

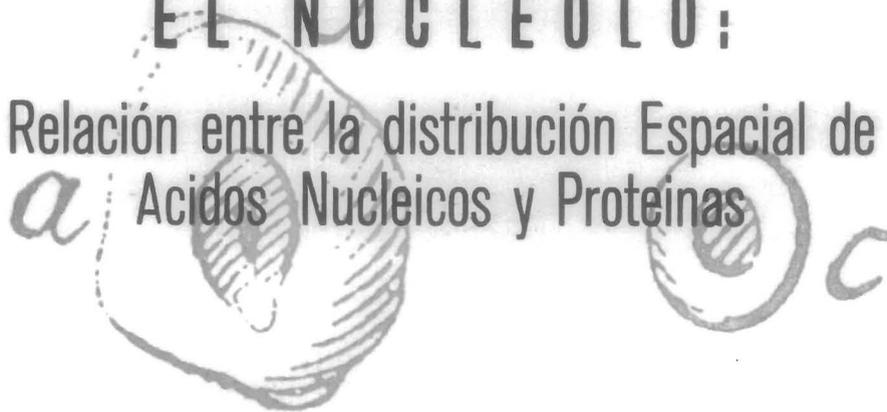
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

*Fig. 10.*

**EL NUCLEOLO:**

Relación entre la distribución Espacial de  
Acidos Nucleicos y Proteínas



**T E S I S**

que para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**  
(BIOLOGIA)

presenta

**LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA**

MEXICO, D. F.

1988

145



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 esta 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.

dedico este trabajo a  
la señora Teresa García Calderón de Jiménez.

A Lourdes.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Harris Busch, jefe del Depto. de Farmacología del Colegio Baylor de Medicina, por haber hecho posible mi estancia en los E.E.U.U. Su entusiasmo, estímulo y apoyo fueron determinantes en la elaboración de esta tesis. Sus comentarios y sugerencias constantes orientaron el desarrollo del trabajo. Sus enseñanzas me ayudaron a comprender la importancia del nucléolo en la fisiología celular.

Al Dr. Robert Lynn Ochs por recibirme con entusiasmo en el laboratorio y por la dirección de la tesis. El me enseñó las técnicas de inmunofluorescencia, inmunomicroscopía electrónica, técnica argéntica para NOR, técnicas de cultivo de células. Por su entusiasmo, apoyo y estímulo para implementar la técnica de hibridación in situ y por las horas dedicadas a la discusión de los diferentes aspectos de la tesis. Sus enseñanzas han sido básicas en mi formación. También por las horas compartidas fuera del laboratorio.

A Mary T. Reilly por su colaboración y asesoramiento en el cultivo de células y manejo general del laboratorio. Sus horas de amistad fuera del laboratorio fueron asimismo, un estímulo para seguir adelante en la tesis.

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin y a la Dra. Olga M. Echeverría M., por haberme apoyado y animado a realizar la tesis en los Estados Unidos y por asesorarme en la misma. Sus enseñanzas me iniciaron en la microscopía electrónica. Al Dr. Vázquez Nin por su asesoramiento en la edición computarizada de la tesis; sus comentarios mejoraron la versión final. La Dra. Echeverría hizo sugerencias fundamentales tanto en forma como en contenido. A ambos, un agradecimiento especial de parte de su discípulo. Su amistad ha sido, además, incondicional.

A los compañeros del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, por su apoyo durante mi estancia en E.E.U.U.

A todo el personal del Depto. de Farmacología del Colegio Baylor de Medicina, por acogerme en un ambiente de trabajo; en especial

Al Dr. Lawrence I. Rothblum por haberme proporcionado, sin limitaciones, las clonas biotinadas de rDNA de rata y por enseñarme la técnica de "nick-translation"; sus comentarios sobre la biología molecular del rDNA de rata fueron punto de partida en la hibridación in situ.

Al Dr. Ram Reddy por facilitarme los genes de rRNA 5S de hámster sirio y por las facilidades prestadas por el laboratorio a su cargo. Por su estímulo.

Al Dr. Karel Smetana, por sus comentarios a la tesis y por mostrarme como hacer la técnica de azul de toluidina para RNA y DNA.

Al Dr. Yong Choi por su colaboración en el aislamiento de los nucléolos y por sus comentarios sobre el rRNA.

A Mrs. Rose K. Busch, por su confianza e impulso en la realización del proyecto de investigación de la tesis.

A Dale Henning por proporcionarme el gene del rRNA 5S de háster sirio.

A los estudiantes de doctorado del Baylor College of Medicine:

Dick Suh por su asesoramiento y colaboración entusiasta en la elaboración de las sondas moleculares del gene de U3snRNA y del rRNA 5S; por enseñarme las técnicas de "nick-translation" y "dot-blot". Asimismo, por las horas dedicadas a la explicación de la arquitectura molecular y función del gene U3snRNA humano.

Gokul Das, por facilitarme el gene del U6snRNA de ratón y por sus explicaciones sobre la estructura y función del gene. Por su asesoramiento en algunas consideraciones teóricas sobre el papel de los UsnRNAs en el procesamiento postranscripcional de los RNAs.

Brandt Cassidy por su estímulo y por facilitarme su tesis con los resultados sobre los elementos de acción cis del espaciador no transcrito del rDNA de rata.

Y. Yuan por compartir conmigo sus resultados no publicados sobre los sitios spl del gene de U3snRNA humano.

Al Subcomité de Becas de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. por su apoyo durante los estudios de posgrado y, en especial, durante la elaboración de la presente tesis.

A los miembros del jurado: Dra. Annie Pardo Semo, Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz, Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco, Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin, Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Dr. Heliodoro Celis Sandoval, por la revisión crítica del escrito

A Adriana Jiménez García, por la revisión de la versión final. Después de su munuciosa revisión al estilo, el trabajo hubiera mejorado sustancialmente pero, por falta de tiempo de mi parte, sólo hice caso de aquello que consideré que cambiaría el sentido de lo que se quería expresar. De cualquier forma, esos cambios le dieron una mejor presentación a la tesis.

A los integrantes del área de Biología Celular de la E.N.E.P. Iztacala, quienes me han invitado a comunicar lo aprendido durante la elaboración de la tesis.

Por último, quiero agradecer especialmente a la P. de Biól. Ma. de Lourdes Segura Valdez que, por su apoyo incondicional, ha sido imprescindible en la elaboración de esta tesis. Ella colaboró en la escritura de las diferentes versiones de la tesis, en la preparación de la figuras, en la búsqueda de referencias y en la preparación para la presentación oral del examen de grado.

La parte experimental de esta tesis se realizó en el Electron Microscopy Laboratory del Department of Pharmacology en el Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston, Texas (U.S.A), de febrero de 1986 a julio de 1987, bajo la dirección del Dr. Robert Lynn Ochs.

La tesis estuvo asesorada por el Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin y por la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), de febrero de 1986 a abril de 1988.

# I N D I C E

|   |    |
|---|----|
| <u>INTRODUCCION</u>   | 1  |
| <u>RESUMEN</u>  | 3  |
| <u>ANTECEDENTES</u>   | 6  |
| ♦ Descubrimiento del nucléolo   | 6  |
| ♦ Primeras observaciones sobre la estructura, composición y comportamiento del nucléolo en el ciclo celular | 7  |
| ♦ Establecimiento de la relación del nucléolo con los cromosomas  | 8  |
| ♦ Caracterización citoquímica y estructural del nucléolo  | 9  |
| ♦ Estudios ultraestructurales del nucléolo  | 10 |
| ♦ Composición molecular del nucléolo y su relación con la biogénesis del ribosoma                           | 11 |
| ♦ Estado actual   | 14 |
| ● Proteínas nucleolares no histónicas   | 16 |
| ■ RNA polimerasa I  | 16 |
| ■ C23   | 17 |
| ■ B23   | 18 |
| ■ Fibrilarina   | 18 |
| ■ DNA topoisomerasa I   | 19 |
| ● rDNA  | 20 |
| ● Nucleologénesis   | 22 |
| ● U3snRNA y sus genes   | 23 |
| <u>MATERIALES Y METODOS</u>   | 26 |
| ♦ Cultivos y líneas celulares   | 26 |
| ♦ Sondas génicas moleculares utilizadas   | 26 |
| ♦ Construcción de sondas génicas moleculares  | 26 |
| ♦ Filtros de nitrocelulosa  | 30 |
| ♦ Digestiones enzimáticas   | 31 |
| ♦ Hibridación molecular <i>in situ</i>  | 31 |
| ♦ Tinción de RNA con azul de toluidina  | 32 |
| ♦ Tinción con plata amoniacal   | 32 |
| ♦ Inmunofluorescencia   | 33 |
| ♦ Estudios con drogas   | 34 |
| ♦ Microscopía electrónica   | 34 |

|  |       |    |
|--|-------|----|
| ◆Inmunomicroscopía electrónica   | ----- | 34 |
| ◆Preparación de cromosomas   | ----- | 34 |
| <u>RESULTADOS</u>  | ----- | 36 |
| ◆Hibridación <i>in situ</i>  | ----- | 36 |
| ●Especificidad de la técnica de hibridación <i>in situ</i>   | ----- | 42 |
| ◆rDNA durante la mitosis   | ----- | 42 |
| ●Distribución de rDNA durante la mitosis por medio de hi<br>bridación <i>in situ</i>   | ----- | 42 |
| ●Distribución de rRNA durante la mitosis   | ----- | 43 |
| ●Localización de proteínas Ag-NOR durante la mitosis   | ----- | 44 |
| ●Localización de fibrilarina durante la mitosis  | ----- | 45 |
| ●Localización de la RNA polimerasa I durante la mitosis  | ---   | 46 |
| ◆Estudios con Actinomicina D   | ----- | 47 |
| ●Efecto de 1µg/ml de Actinomicina D durante 24 hs sobre<br>células PtK <sub>2</sub> en cultivo   | ----- | 47 |
| ●Localización de proteínas-Ag en células PtK <sub>2</sub> tratadas<br>con 1µg/ml de Actinomicina D durante 24 hs   | ----- | 50 |
| ●Inmunofluorescencia sobre células PtK <sub>2</sub> en cultivo, tra<br>tadas con 1µg/ml de Actinomicina D  | ----- | 51 |
| ●Microscopía electrónica, tinción-Ag para microscopía<br>electrónica e inmunomicroscopía electrónica en células<br>PtK <sub>2</sub> en cultivo, tratadas con 1µg/ml de Actinomicina D<br>durante 24 hs | ----- | 52 |
| ●Hibridación molecular <i>in situ</i> con una sonda de rDNA bio<br>tinado de rata, contra células PtK <sub>2</sub> en cultivo, tratadas<br>con 1µg/ml de Actinomicina D durante 24 hs                  | ----- | 54 |
| ◆Localización del gene U3snRNA   | ----- | 55 |
| ●Localización del gene para el U3snRNA en células HeLa en<br>interfase, por medio de hibridación molecular <i>in situ</i>  | ----  | 55 |
| ●Localización del gene para el U3snRNA en células PtK <sub>2</sub> en<br>interfase, por medio de hibridación molecular <i>in situ</i>  | ----  | 58 |
| ●Localización del gene para el U3snRNA en nucléolos aisla<br>dos, por medio de hibridación molecular <i>in situ</i>  | ----- | 60 |
| ●Localización del gene U3snRNA en cromosomas metafásicos<br>humanos, por medio de hibridación molecular <i>in situ</i>   | ----- | 62 |

|   |       |    |
|---|-------|----|
| <u>DISCUSION</u>                        | ----- | 64 |
| ◆ Hibridación <i>in situ</i>            | ----- | 64 |
| ◆ rDNA durante la mitosis               | ----- | 65 |
| ◆ Estudios con Actinomicina D           | ----- | 69 |
| ◆ Localización del gene para el U3snRNA | ----- | 71 |
| <u>CONCLUSIONES</u>                     | ----- | 73 |
| <u>REFERENCIAS</u>                      | ----- | 77 |

## INTRODUCCION

En el Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., se realiza investigación sobre el núcleo celular en interfase desde hace aproximadamente 7 años, como continuación de un grupo de trabajo que se dedica al tema desde 1970. En particular, se analizan aspectos morfológicos de la cromatina y de las partículas ribonucleoproteicas del período interfásico. De esta manera se han sugerido mecanismos funcionales en los procesos transcripcionales y postranscripcionales.

El laboratorio, sin embargo, no cuenta con la metodología moderna en el estudio del nucléolo, que es la estructura ribonucleoproteica más conspicua del núcleo interfásico. Debido a esto, se obtuvo colaboración de parte del Baylor College of Medicine para realizar la presente tesis sobre aspectos nucleolares de actualidad.

En eucariontes, el nucléolo es el sitio de síntesis y procesamiento del precursor ribosómico pre-rRNA 45S y del ensamblaje de ribosomas. Además, es un indicador preciso de estados patológicos determinados. Por ejemplo, en células cancerosas es pleomórfico y de mayor volumen respecto de células normales. En enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y el escleroderma, varios componentes nucleolares son antígenos reconocidos por autoanticuerpos producidos durante el desarrollo de estas enfermedades.

En el Departamento de Farmacología del Baylor College of Medicine, en el Centro Médico de Texas, en Houston, E.U.A., se utiliza al nucléolo como objeto de estudio, con base en la hipótesis de trabajo de que hay diferencias moleculares nucleolares entre células en crecimiento normal y células cancerosas o en otros estados patológicos como algunas enfermedades autoinmunes.

Para llevar a cabo lo anterior, se analiza al nucléolo integralmente, desde los mecanismos que controlan la expresión genética hasta la identificación de lesiones moleculares causadas por carcinógenos, a través de un enfoque que combina técnicas bioquímicas y moleculares modernas, como las técnicas de producción de anticuerpos monoclonales mediante hibridomas y el uso de técnicas de DNA recombinante. Así, se han logrado individualizar algunos de los mecanismos involucrados en el control del ciclo celular y en la expresión genética en células normales y cancerosas. De especial interés son algunas proteínas específicas, como los antígenos nucleares de proliferación celular (PCNA), fosfoproteínas nucleolares y enzimas involucradas en la estructura del DNA nucleolar (topoisomeras I). También se estudian las características bioquímicas y funcionales de tales proteínas, así como la estructura y función de sus genes.

El objetivo general de este grupo de investigación es intentar conocer los mecanismos por los cuales las células

eucariontes regulan la producción de ribosomas, así como aquellos por los cuales el nucléolo se transforma, convirtiéndose en un indicador de malignidad y proliferación celular.

Desde el punto de vista biomédico, ese conocimiento permitiría, en un futuro, el desarrollo de tecnología encaminada a la inmunodiagnosia temprana y a la quimioterapia dirigida a segmentos específicos de moléculas involucradas en las enfermedades mencionadas anteriormente.

La presente tesis se llevó a cabo integrando principalmente la metodología ultraestructural y la molecular. Concretamente, se implementó y adaptó la técnica de hibridación molecular *in situ* para la localización de genes cuyo producto primario de transcripción es nucleolar (DNA ribosómico [rDNA] y genes cuya secuencia contiene la información para el U3snRNA); se analizó la distribución de rDNA durante la mitosis y en relación con proteínas nucleolares específicas; y se analizó la distribución de estos mismos elementos en células tratadas con actinomicina D, es decir, sin actividad transcripcional nucleolar.

El título de la tesis hace referencia a la distribución de genes nucleolares durante la interfase y la mitosis y su relación con proteínas nucleolares específicas que pudieran tener una acción determinante en la regulación de esos genes. De esta forma, el análisis morfológico podría indicar los momentos del ciclo celular en los que la asociación de esas proteínas con el rDNA es determinante en la activación e inactivación de los genes.

Este trabajo representa una contribución morfológico-molecular al estudio de los factores que pudieran estar involucrados en la regulación de la expresión genética en eucariontes.

## RESUMEN

En este trabajo se estudió 1) la distribución de DNA ribosómico (rDNA) y de algunas proteínas nucleolares durante la mitosis, 2) la distribución de esos elementos en células tratadas con dosis altas de actinomicina<sup>A</sup> D (act D) durante tiempos prolongados y 3) la distribución del gene U3snRNA en interfase.

1) Con el objeto de intentar demostrar asociaciones específicas entre rDNA y proteínas nucleolares, se analizó la distribución de genes ribosómicos durante la interfase y la mitosis, en especial durante la nucleologénesis, mediante el uso de una técnica en la que se establecieron las condiciones óptimas para la hibridación molecular *in situ* y la preservación de la morfología celular. Además, a nivel de microscopía de luz se relacionó la localización de rDNA con la distribución de las proteínas nucleolares específicas fibrilarina, RNA polimerasa I (RNA pol I) y la(s) proteína(s) responsable(s) de la tinción de plata para el organizador nucleolar (proteínas Ag-NOR), mediante inmunofluorescencia y tinción Ag-NOR. Estos resultados se compararon posteriormente con la distribución de RNA ribosómico (rRNA), usando la técnica de azul de toluidina alcohólico-ácido.

En interfase, las proteínas nucleolares se localizan en todo el nucléolo, en tanto que el rDNA se observa en un área restringida dentro del mismo. En profase, las proteínas nucleolares tienden a disminuir en cantidad y a quedar distribuidas en zonas similares a las que presentan rDNA. Durante la metafase y anafase, se observa que aproximadamente la mitad de los sitios para rDNA (3 de los 6 NORs que se detectan en la rata mediante hibridación *in situ*) se tiñen con plata y presentan RNA pol I. Debido a esto, se concluye que la hibridación *in situ* detecta todos los NORs, mientras que la tinción-Ag y la inmunofluorescencia para RNA pol I sólo detectan NORs "activos". En telofase, el rDNA y las proteínas nucleolares constituyen un juego de cuerpos prenucleolares (PNBs) que aquí se denominan cuerpos prenucleolares-región del organizador nucleolar (NOR-PNBs) puesto que representan el sitio real de formación del nucléolo. Otros PNBs numerosos son de tamaño más pequeño y no contienen cantidades detectables de rDNA ni de RNA pol I. Se concluye que la reconstrucción del nucléolo tiene su origen en sitios específicos de telofase, *i.e.* NOR-PNBs, los cuales contienen la mayoría, o todo, el rDNA y la RNA pol I. De hecho, estos sitios corresponden a los NORs y dan lugar a nucléolos interfásicos.

2) Para conocer si alguno de los elementos del nucléolo inactivado experimentalmente, contiene los mismos componentes moleculares que los NOR-PNBs y representa la maquinaria transcripcional básica, se utilizó act D.

El tratamiento de células PtK<sub>2</sub> con 1.0 µg/ml de act D durante

24 h, promovió la formación de células interfásicas con 2 cuerpos nucleares redondos y cercanos entre sí, analizables con microscopía de contraste de fases. La tinción Ag-NOR en estas células demostró el origen nucleolar de esos cuerpos. Uno se tiñó muy densamente y el otro mostró sólo un punto central con un halo claro alrededor. Este último se llamó "tiro al blanco"

La inmunofluorescencia en estas células, con anticuerpos contra las proteínas fibrilarina y RNA pol I, seguida con tinción Ag-NOR sobre las mismas células, mostró que la fibrilarina estaba presente principalmente en el cuerpo denso teñido con Ag y en cantidades menores en el "tiro al blanco". La RNA pol estaba presente en pequeñas cantidades sólo en el cuerpo denso.

Mediante microscopía electrónica (ME), tinción-Ag para ME e inmunomicroscopía electrónica, los dos cuerpos pueden ser distinguidos. Uno aparece como una masa fibrogranular redonda / densa, teñida muy intensamente con plata y conteniendo la mayoría de la fibrilarina y toda la RNA pol I. El otro cuerpo también es redondo y contiene un cuerpo central pequeño que se tiñe con Ag y contiene fibrilarina. La técnica de hibridación molecular *in situ*, utilizando un fragmento de DNA clonado, demostró que el cuerpo denso que contiene fibrilarina y RNA pol I, también contiene al rDNA.

Por lo anterior se concluye que la act D separa la maquinaria de transcripción nucleolar, la cual consiste de rDNA y proteínas asociadas, del resto de los componentes nucleolares. Como las células Ptk<sub>2</sub> tienen sólo un NOR cromosómico, el cuerpo denso de células tratadas con la droga puede ser una estructura interfásica de tipo NOR.

3) Para determinar si la mayoría de los genes cuyo producto de transcripción es nucleolar, se localizan en un mismo compartimiento celular, se ha examinado la distribución de los genes para los U3snRNA y rRNA 5S, por medio de hibridación molecular *in situ* sobre células interfásicas, usando fragmentos biotinados de DNAs clonados.

El uso de un fragmento de DNA *Hinf* I, que incluía las regiones "upstream", codificante y "downstream" del gene humano U3snRNA, mostró la señal de hibridación en asociación con los nucléolos, en células HeLa y Ptk<sub>2</sub>. La digestión previa con DNasa, pero no con RNasa, eliminó la marca.

Debido a que el fragmento *Hinf* I puede hibridar potencialmente con el U3snRNA, así como con su DNA, se construyó una sonda que incluía la región flanqueadora "upstream" que sólo podría hibridar con el DNA. Esta sonda sólo produjo señal en nucléolos interfásicos y se eliminó con DNasa pero no con RNasa.

Finalmente, se construyó una sonda biotinada de U3snRNA y la marca se encontró en el nucléolo.

Los resultados sugieren que, a nivel de microscopía de luz, los genes para el U3snRNA están asociados estrechamente con el nucléolo interfásico. La hibridación *in situ* en nucléolos aislados, confirmaron lo antedicho.

Se obtuvieron resultados similares con una sonda que detectaba

los genes para el 5S rRNA. La sonda incluía la región codificante.

Quizá es una característica común que los genes esenciales para la función nucleolar estén yuxtapuestos en regiones del nucleoplasma muy cercanas al nucléolo. No se conoce si estos genes están dentro, rodeando o solo asociados con el nucléolo.

Se concluye que los PNBs no contienen rDNA, que de los elementos nucleolares sólo la RNA pol I y el rDNA se mantienen asociados en estados de inactividad nucleolar total y que el gene U3snRNA está asociado con el nucléolo. Los resultados sugieren que la reconstrucción nucleolar ocurre a partir de los "NOR-PNBs", que la diferencia entre el número de NORs y centros fibrilares (FCs) en una misma especie se debe a que no todos los Fcs contienen rDNA, y que puede haber una coexistencia espacial de elementos genéticos cuyo producto de transcripción es nucleolar.

## Antecedentes

### Descubrimiento del nucléolo.

John R. Baker ha sugerido que quizás fué M.D. Roffredi en 1775 quien primero publicó ilustraciones del nucléolo, pues este autor señaló la presencia de "manchas" dentro de algunos de los núcleos de los ovocitos de *Rhabditis* (4,5) (el término núcleo, sin embargo, no fué introducido en la terminología celular hasta 1831 por Robert Brown (15), aunque Leuwenhoek [sic] sí los observó desde 1770 (86)).

A pesar de lo anterior, generalmente se atribuye a Felice Fontana el descubrimiento del nucléolo en 1781, al estudiar los núcleos de las células epiteliales de recubrimiento de la pared corporal de las anguilas (4). El describió al nucléolo como "...un corps oviforme, pourvu d'une tache en son milieu..." ("un cuerpo oviforme [el núcleo], con una mancha [el nucléolo] en su centro...") (50) (Figura 1.).

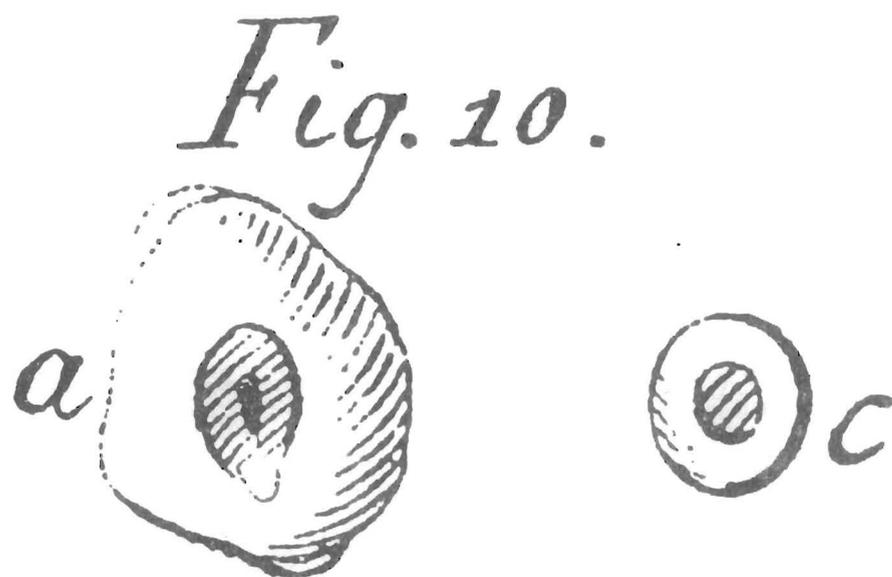


Figura 1. Primera ilustración del nucléolo, debida a Felice Fontana en 1781. El nucléolo es la mancha oscura más interna en *a*; corresponde a una célula epitelial de anguila; *c* es un eritrocito también de anguila (toma do de Schwarzacher y Wachtler, 1983).

La presencia del nucléolo en los núcleos de las células se fué haciendo una observación común durante los años que siguieron a 1775. Se asignaron varios nombres al nucléolo. El término nucléolo (diminutivo de núcleo, del latín *nucleus*, *nux*, que significa nuez, almendra o médula), fué introducido por Valentin

desde 1836 (106). Posteriormente, Schleiden y Schwann en 1838 le llamaron "Kernchen" y "Kernkörperchen" respectivamente (106), aunque esos nombres no perduraron.

Primeras observaciones sobre la estructura, composición y comportamiento del nucléolo en el ciclo celular.

Fenómenos tales como la "desaparición" del nucléolo en células en división, fueron observados por primera vez en 1849 por De Quatrefage en células meióticas del gusano *Teredo* (36). Leydig en 1852 describió a su vez las "vacuolas" dentro del nucléolo de óvulos de *Synapta digitata*, iniciando las descripciones detalladas del organelo (106).

Aún cuando sus reportes eran dispersos y escasos, el nucléolo fue reconocido como una estructura celular regular dentro del núcleo, mucho antes de que Montgomery en 1898 hiciera la primera gran revisión del tema (106).

En su revisión, Montgomery recopila información sobre la descripción cualitativa y cuantitativa de nucléolos en una gran cantidad de especies animales y vegetales. Menciona que para entonces, se habían descrito movimientos nucleolares y variaciones de tamaño durante el ciclo celular. También se habían hecho descripciones detalladas de la desaparición del nucléolo, como la que realizó Hertwig en 1878, donde señala que el nucléolo se disgrega en componentes largos y delgados y en componentes granulares durante la profase de *Asteracanthium*. Por otro lado, Flemming había postulado en 1882 que el nucléolo no estaba rodeado por una membrana. El había supuesto que las vacuolas del nucléolo estaban llenas con algún líquido y demostrado que la sustancia nucleolar era diferente de la de la cromatina. Por su parte, Fol en 1883 describió en *Ciona intestinalis* un nucléolo grande y muy refractivo, con un gran número de vacuolas y cuya sustancia debería ser químicamente heterogénea, puesto que se teñía desigualmente con los colorantes utilizados.

Pfitzer en 1883 describió la asociación de sustancias nucleolares con los cromosomas durante la mitosis. En un intento por caracterizar esas sustancias, Hertwig en 1884 realizó tinciones que le permitieron afirmar que el nucléolo en reposo consistía de una nucleína intensamente teñible y una paranucleína tenue, cuando se usaban colorantes para núcleos.

Rabl realizó observaciones en 1885, que indicaban que en la profase, el nucléolo se desvanece gradualmente y toma parte en la producción de las hebras de cromatina. McMallum en 1895 también describió la asociación de restos nucleolares con los filamentos cromosómicos. Dos años después, Carnoy y Lebrun observaron que los nucléolos se desarrollaban de esas mismas hebras cromatínicas y que ocasionalmente los nucléolos se fusionaban.

En 1887, Schwarz estudió la citoquímica de las plantas y estableció que el núcleo constaba de cromatina, pirenina (sustancia nucleolar), anfipirenina (sustancia de la membrana celular), linina (fibras acromáticas) y paranilina (jugo

nuclear).

Las investigaciones anteriores permitieron a Mann en 1892, proponer que el nucléolo estaría compuesto de 1) una membrana delgada desteñida, 2) numerosos endonucleolos periféricos, 3) una capa sin estructura, 4) una corona de endonucleolos y 5) un endonucleolo grande y central.

Esta primera etapa de investigación del nucléolo se caracterizó principalmente por la descripción de su morfología y de su comportamiento durante la división celular.

#### Establecimiento de la relación del nucléolo con los cromosomas.

Los estudios posteriores se centraron en la relación del nucléolo con los cromosomas. Como ya se mencionó, varios autores habían señalado la asociación de residuos del nucléolo con filamentos de cromatina durante la división de la célula. Sin embargo, De Mol fue quien primero observó, en 1927, que había correlación entre el número máximo de nucléolos y el número de complementos monoploides en la planta *Hyacinthus orientalis*. Sugirió también que debería de haber una relación numérica entre las constricciones secundarias y los nucléolos y, aunque encontró esa relación, no le dió importancia (citado en 99).

La demostración de que los nucléolos son productos de la actividad genética, es decir, se forman por la actividad de regiones cromosómicas precisas, ocurrió poco después.

Emil Heitz en 1930 (67), trabajando con células vegetales y utilizando la reacción de Feulgen para DNA, señaló que el nucléolo se originaba durante la telofase, a partir de los pedúnculos (constricciones secundarias) de los cromosomas satélites. El número y tamaño del nucléolo, dependía del número de cromosomas satélites. Como las constricciones secundarias no se teñían con la reacción de Feulgen, él llamó cromosomas-SAT (*sine acido thymonucleinico*) a aquellos cromosomas con satélites. En su artículo original escribió, "*Die Nukleolen entstehen unterhalb des Trabanten am (am, nicht aus!) Trabantenchromosom...*" ("los nucléolos se forman por debajo de los satélites, en (y no a partir de) los cromosomas con satélites) y que "...*Die Entstehung des Nukleolus am achromatischen Stück des SAT-Chromosoms konnte bei Vicia faba mit Hilfe der Nuklealreaktion...*" ("...la formación de los nucléolos en la pieza acromática de los cromosomas-SAT pudo ser mostrada directamente en *Vicia faba* por medio de la reacción nuclear (Feulgen)...").

En 1934, el estudio de las microsporas de *Zea mays* en profase meiótica, llevó a Bárbara McClintock al descubrimiento de que no es a partir de las constricciones secundarias que el nucléolo se forma en telofase, sino a partir de un cuerpo adyacente al que ella denominó como cuerpo organizador del nucléolo: "...*it is the purpose of this paper to indicate that the nucleolus originates not from the stalk or the secondary constriction but from an organized body in the chromosome directly adjacent to the stalk of the satellite*". Observó que en maíz, el cromosoma 6 era el

portador de ese cuerpo (99).

En esta misma época, McCarty y Haumeder realizaron estudios en los que encontraron correlación entre el tamaño del nucléolo y estados patológicos asociados al cáncer, es decir, a estados de proliferación celular anormal. En 1934, observaron que el nucléolo de células tumorales era de mucho mayor tamaño que el de células normales y postularon su participación en la función proliferativa (98). Actualmente se conoce que el volumen nucleolar es indicador de actividad celular; el volumen nucleolar total es el parámetro morfológico relacionado con la actividad transcripcional del nucléolo (síntesis de pre-rRNA, como se verá más adelante) (163a).

### Caracterización citoquímica y estructural del nucléolo.

El papel preciso del nucléolo en el crecimiento celular fué comprendiéndose cuando se empezaron a caracterizar sus componentes químicos. En 1940, Caspersson y Schultz (22) usaron técnicas espectrofotométricas y concluyeron que, tanto el nucléolo como el citoplasma, eran ricos en RNA. El mismo año, Brachet utilizó digestiones con RNasa sobre ovocitos de anfibio y señaló que, en células con gran actividad de síntesis de proteínas, el nucléolo y el citoplasma eran ricos en RNA. La enzima eliminaba esos componentes, por lo cual no se teñían posteriormente (11,12). Para 1950, Caspersson estableció que hay una relación directa entre el tamaño del nucléolo y los niveles de síntesis de RNA y proteínas (23). Y en 1954, Lettré y Siebs pudieron detectar fibras de DNA dentro del nucléolo, utilizando la técnica de Feulgen (citado en 21).

Otros autores, desde tiempo antes, describían con el microscopio de luz los elementos estructurales del nucléolo. En 1899, Ruzicka encuentra cuerpos intranucleares teñidos densamente con plata cuando combinaba la tinción con azul de toluidina e impregnación argéntica sucesivamente (citado en 88). Más tarde, el desarrollo de la técnica argéntica en neurohistología, permitió también el estudio del nucléolo. Según Schwarzacher (145), Cajal hizo descripciones detalladas de los nucléolos de células nerviosas en 1903 y 1910. Cajal observó, señala, que en el nucléolo había gránulos intensamente teñidos, espacios sin teñir y a veces, una red de material positivo a la plata.

Hasta 1951 fué cuando los investigadores uruguayos Estable y Sotelo (47), utilizando una técnica argéntica en varios tipos celulares, describen una estructura en forma de hilo dentro de los nucléolos interfásicos. Ellos llamaron nucleolonema a esa estructura y la describieron asociada a los cromosomas durante la mitosis, y reagrupada en los organizadores nucleolares en la telofase. Estable y Sotelo concluyeron en su trabajo que "... todo nucléolo verdadero (Feulgen negativo) está compuesto de dos partes, una de estructura microscópicamente perceptible y la otra homogénea, hallándose aquella en la interfase celular incluida en ésta. La primera es siempre la más importante y por tratarse

*de una estructura filamentososa, la designamos nucleolonema o carilionema; a la segunda la llamamos pars amorfa* ".

En 1955, Vincent realizó la segunda gran revisión bibliográfica sobre el nucléolo, en la que resume la información obtenida en la primera mitad del siglo XX (164).

Hasta entonces, se había establecido la constancia del nucléolo en los núcleos de las células, su comportamiento cíclico de "desaparición" y "reaparición" durante la mitosis y sus variaciones en tamaño y características tintóreas. El uso de la histoquímica había permitido reconocer la presencia de ácidos nucleicos, proteínas (algunas enzimas), lípidos y minerales en el nucléolo. Se sabía que el nucléolo se hipertrofia en células con actividad anabólica y se reduce en células en actividad catabólica. También se había sugerido que, debido a que el nucléolo contiene compuestos cuya distribución es predominantemente citoplásmica, debería estar relacionado funcionalmente con las actividades del citoplasma. Así, el nucléolo se consideraba como parte importante en la actividad sintética de la célula.

Debido por un lado a la distribución citoplásmica y nucleolar del RNA, y por otro a la semejanza de esta molécula con el DNA, se pensó que el nucléolo podría actuar de alguna manera como mediador entre la actividad genética del núcleo y la expresión de esa actividad en el citoplasma.

#### Estudios ultraestructurales del nucléolo.

El primer estudio ultraestructural del nucléolo se debe a Borysko y Bang en 1951 (7). Aunque ya habían sido publicados trabajos con el microscopio electrónico en donde se señala la presencia de nucléolo en el núcleo, estos autores fueron los primeros en señalar una estructura filamentososa, inmersa en una matriz homogénea y amorfa del nucléolo. En 1952, Bernhard y col. corroboraron ese tipo de filamentos en el interior del nucléolo (6). Ya para 1963 se conocía que el nucléolo estaba constituido por dos estructuras diferentes, es decir, los elementos fibrilares de 80 a 100 A de espesor y los gránulos de entre 150 y 200 A de diámetro. En este año, Marinozzi y Bernhard, usando digestiones enzimáticas en cortes ultradelgados para microscopía electrónica, demostraron que ambos componentes nucleolares son de naturaleza ribonucleoproteica (96). El mismo año, Marinozzi describe que los granos y fibras ricos en RNA están inmersos en una matriz proteica (95). Porter en 1954 había señalado la similitud entre los entonces llamados "gránulos de Palade" (ribosomas) y un componente granular del nucléolo, en lo que se refiere a su tamaño y composición (102). Posteriormente, Gall y Swift encontraron lo mismo (102,160).

El desarrollo de la técnica autorradiográfica para microscopía electrónica, después de pulsos cortos con RNA marcado con tritio, llevó a La Cour y Crawley en 1964, a establecer que en meristemos radicales, la síntesis inicial de

RNA en el nucléolo ocurría en la región fibrilar, concretamente en el nucleolonema (82). En 1965, Granboulan y Granboulan encontraron que la incorporación de RNA marcado ocurría primero en la zona fibrilar del nucléolo y que después migraba a la región granular (59).

En 1969 se describe otro componente estructural del nucléolo. Recher y col. encontraron unos espacios de bajo contraste electrónico, formado por una red laxa de fibrillas con un diámetro de 40 a 80 Å. Esos espacios fueron llamados centros fibrilares (FCs) (130).

