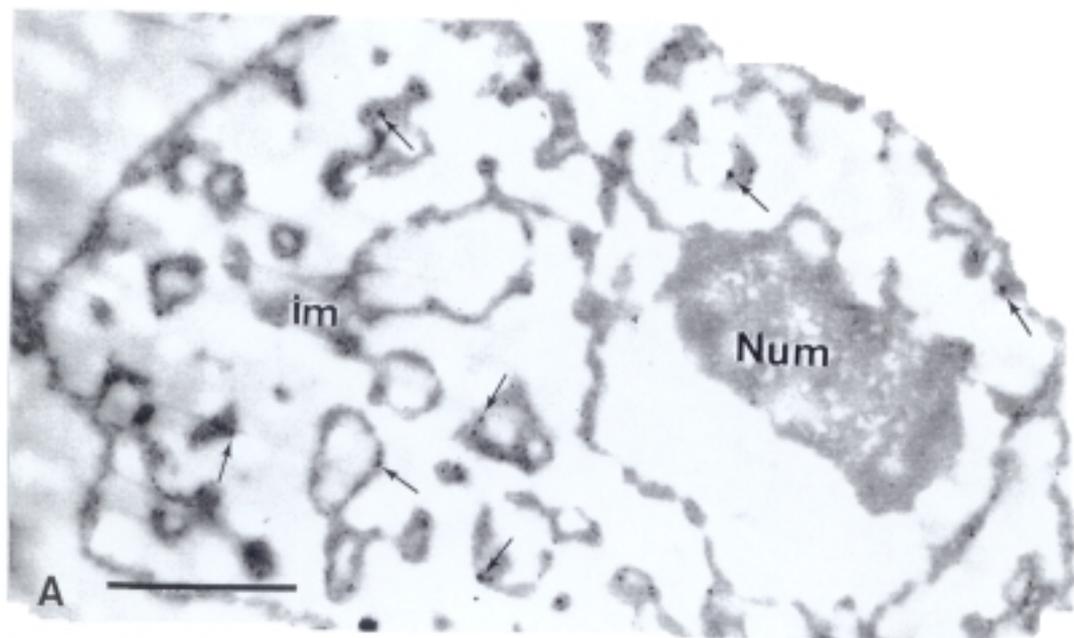
En este caso el anticuerpo utilizado ha sido uno monoclonal, 780-3, distribuido comercialmente por ICN Biomedicals, que reconoce preferencialmente una proteína de los gránulos intercromatínicos de células humanas, de 105 KD, que está relacionada con proliferación.

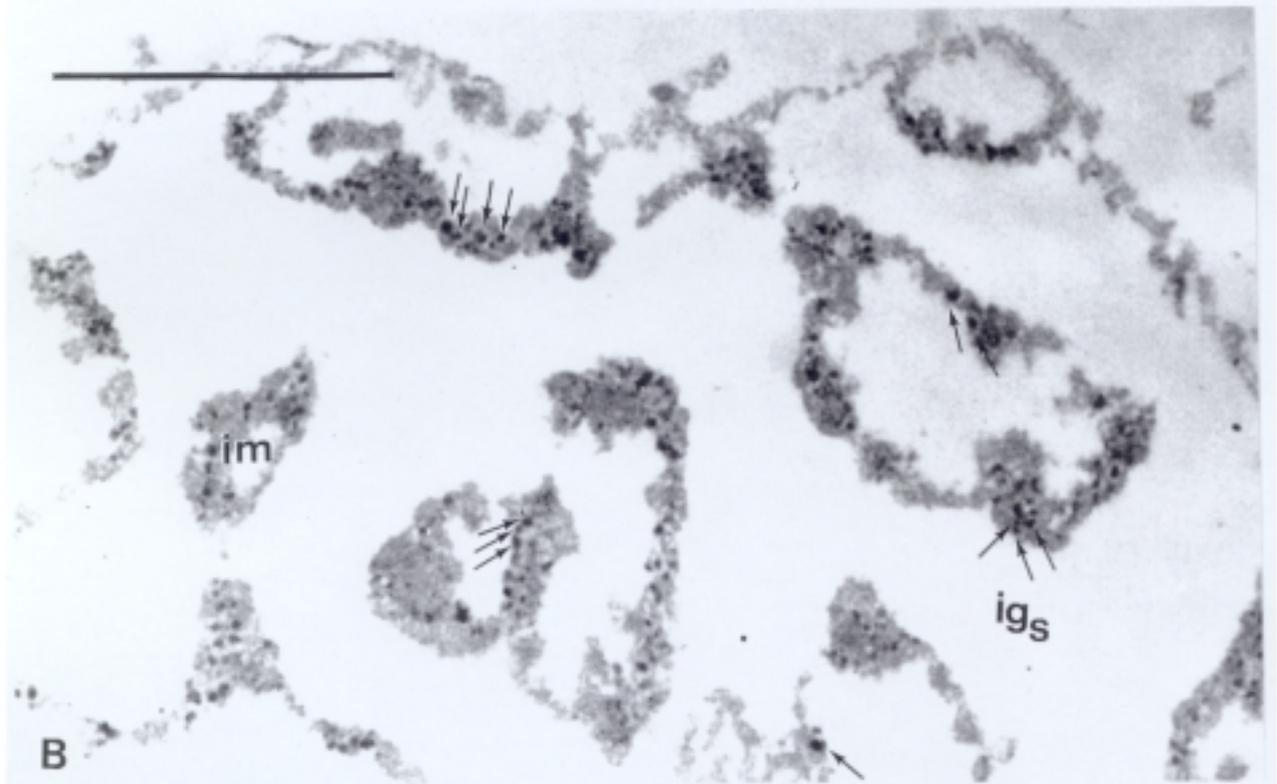
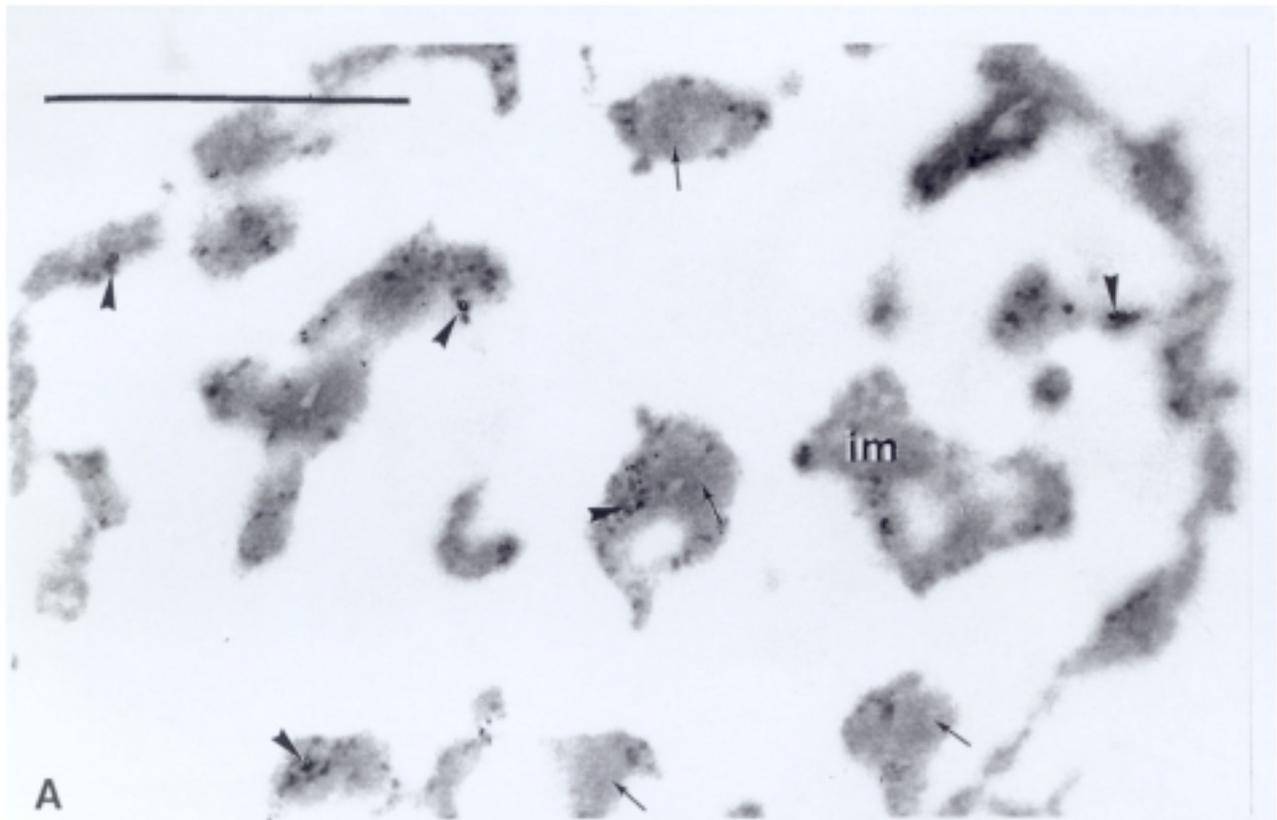
4.4.1.- Inmunoblotting.

Al incubar el anticuerpo sin diluir sobre proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa, tanto de núcleos como de matrices nucleares, no conseguimos resultados específicos, ni siquiera después de tres días de incubación a temperatura ambiente, y de utilizar para revelar la reacción el sistema de detección de máxima sensibilidad ECL de Amersham.

4.4.2.- Inmunomarcado con oro.

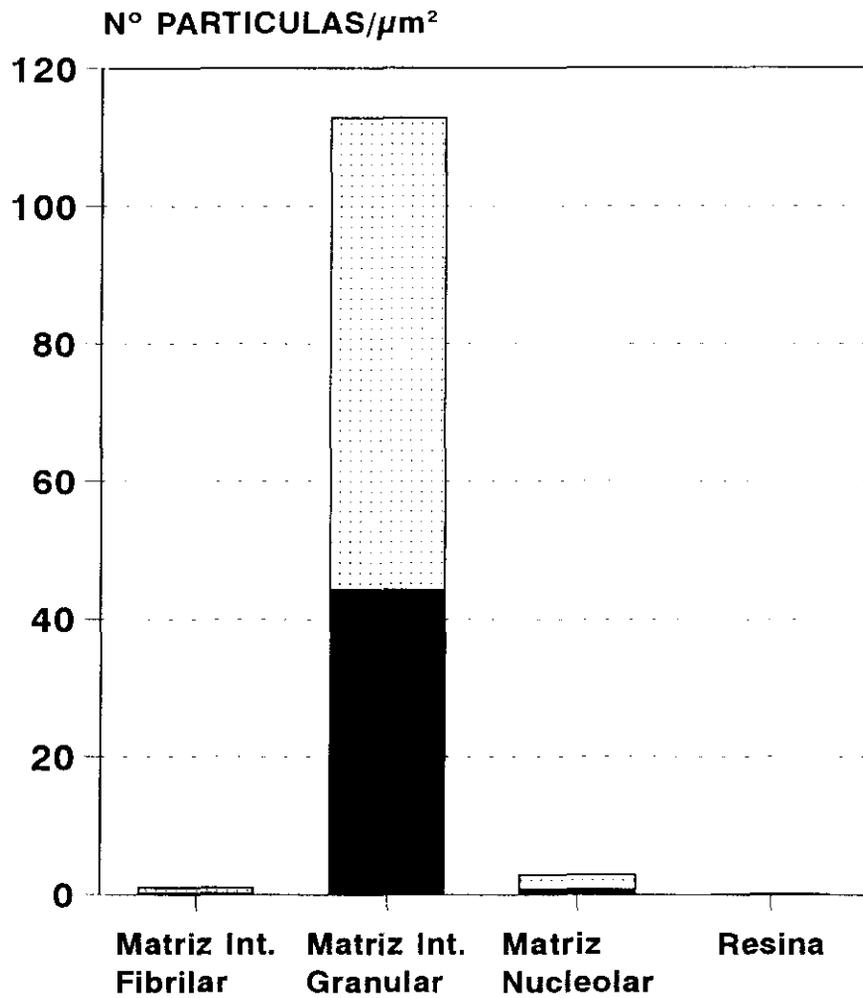
Después de los resultados anteriores, y para comprobar si realmente podía existir un homólogo a dicha proteína en la matriz nuclear de *A. cepa*, se incubaron con el anticuerpo cortes ultrafinos de matrices nucleares incluidas en LR White. Como ya se conocía la baja reactividad del mismo, el periodo de incubación se prolongó hasta dos días en algunas preparaciones, aunque también se hizo siguiendo las





Anti P 105 NA

MARCADO DE LA MATRIZ NUCLEAR



DOMINIOS DE LA MATRIZ

■ MEDIA □ +Desv. Std.

condiciones habituales.

Los resultados obtenidos fueron positivos, observándose que el anticuerpo presentaba una clara especificidad por la matriz interna, pero no de una forma generalizada, sino que las partículas de oro se depositaron sobre los componentes granulares de la misma, careciendo la matriz nucleolar y la lámina de marcado significativo (Fig. 20 A). Si se compara el resultado obtenido con el anticuerpo, con los datos de tinción con bismuto, vemos claramente que los gránulos con los que se asocia el marcado coinciden con los ligam bismuto (Figs. 20 A y 20 B). A mayores aumentos se observa con mas detalle la asociación del marcado a los gránulos de la matriz interna (Figs. 21 A y 21 B).

El grado de marcado inespecífico que se podría deber al anticuerpo secundario, se determinó en cortes en que se omitió la incubación con el anticuerpo primario, los cuales carecían de marcado (Fig. 20 C).

La cuantificación del número de partículas por unidad de área en los distintos compartimentos de la matriz nuclear, confirman la especificidad del marcado en los componentes granulares de la matriz interna (Fig. 22).

5.- MATRIZ NUCLEOLAR. AISLAMIENTO DE NUCLEOLOS Y MATRICES NUCLEOLARES

A lo largo de los estudios realizados sobre la matriz nuclear de *A. cepa*, hemos

comprobado la existencia de una matriz nucleolar como componente constante de las mismas. Esta matriz nucleolar, es resistente a la digestión con nucleasas y extracción con soluciones de alta fuerza iónica, y su presencia es independiente de posibles estabilizaciones por formación de puentes disulfuro, o calor durante el proceso (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990).

Al microscopio óptico se observan las matrices nucleolares como estructuras redondeadas en el interior de las matrices nucleares (Fig 23 C), aparentemente más densas que el resto de las estructuras matriciales, pero mucho más laxas que los nucleolos "in situ" (Fig. 23 A).

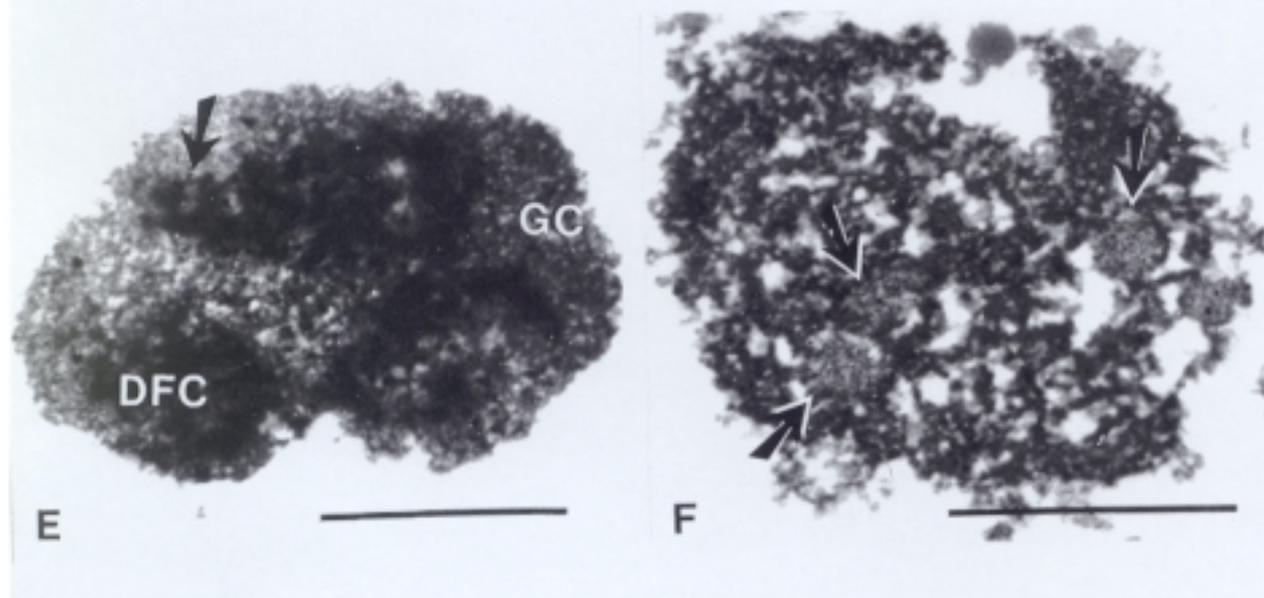
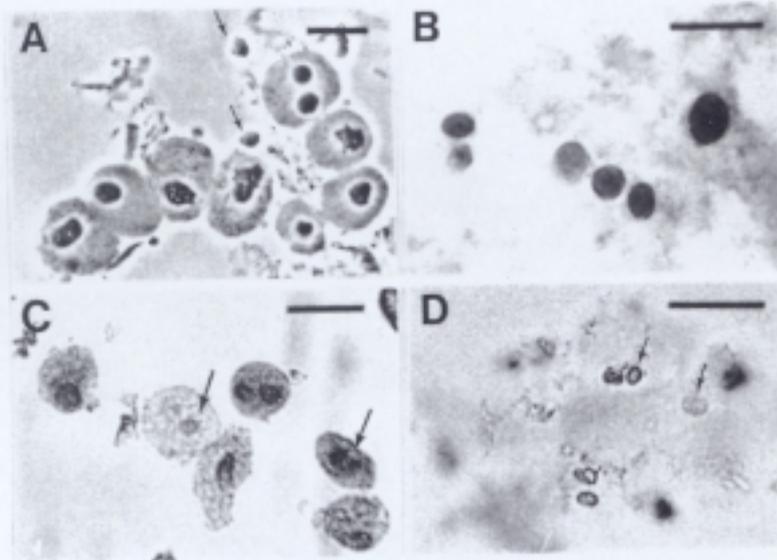
Con el fin de caracterizar los componentes proteicos de la matriz nucleolar sin interferencias por parte de los componentes tanto de la lámina como de la matriz interna, decidimos preparar matrices nucleolares a partir de nucleolos aislados (Apéndice A. Tabla III).

Obtuvimos nucleolos con un alto grado de pureza, libres de restos de cromatina, como se observa en las imágenes del microscopio óptico (Fig. 23 B), y con una preservación estructural muy buena como se demuestra al compararlos con los nucleolos que se encuentran dentro de núcleos aislados (Fig. 23 A). Su estudio al microscopio electrónico demostró que los nucleolos aislados mantenían su integridad, así como la distribución de los tres componentes clásicos de los nucleolos "in situ": centros fibrilares, rodeados por el componente fibrilar denso y en la periferia el componente granular (Fig. 23 E).

Posteriormente los nucleolos aislados se sometieron a extracciones sucesivas con nucleasas y 2 M NaCl, en presencia de DTT, dando lugar a las matrices nucleolares aisladas. Estas aparecen mucho más laxas que los correspondientes nucleolos y de tamaño ligeramente inferior al microscopio óptico (Fig. 23 B y 23 D).

5.1.- ORGANIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE LA MATRIZ NUCLEOLAR AISLADA

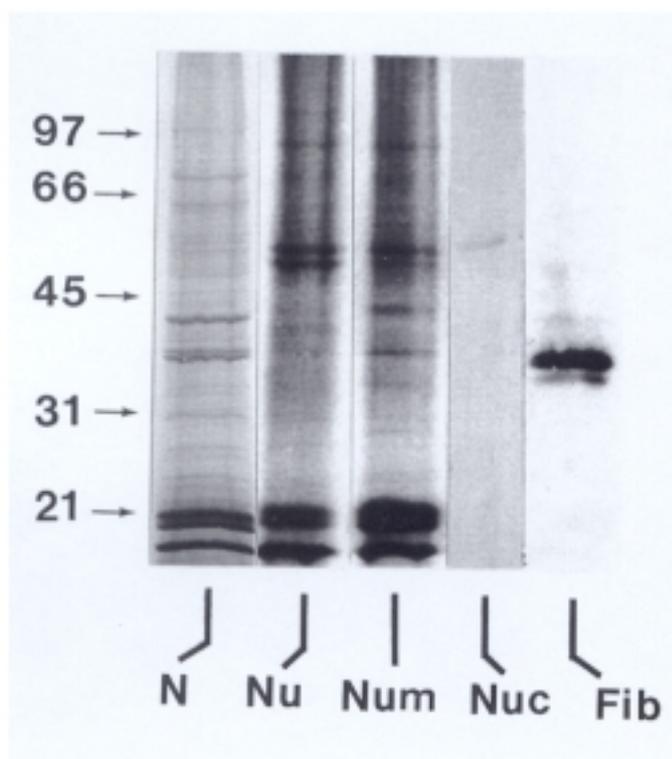
La matriz nucleolar aislada presenta una buena preservación morfológica, conservando una organización semejante a la de aquellas que forman parte de las matrices nucleares (Comparar Fig. 23 C y 23 D). Al microscopio electrónico se observan como estructuras exclusivamente fibrilares, formadas por fibras de 10 nm, sin partículas preribosómicas ni componente granular, que es lo que las diferencia fundamentalmente de los nucleolos aislados (Figs. 23 E y 23 F). En ellas, suelen observarse estructuras redondeadas, fibrilares, menos densas a los electrones, con un diámetro medio de $0,27625 \pm 0.07802 \mu\text{m}$, que se corresponderían con los centros fibrilares del nucleolo aislado, constituyendo por tanto el único componente estructural del nucleolo que permanece como tal en la matriz nucleolar (Fig 23 F).



5.2.- COMPOSICION PROTEICA DE LAS MATRICES NUCLEOLARES

5.2.1.- Estudio de la composición polipeptídica en geles monodimensionales.

Cuando se comparan los perfiles polipeptídicos, en geles monodimensionales, de núcleos, nucleolos aislados y matrices nucleolares aisladas, se observa que son claramente distintos. Los nucleolos presentan un perfil polipeptídico distinto del de los núcleos aislados, con proteínas mayoritarias que no aparecían como tales en los núcleos enteros, entre ellas las bandas de 88, 57, 55, 20, 21 y 14 KD. Aunque las histonas de la zona central del nucleosoma aparecen como componentes de ambas fracciones, no sucede lo mismo con las variantes de la histona H₁, en el rango de 35-40 KD de peso molecular, que son componentes mayoritarios de los núcleos pero no de los nucleolos de células proliferantes de *A. cepa* (Moreno Díaz de la Espina y col. 1991. Vazquez Nin y col., 1992). Una vez sometidos a extracciones sucesivas, se comprobó que en su mayoría dichas bandas permanecen en las matrices nucleolares. La banda de 57 KD aparece menos concentrada en las matrices nucleolares, que muestran un enriquecimiento en otras proteínas de 33, 38, 46, 64, 70 y 76 KD. Como en el caso de las matrices nucleares totales, las matrices nucleolares también presentan abundantes componentes de bajo peso molecular que migran con las histonas del núcleo del nucleosoma (Moreno Díaz de la Espina y col., 1991, Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993b) (Fig. 24).

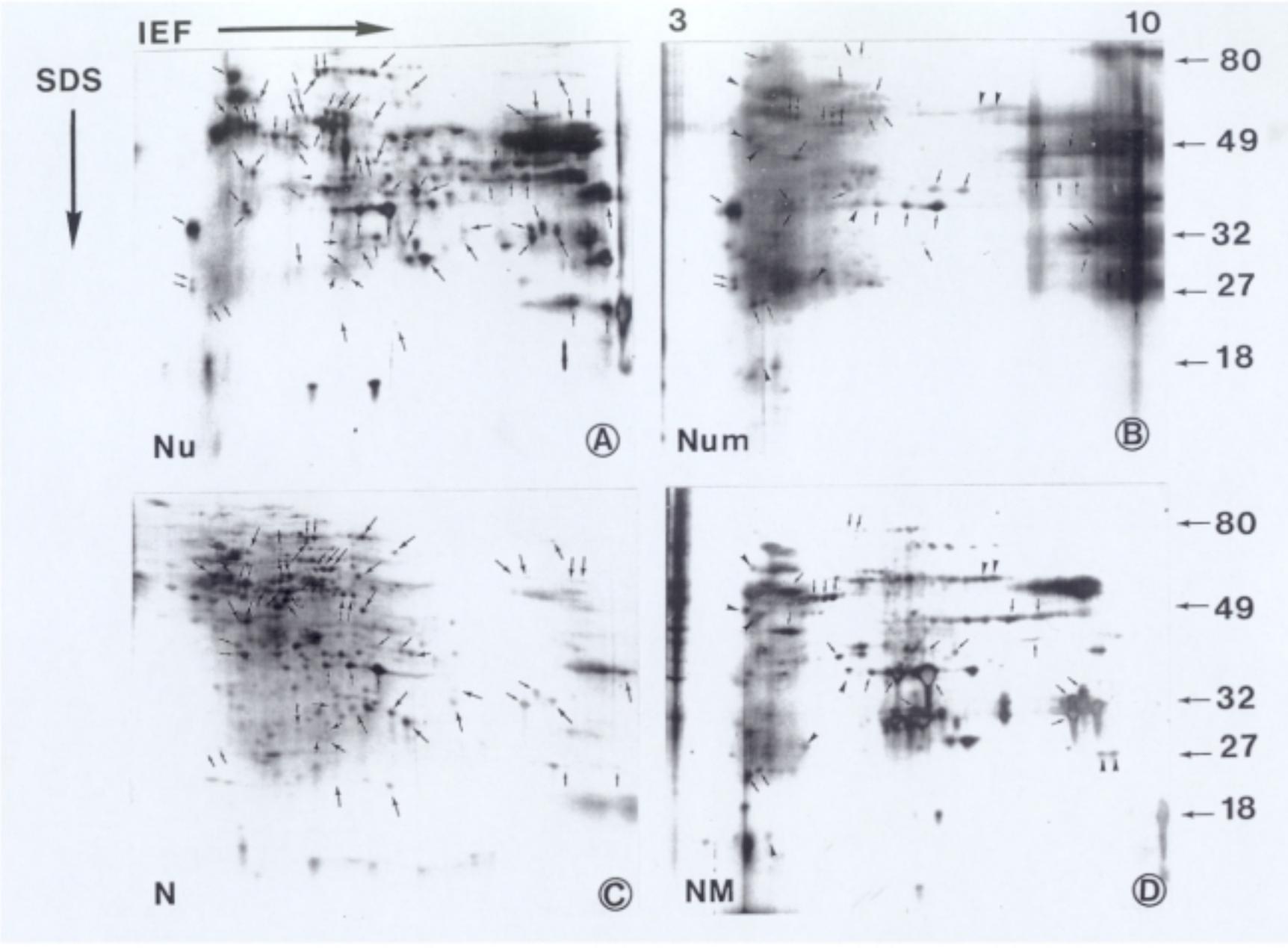


5.2.2.- Estudio de la composición polipeptídica en geles bidimensionales.

Al someter ambas fracciones a electroforesis bidimensional, las diferencias previamente detectadas aparecieron de forma mas clara, de manera que bandas que parecían comunes realmente correspondían a proteínas de igual Pm pero pl diferente, que se presentan en diferente proporción en ambas fracciones (Fig. 25). En geles de matrices nucleolares aisladas teñidos con plata se observan hasta 140 "spots", con una gran mayoría de proteínas ácidas (Fig. 25 B), a diferencia de los nucleolos en cuyos geles se pueden distinguir hasta 180 "spots" que se distribuyen en un rango muy amplio de pl y Pm (Fig. 25 A). Entre nucleolos y matrices nucleolares se han identificado 37 "spots" en común con pesos moleculares entre 27 y 80 KD (Figs. 25 A y 25 B), y solamente 35 con las matrices nucleares totales (Fig. 25 B-D). Estos datos demuestran la compleja composición de las matrices nucleolares aisladas, asociadas a las cuales se encuentran otras proteínas además de las exclusivamente esqueléticas, como en el caso de la matriz nuclear.

6.- CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS DE LAS MATRICES NUCLEOLARES

Con el fin de caracterizar las moléculas o estructuras implicadas en el mantenimiento estructural del nucleolo, hemos realizado en las matrices nucleolares, experimentos de inmunolocalización de dos proteínas nucleolares mayoritarias, involucradas en la transcripción y el procesamiento del rDNA, fibrilarina y nucleolina. En primer lugar mediante inmunoblotting con el fin de detectar la presencia de dichas



proteínas en nuestras fracciones y posteriormente completando el estudio con datos de inmunomarcado con oro e inmunofluorescencia para determinar su localización.

6.1.- LOCALIZACION DE NUCLEOLINA EN LA MATRIZ NUCLEOLAR

La nucleolina es una proteína multifuncional implicada en la regulación de la transcripción del rRNA y que se asocia al rDNA y a los precursores de los rRNAs en el nucleolo de células eucariotas, siendo mayoritaria en el nucleolo de células animales en crecimiento exponencial. La existencia de una proteína semejante a la de células animales en *A. cepa* ya ha sido demostrada (Martín y col., 1992a), y aunque presenta un peso molecular menor que la de vertebrados, conserva las mismas características de solubilidad, distribución así como fosforilación que la de mamíferos (Medina y col., 1993). Debido al interés que podría tener descubrir la posible asociación de esta proteína con el nucleolo residual, así como las implicaciones funcionales derivadas de ello, decidimos analizar su presencia en la matriz nucleolar. Para ello hemos utilizado por un lado tinción con bismuto que tiene una alta afinidad por esta proteína y por otro detección inmunológica con dos anticuerpos antinucleolina.

6.1.1.- Tinción con Bismuto.

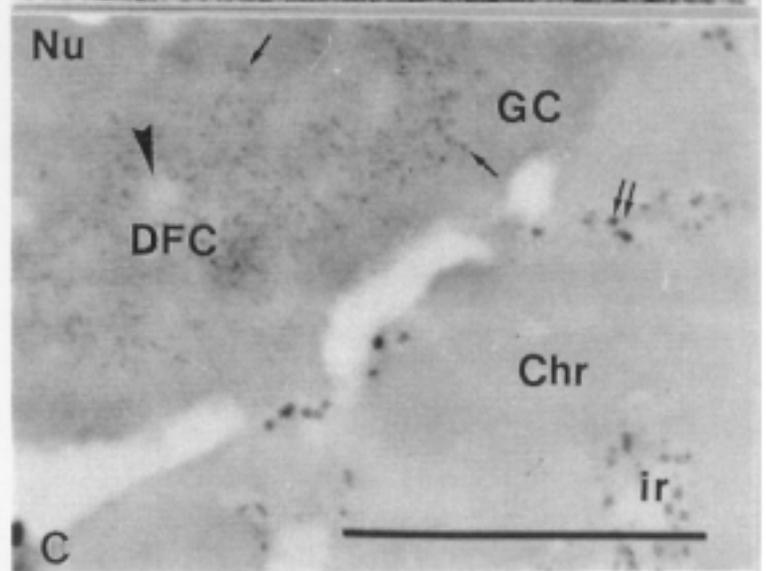
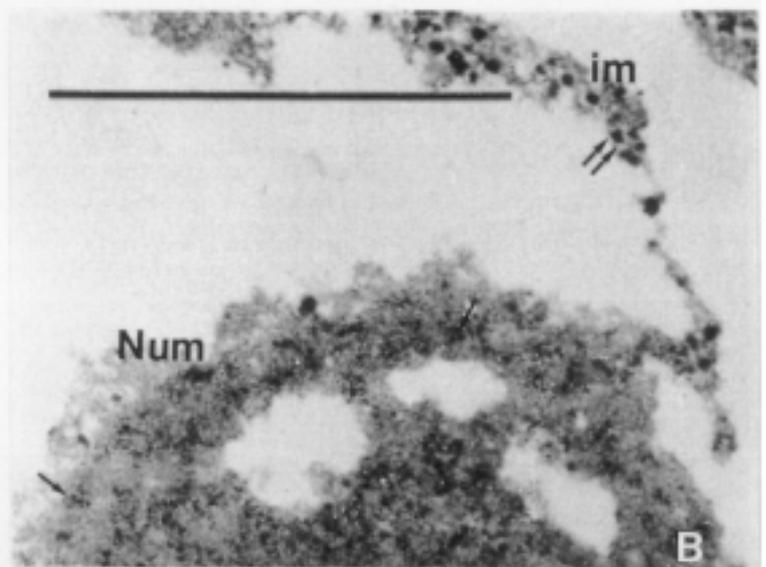
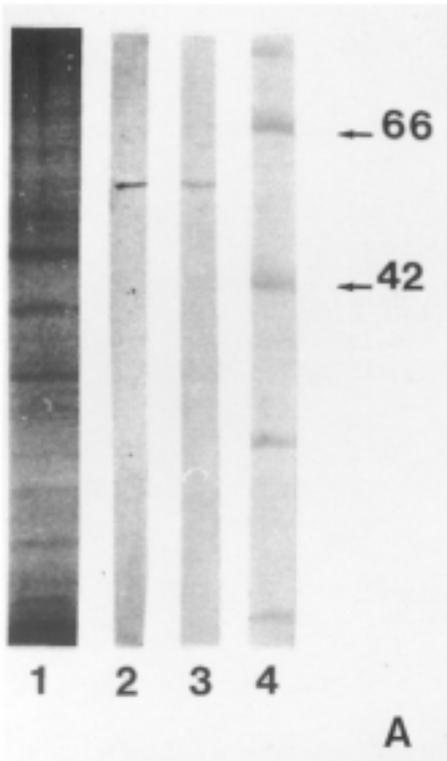
La tinción con oxinitrato de bismuto, utilizada después de fijación con glutaraldehído, que bloquea la reacción inespecífica con los grupos aminos de las proteínas, ha demostrado ser altamente selectiva en núcleos de células

meristemáticas de *A. cepa* contrastando exclusivamente los gránulos intercromatínicos, así como un retículo dentro del componente fibrilar denso del nucleolo que contiene la nucleolina (Fig 26 C) (Moreno Díaz de la Espina y col., 1993b). Cuando se tiñeron siguiendo el mismo procedimiento matrices nucleares de *A. cepa* se observó que se contrasta la matriz nucleolar, pero no uniformemente, sino de forma semejante a los nucleolos, siguiendo un retículo (Fig 26 B). En cuanto al resto de la matriz, aparecen contrastados los componentes granulares de la matriz interna que se corresponden con los gránulos intercromatínicos como vimos anteriormente (Fig. 20 B).

La aplicación de la técnica de impregnación con bismuto sobre proteínas de matrices nucleares separadas electroforéticamente y transferidas a membranas de nitrocelulosa, fijadas con glutaraldehído (Moreno Díaz de la Espina y col., 1993b), detecta una banda de aproximadamente 58 KD. Para confirmar si realmente dicha banda corresponde a la nucleolina, hemos realizado estudios de inmunoblotting e inmunocitoquímicos utilizando dos anticuerpos policlonales, uno de ellos desarrollado contra la nucleolina de hamster (Martín y col., 1992a), y el otro contra la de células T₄ de ratón (Warrener y Petryshyn 1991) (Apéndice A. Tablas V, VII y IX).

6.1.2.- Inmunoblotting.

Cuando se utilizó el anticuerpo antinucleolina sobre proteínas de matrices nucleares totales transferidas a membranas de nitrocelulosa, reconoció una banda de 58 KD, semejante a la detectada en núcleos y nucleolos aislados de *A. cepa* con



anticuerpos antinucleolina de distintas procedencias (Martín y col., 1992a, Moreno Díaz de la Espina y col., 1993b), así como a la banda que se contrasta mediante tinción con bismuto en esta fracción (Fig. 26 A).

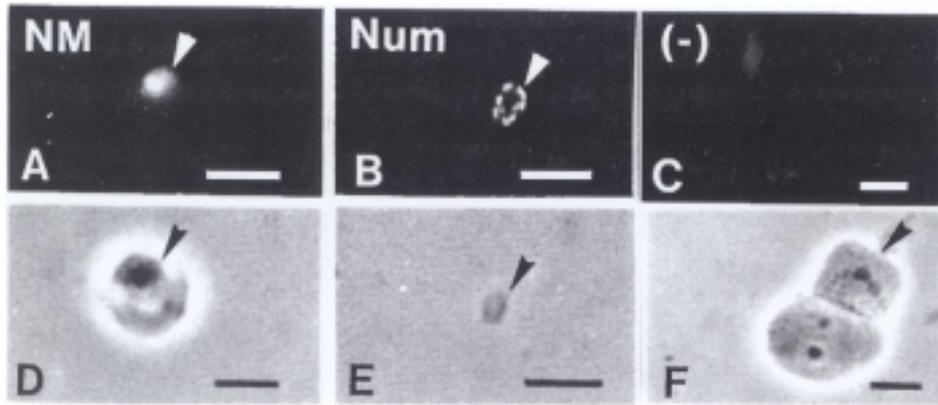
El resultado al hacer reaccionar el anticuerpo con proteínas de matriz nucleolar fue semejante, reconociendo la misma banda de 58 KD que, sin embargo, no aparece como un componente mayoritario de estas fracciones a diferencia de lo que luego veremos con la fibrilarina (Fig. 24).

