



03081
1
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

**Expresión de la Proteína Centromérica
CENP-B en Células Vegetales**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:
Olga Yadira Barbosa Cisneros

MÉXICO, D.F., DICIEMBRE 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION

DISCONTINUA

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Fisiología Celular

**Expresión de la Proteína Centromérica CENP-B
en Células Vegetales**

TESIS

Para obtener el grado de

Doctor en Investigación Biomédica Básica

Presenta:

Olga Yadira Barbosa Cisneros

Asesores:

Dr. Antonio Peña Díaz

Dr. Rafael Herrera Esparza

Dr. Jesús Aguirre Linares

Dr. Edgardo Escamilla Marván

Lugar de realización:

Laboratorio de Biología Molecular
Centro de Biología Experimental, UAZ

México, D.F. Diciembre 1998

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Carlos Casiano de The Scripps Foundation, La Jolla CA. por su valiosa colaboración al proporcionarnos sueros monoespecíficos para las proteínas centroméricas.

Al Dr. José Moreno del Centro Médico Nacional Siglo XXI por permitirnos sintetizar en su laboratorio los oligonucleótidos necesarios para este trabajo y la colaboración con sueros de pacientes con CREST.

A la Dra. Olga Vera del Centro Médico La Raza, por proporcionarnos gentilmente algunos de los sueros de pacientes con CREST.

Al CONACyT por el apoyo económico para la realización de este trabajo con el Proyecto de investigación registrado con el número 1877P-M a nombre del Dr. Rafael Herrera-Esparza.

Además de la beca a nombre de Olga Yadira Barbosa Cisneros, registrado bajo el número 92261.

A mis asesores: Antonio Peña, Rafael Herrera, Jesús Aguirre, Edgardo Escamilla, por su valiosa ayuda en los comentarios y discusión de resultados, así como en la lectura y corrección del presente manuscrito.

De manera muy especial al Dr. Rafael Herrera Esparza por la confianza depositada en mí, y permitirme desarrollar el presente trabajo en el laboratorio de Biología Molecular, del cual es responsable.

A Amilcar

Que con su efimera presencia dio un cambio radical a mi vida

A Gloria

Cuya sentida ausencia me lleva a ver hacia adelante día con día

A todos los que están, por que están y no por lo que son.

Indice

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Introducción	1
Ciclo celular	
Interfase	
Fase G ₁	
Fase S	2
Fase G ₂	3
División Celular	
Profase	4
Prometafase	
Metafase	5
Anafase	
Telofase	
La citocinesis	6
Cromosomas	6
Características del complejo centrómero/cinetocoro	7
Función del centrómero	8
Autoanticuerpos; sondas moleculares para el centrómero	9
CENP-A	
CENP-B	
CENP-C	10
CENP-D	
Pasajeros cromosomales	
INCENP	
CENP-E	11
CENP-F o p ³³⁰	
MSA-36	
JB	
TD-60	12
37A5	
Modelos propuestos para la organización del Centrómero/cinetocoro	13
Participación de CENP en el ensamble del centrómero/cinetocoro	
Los centrómeros y el ciclo celular en vegetales	14
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivo general	18
Objetivos específicos	

Material y métodos	19
Caracterización de sueros anti-centrómero	
Cultivos celulares	
Localización de los centrómeros por inmunofluorescencia indirecta	19
Aislamiento de las proteínas centroméricas a partir de extractos celulares crudos	
Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	
Purificación de anticuerpos de afinidad CENP-B	20
Síntesis de oligonucleótidos para usarlos como sondas y para amplificación por PCR	
Digestión con nucleasas	
Ensayos de interacción de α DNA y CENP-B	21
Marcaje de oligonucleótidos para CENP-B box por oligo-tailing	
Hibridación <i>in situ</i> y visualización de α DNA	
Reacción en cadena de polimerasa/reverso transcriptasa (rtPCR)	22
Resultados	24
Caracterización de los sueros	
Caracterización de centrómeros vegetales por inmunofluorescencia y <i>Western blot</i>	25
La interacción centrómero-cinetocoro es mantenida por CENP-B	26
La proteína CENP-B retiene satélites de α DNA	27
Amplificación del cDNA que codifica para el extremo amino-terminal de CENP-B de células vegetales	28
Hibridación <i>in situ</i> de CENP-B box en vegetales	29
Discusión	31
Referencias	36

RESUMEN

Los centrómeros son estructuras críticas en la división celular; la proteína **CENP-B** es la mejor caracterizada de las proteínas centroméricas y es reconocida por el suero de pacientes con esclerodermia. Se une a la heterocromatina centromérica con secuencias de 17 pb del DNA satélite alfa (designadas como CENP-B box).

El estudio de la división en células vegetales tiene importancia en biología celular porque se desconocen muchos aspectos. Dada la importancia de CENP-B en la organización y ensamblaje de la región centrómero/cinetocoro, se realizó el presente trabajo para tratar de responder las siguientes preguntas: ¿Tiene la región centrómero/cinetocoro en las células vegetales una organización estructural semejante a la de células animales? ¿ Existe CENP-B o alguna proteína análoga en los vegetales? ¿Presenta funciones semejantes?

Con este propósito, se estudiaron por inmunofluorescencia indirecta 22 sueros de pacientes con esclerodermia identificando los sueros anti-centrómero. Por *Western blot* se realizó la especificidad contra la proteína CENP-B. Se seleccionó un suero para purificar anticuerpos de afinidad, el cual fue utilizado como sonda para la localización de centrómeros en frijol y cebolla. Adicionalmente extractos proteicos de plantas fueron sometidos a *Western blot* para definir su reactividad molecular. Se preparó un inmunoadsorbente para retener la proteína CENP-B y CENP-B box, los productos de este inmunoadsorbente se amplificaron por PCR con oligonucleótidos específicos para CENP-B box, utilizando extractos vegetales. Finalmente el cDNA del extremo amino terminal de CENP-B fue amplificado por PCR en células HEP-2 y vegetales utilizando oligonucleótidos específicos.

Los principales resultados del presente estudio son los siguientes:

1. Los anticuerpos humanos anti-CENP-B reconocen centrómeros vegetales en frijol y cebolla.
2. Estos anticuerpos reconocen por *Western blot* una proteína con masa molecular cercana a 80 kD, similar a la de CENP-B.
3. La proteína análoga a CENP-B en vegetales posee la habilidad de retener repeticiones de α DNA.
4. Por hibridación *in situ* se demostró la región CENP-B box en diferentes células vegetales.
5. Se obtuvo por PCR un amplificado de 365 pb correspondiente al extremo amino terminal de CENP-B en frijol, cebolla, papa y zanahoria.

En conclusión nuestros resultados apoyan la idea de que las plantas poseen una proteína centromérica con masa molecular ~80 kD similar a CENP-B, esta proteína retiene α DNA satélites, por lo que creemos que presenta una función similar en la organización y ensamble del complejo centrómero/cinetocoro.

SUMMARY

Centromeres are critical structures in cell division; CENP-B is the most important protein of the centromeric complex and is recognized by autoantibodies from patients with scleroderma.

The studies of vegetal cell division are important in biology because many aspects are unknown. CENP-B is important in the organization and for the assembly of centromere/kinetochore complex, for this reason current studies were designed for answer the following questions: Has the plant centromere/kinetochore a region with structural organization similar to that found in animal cells? Is there a similar protein to CENP-B in plant cells? If so, arises the question if it has similar function?

To accomplish our aim an immunofluorescent screening of 22 scleroderma sera was carried out for the identification of anti-centromeric sera. By Western blot was established the fine specificity against CENP-B protein. From this batch one serum was selected for affinity purified anti-CENP-B antibodies obtention, which were used as probes for plant centromere localization in bean, onion. Additionally plant extracts were used in Western blot to define its molecular reactivity. Additionally an immunoadsorbent was prepared to retain CENP-B protein and CENP-B box, immunoadsorbent products were PCR amplified with specific oligonucleotides for CENP-B box was carried out in vegetal extracts. Finally the cDNA of the amino terminal from CENP-B was amplified by PCR in vegetal and HEp-2 cells using specific oligonucleotides.

The principal results of current studies are the following:

1. Human anti-CENP-B autoantibodies recognized vegetal centromeres in bean and onion.
2. These antibodies recognized by Western blot a protein with molecular mass close to 80 kDa, which is similar to the animal CENP-B protein.
3. The analog CENP-B protein in vegetals possesses the ability to retain α DNA repeats.
4. It was able to demonstrate by *in situ* hybridization assays, the CENP-B box in different vegetals cells.
5. By PCR a cDNA with 365bp was amplified, and this product corresponded to the amino terminal extreme of CENP-B from bean, onion, potato and carrot.

In conclusion our results support the notion that the plants possesses a centromeric protein similar to CENP-B with a molecular mass ~80 kD, this protein has the ability to retain α DNA satellites, reason why we believe that it has similar function such as organization and assembly the centromere/kinetochore complex.

Introducción

Ciclo celular

El ciclo celular constituye una serie de fenómenos complejos, mediante los cuales todo el material celular se distribuye en las células hijas, y se divide en dos estadios: la interfase y la división celular (mitosis, meiosis).

La interfase es el periodo que existe entre una división y la siguiente. La célula está en "reposo aparente", el DNA se encuentra formando una madeja denominada cromatina, que en la fase de división se condensa para constituir los cromosomas, estos presentan sus brazos unidos en un punto central llamado centrómero. La mitosis sólo representa una pequeña fracción del tiempo vital de la célula, y puede considerarse como la separación final de las unidades moleculares previamente duplicadas¹⁻³.

Interfase

Es una etapa de intensa actividad biosintética, durante la cual la célula duplica su tamaño y el complemento cromosómico. Comprende más del 90% del ciclo celular, dividido en los siguientes periodos G_1 , S y G_2

Fase G_1 . Es un intervalo entre la división celular y la síntesis de DNA, es el periodo más variable del ciclo, ya que de acuerdo con la condición fisiológica de la célula, puede durar días, meses e incluso años, dependiendo del tipo de tejido, especie y etapa de desarrollo embrionario en que se encuentre.

Si las condiciones del medio son favorables para el desarrollo, la célula crece y alcanza el tamaño que le permita avanzar en las siguientes etapas del ciclo; el primer punto de control para la progresión es el tamaño celular, y si no es adecuado, la célula detiene su avance en el ciclo, hasta que alcance el tamaño apropiado que le permita llegar a la división. En este punto la célula depende del aporte de nutrientes en el medio y de factores de crecimiento (como algunas hormonas y citocinas). La duración de la etapa de G_1 es controlada por ciclinas C y D (CLN1 y CLN2 en levaduras), que aparecen de manera temprana en esta etapa⁴⁻⁷.

El punto de control probablemente más importante en esta etapa es el "punto de restricción" (punto R), de inicio o "start", en el que una vez que la

célula ha llegado a él, se compromete a cursar las siguientes etapas del ciclo. Desde que Arthur Pardee sugirió la existencia de este punto, las observaciones subsecuentes, realizadas sobre todo en los últimos años, han permitido relacionar el control fisiológico del punto R, a través de los ciclos de fosforilación, como ocurre en la proteína de retinoblastoma (pRb), en la que su hipofosforilación induce una señal inhibidora de crecimiento, en tanto que la hiperfosforilación de pRb favorece la progresión del ciclo. De tal manera que las señales de transducción que gobiernan el punto de restricción dependen del estado de fosforilación de pRb. Este evento involucra varios pasos de fosforilación, iniciados por los complejos CDK4/6-ciclina D y son terminados por CDK2-ciclina E, ya que este complejo es activado al tiempo en que la célula pasa a través del punto R⁸.

En el caso de aquellas células que no reúnen las condiciones requeridas para su crecimiento, salen del ciclo celular a una etapa de reposo o *quiescencia* denominada G₀, en la cual la célula permanece de manera temporal o definitiva. Bajo ciertos estímulos y dependiendo del tipo celular de que se trate, puede regresar al ciclo, para concluir la etapa de G₁. En G₀ las células disminuyen de tamaño rápidamente, las proteínas y RNA se degradan y su velocidad de síntesis disminuye a un tercio del de las células en proliferación⁵.

En condiciones favorables de crecimiento, el contenido total de proteínas se incrementa regularmente en forma continua a través del ciclo, esto indica que la síntesis de RNA ocurre a una velocidad constante. Sin embargo, en la fase M se ha encontrado que se suprime la síntesis de RNA, debido a que la condensación de cromosomas impide la transcripción, por lo que la síntesis protéica también se reduce.

En G₁ se sintetizan otras proteínas denominadas ciclinas: la ciclina A controla la transición G₁/S, y forma un complejo con Cdk2, que es requerido para activar la maquinaria de replicación del DNA⁹. La ciclina B participa en el disparo de la fase M (mitosis) formando un complejo con Cdc 2 para integrar el factor promotor de la mitosis (PMF)⁶.

Fase S . Se lleva a cabo la síntesis o replicación de DNA, su duración es relativamente constante para cada tipo celular. Esta fase se inicia con una serie de señales extracelulares, llevadas al núcleo de la célula, para que se inicie la replicación en la que participa un factor llamado "activador de la fase S" (probablemente ciclina A), el cual limita la fase G₁⁹.

La replicación opera bajo un estricto control, los eventos de iniciación son coordinados de tal manera que el genoma es duplicado una sola vez por ciclo, un factor permisivo se une al DNA en los futuros sitios de iniciación, cuando el material genético se encuentra en el citoplasma, este factor *per se* es capaz de soportar un evento de iniciación, que al comenzar se separa del DNA y sale al citoplasma a través de la envoltura nuclear, evitando una re-replicación¹⁰.

La replicación en las células eucarióticas es bidireccional y no hay evidencias que sugieran la necesidad de secuencias específicas para terminarla. Esta fase finaliza cuando dos horquillas de replicación se encuentran o cuando se alcanza el final del cromosoma^{1,2}.

En la etapa tardía de S, los sátelites repetidos de DNA centroméricos se replican, al tiempo que un factor citoplasmático retarda la entrada celular a la mitosis, hasta que termina la replicación¹¹⁻¹³.

Fase G₂. Es la etapa de preparación para la mitosis, en esta fase la célula se detiene para concluir la síntesis de DNA, pausa que también permite se corrijan los errores que pudieran ocurrir en la replicación. Además, se producen los factores necesarios para la condensación de los cromosomas y los que participan en todos los eventos implicados en la división celular.

La velocidad de síntesis protéica disminuye en un 75%, y G₂ es el periodo de producción de proteínas y RNA's requeridos para la división celular. En esta fase se producen los factores que disparan la mitosis, como la ciclina B, que posteriormente formará un complejo con Cdc 2, para producir el factor promotor de la mitosis, responsable del inicio de todos los eventos de la mitosis, paralelamente se inhiben los factores de retardo mitótico^{14,15}.

Existe un punto de control al finalizar la etapa, en donde la célula antes de pasar a mitosis debe verificar si terminó de replicar el DNA, y si se corrigieron los posibles errores ocurridos en la replicación.

División Celular

La mitosis es un mecanismo que permite a la célula distribuir en equivalencia los componentes duplicados durante la interfase; en consecuencia, la división celular es la separación final de las unidades macromoleculares, previamente sintetizadas.

Los eventos fisiológicos permiten dividirla en dos etapas: 1) Aquella que engloba la preparación para la segregación de cromátidas, la condensación de los cromosomas, el ensamblaje del huso bipolar mitótico y la unión de los cromosomas a éste por medio del cinetocoro, lo que comprende la profase, prometafase y metafase. 2) La etapa que corresponde a la separación de las cromátidas y su movimiento migratorio a través de los microtúbulos del huso y la citocinesis, correspondiendo a la anafase, telofase y citocinesis¹⁴.

Se conocen dos tipos de mitosis: La mitosis cerrada en la que el huso se forma dentro del núcleo y la membrana nuclear permanece intacta durante la mitosis, ésta se presenta en muchos hongos y protozoarios. La mitosis abierta es aquella donde el huso se forma en el citoplasma y la membrana nuclear se rompe durante la profase, ocurre en todos los vertebrados y plantas superiores.

Profase. Es la fase de la mitosis, donde los cromosomas aparecen como delgados filamentos que se condensan por enrollamiento y plegamiento o espiralización, con lo que se acortan haciéndose más gruesos. Cada uno está constituido por dos cromátidas que resultan de la duplicación del DNA durante el periodo S. La condensación de cada cromátida, permite visualizar su constricción primaria que corresponde al centrómero/cinetocoro. Hay proteínas que se asocian al centrómero permitiendo la unión adecuada de microtúbulos para la migración correcta de las cromátidas hermanas hacia los polos opuestos.

En esta fase el nucleolo tiende a desintegrarse y desaparece al finalizar la profase. En el citoplasma se forma el huso, evento que es iniciado por el desplazamiento de uno de los dos pares de centriolos (previamente duplicados en fase S). La mitad del áster original alrededor del núcleo, describe una trayectoria de 180°, hasta alcanzar el polo opuesto, lo cual se produce por la polimerización de los microtúbulos que finalmente forman el huso mitótico.

Prometafase. Es un periodo muy corto durante el cuál se desintegra la envoltura nuclear, los cromosomas quedan en aparente desorden, el centrómero ya maduro captura a los microtúbulos del huso, que al estar creciendo se desplazan alrededor del núcleo, así quedan accesibles y son atrapados por la región centrómero/cinetocoro. En este punto el nucleoplasma se mezcla con el citoplasma. Los eventos de estas dos primeras etapas se presentan debido a la acción directa de fosforilación del PMF sobre las Histonas 1, las láminas nucleares y proteínas asociadas a microtúbulos.

Metafase Los cromosomas sufren movimientos oscilatorios hasta que se ordenan o alinean en el centro de la célula, donde se orientan para formar la placa ecuatorial, en preparación para la separación de las cromátidas. Existe un punto de control en el ensamble del huso, que detecta defectos en la estructura y alineamiento de los cromosomas, éste retarda la segregación de los cromosomas (anafase), hasta que se corrigen las alteraciones. Los cinetocoros que no se unen al huso, generan una señal inhibitoria que altera el ciclo celular, se han identificado los componentes protéicos responsables de esta señal, algunos se localizan en el cinetocoro (MAD2), razón por la que la interacción microtúbulo-cinetocoro es relevante para activar este punto de control¹⁴⁻¹⁷.

Anafase. La transición metafase-anafase es un proceso altamente regulado por la actividad del complejo promotor de la anafase (APC), que promueve la degradación de proteínas, dentro de las que se incluyen las ciclinas mitóticas e inhibidores de la anafase, a través de proteólisis dependiente de ubiquitina¹⁸.

La separación de los centrómeros en todos los cromosomas y la migración de las cromátidas hacia los polos ocurre simultáneamente. El centrómero precede al resto del cromosoma hijo, aparentemente traccionado por las fibras del huso. Este mecanismo no está totalmente definido, pero se ha propuesto que existe un complejo de fuerzas que actúan a lo largo del microtúbulo, y que derivan de su polimerización y de las proteínas motoras dependientes de microtúbulos. Otras proteínas citoplasmáticas como la dineína, dinactina, cinesina, y las relacionadas a la cinesina como la Eg5 y NuMA, que se localizan en la región centrómero/cinetocoro, facilitan el desplazamiento de las cromátidas¹⁹.

Las fibras cromosómicas del huso se acortan hasta alcanzar la tercera o quinta parte de su longitud original, en tanto que las fibras continuas se alargan ampliando la zona de traslape en la región media de la célula, y sirve para reacomodar las fibras de actina, las cuales son desplazadas de la periferia celular a la placa ecuatorial, formando el anillo de constricción que dirigirá la citocinesis. Esta separación es perfecta y nunca migran dos cromátidas hermanas (procedentes del mismo cromosoma) al mismo polo, invariablemente quedan en grupos diferentes.

Telofase. El final de la migración polar de los cromosomas hijos señala el principio de la telofase, el cromosoma comienza a desenrollarse o descondensarse, agrupándose en masas de cromatina rodeada por segmentos discontinuos de envoltura nuclear, que son cisternas de retículo endoplásmico dispuestas alrededor de los cromosomas, las cuales

finalmente se fusionan para formar una sola envoltura nuclear; al descondensarse la cromatina se inicia la formación del nucléolo. Los cambios en esta etapa, son un proceso contrario al presentado en la profase¹⁶.