#### Composición molecular del nucléolo y su relación con la biogénesis del ribosoma

El desarrollo de técnicas bioquímicas y moleculares permitieron establecer una correlación entre la estructura, la composición y la función de los elementos nucleolares.

La primera indicación realmente válida de que el nucléolo estaba involucrado en la producción del RNA estable de los ribosomas ocurrió en 1959. Woods y Taylor usaron autorradiografía con  $^3\text{H}$ -citidina y observaron que la marca aparecía primero en el RNA nucleolar y después en el rRNA del citoplasma. Es decir, había una migración del rRNA del nucléolo al citoplasma (citado en 102).

Perry y col. en 1960 y 1961 (123, citado en 125) aportaron pruebas más certeras sobre este problema. Utilizando irradiación con un microrayo de luz ultravioleta sobre el nucléolo de células HeLa, observaron que no se producían casi dos terceras partes del rRNA citoplásmico. Edström y col. en 1961 acumularon más pruebas sobre el origen nucleolar del rRNA (42). Usaron técnicas de microdissección y de microelectroforesis y mostraron que la composición de bases nitrogenadas del RNA nucleolar era la misma que la del RNA citoplásmico, pero era diferente de otros RNAs, es decir, era rRNA.

Por otro lado, Birnstiel y col. en 1964, demostraron que la secuencia de aminoácidos de las proteínas nucleolares era similar a la de algunas proteínas del ribosoma (citado en 102).

Por esa época también se estableció la existencia de un precursor molecular del rRNA, más largo que los rRNAs 18S y 28S, y la existencia de redundancia de los genes que los originaban, así como su localización en los NORs.

Perry en 1962 fué quien aportó evidencias de la existencia de un precursor a partir del cual se originaban los rRNAs 18S y 28S. Mediante autorradiografía y estudios de sedimentación en células tratadas con actinomicina D, encontró que una parte del RNA nucleolar de marcado rápido, sedimentaba antes que los rRNAs citoplásmicos más pesados (124).

Posteriormente, Scheerer y col. reportaron la presencia de una molécula larga, precursora del rRNA (pre-rRNA) en células HeLa. Este precursor sedimentaba en 45S y producía derivados de 35S rRNAs (143).

Weinberg y col. en 1967, usando geles de electroforesis, detallaron el proceso de conversión del pre-rRNA 45S en los rRNAs 18S y 28S en nucléolos aislados (102). Esto se debió en gran parte al desarrollo de una técnica estándar y rutinaria para el aislamiento de los nucléolos en 1963 (110), con la cual Busch y col. iniciaron una nueva etapa en la investigación nucleolar, que abarca el análisis molecular de este organelo.

Por otro lado, Granboulan y Scheerer en 1969 lograron finalmente observar las moléculas precursoras y derivadas del pre-rRNA, por medio de microscopía electrónica, estableciendo que en el procesamiento ocurren cambios de longitud de la cadena de RNA (102).

Otros estudios mostraron posteriormente la redundancia del gene para los rRNAs 18S y 28S. A través de experimentos de hibridación, Chipchase y Birnstiel en 1963, establecieron que del total del DNA celular, aproximadamente el 0.3% era rDNA (102). McConkey y Hopkins en 1964 encontraron que en células HeLa se presentaban 400 copias del gene para el rRNA 28S y que estas secuencias eran abundantes en fracciones nucleolares (100,137).

Brown y Gurdon habían ya establecido en 1964, que los embriones mutantes anucleolados de *Xenopus laevis* no producían ningún tipo de rRNA pero sí mRNA (14). Rittosa y col. y Birnstiel y col. en 1966 encontraron además una correlación grande entre el número de NORs y las secuencias de rDNA, por medio de experimentos de hibridación (137,8).

También en 1966, Birnstiel y col. lograron aislar el DNA puro que producía los rRNA 18S y 28S, a través de gradientes de densidad (8). Brown y Weber y Birnstiel y col. en 1968 (16,9), utilizando fragmentos de rDNA de diferentes pesos moleculares, colocándolos con rRNAs 18S y 28S y determinando la hibridación de las moléculas, demostraron que las secuencias de esos rRNAs se unían a un DNA de cierta longitud; cuando usaban fragmentos muy cortos, no se unían, pero a cierto tamaño, ambas moléculas sí formaban híbridos con el DNA. Esto llevó a la conclusión de que los dos segmentos genéticos estaban colocados alternadamente y que el producto de ambos estaba contenido en el precursor 45S pre-rRNA.

Un año antes, Knight y Darnell encontraron que en la subunidad grande del ribosoma, se encontraba una molécula de rRNA de 5S, unida por puentes de hidrógeno a la molécula del 28S rRNA (80). Pero Brown y Weber en 1968 demostraron que el gene para el 5S rRNA no estaba unido al rDNA en *Xenopus* (16).

Pardue y col. en 1973, habían demostrado la presencia de esos genes, cuyo número de copias es de casi 20 000, en los telómeros de los brazos largos de casi todos los cromosomas de *Xenopus*, por medio de hibridación *in situ* (121). Por otro lado, Prenskey y col. en 1973 y Cockburn y col. en 1976, encontraron que en *Dictyostelium* y *Saccharomyces*, esos genes se localizaban en el espaciador de la molécula del rDNA (citado en 102).

A pesar de que la cantidad de rRNA 5S está en proporción 1:1 con el rRNA 28S en el ribosoma, se ha encontrado que su síntesis no está coordinada (citado en 102).

La visualización de los genes ribosómicos con el microscopio electrónico fué posible gracias a la técnica de extendidos moleculares ideada por Miller y Beatty en 1969 (101). Ellos encontraron que el componente exterior del nucléolo era de naturaleza granular y que el interior, al ser extendido, estaba formado por hebras de DNA altamente repetitivo, con zonas de actividad grande, en donde cada unidad repetida estaba separada de los genes adyacentes por un segmento espaciador inactivo de longitud variable. Adosados a la hebra activa, se encontraban hebras de RNA formando un gradiente de longitudes que le confería el aspecto de un "árbol de Navidad". Las hebras de DNA activas estaban a su vez cubiertas por hileras de RNA polimerasa.

La arquitectura molecular del gene rDNA comenzó a describirse como una serie de unidades repetitivas, en hilera, las cuales consistían de un gene para rRNA y un espaciador no transcrito (NTS). Cada gene de rDNA consistía de 3 regiones transcripibles: la de los rRNAs 18S, 28S y 5.8S. Este último rRNA había sido descubierto por Fene y col. en 1968, en unión con el rRNA 28S (62). Speirs y Birnstiel en 1974, determinaron que el gene para 5.8S se localizaba entre los segmentos génicos cuya secuencia contenía codificada la información para la producción de los rRNAs 18S y 28S (153). Busch y Rothblum en 1982 y Hadjiolov en 1985, realizaron una amplia revisión bibliográfica del tema rDNA, en donde detallan el conocimiento molecular fino del gene y su relación con la biogénesis del ribosoma en eucariontes (20,61).

Los resultados de las investigaciones nucleolares mencionadas hasta el año de 1970, habían sido detalladas por Harris Busch y Karel Smetana en la tercera y más amplia revisión del tema hasta ese momento (21). Esta monografía extensa constituye actualmente un escrito clásico dentro de la investigación del nucléolo.

Hasta entonces, se había establecido ya que el nucléolo es el sitio de mayor producción de RNA en la célula (del 80 al 90%) y que en él se dan los procesos básicos de la formación del ribosoma; que el número de NORs es característico de cada especie; que debido a su diferencia morfológica entre células cancerosas y normales, pudiera ser responsable de la producción de elementos anormales que afectan la respuesta de las células a estímulos externos e internos. También se habían localizado actividades enzimáticas como la NAD sintetasa y la RNA polimerasa en el nucléolo. Ultraestructuralmente se conocían los elementos del nucléolo y, desde el punto de vista molecular, se conocía la composición principal de este organelo.

De 1970 a la fecha, el avance sigue siendo paralelo entre la morfología y la composición molecular del nucléolo, pero a mayor velocidad con respecto a períodos previos debido al uso de técnicas modernas de inmunolocalización ultraestructural, autorradiografía ultraestructural de alta resolución, genética molecular y bioquímica de ácidos nucleicos y proteínas.

Existen varias revisiones bibliográficas actuales sobre el nucléolo, tanto de tipo ultraestructural (21,48,54,55,57,77,102,150) como molecular (17,20,21,61,77,102,125), que permiten tener el panorama reciente sobre el tema descrito en la siguiente sección

y que se pretende resumir en la Figura 2. Además, la investigación nucleolar actual cuenta con un foro de discusión internacional a través del European Nucleolar Workshop, que se celebra en un país europeo cada 2 años y que, la mayoría de las veces, resulta en la publicación de una revisión conjunta sobre el tema, elaborada por especialistas.

### Estado actual.

El nucléolo puede ser considerado el componente ribonucleoproteico (RNP) más complejo y altamente ordenado en eucariontes. Sus constituyentes moleculares están distribuidos en dominios ultraestructurales bien definidos, en tal forma que llevan a cabo secuencialmente los eventos de síntesis y procesamiento del pre-rRNA y el ensamblaje de partículas prerribosómicas (21, 61). Morfológicamente, el nucléolo está compuesto de los centros fibrilares (FCs), la región fibrilar densa (DFR) y la región granular (G) (55). Los FCs son regiones transparentes a los electrones cuando se observan con las técnicas habituales para microscopía electrónica, que contienen fibras de aproximadamente 50 Å de espesor, como los organizadores nucleolares (NORs) (74,104). Contienen los genes ribosómicos (rDNA 18S, 5.8S, 28S) (1), RNA polimerasa I (97,142), las proteínas del organizador nucleolar teñidas con plata (proteínas Ag-NOR) (10,48,57,69,70,151), así como las proteínas nucleolares principales fibrilarina (114), y la fosfoproteína C23 (45,151), y representan quizá el sitio donde ocurre la transcripción muy temprana del pre-rRNA (162). La DFR está compuesta de fibras muy abundantes de 40 a 80 Å de espesor. También contiene proteínas Ag-NOR (48,69,151), fibrilarina (114) y las fosfoproteínas C23 (45,151) y B23 (151) y pueden ser el sitio donde tiene lugar la actividad transcripcional más abundante y el procesamiento temprano del pre-rRNA (61,120). La G es una zona de gránulos de 150 a 200 Å de diámetro. Es abundante en la fosfoproteína B23 (151) y productos intermedios del procesamiento del precursor pre-rRNA; representa el sitio de procesamiento más tardío, maduración y almacenamiento de prerribosomas (69). La región fibrogranular (F) o nucleolonema, es una zona donde se mezclan las fibras de 40 a 80 Å de espesor y 200 a 400 Å de longitud, con los gránulos de 150 a 200 Å de diámetro. Su distribución es similar a la de la proteína fibrilarina en células PtK<sub>2</sub> (114). La cromatina perinucleolar (PNC) no es un constituyente nucleolar propiamente dicho. Es una cubierta de cromatina que rodea al nucléolo y que ocasionalmente penetra en éste, a través de fibras delgadas que quizá tienen conexión con los centros fibrilares (55). Se podría considerar como un tipo especial de cromatina en donde se localizan los genes que intervienen en el funcionamiento nucleolar.

### Proteínas nucleolares no histónicas.

De acuerdo con Busch, en el nucléolo hay más de 400 proteínas (19). Gracias al descubrimiento de una técnica para el aislamiento de nucléolos (110), Orrick y col. pudieron fraccionar este componente nuclear y analizar sus proteínas por medio de geles bidimensionales (119). Encontraron que en células de hígado normal de rata y en células del hepatoma de Novikoff, el nucléolo contenía 47 proteínas. Dividieron el gel bidimensional en tres regiones (A,B,C) y los componentes de cada zona fueron numerados en orden decreciente de movilidad en las dos dimensiones.

Posteriormente, Olson y col. determinaron el grado de fosforilación de las proteínas nucleolares y encontraron que de todas ellas, las proteínas número 23 de las regiones B y C eran abundantes y estaban fosforiladas (115). Por ésto, y considerando que la fosforilación y desfosforilación se han postulado como mecanismos de regulación de la expresión genética (30), Busch y col. las aislaron y caracterizaron bioquímicamente (17). Otras proteínas han sido estudiadas con base en otros criterios, e.g., abundancia, ser moléculas antigénicas en ciertas enfermedades autoinmunes o ser indicadores cuantitativos de estados patológicos como el cáncer. Asimismo otras proteínas están siendo encontradas como componentes esenciales del NOR, por ejemplo la denominada fosfoproteína pp135 (126).

### **RNA polimerasa I.**

La RNA polimerasa I es un complejo enzimático que transcribe los genes en cuya secuencia se encuentra codificada la información para la producción de las moléculas precursoras de pre-rRNA (134). Consta de 8 subunidades polipeptídicas denominadas S1 a S8, con pesos moleculares que van de 17.5 a 190 kDa. Las subunidades S4 y S5 tienen actividad de cinasa (138). Cada una posee un sitio de unión para ATP (138). Recientemente se ha estudiado la localización de esta enzima en células interfásicas y mitóticas (97,142). Scheer y Rose utilizaron un antisuero contra la RNA polimerasa I de un conejo inmunizado con la enzima purificada. Con inmunolocalización ellos encontraron que la enzima se encuentra presente en los FCs interfásicos y en los NOR metafásicos. Estos resultados son notables en el sentido de que la transcripción se postula que ocurre en la DFR del nucléolo. Varios argumentos se pueden discutir. Uno de ellos sería el de que la enzima usada para inmunizar reconoce un estado inactivo de la enzima y por eso no reconoce la DFR. Otro es que estos resultados están de acuerdo con los encontrados recientemente sobre la transcripción inicial en los FCs (162). Actualmente no se puede precisar la causa de los resultados contradictorios debidos a la autorradiografía e inmunomicroscopía electrónica.

## C23.

La fosfoproteína ácida C23, nucleolina o proteína de 100 kDa, es la proteína más abundante en el nucléolo de células en crecimiento exponencial (76,117). En células de hepatoma de Novikoff alcanza el 9.5% del total de proteínas de este organelo (25). En células normales su proporción se incrementa proporcionalmente con la actividad de transcripción nucleolar (25). Durante la mitosis se asocia a los NOR y a las superficies cromosómicas, de donde se condensa en PNBs y se fusiona con el NOR en telofase (53,112). Se localiza en los NOR de cromosomas metafásicos y en el nucléolo interfásico está asociada a los FCs y a la DFR (45,151). Es una de las proteínas Ag-NOR.

La proteína C23 tiene un peso molecular de 103 kDa y es de naturaleza ácida (punto isoeléctrico, p.I.=5.2) (58). Es altamente fosforilada (1.2 moles de fosfoserina/mol de C23) (93) y metilada (1.3 moles de dimetilarginina [DMA]/mol de C23) (89,91).

La proteína se une a secuencias de rDNA de hebra sencilla, en algún lugar entre el sitio de inicio de la transcripción y 500 nucleótidos por detrás de ese sitio, en el espaciador no transcrito (NTS), en regiones ricas en dAdT (118). También se une a secuencias de pre-rRNA recién sintetizado (72).

El gene para esta proteína fue clonado recientemente (83,76). El producto consta de 713 aminoácidos (aa) que pueden dividirse en tres regiones que le confieren capacidad multifuncional. La primera región de aa contiene 6 secuencias con residuos no polares, seguidas de hileras de aa ácidos. Esta zona es similar a la de la proteína HMG 14 y podría interaccionar con la cromatina a través de las histonas, posiblemente en la región del NTS. La segunda zona, cerca del extremo carboxilo terminal, contiene glicina en abundancia y residuos de arginina dimetilados ( $N^{\omega}$ ,  $N^{\omega}$ -dimetilarginina). Esta región de la molécula es extendida y es similar a regiones de las proteínas de los "splicesomes", por lo que se propone que juega un papel importante en la interacción con el RNA. La tercera zona se encuentra en la parte central de la molécula y contiene segmentos alternos de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos.

La proteína es fosforilada por una proteína cinasa nucleolar de tipo NII (25). En el núcleo celular las proteínas nucleares son fosforiladas por proteínas cinasas independientes de cAMP. Hay dos clases, la NI y la NII, que usan caseína como sustrato. Las proteínas HMG 14, topoisomerasas I y II y una subunidad de la RNA polimerasa I son fosforiladas por la cinasa tipo II. La fosforilación ocurre en las serinas cerca del extremo amino terminal, que es rico en  $\alpha$ -hélice. Los sitios de fosforilación son dos regiones muy ácidas; una región ocupa los residuos 21 a 49 y la otra los residuos 180 a 221.

Las proteínas nucleolares topoisomerasa I, RNA polimerasa I y C23 permanecen asociadas con el rDNA en la mitosis.

La proteína C23 se ha observado que puede inhibir la transcripción de rDNA si se desfosforila, pero durante la

transcripción está fosforilada pero se degrada durante el proceso (25,76).

Estas características sugieren que la C23 puede intervenir en la regulación de la conformación de la cromatina nucleolar, participar en la especificidad de la RNA polimerasa I, controlar la formación de estructura secundaria de los transcritos tempranos de rRNA y mantener inactivo el aparato de transcripción, hasta que es desfosforilada y fragmentada (25).

### B23.

La fosfoproteína ácida B23 es una de las proteínas nucleolares más abundantes. Tiene un peso molecular de 37 kDa y un punto isoeléctrico de 5.1 (30). Se localiza en la región granular del nucléolo en interfase (151). En mitosis, la proteína B23 se distribuye hacia el nucleoplasma en profase y se asocia con la superficie de los cromosomas en metafase y anafase; en telofase aparece en los PNBs y se distribuye posteriormente en el nucléolo en formación (112).

Su localización en la región granular del nucléolo, sugiere que puede estar involucrada en la síntesis y procesamiento del ribosoma (151). Por otro lado, en células tratadas con actinomicina D o sus análogos, la proteína B23 transloca hacia el nucleoplasma, sugiriendo que está involucrada en algún evento postranscripcional de la molécula del pre-rRNA (169). Asimismo, en células a las que se les ha suprimido el medio nutritivo y se les ha administrado posteriormente, se observa que la proteína B23 transloca al nucleoplasma (29).

Los sitios de fosforilación de la proteína B23 son similares a los de la proteína C23, es decir, la fosfoserina está flanqueada por residuos de aa ácidos (30).

La molécula presenta 3 formas químicamente distintas, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\eta$  (30). Las 3 parecen ser fosforiladas aunque parece que corresponden a productos de degradación de una misma especie molecular (29). Actualmente se trabaja en la clonación del gene cuya secuencia contiene la información para la producción de esta proteína.

### Fibrilarina.

Recientemente, usando autoanticuerpos humanos de pacientes con la enfermedad autoinmune de escleroderma, Ochs y col. (114) identificaron una nueva proteína en el nucléolo (34 kDa y pI 8.5) que fué llamada fibrilarina debido a su localización tanto en los FCs como en la DFR de nucléolos cuando se estudió por medio de inmunomicroscopía electrónica. En experimentos de digestión con nucleasas *in situ*, se demostró que mientras que el tratamiento con la RNasa solo elimina parcialmente a la fibrilarina del nucléolo, el tratamiento con DNasa la elimina por completo. Los datos de localización y digestiones sugirieron que la fibrilarina

se asocia con el DNA nucleolar y quizá con el pre-rRNA recién transcrito en la DFR.

También se observó una asociación entre la fibrilarina y el nivel de síntesis de rRNA. En los nucléolos hipoactivos de linfocitos periféricos, se observó una tinción ligera para fibrilarina. Sin embargo, nucléolos activos como los de células HeLa y Ptk<sub>2</sub>, contenían mucho más fibrilarina (116).

Lischwe y col. en 1985 (90), aislaron y purificaron la fibrilarina y mostraron que su composición de aminoácidos era muy especial pues contenía 23 moles de glicina y 4 moles de DMA/mol de fibrilarina. Además, la antifibrilarina podía inmunoprecipitar específicamente las partículas U3snRNP. La composición de la fibrilarina, su peso molecular de 34 kDa y su pI de 8.5 la hacen similar a la proteína que se une a los hnRNAs (114); especialmente es similar a la A<sub>2</sub> (114). Christensen también produjo un anticuerpo contra una proteína de 34kDa en *Physarum* y encontró que se localizaba en el nucléolo y en las regiones activas de cromosomas politénicos (33).

Por otro lado, la fibrilarina es similar a la proteína desestabilizadora de la hélice, recientemente descrita (114); ésta tiene la capacidad de unir RNA o DNA de hebra sencilla y de formar partículas cuando se une a ácidos nucleicos extendidos.

La fibrilarina, que se localiza específicamente en el nucléolo, se relaciona con otras proteínas de 30 a 40 kDa, en el sentido de que tienen un alto contenido de glicina, un pI básico, un alto contenido de DMA y tienen la capacidad de unir RNA y/o DNA (114). Por esto, la fibrilarina podría cumplir las funciones de unirse a rDNA para desestabilizarlo y desenrollarlo para permitir ser transcrito por la RNA polimerasa I; puede unirse a pre-rRNA en síntesis o recién sintetizado para empacarlo en partículas prerribosómicas y podría intervenir, junto con el U3snRNA, en el procesamiento temprano del pre-rRNA.

La fibrilarina ha sido localizada en un gran número de tipos celulares y especies biológicas, incluyendo células de raíz de cebolla, en donde se presenta como una proteína de 20 kDa (116). También se ha localizado en los nucléolos remanentes de células nucleadas de eritrocitos de rana (116). Por esto, la fibrilarina es una proteína conservada en la evolución, presente en todos los núcleos de células activas e inactivas. Estos descubrimientos sugieren que la proteína se une al rDNA en nucléolos remanentes, aún cuando la transcripción no esté ocurriendo.

En interfase, la fibrilarina forma un filamento similar al nucleolonema y se localiza en la DFR y en los FCs. En mitosis, se localiza en los NORs metafásicos y en telofase se distribuye en los cuerpos prenucleolares (PNBs) durante la nucleogénesis (114).

### DNA topoisomerasa I.

Las topoisomerasas son enzimas que pueden alterar la topología del DNA y por ello se ha propuesto que intervienen en

los eventos de transcripción, duplicación, recombinación y reparación de esa molécula en eucariontes. La topoisomerasa I cataliza el relajamiento del DNA superenrollado al producir roturas transitorias de una hebra (52).

Su papel en la transcripción fué sugerido por su unión estrecha con nucleosomas activos y por su colocación con la RNA polimerasa II en regiones de genes en transcripción (52).

La topoisomerasa I es una fosfoproteína que es fosforilada por una proteína cinasa de tipo NII, al igual que la C23. La fosforilación ocurre en un péptido rico en serina, cerca del extremo amino terminal (41).

La DNA topoisomerasa I está estrechamente asociada con el nucléolo *in situ* (60). Sin embargo, sólo recientemente se ha demostrado que en extractos nucleares, el relajamiento del gene rDNA superenrollado, por medio de la enzima es obligatorio para la transcripción, quizá a través de su acción como un "sacacorchos" para disminuir la tensión del DNA debida a la torsión (13).

## rDNA.

En eucariontes, el DNA ribosómico (rDNA) es el DNA nucleolar a partir del cual se sintetiza el precursor ribosómico pre-rRNA. El rDNA se localiza en los FCs del nucléolo (1,75) y es uno de los genes más abundantes en la célula. Se presenta como copias múltiples, cada una de las cuales genera varias moléculas de pre-rRNA, que es el precursor de las moléculas de los rRNAs del ribosoma, *i. e.*, 18S, 5.8S y 28S. En humanos se presentan alrededor de 200 copias de este gene por genoma diploide (20). La molécula de rDNA (Fig. 2, B,C) consta de la secuencia codificante que incluye un espaciador transcrito externo (ETS), las regiones del gene 18S, 5.8S, 28S y dos regiones espaciadoras internas (ITS I, ITS II). Entre cada unidad repetitiva se localiza una región grande denominada espaciador no transcrito (NTS), en donde se localizan las regiones del promotor, terminador y secuencias que aumentan la transcripción (61).

El estudio de la molécula ha sido muy intenso en los últimos años, desde que se estableció su papel en la biogénesis del ribosoma. De hecho, los tres últimos volúmenes de la serie *The cell nucleus*, editada por el Dr. H. Busch, se dedican exclusivamente al tema rDNA (20). Asimismo, la secuencia nucleotídica del rDNA de algunas especies está completamente determinada, como es el caso de *Xenopus laevis* (61).

La región codificante del rDNA se ha conservado entre las especies relacionadas (20) pero no ocurre así con la región del ETS, que es heterogéneo en secuencias de bases.

Diversos grupos de investigación se dedican al estudio de la secuencia nucleotídica de los genes de rDNA, tanto en humanos como en otros mamíferos. De igual manera se estudian a nivel molecular los factores involucrados en la regulación de la expresión genética del rDNA.

Se ha establecido la nomenclatura de elementos de acción *cis* para aquellas regiones del genoma que tienen determinadas secuencias de bases que hacen de esa región un candidato para la unión de otros elementos. Los elementos de acción *trans* son por otro lado los factores proteicos que se unen a fracciones específicas del gene y modulan su actividad (141).

A continuación se detalla la anatomía molecular fina del rDNA de la rata (Fig. 2, C).

En la rata, cada unidad repetitiva de rDNA consta de un total de aproximadamente 37 000 pares de bases (bp), 13 000 de las cuales corresponden a la unidad transcripcional (incluyendo el ETS, el 18S, ITS I, 5.8S, ITS II y el 28S, en dirección 5'-3') y 24 000 correspondientes al NTS (32).

La unidad transcripcional del rDNA de rata incluye 4 400 bp de ETS, 1 874 bp de 18S, 1 066 bp de ITS I, 156 bp de 5.8S, 765 bp de ITS II y 4 802 bp de 28S, la secuencia nucleotídica de las cuales ya ha sido obtenida (27,31,44,49,65,66,109,140,157,165,166,167,168).

El sitio de inicio de la transcripción y secuencias adyacentes fueron determinadas como "TATA box" (TATATGC) siendo la G la primera base del transcrito (140). Por detrás del sitio de inicio de la transcripción ("upstream") se han determinado elementos de acción *cis* como el promotor (P) que incluye desde -40 bp hasta más 10 bp, el sitio de unión del complejo de preiniciación (PIC), que abarca de -167 a -122 bp. Sobrepuesto a una parte del PIC, se encuentra un elemento "enhancer" (E) que incluye desde -1 018 hasta -286 bp. Enseguida se encuentra otra región conservada evolutivamente denominada región variable.

Las regiones "upstream" más alejadas contienen elementos repetitivos conocidos como *Alu2*, pues son secuencias que se cortan con la enzima de restricción del mismo nombre.

Aunque se conocen gran cantidad de elementos de acción *cis* cerca del sitio de inicio de la transcripción del rDNA de rata, no se conocen con exactitud los elementos más lejanos. Recientemente, sin embargo, Cassidy y col. (26,28) han descubierto que en el ETS del rDNA de rata se localizan dos elementos de acción *cis* más. Ellos son un "enhancer" y un sitio de inicio de la transcripción adicional. Este último se encuentra localizado entre -732 y -719 bp del sitio de inicio de la transcripción principal.

Así mismo, Rothblum y col. (141) han encontrado un elemento de acción *trans* que se une específicamente a ese promotor adicional, incrementando hasta de 8 a 10 veces la transcripción. Ese elemento es un proteína de 16 kDs cuya composición de aminoácidos es similar a las proteínas HMGs.

Por delante del sitio de terminación de la transcripción en el 28S ("downstream") se encuentran localizados diversos elementos. Entre ellos hay un terminador (T) llamado *Sa/I* box, que es una región de 18 nucleótidos rico en secuencias GTCGAC localizada 565 nucleótidos por delante del sitio de terminación, *i.e.*, el extremo 3' del 28S (hay otro terminador "upstream" llamado *To* en ratón que quizá esté presente en rata. Más adelante hay

secuencias repetidas que incluyen regiones *SaII* y regiones denominadas B2. Aproximadamente 2 500 bp "downstream", hay otro elemento de acción *cis* que potencialmente forma DNA Z, es decir, una región que puede actuar en la recombinación del gene (166). Entre 3 818 y 3 833 bp "downstream" se localiza otro elemento de acción *cis*, el origen de replicación.

La complejidad molecular del rDNA, sin embargo, pone en evidencia la similitud del gene con otros genes eucariontes no ribosómicos y con los procariontes: la presencia de promotores, "enhancers", sitios de terminación, etc. (88). La molécula sintetizada a partir de este gene es posteriormente procesada (Fig. 2, D,E) (61) para finalmente originar las moléculas de rRNA que, en asociación con proteínas ribosómicas y no ribosómicas, toman parte en el ensamblado y maduración del ribosoma. El papel del U3snRNA en el procesamiento postranscripcional del pre-rRNA se explica en otra sección.

### Nucleologénesis

Los componentes nucleolares varían tanto cuantitativa como cualitativamente concomitantemente con cambios en la actividad transcripcional, especialmente durante la mitosis, etapa durante la cual la transcripción se suspende casi completamente en profase y luego reinicia hasta telofase (35,107,146,154). Durante la profase el nucléolo se disgrega y se restringe en ciertas regiones cromosómicas, a saber, las regiones del organizador nucleolar (NORs). En telofase tardía e interfase temprana el nucléolo se reconstruye (113,154) a partir de transcripción nueva de pre-rRNA y fusión subsecuente de cuerpos prenucleolares (PNBs) preempaquetados y discretos (35,107,111) que se condensan a partir de material nucleolar pericromosómico rico en proteínas, que aparece por primera vez en anafase (154). El proceso de reconstrucción nucleolar se denomina nucleologénesis (35,111,113,154). El comportamiento del nucléolo durante la mitosis y en especial durante la nucleologénesis, ofrece un sistema para estudiar las asociaciones espaciales y transitorias entre ácidos nucleicos y proteínas que pueden estar involucrados en la regulación de expresión genética. La distribución de las fosfoproteínas nucleolares C23 (53,112) y B23 ha sido reportada recientemente durante la mitosis (112) y nucleologénesis (113) en relación con la distribución de proteínas Ag-NOR. Se ha mostrado que mientras una fracción pequeña de la C23 queda en el nucléolo y quizá se une al NOR, la B23 por otro lado, se distribuye en el nucleoplasma, rodeando a los cromosomas. Ambas proteínas, sin embargo, aparecen en los PNBs y luego se fusionan con los NORs. En un reporte posterior, estos autores mostraron una distribución de la proteína nucleolar fibrilarina en los PNBs y los NORs (114), similar a como ocurre con la C23.

También se ha mostrado que los PNBs contienen RNA (107,108), pero la localización del rDNA no se conoce en el estado de PNBs de la nucleologénesis, ni se conoce la distribución real de estos

genes durante todos los estados de la mitosis, aunque se ha establecido muy bien que éstos se localizan en los NORs durante la telofase (1). Un reporte reciente indica la localización del rDNA por medio de hibridación *in situ*, pero solo durante ciertas fases de la mitosis (94).

Con el objeto de intentar demostrar asociaciones específicas entre el rDNA y algunas proteínas nucleolares, aquí se documenta la distribución de los genes ribosómicos durante la mitosis, con especial énfasis en la nucleologénesis, usando un método en el que se han hecho óptimas las condiciones para la hibridación molecular *in situ* no isotópica y preservación de morfología celular. A nivel de microscopía de luz se pudo además relacionar la localización del rDNA con la distribución de las proteínas nucleolares específicas fibrilarina, RNA polimerasa I y la(s) proteína(s) Ag-NOR por medio de inmunofluorescencia y tinción Ag-NOR. Mas aún, se compararon estos resultados con la distribución del rRNA, puesto en evidencia por la técnica de tinción con azul de toluidina alcohólico a pH ácido (149). De esta parte del trabajo se concluyó que la mayoría de los PNBs no contienen rDNA ni RNA polimerasa I, en tanto que los "NOR-PNBs" sí contienen esos elementos. Además se discuten esos descubrimientos en relación con la reconstrucción nucleolar a partir de los "NOR-PNBs" y en relación con la controversia acerca de las diferencias entre el número de NORs y FCs.

### U3snRNA y sus genes.

Los UsnRNAs (RNAs nucleares pequeños, ricos en ácido uridílico) son moléculas de interés por su papel en el procesamiento de RNAs inmaduros (pre-RNAs) (19,131). Entre los UsnRNAs, el U3snRNA y el recientemente descrito U8snRNA (132) son especies únicas por su localización nucleolar.

El U3snRNA es un RNA pequeño (de 217 nucleótidos en humanos), abundante (unas  $2 \times 10^5$  copias/célula de mamífero), muy conservado através de la evolución (en amibas, dinoflagelados, plantas, animales) y uno de los dos RNAs (el otro es el U8snRNA) nucleolares de vertebrados que se sabe que tienen un extremo 3' metilado (7-metilguanosa [ $m_7Gcap$ ]) (122).

El U3 y las proteínas asociadas (U3 RNP) pueden ser inmunoprecipitados selectivamente por ciertos autoanticuerpos de pacientes humanos y por un anticuerpo monoclonal que reacciona con una proteína de 34 kDa asociada (90). La localización nucleolar del U3snRNA y las observaciones de que puede estar asociado con una partícula de RNP de más de 60S y con un RNA de 28-35S (después de desproteínizar), sugieren que este RNA puede estar involucrado en el procesamiento del rRNA, en el ensamblaje del ribosoma o en su transporte (131).

Las primeras hipótesis en relación con la función del U3snRNA se habían basado principalmente en los hallazgos de que se asocia por puentes de hidrógeno a los rRNAs 28S y 32S (3,34,43,122,129)

y sobre la complementaridad entre las secuencias de nucleótidos del U3 y el rRNA (122). En células de mamíferos, un precursor de 45S pre-rRNA se procesa en varios pasos para producir rRNAs de 28S, 5.8S y 18S (20,61,125). Un rRNA de 32S es un intermediario del procesamiento, que consiste de RNAs 5.8S y 28S, unidos covalentemente por medio del espaciador transcrito interno II (ITS II). Bachellerie y col. y más tarde Tague y Gerbi (3,161), observaron que la secuencia en el extremo 5' del ITS II estaba conservada entre las especies de vertebrados, y era complementaria a los nucleótidos 158 al 167 del U3snRNA de rata. Por esto, postularon que el U3 puede hacer apareamiento de bases con esta secuencia y mediar la rotura que separa el 5.8S del ITS II. Datos más recientes no apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, Moser y Cavet (citado en 161) sugieren que el U3 se asocia con un RNA poliadenilado no ribosómico en el nucléolo. Aunque los nucleótidos 158 a 167 del U3snRNA se predice que son de hebra sencilla cuando se usa un programa de computadora que genera modelos de estructuras secundarias, la secuencia en el extremo 5' del ITS II diverge mucho entre las especies de eucariontes primitivos. Además, los estudios con inmunofluorescencia sugieren que el U3 RNP se localiza en la región fibrilar del nucléolo, donde ocurre la síntesis del rRNA y quizás el ensamblaje temprano de las partículas prerribosómicas, pero no se encuentra en la región granular, donde parece que tienen lugar los eventos más tardíos del procesamiento del pre-rRNA (incluyendo la rotura del 5.8S del ITS II).

Por otro lado, en un estudio reciente (121) Parker y Steitz analizaron la constitución proteica del U3snRNP, los sitios de interacción proteína-RNA en la partícula y la estructura secundaria del U3snRNA. Los resultados indicaron que las U3snRNP de células HeLa contienen proteínas no fosforiladas de 36, 30, 13 y 12.5 kDa y dos proteínas fosforiladas de 74 y 59 kDa respectivamente. Los nucleótidos 72 a 90, 106 a 121, 154 a 166 y 190 a 217, deben interactuar con proteínas pues estas zonas inmunoprecipitan luego del tratamiento con RNasa A. La estructura secundaria del U3snRNA incluye zonas de hebra sencilla, conservadas evolutivamente (como los nucleótidos 104 a 112) y no conservadas (como los nucleótidos 65 a 74, 80 a 84 y 88 a 93). Estas zonas podrían establecer enlaces con el rRNA. La secuencia nucleotídica de 159 a 168 no es accesible y por ello no interactuaría con el rRNA 5.8S. Los autores concluyeron y discutieron que el U3snRNA puede participar en el procesamiento del pre-rRNA, cerca del extremo 3' del rRNA 28S (unos 30 a 80 nucleótidos por delante del sitio de terminación de la transcripción) (Figura 3).

Recientemente, Suh y col. han aislado, clonado y obtenido la secuencia del gene humano para el U3snRNA (158). Ellos encontraron que, aunque el U3snRNA es transcrito por la RNA polimerasa II (igual que los otros UsnRNAs, excepto el U6, que es transcrito por la RNA polimerasa III (133)) las secuencias del promotor y del "enhancer" son diferentes de las de los genes para mRNAs (158). Las secuencias flanqueadoras, como el "enhancer", el

promotor y la señal de procesamiento en el extremo 3' del gene, son homólogas a las de los genes para el U1 y U2snRNAs. Además, encontraron que el gene U3 contiene lo que se ha llamado la "U3 Box" cerca del enhancer, similar a la de rata (156). Esta secuencia está involucrada en la unión de un factor de transcripción (156).

