



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Marco Álvarez S.

Departamento de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional Andrés Bello

Profesor Co-Patrocinante

Dr. Jaime Figueroa V.

Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad Austral de Chile

**ESTUDIO DE LA PROTEOMICA NUCLEAR DEL PEZ *CYPRINUS*
CARPIO DURANTE EL PROCESO DE ACLIMATIZACIÓN
ESTACIONAL**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

LAURA INÉS GUAJARDO CÁCERES

VALDIVIA – CHILE

2005

*A mis padres Juan y Carmen por estar siempre conmigo
A mis hermanas Susana, Alicia y Cecilia
A mis sobrinos*

AGRADECIMIENTOS

Mis primeras palabras de agradecimiento son para mi familia, en especial para mis padres por su cariño incondicional y constante apoyo. A mis hermanas y a mis sobrinos Felipe, Nicolás, Antonia, Amanda, Alejandra, Amapola y Agustín.

Al Dr. Marco Álvarez por permitirme formar parte de este proyecto de investigación, guiarme y apoyarme en esta etapa de mi formación profesional.

A la Dra. María Inés Vera y al Dr. Alfredo Molina del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello, por los consejos oportunos y por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A la Dra. Gudrum Kausel y al Dr. Jaime Figueroa del Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral de Chile, por aceptar formar parte de la comisión de mi tesis.

Quiero agradecer especialmente a Lidia Zúñiga de la Unidad de Reproducción y Desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas, PUC, por su ayuda en la realización experimental de mi tesis.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, tanto de pre-grado como de post-grado, especialmente a Gino, Iselys y Naty.

A Claudita, Cristina, Pamela, Soledad, Rody y Verónica, por los gratos momentos compartidos, por su cariño y amistad.

A mi gran amiga Danae, por su amistad incondicional y gran apoyo durante todos estos años especialmente los vividos en Valdivia.

Esta tesis fue financiada por el proyecto 1040197 del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, FONDECYT.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDOS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCION	3
3. MATERIALES Y METODOS	11
3.1 MATERIALES	11
3.1.1 Equipos	11
3.1.2 Reactivos	11
3.1.3 Soluciones	12
3.2 METODOS	13
3.2.1 Peces para experimentación	13
3.2.2 Purificación de núcleos de hepatocitos de carpa	13
3.2.3 Cuantificación de proteínas	14
3.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	14
3.2.5 Tinción del gel	15
3.2.6 Análisis de <i>Western Blot</i>	15
3.2.6.1 Electrotransferencia	15
3.2.6.2 Inmunodetección de nucleolina	16
3.2.6.3 Inmunodetección de macroH2A	16
3.2.6.4 Inmunodetección de β-actina	17

3.2.7	Geles bidimensionales (2D-PAGE)	17
3.2.7.1	Preparación de la muestra	17
3.2.7.2	Isoelectroenfoque	18
3.2.7.3	Equilibrio IPG <i>Strip</i>	20
3.2.7.4	Segunda dimensión (SDS-PAGE)	20
3.2.8	Tinción con plata	21
3.2.9	Análisis de geles SDS-PAGE y <i>Western blot</i>	21
3.2.10	Análisis de geles 2D	21
4.	RESULTADOS	23
4.1	Aislamiento de núcleos de tejido hepático de carpas aclimatizadas	23
4.2	Comparación de los perfiles proteicos de las fracciones aisladas de hepatocitos de carpas aclimatizadas a verano e invierno en geles unidimensionales	23
4.3	Evaluación del grado de pureza y enriquecimiento en la fracción de proteína nucleares mediante ensayos de <i>Western blot</i>	26
4.3.1	Nucleolina	26
4.3.2	macroH2A	28
4.3.3	β-actina	28
4.4	Evaluación de la expresión estacional de las proteínas nucleares nucleolina, nucleofosmina (B23) y macroH2A mediante ensayos de <i>Western blot</i>	28
4.4.1	Nucleolina	31
4.4.2	Nucleofosmina	31
4.4.3	MacroH2A	35

4.5	Análisis comparativo de extractos de proteínas nucleares correspondientes a carpas aclimatizadas a verano e invierno en geles bidimensionales (2-D)	35
4.6	Caracterización del perfil de proteínas nucleares en geles bidimensionales	37
4.7	Análisis de los cambios en los niveles de expresión de proteínas nucleares fraccionadas en geles bidimensionales y representativos de ambas condiciones de adaptación	39
5.	DISCUSION	45
6.	BIBLIOGRAFIA	54

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	
Aislamiento de núcleos de hepatocitos de carpas aclimatizadas a verano e invierno	24
Figura 2	
Separación electroforética de fracciones proteicas obtenidas durante las etapas de aislamiento de núcleos de hepatocitos de carpas aclimatizadas	25
Figura 3	
Análisis del enriquecimiento de las fracciones nucleares utilizando la proteína nucleolina como marcador molecular	27
Figura 4	
Análisis del enriquecimiento de las fracciones nucleares utilizando la proteína macroH2A como marcador molecular	29
Figura 5	
Análisis del grado de pureza de las fracciones nucleares mediante la inmunodetección de la proteína β -actina como marcador molecular citoplasmático	30
Figura 6	
Evaluación de la expresión génica de la proteína nucleolina en fracciones nucleares de carpas aclimatizadas a verano e invierno	32
Figura 7	
Cuantificación de la expresión estacional de nucleolina de carpa	33

Figura 8

Estudio de la expresión estacional de las proteínas B23 y macro H2A en extractos nucleares de carpas aclimatizadas a verano e invierno 34

Figura 9

Comparación de los perfiles proteicos de extractos nucleares fraccionados en geles 2D provenientes de hepatocitos de carpas aclimatizadas a verano e invierno 36

Figura 10

Identificación en geles bidimensionales de proteínas nucleares que presentan una expresión mayoritaria durante la estación veraniega 42

Figura 11

Identificación en geles bidimensionales de proteínas nucleares que presentan una expresión mayoritaria durante la estación invernal 44

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1	
Informe general del análisis informático obtenido a partir de fraccionamientos en geles 2D de extractos nucleares de hepatocitos de carpas aclimatizadas a verano e invierno	38
Tabla 2	
Análisis de la expresión de proteínas que no presentan variación significativa en su contenido entre las estaciones de verano e invierno	40
Tabla 3	
Análisis de las proteínas que presentan un mayor contenido durante la estación veraniega	41
Tabla 4	
Análisis de las proteínas que presentan un mayor contenido durante la estación invernal	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosíntrifosfato
BSA	albúmina de suero bovino
CFD	Componente fibrilar denso
CG	Componente granular
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
GAR	Dominio rico en residuos glicina y arginina
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IEF	Isoelectroenfoque
IPG	Gradiente de pH inmovilizada
ITS2	Espaciador del transcrito interno 2
kDa	1000 daltons
L	litros
mRNA	RNA mensajero
MyHC	Cadena pesada de miosina
NLS	Señal de localización nuclear
nm	nanómetros
NOR	Regiones organizadoras del nucléolo
NP-40	nonidet P 40
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	tampón fosfato salino
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
RBD	Dominios de unión a RNA
rDNA	DNA ribosomal
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
rRNA	RNA ribosomal

SDS	dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
Tris	ácido tris-(hidroximetil)-aminometano
tRNA	RNA de transferencia
TTBS	Tampón (tween) tris salino
Tween 20	Monolaurato de polioxietilen sorbitan
U	unidad o unidades
V	Volt

1. RESUMEN

La aclimatización estacional del pez *Cyprinus carpio* desencadena diversos mecanismos moleculares que sustentan la homeostasis requerida para la supervivencia del organismo. En este contexto, se ha demostrado que procesos fundamentales tales como la transcripción o la traducción se ven afectados en el transcurso de dicha adaptación. Actualmente, existen claras evidencias que señalan que el proceso de adaptación involucra una reprogramación de la expresión génica. En la carpa, una de las características celulares más sobresalientes es la reorganización de los componentes nucleolares durante el ciclo de adaptación estacional. De acuerdo a estos antecedentes, es manifiesto que tal característica requiere de una delicada regulación y por tanto una activa participación de factores proteicos que coordinan este fenotipo ultraestructural. En consecuencia, esta investigación concentró su interés en el estudio proteómico de extractos nucleares aislados de hepatocitos de carpas aclimatizadas. Nuestros resultados permitieron comprobar que factores relevantes en la función nuclear tales como nucleolina, macroH2A y B23, presentan una expresión génica diferencial concomitante al proceso adaptativo, y consistentes con los roles regulatorios descritos para estas proteínas. Igualmente, hemos realizado por primera vez un análisis global de la expresión estacional de las proteínas nucleares asociado al fenómeno de aclimatización. Los estudios proteómicos revelaron que aproximadamente un 65% de las proteínas nucleares no cambian ostensiblemente en su contenido durante el ciclo estacional, sin embargo, al menos un 20% de ellas se ve afectada por el proceso de adaptación. Sobre la base de este análisis, hemos seleccionamos un conjunto de proteínas representativas de estaciones opuestas (verano e invierno) para su posterior identificación mediante espectrometría de masa. La caracterización de estas poblaciones de proteínas permitirá entender de mejor manera el intrincado proceso que conlleva la aclimatización estacional.

1.1 SUMMARY

The seasonal acclimatization of the carp *Cyprinus carpio* triggers diverse molecular mechanisms that sustain the homeostasis that is required for the survival of the organism. In this context, it has been shown that fundamental processes such as transcription and translation, are affected during the process of adaptation. Currently, clear evidence indicates that this adaptational process involves a reprogramming of the genetic expression. In the carp, one of the most outstanding cellular characteristics is the reorganization of the nucleolar components during the cycle of seasonal adaptation. According to these findings, it is clear that such a characteristic requires a delicate regulation and therefore an active participation of protein factors that coordinate this ultrastructural phenotype. Thus, this investigation focused on the proteomic study of nuclear extracts of hepatocytes isolated from acclimatized carps to summer and winter. Our results showed that important nuclear factors such as nucleolin, macroH2A and B23, display a differential genetic expression along the adaptive process, which is in agreement with the regulatory roles described for these proteins. Also, we have done for the first time a global analysis of the seasonal expression of nuclear proteins associated to the acclimatization phenomenon. The proteomic studies revealed that approximately 65% of the nuclear proteins do not change significantly their expression levels during the seasonal cycle. Nevertheless, at least 20% of them is affected by the adaptation process. Based on this analysis, we have selected a representative protein set from each season for further identification by mass spectrometry. The characterization of these protein populations will allow a better understanding of the intricate process that entails seasonal acclimatization.

2. INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos son sistemas abiertos que se encuentran en constante intercambio de materia y energía con su hábitat. En consecuencia, ellos se ven afectados por diversas propiedades físicas de su medio ambiente tales como temperatura, concentración iónica, presión de oxígeno, luminosidad, concentración de nutrientes, estímulos mecánicos, magnéticos y eléctricos (Prosser, 1986). En la mayoría de las ocasiones, dichos factores actúan simultáneamente presentado además fluctuaciones cíclicas concomitantes a los distintos períodos estacionales (por ejemplo: temperatura y fotoperíodo). En todos estos casos, el individuo necesita obligatoriamente generar respuestas adaptatorias ante tales estímulos naturales, las cuales en su conjunto configuran el denominado proceso de **aclimatización estacional**. Un notable ejemplo de lo anterior lo constituyen los peces ectotermos euritermales.

El pez *Cyprinus carpio* (carpa) es un ectotermo euritermal que genera respuestas compensatorias a los efectos que producen en su metabolismo cambios en parámetros ambientales tales como temperatura y fotoperíodo. Dichos cambios son transducidos a señales moleculares, que redundan en una reprogramación cíclica de las funciones celulares (Oñate *et al.*, 1987; Vera *et al.*, 1993; Figueroa *et al.*, 1994; Vera *et al.*, 1997; Kausel *et al.*, 1999a).

Desde un punto de vista fisiológico, las adaptaciones compensatorias tienen importantes efectos sobre el gasto energético requerido para procesos biológicos elementales tales como la respiración, el crecimiento, la alimentación, la reproducción y la locomoción. Por ejemplo, en la carpa y otros teleósteos, durante la estación invernal se ha observado que algunas señales neuromusculares pueden ser modificadas tanto en la duración del estímulo del nervio motor como en los tiempos de activación y relajación muscular en respuesta al descenso de la temperatura (Johnston y Temple, 2002; Cole *et al.*, 2004). De igual manera, se ha observado que la carpa

adulta expresa dos isoformas distintas de la cadena pesada de la miosina (MyHC) como consecuencia de los cambios de temperatura producidos durante la aclimatización (Cole *et al.*, 2004). Por otro lado, las adaptaciones de las características y capacidades mitocondriales también son cruciales durante la aclimatización a la estación fría de los ectotermos marinos. Cuando dichos organismos están expuestos a temperaturas frías, estos deben compensar el efecto del descenso de la temperatura de su hábitat y mantener el equilibrio funcional entre la formación y la demanda de ATP, aumentando la densidad mitocondrial y/o la capacidad de las enzimas mitocondriales (Itoi *et al.*, 2003; Lucassen *et al.*, 2003).

Junto a lo anteriormente expuesto y desde el punto de vista molecular, ha sido claramente demostrado que el proceso de adaptación estacional conlleva además una reprogramación a nivel de expresión génica. Así, este proceso permite regular y proporcionar las condiciones homeostáticas que estos peces ectotermos requieren para sobrevivir (Segner y Braunbeck, 1990; Goldspink, 1995; Tiku *et al.*, 1996; Hirayama y Watabe, 1997; Figueroa *et al.*, 1997; Hirayama *et al.*, 1998; Arends *et al.*, 1998).

La carpa, al igual que todas las especies ectotérmicas euritermales, debe adaptarse a las variaciones estacionales de su medio ambiente. En estas condiciones, dicho pez se ve confrontado a marcados cambios en parámetros físicos de su hábitat. En particular, estudios en los ecosistemas que representan los ríos del sur de Chile, han demostrado variaciones ostensibles de la temperatura del agua, alcanzando rangos iguales o superiores a los 10°C (Campos *et al.*, 1974).

Con anterioridad, nuestro laboratorio ha puesto en evidencia que el proceso de aclimatización estacional al cual está sometida la carpa, involucra cambios significativos tanto a nivel transcripcional como de síntesis de proteínas (Sáez *et al.*, 1984). Particularmente, se ha observado que los efectos moleculares derivados del proceso adaptativo de carpa se reflejan en la actividad del compartimiento nuclear más prominente: el nucléolo (Vera *et al.*, 1993; Vera *et al.*,

1997; Vera *et al.*, 2000; Álvarez *et al.*, 2004). Este suborganelo nuclear ocupa una parte importante del nucleoplasma de las células eucariotas, variando de tamaño y número según el tipo celular analizado y el estado fisiológico de la célula (Visintin y Amon, 2002). Principalmente, ello estaría directamente vinculado al desarrollo de la función más importante de este compartimiento: la biogénesis ribosomal (Mélène y Xue, 1995; Olson *et al.*, 2002). El nucléolo es un dominio funcional que se origina a partir de las regiones organizadoras del nucléolo (NOR) constituidas por múltiples copias de genes que codifican para los RNAs ribosomales 28S, 18S y 5.8S (Mélène y Xue, 1995). En torno a ellas, es posible distinguir al menos tres componentes nucleolares básicos: el componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y la heterocromatina. Las características ultraestructurales de cada uno de estos compartimentos está en directa relación con las diferentes etapas de la biogénesis ribosomal (Schwarzacher y Wachtler, 1993).

Los ribosomas eucarióticos se ensamblan en el nucléolo antes de ser exportados al citoplasma. Este es un proceso altamente dinámico y se encuentra regulado en todos los pasos de su biosíntesis (síntesis, procesamiento, modificación de los pre-rRNAs y ensamblaje con proteínas ribosomales) (Fatica y Tollervey, 2002). Interesantemente, nuevas evidencias han permitido atribuir funciones insospechadas para el nucléolo tales como la maduración de tRNAs, exportación de RNAs vírales, regulación del ciclo celular y envejecimiento (Roix y Misteli, 2002).

Se ha observado que en células activas en síntesis ribosomal, los nucléolos aparecen prominentes y sus componentes altamente entremezclados. Por el contrario, después de bloquear la actividad de la RNA polimerasa I con el antibiótico Actinomicina D, los componentes nucleolares se observan segregados (Thiry y Goessens, 1996). Un efecto similar ha sido descrito en hepatocitos de rata sometidos a shock hipotérmico, donde dichos componentes se separan

parcialmente aunque sin alcanzar una segregación clásica, siendo este un fenómeno reversible al aumentar la temperatura (Puvion *et al.*, 1977).

