

00381

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Ciencias

26
2ej



Disección Molecular del Nucléolo *in situ*.

Visualización de Acidos Nucleicos Nucleolares
por Hibridación *in situ* Fluorescente y Ultraestructural

TESIS

que para obtener el grado académico de
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

PRESENTA:

La M. en C. MARIA DE LOURDES SEGURA VALDEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Director de Tesis: Dr. Luis Felipe Jiménez García



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mis padres Felipe y Raquel y a mi hija Jere

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE	3
2.1. RESUMEN	6
2.2. ABSTRACT	8
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1. Generalidades sobre la biología celular y molecular del nucléolo	9
3.2. El nucléolo fue observado desde 1781	10
3.3. En el nucléolo se producen los ribosomas	12
3.4. Ultraestructura del nucléolo	14
3.5. El nucléolo y los ribosomas contienen varios rRNAs y UsnRNAs	17
3.6. Los rRNAs del ribosoma se forman en el nucléolo a partir de un precursor llamado pre-rRNA	18
3.7. Los UsnRNAs nucleolares participan en la maduración del pre-rRNA	20
3.8. El precursor pre-rRNA se transcribe a partir del gen rDNA	22
3.9. El nucléolo contiene unas 400 proteínas	24
3.10. La nucleologénesis es útil para estudiar relaciones espacio-temporales de ácidos nucleicos y proteínas nucleolares	27
3.11. La distribución de DNA y RNA nucleolares se puede estudiar por hibridación <i>in situ</i>	28

3.11.1. Marcado de la sonda	31
3.11.2. Factores que afectan la tasa de hibridación	34
4. OBJETIVOS	37
5. METODOLOGÍA	38
5.1. Células.	38
5.2. Tinción de plata.	38
5.3. Anticuerpos	38
5.4. Inmunotransferencia	39
5.5. Sondas	39
5.5.1. Marcado de la sonda	40
5.5.2 Verificación del marcado por "dot blot"	40
5.6. Análisis tipo northern	41
5.7. Hibridación <i>in situ</i> con enzimas cromógenas	41
5.8. Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	41
5.9 Hibridación <i>in situ</i> en combinación con inmunolocalización	42
5.10. Hibridación <i>in situ</i> para microscopía electrónica de transmisión	45
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1. Los genes de rDNA se localizan en el componente fibrilar denso (DFC) en nucléolos de hepatocitos de rata	50
6.2. En interfase, el rRNA se localiza en el nucléolo. El U3snRNA se localiza en el nucléolo y en los cuerpos espiralados	64

6.3. El U3snRNA se localiza en cuerpos prenucleolares (PNBs) durante la telofase	75
7. CONCLUSIONES	86
8. AGRADECIMIENTOS	88
9. REFERENCIAS	89

2.1. RESUMEN

El nucléolo es el sitio de síntesis y procesamiento de la mayor parte del RNA prerribosómico (pre-rRNA) y del ensamblado de las subunidades de los ribosomas citoplásmicos en las células eucariontes. El nucléolo contiene gran cantidad de proteínas y ácidos nucleicos característicos, que aparentemente se distribuyen en subcompartimientos bien definidos morfológicamente como se observan con el microscopio electrónico de transmisión. En este trabajo se estudió la localización subcelular de los principales ácidos nucleicos del nucléolo por hibridación *in situ* con sondas marcadas con biotina, para conocer si aquellas moléculas tienen una localización definida que ayude a determinar si hay una correlación entre la estructura nucleolar y los eventos de síntesis y maduración del pre-rRNA y del ensamblado del ribosoma. El DNA ribosómico (rDNA) se analizó por un procedimiento de hibridación *in situ* ultraestructural desarrollado en este trabajo, que se aplicó en hepatocitos de rata en interfase. También se estudió la distribución del RNA ribosómico (rRNA) y del RNA U3 (U3snRNA) durante la interfase y la mitosis, utilizando hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Algunas muestras se trabajaron con un doble procedimiento de hibridación *in situ* seguido de inmunolocalización para visualizar las proteínas coilina o la S6. Para determinar la especificidad de la sonda de U3snRNA y del anticuerpo contra la proteína S6, se llevaron a cabo análisis de electrotransferencia northern e inmunotransferencia, respectivamente. En interfase, el rDNA se localiza en el componente fibrilar denso (DFC) del nucléolo. Se encuentra distribuido preferentemente en las porciones que son cercanas a los centros fibrilares (FCs). El rRNA se observó en el citoplasma y en el nucléolo durante la interfase, en tanto que el U3snRNA se encontró tanto en el nucléolo como en los cuerpos espiralados, en donde coexiste con las proteínas coilina y S6. Durante la mitosis, ambos RNAs se separan del nucléolo. En telofase, durante la nucleologénesis, el rRNA se observa en la región del organizador nucleolar (NOR) y en el citoplasma, mientras que el U3snRNA se localiza en los cuerpos prenucleolares (PNBs), como material heredado de la célula madre que se fusiona con el NOR. Se concluye que los genes de rDNA intranucleolares se localizan en el componente fibrilar denso (DFC) del nucléolo, en donde debe ocurrir la actividad transcripcional del pre-rRNA.