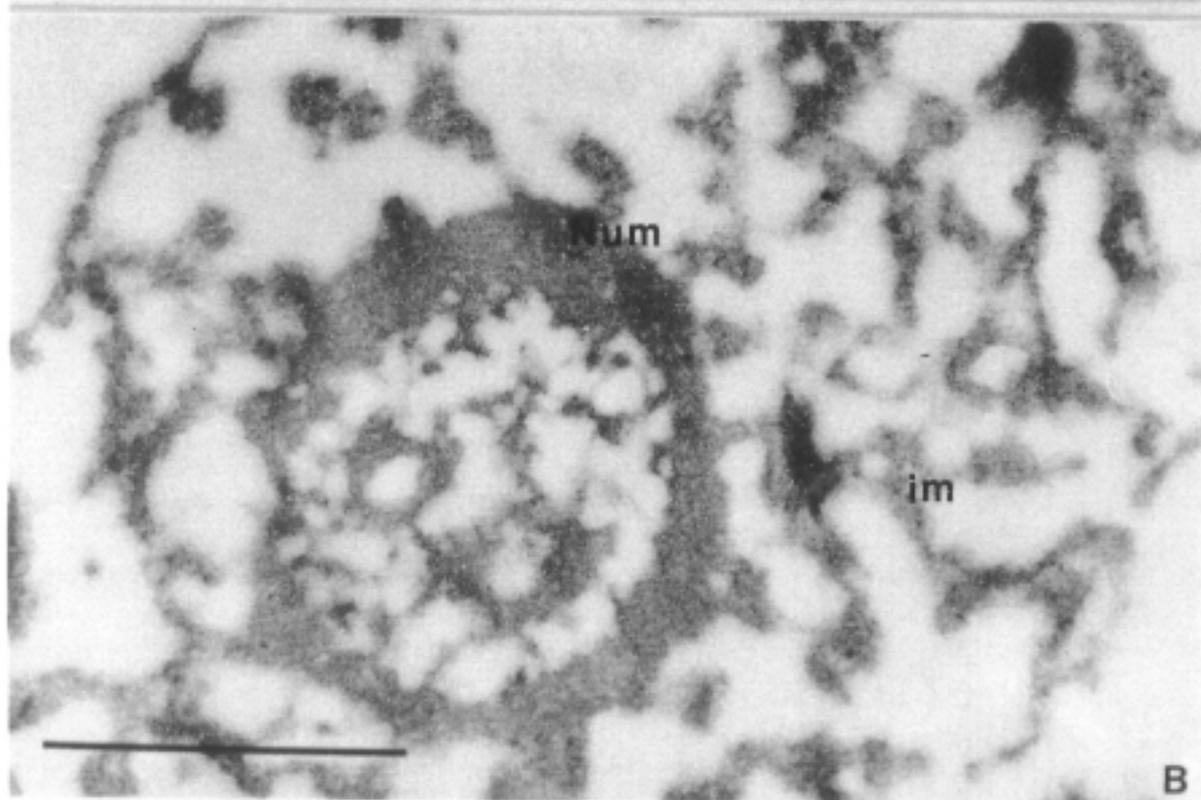
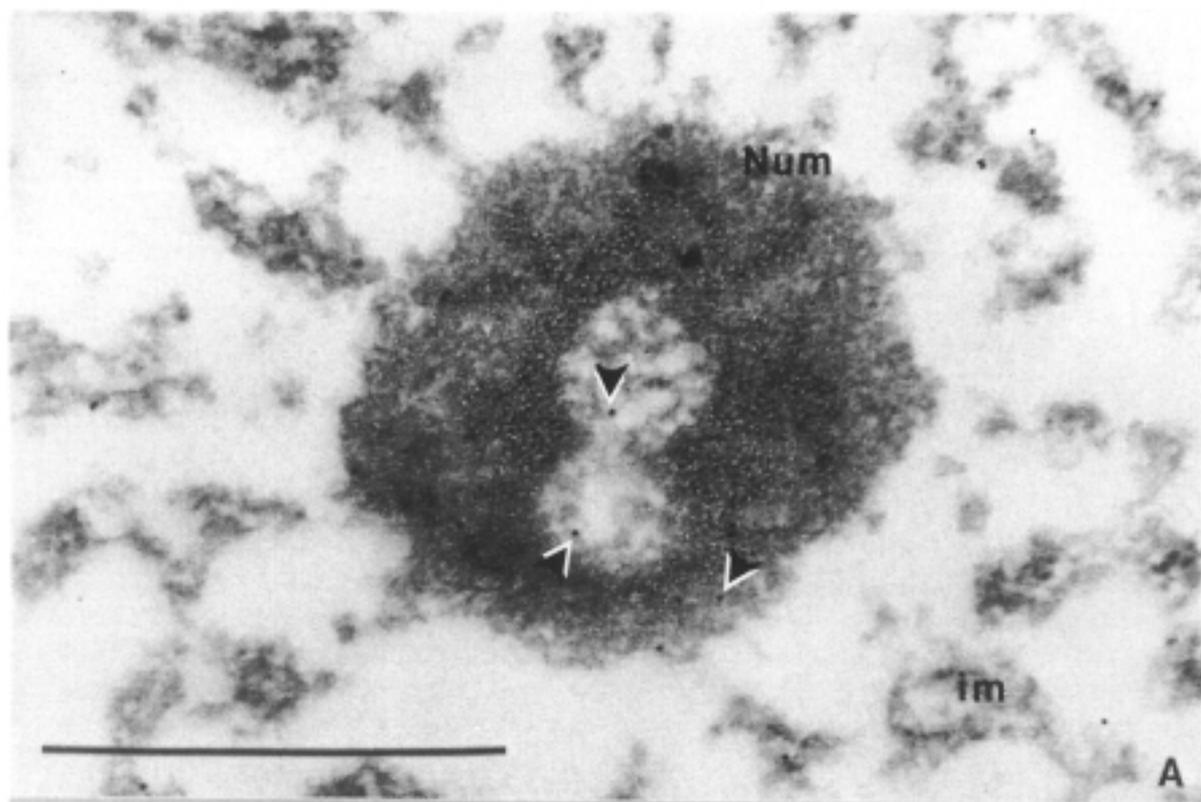
6.1.3.- Inmunofluorescencia.

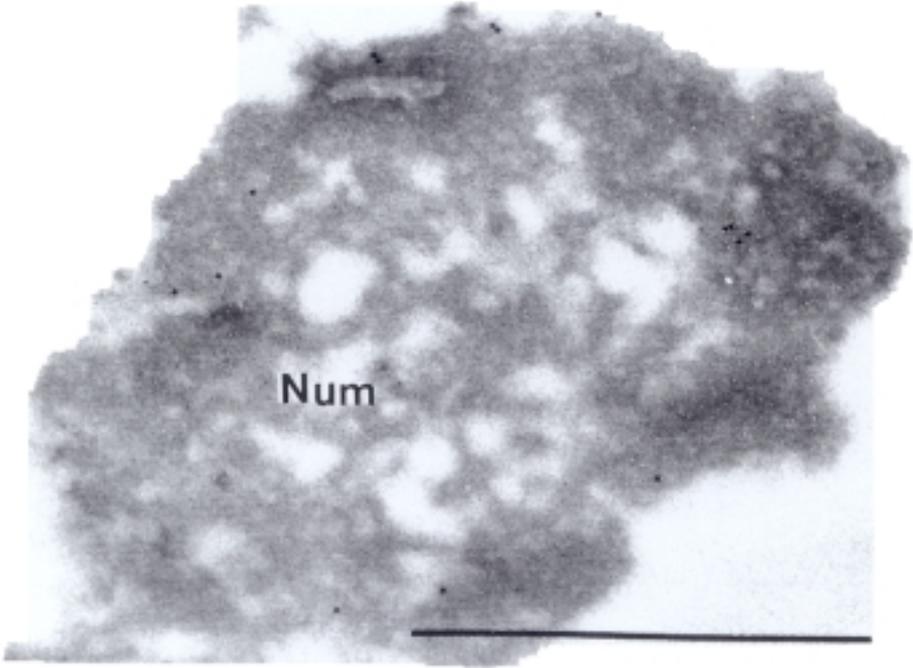
Al incubar con los anticuerpos antinucleolina matrices nucleares y nucleolares, y observarlos mediante inmunofluorescencia indirecta, comprobamos que la reacción se asociaba con la matriz nucleolar, tanto aislada como formando parte de las matrices nucleares enteras (Fig. 27 A y 27 B). El control negativo, en que se omitió la incubación con el anticuerpo primario, carece de fluorescencia (Fig. 27 C). Si tenemos en cuenta que en el proceso de obtención de las matrices se han utilizado soluciones de baja fuerza iónica, con las que se solubiliza la mayoría de la nucleolina nuclear (Cerdido y col., 1993), podemos tener la certeza de que la detectada es la fracción insoluble de la proteína que está fuertemente unida al esqueleto nucleolar.

6.1.4.- Inmunomarcado con oro.

Estos datos se confirmaron al observar la reacción de los anticuerpos al

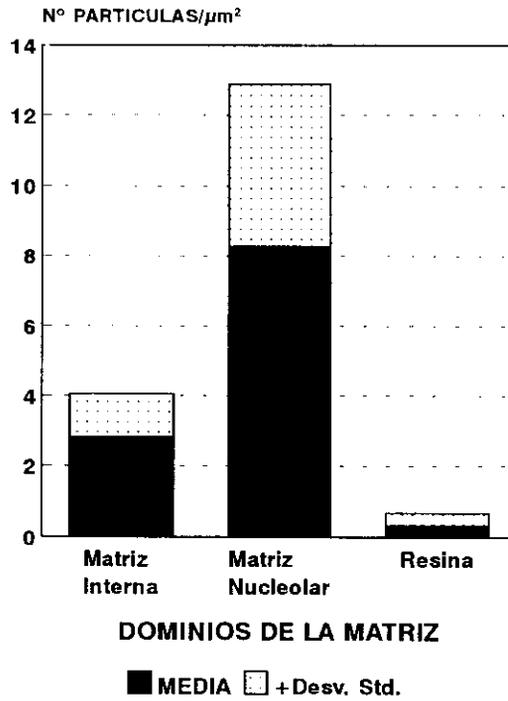






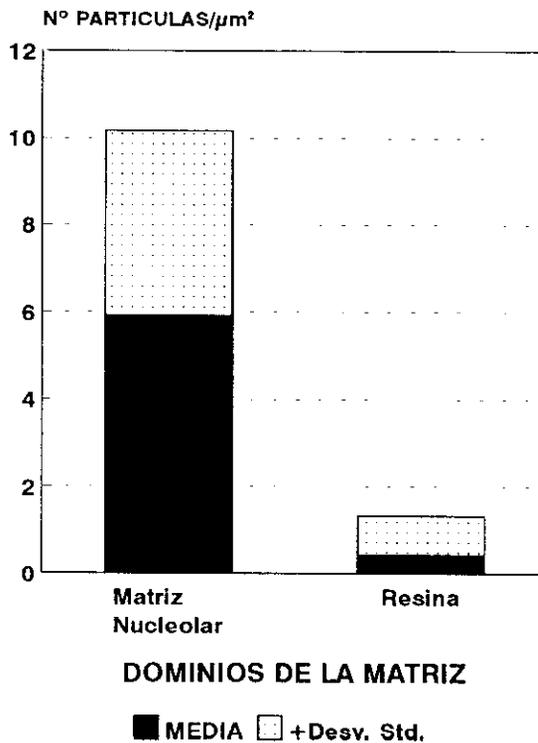
NUCLEOLINA

MARCADO DE LA MATRIZ NUCLEAR



(A)

MARCADO DE LA MATRIZ NUCLEOLAR



(B)

microscopio electrónico, mostrando como las partículas de oro se acumulan en el nucleolo residual, tanto en el caso de las matrices nucleares enteras (Fig. 28 A), como en el de las matrices nucleolares aisladas (Figs. 29), aunque aparezcan algunas partículas asociadas a la matriz interna en las matrices nucleares. Cuando en la incubación se suprimió el anticuerpo primario, las muestras aparecieron desprovistas de marcado (Fig. 28 B). La cuantificación de los datos reveló que la reacción era específica de la matriz nucleolar, así como que el marcado era ligeramente inferior cuando se analizaban los datos en matrices nucleolares (Fig. 30 B) aisladas que cuando estas se encontraban formando parte de matrices nucleares (Fig.30 A).

6.2.- DETECCION DE FIBRILARINA EN LA MATRIZ NUCLEOLAR

La fibrilarina es una proteína nucleolar muy conservada, que se caracteriza por asociarse a los snoRNAs U_3 , U_5 y U_{13} formando parte de las partículas ribonucleoproteicas que participan en el procesamiento del pre-rRNA (Fournier y Maxwell, 1993). En las distintas especies se caracteriza por tener un Pm de 34-38 KD, un pl básico (8.5-10), y un alto contenido en glicina y en N^5 - N^8 dimetilarginina.

Al formar parte, la fibrilarina, de los complejos multiméricos responsables del procesamiento del rRNA, su presencia como componente de la matriz nucleolar, aparte de un posible papel estructural, tendría un significado funcional muy importante en la matriz nucleolar.

Para detectar su presencia en la matriz nucleolar de *A. cepa* hemos utilizado

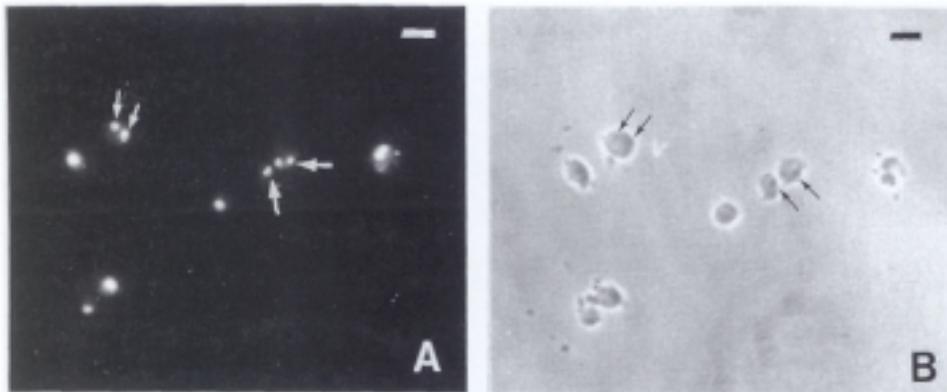
dos anticuerpos, uno es un suero autoinmune (S_4), que reconoce dicha proteína nucleolar (Lischwe y col., 1985, Ochs y col., 1985), y el otro es un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de la proteína B_{36} de *Physarum* (Christensen y col., 1986) (Apéndice A. Tablas. V, VII y IX).

6.2.1.- Inmunoblotting.

En blots monodimensionales de proteínas de matrices nucleolares, el suero autoinmune reconoce una banda mayoritaria de 37 KD junto con otra banda de menor concentración que presenta una movilidad ligeramente superior, análogas a las detectadas en núcleos o nucleolos aislados (Fig. 24). Teniendo en cuenta que el procedimiento de aislamiento de las muestras se ha realizado en condiciones reductoras, así como a bajas temperaturas podemos descartar por un lado la estabilización de las proteínas durante el proceso de aislamiento, y por otro una posible degradación de la proteína.

6.2.2.- Inmunofluorescencia.

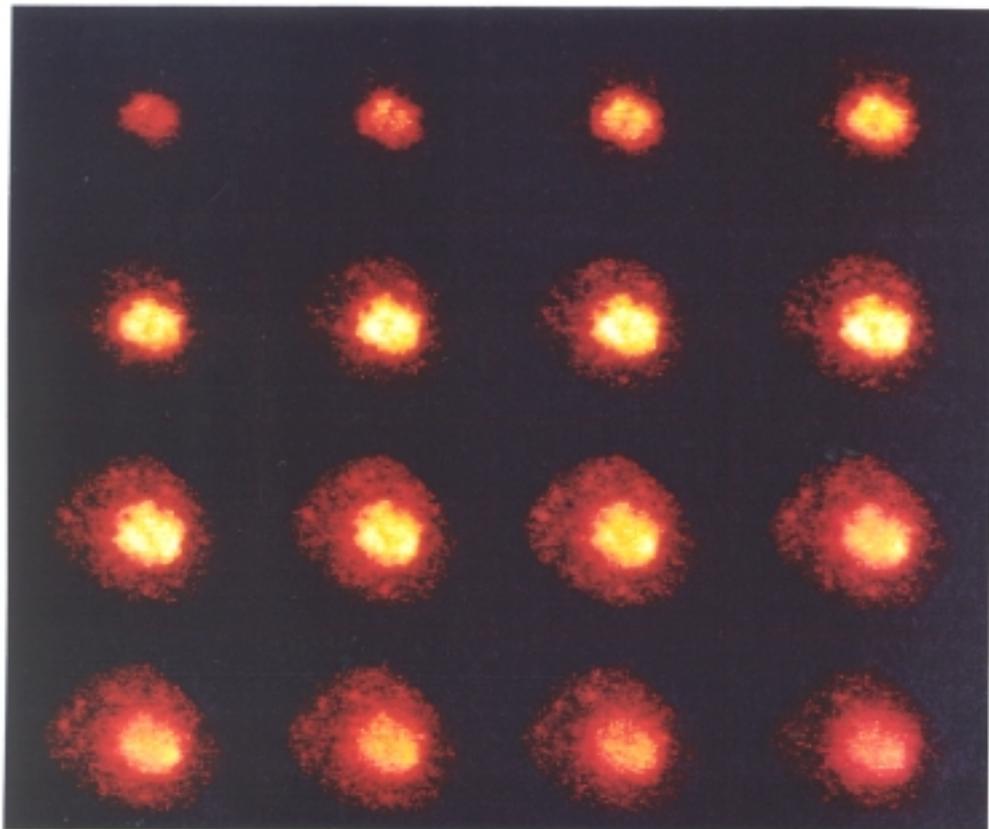
Los datos de inmunofluorescencia, obtenidos con los mismos anticuerpos en matrices nucleares muestran que la fluorescencia se localiza en el nucleolo residual, careciendo de marcado significativo el resto de los componentes de las matrices (Fig. 31 A). Las observaciones de contraste de fase permiten apreciar el buen grado de extracción de las matrices nucleares (Fig. 31 B), que confirman que la presencia de fibrilarina no se debe a una extracción deficiente de las matrices.



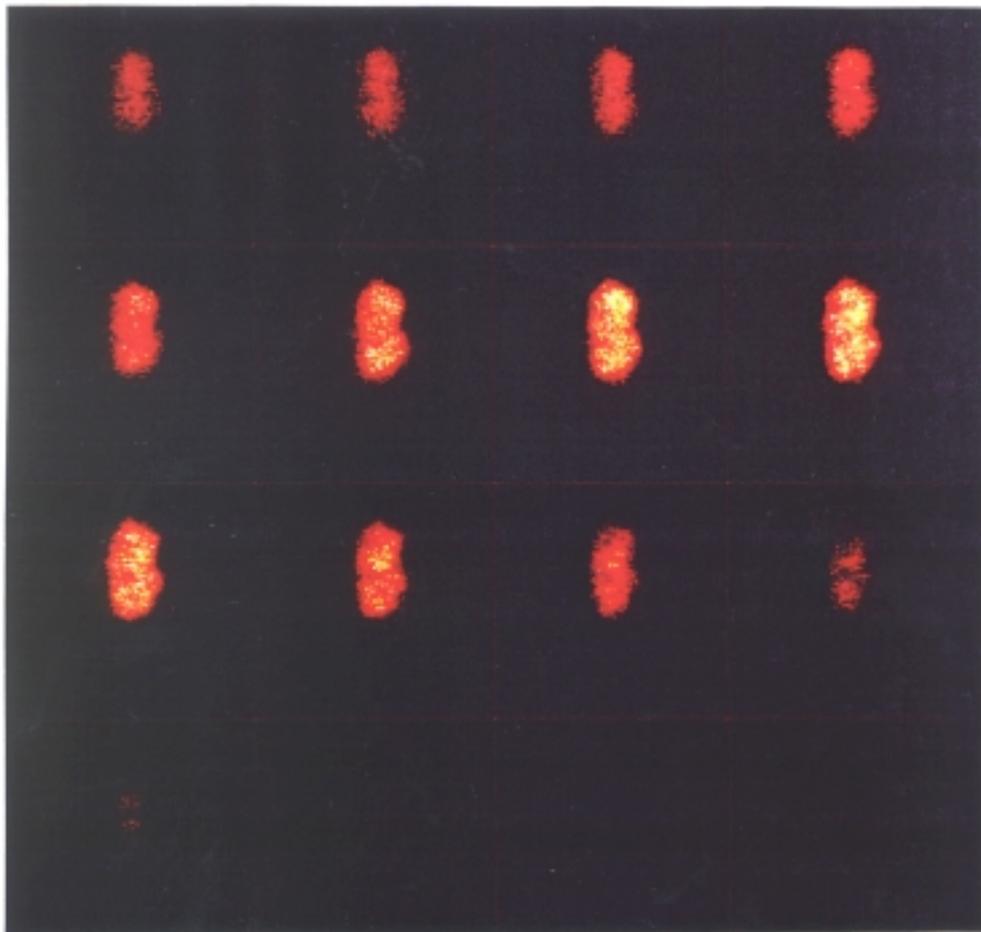
La distribución topológica de la proteína en la matriz nucleolar se analizó mediante microscopía de fluorescencia confocal. Se obtuvieron imágenes de secciones ópticas seriadas de matrices nucleares incubadas con dichos anticuerpos, y se observó que la reacción se localizaba en el nucleolo de forma específica (Figs. 32 A), distribuyéndose en dominios discretos dentro de la matriz nucleolar como se observa una vez eliminada toda la fluorescencia localizada fuera de foco (Fig. 32 B), que por su número no corresponden con los centros fibrilares, como se confirmará mas adelante con los datos del inmunomarcado con oro.

6.2.3.- Inmunomarcado con oro.

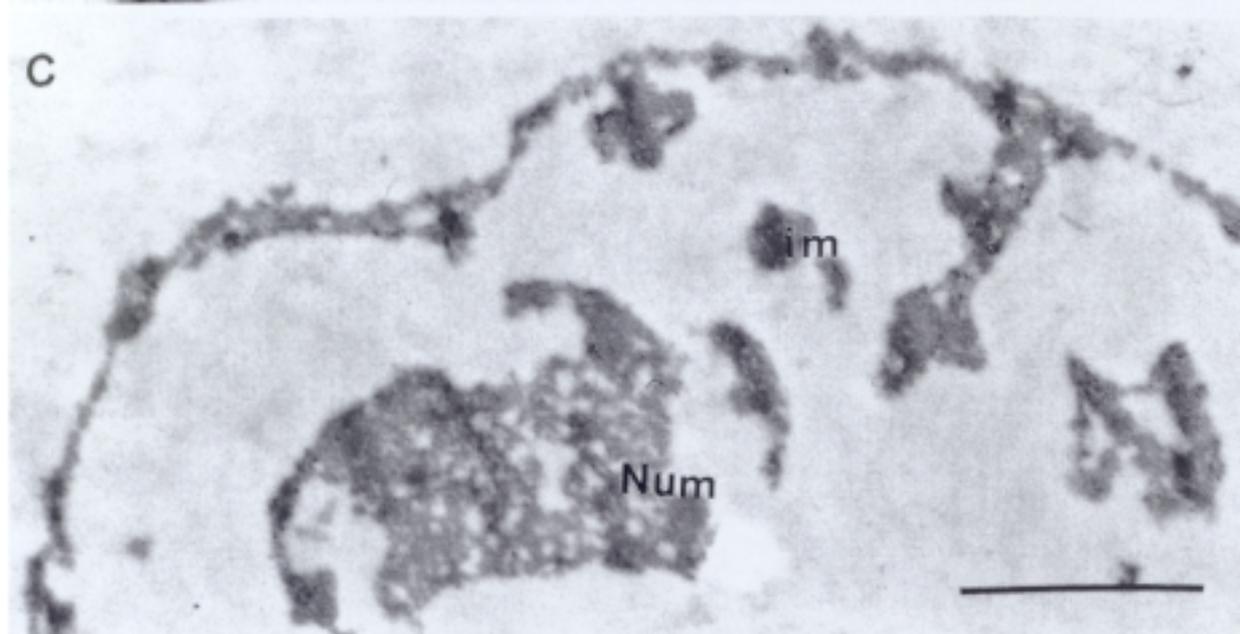
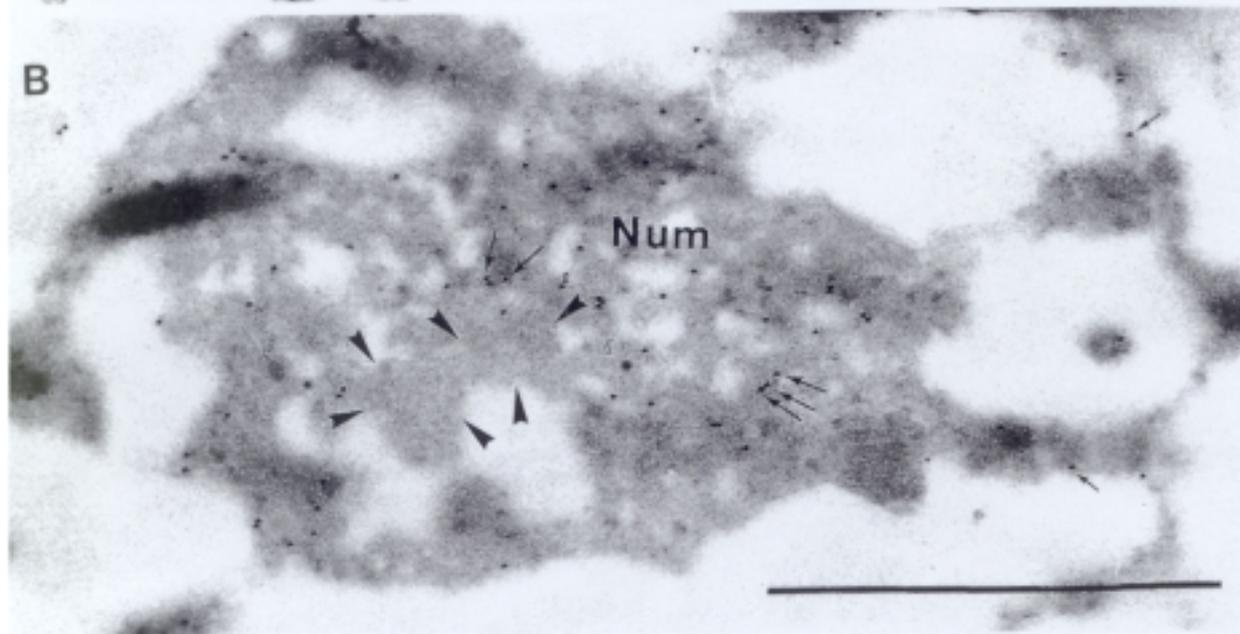
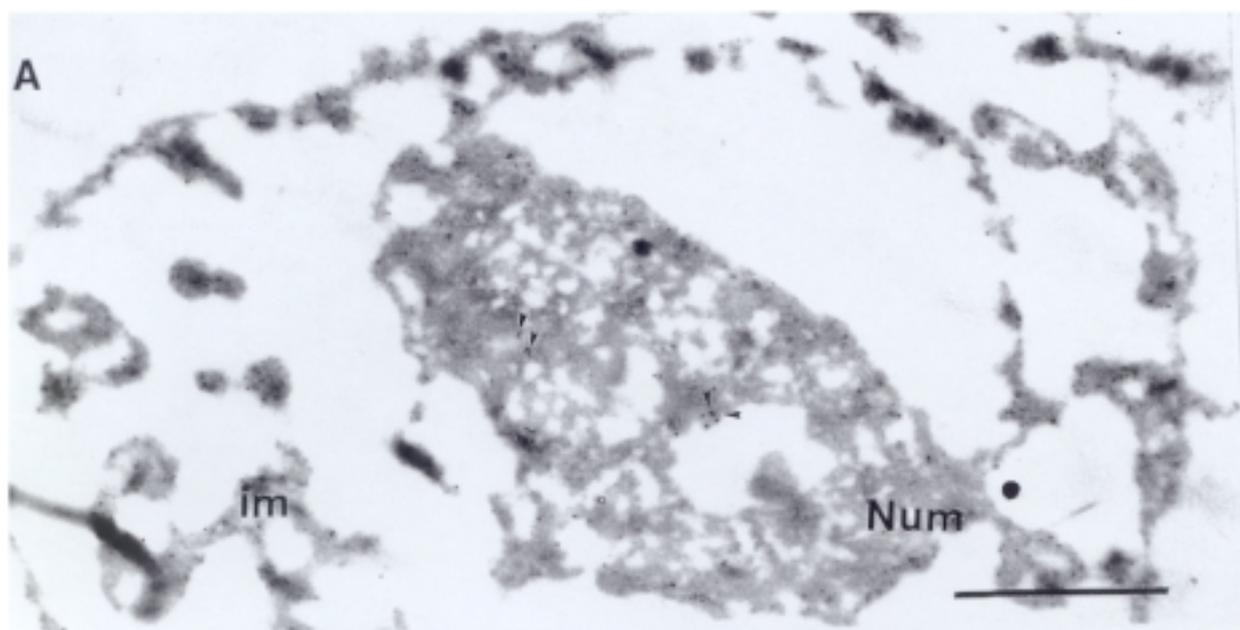
El inmunomarcado con oro para microscopía electrónica confirma los datos anteriores de distribución específica de la fibrilarina en la matriz nuclear, y a su vez permite estudiar su distribución en los componentes del nucleolo cuya resolución queda por debajo de la del microscopio confocal. Las partículas de oro aparecen asociadas a la matriz fibrilar del nucleolo mientras que los centros fibrilares aparecen desprovistos de marcado (Fig. 33 A y 33 B). El control negativo aparece desprovisto de marcado (Fig. 33 C).



A



B

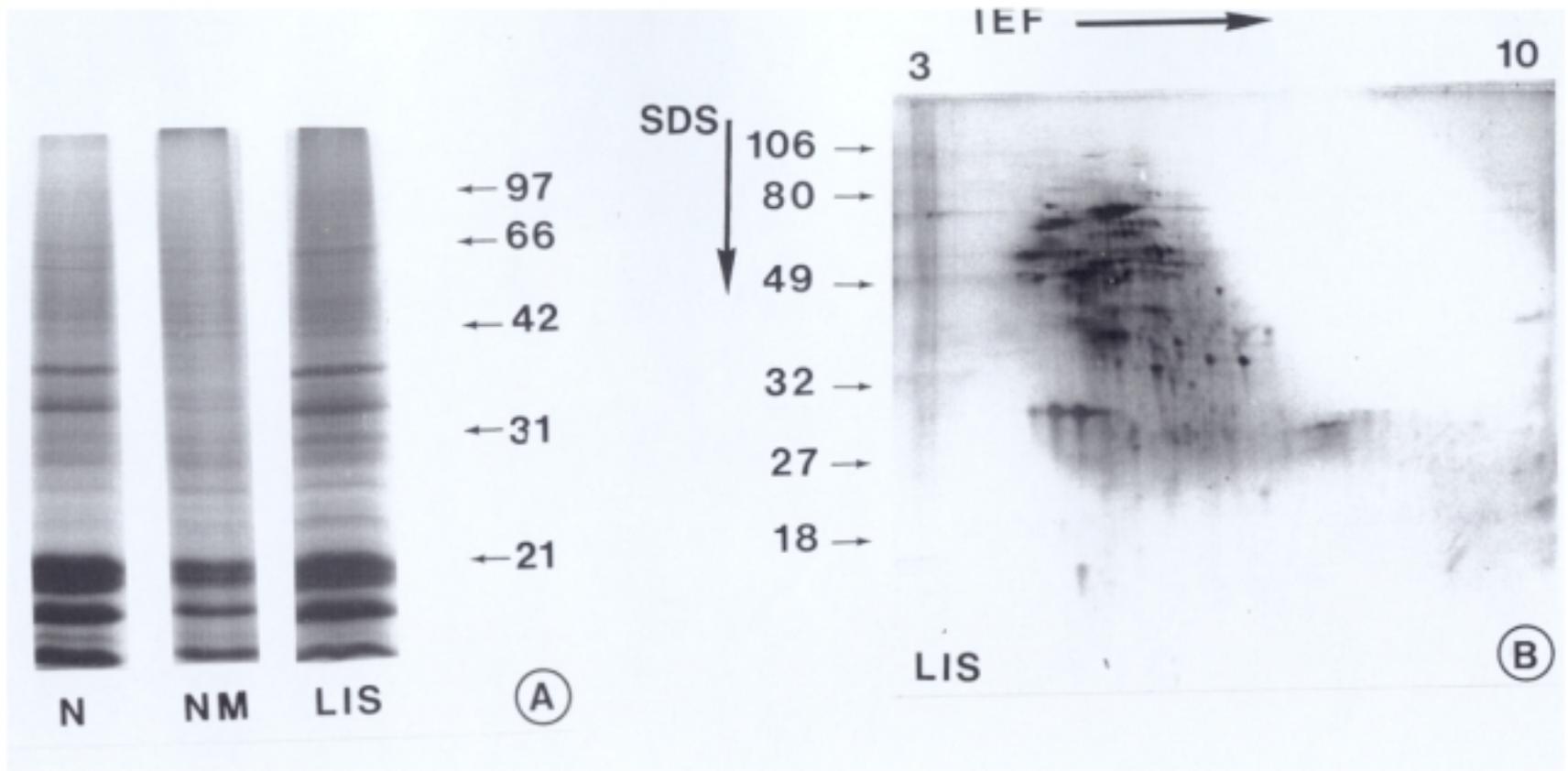


7.- ENSAYOS DE ASOCIACION DE DNA

7.1.- MATRICES NUCLEARES OBTENIDAS POR EL METODO DE LIS.

Los métodos de obtención de matrices nucleares en los que las condiciones de fuerza iónica son semejantes a las fisiológicas, se introdujeron debido a que se pensaba que las soluciones de alta fuerza iónica podían producir reorganización de los puntos de anclaje de los "loops" de DNA y la precipitación de los complejos de transcripción en las matrices. Por ello el método de LIS ha sido el de elección para estudios de asociación de DNA y secuencias MAR a las mismas . Se basa en la eliminación de histonas previamente a la digestión con nucleasas (Mirkovitch y col., 1984). Sin embargo tiene el problema en células animales, de la necesidad de estabilización por calor que puede producir la asociación inespecífica de proteínas. En nuestro caso no ha sido necesario el paso de estabilización por calor ya que las matrices conservaban su estructura sin desorganizarse, característica ya observada de forma general en plantas (Breyne y col., 1992, Avramova y Bennetzen 1993).

Las matrices de *A. cepa* obtenidas por el método de LIS sin estabilización se caracterizan porque presentan mas histonas que las obtenidas extrayendo con alta fuerza iónica (Fig. 34 A), siendo lo más característico la presencia de las variantes de la histona H₁, entre 35-40 KD, en cantidad considerable, que no aparecen en las otras matrices. Este resultado coincide con los obtenidos en otras especies de plantas (Hall y col., 1991, Breyne y col., 1992) y en sistemas animales (Mirkovitch y col., 1984). En la figura 34 B se observa el perfil polipeptídico bidimensional de las matrices LIS, y



se aprecian claras diferencias con respecto al de las matrices obtenidas en condiciones de extracción con soluciones de alta fuerza iónica (Comparar Figs. 3 y 34 B).

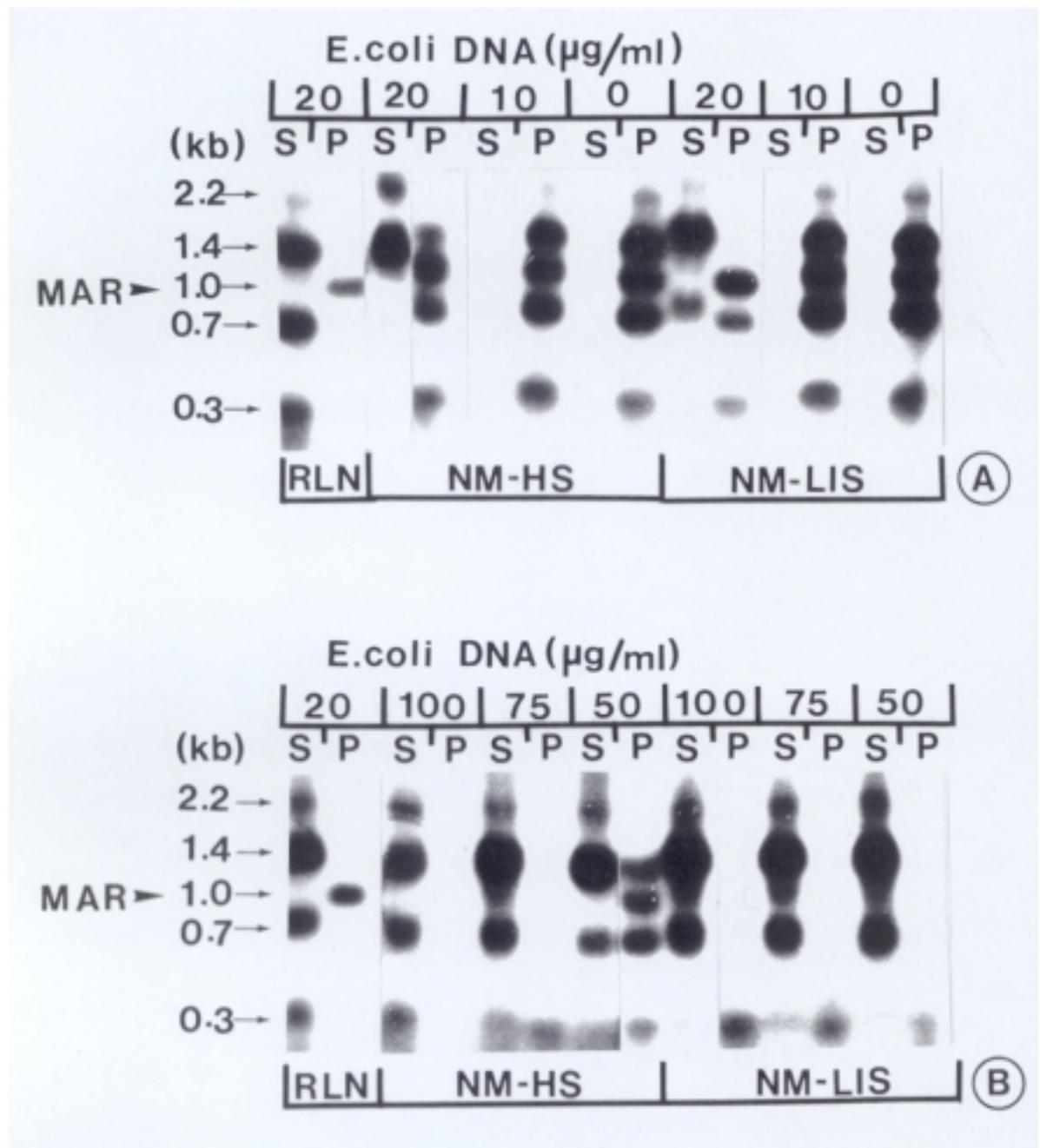
7.2 - UNION DE SECUENCIAS MAR A LAS MATRICES NUCLEARES

Las secuencias MAR, son las secuencias de DNA que se unen específicamente a las matrices nucleares, constituyendo los puntos de anclaje de los "loops" de DNA a las mismas. Se sabe que dicha unión es específica y reversible, y que la capacidad de interacción está altamente conservada a lo largo de la evolución, de forma que secuencias MAR de orígenes distintos se pueden intercambiar, como demuestran los estudios realizados "in vitro" (Cockeril y Garrard, 1986, Phi Van y Strätling 1988, Izaurralde y col., 1988). Por ello hemos iniciado estudios de asociación de secuencias MAR a nuestras matrices nucleares de *A. cepa* según los experimentos de Ludérus y col. (1992). Las muestras utilizadas fueron matrices nucleares obtenidas por el método de LIS (Mirkovitch y col., 1984), con la variante de que en lugar de enzimas de restricción utilizamos DNasa I. También hemos utilizado matrices nucleares obtenidas por el procedimiento que seguimos normalmente en el laboratorio basado en el de Berezney y Coffey (1974), con el fin de comprobar si el comportamiento era igual, o dicha capacidad de unión se perdía al utilizar soluciones de alta fuerza iónica.

Como DNA exógeno se ha utilizado la secuencia MAR del conjunto de genes de las histonas de *D. melanogaster* (Mirkovitch y col., 1984). La afinidad por las

matrices de *A. cepa* se comprobó mediante experimentos de competición con fragmentos de DNA inespecíficos, que no contienen secuencias MAR, como fragmentos de restricción del plásmido pBR322 o DNA de *E. coli* sonicado.

Una vez incubadas las matrices nucleares con fragmentos de restricción del plásmido pBR322, entre los que estaban los que contenían la secuencia MAR antes mencionada, en presencia y ausencia de DNA de *E. coli*, se separaron los fragmentos unidos a las matrices, de los solubles, y se estudiaron utilizando geles de agarosa. Al analizar los resultados nos encontramos con un inconveniente, debido a la utilización de DNasa en lugar de enzimas de restricción en el procedimiento de obtención de matrices nucleares. Al digerir absolutamente todo el DNA, las matrices nucleares, incubadas solamente con los fragmentos de restricción del plásmido, unieron todos los fragmentos y no solo aquellos que contenían la secuencia MAR. En presencia de DNA de *E. coli* se aprecia como el que se une más específicamente es el que contiene dicha secuencia (Fig. 35 A), sin embargo se necesitó elevar muchísimo los niveles de DNA de *E. coli* para conseguir que el resto de los fragmentos se eliminaran, y asociados a las matrices se encontraran exclusivamente los indicados, sin embargo por algún error en el procedimiento experimental se observa que dichos fragmentos deberían estar en las fracciones de matrices ya que no aparecen entre los fragmentos no unidos, pero dichas muestras no dieron señal alguna en los geles. Los resultados fueron iguales tanto en el caso de matrices obtenidas con soluciones de alta fuerza iónica como de las obtenidas con soluciones de baja fuerza iónica (Fig. 35 B).