En 1987, Suh y col. hicieron extractos nucleares y nucleolares y encontraron que el gene para el U3snRNA se localiza principalmente, pero no exclusivamente, en el nucleoplasma y que hay 10 copias del mismo en células humanas (159). Ellos habían propuesto previamente, experimentos en los cuales se utilizaran las regiones codificante y flanqueadora del gene como sondas moleculares, para detectar su localización subcelular en interfase, es decir, para conocer si los genes eran nucleoplásmicos o nucleolares (158).

Con el objeto de complementar los resultados obtenidos *in vitro* y de estudiar la regulación del gene para el U3snRNA en humanos, y la función de su producto, se iniciaron en esta tesis una serie de experimentos de hibridación molecular *in situ* con diferentes sondas, las cuales incluían la región codificante y/o flanqueadora del gene. En esta tesis se presentan los resultados de esos estudios, que indican la localización nucleolar de los genes mencionados.

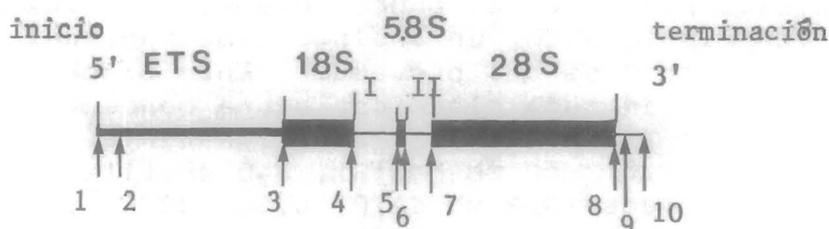


Figura 3.- Sitios de procesamiento postranscripcional (1-10) del pre-rRNA humano. El U3snRNA humano tiene secuencias nucleotídicas complementarias a algunos de los sitios. El análisis detallado de esas secuencias ha sido descrito (122). Hay complementaridad con los sitios 1, 2, 3 y 7 "upstream", es decir, a los sitios de inicio de la transcripción (1), al sitio de procesamiento del ETS (2), al extremo 5' del 18S (3) y al extremo 5' del 28S. "Downstream", hay complementaridad con el sitio 9, es decir, con el extremo 3' del 28S, antes de la señal de terminación de la transcripción. I, II espaciadores transcritos internos I y II. (Tomado de 122).

## MATERIALES Y METODOS

Cultivos y líneas celulares. Se cultivaron células epiteliales renales de macho adulto de la rata canguro "narizona" (*Potorous tridactylus apicalis* Gould, 1851 [Marsupialia: Macropodidae; 2n=13, 1 NOR]), línea PtK<sub>2</sub> (NBL-S) (ATCC CCL 56, Rockville, MD), células de carcinoma epitelioide de cervix humano (*Homo sapiens* Linnaeus, 1758 [Primates: Hominidae; 2n=46, 10 NORs]), línea HeLa 53 (ATCC CCL 2.2, Rockville, MD) y células epitelioides renales de rata (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 [Rodentia: Muridae; 2n=42, 6 NORs]), línea NRK-52E (ATCC CRL 1571, Rockville, MD) sobre cubreobjetos de vidrio estériles en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro, suplementadas con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco) conteniendo glutamina, piruvato y 10% de suero fetal de ternera (FCS, Gibco) en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 2% y a 37°C.

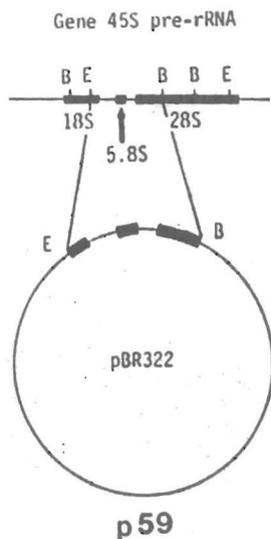
Sondas génicas moleculares utilizadas. Las sondas génicas moleculares utilizadas y sus principales características se muestran en la Tabla 1 y en las Figuras 4 y 5.

Construcción de sondas génicas moleculares. Las sondas fueron biotinadas por el procedimiento de "nick translation" (135) con Bio-16-dUTP, un análogo biotinado del TTP, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Enzo Biochemical y 135). En resumen, 1 µl de cada plásmido, a una concentración de 1 µg/ml, se incubó por 2 h a 14 °C en amortiguador de reacción (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5 y 50 mM MgCl<sub>2</sub>), H<sub>2</sub>O destilada, solución de desoxinucleótidos (0.3 mM dATP, 0.3mM dGTP, 0.3 mM dCTP en 50 mM tris-HCl, pH 7.5), Bio-16-dUTP (0.3 mM en 50 mM Tris-HCl, pH 7.5), DNA polimerasa I (3 U/ml en 0.1 M amortiguador sódico de fosfatos, pH 7.2/50% glicerol [v/v]/1.0 mM DDT) y DNasa I (0.5 mg/ml en 0.1 M MgCl<sub>2</sub> diluida 1:2000 en amortiguador: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5/1mg/ml BSA libre de nucleasas). Inmediatamente después se agregó amortiguador de paro (0.2 M EDTA) y se incubó por 10 min a 65°C. Posteriormente se agregó tRNA (70 µg) de *E. coli* y se incubó a 4°C sobre hielo. Para recuperar las sondas se utilizó precipitación con etanol. A los 50 µg de la solución con los componentes mencionados, se añadieron 27.5 µl de acetato de amonio 7.5 M y 110 µl de etanol absoluto. Se incubó a -80°C o sobre hielo seco por 15 min. En seguida, se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min y después de eliminar el sobrenadante cuidadosamente, se repitió el procedimiento con acetato de amonio y etanol. Después se enjuagó con etanol al 70% y una vez eliminado el alcohol y los restos de sales, el DNA fue liofilizado por 30 min. Finalmente, cada sonda fue resuspendida en amortiguador T.E. (T.E. es 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.0 mM

| Gene                  | Origen           | Clona       | Vector     | Fragmento usado                 | Longitud del fragmento usado (bp) |             |              |      |       |      |      |
|-----------------------|------------------|-------------|------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------|--------------|------|-------|------|------|
|                       |                  |             |            |                                 | vector                            | gene        |              |      | total |      |      |
|                       |                  |             |            |                                 | "upstream"                        | codificante | "downstream" |      |       |      |      |
| U3snRNA               | humano           | hU3-1       | pBR322     | HinfI-HinfI<br>(-280 a +250)    | -----                             | 280         | 217          | 250  | 747   |      |      |
| U3snRNA               | humano           | hU3-1       | pBR322     | HinfI-HaeIII<br>(-280 a +5)     | -----                             | 275         | ---          | ---  | 275   |      |      |
| U3snRNA               | humano           | hU3-178     | pBR322     | BamHI-BamHI<br>(-1200 a -300)   | -----                             | 900         | ---          | ---  | 900   |      |      |
| U3snRNA               | humano           | BST-U3      | pBS        | Todo el plásmido<br>HaeIII-SmaI | 2746                              | 5           | 217          | 50   | 3018  |      |      |
| "U3snRNA"             | humano           | hU3-178     | sp6        | HaeIII-EcoRI<br>(-5 a +178)     | -----                             | 5           | 178          | ---  | 183   |      |      |
| U3snRNA<br>pseudogene | humano           | hU3-5       | sp6        | EcoRI-HinfI<br>(-240 a +250)    | ---                               | 240         | 217          | 250  | 707   |      |      |
| 5S rRNA               | hámster<br>sirio | pTH1        | pBR322     | Todo el plásmido<br>BamHI-BamHI | 4362                              | 1500        | 500          | 500  | 6832  |      |      |
| U1snRNA               | humano           | pHU1-ID     | pBR322     | Todo el plásmido<br>EcoRI-EcoRI | 4362                              | 200         | 160          | 236  | 4958  |      |      |
| U6snRNA               | ratón            | pMU6-149(B) | Bluescript | Todo el plásmido<br>AluI-AluI   | 2959                              | 150         | 107          | 85   | 3301  |      |      |
| rDNA                  | rata             | p59         | pBR322     | Todo el plásmido<br>EcoRI-BamHI | 2959                              | 18S         | ITS1         | 5.8S | ITS2  | 28S  | 6490 |
|                       |                  |             |            |                                 |                                   | 227         | 1066         | 156  | 765   | 1317 |      |

Tabla 1. Características de las diferentes sondas moleculares utilizadas. "U3snRNA" es el fragmento de restricción HaeIII-EcoRI correspondiente a la hebra no codificante del gene; esta sonda solo hibridiza con la hebra de DNA codificante pero no con el RNA. El vector es el plásmido en el cual el gene fue originalmente clonado. Los fragmentos usados fueron obtenidos por digestión del vector con enzimas de restricción. Los números entre paréntesis indican la posición de los sitios de restricción con respecto al sitio de inicio (-) o terminación (+) de la transcripción. "Upstream" es la posición por detrás del sitio de inicio de la transcripción; "downstream", por delante del sitio de terminación de la transcripción. Para el rDNA, se señalan los fragmentos del gene 45S pre-rRNA: parte del 18S, el espaciador transcrito interno 1 (ITS1), el 5.8S, el ITS 2 y parte del 28S. bp, pares de bases; para el "U3snRNA", bp significa nucleótidos pues es la hebra sencilla no transcrita del gene.

Figura 4. Sonda génica molecular de rDNA de rata. a) p59 es el fragmento *Eco*RI (E)/*Bam*HI (B) clonado en los sitios E/B del vector molecular pBR322. b) Secuencia de bases del fragmento E/B. La secuencia de nucleótidos 1 al 2282 fue reportada por Rothblum y col. (139) y corresponde a la hebra no transcrita de rDNA. El resto de la secuencia fué logrado por Hadjiolov y col. (62) y corresponde al rRNA. El fragmento contiene 227 pares de bases (bp) del 18S, los espaciadores transcritos internos (ITS) I y II, el 5.8S y 1318 bp del 28S. En total, p59 contiene 3531 de los 13063 bp del ene 45S pre-rRNA de rata.

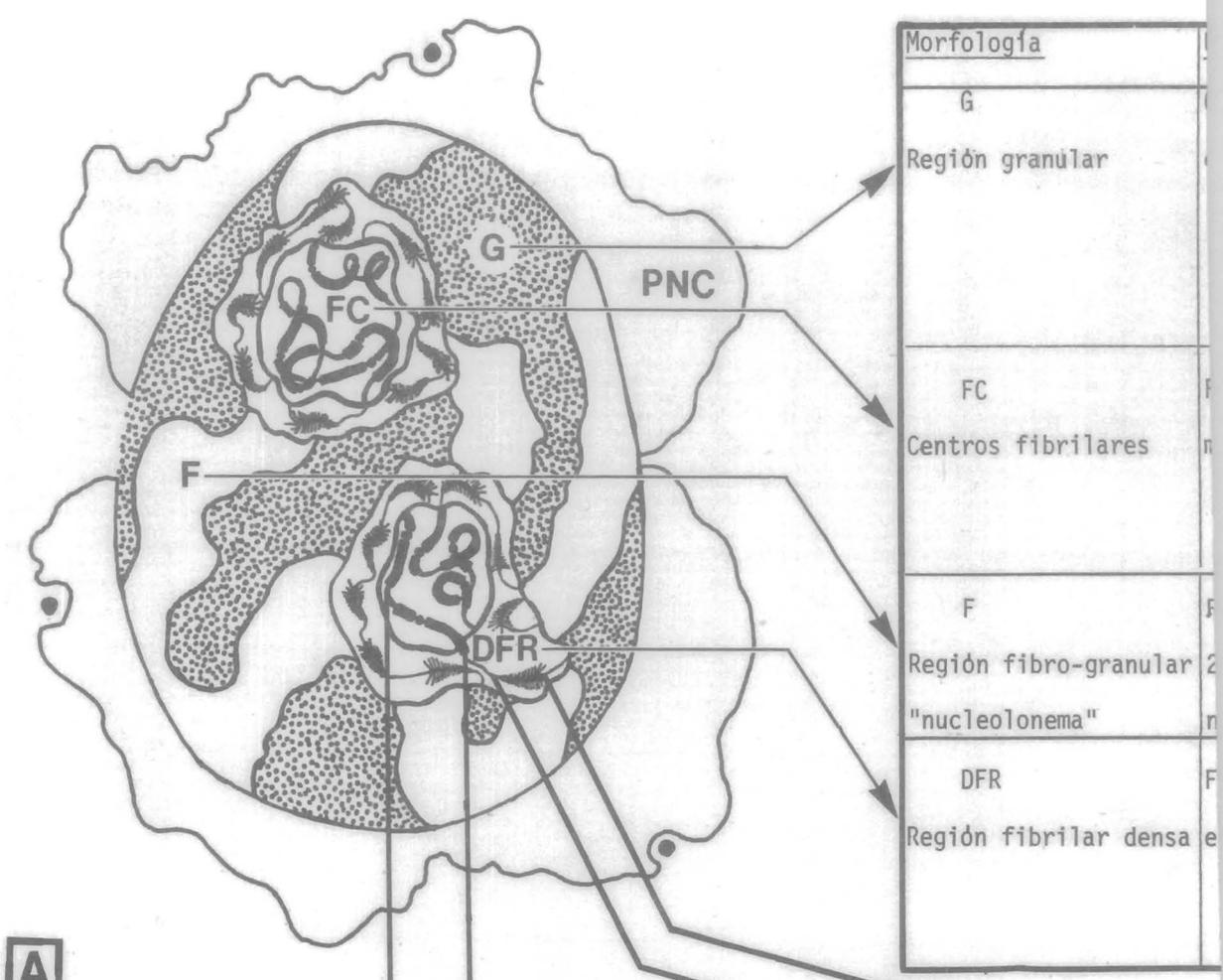


5' GAATTC CCGAAGTAACTGCGGGTATAAGCTTGGCTTGAATTAAGTCCCTCCCTTTGTACACACCCCGCTC  
 10 20 30 40 50 60 70  
 80 GCTACTACCGATTGCATGGTTTACGAGGCCCTCGGATCGGGCCCCGGGGTGCAGCCAGCCCGCTGGCGG  
 90 100 110 120 130 140  
 150 AGCCCTGAGAAGACCTCGAACCTGACTATCTAGAGGAGTAAAGTCTGAACAGGTTTCCGTAGGTGAAC  
 160 170 180 190 200 210  
 220 CTGCGAAGGATCATTACCGAGAGGCCCGAGGGGGCTCGTCCCTCCCTCTTGGGCTGTGTGAGTG  
 230 240 250 260 270 280  
 290 TTCCTCTTCTCGCCGGAGGGCGCTCCCGGTGGTCCCGTGTCCGGCTCTCGGCTCTGTGGCGG  
 300 310 320 330 340 350  
 360 TGCCGTGGCCCGCCGGAGGGGGTTTCGGGACAGGTGTCCGGTGGCAGGGGTGTCGGGTCTGTGTCGGCC  
 370 380 390 400 410 420  
 430 GCGGACCTCTCCCTTTCTCGCTCTTCCCTCGAGCCCTCCGTGGCCCGCTCCGCTCCGGCCGCTG  
 440 450 460 470 480 490  
 500 CGTCCGAGCAGCGCCCTTCTGCTCTTCCCGACCGCTCCGTGATCTGTGTGACCGGGGGTGTGAT  
 510 520 530 540 550 560 ITS I  
 570 GTGATCTCTCGGGCGGTGGCCGAGCCGCTGCTTCTCGAGGGCGTCCCGCTCTCCCGCCGCG  
 580 590 600 610 620 630  
 640 GGTCTCTCGGACGAGCGTCCCGTCCCGCCCGTCCGGTGGGGGGGCTGTGTGTCGGCGTCCG  
 650 660 670 680 690 700  
 710 CGGTGGGCTCGCCCGCCCGCCGCTCTTCTGGGCTCCGTGTCGGCCCGCTCTGTCCGGTACT  
 720 730 740 750 760 770  
 780 GCTCTCCGCTCCCGCCCGAGGTTTCCGACCCCGGGGGTCCCGCTACCGTCCCGGGTCCGGGG  
 790 800 810 820 830 840  
 850 CGGTGGGCGGTAGGACGCTCGTCCCGGGAGGGCTTCCCGCTCCCGCCGCTCCCGGCTC  
 860 870 880 890 900 910  
 920 CCTCAGCTGAGGGCGACCCCTCTGCGCCCGGCTTCCGAGGGCGGCTTCCGGGGCGCTGTCCG  
 930 940 950 960 970 980  
 990 GAGCCCCCTCTGGCCCGCAGGGGTTCCCGCCCGAGCCCTGGCTTGTCCCGCCGTTGGCCGGCCG  
 1000 1010 1020 1030 1040 1050  
 1060 CGCGGTGCGGGTCTGCGGCTCCGCTCCCGTGTCTCCCGCTTTCGCTCCGACCTGTCTTT  
 1070 1080 1090 1100 1110 1120  
 1130 TTTTATTTTCTTACGTGTCGCTTCTGTTCCCGCTGGCCGCTGAGGGAGCCCTCCCGCTC  
 1140 1150 1160 1170 1180 1190  
 1200 CGTCCGGCCCTCCCATCCCGCAGGAGGGCCCGGGGGCGCTTGTGGGCTGTGACACCCCGT  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260  
 1270 TGCCGAGTTCGGCTCACACCTCAGATAACCGTACGACTTACCGGTGATGACTCGGCTCGTCCGCTC  
 1280 1290 1300 1310 1320 1330 5.8S  
 1340 TGAAGACCGCAGCTAGCTCGGAGATTAAATGTAATTCAGGACACATGATGATCGACACTTCGAACG  
 1350 1360 1370 1380 1390 1400  
 1410 ACTTGGCCCGGGTTCCTCCGGGCTACCGCTGTCTGAGCGTCCCTGAGCATCAATGCCCGCC  
 1420 1430 1440 1450 1460 1470  
 1480 CTTCGGTTCGCGCCCGGGGGGATCCGCTCCCGCGGCTGGGAGTCTGCTCGCAGGGCCCGCTCC  
 1490 1500 1510 1520 1530 1540  
 1550 GGGCCCTCCGCTCCGGAATTCGACGTCGGCCGCTCCCGCTTCCCGCCCGCTCCGCTCCGCTCCG  
 1560 1570 1580 1590 1600 1610  
 1620 CGGGTCTCTCCCTCCCGCCGCTCGTCCGCGGGCCCGCCCTCCGCGCTCTTCCCGCCGCG  
 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
 1690 CTCGCGCTCCCGCTCCGCTCCCGCCGCTTCCCGCCGCTGGGAGGCTCCGGGGCCCGCTCCG  
 1700 1710 1720 1730 1740 1750  
 1760 TGTGGCGCGGAGAGGGGGGAAAGTCCGCTCCCGGGTCTGTCGCGCCCTCCCGCTCCGCTCCGCT  
 1770 1780 1790 1800 1810 1820 ITS II  
 1830 GGCAGGACCCCGCCCGGGCCCGGGCTCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCTCCGCGGAGAGA  
 1840 1850 1860 1870 1880 1890  
 1900 GAGAGACGAGACCCCGAGGCTCTCCGGGGCCGTAACCGCCCGCGGGCCCGCTCCCGCT  
 1910 1920 1930 1940 1950 1960  
 1970 CCTCTCTCCCGCTCCCTTACCGGGCCGACCGCTCCGGCCCGCCCGGGCCCGGGCCCGCTCCG  
 1980 1990 2000 2010 2020 2030  
 2040 TCGCCGACCGACTTCCCGGGATGTGGGGCCCGCCCGAAGGAGAGGTCGCGGGCTCCCGCTGG  
 2050 2060 2070 2080 2090 2100  
 2110 CTCGCCCGGCGCCCTCCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCG  
 2120 2130 2140 2150 2160 2170  
 2180 GTCGCGCCCGCCCGCCGACT  
 2190 2200 2210 2220 2230 2240  
 2250 CCCTGAAATTAAGCATATTAGTCAAGCGAGAAAGAAAGTAAACAGGAUUCUCCAGUAACGGCGAGUGAAACAGGAAGAG  
 2260 2270 2280  
 2282

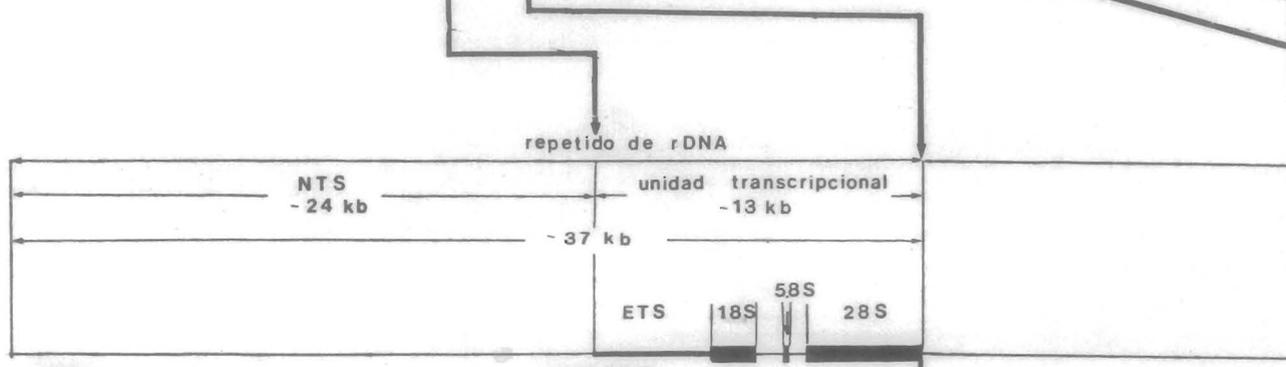
CCCAGCGCGAAUCCCGCCGCGCCGCGGGGAAUUGGGGUAUCGGAAGACCCACUCCCGCGCCGCGUCUGGGGGGGCCAAAGUCCUUGAUUCGAGGCCAGC  
 CCGUGGACGGUGAGGGCCGUAAGCGGCCCGCGCGCCGGCCCGGGUUGUCCCGGAGUCGGGUUGUCUUGGAAUUGCAGCCAAAGCGGGUGGUAUCUUGAUUAAGGC  
 UAAUACCGGCACGAGACCGAUAGCCAAAGUAACCGUAAGGGAAAGUUGAAAGAAUUGAAGAGAGAUUCAGAGGGCGUGAAACCGUUAAGAGGUAAACGGGUGG  
 GGUCGCGCAGUCCGCCCGGAGGAUUAACCGGCGCGGUCGCGCCGCGGGUGUCGCGCGGAUCUUUCCGACCCCGUUCUCCGACCCUCCACCCGCGCGU  
 CUCUCUCCCGUCCCGGCGUCCGCGGUCGCGGUCUCCGUCUCCUCCGGGGGGUGUCGCGGGGCGUCCGGCGCGGGCGGGGUGUGUGGGGGCGCGCGGGCG  
 GGGCCGGGGUGGGGUCGGGCGGGGACCGCCCGGUCGCGGACCGGCGCGCGGGGCGACUUCACCGUGGGGUGGCGCGGACCGGUCGCGGGAUCCCGGGCC  
 AGGCCCGGGGAAGGUGGUCGCGGGGGGGCGGCGUACCCGUGGGCGCGGACCCGCGCCGAGUGUACAGCCCCCGGGCAGCAGCGUCGCGGAUCCCGGGGCC  
 GAGGGAGCGGAUACCGUCCGCGGCGUUCUCCCGGCGUCCUCCCGCCUCCCGUUGGGUGGGCGAAAGGGGGCGGUCGCGGGGGCGGGCCCGCCUCC  
 ACGGGCGGACCGUUCUCCACCCCGCGGCGUCCGUCGCGUUCUCCGUGGUCGGGGCCGGGGGGCGGGAACUCUCCAGUCCGCGCCGGGCGUUCGCGCGU  
 CGGGCCGGGGGGCGUCCACGCGUUCUCCCGGCGUUCGCGGUGGGGGGAGCGAAGCCGAGCGACGGGUCGCGGGCGAUGUCGGUACCCAGCCCGGCG  
 UUGAAACACGGACCAAGGAGUCUAACGCGUGCGGAGUCAGGGGUCGUCGAAAGCCCGGUGCGCAUUAAGGUGUGGGCCCGUCCGGGGCCCGAGGUG

a

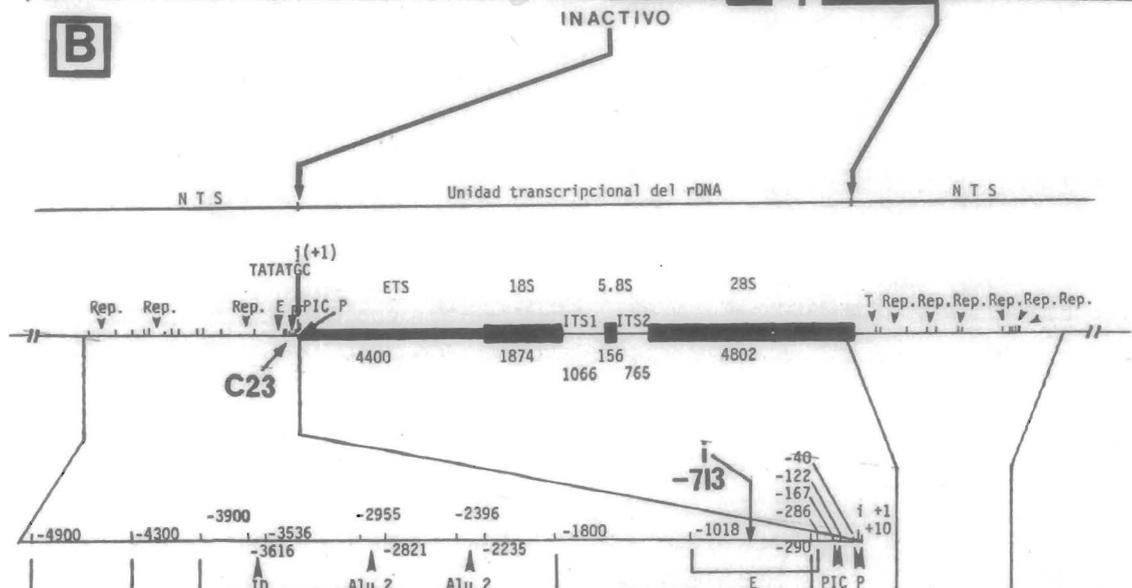
b



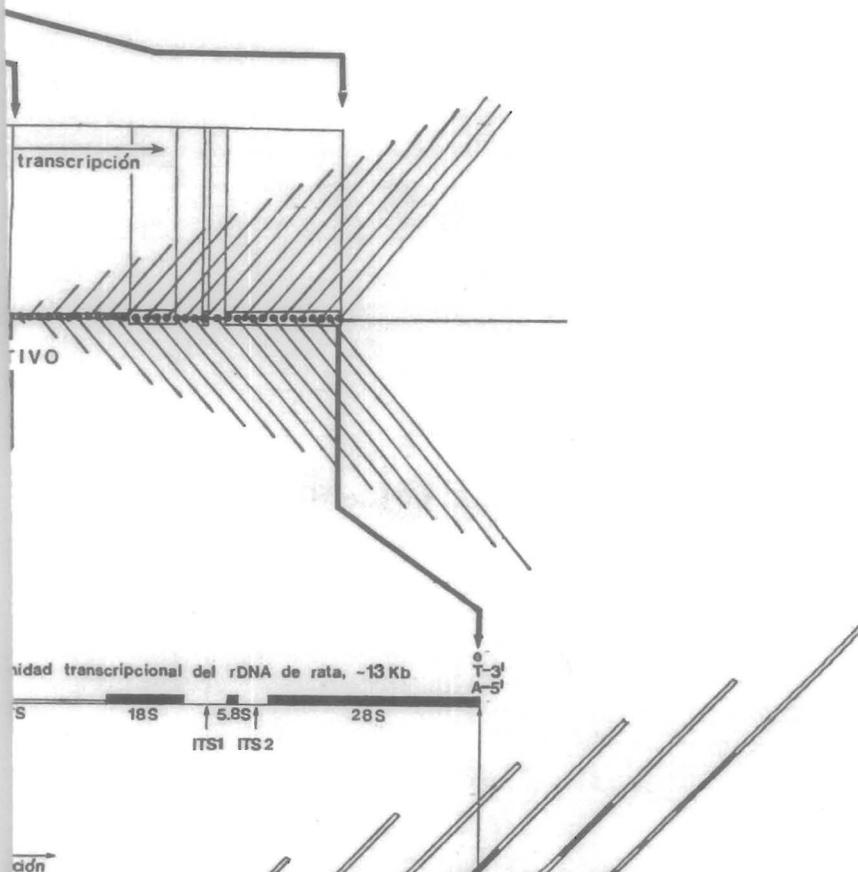
**A**



**B**



|                  | Principales componentes moleculares conocidos  | Función  |  |
|------------------|--|--|--|
|                  | Proteínas  | Acidos nucleicos   |  |
| 00 Å de          | B23 (Mr 37Kd/pI 5.1)<br>Ribocarina (40/5.8)<br>S1 (45/5.0)<br>L-r-proteínas<br>S-r-proteínas | pre-rRNA (+ prots.<br>80S, 55S, 40S)<br>(45S,41S,36S,32S,28S,<br>21S,18S,12,5.8;5S rRNA) | Procesamiento y maduración de pre-ribosomas; formación de subunidades ribosómicas L y S. Transporte, almacén, estructura |
| mada--<br>pesor  | Fibrilarina (34/8.4)<br>C23 (110/5.5)<br>RNA polimerasa I                                    | rDNA, rRNA   | Ensamble-desensamble de cromatina nuclear. Transcripción?  |
| espesor          | Fibrilarina (34/8.4)<br>C23 (110/5.5)  | 45S pre-rRNA   | Procesamiento; estructura  |
| ud; grá<br>diám. | Fibrilarina (34/8.4)<br>C23 (110/5.5)  | 45S pre-rRNA   | Procesamiento; estructura  |
| de               | B23 (37/5.1)<br>C23 (110/5.5)<br>Fibrilarina (34/8.4)<br>p180 (180/4.2)                      | 45S pre-rRNA   | Transcripción de rDNA, procesamiento temprano del pre-rRNA   |



EDTA) para lograr una concentración final aproximada de 40µg/ml. Las muestras se almacenaron a 4°C o a -20°C hasta su uso.

Filtros de nitrocelulosa. Con el objeto de verificar la incorporación de nucleótidos biotinados en las diferentes sondas moleculares génicas utilizadas, se llevó a cabo la detección de éstas luego de adherirlas a filtros de nitrocelulosa por la técnica de "dot blot" (78). El procedimiento, generalmente utilizado para detectar hibridación de ácidos nucleicos, consistió en colocar 1 µl de cada sonda disuelta en amortiguador T.E. en diferentes tubos de microcentrifuga y agregar a cada tubo 24 µl de agua destilada, desionizada y esterilizada. Posteriormente se añadieron 2.8 µl de NaOH 2N fresco a cada tubo para desnaturalizar el DNA. Se centrifugaron por 5 s a 10 000 rpm para concentrar la solución. Los tubos con NaOH fueron incubados a 65°C por 10 min, al cabo de los cuales se enfriaron rápidamente sobre hielo. Luego se añadieron 27.8 µl de una solución de acetato de amonio (NH<sub>4</sub>-Ac) 2M a cada tubo, para neutralizar los grupos OH<sup>-</sup>. La mezcla se agitó ligeramente para homogeneizar los componentes. En este punto, se colocaron filtros de nitrocelulosa de 0.45 mm de grosor y 25 mm de diámetro (Schleicher and Schwell) sobre tiras de papel filtro del número 3 (Whatman), evitando cualquier contaminación posible con las manos. Los filtros fueron después humedecidos con una o dos gotas de una solución de acetato de amonio 1M hasta que se absorbió todo el líquido. Posteriormente las muestras de DNA fueron dispersadas (aproximadamente 55 µl) sobre el correspondiente filtro de papel de nitrocelulosa. Se dejó absorber la solución, pero no secar y se agregó una gota de acetato de amonio 1M a cada filtro, dejando absorber pero no secar, para dispersar el DNA sobre el filtro. Inmediatamente después los filtros fueron pasados rápidamente por una solución de 4X SSC (citrato salino estándar, SSC es 0.15 M NaCl, 0.015 M citrato de sodio) y se colocaron sobre papel filtro del número 3 hasta que la muestra se absorbió en el filtro. Finalmente los filtros fueron colocados en un horno, entre dos hojas de papel filtro, a una temperatura de 80°C durante 2 h en vacío.

Para detectar el DNA biotinado se siguió el procedimiento de detección con el complejo de avidina-biotina-peroxidasa (ABC), descrito en la parte de hibridación molecular *in situ*. En resumen, después de secos, los filtros se colocaron en una solución de prehibridación conteniendo 1% de albúmina de suero de bovino (BSA) y 50% de formamida, para bloquear los sitios a los que se puede unir inespecíficamente el complejo ABC, durante 1 a 6 h, a temperatura ambiente y con agitación ligera y constante. En seguida se retiró la solución y se añadió el complejo ABC (Vector) diluido en PBS (PBS: 10 mM PO<sub>4</sub>, 0.85% NaCl), sin magnesio y conteniendo BSA al 1%, incubándose a 37°C durante 1h. Después se retiró esta solución y se enjuagó en amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6. Inmediatamente después se reveló la

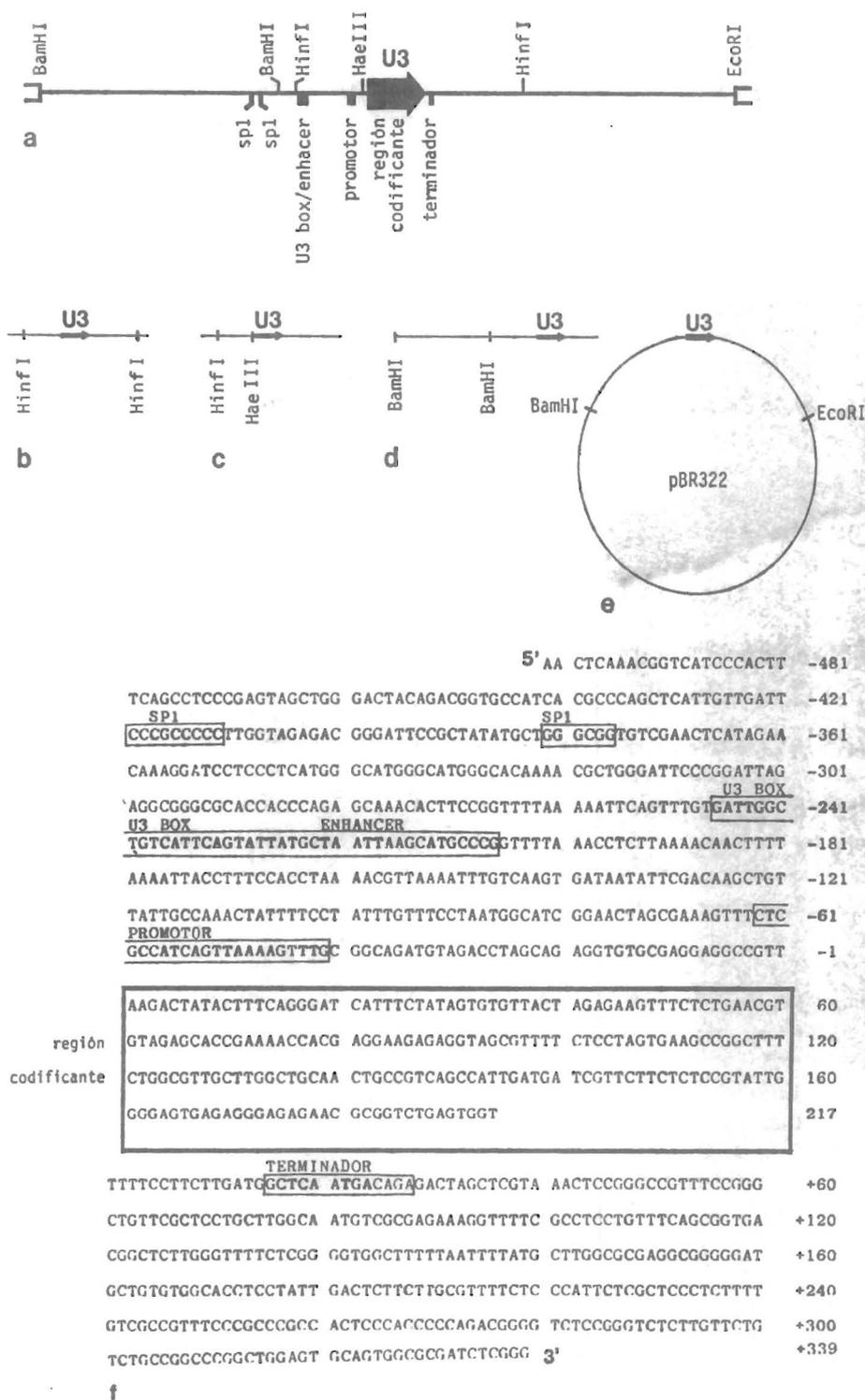


Figura 5. Sonda molecular del gene U3snRNA humano. a) En el mapa de restricción se muestran también las regiones funcionales del gene: los sitios de unión sp1, la región "U3 box/enhancer" y el promotor por detrás del sitio de inicio de la transcripción (upstream); la región codificante (U3); el terminador delante de la región transcrita (downstream). b-e) diferentes sondas utilizadas: b) Fragmento *HinFI* con la región codificante y secuencias upstream y downstream; c) fragmento *HaeIII* con la región upstream inmediata; d) fragmento *BamHI* con la secuencia upstream lejana. e) Gene completo clonado en el vector pBR322. f) Secuencia de bases del gene mostrando las diferentes regiones funcionales. La secuencia corresponde a la hebra no transcrita.

reacción con una solución de DAB al 0.1% y  $H_2O_2$  al 0.02% en el amortiguador Tris-HCl mencionado. La reacción se detuvo eliminando la solución de DAB y enjuagando con agua destilada por tres veces. Los filtros se dejaron secar al aire y se analizaron.