La citocinesis. En células animales la citocinesis puede dividirse en cinco sub-fases: 1) El huso mitótico en anafase indicará el sitio en el que se formará el surco de clivaje. 2) El ensamble del anillo contráctil formado por actina y miosina. 3) La constricción del anillo. 4) La formación del cuerpo medio donde se separan los remanentes del huso mitótico y 5) La constricción se profundiza hasta lograr la separación de las dos células hijas. El citoplasma celular disminuye su viscosidad, los ásteres son menos aparentes y tienden a desaparecer. Los distintos componentes citoplasmáticos se distribuyen en ambas células hijas²⁰.

Cromosomas La arquitectura de los cromosomas eucarióticos, juega un papel importante en los procesos de transcripción y replicación, así como en la segregación de las cromátidas hermanas durante la división celular. Algunas proteínas nucleares conocidas como "pasajeros cromosomales" se unen a los cromosomas, ya que requieren un vehículo para su redistribución en las células hijas²¹. Tradicionalmente a los cromosomas se les ha definido como los hilos asociados a los microtúbulos del huso mitótico de células en división²².

Uno de los sucesos más importantes en la mitosis y meiosis, es la segregación del material hereditario entre las dos células hijas, proceso en el cual los cromosomas se unen a los microtúbulos del aparato mitótico por medio del complejo centrómero/cinetocoro, el que varía en magnitud dependiendo de la especie, así, su tamaño depende del número de microtúbulos que se les unirán en prometafase²³.

Los estudios en mamíferos han proporcionado información detallada en cuanto a estructura, composición y función del cinetocoro. Los centrómeros de cromosomas eucarióticos son regiones específicas de las fibras de cromatina, que integran un dominio de DNA distinto, el cual al microscopio aparece como una constricción primaria, y puede ser identificada en los cromosomas en metafase. La región del centrómero media la interacción entre cromátidas hermanas y nuclea el ensamble del cinetocoro.

El cinetocoro es una región de diferenciación estructural, que está compuesta de DNA centromérico y proteínas, por microscopía electrónica es visualizado como una placa o disco trilaminar en la superficie de los cromosomas. El centrómero, por lo tanto, es responsable de delinear un

dominio cromosomal accesible al aparato de segregación, que proporciona las bases estructurales para el ensamble de los componentes del cinetocoro^{22, 24-26}.

El centrómero tiene la secuencia de DNA requerida para el apareamiento entre las cromátidas hermanas, en tanto que el cinetocoro posee la maquinaria y fuerza necesarias para la unión a los microtúbulos del huso, a través de los motores mitóticos como la dineína, para llevar a cabo la separación y migración de las cromátidas a los polos opuestos. La región centromérica de los cromosomas mitóticos se divide en dos partes, de acuerdo a las características inmunológicas de las proteínas centroméricas: la región externa corresponde a la placa del cinetocoro y la interna a la cromatina. A su vez, el cinetocoro se subdivide en dos dominios altamente organizados que están compuestos por la placa trilaminar y la corona fibrosa²⁷. Figura 1.

Características del complejo centrómero/cinetocoro

La región interna del centrómero es un segmento lineal de DNA satélite no codificable, representa aproximadamente el 5% del genoma humano, y contiene la información que determina la posición del centrómero²², las características de apareamiento del cromosoma y los patrones de segregación de las cromátidas hermanas durante la mitosis y meiosis^{28, 29}.

Un subgrupo de α DNA satélite humano (satélite alfa o DNA alfoide) está compuesto de segmentos repetidos de 170 pb, organizados en grupos de dímeros y pentámeros, formando una unidad que se repite de 100 a 150 veces a lo largo del centrómero, varía en cantidad y secuencia de cromosoma a cromosoma.

Estudios recientes sugieren que el DNA centromérico en cromosomas de eucariontes superiores, está constituido por un segmento simple y continuo de 500 ~ 5000 kb, con bloques repetitivos de DNA satélite, que actúan como determinantes primarios en la estructura del cinetocoro²⁴. Existen segmentos cortos de DNA centromérico que están intercalados alternando con el DNA satélite alfa, los que unen a los microtúbulos.

La región externa del centrómero es un disco trilaminar, localizado en la superficie de cada cromátida. El disco interior es contiguo a la heterocromatina centromérica, mientras que el disco externo y su corona asociada parecen ser el sitio de unión a los microtúbulos del huso. Figura 1.

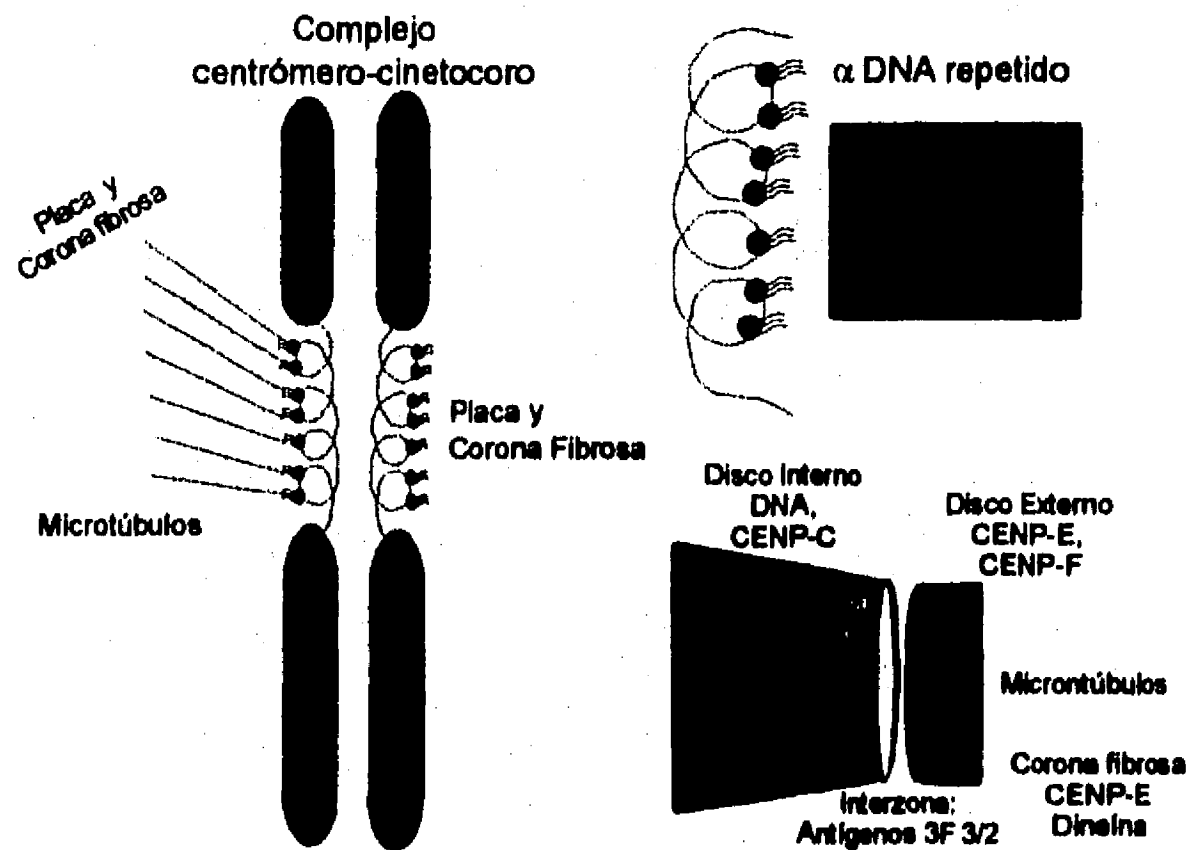


Figura 1. Primer modelo propuesto para la organización de la región del cinetocoro, donde se considera la formación de una estructura trilaminar, compuesta por tres láminas, una interna, que está contigua a la cromatina centromérica, la externa donde se localiza la corona fibrosa, lugar de unión a microtúbulos del huso mitótico.

Función del centrómero

- 1) Sirve como punto de unión de los cromosomas al huso mitótico. Unión que ocurre en una estructura especializada semejante a un botón denominada "el cinetocoro".
- 2) Es el sitio de regulación del par de cromátidas hermanas. En la transición metafase/anafase algunas señales actúan en el centrómero para liberar el punto de adhesión de las cromátidas hermanas.
- 3) El centrómero es el lugar de ubicación de algunos motores que mueven los cromosomas durante la mitosis. Varias proteínas motoras han sido localizadas en la región centromérica.
- 4) Sitio de unión de las proteínas nucleares que se redistribuyen en la placa ecuatorial del huso mitótico^{21,31-33}.

Autoanticuerpos: sondas moleculares para el centrómero

Un avance significativo en la biología celular y molecular del complejo centrómero/cinetocoro, se ha derivado del hecho de que algunos autoanticuerpos de pacientes con esclerodermia, particularmente los que tienen la variable CREST (Calcinosis, Raynaud, Esclerodactilia y Talangiectasias), reaccionan contra elementos del complejo. Los autoanticuerpos reconocen específicamente diversas proteínas del cinetocoro, que hasta el momento se han clasificado en:

1. Las que forman la placa trilaminar (CENP).
2. Proteínas accesorias como la tubulina y dineína, que se localizan en la corona^{28, 33, 36}.
3. Proteínas pasajeros cromosomales:
 - A. Internas (INCENP), que se asocian temporalmente a la región centromérica.
 - B. Proteínas de unión a las cromátidas (CLIPs), se detectan después de que ha ocurrido la separación de estas, casi al final de la división celular.
 - C. Proteínas que se unen transitoriamente a los cromosomas en la región centrómero/cinetocoro.

CENP-A. Tiene una masa molecular de 17 kD y es parecida a la histona H3, con la cual comparte un alto grado de similitud, particularmente en la región del carboxilo terminal. CENP-A se asocia predominantemente a los mononucleosomas. Tentativamente parece participar en el empaquetamiento del DNA centromérico³¹⁻³⁶.

CENP-B. Con un peso molecular de aproximadamente 80 kD, es la mejor caracterizada de las proteínas centroméricas, se localiza en la heterocromatina centromérica en el dominio central del cinetocoro, se asocia con algunas secuencias de 17 pb del DNA satélite alfa (designadas como CENP-B box). El DNA alfoide es una secuencia repetitiva de 170 pb agrupadas en pocas megabases de la región centromérica; es importante señalar que la interacción del DNA con las proteínas en la región centromérica, se realiza mediante el reconocimiento de secuencias específicas de CENP-B box y una región comprendida entre los 158 aminoácidos de la región amino terminal de la proteína, formando lo que se conoce como complejo A³⁷. El reconocimiento es de vital importancia en la formación de la región del centrómero/cinetocoro, ya que la secuencia de α DNA por sí sola puede ser la determinante primaria de la estructura y función del centrómero; este dominio tiene un alto grado de conservación filogenética, está absolutamente conservado en los humanos, roedores y

otros mamíferos. El dominio tiene un "motivo" o sitio de unión al DNA característico de la familia de proteínas hélice-asa-hélice³⁸.

La secuencia de amino ácidos de CENP-B³⁸ indica que tiene cuatro dominios separados por tres regiones (dos de ellas A1 y A2) con altas concentraciones de ácido aspártico y glutámico, que aparentemente son críticas para la interacción; además de las interacciones DNA-proteínas, en el ensamblaje de CENP-B dentro del centrómero podrían ser importantes las interacciones proteína-proteína, pues, según Yoda (1992) y Kitagawa (1995), CENP-B sufre un proceso de dimerización, en el cual uno de los componentes del homodímero se une a la región amino terminal de la otra, que a su vez reconoce el extremo carboxilo terminal de su contraparte, y a su vez cada una de ellas está unida a un segmento de α DNA^{37, 39}.

La distribución de CENP-B varía entre diferentes cromosomas y se correlaciona con la cantidad de DNA alfoide por cromosoma²³ (figura 1). En tanto que la región del DNA alfoide al cual se une (CENP-B box) se ha encontrado en todos los cromosomas (excepto el Y) de humanos, chimpancés, gorilas y orangutanes⁴⁰.

Se ha estudiado la expresión del gen que codifica para CENP-B durante diferentes etapas del ciclo celular, encontrándose que su síntesis es relativamente continua durante todas las fases del ciclo, pero que alcanza el nivel más alto en G2 y el nivel más bajo en S⁴¹.

CENP-B es uno de los principales antígenos del centrómero, y es reconocido por la mayoría de los sueros autoinmunes con especificidad anti-centrómero. Antigénicamente está formado por tres epítomos, de los cuales sólo uno es reconocido por todos los sueros con anticuerpos anticentrómero³⁸.

CENP-C. Tiene peso molecular de 140 kD y se desconocen muchas de sus características; sin embargo, hay evidencias que sugieren un importante papel en el ensamble y función del cinetocoro, y además su participación es esencial para una mitosis normal⁴².

CENP-D. Es otra proteína identificada por sueros de CREST; tiene una masa molecular 47 kD y la secuencia de uno de sus péptidos ha permitido deducir que la secuencia de nucleótidos corresponde exactamente a la encontrada en las regiones reguladoras de la condensación del cromosoma (RCC1)³⁰; está relacionada con el control del ciclo celular.

Pasajeros cromosomales

INCENP. Tienen una masa molecular que varía de 133 a 145 kD. Son las proteínas internas del centrómero cuya función se cree que es estructural, debido a que transitoriamente se localizan en el núcleo durante la interfase, en cromosomas en prometafase, en el centrómero de cromosomas en metafase, en la zona media del huso en la transición de metafase a telofase, y en el surco de separación entre anafase y telofase, flanqueando el cuerpo medio en el puente intercelular³².

CENP-E. Tiene una masa molecular de 250-300 kD, y es una de las proteínas centroméricas que sufre una drástica redistribución durante el ciclo celular, ya que no se le detecta en la interfase, en tanto que en la profase y metafase se localiza unida a la región centromérica, mas en anafase se encuentra en la zona media, de donde posiblemente se descarta después de la citocinesis. Es probable que ésta también sea una proteína motor parecida a la quinesina³⁵.

CENP-F o p³³⁰. Es una nueva proteína nuclear reguladora del ciclo celular, designada provisionalmente como p330 (doblete de 330 kD). Se expresa y se distribuye intracelularmente durante todo el ciclo celular. Se observa sólo en células en proliferación; comienza a acumularse en el núcleo durante la fase S temprana, alcanzando su máxima expresión durante la transición de G₂ a mitosis. Se concentra en el cinetocoro durante la profase pero se relocaliza en la zona media del huso al principio de la anafase. En la telofase tardía se localiza predominantemente en la región del cuerpo medio, flanqueando la región extracelular y desaparece gradualmente con la separación de las células hijas. Su posible función "*in vivo*" se relaciona con la fuerza, maduración y ensamble del complejo centrómero/cinetocoro; con la segregación de cromosomas, y con la estabilización del eje central durante la citocinesis²¹.

MSA-36. Su masa molecular es de 36 kD y su función es desconocida; como es una proteína transitoria su ubicación varía en las diferentes fases del ciclo celular. Se localiza en el núcleo en G₂ tardía, en la prometafase se encuentra en los cromosomas, en la metafase en el centrómero de los cromosomas, y en la anafase-telofase en la zona media del huso y flanqueando el cuerpo medio del puente intercelular.

JB. Con una masa molecular de 38 kD; su función aún es desconocida y al igual que la anterior varía su localización durante el ciclo celular. Está ausente o enmascarada en interfase y profase. En los cromosomas de algunas células se localiza en el centrómero durante prometafase, en el

centrómero de cromosomas en la metafase, en la zona media del huso en la transición de anafase-telofase y flanqueando el cuerpo medio en el puente de separación intercelular.

TD-60. Tiene una masa molecular 60 kD; probablemente participa en la citocinesis. Debido a que es una proteína transitoria, no se localiza en interfase, o tal vez se encuentre enmascarada; se ubica en el centrómero en la prometáfase y anafase temprana, en la zona media del huso en la mitad de anafase-telofase, en el surco de separación en mitad de anafase-telofase y flanqueando el cuerpo medio en el anillo de constricción intercelular.

37A5. Es una proteína con peso molecular que varía de 140 a 155 kD; su función es desconocida, se encuentra oculta hasta la profase; localizándosele en el centrómero de los cromosomas en metafase, en la zona media del huso en anafase-telofase, y en ambos lados del cuerpo medio en la constricción intercelular³². (Tabla 1)

En relación al ciclo celular, las proteínas no histonas asociadas al centrómero pueden clasificarse dentro de dos categorías:

A) Aquellas que están presentes en el centrómero a lo largo de todo el ciclo celular (A, B, C, y D) y

B) Las que se unen de manera ciclo dependiente como las INCENP, CLIP, CENP-E y CENP-F o p³⁹⁰, este grupo está considerado dentro de la creciente familia de "pasajeros cromosomales".

Debido a la redistribución de las proteínas "pasajeros cromosomales" durante el ciclo, se ha sugerido que pudieran estar involucradas en las siguientes funciones:

-Regulación en el apareamiento de las cromátidas hermanas.

-Integración estructural de las dos mitades del huso.

-Función motora durante la elongación del huso (anafase B).

-Estabilización del extremo plus y microtúbulos en el huso central.

-En la fase temprana del movimiento cromosomal hacia los polos del huso (anafase A)

Tabla 1

PRINCIPALES PROTEÍNAS DEL CENTRÓMERO/CINETOCORO (Earnshaw, JCB, 1994)

Proteína	CENP-A	CENP-B	CENP-C	CENP-D	CENP-E	CENP-F	INCEN-A	INCEN-B
Masa molecular	17	80	140	47	250-300	330-400	133-135	145-155
Función	Empaqueta el DNA centromérico	Organiza el Centromero cinetocoro	Necesaria para una mitosis normal	Condensa cromosomas	Semejante a cinesina	Regula el ciclo celular	Proteína estructural	Induce citocinesis
Ubicación en el Centrómero	Todo el ciclo	Todo el ciclo	Todo el ciclo	Todo el ciclo	Metafase	Profase y Anafase zona media (huso)	Profase y Anafase zona media (huso)	Profase y Anafase zona media (huso)

Modelos propuestos para la organización del centrómero/cinetocoro

El análisis histoquímico indica que el cinetocoro está compuesto de DNA⁴³, proteínas y posiblemente RNA; sin embargo, no se conoce de manera total la relación que existe entre estas moléculas para constituir la ultraestructura del centrómero/cinetocoro. Se ha propuesto el modelo de subunidad repetida⁴⁴, el cual considera que el centrómero/cinetocoro es una fibra de 30 nm, constituida por múltiples "elementos" agrupados, capaces de unir los microtúbulos *vía* tubulina, las unidades a su vez están separadas por segmentos de DNA (linkers) de largo indeterminado.

Cuando los cromosomas en metafase se condensan, estos "elementos" repetitivos de unión son doblados y alineados en forma paralela para integrar la capa externa del cinetocoro; ésta contiene la corona fibrosa asociada a la tubulina y la dineína (consideradas proteínas accesorias). La dineína se localiza en la región distal de los cinetocoros; se ha propuesto que ésta constituye el motor que dirige los movimientos de los cromosomas hacia los polos opuestos^{28,45,46}.

Participación de CENP en el ensamble del centrómero/cinetocoro. Existen dos características del ensamblaje del centrómero, que los hace indistinguibles de otras regiones de la heterocromatina: 1) Los centrómeros permanecen condensados durante la interfase como otras regiones de heterocromatina; 2) El análisis de células en diferentes fases del ciclo celular con anticuerpos anticentrómero, revela que en fase G₁ existe un solo centrómero, y como dos discretos centrómeros desde la fase G₂ tardía, hasta la metafase⁴⁷, después de esta etapa la mayoría de las proteínas CENP permanecen unidas al centrómero de cada cromátida y sólo una pequeña parte, las correspondientes a CENP-E y probablemente las INCENP, CLiPs, CENP-F "pasajeros cromosomales" se redistribuyen en la zona media, para luego perderse durante la citocinesis²⁴.

Los antígenos CENP, aparentemente, participan en dos estados del ensamblaje de la región centrómero/cinetocoro. El bloqueo de CENP tres horas antes de la mitosis, inhibe el ensamble de la estructura trilaminar del cinetocoro en la mitosis, los cromosomas se unen a microtúbulos pero son incapaces de realizar el desplazamiento hacia los polos. Por otro lado, si se bloquean las CENP dos horas antes de la mitosis, el efecto es diferente, pues a pesar de que se realiza el ensamblaje del cinetocoro, es inestable; esto es paralelo a un defecto de la condensación de la cromatina en la región interna de la placa del cinetocoro, lo cual causa un arresto de las células en metafase^{48, 49}.