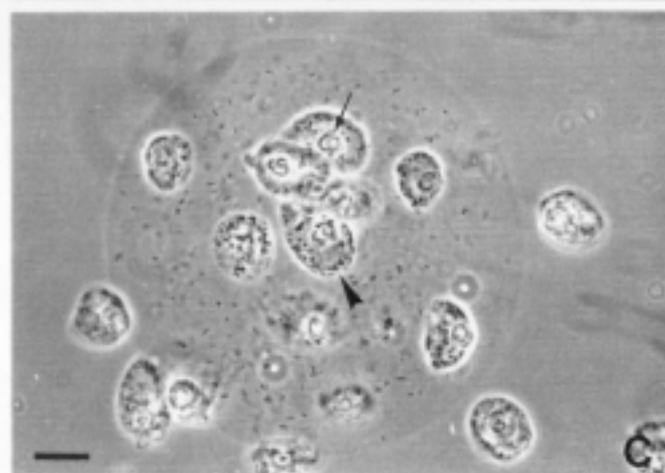
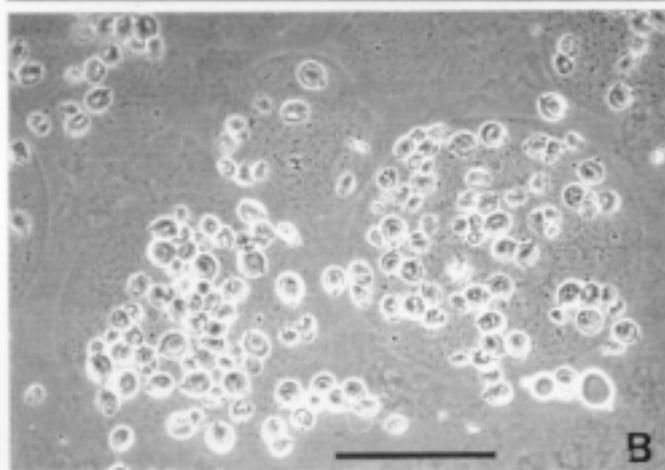
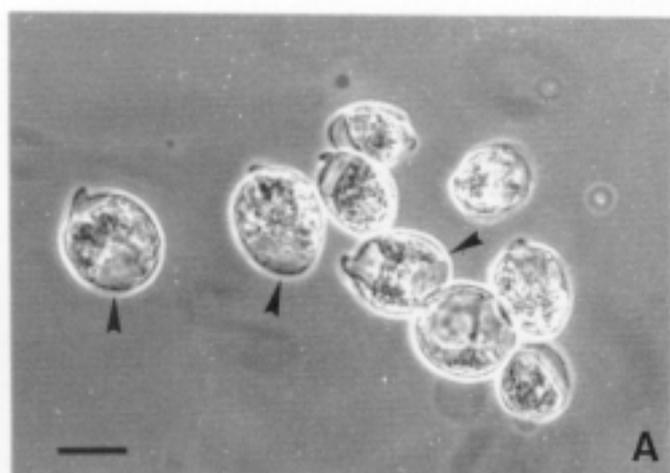


II.- DINOFLAGELADOS

Aunque, desde un principio, hemos dispuesto de tres especies de dinoflagelados, de vida libre, para realizar nuestros estudios de organización ultraestructural del núcleo de estos organismos, *Gimnodinium splendens*, *Alexandrium lusitanicum* y *Amphidinium carterae*, la especie que finalmente hemos utilizado para los estudios de matriz nuclear ha sido *A. carterae*, debido a sus características especiales, que facilitaron la preparación de matrices nucleares de forma masiva. Crece con facilidad en cultivo de forma que hemos podido partir de grandes cantidades de muestra, no posee teca y el contenido en DNA de su núcleo es bajo en relación con otras especies de dinoflagelados.

1.- ENCAPSULACION DE LAS CELULAS EN MICROBOLAS DE AGAROSA

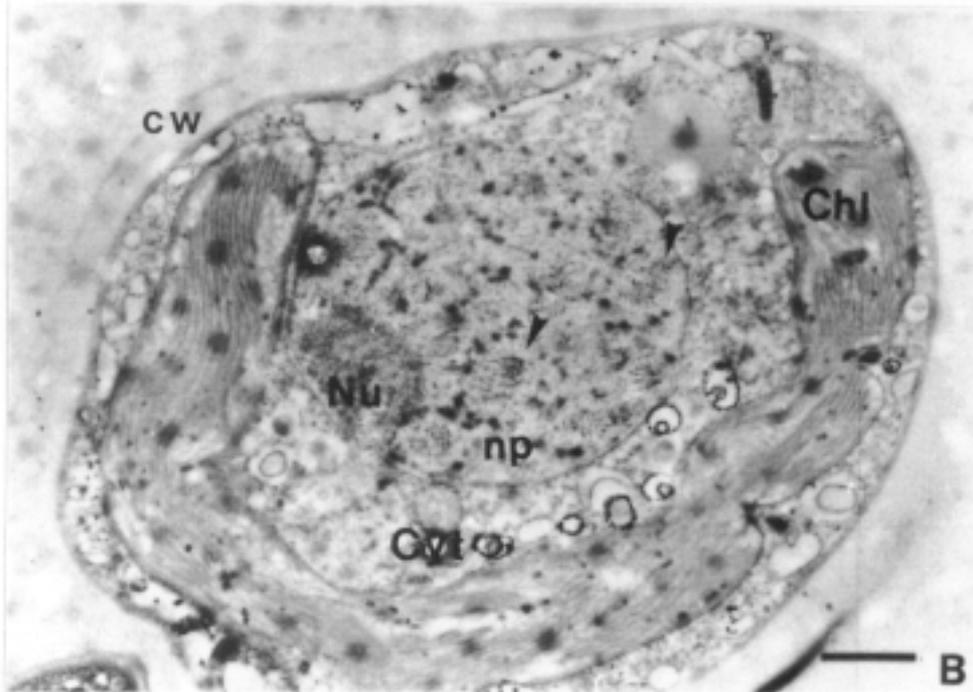
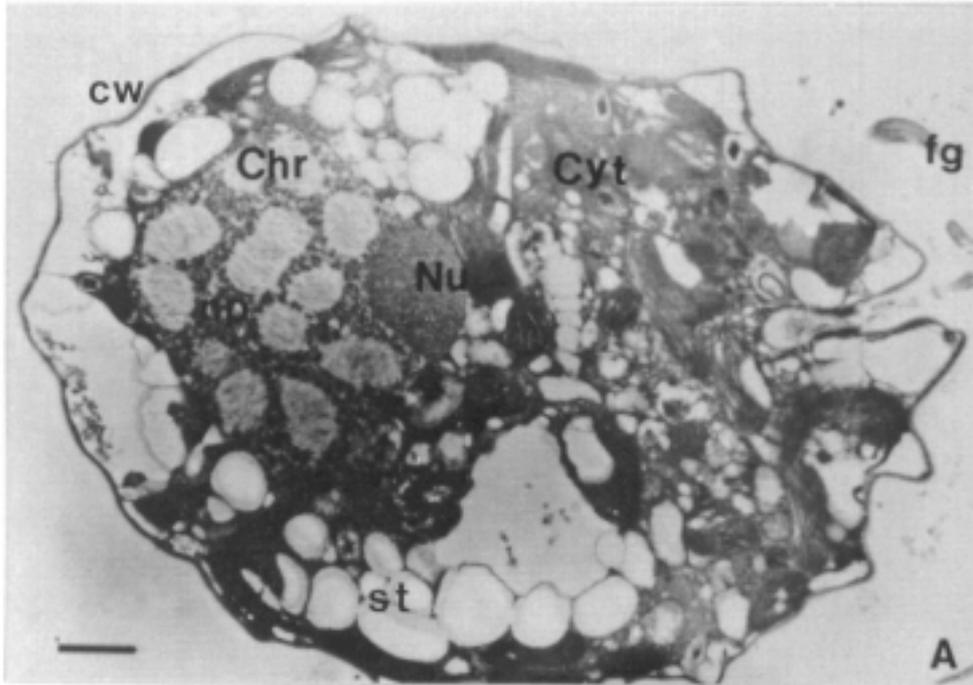
La encapsulación se realizó con el fin de evitar que durante el proceso extractivo, para obtener las matrices nucleares, las células sufrieran cualquier tipo de alteración morfológica, o desplazamiento y redistribución de sus componentes. Las células de *A. carterae* encapsuladas en microbolas de agarosa al 0.5% y observadas al microscopio óptico en contraste de fase, presentan una buena preservación si las comparamos con las observadas libres en solución tampón (Figs. 36 A y 36 B). El número de células por microbola fue elevado, presentando éstas un diámetro de unas 400 ± 170 μm . En el interior de las células, bien sea en las microbolas o libres, el



núcleo presenta una posición distal y se diferencia claramente del citoplasma en microscopía de contraste de fase, ya que este último es mucho más refringente debido a la gran cantidad de pigmentos que contiene. Cuando las células encapsuladas se observaron al microscopio electrónico mostraron muy buena preservación estructural, con la pared celular intacta, núcleo y citoplasma perfectamente preservados, sin ningún tipo de alteración, lo que demuestra que la agarosa es perfectamente permeable permitiendo el paso de fijadores y demás soluciones (Fig. 37 A y 37 B). En el citoplasma se distinguen claramente mitocondrias, plastidios, vacuolas y gránulos de almidón. El núcleo presenta el nucleolo próximo a la envuelta nuclear, los cromosomas típicos de Dinoflagelados, y entre ellos la región pericromosómica fibrillogranular (Fig. 37 B).

2.- MATRIZ NUCLEAR. ORGANIZACION ULTRAESTRUCTURAL

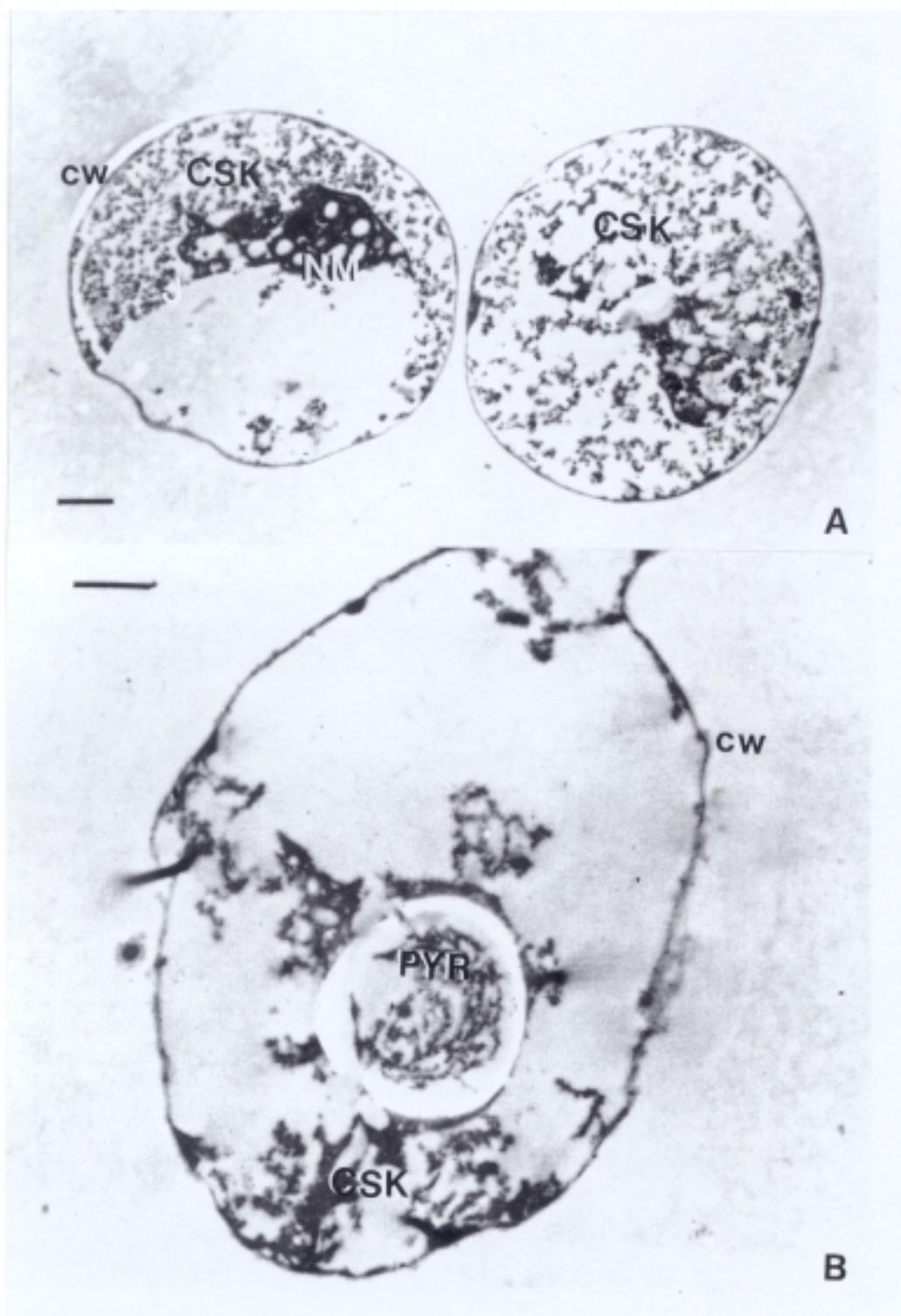
Una vez comprobado que el proceso de encapsulación no afectaba a las características estructurales de las células, y que la agarosa realmente tiene un papel protector, permitiendo el paso de soluciones y componentes a su través, las células se sometieron a extracción secuencial, para la obtención de matrices nucleares "in situ". Al observarlas al microscopio óptico se comprueba la eliminación drástica de componentes que conduce al descenso acusado de color del citoplasma como consecuencia de la eliminación de pigmentos. En el citoplasma se aprecian como estructuras residuales más evidentes los restos del pirenoide y el citoesqueleto. El núcleo permanece en su posición característica y altamente extraído (Fig. 36 C).

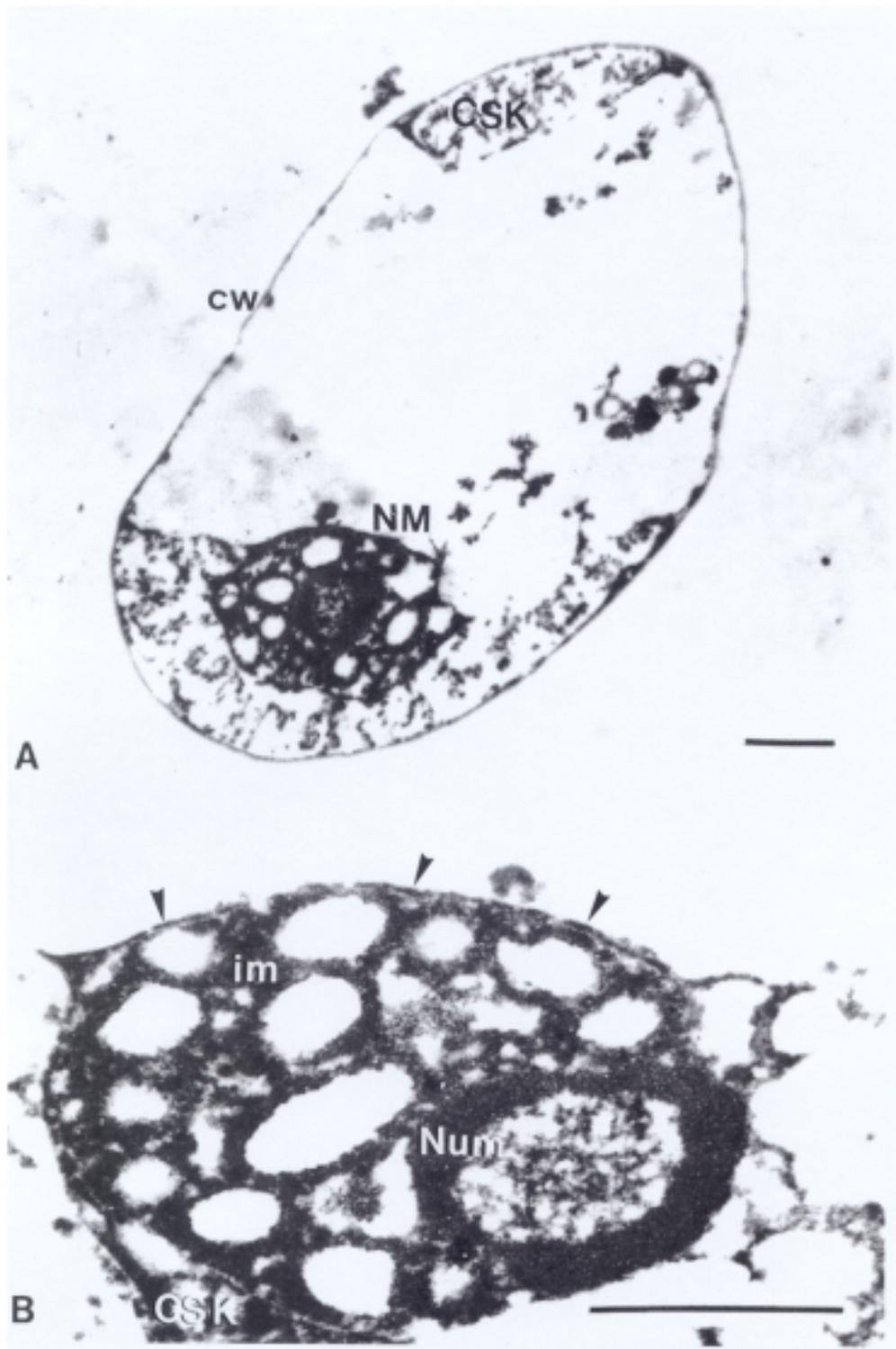


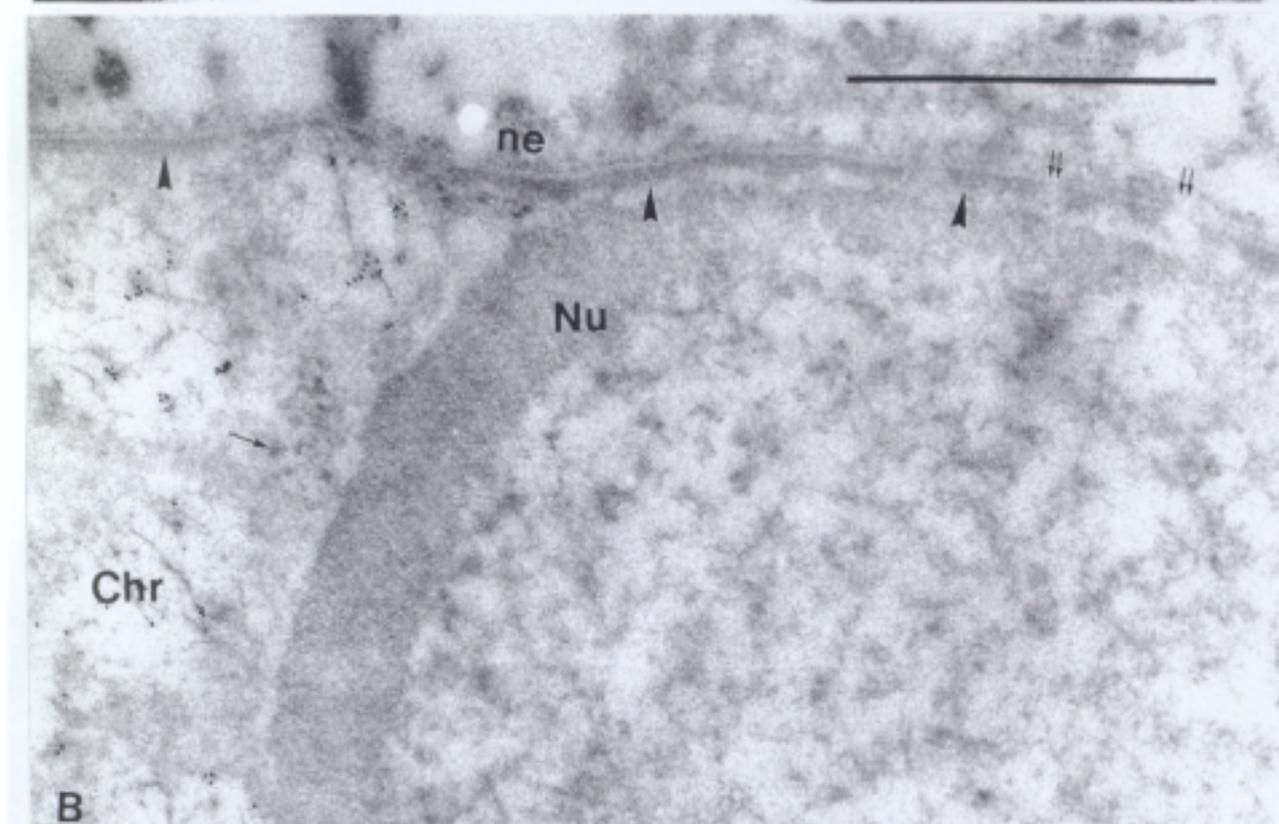
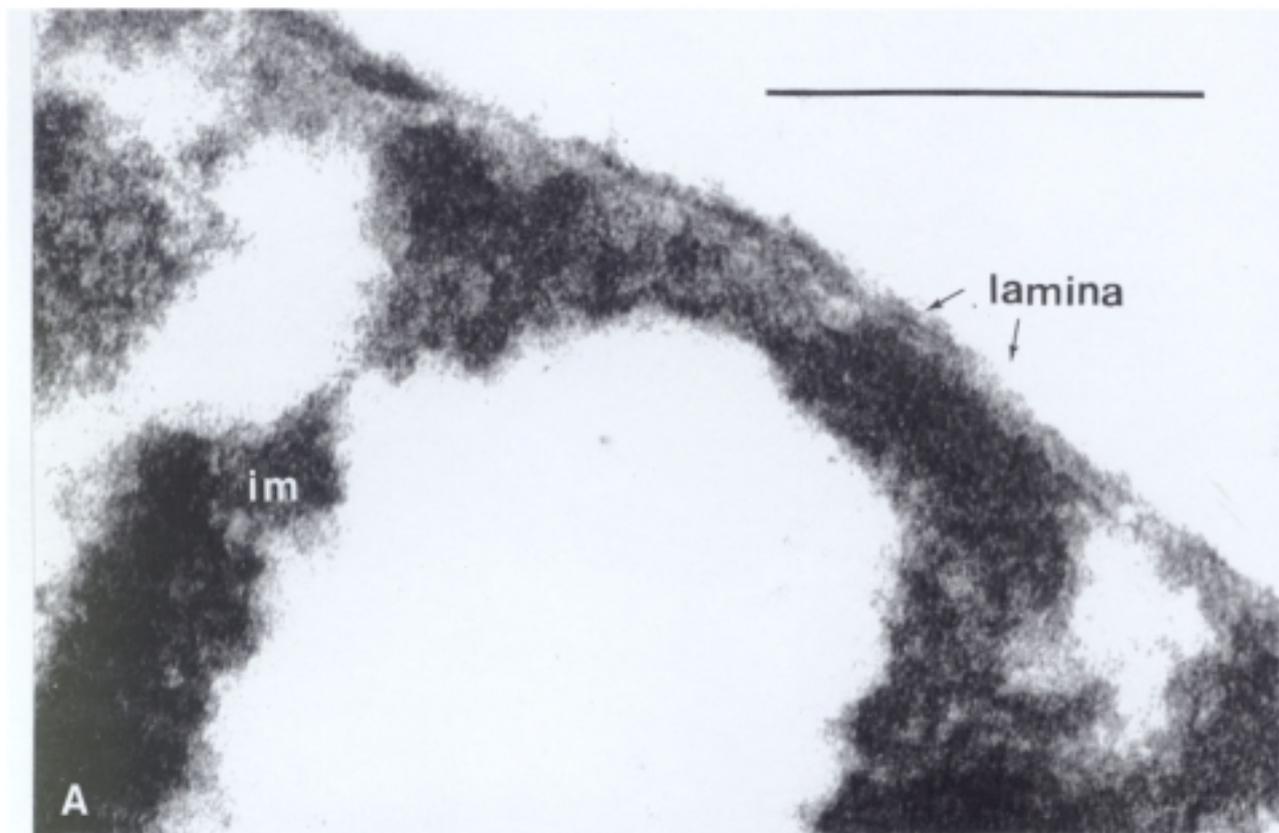
El efecto de la extracción se aprecia con mayor detalle al microscopio electrónico. El citoplasma carece de todas sus estructuras membranosas, quedando reducido al citoesqueleto de naturaleza fibrillogranular, que conecta la matriz nuclear con la pared celular (Figs. 38 A y 39 A). Dentro del citoesqueleto se aprecian de forma evidente los elementos residuales del pirenoide, distinguiéndose perfectamente sus conexiones con el citoesqueleto general. Los espacios ocupados anteriormente por las membranas del pirenoide, cloroplastos y mitocondrias aparecen vacíos (Fig. 38 B).

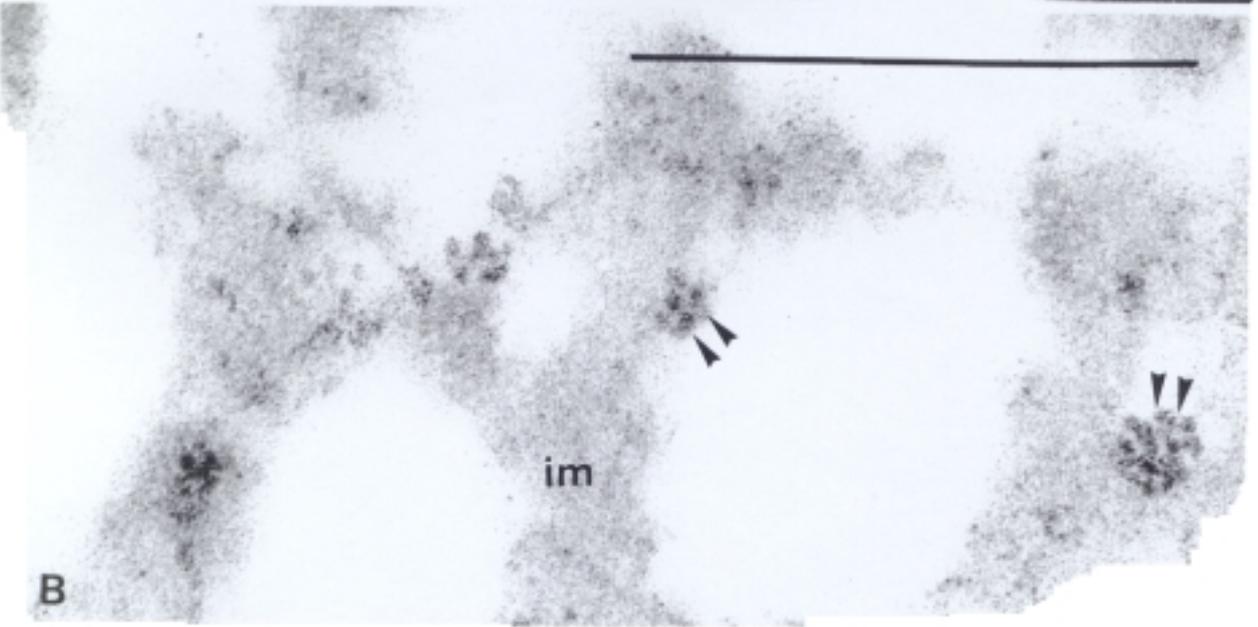
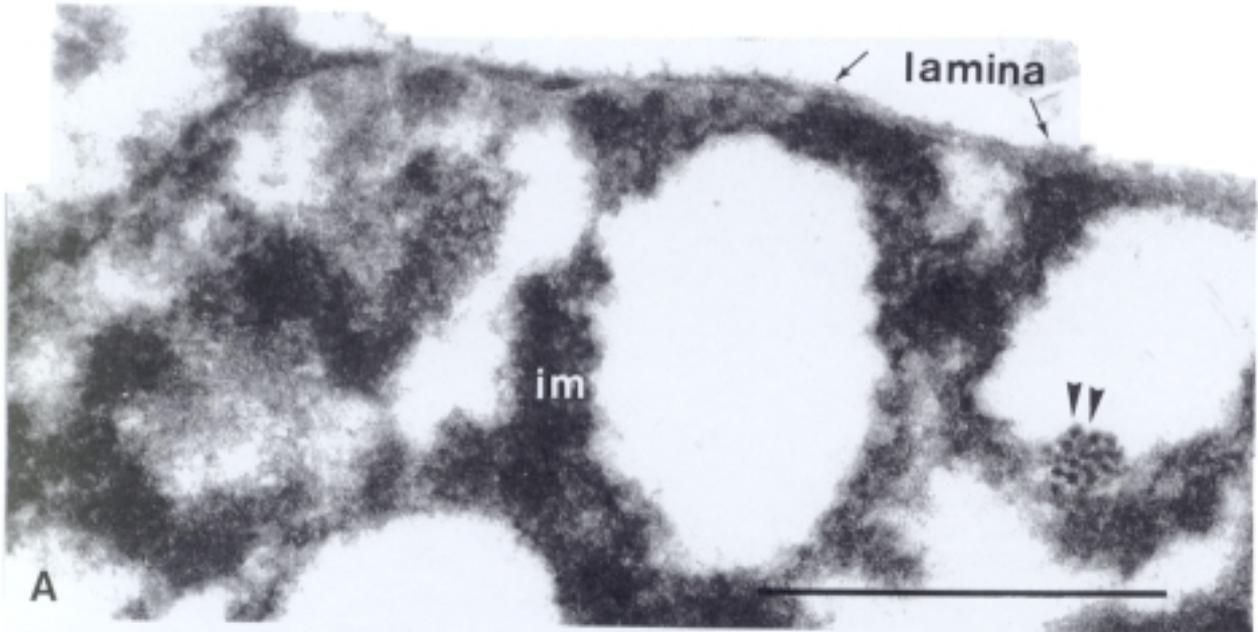
La matriz nuclear permanece en posición distal con una organización morfológica constante semejante a la del resto de eucariotas, con su lámina, nucleolo residual y el retículo que constituye la matriz interna. Las áreas previamente ocupadas por los cromosomas en los núcleos enteros aparecen como zonas vacías (comparar Fig. 39 A con Figs. 37 A y 37 B). A mayor aumento se aprecia con mayor detalle la organización de dichas matrices (Figs. 39 B y 40 A).

La lámina forma una capa continua rodeando a la matriz nuclear, unida hacia el interior con la matriz interna y conectada hacia el exterior con el citoesqueleto (Fig. 39 B). La lámina también se puede observar en células de dinoflagelados sin extraer debido a su buen grado de desarrollo en algunos de estos organismos, de forma que aparece como una capa de organización fibrilar, muy densa, adosada a la cara interna de la envuelta nuclear (Fig. 40 B). La matriz interna es un retículo formado por fibras elementales de 5 nm organizadas en otras de mayor diámetro, con pocos componentes granulares, constituyendo los componentes residuales de las regiones







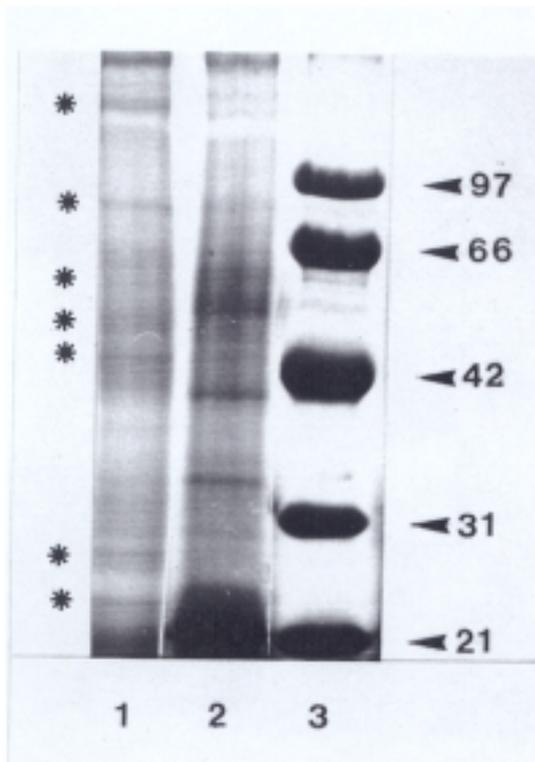


pericromosómicas (Figs. 40 A y B). En ella se aprecian unos cuerpos formados por fibras de 10-15 nm que se contrastan preferencialmente cuando se tiñen las matrices con bismuto (Figs. 41 A y B) y parecen semejantes en su organización morfológica a los "coiled bodies" de eucariotas superiores. La matriz nucleolar presenta una estructura fibrilar muy semejante a la de otros eucariotas (Fig. 39 B).

3.- COMPOSICION PROTEICA DEL COMPLEJO MATRIZ NUCLEAR-CITOESQUELETO

El patron polipeptídico de células enteras de *A. carterae* presentan un gran número de bandas en el rango entre 125-14 KD, destacando como mayoritarias bandas de 120, 79, 66, 64, 60, 57, 44, 34 KD y componentes de bajo peso molecular inferior a 24 KD. En los perfiles de fracciones de matrices nucleares con citoesqueletos, se observa que disminuye el número de componentes, desaparecen en gran parte los de bajo peso molecular, y se enriquecen en bandas de 120, 79, 51, 28 y 26 KD (Fig. 42).

Una vez comprobada la existencia de una matriz nuclear insoluble en dinoflagelados y estudiadas sus proteínas de forma general, el siguiente paso consistió en estudiar el significado funcional de estas matrices nucleares y su papel en la organización de los "loops" de DNA, dato fundamental, debido a las características nucleares especiales de dichos organismos. Por ello iniciamos la caracterización de las proteínas supuestamente involucradas en la organización topológica de los "loops" de DNA en eucariotas: laminas y topoisomerasa II.



3.1.- DETECCION DE LAMINAS EN LA MATRIZ NUCLEAR

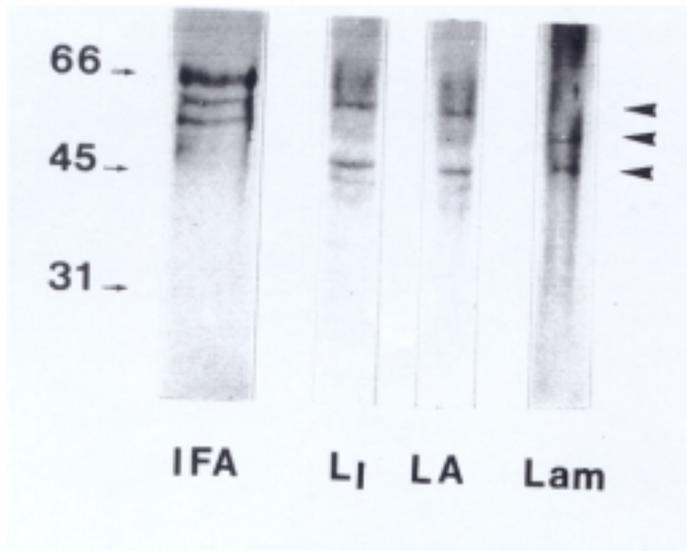
Para determinar si las laminas son componentes de la matriz nuclear de dinoflagelados, hemos utilizado los mismos anticuerpos que en el caso de *A. cepa*. Un anticuerpo policlonal que reconoce laminas de pollo (Stick y Hausen, 1980) y los anticuerpos monoclonales L34B4 que reconoce laminas tipo A de pollo y L74A2 que reconoce la LI de *X. laevis* (Stick, 1988). También el anticuerpo IFA (Pruss y col., 1981), que reconoce un epitopo muy conservado de todas las proteínas tipo filamento intermedio, como control junto con el MAC322 que reacciona con un epitopo muy conservado de la citoqueratina 8, presente en animales y plantas (Ross y col., 1991).

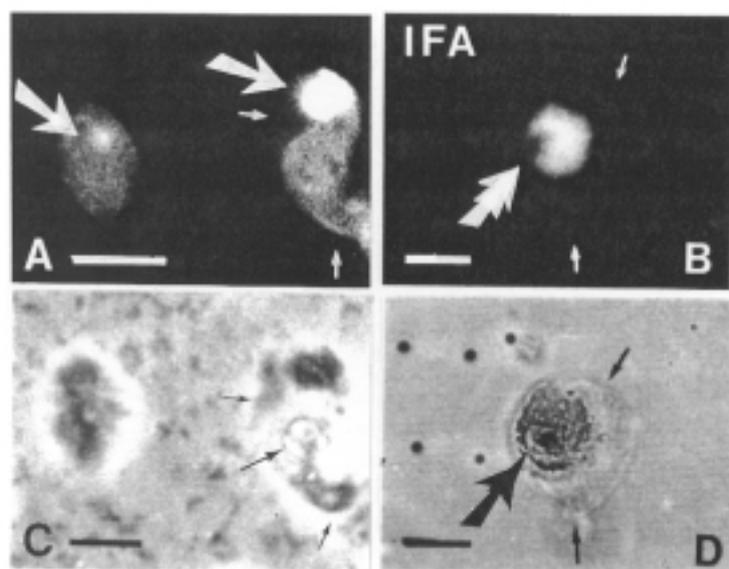
3.1.1.- Inmunoblotting.

Las proteínas de fracciones de citoesqueleto-matriz nuclear, transferidas a membranas de nitrocelulosa, se hicieron reaccionar con el anticuerpo IFA, revelando tres bandas, una mas gruesa de 66 KD y otras dos menos intensas de 62 y 58 KD. Por su parte los anticuerpos monoclonales antilaminas tipo A L34B4 y tipo B L74A2 reconocen ambos dos bandas mayoritarias de 62 y 50 KD, mientras que el suero policlonal reconoce dos bandas mayoritarias de 58 y 50 KD (Fig. 43).

3.1.2.- Inmunofluorescencia.

Una vez comprobada la existencia de proteínas antigénicamente relacionadas





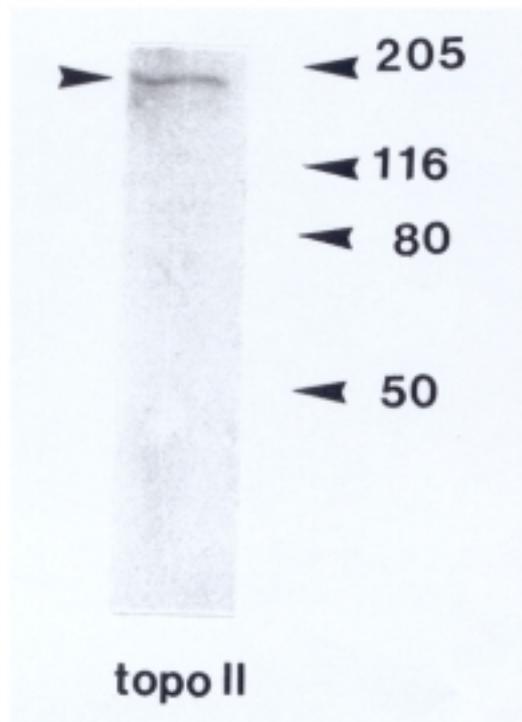
con las laminas en la matriz nuclear, había que determinar su localización topológica. Se incubaron frotis de células extraídas de *A. carterae* con el suero antilamina, y se observó la reacción por inmunofluorescencia indirecta, apreciándose claramente la intensa fluorescencia del núcleo contrastando con la débil autofluorescencia que estos organismos presentan a nivel de citoesqueleto (Figs. 44 A y C). Si comparamos ahora dichos resultados con los obtenidos al incubar las células con el IFA que produce fluorescencia de todos los filamentos intermedios residuales de la célula, vemos que aparece fluorescente todo el citoesqueleto debido a la presencia de proteínas de tipo filamento intermedio en esta estructura, mientras que las zonas vacías por efecto de la extracción no aparecen fluorescentes (Figs. 44 B y D).