Digestiones enzimáticas. Como controles para la hibridación molecular *in situ*, algunos de los cubreobjetos con células fueron tratados con 100  $\mu$ g/ml de RNasa A (Sigma) en 2X SSC por 60 min a 37°C o con 1000 U/ml de DNasa I (Worthington, libre de proteasas y RNasas) en PBS. En el caso de la RNasa, la enzima se aplicó después del tratamiento con glicina y los cubreobjetos fueron sumergidos enseguida dos veces en etanol helado al 70% y dos veces en etanol helado al 95%, cada vez durante 5 min antes de secar al aire. Posteriormente los cubreobjetos fueron tratados con la solución de NaOH como se explica en la siguiente parte. En el caso de la DNasa, las células en cultivo fueron enjuagadas 3 veces en PBS y luego fueron fijadas en acetona al 100% durante 5 min a -20°C. Después se lavaron en PBS por 10 min, 3 veces y se aplicó inmediatamente la enzima durante 2 h. Luego se lavaron las células en PBS, 3 veces y durante 10 min cada vez. Los pasos restantes comenzaron con otra fijación en paraformaldehído al 4% y continuaron con el siguiente procedimiento:

Hibridación molecular *in situ*. El protocolo de hibridación, descrito originalmente por Gall y Pardue en 1969 (51), se basó principalmente en el de Pardue (120) y en el de Singer y col. (147), con algunas adaptaciones y modificaciones de otros autores (64,84,85). Después de 1 o 2 días en cultivo, las células fueron enjuagadas 3 veces en PBS con 5 mM de  $MgCl_2$ . Después fueron fijadas de 5 a 10 minutos en paraformaldehído preparado en ese momento. Después de la fijación, las células fueron permeabilizadas con acetona al 100% a -20°C por 2 min o con etanol al 70% a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez permeabilizadas, las células fueron rehidratadas en PBS por 10 min a temperatura ambiente. Después se eliminaron los restos de fijador utilizando un tratamiento con glicina 0.1 M en Tris-HCl 0.2 M, pH 7.4, durante 10 min. El DNA celular fue desnaturalizado durante 1 a 3 min con NaOH 0.07 N preparado en ese instante. En seguida se aplicaron 2 lavados de 5 min cada uno, tanto con etanol helado al 70% como con etanol helado al 95%. Después se secaron al aire. También se utilizaron otros agentes desnaturalizantes del DNA, incluyendo SSC 0.1X a 100°C de 30 a 180 s, HCl 0.2 N a temperatura ambiente por 20 min, formamida al 90%/SSC 0.1X (pH 7.2) a 65°C por 2.5 h y formamida al 60%/EDTA  $2 \times 10^{-4}$  M (pH 8) a 55°C por 4 min (148). Todas las condiciones produjeron resultados similares.

La sonda biotinada y el DNA de esperma de salmón desnaturalizado se resuspendieron en formamida (Sigma), se

calentaron a 90°C durante 10 min y se enfriaron rápidamente sobre hielo. La sonda fue combinada con la solución de hibridación previamente hecha antes de colocarla sobre las células. Así, la solución de hibridación final consistió de formamida al 50%, SSC 2X, albúmina de suero de bovino (BSA) al 0.2%, sulfato de dextran al 10%, 1 mg/ml de DNA de esperma de salmón y aproximadamente 0.3 µg/ml de sonda molecular. Se aplicaron 20 µl de la mezcla sobre los cubreobjetos y éstos se invirtieron sobre portaobjetos siliconizados previamente. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 16 a 20 h en cámaras húmedas. Después de la hibridación, los cubreobjetos fueron flotados y enjuagados durante 30 min con SSC 2X/formamida al 50% a temperatura ambiente, durante 30 min con agitación suave, con SSC 1X/formamida al 50% a 37°C durante 30 min, con SSC 1X 30 min y con PBS durante 10 min. Se obtuvieron resultados similares cuando solo se utilizaron 3 enjuagues de 10 min cada uno, con PBS y esto se llevó a cabo subsecuentemente.

Para detectar la hibridación con la sonda biotinada, las células fueron incubadas a 37°C por 1 h con el complejo avidina-biotina-peroxidasa de rábano (complejo ABC, Vector Laboratories, 2 µg/ml en PBS). Después se lavaron las células en PBS durante 10 min a temperatura ambiente y el complejo ABC fue visualizado haciéndolo reaccionar durante 5 a 10 min con diaminobenzidina al 0.1%/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.02% en PBS (pH 7.5), preparado en el momento de usarlo. Las células fueron lavadas nuevamente durante 5 min en PBS y el precipitado café-oscuro en los sitios de hibridación fue intensificado con tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 1% durante 1 h. Las muestras fueron enjuagadas con H<sub>2</sub>O bidestilada varias veces y después de deshidratarlas en una serie creciente de etanol, se pasaron a xilol y se montaron en Permount. Las preparaciones se observaron en un fotomicroscopio Leitz Laborlux 11, equipado con una cámara Nikon FX-35A, fotómetro microflex UFX y un objetivo de inmersión planoapocromático de campo claro.

Tinción de RNA con azul de toluidina. La técnica de tinción con azul de toluidina alcohólico ácido para RNA se realizó de acuerdo con Smetana (149). En resumen, los cubreobjetos con células fueron enjuagados con PBS, secados al aire y colocados horizontalmente para agregar después unas gotas de una solución de azul de toluidina alcohólico y ácido. La solución consistió de azul de toluidina al 0.025% en etanol al 10%, la cual fue diluida 10 veces con una solución de ácido cítrico 0.1 M y fosfato disódico 0.2 M, amortiguada a pH 5-5.4.

Después de 30 min con la solución de azul de toluidina, los cubreobjetos fueron drenados verticalmente y se observaron sin llevar a cabo un enjuague previo.

Tinción con plata amoniacal. La tinción de plata amoniacal para organizador nucleolar fue llevada a cabo de

acuerdo a Goodpasture y Bloom (58). Esencialmente, las células fueron enjuagadas 3 veces con PBS y fijadas con glutaraldehído al 1.6% o con formaldehído al 2% durante 10 min a 4 °C. Inmediatamente después fueron posfijadas con la solución A de Carnoy durante 5 min. Después fueron rehidratadas en etanol al 70% y al 50%, durante 5 min cada uno. Luego se colocaron en agua destilada durante 10 min, al cabo de los cuales se les agregó, luego de drenar y eliminar el exceso de agua (sin secar), una solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) al 50% en agua destilada. Los cubreobjetos se colocaron sobre portaobjetos y se depositaron en una plancha de calor a 45-55°C durante 10 min. Posteriormente se enjuagaron con agua helada varias veces. Para el revelado de la reacción se prepararon 2 soluciones:

- 1) Reactivo  $\text{NH}_4\text{-As}$ . A una solución de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) al 50% (5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  + 5 ml de agua destilada) se agregó  $\text{AgNO}_3$  para dar una concentración del 40% (4 g).
- 2) Revelador. Una solución de formaldehído al 3% se neutraliza (pH 7) con cristales de acetato de sodio. Posteriormente, el pH es disminuído a entre 5 y 6 con unas gotas de ácido fórmico al 88%.

El revelado se lleva a cabo mezclando ambas soluciones en proporción de 1:1 y colocándola sobre las células; éstas se colocan nuevamente sobre un portaobjetos y se dejan revelar durante aproximadamente 1 min o hasta el momento en que el color de la preparación se torna amarilla claro. Posteriormente se enjuaga con agua destilada fría, se deshidrata en etanol a concentraciones crecientes graduales, se coloca en xilol y se monta para su observación.

Inmunofluorescencia. Después de 1 o 2 días de estar creciendo en monocapas sobre cubreobjetos, las células fueron enjuagadas con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) y fijadas por 20 min a 25°C en formaldehído al 2% (grado microscopía electrónica, Polysciences) amortiguado en PBS. Las células fijadas fueron permeabilizadas por alguno de los siguientes 3 métodos, obteniéndose resultados similares: a) en acetona al 100% por 3 min, a -20°C, b) en etanol al 95% por 3 min a -20°C, c) en Tritón X-100 al 0.02% amortiguado en PBS, por 5 min a 0°C.

Después de la permeabilización, las células fueron enjuagadas con PBS 3 veces, durante 10 min cada una. Posteriormente se incubaron debajo de los cubreobjetos con:

- 1) anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína B23 a una dilución de 1/20 en PBS,
- 2) anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína C23 a una dilución de 1/200 en PBS,
- 3) anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína fibrilarina (72B9) a una dilución de 1/50 en PBS,
- 4) suero autoinmune humano contra la proteína RNA polimerasa I a una dilución de 1/100 en PBS, durante 1 h a 37°C, en cámaras húmedas.

Posteriormente las células fueron lavadas en PBS 4 veces, por

15 min cada una, a temperatura ambiente, e incubadas con el segundo anticuerpo, ya fuera anti-conejo IgG de cabra conjugado con rodamina (C23), anti-ratón IgG de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (B23) o anti-humano IgG de cabra, diluidos 1/20 en PBS, durante 1 h a 37°C. Las células después fueron lavadas en PBS 4 veces, por 15 min cada una y montadas en medio para fluorescencia (90% glicerol/10% PBS, pH 8, conteniendo 4% de n-propil galato (133a)). Las preparaciones se examinaron con el objetivo de inmersión en un microscopio Leitz Laborlux 11, equipado con iluminación de epifluorescencia y con una cámara Nikon FX-35A y fotómetro Microflex UFX. Para los controles, se utilizaron anticuerpos primarios (preinmunizados) de suero normal de conejo (NRS), de ratón (NMS) o de humano (NHS).

Estudios con drogas. Los cultivos de células PtK<sub>2</sub> fueron tratados con una dosis de 1.0 µg/ml de actinomicina D (Act. D) durante 24 h a 37°C.

Microscopía electrónica. Las células creciendo en monocapas se procesaron para microscopía electrónica de acuerdo con la técnica descrita por Spector y col. (151).

Inmunomicroscopía electrónica. Se realizó básicamente de acuerdo con procedimientos previamente descritos (114,151). En general, las células fueron fijadas en glutaraldehído al 1% en PBS. Se permeabilizaron en Tritón X-100 al 0.2% y se lavaron en PBS con suero normal de ternera al 1% antes de incubárlas con el anticuerpo primario o con suero preinmune durante 1 h a 37°C. Las células se lavaron luego con varios cambios de PBS. Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa, a una dilución de 1:20 durante 1 h a 37°C. El producto de la reacción de la peroxidasa se reveló añadiendo diaminobenzidina (DAB) al 0.5% con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 0.01% por 5 min a temperatura ambiente. Las células después se fijaron con tetraóxido de osmio al 1% y se prepararon para microscopía electrónica de acuerdo con técnicas estándar.

Preparación de cromosomas. Los cromosomas se prepararon por técnicas estándar (73). Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica humana y se cultivaron durante 66 a 72 h en suero humano al 20%, inactivado por calor y conteniendo además 5 µg/ml de leucoaglutinina (PHA-L). después se añadió colcemida a una concentración final de 0.1 µg/ml durante 2 h, a 37°C. Posteriormente se cosecharon las células y se trataron con una solución hipotónica de KCl al 0.075 M durante 10 min a temperatura ambiente. En seguida las células fueron fijadas en

ácido acético-etanol (1:3) por 15 min, 5, veces. Las preparaciones sobre portaobjetos se realizaron con técnicas estándar (44b). Algunas de las muestras se tñeron con Giemsa, a pH 6.8, durante 5 min.

## RESULTADOS

### HIBRIDACION *IN SITU*.

Luego de intentar varios procedimientos (Figura 7), el protocolo de la técnica de hibridación *in situ* adaptado al presente estudio se detalla en la Figura 9. Según se aprecia, hay varios aspectos que se pueden resaltar: la desnaturalización del DNA celular se puede llevar a cabo sin problemas con una solución de NaOH 0.07 N. El tiempo de desnaturalización es un punto crítico en el procedimiento pues oscila entre 45 segundos exactos y 3 minutos, variando entre los tipos celulares utilizados. El tiempo exacto de desnaturalización debe ser encontrado para cada célula, con una precisión del orden de unos pocos segundos. Otro punto importante es el uso de un enjuague, posterior a la hibridación, con PBS durante 10 a 30 minutos. Este enjuague es suficiente para evitar ruido de fondo y no es necesario el uso de condiciones salinas más fuertes.

El número de células que pueden hibridizar en una sola preparación es variable. Con las condiciones óptimas reportadas aquí, se logra el máximo de hibridación (Figura 8). Sin embargo, el porcentaje de células hibridizadas por preparación puede ser eventualmente muy elevado, pero generalmente la hibridación se obtiene hacia los bordes de la preparación. Es necesario realizar estudios más intensos sobre estos aspectos para llegar a tener un método de rutina en el que se obtengan porcentajes cercanos a 100.

La elaboración de filtros de nitrocelulosa para checar la incorporación de nucleótidos biotinados en las diferentes sondas (Figura 9a) indica que el problema de la falta ocasional de hibridación no se debe a falta de marcado, sino a fallas en el procedimiento. En este trabajo se han logrado condiciones óptimas que permiten llevar a cabo un protocolo rutinario de hibridación *in situ* con buenos resultados.

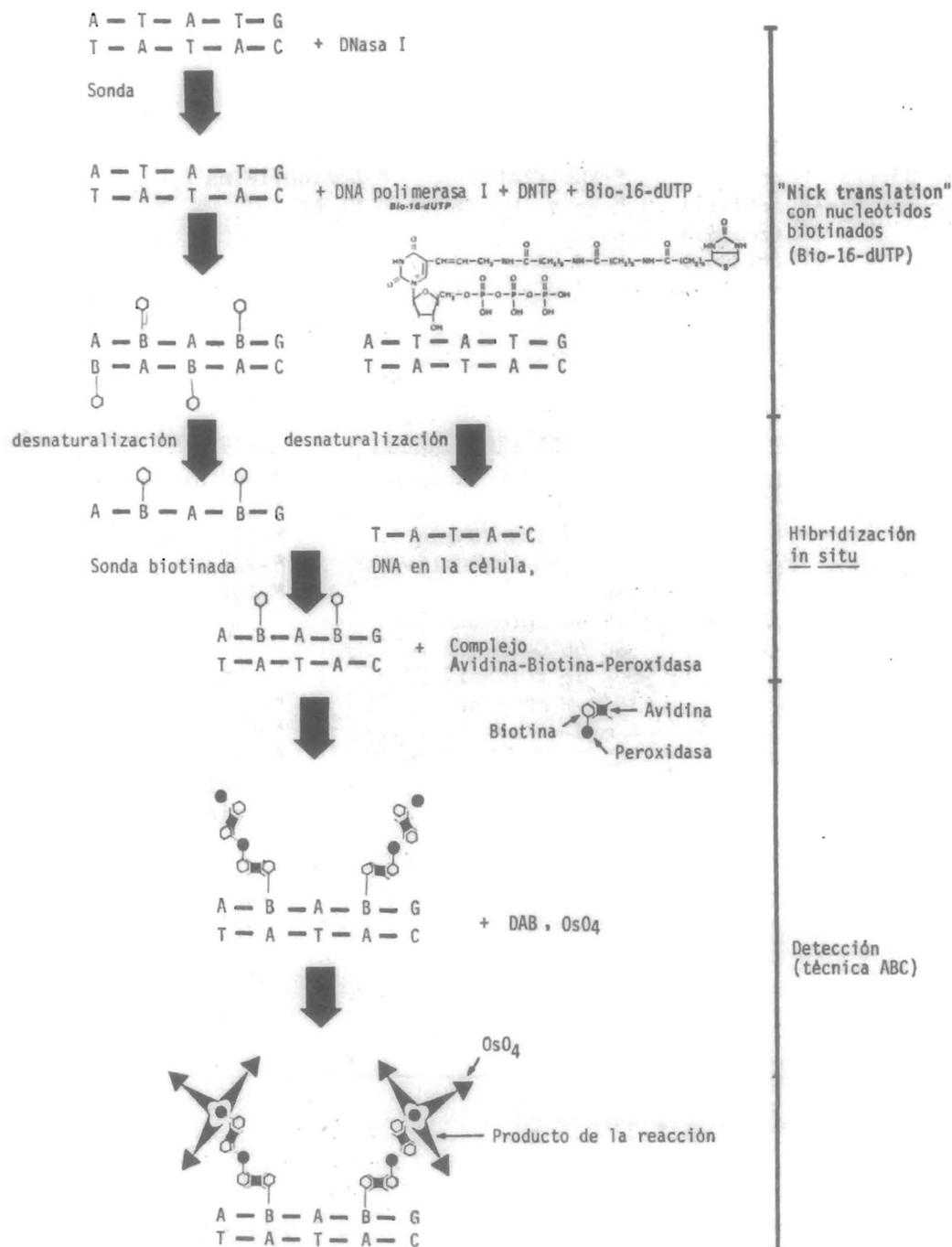


Figura 6. Generación de señal no isotópica en el procedimiento de hibridación *in situ* utilizado. La sonda es incubada con DNasa I pancreática para producir cortes o "nicks" al azar. El DNA es incubado luego en presencia de DNA polimerasa I de *E. coli*, nucleótidos trifosfatados (DNTP) y uridina biotinada (Bio-16-dUTP). La DNA polimerasa I cataliza la adición de residuos nucleotídicos del extremo 5' fosforilo. El "nick" es movido o transferido linealmente a lo largo del DNA. En presencia de nucleótidos biotinados preexistentes los nucleótidos no modificados del DNA son sustituidos por biotina (B). Posteriormente, el DNA biotinado y celular son desnaturalizados e hibridizados *in situ*. Los híbridos son detectados con el complejo avidina-biotina-peroxidasa. El complejo avidina-biotina tiene una constante de afinidad alta ( $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) que mantiene la unión estable. La enzima peroxidasa actúa sobre su sustrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  y en presencia de diaminobenzidina (DAB) como donador de electrones, se produce un precipitado oxidado oscuro. El tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) añade mayor contraste a la preparación. Al final, el producto de la reacción, en forma de precipitado, indica los lugares de hibridación *in situ*.

| Sonda                        | Tipo celular                   | Tratamiento      | Fijación           |
|------------------------------|--------------------------------|------------------|--------------------|
| *-rDNA de rata (p59)         | *-PtK <sub>2</sub> (marsupial) | *-4 µg/ml de     | *-Paraformaldehído |
| *-gene U3snRNA humano        | *-NRK (rata)                   | * Actinomicina D | al 4% 4-15 min     |
| fragm. <i>Hin</i> I (codif.) | *-HeLa (humano)                | 24 hs            | -Sol. A de Carnoy  |
| "      III(codif.)           |                                | -No              | 5 min              |
| "      HI (flanq.)           |                                |                  | -Formaldehído al   |
| *-U3snRNA (hebra no transc.) |                                |                  | 4% 15 min          |
| *-gene rRNA 5S de hámster    |                                |                  |                    |
| *-gene U6snRNA de ratón      |                                |                  |                    |
| -No                          |                                |                  |                    |

| Permeabilización       | Desnaturalización                 | Mezcla de hibridación        |
|------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| *-etanol al 70% 10 min | *-NaOH 0.07 N 15 seg-             | *-50% de formamida           |
| -acetona al 100% 3 min | 10 min                            | *-0.2% de BSA                |
| -20°C                  | - HCl 0.1 N 20 min                | *-10 mM de VRC               |
| -1µg/ml proteinasa K   | -0.1X SSC 100°C 15-               | *-2X SSC                     |
| 15-20 min 37°C         | 180 seg                           | *-10% de sulfato de dextran  |
| -Tritón X-100 0.2%     | -50% de formamida/2X              |                              |
| 5 min                  | SSC 60°C 10 min                   | +                            |
|                        | -60% de formamida/2 x             | *-sonda desnaturalizada      |
|                        | 10 <sup>-4</sup> M EDTA pH 8 55°C | *-DNA de esperma de salmón   |
|                        | 4 min                             | *-Formamida                  |
|                        | -90% de formamida/0.1X            | (calentar a 90°C 10 min, en- |
|                        | SSC 65°C 2.5 hs                   | friar sobre hielo)           |
|                        |                                   | -                            |
|                        |                                   | *-DNA de esperma de salmón   |
|                        |                                   | y/o                          |
|                        |                                   | -Tritón X-100 al 0.2%        |

#### Condiciones de hibridación

| Concentración          | tiempo        | temperatura               |
|------------------------|---------------|---------------------------|
| -0                     | *-4-24 hs     | *-37°C                    |
| *-4-166 ng por muestra |               |                           |
| *-sobre parafilm       | ---sellado    | -calentado 3 min a 80°C   |
| -sobre vidrio          | --*no sellado | *-no calentado            |
|                        |               | *en baño de agua          |
|                        |               | *-en cámara de incubación |
|                        |               | -en plancha caliente      |
|                        |               | *-con amortiguador(atm.)  |
|                        |               | -sin amortiguador         |

| Lavados de posthibridación    | Detección           | % de células hibridizadas                            |
|-------------------------------|---------------------|--|
| -50% de formamida/2X SSC 37°C | -Complejo ABC       | -1-16% (% del área del cubreobjetos con hibridación) |
| 30 min y/o                    | *-nuevo             |  |
| -50% de formamida/1X SSC 37°C | -antiguo            |  |
| 30 min y/o                    | -Fosfatasa alcalina |  |
| -1X SSC 30 min y/o            | -Quimiosonda        |  |
| *-PBS 10 min                  |                     |  |

Figura 7. Diferente condiciones ensayadas para la hibridación *in situ*. Se marcan con \* las mejores condiciones.

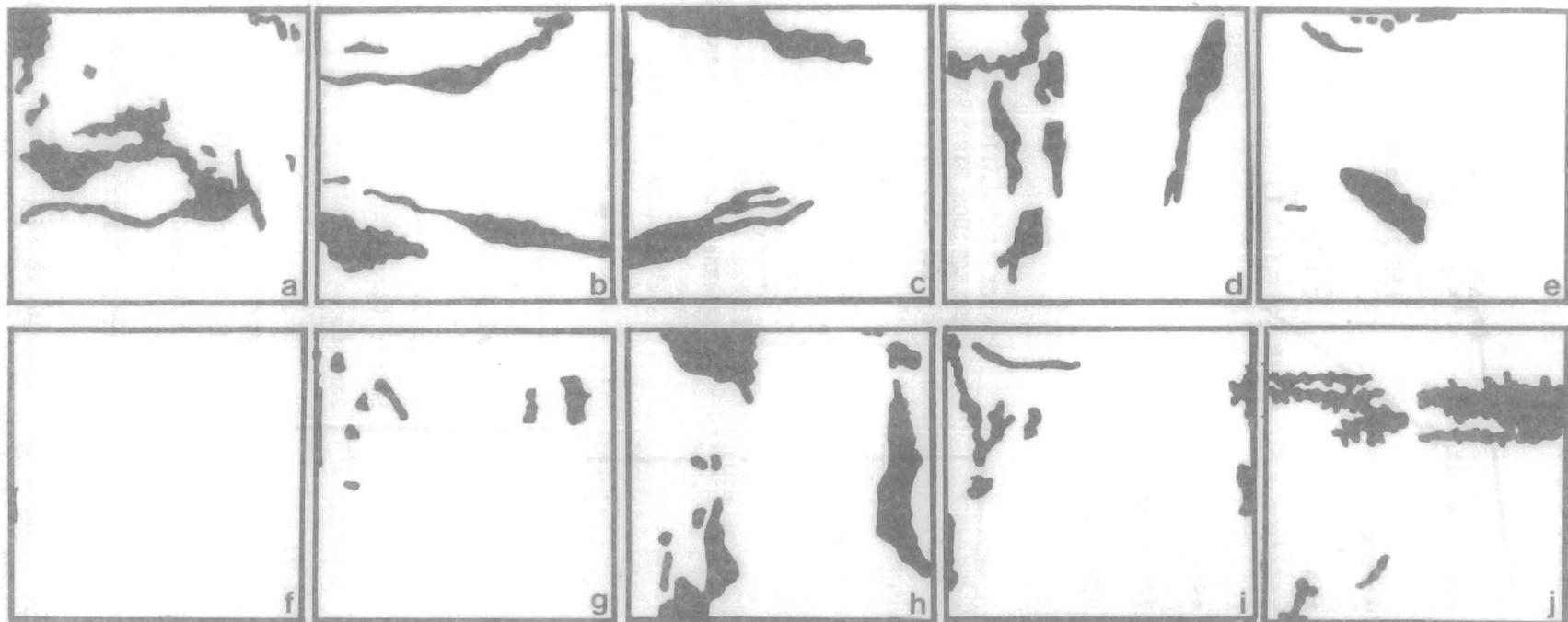


Figura 8. Efecto de diferentes agentes desnaturalizantes sobre el porcentaje de células hibridizadas *in situ*. Cada cuadro representa un cubreobjetos sobre el cual crecieron células NRK en monocapa hasta llegar al estado de confluencia. El área sombreada indica la zona del cubreobjetos que contiene células hibridizadas con la sonda de rDNA. El porcentaje es el área del cubreobjetos ocupada por células que resultaron positivas a la hibridización molecular *in situ*. a) 0.07 N NaOH 3 min, 16%; b) 0.07 N NaOH 4 min, 12%; c) 0.07 N NaOH 5 min, 10%; d) 0.1X SSC 100 C, 30 seg, 11% e) 0.1X SSC 100 C, 60 seg, 4%; f) 0.1X SSC 100 C, 180 seg, 1%; g) 0.2 N HCl 20 min, 4%; h) 90% formamida/0.1X SSC 65 C, 2.5 h, 14%; i) 60% formamida/ 2 X 10<sup>-3</sup> M EDTA, pH 8.0, 55 C 4 min, 5% j) 50% formamida/2X SSC, 60 C, 10 min, 15%.

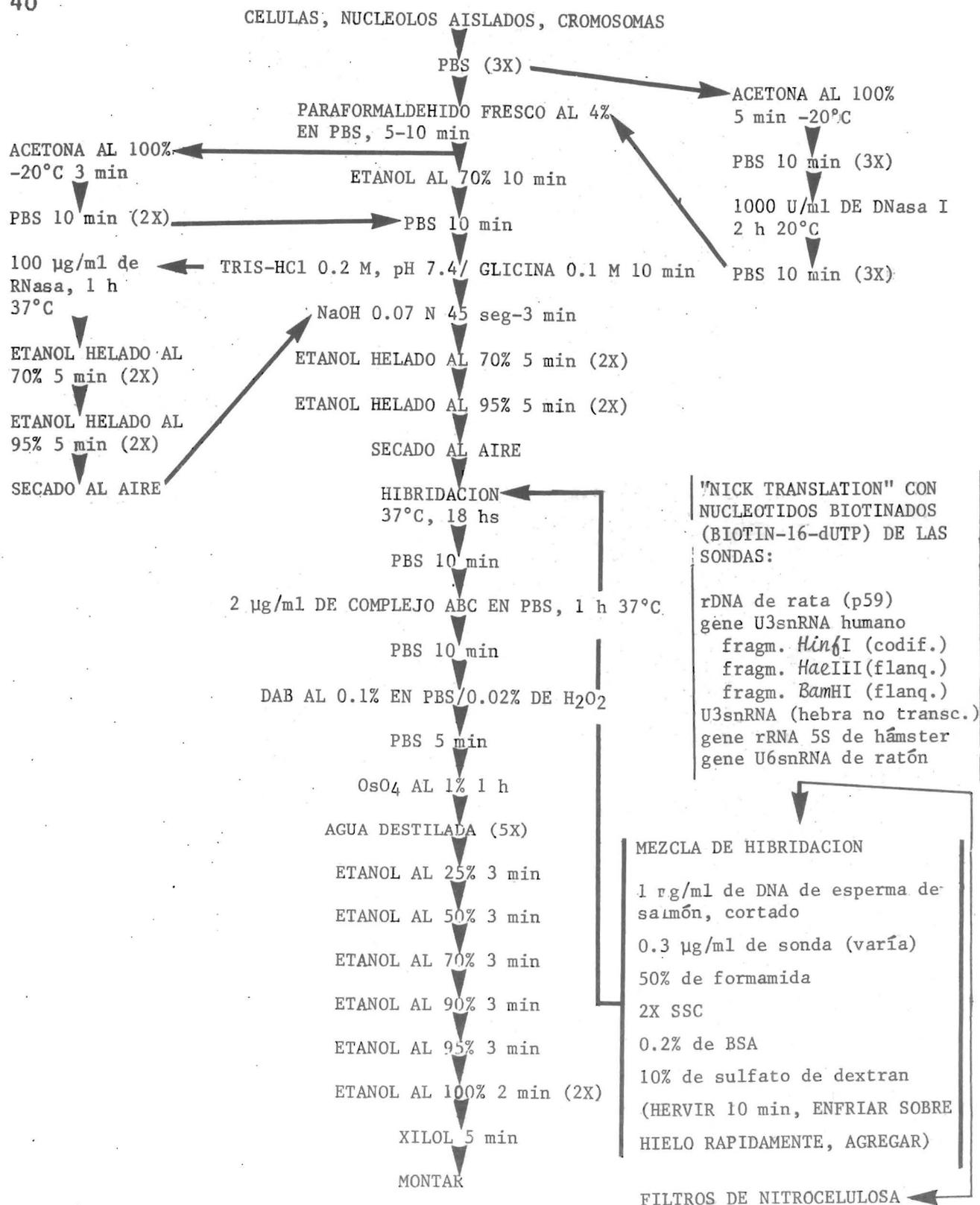


Figura 9. Protocolo de la técnica de hibridación *in situ* seguido en el presente trabajo. El tratamiento con enzimas es opcional, así como la permeabilización con acetona o con alcohol etílico. El calentamiento de la mezcla de hibridación depende de la sonda utilizada.

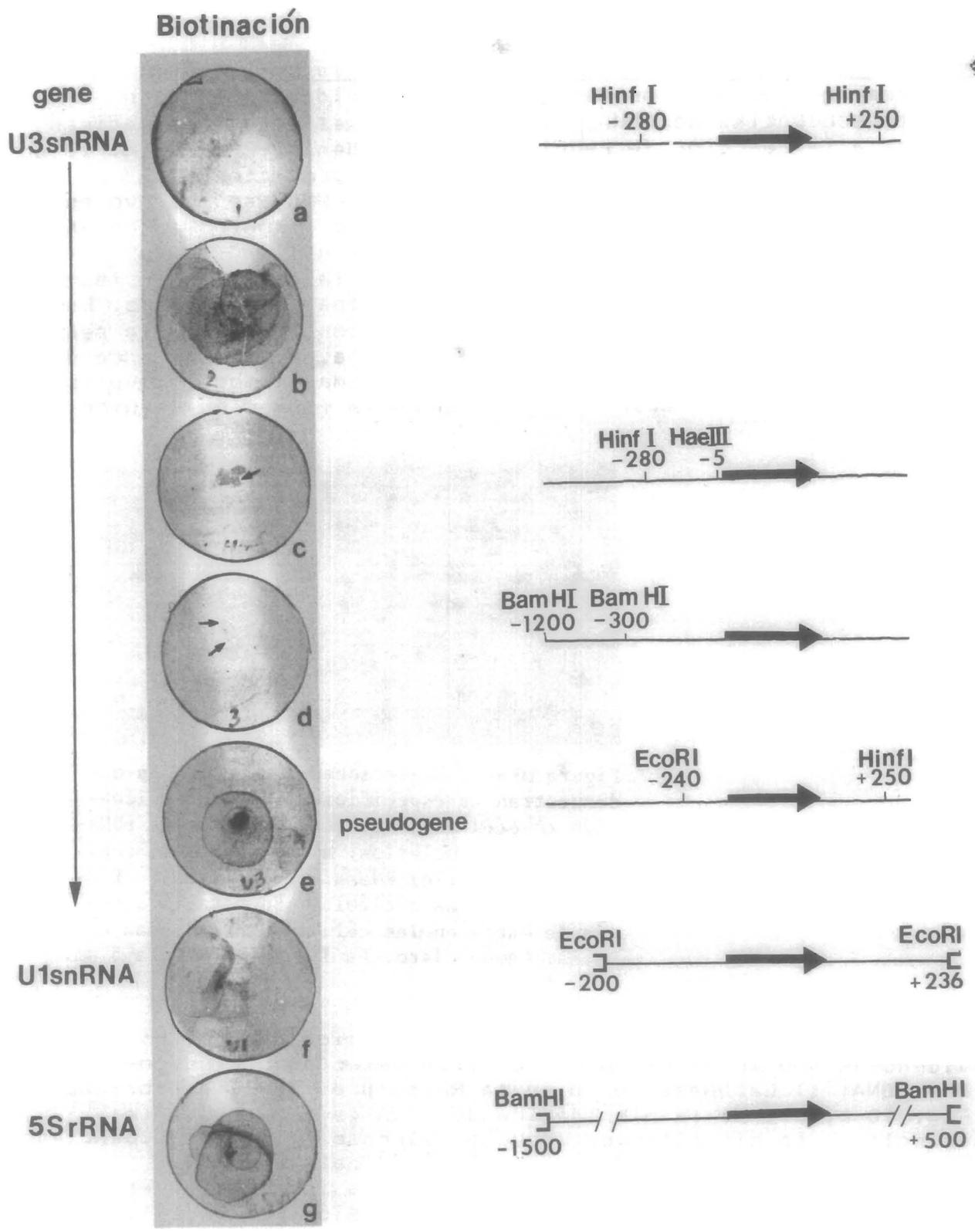


Figura 9a. Sondas g3nicas moleculares biotinadas por "nick translation" (135) y adheridas a filtros de nitrocelulosa por el procedimiento de "dot-blot" (78). A la derecha se representan los fragmentos de restricci3n utilizados en los filtros. La flecha representa la regi3n g3nica que puede ser transcrita. La sonda se adhiere a los filtros y se pone en evidencia con el complejo ABC descrito en Materiales y M3todos. a) Control, la sonda del gene para el U3snRNA no fu3 biotinada; b-d) gene humano de U3snRNA; e) pseudogene humano de U3snRNA; f) gene de U1snRNA humano; g) gene de rRNA 5S de h3mster sirio. No todas las sondas fueron utilizadas para hibridaci3n ni todas las sondas fueron ensayadas en filtros.

**Especificidad de la técnica de hibridación *in situ*.** Para confirmar que nuestro procedimiento de hibridación *in situ* detecta secuencias de rDNA, se hicieron digestiones enzimáticas previas a la reacción de reunión de las cadenas. En la Fig. 10 no se llevó a cabo pretratamiento alguno y el producto de la reacción de la peroxidasa, específico para rDNA, se observó en un sitio preciso dentro de cada nucléolo. No se encontró marca en el nucleoplasma ni en el citoplasma. Cuando se utilizó DNasa (Fig. 10 b), no se encontró el producto de la reacción en las células, aunque éstas mostraron los nucléolos bien fijados. En la Fig. 10 c, las células fueron pretratadas con RNasa A y la señal de hibridación fue similar a la de la Fig. 10 a. La ausencia de un patrón de marcado ribosómico en el citoplasma, demostró que las condiciones de hibridación resultaron en la formación de híbridos

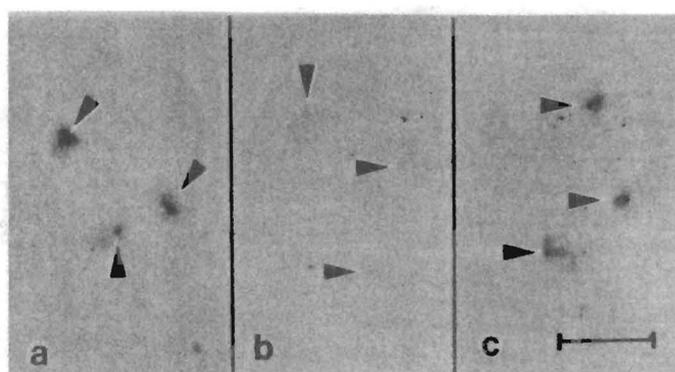


Figura 10 a-c. Digestiones con nucleasas que demuestran la especificidad de la hibridación *in situ* para detectar híbridos de rDNA-rDNA en los nucléolos. a) Control, sin enzimas, b) DNasa, c) RNasa. Las cabezas de flecha indican los nucléolos. Se nota la ausencia de marca en las células NRK tratadas con DNasa. Campo claro. La línea representa 5  $\mu$ m.

tipo rDNA-rDNA y no rDNA-rRNA. Por lo anterior, las siguientes evidencias apoyan el hecho de se están detectando híbridos de rDNA-rDNA: 1) La DNasa, pero no la RNasa previenen la hibridación (Fig. 10 b, c); 2) la hibridación de rDNA es estrictamente nucleolar y no citoplásmica (como en el caso del rRNA evidenciado por medio de la técnica de azul de toluidina) (Fig. 12); 3) el número de NORs cromosómicos (79) en rata es igual al número de sitios de hibridación en cromosomas metafásicos (Fig. 11).