En este contexto, se ha descrito que el rasgo ultraestructural más importante que se observa durante la aclimatización estacional de la carpa es la reorganización de los componentes nucleolares. Estudios de microscopía electrónica en hepatocitos de carpas aclimatizadas a la estación invernal, permitieron revelar una clara redistribución de estos componentes (Sáez *et al.*, 1984; Vera *et al.*, 1993a). Dicha segregación se produce en forma natural y se encuentra asociada a una inactivación temporal de la síntesis del RNA ribosomal. Inversamente, el aspecto integrado de los componentes nucleolares de hepatocitos de carpa adaptadas a verano, es una clara indicación de la síntesis activa de este tipo de RNA (Vera *et al.*, 1993).

En la actualidad es sabido que el nucléolo es una estructura altamente dinámica que está en constante comunicación con el nucleoplasma y con otros dominios nucleares (Chen y Huang, 2001). Hace pocos años atrás, fue establecida por primera vez la composición proteica del nucléolo (Andersen *et al.*, 2002; Scherl *et al.*, 2002). En este contexto, la identificación de una población de alrededor de 350 proteínas, junto con la identificación de una variedad de procesos biológicos a los cuales estas proteínas están asociadas, ha permitido reforzar el concepto actual de una “plurifuncionalidad” de este compartimiento nuclear. En particular, a partir del trabajo de Andersen y col. (2002), fue posible establecer cambios notables del proteoma nucleolar, por ejemplo en respuesta a la inhibición de la transcripción con el antibiótico actinomicina D. De la misma manera, existen evidencias de un rápido intercambio de proteínas no ribosomales tales como UBF, B23, nucleolina y fibrilarina, entre el nucléolo y nucleoplasma durante la interfase (Chen y Huang, 2001). Entre estas proteínas de rápida movilidad, son de particular interés las proteínas nucleolares nucleolina y nucleofosmina (B23).

Nucleolina es la proteína no ribosomal más abundante del nucléolo y cuya función principal ha sido asociada a la regulación de la biogénesis ribosomal (Ginisty et al., 1999). Sin embargo, posteriores antecedentes han permitido postular a nucleolina como una proteína multifuncional (Tuteja y Tuteja, 1998) Por otro lado, la proteína B23 es una proteína nucleolar que, al igual que nucleolina, se encuentra involucrada en el proceso de biogénesis ribosomal, en particular asociada a la etapa de ensamblaje de las partículas ribosomales (Huang *et al.*, 2005).

En términos generales, la reprogramación génica (concomitante al proceso de aclimatización estacional de la carpa) sin duda debe involucrar mecanismos de regulación transcripcional hasta ahora no dilucidados. Por tal circunstancia, los factores proteicos asociados a este control deberían reflejarse en el proteoma de ambas condiciones adaptativas en la carpa. Dentro del conjunto de proteínas involucradas en los mecanismos regulatorios de la transcripción, las histonas juegan un rol crítico en la regulación epigenética de la transcripción al formar parte integral de los nucleosomas en el DNA. En este contexto, recientemente se ha puesto en evidencia el rol mayor que podría desempeñar la proteína macroH2A, una variante de la histona canónica H2A, la cual tendría una marcada actividad inhibitoria de la transcripción (Perche *et al.*, 2003). Dicha proposición se basa en el enriquecimiento de macroH2A observada en el cromosoma X inactivo de las hembras de mamíferos (Chadwick y Willard 2002). En la carpa, recientemente se ha reportado que existe un marcado aumento de la expresión de macroH2A durante la estación fría (Pinto *et al.*, 2005). Esta observación, sumado a un significativo incremento en el grado de metilación del DNA, han permitido sugerir que ambos mecanismos moleculares pueden cumplir roles esenciales en la remodelación de la cromatina y la regulación de la expresión génica durante la estación invernal.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, el análisis del repertorio de las proteínas solubles de la fracción nuclear resulta de particular interés para aumentar el conocimiento de los

mecanismos moleculares que estarían involucrados en el proceso de aclimatización estacional. En particular, proteínas tales como nucleolina, B23 y macro H2A surgen lógicamente como interesantes candidatos para esta regulación.

La proteómica, que es un campo de la ciencia post-genómica, apunta a dilucidar las redes funcionales de los sistemas biológicos mediante un análisis directo de las proteínas expresadas (Takahashi *et al.*, 2003). Así, mediante este análisis es posible poner en evidencia el contenido proteico total de un tejido, célula o compartimiento. En la actualidad, es sabido que la población de proteínas que reside en cada compartimiento celular se origina en respuesta a las variaciones de su entorno. En consecuencia, esta puede verse alterada por cambios de concentración, localización o transformación en respuesta a una condición biológica específica (Dreger, 2003). De esta manera, la proteómica aparece como un área de investigación que permite estudiar la dinámica de la expresión génica que acompaña a múltiples procesos celulares (incluyendo desórdenes biológicos) manifestados en la localización, modificación e interacciones entre proteínas (Takahashi *et al.*, 2003).

Diversos estudios bioquímicos, análisis *in vivo*, y estudios proteómicos, han contribuido a aumentar el conocimiento acerca de los factores reguladores y vías de señalización, que aparecen como indispensables para el control de los genes que regulan la proliferación, diferenciación y otros procesos celulares (Stein *et al.*, 2004). El conocimiento actual demuestra que la puesta en función de estos mecanismos reguladores requiere de una enzimología compleja (Stein *et al.*, 2003). La mayoría de las proteínas que desempeñan estas funciones son altamente reguladas por modificaciones post-traduccionales tales como, fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones, glicosilaciones, etc. Consecuentemente, es esperable que un cambio en el estado metabólico de una célula se traduzca directamente en un cambio en su proteoma. De esta manera, el proteoma

de una célula correspondería al resultado final de la expresión génica, síntesis ribosomal y degradación proteolítica en un estado definido (Dreger, 2003a).

Las modificaciones post-traduccionales son eventos que provocan cambios en las propiedades de las proteínas. Ellas pueden contemplar eventos proteolíticos o bien adición de un grupo específico a uno o más aminoácidos. Es sabido que tales modificaciones pueden determinar en una proteína su estado activo, localización, recambio o interacción con otras proteínas. En señalización por ejemplo, las cascadas de quinasas son activadas o desactivadas por la adición y remoción reversible de un grupo fosfato, así como la ubiquitinación en el ciclo celular marca a las ciclinas para su posterior destrucción (Mann y Jensen, 2003). Los estudios de las modificaciones post-traduccionales, han proporcionado las claves para dilucidar un sinnúmero de procesos biológicos. Por ejemplo diversas proteínas reguladoras, incluyendo los reguladores del ciclo celular y factores de transcripción, contienen un sitio de fosforilación dentro o adyacente a una señal de localización nuclear (NLS). En consecuencia, la importación nuclear de una proteína puede estar regulada por fosforilaciones de estos sitios (Harreman *et al.*, 2004).

De acuerdo a los antecedentes anteriormente expuestos, un análisis proteómico del repertorio de proteínas solubles de la fracción nuclear de hepatocitos de carpa nos permitiría aportar con nuevos antecedentes para comprender de mejor manera el complejo proceso molecular que conlleva el proceso de adaptación estacional en el pez *C. carpio*.

En este contexto, nuestra **hipótesis de trabajo** sostiene que: ***“Existe una reprogramación génica asociada al proceso de adaptación estacional en el pez *C. carpio*, cuya acción se ve reflejada en cambios del repertorio de proteínas nucleares presentes en verano e invierno”***.

En consecuencia, para evaluar esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos generales y específicos:

Objetivo General

Nos proponemos comparar y analizar los perfiles proteicos de extractos nucleares de hepatocitos de *C. carpio* representativos de los estados de adaptación correspondientes a invierno y verano. Esperamos de esta forma evidenciar experimentalmente por primera vez cambios en el proteoma del compartimiento nuclear de la carpa, concomitante al proceso de adaptación estacional.

Objetivos Específicos

1. Establecimiento de un protocolo estándar de aislamiento de extractos nucleares en hepatocitos de carpa aclimatizadas a verano e invierno para ensayos de proteómica.
2. Análisis de patrones de expresión de las proteínas macroH2A, nucleolina y B23, proteínas asociadas a la función nucleolar.
3. Evaluación global de los patrones de expresión de proteínas nucleares en condiciones de adaptación estacional mediante ensayos en geles bidimensionales.
4. De acuerdo a los análisis de los proteomas nucleares realizados en ambas estaciones, y teniendo en consideración particularmente aquellas que presentan una expresión diferencial, pretendemos seleccionar un cierto número de proteínas “candidatas” para una posterior identificación por espectrometría de masa.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Equipos

De *BIO-RAD*: Cámara de electroforesis Mini-PROTEIN® 3 Cell, Cámara de electroforesis Mini-PROTEIN® 3 Dodeca™ Cell, Cámara de transferencia Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Fuente de poder *POWER PAC* 1000, Sistema de isoelectroenfoque PROTEIN® IEF Cell, Sistema de preparación de geles (PAGE-SDS) PROTEAN® II xi Multi-Gel Casting Chamber.

Agitador magnético de *Cole Parmer* modelo Vela™, Agitador tipo balancín de *Cole Parmer*, balanza analítica de *Scientech* modelo SA 80, cámara de Neubauer BOECO Germany, centrifuga refrigerada *Hettich* modelo MIKRO 22R, centrífuga *Medilite* modelo Termo IEC, Homogenizador Ultraturrax® IKA T18 basic; Lector de absorbancia para placas de 96 pocillos de *Bio-Tek Instrument, Inc.*, modelo *EL_x 800*, Microscopio óptico OLYMPUS BX41, Sonicador Autotune Series, *High Intensity Ultrasonic Processor* (Model 130 Watt), Scanner Epson Perfection 1670.

3.1.2 Reactivos

De *Sigma Chemical Co.*, se obtuvo el anticuerpo monoclonal anti - β -actina de músculo liso, (N° A5441), y los siguientes reactivos: AgNO₃, Azul de bromofenol, Azul de coomassie R-250, Azul de tripán 0.4%, Desoxiribonucleasa I, DTT, EDTA, Na₂CO₃, Ribonucleasa A, TEMED, Tiosulfato de sodio, Rojo Ponceau S.

De *Winkler Ltda.*, se obtuvieron los reactivos: Agarosa, NaHCO₃, MgCl₂, KCl, NaCl, NaH₂PO₄, Glicerol, Glicina, NaOH, Nonidet (NP-40), Marcador de proteínas rango amplio (14-

116 kDa), marcados de proteínas preteñido (19-118 kDa), Dodecil sulfato de sodio (SDS), Tris base, Ácido acético 90%, Etanol 70%.

De **Merck** se adquirió: Ácido clorhídrico fumante 37% p.a., Formaldehído 37%, Etanol, Isopropanol, Glicerol, Ácido acético, β -mercaptoetanol, fosfato de sodio primario, fosfato de sodio secundario, Sacarosa, Tween 20.

De **BioRad** se obtuvieron: kit de cuantificación de proteínas *D_c Protein Assay*, Membrana de nitrocelulosa Trans-Blot[®] Transfer Medium, Urea, Acrilamida, N,N'-metilén-bis-acrilamida, Aceite mineral, Anfolito rango de pH 3-10, Anfolito rango de pH 4-7, IPG ReadyStrip de pH (3-10) y pH (4-7), de 7cm, Iodoacetamida, CHAPS, 2D SDS-PAGE Standards.

De **KPL, USA** se adquirieron: los anticuerpos secundarios Anticuerpos anti-IgG (H+L) de ratón y conejo conjugados a peroxidasa.

De **Roche Diagnostic**, Alemania., se obtuvo el cóctel de inhibidores de proteasas *Complete*.

De **GIBCO BRL.**, se obtuvo PMSF.

De **Schleicher y Schuell.**, se adquirió la membrana de nitrocelulosa OPTITRAN

De **PIERCE** se obtuvo el *kit* de quimioluminiscencia *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*.

3.1.3 Soluciones

PBS 1X: NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM

TTBS 1X: Tris-HCl 0,2 M pH 7.6, NaCl 0,13M, Tween 0,1 %

3.2 METODOS

3.2.1 Peces para experimentación

Las carpas (*Cyprinus carpio*), fueron capturadas durante las estaciones de verano e invierno y mantenidas en condiciones naturales de aclimatización (Lampa, Santiago) al menos tres semanas antes de realizar los experimentos. La temperatura del agua fue controlada constantemente durante el ciclo anual determinándose que esta varía entre 7-10°C en invierno y 18-22°C en verano. La alimentación fue dada por residuos en suspensión del mismo hábitat y esporádicamente suplementado con alimento comercial sólido. Las muestras de tejido hepático de peces aclimatizados a verano e invierno fueron disectados, limpiados y fraccionados en muestras de 3 g las cuales fueron rápidamente congeladas y almacenadas en freezer de -80°C.

3.2.2 Purificación de núcleos de hepatocitos de carpa

Se aislaron núcleos de hepatocitos de carpas aclimatizadas a verano e invierno según los protocolos modificados de Andersen *et al.*, (2002) y Scherl *et al.*, (2002). Una muestra de 3 g de tejido hepático fue lavado brevemente con PBS 1X (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10mM y KH₂PO₄ 2mM) y se procedió a extraer cuidadosamente con pinza fina todas aquellas fibras de tejido conectivo contaminante. Una vez limpia la muestra, esta se homogeneizó con un Ultraturrax en 20ml de tampón sacarosa 0,25M, CaCl₂ 3mM, Tris-HCl 20mM; pH (7,4), PMSF 0,1mM a 4 °C. El homogeneizado se filtró a través de gasa y se lavó dos veces con 10ml del mismo tampón de homogenización. El filtrado obtenido corresponde a la fracción que denominamos fracción de proteínas totales. Luego, este filtrado fue centrifugado a 228 x g durante 10 min a 4°C. El sedimento obtenido corresponde a la denominada fracción nuclear y el sobrenadante es la fracción citoplasmática. El sedimento de núcleos fue lavado tres veces con 10 ml de tampón PBS y posteriormente resuspendido en 3ml de sacarosa 0,25M, MgCl₂ 10mM,

PMSF 0,1mM. Luego, la suspensión de núcleos fue depositada sobre una solución de 30 ml de sacarosa 0,88M, MgCl₂ 0,05mM, PMSF 0,1mM y centrifugado a 2000 x g por 10 min a 4 °C. Durante las diferentes etapas de purificación, las muestras fueron controladas en su integridad y pureza mediante observaciones al microscopio de luz tiñendo los núcleos con azul de tripán 4%, en una proporción 1:1. Finalmente el sedimento nuclear se resuspendió en 1ml de tampón sacarosa 0,34M, MgCl₂ 0,05mM, PMSF 0,1mM.

Cuando la fracción nuclear fue utilizada para experiencias de isoelectroenfoque (IEF), luego del último paso de centrifugación, las muestras fueron resuspendidas directamente en PBS 1X, EDTA 5mM, e inhibidores de proteasas, *Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche, USA). Los núcleos aislados fueron cuantificados en una cámara de Neubauer.

3.2.3 Cuantificación de proteínas

Las diferentes fracciones proteicas fueron cuantificadas utilizando el Kit DC TM Protein Assay (Bio-Rad, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizó una curva de calibración utilizando albúmina sérica de bovino (BSA) como estándar. Se prepararon soluciones estándar de BSA a las siguientes concentraciones: 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 mg/ml. Las muestras y las soluciones estándar se midieron por triplicados a una absorbancia de 630nm en un lector de microplacas *Bio-Tek Instrument, Inc.*, Modelo *EL_x 800*.

3.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las distintas muestras obtenidas durante la purificación nuclear fueron fraccionadas en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes preparados de acuerdo a la metodología descrita por Sambrook y Russell (2001). En la preparación de los geles se utilizó un gel separador 12%T; 1,3%C y un gel espaciador 6%T; 0,7%C.

Las muestras fueron preparadas mezclando 15 µg de proteína con tampón de carga Tris-HCl 62,5 mM, pH (6,8), SDS 1%, glicerol 10%, DTT 100 mM y trazas de azul de bromofenol. Las muestras fueron hervidas durante 3 min e inmediatamente depositadas en el gel. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 h a 70 V con el tampón de corrida Tris 25mM, glicina 250 mM; (pH 8,3), SDS 0.1 %. De manera sistemática se fraccionaron simultáneamente 2 geles idénticos, el primero para tinción directa y su replica, transferida a membranas de nitrocelulosa para análisis posteriores de *western blot*.

3.2.5 Tinción del gel

Una vez finalizadas las corridas electroforéticas los geles de poliacrilamida fueron incubados durante 10 min en una solución de tinte (metanol 50% v/v; ácido acético 10% v/v; azul de coomassie R-250 0,25%, p/v). Posteriormente, se incubó el gel con solución para desteñir (metanol 30% - ácido acético 10%) hasta eliminar el exceso de colorante.