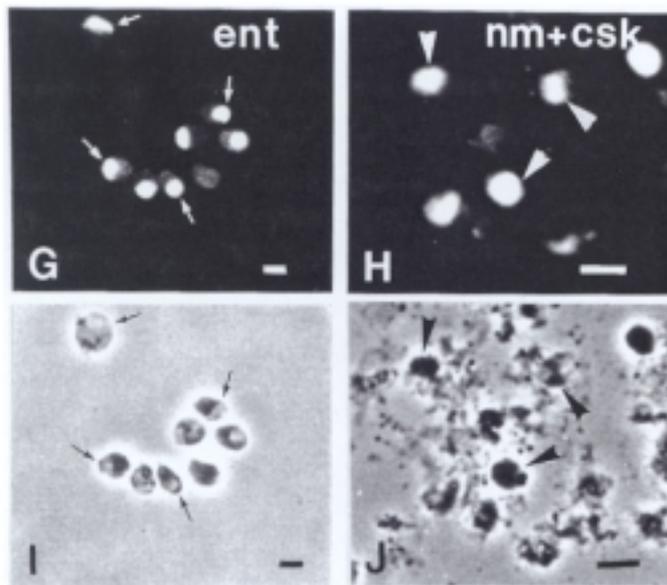
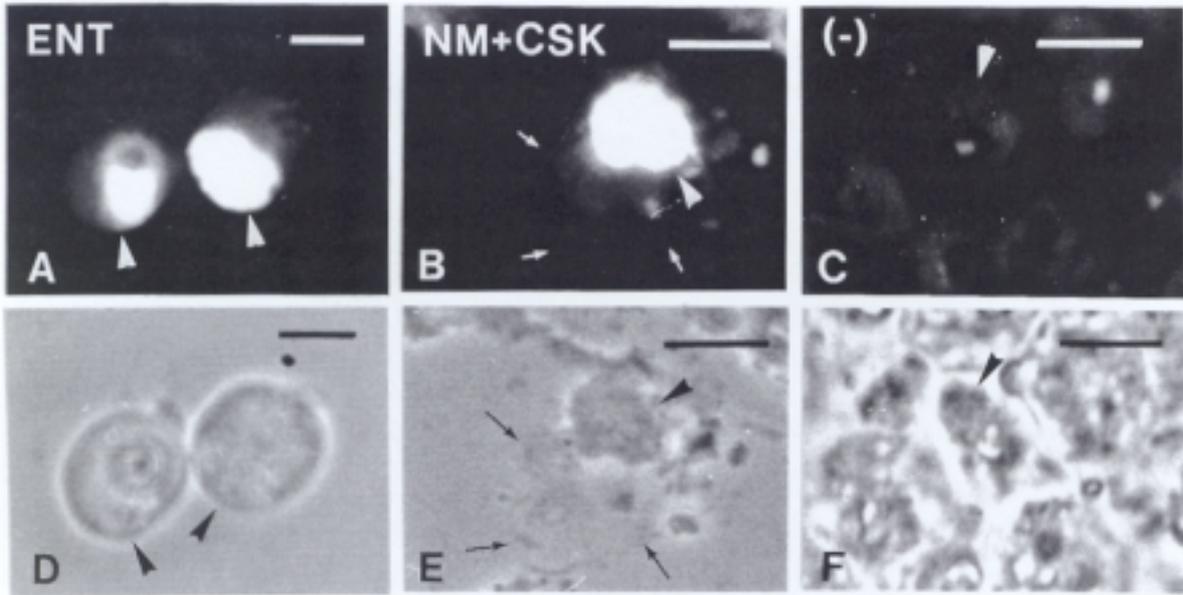
3.2.- DETECCION DE TOPOISOMERASA II EN LA MATRIZ NUCLEAR

La topoisomerasa II tiene un papel fundamental en la organización topológica del DNA y es un componente constante de las matrices nucleares de animales y plantas. Aunque no existían datos sobre la existencia de topoisomerasas de tipo eucariota en dinoflagelados, decidimos investigar su presencia en núcleos y matrices nucleares, utilizando un anticuerpo desarrollado contra la topoisomerasa II humana (Tsai-Pflugfelder y col., 1988) comercializado por Cambridge Research Biochemicals.

3.2.1.- Inmunoblotting.

El anticuerpo al reaccionar con proteínas de las fracciones de matrices nucleares-citoesqueleto de *A. carterae* reconoce una banda de 187 KD, por lo que





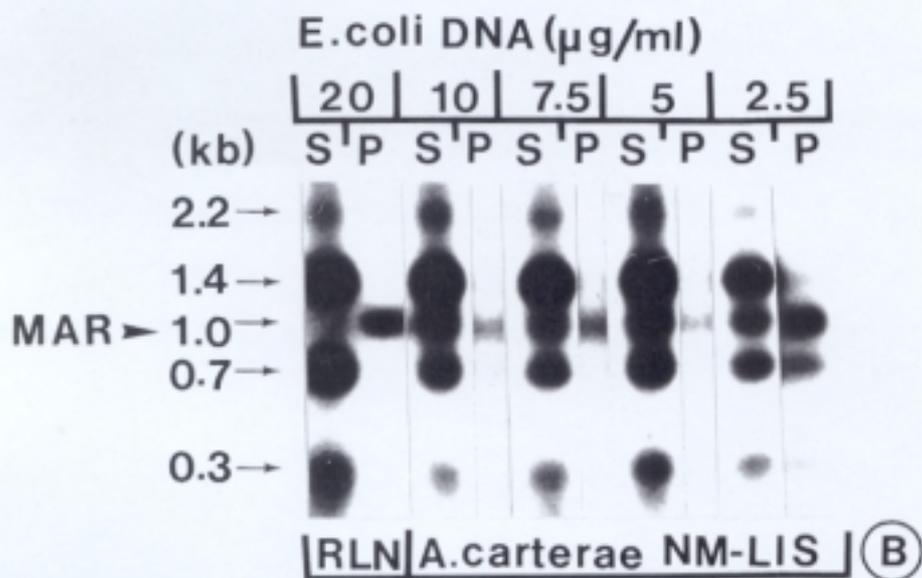
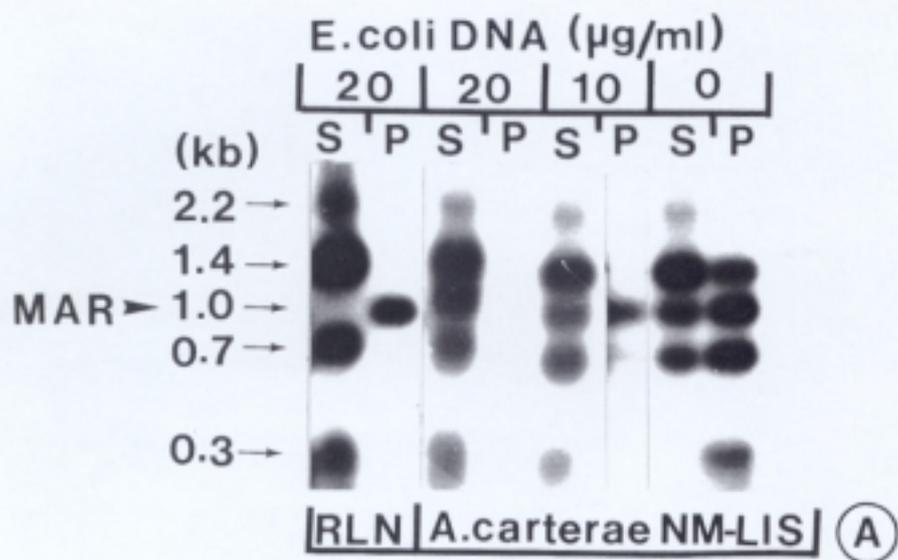
parece que la topoisomerasa II o una proteína antigénicamente relacionada con ella forma parte de la matriz nuclear de dinoflagelados (Fig. 45).

3.2.2.- Inmunofluorescencia.

La reacción inmunofluorescente es general, en fracciones tanto de células enteras como extraídas, confirmando los datos de inmunoblotting (Figs. 46 A-J). El marcado de la topoisomerasa II queda reducido al núcleo en células enteras (Figs. 46 A y G) y a la matriz nuclear en el caso de células extraídas (Figs. 46 B y H), mientras que el resto de la célula muestra una débil fluorescencia, confirmándose con los controles negativos que se debe a la autofluorescencia propia del citoesqueleto (Figs. 46 C y F).

4.- UNION DE SECUENCIAS MAR A MATRICES NUCLEARES

En estos experimentos solamente se han utilizado matrices obtenidas por el método de LIS. La secuencia MAR y el protocolo experimental utilizado fueron los mismos que en los experimentos con *A. cepa* (Ver apartado 1.7.2 de resultados). El resultado obtenido se muestra en la Fig. 47, se presentó el mismo problema que en el caso de la matriz nuclear de cebolla, debido a la digestión con DNasa I, sin embargo en este caso parece que se necesita muy poca cantidad de DNA de *E. coli* para desplazar los fragmentos que contienen la secuencia MAR y que en principio se unen a las matrices nucleares, lo que quiere decir que las matrices de dinoflagelados reconocen secuencias MAR de eucariotas, aunque la afinidad es baja (Fig. 47).



DISCUSSION

I.- ALLIUM CEPA

1.- PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION DE ELECCION PARA ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y DE ANALISIS DE PROTEINAS, O DE ASOCIACION SECUENCIAS MAR

Los estudios previos sobre matrices nucleares de *A. cepa* desarrollados por nuestro grupo desde los años 80, determinaron no sólo la existencia en plantas, de una matriz nuclear estructuralmente semejante a la de animales, con sus tres dominios fundamentales, lámina, matriz nucleolar y matriz interna (Barthelley y Moreno Díaz de la Espina, 1984, Moreno Díaz de la Espina y col., 1991), sino también, que dicha organización estructural permanecía constante, independientemente del procedimiento de extracción utilizado. La utilización de distintos procedimientos de extracción permitió concluir que la presencia de estos componentes no depende de la formación de puentes disulfuro durante la secuencia de extracciones, y que resisten la digestión con RNasa A (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990), en contraste con lo que suele suceder en el caso de células animales (Kaufmann y col., 1981, Kaufmann y Shaper, 1984, Burgeois y col., 1987, Belgrader y col., 1991b, Bouvier y col., 1985, Stuurman y col., 1992b).

Estudios realizados en otras especies vegetales, han confirmado que la matriz nuclear de plantas superiores presenta la organización general descrita (Galcheva-Gargova, 1988, Krachmarov y col., 1991, Beven y col., 1991, Frederick y col., 1992,

Avramova y Bennetzen, 1993).

La principal característica diferencial de las matrices nucleares de plantas, es la estabilidad de su matriz interna. La matriz interna de células animales, es sensible a la RNasa, siendo su efecto dependiente del momento de utilización de ésta en la secuencia extractiva; a la presencia en el medio de extracción de agentes reductores y a la estabilización por calor. Sin embargo en células vegetales, se ha comprobado que permanece inalterable aunque se digieran con RNasa, independientemente del orden en que se utilice (Barthelley y Moreno Díaz de la Espina, 1984, Stolyarov, 1984, Ghosh y Dey, 1986, Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Moreno Díaz de la Espina y col., 1991, Frederick y col., 1992, Avramova y Bennetzen, 1993). Por esta causa, no se han obtenido resultados satisfactorios cuando se han intentado obtener láminas aisladas basándose solamente en la introducción de RNasa, permaneciendo muchos restos de matriz interna asociados a la lámina (McNulty y Saunders, 1992). Existen casos en que simplemente es el nucleolo residual el que ha desaparecido (Masuda y col., 1993), en contraste con datos obtenidos por el mismo procedimiento en la misma especie, *D. carota*, por Beven y col., (1991). El hecho de que en algunos casos exista cierta sensibilidad a la digestión con dicha nucleasa depende únicamente del grado de actividad transcripcional de las células, por tanto del tejido utilizado, y no del procedimiento de extracción en sí (Krachmarov y col., 1991).

Pero la matriz interna no sólo permanece estable frente a la RNasa, sino también al uso de agentes reductores, como DTT, en el medio, lo que indica que su

presencia no depende de la formación de puentes disulfuro (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990).

Debido a esa estabilidad intrínseca, no se necesita una estabilización de los núcleos por calor, previa a la extracción de matrices mediante soluciones de fuerza iónica semejante a la fisiológica, como en el caso del método de LIS (Mirkovitch y col., 1984); así se deduce de estudios realizados en distintas especies de plantas (Hall y col., 1991, Breyne y col., 1992, Avramova y Bennetzen, 1993).

Teniendo en cuenta todas estas características, el hecho de elegir un método de obtención de matrices nucleares u otro ha dependido de los estudios para los cuales iban a ser utilizadas posteriormente, pues no es lo mismo estar interesados en la ultraestructura y análisis proteico, o en ensayos de DNA y caracterización de secuencias MAR.

1.1.- MATRICES NUCLEARES DE PARA ESTUDIOS BIOQUIMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES

Para la caracterización proteica de los componentes de las matrices nucleares de *A. cepa*, así como el estudio de su distribución en los diferentes dominios de las mismas, hemos elegido el procedimiento de extracción descrito por Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, (1990) y Cerezuela (1991), en que se realizan las digestiones enzimáticas previamente a la extracción con soluciones de alta fuerza iónica. una vez comprobado, que tanto los núcleos de partida como las matrices

H₁, en el rango de 35-40 KD de peso molecular, han desaparecido por completo, como era de esperar, el hecho de que permanezcan considerables cantidades de proteínas en la zona correspondiente a las histonas del núcleo del nucleosoma, plantea una serie de interrogantes acerca de su significado.

Parece extraño, que después de eliminar alrededor de un 90% del DNA de las células, según el control realizado mediante inmunofluorescencia con DAPI (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Cerezuela, 1991), puedan permanecer tal cantidad de histonas. Los datos de Grebanier y Pogo, (1979), sobre la asociación de la histona H₃ a las matrices, cuando los núcleos se han sometido a "crosslinking", podrían apoyar que su presencia en nuestras matrices se debiera a una asociación inespecífica durante el proceso de obtención de las mismas por alguna causa aún sin determinar. La presencia de componentes de carácter ácido en una proporción muy marcada, detectada en los geles bidimensionales de las matrices nucleares, podría ser la causa de la asociación inespecífica de histonas a las mismas.

Sin embargo el hecho de que la RNasa A se reasocie de forma inespecífica a las matrices una vez realizadas las digestiones (Belgrader y col., 1991b), que muestra un peso molecular semejante al de estas histonas, apoya la idea de que el acúmulo de proteínas en esta región del gel se deba a otras proteínas de bajo peso molecular que se asociarían a las matrices inespecíficamente. Por otra parte, al no obtener reacción con el anticuerpo anti-histona H₄, que reconoce a la histona en núcleos enteros, apoya la hipótesis de que dichas proteínas reflejan componentes de bajo peso molecular, no histónicos que son típicos de las matrices de eucariotas inferiores

(Herlan y col., 1979). Resultados semejantes se han descrito en células de vertebrados (Berezney, 1984).

A pesar de esto, este procedimiento de extracción en alta fuerza iónica es el más extractivo. Su eficacia en cuanto a la eliminación de componentes histónicos queda demostrada, si lo comparamos con el método de LIS, que veremos a continuación, que da lugar a matrices que no sólo son ricas en proteínas en el rango de las histonas de la zona central del nucleosoma, sino que retienen gran cantidad de histona H₁. Esta mayor capacidad extractiva, junto con el que las matrices obtenidas presenten una perfecta organización estructural, hace que sea el procedimiento de elección para estudiar los componentes polipeptídicos responsables de su organización y mantenimiento.

1.2.- MATRICES NUCLEARES PARA ENSAYOS DE DNA

Los procedimientos de obtención de matrices nucleares basados en la utilización de soluciones de baja fuerza iónica; más próximas a las condiciones fisiológicas, se introdujeron cuando se comprobó que la utilización de soluciones de una fuerza iónica elevada podía dar lugar al desplazamiento de los puntos de anclaje de los "loops" de DNA y su reorganización, además de provocar la precipitación de los complejos de transcripción en las matrices, e incluso la redistribución de sus componentes. Por ello Mirkovitch y col., en 1984, decidieron desarrollar un procedimiento con el que se estabilizasen las uniones de los "loops" de DNA a las matrices, para realizar estudios de asociación de DNA y secuencias MAR a las

mismas. Para ello realizaron la extracción de las histonas con un detergente, LIS, previamente a la digestión del DNA con enzimas de restricción. El inconveniente que introduce esta metodología es, que en el caso de células animales la matriz interna se desorganiza y desaparece. Por esto se requiere previamente a la puesta en contacto de los núcleos con la solución de LIS, una estabilización por calor. Pero el calor origina a su vez asociaciones inespecíficas de proteínas a las matrices nucleares (McConnell y col., 1987, Martelli y col., 1991b y 1994, Warters y col., 1993), con lo cual surgió la polémica acerca de si dicho tratamiento podría estar provocando realmente agregados internos artificiales, de forma que las matrices en sí no fuesen más que puros artefactos (Cook, 1988). Sin embargo, debido a que este procedimiento no produce alteraciones que afecten a los puntos de anclaje de los "loops" de DNA a las matrices, ya que preserva las uniones de las secuencias MAR a las mismas, es el que se utiliza generalmente cuando se quieren hacer estudios del DNA asociado a las matrices, caracterización de secuencias MAR y afinidad por secuencias MAR de sistemas heterólogos.

En nuestro caso el paso de estabilización térmica no fue necesario, obteniéndose matrices de *A. cepa* con sus tres componentes perfectamente estables y evitándose la posible asociación inespecífica de proteínas. Este hecho es una prueba de la resistencia de la matriz interna de plantas frente a distintos tratamientos, en este caso la extracción con LIS, confirmando los datos obtenidos en otras especies vegetales (Breyne y col., 1992, Avramova y Bennetzen, 1993). Además como veremos en el apartado (2.4.1), comparando dichas matrices con las obtenidas por el procedimiento rutinario de extracción con soluciones de alta fuerza iónica, la

capacidad de asociación de secuencias MAR es la misma y aparentemente con la misma afinidad, como han descrito Avramova y Bennetzen (1993), también en plantas. Por lo tanto en principio no parece indispensable en el caso de plantas la utilización de matrices nucleares obtenidas por el método de LIS para la realización de ensayos de asociación de secuencias MAR a las mismas.

En cuanto a la composición polipeptídica de dichas matrices, sus perfiles polipeptídicos monodimensionales muestran que este procedimiento es mucho menos extractivo, que el que utiliza condiciones de fuerza iónica alta. Destacando la gran proporción no sólo de proteínas en el rango de movilidad de las histonas de la zona central del nucleosoma, sino de las variantes de la H₄, caso que nunca se ha dado con los otros protocolos, aparentemente mucho más extractivos. Sin embargo no es un resultado característico de *A. cepa*, pues en distintas especies de animales y plantas, utilizando el mismo procedimiento se han obtenido los mismos resultados (Mirkovitch y col., 1984, Hall y col., 1991, Breyne y col., 1992). Lo que parece quedar claro es que aunque con las distintas metodologías de obtención, las matrices presenten una organización semejante, no están formadas por los mismos componentes polipeptídicos. Dichas diferencias se aprecian mejor cuando se comparan los patrones polipeptídicos obtenidos mediante electroforesis bidimensional de matrices nucleares obtenidas en condiciones de alta concentración salina, y en condiciones mas suaves.

Estas diferencias confirman que la matriz nuclear es un concepto operativo, con una composición proteica que depende del procedimiento de extracción utilizado.

Existiría un grupo fijo de proteínas que formarían el nucleoesqueleto básico, y una serie de proteínas asociadas a ellas, con mayor o menor afinidad, en función de la situación fisiológica celular específica y del procedimiento de extracción utilizado. Existen componentes matriciales diferentes en función del tipo y estado de diferenciación celular (Fey y Penman, 1988, Stuurman y col., 1990).

2.- FRACCIONAMIENTO DE LOS COMPONENTES DE LA MATRIZ NUCLEAR.

2.1.- LAMINA

La lámina, componente característico del núcleo eucariota, constituye el esqueleto residual de la envuelta nuclear, situándose en íntimo contacto con la cara interna de la membrana nuclear (Gerace, 1986, Dessev, 1992).

La observación de la lámina como componente constante de la matriz nuclear de células de plantas de distintas especies como cebolla (Barthelémy y Moreno Díaz de la Espina, 1984, Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Moreno Díaz de la Espina y col., 1991); maíz (Krachmarov y col., 1991); judía (Galcheva-Gargova, 1988); guisante (Li y Roux, 1992, McNulty y Saunders, 1992) y zanahoria (Beven y col., 1991. Frederick y col., 1992, Masuda y col., 1993) ha llevado a que se la considere como un componente fundamental en el núcleo de plantas superiores. Sin embargo, la existencia de una lámina perfectamente organizada en plantas constituyó una gran controversia hasta muy recientemente, ya que se pensaba que los filamentos

intermedios eran proteínas exclusivas de vertebrados. Aunque la existencia en ellas de determinantes antigénicos relacionados con los filamentos intermedios estaba demostrada (Dawson y col., 1985, Goodbody y col., 1989, Hargreaves y col., 1989b, Shaw y col., 1991), la posible organización de los mismos formando un retículo perfectamente organizado a nivel citoplásmico no lo estaba. Por esto en un principio, la lámina visualizada en células de cebolla al microscopio electrónico constituyó el primer dato de la existencia en plantas de un entramado esquelético tipo filamento intermedio. Recientemente se han presentado evidencias de la presencia en células de zanahoria de un armazón citoesquelético de filamentos intermedios (Yang y col., 1992b).

La existencia de una lámina, con una organización igual a la de animales (Aebi y col., 1986, Nigg, 1989), de estructura filamentosa, apunta a su vez a la posibilidad de que esté constituida por laminas, como en animales.

Las laminas son proteínas que constituyen el grupo V de los filamentos intermedios (Aebi y col., 1986, Fisher y col., 1986, McKeon y col., 1986, Osborn y Weber, 1986, Franke, 1987, Nigg 1992, Moir y Goldman, 1993), caracterizadas en vertebrados (Krohne y Benavente, 1986), invertebrados (Dessev y col., 1990) y eucariotas inferiores como levaduras (Georgatos y col., 1989) y hongos (Lang y Loidl, 1993). Aparte del dominio central en α -hélice, característico de los filamentos intermedios y necesario para formar polímeros, presentan en su estructura una señal de localización nuclear, y un extremo carboxilo terminal con el motivo CAAX responsable de la unión a membranas (Loewinger y McKeon, 1988, Nigg, 1989 y

1992, Kitten y Nigg, 1991, McKeon, 1991, Heitlinger y col., 1992, Firmbach-Kraft y Stick, 1993, Georgatos y col., 1994, Hennekes y Nigg, 1994). Parecen ser las proteínas más antiguas dentro de los filamentos intermedios, pudiendo haberse originado el resto a partir de un gen ancestral de las láminas por pérdida de dichas secuencias características (Weber y col., 1988 y 1989, Dodemont y col., 1990, Döring y Stick, 1990). En base a sus secuencias, así como a sus propiedades bioquímicas, en vertebrados se distinguen dos tipos de láminas, tipo A (incluyen las A y C) tipo B y LIII (Stick, 1988). Dentro de las B existen varios tipos correspondientes a distintos genes (Stick, 1994). Las células pueden contener entre una y cinco láminas diferentes (Benavente y col., 1985, Stick y Hausen, 1985, Lehner y col., 1987, Stewart y Burke, 1987), que forman homo o heteropolímeros, cuyo ensamblaje y desorganización, a lo largo del ciclo celular se regula mediante procesos de fosforilación y defosforilación en los que intervienen proteínas como la $p^{34}cdc2$ kinasa entre otras (Gerace y Blobel, 1980, Bailer y col., 1991, Nigg, 1992, Haas y Jost, 1993, Hennekes y col., 1993, Moir y Goldman, 1993).

Como vemos es un grupo de proteínas bastante bien caracterizado, sin embargo en plantas no se había demostrado su presencia de forma definitiva, por ello decidimos obtener fracciones de láminas y caracterizarlas.

2.1.1. Obtención de láminas.

A la hora de obtener láminas el primer problema que se nos planteó fue la gran estabilidad de la matriz interna, resistente, como vimos en el apartado 1 de la

discusión, a agentes desestabilizantes del tipo de la RNasa, las soluciones de alta fuerza iónica y el DTT. Por ello decidimos introducir en nuestro procedimiento de obtención de matrices nucleares, la extracción con urea, a concentración lo mas alta posible, sin llegar a extraer de la matriz las proteínas tipo filamento intermedio, que se despolimerizan a concentraciones de urea 6 M (Beven y col., 1991, Shaw y col., 1991).

Las matrices extraídas con urea conservan su estructura tripartita, con una lámina bien desarrollada y relativamente abundantes componentes internos, por lo que no se pueden considerar láminas purificadas, sino fracciones enriquecidas en componentes de la lámina, semejantes a las utilizadas en otras especies de plantas para el estudio de sus laminas, ante la dificultad para eliminar la matriz interna (Beven y col., 1991, Li y Roux, 1992, McNulty y Saunders, 1992). Los perfiles polipeptídicos revelan también las diferencias de composición entre ambas fracciones. En geles monodimensionales ya se aprecia un patrón de bandas distinto en las matrices nucleares obtenidas con o sin extracción con urea, percibiéndose sobre todo las diferencias en geles bidimensionales (Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993c). El descenso en el número de "spots" de los geles bidimensionales, es un indicador de la cantidad de proteínas extraídas de las matrices por la urea. Sin embargo, aunque se supone que las fracciones estan enriquecidas en componentes de la lámina, los filamentos intermedios, a los que pertenecen las laminas, siguen siendo minoritarios como se deduce de la reacción con el anticuerpo IFA, que sólo reconoce una serie de "spots" en una zona determinada del gel, como comentaremos con mas detalle. Solamente destacar que esta baja proporción sólo se explica debido a que

una gran cantidad de componentes de la matriz interna y nucleolar, que se encuentran en una elevada proporción en la matriz nuclear de cebolla, son capaces de resistir la extracción drástica con urea.

2.1.2.- Identificación de proteínas tipo lamina.

Se ha creado un cierto grado de confusión en torno a la existencia de proteínas tipo filamento intermedio o tipo lamina, en la matriz nuclear de plantas . Parece claro, por los estudios inmunológicos, que en el núcleo de plantas existen proteínas relacionadas con los filamentos intermedios (Galcheva-Gargova, 1988, Beven y col., 1991. Frederick y col., 1992, Li y Roux, 1992, McNulty y Saunders, 1992, Ivachenco y col., 1993). Sin embargo la confusión surge debido a la gran variabilidad de sus pesos moleculares, así como a su distribución nuclear. La falta de anticuerpos monoespecíficos contra laminas de plantas, así como la falta de conocimiento de los antígenos tipo filamento intermedio en ellas han sido las causas de tanta incertidumbre.

Gracias a la utilización de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales de variada procedencia, podemos afirmar la presencia de laminas o proteínas antigénicamente relacionadas con ellas en la lámina de las matrices de cebolla. Al estar desarrollados los anticuerpos contra distintos tipos de laminas de origen diferente, la posibilidad de que nuestros resultados se deban a reacciones cruzadas inespecíficas es muy baja.

La posibilidad de que las proteínas identificadas correspondan a contaminaciones con antígenos tipo filamento intermedio del citoplasma, se descartó mediante control de las muestras al microscopio óptico y electrónico, que demostraron que las matrices estaban libres de restos citoplásmicos, así como por la falta de reacción de dichas proteínas con anticuerpos dirigidos contra proteínas de tipo filamento intermedio de origen citoplásmico de plantas, como el AFB (Hargreaves y col., 1989a) o el anticuerpo MAC 322 que reconoce un epitopo de filamento intermedio común entre plantas y animales (Ross y col., 1991).

El anticuerpo IFA, que reconoce un epitopo muy conservado dentro de todos los filamentos intermedios (Pruss y col., 1981), presente en las laminas (Osborn y Weber, 1987), reacciona en las matrices nucleares de cebolla con una serie de cinco "spots", con pesos moleculares entre 58 y 65 KD, y pls de 5-7, que presentan distinta reactividad frente a los anticuerpos antilamina utilizados, que reconocen preferencialmente a laminas de tipo A o B. De forma que hemos podido asignar los distintos "spots" a un tipo determinado de lamina (A o B). Así mientras los anticuerpos contra la laminas de tipo B, reconocen un solo "spot" de unos 64 KD y pl ácido, los anticuerpos antilamina A reconocen varios, que se suelen presentar como varias isoformas que se originan debido a ligeras modificaciones postranslacionales, todas ellas con pls mas básicos que el de la supuesta lamina tipo B, característica de las laminas de tipo A. Aunque sin tener datos acerca de la secuencia de dichas proteínas no se puede afirmar de una forma definitiva que las laminas de *A. cepa* pertenezcan a un tipo u otro de los ya descritos en vertebrados. Aparentemente existe un alto grado de conservación de sus pesos moleculares, puntos isoeléctricos y modelos de

migración en geles bidimensionales no sólo de las laminas de tipo B, que son constitutivas y se consideran como las mas antiguas (Stick, 1992), sino también de las de tipo A.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en otras especies vegetales, observándose una gran semejanza entre los peso molecular de las proteínas identificadas en cebolla con los de las que reconoce el anticuerpo IFA en zanahoria (Frederick y col., 1992) y guisante (Li y Roux, 1992), así como utilizando anticuerpos antilamina B en esta última especie (McNulty y Saunders, 1992).

El conocimiento tan restringido acerca de los filamentos intermedios de plantas, hace que la identificación de proteínas tipo lamina en su lámina, cuya relación filogenética y estructural con los filamentos intermedios están ampliamente demostradas, constituya un dato fundamental desde el punto de vista de la evolución de este grupo de proteínas dentro del núcleo eucariota. Ya que confirma a las laminas como miembros antiguos dentro de la familia de los filamentos intermedios, que habrían evolucionado a partir de un gen ancestral común, conservándose mucho mejor que sus correspondientes representantes citoplásmicos (Döring y Stick, 1990). Además el hecho de que la lámina se organice de forma semejante en eucariotas superiores, da pie a que se investiguen las relaciones existentes entre el nucleoesqueleto y el citoesqueleto en plantas.

Parece claro que a nivel estructural la lámina de vertebrados y plantas están muy relacionadas, sin embargo en lo que se refiere a las propiedades funcionales de

las laminas que los integran hay menos información. Recientemente se ha identificado en guisante una proteína kinasa II que fosforila proteínas tipo lamina de su lámina (Li y Roux, 1992), por lo que parece que los mecanismos fundamentales que regulan el comportamiento de dichas proteínas también son semejantes en ambos sistemas. También se conoce la existencia en la lámina de guisante de una NTPasa, derivada supuestamente de un precursor tipo lamina, semejante al enzima correspondiente de la matriz nuclear de células de hígado de rata, que aproximaría todavía más las características funcionales nucleares en ambos grupos.

2.1.3.- Localización topológica de las laminas.

La distribución que presentan las laminas en las matrices de cebolla, determinada mediante inmunolocalización por inmunofluorescencia e inmunomarcado con oro, es distinta a la localización exclusivamente periférica descrita en vertebrados (Krohne y Benavente, 1986, Paddy y col., 1990). En nuestro caso, se observa que la fluorescencia presenta una distribución discontinua en la lámina, como sucede en vertebrados, pero también existe reacción en el interior de las matrices mostrando un patrón de distribución punteado. Esta distribución, queda confirmada por los resultados obtenidos al microscopio electrónico, con secciones ultrafinas de matrices sometidas a inmunomarcado con oro, cuya especificidad ha sido demostrada mediante cuantificación de dicho marcado.

Los datos anteriores, junto con la alta especificidad de los anticuerpos, demostrada en inmunoblots de geles bidimensionales, sugieren que la distribución de

las laminas, o proteínas relacionadas antigénicamente con ellas, en las matrices de *A. cepa*, es tanto periférica, asociada a la lámina, como interna, de forma semejante a lo que sucede con la distribución de proteínas de tipo filamento intermedio identificadas en otras matrices de plantas (Frederick, 1992, McNulty y Saunders, 1992).

La localización atípica de las laminas con respecto a lo generalmente aceptado en las matrices de vertebrados, podría explicarse desde distintos puntos de vista. Teniendo en cuenta que los conocimientos acerca de proteínas del grupo de los filamentos intermedios en plantas son pocos, podría suceder que dentro de ellas existiesen otros grupos de proteínas con determinantes antigénicos en común con las laminas localizadas en la matriz interna (Mirzayan y col., 1992, Yang y col., 1992a), o que el nucleoesqueleto de plantas se organice de forma distinta, como se pensaba en el caso de los filamentos intermedios citoplásmicos, aunque los datos más recientes parecen indicar una mayor aproximación a las células de vertebrados también en cuanto al citoesqueleto se refiere (Yang y col., 1992b). También podría realmente existir un nucleoesqueleto interno de proteínas de tipo filamento intermedio en plantas, como el encontrado en algunos vertebrados. (Jackson y Cook, 1988).

Recientemente se ha empezado a cuestionar la idea de que las laminas se localizan exclusivamente en la periferia nuclear en células animales (Bridger y col., 1993, Goldman y col., 1992, Moir y col., 1994). Los experimentos de microinyección de lamina A en el citoplasma celular, muestran que ésta se incorpora rápidamente al núcleo, no directamente a la lámina, sino que permanece en forma de acúmulos, en

dominios discretos en el nucleoplasma hasta su incorporación a la lámina, apareciendo de forma masiva dichos acúmulos durante la fase G₁ y S del ciclo celular. Lo que en un principio podría parecer simplemente un artefacto debido al exceso de proteína microinyectada, queda descartado cuando se hace un estudio semejante en células sin microinyectar (Goldman y col., 1992). Estudios posteriores con anticuerpos antilamina, han confirmado dicho patrón de distribución en células sincronizadas en fase G₁ (Bridger y col., 1993). El que se observaran en contacto con regiones de heterocromatina, llevó a algunos a especular sobre la posibilidad de que se debieran a invaginaciones de la membrana nuclear (Belmont y col., 1993), sin embargo, estudios posteriores lo han descartado (Moir y col., 1994). Lo que parece mas probable, es que sean regiones en las que se acumulan las laminas recientemente sintetizadas en espera de su incorporación a la lámina, para lo cual tienen que tener un periodo de maduración, durante el cual sufren una serie de transformaciones postranslacionales como isoprenilación, metilación, fosforilación y proteolisis final (Lutz y col., 1992, Nigg, 1992, Moir y Goldman, 1993). El que aparezcan sobre todo en G₁ parece indicar que se debería al hecho de que las células en crecimiento necesitan gran cantidad de proteínas para ir desarrollando su lámina. Bridger y col., (1993), han observado estructuras filamentosas en el nucleoplasma que corresponderían a laminas preensambladas en pequeños filamentos, que están en contacto directo con la cromatina condensada, como paso previo a su ensamblaje definitivo en la estructura periférica.

Los datos de interacción de las laminas con la cromatina son abundantes (Nigg, 1992), especialmente en lo que se refiere a las laminas de tipo A, en que

muchos estudios lo demuestran "in vitro" (Glass y Gerace, 1990, Höger y col., 1991, Glass y col., 1993). El hecho de que las laminas localizadas a nivel nucleoplásmico se encuentren en íntimo contacto con la heterocromatina podría tener su explicación en su participación en la reorganización de la cromatina que se produce después de la mitosis (Benavente y Krohne, 1986, Bridger y col., 1993).

Nuestros resultados, por tanto, se podrían deber también a la asociación de las laminas de cebolla con la matriz interna como consecuencia de los distintos procesos fisiológicos que se producen en las células a lo largo del ciclo celular como en el caso de células animales (Moir y Goldman, 1993).

2.2.- MATRIZ INTERNA

La matriz interna de células de cebolla, como hemos visto, presenta una gran estabilidad frente a los distintos procesos de obtención utilizados (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990), constituyendo el retículo fibrillogranular que une el esqueleto nucleolar con la lámina, estructuralmente bien diferenciado de ellos, que son exclusivamente fibrilares. Dicho retículo coincide aproximadamente con el de tipo ribonucleoproteico que aparece contrastado preferencialmente cuando se utiliza la tinción de EDTA de Bernhard, (1969), en núcleos "in situ" y aislados de cebolla (Medina y col., 1989, Moreno Díaz de la Espina y col., 1991), lo que demuestra que la matriz interna constituye un componente subyacente constante del núcleo de cebolla como sucede en animales (Berezney y Coffey, 1976, Zborek y col., 1990).

Las fibras de 5-10 nm y gránulos de 25 nm que la forman, son semejantes a los descritos en sistemas animales (Bouteille y col., 1983, Berezney, 1984) y plantas (Frederick y col., 1992, McNulty y Saunders, 1992), y no se distribuyen homogéneamente. En la matriz interna, por contra, se diferencian dos mallas, una exclusivamente fibrilar, y otra fibrilogramular. La fibrilogramular, deriva de las estructuras ribonucleoproteicas de las regiones intercromatínicas del núcleo, es decir del retículo de gránulos intercromatínicos, como demuestra su afinidad por bismuto y la presencia de epitopos comunes constituyendo el soporte estructural para la síntesis, "splicing" y transporte del RNA no nucleolar. El componente exclusivamente fibrilar, de significado no tan claro, podría corresponder con la fracción nucleoesquelética que interviene directamente en la organización topológica del núcleo, sirviendo de soporte a los complejos multiméricos de transcripción y "splicing" y también de replicación y anclaje de los "loops" de DNA (Jackson y col., 1993, Spector, 1993b).

La resistencia de la matriz interna de plantas dificulta la asignación de sus componentes proteicos en las fracciones de matrices totales. Ya que aunque las matrices nucleolares pueden obtenerse aisladas y sus proteínas identificarse en las matrices totales, las láminas no. Por tanto los estudios de identificación de los componentes de la matriz interna se han tenido que basar en el uso de anticuerpos específicos contra proteínas que componen la matriz interna de otros sistemas.

La resistencia de la matriz interna de plantas tiene que ser debida a una forma de organización especial basada en distintos factores a los que hemos intentado

llegar mediante los mencionados estudios inmunológicos.

2.2.1.- Topoisomerasa II. Componente de la matriz interna.