Cuando se produce pre-rRNA nucleolar durante la telofase, algunas moléculas que participan en su maduración -como el U3snRNA- se fusionan con el NOR. La localización de U3snRNA y de la proteína S6 en los cuerpos espiralados, sugiere un papel importante de estos pequeños cuerpos ribonucleoproteicos intranucleares en el metabolismo de los RNAs inmaduros del nucléolo.

2.2. ABSTRACT

The nucleolus is the site of most preribosomal (pre-rRNA) synthesis and processing and assembly of cytoplasmic ribosomes in eukaryotes. The nucleolus contains many characteristic nucleic acids and proteins that apparently are distributed in so well defined subcompartments when observed with the transmission electron microscope. In this study, the subcellular localization of major nucleic acids of the nucleolus was studied by means of *in situ* hybridization using biotinylated probes, in order to see whether or not those molecules are specifically localized, in such a way that a correlation of nucleolar structure and metabolism of pre-rRNA can be obtained. rDNA was analyzed by a procedure of ultrastructural *in situ* hybridization developed during this work for rat hepatocytes. Moreover, the distribution of rRNA and U3snRNA was studied by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) during interphase and mitosis. Some samples were used for a double procedure of *in situ* hybridization followed by immunofluorescence to coilin or ribosomal protein S6. To determine the specificity of the U3snRNA probe and that of the antibody for protein S6, a northern and western analysis were carried out, respectively. During interphase, rDNA was localized to the dense fibrillar component (DFC) of the nucleolus, mainly in the periphery of the fibrillar centers (FCs). rRNA was observed in the nucleoli and cytoplasm while U3snRNA was observed in both, nucleolus and coiled bodies, where proteins coilin and S6 are also present. During mitosis, both RNAs go away from the nucleolus. At telophase, during nucleologenesis, rRNA is present in the NORs and in the cytoplasm, while U3snRNA is present in the prenucleolar bodies (PNBs), as maternally inherited material, that fuse to the NORs. It is concluded that rDNA genes are present in the DFC of the nucleolus, where transcriptional activity should take place. When pre-rRNA is synthesized at telophase, some molecules participating in its maturation -as U3snRNA- fuse to the NORs. The localization of U3snRNA and ribosomal protein S6 in coiled bodies, suggests an important role for these small intranuclear ribonucleoprotein bodies in the metabolism of immature nucleolar RNAs.

3. INTRODUCCION

3.1. Generalidades sobre la biología celular y molecular del nucléolo

En el nucléolo se producen los ribosomas, que son las estructuras celulares citoplásmicas en donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas (en Alberts y col., 1994). El nucléolo es la estructura ribonucleoproteica intranuclear más conspicua y ubicua en las células eucariontes. Es el sitio en donde ocurre la síntesis y procesamiento del RNA prerribosómico (pre-rRNA) y el ensamblado de las subunidades del ribosoma (Busch y Smetana, 1970; Hadjiolov, 1985; Scheer y Benavente, 1990). En estos procesos intervienen ácidos nucleicos y proteínas que no se encuentran en otra parte de la célula durante la interfase (en Jiménez-García, 1988) y que se distribuyen en subcompartimientos nucleolares bien definidos como se observan con el microscopio electrónico. Estos compartimientos se denominan centros fibrilares (FCs), componente fibrilar denso (DFC) y componente granular (G) (Wachtler y Stahl, 1993; Risueño y Testillano, 1994). Aunque el nucléolo se disgrega en sus componentes moleculares y estructurales durante la mitosis (ver Jiménez García y col, 1989), se forma de nuevo durante la telofase a partir de segmentos cromosómicos específicos denominados organizadores nucleolares (NORs) (McClintock, 1934), que contienen los genes rDNA, de los cuales se produce el pre-rRNA.

3.2. El nucléolo fue observado desde 1781

El nucléolo fue descrito por primera vez por el italiano Felice Fontana en 1781, en una muestra de *mucus* que contenía células del epitelio superficial de descamación de la piel de anguila. En su trabajo sobre el efecto del veneno de las serpientes (Fontana, 1781), Fontana describe al nucléolo de la siguiente manera:

"La Fig. 10. réprésé un de ces globules de la Fig. 9. qui avait dans son milieu un corps oviforme taché aussi au milieu. On y a mis à côté le corps C, qui est un des globules du sang pour en comparer la grosseur" ("La Fig. 10. representa uno de esos glóbulos de la Fig. 9. que tiene un cuerpo oviforme en el centro que a su vez está manchado también en el centro. El cuerpo C, es un glóbulo de la sangre para comparar los tamaños").