3.2.6 Análisis de *Western blot*

3.2.6.1 Electrotransferencia

Para la realización de las experiencias de *Western blot*, los geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa durante 1 h a 500 mA en tampón Tris 48 mM; glicina 39 mM; metanol 20%; SDS 0,0375% (Sambrook *et al.*, 2001). Al final de la electrotransferencia, y con el objeto de evaluar el rendimiento de la transferencia, se colorearon las membranas con una solución de rojo Ponceau S 0,1% en ácido acético 5% durante 1 min. El exceso de colorante fue eliminado incubando la membrana con PBS 1X.

3.2.6.2 Inmunodetección de nucleolina

Para detectar la presencia de nucleolina en las distintas fracciones proteicas, se incubó la membrana de nitrocelulosa con solución de bloqueo (Tris-HCl 10mM; pH (7,5), 10mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 100mM, Tween 20 0,5% y leche descremada 5%) durante 1 h. Luego, se incubó la membrana con un anticuerpo policlonal anti-nucleolina de carpa, producido por nuestro laboratorio (Álvarez *et al.*, 2003), en una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo esta vez suplementada con leche descremada 1% por 1 h. Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces por 10 min con la solución de lavado que básicamente tiene la misma composición de la solución de bloqueo pero sin leche descremada. Posteriormente, se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa en una dilución de 1:1500. El exceso de anticuerpo secundario fue eliminado por consecutivos lavados.

La membrana fue revelada mediante quimioluminiscencia utilizando el kit *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat* (PIERCE, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las membranas fueron expuestas durante 1 min frente a una película autorradiográfica (Kodak, USA).

3.2.6.3 Inmunodetección de macroH2A

Para el análisis de *western blot* contra macroH2A, se utilizó un anticuerpo policlonal contra macroH2A humana (gentilmente proveído por el Dr. Philippe Bouvet, Francia). La inmunotransferencia se realizó de manera similar a la descrita en el punto 3.2.6.1 y la inmunodetección de acuerdo a lo mencionado en el punto 3.2.6.2, a excepción de la dilución del anticuerpo anti macroH2A que fue de 1:4000. La incubación con el anticuerpo secundario y la metodología del revelado fueron similares a lo descrito anteriormente.

3.2.6.4 Inmunodetección de β -actina

La inmunotransferencia se realizó como se describe en el punto 3.2.6.1. La membrana fue bloqueada durante 1 h con solución TTBS (Tris-HCl 0,2 M pH 7.6, NaCl 0,13M, Tween 0,1 %) suplementada de leche descremada 10%. La membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal anti β -actina (Sigma, USA) generado en ratón, usando como inmunógeno un péptido sintético derivado del extremo N-terminal de β -actina de músculo liso de pollo, en una dilución de 1:5000 en la misma solución TTBS pero con leche descremada 3%. Finalizada la incubación, se lavó 3 veces con solución TTBS por 5 min y luego se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa en un dilución de 1/1500. Se lavó para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y se reveló similarmente a lo descrito en el punto 3.2.6.2.

3.2.7 Geles bidimensionales (2D-PAGE)

3.2.7.1 Preparación de la muestra

La fracción conteniendo núcleos purificados fue resuspendida en 500 μ l de solución de PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 10mM y KH_2PO_4 2mM), EDTA 5mM e inhibidores de proteasas (Roche. USA). Luego, la muestra fue sonicada 6 veces con pulsos de 15'' a una amplitud de 70 y manteniendo siempre la muestra en hielo. El sonicado se incubó durante 30 min en hielo con RNAsa A y DNAsa I (70U/ml y 2U/ml respectivamente). Las muestras fueron centrifugadas a 14000 x g durante 10 min a 4°C, luego de lo cual se tomó el sobrenadante que contiene la fracción soluble de las proteínas nucleares y se cuantificó (sección 3.2.3). Se tomó un volumen de muestra conteniendo 100 μ g de proteínas nucleares y se precipitó con acetona 100% fría vol/vol. Se adicionaron 5 volúmenes de acetona por volumen de muestra nuclear. La precipitación se llevó a cabo durante toda la noche a -20°C. Posteriormente, las muestras fueron

centrifugadas a 14000 x g por 15 min a 4°C, luego de lo cual se descartó el sobrenadante y los precipitados se almacenaron a -80°C para su posterior utilización.

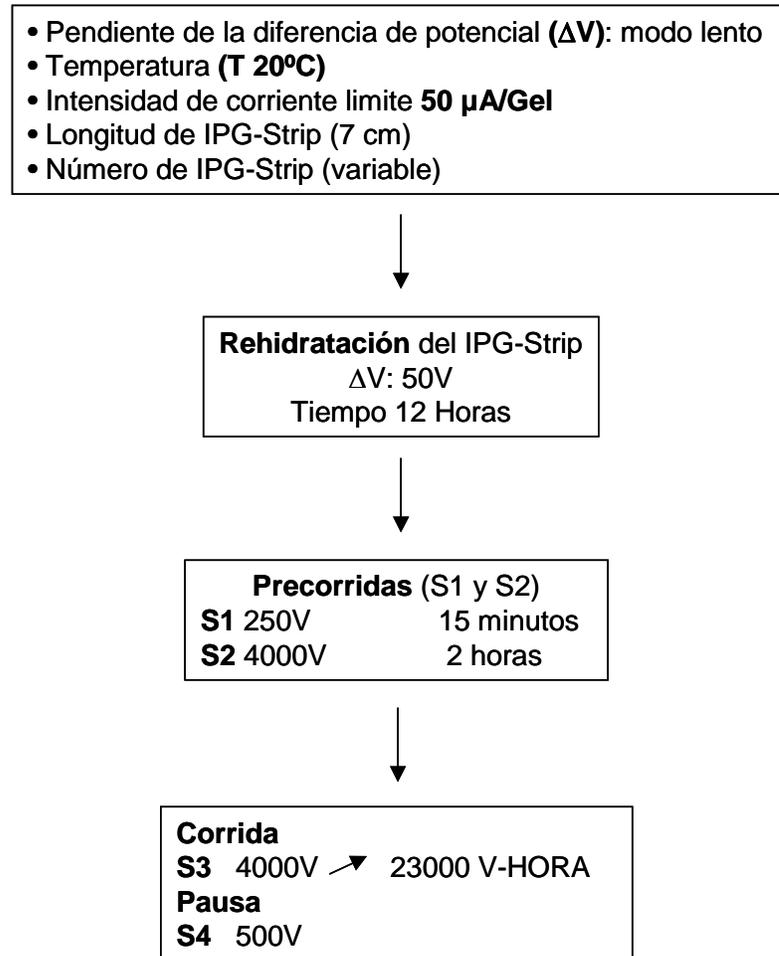
3.2.7.2 Isoelectroenfoque

Los extractos de proteínas nucleares fueron resuspendidos en 125 µl tampón de hidratación (Urea 8,9 M, CHAPS 3%, NP-40 1%, DTT 0,05 M, anfolito pH (3-10) 1,4%, anfolito pH (4-7) 0,6% y azul de bromofenol 0,001%). A continuación, y para permitir una mejor disgregación de las proteínas, las muestras fueron sonicadas 3 veces por 10 s a una amplitud de 40 y mantenidas en hielo. Luego de sonicadas, las muestras se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y centrifugaron por 15 min a 14000 x g para eliminar el exceso de urea. Los sobrenadantes obtenidos se cargaron directamente en los geles de isoelectroenfoque con gradientes de pH inmovilizada (IPG Strips) y migrados en la cámara de isoelectroenfoque (IEF focusing tray) del sistema PROTEAN IEF CELL (Bio-Rad).

Las muestras nucleares representativas de las estaciones de verano e invierno fueron migradas por triplicado. Paralelamente se fraccionó un estándar para geles bidimensionales 2-D SDS-PAGE (Bio-Rad), que consistió en siete proteínas correspondientes a ovoalbúmina 76 kDa-pI (6,0; 6,3; 6,6), BSA 66,6 kDa-pI (5,4; 5,5; 5,6), actina de músculo de bovino 43 kDa-pI (5,0; 5,1), GAPDH de músculo de conejo 36 kDa-pI (8,3; 8,5), anhidrasa carbónica de bovino 31 kDa-pI (5,9; 6,0), inhibidor de tripsina de soja 21,5 kDa-pI (4,5) y mioglobina de caballo 17,5 kDa-pI (7). La migración de dicho estándar en SDS-PAGE, se realizó bajo las mismas condiciones experimentales que las muestras analizadas.

El protocolo de separación por isoelectroenfoque fue determinado según parámetros e instrucciones indicadas en el manual del fabricante (Bio-Rad,USA). El diseño del programa empleado tomó en consideración el número, tamaño y gradiente de pH de los IPG *strip*

empleados, así como también dependiendo del tipo y concentración de muestras tratadas. Los tiempos y los voltajes aplicados en los pasos de hidratación, precorrida y corrida de isoelectroenfoque fueron programados según se describe en el siguiente diagrama:



Esquema de programación de isoelectroenfoque: Los parámetros indicados en el recuadro superior se mantuvieron constantes durante toda la etapa de isoelectroenfoque

3.2.7.3 Equilibrio IPG *Strip*

Previo a la corrida electroforética en segunda dimensión (SDS-PAGE), fue necesario equilibrar los IPG *Strips*. El primer paso de equilibrio consistió en saturar los geles con SDS y agentes reductores para lo cuál cada gel se incubó con 2,5 ml tampón de equilibrio I (Urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 0,375 M; pH (8,8), glicerol 20%, DTT 130 mM) durante 15 min a temperatura ambiente y agitación constante. Enseguida, se descartó la solución y se realizó un segundo paso de equilibrio esta vez incubando con 2,5 ml tampón de equilibrio II (Urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 0,375 M; pH (8,8), glicerol 20% y Iodoacetamida 135 mM), en las mismas condiciones anteriores.

3.2.7.4 Segunda dimensión (SDS-PAGE)

Se prepararon geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (gel separador 12% T; 1,3%C, gel espaciador 4%T; 0,4%C) siguiendo la metodología estándar de Sambrook *et al.*, (2001) en el sistema Mini-PROTEAN[®]3 Multi-Casting Chamber (BioRad, USA). Finalizada la etapa de equilibrio de los IPG *strips*, los geles se sumergieron en tampón de corrida para proteínas por algunos segundos, y luego se depositaron sobre los geles SDS-PAGE para la segunda dimensión. Para evitar el desplazamiento de los IPG *strips* durante la corrida, estos fueron fijados con agarosa 1% en solución de corrida para proteínas (Tris-HCL 25 mM, glicina 250 mM; (pH 8,3), SDS 0.1 %) y conteniendo trazas de azul de bromofenol como indicador del frente iónico durante la migración. Igualmente, se cargaron 3 µl de un marcador de tamaño molecular para proteínas (Winkler, Chile). El fraccionamiento se llevó a cabo utilizando el sistema Mini-PROTEIN[®]3 Dodeca TM Cell (BioRad, USA) que permite correr simultáneamente hasta una docena de geles. En primer lugar se realizó una pre-corrida

electroforética de 10 min a 60mA para luego continuar con una corrida de aproximadamente 140 min a 70V.

3.2.8 Tinción con plata

Una vez finalizada la corrida electroforética en segunda dimensión, se procedió a colorear los geles con tinción de plata. En primer lugar, cada gel se fijó con 50 ml de metanol 40%, formaldehído 0,02% y agitación suave por 10 min. Luego, los geles se lavaron dos veces con agua desionizada durante 5 min. Terminados los lavados, los geles fueron incubados con 50 ml de solución de tiosulfato de sodio 0,2 g/l por 60 s, lavados con agua desionizada por 20 s, para finalizar incubando con solución de nitrato de plata 0,01 M por 10 min. Posteriormente se lavó brevemente con agua desionizada y enseguida con solución de tiosulfato de sodio 0,2 g/l. El revelado se llevó a cabo incubando los geles en 50 ml de solución conteniendo carbonato de sodio 3%, tiosulfato de sodio 0,0004%, y formaldehído 0,02% por aproximadamente 4-5 min. La reacción de coloración fue detenida con ácido acético 5%, para finalmente lavar los geles con agua desionizada.

3.2.9 Análisis de geles SDS-PAGE y *Western blot*

Los geles unidimensionales y ensayos de *Western blot* fueron analizados con los programas Gel-Pro Analyzer 3.1 y el *software* UN SCAN IT, respectivamente.

3.2.10 Análisis de geles 2D

Los geles bidimensionales conteniendo los extractos de proteínas nucleares fraccionadas fueron analizados con el programa Image MasterTM 2D Platinum Software (Swiss Institute of Bioinformatics, GeneBio and Amersham Biosciences).

La primera etapa del análisis consistió en establecer los parámetros para la detección de los grupos de proteínas (*spots*) para ser aplicados a los seis geles analizados (tres por cada estación). Ellos consideraban valores de intensidad, área mínima, volumen etc. Con el objeto de centrar nuestro interés sólo en las proteínas más relevantes de cada estación, fueron excluidos del análisis los *spots* que presentaron una muy baja concentración y que en consecuencia presentaban un porcentaje de tinción menor al 10 % respecto al que presentó el mayor porcentaje de intensidad. Luego de la detección, los *spots* fueron cuantificados en cada uno de los geles.

Se observó que los geles representativos de la estación invernal presentaron un mayor número de *spots*. En consecuencia, se tomó este perfil proteico como patrón de referencia para los estudios posteriores. En primer lugar se compararon entre sí los tres geles con muestras nucleares proveniente de una misma estación mediante superposición de sus imágenes. A partir de esta primera aproximación, se construyeron los “geles virtuales” o geles promedio para cada estación, el cual sólo considera las proteínas presentes en los tres geles empalmados.

Finalmente los geles sintéticos de cada estación fueron comparados entre sí. Este empalme nos permitió determinar las proteínas específicas para cada estado adaptativo, así como aquellas que resultaron ser común en ambas condiciones. Estas últimas nos permitieron establecer los llamados pares o grupos de *spots*, vale decir aquellos que representan una misma proteína referencial en distintos geles.

Los tamaños moleculares y puntos isoeléctricos de las proteínas detectadas en los geles fueron estimados con el programa Image Master™ 2D Platinum, tomando como referencia el gel conteniendo la muestra estándar (2-D SDS-PAGE; Bio-Rad).

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de núcleos de tejido hepático de carpas aclimatizadas

El protocolo de purificación modificado de Scherl *et al.* (2002) nos permitió la obtención de núcleos de hepatocitos de carpas aclimatizadas a verano e invierno. Las preparaciones nucleares mostraron una adecuada integridad y un alto grado de pureza al ser observados al microscopio óptico (Figura 1). El rendimiento promedio fue de 85×10^6 núcleos por gramo de tejido de verano y 63×10^6 núcleos por gramo de tejido de invierno.

4.2 Comparación de los perfiles proteicos de las fracciones aisladas de hígados de carpas aclimatizadas a verano e invierno en geles unidimensionales

En primer lugar, se procedió a separar electroforéticamente en geles SDS-PAGE las distintas fracciones proteicas obtenidas en las etapas de purificación y representativas de cada estación. En términos generales, pudimos comprobar que el perfil proteico de las fracciones nucleares cambia significativamente respecto a las fracciones total y citoplasmática (Figura 2). Esta clara diferencia, permitió deducir un consistente enriquecimiento en la población de proteínas nucleares. Esta observación se ve confirmada con la nítida presencia de proteínas que, de acuerdo a su tamaño molecular, patrón de migración, y alta abundancia, corresponden a las histonas convencionales H2A, H2B, H3 y H4 (Scherl *et al.*, 2002 y Shiio *et al.*, 2003). De esta manera, la gran abundancia de histonas observada en las fracciones nucleares es un buen indicador del enriquecimiento de proteínas específicas para esta fracción. Adicionalmente, y de acuerdo a un análisis realizado con el *software* Gel-Pro Analyzer (3.1), tomando como referencia los tamaños moleculares de un marcador de proteínas de rango amplio (14-16 kDa), pudimos estimar los tamaños moleculares para estas proteínas los cuales serían de 18.7 kDa (H3); 17.3kDa

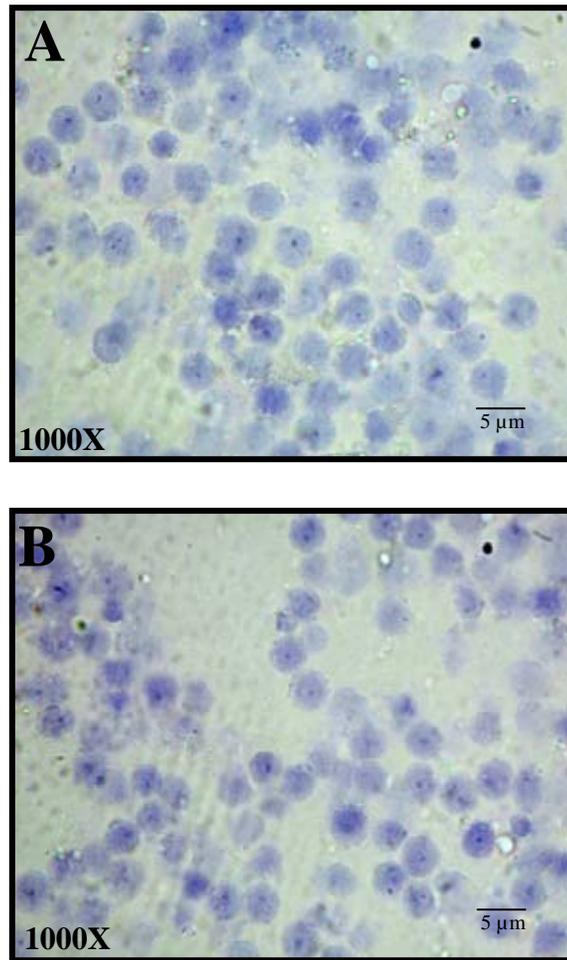


Figura 1: Aislamiento de núcleos de hepatocitos de carpas aclimatizadas a verano e invierno. En el panel (A) se muestra una preparación estándar de núcleos aislados de hepatocitos de carpas adaptadas a verano y en (B), núcleos de hepatocitos de carpas adaptadas a invierno. Ambas muestras fueron evaluadas en su pureza bajo el microscopio óptico con tinción de azul de tripán.