La mayoría de los procesos en los que interviene la molécula de DNA llevan asociados una serie de dificultades topológicas como consecuencia de su estructura, en forma de doble hélice. Dichas complicaciones se superan gracias a la existencia de las topoisomerasas I y II (Osheroff y col., 1991, Wang, 1991), por lo que estas enzimas juegan un papel esencial en gran parte de los procesos celulares. Desde el punto de vista enzimático, la topoisomerasa II se sabe que participa en los procesos de replicación y reparación del DNA, y se ha sugerido, aunque no está claro, que juega también un papel en la transcripción (Wang, 1985, Anderson y Roberge, 1992). Su papel enzimático se basa en la rotura reversible de las dos cadenas de la doble hélice del DNA, con la finalidad de disminuir las tensiones que se originan debido al avance de las horquillas de replicación o transcripción, volviéndolas a unir posteriormente (Wang, 1985 y 1991). Sin embargo, además de su actividad propiamente enzimática, parece que tiene un papel estructural fundamental como componente del esqueleto cromosómico (Ernshaw y col., 1985) y de la matriz nuclear interfásica (Berrios y col., 1985) participando, debido a su afinidad por las secuencias MAR del DNA (Adachi y col., 1989), en el mantenimiento de la conformación del DNA formando "loops", que se anclan a la matriz nuclear precisamente mediante la interacción de dichas secuencias MAR con la topoisomerasa II (Cockeril y Garrard, 1986. Gasser y Laemmli, 1986, Laemmli y col, 1992).

Con un anticuerpo desarrollado contra un fragmento de la DNA topoisomerasa II humana (Tsai-Pflugfelder y col., 1988), hemos identificado la existencia de topoisomerasa II como componente insoluble de la matriz nuclear de cebolla. Esta proteína forma realmente parte de la fracción insoluble, ya que en nuestro caso no se han sometido las muestras a estabilización por calor, que produce una asociación inespecífica de la topoisomerasa II a la matriz nuclear (Kaufmann y Shaper, 1991). Su peso molecular, aunque superior al de células humanas, ya que ronda los 215 KD, coincide sin embargo con el valor obtenido para la topoisomerasa II en otras especies de plantas (Fukata y col., 1986).

Los datos de inmunofluorescencia, demuestran que aunque la localización del enzima en núcleos intactos es principalmente nucleoplásmica, la fracción insoluble en las matrices de cebolla, se encuentra asociada a la matriz interna y también a la nucleolar, pudiendo localizarse mayoritariamente en uno u otro dominio matricial. Estos datos en principio se contradicen con los que la describen como componente exclusivo de la matriz interna de *Drosophila* (Berrios y col., 1985).

Los estudios realizados sobre la topoisomerasa II en variedad de tipos celulares, en los últimos años, pueden dar una explicación a estos resultados. Se han caracterizado dos isoformas de la topoisomerasa II humana, una de 170 KD, y otra de 180 KD (Chung y col., 1989), cuya concentración y actividad varían según la fase del ciclo celular (Zini y col., 1992, Petrov y col., 1993). Mientras, algunos estudios de localización de ambas isoformas, utilizando anticuerpos específicos contra cada una de ellas, en células animales sin extraer, de distinto origen, han localizado la isoforma

de 180 KD exclusivamente en el nucleolo, y la de 170 KD en el nucleoplasma (Negri y col., 1992, Zini y col., 1992 y 1994), otros datos indican que ambas isoformas se encuentran en ambos dominios nucleares (Petrov y col., 1993). En células embrionarias interfásicas de *Drosophila*, Swedlow y col., (1993) observan la localización de la proteína de 170 KD por todo el núcleo, aunque se acumula en determinadas zonas en función del momento de la interfase, que podrían corresponderse con organizadores nucleolares o nucleolos. En matrices nucleares de células animales, la isoforma de 180 KD se asocia exclusivamente a la matriz nucleolar, y lo que es más importante, se ha demostrado que tiene una elevada capacidad de resistencia frente a las diferentes extracciones, de forma que permanece en una elevada proporción en las estructuras residuales (Zini y col., 1992).

Nuestros resultados podrían deberse a que el anticuerpo, al no estar desarrollado de forma específica contra una u otra isoforma, estuviese reconociendo ambas en la fracción insoluble. La distribución preferencial de la proteína insoluble en uno u otro compartimento, estaría relacionada con la expresión de cada una de las isoformas, en función de la fase del ciclo celular, lo que explicaría las diferencias observadas entre unas matrices y otras dentro de la misma muestra, al no provenir de una población celular sincronizada. Sin descartar, que pueda ser debido no sólo a una diferencia en la concentración de los antígenos detectados, sino también a que su accesibilidad sea distinta en ambos compartimentos de las matrices (Petrov y col., 1993, Swedlow y col., 1993).

Los datos de cuantificación del marcado al microscopio electrónico, muestran

que aunque distribuido en los tres compartimentos de las matrices de cebolla, es mayoritario en la matriz interna. Sin embargo considerando el nivel de marcado nucleolar frente a su desviación, nos revela que en muchas de las matrices analizadas el nucleolo aparecía prácticamente desprovisto de marcado, frente a otras en las que aparecería significativamente marcado, confirmándose los datos de inmunofluorescencia.

La presencia de topoisomerasa II en las matrices nucleares de cebolla, con una distribución que mimetiza la del DNA residual asociado a las mismas, unida a la capacidad de asociación de secuencias MAR exógenas, que son ricas en adeninas y timidinas (Gasser y Laemmli, 1986, Amati y Gasser, 1988), y contienen la secuencia de reconocimiento para la topoisomerasa II (Sander y Hsieh, 1993), sugieren que la topoisomerasa II intervendría en el anclaje de las bases de los "loops" de DNA a la matriz nuclear de plantas, y que las secuencias MAR se asociarían a los tres dominios de las matrices.

Por tanto la matriz nuclear de plantas, como en el caso de animales, es el soporte estructural necesario para el anclaje de los "loops" de DNA, así como para los procesos de replicación (Hozák y col., 1993a, y 1994b).

2.2.2.- Componentes de tipo filamento intermedio.

Una de las principales incógnitas acerca de la matriz interna, es la naturaleza de sus componentes básicos. Su resistencia a la extracción, incluso con soluciones de

urea 4 M, podría explicarse por la existencia en su núcleo de un soporte estructural basado en proteínas de tipo filamento intermedio, como se ha observado en células animales (Jackson y Cook, 1988, Yang y col., 1992a). A dicho soporte estructural se anclarían los "loops" de DNA, así como los distintos complejos multiméricos que intervienen en las funciones de transcripción y "splicing". Un nucleoesqueleto de actina no parece probable, puesto que la DNasa I despolimeriza la F-actina y destruiría la arquitectura interna de la matriz durante el procedimiento de extracción.

En *A. cepa* el anticuerpo IFA detecta una distribución interna de epitopos en las fibras de la matriz interna (Moreno Díaz de la Espina, 1995). Además cuando se analiza la reacción con el anticuerpo IFA en blots, se comprueba que aparte de los "spots" correspondientes a las distintas laminas, reconoce otro, muy abundante, de unos 58 KD, no reconocido por ninguno de los anticuerpos antilaminas ensayados, y que podría corresponder a algún componente tipo filamento intermedio intranuclear de la matriz de *A. cepa*. Dicha posibilidad, cobra mas fuerza, si tenemos en cuenta que su peso molecular coincide con el de una proteína del grupo de las keratinas descrita en la matriz nuclear de células de hígado de rata (Aligüé y col., 1990).

Utilizando un anticuerpo desarrollado contra una proteína tipo filamento intermedio de la matriz nuclear de zanahoria (Beven y col., 1991), hemos identificado una proteína de 102 KD localizada fundamentalmente en el componente fibrilar de la matriz interna. La localización mediante inmunofluorescencia, demuestra que la reacción se debe a proteínas de tipo filamento intermedio diferentes a las laminas, ya que la distribución del antígeno en los componentes internos de las matrices, es

difusa y claramente diferente al patrón de distribución punteado de las laminas asociadas a la matriz interna. Además los antígenos reconocidos por el JIM 63, no producen la intensa fluorescencia periférica típica de las laminas.

Por tanto los estudios inmunológicos nos permiten concluir que, existen al menos dos componentes distintos de tipo filamento intermedio en la matriz interna de *A. cepa*. Nuestros datos coinciden con los de otros autores que detectan filamentos intermedios internos en las matrices nucleares de otras especies vegetales (Beven y col., 1991, Frederick y col., 1992, McNulty y Saunders, 1992, Ivachenco y col., 1993).

El hecho de que tanto las proteínas de tipo filamento intermedio como la topoisomerasa II, aparezcan siempre asociados a los componentes fibrilares de la matriz interna de células de cebolla, sugiere la existencia de dos dominios dentro de la misma, con composición y funcionalidad diferente como vamos a ver a continuación.

Sin embargo, serían necesarios estudios del tipo de los desarrollados por He y col., (1990), en células animales, basados en extracciones con soluciones de fuerza iónica creciente, así como la utilización de secciones en las que se elimina la resina, para observar la organización interna del nucleoesqueleto, y discriminar realmente cuáles son las proteínas pertenecientes al nucleoesqueleto base, y cuáles forman parte de los complejos multiméricos asociados a ellas.

2.2.3.- Granulos intercromatínicos.

Los gránulos intercromatínicos son estructuras bastante bien caracterizadas en células animales. Son componentes de la región intercromatínica del núcleo interfásico, que aparecen como grupos de gránulos de 20-25 nm, interconectados entre sí por fibrillas formando un retículo. Dicho retículo coincide, en células animales, con el patrón fluorescente que se observa en el núcleo al microscopio óptico, cuando se utilizan anticuerpos contra proteínas de los snRNPs, o mediante hibridación "in situ" con sondas contra snRNAs. Teniendo en cuenta que en ellos no se ha detectado nunca síntesis de RNA, se consideran estructuras íntimamente relacionadas con el almacenamiento y "splicing" del mRNA (Puvion-Dutilleul, 1983, Spector, 1993a y 1993b). Son ricos en proteínas fosforiladas (Wassef, 1979), y constituyen parte de la matriz nuclear obtenida tras someter a los núcleos a extracciones con detergentes, soluciones de alta y baja fuerza iónica, y digestión con nucleasas (Berezney y Coffey, 1977, Kryzowska-Gruca y col., 1983, Zborek, 1990).

Distintos estudios realizados utilizando técnicas citoquímicas específicas para RNA, dobles digestiones enzimáticas, así como tinción preferencial con oxinitrato de bismuto para proteínas fosforiladas, han demostrado que las plantas presentan gránulos intercromatínicos formando un retículo intranuclear con una organización semejante a la de animales, aunque topológicamente no se distribuyan de la misma manera, al no encontrarse agrupados (Medina y col., 1989, Moreno Díaz de la Espina y col., 1992 y 1993b). Si tenemos en cuenta la importancia de los gránulos intercromatínicos, al estar íntimamente relacionados con los mecanismos que regulan

el "splicing" del RNA (Jimenez-García y Spector, 1993), su existencia en plantas indica el alto grado de conservación de las estructuras que soportan dichos procesos en células eucariotas.

Los estudios ultraestructurales demuestran que el retículo de gránulos intercromatínicos es altamente insoluble, y forma parte de la matriz nuclear de cebolla independientemente del procedimiento de extracción utilizado, observándose como un retículo continuo que se extiende desde la matriz nucleolar a la lámina cuando se efectúa reconstrucción tridimensional de matrices nucleares enteras (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Moreno Díaz de la Espina, 1995). Además el que los gránulos intercromatínicos de las matrices sigan presentando una elevada afinidad por el bismuto, confirma que conservan una elevada proporción de proteínas fosforiladas,

El dato mas relevante que confirma la identidad de las estructuras contrastadas con bismuto y los gránulos intercromatínicos, ha sido la detección en ellos de una proteína característica de los gránulos intercromatínicos de células de mamíferos (Clevenger y Epstein, 1984a y 1984b): la proteína P-105 (antígeno nuclear asociado con proliferación). La cuantificación de los datos de inmunomarcado con oro para microscopía electrónica, demuestra que el marcado es específico en los gránulos del dominio fibrillogranular de la matriz interna. Aunque no se observa un marcado homogéneo de los mismos, esto es probablemente debido a que el anticuerpo detecta exclusivamente los epitopos expuestos en la superficie del corte, mientras que la imagen del microscopio electrónico incluye toda la estructura del grosor del corte. Al

ser los gránulos intercromatínicos los lugares de acumulación de la maquinaria de "splicing" (Spector, 1993a y 1993b), la matriz nuclear de plantas sería el soporte estructural de este proceso, como en células animales.

En conclusión, los datos obtenidos al estudiar la organización y composición de la matriz interna de cebolla, confirman que existen en ella dos dominios estructurales definidos. Uno exclusivamente fibrilar, formado por proteínas de tipo filamento intermedio, que serían los componente hipotéticos del nucleoesqueleto básico, como ocurre en células animales (Jackson y Cook, 1988, Wang y Traub, 1991), en las que se han caracterizado incluso proteínas relacionadas con los filamentos intermedios formando parte de los filamentos básicos del nucleoesqueleto interno (Yang y col., 1992a). La topoisomerasa II, que está implicada en el anclaje de los loops de DNA a la matriz nuclear (Gasser y col., 1989), y que formaría parte de los complejos de replicación o replisomas (Berezney, 1984) se encuentra también asociada a este dominio. El otro dominio es fibrilogranular, contiene los gránulos intercromatínicos, y sería el soporte de los complejos de "splicing" del RNA, constituyendo la base estructural de las denominadas cadenas o "tracks" de RNA (Spector, 1993a y 1993b, Xing y Lawrence, 1993, Blencowe y col., 1994).

2.3.- MATRIZ NUCLEOLAR

El nucleolo constituye la expresión morfológica de todos los procesos fisiológicos que dan lugar a la biogénesis de los ribosomas. Está formado por rDNA, rRNAs, snoRNAs y distintos tipos de proteínas, y presenta una organización

ultraestructural y características generales muy semejantes en todos los eucariotas superiores (Scheer y Benavente, 1990, Scheer y col., 1993, Scheer y Weisenberger, 1994). Sin embargo, existe todavía una gran controversia acerca de la presencia de una matriz nucleolar como soporte de los complejos de transcripción y procesamiento del rRNA y no están claros los mecanismos moleculares que mantienen la estructura del nucleolo organizada (Labbart y col., 1984).

El hecho de que no sea necesaria la existencia de un nucleolo de estructura convencional para la síntesis del rRNA y su procesamiento (Scheer y Benavente, 1990), el que el nucleolo organizado persista en ausencia de síntesis de rRNA (Risueño y Moreno Díaz de la Espina, 1979), e incluso en ausencia de genes de rDNA (Hay y Gurdon, 1967), apoya el que exista detrás de todo ello una organización estructural basada en interacciones proteicas, independiente de la síntesis y procesamiento del rRNA.

Los estudios ultraestructurales demuestran que la matriz nucleolar es un componente constante de la matriz nuclear en *A. cepa* (Barthelémy y Moreno Díaz de la Espina, 1984, Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993a y 1993b), y no un artefacto originado durante el proceso de extracción ya que independientemente de la metodología utilizada, el nucleolo residual presenta una estructura básica semejante, capaz de resistir digestión con RNasa previamente a la extracción salina, e independiente de la formación de puentes disulfuro (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990). Dichos resultados confirman los obtenidos en otras matrices nucleares de plantas (Stolyarov, 1984, Gosh y Dey, 1986, Corben y col., 1989,

Frederick y col., 1992).

La obtención de fracciones purificadas de nucleolos aislados, que mantienen sus componentes estructurales perfectamente diferenciados, carentes de cromatina contaminante, y muy estables si se mantienen en medios con la adecuada concentración de cationes divalentes (Martín y col., 1992a), nos ha permitido realizar un estudio detallado de la matriz nucleolar de cebolla, ya que a partir de ellos hemos aislado las matrices nucleolares para el estudio de su ultraestructura y composición proteica.

2.3.1.- Ultraestructura y significado estructural.

Las matrices nucleolares aisladas de *A. cepa* presentan una estructura exclusivamente fibrilar, muy semejante a la de las que se encuentran formando parte de las matrices totales (Moreno Díaz de la Espina y col., 1991). En ellas han desaparecido los componentes granular y fibrilar denso como tales, por efecto de la extracción. De los elementos estructurales del nucleolo aislado sólo se conservan como tales los centros fibrilares.

La semejanza estructural de la matriz nucleolar aislada con la de las que se localizan dentro de las matrices nucleares totales, que a su vez se corresponde básicamente con la organización de los nucleolos "in situ", exceptuando la ausencia de partículas preribosómicas (Martín y col., 1989, Medina y col., 1990), apoya la existencia de una matriz nucleolar como soporte funcional del nucleolo, que no se

correspondería con un mero artefacto producido durante la manipulación de las muestras. La conservación de la estructura básica de la matriz nucleolar, incluso en matrices nucleolares aisladas, indica que el mantenimiento de la integridad estructural del nucleolo se debe, al menos parcialmente, a factores intrínsecos, probablemente a la existencia de un esqueleto nucleolar, y no depende de otros componentes de la matriz nuclear. La estabilidad de la matriz nucleolar podría estar relacionada con la que presenta la matriz interna de cebolla a distintos agentes desestabilizadores como DTT, RNasa, 2 M NaCl (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993c), así como la descrita en otras matrices de plantas (Avramova y Bennetzen, 1993) constituyendo una característica común de la matriz nucleolar de plantas. Sin embargo no se puede descartar que la presencia de cationes divalentes contribuya a dicha estabilización, ya que existen datos en células de sistemas animales en que se ha observado que la matriz nucleolar se desorganiza cuando se suprimen los cationes divalentes de los tampones, aunque no en preparaciones extendidas (Stephanova y Valkov, 1991)

La ultraestructura de las matrices nucleolares de cebolla aisladas o asociadas a la matriz total, es semejante a la de las obtenidas en célula Hela, con los centros fibrilares reconocibles ultraestructuralmente, rodeados por los elementos fibrilares (Hozàk y col., 1992 y 1994a). Los experimentos con DRB, han demostrado que no es necesaria la existencia de un nucleolo organizado de forma convencional para que se produzca la síntesis del rRNA, sino que es suficiente la presencia de centros fibrilares y componente fibrilar denso asociado a ellos (Scheer y col., 1984, Scheer y Benavente, 1990). Así mismo los experimentos de inmunolocalización "in situ", con

anticuerpos específicos, han demostrado que la RNA polimerasa I, topoisomerasa I, y el factor de transcripción UBF de la polimerasa I se localizan en los centros fibrilares y el componente fibrilar denso próximo a ellos (Scheer y Benavente, 1990, Medina y col., 1991, Rodrigo y col., 1992, Spector, 1993a), indicando que los centros fibrilares constituirían el lugar de anclaje de los complejos de transcripción del rDNA (Dickinson y col., 1990, Hozàk y col., 1994a), y el componente fibrilar que les rodea lo sería para las partículas preribosómicas (Franke y col., 1981, Jackson y col., 1993), como sucede a nivel de esqueleto extranucleolar con el RNA recién sintetizado (Jackson y col., 1993).

2.3.2.- Composición proteica.

Los perfiles polipeptídicos monodimensionales de nucleolos y matrices nucleolares aislados demuestran claramente las diferencias existentes entre ambas fracciones, apareciendo enriquecidas las matrices en bandas semejantes a las descritas en las estructuras homólogas de células de hígado de rata (Todorov y Hadjolv, 1979, Comings y Peters, 1981, Olson y Thompson, 1983 y Olson Y col., 1986). Una característica paradójica es la gran cantidad de histonas de la zona central del nucleosoma que aparecen en las matrices nucleolares, después de digestión exhaustiva con DNasa I, que elimina la mayoría del DNA. Este mismo resultado se obtiene en células de hepatoma de Novikoff (Olson y col., 1986), así como en las matrices totales de cebolla (Moreno Díaz de la Espina y col., 1991). Teniendo en cuenta que en geles bidimensionales, las matrices nucleolares de cebolla muestran un enriquecimiento en proteínas de carácter ácido, con respecto a los nucleolos

aislados, al igual que ocurre en las matrices nucleolares de células de ratón (Shiomi y col., 1986), podría suceder que las histonas se reasociaran de forma inespecífica con ellas. No se puede descartar la posibilidad de que se trate de otras proteínas con movilidad electroforética semejante a la de las histonas. Sobre todo si tenemos en cuenta que con el anticuerpo anti-histona H₄, las matrices nucleares de cebolla no muestran reacción. Así como la comprobación de que la RNasa A se reasocia de forma inespecífica a las matrices después de las digestiones a pesar de los lavados exhaustivos, como se ha descrito en células Hela (Belgrader y col., 1991b). Su peso molecular está en el mismo rango que el de las histonas, y esto apoyaría el que se trate de componentes proteicos distintos de ellas.

La electroforesis bidimensional demuestra que, proteínas que parecían homólogas en las matrices nucleolares con respecto a los nucleolos aislados, en geles monodimensionales, resulten corresponder a proteínas con distintos valores de pIs, que se encontraban en distinta concentración. El patrón proteico es claramente diferente, con un evidente descenso del número de componentes, que demuestra que la extracción ha sido eficaz, como muestran los estudios ultraestructurales realizados paralelamente.

A pesar de las diferencias cualitativas y cuantitativas, existen proteínas comunes entre matrices nucleolares y nucleolos aislados, lo que demuestra tal como comentamos al estudiar su organización ultraestructural, que no se trata de una estructura artefactual originada durante el proceso de aislamiento, ni constituye una simple asociación de proteínas de forma inespecífica. Además el hecho de que la

matriz nucleolar presente un patrón polipeptídico complejo, indica que no se trata de una estructura meramente nucleoesquelética, sino que sería una estructura multifuncional compleja, cuya composición podría variar en función del método de extracción, presentando componentes asociados a ella además de los puramente estructurales (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Olson y col., 1986).

La comparación con los perfiles de las matrices nucleares totales, permite comprobar que las proteínas de las matrices nucleolares son un subgrupo de las matriciales totales, cuantitativamente importante debido al mayor tamaño relativo que muestra la matriz nucleolar con respecto a los otros dos dominios de las matrices nucleares.

El patrón polipeptídico complejo característico de las matrices nucleolares, confirma la idea de que constituyen un complejo funcional organizado, siendo el soporte con el que interaccionan los prerribosomas y las proteínas ribosómicas y jugando un papel semejante al de la matriz nuclear en su interacción con las partículas que contienen el hnRNA (Faiferman y Pogo, 1975).

2.3.3.- Caracterización de la nucleolina como componente de la matriz nucleolar.

La nucleolina o proteína C23 es un componente constante del nucleolo de células eucariotas. Es una proteína multifuncional que interviene en la regulación de la transcripción de los rDNAs, con unas características estructurales que le permiten

asociarse a los precursores de los rRNAs, así como al DNA y la histona H₁ (Jordan, 1987, Lapeyre y col., 1987, Caizergues-Ferrer y col., 1989, Olson y col., 1990, Fournier y Maxwell, 1993, Heine y col., 1993, Suzuki y col., 1993).

La nucleolina de plantas se caracteriza por presentar un peso molecular inferior a la correspondiente de vertebrados (Martín y col., 1992a, Moreno Díaz de la Espina y col., 1993b, Medina y col., 1993) pero sin embargo presenta una distribución, *características de solubilización y fosforilación semejantes a la de mamíferos* (Medina y col., 1993).

Mediante inmunoblotting con anticuerpos específicos y tinción preferencial con bismuto, hemos identificado una fracción residual minoritaria de nucleolina en la matriz nucleolar de cebolla. La posibilidad de que se pudiera tratar de un contaminante queda descartada ya que las fracciones de matrices nucleolares se observan bien extraídas al microscopio electrónico, y no aparecen contaminadas con nucleolos sin extraer. Mediante inmunofluorescencia indirecta, la nucleolina se localiza de forma específica en las matrices nucleolares, ya estén aisladas o formando parte de las matrices nucleares totales. Lo mismo sucede cuando se observa la inmunolocalización al microscopio electrónico, con una acumulación preferente de las partículas de oro en el nucleolo residual. Finalmente, el que la banda de 58 KD, reconocida por los anticuerpos, se tiña preferencialmente con bismuto en blots de proteínas de matrices nucleares fijadas con glutaraldehído, que constituye una característica de la nucleolina (Gas y col., 1984, Moreno Díaz de la Espina y col., 1993b), y el contraste preferencial del nucleolo residual de las matrices nucleares cuando se aplica esta técnica al

microscopio electrónico, confirman que realmente una fracción insoluble de la nucleolina forma parte de la matriz nucleolar de *A. cepa* (Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993b y 1993d).

Sin embargo, la baja intensidad de la banda revelada con inmunoblotting y la cuantificación del inmunomarcado con oro, indican que la fracción insoluble de la nucleolina es minoritaria en las matrices, ya que la mayor parte de la proteína se solubiliza cuando se exponen los núcleos a soluciones de baja fuerza iónica (Cerdido y col., 1993), como las utilizadas en el proceso de obtención de las matrices nucleolares. Por tanto la fracción de nucleolina insoluble capaz de resistir el proceso de extracción debe ser una mínima proporción de la nucleolina total, pero que se encuentra fuertemente unida a la matriz nucleolar de cebolla. En contraste con nuestros datos, en células de hepatoma de Novikoff el tratamiento de los núcleos con las mismas soluciones impide la detección de la nucleolina de la fracción residual final (Olson y Thompson, 1983). El que la nucleolina residual constituya una proporción tan minoritaria de la proteína total, ha podido ser la causa de que no se haya detectado en la matriz nucleolar de células animales (Shiomi y col., 1986) antes de desarrollarse métodos de detección de alta sensibilidad como los utilizados en nuestro caso para la detección por inmunoblotting de la proteína (Olson y Thompson, 1983).

El peso molecular de la nucleolina insoluble, detectada en matriz nucleolar, es algo inferior al previamente descrito en núcleos y nucleolos aislados del mismo tejido (Martín y col., 1992a, Moreno Díaz de la Espina y col., 1993b) y al de la fracción que se solubiliza en condiciones de baja fuerza iónica (Cerdido y col., 1993). Esto podría

explicarse por la propiedad que tiene la nucleolina de sufrir procesos de fosforilación ligados a endoproteólisis, originando péptidos de menor tamaño según sus necesidades funcionales (Bugler y col., 1982, Warrener y Petryshyn, 1991, Fang y Yeh, 1993, Suzuki y col., 1993). Nuestra proteína podría corresponderse con una subfracción de la nucleolina cuyo peso molecular característico sería debido a alguna modificación postranslacional funcional. Aunque no parece probable una degradación de la misma ya que el procedimiento de obtención de matrices nucleolares aisladas se llevó a cabo en presencia de antiproteasas y a baja temperatura, y otras proteínas de la matriz nucleolar como la fibrilarina no se ven afectadas en su peso molecular. La gran sensibilidad de esta proteína a la proteólisis (Olson y col., 1990, Warrener y Petryshyn, 1991, Suzuki y col., 1993), no permite descartar completamente esta hipótesis.

Al ser tan pequeña la concentración de nucleolina insoluble respecto a las proteínas totales de la matriz nucleolar, se puede considerar que la nucleolina no es un componente básico del esqueleto nucleolar, sino que formaría parte de los complejos multiméricos que intervienen en la expresión génica del rDNA. Su capacidad de unión a histonas y DNA (Suzuki y col., 1993), nos lleva a proponerla como firme candidata a localizarse en los complejos de anclaje de los "loops" de rDNA a la matriz nucleolar (Bolla y col., 1985, Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993b, Stephanova y col., 1993). Muy recientemente se ha demostrado que la nucleolina es una proteína de anclaje de secuencias MAR a la matriz nuclear de células animales, interviniendo en el anclaje de los "loops" de los genes ribosómicos a las mismas (Dickinson y Kohwi-Shigematsu, 1995).

Aunque anteriormente Caizergues-Ferrer y col., 1984, habían detectado nucleolina en la matriz nuclear de células de CHO tras ser sometidas a estabilización por calor, que produce una asociación inespecífica de proteínas en la matriz (Martelli y col., 1991b, 1992 y 1994, Warters y col., 1993), y posteriormente Olson y col., (1986) mostraron la existencia de una proteína con el mismo peso molecular de la nucleolina en matrices nucleolares de células de hepatoma de Novikoff, ésta es sin embargo la primera vez que se identifica a la nucleolina como componente de la matriz nucleolar de células que no se han sometido a ningún tipo de estabilización (Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993b). Los datos recientes que identifican a la nucleolina como una de las proteínas de la matriz nuclear de células animales, que interviene en la asociación de las secuencias MAR a las mismas, confirman nuestros datos acerca de la existencia de una fracción insoluble de la nucleolina minoritaria, fuertemente unida a la matriz nucleolar (Dickinson y Kohwi-Shigematsu, 1995).

2.3.4.- Identificación de la fibrilarina como componente de la matriz nucleolar.

La fibrilarina, es una proteína nucleolar altamente conservada en eucariotas, que se ha caracterizado en diferentes especies desde mamíferos (Aris y Blobel, 1991), pasando por anfibios (Lapeyre y col., 1990), hongos (Christensen y col., 1986), levaduras (Schimang y col., 1989), hasta plantas (Reimer y col., 1987, Gultinan y col., 1988, Testillano y col., 1992, Cerdido y Medina, 1995), con una serie de características bioquímicas comunes, un peso molecular entre 34-38 KD, un valor de pI básico, (pI=8.5-10) y un alto contenido en dimetilarginina, característica común a

muchas proteínas nucleolares como la nucleolina. Se localiza en el componente fibrilar denso del nucleolo, formando un complejo ribonucleoproteico con el U₃ snRNA, además del U₈, U₁₂, U₁₃ y U₁₄ que interviene en el procesamiento del rRNA. La fibrilarina actúa en el primer paso del procesamiento, eliminando nucleótidos del extremo 5' (Lischwe y col., 1985, Ochs y col., 1985, Kass y col., 1990, Puvion-Dutilleul y col., 1991a, Fournier y Maxwell, 1993, Azum-Gélade y col., 1994, Jimenez García y col., 1994).

También se ha localizado fibrilarina en estructuras nucleolares no activas en transcripción, como son los cuerpos prenucleolares en células de CHO (Azum-Gélade y col., 1994), junto con el U₃ snoRNA, lo que ha llevado a proponer un modelo mediante el cual los factores que intervienen en el procesamiento del rRNA sufrirían un trasvase de los lugares de ensamblaje o almacenamiento a los sitios donde se está produciendo la transcripción de forma activa (Jimenez García y col., 1994), como sucede con los factores que intervienen en el procesamiento del mRNA (Jimenez García y Spector, 1993).

La utilización de dos anticuerpos antifibrilarina que reconocen la proteína tanto de origen humano, como de *P. poliocephalum*, nos ha permitido demostrar que la fibrilarina es un componente relativamente abundante de la matriz nucleolar de cebolla. Como en el caso de la nucleolina, los experimentos realizados a baja temperatura, en presencia de agentes reductores, permiten descartar una posible estabilización de la proteína por calor, así como su asociación inespecífica a las matrices nucleolares por formación de puentes disulfuro (Kaufmann y col., 1981,

Kaufmann y Shaper, 1984, Martelli y col., 1991b, 1992 y 1994, Stuurman y col., 1992a, Warters y col., 1993). Así mismo los controles realizados al microscopio óptico y electrónico de las fracciones de matrices nucleolares demuestran que no se debe a que existan nucleolos sin extraer como contaminantes en las muestras, o a una deficiente extracción de las matrices. Si además tenemos en cuenta que recientemente, Cerdido y Medina (1995) han descrito la existencia de dos fracciones de fibrilarina en núcleos de *A. cepa*, una fracción mayoritaria soluble, que se extrae con soluciones de baja fuerza iónica, y otra insoluble que permanece como componente residual de las estructuras que se obtienen tras someter los núcleos a extracción posterior con alta fuerza iónica, estamos en condiciones de afirmar que existe una fracción de fibrilarina insoluble como componente estructural de la matriz nucleolar de *A. cepa*. Se confirman así los resultados inmunocitoquímicos preliminares obtenidos en células Hela (Ochs y Smetana, 1991), así como los sugeridos por Shiomi y col. (1986), que detectan una proteína de 34 KD asociada a la matriz nucleolar de células de ratón, que consideran semejante a la fibrilarina.

Los resultados del inmunoblotting demuestran que la fibrilarina de las matrices nucleares presenta un valor de peso molecular muy conservado, no solo con respecto a otras especies de vegetales, sino también con mamíferos, levaduras y anfibios (Guiltinan y col., 1988, Schimang y col., 1989, Lapeyre y col., 1990, Aris y Blobel, 1991, Testillano y col., 1992, Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993b, Cerdido y Medina, 1995), y presenta la microheterogeneidad descrita para esta proteína en plantas (Guiltinan y col., 1988).

Los datos de inmunofluorescencia utilizando los mismos anticuerpos confirman la asociación de la fibrilarina con la matriz nucleolar. La mayor resolución obtenida mediante inmunomarcado con oro para microscopía electrónica, permite confirmar la especificidad de la distribución de la proteína, y analizar la distribución topológica en la matriz nucleolar. El marcado de fibrilarina residual es mucho mayor que el de la nucleolina, y aparece distribuido por la matriz nucleolar, excepto en los centros fibrilares, que tampoco parecen contener la proteína en las células sin extraer, ya que es un componente característico del componente fibrilar denso (Scheer y Benavente, 1990, Puvion-Dutilleul, y col., 1991b, Testillano y col., 1992, Cerdido y Medina, 1995), aunque en algunos casos sí se ha localizado en ellos (Ochs y col., 1985). El uso de la microscopía laser confocal, que permite efectuar secciones ópticas de las estructuras, y analizar la distribución tridimensional de los antígenos en ellas, nos ha permitido concluir que la distribución de la fibrilarina en la matriz nucleolar no es *uniforme*, sino que se localiza en *domínios discretos*, que por su tamaño (ver Medina y col., 1983), y reactividad con el anticuerpo, no corresponden a los centros fibrilares.

Como ya hemos comentado, la fibrilarina es un componente fundamental de los complejos multiméricos de snoRNPs o procesomas, en los que se lleva a cabo el procesamiento de los rRNAs (Fournier y Maxwell, 1993). Por tanto nuestros resultados apoyan la idea de la existencia de complejos preensamblados de snoRNPs insolubles, que se localizarían en la zona fibrilar de la matriz nucleolar, al igual que sucede en la matriz nuclear con los complejos de transcripción y "splicing" (Zeitlin y col., 1987, Jackson y col., 1993). Sin embargo el posible papel estructural de la fracción insoluble de fibrilarina en la organización del componente fibrilar denso no se puede descartar,

sobre todo teniendo en cuenta que esta proteína es uno de los componentes mayoritarios de los cuerpos prenucleolares mitóticos, que son estructuras sintéticamente inactivas, que contribuyen al ensamblaje del nuevo nucleolo en G₁ temprano (Azum-Gélade y col., 1994, Jimenez García y col., 1994), y que forman parte de la matriz nuclear del núcleo en este estado del ciclo (Moreno Díaz de la Espina y Mínguez, 1995).

2.4.- DNA Y MATRIZ NUCLEAR

El DNA en eucariotas presenta cuatro niveles fundamentales de organización. El primero lo constituye la doble hélice del DNA, en que dos cadenas antiparalelas se unen por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Dicha doble hélice, al enrollarse en torno al núcleo proteico de los nucleosomas, formado por dos copias de las histonas H_{2A}, H_{2B}, H₃ y H₄, da lugar a la fibra nucleosomal de 10 nm, que al compactarse da lugar a los filamentos de 30 nm, en cuya estabilización interviene la histona H₁. Finalmente, el orden superior de organización son los "loops" de DNA que forman dichos filamentos, que se distribuyen topológicamente gracias a determinadas proteínas de la matriz nuclear que se unen a secuencias específicas de DNA denominadas secuencias MAR (Getzenber y col., 1991, Pienta y col., 1991).

Por tanto los componentes estructurales del núcleo están implicados en la organización de orden superior del DNA. La matriz nuclear es el componente nuclear que de forma dinámica controla y dirige la organización tridimensional del DNA en "loops" (Pardoll y col., 1980, Nickerson y col., 1990).

El control de la extracción de DNA de las matrices nucleares de *A. cepa* mediante fluorescencia con DAPI, demuestra una eliminación masiva del DNA, siendo el valor residual menor del 5%, de acuerdo con las estimaciones de Potashkin y col., (1984) (Cerezuela y Moreno Díaz de la Espina, 1990, Moreno Díaz de la Espina y col., 1991)). Sin embargo los estudios de inmunolocalización utilizando un anticuerpo monoclonal anti-DNA, altamente sensible y específico en células de cebolla (Martín y col., 1989), demuestran que existe DNA residual en la matriz nuclear, aunque su concentración es muy baja en comparación con los valores obtenidos en núcleos "in situ". Este DNA resistiría la digestión exhaustiva con DNasa I, al estar protegido por proteínas insolubles en la matriz.

El DNA residual de las matrices, debe por tanto corresponder a los puntos de anclaje de los "loops" de DNA a la matriz que contienen las secuencias MAR. Su distribución topológica preferente en la matriz interna y matriz nucleolar, coincide con la descrita para las secuencias MAR, en otros sistemas (Razin, 1987).

Por tanto el DNA que detectamos con el anticuerpo correspondería con puntos de asociación del DNA a la matriz nuclear. En el caso de la matriz nucleolar, el DNA reflejará los puntos de anclaje correspondientes a los genes ribosómicos, localizados en el nucleolo "in situ" en el componente fibrilar denso y los centros fibrilares (Martín y col., 1989, Thiry, 1992, Hózak y col., 1993b)), que son componentes a su vez de la matriz nucleolar; resultados que concuerdan con los de localización de secuencias específicas de rDNA asociadas a matrices nucleolares (Bolla y col., 1985, Stephanova y col., 1993). En el caso del DNA asociado a la matriz interna reflejará los

correspondientes a los genes no ribosómicos. Sin embargo estos datos no permiten hacer una estimación cuantitativa de los puntos de anclaje existentes en el núcleo, ya que según el procedimiento experimental utilizado, pueden detectarse más o menos puntos (Razin y Vassetzky, 1992). Por otro lado, el anticuerpo no nos permite detectar las secuencias MAR específicamente, al no reconocer secuencias específicas de DNA.

2.4.1. Secuencias MAR.

Las secuencias MAR son las secuencias de DNA que interaccionan directamente con ciertas proteínas de la matriz nuclear, y están involucradas en el anclaje de los "loops" de DNA a la misma (Mirkovitch y col., 1984, Laemmli y col., 1992). Se caracterizan por ser fragmentos de DNA de 0.3-3 kb, con un alto contenido de adeninas y timidinas (A y T), con secuencias denominadas "A-box" y "T-Box", el motivo ATATTT, así como generalmente la secuencia consenso de reconocimiento de la DNA topoisomerasa II (Cockerill y Garrard, 1986, Gasser y Laemmli, 1986, Boulikas, 1992).

Se han identificado secuencias MAR en invertebrados (Mirkovitch y col., 1984), vertebrados (ver: Gasser y col., 1989), levaduras (Amati y Gasser, 1988) e incluso plantas (ver: Breyne y col., 1994), y entre ellas parece existir un alto grado de conservación ya que existen secuencias MAR de animales que se ha comprobado que se asocian a matrices nucleares de plantas de forma específica y viceversa (Breyne y col., 1992, Dietz y col., 1994, Mlynarova y col., 1994).

Recientemente se han identificado secuencias MAR en matrices de varias especies de plantas, como tabaco (Hall y col., 1991, Breyne y col., 1992), guisante (Slatter y col., 1991), maíz (Avramova y Bennetzen, 1993, Paul y Ferl, 1993, Stoilov y col., 1992), y petunia (Dietz y col., 1994). Presentan en su mayoría características estructurales comunes con las descritas en sistemas animales, levaduras e insectos. La mayoría se localizan en las regiones no transcritas del extremo 5' o 3' de los genes (Slatter y col., 1991, Avramova y Bennetzen, 1993), como sucede en sistemas distintos a las plantas (Gasser y col., 1989). A su vez coinciden con otras secuencias MAR en presentar secuencias ricas en adeninas y timidinas, aunque en muchos casos no contengan la secuencia consenso de reconocimiento de la DNA topoisomeras II (Slatter y col., 1991).