Poco más de 100 años después de esta publicación, a finales del siglo XIX, Montgomery realiza una exhaustiva revisión sobre el conocimiento del nucléolo (Montgomery, 1898), en donde establece la presencia casi universal de la estructura en los seres vivos y su comportamiento durante la mitosis. Para los años 1930s, Heitz en 1931-33 y McClintock en 1934 (ver McClintock, 1934), seguidos de muchos citólogos y citogenetistas, establecieron firmemente que el nucléolo se formaba a partir de un segmento específico de determinados cromosomas, que se denominó la región del organizador nucleolar o NOR (McClintock, 1934). En los años 1940s los trabajos citoquímicos de Casperson y Brachet mostraron que el nucléolo contiene gran cantidad de RNA, cuya particularidad es la de que es abundante en células que sintetizan activamente proteínas (ver Jiménez García, 1988). Estos hallazgos colocaron al nucléolo en una posición

prominente para entender la relación entre el DNA, el RNA y las proteínas (Sommerville, 1981).

En los 1950's muchos citoquímicos y microscopistas electrónicos perfeccionaron el análisis ultraestructural de los organelos celulares. Entre ellos destacan los grupos de Bernhard y Granboulan en Europa y el de Smetana y Busch en Estados Unidos. Así, una serie de estudios logran demostrar la naturaleza ribonucleoproteica del nucléolo (en Busch y Smetana, 1970; Hadjiolov, 1985) y una estructuración no homogénea, en donde ocurre una gran actividad transcripcional. También es en este período se logran aislar nucléolos puros, lo que provocó un avance importante en el estudio de su composición molecular. Esto permitió la identificación de unas 400 proteínas nucleolares y de una gran cantidad de RNAs pequeños no observados hasta entonces (en Jiménez García, 1988).

En los 1960s, dos descubrimientos importantes permitieron la identificación del nucléolo como el principal centro celular de biogénesis del ribosoma en eucariontes (Perry, 1962; Hadjiolov, 1985):

- i. Se obtuvieron evidencias definitivas de que el organizador nucleolar es el sitio de los genes del rRNA .
- ii. Estudios detallados mostraron que el nucléolo es la fuente de un RNA citoplásmico abundante, es decir el rRNA.

Durante los 1970s y 1980s, se establece finalmente que el nucléolo es una estructura ribonucleoproteica que consta de tres compartimientos bien definidos denominados centro fibrilares, componente fibrilar denso y

componente granular (en Wachtler y Stahl, 1993; Risueño y Testillano, 1994).

Actualmente, el trabajo se centra en el estudio estructural y funcional de proteínas y ácidos nucleicos específicos del nucléolo, por métodos que implican el aislamiento, la purificación y la clonación de genes para esas proteínas o ácidos nucleicos, así como de su localización fina por medio de inmunocitoquímica e hibridación *in situ*. Esto permitirá obtener un mapa molecular de los componentes del nucléolo en compartimientos definidos, que permita conocer las relaciones espaciales y temporales entre ácidos nucleicos y proteínas. Lo anterior será útil para la comprensión de la biología celular y molecular del nucléolo, es decir, al entendimiento de cómo se forma un ribosoma en la célula eucarionte.

3.3. En el nucléolo se producen los ribosomas

El ribosoma eucarionte es una estructura ribonucleoproteica que se compone de dos subunidades ultraestructurales denominadas pequeña y grande, que en mamíferos tienen coeficientes de sedimentación de 40S y 60S, respectivamente (en Alberts y col, 1994; Stryer, 1989). Cada subunidad consta de varias proteínas características y de RNA denominado ribosómico (rRNA). En tanto que las proteínas del ribosoma se producen en el citoplasma a partir de mRNA que ha madurado en el nucleoplasma por procesos como el "splicing", la mayoría de sus rRNAs se sintetizan y maduran dentro del nucléolo, a partir de un solo precursor denominado pre-rRNA (ver Hadjiolov, 1985). De este precursor, que en mamíferos tiene un coeficiente de sedimentación de 45S, se forman los rRNAs del ribosoma por

un proceso de maduración química. La subunidad pequeña contiene un rRNA de 18S, en tanto que la subunidad grande contiene los rRNAs 28S y 5.8S. El precursor pre-rRNA 45S se transcribe a partir de los genes de rDNA. Estos genes se encuentran en copias múltiples en el genoma de los eucariontes (en humanos hay unas 200 copias), se arreglan uno tras otro (en *tandem*) y son muy activos. El ribosoma se ensambla, con los productos de maduración del pre-rRNA que se asocian con proteínas que han sido sintetizadas en el citoplasma, y que regresan al nucléolo.