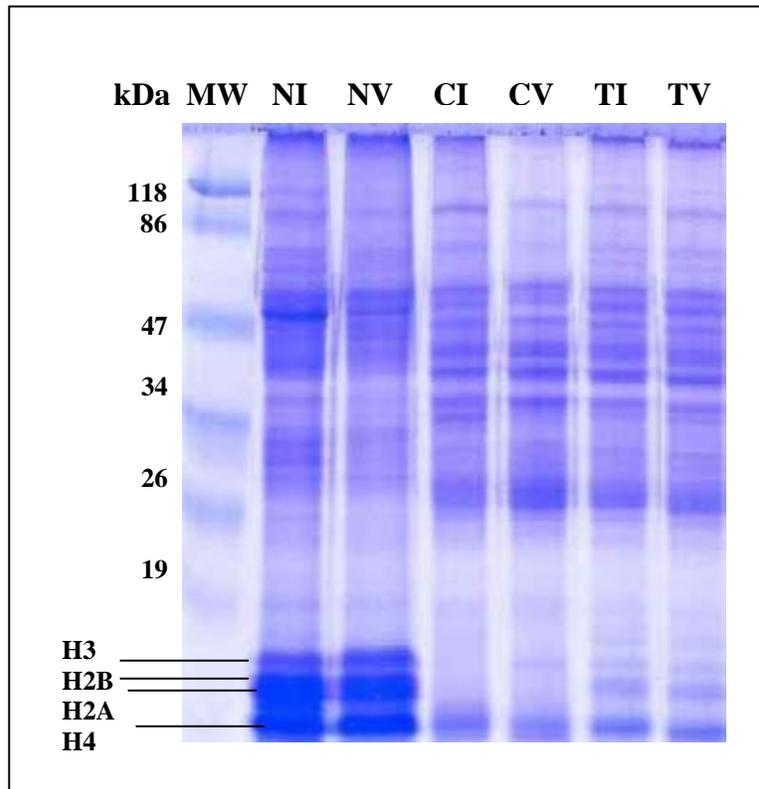


Figura 2: Separación electroforética de fracciones proteicas obtenidas durante las etapas de aislamiento de núcleos de hepatocitos de carpas aclimatizadas. 20 μ g de cada muestra fueron fraccionados en geles 12% SDS-PAGE. El carril NI y NV corresponden a las fracciones de proteínas nucleares representativas de hepatocitos de invierno y verano respectivamente. Los carriles CI, CV, TI y TV corresponden a las fracciones citoplasmática y totales respectivamente de ambas condiciones de estudio. En las fracciones nucleares se destacan la ubicación de las proteínas histónicas H3, H2A, H2B y H4.

(H2B); 16.7 kDa (H2A) y 14.2 kDa (H4) respectivamente. Al comparar el perfil de proteínas de las fracciones nucleares representativas de verano (NV) e invierno (NI), los geles unidimensionales SDS-PAGE permitieron revelar sólo mínimos cambios entre ellas. Eventualmente fue posible observar la presencia de algunas proteínas enriquecidas en una u otra fracción (Figura 2).

Sin perjuicio de lo anterior, y con el propósito de evaluar la pureza de las fracciones nucleares obtenidas mediante nuestro protocolo de purificación, se procedió a realizar ensayos de inmunodetección contra diferentes proteínas que presentan localización subcelular conocida. Como marcadores nucleares fueron utilizados anticuerpos contra nucleolina, B23 y la variante de histona macroH2A. Por otro lado, como control citoplasmático se utilizó un anticuerpo contra β -actina.

4.3 Evaluación del grado de pureza y enriquecimiento en la fracción de proteínas nucleares mediante ensayos de *Western blot*

4.3.1 Nucleolina

En primer lugar, se evaluó el grado de pureza y enriquecimiento de la fracción nuclear en ambos estados adaptativos, mediante la inmunodetección de la proteína nucleolina. Generalmente, en la fracción nuclear se observó una intensa marcación con el anticuerpo específico. Inversamente, las fracciones citoplasmática y total presentaron sólo una tenue inmunorreacción (Figura 3B). Este resultado permitió confirmar un significativo enriquecimiento de la proteína nucleolina en la fracción nuclear, la cuál se ve reflejada en una reacción positiva al anticuerpo con una única banda cuyo tamaño molecular fue de aproximadamente 100 kDa. Este resultado es consistente con el tamaño molecular descrito para esta proteína en otras especies (Ginisty *et al.*, 1999).

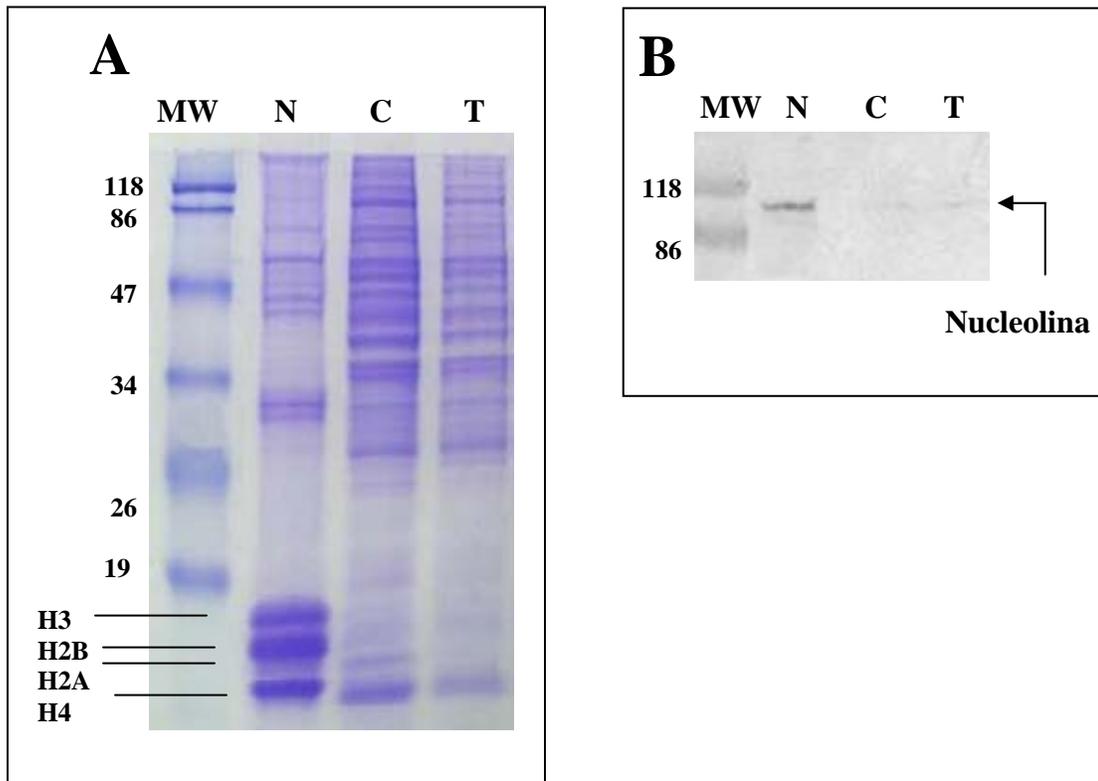


Figura 3: Análisis del enriquecimiento de las fracciones nucleares utilizando la proteína nucleolina como marcador molecular. El panel (A) muestra la separación electroforética de los extractos de proteínas en un gel 12% SDS-PAGE correspondientes a la fracción nuclear (N), la fracción citoplasmática (C) y la fracción total (T) de hepatocitos aislados de carpas aclimatizadas a invierno. En el gel se depositaron 10 μ g de proteína de cada fracción y se indican los tamaños de los marcadores de peso molecular en kilodaltons (kDa). El panel (B) muestra el análisis de enriquecimiento de proteínas nucleares mediante *western blot* utilizando la reacción del anticuerpo anti-nucleolina como control del compartimiento nuclear. La flecha destaca la reacción positiva con la proteína nucleolina de carpa.

4.3.2 macroH2A

Un segundo marcador nuclear fue analizado en las fracciones purificadas, la variante de histona macroH2A. El anticuerpo anti-macroH2A reconoció una única banda inmunorreactiva de tamaño molecular aproximado de 39 kDa (Figura 4B), concordante con el tamaño molecular descrito para esta proteína (Abbott *et al.*, 2004). La variante de histona macroH2A se observó considerablemente concentrada en la fracción nuclear, no advirtiéndose ninguna inmunorreacción en las otras fracciones estudiadas.

4.3.3 β -actina

A continuación se procedió a evaluar la eventual presencia de proteínas citoplasmáticas contaminantes en la fracción nuclear. Con este objetivo, se utilizó como marcador citoplasmático un anticuerpo contra β -actina. Nuestros resultados indicaron una reacción positiva tanto en la fracción citoplasmática como en la fracción de proteínas totales (figura 5B). En ambos casos, el anticuerpo reaccionó positivamente con una única proteína de tamaño molecular aproximado a 42 kDa, la cual se ve mayoritariamente enriquecida en la fracción citoplasmática. Por el contrario, la fracción nuclear no presentó reacción alguna con este anticuerpo.

4.4 Evaluación de la expresión estacional de las proteínas nucleares nucleolina, nucleofosmina (B23) y macroH2A mediante ensayos de *western blot*

La expresión de algunas proteínas nucleares fue evaluada mediante análisis de *Western Blot* en las muestras obtenidas en nuestro protocolo de purificación. En este contexto, se utilizaron como marcadores nucleares, proteínas que han sido sugeridas cumplir funciones esenciales en la regulación de la biogénesis ribosomal (nucleolina y B23) y en regulación de la expresión génica (macroH2A).

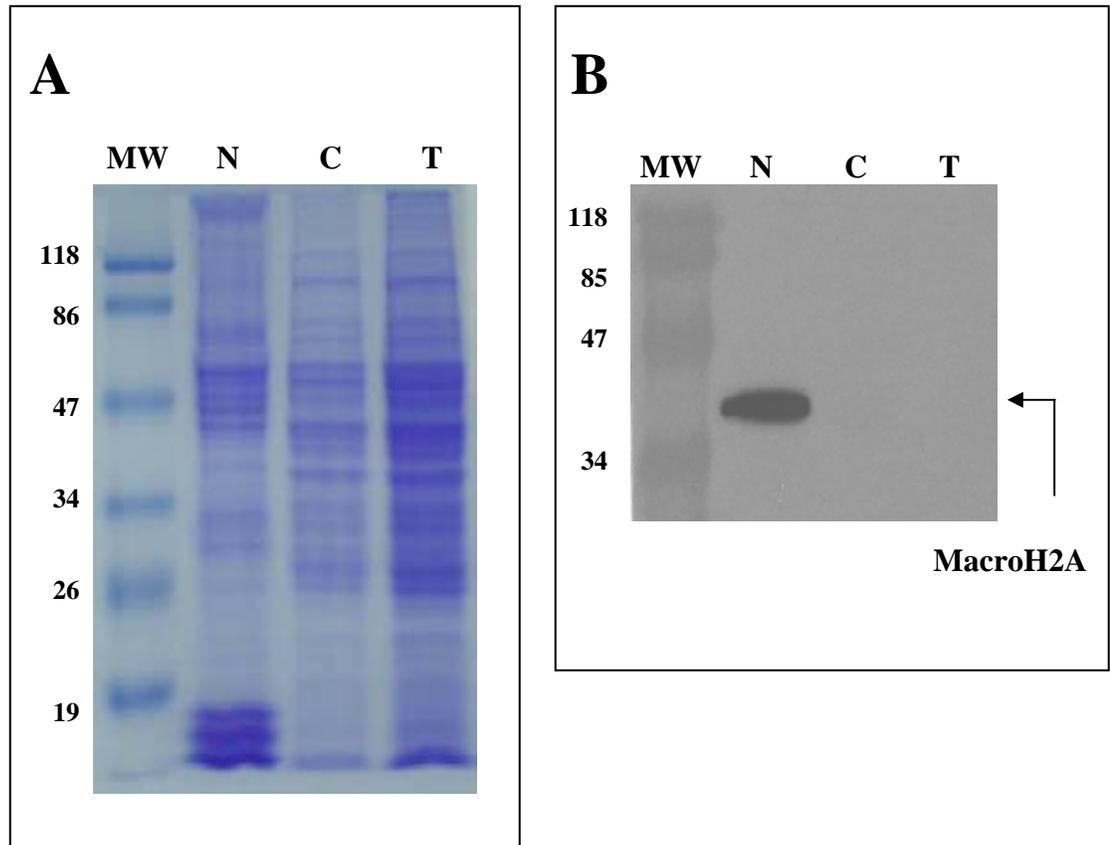


Figura 4: Análisis del enriquecimiento de las fracciones nucleares utilizando la proteína macroH2A como marcador molecular. En el panel (A) se muestra el fraccionamiento electroforético de 10 μ g de extractos de proteínas de hepatocitos de carpas aclimatizadas a invierno. Los carriles representan a la fracción nuclear (N), citoplasmática (C) y total (T) respectivamente. El panel (B) muestra el análisis de *western blot* empleando como marcador de enriquecimiento nuclear el anticuerpo anti-macroH2A. La flecha indica la innumoreacción positiva para la proteína en carpa.

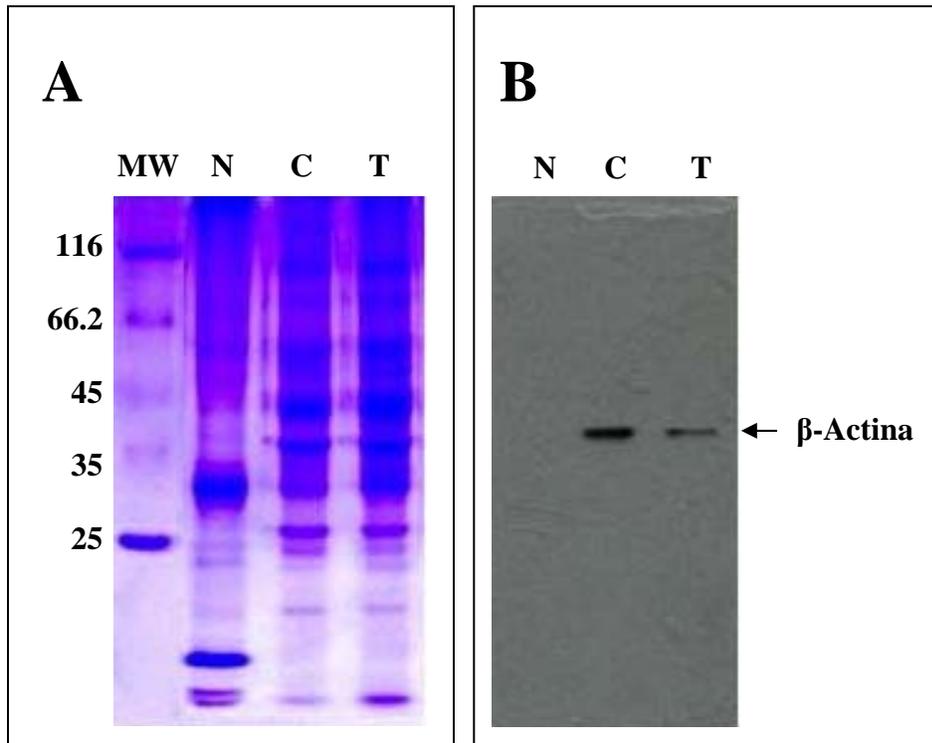


Figura 5: Análisis del grado de pureza de las fracciones nucleares mediante la inmunodetección de la proteína β -actina como marcador molecular citoplasmático. La figura muestra en el panel (A) el fraccionamiento electroforético de 10 μ g de extracto de proteínas de hepatocitos de carpas aclimatizadas a invierno. El carril N, C y T corresponden a las fracciones nuclear, citoplasmática y total, respectivamente. En el panel (B), se observa el análisis del grado de pureza de la fracción nuclear mediante un ensayo de *western blot* empleando como marcador citoplasmático un anticuerpo anti- β -actina.