## rDNA DURANTE LA MITOSIS

Distribución de rDNA durante la mitosis por medio de hibridación *in situ*. Posteriormente, queríamos establecer la localización precisa del rDNA durante la mitosis y compararla con la distribución de proteínas nucleolares específicas. La Fig. 11

muestra la localización de secuencias de rDNA en células NRK durante la mitosis. Un núcleo interfásico típico tiene 3 nucléolos marcados (Fig. 11a, cabezas de flecha). En 2 de ellos, la marca aparece como una pareja en dominios discretos. En profase (Fig. 11b), cuando los nucléolos se están dispersando, se observaron 3 pares de puntos (cabezas de flecha) en los sitios probables de los NORs. En metafase (Fig. 11c), la señal de hibridación se presentó en 6 regiones diferentes (cromosomas), alineadas sobre la placa metafásica, correspondientes a los 6 NORs de las células de rata (79). En la anafase (Fig. 11 d), la

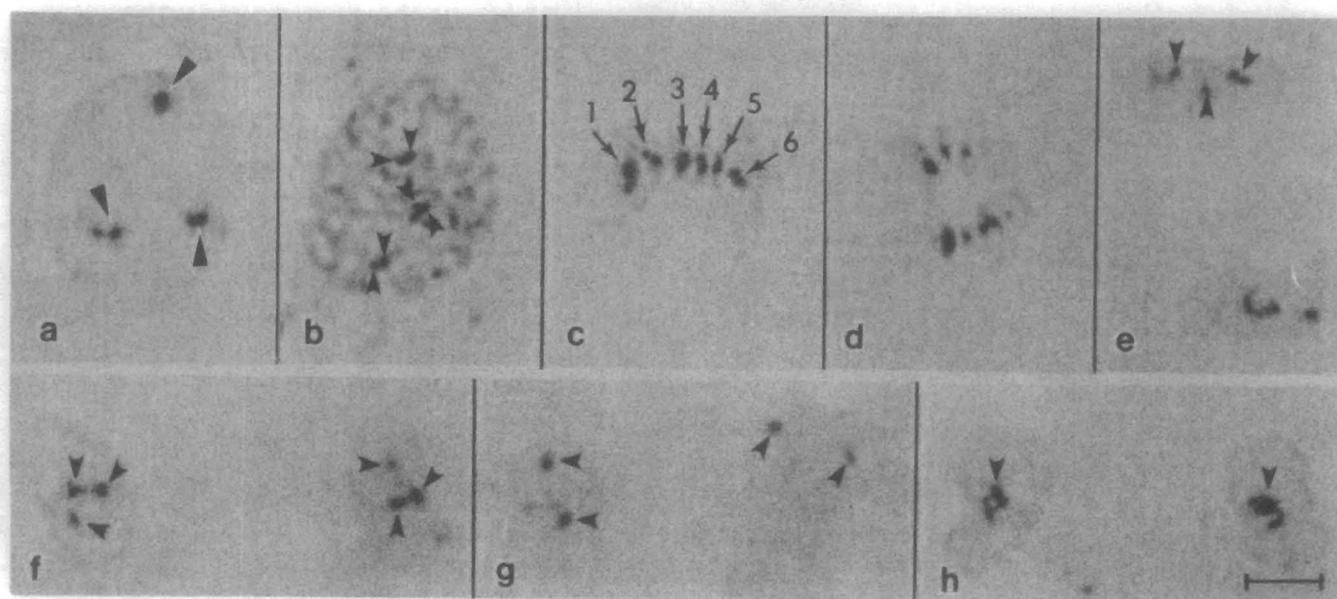


Figura 11a-h. Hibridación molecular *in situ* no isotópica en microscopía de luz con una sonda biotinada de rDNA de rata contra el rDNA de células NRK durante la mitosis. a) Interfase, b) profase, c) metafase, d) anafase, e-h) telofase, correspondientes a la etapa de PNBs de la nucleologénesis. El producto de reacción de la peroxidasa es igual, en general, al número y posición de los 6 NORs en la rata (flechas y cabezas de flecha). Se nota la ausencia de marca en los sitios que corresponden a los PNBs en telofase. Campo claro. La línea representa 5  $\mu$ m.

marca fue vista sobre las cromátidas hermanas. Durante la telofase (Fig. 11 e), las áreas de hibridación (cabezas de flecha) indican los sitios de la construcción nucleolar durante la nucleologénesis. La marca estuvo ausente en los cuerpos prenucleolares, excepto en los NOR-PNBs (comparar con la Fig 13e).

Distribución de rRNA durante la mitosis. Para confirmar que los experimentos de hibridación *in situ* habían detectado rDNA y no rRNA, algunas células fueron teñidas para RNA con azul de toluidina alcohólico a pH ácido. Esto nos permitió comparar la distribución de rRNA y rDNA durante el ciclo celular. La Fig. 12 muestra el patrón de tinción en células NRK durante la mitosis. En células interfásicas (Fig. 12 a), la tinción ocurre principalmente en el citoplasma y en los nucléolos. La masa nucleolar no fue teñida homogéneamente, como lo muestra la

presencia de áreas claras (cabezas de flecha) que indican ausencia de colorante. Estas áreas tienen un patrón punteado y pueden representar a los FCs (151). Con esta técnica, la mayoría del RNA detectable puede ser rRNA puesto que sólo el nucléolo y el citoplasma son teñidos muy intensamente. En profase (Fig. 12b), la tinción se distribuyó en el citoplasma, pero una parte del colorante se depositó entre los cromosomas en condensación (cabezas de flecha). En metafase (Fig. 12 c), la tinción fué muy intensa, particularmente alrededor de la masa cromosómica (cabezas de flecha). En anafase (Fig. 12 d), la tinción se localizó en la interzona de cromosomas en separación (cabezas de flecha). Durante la telofase (Fig. 12 e), la tinción se restringió al citoplasma y no se detectó en la masa cromosómica descondensante.

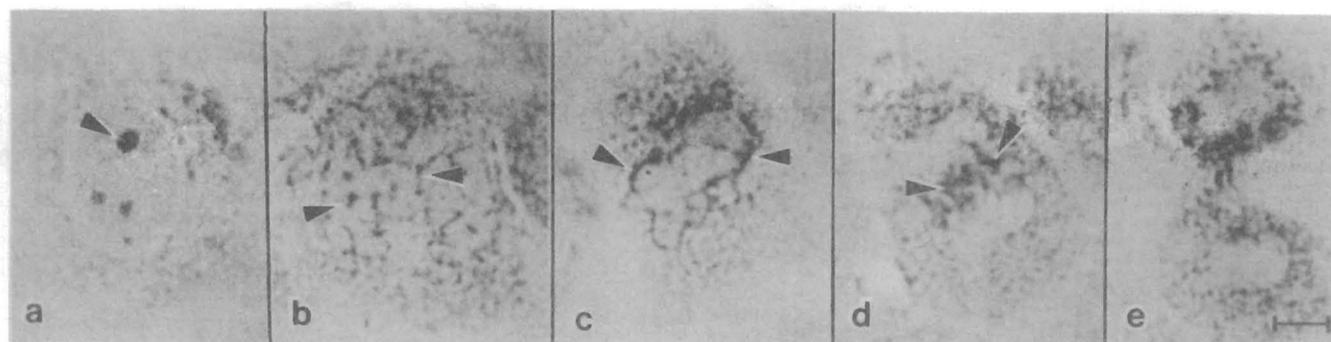


Figura 12a-e. Tinción con azul de toluidina alcohólico-ácido en células NRK durante la mitosis. a) Interfase, b) profase, c) metafase, d) anafase, e) telofase. La tinción se restringe al citoplasma y al nucléolo (cabeza de flecha en a). En profase, la tinción se localiza en el citoplasma y entre los cromosomas en descondensación (cabezas de flecha). En metafase, la tinción está distribuida alrededor de los cromosomas y como una envoltura bien definida, mientras que en anafase se observa como una interzona entre las células hijas (cabezas de flecha). Durante la telofase, la tinción ocupa el citoplasma, como en las etapas previas. No se pudo detectar tinción alguna en los PNBs con esta técnica. Campo claro. La línea representa 5  $\mu$ m.

Localización de proteínas Ag-NOR durante la mitosis Puesto que nos interesaba conocer las asociaciones precisas entre el rDNA y proteínas nucleolares específicas durante la inactivación y reactivación de la transcripción ocurridas durante la mitosis, decidimos utilizar la técnica argéntica para NOR (Ag-NOR) como marcador de los genes ribosómicos activos (103). En la interfase (Fig 13 a), fué evidente la presencia de un patrón puntiforme en cada nucléolo, lo cual indicó la presencia de varios FCs. Cuando el nucléolo se disgrega en profase (Fig. 13 b), los depósitos de plata se restringieron a los NORs y obtuvieron un tamaño mínimo en metafase (Fig. 13 c) y anafase (Fig. 13 d). Los depósitos de plata aparecieron como tres parejas de puntos bien definidos sobre la placa metafásica, los cuales se separaron subsecuentemente para dar lugar a 3 NOR teñidos en cada célula hija (flechas). Durante la telofase (Fig. 13 4e), los granos de plata aparecieron en numerosos PNBs (cabezas de flecha) que se

fusionaron con los 3 NOR-PNBs teñidos más intensamente (flechas). Estos se distinguieron de los otros PNBs debido a su tamaño y a su intensidad de tinción mayores. El número de NOR-PNBs teñidos con plata fuè igual al número de regiones teñidas cuando se aplicó la técnica de hibridación *in situ*, i.e., fuè de 3 (Fig. 11 e).

Localización de fibrilarina durante la mitosis. Para caracterizar más específicamente cuales proteínas se asocian al rDNA y/o al rRNA a lo largo de la mitosis y de la nucleogénesis, se utilizó

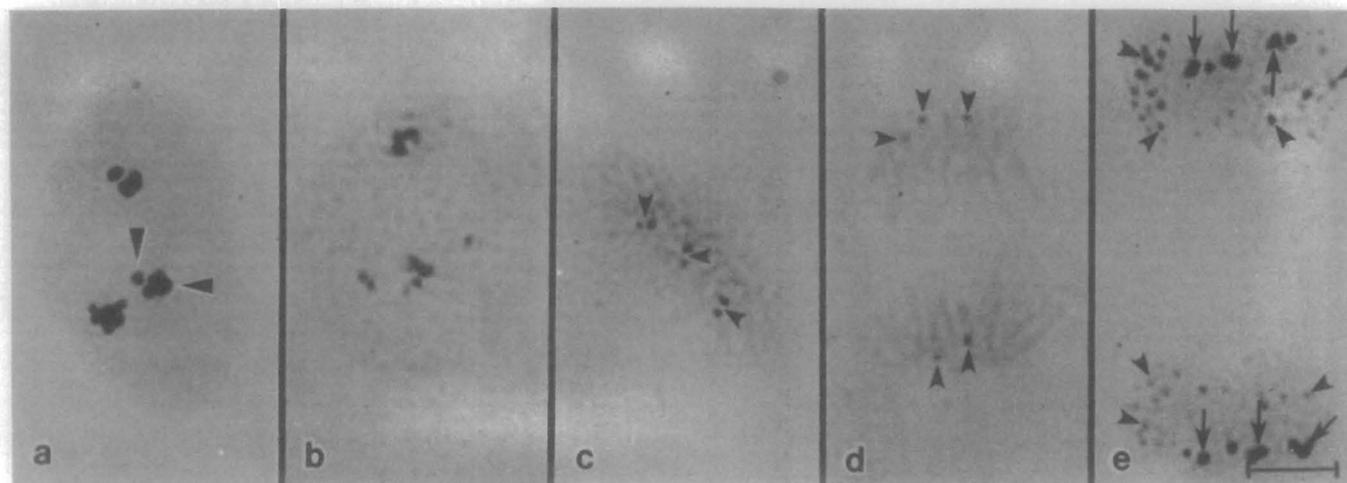


Figura 13a-e. Tinción Ag-NOR para microscopía de luz en células NRK durante la mitosis. a) Interfase, b) profase, c) metafase, d) anafase, e) telofase. La marca se observa en los FCs en interfase y sólo en los NORs de metafase a anafase (flechas). Durante la telofase, es característica la aparición abrupta de PNBs numerosos (cabezas de flecha) y la presencia de "NOR-PNBs" más grandes (flechas) en este estado de la nucleogénesis. Campo claro. La línea representa 5  $\mu$ m.

la técnica de inmunomarcado con anticuerpos contra las proteínas nucleolares fibrilarina y RNA polimerasa I. Debido a que la fibrilarina es quizá una proteína asociada al rDNA y/o al pre-rRNA (116), se siguió su comportamiento durante la mitosis y se comparó con el de el rDNA. En células NRK, la fibrilarina se encontró en un patrón puntiforme o filamentososo en interfase (Fig. 15 a y f, cabezas de flecha). Esta distribución fuè similar a la de las proteínas-Ag pero varió con respecto de la distribución de rDNA (Figs. 11 a y 13 a). Durante la profase (Figs. 15 b,g), la fibrilarina se dispersó en el nucleoplasma, hasta que virtualmente no pudo detectarse en la metafase (Figs. 15 c, h). En la anafase (Figs. 15 d, i), la fibrilarina apareció gradualmente en la superficie de los cromosomas (cabezas de flecha). Durante la telofase (Figs. 15 e, j), la fibrilarina tuvo el mismo comportamiento que las proteínas-Ag y apareció en PNBs numerosos (cabezas de flecha) así como en los NOR-PNBs (flechas).

Localización de la RNA polimerasa I durante la mitosis. Se hizo inmunofluorescencia con anticuerpos contra la RNA pol I puesto que se sabe que esta enzima se encuentra en los NORs en cromosomas metafásicos y en los FCs en la interfase (142) y es responsable de la síntesis de pre-rRNA. Por esto, es de interés determinar su localización durante la mitosis, en relación con su asociación con el rDNA. La Fig. 16 ilustra la distribución de la RNA pol I durante la mitosis. En la interfase (Figs. 16 a, f), se observó un patrón puntiforme en cada uno de los nucléolos

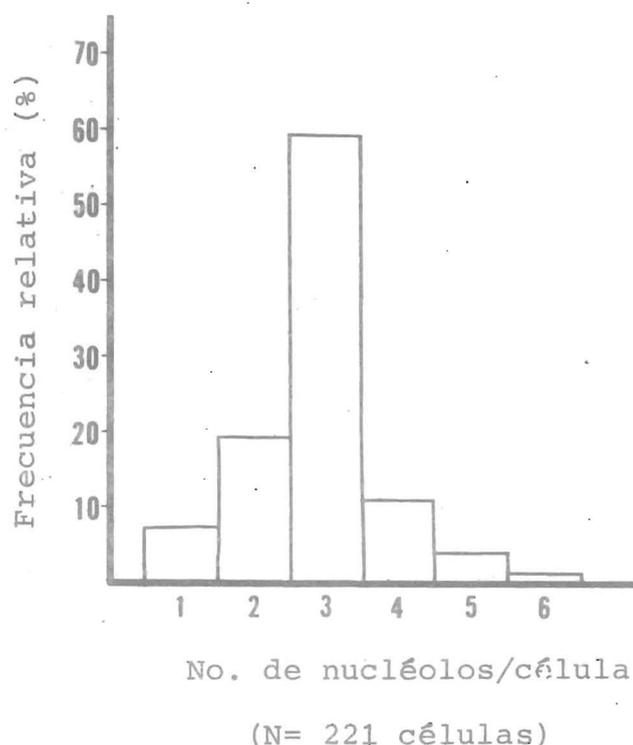


Figura 14. Distribución de frecuencias que indica el número de nucléolos por cada célula NRK. Aproximadamente el 60% de la población celular muestra 3 nucléolos en interfase.

(cabezas de flecha). Este patrón de tinción fue similar al observado con tinción-Ag y fibrilarina (Figs. 13 a y 15 a). En profase, la enzima RNA pol I se distribuyó hacia el nucleoplasma (Figs. 16 b, g). En metafase (Figs. 16 c, h), se observó como pares

de puntos en la placa metafásica (flechas). En la anafase (Figs. 16 d, i), las cromátidas hermanas se separaron y se observaron

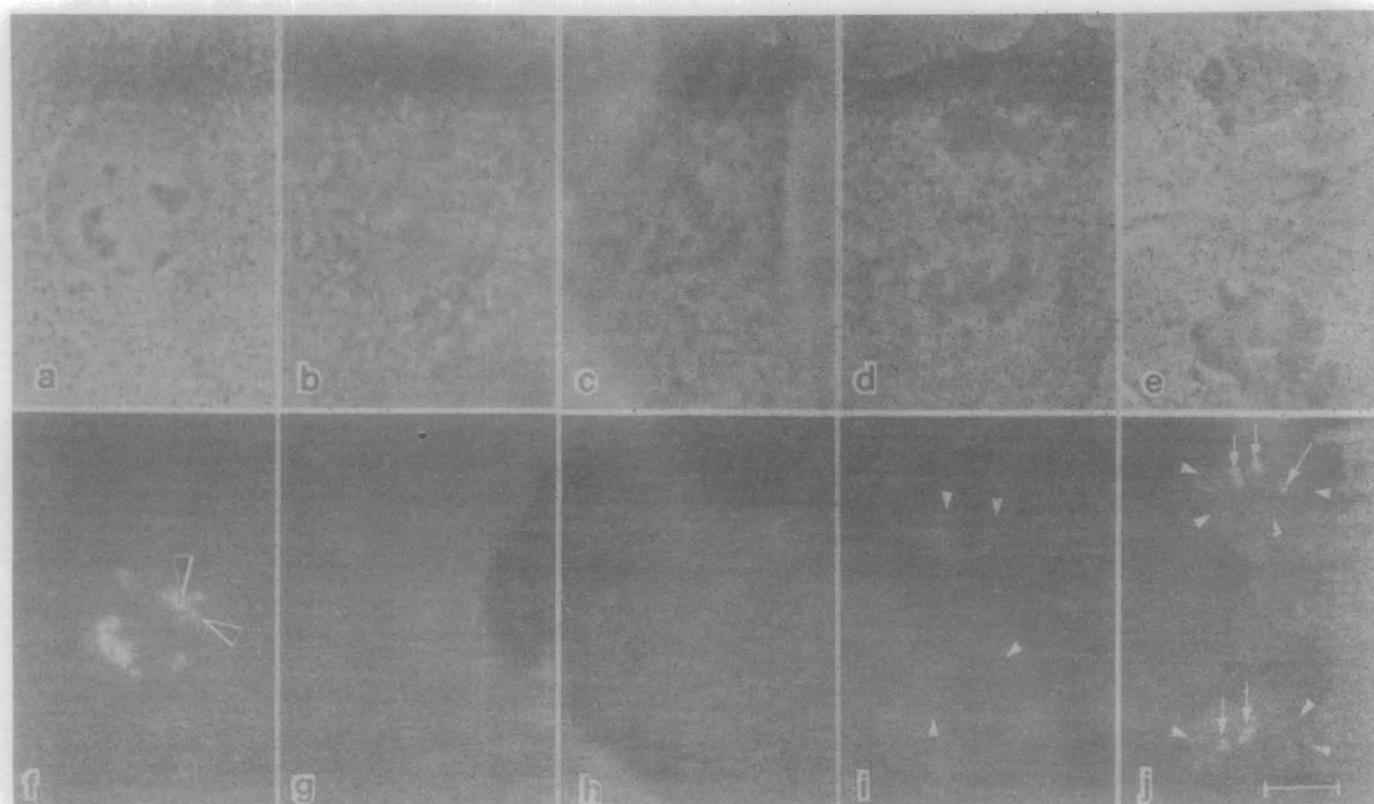


Figura 15a-j. Contraste de fases (a-e) y la correspondiente inmunofluorescencia indirecta (f-j) de células NRK durante la mitosis, marcadas con un anticuerpo contra la proteína nucleolar fibrilarina. a, f) Interfase, b,g) profase, c, h) metafase, d, i) anafase, e, j) telofase. En la interfase, se observa un patrón puntiforme y/o filamentosos. De la profase a la metafase, la fibrilarina se dispersa gradualmente y, en anafase, reaparece sobre la superficie de los cromosomas (cabezas de flecha). Durante la telofase, la fibrilarina es apenas detectable en los PNBs (cabezas de flecha) y muy abundante en los "NOR-PNBs" (flechas). La similitud con la tinción-Ag es muy clara, especialmente durante la telofase (Comparar con la Figura ). La línea representa 5  $\mu$ m.

varios puntos (indicativos de la presencia de RNA pol I) que reflejaban la distribución de NORs "activos". Durante la telofase (Figs. 16 e, j-n), la enzima se asoció con los NOR-PNBs (flechas en la Fig. 16 j) pero no con los otros PNBs.

#### ESTUDIOS CON ACTINOMICINA D

Efecto de 1  $\mu$ g/ml de Actinomicina D durante 24 hs sobre células Ptk<sub>2</sub> en cultivo. Posteriormente se deseaba conocer la presencia o ausencia de rDNA en PNBs inducidos por la acción de la droga actinomicina D (144). La droga segrega al núcleo en sus

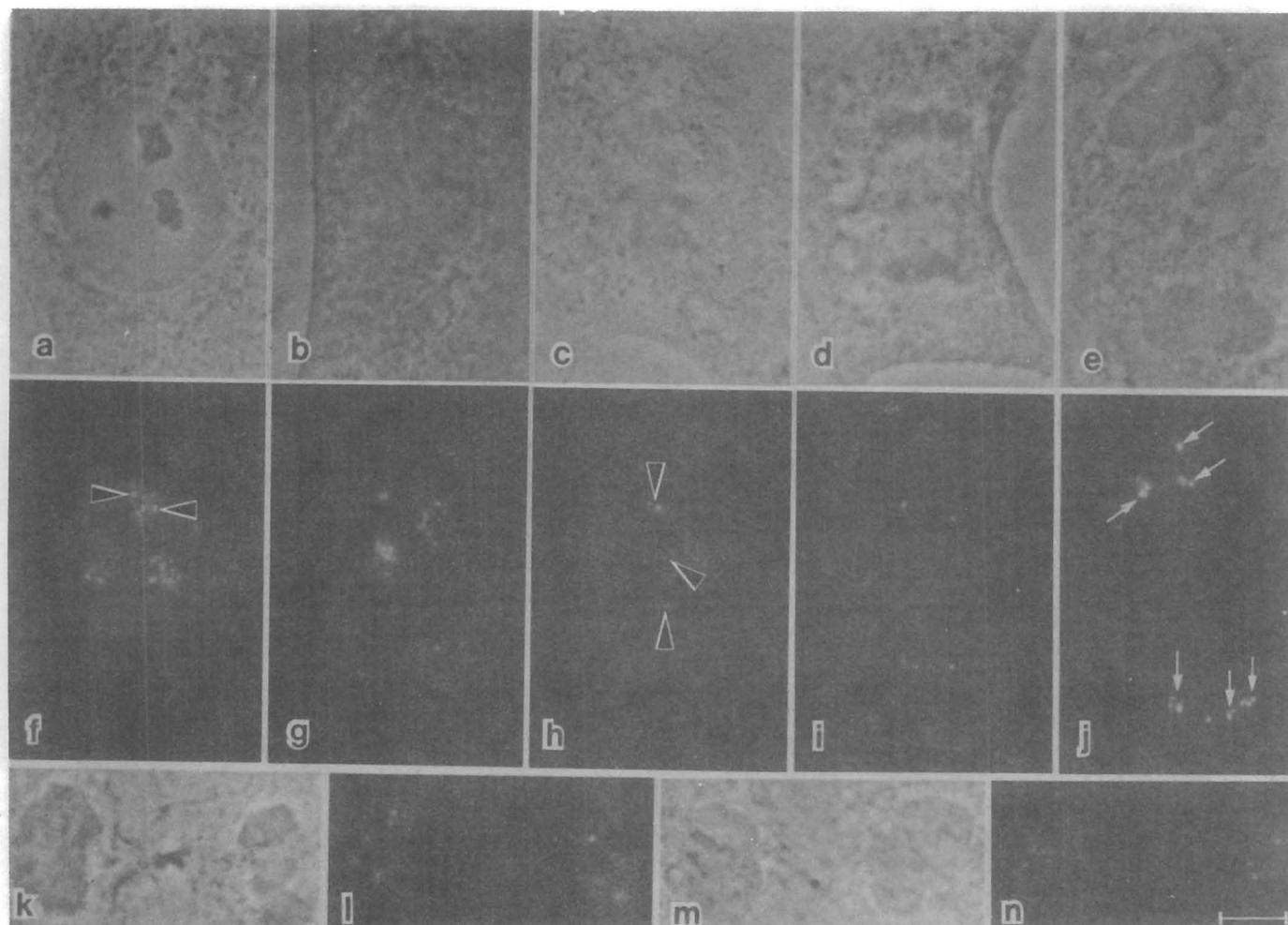


Figura 16 a-n. Contraste de fases (a-e, k, m) y la correspondiente inmunofluorescencia indirecta (f-j, l, n) de células NRK durante la mitosis, marcadas con un anticuerpo contra la RNA polimerasa I. a-f) Interfase, b, g) profase, c, h) metafase, d, i) anafase, e, j-n) telofase. En la interfase, el patrón puntiforme refleja la localización de los FCs (cabezas de flecha). Posteriormente, la RNA polimerasa I se localiza en los NORs en metafase (cabezas de flecha) y anafase. Durante la telofase la RNA polimerasa I se asocia con los "NOR-PNBs" (flechas en j) pero no con otros PNBs (j-n). La línea representa 5  $\mu$ m.

componentes estructurales y, a ciertas dosis, produce PNBs que se han caracterizado en cuanto a algunos de sus componentes químicos. Contienen las proteínas nucleolares B23, C23 y fibrilarina (113,114). Realizando estos experimentos, obtuvimos un resultado no descrito antes en la literatura.

En la Figura 17 se observan los resultados. En contraste de fases de células aún vivas (posteriormente mueren) Fig. 17a), el nucléolo se observa disgregado en 2 cuerpos principales, redondos y relativamente grandes (cabezas de flecha), y en otros cuerpos pequeños del tipo de los PNBs (flechas). Las mismas células de

a) fueron tratadas con la tinción-Ag b) y se observó que uno de los cuerpos densos y grandes en a) era teñido muy intensamente con plata (cabeza de flecha), mientras que el otro sólo se teñía en su centro (cabeza de flecha doble). También se observó la presencia de una masa homogénea y amarillenta (flecha). Las mismas célula en b) y en a) fueron analizadas en contraste de fases y se notó que los lugares teñidos con plata eran

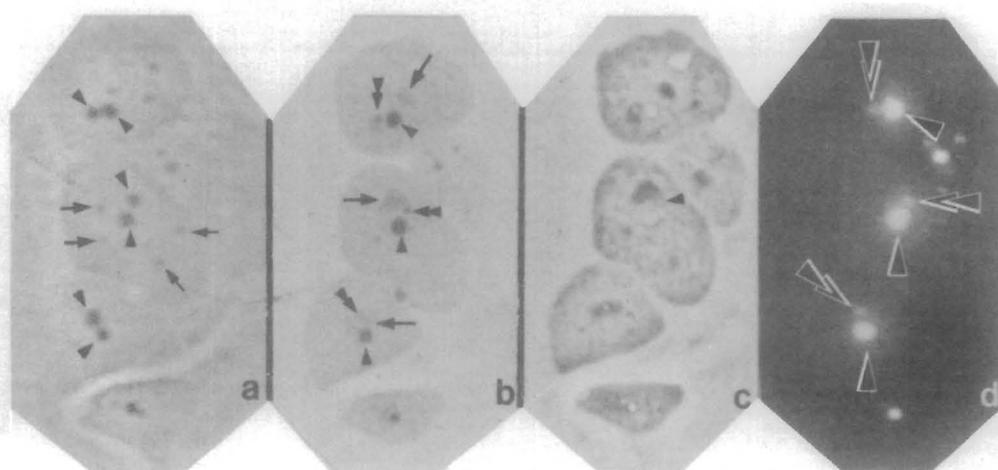


Figura 17. Efecto de la aplicación de 1  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicina D durante 24 horas sobre células PtK<sub>2</sub> en cultivo. a) En contraste de fases, el nucléolo se observa separado en 2 cuerpos redondos, grandes y densos (cabezas de flecha) y en otros cuerpos pequeños (flechas). b) Tinción-Ag de las mismas células. Uno de los cuerpos grandes se tiñe intensamente (cabeza de flecha) y el otro sólo en el centro (cabeza de flecha doble). Se observa una masa más laxa de material ligeramente teñido (flecha). c) Las mismas células teñidas, en contraste de fases. Los cuerpos teñidos con plata dan una apariencia birrefringente (cabeza de flecha en uno de ellos). d) Inmunolocalización de la proteína nucleolar fibrilarina en las mismas células. Se tiñen las mismas zonas teñidas con plata en b), es decir, contienen fibrilarina (cabeza de flecha y cabeza de flecha doble). X 100.

birrefringentes y por lo tanto, más fácilmente observables y distinguibles. El cuerpo denso en a), que en b) se tiñó muy intensamente con plata, mostró la mayor birrefringencia en c) (cabeza de flecha). Exactamente las mismas células fueron tratadas con un anticuerpo marcado con fluoresceína, contra la proteína nucleolar fibrilarina, previo a la tinción-Ag. Los resultados se observan en d). El mismo cuerpo teñido intensamente con plata, birrefringente y denso en contraste de fases, contenía la mayor parte de la fibrilarina (cabeza de flecha). El otro cuerpo también contenía fibrilarina, pero sólo en la misma parte central que fué teñida con plata (cabeza de flecha doble).

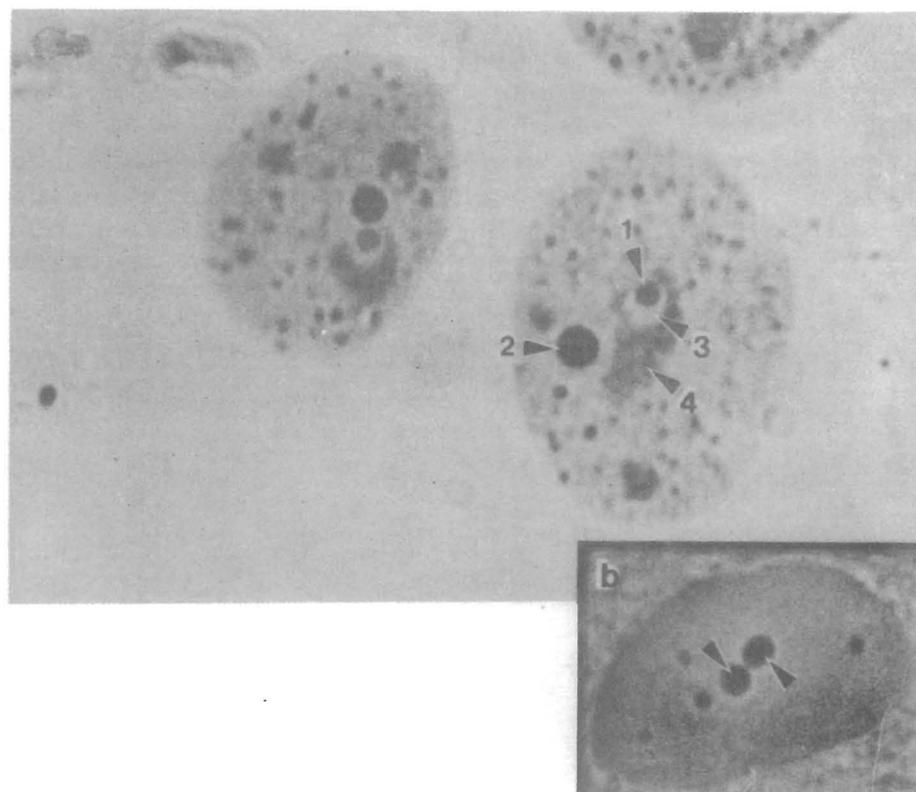


Figura 18. Tinción de plata específica para la región del organizador nucleolar (NOR) a) y microscopía de contraste de fases b) en células PtK<sub>2</sub> de rata canguro, tratadas con 1 µg/ml de actinomicina D durante 24 horas. En microscopía de contraste de fases b), las células tratadas con actinomicina D resultaron en la formación de dos cuerpos densos redondos y de igual tamaño (cabezas de flecha). La tinción-Ag en este tipo de células resultó en la formación de un cuerpo redondo teñido con plata 2) y un cuerpo argentafín redondo más pequeño 1), rodeado por una zona clara (halo) 3) que daba la apariencia de un "tiro al blanco". Una masa amarilla 4) a su vez circundaba esta última estructura. X 100.

Localización de proteínas-Ag en células PtK<sub>2</sub> tratadas con 1 µg/ml de actinomicina D durante 24 hs. Enseguida se analizó más detalladamente la figura producida por el tratamiento con la droga. En la Figura 18 se observan células PtK<sub>2</sub> teñidas con la tinción-Ag y en contraste de fases. En b) se notan los dos cuerpos densos en contraste de fases (cabezas de flecha). En a) se observa una de las células con las 4 zonas producidas por la segregación nucleolar. Uno de los cuerpos (#2) fué teñido muy intensamente con plata, es redondo y grande. El otro cuerpo está formado por un centro pequeño, redondo y teñido también con plata (#1), rodeado por un halo claro (#3). Ambas estructuras semejan un "tiro al blanco" y por ello, fué nombrado así. Hay aún otro

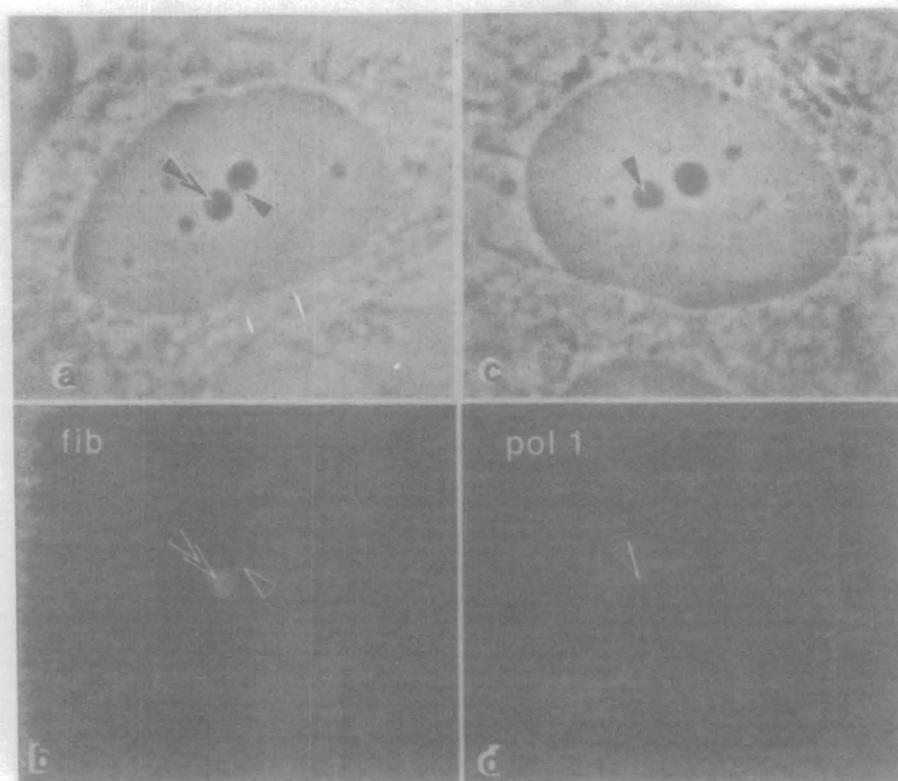


Figura 19. Inmunofluorescencia de las proteínas nucleolares fibrilarina y RNA polimerasa I en células PtK<sub>2</sub> tratadas con 1 µg/ml de actinomicina D durante 24 horas. a y b) Contraste de fases e inmunofluorescencia de la proteína fibrilarina. Uno de los cuerpos densos en contraste de fases se tiñe intensamente con anti-fibrilarina (cabeza de flecha doble); el otro sólo en el centro (cabeza de flecha). c y d) Contraste de fases y la correspondiente inmunofluorescencia para la RNA polimerasa I. Sólo uno de los cuerpos densos es positivo con anti-RNA polimerasa I (cabeza de flecha). X 100.

elemento que se tiñe homogéneamente de color amarillo claro y que rodea al halo, aunque no simétricamente (#4). En el nucleoplasma también se observan PNBs muy pequeños y abundantes.