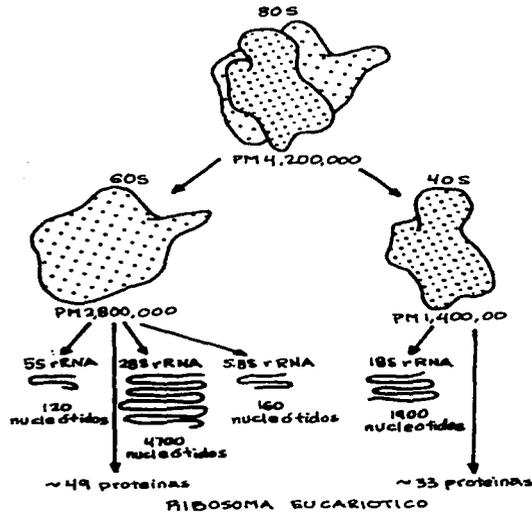


Figura 1. Esquema de un ribosoma eucariote de mamífero (tomado de Alberts y col, 1994).

3.4. Ultraestructura del nucléolo

La estructura fina del nucléolo puede ser descrita en términos de la distribución de tres elementos básicos y la presencia de espacios nucleolares (denominados intersticios y/o vacuolas), así como de cromatina condensada (Jordan, 1991). Tales componentes son dominios que corresponden a las diferentes etapas del proceso de biogénesis del ribosoma (Hernandez-Verdun, 1991). Los tres componentes nucleolares son los centros fibrilares (FCs), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (G). (Goessens y Lepoint, 1974).

En el siguiente cuadro se resumen las principales características de cada uno de los componentes (modificado de Jiménez García, 1988)

COMPONENTE	CONTENIDO	FUNCION
CENTROS FIBRILARES Semitransparentes a los electrones. Fibras de 5 nm	Contiene genes ribosómicos (rDNA) en la periferia, DNA pol I, UBF, proteínas Ag-NOR, fibrilarina y fosfoproteína C23	Quizá almacenamiento de factores de la transcripción del pre-rRNA.
COMPONENTE FIBRILAR DENSO Fibras abundantes de 4-8nm de espesor	Proteínas Ag-NOR : fibrilarina, C23 y B23, RNA polimerasa I, UBF.	Es el sitio en donde tiene lugar la actividad transcripcional más abundante y el procesamiento temprano del pre-rRNA
COMPONENTE GRANULAR Gránulos de 15-20 nm de diámetro	Abundante en la fosfoproteína B23 y productos intermedios del procesamiento del precursor pre-rRNA	Es el sitio de procesamiento tardío del pre-rRNA y del almacenamiento de preribosomas

Cuadro 1. Diferentes componentes del nucléolo.



Figura 2. Micrografía electrónica de dos tipos de nucléolo. a) nucléolo de célula de músculo liso de pulmón de perro (*Canis familiaris*), en donde predominan los centros fibrilares. b) nucléolo de hepatocito de rata, en donde predomina el componente fibrilar denso. FLECHAS, centros fibrilares; DFC, componente fibrilar denso; G, componente granular; pnc, cromatina perinucleolar. a) X; b) X.

Los centros fibrilares (FC) han sido considerados como los sitios de almacén de genes ribosomales inactivos en transcripción. El componente fibrilar denso (DFC), por el contrario, se ha propuesto como el sitio de transcripción de estos genes. Sin embargo, este planteamiento ha generado una fuerte controversia en los últimos años. Como se verá más adelante, en este trabajo hemos tratado de contribuir a la resolución de este problema. A pesar de lo anterior, existe sin embargo, consenso acerca de la distribución de los genes rDNA en la porción fibrilar del nucléolo, ya sea DFC o FCs, aunque los últimos resultados parecen indicar la distribución del rDNA en el DFC adyacente a los FCs (Hernandez-Verdun, 1991; Wachtler y col., 1992, Jiménez-García y col., 1993).

Según Hernandez-Verdun (1991) el argumento más importante para sustentar la propuesta de que la DFC es el sitio de transcripción de los genes ribosomales, es la incorporación de uridina tritiada después de pulsos cortos. Además, la localización de la RNA polimerasa I que encontraron Scheer y Rose (1984) en los FCs, se ha ampliado al DFC. La presencia de la enzima no prueba que esta región constituya el sitio de transcripción, pues la enzima activa podría no ser detectable debido a que su epítipo estaría ocupado en el proceso de transcripción.

El componente granular (GC) es el sitio de maduración y almacén de las subunidades ribosomales (Hernandez-Verdun, 1991)

La matriz nucleolar está compuesta de fibrillas fuertemente empaçadas y organizadas de tal manera que muestran un aspecto más o menos reticular, lo que corresponde al nucleolonema observable con microscopía de luz (Puvion y Moyne, 1981).