4.4.1 Nucleolina

Nuestros ensayos de *western blot* demostraron la presencia de la proteína nucleolina en los extractos nucleares provenientes de carpas adaptadas tanto a verano como invierno (Figura 6.B). El anticuerpo anti-nucleolina de carpa reconoció una banda de un tamaño molecular aproximado de 100 kDa, el cual es consistente con el tamaño descrito para nucleolina en otras especies (95-100 kDa) (Ginisty *et al.*, 1999). Nuestros ensayos confirmaron un mayor contenido de nucleolina durante la estación invernal respecto a su contraparte veraniega. Con el objetivo de cuantificar dicha diferencia, adicionalmente se efectuó un análisis semi-cuantitativo sobre los inmunoblots empleando el *software* UN-SCAN IT. Dicho estudio permitió establecer que durante la estación invernal, el contenido de nucleolina es aproximadamente tres veces superior durante la estación invernal respecto a la estación veraniega. (Figura 7).

4.4.2 Nucleofosmina

Similarmente, el contenido de la proteína nuclear B23 fue evaluado en condiciones de adaptación estacional. En este caso, el anticuerpo detectó una única señal positiva en la fracción conteniendo extracto de proteínas provenientes de carpas aclimatizadas a verano (Figura 8B). De manera interesante, el anticuerpo reconoce una banda de 57 kDa la cual es considerablemente mayor a lo descrito para B23 en mamíferos, en donde la proteína presenta un tamaño molecular de aproximadamente 40 kDa (Huang *et al.*, 2005).

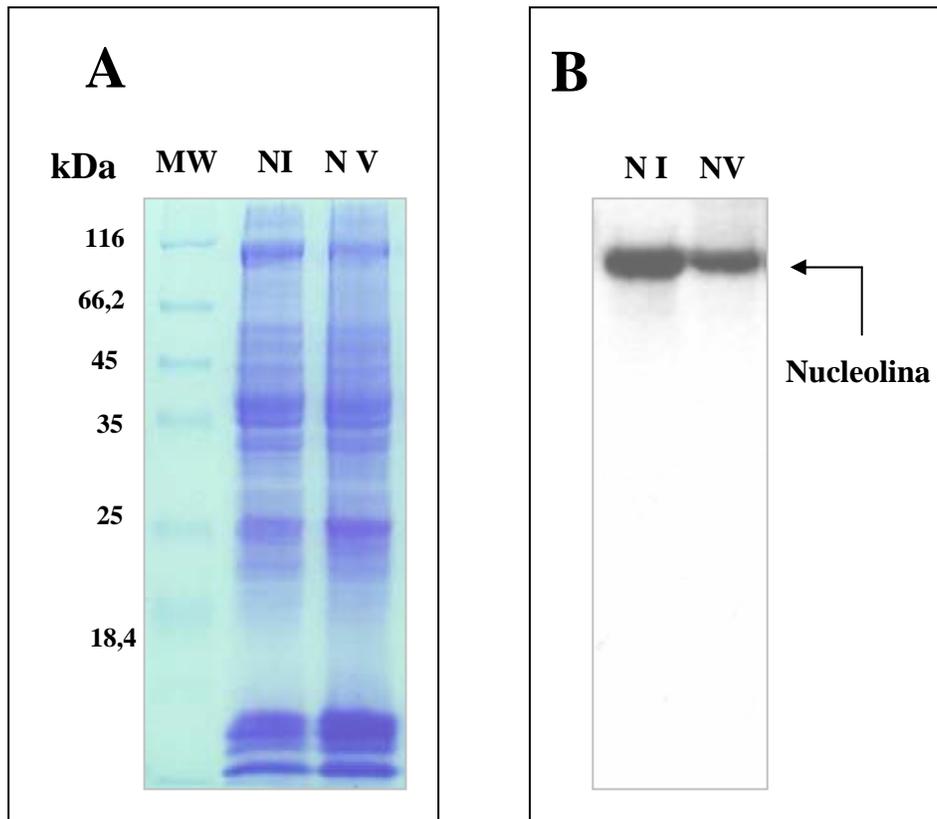


Figura 6: Evaluación de la expresión génica de la proteína nucleolina en fracciones nucleares de carpas aclimatizadas a verano e invierno.

A) Se muestra el fraccionamiento en gel 12% SDS-PAGE de 10 μ g de extractos de proteínas nucleares provenientes de carpas aclimatizadas a verano (NV) e invierno (NI) respectivamente. B) Análisis de *western blot* empleando un anticuerpo policlonal anti-nucleolina de carpa. La flecha señala la inmunoreacción de nucleolina en ambas estaciones.

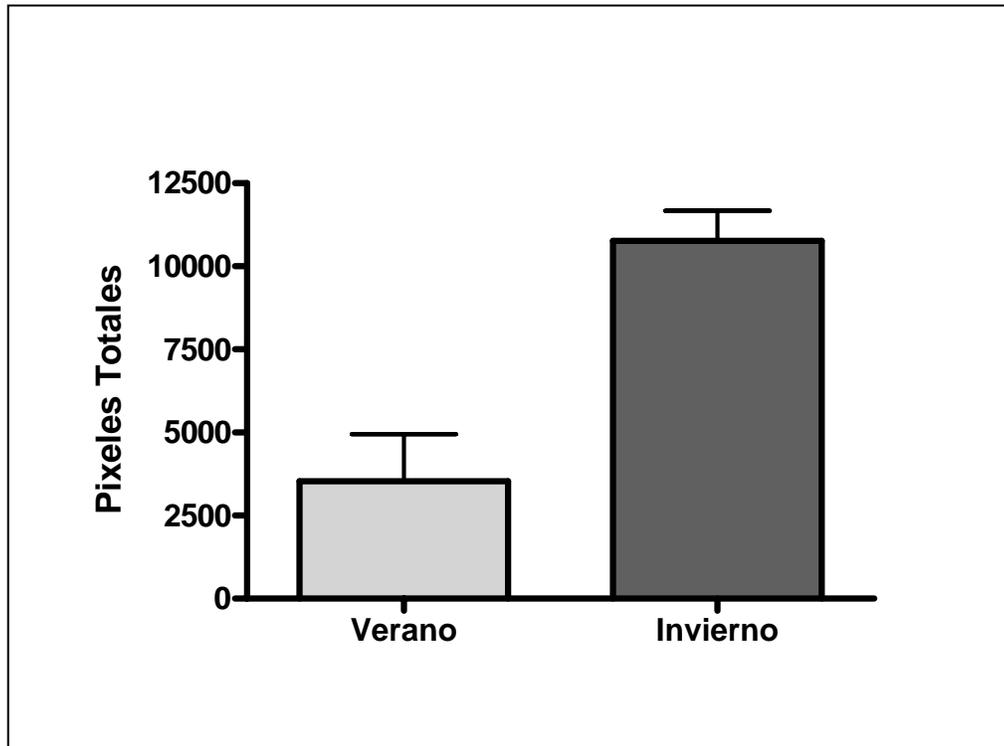


Figura 7: Cuantificación de la expresión estacional de nucleolina de carpa.

El gráfico muestra la cuantificación de la expresión de nucleolina en los ensayos de *western blot* (n=3). El análisis fue realizado con el programa UN-SCAN IT.

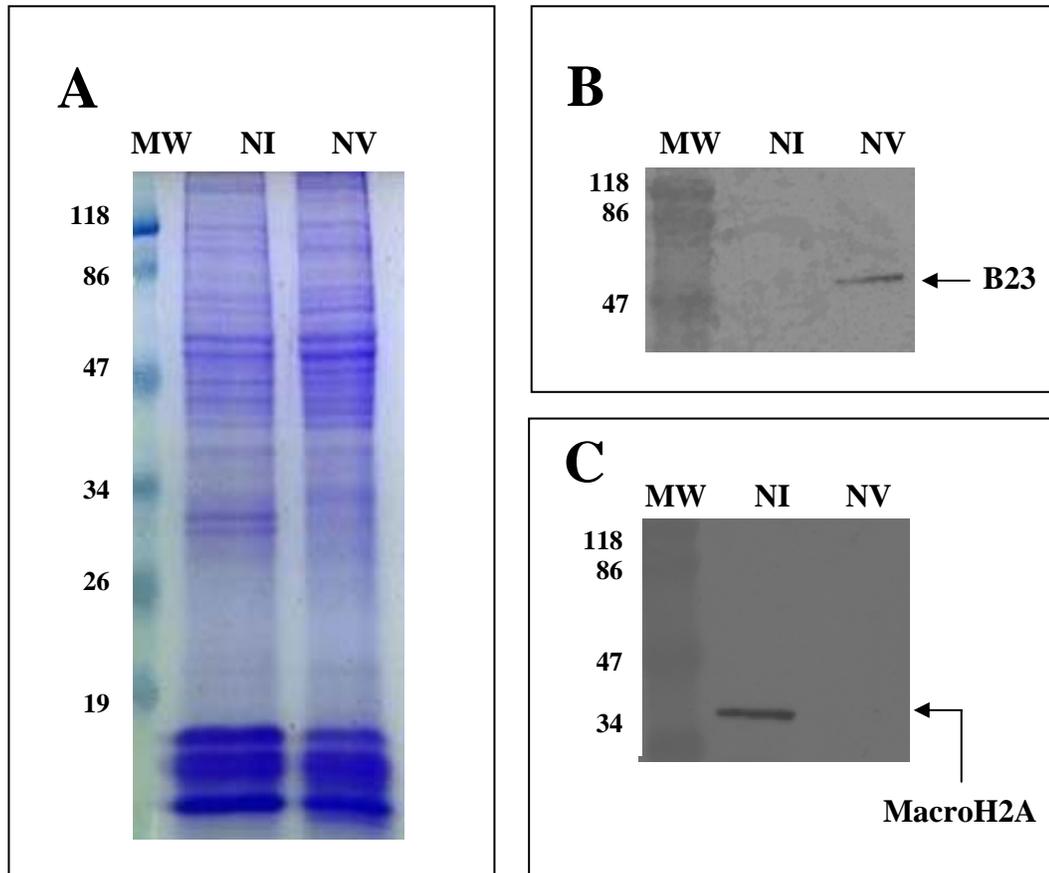


Figura 8: Estudio de la expresión estacional de las proteínas B23 y macro H2A en extractos nucleares de carpas aclimatizadas a verano e invierno. (A) Se muestra el fraccionamiento de extractos nucleares de hepatocitos de carpas adaptadas a invierno (NI) y verano (NV) en gel SDS-PAGE 12%. En cada carril fueron depositados 10 μ g de extracto nuclear. (B) Análisis de *western blot* revelando con el anticuerpo anti-B23. La flecha indica la inmunoreacción con B23 de carpa. (C) Se muestra el resultado del análisis de *western blot* empleando el anticuerpo anti-macroH2A. La flecha indica la señal positiva correspondiente a macroH2A en carpa.

4.4.3 MacroH2A

Finalmente, se analizó la expresión estacional de una tercera proteína nuclear, la variante de histona macroH2A. Los resultados obtenidos confirmaron un mayor contenido de la proteína en la fracción correspondiente a extractos nucleares de invierno respecto a aquella de verano (Fig. 8C). Una única señal fue detectada a un tamaño molecular de aproximadamente 40 kDa, lo cual es consistente al tamaño descrito para esta proteína en otras especies (Pehrson y Fuji, 1998).

4.5 Análisis comparativo de extractos de proteínas nucleares correspondientes a carpas aclimatizadas a verano e invierno en geles bidimensionales (2-D)

Teniendo en consideración que los estudios de los perfiles proteicos en geles unidimensionales no permitieron establecer claras diferencias entre las muestras provenientes de carpas aclimatizadas a verano e invierno, se procedió a estudiar el perfil global y la expresión de las proteínas nucleares de verano e invierno en geles bidimensionales (2D; IEF/SDS-PAGE).

Los resultados obtenidos demostraron un perfil proteico sustancialmente distinto entre ambas estaciones (Figura 9). Los geles bidimensionales permitieron apreciar que existen ciertas poblaciones de proteínas que presentan una mayor expresión en condiciones de adaptación a invierno o verano. Por otro lado, también fue posible revelar una población distintiva que no varía significativamente entre ambas estaciones. En términos generales, la mayoría de las proteínas migra en la región más básica de la gradiente entre un rango de pH 6 a pH 9. Sin embargo, una importante proporción de proteínas extremadamente básicas no fueron resueltas claramente en la gradiente de pH utilizada (escala de pH 3-10). Respecto a esta significativa población de proteínas no resueltas, y considerando la extremada basicidad de ellas, es posible suponer que se trata de la fracción correspondiente a las proteínas histonas.

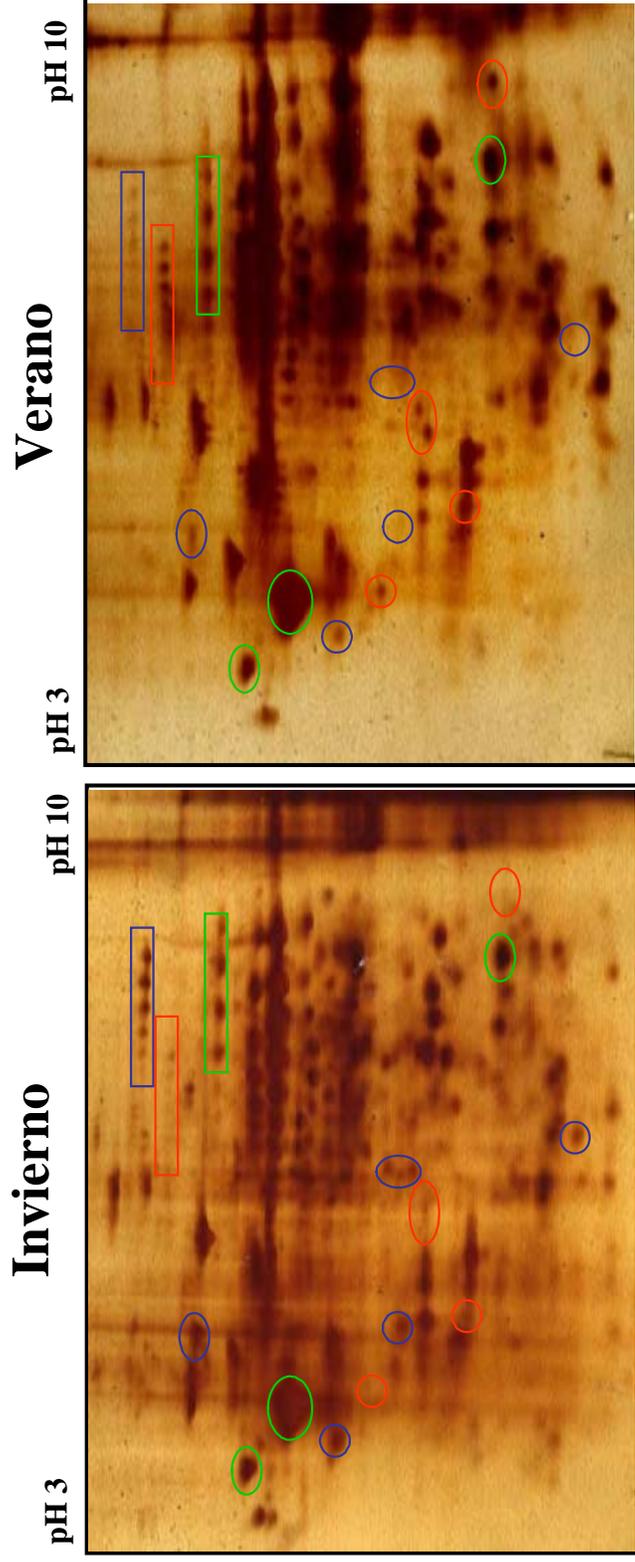


Figura 9: Comparación de los perfiles proteicos de extractos nucleares fraccionados en geles bidimensionales provenientes de hepatocitos de carpas aclimatizadas a verano e invierno. La figura muestra el fraccionamiento bidimensional de 100 μg extractos nucleares correspondientes a hepatocitos de carpas de invierno y verano. Se utilizó una gradiente lineal de pH 3 a 10 para la primera dimensión y un gel SDS-PAGE 12% para la segunda dimensión. Se destacan en recuadros azules aquellas proteínas que se encuentran principalmente representadas en la condición estacional de invierno. Por otro lado, en recuadros rojos se señalan aquellas proteínas que presentan una mayor expresión en verano.

