

## CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE $\beta$ -ACTINA NUCLEAR Y SU MOTOR ASOCIADO MN I EN PLANTAS: EVIDENCIA DE SU IMPLICACIÓN EN LOS FOCOS DE TRANSCRIPCIÓN Y ASOCIACIÓN AL NÚCLEOESQUELETO.

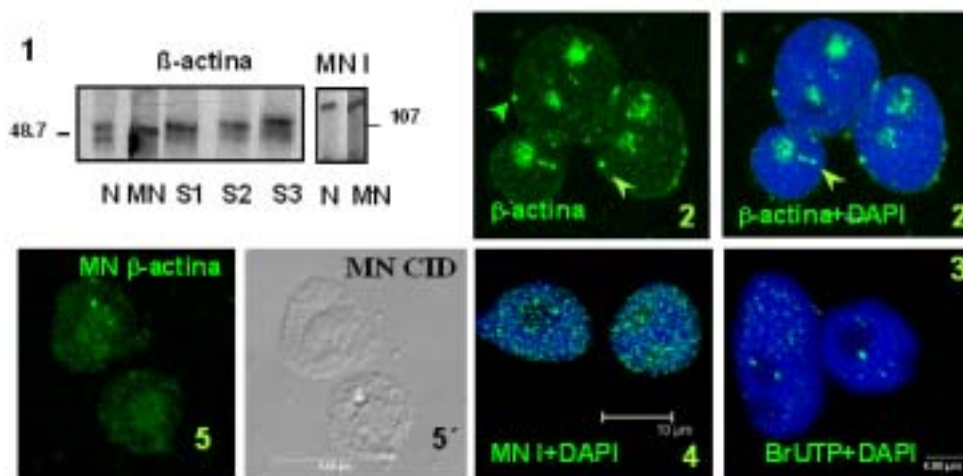
**Moreno Díaz de la Espina S y Cruz J R.**

Departamento Biología de Plantas. Centro Investigaciones Biológicas. CSIC. Ramiro de Maeztu 9. 28040 Madrid. España. Telef. 3491 8373112. FAX: 3491 652415209. [smoreno@cib.csic.es](mailto:smoreno@cib.csic.es)

La actina es un componente mayoritario del citoesqueleto con funciones fundamentales en señalización, transporte intracelular y organización estructural. El núcleo de vertebrados contiene una forma de  $\beta$ -actina implicada en transcripción/procesamiento de RNA, remodelación de cromatina, transporte y organización nuclear, así como varias ABPs y ARPs (1, 2). El citoesqueleto de actina en plantas está bien caracterizado, pero la existencia y funciones de esta proteína en el núcleo vegetal están por demostrar. Aunque existen evidencias de la conservación de ciertas ARPs nucleares como AtARP4 (un ortólogo de BAF53), las principales ABPs nucleares como la p 4.1, laminas y emerina no están conservadas en plantas.

Hemos analizado la presencia y distribución subnuclear de  $\beta$ -actina y su proteína motor miosina 1 $\beta$  (MNI) en el núcleo de células meristemáticas de *Allium cepa* con anticuerpos específicos para distintas configuraciones de actina y contra MN I y evaluado sus relaciones con los complejos de transcripción/ splicing, así como su asociación al núcleoesqueleto mediante *western blots*, inmunomarcado para microscopía confocal, experimentos de run-on *in situ*, tratamiento con inhibidores específicos de las RNA polimerasas I y II y extracciones nucleares. Nuestros resultados revelan homólogos nucleares de  $\beta$ -actina con distintas configuraciones y solubilidad asociados a los dominios de transcripción de las RNA polimerasa I y II y a una subclase de cuerpos de Cajal. La distribución nuclear de actina varía en diferentes tejidos de la raíz y en las células del meristemo quiescente ( $G_0$ ) se reubica en dominios específicos junto con otras proteínas del complejo de *splicing* (3). MN I presenta una distribución similar a la de  $\beta$ -actina en los focos de transcripción, pero su cinética de asociación es distinta mostrando una respuesta más rápida a la variación en los niveles de transcripción.

Para investigar la implicación de la  $\beta$ -actina en la organización nuclear de plantas, hemos analizado su distribución en el núcleoesqueleto, constituido por un entramado de filamentos ramificados con una lámina periférica, nucleolo y cuerpos nucleares asociados (4), y sus relaciones topológicas con las NIFs que son componentes de los núcleofilamentos (5). Nuestros resultados revelan la asociación de  $\beta$ -actina y MNI al núcleoesqueleto, a pesar de no estar conservadas las principales ABPs nucleares implicadas ni las proteínas largas *coiled-coil* que organizan el núcleoesqueleto contráctil que son fundamentales para la organización estructural del núcleo de vertebrados (5). En plantas existen varias proteínas estructurales de tipo *coiled-coil* específicas como NMCP1, NuMA (4), NIFs (5) y los homólogos funcionales de laminas (7) que serían candidatas a estas funciones.



1.- Western blots representativos que revelan la existencia de fracciones de  $\beta$ -actina en el núcleo (N) con diferente solubilidad, extraíbles mediante detergente (S1), DNasa y fuerza iónica moderada (S2), y alta fuerza iónica (S3), una de ellas asociada al núcleoesqueleto (MN) (ver procedimientos de extracción en ref.4). Su proteína motor MN I también se encuentra en el núcleo (N) y núcleoesqueleto (MN). 2.- Distribución nuclear de  $\beta$ -actina mediante IF confocal con los mismos anticuerpos. La proteína se acumula en los focos de transcripción de las RNAPol I y II. La fusión de las imágenes de  $\beta$ -actina (verde) y DAPI (2') muestra los focos de la RNA pol I enclaustrados en el nucleolo y los de la RNA pol II dispersos en el nucleoplasma. Su distribución es similar a la de MN I (4) y a la de los sitios de transcripción activa revelados mediante experimentos de *run-on in situ* tras un pulso de Br-UTP (5), aunque estos últimos son mas escasos y de menor tamaño ya que detectan exclusivamente la transcripción durante un pulso con el nucleótido marcado, mientras que actina forma parte del complejo de la polimerasa y también de los complejos de *splicing* cotranscripcional.  $\beta$ -actina se asocia también a un subgrupo de cuerpos de Cajal (CBs) (flecha) y produce un tenue marcado de los filamentos de los dominios intercromatínicos del núcleo (2). 4.- La MN I se detecta en focos de transcripción pero no en los CBs. 5.- La  $\beta$ -actina del núcleoesqueleto se acumula en los núcleofilamentos y en los dominios correspondientes al esqueleto nucleolar, como revela la superposición de las imágenes de marcado y contraste interdiferencial (CID) (5 y 5').

### Referencias:

- 1.- Bettinger et al (2004) *Nat Rev Mol Biol Cell Biol* 5, 410.
- 2.- Kiseleva et al. (2004). *J Cell Sci* 117, 2481-2490
- 3.- Cui and Moreno Díaz de la Espina (2003) *Planta* 217, 21-31.
- 4.- Yu and Moreno Díaz de la Espina (1999). *Exp Cell Res* 246, 516.
- 5.- Blumenthal et al. (2004). *Planta* 218, 965-975.
- 6.- Qi et al. (2005). *J Cell Biochem* 95, 1284-1291.
- 7.- Mínguez and Moreno Díaz de la Espina (1993). *J Cell Sci* 106, 431.