Los centrómeros y el ciclo celular en vegetales

Los centrómeros de las células vegetales y animales unen docenas de microtúbulos (15-25), que resulta en un aumento de su eficiencia. La diferenciación del centrómero/cinetocoro en eucariontes superiores representa unidades múltiples, que pudieron haber evolucionado como agrupaciones de unidades repetidas, ya que al comparar las secuencias de nucleótidos de la región centromérica de *S. cerevisiae*, *S. pombe* y el DNA satélite de mamíferos, muestra que existen algunos dominios conservados entre estas especies²².

Los eventos cruciales en células eucariontes, como la replicación del DNA y la mitosis, son reguladas por una cascada de fosforilación de proteínas. Los estudios genéticos de las células animales han conducido a la identificación de muchos de los componentes de esta cascada; desafortunadamente en las células vegetales no se ha logrado avanzar y sólo se han aplicado analogías respecto a otras células eucariontes. Sin embargo, algunas de las

herramientas utilizadas para el estudio de células animales empiezan a ser aplicadas en vegetales. Con la ventaja de que la mayoría de las proteínas regulatorias del ciclo celular son altamente conservadas entre eucariontes no vegetales, se puede utilizar la información de los genes que controlan el ciclo celular en dichas células y algunas secuencias conservadas pueden utilizarse como sondas de hibridación. De esta manera están siendo identificados los principales genes que controlan el ciclo celular (u homólogos), como es el caso de las cinasas dependientes de ciclinas, ciclinas y fosfatasas⁵⁰⁻⁵³.

Si bien a nivel celular, las plantas muestran muchas características mitóticas de las células animales y de hongos, también presentan diferencias significativas, una de ellas es que las células diferenciadas tienen la capacidad de re-entrar al ciclo celular y dividirse, en coordinación con las células que las rodean. Las células vegetales, a pesar de no poseer centrosomas o centros organizadores de microtúbulos, como ocurre en las células animales, su ausencia no tiene efecto aparente en la división celular, pero sí origina un dilema conceptual de acuerdo con el papel exacto de los centrosomas; surge así el concepto de "centrosomas flexibles", donde la nucleación de microtúbulos se acompaña de material pericentriolar amorfo; de ahí que la nucleación de los microtúbulos en las plantas sea generalmente dispersa; esto incluye microtúbulos asociados a la corteza nuclear en la interfase, a la banda de preprofase en G₂ y al uso mitótico y a los microtúbulos del fragmentoplasto^{54,55}.

En las plantas, las proteínas que co-localizan con los centros organizadores de microtúbulos incluyen fosfoproteínas que reaccionan con el anticuerpo MPM-2 (el cual reconoce proteínas fosforiladas asociadas con centrosomas). Además, existen epítomos que reaccionan con otros anticuerpos, como el suero autoinmune 5051, que reconoce el material pericentriolar en células animales y el monoclonal 6C6, que reconoce una proteína vegetal de 180 kD, además de los centrosomas de ternera. Finalmente, la centrina es una fosfoproteína que une calcio y que co-localiza en ciertos centros organizadores de microtúbulos en plantas⁵⁶.

Justificación

El estudio de la división celular en células vegetales tiene importancia en biología celular porque se desconocen muchos aspectos, pues la mayoría de los estudios se han enfocado a determinar aspectos de la mitosis en células animales o en procariontes. Además, explorar los aspectos moleculares que intervienen en la división celular en plantas está justificado por la importancia que este reino tiene como abastecedor de alimentos en la cadena alimenticia. En el momento que se disponga de una amplia información de los mecanismos de reproducción y división celular en vegetales, estos conocimientos en ciencia básica, podrían ser aplicados para producir más y mejores alimentos.

Por otro lado, es importante definir desde el punto de vista evolutivo, si algunas secuencias de la proteína CENP-B están conservadas filogenéticamente y se localizan también en los vegetales superiores. Dada la importancia de CENP-B en la organización y ensamblaje de la región centrómero/cinetocoro, se realizó el presente trabajo para tratar de responder las siguientes preguntas, que nos permitan profundizar en el conocimiento de la región centrómero/cinetocoro en los vegetales:

1. ¿Tiene la región centrómero/cinetocoro en las células vegetales una organización estructural semejante a la de las células animales?
2. ¿Existe homología entre las proteínas de origen animal y vegetal?
3. ¿Existe CENP-B o alguna proteína análoga en los vegetales, que pudiera cumplir funciones de interacción con CENP-B Box, como ocurre en las células animales?

Hipótesis

El mecanismo molecular de la división celular está conservado filogenéticamente, por lo que la proteína CENP-B o una proteína análoga está presente en las células vegetales y probablemente tenga funciones semejantes.

Objetivo general

Determinar si en vegetales existe una proteína centromérica CENP-B o una proteína análoga a la de los mamíferos.

Objetivos específicos

- A. Determinar la presencia de la proteína CENP-B en extractos totales de proteínas vegetales;**
- B. La caracterización molecular de la proteína CENP-B en vegetales;**
- C. Determinar si existen analogías o diferencias inmunológicas entre las proteínas CENP-B animales y vegetales;**
- D. Determinar la interacción de la proteína CENP-B con el DNA alfoide;**
- E. Localizar segmentos de DNA alfoide en células animales y vegetales, para establecer el lugar de interacción de las proteínas con la heterocromatina centromérica;**
- F. Amplificar el segmento aminoterminal del gen que codifica para la proteína CENP-B, ya que es la región más importante para la función de esta proteína.**

Material y métodos

Caracterización de sueros anti-centrómero. Se estudió un lote de 50 sueros de pacientes con esclerodermia, obtenidos del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Centro Médico la Raza y del Centro de Biología Experimental. Los pacientes reunían los criterios del ACR para clasificación de esclerodermia. Se incluyeron sueros de 50 controles sanos y 3 sueros tipo, positivos para anticuerpos anticentrómero proporcionados gentilmente por el Dr. Carlos Casiano (The Scripps Foundation, La Jolla, CA). Los sueros se caracterizaron por inmunofluorescencia indirecta utilizando células HEp-2.

Cultivos celulares. Las células HEp-2 obtenidas del American Type Culture Collection (pase número 364) y cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FBS, Gibco), fueron disociadas de cultivos confluentes con tripsina al 0.5% preparada en EDTA 1.25 mM; ya disociadas fueron cultivadas en laminillas para la obtención de preparaciones en monocapa. Posteriormente fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 1%, fijadas en acetona fría y mantenidas a -20°C , hasta su uso. Las células vegetales fueron obtenidas de semillas de frijol, zanahoria, cebolla y papa, cultivadas en medio de Murashige-Skoog. Después de dos semanas se colectaron las raíces, que se disociaron con HCl 0.5 M, se fijaron en laminillas y se permeabilizaron como se describió, y se utilizaron para ensayos de inmunofluorescencia indirecta e hibridación *in situ*.

Localización de los centrómeros por inmunofluorescencia indirecta. Para la inmunolocalización de los centrómeros se usaron, células HEp-2 y células vegetales disociadas. Los sueros marcadores del centrómero fueron diluidos progresivamente, iniciando con la dilución 1:40 en amortiguador salino de fosfato a pH de 7.2 (PBS). Las preparaciones celulares se incubaron con los sueros por 30 min a temperatura ambiente y en una cámara húmeda, y posteriormente se lavaron tres veces por 10 min en PBS, e incubaron 30 min con un suero de cabra anti-inmunoglobulina humana, marcado con fluoresceína (CLB, Amsterdam), en una dilución 1:80. Después de tres lavados en PBS, las laminillas fueron montadas en glicerol-PBS 1:9 y evaluadas por dos observadores independientes en un microscopio de epifluorescencia (Olympus B-Max).

Aislamiento de las proteínas centroméricas a partir de extractos celulares crudos. Las proteínas de células HEp-2, o de células vegetales, fueron extraídas por sonicación en amortiguador de extracción (SDS al 1%,

EDTA 0.25 mM, 2-mercaptoetanol 2 M, Tris 1 mM, pH 7.5 y PMSF 5 mM). Las células se sonicaron 5 veces, durante 30 seg, usando el 50% de potencia; después, las muestras se sometieron a ebullición durante 3-5 min, se centrifugaron para separar los detritus celulares, se tomó el sobrenadante como fuente cruda de CENP, en el que se determinó la concentración de proteínas totales por el coeficiente de extinción a 280 nm. En la caracterización espectrofotométrica se utilizó una curva tipo trazada con albúmina sérica bovina.

Electroforesis en geles de poli(acrilamida) (PAGE). Se realizó en minigeles en condiciones reductoras, utilizando el procedimiento descrito por Laemmli y Favre⁵⁷. La concentración de acrilamida fue del 11%; el tiempo de corrimiento de 60 min a 100 V. Al término de la electroforesis algunos geles se tiñeron con azul de Coomassie y otros sin teñir fueron electrotransferidos a hojas de nitrocelulosa por el procedimiento descrito por Towbin⁵⁸. Las proteínas transferidas se probaron con anticuerpos anticentrómero y las bandas inmunoreactivas fueron detectadas con Proteína A de *Staphylococcus aureus* marcado con 125 I, seguida de autorradiografía con películas X OMAT en cassetes con pantalla intensificadora⁵⁹.

Purificación de anticuerpos de afinidad CENP-B. Para este propósito se corrieron extractos de células HEP-2 en geles preparativos al 11%; estos fueron electrotransferidos como se describió previamente. Las tiras de nitrocelulosa se tiñeron con "Fast green", después se cortaron horizontalmente aislando la banda de 80 kDa; ésta fue desteñida con agua destilada, y se incubó con un suero de CREST, que tenía títulos altos de anticuerpos anti centrómero y reconocía por réplica tipo *Western blot* la banda correspondiente a CENP-B de 80 kDa. El suero diluido 1:50, fue incubado toda la noche con la tira de nitrocelulosa de CENP-B, en agitación en balancín; al término de la incubación, fue exhaustivamente lavada con GB (Tritón X-100 0.5M, trietanolamina 50 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM pH 7.4, SDS 0.1%) y los anticuerpos anti-CENP-B fueron eluidos de la tira de nitrocelulosa con glicina-HCl 0.2M, pH 2.5. El eluido fue neutralizado con Tris 0.1 M pH 9.6, después dializado contra agua destilada y finalmente liofilizado. Los anticuerpos de afinidad anti-CENP-B se utilizaron para caracterizar en *Western blot* los extractos vegetales, así como para preparar un inmunoadsorbente para los ensayos de interacción de CENP-B con DNA alfoide.

Síntesis de oligonucleótidos para usarlos como sondas y para amplificación por PCR. El diseño de los oligonucleótidos complementarios para la región conservada de CENP-B fue realizado en un procesador Pentium II MMX, utilizando el programa PRIMER, tomando en cuenta la

secuencia de CENP-B humana, reportada por Earnshaw *Et al*⁵⁸. Los primeros 439 nucleótidos que corresponden a 158 residuos de amino ácidos de la región amino terminal. La síntesis de nucleótidos fue realizada en un sintetizador de DNA (Applied Biosystems). La secuencia del oligonucleótido del extremo 5' de CENP-B fue: 5'-ACAGCTGACGTTCCGGGAGA-3' y el oligonucleótido 3' fue: 5'-GTTGGAGGCGGTGAAGTCGT-3'. Los oligómeros para CENP-B box fueron diseñados de acuerdo con la secuencia de CENP-B box humana reportada por Wayne and Willard⁶⁰. La secuencia 5' fue: 5'-CTTTCGTTGGAAACGGGA-3', y la secuencia 3' fue: 5'-GAAAGCAACCTTTGCCCT-3'.

Digestión con nucleasas. Para probar la protección que CENP-B le confiere al interactuar con el DNA alfoide, las laminillas de células HEP-2 se digirieron con 0.25% de DNasa tipo I, o nucleasa de *Aspergillus*, actividad 1:10,000 (Sigma). Alternativamente las células fueron incubadas con enzimas de restricción como *Eco* RI, *Bam* HI y *Hind* III (Promega Biotech). Se incluyeron controles que no habían sido sometidos a ningún tratamiento. Además se incluyó un control sometido a la acción de tripsina-EDTA 1:250 (Gibco). Las laminillas con monocapas de células HEP-2 fueron incubadas con las nucleasas a 37°C por 60 min, posteriormente lavadas tres veces con PBS, al término de lo cual se utilizaron para ensayos de inmunofluorescencia indirecta, con sueros anticentrómero. Adicionalmente, las monocapas celulares se despegaron del frasco de cultivo por tripsinización suave (tripsina 0.4%-EDTA, por 2 min); las células en suspensión fueron exhaustivamente lavadas, después permeabilizadas y digeridas en suspensión con nucleasas como se describió previamente; finalmente fueron fijadas a laminillas con citocentrífuga para ser utilizadas en inmunofluorescencia indirecta.

Ensayos de interacción de α DNA y CENP-B. La proteína CENP-B fue purificada de extractos de células HEP-2 ó de vegetales por cromatografía de afinidad. El inmunoadsorbente se preparó utilizando la IgG anti-CENP-B de afinidad, eluida de la banda CENP-B con glicina como ya se describió. La IgG-anti-CENP-B fue acoplada a Sefarosa-4B activada con bromuro de cianógeno.

El inmunoadsorbente-anti-CENP-B se incubó con extractos de proteínas animales o vegetales que contenían CENP-B; después de lavar exhaustivamente con PBS, el complejo Sefarosa-anti-CENP-B/CENP-B fue incubado toda la noche con DNA genómico de células HEP-2, o de vegetales (extraído con fenol/cloroformo/isopropanol). Después de la incubación se centrifugó a 10,000 rpm y los precipitados fueron utilizados como templados para amplificación de la caja CENP-B, con oligonucleótidos específicos. Los

productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1%, y se tiñeron con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta. Se incluyeron controles negativos para PCR, que no tenían la proteína CENP-B o sin templados de DNA.

Marcaje de oligonucleótidos para CENP-B box por oligo-tailing. Las sondas de CENP-B box fueron ajustadas a 10 ng/ml a 260 nm, y después marcadas con Fluoresceína-11 dUTP utilizando la reacción de transferasa terminal (Oligocolor kit RPN-3400, Amersham). Los oligonucleótidos conjugados con F11-dUTP se incubaron a 37°C por 90 min, posteriormente las sondas marcadas fueron utilizadas para hibridación *in situ*.

Hibridación *in situ* y visualización de α DNA. Las células vegetales y HEP-2 se pre-hibridaron con HCl 0.02M, permeabilizadas con Triton X-100 al 0.01% en PBS, y después lavadas en ácido acético frío al 20%. Las sondas se diluyeron en amortiguador de hibridación/formamida (1:1) y ajustadas a 50 ng/ml. Las preparaciones celulares fueron cubiertas con la sonda e incubadas a 90°C durante tres min, posteriormente las laminillas se incubaron a 37°C por dos h, y al final de la incubación fueron lavadas con amortiguador SSC (NaCl 3M, Citrato de sodio 0.3M, pH 7). Para la detección de color las laminillas fueron lavadas en TBS y tratadas con la solución bloqueadora; después de un nuevo lavado con TBS, se incubaron una hora con anticuerpos anti-fluoresceína conjugados con fosfatasa alcalina. Después de lavarlas con TBS, la reacción de color fue inducida con sustrato NBT; las laminillas fueron incubadas en oscuridad por 15 h, finalmente enjuagadas, montadas y evaluadas en microscopio de luz⁶¹. Las imágenes fueron transferidas a un digitalizador de imágenes Kodak 40, y procesadas en los programas Photoenhancer y el analizador de imagen 1.53 del NIH.

Reacción en cadena de polimerasa/reverso transcriptasa (rtPCR). El RNA total fue extraído de tejido vegetal y células HEP-2 por el método de ácido guanidinina-tiocianato-fenol-cloroformo (TRizol, Gibco BRL), y cuantificado a 260 nm. Para la síntesis del DNA se utilizaron 250 ng de RNA total y 200 μ M de dNTP, 0.75 μ M del primer 3' y 5U/20 μ l de rTth/DNA polimerasa (Gene Amp [®]PCR System 9600). La reacción de transcriptasa inversa se realizó a 70°C por 10 min y fue detenida mediante una breve incubación en hielo. Después, la amplificación del cDNA de CENP-B fue realizada por PCR, agregando 0.15 μ M del primer 5'. Los tubos con 100 μ l de reacción fueron cubiertos con 50 μ l de aceite mineral. La amplificación por PCR se efectuó con 50 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94°C por 2 min, 48°C por 2 min y 72 °C por 1.4 min, en un termociclador (COY Temp Cycler).

Por otro lado el DNA utilizado para amplificación por PCR fue extraído con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico⁶², posteriormente sometido a la reacción de polimerasa en cadena en presencia de Taq polimerasa. Al final de las reacciones las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% conteniendo 0.5 mg/ml de bromuro de etidio. Los productos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Resultados

Caracterización de los sueros. Al estudiar por inmunofluorescencia indirecta los sueros de pacientes con esclerodermia, como fuentes tentativas de anticuerpos anti-CENP-B, se pudieron detectar anticuerpos anti-centrómero en 16 de los 50 sueros, los sueros restantes produjeron patrones fluorescentes distintos, como nucleolares o nucleosomales, por lo que se eliminaron del estudio. Los sueros de individuos sanos resultaron negativos.

Con la finalidad de conocer la especificidad fina de estos 16 sueros a proteínas CENP, se estudiaron por *Western blot*, usando tiras de nitrocelulosa con proteínas de células HEP-2 como un tamiz inicial. Quince sueros reconocieron proteínas centroméricas, que fueron identificadas con base en su peso molecular y tomando en cuenta la reactividad de los sueros tipo proporcionados gentilmente por el Dr. Casiano, solamente uno resultó negativo. La reactividad más frecuente resultó contra la proteína CENP-A en asociación con cualquiera de las otras proteínas CENP-B o CENP-C. (Tabla 2 y Figura 2)

Tabla 2

ESPECIFICIDAD FINA DE ANTICUERPOS ANTI-CENTRÓMERO

Suero	AAN	Título	Western blot	Proteína
1	Centrómero	1:160	17/40/140	CENP-A,B,C
2	Centrómero	1:160	17	CENP-A
3	Centrómero	1:160	17,80	CENP-A, B
4	Centrómero	1:80	17	CENP-A
5	Centrómero	1:80	17	CENP-A
6	Centrómero	1:80	17	CENP-A
7	Centrómero	1:40	17,80	CENP-A
8	Centrómero	1:40	Neg	Neg
9	Centrómero	1:80	17,80	CENP-A,B
10	Centrómero	1:80	17	CENP-A
11	Centrómero	1:80	17	CENP-A
12	Centrómero	1:80	80	CENP-B
13	Centrómero	1:80	80	CENP-B
14	Centrómero	1:160	17	CENP-A
15	Centrómero	1:160	17	CENP-A
16	Centrómero	1:320	17	CENP-A

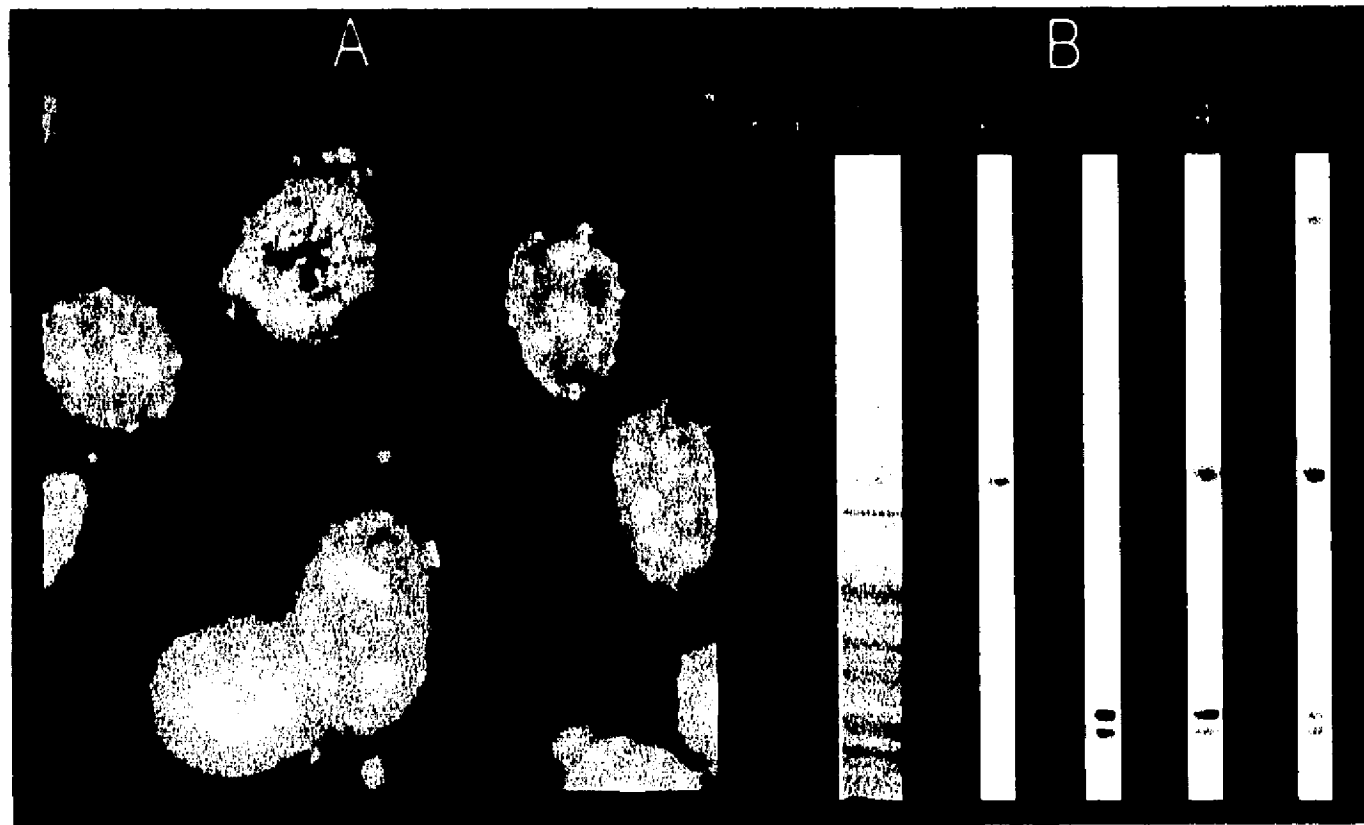


Figura 2. Reactividad anticentrómero de sueros de pacientes con CREST. A. Inmunofluorescencia. B. Inmunorreplia tipo *Western* usando extractos de células HEp-2. Izquierda marcadores de peso molecular (Novagen). 1) PAGE al 11%. 2) Anti-CENP-B (80 kD). 3) Anti-CENP-A (doblete de 17 kD). 4) Anti-CENP-A y B. 5) Anti-CENP-A, B y C (140 kD).