4.6 Caracterización del perfil de proteínas nucleares en geles bidimensionales

En primer lugar, se procedió a realizar la comparación de los perfiles proteicos obtenidos en geles 2D de extractos nucleares aislados de hepatocitos de carpas adaptadas a invierno y verano. La comparación del número de los *spots* entre las muestras reveló diferencias significativas. Los extractos nucleares de invierno contuvieron en promedio 433 *spots*, mientras que la muestra de verano contiene en promedio 328 *spots* (Tabla 1A).

Para estandarizar el análisis de la expresión diferencial en geles 2D, se crearon los “geles virtuales” o “geles promedio”, a partir de la superposición de imágenes de tres geles provenientes de la misma estación. El gel promedio solo consideró los *spots* que se encontraban presentes en todos los geles, los cuales fueron considerados como “*spots* verdaderos”. El gel promedio de invierno contuvo 341 *spots*, mientras que el de verano 265 *spots* (Tabla 1B).

La comparación de ambos proteomas mediante el empalme de los geles promedio, nos permitió determinar las proteínas específicas presentes en ambas condiciones adaptativas, constituyendo estas últimas los llamados pares de *spots*. Entre estos últimos, pudimos establecer que existen diferencias cuantitativas importantes. Así, se encontraron 154 pares de *spots*, presentando la misma localización en los geles correspondientes a las dos condiciones de estudio (Tabla 1B). Esto significa que estas proteínas exhibieron el mismo tamaño molecular y pI en ambas muestras, lo cual permite concluir que estos pares no ven alterada su migración producto de la adquisición de alguna modificación post-traducciona como resultado de la aclimatización estacional. Sin embargo, en esta categoría también se pudo observar que existen diferencias significativas en los porcentajes de volumen (% V) los *spots* detectados en ambas estaciones (Tablas 3 y 4). El porcentaje de volumen es estimado midiendo el porcentaje de área e intensidad de cada *spots*.

A

Nombre	Clase	Grupo	Spots	I. Mínima	I. Máxima
Inv (13)	Invierno	Ref	435	255	60952
Inv (62)	Invierno		413	255	65535
Inv (67)	Invierno		451	255	65535
Ver (35)	Verano	Ref	315	255	65535
Ver(30)	Verano		369	255	64697
Ver (92)	Verano		300	255	65506

B

Nombre	Clase	Spots	Pares
V-INV	Virtual. Invierno	341	154
V-VER	Virtual. Verano	265	154

Tabla 1: Informe del análisis informático obtenido a partir de fraccionamientos en geles 2D de extractos nucleares de hepatocitos de carpas aclimatizadas a verano e invierno. En el panel **A** se muestra el reporte entregado por el software *Image Master 2D Platinum* del análisis correspondiente a tres muestras representativas de verano (individuos 30, 35 y 92) e invierno (individuos 13, 62 y 67) respectivamente. En ella se destacan el número de *spots* detectados y las intensidades mínimas y máximas. Por otro lado, en el panel **B** se muestra la estadística de la construcción de los geles virtuales, empleando como referencia la condición que presentó un mayor número de proteínas (invierno). La columna indicada como “pares” representa el número de *spots* comunes en ambas estaciones que fueron detectados después del empalme de los geles virtuales de ambas estaciones.

4.7 Análisis de los cambios en los niveles de expresión de proteínas nucleares fraccionadas en geles bidimensionales y representativos de ambas condiciones de adaptación

Dentro de los pares de proteínas detectados en ambas condiciones de adaptación, pudimos estimar que alrededor de un 64,7% presenta un bajo coeficiente de variación (CV), igual o menor a un factor 0.1. Dicho valor, en términos cuantitativos, permite clasificarlas como aquellas proteínas en las que no se observa diferencias de expresión significativas entre las dos condiciones de estudio (Tabla 2).

Por el contrario, este mismo análisis permitió determinar que aproximadamente un 20 % de los pares de *spots* detectados en ambas condiciones adaptativas presentan un elevado coeficiente de variación igual o superior a un factor 0.5. Esta cifra representa el límite en el cuál podemos considerar que dicha población presenta un incremento en la expresión de la proteína equivalente al menos a tres veces, lo que indicaría que estas proteínas detectadas en ambas condiciones estacionales, presentan diferencias significativas en su nivel de expresión. En consecuencia, para efectos de nuestro análisis, se estableció como límite el valor de $CV \leq 0.5$, teniendo en consideración que un valor inferior pudiera deberse a diferencias en la carga de proteína o intensidad de la tinción empleada (Choe y Lee, 2003).

De esta manera, nuestro estudio permitió seleccionar inicialmente cuatro proteínas en los geles bidimensionales con los números de identificación (ID) 582, 715, 721 y 724, los cuales presentan una mayor expresión en la estación veraniega (Tabla 3 y Figura 10). Mediante el mismo análisis, pudimos seleccionar además cuatro proteínas que presentan una expresión sustancialmente mayor en invierno: ID 144, 145, 150 y 400 (Tabla 4 y Figura 11).

Grupo ID	Media	M.S.D	CV	%V (Invierno)	%V (Verano)	pI	MW(kDa)
149	0,357	0,000	0,001	0,357	0,358	6,05	82,5
242	0,474	0,007	0,015	0,467	0,481	7,32	72,0
248	0,395	0,022	0,056	0,373	0,417	7,65	71,0
277	0,573	0,011	0,020	0,561	0,584	3,65	61,0
350	0,274	0,007	0,027	0,281	0,267	4,45	58,0
351	0,281	0,005	0,019	0,276	0,286	7,95	58,0
355	0,358	0,012	0,032	0,346	0,369	7,95	57,0
359	0,462	0,011	0,023	0,452	0,473	8,45	57,0
381	0,133	0,009	0,070	0,124	0,143	4,21	45,0
641	0,524	0,013	0,024	0,511	0,536	6,29	30,0

Tabla 2: Análisis de la expresión de proteínas que no presentan variación significativa en su contenido entre las estaciones de verano e invierno. En la tabla se muestran el informe estadístico de algunas proteínas correspondientes a *spots* presentes en ambas condiciones adaptativas y que no presentan variaciones significativa en su contenido. La columna “**Grupo ID**” corresponde al número de identificación asignado al grupo de *spots*. La “**Media**” corresponde a la tendencia central o promedio de los porcentajes de volumen de los *spots* de ambas estaciones. **M.S.D** es el promedio de la desviación estándar de cada grupo. El **Coefficiente de Variación (CV)** es el cociente entre M.S.D y la media. Los porcentajes de volumen (%V) de los *spots* de **invierno** y **verano** simbolizan una medida aproximada de abundancia relativa medida en píxeles. Finalmente, pI corresponde al punto isoelectrico estimado y MW el tamaño molecular en kDa.

Grupo ID	Media	M.S.D	CV	%V (Invierno)	%V (Verano)	pI	MW(kDa)
245	0,214	0,114	0,533	0,100	0,328	7,70	71,0
302	0,310	0,191	0,616	0,119	0,501	8,30	65,5
529	0,282	0,145	0,514	0,137	0,427	8,45	41,0
556	0,147	0,074	0,503	0,072	0,222	5,18	35,5
582	0,325	0,198	0,609	0,178	0,573	7,70	34,5
584	0,254	0,167	0,657	0,087	0,421	7,20	34,5
661	0,432	0,228	0,528	0,204	0,660	8,42	31,0
715	0,403	0,236	0,586	0,167	0,638	6,38	26,0
721	0,359	0,206	0,574	0,153	0,564	7,01	26,0
724	0,394	0,218	0,553	0,176	0,611	8,25	26,0

Tabla 3: Análisis de las proteínas que presentan un mayor contenido durante la estación veraniega. La tabla resume aquellas proteínas que presentan un mayor **coeficiente de variación** en verano. **Grupo ID** corresponde al número de identificación asignado al grupo de *spots*. La **Media** corresponde a la tendencia central o promedio de los porcentajes de intensidad de los *spots* de ambas estaciones. (**M.S.D**) es el promedio de la desviación estándar de cada grupo *spots*. El Coeficiente de Variación (**CV**) es el cociente entre M.S.D y la media. La abundancia relativa de los *spots* de invierno y verano esta medida en píxeles. El **pI** es el punto isoeléctrico y **MW** es el tamaño molecular en kDa de la proteína. Los *spots* destacados en negrilla corresponden a las proteínas indicadas en la figura 10.

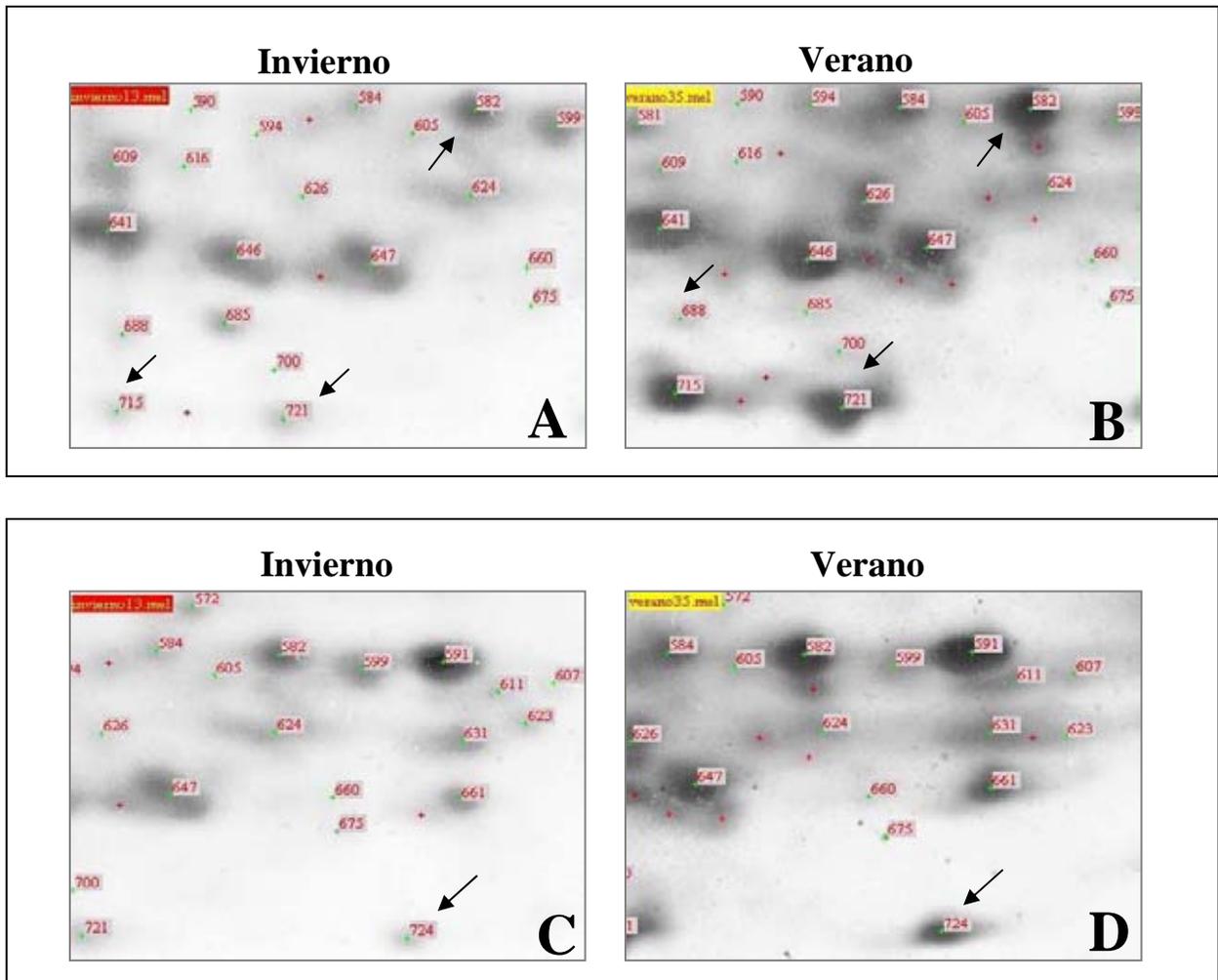


Figura 10: Identificación en geles bidimensionales de proteínas nucleares que presentan una expresión mayoritaria durante la estación veraniega. Los paneles (A) y (C) muestran una región representativa del fraccionamiento de extractos nucleares de carpas aclimatizadas a invierno. En tanto, los paneles (B) y (D) destacan la región equivalente dentro del fraccionamiento de extractos nucleares representativos de carpas aclimatizadas a verano. Los números corresponden a los identificadores asignados durante el análisis. Las flechas indican las proteínas seleccionadas como representativas de una expresión mayoritaria durante el estado adaptativo de verano comparados con invierno.

Grupo ID	Media	M.S.D	CV	%V (Invierno)	%V (Verano)	pI	MW(kDa)
94	0,200	0,100	0,500	0,300	0,100	5,81	118,0
144	0,253	0,183	0,723	0,436	0,069	7,85	86,0
145	0,233	0,147	0,631	0,380	0,086	7,70	86,0
150	0,241	0,139	0,577	0,380	0,102	8,10	86,0
212	0,353	0,178	0,504	0,529	0,174	4,85	71,0
246	0,327	0,164	0,502	0,491	0,163	8,10	72,0
400	0,350	0,175	0,500	0,525	0,175	3,98	48,0
480	0,208	0,146	0,702	0,354	0,062	5,42	39,5
513	0,357	0,179	0,501	0,536	0,178	5,42	35,5
653	0,150	0,120	0,800	0,270	0,030	9,25	30,0

Tabla 4: Análisis de las proteínas que presentan un mayor contenido durante la estación invernal. Se indican ejemplos de proteínas que presentan un mayor coeficiente de variación en invierno. **Grupo ID** corresponde al número de identificación asignado al grupo de *spots*. La **Media** corresponde a la tendencia central o promedio de los porcentajes de volumen de los *spots* de ambas estaciones. **M.S.D** es el promedio de la desviación estándar de cada grupo. El Coeficiente de Variación (**CV**) es el cociente entre **M.S.D** y la media. La abundancia relativa de los *spots* de invierno y verano esta medida en píxeles. **pI** es el punto isoelectrico y **MW** es el tamaño molecular en kDa de la proteína. Los *spots* destacados en negrilla corresponden a los ejemplos señalados en la figura 11.