La localización precisa del rDNA aún no es muy clara, pues existen trabajos que muestran (con microscopía de luz) que se encuentra en los FCs del nucléolo (Arroua *et al.*, 1982). En trabajos más recientes, el grupo de Thiry (Thiry y Thiry-Blaise, 1989; Thiry y Goessens, 1992), trabajando con células murinas tumorales de Ehrlich y el de Puvion (Puvion-Dutilleul y col. 1991a) con células transformadas HeLa, también lo encuentran en FCs utilizando hibridación *in situ* ultraestructural. Por el contrario, Wachtler y su grupo (1990 y 1992) encuentran el rDNA en DFC de nucléolos de espermatozoides y linfocitos humanos, también por hibridación *in situ* al microscopio electrónico. En este trabajo hemos usado nucléolos de hepatocitos de rata normal. Los resultados apoyan la presencia de rDNA en el DFC.

3.5. El nucléolo y los ribosomas contienen varios rRNAs y UsnRNAs

Aunque los trabajos citoquímicos de Brachet y Cassperson en los 1940s demostraron que los nucléolos contenían RNA similar al del citoplasma, no fue sino hasta la década de los 1960s que se pudo determinar que se trataba de un RNA diferente al RNA heterogéneo nuclear. Por entonces se determinó que en el nucléolo se presentaban varios RNAs de diferente tamaño que actualmente se conoce que corresponden a diferentes estadios de maduración de una sola molécula (en Hadjiolov, 1985). El análisis de esos RNAs y los de los ribosomas indicó que las formas maduras correspondían a RNAs denominados ribosómicos o rRNAs. A finales de los 1960s, el grupo de Busch logró aislar otro tipo de RNA nuclear que era diferente tanto del heterogéneo nuclear (hoy pre-mRNA) y

su forma madura (mRNA), como del pre-ribosómico (pre-rRNA) o su forma madura (rRNA) (en Busch y col., 1985). Por su tamaño pequeño de hasta 200 nucleótidos, su localización nuclear y su alto contenido en residuos de uracilo, estos RNAs se denominaron UsnRNA (uracyl-rich small nuclear RNAs). De ellos, los más abundantes (U1, U2, U4, U5, U6snRNAs) se encontraban en el nucleoplasma, en tanto que otro tipo, denominado U3snRNA, aunque también abundante, se localizaba estrictamente en el nucléolo. A estos estudios siguieron varios que indicaban la presencia de UsnRNAs característicos del nucléolo, como el U8, U13, U14, U15, U17, U20, U22, E1, E2, E3snRNAs (Maxwell y Fournier, 1995). La demostración del papel de los UsnRNAs en la eliminación de intrones del pre-mRNA (ver Sharp, 1994) y más recientemente en la eliminación de secuencias espaciadoras en el pre-rRNA (Kass y col. 1990), ha motivado un gran interés en estas pequeñas moléculas dentro del control postranscripcional de la expresión genética.

3.6. Los rRNAs del ribosoma se forman en el nucléolo a partir de un precursor llamado pre-rRNA

Una vez producido el pre-rRNA en el nucléolo, sufre una serie de modificaciones que llevan consigo cortes a lo largo de la molécula (en Hadjiolov, 1985). En mamíferos, estos cortes ocurren en al menos 10 sitios, que incluyen las regiones de unión de las moléculas 18S, 5.8S y 28S con los espaciadores adyacentes. Durante el proceso de maduración, se forman varios precursores con coeficientes de sedimentación diversos. Aunque la secuencia precisa de cortes no se conoce con exactitud, en general se produce de la siguiente forma: En el primer paso se forma un precursor de 41S, que contienen todas las formas de

rRNAs. Después, a partir de este, se forman un precursor de 32S que contiene el 5.8S, el 28S y el espaciador transcrito interno 2 (ITS2) y uno de 21S, que contiene al 18S y al espaciador transcrito interno 1 (ITS1). En el siguiente paso se produce el 18S a partir del 21S, y el 28S y 5.8S se forman a partir del 32S.