Nuestros resultados preliminares demuestran que las matrices nucleares de *A. cepa* presentan afinidad por las secuencias MAR de invertebrados, de acuerdo con lo descrito por Breyne y col. (1992). Las matrices utilizadas en el proceso fueron de dos tipos, las obtenidas por el método de LIS, basado en extracción con baja fuerza iónica, así como matrices obtenidas mediante extracción con soluciones de alta fuerza iónica. En el caso de las matrices obtenidas por el método de LIS, no se efectuó estabilización por calor, demostrando que los puntos de anclaje de las secuencias MAR están unidos fuertemente al nucleoesqueleto en la matriz interna mostrando nuevamente la elevada resistencia de la matriz interna de plantas (Avramova y Bennetzen, 1993), al contrario de lo que ocurre en células animales (Mirkovitch y col., 1984, Izarraulde y col., 1988) En cuanto a los ensayos de asociación de DNA, ambos tipos de muestras presentaron igual capacidad de

asociación de secuencias MAR, confirmando los resultados previos en otras especies de plantas (Avramova y Bennetzen, 1993). Las pruebas de competición con DNA exógeno de *E. coli*, demuestran que la asociación de secuencias MAR heterólogas es específica, si bien se necesitaron niveles de DNA de *E. coli* altos para saturar todos los lugares de unión inespecífica del DNA, debido a la utilización de DNasa en el proceso de obtención de las matrices en lugar de enzimas de restricción.

Se conocen varias de las proteínas que interaccionan con las secuencias MAR en la matriz nuclear de células de distintos orígenes, como las proteínas ARBP y p120 (Von Kries y col., 1991 y 1994), topoisomerasa II (Adachi y col., 1989), así como las laminas B₁, de tipo A, y otras proteínas de la matriz interna relacionadas con los filamentos intermedios (Ludérus y col., 1992 y 1994, Yang y col., 1992a), y las matrininas (Hakes y Berezney, 1991b).

El hecho de que hayamos detectado en nuestras muestras la presencia, como componentes estructurales de las matrices, de laminas, topoisomerasa II, y nucleolina hace que estas proteínas se presenten como los posibles intermediarios en estas uniones, lo que no excluye que existan otros componentes de la matriz interna de cebolla involucrados en dicho proceso.

Diferentes estudios en los que se ha comprobado que la secuencia consenso para la topoisomerasa II en plantas es algo distinta a la de animales (Sørensen y col., 1991), junto con la observación de la falta de homología existente entre distintas secuencias MAR, han llevado recientemente a la conclusión de que realmente, las

proteínas de la matriz nuclear que se asocian a ellas reconocen características estructurales del DNA de dichos fragmentos mas que secuencias específicas (Poljak y col., 1994). Ello explicaría la afinidad de las matrices por secuencias MAR de orígenes diversos, como las matrices de tabaco por secuencias MAR de levaduras (Hall y col., 1991), matrices de maíz por MARs de animales (Avramova y Benetzen, 1993), en nuestro caso por secuencias de insectos, así como al contrario, que *secuencias MAR de plantas se unan específicamente a matrices de células animales* (Dietz y col., 1994).

Las secuencias MAR, aparte de un papel propiamente estructural en la organización de la cromatina, juegan un papel funcional en la expresión génica. Están situadas justo delante de los genes a los que se asocian, hacia el extremo 5', probablemente coincidiendo con o muy próximas a los elementos reguladores de los mismos, en plantas (Hall y col., 1991, Avramova y Benetzen, 1993, Paul y Ferl, 1993) y en animales (Cockerill y Garrard, 1986, Webb y col., 1991). De forma que por un lado se puede considerar que las secuencias MAR facilitan la transcripción, ejerciendo su papel al modificar la estructura de la cromatina de manera que se favorecerá la interacción de las secuencias de DNA con los factores de transcripción "trans" asociados a las matrices, al ponerlas muy próximas (Poljak y col., 1994, Hoffman, 1993). Existen además estudios realizados tanto en plantas como en animales, que muestran como secuencias MAR flanqueando genes de sistemas heterólogos, son capaces de estimular la expresión de los mismos (Blasquez y col., 1989, Breyne y col., 1992, Allen y col., 1993, Poljak y col., 1994), confirmando el hecho de la participación de dichas secuencias directamente en la expresión génica.

Aparte de estimular la expresión génica, se ha sugerido que las secuencias MAR, son capaces de conferir a los genes que flanquean capacidad de expresarse independientemente de su localización con respecto al resto del genoma (Dietz y col., 1994, Mlynarova y col., 1994), aunque en lo que se refiere a este aspecto existan opiniones contrarias (Poljak y col., 1994).

En resumen, parece que las secuencias MAR podrían tener un papel estructural a la vez que funcional (Poljak y col., 1994).

En conclusión, los resultados preliminares sugieren que la organización estructural y funcional de orden superior del DNA en células de plantas es semejante a la de animales, si no idéntica. Aunque la caracterización molecular y genética de algunas MAR de plantas está relativamente avanzada en algunas especies, no se conocen todavía las proteínas responsables de la interacción de la matriz nuclear con las secuencias MAR.

II.- DINOFLAGELADOS

1.- LA MATRIZ NUCLEAR Y LA ORGANIZACION NUCLEAR EN DINOFLAGELADOS

Las características del núcleo de dinoflagelados (Spector, 1984), que constituyen el único grupo de eucariotas que carece de nucleosomas e histonas, y

presentan características tanto eucariotas como procariotas (Cavalier-Smith, 1981, Herzog y Soyer, 1981, Herzog y col., 1984, Loeblich, 1984, Rizzo, 1987 y 1991), hace muy interesante desde el punto de vista evolutivo el estudio de la estructura responsable de su organización. Principalmente de su cromatina para comprobar si su DNA, que carece de histonas y por tanto de nucleosomas, se organiza formando "loops", y si existe una matriz nuclear responsable de la organización y coordinación de la funcionalidad nuclear (Berezney, 1991, Getzenberg y col., 1991, Pienta y col., 1991, Razin y Vassetzky, 1992).

Sin embargo existen gran cantidad de problemas metodológicos que han podido frenar hasta ahora dichas investigaciones. Como sabemos, el punto de partida para la obtención de matrices nucleares de cualquier tipo celular, pasa generalmente por la obtención de núcleos aislados con un alto rendimiento, que permitan obtener una muestra final de matrices adecuada. Como principales inconvenientes para el fraccionamiento nuclear estos organismos presentan una pared celular rígida (Taylor, 1987a) y un contenido en DNA muy elevado (Spector, 1984, Rizzo, 1987).

Para solventar estos problemas hemos elegido un dinoflagelado de vida libre, sin teca, *A. carterae* (Taylor, 1987b), con un bajo contenido en DNA (Galleron y Durrand, 1978 y 1979), dentro del rango e incluso menor que el de algunas especies de plantas en las que ya se han obtenido matrices nucleares (Marie y Brown, 1993). Además de las características anteriores, su facilidad de cultivo (Oliveira y Huynh, 1989), nos ha permitido partir de un volumen de muestra considerable. Por otra parte se ha evitado el aislamiento de núcleos al utilizar la técnica de microencapsulación

de las células previamente a la extracción, con el fin de poder obtener matrices nucleares "in situ" (Jackson y Cook, 1985, Jackson y col, 1988).

Hemos estandarizado el procedimiento de obtención de matrices de dinoflagelados con resultados muy satisfactorios, semejantes a los obtenidos con células en animales (Jackson y col., 1988) y eucariotas inferiores (Waitz y Loidl, 1988, Lang y col., 1993).

Se eligió dicho procedimiento para evitar en el mayor grado posible la pérdida de muestra que se produciría al intentar aislar núcleos, facilitar su manipulación, así como evitar la producción de artefactos, que podrían originarse como consecuencia del desplazamiento y reorganización de distintos componentes celulares a lo largo de los distintos tratamientos a que se somete a las células.

La comparación al microscópio óptico y electrónico de las células encapsuladas, con otras en estado libre y con las estructuras residuales finales, demuestra que no se producen alteraciones estructurales significativas por efecto de la encapsulación a lo largo del proceso extractivo, excepto la eliminación observable de los componentes solubilizados en cada paso, obteniendo finalmente fracciones de matrices nucleares y citoesqueleto, cuya organización básica es congruente con la del organismo entero.

La puesta a punto del procedimiento de extracción nos ha permitido obtener por primera vez matrices nucleares de dinoflagelados "in situ", y comprobar que su

matriz nuclear es de tipo eucariota, con ciertas características estructurales propias derivadas de sus peculiaridades, pero semejante a la de animales (Berezney, 1984, Verheijen y col., 1988), plantas (Moreno Díaz de la Espina y col., 1991, Krachmarov y col., 1991, Frederick y col., 1992) y eucariotas inferiores (Wunderlich y Herlan, 1977, Mitchelson y col., 1979, Waitz y Loidl, 1988, Lang y col., 1992, Eberharter y col., 1993).

Este dato contribuye por un lado a aclarar algo más la posición evolutiva de dichos organismos, con un claro origen eucariota, y por otro demuestra que la matriz nuclear es realmente una adquisición ancestral del núcleo eucariota que no depende de la presencia de nucleosomas e histonas.

1.1.- ULTRAESTRUCTURA DE LA MATRIZ NUCLEAR

Las observaciones mediante microscopía óptica y electrónica, demuestran que la matriz nuclear de dinoflagelados se organiza de forma semejante al resto de eucariotas, con tres dominios estructurales: la lámina, matriz interna y nucleolo residual, que se corresponden con dominios estructurales y funcionales del núcleo intacto.

La lámina, con una estructura semejante a la de eucariotas superiores, está muy desarrollada, observándose incluso en células sin extraer en algunas especies de los mismos. La presencia de una lámina en otros grupos de eucariotas inferiores (Wunderlich y Herlan, 1977, Georgatos y col., 1989, Lang y Loidl, 1993), relacionados

evolutivamente con los dinoflagelados (Sogin, 1991), confirma que esta estructura es de origen ancestral.

En dinoflagelados la lámina tiene probablemente un significado funcional ligeramente distinto al de eucariotas. Los dinoflagelados presentan una mitosis cerrada, con separación de los cromosomas en el interior del núcleo, sin que se produzca la rotura de la envuelta nuclear, ni los microtúbulos penetren al núcleo (Heath, 1980). En otros eucariotas la lámina es responsable del mantenimiento de la envuelta nuclear en interfase, estando directamente relacionada con su desorganización en mitosis y posterior reformación al final de la misma (Dessev, 1992, Nigg, 1992, Moir y Goldman, 1993). En este caso parece que aparte de ser el soporte estructural de la membrana nuclear interfásica, la lámina podría jugar un papel fundamental facilitando el anclaje de los cromosomas, a través de los kinetocoros, de manera que contacten con los microtúbulos citoplásmicos, los cuales van a facilitar la segregación en mitosis (Oakley y Dodge, 1979, Heath, 1980).

La matriz interna fibrillogranular, es semejante a la descrita en eucariotas superiores (Berezney, 1984, Verheijen, 1988, Moreno Díaz de la Espina y col., 1991, Frederick y col., 1992) e inferiores (Wunderlich y Herlan, 1977, Mitchelson, 1979, Waitz y Loidl, 1988, Cardenas y col., 1990). Se corresponde con el esqueleto residual de la región intercromosómica, distinguiéndose claramente en las matrices los espacios vacíos anteriormente ocupados por los cromosomas. Sus componentes estructurales, análogos a los descritos en otros eucariotas, son fibras de unos 10 nm, y gránulos de 20-25 nm. La característica específica es la presencia en ella de unas

estructuras, que presentan una morfología y organización estructural semejante a la de los "coiled bodies" (Bouiteille y col., 1974, Moreno Díaz de la Espina y col., 1982, Martín y col., 1992b), pero que tienen cierta similitud con los gránulos intercromatínicos, ya que son ricos en proteínas fosforiladas, como demuestra su tinción con bismuto (Wassef, 1979, Puvion-Dutilleul y Laithier, 1987, Medina y col., 1989, Moreno Díaz de la Espina y col., 1993b).

En cuanto al tercer componente estructural de las matrices, la matriz nucleolar, al ser el nucleolo de dinoflagelados muy semejante al del resto de eucariotas, excepto en lo referente a la región del organizador nucleolar, que presenta una estructura análoga a la del resto de cromosomas de dinoflagelados (Salamin Michel, 1990, Soyer-Gobilard y Geraud, 1992), no es de extrañar que el nucleolo residual presente una estructura similar a los que se pueden observar en matrices nucleares de plantas (Moreno Díaz de la Espina y col., 1991, Corben y col., 1989), animales (Berezney, 1984) y eucariotas inferiores (Waitz y Loidl, 1988). Esto indica que las estructuras responsables del soporte físico de los procesos de transcripción y procesamiento del rRNA están altamente conservadas en la evolución de eucariotas.

1.2.- PROTEINAS DE LA MATRIZ NUCLEAR

Los perfiles polipeptídicos de las fracciones residuales que contienen matrices nucleares con citoesqueleto, presentan claras diferencias con los de células enteras. Aunque ambos son de composición compleja, el número de bandas es menor después de la extracción, y los componentes mayoritarios son distintos.

Sin embargo, al tener en la misma fracción las proteínas de la matriz nuclear con las del citoesqueleto, y no poder determinar qué proteínas son componentes de uno u otro dominio celular, la identificación de las proteínas específicas de la matriz nuclear, se ha llevado a cabo con métodos inmunológicos. El hecho de que presenten una lámina bien organizada así como un citoesqueleto conspicuo, nos llevó a investigar en primer lugar las proteínas tipo filamento intermedio que los constituyen. El anticuerpo universal contra filamentos intermedios IFA, que reconoce un epitopo muy conservado de todas las proteínas de esta familia (Pruss y col., 1981), revela que existirían al menos tres componentes tipo filamento intermedio con distintos pesos moleculares en las muestras de matrices nucleares con citoesqueleto de dinoflagelados, aunque probablemente un estudio en geles bidimensionales permitiría concretar a cuantas proteínas diferentes se corresponden. Estos datos confirman la aparición evolutiva temprana de estas proteínas, en contra de lo que se ha podido deducir a veces, debido a la dificultad de su detección en eucariotas inferiores (Riemer y col., 1991). Aunque estas bandas podrían corresponder a laminas, ya que son los miembros mas antiguos de la familia de los filamentos intermedios, no se puede descartar la existencia de filamentos intermedios citoplásmicos debido a la inmunofluorescencia citoplásmica observada con este anticuerpo.

Los anticuerpos contra laminas de vertebrados que reconocen dos de las tres bandas reveladas por el IFA y otra de menor peso molecular, producen una reacción de inmunofluorescencia que las localiza principalmente en la periferia nuclear, que probablemente se corresponde con la lámina. Por tanto corresponderían a laminas que se detectan por primera vez en dinoflagelados (Mínguez y col., 1994);

confirmando la hipótesis de que las laminas son miembros ancestrales de la familia de los filamentos intermedios, muy conservadas a lo largo de la evolución (Weber y col., 1989, Dodemont y col., 1990, Döring y Stick, 1990).

Los resultado con los anticuerpos anti-lamina e IFA, parecen a primera vista paradójicos, pues aparentemente al ser las laminas una clase de filamentos intermedios, el anticuerpo universal contra este grupo de proteínas debería reconocer a todas las laminas, tal como hemos visto en cebolla. Probablemente la banda de menor peso molecular correspondiente a alguna proteína tipo lamina o filamento intermedio, no sea reconocida por el IFA debido a que ha sufrido alguna modificación que conduce a la eliminación de la secuencia de aminoácidos correspondiente a este epitopo. Este fenómeno que no ha sido detectado hasta el presente en eucariotas superiores, en eucariotas inferiores no es infrecuente, y ha podido ser la causa de que se considerase en muchos de ellos la carencia de este tipo de proteínas. De forma que en eucariotas inferiores una reacción positiva con el IFA implica que hay filamentos intermedios, pero la ausencia de reacción con este anticuerpo no puede excluir la presencia de este tipo de proteínas (Riemer y col., 1991 y 1993). De hecho, el que pudiera tratarse de una lamina concuerda con los datos de Lang y col., 1992, que han detectado en la matriz nuclear de *Physarum* una proteína tipo lamina de unos 50 KD.

En general aunque las laminas detectadas en dinoflagelados, presentan pesos moleculares inferiores a los de animales y plantas (Krohne y Benavente, 1986, Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993c), se corresponden aproximadamente con

los de otros eucariotas inferiores (Lang y col., 1992, Lang y Loidl, 1993)).

En lo que se refiere a la banda de 66 KD reconocida por el IFA, pero ausente en todas las reacciones con los anti-laminas, podría corresponder a algún filamento intermedio del citoesqueleto, lo que explicaría la fluorescencia a nivel citoplásmico con este anticuerpo.

La identificación de la topoisomerasa II como componente del núcleo y la matriz nuclear de dinoflagelados (Moreno Díaz de la Espina y col., 1993a, Mínguez y col., 1994) ha sido de mucha importancia, ya que constituye un carácter eucariota más de este Phylum. Hasta ahora no se sabía si el DNA de los dinoflagelados, que no tiene histonas, tenía enzimas del tipo de las topoisomerasas eucariotas. Dado que el anclaje de los "loops" de DNA a la matriz nuclear en eucariotas, se produce mediante la topoisomerasa II (Adachi y col., 1989, Razin y Vassetzky, 1992), su presencia en dinoflagelados indica que su DNA atípico (Dodge, 1985), podría organizarse en "loops" de tipo eucariota. La posible asociación inespecífica de la topoisomerasa II, a los elementos residuales de la matriz nuclear durante el proceso extractivo de los núcleos, queda descartada por la metodología utilizada, que incluye baja temperatura, condiciones reductoras y no utiliza estabilización por calor (Kaufmann y Shaper, 1984 y 1991, Martelli y col., 1991b, 1992 y 1994, Stuurman y col., 1992a).

Aunque, la presencia de las proteínas de anclaje no implica que existan "loops", la capacidad de asociación de secuencias MAR de otros sistemas indica que

los complejos de anclaje son de tipo eucariota. Parece confirmarse por tanto que, la matriz nuclear es una estructura altamente conservada, y que en el caso de dinoflagelados, a pesar de las características peculiares de organización de su DNA, también tiene un papel fundamental en la organización espacial del DNA en "loops", una de las funciones principales de la matriz nuclear en eucariotas (Nelson y col., 1986, Bodnar, 1988). Por otra parte, al carecer de nucleosomas e histonas, el hecho de que presenten una matriz nuclear eucariota demuestra que los mecanismos que controlan los dos niveles fundamentales de organización de la cromatina en eucariotas, nucleosomas y "loops", pueden funcionar de forma independiente, quedando la duda de cual surgió en primer lugar.

Por tanto los dinoflagelados son organismos que frente a un mínimo número de características procariotas, como son la ausencia de nucleosomas e histonas, la estructura de sus cromosomas, así como la asociación de estos a la envuelta nuclear durante su división; pueden considerarse eucariotas, tanto por su organización citoplásmica (Cavalier-Smith , 1981, Dodge y Greuet, 1987), como por el resto de sus características en cuanto a organización nuclear y componentes se refiere. Su DNA presenta una organización secuencial eucariota (Rizzo, 1987 y 1991), además no presentan síntesis continua del mismo, sino que se distingue una fase S perfectamente diferenciada (Galleron y Durrand, 1979). Los rRNAs se organizan en tandem (Herzog y col., 1984). Sus snRNAs presentan características semejantes a los de eucariotas (Reddy y col., 1983 y 1985, Liu y col., 1984), además los estudios secuenciales de rRNAs y 5S RNAs apoyan su pertenencia a eucariotas (Hinnebusch y col., 1981, Lenaers y col., 1991).

Nuestros resultados, contribuyen a su clasificación como eucariotas auténticos, ya que presentan una matriz nuclear con una organización semejante a la de eucariotas superiores, con capacidad de asociar específicamente secuencias MAR heterólogas, y en la que hemos identificado proteínas capaces de ligar secuencias MAR, tanto laminas como topoisomerasa II. Por tanto, se puede sugerir, que a pesar de carecer de nucleosomas e histonas, los dinoflagelados presenten una organización de su DNA en "loops" eucariotas.

Si junto con todo lo anterior, tenemos en cuenta que los dinoflagelados vivientes mas primitivos, que son las especies parásitas y *Oxhyrris marina*, sí tienen nucleosomas e histonas; cada vez cobra mas fuerza la hipótesis de que realmente, la ausencia de éstos en el resto de las especies del Phylum se debería a una pérdida secundaria del conjunto de genes de histonas (Loeblich, 1984), a la que han sobrevivido gracias a su particular mitosis cerrada, que comparten con las especies más primitivas.

CONCLUSIONES

1.- La matriz nuclear de células de *A. cepa* presenta una organización estructural constante, ya se extraiga en condiciones de alta o baja fuerza iónica. Consta de tres dominios estructurales y funcionales: lámina, matriz interna y matriz nucleolar. Destaca la elevada estabilidad de sus componentes internos, frente a agentes desestabilizantes como RNasa, 2 M NaCl, DTT y 3',5'-diiodosalicilato de litio.

2.- Su composición proteica es compleja, con hasta 190 proteínas separables en geles bidimensionales; confirmando que la matriz nuclear de *A. cepa*, no se corresponde con un nucleoesqueleto sencillo formado por un número reducido de proteínas, sino con una estructura compleja, cuya composición proteica varía en función del procedimiento de extracción utilizado.

3.- La presencia de laminas tipo A y tipo B, con valores de peso molecular y punto isoeléctrico muy conservados, y con una distribución no sólo periférica, que se corresponde con una lámina bien organizada, sino también asociada a la matriz interna, confirma que las laminas son miembros antiguos de la familia de los filamentos intermedios, que se han conservado en plantas mejor que los correspondientes filamentos intermedios citoplásmicos, ya que en ellas no está clara la existencia de un citoesqueleto organizado de filamentos intermedios.

4.- La presencia de componentes antigénicos relacionados con los filamentos intermedios en la matriz interna, junto con la estabilidad de este dominio de la matriz frente a la extracción con urea, indica que podría existir un nucleoesqueleto básico formado por proteínas de tipo filamento intermedio.

5.- La topoisomerasa II, con un peso molecular semejante al descrito en otras especies de plantas y antigénicamente relacionada con la topoisomerasa II de células humanas, es un componente de la matriz nuclear de cebolla. Su localización coincidente con la del DNA residual, indica, que la topoisomerasa II residual probablemente participa en el anclaje de los "loops" de DNA a la matriz.

6.- Los gránulos intercromatínicos son componentes estructurales constantes de la matriz interna de *A. cepa*, con una distribución semejante a la que tienen en los núcleos "in situ", como demuestra su afinidad por el bismuto y la localización en ellos de epitopos característicos de los gránulos intercromatínicos. Estos datos relacionan a los gránulos intercromatínicos, con la red ribonucleoproteica de la matriz nuclear interna.

7.- La distribución diferencial de los componentes de la matriz interna demostrada por inmunomarcado sugiere la existencia de al menos dos subdominios estructural y funcionalmente distintos, aunque altamente interrelacionados, en la matriz interna. Uno es fibrilogramular, incluye a los gránulos intercromatínicos, y contendría los complejos multiméricos que intervienen en el "splicing" del hnRNA; proporcionando el soporte físico para los "tracks" de RNA nuclear.

El otro es fibrilar, contiene proteínas estructurales, probablemente de tipo filamento intermedio, pero también topoisomerasa II y DNA residual, y podría corresponder al nucleoesqueleto básico al que se asocian, de forma estable, los "loops" de DNA y los complejos de replicación.

8.- La matriz nucleolar es el único dominio de la matriz nuclear de *A. cepa* fácilmente separable, al poder obtenerse a partir de nucleolos aislados, y quizás por ello el mejor definido. Constituye el soporte físico subyacente del nucleolo, ya que el mantenimiento de la estructura y forma nucleolar depende, al menos parcialmente, de su propio nucleoesqueleto y no de otros componentes de la matriz nuclear.

9.- La composición proteica de la matriz nucleolar es compleja y distinta de la del nucleolo aislado; con mas de 125 proteínas separables en geles bidimensionales y enriquecida en proteínas ácidas; demostrando que corresponde a una estructura compleja.

10.- A nivel ultraestructural la aportación mas significativa de nuestro trabajo, es la demostración de que los centros fibrilares del nucleolo son componentes de la matriz nucleolar.

11.- El uso de técnicas de inmunomarcado, nos ha permitido identificar dos proteínas típicas nucleolares como componentes de la fracción insoluble correspondiente a la matriz nucleolar. Mientras que la fibrilarina es un componente mayoritario de las matrices, la nucleolina es mucho menos abundante.

12.- La presencia de una fracción insoluble de fibrilarina como componente de la matriz nucleolar de *A. cepa*, indica la existencia de complejos multiméricos que intervienen en el procesamiento del rRNA, asociados a la matriz nucleolar. Su utilización como marcador de los mismos, nos ha permitido establecer su distribución

topológica en la matriz nucleolar mediante microscopía confocal.

13.- La presencia de la nucleolina como componente minoritario de la matriz nucleolar, demuestra el papel que juega esta proteína en el anclaje de los "loops" de rDNA a la matriz.

14.- La técnica de encapsulación en microbolas de agarosa ha permitido obtener matrices nucleares de dinoflagelados "in situ", con un elevado rendimiento, sin alteraciones morfológicas, y con un grado de extracción adecuado y homogéneo.

15.- Los dinoflagelados que carecen de nucleosomas e histonas, tienen una matriz nuclear con una organización típicamente eucariota: con lámina, matriz interna y matriz nucleolar. La matriz nuclear es por tanto una adquisición temprana del núcleo eucariota, altamente conservada a lo largo de la evolución.

16.- La existencia de proteínas antigénicamente relacionadas con las laminas de eucariotas, en la lámina de dinoflagelados, con pesos moleculares algo inferiores a las de animales y plantas, pero semejantes a las de eucariotas inferiores, confirma el origen ancestral de estas proteínas, altamente conservadas a lo largo de la evolución en eucariotas.

17.- La identificación en la matriz nuclear de dinoflagelados de proteínas con afinidad por las secuencias MAR, como la topoisomerasa II y las laminas, unida a su capacidad de ligar secuencias MAR de sistemas heterólogos, sugiere que la matriz

nuclear jugaría un papel en la organización de su DNA no nucleosómico en "loops, siendo los complejos de anclaje de tipo eucariota. Por tanto, los mecanismos de interacción DNA-proteínas parecen estar muy conservados en ellos a pesar de no presentar histonas.

18.- La existencia de una matriz nuclear en dinoflagelados, implicada en la organización del DNA en dominios discretos, indica que esta estructura es una adquisición temprana del núcleo eucariota, independiente de la existencia de nucleosomas e histonas, de manera que los mecanismos que controlan los dos niveles de organización de la cromatina eucariota, loops de DNA y nucleosomas, serían molecular y evolutivamente independientes.

19.- La demostración de que los dinoflagelados presentan una matriz nuclear, con una organización y composición semejante a la del resto de eucariotas, confirma su origen eucariota, y constituye una importante contribución a la taxonomía del Phylum.

BIBLIOGRAFIA

- Aaronson, R.P. y Blobel G. (1975). Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72, 1007-1011.
- Adachi, Y., Käs, E. y Laemmli, U.K. (1989). Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J.* 8, 3997-4006.
- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. y Gerace, L. (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 323, 560-564.
- Agutter, P.S. y Richardson, J.C.W. (1980). Nuclear non-chromatin proteinaceous structures: their role in the organization and function of the interphase nucleus. *J. Cell Sci.* 44, 395-435.
- Aligué, R., Bastos, R., Serratos, J., Enrich, C., James, P., Pujades, C. y Bachs, O. (1990). Increase in a 55-kDa keratin-like protein in the nuclear matrix of rat liver cells during proliferative activation. *Exp. Cell Res.* 186, 346-353.
- Allen, G.C., Hall Jr., G.E., Childs, L.C., Weissinger, A.K., Spiker, S. y Thompson, W.F. (1993). Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells. *The Plant Cell* 5, 603-613.
- Allen, J.R., Roberts, T.M., Loeblich, A.R. y Klotz, L.C. (1975). Characterization of the DNA from the Dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* and implications for nuclear organization. *Cell* 6, 161-169.
- Amati, B.B. y Gasser, S.M. (1988). Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear scaffold. *Cell* 54, 967-978.
- Anderson, H.J. y Roberge, M. (1992). DNA topoisomerase II: a review of its involvement in chromosome structure, DNA replication, transcription and mitosis. *Cell Biol. Int. Rep.* 16, 717-724.
- Aris, J.P. y Blobel, G. (1991). cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 931-935.
- Avramova, Z. y Bennetzen, J.L. (1993). Isolation of matrices from maize leaf nuclei: identification of a matrix-binding site adjacent to the *Adh1* gene. *Plant Mol. Biol.* 22, 1135-1143.
- Azum-Gélade, M-C., Noaillac-Depeyre, J., Caizergues-Ferrer, M. and Gas, N. (1994). Cell cycle redistribution of U3 snRNA and fibrillarin. *J. Cell Sci.* 107, 463-475.
- Bailer, S.M., Eppenberger, H.M., Griffiths, G. y Nigg, E.A. (1991). Characterization of a 54-kD protein of the inner nuclear membrane: evidence for cell cycle-dependent interaction with the nuclear lamina. *J. Cell Biol.* 114, 389-400.
- Balech, E. (1985). The genus *Alexandrium* or *Gonyaulax* of the Tamarensis group. En: *Toxic Dinoflagellates*, pp: 33-38. Anderson, White y Baden (Eds). Elsevier Science Publishing Co., Inc.
- Barthelémy, I. y Moreno Díaz de la Espina, S. (1984). Preliminary studies on the plant nuclear matrix ultrastructure. *Cienc. Biol.* 9, 138-139.
- Belgrader, P., Dey, R. y Berezney, R. (1991a). Molecular cloning of matrin 3. A 125 kD protein of the nuclear matrix contains an extensive acidic domain. *J. Biol. Chem.* 266, 9893-9899.
- Belgrader, P., Siegel, A.J. y Berezney, R. (1991b). A comprehensive study on the isolation and characterization of the HeLa S3 nuclear matrix. *J. Cell Sci.* 98, 281-291.
- Belmont, A.S., Zhai, Y. y Thilenius A. (1993). Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography. *J. Cell Biol.* 123, 1671-1685.

- Benavente, R. y Krohne, G. (1986). Involvement of nuclear lamins in postmitotic reorganization of chromatin as demonstrated by microinjection of lamin antibodies. *J. Cell Biol.* 103, 1847-1854.
- Benavente, R., Krohne, G. y Franke, W.W. (1985). Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*. *Cell* 41, 177-190.
- Berezney, R. (1984). Organization and functions of the nuclear matrix. En: Chromosomal nonhistone proteins, vol. IV, pp.120-180. L.S. Hnilica, Ed., CRC Press, Boca Raton.
- Berezney, R. (1991). The nuclear matrix: a heuristic model for investigating genomic organization and function in the cell nucleus. *J. Cell. Biochem.* 47, 1-15.
- Berezney, R. y Coffey, D.S. (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1410-1417.
- Berezney, R. y Coffey, D.S. ((1975). Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA. *Science* 189, 291-293.
- Berezney, R. y Coffey, D.S. (1976). The nuclear protein matrix: isolation, structure, and functions. *Adv. Enz. Reg.* 14, 63-100.
- Berezney, R. y Coffey, D.S. (1977). Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* 73, 616-637.
- Bernhard, W. (1969). A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27, 250-265.
- Berrios, M., Osheroff, N. y Fisher, P.A. (1985). In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4142-4146.
- Beven, A., Guan, Y, Peart, J, Cooper, C. y Shaw P. (1991). Monoclonal antibodies to plant nuclear matrix reveal intermediate filament-related components within the nucleus. *J. Cell Sci.* 98, 293-302.
- Blasquez, V.C., Xu, M., Moses, S.C. y Garrad, W.T. (1989). Immunoglobulin *k* gene expression after stable integration. I. Role of the intronic MAR and enhancer in plasmacytoma cells. *J. Biol. Chem.* 264, 21183-21189.
- Blencowe, B.J., Nickerson, J.A., Issner, R., Penman, S. y Sharp, P.A. (1994). Association of nuclear matrix antigens with exon-containing splicing complexes. *J. Cell Biol.* 127, 593-607.
- Bodnar, J.W. (1988). A domain model for eukaryotic DNA organization: a molecular basis for cell differentiation and chromosome evolution. *J. theor. Biol.* 132, 479-507.
- Bolla, R.I., Braaten, D.C., Shiomi, Y, Hebert, M.B. y Schlessinger, D. (1985). Localization of specific rDNA spacer sequences to the mouse L-cell nucleolar matrix. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1287-1294.
- Boulikas, T. (1992). Homeotic protein binding sites, origins of replication, and nuclear matrix anchorage sites share the ATTA and ATTTA motifs. *J. Cell. Biochem.* 50, 111-123.
- Boulikas, T. (1993). Nature of DNA sequences at the attachment regions of genes to the nuclear matrix. *J. Cell Biochem.* 52, 14-22.
- Bourgeois, C.A, Bouvier, D., Seve, A.P. y Hubert, J. (1987). Evidence for the existence of a nucleolar skeleton attached to the pore complex-lamina in human fibroblasts. *Chromosoma* 95, 315-323.52, 14-22.
- Bouteille, M., Laval, M. y Dupuy-Coin, A.M. (1974). Localization of nuclear functions

- as revealed by ultrastructural autoradiography and cytochemistry. En: *The Cell Nucleus*, vol. 1, pp: 3-71. Busch, H. (ed). Academic Press. N.Y. .
- Bouteille, M., Bouvier, D. y Seve, A.P. (1983). Heterogeneity and territorial organization of the nuclear matrix and related structures. *Int. Rev. Cytol.* 83, 135-182.
- Bouvier, D., Hubert, J., Sève, A-P., Bouteille, M. (1985). Structural aspects of intranuclear matrix desintegration upon RNase digestion of HeLa cell nuclei. *Eur. J. Cell Biol.* 36, 323-333.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- Breyne, P., Van Montagu, M. y Gheysen, G. (1994). The role of scaffold attachment regions in the structural and functional organization of plant chromatin. *Transgenic Res.* 3, 195-202.
- Breyne P, Van Montagu, M., Depicker, A. y Gheysen, G. (1992). Characterization of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco. *Plant Cell* 4, 463-471.
- Bridger, J.M., Kill, I.R., O'Farrell, M. y Hutchison, C.J. (1993). Internal lamin structures within G₁ nuclei of human dermal fibroblasts. *J. Cell. Sci.* 104, 297-306.
- Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M., Bouche, G., Bourbon, H. y Amalric, F. (1982). Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *Eur. J. Biochem.* 128, 475-480.
- Caizergues-Ferrer, M., Dousseau, F., Gas, N., Bouche, G., Stevens B. y Amalric, F. (1984). Induction of new proteins in the nuclear matrix of CHO cells by a heat shock: detection of a specific set in the nucleolar matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 444-450.
- Caizergues-Ferrer, M., Mariottini, P, Curie, C., Lapeyre, B., Gas, N., Amalric, F. y Amaldi, F. (1989). Nucleolin from *Xenopus laevis*: cDNA cloning and expression during development. *Genes & Develop.* 3, 324-333.
- Cardenas, M.E., Laroche, T. y Gasser, S.M. (1990). The composition and morphology of yeast nuclear scaffolds. *J. Cell Sci.* 96, 439-450.
- Carmo-Fonseca, M. (1988). Androgen-dependent nuclear proteins in rat ventral prostate are glycoproteins associated with the nuclear matrix.. *Cell Biol. Int. Rep.* 12, 607-620.
- Carter, K.C., Taneja, K.L. y Lawrence, J.B. (1991). Discrete nuclear domains of poly (A) RNA and their relationship to the functional organization of the nucleus. *J. Cell Biol.* 115, 1191-1202.
- Carter, K.C., Bowman, D., Carrington, W., Fogarty, K., McNeil, J.A., Fay, F.S. y Lawrence, J.B. (1993). A three-dimensional view of precursor messenger RNA metabolism within the mammalian nucleus. *Science* 259, 1330-1335.
- Cavalier-Smith, T. (1981). The origin and early evolution of the eukaryotic cell. *Soc. Gen. Microbiol. Symp.* 32, 33-84.
- Cerdido, A., y Medina, F.J. (1995). Subnuclear localization of fibrillarin and variations in its level during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma* (en prensa).
- Cerdido, A., Caizergues-Ferrer, M. y Medina, F.J. (1993). Characterization of a set of major proteins extracted from plant cell nuclei in low ionic strength conditions. *Proceedings of the 13th European Workshop on the cell nucleus*. Budapest, pp.

15.

- Cerezuela, M.A. (1991). Efectos del procedimiento de extracción en la organización estructural y composición química de la matriz nuclear en plantas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Cerezuela, M.A. y Moreno Díaz de la Espina, S. (1990). Plant nuclear matrix effects of different extraction procedures on its structural organization and chemical composition. En: *Nuclear Structure and Function*, J.R. Harris and I.B. Zbarsky (eds.), Plenum Press, New York, pp: 317-322.
- Chaly, N., Sabour, M.P., Silver, J.C., Aitchison, W.A., Little, J.E. y Brown, D.L. (1986). Monoclonal antibodies against nuclear matrix detect nuclear antigens in mammalian, insect and plant cells: an immunofluorescence study. *Cell Biol. Int. Rep.* 10, 421-428.
- Christensen, M.E., Moloo, J., Swischuk, J.L. y Schelling, M.E. (1986). Characterization of the nucleolar protein, B-36, using monoclonal antibodies. *Exp. Cell Res.* 166, 77-93.
- Chung, T.D.Y., Drake, F.H., Tan, K.B., Per, S.R., Crooke, S.T. y Mirabelli, C.K. (1989). Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9431-9435.
- Ciejek, E.M., Tsai, M-J. y O'Malley, B.W. (1983). Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix. *Nature* 306, 607-609.
- Ciejek, E.M., Nordstrom, J.L., Tsai, M-J. y O'Malley, W.O. (1982). Ribonucleic acid precursors are associated with the chick oviduct nuclear matrix. *Biochemistry* 21, 4945-4953.
- Clevenger, C.V. y Epstein, A.L. (1984a). Identification of a nuclear protein component of interchromatin granules using a monoclonal antibody and immunogold electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 151, 194-207.
- Clevenger, C.V. and Epstein, A.L. (1984b). Use of immunogold electron microscopy and monoclonal antibodies in the identification of nuclear substructures. *J. Histochem. Cytochem.* 32, 757-765.
- Cockerill, P.N. y Garrard W.T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 44, 273-282.
- Comings, D.E. y Okada, T.A. (1976). Nuclear proteins. III. The fibrillar nature of the nuclear matrix. *Exp. Cell Res.* 103, 341-360.
- Comings, D.E. y Peters, K.E. (1981). Two-dimensional gel electrophoresis of nuclear particles. En: *The cell nucleus*, vol. IX, 89-118. Academic Press Inc.
- Cook, P.R. (1988). The nucleoskeleton: artefact, passive framework or active site?. *J. Cell Sci.* 90, 1-6.
- Cook, P.R. (1991). The nucleoskeleton and the topology of replication. *Cell* 66, 627-635.
- Corben, E., Butcher, G., Hutchings, A., Wells, B. y Roberts, K. (1989). A nucleolar matrix protein from carrot cells identified by a monoclonal antibody. *Eur. J. Cell Biol.* 50, 353-359.
- Dawson, P.J., Hulme, J.S. y Lloyd, C.W. (1985). Monoclonal antibody to intermediate filament antigen cross-reacts with higher plant cells. *J. Cell Biol.* 100, 1793-1798.
- De Jong, L., van Driel, R., Stuurman, N., Meijne, A.M.L. y van Renswoude, J. (1990).