Inmunofluorescencia sobre células PtK<sub>2</sub> en cultivo, tratadas con 1 µg/ml de actinomicina D. Posteriormente se utilizó la técnica de inmunofluorescencia para corroborar si esos cuerpos eran derivados nucleolares o no. En la Figura 19 a y b) se observa a las células en contraste de fases y la inmunolocalización de la proteína fibrilarina, respectivamente. uno de los cuerpos densos en contraste de fases se tiñe completamente cuando se utiliza anti-fibrilarina acoplado con fluoresceína (cabeza de flecha doble). El otro sólo se marca en el centro (cabeza de flecha).

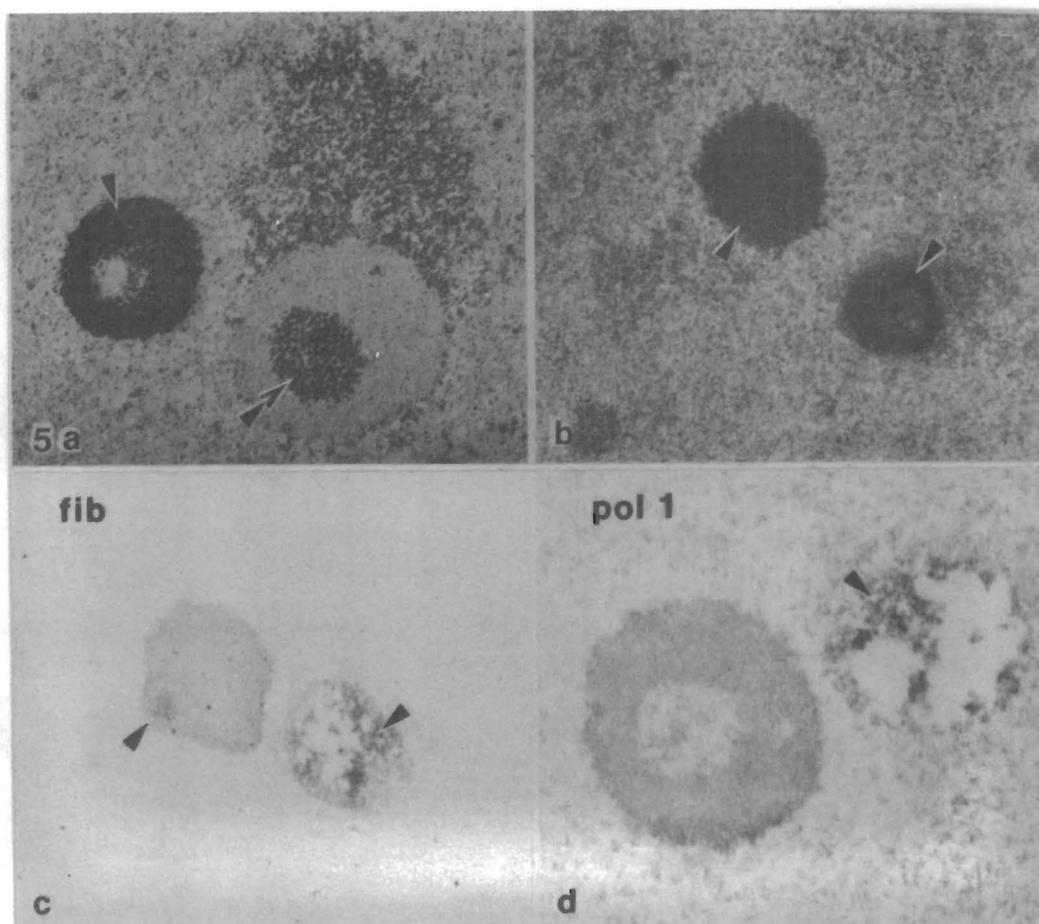


Figura 20. Microscopía electrónica de células PtK<sub>2</sub> tratadas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicina D durante 24 horas. a) Tinción-Ag que muestra la marca del cuerpo teñido densamente (cabeza de flecha) y del "tiro al blanco" (cabeza de flecha doble). b) Fijación con glutaraldehído y tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo, en donde se muestra la morfología de los 2 cuerpos producidos después del tratamiento con la droga (cabezas de flecha). c) Inmunomarcado con anti-fibrilarina acoplado a peroxidasa (cabezas de flecha) en los cuerpos nucleolares producidos por el tratamiento con actinomicina D. d) Inmunomarcado con anti-RNA polimerasa I acoplado a peroxidasa (cabeza de flecha) en sólo uno de los cuerpos nucleolares producidos por la droga. X 8 000.

En la Fig. 19 c y d) se utilizó un anticuerpo contra la RNA polimerasa I. Sólo uno de los cuerpos densos en contraste de fases fué marcado (cabeza de flecha). Ese cuerpo es el mismo que se tiñe con anti-fibrilarina.

Microscopía electrónica, tinción-Ag para microscopía electrónica e inmunomicroscopía electrónica de células PtK<sub>2</sub> en cultivo, tratadas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicina D durante 24 hs. El siguiente paso fué el de conocer la composición proteica y la estructura fina de esos cuerpos densos, por medio de microscopía electrónica. Los resultados se ilustran en la Figura 20. En la

Fig. 20 a) se utilizó la tinción-Ag modificada para células en cultivo y microscopía electrónica (69). Uno de los cuerpos se tiñe intensamente (cabeza de flecha), en tanto que el otro sólo se contrasta en el centro, de manera idéntica a como se observó con microscopía de luz. La masa amarillenta presenta un contraste ligero. El halo claro no se tiñe con plata. En la

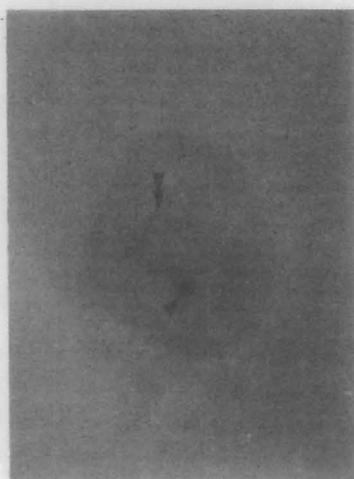


Figura 21. Hibridación molecular *in situ* en células PTK<sub>2</sub> tratadas con 1 µg/ml de actinomicina D durante 24 horas; utilizando una sonda biotinada de rDNA de rata. El producto de la reacción de la peroxidasa se observa sólo en uno de los cuerpos redondos producidos por la droga (cabeza de flecha), indicando que contiene rDNA. El otro cuerpo carece de marca, es decir, de rDNA (cabeza de flecha doble). Tanto el citoplasma como el nucleoplasma son negativos a la reacción. X 100.

Fig. 20 b) se observa la ultraestructura de ambos cuerpos cuando se utiliza la técnica estándar para microscopía electrónica, es decir, fijación con glutaraldehído y contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. El cuerpo que se contrasta con plata es de naturaleza fibrilar (cabeza de flecha) y homogéneo. El otro

cuerpo es fibrilar en la periferia (halo claro, cabeza de flecha) y poco denso a los electrones en su centro. La masa amarilla es de naturaleza granular.

En la Fig. 20 c) se utilizó inmunomicroscopía electrónica con anticuerpos marcados con peroxidasa, contra la proteína

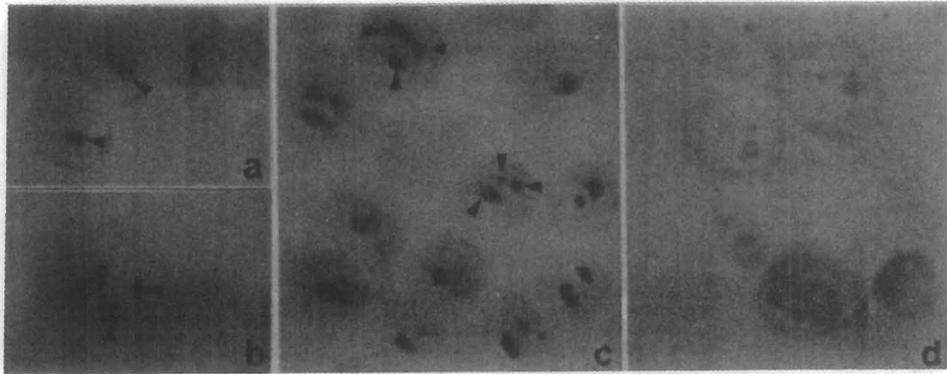


Figura 22. Localización del gene para el U3snRNA humano en células HeLa, por medio de hibridación molecular *in situ* con el fragmento de restricción *Hin*I biotinado. La marca se observa exclusivamente en ciertas zonas del nucléolo (cabezas de flecha) cuando no hay tratamiento enzimático previo a y b). En c), se hizo un tratamiento previo a la reacción de hibridación, con 100  $\mu$ g/ml de RNasa A durante 1 hora a 37°C; la marca se observa en los nucléolos (cabezas de flecha). d) Cuando se utiliza DNasa I a una concentración de 1000 U/ml previo a la hibridación, la marca no se observa en las células. Sin embargo, la enzima no daña la morfología nucleolar. Campo claro, X 100.

fibrilarina. Uno de los cuerpos se contrasta completamente, aunque se observan espacios debido a la preservación ineficiente del material dada la técnica (fijación en formaldehído) (cabeza de flecha a la derecha). El otro cuerpo se contrasta sólo en una región, de igual forma como ocurrió cuando se observó con microscopía de luz. No hay marca en el nucleoplasma.

En la Fig. 20 d) se observa la inmunolocalización al microscopio electrónico cuando se utiliza un anticuerpo contra la proteína RNA polimerasa I. Sólo el cuerpo positivo a la plata y a la antifibrilarina, es positivo también para la anti-RNA polimerasa I (cabeza de flecha). Los espacios corresponden seguramente a la mala preservación de la muestra debido a la fijación.

Hibridación molecular *in situ* con una sonda de rDNA biotinado de rata, contra células Ptk<sub>2</sub> en cultivo, tratadas con 1  $\mu$ g/ml de actinomicina D durante 24 hs. Enseguida, se investigó la distribución de los genes ribosómicos en células tratadas con la

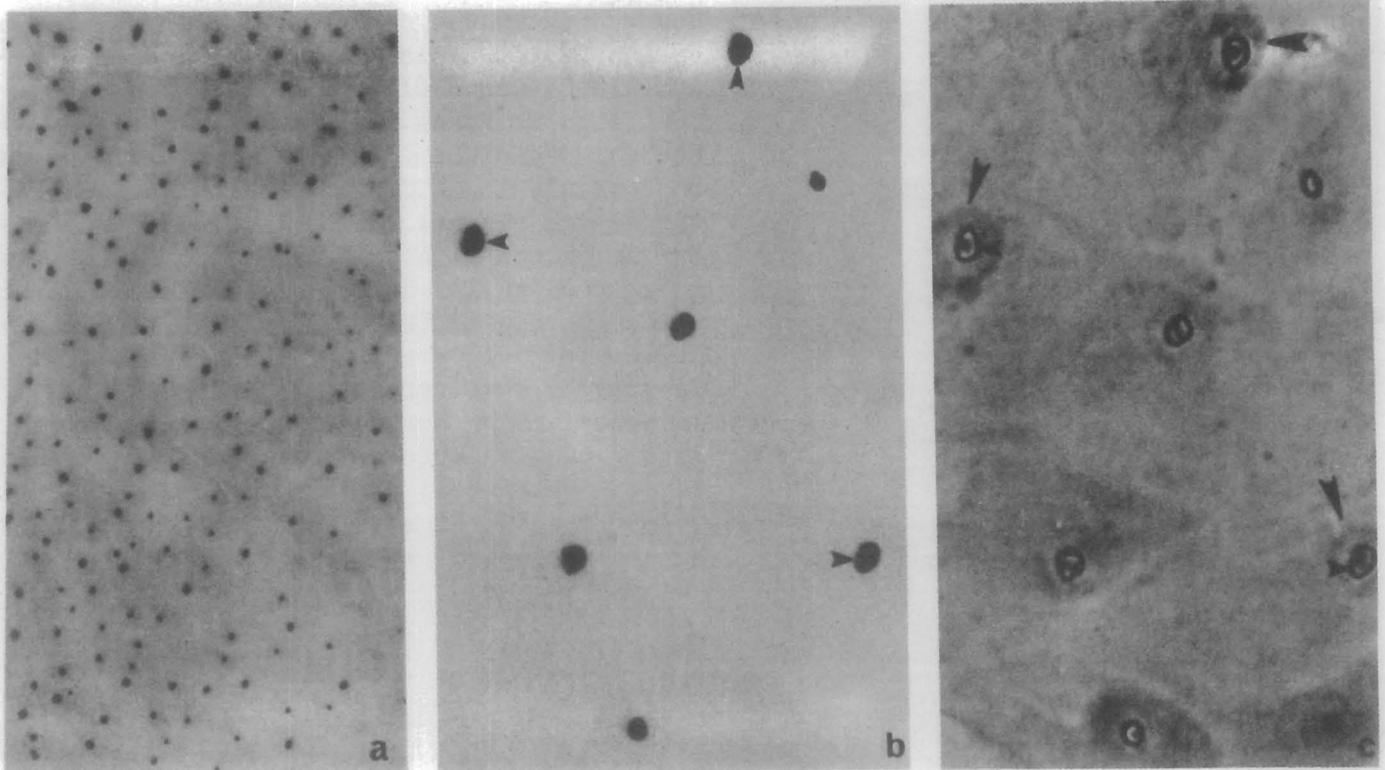


Figura 23. Localización del gene para el U3snRNA humano en células PtK<sub>2</sub> por medio de hibridación molecular *in situ*, con un fragmento *Hinf*I biotinado. a) Aumento bajo de la zona de hibridación. La marca ocurre en casi todas las células y es muy intensa, pero estrictamente nucleolar. b y c) Campo claro y el correspondiente contraste de fases de una zona en a), a mayor aumento. Las zonas discretas en b) (cabezas de flecha), corresponden a los nucléolos, como se observa en c), en donde se marca el límite de los núcleos con cabezas de flecha grandes. a X 10; b y c) X 100.

droga, mediante la técnica de hibridación *in situ*, utilizando un segmento de la región codificante del rDNA de rata, previamente biotinado. Esta sonda forma híbridos con el rDNA de otros mamíferos puesto que la región codificante se ha conservado durante la evolución de este grupo. Así, las células PtK<sub>2</sub> de marsupial efectivamente formaron tales híbridos. En la Figura 21. se observan los resultados. Sólo uno de los cuerpos fué marcado con este procedimiento (cabeza de flecha). El otro cuerpo no contenía cantidades apreciables de rDNA (cabeza de flecha doble). Ese cuerpo corresponde, según nuestras observaciones, al mismo cuerpo que contiene fibrilarina, RNA polimerasa I y las proteínas-Ag.

#### LOCALIZACION DEL GENE U3snRNA

Localización del gene para el U3snRNA en células HeLa en interfase, por medio de hibridación molecular *in situ*. Para

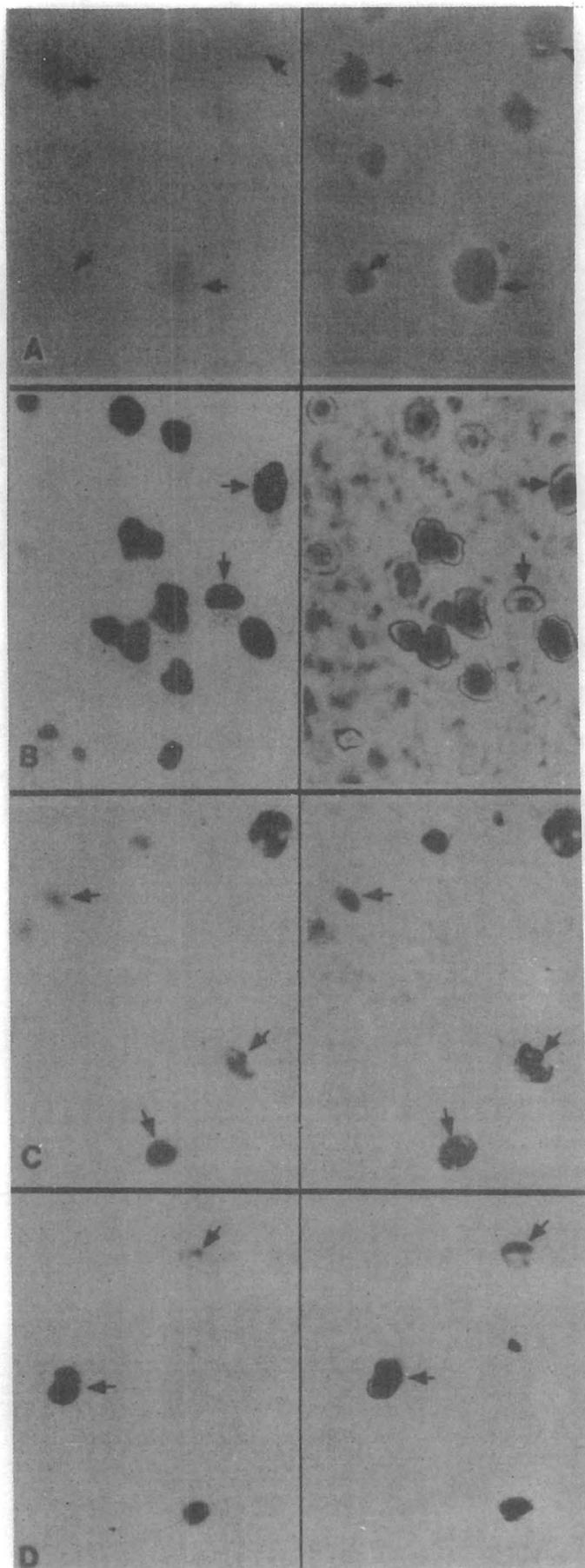


Figura 24. Hibridación molecular *in situ* con sondas biotinadas del gene U3snRNA humano sobre nucléolos aislados del hepatoma de Novikoff. A-D) Campo claro y el correspondiente contraste de fases en la columna derecha. A) Control negativo; la solución de hibridación no contenía sonda de DNA. Los nucléolos se marcan con flechas. B) Control positivo; hibridación con el plásmido p59 (rDNA). La marca aparece en los nucléolos (flechas). C) Hibridación con el fragmento *Hin*<sub>6</sub>I (región codificante) del gene para el U3snRNA; la marca aparece en ciertas zonas del nucléolo (flechas). D) Hibridación con una sonda de la región adyacente a la secuencia codificante, por detrás del sitio de iniciación de la transcripción. La marca aún se puede observar en los nucléolos. X 100.

conocer la regulación de la expresión de un gene específico, uno de los aspectos que es necesario investigar primero es su localización subcelular. El U3snRNA es el snRNA más abundante en el nucléolo. Debido a que no se conocía la ubicación del gene que

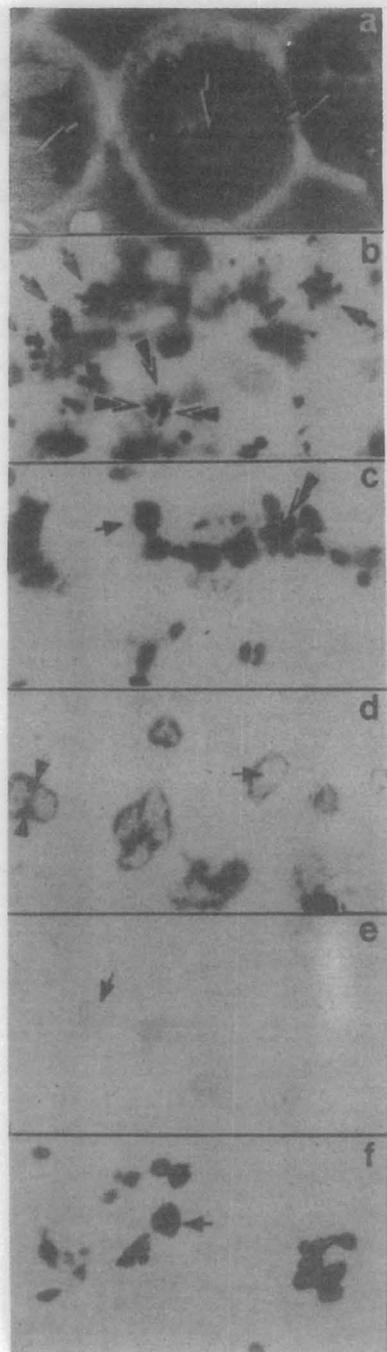


Figura 25. Caracterización citoquímica de los nucléolos aislados. a) Contraste de fases de células vivas de hepatoma de Novikoff. Los nucléolos son grandes y de forma irregular (flechas). b-f) Campo claro. b) Tinción-Ag de los nucléolos aislados. Las flechas señalan la tinción de elementos de tamaño similar al de los nucléolos en a). Las cabezas de flecha dobles indican las regiones del nucléolo que se marcan (FCs). c) Tinción con azul de toluidina para RNA. Los nucléolos se tiñen intensamente (flechas), salvo en algunos espacios que son claros (doble cabeza de flecha) y apenas perceptibles (FCs). d) Tinción con azul de toluidina para DNA (Feulgen modificado). Los nucléolos son negativos (flecha) pero se observa material teñido alrededor de ellos (cabezas de flecha) que corresponden a cromatina perinucleolar. e) RNasa-azul de toluidina para RNA. Los nucléolos no se tiñen (flecha). f) DNasa-azul de toluidina para RNA. La enzima no elimina el material nucleolar principal (flecha). X 100

lo produce, se estudió este aspecto por técnicas de hibridación *in situ*. En la Fig. 22 se ilustran los resultados obtenidos con una sonda de del gene U3 humano, hibridizado sobre células HeLa. En a y b) se observan las marcas de la hibridación en los nucléolos, ya sea en células mononucleoladas (a) o multinucleoladas (b). En c) se utilizó RNasa previamente a la

hibridación. Los resultados indican que los híbridos formados son del tipo DNA-DNA. Sin embargo, cuando se utilizan 1000 U/ml de DNasa por 2 hs a 37°C, la marca es evitada, indicando que los híbridos formados señalaban la localización del gene. Ni la RNasa ni la DNasa alteran en gran medida la morfología nucleolar.

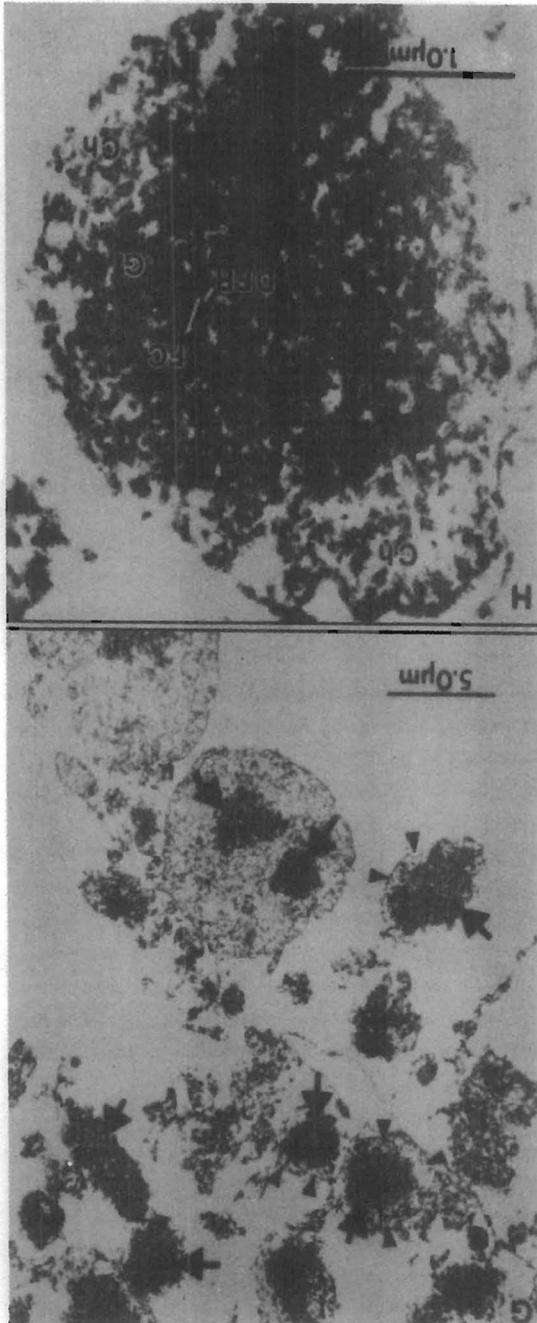


Figura 25. (Continuación). Ultraestructura de los nucléolos aislados, teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo. G) Aumento bajo en donde se observa que los nucléolos no son los únicos elementos de la fracción utilizada. Se notan los nucléolos (flechas) y residuos de cromatina adyacente (cabezas de flecha). H) A mayor aumento, se observan los elementos estructurales característicos del nucléolo y la cromatina adyacente (Chr). DFR, región fibrilar densa; FC, centro fibrilar; G, región granular.

Localización del gene para el U3snRNA en células Ptk<sub>2</sub> en interfase, por medio de hibridación molecular *in situ*. Debido a que la sonda génica molecular utilizada correspondía a un fragmento de restricción que incluía la región codificante del gene, ya que éste se ha conservado durante su evolución (158), se realizó hibridación *in situ* en otro tipo celular. Se utilizaron

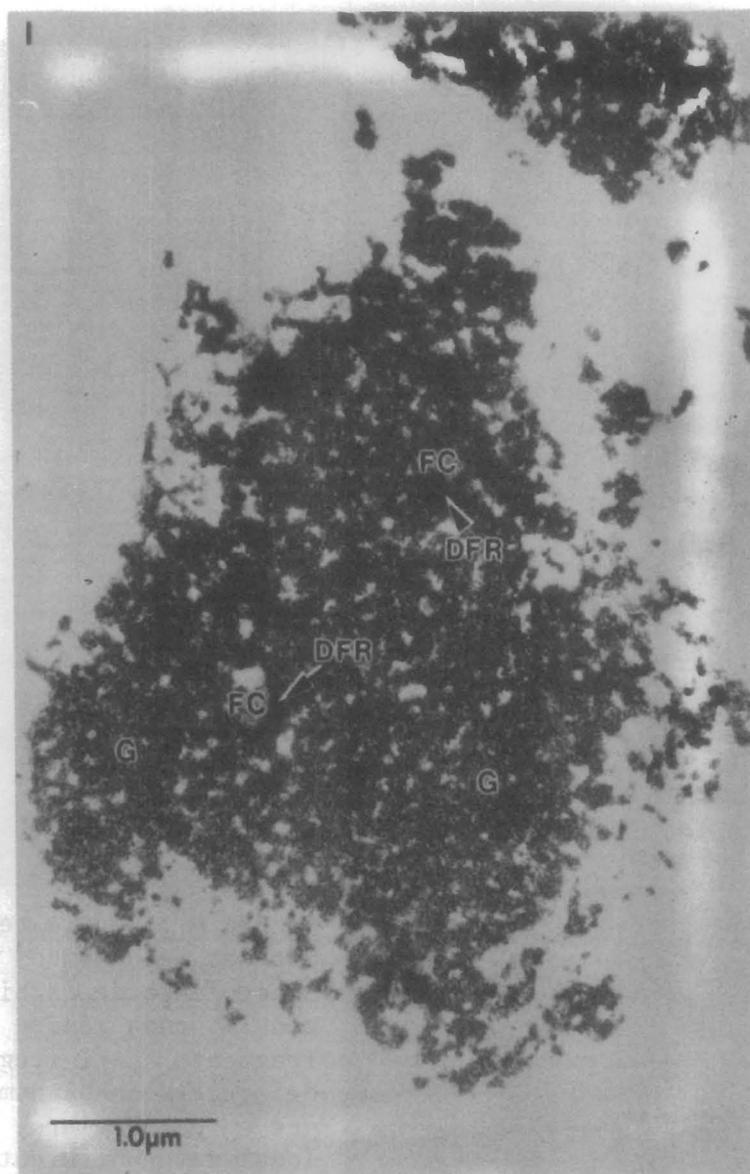


Figura 25. (Continuación). Ultraestructura de uno de los nucléolos aislados. Después del procedimiento, los nucléolos conservan sus elementos característicos, que aquí se notan claramente. Las siglas son las mismas que en la figura anterior. Acetato de uranilo-citrato de plomo. X 8000.

células Ptk<sub>2</sub> mononucleoladas, de marsupial. los resultados se observan en la Fig 24. En a) se observa que la marca sólo se localiza en el nucléolo y que el porcentaje de células con híbridos en el campo del microscopio es alto. b) A mayor aumento, con campo claro, se distinguen marcas en zonas discretas (cabezas de flecha), que al observarse en contraste de fases (c), demuestran ser nucléolos (cabezas de flecha chicas), dada su localización en el interior del núcleo (cabezas de flecha grandes).

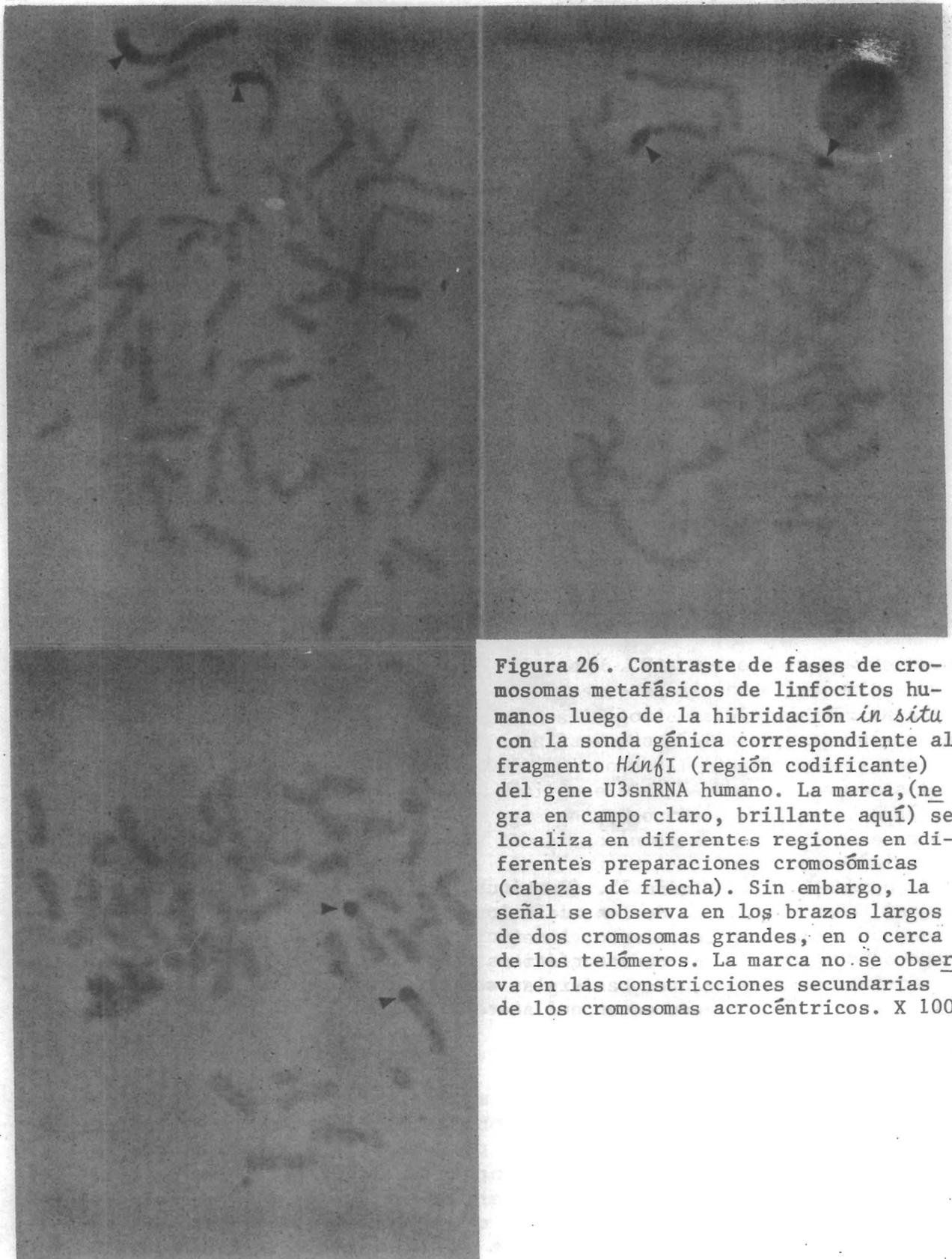


Figura 26. Contraste de fases de cromosomas metafásicos de linfocitos humanos luego de la hibridación *in situ* con la sonda génica correspondiente al fragmento *Hinf*I (región codificante) del gene U3snRNA humano. La marca, (negra en campo claro, brillante aquí) se localiza en diferentes regiones en diferentes preparaciones cromosómicas (cabezas de flecha). Sin embargo, la señal se observa en los brazos largos de dos cromosomas grandes, en o cerca de los telómeros. La marca no se observa en las constricciones secundarias de los cromosomas acrocéntricos. X 100.

Localización del gene para el U3snRNA en nucléolos aislados, por medio de hibridación molecular *in situ*. Para conocer si el gene analizado es o no intranuclear, se aislaron nucléolos del

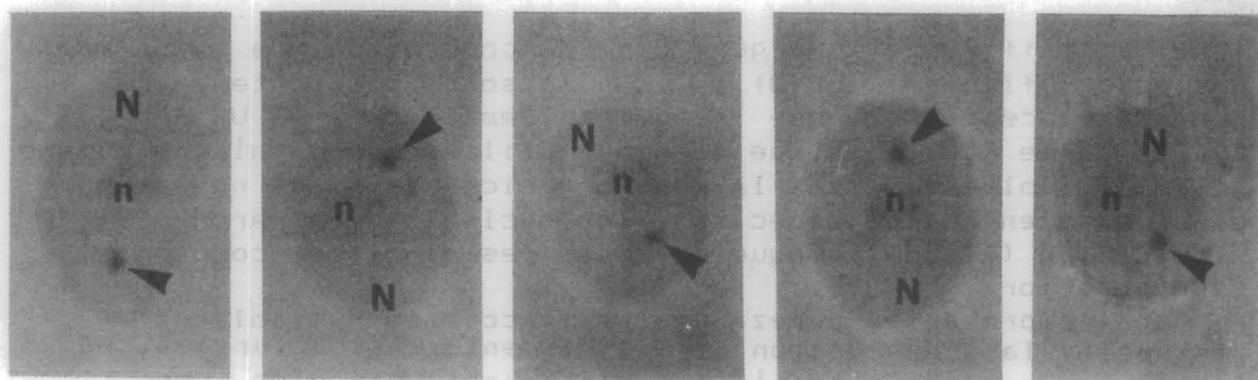


Figura 27. Localización del gene para el U6snRNA en células interfásicas PtK<sub>2</sub> por medio de hibridación *in situ*. Las células fueron tratadas con RNasa previo a la hibridación. La sonda es la región codificante del gene de ratón. La marca es nucleoplásmica, como se aprecia en varias células (cabezas de flecha). N, núcleo; n, nucléolo. Campo claro, X 100.

hepatoma de Novikoff de rata y se trataron con la técnica de hibridación *in situ* con diferentes sondas génicas. La Figura 24 muestra en la columna de la izquierda, los resultados obtenidos, en campo claro (A-D). En la columna de la derecha se observan los correspondientes contraste de fases. A) Control negativo. Los

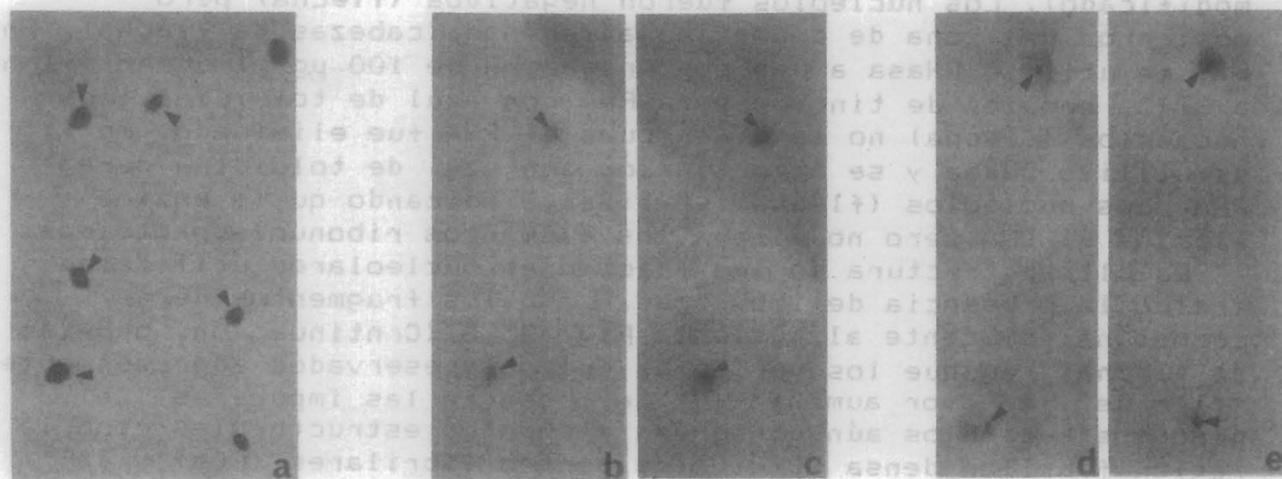


Figura 28. Localización del gene para el rRNA 5S en células interfásicas PtK<sub>2</sub> por medio de hibridación *in situ*. La sonda es la región codificante del gene de hámster chino. a) Campo claro, X 100. La marca es nucleolar (cabeza de flecha). b, c) Campo claro y el correspondiente contraste de fases para observar detalles de la célula. La marca es nucleolar (cabeza de flecha). d, e) Contraste de fases de células tratadas previamente con RNasa. La marca es menos intensa pero estrictamente nucleolar (cabeza de flecha).

nucléolos fueron hibridizados con la mezcla de reacción pero sin sonda génica. Los nucléolos no presentan marca (flechas). En B) se usó una sonda de rDNA como control positivo. La sonda utilizada fué el plásmido p59. Los resultados indican que la marca es nucleolar (flechas). En C) se usó el fragmento *Hinf*I

(región codificante) del gene U3snRNA como sonda. La marca es nucleolar (flechas). En D) se usó una sonda que contenía la región adyacente del gene (fragmento *Bam*HI) para el U3snRNA. Curiosamente (debido a que la sonda utilizada provenía de humano y los nucléolos de rata; la región génica utilizada no está conservada entre las especies), los nucléolos mostraron hibridación (flecha) aunque en zonas restringidas, como en el caso anterior.