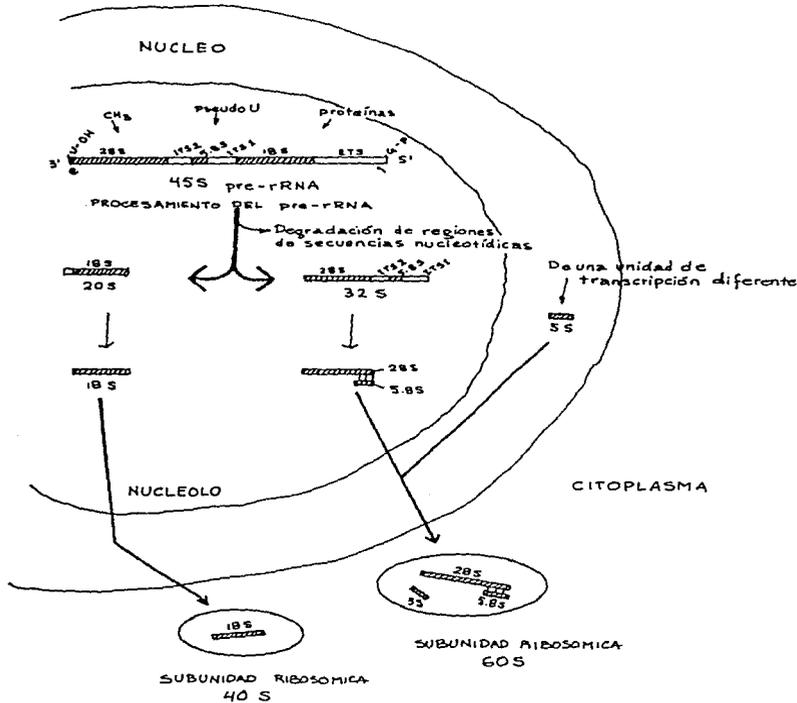


Figura 3. Esquema que muestra la organización molecular del pre-rRNA y su maduración (modificado de Alberts y col., 1994, Darnell y col., 1990. y Jiménez García, 1988).

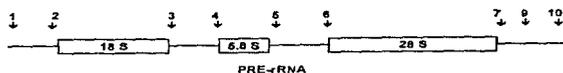
3.7. Los UsnRNAs nucleolares participan en la maduración del pre-rRNA

Desde el momento en que la molécula del pre-rRNA se comienza a producir a partir de rDNA, se asocian a ella varias proteínas y UsnRNAs que forman partículas ribonucleoproteicas (UsnRNPs). En éstas, la proteína más abundante es la fibrilarina y el RNA principal es el U3snRNA (Ochs y col., 1985a). La participación de este último en el procesamiento del pre-rRNA está bien documentada. En efecto, en extractos en donde se tiene pre-rRNA pero no U3snRNA, no ocurre el procesamiento del precursor de 45S. Además, el mecanismo involucra apareamiento de bases entre el pre-rRNA y el U3snRNA. El U3snRNA es el snRNA más abundante en vertebrados y se asocia con una partícula de RNP de más de 60S y con un RNA de 28-35S (después de desproteinizar) a través de puentes de hidrógeno (Prestayko y col., 1970; Bachellerie y col., 1983; Crouch, y col., 1983; Epstein y col., 1984; Parker y Steitz, 1987), es decir, hay complementaridad entre las secuencias de nucleótidos del U3snRNA y el pre-rRNA (Fig. 1) (Reddy col., 1979; Bachellerie y col., 1983, Parker y Steitz, 1977). Estudios realizados con inmunofluorescencia sugieren que el U3snRNP se localiza en la región fibrilar del nucléolo, donde ocurre la síntesis del rRNA y quizá el ensamblaje temprano de las partículas prerribosómicas, pero no se le ha encontrado en la región granular, donde aparentemente ocurren los eventos más tardíos del procesamiento del pre-rRNA (Tague y Gerbi, 1984).

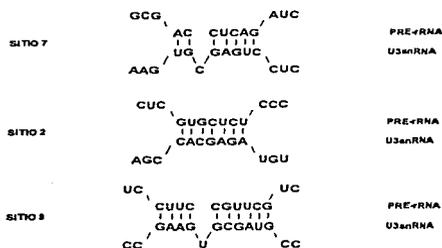
Otros UsnRNAs también participan en este proceso. De entre ellos, cabe destacar el caso del U14snRNA, que se produce a partir del procesamiento de intrones de RNAs premensajeros (pre-mRNA), como el de los premensajeros de la proteína cognate de choque térmico de 70 kDa (Liu

y Maxwell, 1990; Leverette y col., 1992). Se ha establecido claramente que este U14snRNA participa en la maduración del rRNA de 18S y que el proceso involucra también apareamiento de bases entre el U14snRNA y el pre-rRNA. Otros UsnRNAs, como el U8, U13, U15, U20, U22, E1, E2, E3, —descubiertos recientemente—, parecen también jugar un papel importante en la maduración del pre-rRNA (Maxwell y Fournier, 1995), aunque no existen a la fecha trabajos que documenten ampliamente este hecho.

a).



b).



c).

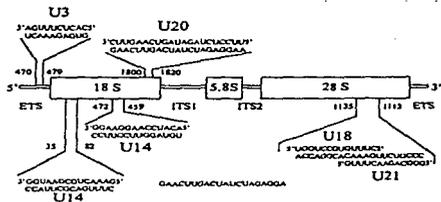


Figura 4. Esquema que muestra el apareamiento de bases entre el pre-rRNA y los U3snRNA y U14snRNA (de Maxwell y Fournier, 1995)

3.8. El precursor pre-rRNA se transcribe a partir del gen rDNA

El DNA ribosomal forma prácticamente el total del DNA nucleolar (Busch y Smetana, 1970). Además, unas 400 proteínas diferentes (Busch y Reddy, 1981), asociadas con los diferentes productos del procesamiento del pre-rRNA, conforman el resto de la masa del nucléolo. El DNA ribosómico (rDNA) es el único DNA que se ha detectado en el nucléolo y es a partir del cual se sintetiza el precursor ribosómico pre-rRNA. El rDNA es uno de los genes más abundantes en eucariontes y 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 en mamíferos, i.e. 18S, 5.8S y 28S. En humanos se presentan alrededor de 200 copias de este gen por genoma diploide. La región codificante del rDNA se ha conservado entre las especies relacionadas pero no ocurre así con la región del espaciador transcrito externo (ETS), que es heterogéneo en secuencias de bases (Busch y Rothblum, 1982; ver Jiménez-García, 1988).