Caracterización de centrómeros vegetales por inmunofluorescencia e inmunorreplia tipo *Western*. De los sueros que presentaron patrón centromérico, solamente dos fueron monoespecíficos para CENP-B y reconocieron una sola banda con una masa molecular de 80 kD (sueros # 12 y 13). Esta misma banda fue reconocida por un suero control anti-CENP-B. Uno de los sueros monoespecíficos se utilizó para obtener anticuerpos purificados por afinidad. Los anticuerpos anti-CENP-B, fueron usados en ensayos de inmunofluorescencia e inmunorreplia tipo *Western* en células o extractos proteicos de vegetales.

Fue posible visualizar centrómeros mediante pruebas de inmunofluorescencia en células de *Phaseolus vulgaris* dissociadas y células de cebolla, en tanto que en las células de papa y zanahoria no fue posible visualizar estructuras centroméricas. En las preparaciones vegetales, el patrón de fluorescencia fue similar al observado en células HEp-2, sólo que el número de centrómeros fue menor. Por otro lado, los anticuerpos

purificados por afinidad anti-CENP-B reaccionaron intensamente con una banda de 80 kDa en extractos de diferentes vegetales, siendo más intensa la de frijol y la de cebolla. Los ensayos de precipitación en agar usando estos extractos demostraron que las proteínas vegetales resultaron inmunológicamente idénticas a CENP-B de células HEP-2. (Figura 4)

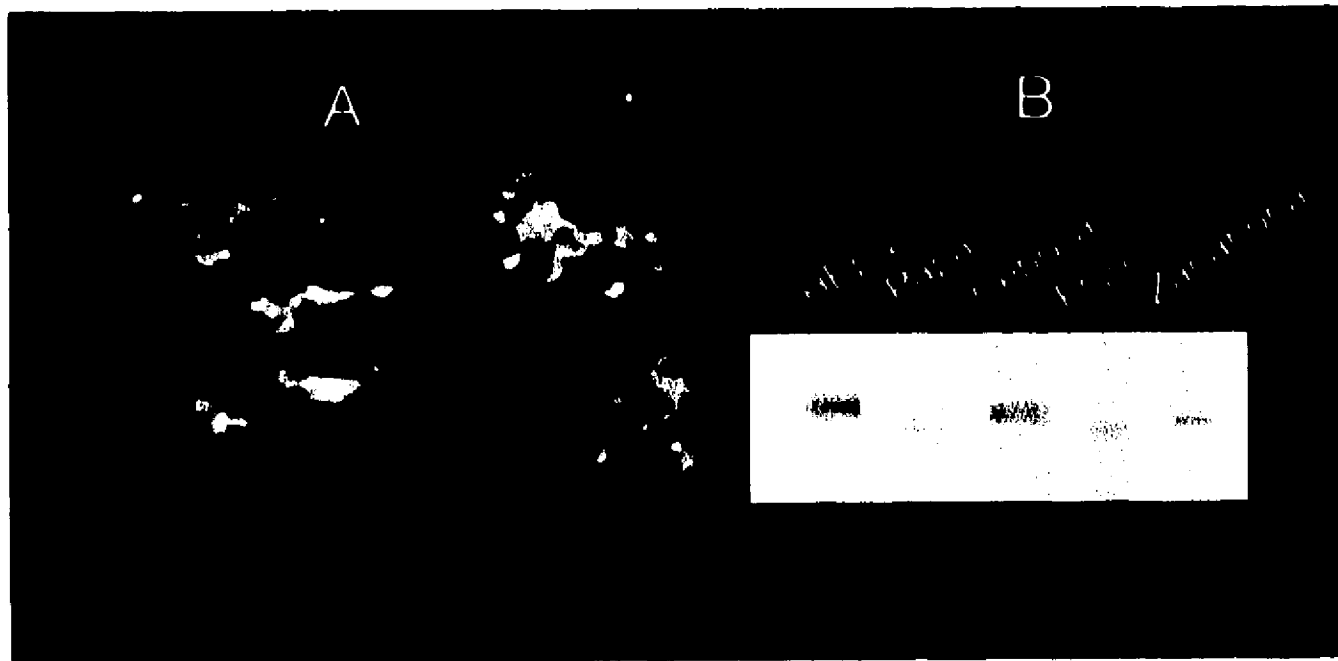


Figura 3. A. Inmunofluorescencia representativa de centrómeros de frijol, probados con anticuerpos de afinidad anti-CENP-B. B. Autorradiografía que muestra la reactividad de estos anticuerpos a una banda de aproximadamente 80 kD en diferentes extractos celulares

La interacción centrómero-cinetocoro es mantenida por CENP-B. Para definir la importancia de la proteína CENP-B en la formación del centrómero, se realizaron ensayos en células HEP-2 digeridas con nucleasas o tripsina; todos los sueros anticentrómero fueron probados en células pre-digeridas, y los títulos de anticuerpos y el patrón fueron comparados con aquellos obtenidos en células HEP-2 sin ningún tratamiento. Como puede observarse en la Figura 4, el tratamiento con DNasa no eliminó el patrón centromérico ni modificó el título de anticuerpos. En algunos sueros, sin embargo, el título de anticuerpos disminuyó en 80% de los sueros después del tratamiento con la endonucleasa de restricción *Hind* III. La nucleasa de *Aspergillus* no tuvo ningún efecto en el patrón de fluorescencia; tampoco las otras endonucleasas de restricción *Eco* RI y *Bam* HI alteraron el patrón ni el título como puede observarse en la Tabla 4. La digestión con nucleasas en células en suspensión produjo resultados similares a los obtenidos en células en monocapas. La digestión con tripsina abolió el patrón centromérico producido por todos sueros, indicando que las proteínas centroméricas constituyen el eje organizador del complejo centrómero-cinetocoro. Resultados similares fueron obtenidos con células de frijol.

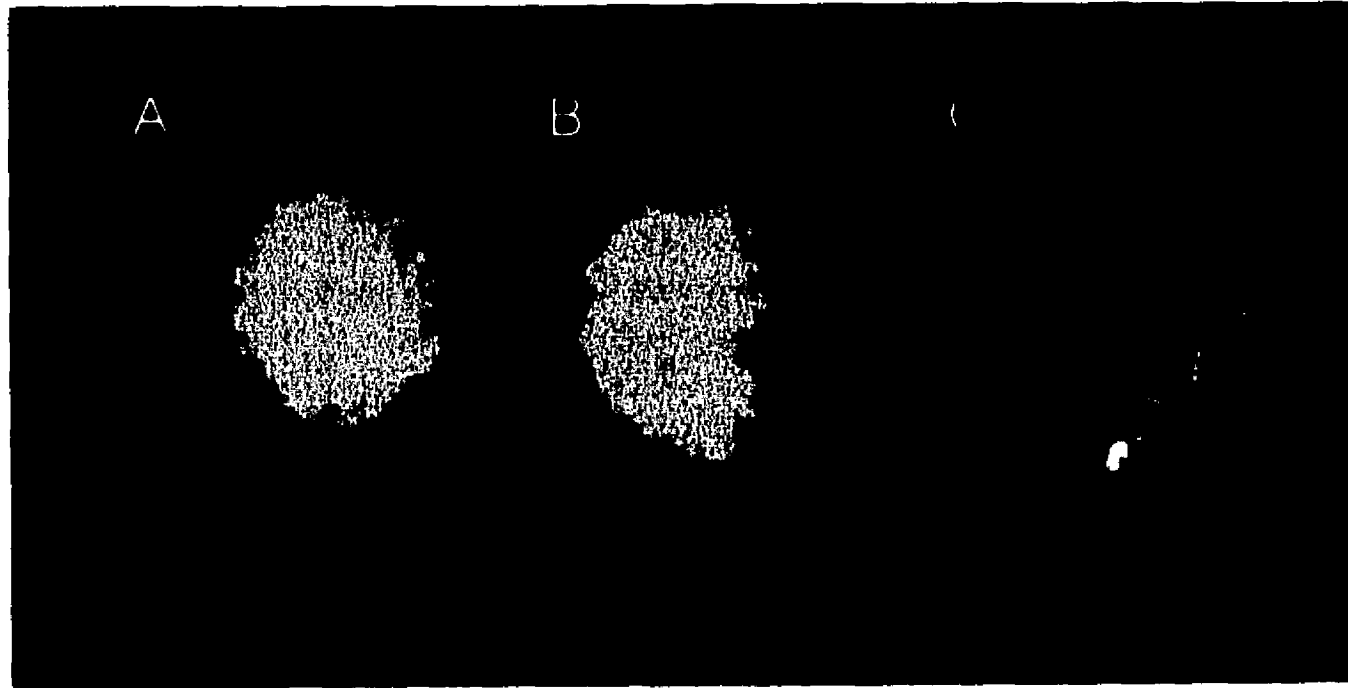


Figura 5. Anticuerpos anticentrómero por inmunofluorescencia indirecta. En células digeridas con: A) DNasa. B) Eco RI. C) Tripsina.

Tabla 4

Las proteínas centroméricas protegen de la digestión al DNA alfoide

Suero	Intactas	DNasa	Nuclesa	Bam HI	Eco RI	Hind III	Tripsina
1	160	160	160	160	160	40	0
2	160	160	160	160	160	80	0
3	160	160	80	160	160	40	0
4	80	80	80	80	80	0	0
5	80	80	80	80	80	0	0
6	80	80	80	80	80	40	0
7	40	80	80	80	80	20	0
8	40	40	40	40	40	0	0
9	80	80	80	80	80	40	0
10	80	80	80	80	80	80	0
11	80	80	80	80	80	80	0
12	80	80	80	80	80	40	0
13	80	80	80	80	80	20	0
14	160	160	160	80	160	80	0
15	160	160	160	80	160	80	0
16	320	320	320	320	320	160	0

La proteína CENP-B retiene satélites de α DNA. Con la evidencia que las proteínas centroméricas conferían protección al DNA alfoide evitando su digestión con diversas nucleasas, se preparó un inmunoadsorbente para

purificar la proteína CENP-B, con la cual se inmunoprecipitaron satélites de alfa DNA; a partir de este complejo se amplificaron secuencias de CENP-B box por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos sentido y antisentido. La presencia de proteína CENP-B en el inmunoabsorbente permitió la amplificación por PCR de CENP-B box, en tanto que la ausencia de CENP-B o de DNA en la inmunoprecipitación previa a la PCR, resultó negativo para la amplificación de DNA alfoide (CENP-B box). Estos resultados fueron análogos en pruebas de interacción-amplificación-PCR con extractos protéicos y DNA de origen animal y vegetal. (Figura 5)

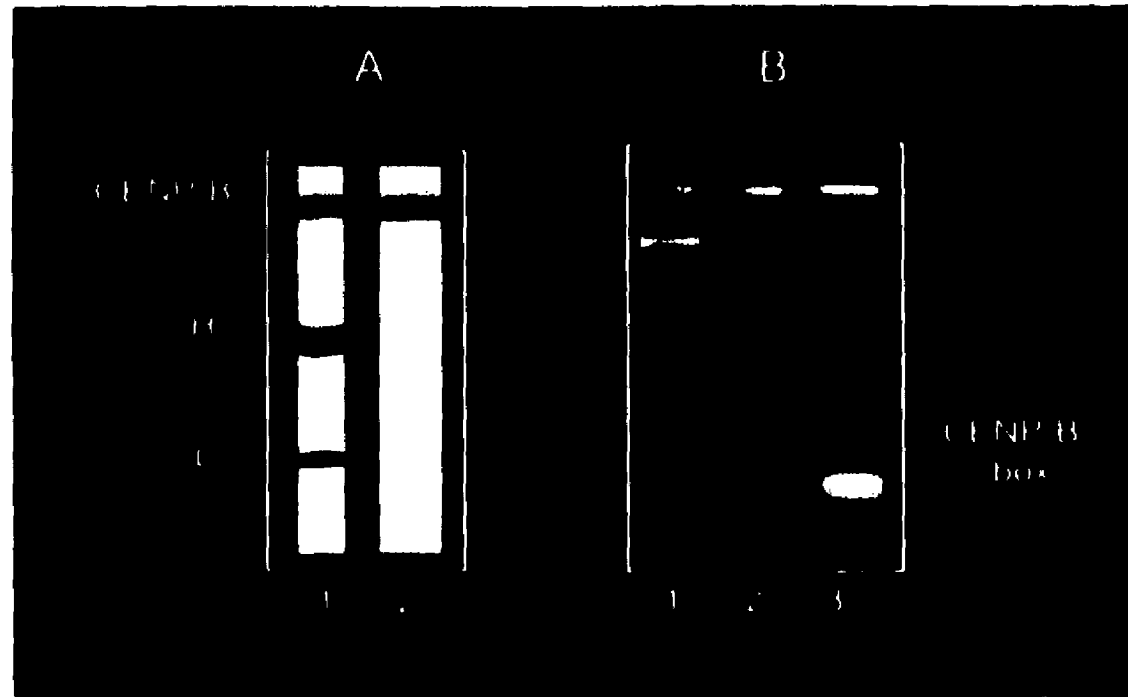


Figura 5. A) Carril 1: Inmunoprecipitación de CENP-B por un suero anti-CENP-B (H, cadenas pesadas; L, cadenas ligeras, proteína CENP-B). Carril 2: Proteína CENP-B eluida del inmunoabsorbente usando 0.1 mM de glicina a pH 2.8. B) Secuencias de CENP-box amplificadas usando PCR con el inmunoabsorbente conteniendo los satélites de DNA/CENP-B como un templado. Los productos de PCR fueron resueltos en agarosa y teñidos con bromuro de etidio. Carril 1: Marcadores de tamaño (pb) de DNA. Carril 2: Amplificación negativa en ausencia de CENP-B. Carril 3: Amplificación de CENP-B box en presencia de templados CENP-B/Alfa DNA

Amplificación del cDNA que codifica para el extremo amino-terminal de CENP-B de células vegetales. Se utilizó RNA total obtenido mediante TRizol, de frijol, zanahoria, cebolla, papa y de células HEp-2. Después de la reacción de transcriptasa reversa, se amplificó el extremo amino-terminal de CENP-B, vía PCR con oligonucleótidos específicos sentido y anti-sentido para CENP-B. El producto de PCR fue un segmento de aproximadamente 365 nucleótidos. Los amplificados de células animales y vegetales presentaron una logitud similar. La amplificación del extremo amino-terminal de CENP-B a partir de DNA genómico vegetal y de células HEp-2, presentó

el mismo comportamiento electroforético, que los amplificados obtenidos vía RT-PCR. (Figura 6)



Figura 6. Amplificación del extremo amino terminal del gene humano para CENP-B, por RT-PCR. 1) cDNA de células HEp-2. 2) cDNA de *Phaseolus vulgaris*.

Por otro lado se pudo demostrar vía PCR, la presencia de CENP-B box en las células vegetales estudiadas, en todos los casos el producto amplificado con oligonucleótidos específicos, generó un fragmento de DNA de aproximadamente 150 pb.

Hibridación *in situ* de CENP-B box en vegetales. Se demostraron los complejos del centrómero/cinetocoro en células HEp-2 y en células vegetales, con sondas específicas para CENP-B box; estas fueron marcadas por "oligo tailing", utilizando la reacción de desoxinucleotidil transferasa terminal, que cataliza la adición de una cola de FI-dUTP en el extremo 3' del oligonucleótido. Las sondas marcadas fueron utilizadas en células HEp-2, en *Phaseolus vulgaris* así como en células de cebolla y de zanahoria, para hibridar las unidades de alfa DNA que unen a las moléculas de la proteína CENP-B.

Las sondas para CENP-B box humano hibridaron con repeticiones de alfa DNA en el núcleo de células de *Phaseolus vulgaris*, de cebolla y de células HEp-2. Los patrones de hibridación de oligómeros de CENP-B box fueron similares a los patrones anticentrómero observados por inmunofluorescencia Figura 7

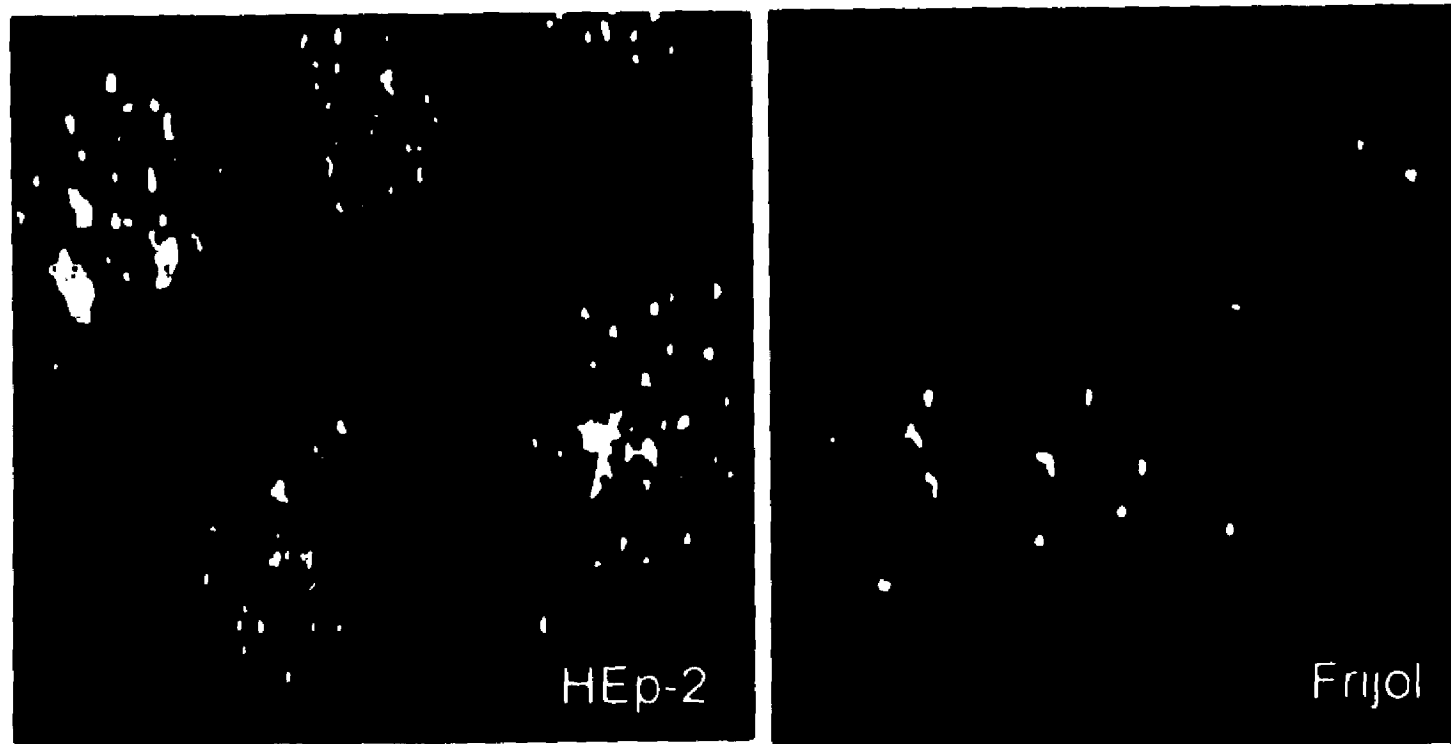


Figura 7. Hibridación *in situ* de células Hep-2 y células de *Phaseolus vulgaris*. A) Imagen digitalizada de células HEp-2 tratadas con oligómeros contra alfa DNA; muestran una hibridación positiva a lo largo del complejo centrómero/cinetocoro. B) Imágenes digitalizadas de células de *Phaseolus vulgaris* tratadas con oligómeros contra alfa DNA; muestran una hibridación positiva en la región del complejo centrómero/cinetocoro.