Para comprobar la pureza de las fracciones nucleolares aisladas y la preservación de sus elementos estructurales, se realizaron pruebas citoquímicas y ultraestructurales. Los resultados se observan en la Fig. 25 a-i). En a) se observan, en contraste de fases, las células vivas con sus nucléolos prominentes y de forma irregular (flechas). Una vez aislados, los nucléolos fueron analizados para confirmar su origen y naturaleza. En b) se utilizó la tinción-Ag. La reacción ocurrió en los nucléolos (flechas) y en su mayoría, en regiones discretas (cabezas de flecha dobles) que corresponden a los FCs y a la DFR. Con la técnica de azul de toluidina para RNA (c), los nucléolos se tiñeron intensamente (flecha), pero algunas zonas no fijaron el colorante (cabeza de flecha doble). Estas zonas claras corresponden a los FCs (151). En d), los nucléolos fueron teñidos con la técnica de azul de toluidina para DNA (Feulgen modificado). Los nucléolos fueron negativos (flecha) pero mostraron una zona de cromatina adyacente (cabezas de flecha). En e), se utilizó RNasa a una concentración de 100 µg/ml durante 1 h a 37°C, seguida de tinción para RNA con azul de toluidina. Los nucléolos (flecha) no se tiñen pues el RNA fue eliminado. En f) se utilizó DNasa y se hizo tinción con azul de toluidina para RNA. Los nucléolos (flecha) se tiñen, indicando que la enzima elimina el DNA pero no altera los elementos ribonucleoproteicos.

La ultraestructura de las fracciones nucleolares utilizadas indicó la presencia de impurezas, como los fragmentos de cromatina adyacente al nucléolo Fig. 25 G (Continuación, cabezas de flecha), aunque los nucléolos fueron preservados adecuadamente (flechas). A mayor aumento (H) se observan las impurezas (Ch) pero los nucléolos aún conservan elementos estructurales como la región fibrilar densa (DFR), los centro fibrilares (FCs) y la región granular (G). Los nucléolos puros (Fig. 25 I (Continuación)) muestran igual conservación de elementos estructurales característicos de este organelo.

Localización del gene U3snRNA en cromosomas metafásicos humanos, por medio de hibridación molecular *in situ*. Con el objeto de conocer si el gene humano para el U3snRNA se encuentra asociado a genes nucleolares a lo largo de todo el ciclo celular, se estudió la localización del gene en cromosomas metafásicos humanos de linfocitos estimulados. Los resultados de la técnica de hibridación *in situ* con una sonda del gene correspondiente a la región codificante (fragmento *Hinf*I) se muestran en la Fig. 26.

La señal de hibridación se observa en regiones distintas a los sitios correspondientes a los organizadores nucleolares (NORs), lugar en donde se localizan los genes del rDNA. Estos últimos se encuentran en las constricciones secundarias de los cromosomas acrocéntricos (68). No se ha determinado aún la región cromosómica específica en donde se localizan los genes U3 en humano.

Con el objeto de utilizar un control positivo para la detección del gene U3snRNA, se llevó a cabo la técnica con una sonda del gene para el U6snRNA de ratón en células PtK<sub>2</sub>. Los resultados se ilustran en la Fig. 27. Como resulta claro, el gene es nucleoplásmico.

Otro control positivo utilizado fuè el gene para el rRNA 5S de hámster chino. Los resultados fueron inesperados pues, al igual que el gene para el U6snRNA, èste había sido reportado como nucleoplásmico y, en metafase en los telómeros de la mayoría de los cromosomas (121,133). La Fig. 28 muestra la localización nucleolar del gene para el rRNA 5S de hámster chino, en células PtK<sub>2</sub>. Los resultados presentes, sin embargo, concuerdan con los reportados recientemente en la reunión anual de la Sociedad de Biología Celular de los Estados Unidos (72a). Ahí se reporta la asociación estrecha de estos genes con el nucléolo.

## DISCUSION

### HIBRIDACION *IN SITU*

Varias evidencias apoyan la especificidad de la detección de híbridos rDNA-rDNA: 1) la DNasa y no la RNasa elimina la marca, 2) la tinción-Ag y la localización de RNA pol I semejan la posición del NOR durante la mitosis, de igual manera como lo hace el rDNA, 3) el marcado es estrictamente nucleolar y no citoplásmico o nucleoplásmico como en el caso del rRNA, cuando se utiliza la técnica de azul de toluidina. El rRNA se comporta de la misma manera que la vaina de snRNP alrededor de los cromosomas (152) y no como el NOR. Es posible que el rRNA no haya sido detectado, debido quizá a que está unido fuertemente a proteínas desde que está siendo sintetizado (61). En los ribosomas lo protegen gran cantidad de proteínas, en tanto que el rDNA en el nucléolo se encuentra en una configuración extendida y no nucleosomal (37,38), lo cual facilita su desnaturalización y posterior hibridación, 4) El número de NORs en rata es igual al número de sitios de hibridación en metafase. Debido a que no hay reportes sobre la distribución de rDNA durante la mitosis por medio de hibridación molecular *in situ*, salvo el de Manuelidis en 1985 (94), el cual es incompleto, esta parte de la tesis se enfocó en ese aspecto.

En lo que se refiere a los NORs, la metafase y la telofase resultaron ser puntos claves. En rata, hay 3 cromosomas con secuencias genicas rDNA (79). Esto significa que debe haber 6 sitios en telofase puesto que cada cromátida hermana contiene tales secuencias. Pero, debido a que en metafase se presentan además cromosomas homólogos, era de esperarse que la hibridación *in situ* pusiera de manifiesto 12 sitios, si la resolución era lo suficientemente buena. En efecto, se pudieron detectar 6 sitios de hibridación alineados en la placa metafásica, cada uno de ellos correspondiendo muy probablemente a pares de cromátidas. Por otro lado, la tinción-Ag puso de manifiesto sólo 3 pares de sitios en metafase, lo cual implica el marcado de 3 sitios cromosómicos o 3 cromátidas; las otras 3 cromátidas de los homólogos no han sido marcadas debido quizá a que sus NORs no fueron activos en la última interfase premitótica (103).

Estas observaciones nos llevaron a investigar el número de nucléolos que pueden formarse a partir de 6 NORs en las células NRK. El histograma de la Figura 14 indicó que la mayoría de las células son capaces de construir 3 nucléolos interfásicos. Esto significa que solamente 3 NORs son activos o que cada 2 de ellos se fusionan para formar un solo nucléolo, fenómeno que ya ha sido observado varias veces (21). Como la tinción-Ag detecta 3 NORs en metafase y anafase, podemos aceptar la primera opción, o una

combinada en la que un nucléolo contiene 2 NORs, uno activo y el otro inactivo. Nosotros hemos visto 1 o 2 sitios marcados en interfase en nucléolos individuales. Otra posibilidad sería la de encontrar rDNA extranucleolar, que indicaría la presencia de genes inactivos. En este trabajo no se encontró marca fuera del nucléolo.

La distribución de RNA pol I semeja la de la tinción-Ag más que la del rDNA durante la mitosis. La fibrilarina no es detectable en metafase, aunque se ha reportado anteriormente su presencia en el NOR de células PtK<sub>2</sub> (114).

Además de la especificidad de la técnica, se observó que las condiciones utilizadas para desnaturalizar e hibridizar no destruyen la morfología celular. Así que es posible suponer que los subdominios nucleolares no están siendo alterados estructuralmente de manera importante.

Basados en la especificidad de la técnica, nuestros resultados indican que el rDNA se localiza en los NORs a lo largo de la mitosis, como se esperaba. Además, se ha mostrado evidencia de que: a) en interfase, el rDNA no ocupa todos los FCs, y tal vez ni siquiera toda la región fibrilar; b) la hibridación *in situ*, comparada con la tinción-Ag y la distribución de la RNA pol I, detecta el número real de NORs en metafase, *i.e.*, el doble. c) Durante la nucleologénesis, los PNBs no contienen cantidades detectables de rDNA ni de RNA pol I. La totalidad de estos elementos se mantiene en los "Nor-PNBs", junto con algo de las proteínas-Ag y tal vez una pequeña cantidad de fibrilarina; otro PNBs sí contienen fibrilarina y proteínas-Ag. Esto implicaría que la RNA pol I no es una de las proteínas responsables de la tinción-Ag, como ya se ha propuesto antes (164a). La proteína C23 (92) o la fibrilarina podrían ser entonces las responsables de tal tinción.

## rDNA DURANTE LA MITOSIS

Quizá no todos los FCs de los nucléolos interfásicos de células NRK contienen rDNA. Cuando se comparó el patrón de marcado para rDNA con el patrón para RNA, tinción-Ag, fibrilarina y RNA pol I en metafase, se obtuvo un resultado imprevisto: el rDNA estaba restringido a una o 2 áreas discretas en cada nucléolo, mientras que la plata y la RNA pol I mostraban un patrón punteado, correspondiente a los FCs. La presencia de 1 o 2 sitios para rDNA puede indicar una diferencia en la etapa del ciclo celular.

La fibrilarina también mostró un patrón punteado, aunque la mayoría de las veces se presentaba como una hebra gruesa que semeja la estructura nucleolonemal.

La presencia de un patrón punteado de áreas claras en nucléolos teñidos con azul de toluidina alcohólico-ácido, sugirió nuevamente la presencia de numerosos FCs carentes de RNA.

Estas observaciones se contraponen a los resultados encontrados por otros autores utilizando autoradiografía

ultraestructural con [ $^3\text{H}$ ]Ur (162) y técnicas específicas (37), exclusivas (2,128) o preferenciales (162) para cromatina, con las cuales se ha demostrado repetidamente que en el nucléolo hay fibras de DNA que provienen de la cromatina perinucleolar y que llevan a cabo actividad transcripcional en el componente fibrilar.

Por lo anterior, aquí se postula que no todo el DNA nucleolar debe consistir de rDNA, sino que debe contener otros genes, ya que hay continuidad entre la cromatina nucleolar y la perinucleolar (2,37,163). Fue necesario el uso de la hibridación *in situ* para demostrar de manera inequívoca qué parte del DNA nucleolar es rDNA. En efecto, hay evidencias de que, al menos al nivel de la microscopía de luz, la mayoría del rDNA se localiza exclusivamente en los FCs (1) en interfase y en los NORs en metafase (62).

En este trabajo se encontró que, en rata, hay rDNA en cantidades detectables en zonas restringidas del nucléolo, correspondientes probablemente a un número limitado de FCs. En microscopía electrónica, además, se observa que en células PtK<sub>2</sub> hay numerosos FCs, lo que indica que este tipo celular tiene un número de estas estructuras mayor que el de zonas de hibridación en microscopía de luz (Fig. 29). No obstante, no se puede excluir la posibilidad de que el rDNA forme parte de un "complejo fibrilar" (72b) o de que emita hebras muy delgadas hacia afuera, que no puedan ser detectadas con el microscopio de luz.

Estos hechos nos han llevado a sugerir que aquellos FCs que contienen rDNA son los mismos que se forman a partir de los NORs, y que los que no contienen estos genes podrían ser el resultado de la fusión de PNBs que no están involucrados con la actividad transcripcional temprana en la fase G<sub>1</sub>. Estos últimos entonces, representarían estructuras de almacén con proteínas listas para ser usadas o transferidas a la siguiente generación. Más aún, estas suposiciones pueden justificar o explicar las diferencias que se observan entre el número relativamente grande de FCs en interfase y el correspondiente número menor de NORs en metafase en la misma especie. Así que, **algunos FCs no son en realidad la contraparte de los NORs metafásicos**. Analizando con cuidado la nucleologénesis, obtuvimos apoyo parcial para esta hipótesis.

Los "NOR-PNBs" y no otros PNBs, contienen la mayoría, si no es que todo, el rDNA y la RNA pol I. Recientemente, Ochs y col. (113) plantearon la siguiente pregunta: ¿Dónde está el rDNA durante la nucleologénesis?. Este aspecto es de interés especial porque durante la telofase ocurre un rearreglo y desenrollamiento de rDNA, que da lugar al nucléolo interfásico. La pregunta ha tratado de ser respondida antes. Por ejemplo, Mirre y Sthal (105) sugirieron, basados en estudios autorradiográficos después de la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]Ur en ovocitos de ratón, que el rDNA se encuentra inicialmente compactado en los FCs al inicio de la nucleologénesis, pero que se desenrolla progresivamente y se distribuye hacia todo el

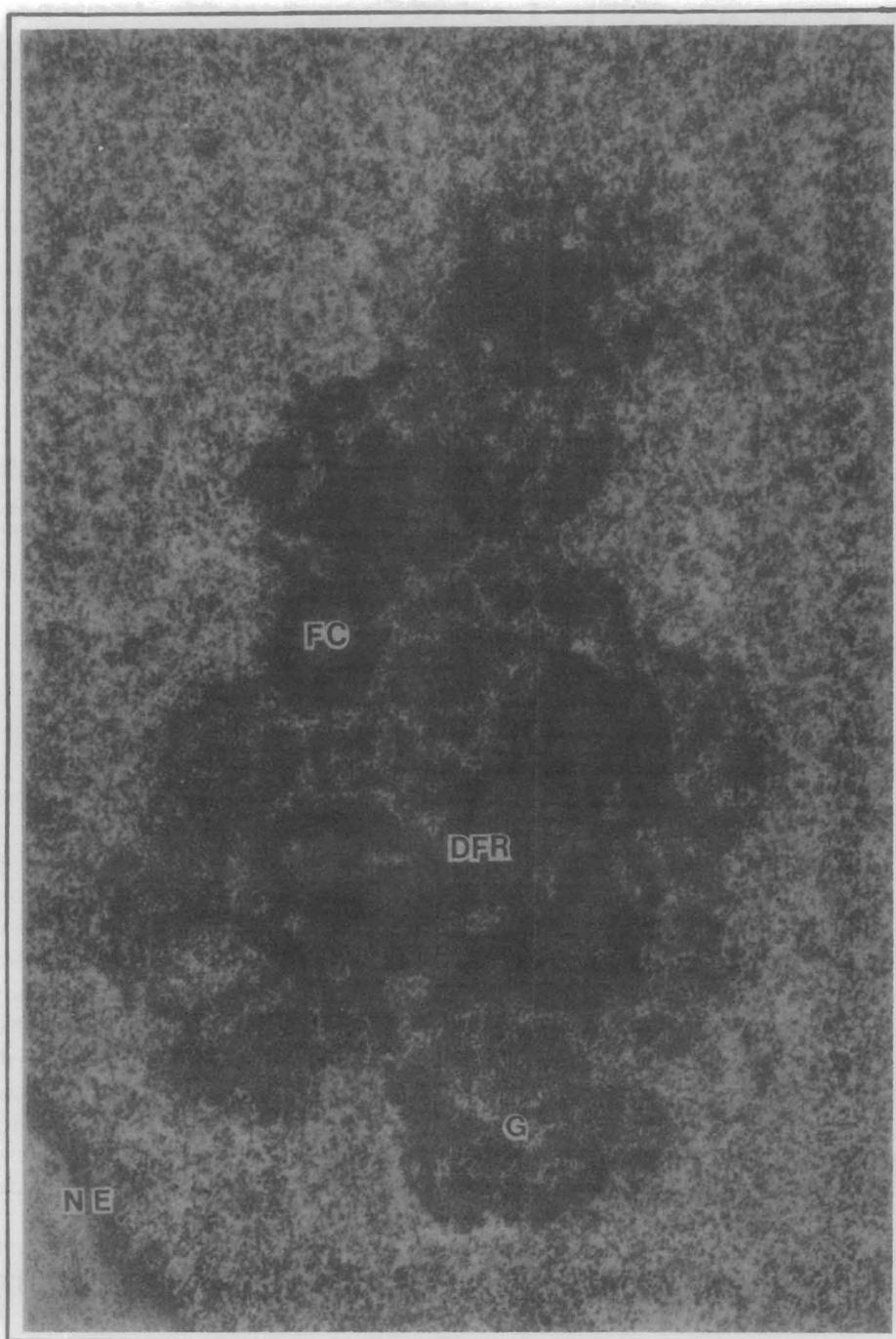


Figura 29. Nucléolo interfásico de una célula PtK<sub>2</sub> en cultivo. FC, centros fibrilares; DFR, región fibrilar densa; G, región granular. NE, envoltura nuclear. Acetato de uranilo-citrato de plomo, 8000 X.

componente fibrilar. Otros autores encontraron que en meristemas radicales de cebolla, sólo los PNBs más grandes incorporan [ $^3$ H]Ur, sugiriendo además que otros PNBs no son ni el producto ni el sitio de actividad transcripcional en telofase (108). Por otro lado, se había establecido que el rDNA se localizaba en los FCs en interfase (1). Sin embargo, como la autorradiografía sólo muestra genes activos y queríamos establecer la posición real de los genes ribosómicos durante la nucleogénesis, llevamos a cabo estudios de hibridación *in situ* con sondas de rDNA.

Esencialmente, estamos de acuerdo con el hecho de que sólo los PNBs más grandes llevan a cabo actividad transcripcional al inicio de la nucleogénesis, puesto que sólo ellos contienen rDNA. Pero por el contrario, sugerimos que el desenrollamiento de este DNA está limitado a dominios específicos, justo alrededor de los FCs, pues no se detectó marca en otros sitios.

Los resultados de Thiry y col. (162) sobre la actividad transcripcional muy temprana y los de Scheer y Rose sobre la localización ultraestructural de la RNA pol I (142), apoyan la idea de la actividad transcripcional dentro, o muy cercanamente a los FCs, aunque no se puede eliminar la posibilidad de que la localización interna se deba a invaginaciones de la DFR en el FC. Quizá los métodos de autorradiografía ultraestructural no son lo suficientemente precisos para resolver diferencias transcripcionales que ocurren en tiempos muy cortos, de tal forma que la marca se encuentra en sitios distintos de donde ya ha ocurrido la transcripción. Entonces, es posible suponer que durante la nucleogénesis, el rDNA de los "NOR-PNBs" no se aleja demasiado sino que sufre un desenrollamiento local, a partir del cual se inicia la transcripción. Este desenrollamiento local puede originar más tarde la DFR. A pesar de esto, pudieran haber asas de rDNA no detectable. El procedimiento de hibridación *in situ* utilizado aquí, es potencialmente aplicable a nivel ultraestructural, lo cual ayudaría a responder esta interrogante.

Se podría plantear un esquema en donde los PNBs grandes, que contienen rDNA y RNA pol I, así como proteínas-Ag y fibrilarina, representan entonces los NORs en etapas previas de la mitosis. Estas estructuras crecen en tamaño y se convierten en centros de nucleación a partir de los cuales comienza la transcripción, añadiendo una DFR alrededor (24,56,87,113,127,154,155). Estos PNBs también contienen proteína C23 (113). Estas estructuras fueron llamadas "NOR-PNBs" para distinguirlas de otra población de PNBs vistos en telofase durante la nucleogénesis. Es interesante notar que, durante la nucleogénesis, los "NOR-PNBs" presentan un patrón punteado cuando se usan anticuerpos contra la RNA pol I. También se observó un marcado muy ligero sobre la superficie de los cromosomas en descondensación, pero no mostraban un patrón de PNBs. La presencia de RNA polimerasa I con un patrón puntiforme en los "NOR-PNBs", se puede explicar que es debido a una síntesis y transporte muy rápidos de la enzima en telofase, o por acumulación por una vía diferente a los PNBs. Así mismo, podría ser que la enzima no fuera reconocida por el anticuerpo debido a un estado conformacional

durante este período. Queda por aclarar si la enzima se conserva cuantitativamente durante la mitosis (98). Los otros PNBs son mas pequeños y contienen las proteínas-Ag, fibrilarina, C23 y B23, pero no contienen cantidades detectables de RNA polimerasa I o rDNA, ni actividad transcripcional (108). Por consiguiente, los "NOR-PNBs" son las estructuras reales que originan el nucleolo maduro durante la telofase-interfase temprana, a través de la iniciación de la transcripción del rDNA y a través de la capacidad para atraer o atrapar algunas proteínas que han sido preempacadas en PNBs previamente. Entonces, los otros PNBs, o el material en ellos, se reorganizan y dan lugar a FCs sin rDNA en la siguiente interfase y pueden ser los FCs que no son la contraparte de los NORs metafásicos. Los centros activos de reconstrucción nucleolar, sin embargo, ya sea que ocurran directamente a partir de las constricciones secundarias (67) o partir de fragmentos de DNA adyacentes a ellas (99), es un problema que queda por resolver, quizá con ayuda de la hibridación *in situ* de alta resolución.

Aunque se ha presentado evidencia de colocalización del rDNA, RNA polimerasa I, fibrilarina y proteínas-Ag durante la mitosis e interfase, aquí no se ha demostrado si estas proteínas tienen algún papel en la transcripción del rDNA en el inicio de la nucleologénesis.

La nucleologénesis involucra al menos los eventos de empaquetamiento de PNBs, posterior fusión con los "NOR-PNBs" que apenas iniciaron la transcripción y el rearrreglo de componentes en el nucleolo interfásico. La síntesis de pre-rRNA juega un papel importante en todo el proceso y por ello, los eventos relacionados con ella son cruciales. El conocimiento de los elementos de acción-*cis* y los factores transcripcionales del rDNA (141), y del tiempo exacto en que las proteínas nucleolares se asocian a los "NOR-PNBs", son factores que van a contribuir a descifrar el mecanismo de la nucleologénesis *in vivo*.

La transcripción del rDNA parece ser independiente de la estructura de la cromatina (39) o de la presencia de RNA polimerasa I, pero parece depender de modificaciones en el DNA, e.g. metilación (61) o cambios conformacionales debidos a la DNA topoisomerasa I (41) y debe también ser dependiente de la calidad y cantidad de elementos estructurales y reguladores de la maquinaria transcripcional, algunos de los cuales pueden ser proteínas nucleolares específicas (18).

## ESTUDIOS CON ACTINOMICINA D

Varias drogas inducen segregación nucleolar, es decir, separación de los componentes estructurales del nucleolo *in situ* (21,77,113). La actinomicina D a dosis de 0.1 µg/ml durante 1 a 2 hs, induce la formación de cuerpos similares a los PNBs, luego de haber formado una estructura a manera de rompecabezas que contiene a los elementos del nucleolo separados (113). Esos

cuerpos se han caracterizado por técnicas inmunocitoquímicas y se han considerado como nucléolos pequeños (113). La colchicina a concentraciones de 0.5 a 2.0  $\mu\text{g/ml}$  durante 17 a 72 hs, induce la formación de micronúcleos que, desde el punto de vista estructural, contienen nucléolos pequeños carentes de FCs y región G (71). Además, algunos no contienen actividad de RNA polimerasa I (71). La D-galactosamina produce un tipo de segregación en la que algunos de los restos nucleolares contienen rDNA y RNA polimerasa I (63). Estos remanentes han sido considerados como FCs dada su estructura y su caracterización inmunocitoquímica y bioquímica (40,63).

De esta forma, hay tres enfoques similares en los que se produce segregación nucleolar con el objeto de inducir la formación de una estructura tipo NOR-FC que pudiera ser aislada y caracterizada, con el fin de estudiar la regulación de la expresión genética del gene rDNA *in vitro*.

En este trabajo se utilizó actinomicina D a dosis elevadas (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) y tiempos largos (24 hs), con el objeto de conocer la distribución del rDNA y de algunas proteínas nucleolares en los PNBs inducidos experimentalmente. Los resultados indican la ausencia de esos elementos en los PNBs, pero su presencia en los "NOR-PNBs". Los PNBs sí contienen, en cambio, las proteínas Ag-NOR y fibrilarina.

Un descubrimiento importante, referente al uso de la droga, es el de la producción de dos cuerpos redondos, grandes y densos, observada en contraste de fases, indistinguibles uno del otro. Con la tinción Ag-NOR se puso en evidencia una figura que se nombró "tiro al blanco" y que es característica sólo de células PtK<sub>2</sub>. Se intentó producir la misma figura en células HeLa, HeP-2 y NRK sin ningún resultado. Lo más que se logró fue producir una segregación nucleolar típica.

Uno de los cuerpos redondos en células PtK<sub>2</sub>, contiene rDNA y RNA polimerasa I, además de fibrilarina. El otro cuerpo contiene esta última proteína pero no presenta la enzima ni el rDNA.

En los experimentos de Hadjilova y col. (63), usando D-galactosamina, se indujo la formación de cuerpos nucleolares que fueron caracterizados bioquímicamente. Sin embargo, la segregación lograda por ellos no es tan marcada como la encontrada aquí, en la que se pueden distinguir perfectamente los cuerpos producidos, uno de los cuales es un cuerpo tipo NOR-FC, que pudiera ser aislado fácilmente. Por otro lado, los estudios de Hernandez-Verdun y col. (71) en micronúcleo inducidos es otro buen sistema para estudiar cuerpos que se semejan a los NOR-FCs. Sin embargo, ninguno de esos grupos de trabajo ha demostrado de manera concluyente que los cuerpos obtenidos contengan rDNA. En este trabajo se ha demostrado, de manera inequívoca, mediante técnicas de hibridación molecular *in situ*, que uno de los cuerpos producidos en células PtK<sub>2</sub>, contiene rDNA, además de RNA polimerasa I. Esta enzima sí ha sido encontrada por aquellos autores. Aún cuando la sonda molecular utilizada en nuestro trabajo no proviene de rDNA de células del

marsupial, sino de rata, la región génica usada se ha conservado a través de la evolución (20), por lo que se cree que forme híbridos con la mayoría, o todos los mamíferos.

## LOCALIZACION DEL GENE PARA EL U3snRNA

En este trabajo se dan evidencias de la localización nucleolar, o al menos de la asociación estrecha con el nucléolo, de los genes para el U3snRNA.

En los experimentos de hibridación *in situ* con una sonda que incluyó la región codificante del gene para el U3snRNA en humanos, aplicado a diferentes tipos celulares, la marca apareció siempre en el nucléolo. Como la región codificante se ha conservado en la evolución, se esperaba que hubiera hibridación de la sonda con el DNA de diferentes especies, (en este caso se usaron células humanas, de marsupial y de rata). Los experimentos con digestiones enzimáticas previas a la reacción de hibridación *in situ*, indican que los híbridos formados son del tipo DNA-DNA y no RNA-DNA. Los controles tanto positivos como negativos confirman estos resultados. Asimismo, se dió evidencia de que el tratamiento de desnaturalización del DNA celular con NaOH a 0.07 N, no implica pérdida de RNA ni de DNA, ni altera la morfología nucleolar.

El uso de sondas génicas que incluyen los genes para el U6 (nucleoplásmico) confirmaron que el DNA nucleoplásmico también es accesible a la hibridación y no únicamente el nucleolar.

El uso de sondas con regiones adyacentes al gene indicó también que en éste se localiza en el nucléolo.

Los experimentos con nucléolos aislados apoyaron la validez de la observación de que los genes para el U3 son nucleolares; sin embargo, dos hechos ponen en entredicho la localización nucleolar: 1) la sonda génica que incluye la región "upstream" (fragmento *Bam* HI) del gene humano, forma híbridos con nucléolos aislados de hepatoma de Novikoff de rata. Esto fué un resultado paradójico pues esa secuencia no está conservada en la evolución y se esperaba que no formara híbridos. Quizá la formación de híbridos se debió a que, por ser secuencias muy repetitivas, forman doble cadena con otras regiones repetitivas de otros genes, o del espaciador no transcrito del rDNA, el cual sí se localiza en el nucléolo. 2) El análisis citoquímico y ultraestructural de los nucléolos aislados muestra que la fracción nucleolar no es pura, pues se presentan restos de cromatina perinucleolar.

Posiblemente en gene para el U3snRNA se localiza en esa zona perinucleolar, lo cual hace difícil de establecer si está en, o solo muy asociado al nucléolo. Es posible que el gene U3snRNA forma parte del DNA nucleolar, que tiene continuidad con la región de pericromatina nucleolar, como se ha mostrado en varias ocasiones por medio de estudios ultraestructurales (21,38,163).

Un resultado novedoso en este trabajo es el reporte de que el

gene para el rRNA 5S se encontró localizado en el nucléolo o estrechamente asociado con él. Recientemente se reportó lo mismo (44a) y quizá es una característica que los genes vinculados en una función se encuentren asociados espacialmente, quizá en la región de cromatina perinucleolar. Los resultados encontrados por Pardue previamente (74a), que indican la localización no nucleolar del gene, pueden corresponder a mala preservación celular, la cual aquí hemos conservado en gran medida. El presente resultado sugiere al menos que este problema merece una atención más detallada.

Los experimentos de hibridación *in situ* a nivel ultraestructural seguramente darían la respuesta a estas interrogantes. Así el DNA que contiene los genes en cuya secuencia se encuentra codificada la información para productos nucleolares, podría estar compartimentalizada espacialmente en una región nuclear bien definida como es el nucléolo.

Esto no implica que los genes se localicen en la misma zona cromosómica como se muestra aquí para el U3 en cromosomas. Estos genes no se encuentran en la misma zona que el rDNA, *i.e.* las constricciones secundarias, y ni aún en los mismos cromosomas, *i.e.* los acrocéntricos.

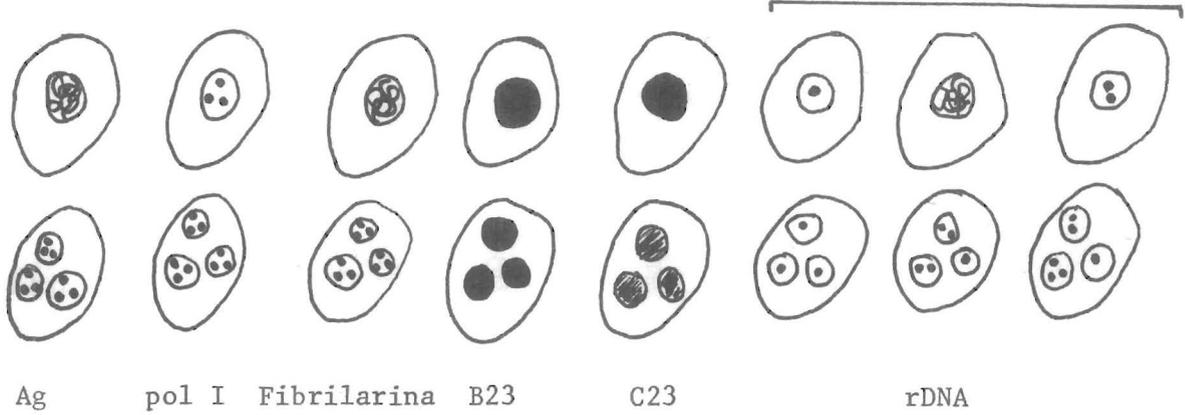
Sin embargo, los cromosomas se mantienen unidos en la célula, formando una red que los hace casi indistinguibles uno del otro durante la mitosis. Así, no puede descartarse el hecho de que aún en mitosis, los genes de segmentos cromosómicos diferentes, pero involucrados en una misma función, se encuentren localizados en una misma zona celular, expuestos a un mismo ambiente de factores de regulación génica. De hecho, se observó en el trabajo de rDNA en mitosis, que el rDNA se localiza en un lugar muy específico en esa etapa y en interfase, es decir, en los NORs y los FCs, respectivamente.

Estudios recientes de la reconstrucción tridimensional de la cromatina en hepatocitos de rata, indican que los cúmulos de cromatina en interfase sigue un patrón ordenado dependiendo del tipo celular. Uno de los cúmulos que presentan un orden más discernible es el de la cromatina perinucleolar (46 y com.per.).

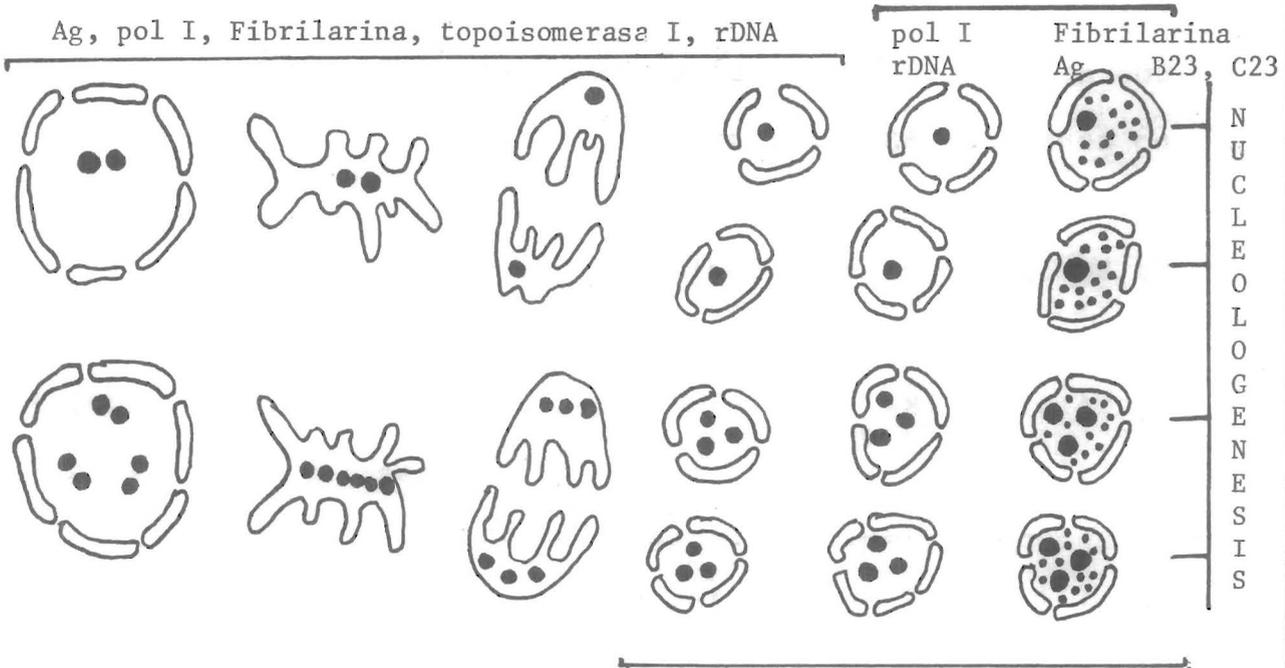
## CONCLUSIONES

- Durante la mitosis, el rDNA permanece asociado a las regiones de los NORs, junto con otras proteínas del nucléolo.
- Los cuerpos prenucleolares (PNBs) diferentes de los "NOR-PNBs", no contienen RNA polimerasa I ni rDNA.
- La actinomicina D, a dosis de 1µg/ml durante 24 horas a 37°C, produce la segregación de dos cuerpos nucleolares principales en células PtK<sub>2</sub> en cultivo. Sólo uno de esos cuerpos contiene proteínas-Ag, fibrilarina, RNA polimerasa I y rDNA. Estos elementos nucleolares lo hacen similar a los centros fibrilares (FCs) del período interfásico.
- El gene en cuya secuencia se encuentra codificada la información para la producción del U3snRNA nucleolar, está asociado espacialmente, de manera estrecha, con el nucléolo.