El rDNA es una molécula altamente compleja con gran similitud con otros genes eucariontes no ribosómicos y con los procariontes: presencia de promotores, "enhancers", sitios de terminación, etc. La molécula sintetizada a partir de este gen es posteriormente procesada (ver Hadjiolov, 1985) para finalmente originar las moléculas de rRNA que, en asociación con proteínas ribosomales y no ribosomales, toman parte en el ensamblado y maduración del ribosoma.

El gen rDNA de rata, muy similar al de otros mamíferos, está organizado en *tandem*. Cada unidad de transcripción está separada por un espaciador no transcrito (NTS) de unos 24 000 pb. La unidad de transcripción consta de un

sitio de inicio de la transcripción precedido por una caja TATA. Inmediatamente al sitio de inicio de la transcripción sigue una secuencia de 4400 pb que se denomina espaciador transcrito externo 1 (ETS 1). Enseguida está la región del rRNA 18S, de 1874 pb. Después hay una región espaciadora denominada espaciador transcrito interno 1 (ITS 1) de 1066 pb, seguida del rRNA 5.8S, de 156 pb. Sigue otro espaciador transcrito interno, el número 2 (ITS 2) con 765 pb, seguido del rRNA 28S, que tiene 4802 pb. Finalmente se encuentra el espaciador transcrito externo 2 (ETS 2), de unos 500 pb, que precede al siguiente NTS de 24 000. Luego se repite la unidad de transcripción.

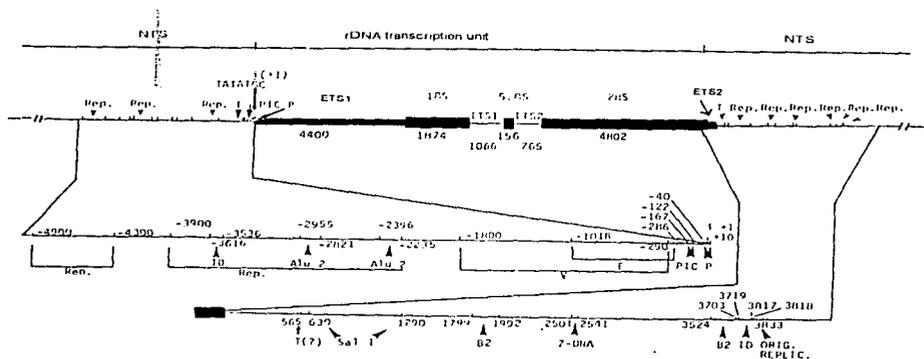


Figura 5. Esquema que muestra la organización molecular del rDNA (tomado de Jiménez García , 1988)

3.9. El nucléolo contiene unas 400 proteínas

Con la implementación de un método para el aislamiento del nucléolo, se pudo determinar que esta estructura en mamíferos contiene unas 400 proteínas propias (en Busch y Reddy, 1989). De todas ellas, se comenzaron a analizar aquellas que pudieran ser importantes por alguno de los siguientes criterios: a) que fueran muy abundantes y/o b) que tuvieran capacidad de fosforilación. El primer criterio involucraría un papel estructural o funcional en el nucléolo. El segundo criterio podría reflejar alguna importancia en la regulación de la expresión genética, como se ha propuesto para las proteínas fosforiladas. Con estos criterios, se han aislado, purificado y caracterizado algunas proteínas nucleolares. De varias de ellas se conoce la secuencia del gen a partir del cual se producen (ver Wachtler y Stahl, 1993).

RNA polimerasa I. Es la enzima que sintetiza el pre-rRNA. Esta enzima está presente en la región del organizador nucleolar (NOR) en mitosis, aunque no se ha detectado transcripción en esta etapa. Se localiza en la porción fibrilar del nucléolo (Gruca y col, 1978; Scheer y Rose, 1984; Raska y col, 1989).

Nucleolina. La nucleolina es también llamada C23 o proteína de 110kDa y tiene un pI de 5.1 (Busch y col. 1985). Es una proteína fosforilada presente en grandes cantidades en nucléolos de células muy activas en la biogénesis del ribosoma. Es la proteína responsable de la tinción con plata (Busch y col., 1985). La proteína se une al NTS (Olson y col., 1983) y cicla entre el nucléolo y el citoplasma (Borer y col., 1989). La proteína influye en la estructura del rDNA alterando su estructura secundaria (Sipos y Olson,

1991) y en la transcripción del pre-rRNA (Medina, 1989). Se fosforila dependiendo del ciclo celular e interacciona con el rRNA (Belenguer y col., 1990). Parece intervenir en el ensamblado del ribosoma (Ghisolfi y col., 1990). Se conoce su cDNA y su localización cromosómica (Maridor y Nigg, 1990; Srivastava y col., 1990).