- Principles of nuclear organization. *Cell Biol. Int. Rep.* 14, 1051-1074.
- Deltour, R. y Mosen, H. (1987). Proposals for the macromolecular organization of the higher plant nucleolonema. *Biol. Cell* 60, 75-86.
- Dessev, G.N. (1992). Nuclear envelope structure. *Curr. Op. Cell Biol.* 4, 430-435.
- Dessev, G.N., Iovcheva-Dessev, C. y Goldman, R.D. (1990). Lamin dimers. Presence in the nuclear lamina of surf clam oocytes and release during nuclear envelope breakdown. *J. Biol. Chem.* 265, 12636-12641.
- Dickinson, P., Cook, P.R. y Jackson, D.A. (1990). Active RNA polymerase I is fixed within the nucleus of HeLa cells. *EMBO J.* 9, 2207-2214.
- Dickinson, L.A. y Kohwi-Shigematsu, T. (1995). Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base-unpairing potential. *Mol. Cell. Biol.* 15, 456-465.
- Dietz, A., Kay, V., Schlake, T., Landsmann, J. y Bode, J. (1994). A plant scaffold attached region detected close to a T-DNA integration site is active in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 22, 2744-2751.
- Dijkwel, P.A. y Wenink, P.W. (1986). Structural integrity of the nuclear matrix: differential effects of thiol agents and metal chelators. *J. Cell Sci.* 84, 53-67.
- Dijkwel, P.A., Vaughn, J.P. y Hamlin, J.L. (1991). Mapping of replication initiation sites in mammalian genomes by two-dimensional gel analysis: stabilization and enrichment of replication intermediates by isolation of the nuclear matrix. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3850-3859.
- Dijkwel, P.A., Wenink, P.W. y Poddighe, J. (1986). Permanent attachment of replication origins to the nuclear matrix in BHK-cells. *Nucl. Acids Res.* 14, 3241-3249.
- Dodemont, H., Riemer, D. y Weber, K. (1990). Structure of an invertebrate gene encoding cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins: implications for the origin and the diversification of IF proteins. *EMBO J.* 9, 4083-4094.
- Dodge, J.D. (1985). The chromosomes of Dinoflagellates. *Int. Rev. Cytol.* 94, 5-20.
- Dodge, J.D. y Greuet, C. (1987). Dinoflagellate ultrastructure and complex organelles, a general ultrastructure. En: *The biology of Dinoflagellates*. Botanical Monographs, vol 21, pp: 93-118. F.J.R. Taylor (ed). Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Döring, V. y Stick, R. (1990). Gene structure of nuclear lamin LIII of *Xenopus laevis*; a model for the evolution of IF proteins from a lamin-like ancestor. *EMBO J.* 9, 4073-4081.
- Dworetzky, S.I., Wright, K.L., Fey, E.G., Penman, S., Lian, J.B., Stein, J.L. y Stein, G.S. (1992). Sequence-specific DNA-binding proteins are components of a nuclear matrix-attachment site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4178-4182.
- Dwyer, N. y Blobel, G. (1976). A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* 70, 581-591.
- Earnshaw, W.C., Halligan, B., Cooke, C.A., Heck, M.M.S. y Liu, L.F. (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.* 100, 1706-1715.
- Eberharter, A., Grabher, A., Gstraunthaler, G. y Loidl, (1993). Nuclear matrix of the lower eukaryote *Physarum polycephalum* and the mammalian epithelial LLC-PK₁ cell line. A comprehensive investigation of different preparation procedures. *Eur. J. Biochem.* 212, 573-580.
- Evan, G.I. y Hancock, D.C. (1985). Studies on the interaction of the human c-myc

- protein with cell nuclei: p62^{c-myc} as a member of a discrete subset of nuclear proteins. *Cell* 43, 253-261.
- Faiferman I. y Pogo, A.O. (1975). Isolation of a nuclear ribonucleoprotein network that contains heterogeneous RNA and is bound to the nuclear envelope. *Biochemistry* 14, 3808-3816.
- Fang, S-H. y Yeh, N-H. (1993). The self-cleaving activity of nucleolin determines its molecular dynamics in relation to cell proliferation. *Exp. Cell Res.* 208, 48-53.
- Fey, E.G. y Penman, S. (1988). Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 121-125.
- Fey, E.G., Krochmalnic, G. y Penman, S. (1986a). The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J. Cell Biol.* 102, 1654-1665.
- Fey, E.G., Ornelles, D.A. y Penman, S. (1986b). Association of RNA with the cytoskeleton and the nuclear matrix. *J. Cell Sci. Suppl.* 5, 99-119.
- Firnbach-Kraft, I. y Stick, R. (1993). The role of CaaX-dependent modifications in membrane association of *Xenopus* nuclear lamin B3 during meiosis and the fate of B3 in transfected mitotic cells. *J. Cell Biol.* 123, 1661-1670.
- Fisher, P.A., Berrios, M. y Blobel, G. (1982). Isolation and characterization of a proteinaceous subnuclear fraction composed of nuclear matrix, peripheral lamina and nuclear pore complexes from embryos of *D. melanogaster*. *J. Cell Biol.* 92, 674-686.
- Fisher, D.Z., Chaudhary, N. y Blobel, G. (1986). cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6450-6454.
- Fisher, P.A., Lin, L., McConnell, M., Greenleaf, A., Lee, J.M. y Smith, D.E. (1989). Heat shock-induced appearance of RNA polymerase II in karyoskeletal protein-enriched (nuclear "matrix") fractions correlates with transcriptional shutdown in *D. melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 264, 3464-3469.
- Fournier, M.J. y Maxwell, E.S. (1993). The nucleolar snRNAs: catching up with the spliceosomal snRNAs. *TIBS* 18, 131-135.
- Franke, W.W. (1987). Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: a growing multigene family. *Cell* 48, 3-4.
- Franke, W.W., Kleinschmidt, J.A., Spring, H., Krohne, G., Grund, C., Trendelenburg, M.F., Stoehr, M. y Scheer, U. (1981). A nucleolar skeleton of protein filaments demonstrated in amplified nucleoli of *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* 90, 289-299.
- Frederick, S.E., Mangan, M.E., Carey, J.B. y Gruber, P.J. (1992). Intermediate filament antigens of 60 and 65 kDa in the nuclear matrix of plants: their detection and localization. *Exp. Cell Res.* 199, 213-222.
- Fukata, H., Ohgami, K. y Fukasawa, H. (1986). Isolation and characterization of DNA topoisomerase II from cauliflower inflorescences. *Plant Mol. Biol.* 6, 137-144.
- Galcheva-Gargova, Z.I., Marinova, E.I. y Koleva, S.T. (1988). Isolation of nuclear shells from plant cells. *Plant, Cell Envir.* 11, 819-825.
- Galleron, C. y Durrand, A.M. (1978). Characterization of a dinoflagellate (*Amphidinium carterae*) DNA. *Biochimie* 60, 1235-1242.
- Galleron, C. y Durrand, A.M. (1979). Cell cycle and DNA synthesis in a marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Protoplanma* 100, 155-165.
- Gas, N., Inchauspé, G., Azum, M.C. y Stevens, B. (1984). Bismuth staining of a

- nucleolar protein. *Exp. Cell Res.* 151, 447-457.
- Gasser, S.M. (1991). Replication origins, factors and attachment sites. *Current Op. Cell Biol.* 3, 407-413.
- Gasser, S.M. y Laemmli, U.K. (1986). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* 46, 521-530.
- Gasser, S.M. y Laemmli, U.K. (1987). The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J.* 5, 511-518.
- Gasser, S.M., Amati, B.B., Cardenas, M.E. y Hofmann, J.F.-X. (1989). Studies on scaffold attachment sites and their relation to genome function. *Int. Rev. Cytol.* 119, 57-96.
- Georgatos, S.D., Maroulakou, I. y Blobel, G. (1989). Lamin A, lamin B, and lamin B receptor analogues in yeast. *J. Cell Biol.* 108, 2069-2082.
- Georgatos, S.D., Meier, J. y Simos, G. (1994). Lamins and lamin-associated proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* 6, 347-353.
- Gerace, L. (1986). Nuclear lamina and organization of nuclear architecture. *TIBS* 11, 443-446.
- Gerace, L. y Blobel, G. (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19, 277-287.
- Gerace, L. y Burke, B. (1988). Functional organization of the nuclear envelope. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4, 335-374.
- Géraud, M-L., Sala-Rovira, M., Herzog, M. y Soyer-Gobillard, M-O. (1991). Immunocytochemical localization of the DNA-binding protein HCC during the cell cycle of the histone-less dinoflagellate protist *Cryptothecodinium cohnii* B. *Biol. Cell* 71, 123-134.
- Getzenberg, R.H., Pienta, K.J., Ward, W.S. y Coffey, D.S. (1991). Nuclear structure and the three-dimensional organization of DNA. *J. Cell. Biochem.* 47, 289-299.
- Ghosh, S. y Dey, R. (1986). Nuclear matrix network in *Allium cepa*. *Chromosoma* 93, 429-434.
- Glass, J.R. y Gerace, L. (1990). Lamins A and C bind and assemble at the surface of mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.* 111, 1047-1057.
- Glass, C.A., Glass, J.R., Taniura, H., Hasel, K.W., Blevitt, J.M. y Gerace, L. (1993). The α -helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *EMBO* 12, 4413-4424.
- Goldman, A.E., Moir, R.D., Montag-Lowy, M., Stewart, M. y Goldman, R.D. (1992). Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 119, 725-735.
- Goodbody, K.C., Hargreaves, A.J. y Lloyd, C.W. (1989). On the distribution of microtubule-associated intermediate filament antigens in plant suspension cells. *J. Cell Sci.* 93, 427-438.
- Grebanier, A.E. y Pogo, A.O. (1979). Cross-linking of proteins in nuclei and DNA depleted nuclei from friend erytroleukemia cells. *Cell* 18, 1091-1099.
- Greimers, R. y Deltour, R. (1981). Organization of transcribed and nontranscribed chromatin in isolated nuclei of *Zea mays* root cells. *Eur. J. Cell Biol.* 23, 303-311.
- Guiltinan, M.J., Schelling, M.E., Ehtesham, N.Z., Thomas, J.C. y Christensen, M.E. (1988). The nucleolar RNA-binding protein B-36 is highly conserved among plants. *Eur. J. Cell Biol.* 46, 547-553.

- Haas, M. y Jost, E. (1993). Functional analysis of phosphorylation sites in human lamin A controlling lamin disassembly, nuclear transport and assembly. *Eur. J. Cell Biol.* 62, 237-247.
- Hakes, D.J. y Berezney, R. (1991a). Molecular cloning of matrin F/G: a DNA binding protein of the nuclear matrix that contains putative zinc finger motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6186-6190.
- Hakes, D.J. y Berezney, R. (1991b). DNA binding properties of the nuclear matrix and individual nuclear matrix proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 11131-11140.
- Hall, G.Jr., Allen, G.C., Loer, D.S., Thompson, W.F. y Spiker, S. (1991). Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9320-9324.
- Hargreaves, A.J., Dawson, P.J., Butcher, G.W., Larkins, A., Goodbody, K.C. y Lloyd, C.W. (1989a). A monoclonal antibody raised against cytoplasmic fibrillar bundles from carrot cells, and its cross-reaction with animal intermediate filaments. *J. Cell Sci.* 92, 371-378.
- Hargreaves, A.J., Goodbody, K.C. y Lloyd, C.W. (1989b). Reconstitution of intermediate filaments from a higher plant. *Biochem. J.* 261, 679-682.
- Hassan, A.B. y Cook, P.R. (1993). Visualization of replication sites in unfixed human cells. *J. Cell Sci.* 105, 541-550.
- Hay, E.D. y Gurdon, J.B. (1967). Fine structure of the nucleolus in normal and mutant *Xenopus* embryos. *J. Cell Sci.* 2, 151-162.
- He, D., Nickerson, J.A. y Penman, S. (1990). Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* 110, 569-580.
- Heath, I.B. (1980). Variant mitosis in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis?. *Int. Rev. Cytol.* 64, 1-80.
- Heine, M.A., Rankin, M.L. y DiMario, P.J. (1993). The Gly/Arg-rich (GAR) domain of *Xenopus* nucleolin facilitates in vitro nucleic acid binding and in vivo nucleolar localization. *Mol. Biol. Cell* 4, 1189-1204.
- Heitlinger, E., Peter, M., Lustig, A., Villiger, W., Nigg, E.A. y Aebi, U. (1992). The role of the head and tail domain in lamin structure and assembly: analysis of bacterially expressed chicken lamin A and truncated B₂ lamins. *J. Struct. Biol.* 108, 74-91.
- Hennekes, H. y Nigg, E.A. (1994). The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. A single point mutation prevents proteolytic cleavage of the lamin A precursor and confers membrane binding properties. *J. Cell Sci.* 107, 1019-1029.
- Hennekes, H., Peter, M., Weber, K. y Nigg, E.A. (1993). Phosphorylation on protein kinase C sites inhibits nuclear import of lamin B₂. *J. Cell Biol.* 120, 1293-1304.
- Herlan, G., Eckert, W.A., Kaffenberger, W. y Wunderlich, F. (1979). Isolation and characterization of an RNA-containing nuclear matrix from *Tetrahymena* macronuclei. *Biochemistry* 18, 1782-1788.
- Herzog, M. y Soyer, M-O. (1981). Distinctive features of dinoflagellate chromatin. Absence of nucleosomes in a primitive species *Prorocentrum micans* E. *Europ. J. Cell Biol.* 23, 295-302.
- Herzog, M. y Soyer, M-O. (1983). The native structure of dinoflagellate chromosomes and their stabilization by Ca²⁺ and Mg²⁺ cations, *Europ. J. Cell Biol.* 30, 33-41.
- Herzog, M., Von Boletzky, S. y Soyer, M-O. (1984). Ultrastructural and biochemical nuclear aspects of eukaryote classification: independent evolution of the

- dinoflagellates as a sister group of the actual eukaryotes?. *Orig. Life* 13, 205-215.
- Himes, M. y Beam, C.A. (1975). Genetic analysis in the dinoflagellate *Cryptothecodinium (Gyrodinium) cohnii*: evidence for unusual meiosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4546-4549.
- Hinnebusch, A.G., Klotz, L.C., Blanken, R.L. y Loeblich III, A.R. (1981). An evaluation of the phylogenetic position of the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* based on 5S rRNA characterization. *J. Mol. Evol.* 17, 334-347.
- Hoffman, M. (1993). The cell's nucleus shapes up. *Science* 259, 1257-1259.
- Höger, T.H., Krohne, G. y Kleinschmidt, J.A. (1991). Interaction of *Xenopus* lamins A and L_{II} with chromatin in vitro mediated by a sequence element in the carboxyterminal domain. *Exp. Cell Res.* 197, 280-289.
- Honda, S.I., Hongladarom, T. y Catles, G.G. (1966). A new isolation medium for plant organelles. *J. Exptl. Botany* 52, 460-472.
- Hozák, P., Géraud, G. y Hernandez-Verdun, D. (1992). Revealing nucleolar architecture by low ionic strength treatment. *Exp. Cell Res.* 203, 128-133.
- Hozák, P., Cook, P.R., Schöfer, C., Mosgöller, W. y Wachtler, F. (1994a). Site of transcription of ribosomal RNA and internucleolar structure in HeLa cells. *J. Cell Sci.* 107, 639-648.
- Hozák, P., Hassan, A.B., Jackson, D.A. y Cook, P.R. (1993a). Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton. *Cell* 73, 361-373.
- Hozák, P., Jackson, D.A. y Cook, P.R. (1994b). Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J. Cell Sci.* 107, 2191-2202.
- Hozák, P., Schöfer, C., Sylvester, J. y Wachtler, F. (1993b). A study on nucleolar DNA: isolation of DNA from fibrillar components and ultrastructural localization of different DNA probes. *J. Cell Sci.* 104, 1199-1205.
- Ivanchenko, M., Tasheva, B., Stoilov, L., Christova, R. y Zlatanova, J. (1993). Characterization of some nuclear matrix proteins in maize. *Plant Sci.* 91, 35-43.
- Izaurrealde, E., Mirkovitch, J. y Laemmli, U.K. (1988). Interaction of DNA with nuclear scaffolds in vitro. *J. Mol. Biol.* 200, 111-125.
- Jack, R.S. y Eggert, H. (1992). The elusive nuclear matrix. *Eur. J. Biochem.* 209, 503-509.
- Jackson, D.A. (1991). Structure-function relationships in eukaryotic nuclei. *BioEssays* 13, 1-10.
- Jackson, D.A. y Cook, P.R. (1985). A general method for preparing chromatin containing intact DNA. *EMBO J.* 4, 913-918.
- Jackson, D.A. y Cook, P.R. (1988). Visualization of a filamentous nucleoskeleton with a 23 nm axial repeat. *EMBO J.* 7, 3667-3677.
- Jackson, D.A., Yuan, J. y Cook, P.R. (1988). A gentle method for preparing cyto- and nucleo-skeletons and associated chromatin. *J. Cell Sci.* 90, 365-378.
- Jackson, D.A., Dolle, A., Robertson, G. y Cook, P.R. (1992). The attachments of chromatin loops to the nucleoskeleton. *Cell Biol. Int. Rep.* 16, 687-696.
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J. y Cook, P.R. (1993). Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J.* 12, 1059-1065.
- Jiménez-García, L.F. y Spector, D.L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59.
- Jiménez-García, L.F., Elizundia, J.M., Lopez Zamorano, B., Maciel, A., Zavala, G.,

- Echeverría, O.M. y Vazquez-Nin, G.H. (1989). Implications for evolution of nuclear structures of animal, plants, fungi and protoctists. *BioSystems* 22, 103-116.
- Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M.L., Ochs, R.J., Rothblum, L.I., Hannan, R. y Spector, D.L. (1994). Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol. Biol. Cell* 5, 955-966.
- Jordan, G. (1987). At the heart of the nucleolus. *Nature* 329, 489-490.
- Jordan, E.G., Timmis, J.N. y Trewevas, A.J. (1980). The plant nucleus. En: *The Biochemistry of Plants. The plant cell*, vol 1, pp: 489-588. Tolbert, N.E. (Ed.). Acad. Press N.Y.
- Kass, S., Tyc, K., Steitz, J.A. y Sollner-Webb, B. (1990). The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* 60, 897-908.
- Kaufmann, S.H. y Shaper, J.H. (1984). A subset of non-histone nuclear proteins reversibly stabilized by the sulfhydryl cross-linking reagent tetrathionate. *Exp. Cell Res.* 155, 477-495.
- Kaufmann, S.H. y Shaper, J.H. (1991). Association of topoisomerase II with the hepatoma cell nuclear matrix: the role of intermolecular disulfide bond formation. *Exp. Cell Res.* 192, 511-523.
- Kaufmann, S.H., Coffey, D.S. y Shaper, J.H. (1981). Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope, and pore complex lamina. *Exp. Cell Res.* 132, 105-123.
- Kearns, L.P. y Sigee, D.C. (1980). The occurrence of period IV elements in dinoflagellate chromatin: an X-ray microanalytical study. *J. Cell Sci.* 46, 113-127.
- Kitten, G.T. y Nigg, E.A. (1991). The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B₂. *J. Cell Biol.* 113, 13-23.
- Kornberg, R.D. (1977). Structure of chromatin. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 931-954.
- Krachmarov, C., Stoilov, L. y Zlatanova, J. (1991). Nuclear matrices from transcriptionally active and inactive plant cells. *Plant Sci.* 76, 35-41.
- Krohne, G. y Benavente, R. (1986). The nuclear lamins. A multigene family of proteins in evolution and differentiation. *Exp. Cell Res.* 162, 1-10.
- Krohne, G., Stick, R., Kleinschmidt, J.A., Moll, R., Franke, W.W. y Hausen, P. (1982). Immunological localization of a major karyoskeletal protein in nucleoli of oocytes and somatic cells of *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* 94, 749-754.
- Kryzowska-Gruca, S., Zborek, A. y Gruca, S. (1983). Distribution of interchromatin granules in nuclear matrices obtained from nuclei exhibiting different degree of chromatin condensation. *Cell Tissue Res.* 231, 427-437.
- Kuehl, L. (1964). Isolation of plant nuclei. *Zeitschrift für Naturforschung* 19b, 525-532.
- Labhart, P., Banz, E., Nes, P.J., Parish, R.W. y Koller, Th. (1984). A structural concept for nucleoli of *Dictyostelium discoideum* deduced from dissociation studies. *Chromosoma* 89, 111-120.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laemmli, U.K., Kas, E., Poljak, L. y Adachi, V. (1992). Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains.

- Curr. Op. Genet. Dev. 2, 275-285.
- Lang, S. y Loidl, P. (1993). Identification of proteins immunologically related to vertebrate lamins in the nuclear matrix of the myxomycete *Physarum polycephalum*. Eur. J. Cell Biol. 61, 177-183.
- Lang, S., Decristoforo, T. y Loidl, P. (1992). Synthesis and characterization of nuclear matrix proteins during the cell cycle of *Physarum polycephalum*. Cell Biol. Int. Rep. 16, 1169-1175.
- Lang, S., Decristoforo, T., Waitz, W. y Loidl, P. (1993). Biochemical and morphological characterization of the nuclear matrix during the synchronous cell cycle of *Physarum polycephalum*. J. Cell Sci. 105, 1121-1130.
- Lapeyre, B., Bourbon, H. y Amalric, F. (1987). Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1472-1476.
- Lapeyre, B., Mariottini, P., Mathieu, C., Ferrer, P., Amaldi, F., Amalric, F. y Caizergues-Ferrer, M. (1990). Molecular cloning of *Xenopus* fibrillarin, a conserved U₃ small nuclear ribonucleoprotein recognized by antisera from humans with autoimmune disease. Mol. Cell. Biol. 10, 430-434.
- Lawrence, J.B., Singer, R.H. y Marselle, L.M. (1989). Highly localized tracks of specific transcripts within interphase nuclei visualized by in situ hybridization. Cell 57, 493-502.
- Lebel, S. y Raymond, Y. (1987). Lamins A, B and C share an epitope with the common domain of intermediate filament proteins. Exp. Cell Res. 169, 560-565.
- Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., Fakan, S. y Nigg, E.A. (1986). Nuclear substructure antigens. Monoclonal antibodies against components of nuclear matrix preparations. Exp. Cell Res. 162, 205-219.
- Lehner, C.F., Stick, R., Eppenberger, H.M. y Nigg, E.A. (1987). Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development. J. Cell Biol. 105, 577-587.
- Lenaers, G., Scholin, C., Bhaud, Y., Saint-Hilaire, D. y Herzog, M. (1991). A molecular phylogeny of dinoflagellate protists (Pyrrhophyta) inferred from the sequence of 24S rRNA divergent domains D1 and D8. J. Mol. Evol. 32, 53-63.
- Lewis, C.D. y Laemmli, U.K. (1982). Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. Cell 29, 171-181.
- Li, H. y Roux, S.J. (1992). Casein kinase II protein kinase is bound to lamina-matrix and phosphorylates lamin-like protein in isolated pea nuclei. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8434-8438.
- Lischwe, M.A., Ochs, R.L., Reddy, R., Cook, R.G., Yeoman, L.C., Tan, E.M., Reichlin, M. y Busch, H. (1985). Purification and partial characterization of a nucleolar scleroderma antigen (M_r=34,000; pI, 8.5) rich in N^G, N^G-dimethylarginine. J. Biol. Chem. 260, 14304-14310.
- Liu, M-H., Reddy, R., Henning, D., Spector, D. y Busch, H. (1984). Primary and secondary structure of dinoflagellate U5 small nuclear RNA. Nucl. Acids Res. 12, 1529-1542.
- Loeblich, A.R. (1984). Dinoflagellate evolution. En: Dinoflagellates. Acad. Press Inc. pp: 482-521.
- Loewinger, L. y Mckeeon, F. (1988). Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. EMBO J. 7, 2301-2309.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein

- measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Biochem.* 193, 265-275.
- Luck, B.T. y Lafontaine, J.G. (1982). An ultracytochemical study of nuclear bodies in meristematic plant cells (*Cicer arietinum*). *Can. J. Bot.* 60, 611-619.
- Luck, B.T. y Lafontaine, J.G. (1983). An ultracytochemical study of the nucleoplasm in meristematic plant cell (*Allium porrum*) interphase nuclei. *Can. J. Bot.* 61,, 2554-2565.
- Ludérus, M.E.E., den Blaauwen, J.L., de Smit, O.J.B., Compton, D.A. y van Driel, R. (1994). Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6297-6305.
- Ludérus, M.E.E., de Graaf, R., Mattia, E., den Blaauwen, J.L., Grande, M.A., de Jong, L. y van Driel, R. (1992). Binding of matrix attachment regions to lamin B₁. *Cell* 70, 949-959.
- Lutz, R.J., Trujillo, M.A., Denham, K.S., Wenger, L. y Sinensky, M. (1992). Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3000-3004.
- Lydersen, B. y Pettijohn, D. (1980). Human-specific nuclear protein that associates with the polar region of the mitotic apparatus distribution in human/hamster hybrid cell. *Cell* 22, 489-499.
- Maniatis, T., Frisch, E.F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: laboratory manual.* (Cold Spring Harbor. N.Y.: Cold Spring Harbor laboratory).
- Marie, D. y Brown, S.C. (1993). A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol. Cell* 78, 41-51.
- Martelli, A.M., Cocco, L. y Monzoli, F.A. (1991a). On the association of DNA polymerase activity with the nuclear matrix in HeLa cells. *Cell Biol. Int. Rep.* 15, 131-140.
- Martelli, A.M., Bareggi, R., Riederer, B.M., Marugg, R.A. y Narducci, P. (1994). The effect of in vitro heating on the distribution of nuclear matrix polypeptides in HeLa cells. *Cell Biol. Int.* 18, 151-158.
- Martelli, A.M., Falcieri, E., Gobbi, P., Manzoli, L., Gilmour, R.S. y Cocco, L. (1991b). Heat-induced stabilization of the nuclear matrix: a morphological and biochemical analysis in murine erythroleukemia cells. *Exp. Cell Res.* 196, 216-225.
- Martelli, A.M., Falcieri, E., Gobbi, P., Manzoli, L., Cataldi, A., Rana, R.A. y Cocco, L. (1992). Further considerations on the thermal stabilization of the nuclear matrix in mouse erythroleukemia cells. *Cell Biol. Int. Rep.* 16, 307-317.
- Martin, M. y Medina, F.J. (1991). A Drosophila anti-RNA polymerase II antibody recognizes a plant nucleolar antigen, RNA polymerase I, which is mostly localized in fibrillar centres. *J. Cell Sci.* 100, 99-107.
- Martin, M., Moreno Díaz de la Espina, S. y Medina, F.J. (1989). Immunolocalization of DNA at nucleolar structural components in onion cells. *Chromosoma* 98, 368-377.
- Martin, M., Garcia-Fernández, L.F., Moreno Díaz de la Espina, S., Noailac-Depeyre, J., Gas, N. y Medina, F.J. (1992a). Identification and localization of a nucleolin homologue in onion nucleoli. *Exp. Cell Res.* 199, 74-84.
- Martín, M., Moreno Díaz de la Espina, S., Jimenez-García, L.F., Fernandez Gomez, M.E. y Medina, F.J. (1992b). Further investigations on the functional role of two nuclear bodies in onion cells. *Protoplasma* 167, 175-182.

- Masuda, K., Takahashi, S., Nomura, K., Arimoto, M. y Inoue, M. (1993). Residual structure and constituent proteins of the peripheral framework of the cell nucleus in somatic embryos from *Daucus carota* L. *Planta* 191, 532-540.
- Mayer, D.T. y Gulick, A. (1942). The nature of the proteins of cellular nuclei. *J. Biol. Chem.* 146, 433-440.
- McConnell, M., Whalen, A. M., Smith, D.E. y Fisher, P.A. (1987). Heat shock-induced changes in the structural stability of proteinaceous karyoskeletal elements in vitro and morphological effects in situ. *J. Cell Biol.* 105, 1087-1098.
- McKeon, F. (1991). Nuclear lamin proteins: domains required for nuclear targeting, assembly, and cell-cycle-regulaed dynamics. *Curr. Op. Cell Biol.* 3, 82-86.
- McKeon, F.D., Kirschner, M.W. y Caput, D. (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319, 463-468.
- McNulty, A.K. y Saunders, M.J. (1992). Purification and immunological detection of pea nuclear intermediate filaments: evidence for plant nuclear lamins. *J. Cell Sci.* 103, 407-414.
- Medina, F.J., Cerdido, A. y Caizergues-Ferrer, M. (1993). Insights into the characterization of the plant nucleolin homologue. En : *Proceedings of the 13th European workshop on the cell nucleus.* pp.:66.
- Medina, F.J., Martín, M. y Moreno Díaz de la Espina, S. (1990). Implications for the function-structure relationship in the nucleolus after immunolocalization of DNA in onion cells. En: *Nuclear Structure and Function.* J.R. Harris y J.B. Zbarsky (eds.). Plenum Press, New York, pp:231-235.
- Medina, F.J., Risueño, M.C. y Moreno Díaz de la Espina, S. (1983). 3-D reconstruction and morphometry of fibrillar centres in plant cells in relation to nucleolar activity. *Biol. Cell* 48, 31-38.
- Medina, F.J., Cerdido, A., Maroto, M., Manzanares, M. y Marco, R. (1994). Enhancement of the immunocytochemical detection of antigens by microwave irradiation. Benefits and limitations analysed in isolated plant nuclei and *Drosophila* embryos in toto. *Histochemistry* 102, 45-50.
- Medina, M.A., Moreno Díaz de la Espina, S., Martín, M. y Fernandez-Gomez, M.E. (1989). Interchromatin granules in plant nuclei. *Biol. Cell* 67, 331-339.
- Mínguez, A. y Moreno Díaz de la Espina, S. (1993a). Characterization and distribution of the proteins of a plant nuclear matrix. *Eur. J. Cell Biol.* 60, Sup. 37, 10.
- Mínguez, A. y Moreno Díaz de la Espina, S. (1993 b). Investigation of the protein components of the nucleolar matrix of onion cells by immunoblotting, immunogold labelling and ultracytochemistry. *Abstracts of the second Interamerican Congress on Electron Microscopy*, pp.:233-234.
- Mínguez, A. y Moreno Díaz de la Espina, S. (1993c). Immunological characterization of lamins in the nuclear matrix of onion cells. *J. Cell Sci.* 106, 431-439.
- Mínguez, A. y Moreno Díaz de la Espina. (1993d). Nucleolin is a component of the nucleolar matrix in meristematic onion cells. En. *Proceedings of the 13th European Workshop on the Cell Nucleus*, P.:69.
- Mínguez, A., Franca, S. y Moreno Díaz de la Espina, S. (1994). Dinoflagellates have a eukaryotic nuclear matrix with lamin-like proteins and topoisomerase II. *J. Cell Sci.* 107, 2861-2873.
- Mirkovitch, J., Mirault, M-E. y Laemmli, U.K. (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* 39, 223-

- Mirzayan, C., Copeland, C.S. y Snyder, M. (1992). The NUF1 gene encodes an essential coiled-coil related protein that is a potential component of the yeast nucleoskeleton. *J. Cell Biol.* 116, 1319-1332.
- Mitchelson, K.R., Bekers, A.G.M. y Wanka, F. (1979). Isolation of a residual protein structure from nuclei of the myxomycete *Physarum polycephalum*. *J. Cell Sci.* 39, 247-256.
- Mlynárová, L., Loonen, A., Heldens, J., Janse, R.C., Keizer, P., Stiekema, W.J. y Nap, J-P. (1994). Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. *Plant Cell* 6, 417-426.
- Moir, R.D. y Goldman, R.D. (1993). Lamin dynamics. *Curr. Op. Cell Biol.* 5, 408-411.
- Moir, R.D., Montag-Lowy, M. y Goldman, R.D. (1994). Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J. Cell Biol.* 125, 1201-1212.
- Moreno Díaz de la Espina, S. (1995). Nuclear matrix isolated from plant cells. En: Structural and functional organization of the nuclear matrix. R. Berezney y K.W. Jeon (eds.). *Int. Rev. Cytol.* Capítulo 11 (en prensa).
- Moreno Díaz de la Espina, S. y Mínguez, A. (1995). Prenucleolar bodies form part a of the telophasic nuclear matrix in plant cells. *Eur. J. Cell Biol.* (enviado).
- Moreno Díaz de la Espina, S., Barthelémy, I. y Cerezuela, M.A. (1991). Isolation and ultrastructural characterization of the residual nuclear matrix in a plant cell system. *Chromosoma* 100, 110-117.
- Moreno Díaz de la Espina, S., Mínguez, A. y Franca, S. (1993a). La matriz nuclear: una base para la expresion genica y el funcionamiento nuclear. *Progresos en Biología Celular*, pp.:401-407. J. Becerra, J.M. Perez-Figares, P. Fernandez-LLebrez (eds). Universidad de Málaga .
- Moreno Díaz de la Espina, S., Risueño, M.C. y Medina, F.J. (1982). Ultrastructural, cytochemical and autoradiographic characterization of coiled bodies in the plant. *Biol. Cell* 44, 229-238.
- Moreno Díaz de la Espina, S., Medina, A., Mínguez, A. y Fernández-Gómez, E. (1993b). Detection by bismuth staining of highly phosphorylated nucleo-proteins in plants. Determination of its specificity by X-ray microanalysis, SDS-PAGE and immunological analysis. *Biol. Cell* 77, 297-306.
- Moreno Díaz de la Espina, S., Mínguez, A., Vázquez-Nin, G.H. y Echeverría, A.M. (1992). Fine structural organization of a non-reticulate plant cell nucleus. *Chromosoma* 101, 311-321.
- Nagl, W. (1985). Chromatin organization and the control of gene activity. *Int. Rev. Cytol.* 94, 21-56.
- Nakayasu, H. y Berezney, R. (1989). Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J. Cell Biol.* 108, 1-11.
- Nakayasu, H. y Berezney, R. (1991). Nuclear matrins: identification of the major nuclear matrix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10312-10316.
- Negri, C., Chiesa, R., Cerino, A., Bestagno, M., Sala, C., Zini, N., Maraldi, N.M. y Astaldi Ricotti, G.C.B. (1992). Monoclonal antibodies to human DNA topoisomerase I and the two isoforms of DNA topoisomerase II: 170- and 180-kDa isozymes. *Exp. Cell Res.* 200, 452-459.
- Nelson, W.G., Pienta, K.J., Barrack, E.R. y Coffey, D.S. (1986). The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. *Ann. Rev. Biophys.*

- Biophys. Chem. 15, 457-475.
- Neri, L.M., Massotti, G., Capitani, S. y Maraldi, N.M. (1992). Nuclear matrix-bound replicational sites detected in situ by 5-bromodeoxyuridine. *Histochemistry* 98, 19-32.
- Nickerson, J.A., He, D., Fey, E.G. y Penman, S. (1990). The nuclear matrix. En: *The eukaryotic Cell Nucleus: Molecular Biochemistry and Macromolecular Assemblies*, vol. 2, 763-782. Strauss and Wilson (eds.). Bradford Press.
- Nigg, E.A. (1989). The nuclear envelope. *Curr. Op. Cell Biol.* 1, 435-440.
- Nigg, E.A. (1992). Assembly-disassembly of the nuclear lamina. *Curr. Op. Cell Biol.* 4, 105-109.
- Oakley, B.R. y Dodge, J.D. (1974). Kinetochores associated with the nuclear envelope in the mitosis of a Dinoflagellate. *J. Cell Biol.* 63, 322-325.
- Oakley, B.R. y Dodge, J.D. (1979). Evidence for a double-helically coiled toroidal chromonema in the Dinoflagellate chromosome. *Chromosoma* 70, 277-291.
- Ochs, R.L. y Smetana, K. (1991). Detection of fibrillarin in nucleolar remnants and the nucleolar matrix. *Exp. Cell Res.* 197, 183-190.
- Ochs, R.L., Lischwe, M.A., Spohn, W.H. y Busch, H. (1985). Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol. Cell* 54, 123-134.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Ohyama, T., Iwaikawa, Y., Takegami, M. y Ito, M. (1987). Isolation of residual nuclear structures from microsporocytes of *Trillium kamtschaticum*. *Cell Struc. Funct.* 12, 433-442.
- Oliveira, L. y Huynh, H. (1989). Ultrastructure and cytochemistry of the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae* grown on three sources of nitrogen. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 21, 641-651.
- Olson, M.O.J. y Thompson, B.A. (1983). Distribution of proteins among chromatin components of nucleoli. *Biochemistry* 22, 3187-3193.
- Olson, M.O.J., Kirstein, M.N. y Wallace, M.O. (1990). Limited proteolysis as a probe of the conformation and nucleic acid binding regions of nucleolin. *Biochemistry* 29, 5682-5686.
- Olson, M.O.J., Wallace, M.O., Herrera, A.H., Marshall-Carlson, L. y Hunt, R.C. (1986). Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. *Biochemistry* 25, 484-491.
- Osborn, M. y Weber, K. (1986). Intermediate filament proteins: a multigene family distinguishing major cell lineages. *TIBS* 11, 469-472.
- Osborn, M. y Weber, K. (1987). Cytoplasmic intermediate filament proteins and the nuclear lamins A, B and C share the IFA epitope. *Exp. Cell Res.* 170, 195-203.
- Osheroff, N., Zechiedrich, E.L. y Gale, K.C. (1991). Catalytic function of DNA topoisomerase II. *BioEssays* 13, 269-275.
- Paddy, M.R., Belmont, A.S., Saumweber, H., Agard, D.A. y Sedat, J.W. (1990). Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery. *Cell* 62, 89-106.
- Pardoll, D.M., Vogelstein, B. y Coffey, D.S. (1980). A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell* 19, 527-536.
- Paul, A-L. y Ferl, R.J. (1993). Osmium tetroxide footprinting of a scaffold attachment region in the maize Adh1 promoter. *Plant Mol. Biol.* 22, 1145-1151.
- Petrov, P., Drake, F.H., Loranger, A., Huang, W. y Hancock, R. (1993). Localization