Discusión

El presente estudio fue diseñado para demostrar la presencia de proteínas centroméricas en células de vegetales superiores, en particular CENP-B. Para este propósito se utilizaron como sondas moleculares los sueros autoinmunes de pacientes con la variante de esclerodermia CREST, los que fueron probados por inmunofluorescencia indirecta en células disociadas de diversos vegetales. Se realizaron extracciones de proteínas a partir de los tejidos vegetales, fueron caracterizadas por electroforesis y probadas en *Western blot*.

Se pudo demostrar por inmunofluorescencia indirecta la presencia de centrómeros en células de frijol y de cebolla, las cuales claramente exhibieron estructuras correspondientes a centrómeros, que tienen menor tamaño a las observadas en células tumorales humanas HEp-2. Además, el número de centrómeros también fue menor, con un promedio de 8-10 por célula. Resultó evidente la negatividad de la inmunofluorescencia en células de papa y de zanahoria. Este resultado probablemente es debido a que la inmunofluorescencia en células disociadas de zanahoria y papa no tienen suficiente sensibilidad, porque el tamaño de los centrómeros es menor que en los otros tejidos estudiados, este problema técnico, también ha sido reportado por otros autores⁶³. La especificidad fina que los sueros anticentrómero reconocieron en *Western blot* con mayor frecuencia, fueron CENP-A con 17 kD y CENP-B con 80 kD; estos resultados en células humanas, son comparables a los que otros autores han reportado⁶⁴. A partir de la caracterización fina, se seleccionaron dos sueros que presentaban los títulos mayores de anti-centrómero y fuerte reactividad contra la banda de 80 kD; de estos fueron purificados anticuerpos de afinidad, los cuales se utilizaron en la caracterización molecular en extractos vegetales. En todos los extractos, los anticuerpos anti-CENP-B reconocieron una banda de aproximadamente 80 kD, que corresponde a una proteína vegetal análoga a CENP-B animal, en ensayos preparativos los extractos vegetales y animales se enfrentaron a los anticuerpos anti-CENP-B concentrados, en pruebas de doble difusión en agar y los extractos vegetales reaccionaron en bandas de inmunoprecipitado con identidad total; es por ello que se les consideró inmunológicamente análogas.

Por otro lado, se utilizaron los anticuerpos anti-CENP-B para purificar por afinidad a la proteína CENP-B, cuya habilidad de retener satélites alfa se demostró en ensayos de interacción con DNA genómico; la interacción fue

seguida de inmunoprecipitación y amplificación de secuencias específicas de CENP-B box. Con estos experimentos logró demostrarse la importancia de la proteína CENP-B para retener satélites alfa; la ausencia de proteína resultó en la ausencia de DNA alfoide; este sistema funcional opera tanto para células animales como para vegetales, ya que los ensayos de interacción con proteína CENP-B y DNA de frijol, produjo resultados similares. Además, la interacción de las proteínas centroméricas protege al DNA alfoide de ser digerido con nucleasas. Los resultados aquí presentados son similares a los que Wrong y Rattner demostraron previamente⁶⁵, de igual forma, la interacción de CENP-B y CENP-B box había sido reportada previamente por Muro y Matsumoto³³. El presente estudio amplía estas observaciones y aporta un paso extra vía PCR, para amplificar secuencias específicas de DNA centromérico.

La presencia de secuencias específicas de CENP-B box se confirmó por pruebas de hibridación *in situ*, las cuales exhibieron correspondencia total con los patrones de fluorescencia de la proteína CENP-B y aquellos producidos por las sondas marcadas para CENP-B box. Este resultado era esperado, ya que ambos elementos interactúan y sirven de interfase para el ensamble de otros componentes que permiten la segregación del material hereditario.

El diseño de oligonucleótidos específicos para CENP-B y/o para CENP-B box, tomando como base las secuencias de los genes de mamíferos, produjo resultados favorables, ya que fue posible amplificar vía PCR el extremo amino terminal de CENP-B, el cual está altamente conservado en la escala filogenética^{22,23,40,50}, este dominio permite la interacción con las secuencias nucleotídicas de CENP-B box; y desarrolla la correcta función de la proteína. En todos los vegetales examinados por RT-PCR, fue posible obtener amplificadas de aproximadamente 365 pb; estos y los de células HEP-2 presentaron tamaño similar.

Los centrómeros vegetales se detectaron inicialmente por otros investigadores, con sueros de esclerodermia en tejidos vegetales de la monocotiledónea *Hemantus catarinae*; estas observaciones fueron complementadas con la caracterización molecular en diversos extractos vegetales, por *Western blot*⁵⁰. La presencia de CENP-B en frijol no había sido reportada previamente; parte de los hallazgos del presente estudio han sido publicados, en ellos se demuestra la existencia de esta proteína CENP-B en frijol⁶⁶, por inmunofluorescencia, *Western blot* y amplificación por PCR del extremo aminoterminal de CENP-B. Estas observaciones se han ampliado a

otros vegetales, los que aparentemente presentan una organización a nivel del centrómero, similar a la encontrada en el frijol.

En la revisión de la literatura, puede percibirse la escasa información respecto a la organización molecular de los centrómeros vegetales; sólo se habían reportado secuencias similares a CENP-B box en algunos cereales⁶⁷, lo que nos permitió inferir la presencia de CENP-B como contraparte proteica para la interacción del alfa DNA.

La importancia del presente estudio radica en la demostración de que proteínas centroméricas en diversos vegetales comparten epítopes comunes con los centrómeros de mamíferos. En vegetales, los centrómeros son reconocidos por un limitado número de sueros de CREST, ya que en pruebas tamiz solamente 2 de 50 sueros con anticuerpos anticentrómero presentaron reactividad molecular al centrómero/cinetocoro vegetal, esto ha sido enfatizado por Houben⁶⁸ y coincide con nuestras observaciones. Tal hallazgo sugiere que probablemente las proteínas de la región nucleo-proteica no son idénticas, sin embargo, pueden tener algún grado de homología, o bien los autoanticuerpos humanos podrían tener una reacción cruzada que les permite reconocer proteínas del centrómero vegetal, así, los autoanticuerpos de CREST constituyen una poderosa herramienta para la caracterización molecular del complejo centrómero/cinetocoro, su utilidad ha sido demostrada por otros investigadores.

Desde el punto de vista morfológico, los estudios de inmunofluorescencia no proporcionaron la resolución necesaria para definir si el centrómero/cinetocoro del frijol y cebolla, tienen los dos dominios descritos en centrómeros de mamíferos reconocidos por los autoanticuerpos, no obstante, en el *Western blot* de extractos vegetales reconocieron una proteína ~80 kDa que presentó identidad inmunológica con CENP-B humana.

La presencia de CENP-B en el centrómero, obedece a su interacción con la región de unión al DNA altamente conservada, denominada CENP-B box, ésta tiene un alto grado de homología con mamíferos³⁹ y parte de su secuencia está presente en levaduras⁶⁹ y en el cromosoma B del maíz, donde se denomina Zm180knob⁷⁰; la secuencia tiene múltiples repeticiones, que están también presentes en otras especies vegetales como la *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Zea maiz*, *Oryza sativa*, *Triticeae*, *Lycopersicum esculentum*⁷¹⁻⁷⁴.

Es sorprendente que tanto el tamaño de las repeticiones de DNA centromérico vegetal como el de *Arabidopsis* (180 pb)^{75,76} y el del arroz (168pb)⁷⁵ es muy cercano a CENP-B box humano (170pb), estos datos

sugieren que la longitud y probable organización genómica de la región centromérica entre algunos vegetales y mamíferos es más parecida de lo que se esperaba, por otro lado, se ha descrito un grado significativo de homología entre CENP-B box humano, repeticiones de DNA centromérico del tomate⁷⁴ y de la caña de azúcar⁷⁷. Los resultados del presente estudio en frijol, sugieren que CENP-B box tiene un tamaño aproximado de ~150 pb, se desconoce su grado de homología con CENP-B box de mamíferos. A pesar de que pudiera existir poca conservación en la secuencia de las repeticiones con otras plantas, la secuencia primaria del DNA puede proporcionar sólo parte de la información necesaria para especificar la función del centrómero.

Aunado a lo anterior, se han descrito diversas proteínas centroméricas con un alto grado de conservación filogenética, este es el caso de la proteína ZW10⁷⁸, la que está presente en humanos, en *Drosophila melanogaster*, en *Caenorhabditis elegans* y *Arabidopsis thaliana*. Otras proteínas que tienen un grado significativo de homología son la gamma tubulina, centrina, pericentrina y proteínas fosforiladas relacionadas con centros organizadores de microtúbulos de centrosomas de mamíferos y de endomembranas o envolturas nucleares de vegetales⁷⁹⁻⁸²; estos hallazgos sugieren que los mecanismos de nucleación/organización de microtúbulos de plantas y animales son similares

A pesar de que el genoma de *Arabidopsis thaliana* está explorado en un 60%, las secuencias de CENP-B no han sido descritas como tales o como secuencias correspondientes a las regiones centroméricas de cromosomas vegetales, sin embargo, el extremo amino terminal de CENP-B tiene aproximadamente un 20% de homología con algunas secuencias de *Arabidopsis thaliana*, un 30% con la secuencia del maíz, 35% *Saccharomyces cerevisiae*, en *C. elegans* del 38%, *Drosophila melanogaster* 35% y de *Xenopus laevis* cerca del 90%. Estos datos son alentadores ya que en un futuro la caracterización de las regiones centrómero cinetocoro en vegetales será completa y permitirá establecer con precisión el grado de cercanía filogenética de estas moléculas que aparentemente son conservadas.

Llama la atención que otras moléculas relacionadas con el proceso de división celular, como es el caso de la gamma tubulina, que forma parte del aparato mitótico, el grado de homología entre las gamma tubulinas 1 y 2 de *Arabidopsis thaliana*, animales y hongos coinciden en un 70% en la secuencia de aminoácidos, esto sugiere la presencia de secuencias genéticas altamente conservadas.

Finalmente, la evidencia experimental de varios grupos de investigadores, y por los datos obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que existe una proteína centromérica análoga a CENP-B en diversas especies vegetales, por su localización, tamaño y capacidad de unir satélites de DNA; es probable que tenga funciones similares a CENP-B de células animales, como son la de formar y organizar la región del complejo centrómero-cinetocoro.

Las perspectivas que ofrece esta línea de investigación son: 1. Determinar el grado de homología entre CENP-B de vegetales y mamíferos, para confirmar que se trata de una proteína filogenéticamente conservada. 2. Demostrar mediante estudios funcionales el papel de esta proteína en la organización del complejo centrómero/cinetocoro vegetal. 3. Demostrar mediante ensayos de mutagénesis y/o microinyección de anticuerpos anti-CENP-B si la proteína es indispensable para la segregación del material hereditario. 4. Explorar con técnicas moleculares, como hibridación *in situ*, la expresión de ésta y otras proteínas centroméricas en diversas especies vegetales; lo cual ayudará a conocer su papel en la fisiología de mitosis vegetal. 5. Definir la secuencia de CENP-B box para compararla con otras repeticiones de DNA de diversas especies vegetales. 6. Usar autoanticuerpos humanos para la inmunolocalización de otros componentes del aparato de segregación del material hereditario.

Referencias

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson J. The Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. Third Ed.1994, 864-906
2. Widnell CC. and Pfenninger K. Essential Cell Biology. Ed. Williams & Wilkins 1990, 44-62.
3. Thomas J. Cell Cycle Control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 1995,46:317-39
4. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc Natl Acad Sci. USA 1974,71:1286-90
5. Pardee AB. Events and regulation of cell proliferation. Science 1989, 246: 603-608.
6. Xiong Y, Beach D. Population explosion in the cyclin family. Curr Biol 1991, 1:362-634.
7. Norbury C, Nurse P. Cyclins and cell cycle control. Curr Biol 1991, 1:23-24.
8. Resnitzky D, Reed SI. Different roles for cyclins D1 y E in regulation of the G1-to-S transsition. Mol Cell Biol 1995,15:3463-3469.
9. Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJC. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblast. Cell 1991,67:1169-1179.
10. Mahbubani HM, James PJC, Chevalier S, Thömmes P, Blow JJ. Cell Cycle Regulation of the replication licensing system: Involvement of a Cdk-dependent Inhibitor. J Cell Biol 1997,136:125-135.
11. Blow JJ. DNA replication and its control. Curr Opin Cell Biol 1989, 1:264-267.
12. Askey RA, Fairman MP, Blow JJ. S phase of the cell cycle. Science 1989, 246:609-614.
13. Muzi-Falconi M, Brown GW, Kelly TJ. DNA replication: Controlling initiation during the cell cycle. Curr Biol 1996,6;3:229-233
14. Hunt T. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. Curr Opin Cell Biol 1989, 1:268-274
15. Moran E. Cycles within cycles. Curr Biol 1991, 1:281-283.
16. Hartwell LH, Weinert TA. Check points: Controls that ensure the order of cell cycle events. Science 1989, 246:629-634.
17. Rudner AD, Murray AW. The spindle assembly checkpoint. Curr Opin Cell Biol 1996,8:773-780.
18. Cohen-Fix O, Koshland D. The methaphase-to-anaphase transition: avoiding a mid-life crisis. Curr Opin Cell Biol 1997,9:800-806.
19. Galio T, Saredi A, Bingham JB *Et al.* Opposing Motor Activities Are required for the organization of the mammalian mitotic spindle pole. J Cell Biol 1996,135;2:399-414.
20. Glotzer M. The mechanism and control of cytokinesis. Curr Opin Cell Biol 1997,9:815-823.
21. Casiano CA, Landberg G, Ochs RL, Tan EM. Autoantibodies to a novel cell cycle-regulated protein that accumulates in the nuclear matrix during S phase

- and is localized in the kinetochores and spindle midzone during mitosis. *J Cell Sci* 1993, 106, 1045-1056.
22. Bloom K, Yeh E. Centromeres and telomeres: Structural elements of eukaryotic chromosomes. *Curr Opin Cell Biol* 1989, 1:526-532.
 23. Cherry LM, Faulkner AJ, Grossberg LA, Balczon R. Kinetochores size variation in mammalian chromosomes: an image analysis study with evolutionary implications. *J Cell Biol* 1989, 92:281-289.
 24. Brinkley BR. Centromeres and Kinetochores integrated domains on eukaryotic chromosomes. *Curr Opin Biol* 1990, 2:446-452.
 25. Sluder G. Functional properties of kinetochores in animal cells. *J Cell Biol* 1990, 2:23-27.
 26. Pluta A, Cooke CA, Earnshaw W. Structure of mammalian centromere at metaphase. *J Cell Biol* 1990, 15:181-185.
 27. Haff T, Peter E, Warburton, Willard HF. Integration of Human α -Satellite DNA into simian chromosomes: Centromere protein binding and disrupt of normal chromosome segregation. *J Cell Biol* 1992, 70:681-696.
 28. McIntosh JR., Pfarr CM. Mitotic motors. *J Cell Biol* 1991, 115:577-585.
 29. Mitchison TJ. Mitosis: basic concepts. *Curr Opin Cell Biol* 1989, 1:67-74.
 30. Bischoff FR, Maier G, Titz G, Ponstingl H. A 47 kDa human nuclear protein recognized by anti kinetochores autoimmune sera is homologous with the protein encoded by RCC1, a gene implicated in onset of chromosome condensation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:8617-8621.
 31. Compton D, Yen TJ, Cleveland D. Identification of Novel Centromere/Kinetochores-associated Protein using monoclonal antibodies generated against Human Mitotic Chromosome scaffolds. *J Cell Biol*, 1991, 112:1083-1097.
 32. Earnshaw WC, Mackay AM. Role of nonhistone protein in the chromosomal events of mitosis. *J. Cell Biol* 1994, 8:947-956.
 33. Muro Y, Masumoto H, Yoda K, Nosaki N, Ohasashi M, Okasaki T. Centromere protein B assembles human centromeric α -satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box. *J Cell Biol* 1992, 116:585-596.
 34. Kremer L, Del Mazo J, Avila J. Identification of centromere proteins in different mammalian cells. *Eur J Cell Biol* 1988, 46:196-199.
 35. Yen T, Compton D, Wise D, Zinkowski R., Brinkley B, Earnshaw W, Cleveland D. CENP-E a novel human centromere associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *EMBO J* 1991, 10:1245-1254.
 36. Mitchinson T., Kirschner MW. Properties of the kinetochores in vitro. II Microtubule capture and ATP-dependent translocation. *J. Cell Biol* 1985, 101:766-777.
 37. Yoda K, Kitagawa K, Masumoto H *et al.* A Human Centromere Protein, CENP-B, has a DNA binding domain containing four potential alpha helices at the NH2 terminus, which is separable from dimerizing activity. *J of Cell Biol* 1992, 119:6:1413-1427
 38. Earnshaw W, Sullivan K, Machlin P, Kaiser D, Pollard T, Rothfield N, Cleveland D. Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the human centromere autoantigen. *J Cell Biol* 1987, 104:817-829.

39. Kitagawa K, Masumoto H, Ikeda M, Okazaki T. Analysis of protein-DNA and protein-protein interactions of centromere protein B (CENP-B) and properties of the DNA-CENP-B complex in the cell cycle. *Mol Cell Biol* 1995, 15;3:1602-1612.
40. Haaf T, Mater AG, Wienberg J, Ward DC. Presence and abundance of CENP-B box sequences in great ape subsets of primate-specific alpha-satellite DNA. *J Mol Evol* 1995, 41;4:487-491.
41. Zhang HX, Chen DG, Peng A, Wang YC. Relationship between CENP-B gene expression and the cell cycle. *Shih Yen Sheng Wu Hsueh Pao* 1995, 28;3:291-298.
42. Lanini L and McKeon F. Domains required for CENP-C assembly at the kinetochore. *Mol Cell Biol* 1995,6:1049-1059.
43. Valdivia MM., Brinkley BR. Fractionation and characterization of the kinetochore from mammalian metaphase chromosomes. *Meth Achiev Exp Pathol* 1986, 12:200-223.
44. Zinkowski RP. The Centromere-Kinetochore complex: A repeat Subunit model. *J Cell Biol* 1991, 113:1091-1110.
45. Nicklas R. The motor for poleward chromosome movement in anaphase is in or near the kinetochore. *J Cell Biol* 1989, 109:2245-2255.
46. Pfarr CM, Cour M, Grissom PM., Hays TS., Porter ME., McIntosh JR. Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature* 1990, 345:263-265.
47. Bartoldi MF. Nuclear distribution of centromeres during the cell cycle of human diploid fibroblasts. *J Cell Sci* 1992, 99:255-263.
48. Pluta A, Saito HN, Earnshaw W. Identification of a subdomain of CENP-B that is necessary and sufficient to the human centromere. *J Cell Biol* 1992, 116:1081-1093.
49. Bloom K. The Centromere Frontier Kinetochore Components, microtubule-based motility, and the CEN-Value Paradox (Minireview). *J Cell Biol* 1993, 73:621-624.
50. Mole-Bajer J, Bajer AS, Zinkowski RP, Balczon RD, Brinkley BR. Autoantibodies from a patient with scleroderma CREST recognized kinetochores of the higher plant *Haemanthus*. *Proc Natl Acad Sci.USA* 1990, 87:3599-3603.
51. Staiger C, Doonan J. Cell division in plants *Curr Opin Cell Biol* 1993,5:226-231
52. Hirt H. Multiple roles of MAP Kinases in plant signal transduction. *Trend Plant Sci* 1997,2:1:11-15.
53. Jacobs TW. Cell Cycle Control. *Ann Rev. Plant Physiol* 1995,46:317-39.
54. Stoppin V, Vantard M, Schimit AC, Lambert AM. Isolated plant nuclei nucleate microtubule assembly: The nuclear surface in higher plants has centrosome-like activity. *Plant Cell* 1994,6:1099-1106.
55. Marc J. Microtubule-organizing centres in plants, *Trends Plant Sci* 1997,2;6:223-230.
56. Doonan J and Fobert P. Conserved and novel regulators of the plant cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9:824-830.
57. Laemmli UK, Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4 I DNA packaging events. *J. Mol Biol* 1973, 80:575-599.