I  
N  
T  
E  
R  
F  
A  
S  
E



M  
I  
T  
O  
S  
I  
S

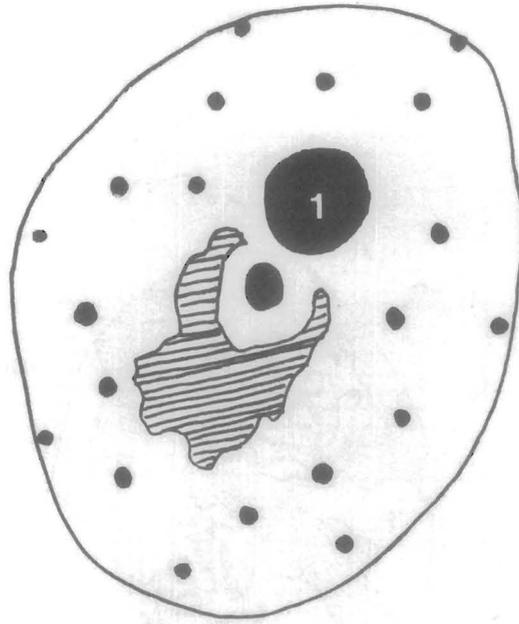


rDNA DURANTE LA MITOSIS

El rDNA colocaliza con las proteínas Ag-NOR, RNA polimerasa I, fibrilarina y DNA topoisomerasa I, tanto en interfase como en mitosis en células Ptk<sub>2</sub> y NRK. La localización se restringe a los NOR metafásicos y quizá a los FCs interfásicos.

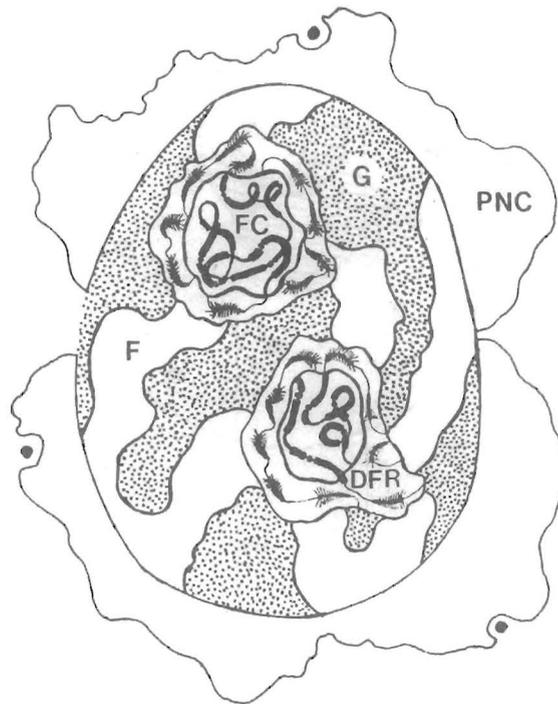
El rDNA no se localiza en los PNBs durante la nucleogénesis.

Entonces, la asociación de rDNA y algunas proteínas nucleolares, *i.e.*, proteínas Ag-NOR, RNA polimerasa I, fibrilarina y DNA topoisomerasa I durante el ciclo celular, indica que pueden formar parte de la maquinaria esencial de transcripción y/o duplicación, ya sea como elementos funcionales o estructurales. Tales componentes moleculares definen un dominio nuclear: el nucléolo.



### ESTUDIOS CON ACTINOMICINA D

El tratamiento de células Ptk<sub>2</sub> en cultivo, con 1 g/ml de actinomicina D durante 24 hs, produce una figura estructural del nucléolo que está representada principalmente por un cuerpo grande y redondo (1), cuyo contenido molecular es rDNA, RNA polimerasa I, fibrilarina y proteínas Ag-NOR. Por su contenido, esa estructura es similar a los FCs del nucléolo interfásico. La maquinaria transcripcional básica se encuentra localizada en un dominio específico en células en las que la transcripción se ha detenido. Este cuerpo es un FC potencialmente aislable.



#### LOCALIZACIÓN DEL GENE U3snRNA

El gene de U3snRNA se encuentra localizado en estrecha asociación con el nucléolo, según se mostró con hibridación *in situ*. Los datos no concuerdan con estudios moleculares del gene. Sin embargo, como no se ha determinado la localización ultraestructural precisa de este gene, es posible que se encuentre sólo en estrecha asociación con el nucléolo, formando parte de la cromatina perinucleolar (PNC). Asimismo, es posible que se encuentre formando parte del DNA nucleolar que se distribuye en todo el nucléolo. Quizá forma parte de un segmento de DNA que une la PNC con algunas hebras de rDNA en los FCs y/o la DFR.

La asociación de genes y proteínas nucleolares en un mismo dominio interfásico, parece indicar que las moléculas que intervienen en una misma función (nucleolar), se reúnen en un microambiente nuclear, independientemente de que los genes se encuentren en cromosomas metafásicos diferentes.

## REFERENCIAS

- 1.-Arroua, M.L., Hartung, M., Devictor, M., Berge-Lefranc, J.L. and Stahl, A. (1982): Localisation of ribosomal genes by *in situ* hybridization in the fibrillar centre of the nucleolus in the human spermatocyte. *Biol. Cell*, 44: 337-340.
- 2.-Anteunis, A., Pouchelet, M., Gansmuller, A. and Robineaux, R. (1979): Organization of nucleolar DNA in resting lymphocytes as revealed by the diaminobenzidine technique. *J. Ultrastruct. Res.*, 69: 22-27.
- 3.-Bachelierie, J.P., Michot, B. and Raynal, F. (1983): Recognition signals for mouse pre-rRNA processing. A potential role for U3 nucleolar RNA. *Molec. Biol. Rep.*, 9: 79-86.
- 4.-Baker, J.R. (1949): The Cell-Theory: a restatement, history and critique. Addendum to part II. *Quart. J. micr. Sci.*, 90: 331.
- 5.-Baker, J.R. (1955): The Cell-Theory: a restatement, history and critique. Part V. the multiplication of nuclei. *Quart. J. micr. Sci.*, 96: 449-481
- 6.-Bernhard, W., Haguenu, F. et Oberling, C. (1952): L'ultra-structure du nucléole de quelques cellules animales, révélée par le microscope électronique. *Experientia*, 8: 58-59.
- 7.-Borysko, E. and Bang, F.B. (1951): Structure of the

- nucleolus as revealed by the electron microscope. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **89**: 468-470.
- 8.-Birnstiel, M.L., Wallace, H., Sirlin, J.L. and Fischberg, M. (1966): Localization of the ribosomal DNA complements in the nucleolar organizer region of *Xenopus laevis*. *Natl. Cancer. Inst. Monograph.*, **23**: 431-448.
- 9.-Birnstiel, M.L., Speirs, J., Purdom, I., Jones, K. and Loening, U.E. (1968): Properties and composition of the isolated ribosomal DNA satellite of *Xenopus laevis*. *Nature*, **219**: 454-463.
- 10.-Bouteille, M. and Hernandez-Verdun, D. (1979): Localization of a gene: the nucleolar organizer. *Biomedicine*, **30**: 282-287.
- 11.-Brachet, J. (1940): La détection histochimique des acides pentosenucléiques. *Compt. rend. soc. Biol.*, **133**: 88-90.
- 12.-Brachet, J. (1940): La localisation des acides pentosenucléiques pendant le développement des amphibiens. *Compt. rend. soc. Biol.*, **133**: 90-91.
- 13.-Brill, S.J., DiNardo, S., Voelkel-Meiman, K. and Sternglanz, R. (1987): Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication and for transcription of ribosomal RNA. *Nature*, **326**: 414-416.
- 14.-Brown, D.D. and Gurdon, J.B. (1964): Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **51**: 139-146.
- 15.-Brown, R. (1833): On the organs and mode of fecundation in Orchideae and Asclepiadeae. *Trans. Linn. Soc.*, **16**: 685-738.

- 16.-Brown, D.D. and Weber, C.S. (1968): Gene linkage by RNA-DNA hybridization. *J. Mol. Biol.*, **34**: 681-697.
- 17.-Busch, H. (1981): Molecular biology of the nucleolus and its relation to cancer. In Medicine in transition. The centennial of the University of Illinois College of Medicine. Cohen, E.P. (Ed.), pp 259-295. Univ. Ill. Press, Illinois.
- 18.-Busch, H., Cassidy, B., Henning, D., Lischwe, M., Ochs, R. Reddy, R., Rothblum, L. and Suh, D. (1985): Novel findings in the chemistry of the nucleolus. Abstract, **9th. European Nucleolar Workshop, Cracow, Poland, 1985.**
- 19.-Busch, H. and Reddy, R. (1981): RNA and protein components of the nucleolus: use of scleroderma antibodies as probes. In Current topics in Rheumatology. Systemic sclerosis. (scleroderma). Black, C.M. and Myers, A.R. (Eds.), pp 301-307. Gower Medical Publ. Ltd., New York.
- 20.-Busch, H. and Rothblum, L. (eds.) (1982): The Cell Nucleus. rDNA, Part A. Acad. Press.
- 21.-Busch, H. and Smetana, K. (1970): The nucleolus. Acad. Press, New York.
- 22.-Caspersson, T. and Schultz, J. (1940): Ribonucleic acids in both nucleus and cytoplasm, and the function of the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **26**: 507-515.
- 23.-Caspersson, T.O. (1950): Cell growth and cell function. W.W. Norton &Co., New York.
- 24.-Cabello, P., González-Fernández, A., Leyton, C., Sans, J. and de la Torre, C. (1986): Stimulated nucleologenesis in

- meristematic cells with hypomethylated DNA. **Biol. Cell**, **58**: 91-94.
- 25.-Caizergues-Ferrer, M., Belenguer, P., Lapeyre, B., Amalric, F., Wallace, M.O. and Olson, M.O.J. (1987): Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase. **Biochemistry**, **26**: 7876-7883.
- 26.-Cassidy, B.G. (1987): *In vitro* analysis of the *cis*-acting transcriptional elements of the rat ribosomal gene repeat. Ph. D. Thesis, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A.
- 27.-Cassidy, B.G., Subrahmanyam, Ch.S and Rothblum, L.I. (1982): The nucleotide sequence of the 5' region of rat 18S rDNA and adjoining spacer. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **107**: 1571-1576.
- 28.-Cassidy, B., Yang-Yen, H.F. and Rothblum, L. (1986): Transcriptional role for the nontranscribed spacer of rat ribosomal DNA. **Mol. Cell. Biol.**, **6**: 2766-2773.
- 29.-Chan, P.K., Aldrich, M. and Busch, H. (1985): Alterations in immunolocalization of the phosphoprotein B23 in HeLa cells during serum starvation. **Exptl. Cell Res.**, **161**: 101-110.
- 30.-Chan, P.K., Aldrich, M. Cook, R. and Busch, H. (1986): Amino acid sequence of protein B23 phosphorylation site. **J. Biol. Chem.**, **261**: 1868-1872.
- 31.-Chan, Y.L., Gutell, R., Noller, H.F. and Wool, I.G. (1984): The nucleotide sequence of a rat 18S ribosomal ribonucleic

- acid gene and a proposal for the secondary structure of 18S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **259**: 224-230.
- 32.-Chikaraishi, D.M., Buchanan, L., Danna, K.J. and Harrington, C.A. (1983): Genomic organization of rat rDNA. *Nucleic Acids Res.*, **11**: 6437-6452.
- 33.-Christensen, M.A., Maloo, J., Swischuk, J.L and Schelling, M. (1986): Characterization of the nucleolar protein, B36, using monoclonal antibodies. *Exptl. Cell Res.*, **166**: 77-93.
- 34.-Crouch, R.J., Kanaya, S. and Earl, P.L. (1983): A model for the involvement of the small nucleolar RNA (U3) in processing eukaryotic ribosomal RNA. *Mol. Biol. Rep.*, **9**: 75-78.
- 35.-De la Torre, C., Fernández-Gómez, E. and Giménez-Martín, G. (1975): Rate of nucleologenesis as a measure of gene activity. *Nature*, **256**: 503-505.
- 36.-De Quatrefages, M.A. (1849): Etudes embryogéniques. Mémoire sur l'embryogénie des tarets. *Ann. Sci. Nat. Ser. 3*, **11**: 202-228.
- 37.-Derenzini, M., Pession, A., Betts-Eusebi, M., Novello, F. (1983): Relationship between the extended, non-nucleosomal intranucleolar chromatin *in situ* and ribosomal RNA synthesis. *Exptl. Cell Res.*, **145**: 127-143.
- 38.-Derenzini, M., Viron, A. and Puvion-Dutilleul, F. (1982): The feulgen-like osmium-amine reaction as a tool to investigate chromatin structure in thin sections. *J. Ultrastruct. Res.*, **80**: 133-147.
- 39.-Derenzini, M., Hernandez-Verdun, D., Farabegoli, F.,

Ultramicroscopy, 21: 103-110.

- 47.-Estable, C. y Sotelo, J.R. (1951): Una nueva estructura celular: el nucleolonema. *Inst. Inv. Cien. Biol. Publ. (Montevideo)*, 1: 105-126.
- 48.-Fakan, S. and Hernandez-Verdun, D. (Eds.) (1986): The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Biol. Cell*, 56: 189-206.
- 49.-Financsek, I., Tora, L., Kelemen, G. and Hidvegi, E. (1986): Supercoil induced S1 hypersensitive sites in the rat and human ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res.*, 14: 3263-3277.
- 50.-Fontana, F. (1781): Traité sur le vènin de la vipere, sur les poisons americans, sur le laurier-cerise et sur quelques autres poisons vegetaux. On y a joint des observations sur la structure primitive du corps animal. Diffèrentes expèriences sur la reproduction des nerfs et la description d'un nouveau canal de l'oeil. Florence. La cita original no fuè consultada, pero èsta se encuentra en la Library of Congress, en Washington D.C., U.S.A., con número de catálogo QP941.F69 (34e1).
- 51.-Gall, J. G. and Pardue, M.L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 63: 378-383.
- 52.-Garg, L.C., DiAngelo, S. and Jacob, S.T. (1987): Role of DNA topoisomerase in the transcription of supercoiled rRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 3185-3188.

- 53.-Gas, N., Escande, M.L. and Stevens, B.J. (1985):  
Immunolocalization of the 100 K nucleolar protein during the  
mitotic cycle in CHO cells. *Biol. Cell*, **53**: 209-218.
- 54.-Giménez-Martín, G., de la Torre, C., López-Sáez, J.F. and  
Espona, P. (1977): Plant nucleolus: structure and physiology.  
*Cytobiologie*, **14**: 421-462.
- 55.-Goessens, G. (1984): Nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol.*,  
**87**: 107-158.
- 56.-Goessens, G. and Lepoint, A. (1974a): The fine structure of  
the nucleolus during interphase and mitosis in Ehrlich tumour  
cells cultivated *in vitro*. *Exptl. Cell Res.*, **87**: 63-72.
- 57.-Goessens, G. and Lepoint, A. (1974b): The nucleolus-  
organizing regions (NORs): recent data and hypotheses. *Biol.  
Cell.*, **35**: 211-220.
- 58.-Goodpasture, C. and Bloom, S.E. (1975): Visualization of  
nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using  
silver staining. *Chromosoma (Berl.)*, **53**: 37-50.
- 59.-Granboulan, N. et Granboulan, P. (1965): Cytochimie  
ultrastructurale du nucléole. II. Etude des sites de synthèse  
du RNA dans le nucléole et le noyau. *Exptl. Cell Res.*, **38**:  
604-619.
- 60.-Gulder, H.H., Szostecki, C., Vosberg, H.P., Lamoek, H.J.,  
Penner, E. and Bautz, F.A. (1986): Scl 70 autoantibodies from  
scleroderma patients recognize a 95 kDa protein identified as  
DNA topoisomerase I. *Chromosoma (Berl.)*, **94**: 132-138.
- 61.-Hadjiolov, A.A. (1985): The nucleolus and ribosome

biogenesis. Springer-Verlag, New York.

- 62.-Hadjiolov, A.A., Georgiev, O.I., Nosikov, V.V. and Yavachev, L.P. (1984): Primary and secondary structure of rat 28S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.*, **12**: 3677-3693.
- 63.-Hadjiolova, K., Rose, K.M. and Scheer, U. (1986): Immunolocalization of nucleolar proteins after D-galactosamine-induced inhibition of transcription in rat hepatocytes. *Exptl. Cell Res.*, **165**: 481-493.
- 64.-Harper, M.E. and Saunders, G.F. (1981): Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma (Berl.)*, **83**: 431-439.
- 65.-Harrington, C.A. and Chikaraishi, D.M. (1983): Identification and sequence of the initiation site for rat 45S ribosomal RNA synthesis. *Nucleic Acids Res.*, **11**: 3317-3332.
- 66.-Harrington, C.A. and Chikaraishi, D.M. (1987): Transcription of spacer sequences flanking the rat 45S ribosomal DNA gene. *Mol. Cell. Biol.*, **7**: 314-325.
- 67.-Heitz, E. (1931): Die ursache der gesetzmabigen zahl, lage, form und grobe pflanzlicher nukleolen. *Planta (Berl.)*, **12**: 775-844.
- 68.-Henderson, A.S., Warburton, D. and Atwood, K.C. (1972): Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**: 3394-3398.
- 69.-Hernandez-Verdun, D., Hubert, J., Bourgeois, C. et Bouteille, M. (1978): Identification ultrastructurale de

- l'organisateur nucléolaire par la technique à l'argent. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, **287**: 1421-1423
- 70.-Hernandez-Verdun, D. (Ed.) (1983): The nucleolar organizer regions. *Biol. Cell*, **49**: 191-202.
- 71.-Hernandez-Verdun, D., Bouteille, M., Ege, T. and Ringertz, N.R. (1979): Fine structure of nucleoli in micronucleated cells. *Exptl. Cell Res.*, **124**: 223-235.
- 72.-Herrera, A.H. and Olson, M.O.J. (1986): Association of protein C23 with rapidly labeled nucleolar RNA. *Biochemistry*, **25**: 6258-6264.
- 72a.-Hines, P.J. and Bakken, A.H. (1986): 5S ribosomal genes are associated with active nucleoli. *J. Cell Biol.*, **103**: 498a.
- 72b.-Hozák, P., Zatssepina, O., Vasilyeva, I. and Chentsov, Y. (1986): An electron microscopic study of nucleolus-organizing regions at some stages of the cell cycle ( $G_0$  period,  $G_2$  period, mitosis). *Biol. Cell*, **57**: 197-206.
- 73.-Humason, G. (1979): Animal tissue techniques, 4th ed. Freeman and Co.
- 74.-Hsu, T.C., Brinkley, B.R. and Arrighi, F.E. (1967): The structure and behavior of the nucleolus organizers in mammalian cells. *Chromosoma (Berl.)*, **23**: 137-153.
- 75.-Hsu, T.C., Spirito, S. and Pardue, M.L. (1975): Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma (Berl.)*, **53**: 25-36.
- 76.-Jordan, G. (1987): At the heart of the nucleolus. *Nature*,

329: 489-490.

- 77.-Jordan, E.G. and Cullis, C.A. (Eds.) (1982): The nucleolus. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 78.-Kafatos, F.C., Jones, C.W. and Efstratiadis, A. (1979): Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1541-1552.
- 79.-Kano, Y., Maeda, S. and Sugiyama, T. (1976): The localization of ribosomal cistrons (rDNA) in chromosomes of the rat. *Chromosoma (Berlin)*, 55: 37-42.
- 80.-Knight, E. and Darnell, J.E. (1967): Distribution of 5 S RNA in Hela cells. *J. Mol. Biol.*, 28: 491-500.
- 81.-Lacoste-Royal, G. and Simard, R. (1984): Distribution of U3 snRNA in the nucleolus of CHO cells. *Biol. Cell*, 52: 191.
- 82.-La Cour, L.F. and Crawley, W.C. (1965): The site of rapidly labelled ribonucleic acid in nucleoli. *Chromosoma (Berl.)*, 16: 124-132.
- 83.-Lapeyre, B., Bourbon, H. and Amalric, F. (1987): Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 1472-1476.
- 84.-Lawrence, J.B. and Singer, R.H. (1985): Quantitative analysis of *in situ* hybridization methods for the detection of actin gene expression. *Nucleic Acids Res.*, 13: 1777-1799.
- 85.-Lawrence, J.B. and Singer, R.H. (1986): Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins.

**Cell, 45: 407-415.**

- 86.-Leuwenhoek (sic), A. (1770): Concerning the circulation and globules of the blood in butts. **Phil. Trans.**, **22**: 491-494.
- 87.-Lepoint, A. and Goessens, G. (1978): Nucleologogenesis in Ehrlich tumour cells. **Exptl. Cell Res.**, **117**: 89-94.
- 88.-Lewin, R. (1987): Genes, 3rd ed. John Wiley and sons, New York.
- 89.-Lischwe, M.A., Cook, R.G., Ahn, Y.S., Yeoman, L.C. and Busch, H. (1985): Clustering of glycine and N(G), N(G)-dimethylarginine in nucleolar protein C23. **Biochemistry**, **24**: 6025-6028.
- 90.-Lischwe, M.A., Ochs, R.L., Reddy, R., Cook, R.G., Yeoman, L.C., Tan, E.M., Reichlin, M. and Busch, H. (1985): Purification and partial characterization of a nucleolar scleroderma antigen (Mr= 34 000; pI= 8.5) rich in N(G), N(G)-dimethylarginine. **J. Biol. Chem.**, **260**: 14304-14310.
- 91.-Lischwe, M.A., Roberts, K.D., Yeoman, L.C. and Busch, H. (1982): Nucleolar specific acidic phosphoprotein C23 is highly methylated. **J. Biol. Chem.**, **257**: 14600-14602.
- 92.-Lischwe, M.A., Smetana, K., Olson, M.O.J. and Busch, H. (1979): Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. **Life Sci.**, **25**: 701-708.
- 93.-Mamrack, M.D., Olson, M.O.J. and Busch, H. (1979): Amino acid sequence and sites of phosphorylation in a highly acidic region of nucleolar nonhistone protein C23. **Biochemistry**, **15**: 3381-3386.

- 94.-Manuelidis, L. (1985): Indications of centromere movement during interphase and differentiation. In Molecular structure of the number 21 chromosome and Down syndrome. Smith, G.F. (Ed.). Ann. New York Ac. Sci., 450: 205-221.
- 95.-Marinozzi, V. (1964): Cytochemie ultrastructurale du nucleole RNA aux proteines intranucleolaires. J. Ultrastruct. Res., 10: 433-456.
- 96.-Marinozzi, V. et Bernhard, W. (1963): Presence dans le nucleole de deux types de ribonucleoproteines morphologiquement distinctes. Exptl. Cell Res., 32: 595-598.
- 97.-Matsui, S. and Sandberg, A.A. (1985): Intranuclear compartmentalization of DNA-dependent RNA polymerases: association of RNA polymerase I with nucleolar organizing chromosomes. Chromosoma (Berlin), 92: 1-6.
- 98.-McCarty, W.C. and Haumeder, E. (1934): Has the cancer cell any differential characteristics? Am. J. Cancer, 20: 403-407.
- 99.-McClintock, B. (1934): The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. Z. Zellforsch. mikr. Anat., 21: 294-328.
- 100.-McConkey, E.H. and Hopkins, J.W. (1964): The relationship of the nucleolus to the synthesis of ribosomal RNA in HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 51: 1197-1204.
- 101.-Miller, O.L., and Beatty, B.R. (1969): Visualization of nucleolar genes. Science, 164: 955-957.
- 102.-Miller, O. L. (1981): The nucleolus, chromosomes, and

- visualization of genetic activity. *J. Cell Biol.*, **91**: 15s-27s.
- 103.-Miller, D.A., Dev, V., Tantravahi, R. and Miller, O.J. (1976): Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exptl. Cell Res.*, **101**: 235-243.
- 104.-Mirre, C. and Knibiehler, B. (1982): A re-evaluation of the relationships between the fibrillar centres and the nucleolus-organizing regions in reticulated nucleoli: ultrastructural organization, number and distribution of the fibrillar centres in the nucleolus of the mouse Sertoli cells. *J. Cell Sci.*, **55**: 247-259.
- 105.-Mirre, C. and Stahl, A. (1981): Ultrastructural organization, sites of transcription and distribution of the fibrillar centres in the nucleolus of the mouse oocyte. *J. Cell Sci.*, **48**: 105-126.
- 106.-Montgomery, T.H. (1898): Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus. *J. Morphol.*, **15**: 265-564.
- 107.-Morcillo, G. and de la Torre, C. (1979): Mapping nucleologenesis in relation to transcription. *Biol. Cell.*, **36**: 1-6.
- 108.-Morcillo, G., de la Torre, C. and Giménez-Martín, G. (1976): Nucleolar transcription during plant mitosis. *In situ* assay for RNA polymerase activity. *Exptl. Cell. Res.*, **102**: 311-316.

- 109.-Mroccka, D.L., Cassidy, B., Busch, H. and Rothblum, L.I.  
(1984): Characterization of rat ribosomal DNA. The highly repetitive sequences that flank the ribosomal RNA transcription unit are homologous and contain RNA polymerase III transcription initiation sites. *J. Mol. Biol.*, 174: 141-162.
- 110.-Muramatsu, M., Smetana, K. and Busch, H. (1963):  
Quantitative aspects of isolation of nucleoli of the Walker carcinosarcoma and liver of the rat. *Cancer Res.*, 23: 510-518.
- 111.-Noel, J.S., Dewey, W.C., Abel Jr., J.H. and Thompson, R.P.  
(1971): Ultrastructure of the nucleolus during the chinese hamster cell cycle. *J. Cell Biol.*, 49: 830-847.
- 112.-Ochs, R.L., Lischwe, M., O'Leary, . and Busch, H. (1983):  
Localization of nucleolar proteins B23 and C23 during mitosis. *Exptl. Cell Res.*, 146: 139-149.
- 113.-Ochs, R.L., Lischwe, M. A., Shen, E., Carrol, R.E. and Busch, H. (1985): Nucleologenesi: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma (Berl.)*, 92: 330-336.
- 114.-Ochs, Lischwe, M., Spohn, W.H. and Busch, H. (1985):  
Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol. Cell*, 54: 123-134.
- 115.-Olson, M.G.J., Orrick, L.R., Jones, C.E. and Busch, H.  
(1974): Phosphorylation of acid soluble nucleolar proteins of Novikoff hepatoma ascites cells *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 249: 2823-2827.

- 116.-Ochs, R.L. Comunicación personal.
- 117.-Olson, M.O.J., Guetzow, K. and Busch, H. (1981):  
Localization of phosphoprotein C23 in the nucleoli by immunological methods. *Exptl. Cell Res.*, **135**: 259-265.
- 118.-Olson, M.O.J., Rivers, Z.M., Thompson, B.A., Kao, W.Y. and Case, S.T. (1983): Interaction of nucleolar phosphoprotein C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **22**: 3345-3351.
- 119.-Orrick, L.R., Olson, M.O.J. and Busch, H. (1973): Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (acid-extracted nucleolar proteins). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**: 1346-1320
- 120.-Pardue, M.L. and Gall, J. G. (1969): Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**: 600-604.
- 121.-Pardue, M.L., Brown, D.D. and Birnstiel, M.L. (1973): Localization of genes for 5 S rRNA in *Xenopus laevis*. *Chromosoma*, **42**: 191-203.
- 122.-Parker, K.A. and Steitz, J. (1987): Structural analysis of the human U3 ribonucleoprotein particle reveal a conserved sequence available for base pairing with pre-rRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7**: 2899-2913.
- 123.-Perry, R.P. (1960): On the nucleolar nuclear dependance of cytoplasmic RNA synthesis in HeLa cells. *Exptl. Cell Res.*, **20**: 216-220.

- 124.-Perry, R.P. (1962): The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **48**: 2179-2189.
- 125.-Perry, R.P. (1976): Processing of RNA. *Ann. Rev. Genet.*, **45**: 605-639.
- 126.-Pfeifle, J. Boller, K. and Anderer, F.A. (1986): Phosphoprotein pp135 is an essential component of the nucleolus organizer region (NOR). *Exptl. Cell Res.*, **162**: 11-22.
- 127.-Ploton, D., Thiry, M., Menager, M., Lepoint, A., Adnet, J.J. and Goessens, G. (1987): Behavior of nucleolus during mitosis. A comparative ultrastructural study of various cancerous cell lines using the Ag-NOR staining procedure. *Chromosoma (Berlin)*, **95**: 95-107.
- 128.-Pouchelet, M. and Anteunis, A. (1979): Nucleolar fibrillar centre and oxidized diaminobenzidine staining. *Biol. Cell.*, **35**: 133-136.
- 129.-Prestayko, A.W., Tonato, M. and Busch, H. (1970): Low molecular weight RNA associated with 28S nucleolar RNA. *J. Mol. Biol.*, **47**: 505-515.
- 130.-Recher, L., Whitescarver, J. and Briggs, L. (1969): The fine structure of a nucleolar constituent. *J. Ultrastruct. Res.*, **29**: 1-14.
- 131.-Reddy, R., Henning, D. and Busch, H. (1979): Nucleotide sequence of nucleolar U3B RNA. *J. Biol. Chem.*, **254**: 11097-11105.

- 132.-Reddy, R., Henning, D. and Busch, H. (1985): Primary and secondary structure of U8 small nuclear RNA. *J.Biol.Chem.*, **260**: 10930-10935.
- 133.-Reddy, R., Henning, D., Das, G., Harless, M. and Wright, D. (1987): The capped U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *J.Biol. Chem.*, **262**: 75-81.
- 133a.-Reilly, M. (1986): A mounting medium which retards fading of fluorescent dyes. *HistoLogic*, **16**: 219.
- 134.-Reimer, G., Rose, K.M., Scheer, U. and Tan, E.M. (1987): Autoantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera. *J. Clin. Invest.*, **79**: 65-72.
- 135.-Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, **113**: 237-251.
- 136.-Ritossa, F.M. and Spiegelman, S. (1965): Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolar organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **53**: 737-745.
- 137.-Ritossa, F.M., Atwood, K.C. and Spiegelman, S. (1966): A molecular explanation of the bobbed mutants of *Drosophila* as partial deficiencies of "ribosomal" DNA. *Genetics*, **54**: 819-834.
- 138.-Rose, K.M., Stetler, D.A. and Jacob, S.T. (1981): Protein kinase activity of RNA polymerase I purified from rat hepatoma: probable function of Mr 42, 000 and 46, 600

- polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 2833-2837.
- 139.-Rothblum, L.I., Parker, D.L. and Cassidy, B. (1982):  
Isolation and characterization of rat ribosomal DNA clones.  
*Gene*, **17**: 75-77.
- 140.-Rothblum, L.I., Reddy, R. and Cassidy, B. (1982):  
Transcription initiation site of of rat ribosomal DNA.  
*Nucleic Acids Res.*, **10**: 7345-7362.
- 141.-Rothblum, L.I., Smith, D., Cassidy, B. and Yang-Yen, H.F.  
(1987): *Cis*-acting and *trans*-acting factors involved in  
ribosomal RNA synthesis: focus on the nontranscribed spacer.  
Abstract, 10th. European Nucle(ol)ar workshop, Nijmegen,  
Holland, 1987.
- 142.-Scheer, U. and Rose, K.M. (1984): Localization of RNA  
polymerase I in interphase and mitotic chromosomes by light  
and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc. Natl.  
Acad. Sci. U.S.A.*, **81**: 1431-1435.
- 143.-Scherrer, K., Latham, H. and Darnell, J.E. (1963):  
Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to  
ribosomal RNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,  
**49**: 240-248.
- 144.-Schoefl, G.I. (1964): The effect of actinomycin D on the  
fine structure of the nucleolus. *J. Ultrastructu. Res.*, **10**:  
224-243.
- 145.-Schwarzacher, H.G., and Wachtler, F. (1983): Nucleolus  
organizer regions and nucleoli. *Hum. Genet.*, **63**: 89-99.
- 146.-Semeshin, V.F., Sherudilo, A.I. and Balyaeva, E.S. (1975):

- Nucleoli formation under inhibited RNA synthesis. *Exptl. Cell Res.*, **93**: 458-467.
- 147.-Singer, R.H. Lawrence, J.B. and Villnave, C. (1986): Optimization of *in situ* hybridization using isotopic and non-isotopic detection methods. *Biotechniques*, **4**: 230-250.
- 148.-Singh, L., Purdom, I.F. and Jones, K.W. (1977): Effect of different denaturing agents on the detectability of specific DNA sequences of various base compositions by *in situ* hybridization. *Chromosoma (Berlin)*, **60**: 377-389.
- 149.-Smetana, K. (1967): Basic histochemical and cytochemical methods. In: Busch, H. (ed.) Methods in cancer research, vol. II. Ac. Press, New York.
- 150.-Somerville, J. (1986): Nucleolar structure and ribosome biogenesis. *Trends Biochem. Sci.*, **11**: 438-442.
- 151.-Spector, D.L., Ochs, R.L. and Busch, H. (1984): Silver staining, immunofluorescence and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma (Berl.)*, **90**: 139-148.
- 152.-Spector, D. L. and Smith, H.C. (1986): Redistribution of U-snRNPs during mitosis. *Exptl. Cell Res.*, **163**: 87-94.
- 153.-Speirs, J. and Birnstiel, M.L. (1974): Arrangement of the 5.8 S cistrons in the genome of *Xenopus laevis*. *J.Mol. Biol.*, **87**: 237-256.
- 154.-Stevens, B. (1965): The fine structure of the nucleolus during mitosis in the grasshopper neuroblast cell. *J. Cell Biol.*, **24**: 349-368.

- 155.-Stockert, J.C., Fernández-Gómez, M.E., Giménez-Martín, G. and López-Sàez, J.F. (1970): Organization of argyrophilic material throughout the division cycle of meristematic cells. **Protoplasma**, **69**: 265-278.
- 156.-Stroke, I.L. and Weiner, A.M. (1985): Genes and pseudogenes for rat U3A and U3B small nuclear RNA. **J. Mol. Biol.**, **184**: 183-193.
- 157.-Subrahmanyam, C.S., Cassidy, B., Busch, H. and Rothblum, L.I. (1982): Nucleotide sequence of the region between the 18S rRNA and 28S rRNA sequences of rat ribosomal DNA. **Nucleic Acids Res.**, **10**: 3667-3680.
- 158.-Suh, D., Busch, H. and Reddy, R. (1986): Isolation and characterization of a human U3 small nucleolar RNA gene. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **137**: 1133-1140.
- 159.-Suh, D., Busch, H. and Reddy, R. (1987): Human U3 small nucleolar RNA genes are localized to the nucleoplasm. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **143**: 658-664.
- 160.-Swift, H. (1959): Studies on nuclear fine structure. **Brookhaven Symp. Biol.**, **12**: 139-152.
- 161.-Tague, B.W. and Gerbi, S. (1984): Processing of the large rRNA precursor: two proposed categories of RNA-RNA interactions in eukaryotes. **J. Mol. Evol.**, **20**: 362-367.
- 162.-Thiry, M., Lepoint, A. and Goessens, G. (1985): Re-evaluation of the site of transcription in Ehrlich tumour cell nucleoli. **Biol. Cell**, **54**: 57-64.
- 163.-Vázquez-Nin, G.H., Chávez, B. and Tomás-Martín, C. (1973):

- A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. *J. Microscopie*, 16: 243-246.
- 163a.-Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., Zavala, G., Jiménez-García, L.F., González, M.A. and Parra, R. (1986): Relations between nucleolar morphometric parameters and pre-rRNA synthesis in animal and plant cells. *Acta Anat.*, 126: 141-146.
- 164.-Vincent, W.S. (1955): Structure and chemistry of nucleoli. *Intern. Rev. Cytol.*, 4: 269-298.
- 164a.-Williams, M.A., Kleinschmidt, J.A., Krohne, G. and Franke, W.W. (1982): Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of *Xenopus laevis* oocytes identified by gel electrophoresis. *Exptl. Cell Res.*, 137: 341-351.
- 165.-Yang-Yen, H.F. and Rothblum, L.I. (1986): Partial nucleotide sequence of a 3.4 kb fragment from the rat ribosomal DNA nontranscribed spacer. *Nucleic Acids Res.*, 14: 5557.
- 166.-Yang-Yen, H.F., Subrahmanyam, C.S., Cassidy, B. and Rothblum, L.I. (1985): Characterization of rat ribosomal DNA II. Identification of the highly repetitive DNA in the non-transcribed spacer. *J. Mol. Biol.*, 184: 389-398.
- 167.-Yang-Yen, H.F. and Rothblum, L.I. (1986): Partial nucleotide sequence of a 3.4kb fragment from the rat ribosomal DNA nontranscribed spacer. *Nucleic Acids Res.*, 14: 5557.
- 168.-Yavachev, L.F., Georgiev, G.I., Braga, E.A., Avdonina,

T.A., Bogomolova, A.E., Zhurkin, V.B., Nosikov, V.V. and Hadjiolov, A.A. (1986): Nucleotide sequence analysis of the spacer regions flanking the rat rRNA transcription unit and identification of repetitive elements. *Nucleic Acids Res.*, **14**: 2799-2810.

169.-Yung, Y.M., Busch, H. and Chan, P.K. (1986): Effects of luzopeptins on protein B23 translocation and ribosomal synthesis in Hela cells. *Cancer Res.*, **46**: 922-925.

J16LF'88