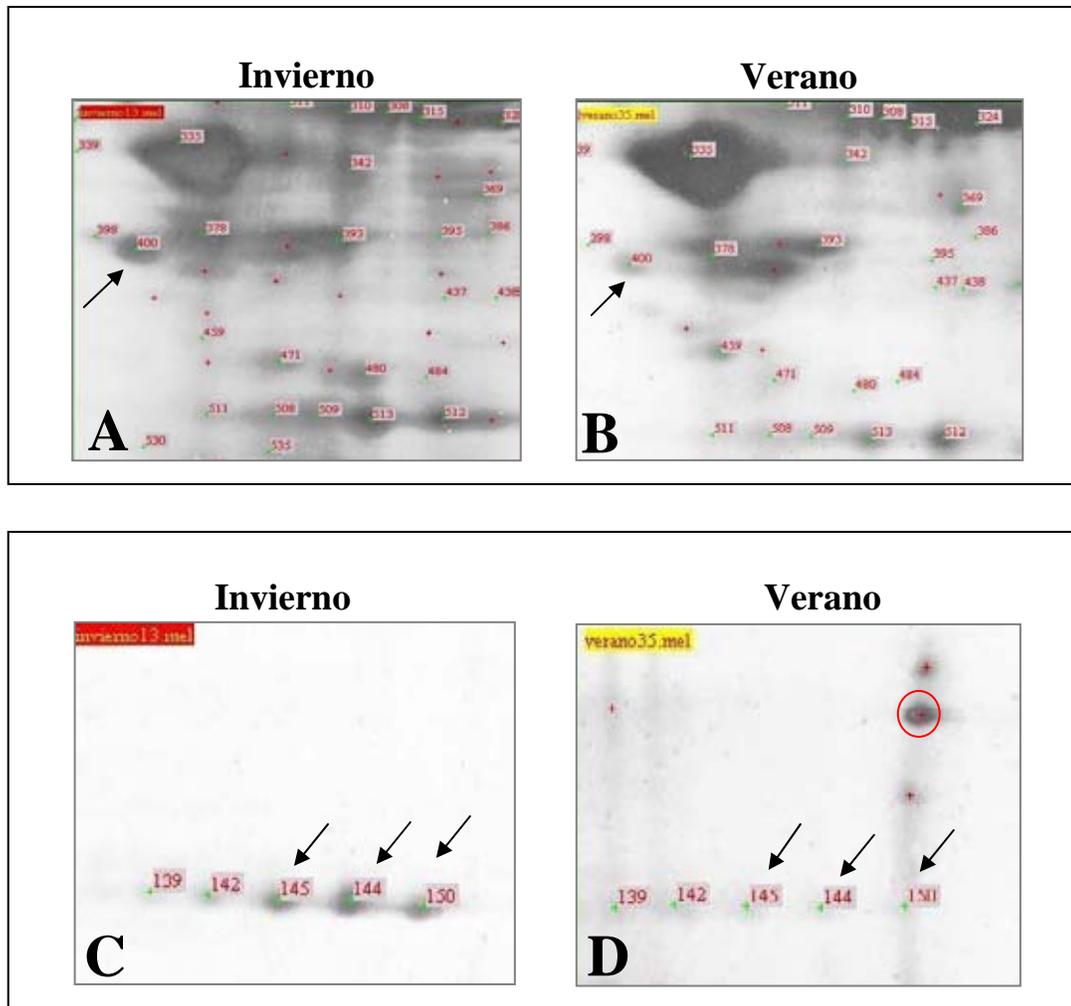


Figura 11: Identificación en geles bidimensionales de proteínas nucleares que presentan una expresión mayoritaria durante la estación invernal. Los paneles (A) y (C) muestran una región representativa del fraccionamiento de extractos nucleares de carpas aclimatizadas a invierno. En tanto, los paneles (B) y (D) destacan la región equivalente dentro del fraccionamiento de extractos nucleares representativos de carpas aclimatizadas a verano. Los números corresponden a los identificadores asignados durante el análisis. Las flechas indican las proteínas seleccionadas como representativas de una expresión mayoritaria durante el estado adaptativo de invierno comparados con verano. Igualmente, en el gel de verano se muestra como ejemplo en un círculo rojo, un *spot* que presenta una expresión exclusiva en esta estación.

5. DISCUSIÓN

El proceso de adaptación estacional que presenta el teleósteo euritermal *Cyprinus carpio*, constituye un excelente modelo de estudio para comprender los mecanismos moleculares que es capaz de generar un organismo enfrentado a los desafíos impuestos por su hábitat. Desde un punto de vista bioquímico, la variación estacional de temperaturas a la cual este pez está sometido debería generar un gran impacto sobre todos sus procesos biológicos influyendo, por ejemplo, en la velocidad de las reacciones químicas y enzimáticas, la fluidez de las membranas y la estructura de las proteínas (Somero, 1997). De esta manera, un coordinado proceso de adaptación estacional resulta esencial para la sobrevivencia de este organismo.

En términos generales, las evidencias reportadas previamente señalan que durante dicho proceso de adaptación estacional ocurre una reprogramación coordinada de la expresión génica concomitante al fenómeno de aclimatización (Álvarez *et al.*, 2004). En este contexto, una de las características celulares más notables observada durante este proceso consiste en una drástica reorganización ultraestructural de los componentes nucleolares, fenómeno el cual está íntimamente asociado a la actividad transcripcional de los genes ribosomales (Sáez *et al.*, 1984). De esta manera, queda en evidencia que una de las principales vías metabólicas de la célula se ve directamente afectada por la reprogramación génica concomitante al proceso de adaptación.

La síntesis de rRNA constituye aproximadamente el 60-70% de la síntesis total de RNA nuclear (Medina *et al.*, 2000). En células animales en crecimiento activo, en células somáticas de plantas y también en levaduras, la síntesis rRNA por la RNA polimerasa I llega a representar cerca del 50% de la producción total de RNA celular (Raska *et al.*, 2004). En consecuencia, dicho proceso emerge como indispensable para la adaptación, crecimiento y proliferación celular, todos ellos, eventos que requieren una gran demanda energética por parte de la célula. Asimismo, es

sabido que este proceso debe responder virtualmente a todas las cascadas de transducción de señales que regulan la homeostasis, proporcionando de esta manera a la célula la maquinaria de síntesis de proteínas que llevan a sustentar dichas funciones (González-Camacho y Medina, 2004).

La compartimentalización de la célula eucariota representa una gran ventaja para el estudio de los proteómas subcelulares (Dreger *et al.*, 2003a). Actualmente, se postula que un estudio de proteínas a nivel subcelular surge como la base para monitorear los cambios dinámicos en el proteóma celular. De esta manera, un análisis de este tipo permitiría obtener información funcional relevante sobre los sistemas biológicos (Dreger *et al.*, 2003b). Siendo el núcleo el compartimiento celular que contiene la información genética y, consecuentemente donde su regulación es mediada, el estudio del contenido e identificación de la población de proteínas nucleares aparece como esencial para un mejor entendimiento de la función y regulación del genoma. Así, el estudio sistemático del proteoma nuclear bajo diferentes condiciones fisiológicas aportaría indicios claves respecto a las funciones moleculares de sus proteínas residentes (Turck *et al.*, 2004).

El estudio cuantitativo y cualitativo del proteóma celular permite realizar una exploración cabal de un estado celular determinado. Al mismo tiempo, presenta la gran ventaja que se centra directamente en las moléculas efectoras finales, las proteínas. Adicionalmente, también permite establecer o predecir eventuales modificaciones post-traduccionales o cambios en la localización subcelular de las proteínas en respuesta a un cierto estado fisiológico de la célula (Gygi *et al.*, 1999).

En orden a evidenciar y comprender en mejor detalle los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de reprogramación génica estacional de la carpa, hemos desarrollado

un estudio proteómico en núcleos de hepatocitos. Para ello, recurrimos al análisis de los perfiles proteicos en distintas condiciones de adaptación.

En primer lugar, se procedió a evaluar el protocolo de purificación de extractos nucleares, así como ensayar la expresión diferencial que exhiben algunas proteínas representativas de dicho compartimiento.

Teniendo en consideración que nucleolina es la proteína no ribosomal más abundante del nucléolo (Lapeyre *et al.*, 1987; Tuteja y Tuteja, 1998), su detección nos permitió comprobar un significativo grado de enriquecimiento de proteínas específicas del compartimiento nuclear. No obstante, es necesario precisar que en nuestros experimentos también observamos una discreta detección de esta proteína en las fracciones totales y citoplasmáticas. Al respecto, podemos especular que dicha señal positiva puede ser asociada a la existencia de isoformas de nucleolina las cuales exhiben una localización citoplasmática. En efecto, ciertas isoformas de nucleolina con presencia citoplasmática han sido recientemente investigadas, las cuales han sido asociadas a funciones tales como estabilizar mRNAs por medio de su capacidad de interactuar con ácidos nucleicos a través de sus dominios de unión a RNA (RBD) (Ginisty *et al.*, 1999), o bien inhibiendo la traducción de dichos mensajeros mediante el bloqueo de la formación del complejo de inicio de la traducción (Sengupta *et al.*, 2004).

En el contexto del proceso de adaptación estacional de la carpa, nuestro estudio confirmó una expresión diferencial de la proteína nucleolina. Nuestros resultados permitieron establecer que el contenido de nucleolina es aproximadamente tres veces superior durante la estación invernal respecto a la estación veraniega. Esta observación es consistente con un eventual rol de la proteína en la inactivación transiente de la síntesis de rRNA observada en invierno (Vera *et al.*, 1993; Álvarez *et al.*, 2003). Diversos trabajos de investigación han permitido proponer que nucleolina actuaría reprimiendo el proceso de transcripción de rRNA mediado por la RNA

polimerasa I, uniéndose directa o indirectamente al promotor de los genes de rRNA, pero no afectando directamente la actividad de la enzima (Roger *et al.*, 2002). Igualmente, un segundo mecanismo alternativo ha propuesto que el dominio N-terminal de nucleolina (rico en aminoácidos básicos) es capaz de interactuar con un dominio homólogo presente en la histona H1, lo cual promovería la condensación de la cromatina y explicaría el rol represor de la proteína (Kharrat *et al.*, 1991; Roger *et al.*, 2002). Contrariamente a lo esperado, y en oposición a esta previa observación, se ha descrito que nucleolina incrementaría su concentración en células animales y vegetales en proliferación (Lapeyre *et al.*, 1986; Srivastava y Pollard 1999; González-Camacho y Medina 2004; Turck *et al.*, 2004). Esta actividad proliferativa de nucleolina, recientemente ha sido atribuida a su dominio rico en residuos glicina y arginina (GAR) el cual presentaría una actividad helicasa que explicaría dicho comportamiento (Nasirudin *et al.*, 2005). Si tenemos en consideración ambos antecedentes, al parecer el rol inhibitorio o activador de nucleolina esta determinado por factores de concentración en el primer caso (Roger *et al.*, 2002) o bien por el nivel de fosforilación de la proteína en el segundo (Zhou *et al.*, 1997 Morimoto *et al.*, 2002; González-Camacho y Medina 2004). Interesantemente, y respecto al grado de fosforilación de la proteína, González-Camacho y Medina (2004) observaron en células vegetales en proliferación que NopA100 (el equivalente a nucleolina en células vegetales) exhibe una amplia gama de estados de fosforilación que se reduce substancialmente en células no proliferativas.

La expresión estacional de una segunda proteína nucleolar nucleofosmina (B23) también fue evaluada. Al igual que nucleolina, esta proteína también fue utilizada como marcador de enriquecimiento de los extractos nucleares. La proteína B23, así como nucleolina, es una fosfoproteína multifuncional que también puede unirse a ácidos nucleicos y que ha sido observada por presentar una actividad tipo ribonucleasa (Hingorani *et al.*, 2000). Previamente,

desde el punto de vista funcional, algunos autores han postulado que la proteína B23 actuaría como chaperona en el ensamblaje de ribosomas (Szebeni *et al.*, 1999; Szebeni *et al.*, 2003). Asimismo, se ha podido evidenciar que esta proteína presenta una alta movilidad entre el nucléolo y el nucleoplasma (Chen y Huang 2001). En este contexto, ha sido posible establecer que su localización nucleolar es dependiente de un estado de transcripción activa del rDNA (Yung *et al.*, 1985). Para establecer esta conclusión, los autores estudiaron el efecto de drogas que inhiben la síntesis de RNA ribosomal respecto a la localización de la proteína B23 en cultivos celulares. Así, las células tratadas con actinomicina D (antibiótico inhibidor de la actividad de la RNA polimerasa I) presentan una disminución del 60% de la cantidad de B23 residente en el nucléolo cuando se compara con células no tratadas con el antibiótico. Consistentemente, los niveles de B23 en el nucleoplasma aumentaron en un rango de tres veces en las células tratadas con el antibiótico. Por otro lado, bajas dosis de α -amanitina (inhibidor de la actividad de la RNA polimerasa II en estas condiciones) y de ciertos inhibidores de la síntesis de proteínas no tuvieron ningún efecto sobre la translocación de B23. En consecuencia, y a la luz de estos y otros antecedentes experimentales, se ha propuesto que B23 debería tener una participación directa en la biogénesis ribosomal. En particular, se ha demostrado que deleciones en el dominio C-terminal de B23 (el cual alberga la actividad ribonucleasa) conducen a alteraciones en el procesamiento del espaciador del transcrito interno 2 (ITS2) del pre-rRNA, afectando especialmente la producción del rRNA 28S (Itahana *et al.*, 2003). Adicionalmente, este dominio ha sido vinculado como el responsable de la localización nucleolar de B23 (Huang *et al.*, 2005).

Respecto a nuestros estudios, los resultados permitieron evidenciar una mayor expresión de B23 en los extractos provenientes de carpas aclimatizadas a verano comparado con invierno.

De esta forma, nuestros datos aparecerían como consistentes con los eventuales roles de B23 propuestos durante la biogénesis ribosomal.

La inmunodetección de B23 en carpa fue observada como una única banda en el extracto nuclear de verano. No obstante, y de manera inesperada, su tamaño molecular estimado fue considerablemente mayor al descrito para la proteína B23 en mamíferos (Feuerstein *et al.*, 1988). Esta disparidad de tamaño, creemos que puede ser debida a una isoforma de B23 resultante de proceso de *splicing* alternativo, similar a lo descrito recientemente también para B23 en humano (Huang *et al.*, 2005). También es posible especular que tal disparidad de tamaños sea un producto de la adquisición de una gran cantidad de modificaciones post-traduccionales por parte de la proteína en la carpa.

Finalmente, la histona macroH2A fue utilizada como tercer marcador nuclear. Esta proteína consiste en un dominio amino-terminal que se asemeja a la histona canónica H2A seguida por una región no histona denominado “dominio macro” (Costanzi y Pehrson, 2001; Abbott *et al.*, 2004). Desde su primera descripción, se ha propuesto que macro H2A tendría una actividad inhibitoria de la transcripción (Perche *et al.*, 2003). Una observación que sustenta esta eventual función, es la notable acumulación de la proteína que se observa durante el proceso de silenciamiento del cromosoma X en hembras de mamíferos (Chadwick y Willard 2002).

En la carpa hemos demostrado que la proteína macroH2A presenta un tamaño molecular de aproximadamente 39 kDa, tamaño similar a lo descrito para esta proteína en otras especies. En lo que concierne a su expresión estacional, se ha podido establecer que durante el proceso de adaptación estacional de la carpa, la proteína macroH2A presenta una expresión notablemente mayor durante la estación invernal y con localización exclusivamente nuclear (Pinto *et al.*, 2005). El mayor contenido de macroH2A en la estación fría es concordante con el descenso de la actividad transcripcional evidenciada durante este período adaptativo. De esta manera, es posible

sugerir que esta variante de histona puede actuar como uno de los factores regulatorios claves de la inhibición transitoria del proceso de transcripción durante la aclimatización de la carpa. Respecto a su mecanismo de acción, se ha postulado que la inactivación de genes mediada por macroH2A puede estar dada por un incremento en la estabilidad de la estructura del nucleosoma comparado cuando este complejo está formado por la histona H2A clásica. De esta forma, la acción de macroH2A provocaría la formación de un nucleosoma asimétrico, con el dominio “macro” fuera del *core* del nucleosoma y con una alta afinidad por el DNA. Todo ello redundaría en una significativa disminución de la accesibilidad de los factores iniciadores de la transcripción (Abbott *et al.*, 2004).

Habiendo podido establecer un alto grado de enriquecimiento de los extractos nucleares purificados, y evidenciando además cambios significativos en la expresión de tres importantes proteínas nucleares, se procedió a comparar los proteómas nucleares de ambas condiciones adaptativas del pez *C. carpio*.

Los perfiles nucleares en geles bidimensionales, nos permitieron poner en evidencia que la mayoría de las proteínas se resuelve entre los rangos más bien básicos de la gradiente de pH. Pudimos observar también que existe una alta concentración de proteínas con carácter extremadamente básico que no pudieron ser resueltas en el rango de pH utilizado (pH 3 a 10). Estas proteínas se acumulan en el extremo de pH superior a 10, y todo hace suponer que entre esta población se deben encontrar las histonas canónicas, las cuales normalmente constituyen la población mas abundante del extracto nuclear (Pusarla y Bhargava, 2005). En orden a concentrar nuestra atención en los perfiles proteicos correspondientes a proteínas no histónicas, sistemáticamente estas proteínas fueron excluidas en las corridas electroforéticas.

El análisis simultáneo de tres geles bidimensionales representativos de cada estación, y mediante un programa computacional diseñado para este fin, pudimos establecer por primera vez

un patrón proteico común y representativo para cada estación (geles virtuales). La superposición de estos geles sintéticos permitió la comparación de los estados adaptativos, de tal manera que pudimos acordar un grupo de proteínas específicas de cada estación, y así poder clasificar aquellas comunes presentes en ambas condiciones (pares). Dentro de esta clasificación, fue posible determinar diferencias cuantitativas importantes, principalmente reflejadas en los porcentajes de volumen (área x intensidad) de los *spots* detectados. De acuerdo al parámetro establecido como coeficiente de variación, pudimos poner en evidencia aquellas que presentaban una expresión diferencial asociada al proceso de adaptación estacional en la carpa. A partir de ellas, pudimos seleccionar 4 proteínas representativas de cada estación, las cuales actualmente están siendo caracterizadas e identificadas mediante experiencias de espectrometría de masa en colaboración con el Dr. Phillipe Bouvet (Francia).