58. Towbin HT, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 76:4350-4354.
59. Marier R, Jansen M, Andriole VT. A new method for measuring antibody using radiolabelled protein A in solid phase radioimmunoassay. *J Immunol Meth* 1989, 28: 41-49.
60. Wayne JS, Willard HF. Structure, organization and sequence of alpha satellite DNA from chromosome 17: evidence for evolution by unequal crossing-over and an ancestral pentamer repeat shared with the human X chromosome. *Mol Cell Biol* 1986, 6:3156-65.
61. Wiegant J, Ried T, Nedderlof PM, van der Ploeg M, Tanke HJ, Raap K. In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Res* 1991, 19:3237-42.
62. Davis LG, Dibner MD, Battery JF. Preparation of DNA from eukaryotic cells: general method. In *basic methods in molecular biology*. Elsevier. Amsterdam 1986,pp:44-61.
63. Citterio S, Sgobati S, Levi M, Colombo BM and Sparvoli E. PCNA and total nuclear protein content as markers of cell proliferation in pea tissue. *J Cell Sci* 1992, 102:71-78.
64. Barbosa-Cisneros O, Avalos-Díaz E, Vera O, Moreno J, Herrera-Esparza R. Localization of the centromere protein CENP-B using scleroderma sera and evidence for a role in centromere survival. *Rev Rheum [Engl Ed]* 1998,65:15-20.
65. Wrong AK, Ratter JB. Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse. *Nucl Acids Res* 1987, 16:11645-61.
66. Barbosa-Cisneros O, Fraire-Velazques S, Moreno J, Herrera Esparza R. CENP-B autoantigen is a conserved protein from humans to higher plants: identification of the aminoterminal domain in *Phaseolus vulgaris*. *Rev Rheum [Engl Ed]* 1997,64:368-374.
67. Aragon-Alcaide L, Miller T, Schwarzacher T, Reader S, Moore G. A cereal centromeric sequence. *Chrom* 1996,5:261-268.
68. Houben A, Guttenbach M, Krieb W, Pich U, Schubert I, Schmid M: Immunostaining and interfase arrangement of field bean kinetochores. *Chrom Res* 1995,3:27-31.
69. Halverson D, Baum M, Stryker J, Carbon J, Clarke L. A centromere DNA-binding protein from fission yeast affects chromosome segregation and has homology to human CENP-B. *J Cell Biol* 1997,136:487-500.
70. Alfenito MR, Birchler JA. Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics* 1993,135:589-97.
71. Jiang J, Nasuda S, Dong F, Scherrer CW, WooSS, Wing RA, Gill BS, Ward DC. A conserved repetitive DNA element located in the centromeres of cereal chromosomes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1996,93:14210-3.
72. Murata M, Ogura Y, Motoyoshi F. Centromeric repetitive sequence in *Arabidopsis thaliana*. *Jpn J Genet* 1994,69:361-70.
73. Dong F, Miller JT, Jackson SA, Wang GL, Ronald PC, Jiang J. Rice (*Oryza sativa*) centromeric regions consist of complex DNA. *Genetics* 1998,95:8135-40.

74. Weide R, Hontelez J, van Kammen A, Koornneef M, Zabel P. Paracentromeric sequences on tomato chromosome 6 show homology to human satellite II and to the mammalian CENP-B binding box. *Mol Gen Genet* 1998,259:190-7.
75. Brandes A, Thompson H, Dean C, Herslop-Harrison JS. Multiple repetitive DNA sequences in the paracentromeric region of *Arabidopsis thaliana* L. *Chromosome Res* 1997,5:238-46.
76. Round EK, Flowers SK, Richards EJ. *Arabidopsis thaliana* centromere regions: Genetic map position and repetitive DNA structure. *Genome Res* 1997,7:1045-53.
77. Nagaki K, Tsujimoto H, Sasakuma T. A novel repetitive sequence of sugar cane, SCEN family, locating on centromeric region. *Chromosome Res* 1998,6:295-302.
78. Starr DA, Williams BC, Li Z, Etemad-Moghadam B, Dawe RK, Goldberg ML. Conservation of the centromere/kinetochore protein ZW10. *J Cell Biol* 1997,138:1289-1301
79. Richards EJ, Dawe RK. Plant centromeres structure and control. *Curr Opin Plant Biol* 1998,1:130-35.
80. Vaughn KC, Harper JD. Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. *Int Rev Cytol* 1998,181:75-149
81. Smirnova EA, Cox DL, Bajer AS. Antibody against phosphorylated proteins (MPM-2) recognizes mitotic microtubules in endosperm cells of higher plant *Haemantus*. *Cell Motil Cytoskeleton* 1995,31:34-44.
82. Liu B, Joshi HC, Wilson TJ, Silflow CD, Palevitz BA, Snustad DP. Gamma tubulin in *Arabidopsis*: gene sequence, immunoblots and immunofluorescence studies. *Plant Cell* 1994,6:303-14.

CENP-B AUTOANTIGEN IS A CONSERVED PROTEIN FROM HUMANS TO HIGHER PLANTS: IDENTIFICATION OF THE AMINOTERMINAL DOMAIN IN *PHASEOLUS VULGARIS**

Olga BARBOSA-CISNEROS, Saúl FRAIRE-VELÁZQUEZ¹, Jose MORENO², Rafael HERRERA-ESPARZA¹

SUMMARY. - Centromeres are critical structures in cell division, and CENP-B is the most important protein of the centromeric complex recognized by autoantibodies from patients with scleroderma. Our major aim was to demonstrate whether CENP-B is a conserved protein along the phylogenetic scale including the higher plants. Vegetal and human cell proteins were extracted from *Phaseolus vulgaris* and HEp-2 cells and were characterized by PAGE, Western blot, and human autoimmune sera containing anti-CENP-B autoantibodies. The aminoterminal of the gene encoding for CENP-B from HEp-2 cells and *Phaseolus vulgaris* was isolated by reverse transcriptase-PCR using complementary oligonucleotides to the human CENP-B gene. Also, in situ hybridization was performed on vegetal tissues and HEp-2 cells using human CENP-B box probes. Our main results were as follows: 1) Autoimmune sera were reactive to a vegetal protein of 80 kDa. 2) Affinity-purified anti-CENP-B antibodies recognized a protein from *Phaseolus vulgaris* with molecular mass similar to that found in human cells. Vegetal and HEp-2 cells CENP-B proteins were immunologically identical. 3) Using RT-PCR, we were able to amplify a cDNA encoding for the aminoterminal domain of CENP-B from *Phaseolus vulgaris* that had the same molecular behaviour as the cDNA from

RÉSUMÉ. - L'auto-antigène CENP-B est une protéine conservée de l'espèce humaine jusqu'aux végétaux supérieurs: identification du domaine amino-terminal dans *Phaseolus vulgaris*. - Les centromères jouent un rôle clé dans la division cellulaire et le CENP-B est la protéine principale du complexe centromérique. Des auto-anticorps sériques dirigés contre le CENP-B s'observent dans la sclérodermie. Le but premier de la présente étude était de déterminer si le CENP-B est une protéine conservée d'un échelon à l'autre de la phylogénèse et notamment, si elle est encore présente chez les végétaux supérieurs. Des protéines extraites de *Phaseolus vulgaris* et de cellules HEp-2 ont été caractérisées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et Western blot et leur réactivité avec un sérum humain contenant des anticorps anti-CENP-B a été déterminée. L'extrémité aminotermine du gène CENP-B des cellules HEp-2 et de *Phaseolus vulgaris* a été isolée après conversion par la transcriptase réverse et amplification génique in vitro réalisée au moyen d'oligonucléotides du gène CENP-B humain. Une hybridation in situ a été faite sur les tissus végétaux et les cellules HEp-2 à l'aide de sondes formées d'une séquence du gène humain CENP-B. Les résultats principaux peuvent être résumés comme suit. (1) Les sérums humains contenant

Summary continued next page

Résumé continué next page

*Centro de Biología Experimental, Universidad Autónoma de Zacatecas (1), Guadalupe, Zacatecas, Mexico and Centro Médico Siglo XXI (2)

Address for reprint request: R. Herrera-Esparza, Immunotechnology Unit, CBE, Universidad Autónoma de Zacatecas, Apartado Postal 167, Guadalupe, Zac. 98600, Mexico. E-mail: herrerae@cantera.technaz.mx

Submitted for publication December 13, 1996. Accepted in revised form April 2, 1997

Rev. Rhum. [Engl. Ed.], 1997, 64 (6): 368-374
Rev. Rhum. [Ed. Fr.], 1997, 64 (6): 431-437

Summary end

Resume end

HEp-2 cells. (4) Complementary oligonucleotides for human CENP-B box hybridized a DNA sequence from *Phaseolus vulgaris*. In conclusion, CENP-B protein is a conserved protein along the phylogenetic scale from humans to higher plants.

Key words: Anticentromere antibodies - CENP-B - Scleroderma - Crest.

Centromeres are specialized domains of eukaryotic chromosomes that play a critical role in the appropriate segregation of chromatin during meiosis and mitosis. Centromeres are composed of repeats of DNA assembled to centromeric proteins called CENP, INCENP, and MAPS [1]. Of the various CENP proteins CENP-B binds to the centromeric DNA through a specific 17 bp sequence called the CENP-B box and present in some satellites [2]. The CENP-B box determines the degree of interaction with CENP-B. Molecular studies of CENP-B protein demonstrated that the aminoterminal domain is a domain of 158 residues that permits interaction with centromeric chromatin [3].

Centromeric proteins have been characterized using autoimmune sera from patients with scleroderma as molecular probes, in particular sera from patients with the CREST variety of scleroderma (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, and telangiectasia) [4].

CENP-B is the key protein for positioning of the centromeric complex, and several studies have demonstrated its presence in different eukaryotic cells. Our main goal was therefore to determine whether the CENP-B autoantigen was a conserved protein present in the vegetal kingdom. Using anticentromere antibodies from scleroderma patients

un anti-CENP-B ont réagi avec une protéine végétale de 80 kDa. (2) Les anticorps anti-CENP-B purifiés par affinité ont reconnu une protéine de *Phaseolus vulgaris* dont la masse moléculaire était voisine de celle du CENP-B humain. Les protéines CENP-B humaine et végétale étaient immunologiquement identiques. (3) Nous avons pu amplifier un ADN complémentaire codant le domaine amino-terminal du CENP-B de *Phaseolus vulgaris*. Le comportement électrophorétique de cet ADN était identique à celui de l'ADN complémentaire des cellules HEp-2. (4) Les oligonucléotides complémentaires de la séquence humaine CENP-B se sont hybridés avec une séquence d'ADN de *Phaseolus vulgaris*. En conclusion, la protéine CENP-B se conserve le long de la phylogénèse, de l'espèce humaine jusqu'aux végétaux supérieurs.

Mots clés : Anticorps anti-centromère - CENP-B - Sclérodémie - Crest (syndrome).

and complementary oligonucleotides for the aminoterminal domain of CENP-B gene, this issue was addressed, and the results demonstrated that higher plants possess the CENP-B protein.

MATERIAL AND METHODS

Sources and specificity of the sera

Samples were obtained from scleroderma patients of the outpatient facilities of the Immunotechnology unit and of the department of Rheumatology of Centro Médico Siglo XXI. A total of 50 patients fulfilling the American College of Rheumatology criteria for scleroderma were included in this study [5]. Negative controls were from 50 healthy individuals. Positive controls for anti-centromere antibodies were kindly provided by C. Casiano (The Scripps Foundation, La Jolla, CA). Sera were characterized by indirect immunofluorescence using HEp-2 cells and vegetal cells obtained from *Phaseolus vulgaris*.

Cell cultures

1) HEp-2 cells were obtained from the American Type Culture Collection (pass number 364) and cultured in DMEM supplemented with 10% fetal

bovine serum (FBS, Gibco). Cells dissociated from confluent cultures by 0.5% trypsin and 1.25 mM EDTA were grown on slides until a monolayer was obtained. Cells were then permeabilized with 1% Triton X-100, fixed in cold acetone, and kept at -20° C until used. 2) Vegetal cultures. *Phaseolus vulgaris* seeds were grown in Murashige-Skoog gel media. After 2 weeks, roots of the plants were collected and cells were dissociated by 0.5M HCl, then fixed on slides and permeabilized as previously described, and finally used for indirect immunofluorescence and for in situ hybridization assays.

Indirect immunofluorescence (IF)

HEp-2 and plant cells were prepared as described above and used as the antigenic source. Sera were diluted progressively from an initial 1:40 dilution in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, and were incubated on the HEp-2 cell preparations for 30 minutes at room temperature in humidity. Cells were washed three times for 10 minutes in PBS incubated for 30 minutes with a 1:80 dilution of goat anti-human immunoglobulin (CLB, Amsterdam). After three more washes in PBS, slides were mounted in glycerol-PBS 9:1 and evaluated by two independent observers under an epifluorescence microscope (Olympus B-Max).

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Western blot

SDS-PAGE was performed under reducing conditions on minigels according to the technique described by Laemmli and Favre in 11% polyacrylamide gels [6]. The unstained gels were electrotransferred onto nitrocellulose sheets (NC) using the procedure described by Towbin [7]. The blotted proteins were probed with affinity-purified anti-CENP-B antibodies. Bound antibodies were developed with 125 Staphylococcus protein A, followed by autoradiography with X OMAT AR film and cassettes with intensifying screens [8].

Affinity-purification antibodies

Anti-CENP-B antibodies were isolated from human CENP-B protein immobilized onto nitrocellulose. The sheets were incubated overnight with undiluted anti-centromere serum. Nonspecific bound antibodies removed by five washings with PTX. Specific bound antibodies were eluted from the NC sheets by 0.2M glycine-HCl, pH 2.8, and neutralized immediately with 1M tris, pH 9.5 [9]. The eluted antibodies were concentrated by Centricon and then used as probes for vegetal CENP-B detection by indirect immunofluorescence or by Western blot.

Oligonucleotide probes

Complementary oligonucleotides were designed using the PRIMER program. Oligomer synthesis was performed in a DNA synthesizer (Applied Biosystems). The probes were deprotected and cleaved, then purified by cartridges with ammonium hydroxide, HPLC grade acetonitrile, trifluoroacetic acid, and acetonitrile buffers.

Oligonucleotides for the conserved domain from CENP-B were synthesized taking in account the first 439 nucleotides, which correspond to 158 residues of aminoterminal domain of the human sequence reported by Earnshaw et al [10]. The 5' oligonucleotide sequence was 5'-CGACAGCT-GACGTTCCGGGA-3' and 3' oligonucleotide sequence was 5'-CCGCACCACACAG-GACGTCGCCGCACC-3'. The CENP-B box oligomers were designed according to the sequence for human CENP-B box reported by Wayne and Willard [11]. The upstream sequence was 5'-CTTCGTTGGAAACGGGA-3' and the downstream sequence was 5'-GAAG-CAACCTTTGCCCT-3'.

Oligonucleotide labeling by oligo-tailing

CENP-B box probes were adjusted to 10 ng/ml at 260 nm by OD and labeled with fluorescein-11 dUPT (FI-dUPT) using a terminal transferase reaction (Oligocolor Kit, RPN-3400, Amersham). Oligonucleotides and FI-dUPT were incubated at 37°C for 90 minutes, then labeled probes were used for hybridization.

In situ hybridization of CENP-B Box

Vegetal and HEp-2 cells were pre-hybridized with 0.02 M HCl, permeabilized with 0.01% Triton-X 100/PBS, and washed in cold 20% acetic acid. Probes were diluted in hybridization buffer/formamide (1:1) and adjusted to 50 ng/ml. Prehybridized cells were covered with the probes and incubated at 90°C during 3 minutes. The slides were then incubated at 37°C for two hours and washed in SSC buffer. For detection, the slides were washed in TBS, treated with blocking solution, again washed in TBS, and incubated for 1 hour with anti-fluorescein antibodies conjugated with alkaline phosphatase. After new washings with TBS, the color reaction was induced by NBT substrate, and the slides were incubated in the dark for 15 hours. The slides were rinsed, mounted, and evaluated microscopically [12]. Images were transferred to a digital 40 Kodak camera and processed by the Photoenhancer and the NIH 1.53 image analyzer program.

Reverse-transcriptase/polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from vegetal tissues or from HEp-2 cells using the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method (TRIzol, Gifco BRL). RNA was quantitated at 260 nm by OD. For cDNA synthesis, 250 ng of the total RNA, 200 μ M of dNTP, and 0.75 μ M of the downstream primer were mixed with 5 U/20 μ l of rTth/DNA polymerase (Gene Amp TmPCR System 9600). The RT reaction was performed at 70°C for 10 min stopped by brief incubation on ice beads. After reverse transcription, cDNA amplification of CENP-B was carried out by PCR, after addition of 0.15 μ M of the upstream primer [13]. The reaction tubes containing 100 μ l of sample mixture were overlaid with 50 μ l of mineral oil. PCR mixtures were amplified in a thermal cycler (COY TempCycler), using 50 cycles under the following conditions: 94°C for 2 min, 48°C for 2 min, and 72° for 1.4 min. At the end of the PCR reaction the samples were electrophoresed in 0.8% agarose gels containing 0.5 mg/ml ethidium bromide. The PCR products were visualized under UV light.

RESULTS

Sera Specificity

Of the 50 sera of scleroderma patients, sixteen showed a centromeric pattern by IF on HEp-2 cells. Sera with other fluorescent patterns were excluded. Centromeric sera were screened by Western blot to establish molecular specificity. Fifteen sera recognized one or more bands corresponding to CENP proteins, and one serum was negative. The protein most frequently recognized was CENP-B (44%), followed by CENP-A of 17 kDa (18%) and CENP-C (12%). Other sera exhibited ill-defined bands. Negative controls were unreactive.

Affinity-purified anti-CENP-B antibodies recognize a vegetal protein of 80 kDa

Of the anti-centromere sera, only two were monospecific for CENP-B and recognized a single band with a molecular mass of 80 kDa corresponding to CENP-B. This band was also recognized by the control serum. Monospecific anti-CENP-B sera were used to obtain affinity-purified antibodies. For this purpose, HEp-2 cell extracts containing CENP-B protein were run in preparative electrophoresis then electrotransferred onto nitrocellulose sheets. The 80 kDa band was cut off, and the nitrocellulose strips were incubated overnight with undiluted CENP-B serum. After extensive washings with GB, the immobilized monospecific antibodies were eluted by 0.05M glycine, then neutralized

with Tris, and finally used in IF and Western blot assays against *Phaseolus vulgaris* extracts.

Human affinity-purified anti-CENP-B antibodies recognized centromeres from dissociated *Phaseolus vulgaris* cells by indirect immunofluorescence. The fluorescent pattern was similar to that observed on HEp-2 cells. Affinity-purified antibodies were reactive to a single 80 kDa band from *Phaseolus vulgaris* extracts. This protein was immunologically identical to CENP-B from HEp-2 cells (fig. 1).

Identification of a cDNA CENP-B from *Phaseolus vulgaris* by PCR-reverse transcription

Using RT-PCR, we were able to amplify part of the cDNA encoding for the aminoterminal CENP-B domain from HEp-2 cells. The amplification had 365 nucleotides and fragment bound the α DNA at the CENP-B box level. A similar fragment was amplified by PCR using genomic DNA from *Phaseolus vulgaris*. Both the HEp-2 cell and the vegetal PCR products exhibited similar electrophoretic behaviors (fig. 1).

Probes against human CENP-B box in situ hybridized centromere-kinetochore complexes from HEp-2 cells and *Phaseolus vulgaris*

Probes were labeled by using terminal deoxynucleotidyl transferase to catalyze attachment of a tail of Fl-dUTP onto the 3' end oligonucleotide. These labeled probes were used on *Phaseolus vulgaris* and HEp-2 cells to hybridize the α DNA repeats that join CENP-B molecules and ensure the cohesion of the centromere-kinetochore complex. Probes for the human CENP-B box hybridized α DNA repeats in the nucleus of dissociated *Phaseolus vulgaris* cells and also from HEp-2 cells. The hybridization patterns of CENP-B box oligomers were similar to the anti-centromere pattern observed by immunofluorescence (fig. 1).