- of DNA topoisomerase II in chinese hamster fibroblasts by confocal and electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 204, 73-81.
- Phi-Van, L. y Strätling, W.H. (1988). The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *EMBO J.* 7, 655-664.
- Pienta, K.J., Getzenberg, R.H. y Coffey, D.S. (1991). Cell structure and DNA organization. *Critical Reviews In* 1, 355-385.
- Poljak, L., Seum, C., Mattioni, T. y Laemmli, U.K. (1994). SARs stimulate but do not confer position independent gene expression. *Nucl. Ac. Res.* 22, 4386-4394.
- Potashkin, J.A., Zeigel, R.F. y Hiberman, J.A. (1984). Isolation and initial characterization of residual nuclear structures from yeast. *Exp. Cell Res.* 153, 374-388.
- Pouchelet, M., Anteunis, A. y Gansmuller, A. (1986). Correspondence of two nuclear networks observed in situ with the nuclear matrix. *Biol. Cell* 56, 107-112.
- Provasoli, L. (1963). Growing marine seaweeds. En: *Proceedings of the 4th Interamerican seaweed symposium (Biarritz 196, 9-17).*
- Provasoli, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. E: *Cultures and Collections of Algae. Proc. U. S.- Japan Conf. Hakane, September 1966.* Watanabe, A. y Hattari, A. (eds.). *Jap. Soc. Plant Physiol. Tokio, 1968,* pp:63-75.
- Pruss, R.M., Mirsky, R. y Raff, M.C. (1981). All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Cell* 27, 419-428.
- Puvion-Dutilleul, F. (1983). Morphology of transcription at cellular and molecular levels. *Int. Rev. Cytol.* 84, 57-101.
- Puvion-Dutilleul, F. y Laithier, M. (1987). Localization of highly phosphorylated proteins in cells altered by Herpes simplex virus infection. *Biol. Cell* 61, 129-139.
- Puvion-Dutilleul, F., Bachellerie, J-P. y Puvion, E. (1991a). Nucleolar organization of HeLa cells as studied by in situ hybridization. *Chromosoma* 100, 395-409.
- Puvion-Dutilleul, F., Mazan, S., Nicoloso, M., Christensen, M.E., y Bachellerie, J.P. (1991b). Localization of U₃ RNA molecules in nucleoli of Hela and 3T3 cells by high resolution "in situ" hibridization. *Eur. J. Cell Biol.* 56, 178-186.
- Rae, P.M.M. (1976). Hydroxymethyluracil in eukaryote DNA: a natural feature of the Pyrrophyta (Dinoflagellates). *Science* 194, 1062-1064.
- Rae, P.M.M. y Steele, R.E. (1978). Modified bases in the DNAs of unicellular eukaryotes: an examination of distributions and possible roles, with emphasis on hydroxymethyl-uracil in dinoflagellates. *BioSystems* 10, 37-53.
- Razin, S.V. (1987). DNA interactions with the nuclear matrix and spatial organization of replication and transcription. *BioEssays* 6, 19-23.
- Razin, S.V. y Vassetzky, Y.S. (1992). Domain organization of eukaryotic genome. *Cell Biol. Int. Rep.* 16, 697-708.
- Reddy, R., Henning, D., Liu, M-H., Spector, D. y Busch, H. (1985). Identification and characterization of a polyadenylated small RNA (s-Poly A⁺ RNA) in dinoflagellates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 552-557.
- Reddy, R., Spector, D., Henning, D., Liu, M.H. y Busch, H. (1983). Isolation and partial characterization of dinoflagellate U1-U6 small RNAs homologous to rat U small nuclear RNAs. *J. Biol. Chem.* 258, 13965-13969.
- Reimer, G., Pollard, K.M., Penning, C.A., Ochs, R.L., Lischwe, M.A., Busch, H. y Tan,

- E.M. (1987). Monoclonal autoantibody from a (New Zealand black x New Zealand white) F₁ mouse and some human scleroderma sera target an M_{34,000} nucleolar protein of the U3 RNP particle. *Arthritis and Rheumatism* 30, 793-800.
- Riemer, D., Dodemont, H. y Weber, K. (1991). Cloning of the non-neuronal intermediate filament protein of the gastropod *Aplysia californica*; identification of an amino acid residue essential for the IFA epitope. *Eur. J. Cell Biol.* 56, 351-357.
- Riemer, D., Dodemont, H. y Weber, K. (1993). A nuclear lamin of the nematode *Caenorhabditis elegans* with unusual structural features; cDNA cloning and gene organization. *Eur. J. Cell Biol.* 62, 214-223.
- Risueño, M.C. y Medina, F.J. (1986). The nucleolar structure in plant cells. En: *Cell Biology Reviews* 7. Basque Country University. Springer.
- Risueño, M.C. y Moreno Díaz de la Espina, S. (1979). Ultrastructural and cytochemical study of the quiescent root meristematic cell nucleus. *J. Submicrosc. Cytol.* 11, 85-98.
- Rizzo, P.J. (1981). Comparative aspects of basic chromatin proteins in dinoflagellates. *BioSystems* 14, 433-443.
- Rizzo, P.J. (1987). Biochemistry of the dinoflagellate nucleus. En: *The Biology of Dinoflagellates*. Botanical Monographs, vol. 21, 143-173. F.J.R Taylor (ed). Blackwell. Scientific Publications.
- Rizzo, P.J. (1991). The enigma of the dinoflagellate chromosome. *J. Protozool.* 38, 246-252.
- Rizzo, P.J., Jones, M. y Ray, S.M. (1982). Isolation and properties of isolated nuclei from the Florida red tide dinoflagellate *Gymnodinium breve* (Davis). *J. Protozool.* 29, 217-222.
- Rodrigo, R.M., Rendón, M.C., Torreblanca, J., García-Herdugo, G. y Moreno, F.J. (1992). Characterization and immunolocalization of RNA polymerase I transcription factor UBF with anti-NOR serum in protozoa, higher plant and vertebrate cells. *J. Cell Sci.* 103, 1053-1063.
- Ross, J.H.E., Hutchings, A., Butcher, G.W., Lane, E.B. y Lloyd, C.W. (1991). The intermediate filament-related system of higher plant cells shares an epitope with cytokeratin 8. *J. Cell Sci.* 99, 91-98.
- Sala-Rovira, M., Geraud, M.L., Caput, D., Jacques, F., Soyer-Gobillard, M.O., Vernet, G. y Herzog, M. (1991). Molecular cloning and immunolocalization of two variants of the major basic nuclear protein (HCc) from the histone-less eukaryote *Cryptothecodinium cohnii* (Pyrrhophyta). *Chromosoma* 100, 510-518.
- Salamin Michel, L., Soyer-Gobillard, M-O., Géraud, M.L. y Gautier, A. (1990). Cytochemistry and immunology of some nuclear proteins in a primitive dinoflagellate. En: *Nuclear Structure and Function*, pp.: 291-296. J.R. Harris and I.B. Zbarsky (Eds). Plenum Press, New York.
- Sander, M. y Hsieh, T.S. (1983). Double strand DNS cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 258, 8421-8428.
- Saxena, P.K., Fowke, L.C. y King, J. (1985). An efficient procedure for isolation of nuclei from plant protoplasts. *Protoplasma* 128, 184-189.
- Scheer, U. y Benavente, R. (1990). Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *BioEssays* 12, 14-21.
- Scheer, U. y Weisenberger, D. (1994). The nucleolus. *Curr. Op. Cell Biol.* 6, 354-359.

- Scheer, U., Kleinschmidt, J.A. y Franke, W.W. (1982). Transcriptional and skeletal elements in nucleoli of amphibian oocytes. En: The nucleolus. Society for Exp. Biology Seminar Series 15. Jordan, E.G. and Cullin, C.A. (eds), pp.: 25-42.
- Scheer, U., Thiry, M. y Goessens, G. (1993). Function and assembly of the nucleolus. TCB 3, 236-241.
- Scheer, U., Hügler, B., Hazan, R., y Rose, K.F. (1984). Drug-induced dispersal of transcribed rRNA genes and transcriptional products: immunolocalization and silver staining of different nucleolar components in rat cells treated with 5,6-dichloro- β -D-ribofuranosilbenzimidazole. J. Cell Biol. 99, 672-679.
- Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R. y Hurt, E.C. (1989). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. EMBO J. 8, 4015-4024.
- Shaw, P.J., Fairbairn, D.J. y Lloyd, C.W. (1991). Cytoplasmic and nuclear intermediate filament antigens in higher plant cells. En: The cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form, pp.: 69-81. Academic Press Limited.
- Shiomi, Y., Powers, J., Bolla, R.I., Nguyen, T.V. y Schlessinger, D. (1986). Proteins and RNA in mouse L cell core nucleoli and nucleolar matrix. Biochemistry 25, 5745-5751.
- Sigee, D.C. (1984). Structural DNA and genetically active DNA in dinoflagellate chromosomes. BioSystems 16, 203-210.
- Sigee, D.C. y Kearns, L.P. (1982). X-ray microanalysis of unfixed chromatin in dinoflagellate cells prepared by a monolayer cryotechnique. J. Biochem. Biophys. Methods 6, 23-30.
- Slatter, R.E., Dupree, P. y Gray, J.C. (1991). A scaffold-associated DNA region is located downstream of the pea plastocyanin gene. The Plant Cell 3, 1239-1250.
- Smith, P.J. y MaKinson, T.A. (1989). Cellular consequences of overproduction of DNA topoisomerase II in an ataxia-telangiectasia cell line. Cancer Res. 49, 118-1124.
- Sogin, M.L. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. Curr. Op. Gen. Dev. 1, 457-463.
- Sorensen, B.S., Fukata, H., Jensen, P.S., Andersen, A.H., Christiansen, K., Fukasawa, H. y Westergaard, O. (1991). Drug stimulated DNA cleavage mediated by cauliflower topoisomerase II. Plant Physiol. 95, 659-662.
- Soyer-Gobillard, M-O. y Geraud, M-L. (1992). Nucleolus behaviour during the cell cycle of a primitive dinoflagellate eukaryote, *Prorocentrum micans* Ehr., seen by light microscopy and electron microscopy. J. Cell Sci. 102, 475-485.
- Soyer-Gobillard, M-O. y Haapala, O.K. (1974). Division and function of dinoflagellate chromosomes. J. Microscopie 19, 137-146.
- Soyer-Gobillard, M-O. y Herzog, M. (1985). The native structure of dinoflagellate chromosomes. Involvement of structural RNA. Eur. J. Cell Biol. 36, 334-342.
- Soyer-Gobillard, M-O., Geraud, M-L., Coulaud, D., Barray, M., Théveny, B., Revet, B. y Delain, E. (1990). Localization of B and Z-DNA in the chromosomes of a primitive eukaryote Dinoflagellate. J. Cell Biol. 11, 293-308.
- Spector, D.L. (1984). Dinoflagellate nuclei. En: Dinoflagellates, pp.: 107-147. Academic Press Inc.
- Spector, D.L. (1990). Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 147-151.
- Spector, D.L. (1993a). Macromolecular domains within the cell nucleus. Annu. Rev.

- Cell Biol. 9, 265-315.
- Spector, D.L. (1993b). Nuclear organization of pre-mRNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 442-448.
- Spector, D.L. y Triemer, R.E. (1981). Chromosome structure and mitosis in the dinoflagellates: an ultrastructural approach to an evolutionary problem. *BioSystems* 14, 289-298.
- Spector, D.L., Vasconcelos, A.C. y Triemer, R.E. (1981). DNA duplication and chromosome structure in the dinoflagellates. *Protoplasma* 105, 185-194.
- Steele, R.E. y Rae, M.M. (1980). Ordered distribution of modified bases in the DNA of a dinoflagellate. *Nucl. Acids Res.* 8, 4709-4725.
- Stephanova, E. y Valkov, N. (1991). Rat liver nucleoli: biochemical characterization of the residual skeletal structure. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 44, 63-66.
- Stephanova, E., Stancheva, R. y Avramova, Z. (1993). Binding of sequences from the 5' and 3'-nontranscribed spacers of the rat rDNA locus to the nucleolar matrix. *Chromosoma* 102, 287-295.
- Stewart, C. y Burke, B. (1987). Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell* 51, 383-392.
- Stick, R. (1988). cDNA cloning of the developmentally regulated lamin L_{III} of *Xenopus laevis*. *EMBO J.* 7, 3189-3197.
- Stick, R. (1992). The gene structure of *Xenopus* nuclear lamin A: A model for the evolution of A-type from B-type lamins by exon shuffling. *Chromosoma* 101, 566-574.
- Stick, R. (1994). The gene structure of B-type nuclear lamins of *Xenopus laevis*: implications for the evolution of the vertebrate lamin family. *Chromosome Res.* 2, 376-382.
- Stick, R. y Hausen, P. (1980). Immunological analysis of nuclear lamina proteins. *Chromosoma* 80, 219-236.
- Stick, R. y Hausen P. (1985). Changes in the nuclear lamina composition during early development of *Xenopus laevis*. *Cell* 41, 191-200.
- Stick, R., Angres, B., Lehner, C.F. y Nigg, E.A. (1988). The fates of chicken nuclear lamin proteins during mitosis: evidence for a reversible redistribution of lamin B₂ between inner nuclear membrane and elements of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 107, 397-406.
- Stoilov, L.M., Mirkova, V., Zlatanova, J. y Djondjurov, L. (1992). Matrix-associated DNA from maize is enriched in repetitive sequences. *Plant Cell Rep.* 11, 355-358.
- Stolyarov, S.D. (1984). Isolation and characterization of the nuclear matrix of the onion *Allium cepa*. *Cytologia* 26, 874-877.
- Stuurman, N., de Jong, L. y van Driel, R. (1992a). Nuclear frameworks: concepts and operational definitions. *Cell Biol. Int. Rep.* 16, 837-852.
- Stuurman, N., Floore, A., Colen, A., de Jong, L. y van Driel, R. (1992b). Stabilization of the nuclear matrix by disulfide bridges: identification of matrix polypeptides that form disulfides. *Exp. Cell Res.* 200, 285-294.
- Stuurman, N., Meijne, M.L., van der Pol, A.J., de Jong, L., van Driel, R. y van Renswoude, J. (1990). The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 5460-5465.
- Suzuki, T., Suzuki, N. y Hosoya, T. (1993). Limited proteolysis of rat liver nucleolin by

- endogenous proteases: effects of polyamines and histones. *Biochem. J.* 289, 109-115.
- Swedlow, J.R., Sedat, J.W. y Agard, D.A. (1993). Multiple chromosomal populations of topoisomerase II detected in vivo by time-lapse, three. dimensional wide field microscopy. *Cell* 73, 97-108.
- Taylor, F.J.R. (1987a). General group characteristics; special features of interest; short history of dinoflagellate study. En: *The Biology of Dinoflagellates*. Botanical Monographs vol. 21, pp.: 1-23. F.J.R. Taylor (ed). Blackwell Scientific Publications.
- Taylor, F.J.R. (1987b). Appendix. Taxonomy and classification. En: *The Biology of Dinoflagellates*. Botanical Monographs, vol. 21, pp.: 723-731. F.J.R. Taylor (ed). Blackwell Scientific Publications.
- Testillano, P.S., Sanchez-Pina, M.A., Lopez Iglesias, C., Christensen, M.E. y Risueño, M.C. (1992). Distribution of B-36 nucleolar protein in relation to transcriptional activity in plant cells. *Chromosoma* 102, 41-49.
- Thiry, M. (1992). New data concerning the functional organization of the mammalian cell nucleolus: detection of RNA and rRNA by in situ molecular immunocytochemistry. *Nucl. Acids Res.* 20, 6195-6200.
- Todorov, I.T. y Hadjiolov, A.A. (1979). A comparison of nuclear and nucleolar matrix proteins from rat liver. *Cell Biol. Int. Rep.* 3, 753-757.
- Tong, Ch-G., Dauwalder, M., Clawson, G.A., Hatem, C.L. y Roux, S.J. (1993). The major nucleoside triphosphatase in pea (*Pisum sativum* L.) nuclei and in rat liver nuclei share common epitopes also present in nuclear lamins. *Plant Physiol.* 101, 1005-1011.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 76, 4350-4354.
- Tsai-Pflugfelder, M., Liu, L.F., Liu, A.A., Tewey, K.M., Whang-Peng, J., Knutsen, T., Hebner, K., Croce, C.M. y Wang, J.C. (1988). Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 85, 7177-7181.
- Tube, R.A. y Berezney, R. (1987). Pre-replicative association of multiple replicative enzyme activities with the nuclear matrix during rat liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 262, 1148-1154.
- Van Driel, R., Humbel, B. y de Jong, L. (1991). The nucleus: a black box being opened. *J. Cell. Biochem.* 47, 311-316.
- Van Eekelen, C.A.G., Salden, M.H.L., Habets, W.J.A., Van de Putte, L.B.A. y Van Venrooij, W.J. (1982). On the existence of an internal nuclear protein structure in HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 141, 181-190.
- Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., Mínguez, A, Moreno Díaz de la Espina, S., Fakan, S. y Martin, T.E. (1992). Ribonucleoprotein components of root meristematic cell nuclei of the tomato characterized by application of mild loosening and immunocytochemistry. *Exp. Cell Res.* 200, 431-438.
- Verheijen, R., van Venrooij, W. y Ramaekers, F. (1988). The nuclear matrix: structure and composition. *J. Cell Sci.* 90, 11-36.
- Verheijen, R., Kuijpers, H., Vooijs, P., van Venrooij, W. y Ramaekers, F. (1986). Protein composition of nuclear matrix preparations from HeLa cells: an immunochemical approach. *J. Cell Sci.* 80, 103-122.

- Vernet, G., Sala-Rovira, M., Maeder, M., Jacques, F. y Herzog, M. (1990). Basic nuclear proteins of the histone-less eukaryote *Cryptothecodinium cohnii* (Pyrrophyta): two-dimensional electrophoresis and DNA-binding properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1048, 281-289.
- Von Kries, J.P., Buck, F. y Strätling, W.H. (1994). Chicken MAR binding protein p120 is identical to human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) U. *Nucl. Acids Res.* 22, 12215-12220.
- Von Kries, J.P., Buhrmester, H. y Strätling, W.H. (1991). A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. *Cell* 64, 123-135.
- Wachsberger, P.R. y Coss, R.A. (1993). Alterations in nuclear matrix ultrastructure of G1 mammalian cells following heat shock: resinless section electron microscopy, biochemical, and immunofluorescence studies. *J. Cell. Physiol.* 155, 615-634.
- Waitz, W. y Loidl, P. (1988). In situ preparation of the nuclear matrix of *Physarum polycephalum*: ultrastructural and biochemical analysis of different matrix isolation procedures. *J. Cell Sci.* 90, 621-628.
- Wang, J.C. (1985). DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 665-697.
- Wang, J.C. (1991). DNA topoisomerases: Why so many? *J. Biol. Chem.* 266, 6659-6662.
- Wang, X. y Traub, P. (1991). Resinless section immunogold electron microscopy of karyocytoskeletal frameworks of eukaryotic cells cultured in vitro. *J. Cell Sci.* 90, 107-122.
- Wansink, D.G., Schul, W., van der Kraan, I., van Steensel, B., van Driel, R. y de Jong, L. (1993). Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J. Cell Biol.* 122, 283-293.
- Warrener, P. y Petryshyn, R. (1991). Phosphorylation and proteolytic degradation of nucleolin from 3T3-F442A cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 716-723.
- Warters, R.L., Chu, G.L., Wong, R.S.L., Lyons, B.W. y Dewey, W.C. (1993). Nuclear protein redistribution in heat-shocked cells. *J. Cell. Physiol.* 154, 402-409.
- Wassef, M. (1979). A cytochemical study of interchromatin granules. *J. Ultrastr. Res.* 69, 121-133.
- Webb, C.F., Das, C., Eneff, K.L. y Tucker, P.W. (1991). Identification of a matrix-associated region 5' of an immunoglobulin heavy chain variable region gene. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5206-5211.
- Weber, K. y Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrilamide gel electroforesis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- Weber, K., Plessmann, U. y Ulrich, W. (1989). Cytoplasmic intermediate filament proteins of invertebrates are closer to nuclear lamins than are vertebrate intermediate filament proteins; sequence characterization of two muscle proteins of a nematode. *EMBO J.* 8, 3221-3227.
- Weber, K., Plessman, U., Dodemont, H. y Kossmagk-Stephan, K. (1988). Amino acid sequences and homopolymer-forming ability of the intermediate filament proteins from an invertebrate epithelium. *EMBO J.* 7, 2995-3001.
- Wood, S.H. y Collins, J.M. (1986). Preferential binding of DNA primase to the nuclear

- matrix in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 261, 7119-7122.
- Wunderlich, F. y Herlan, G. (1977). A reversibly contractile nuclear matrix. Its isolation, structure, and composition. *J. Cell Biol.* 73, 271-278.
- Xing, Y. y Lawrence, J.B. (1993). Nuclear RNA tracks: structural basis for transcription and splicing? *TCB* 3, 346-353.
- Yang, C.H., Lambie, E.J. y Snyder, M. (1992a). NuMA: an unusually long coiled-coil related protein in the mammalian nucleus. *J. Cell Biol.* 116, 1303-1317.
- Yang, C., Xing, L. y Zhai, Z. (1992b). Intermediate filaments in higher plant cells and their assembly in a cell-free system. *Protoplasma* 171, 44-54.
- Yen, C.S., Steele, R.E. y Rae, P.M.M. (1978). Chromatin structure in a dinoflagellate as revealed by electron microscopy of DNA cross-linked in vivo with trimethylpsoralen. *J. Cell Biol.* 79, 120a.
- Zborek, A., Krzyzowska-Gruca, S. y Gruca, S. (1990). Nuclear fraction enriched in interchromatin granules. *Cell Biol. Int. Rep.* 14, 79-88.
- Zeitlin, S., Wilson, R.C. y Efstratiadis, A. (1989). Autonomous splicing and complementation of in vivo-assembled spliceosomes. *J. Cell Biol.* 108, 765-777.
- Zeitlin, S., Parent, A., Silverstein, S. y Efstratiadis, A. (1987). Pre-mRNA splicing and the nuclear matrix. *Mol. Cell. Biol.* 7, 111-120.
- Zini, N., Martelli, A.M., Sabatelli, P., Santi, S., Negri, C., Astaldi-Ricotti, G.C.B. y Maraldi, N.M. (1992). The 180-kDa isoform of topoisomerase II is localized in the nucleolus and belongs to the structural elements of the nucleolar remnant. *Exp. Cell Res.* 200, 460-466.
- Zini, N., Santi, S., Ognibene, A., Bevelloni, A., Neri, L.M., Valmori, A., Mariani, E., Negri, C., Astaldi-Ricotti, G.C.B. y Maraldi, N.M. (1994). Discrete localization of different DNA topoisomerases in HeLa and K562 cell nuclei and subnuclear fractions. *Exp. Cell Res.* 210, 336-348.
- Zurdo, J., Lozano, R.M., Fernandez-Cabrera, C. y Ramirez, J.M. (1991). Dimeric carotenoid interaction in the light-harvesting antenna of purple phototrophic bacteria. *Biochem. J.* 274, 881-884.

APENDICE A: TABLAS

**TABLA I. METODO DE AISLAMIENTO DE MATRICES NUCLEARES DE ALLIUM
CEPA CON SOLUCIONES DE ALTA FUERZA IONICA.**

MERISTEMOS INFILTRADOS EN MEDIO DE AISLAMIENTO	
	<ul style="list-style-type: none"> - Homogeneización 3x15 sg. - Filtración a través de tres filtros superpuestos de luz de malla 30, 50 y 100 µm. "Repetido al menos tres veces"
FILTRADO: NUCLEOS + IMPUREZAS	
	<ul style="list-style-type: none"> - Centrifugación 2400 rpm. - Resuspensión del pellet en medio fresco. "Repetido tres veces mínimo".
NUCLEOS AISLADOS	
	<ul style="list-style-type: none"> - Predigestión con DNasa I 50 µg/ml en TM (10 mM Tris HCl pH= 7.4, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 20 mM DTT).
NUCLEOS PREDIGERIDOS	
	<ul style="list-style-type: none"> - Extracción con Tritón X-100 al 0.5% en TM, 1 mM PMSF, 20 mM DTT.
NUCLEOS TRITON X-100	
	<ul style="list-style-type: none"> - Digestión con nucleasas exógenas: 200 µg/ml DNasa I, 100 µg/ml RNasa A en TM, 1 mM PMSF, 20 mM DTT.
NUCLEOS RESIDUALES	
	<ul style="list-style-type: none"> - Extracción con LM (10 mM Tris HCl pH=7.4, 0.25 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 20 mM DTT).
NUCLEOS LM	
	<ul style="list-style-type: none"> - Extracción con HS (10 mM Tris HCl, pH=7.4, 0.25 mM MgCl₂, 2 M NaCl, 1 mM PMSF, 20 mM DTT).
MATRICES NUCLEARES	
	<ul style="list-style-type: none"> - Extracción con 4 M urea , 10mM Tris HCl ph=8, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 20 mM DTT.
MATRICES NUCLEARES EXTRAIDAS CON UREA	

TABLA II. AISLAMIENTO DE MATRICES NUCLEARES POR EL METODO LIS

NUCLEOS DE ALLIUM CEPA O AMPHIDIINIUM CARTERAE	
	- Predigestión con 50 µg/ml de DNasa en DB (20 mM Tris HCl pH=7.4, 20 mM KCl, 70 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 0.05 mM espermina, 0.125 mM espermidina, 0.1% digitonina, 1 mM PMSF, 20 µg/ml aprotinina, 20 mM DTT).
NUCLEOS PREDIGERIDOS	
	- Extracción con solución de LIS (5 mM HEPES/NaOH pH=7.4, 0.25 mM espermina, 2 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.1% digitonina, 25 mM 3,5-diiodosalicilato de litio, 1 mM PMSF, 20 µg/ml aprotinina, 20 mM DTT).
	- Lavados con DB varias veces.
NUCLEOS LIS	
	- Digestion con DNasa I, 200 µg/ml en DB.
	- Lavados con DB abundantes.
MATRICES NUCLEARES LIS.	

TABLA III. METODO DE AISLAMIENTO DE MATRICES NUCLEOLARES.

NUCLEOS AISLADOS (TABLA I). MEDIO SIN Mg.	
	- Sonicación de la fracción resuspendida en medio de aislamiento de nucleolos: 2.1% Ficoll, 10 mM Tris HCl pH=7.8, , 0.25 mM β-mercaptoetanol, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM PMSF, 20 mM DTT.
NUCLEOLOS CON RESTOS DE CROMATINA	
	- Incubación con LM (10 mM Tris HCl pH=7.4. 0.25 mM MgCl ₂ , 1 mM PMSF, 20 mM DTT). Eliminación de restos de cromatina.
NUCLEOLOS + IMPUREZAS	
	- Purificación: centrifugación a través de un colchón de 1.5 M sacarosa, 1 mM MgCl ₂ , 10 mM Tris HCl pH=7.8, 1 mM PMSF.
NUCLEOLOS AISLADOS	
	- Digestiones con DNasa I y RNasa A. 200 µg/ml de DNasa I, 100 µg/ml de RNasa A en TM (Tris HCl 10 mM pH=7.4, 5mM MgCl ₂ , 1 mM PMSF, 20 mM DTT).
NUCLEOLOS RESIDUALES	
	- Extracción con HS (10 mM Tris HCl pH=7.4, 0.25 mM MgCl ₂ , 2 M NaCl, 1 mM PMSF, 20 mM DTT).
MATRICES NUCLEOLARES	

TABLA IV. METODO DE OBTENCION DE MATRICES DE DINOFLAGELADOS

CULTIVOS DE DINOFLAGELADOS	
	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración de los cultivos por centrifugación 500-1000 rpm. - Lavados posteriormente en tampón A (10 mM Tris HCl pH=7.4, 100 mM KCl, 25 mM EDTA, 0.25 M sacarosa).
CELULAS RESUSPENDIDAS EN TAMPON A	
	<ul style="list-style-type: none"> - Se encapsularon los dinoflagelados en microbolas de agarosa.
CELULAS ENCAPSULADAS	
	<ul style="list-style-type: none"> - Lisis del citoplasma con Triton X-100 al 3% en tampón B (el A sin sacarosa), para eliminar los pigmentos.
CELULAS LISADAS	
	<ul style="list-style-type: none"> - Predigestión con DNasa I 50 µg/ml en TM (10 mM Tris HCl pH=7.4, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 20 mM DTT).
CELULAS PREDIGERIDAS	
	<ul style="list-style-type: none"> - Lavados con LM (10 mM Tris HCl pH=7.4, 0.25 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 20 mM DTT. - Digestión con DNasa I 200 µg/ml, RNasa A 100 µg/ml en TM, 1 mM PMSF, 20 mM DTT.
CELULAS RESIDUALES	
	<ul style="list-style-type: none"> - Extracción con LM.
NUCLEOS LM + RESTOS CITOPLASMICOS	
	<ul style="list-style-type: none"> - Extracción con HS (10 mM Tris HCl pH=7.4, 0.25 mM MgCl₂, 2 M NaCl, 1 mM PMSF, 20 mM DTT).
MATRICES NUCLEARES + CITOESQUELETO	

TABLA V. ANTICUERPOS PRIMARIOS. INMUNOBLOTTING

ANTICUERPO	TIPO	Ig	ANIMAL	DILUCION	MUESTRA
Anti-lamina de pollo.	Policlonal	G	Conejo	1/75-100 1/50 1/50-200	- NM+U. A.cepta. 1D y 2D. - E.coli expresa LIII de X.laevis. - NM. A.carte-rae.
Anti-lamina B ₂ de pollo. L3-2B8	Monoclonal	G	Ratón	SD	- NM+U. A.cepta. 1D.
Anti-lamina A de pollo. L3-4B4	Monoclonal	G	Ratón	SD 1/10	- NM+U. A.cepta. 1D y 2D. - NM. A.carte-rae.
Anti-lamina LI de X.laevis. L7-4A2	Monoclonal	G	Ratón	1/100 "	- NM+U. A.cepta. 1D y 2D. - NM A.carte-rae.
Anti-lamina LII de X.laevis. L7-8C6	Monoclonal	G	Ratón	1/100	- NM+U. A.cepta. 1D.
Anti-lamina LII y LIII de X.laevis. L6-5D5	Monoclonal	G	Ratón	1/500	- E.coli. que expresa LIII.
IFA	Monoclonal	G	Ratón	SD SD-1/10	- NM+U. A.cepta. 1D y 2D. -NM. A.carte-rae.

(Continúa)

ANTICUERPO	TIPO	Ig	ANIMAL	DILUCION	MUESTRA
Anti-vimentina	Monoclonal	G	Ratón	1/100-500	- NM. A.cepta. 1D.
AFB	Monoclonal	M	Rata	SD	- NM. A.cepta. 1D.
MAC 322	Monoclonal	M	Rata	SD "	- NM+U. A.cepta. 1D. - NM. A.cart-e-rae.
Anti-topo II (CRB)	Policlonal	G	Conejo	1/50 "	- NM. A.cepta. 1D. -NM. A.cart-e-rae.
JIM 63	Monoclonal	G	Ratón	SD	- NM. A.cepta. 1D.
Anti-P105 Nuclear Antigen. 780-3. (ICN)	Monoclonal	M	Ratón	SD	- NM. A.cepta. 1D.
Anti-nucleolina. (Hamster)	Policlonal	G	Conejo	1/75	- NM. A.cepta. 1D.
Anti-nucleolina. (Ratón)	Policlonal	G	Conejo	1/200	- Num. A.cepta. 1D.
S ₄ anti-fibrilarina.	Suero	G	Humano	1/200	- Num. A.cepta. 1D.

Abreviaturas.- NM+U: matrices nucleares extraidas con urea. NM: matrices nucleares. Num: matriz nucleolar. SD: sin diluir. 1D: blot monodimensional. 2D: blot bidimensional

TABLA VI. ANTICUERPOS SECUNDARIOS. INMUNOBLOTTING.

ANTICUERPO	MARCADOR	DILUCION		ANTICUERPO 1º
		CNF	ECL	
Anti-IgG de conejo.	Peroxidasa	1/250		Anti-lamina de pollo.
			1/10 ⁴	Anti-topo II. (CRB).
		1/250		Anti-nucleolina. (Hamster).
			1/10 ⁴	Anti-nucleolina. (Ratón).
Anti-IgG de ratón.	Peroxidasa		1/10 ⁴	L3-2B8
			1/10 ⁴	L3-4B4
			1/10 ⁴	L7-4A2
			1/10 ⁴	L7-8C6
		1/250		L6-5D5
		1/250-1/1000		IFA. A.cepa.
		1/10 ⁴	IFA. Dinof.	
Anti-IgG humana.	Peroxidasa		1/10 ⁴	S ₄
Anti-IgG/IgM de rata.	Peroxidasa	1/100		AFB
		1/100		MAC 322
		1/100		JIM 63
Anti-IgM/IgG de ratón.	Peroxidasa		1/10 ³ -1/10 ⁴	Anti-P105 Nuclear Antigen. 780-3. (ICN).

Abreviaturas.- CNF: revelado con cloronaftol. ECL: revelado con el sistema quimioluminiscente ECL de Amersham.

TABLA VII. ANTICUERPOS PRIMARIOS. INMUNOFLORESCENCIA.

ANTICUERPO	TIPO	Ig	ANIMAL	DILUCION	MUESTRA
Anti.lamina de pollo.	Policlonal	G	Conejo	1/50	- NM y N. A.cepa. - NM. A.carte-rae.
Anti-topo II (CRB)	Policlonal	G	Conejo	1/25 "	- NM y N. A.cepa. - NM y células enteras. A.carterae.
JIM 63	Monoclonal	M	Rata	SD	- NM y N. A.cepa.
Anti-nucleolina (Ratón).	Policlonal	G	Conejo	1/100	- NM. A.cepa.
MAC 322	Monoclonal	M	Rata	1/50- 1/500	- Células PK2.
Anti-fibrilarina S ₄	Suero	G	Humano	1/100 1/200	- NM Y N A.cepa.
Anti-fibrilarina P2G3	Monoclonal	G	Ratón	1/100	- NM y N A.cepa.

Abreviaturas.- N: núcleos aislados. **NM:** matrices nucleares. **SD:** sin diluir.

TABLA VIII. ANTICUERPOS SECUNDARIOS. FLUORESCENCIA.

ANTICUERPO	MARCADOR	DILUCION	ANTICUERPO 1º
Anti-IgG de conejo.	FITC	1/400	Anti-lamina de pollo.
		1/50	Anti-topo II (CRB).
		"	Anti-nucleolina. (Ratón).
Anti-IgG de ratón.	FITC	1/50	Anti-fibrilarina P2G3
Anti-IgG humana.	FITC	1/50	S ₄
Anti-IgG de rata.	FITC	1/100	MAC 322
		1/25-1/50	JIM 63

TABLA IX. ANTICUERPOS PRIMARIOS. INMUNOMARCADO CON ORO

ANTICUERPO	TIPO	Ig	ANIMAL	DILUCION	MUESTRA
Anti-lamina de pollo.	Policlonal	G	Conejo	1/500-1/1000	- NM y N A.cepa.
Anti-DNA (Comercial)	Monoclonal	M	Ratón	1/10	- NM y N. A.cepa.
JIM 63	Monoclonal	M	Rata	SD	- NM y N. A.cepa.
Anti-topo II (CRB)	Policlonal	G	Conejo	1/50	- NM. A.cepa.
Anti-P105 Nuclear Antigen. 780-3. (ICN).	Monoclonal	M	Ratón	SD-1/10 "	- NM. A.cepa. - NM. A.carte-rae.
Anti-nucleolina. (Ratón).	Policlonal	G	Conejo	1/100 1/200	- NM. A.cepa.
Anti-fibrilarina S ₄	Suero	G	Humano	1/500 1/800	-NM. A.cepa
Anti-fibrilarina P2G3	monoclonal	G	Ratón	1/1000 1/2000	-NM. A.cepa

Abreviaturas.- N: núcleos aislados. **NM:** matrices nucleares. **SD:** sin diluir.

TABLA X. ANTICUERPOS SECUNDARIOS. INMUNOMARCADO CON ORO.

ANTICUERPO	MARCADOR	DILUCION	ANTICUERPO 1º
Anti-IgG de conejo.	Oro de 10 nm	1/100 " " 1/75 (anticuerpo 3º JIM 63)	Anti-lamina de pollo. Anti-topo II (CRB). Anti-nucleolina. (Ratón). Anti-IgM de rata. (anticuerpo 2º JIM 63).
Anti-IgM de ratón.	Oro de 10 nm	1/50 "	Anti-DNA Anti-P105 Nuclear Antigen. 780-3. (ICN).
Anti-IgG de ratón.	Oro de 10 nm	1/50-1/75	Anti-fibrilarina 92G3
Anti-IgM de rata. (Anticuerpo 2º JIM 63).	Sin marcador	1/500	JIM 63
Anti-IgG humana.	Oro de 10 nm	1/75	Anti- fibrilarina S ₄ .

APENDICE B: SOLUCIONES

1-

MEDIOS DE CULTIVO. DINOFLAGELADOS (V=100 ml)				
	ASP₁	ASP₂	ASP₇	DV
NaCl	2.4 g	1.8 g	2.5 g	1.8 g
KCl	0.06 g	0.06 g	0.07 g	0.06 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.6 g	0.5 g	0.9 g	0.5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.45 g			
Ca (como Cl ⁻)	40 mg	10 mg	30 mg	10 mg
NaNO ₃	10 mg	5 mg	5 mg	0.05 g
K ₂ HPO ₄	2 mg	0.5mg		3 mg
Na ₂ -glycerofosfato .5H ₂ O	2.5 mg		2 mg	
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O		15 mg	7 mg	20.5 mg
NaCO ₃ .H ₂ O		3 mg		
Fe (como Cl ⁻)		50 µg		
Mezcla metálica PII	1 ml	3 ml	3 ml	3 ml
B ₁₂	0.02 µg	0.2 µg	0.1 µg	
Mezcla vitamínica S3		1 ml	1 ml	
Mezcla vitamínica 8A	0.05 ml			0.1 ml
Acido nitrilotriacético		10 mg	7 mg	
Tris (hydroximethyl) amino metano	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Fe (como EDTA)				0.01 mg
pH	7.6	7.8	7.8-8.0	7.5-7.8

2-

MEZCLA ANTIBIOTICA AM9 (10 ml) (PROVASOLI)	
Polimixina	0.2 mg.
Estreptomicina	66 mg.
Tetraciclina	2.6 mg.
cloranfenicol	0.56 mg.
Penicilina	30 mg.
Neomicina	4 mg.

3-

MEDIO DE AISLAMIENTO DE NUCLEOS (pH=7.8)	
Goma arábica	2% P/V.
Glicerol	30% V/V.
Ficoll	1.25% P/V.
Dextrano	2.25% P/V.
Seroalbúmina bovina (BSA)	100 µg/ml.
Ácido etilendiamino tetracético (EDTA)	0.5 mM.
β-Mercaptoetanol	8 mM.
n-Octanol	4 mM.
Fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF)	1 mM.
Acetato magnésico (no añadir en caso de obtención posterior de nucleolos)	50 mM.
Dietilpirocarbonato	6.8 mM.

4-

TAMPON DE DISOCIACION 1D	
SDS	4%
Tris HCl 1 M pH=6.8	12%
Azul de bromofenol	0.01%
Glicerol	20%
DTT	0.1 M

5-

TAMPON DE ELECTRODOS 10X 1D	
Tris	30 g.
Glicina	144 g.
SDS	10 g.
H ₂ O	Hasta 1000 ml.

6-

COLORANTE DE GELES	
Metanol	50%
Ácido acético	10%
Azul de Coomassie R250	0.3%

7-

DECOLORANTE DE GELES	
Metanol	27%
Ácido acético	9%

8-

TAMPON DE DISOCIACION 2D	
Urea	8 m.
β -Mercaptoetanol	2%
Pharmalitos	2%
Triton X-100	0.5%
Azul de Bromofenol	Para dar color

9-

TAMPON DE EQUILIBRIO 2D	
Tris HCl 0.5 M pH=6.8	10%
Urea	6 M.
Glicerol	30%
SDS	1%
Azul de Bromofenol	Da color.

10-

TAMPONES DE TRANSFERENCIA. SISTEMA SEMISECO	
TAMPONES DE ANODO	
A) Metanol al 10% (V/V) en Tris 0.3 M pH=10.4.	B) Metanol al 10% (V/V) en Tris 25 mM pH=10.4.
TAMPON DE CATODO	
Metanol al 20% (V/V) en Tris 25 mM pH=10.4.	

15-

TAMPON TBE	
Tris base	89 mM
Ácido bórico	89 mM
EDTA	2 mM

16-

PBS 10X	
NaCl	8% P/V.
KCl	0.2% P/V.
Na ₂ HPO ₄	1.15% P/V.
KH ₂ PO ₄	0.2%