Adicionalmente es necesario destacar que igualmente son de particular interés aquellas proteínas que fueron detectadas únicamente en una condición de adaptación. Este grupo de proteínas constituiría un ejemplo inequívoco de una expresión diferencial entre ambas estaciones. Adicionalmente, otro grupo de interés son aquellos *spots* en los que se evidenció un desplazamiento horizontal en el gel. Este último efecto puede ser asociado a proteínas que sufren modificaciones post-traduccionales que provocan una alteración de su pI (Mann y Jensen, 2003).

Sin embargo, estas últimas dos poblaciones requieren de un análisis más acabado ya que en geles bidimensionales de alta resolución, ellas pueden producirse ya sea por efectos de carga o bien de preparación de las muestras. Por tales motivos, en esta primera aproximación decidimos centrar nuestro interés en los *spots* presentes en ambas estaciones y que consistentemente muestran diferencias en sus coeficientes de variación.

Al término de este trabajo, podemos concluir que nuestra investigación se posiciona como el primer estudio global de la expresión de proteínas nucleares bajo condiciones de adaptación

estacional en la carpa. Igualmente, este es el primer análisis proteómico nuclear realizado en este pez, y de acuerdo a los resultados obtenidos surge como una aproximación que presenta un formidable potencial para comprender el complejo proceso de aclimatización estacional. Así, observamos que existe un número importante de proteínas que se ven afectadas en su expresión génica durante el proceso de adaptación. Sin duda, el estudio acabado de esta población de proteínas requiere de un profundo y sistemático análisis, razón por la cual actualmente hemos iniciado dicha tarea seleccionando cuatro proteínas representativas de cada estación para su identificación mediante ensayos de espectrometría de masa. De esta manera, ellas representan el primer grupo de candidatos proteicos que intentaremos tipificar con el objetivo de aportar nuevo conocimiento del complejo proceso molecular que se desencadena como respuesta al fenómeno de adaptación en el pez *Cyprinus carpio*.

6. BIBLIOGRAFIA

Manual of 2-D Electrophoresis for Proteomic. A Methods and Product Manual. *BIO-RAD Laboratories*, INC. (USA)

Abbott D.W., Laszczak M., Lewis J.D., Su H., Moore S.C., Hills M., Dimitrov S., Ausio J. (2004) Structural characterization of macroH2A containing chromatin. *Biochemistry.*, **43**:1352-9.

Álvarez M., Molina A., Quezada C., Pinto R., Krauskopf M., Vera M.I. (2004) Eurythermal fish acclimatization and nucleolar function: a review. *Journal of Thermal Biology.*, **29**: 663 –667.

Álvarez M., Quezada C., Navarro C., Molina A., Bouvet P., Krauskopf M., and Vera M.I. (2003) An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochem Biophys Res Commun.*, **301**: 152–158.

Andersen J.S., Lyon C.E., Fox A.H., Leung A.K., Lam Y.W., Steen H., Mann M., Lamond A.I. (2002) Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol.*, **12**: 1-11.

Arends R.J., Van der Gaag R., Martens G.J., Wendelaar Bonga S.E., Flik G. (1998) Differential expression of two pro-opiomelanocortin mRNAs during temperature stress in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *J Endocrinol.*, **159**: 85–91.

Campos H., Bucarey E., Arenas J.N. (1974) Estudios limnológicos del lago Riñihue y río Valdivia (Chile) Boln. Soc. Biol. Concepción, 48: 47-67.

Chadwick B.P., Willard H.F. (2002) Cell cycle-dependent localization of macroH2A in chromatin of the inactive X chromosome. *J Cell Biol.*, **157**:1113-23.

Chen D., Huang S. (2001) Nucleolar Components Involved in Ribosome Biogenesis Cycle between Nucleolus and Nucleoplasm in Interphase Cells. *J. Cell. Biol.*, **153**; 169-176.

Choe L.H., Lee K.H. (2003) Quantitative and qualitative measure of intralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis. *Electrophoresis.*, **24**: 3500-7.

Cole N.J., Hall T.E., Martin C.I., Chapman M.A., Kobiyama A., Nihei Y., Watabe S., Johnston I.A. (2004) Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L. *J Exp Biol.*, **207**: 4239-48.

Costanzi C., Pehrson J.R. (2001) MACROH2A2, a new member of the MARCOH2A core histone family. *J Biol Chem.*, **276**: 21776-84.

Dreger M., (2003a) Proteome analysis at the level of subcellular structures. *Eur. J. Biochem.*, **270**: 589-599.

Dreger M., (2003b) Subcellular proteomics. *Mass Spectrom Rev.*, **22**: 27-56.

Fatica A., Tollervey D. (2002) Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol.*, **14**: 313-8.

Feuerstein N., Chan P.K., Mond J.J. (1988) Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. Implication for the role of the nucleolus in early transduction of mitogenic signals. *J Biol Chem.*, **263**:10608-12.

Figueroa J., Molina A., Álvarez M., Villanueva J., Reyes A., León G., Krauskopf M. (1994) Prolactin gene expression and changes of prolactin pituitary level during the seasonal acclimatization of the carp. *Comp Biochem Physiol.*, **108B**: B 551–560.

Figueroa J., Reyes A., Ríos M., Vera M.I., Krauskopf M. (1997) Effect of temperature and photoperiod on prolactin transcription in *Cyprinus carpio*. *Zool Sci.*, **14**:353–357.

Ginisty H., Sicard H., Roger B., Bouvet P. (1999) Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci.*, **112**: 761-72.

Goldspink G. (1995) Adaptation of fish to different environmental temperature by qualitative and quantitative changes in gene expression. *J Therm Biol.*, **20**:167–174.

González-Camacho F., Medina F.J. (2004) Identification of specific plant nucleolar phosphoproteins in a functional proteomic analysis. *Proteomics.*, **4**: 407-17.

Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.*, **19**:1720-30.

Harreman M.T., Kline T.M., Milford H.G., Harben M.B., Hodel A.E., Corbett A.H. (2004) Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signals. *J Biol Chem.*, **279**: 20613-21.

Hingorani K., Szebeni A., Olson M.O. (2000) Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem.*, **275**: 24451-7.

Hirayama Y., Kobiyama A., Ochiai Y., Watabe S. (1998) Two types of mRNA encoding myosin regulatory light chain in carp fast skeletal muscle differ in their 39 non-coding regions and expression patterns following temperature acclimation. *J Exp Biol.*, **201**: 2815–2820.

Hirayama Y., Watabe S. (1997) Structural differences in the crossbridge head of temperature-associated myosin subfragment-1 isoforms from carp fast skeletal muscle. *Eur J Biochem.*, **246**: 380–387.

Huang N., Negi S., Szebeni A., Olson M.O. (2005) Protein NPM3 interacts with the multifunctional nucleolar protein B23/nucleophosmin and inhibits ribosome biogenesis. *J. Biol. Chem.*, **280**: 5496-5502.

Itahana K., Bhat K. P., Jin A., Itahana Y., Hawke D., Kobayashi R., and Zhang Y. (2003) Tumor Suppressor ARF Degrades B23, a Nucleolar Protein Involved in Ribosome Biogenesis and Cell Proliferation. *Mol. Cell.*, **12**: 1151-1164.

Itoi S., Kinoshita S., Kikuchi K., Watabe S. (2003) Changes of carp FoF1-ATPase in association with temperature acclimation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, **284**: 153-63.

Johnston I.A, Temple G.K. (2002) Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour (Review). *The Journal of Experimental Biology.*, **205**: 2305–2322.

Kausel G., Vera M.I., San Martin R., Figueroa J., Molina A., Muller M., Martial J., Krauskopf M. (1999) Transcription factor Pit-1 expression is modulated upon seasonal acclimatization of eurythermal ectotherms: Identification of two Pit-1 genes in the carp. *J Cell Biochem.*, **75**: 598–609.

Kharrat A., Derancourt J., Dorée M., Amalric F. and Erard M. (1991) Synergistic Effect of Histone H1 and Nucleolin on Chromatin Condensation in Mitosis: Role of a Phosphorylated Heteromer. *Biochemistry.*, **30**: 10329-10336.

Lapeyre B., Amalric F., Ghaffari S.H., Rao S.V., Dumbar T.S., Olson M.O. (1986) Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine-containing region located near the carboxyl-terminal end of nucleolin (C23 and 100 kDa). *J Biol Chem.*, **261**: 9167-73.

Lapeyre B., Bourbon H., 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.*, **84**: 1472-6.

Lucassen M., Schmidt A., Eckerle L.G. and Pörtner H.O. (2003) Mitochondrial proliferation in the permanent vs. temporary cold: enzyme activities and mRNA levels in Antarctic and temperate zoarcid fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, **285**: R1410–R1420.

Mann M., Jensen O.N. (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol.*, **21**: 255-61.

Medina F.J., Cerdido A., De Cárcer G. (2000) The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. *Eur J Histochem.*, **44**: 117-31.

Mélèse T., Xue Z. (1995) The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol.*, **7**: 319-24.

Morimoto H., Okamura H., Haneji T. (2002) Interaction of protein phosphatase 1 delta with nucleolin in human osteoblastic cells. *J Histochem Cytochem.*, **50**: 1187-93.

Nasirudin K.M., Ehtesham N.Z., Tuteja R., Sopory S.K., Tuteja N. (2005) The Gly-Arg-rich C-terminal domain of pea nucleolin is a DNA helicase that catalytically translocates in the 5'- to 3'-direction. *Arch Biochem Biophys.*, **434**: 306-15.

Olson M.O, Hingorani K., Szebeni A. (2002) Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int Rev Cytol.*, **219**: 199-266.

Oñate S., Amthauer R., Krauskopf M. (1987) Differences in the tRNA population between summer- and winter acclimatized carp. *Comp Biochem Physiol.*, **86B**: 663–666.

Pehrson J.R., Fuji R.N. (1998) Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res.*, **26**: 2837-42.

Perche P.Y., Robert-Nicoud M., Khochbin S., Vourc'h C. (2003) Nucleosome differentiation: role of histone H2A variants. *Med Sci.*, **19**: 1137-45.

Pinto R., Ivaldi C., Reyes M., Doyen C., Mietton F., Mongelard F., Alvarez M., Molina A., Dimitrov S., Krauskopf M., Vera M.I., Bouvet P. (2005) Seasonal environmental changes regulate the expression of the histone variant macroH2A in an eurythermal fish. *FEBS Lett.*, **579**: 5553-8.

Prosser L. Ladd. (1986) Adaptational biology: Molecules to organisms. John Wiley & Sons Press, New York. chapt.1, p. 1-2.

Pusarla R.H., Bhargava P. (2005) Histones in functional diversification. *FEBS J.*, **272**: 5149-68.

Puvion E., Viron A., Bernhard W. (1977) Unusual accumulation of ribonucleoprotein constituents in the nucleus of the cultured rat liver cells after hypothermal shock. *J. Microscopie Biol. Cell.*, **29**: 81-88.

Raska I., Koberna K., Malinsky J., Fidlerova H., Masata M. (2004) The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell.*, **96**: 579-94. Review.

Roger B., Moisand A., Amalric F., Bouvet P. (2002) Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. *J Biol Chem.*, **277**: 10209-19.

Roix J., Misteli T. (2002) Genomes, proteomes, and dynamic networks in the cell nucleus. *Histochem Cell Biol.*, **118**: 105-16.

Sáez L., Amthauer R., Rodríguez E., Krauskopf M. (1984b) Effects of insulin on the fine structure of hepatocytes from winter-acclimatized carp: studies on protein synthesis. *J. Exp. Zool.*, **230**: 187-197.

Sáez L., Zuvic T., Amthauer R., Rodríguez E., Krauskopf M. (1984a) Fish liver protein synthesis during cold acclimatization: Seasonal changes of the ultrastructure of the carp hepatocyte. *J. Exp. Zool.*, **230**: 175-186.

Sambrook J., Russell D. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3 ed., Vol. 3: A8.46-A8.47.

Scherl A., Coute Y., Deon C., Calle A., Kindbeiter K., Sanchez J.C., Greco A., Hochstrasser D., Diaz J.J. (2002) Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell.*, **13**: 4100-9.

Schwarzacher H.G., Wachtler F. (1993) The nucleolus. *Anat Embryol.*, (Berl). **188**: 515-36.

Segner H., Braunbeck T. (1990) Adaptive changes of liver composition and structure in golden ide during winter acclimatization. *J Exp Zool.*, **255**: 171–185.

Sengupta T.K., Bandyopadhyay S., Fernandes D.J., Spicer E.K. (2004) Identification of nucleolin as an AU-rich element binding protein involved in bcl-2 mRNA stabilization. *J Biol Chem.*, **279**: 10855-63.

Shiio Y., Eisenman R.N., Yi E.C., Donohoe S., Goodlett D.R., Aebersold R. (2003) Quantitative proteomic analysis of chromatin-associated factors. *J Am Soc Mass Spectrom.*, **14**: 696-703.

Somero G. (1997) Temperature relationships; from molecules to biogeography. In: Handbook of Physiology. Comparative Physiology. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., sect. 13, vol. II, chapt.19, p. 1391–1444.

Srivastava M., Pollard H.B. (1999) Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J.*, **13**: 1911-22.

Stein G.S., Zaidi S.K., Braastad C.D., Montecino M., van Wijnen A.J., Choi J.Y., Stein J.L., Lian J.B., Javed A. (2003) Functional architecture of the nucleus: organizing the regulatory machinery for gene expression, replication and repair. *Trends Cell Biol.*, **13**: 584-92.

Stein G.S., Lian J.B., Van Wijnen A.J., Stein J.L., Javed A., Montecino M., Zaidi S.K., Young D., Choi J.Y., Gutierrez S., Pockwinse S. (2004) Nuclear microenvironments support assembly and organization of the transcriptional regulatory machinery for cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem.*, **91**: 287-302.

Szebeni A., Hingorani K., Negi S., Olson M.O. (2003) Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein B23. *J Biol Chem.*, **278**: 9107-15.

Szebeni A., Olson M.O. (1999) Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci.*, **8**: 905-12.

Takahashi N., Yanagida M., Fujiyama S., Hayano T., and Isobe T. (2003) Proteomic Snapshot analyses of Preribosomal Ribonucleoprotein Complexes formed at various stages of Ribosome Biogenesis in Yeast and Mammalian Cells. *Mass Spectrometry Reviews.*, **22**: 287– 317.

Thiry M., Goessens G. (1996) The nucleolus during the cell cycle. *New York: Landes Company, Chapman and Hall RG.*

Tiku P.E., Gracey A.Y., Macartney A.I., Beynon R.J., Cossins A.R. (1996) Cold-induced expression of D9-desaturase in carp by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Science.*, **271**: 815–818.

Turck N., Richert S., Gendry P., Stutzmann J., Kedinger M., Leize E., Simon-Assmann P., Van Dorsselaer A., Launay J.F. (2004) Proteomic analysis of nuclear proteins from proliferative and differentiated human colonic intestinal epithelial cells. *Proteomics.*, **4**: 93–105

Tuteja R., Tuteja N. (1998) Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, **33**: 407-36.

Vera M.I., Molina A., Pinto R., Reyes M., Alvarez M., Krauskopf E., Quezada C., Torres J., Krauskopf M. (2003) Genomic organization of the rDNA cistron of the teleost fish *Cyprinus carpio*. *Biol Res.*, **36**: 241-51.

Vera M.I., Kausel G., Barrera R., Leal S., Figueroa J., and Quezada C. (2000) Seasonal adaptation modulates the expression of the protein kinase CK2 beta subunit gene in the carp. *Biochem Biophys Res Commun.*, **271**: 735-40.

Vera M.I., Norambuena L., Álvarez M., Figueroa J., Molina A., León G., Krauskopf M. (1993a) Reprogramming of nucleolar gene expression during the acclimatization of the carp *Cell. Mol. Biol. Res.*, **39**: 665-674.

Vera M.I., Ríos H.M., De la Fuente E., Figueroa J., y Krauskopf M. (1997) Seasonal acclimatization of the carp involves differential expression of 5,8S ribosomal RNA in pituitary cells. *Comp Biochem. Physiol.*, **118B**: 777-781.

Vera M.I., Romero F., Figueroa J., Amthauer R., León G., Villanueva J., Krauskopf M. (1993b) Oral administration of insulin in winter-acclimatized carp (*Cyprinus carpio*) induces hepatic ultrastructural changes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106A**: 677-682.

Visintin R., Amon A. (2000) The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr Opin Cell Biol.*, **12**: 752.

Yung B.Y., Busch H., Chan P.K. (1985) Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 (37 kDa/pI 5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. *Biochim Biophys Acta.*, **826**: 167-73.

Zhou G., Seibenhener M.L., Wooten M.W. (1997) Nucleolin is a protein kinase C-zeta substrate. Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells. *J Biol Chem.*, **272**: 31130-7.