DISCUSSION

We addressed the issue of whether or not centromeric proteins are present in higher plants. A large body of evidence indicates that CENP-B is one of the most important proteins of the centromere-kinetochore complex. We used human anti-CENP-B autoantibodies from scleroderma patients to detect CENP-B in human and vegetal cells.

Indirect immunofluorescence showed centromere-like structures in *Phaseolus vulgaris* cells. However the numbers of centromeric dots were lower than in HEp-2 cells. Our results are specific since affinity-purified anti-CENP-B antibodies

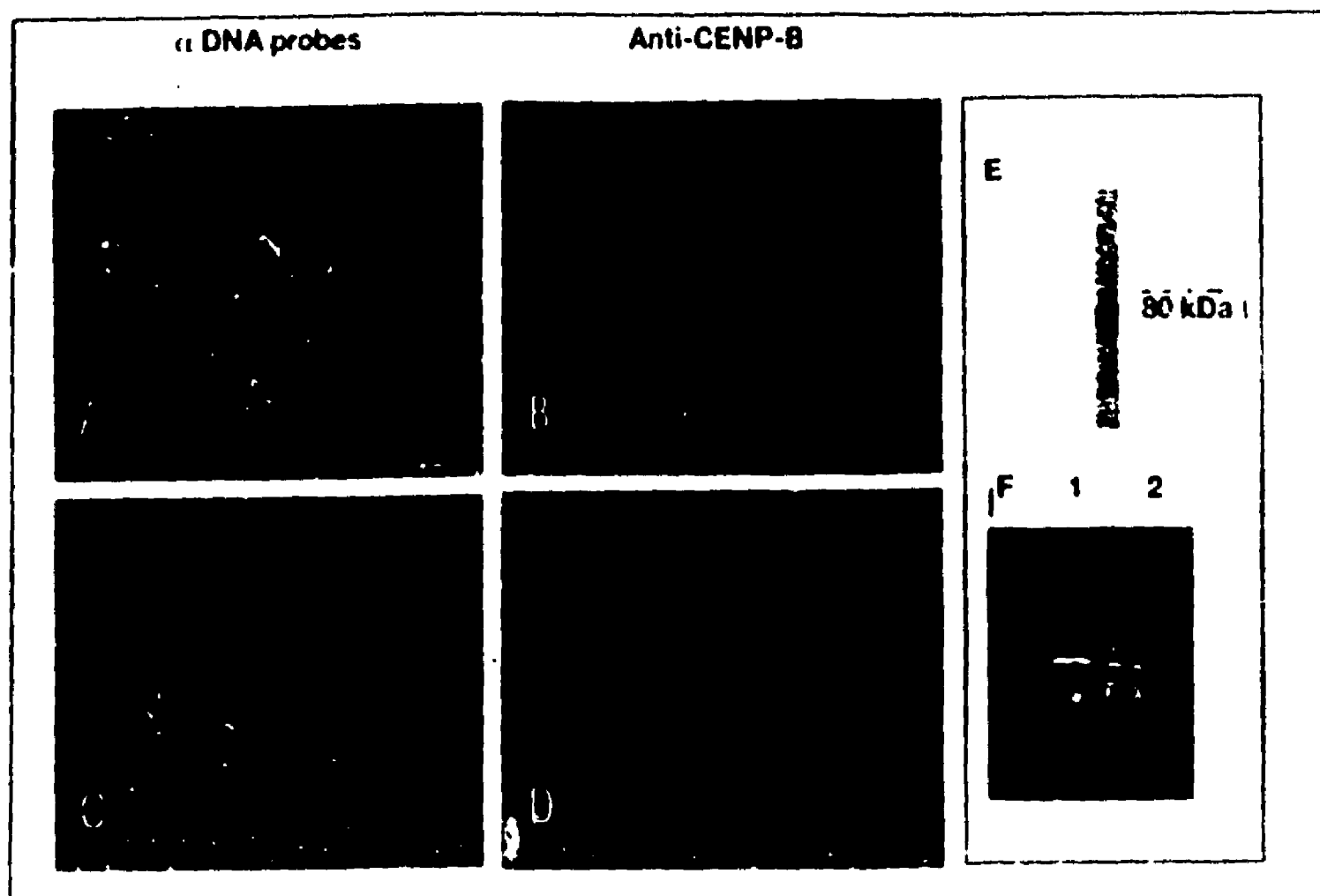


Fig. 1. - In situ hybridization and indirect immunofluorescence of HEp-2 and *Phaseolus vulgaris* cells. A) Digitized images from HEp-2 cells treated with oligonucleotides against α DNA, exhibit positive hybridization along the centromere/kinetochore complex. B) HEp-2 cells show centromeric fluorescent pattern induced by a CREST serum. C) Digitized images from *Phaseolus vulgaris* cells treated with oligonucleotides against α DNA show positive hybridization along the centromere/kinetochore complex. D) *Phaseolus vulgaris* cells show a centromeric fluorescent pattern induced by affinity-purified human anti-CENP-B antibodies. E) Western blot from anti-CENP-B antibodies that reacted against a 80 kDa band from *Phaseolus vulgaris*. F) RT-PCR amplification by oligonucleotides against the aminoterminal domain from human CENP-B gene : 1-cDNA from HEp-2 cells, 2-cDNA from *Phaseolus vulgaris*.

recognized on Western blot a vegetal protein with a molecular mass of 80 kDa fitting the description of human CENP-B. Another indication of the presence of CENP-B in plants was the cDNA obtained by RT-PCR amplification. The primers amplified the sequence encoding for the aminoterminal domain, and the PCR product was similar to that obtained from HEp-2 cells. Finally, complementary labeled oligonucleotides hybridized α DNA from *Phaseolus vulgaris* *in vitro*.

Autoantibodies are commonly used as molecular probes to characterize subcellular particles, for example in plants. Sera from scleroderma patients have been used to demonstrate the presence and function of Topoisomerase I or Scl-70 antigen in *Arabidopsis thaliana*, corn, spinach, and wheat germ [14]. Additionally, cell proliferation markers such as PCNA have been identified in root meristem pea cells using monoclonal antibodies [15]. Another molecule characterized by autoantibodies in the higher plant *Allium cepa* is the RNA polymerase I transcription factor UBE, which was isolated using an anti-NOR serum from a patient with an autoimmune disease [16].

The recognition of centromere kinetochore antigens by human anti-centromere autoantibodies was reported by Mole-Bajer et al [17], who used the serum from a patient with the CREST to immunostain kinetochores from seed cells from the monocot *Haemanthus katerinae* and found a centromeric protein with a molecular mass close to 68 kDa. However these investigators did not specify which CENP protein was identified. We identified CENP-B protein from higher plants using affinity-purified anti-CENP-B human autoantibodies.

Evolving knowledge about the organization of chromosomes in higher plants indicate that it is similar than those of mammalian cells. Therefore, we postulated that CENP-B or a molecule with similar function may be present in plants. To investigate this hypothesis, we designed several oligonucleotides for PCR amplification of the cDNA that encodes for the aminoterminal domain of CENP-B in *Phaseolus vulgaris*. We were able to amplify a sequence of 365 bp with a similar electrophoretic mobility to that of CENP-B from HEp-2 cells. Our data confirm that CENP-B autoantigen is widely distributed along the phylogenic scale.

Another example of conserved proteins from humans to plants are the chaperons [18], which in some cases are also recognized by human autoantibodies [19]. Since the targets of autoantibodies in connective tissue diseases are intracellular conserved molecules involved in basic events of cell physiology, such as CENP-B, the possibility arises that the production of autoantibodies is the result of a primary insult, such as a viral infection or physical cell damage, and is thus a consequence rather than a cause of a previous event [20]. Although it is difficult to speculate how our findings may be of clinical or pathological relevance, mapping of

conserved molecules is a good example of how human autoimmune sera can be used in basic science as a powerful tool for defining molecular structures of autoantigen along evolution.

Acknowledgments

This paper is part of the Ph.D thesis written by Olga Barbosa Cisneros, during her Doctoral studies at the Instituto de Fisiología Celular UNAM, who received a scholarship from CONACYT, registration 92261 (Tutors: Antonio Peña, Jesús Aguirre, Edgard Escamín and Rafael Herrera). This work was financially supported by CONACYT grant 1877-P-M to R. Herrera.

EL AUTOANTÍGENO CENP-B ES UNA PROTEÍNA PRESERVADA DESDE LA ESPECIE HUMANA HASTA LOS VEGETALES SUPERIORES: IDENTIFICACIÓN DEL DOMINIO AMINO-TERMINAL EN EL PHASEOLUS VULGARIS

El centrómero juega un papel clave en la división celular, y el CENP-B es la proteína principal del complejo centromérico. En la esclerodermia se han demostrado la existencia de anticuerpos dirigidos contra el CENP-B. El objetivo primordial de este estudio fue determinar si el CENP-B es una proteína que ha permanecido en la escala filogenética, y especialmente si está todavía presente en los vegetales superiores. Para ello, se extrajeron proteínas del Phaseolus vulgaris y de las células Hep-2 que fueron caracterizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot, y se determinó su reactividad con suero humano que contenía anticuerpos anti-CENP-B. El extremo amino-terminal del gen CENP-B de las células Hep-2 y del Phaseolus vulgaris fue aislado tras la conversión por la transcriptasa y la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos del gen humano CENP-B. Se llevó a cabo una hibridación in situ en los tejidos vegetales y las células Hep-2 con la ayuda de sondas formadas de una secuencia del gen humano CENP-B. Los resultados principales se pueden resumir como sigue: 1) Los sueros humanos conteniendo anti-CENP-B reaccionaron con una proteína vegetal de 80 kDa. 2) Los anticuerpos anti-CENP-B purificados por afinidad reconocieron una proteína del Phaseolus vulgaris cuya masa molecular es muy similar a la del CENP-B humano. Las proteínas CENP-B humanas y vegetales eran inmunológicamente idénticas. 3) Hemos podido amplificar un DNA complementario codificando el dominio amino-terminal del CENP-B del phaseolus vulgaris. El comportamiento electroforético de este DNA era idéntico al del DNA complementario de las células Hep-2. 4) Los oligonucleótidos complementarios de la secuencia humana CENP-B han sido hibridados con una secuencia de DNA del Phaseolus vulgaris. En resumen, la proteína CENP-B ha sido preservada a lo largo de la filogenética, de la especie humana hasta los vegetales superiores.

DAS AUTOANTIGEN CENP-B IST EIN PROTEIN, DAS VOM MENSCHEN BIS ZU DEN HÖHEREN PFLANZEN ERHALTEN BLEIBT: IDENTIFIZIERUNG DES AMINO-TERMINALEN BEREICHS BEI PHASEOLUS VULGARIS

Die Centromeren sind von zentraler Bedeutung für die Zellteilung, und das wichtigste Protein im Centromer-Komplex ist CENP-B. Im Serum von Sklerodermie-Patienten werden gegen CENP-B gerichtete Antikörper beobachtet. Die hier beschriebene Studie befaßte sich vor allem mit der Frage, ob CENP-B durch die Phylogenese hindurch erhalten bleibt und auch bei den höheren Pflanzen vorkommt. Die Proteine, die wir aus Phaseolus vulgaris und Hep-2-Zellen extrahierten, wurden durch Elektrophorese auf Polyacrylamidgel und mit dem Western-Blot charakterisiert. Ihre Reaktionsfähigkeit wurde an Humanserum bestimmt, das Anti-CENP-B-Antikörper enthielt. Das aminoterminal Ende des CENP-B-Gens der Hep-2-Zellen und von Phaseolus vulgaris wurde nach Konversion mit Reverse Transcriptase und Amplifikation durch die Kettenreaktion von Polymerase mit Oligonucleotiden des humanen CENP-B-Gens isoliert. An den pflanzlichen Geweben und den Hep-2-Zellen nahmen wir eine In-situ-Hybridisierung mit Sonden vor. Bei diesen handelte es sich um Sequenzen des humanen CENP-B-Gens. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse: 1) Die Humansenen, die CENP-B-Antigen enthielten, reagierten mit einem pflanzlichen 80-kDa-Protein; 2) die durch Affinität gereinigten CENP-B-Antigene erkannten ein Protein von Phaseolus vulgaris mit einer Molekülmasse ähnlich dem humanen CENP-B, wobei das humane und das pflanzliche CENP-B-Protein immunologisch identisch waren; 3) es konnte eine komplementäre DNA amplifiziert werden, die den auto-terminalen Bereich von CENP-B von Phaseolus vulgaris codierte und sich in der Elektrophorese genau wie die komplementäre DNA der Hep-2-Zellen verhielt; 4) die komplementären Oligonucleotide der humanen CENP-B-Sequenz wurden mit einer DNA-Sequenz von Phaseolus vulgaris hybridisiert. Somit bleibt das Protein CENP-B vom Menschen bis zu den höheren Pflanzen durch die Phylogenese hindurch erhalten.

REFERENCES

1. Earnshaw WC, Mackay A. Role of nonhistone in the chromosomal events of mitosis. *FASEB J* 1994;8: 947-56.
2. Matsumoto H, Masukata H, Muro Y, Okasaki T. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphaoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 1989; 109: 1963-73.
3. Sosa AF, Santoh N, Goldberg I, Earnshaw W. Identification of a subdomain of CENP-B that is necessary and sufficient for localization to the human centromere. *J Cell Biol* 1992; 116: 1081-93.
4. Tan EG, Kodnan G, Garcia I, Maori Y, Fritzler NJ, Pebley C. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibodies and their relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 671-25.
5. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association diagnostic and therapeutic criteria for the classification of systemic sclerosis (Scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
6. Laemmli UK, Faste M. Maturation of the head of bacteriophage T4. DNA packaging events. *J Mol Biol* 1971; 80: 575-99.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

7. Towbin HT, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 76: 4350-5.
8. Marier R, Janse M, Andriole VT. A new method for measuring antibody using radiolabelled protein A in a solid-phase radioimmunoassay. *J Immunol Methods* 1989; 28: 41-9.
9. Roberson PA, Anderson BH, Loviny TLF. Nitrocellulose-bound antigen repeatedly used for the affinity purification of specific polyclonal antibodies for screening DNA expression library. *J Immunol Methods* 1988; 108: 115-22.
10. Earnshaw WC, Sullivan KF, Machin PI, Cooke CA, Kaiser DA, Pollard TD et al. Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *J Cell Biol* 1987; 104: 817-29.
11. Wayne JS, Willard HF. Structure, organization and sequence of alpha satellite DNA from chromosome 17: evidence for evolution by unequal crossing-over and an ancestral pentamer repeat shared with the human X chromosome. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 3156-65.
12. Wiegant J, Raed T, Nedekerf PM, van der Ploeg M, Tanke HJ, Raap K. *In situ* hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 3237-42.
13. Wang AM, Mark DF. Quantitative PCR. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols. A guide to methods and applications*, 1st ed. New York: Academic Press, 1990: 70-5.
14. Agris PF, Parks R, Bowman L, Guenther RH, Kovacs SA, Pelsue S. Plant DNA Topoisomerase I is recognized and inhibited by human ScI-70 sera autoantibodies. *Exp cell Res* 1990; 189: 276-9.
15. Cittero S, Sgorbati S, Levi M, Colombo BM. PCNA and total nuclear protein content as markers of cell proliferation in pea tissue. *J Cell Sci* 1992; 102: 71-8.
16. Rodrigo RM, Rendon MC, Torreblanca J, Garcia-Herdugo G, Moreno F. Characterization and immunolocalization of RNA polymerase I transcription factor UBF with anti-NOR serum in protozoa, higher plant and vertebrate cells. *J Cell Sci* 1992; 103: 1053-63.
17. Mole-Bajer J, Bajer AS, Zinkowski RP, Brinkley BR. Autoantibodies from patients with scleroderma CREST recognized kinetochores of the higher plant *Haemantus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3599-3603.
18. Ellis RJ. Molecular chaperones: The plant connection. *Science* 1990; 250: 954-8.
19. Arora SK, Singh G, Sehgal S. Comparative evaluation of anti-heat shock protein antibodies in SLE and healthy controls. *Scand J Rheumatol* 1995; 24: 160-3.
20. Horsfall AC. Autoantibodies and autoimmune disease: cause or consequence? *Rheumatology Eur* 1995; 24 (Suppl 2): 13-7.



LOCALIZATION OF THE CENTROMERE PROTEIN CENP-B USING SCLERODERMA SERA AND EVIDENCE FOR A ROLE IN CENTROMERE SURVIVAL*

Olga BARBOSA-CISNEROS¹, Esperanza AVALOS-DIAZ¹, Olga VERA², José MORENO², Rafael HERRERA-ESPARZA¹

SUMMARY. - *Objective.* To determine whether centromeric CENP A, B and C proteins play a role in centromere survival. *Methods.* Sixteen anti-centromere sera from scleroderma patients were used. The most common reactivity demonstrated by Western blot was anti-CENP-A, followed by anti-CENP-B and -C, in that order. The reactivity of these sera with HEP-2 cells was studied using an indirect immunofluorescence assay with and without prior digestion by a DNase, *Aspergillus* nuclease and the restriction endonucleases Bam HI, Hind III, and Eco RI. CENP-B was purified using affinity chromatography and anti-CENP-B antibody. The interaction between CENP-B and the CENP-B box was evaluated using immunoprecipitation. Precipitates containing alphaDNA were amplified using a PCR method with specific primers for the CENP-B box. *Results.* None of the nucleases altered the fluorescence pattern. PCR amplification showed that CENP-B adsorbed on a Sepharose-4B/anti-CENP-B antibody column retained alphaDNA satellites. No retention was seen in the absence of CENP-B. *Conclusions.* CENP-B protects alphaDNA from digestion by nucleases and prevents DNase or restriction enzyme digestion from affecting the morphology and location of centromeres. CENP-B may promote and maintain joining of DNA satellites in the centromere.

RÉSUMÉ. - *Mise en évidence de la protéine centromérique CENP-B par des sérums de patients sclérodermiques et arguments en faveur de son rôle dans la survie du centromère.* - *Objectif.* Le but de cette étude était de déterminer si les protéines centromériques CENP A, B et C jouent un rôle dans la survie du centromère. *Méthodes.* Seize sérums de malades sclérodermiques contenant des anti-centromère ont été étudiés par immunofluorescence indirecte sur cellules HEP-2. L'analyse par Western blot a montré que la réactivité la plus fréquente était dirigée contre le CENP-A, suivi du CENP-B puis du CENP-C. L'immunofluorescence indirecte a été réalisée en présence et en l'absence d'ADNase et des enzymes de restriction Bam HI, Hind III ou Eco RI. La protéine CENP-B a été purifiée par chromatographie d'affinité avec un sérum anti-CENP-B. L'interaction entre cette protéine centromérique et la séquence CENP-B a été mise en évidence par immunoprécipitation. Les précipitats contenant de l'alphaADN ont été amplifiés grâce à une amplification génique in vitro (PCR) menée à l'aide d'amorces spécifiques pour la séquence CENP-B. *Résultats.* La digestion par les enzymes de restriction étudiés n'a eu aucun effet sur l'aspect des centromères en immunofluorescence. Le CENP-B contenu dans une colonne d'immunoabsorption Sépharose-4B/anticorps anti-CENP-B a retenu des satellites d'alphaADN, qui ont pu être mis en évidence par amplification génique. En l'ab-

Résumé continued next page

*Department of Immunology, Immunotechnology Unit, CBE, Universidad Autónoma de Zacatecas, México (1) and Centro Médico La Raza and Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México, DF (2)

Address for reprint request: Dr R. Herrera-Esparza, Chepinque 306, Col. Tomas de la Soledad, Zacatecas 98040, México. Fax: 52-522261070. E-mail: herreerarc@cartera.reduaz.mx

Submitted for publication September 12, 1997. Accepted in revised form October 22, 1997

Rev. Rhum. [Engl. Ed.], 1998, 65 (1), 15-20

Rev. Rhum. [Ed. Fr.], 1998, 65 (1), 17-22

Summary end

Résumé end

Key words: CENP-B protein - Sclerodermia - Centromere.

The centromere is a specialized region in the chromosomes of eukaryotic cells that ensures appropriate segregation of chromosomes during mitosis. They are composed by a compact network of heterochromatin containing repeats of satellite DNA that assemble proteins to form the centromere-kinetochore complex. Centromeric DNA is two to three megabases in length [1].

A number of centromere antigens, named CENP (centromeric proteins), INCENP (internal proteins), and MAPS (microtubules associated proteins) [2], have been characterized using sera from patients with scleroderma, especially in its CREST variety (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal motility abnormalities, sclerodactyly, and telangiectasia). The best known CENP protein is CENP-B [3], an 80-kDa protein that binds to a specific 17 bp sequence present in some satellites [4]. This sequence, called the CENP-B box, determines the amount of CENP-B protein in the centromere [5]. Also, CENP-B itself participates actively in the molecular interaction: the amino-terminus of CENP-B is a single 158-residue domain that allows the protein to assemble with centromeric heterochromatin [6].

Studies involving microinjections of anti-CENP-B suggest that assembly of CENP-B with satellite DNA occurs between the S and the G2 phase of the cell cycle [7]. Microinjection of anti-CENP-B into living cells causes an arrest in mitosis at the metaphase, suggesting that interactions between CENP-B and alphaDNA are required for appropriate location of the centromere within the chromosome and for completion of mitosis.

We conducted a series of experiments to determine whether CENP can be demonstrated in cell nuclei in the absence of intact DNA, and whether the alphaDNA-CENP-B interaction is a protective mechanism that plays a role in joining the centromere to the chromosome in the appropriate loca-

tion. We used anticentromere-positive sera from scleroderma patients as molecular probes for immunofluorescence and immunoprecipitation assays followed by CENP-B box PCR amplification.

Mots clés : CENP-B - Sclérodémie - Centromère.

MATERIAL AND METHODS

Sera

Sera from 50 patients fulfilling American College of Rheumatology criteria for scleroderma [8] were studied, as well as negative control sera from 50 healthy subjects. Positive controls for anti-centromere antibodies were kindly provided by Dr. C. Casiano (The Scripps Foundation, La Jolla, CA, USA).

Cell cultures

HEp-2 cells from the American Type Culture Collection (pass number 364) were cultured in Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco). Cells dissociated from confluent cultures using 0.5% trypsin and 1.25 mM EDTA were grown on glass slides until a monolayer was obtained. The cells were then permeabilized with 1% Triton X-100, fixed in cold acetone, and stored at -20°C until use.

Indirect immunofluorescence

HEp-2 cells prepared as described above were used as the antigen source. Sera diluted gradually starting at an initial 1:40 dilution in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, were incubated with the HEp-2 cells for 30 minutes, at room temperature in high humidity. The cells were washed three times for 10 minutes in PBS and incubated for 30 minutes with a 1:80 dilution of goat anti-human immuno-



Fig. 1. Anticentromere reactivity of CREST sera is determined using immunofluorescence (A) and Western blot (B) with HEP-2 cell extracts and anticentromere sera. Left: molecular weight markers (Novagen). 1) 11% SDS-PAGE with HEP-2 cell extracts. 2) Anti-CENP-B (80 kDa). 3) Anti-CENP-A (17 kDa doublet). 4) Anti-CENP-A and -B. 5) Anti-CENP-A, -B, and -C (140 kDa).

globulin (CBL, Amsterdam). After three more washings in PBS, the slides were mounted in glycerol-PBS (9:1) then evaluated by two independent observers under an epifluorescence microscope (Olympus B-Max).

Nuclease digestion

HEp-2 cell monolayers were digested with 0.25% type I DNase or *Aspergillus* nuclease with an activity of 1:10 000 (both from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), or with the restriction endonucleases Eco RI, Bam HI, and Hind III (Promega Biotech). The slides bearing the HEp-2 cell monolayers were incubated with the nucleases for 60 minutes at 37°C, washed three times in PBS, and examined using an indirect fluorescent antibody. Untreated controls and controls digested with trypsin-EDTA 1:250 (Gibco) were included in all experiments. Trypsinized cells were extensively washed, and the cell suspension thus obtained was permeabilized and digested by nucleases as described above, fixed to slides by cytospin, and examined using an indirect immunofluorescent antibody.

Antigen extraction

HEp-2 cells from confluent cultures were extensively washed then resuspended in lysis buffer composed of 1% sodium dodecyl sulfate, 0.25 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM Tris pH 7.5, and 5 mM PMSF. Cell lysates were sonicated five times and centrifuged at 10 000 rpm for 20 minutes. The supernatant was collected and the protein content estimated based on the optical density at 280 nm. Extracts were tested using double diffusion in agar against reference sera. Specificity was determined as described by Ouchterlony [9].

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), Western blot, and autoradiography

Gels containing 11% acrylamide were used. Samples were run under reducing conditions in minigels as described by Laemmli and Favre [10]. Unstained gels were electrotransferred to nitrocellulose sheets as described by Towbin [11]. Transferred proteins were probed with anticentromere-positive sera diluted 1:50 with PTX buffer (0.01 M phosphate, pH 7.5, 0.2% Triton X-100, 0.15 M NaCl, and 1 mM EGTA). Bound antibodies were developed using ¹²⁵I *Staphylococcus aureus* protein A followed by autoradiography with intensifying screens [12]. Positive and negative controls were the same as described above.

AlphaDNA-CENP-B interaction assay

CENP-B was purified from HEp-2 cell extracts using affinity chromatography with an anti-CENP-B Ig linked to a Sepharose 4-B column. Adsorbed CENP-B was incubated overnight with genomic DNA extracted from HEp-2 cells by a mixture of phenol, chloroform, and isopropanol. Negative controls without CENP-B or without DNA templates were also run. After incubation, the CENP-B-DNA mixture was spun at 10 000 rpm. The precipitates were used as templates for PCR amplification with the following oligonucleotides specific for the CENP-B box: upstream, 5' CTTCGTTGGAAACGGGA 3'; downstream, 5' GAAGCAACCTTTGCCCT 3' [13]. PCR products were resolved in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide, and visualized under ultraviolet light.

RESULTS

Antinuclear antibody screening

Sixteen of the 50 scleroderma sera were positive for anti-centromere antibody by indirect immunofluorescence, whereas all the sera from healthy individuals were negative. Specificity of the anticentromere antibodies was determined by Western blot on nitrocellulose sheets bearing proteins transferred from polyacrylamide gels loaded with nuclear extracts. CENP-A, -B, and -C have different molecular weights (17, 80, and 140 kDa, respectively), which allows them to be readily differentiated by Western blot. The most frequent reactivity was anti-CENP-A combined with anti-CENP-B or anti-CENP-C (Figure 1 and Table 1).

Nuclease treatment did not affect fluorescence patterns

The purpose of the experiments involving nuclease digestion was to determine whether the

TABLE I. - Reactivity of anticentromere sera and effect of nuclease digestion on anticentromere titers.

Sera	Titer	DNase	Nuclease	BamHI	Eco RI	Hind III	Trypsin	W blot (kDa)
1	160	160	160	160	160	40	-	17/40-140
2	160	160	160	160	160	80	-	17
3	160	160	80	160	160	40	-	17,80
4	80	80	80	80	80	-	-	17
5	80	80	80	80	80	-	-	17
6	80	80	80	80	80	40	-	17
7	80	80	80	80	80	20	-	17,80
8	40	40	40	40	40	-	-	neg
9	80	80	80	80	80	40	-	17,80
10	80	80	80	80	80	80	-	17
11	80	80	80	50	80	80	-	17
12	80	80	80	80	80	40	-	80
13	80	80	80	80	80	20	-	80
14	160	160	160	80	80	80	-	17
15	160	160	160	80	80	80	-	17
16	320	320	320	320	320	260	-	17

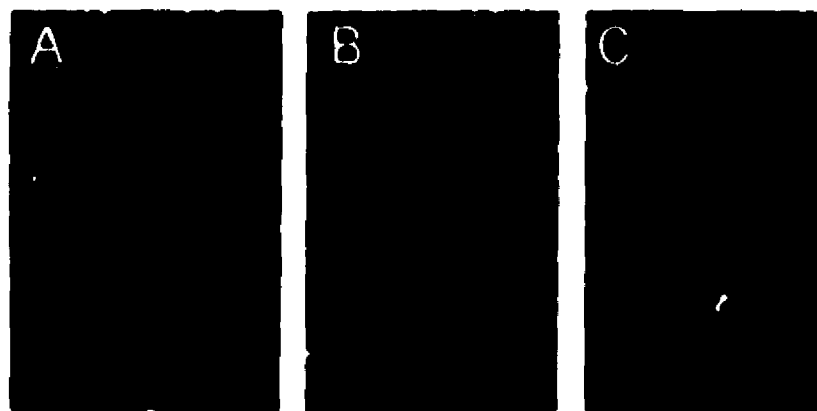


Fig. 2. Anticentromere antibody reactivity by indirect immunofluorescence. A) DNase-digested cells. B) Eco RI-digested cells. C) Trypsin-digested cells.

presence of intact DNA is an important factor in maintenance of the centromeric architecture as evaluated based on the fluorescence pattern observed using a fluorescent anticentromere antibody. No changes in the pattern of fluorescence were seen after exposure to DNase, *Aspergillus* nuclease, or the restriction endonucleases Eco RI or Bam HI. Hind III diminished the anticentromere antibody titer in 80% of the sera (Table I). The effect was the same regardless of the CENP specificity. Exposure of permeabilized HEp-2 cells to DNase or *Aspergillus* nuclease abolished anti-double-stranded DNA reactivity of a serum from a systemic lupus erythematosus patient (data not shown). Nuclease digestion of cell suspensions produced similar effects to those seen with cell monolayers. Trypsin digestion abolished the fluorescence produced by anticentromere antibodies.

AlphaDNA/CENP-B interaction

CENP-B obtained by adsorption on anti-CENP-B was responsible for retention of alphaDNA satel-

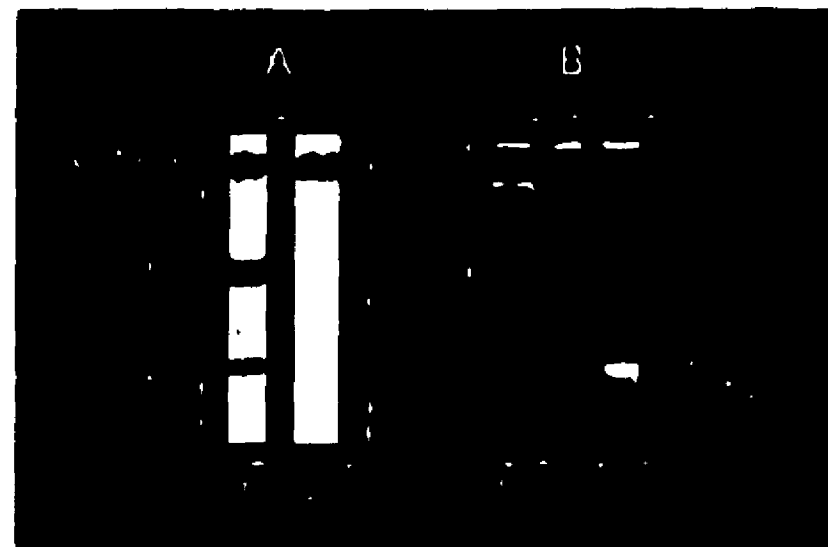


Fig. 3. Lane 1, Immunoprecipitation of CENP-B by anti-CENP-B serum (H= heavy chains; L=light chains). Lane 2 is the CENP-B protein eluted from the immunoadsorbent column using 0.1 M glycine, pH 2.8. B) CENP-box sequences were amplified using PCR with the immunoadsorbent column containing the CENP-B/alphaDNA satellites as the template. PCR products were resolved in agarose gels by ethidium bromide staining. Lane 1: DNA markers. Lane 2: no amplification occurred in the absence of CENP-B. Lane 3: amplification of CENP-box in the presence of CENP-B/alphaDNA templates.

lites. In the presence of CENP-B, PCR amplification using oligonucleotides specific for the CENP-B box amplified a sequence corresponding to alphaDNA (Figure 3). No such amplification occurred in the absence of CENP-B.

DISCUSSION

We found evidence suggesting that CENP plays a role in maintaining the architecture of the centromere. Stable binding of CENP-B to alphaDNA plays a vital role in chromosome segregation during cytokinesis by ensuring that the centromere is appropriately positioned on the chromosome.

Studies of CENP-B/alphaDNA interactions can be expected to shed new light on the mechanisms underlying mitosis, meiosis, and chromosomal abnormalities such as trisomies. In 1987, Wong and Rattner developed the first technique for isolating fractions enriched in centromeric DNA. This technique was based on the poor digestibility of centromeric heterochromatin by *Micrococcus* nuclease [14]. Two years later, Matsumoto et al. took advantage of the same characteristic to clone copies of minor satellites of mouse centromeric DNA [4]. Further studies demonstrated that alphaDNA satellites are composed of 170 bp repeats, and that only 17 bp are required to form the centromere/kinetochore complex. This sequence of 17 bp is called the CENP-box [15]. Two molecules of alphaDNA are needed for the CENP-B/CENP-B box interaction to occur [16].

The apparent strength of CENP-B binding to DNA satellites prompted us to investigate whether a simple indirect immunofluorescence assay is capable of localizing centromere proteins in the nucleus. Nuclease digestion failed to alter the

immunofluorescence pattern produced by antacentromere antibodies, suggesting that centromeric DNA is resistant to nuclease digestion in intact cells. The centromere was undetectable after trypsin digestion. Our in vitro CENP-B/alphaDNA interaction assays and PCR amplification studies confirmed that CENP-B played a role in alphaDNA survival. Our data support the hypothesis put forward by Matsumoto et al. [4] that CENP plays a key role in joining DNA satellites.

Antibody to CENP-B would be expected to result in chromosomal instability, an abnormality that has been reported in patients with scleroderma. However, experimental findings cannot be extrapolated to the clinical situation for the time being, since it is difficult to conceive how autoantibodies located in the extracellular space could come into contact with the chromosomes.

Acknowledgements

Olga Barbosa-Cisneros is a PhD student of the *Programa Doctoral de Ciencias Biomédicas* at the *Instituto de Fisiología Celular*, YNAM and recipient of a scholarship from CONACYT n°92261. This work was supported by CONACYT grant 1877P-M from R. Herrera-Esparza.

PUESTA EN EVIDENCIA DE LA PROTEINA CENTRO- MERICIA CENP-B EN LOS SUEROS DE LOS PACIENTES CON ESCLERODERMIA Y ARGUMENTOS A FAVOR DE SU PAPEL EN LA SUPERVIVENCIA DEL CENTROMERO

Objetivo: El objetivo de este estudio fue determinar si el CENP juega un papel en la supervivencia del centrómero. **Métodos:** Dieciséis sueros de pacientes con esclerodermia positivos para el anticuerpo anticentrómero fueron estudiados por inmunofluorescencia indirecta en células Hep-2. El estudio por Western blot demostró que la reactividad más frecuente estaba dirigida contra el CENP-A, seguida de la del CENP-B y finalmente de la del CENP-C. La inmunofluorescencia indirecta fue llevada a cabo en presencia y en ausencia de ADNasa y de enzimas de restricción Bam HI, Hind III o Eco IR. La proteína CENP-B fue purificada por cromatografía de afinidad con un suero anti CENP-B. La interacción entre esta proteína centromérica y la secuencia CENP-B fue puesta en evidencia por inmunoprecipitación. Los precipitados que contenían el alfa ADN fueron amplificados por PCR con la ayuda de fragmentos específicos para la secuencia CENP-B. **Resultados:** La digestión por los enzimas de restricción utilizados no tuvo ningún efecto sobre el aspecto de los centrómeros en la inmunofluorescencia. El CENP-B contenido en una columna de cromatografía de afinidad con anticuerpos anti CENP-B retuvo los satélites de alfa ADN que pudieron ser puestos en evidencia por PCR. En ausencia de CENP-B la PCR fue negativa. **Conclusiones:** El CENP-B protege al alfa ADN de la digestión por las nucleasas, preservando intacta la estructura y la localización nuclear de los centrómeros. El CENP-B podría favorecer y mantener la unión entre los satélites de ADN en los centrómeros.

NACHWEIS DES ZENTROMERPROTEINS CENP-B MIT SKLERODERMIE-SEREN UND ARGUMENTE FÜR DES- SEN EINFLUSS AUF DIE LEBENSDAUER DES ZENTROMERS

Ziel der Studie: Prüfung, ob CENP die Lebensdauer des Zentromers beeinflusst. **Methoden:** 16 Anti-Zentromeren-Antikörper-positive Sklerodermie-Seren wurden mit indirekter Immunfluoreszenz auf HEp-2-Zellen untersucht. Die Analyse mit dem Western-Blot ergab, daß die meiste Reaktivität in erster Linie gegen CENP-A, in zweiter gegen CENP-B und in dritter gegen CENP-C gerichtet war. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde mit und ohne ADNase und den Restriktionsenzymen Bam HI, Hind III und Eco RI durchgeführt. Das Protein CENP-B wurde mit Affinitätschromatographie mit Anti-CENP-B gereinigt. Die Interaktion zwischen diesem Zentromerprotein und der Sequenz CENP-B wurde durch Immunopräzipitation nachgewiesen. Die Alpha-ADN enthaltenden Präzipitate wurden mit einer Kettenreaktion von Polymerase mit Hilfe von spezifischen Primern für die Sequenz CENP-B amplifiziert. **Ergebnisse:** Die Digestion mit den untersuchten Restriktionsenzymen hatte keine Wirkung auf das Aussehen der Zentromeren in der Immunfluoreszenz. Das in einer Sepharose-4B/Anti-CENP-B-Antikörper-Säule vorhandene CENP-B hielt Satelliten von Alpha-ADN zurück, die dann mit Genamplifikation nachgewiesen werden konnten. Wo kein CENP-B vorhanden war, fiel die Amplifikation negativ aus. **Zusammenfassung:** Die Bindung an CENP-B schützt die Alpha-ADN vor der Digestion durch Nucleasen; auf diese Weise bleibt die Struktur und die Lage der Zentromeren erhalten. Möglicherweise fördert CENP-B die Bindungen zwischen den ADN-Satelliten in den Zentromeren und unterhält sie.

REFERENCES

1. Wevrick R, Willard HF. Long-range organization of tandem arrays of alpha satellite at the centromeres of human chromosomes: high frequency array length polymorphism and meiotic stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9394-8.
2. Tan EM, Rodnan G, Garcia I, Moros Y, Fritzier M, Peebles C. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis: anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 617-25.
3. Earnshaw WC, Rothfield N. Identification of a family of human centromeric proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosome (Berl)* 1985; 91: 313-21.
4. Matsumoto H, Sugimoto K, Okasaki T. Alphoid satellite DNA is tightly associated with centromere antigens in human centromeres throughout the cell cycle. *Exp Cell Res* 1989; 181: 181-96.
5. Willard HF, Wayne JS. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet* 1987; 3: 192-8.
6. Pluta AF, Saitho N, Goldberg I, Earnshaw W. Identification of a subdomain of CENP-B that is necessary and sufficient for localization to the human centromere. *J Cell Biol* 1992; 166: 1081-93.
7. Bernali RL, Delannoy M, Rothfield N, Earnshaw W. Disruption to centromere assembly during interphase inhibits kinetochore morphogenesis and function in mitosis. *Cell* 1991; 66: 1229-38.
8. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association. Diagnostic and therapeutic for the classification of systemic sclerosis scleroderma. *Arthritis Rheum* 1989; 23: 581-90.
9. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis, vol V. In: Kallos P editor. *Progress in allergy*. Basel and New York: Krager, 1958: 1-78.
10. Laemmli UK, Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4 DNA packaging events. *J Mol Biol* 1973; 80: 575-99.
11. Towbin HT, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 76: 4350-5.
12. Marier R, Jansen M, Andriole VT. A new method for measuring antibody using radiolabelled protein A in solid phase radioimmunoassay. *J Immunol Meth* 1989; 28: 41-9.
13. Wayne JS, Willard HF. Structure, organization and sequence of alpha satellite DNA from chromosome 17: evidence for evolution by unequal crossing-over and an ancestral pentamer repeat shared with the human X chromosome. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 156-65.
14. Wong AK, Rattner JB. Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse. *Nucl Acids Res* 1987; 16: 11645-61.
15. Matsumoto H, Masukata H, Muro, Nozaki N, Okasaki T. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 1989; 109: 1963-73.
16. Muro Y, Masumoto H, Yoda K, Nozaki N, Ohasi M. Centromere protein B assembles human centromeric-satellite DNA at 17-pb sequence, CENP-B box. *J Cell Biol* 1992; 116: 585-96.