B23 ó Numatrina. Es una fosfoproteína importante asociada al RNA que se considera como uno de los factores importantes responsables del ensamblado de las partículas prerribosomales (Busch y col., 1985). Se encuentra localizada principalmente en el componente granular, por lo que parece estar involucrada en las etapas tardías del ensamblado del ribosoma. Parece ser una proteína acarreadora ("shuttle") que juega un papel importante en el transporte de pre-ribosomas del nucléolo a citoplasma (Borer y col., 1989). La proteína interacciona con ácidos nucleicos (Dumbar y col., 1989). Se conoce su cDNA (Chang y Olson, 1990; Maridor y Niggs, 1990). Su localización nucleolar depende de una secuencia específica de aminoácidos (Peculis y Gall, 1992).

Fibrilarina. Es una proteína nucleolar localizada en el componente fibrilar denso. Tiene un peso molecular de 34 kDa y un pI de 8.5 (Ochs y col., 1985b). Se le encuentra asociada a U3, U8 y U13snRNAs. Se piensa que puede tener un papel importante en el procesamiento del pre-rRNA. Es una proteína muy conservada evolutivamente; recientemente se ha encontrado una proteína muy similar en arqueobacterias (así como el U3snRNA asociado a ella), lo que refuerza la idea de que los eucariontes provenimos de organismos arqueobacterianos (Amiri, 1994; Potter y col., 1995).

Proteínas Ag-NOR. Es un conjunto de proteínas localizadas en los NOR durante la mitosis y han sido identificadas por su capacidad para reducir plata bajo condiciones ácidas en las que la mayoría de las proteínas permanecen sin teñir. En interfase parecen ser necesarias para la transcripción de genes ribosomales. También han sido usadas como marcadores de NOR activos. En microscopía electrónica se les ha encontrado en el componente fibrilar, en el componente fibrilar denso pero no en el componente granular. Aunque la tinción con plata es un método de tinción selectiva que incluso se utiliza también como marcador de la actividad celular, aún no está clara la manera de identificar estas proteínas. Sin embargo, varias de estas proteínas se identifican con tinciones de geles en los cuales se ha realizado electroforesis (Hernandez-Verdun y col., 1991).

Otras proteínas. En el nucléolo se han caracterizado otras proteínas. Entre ellas destacan GAR 1 (Girard y col., 1992), que es una proteína rica en glicina y arginina y que está involucrada en el procesamiento del pre-rRNA; la histona HV-1 (Allis y col., 1982) y la KU 80 (Li y Yeh, 1992), que puede unirse a rDNA y migra al nucléolo dependiendo del ciclo celular; la mitotina (en Medina , 1989) con peso molecular de 125 kDa y pI de 6.5, cuyo papel no está claro; las proteínas de matriz nucleolar (Corben y col., 1989) con papel estructural; la proteína p120 (Gorczyca y col., 1992) que se regula en el ciclo celular; la S1 que es ribosómica (Hugle y col., 1985); la topoisomerasa I, que induce cambios topológicos en el rDNA, posibilitando la transcripción (Muller y col., 1985); la topoisomerasa II (DNA girasa) que tiene efectos opuestos a la topoisomerasa I (Zini y col., 1992); el factor UBF (Upstream Binding Factor), que es un factor esencial de transcripción del

rDNA (en Raska y Dundr, 1992); una proteína de 41 kDa y otra de 55 kDa (Matsui y col., 1986) que se une a rDNA; otra de 72 kDa (Choubel y Lengyel, 1992) que se induce por interferón alfa; una proteína de 97 kDa (en Medina, 1989) y otra de 100 kDa (Escande-Geraud, 1985), que disminuyen en cantidad cuando baja la síntesis de rRNA; una fosfoproteína de 105 kDa (Pfeifle y col., 1986) que reacciona con anticuerpos contra la proteína C23; otra proteína de 116 kDa (Masson y col., 1990), una de 140 kDa (Chan y col., 1985) y otra de 135 kDa que se relacionan con la proliferación celular. Hay otra proteína de 180 kDa y una de 195 kDa, que tal vez sea una subunidad de la RNA polimerasa I y que es responsable de la tinción con plata (Williams y col., 1982). Recientemente se ha localizado a la proteína DAI en el nucléolo, en la región fibrilar densa y en el componente granular (Jiménez García y col., 1993). La DAI es una cinasa que participa en la síntesis de proteínas durante la infección por adenovirus 2 (Ad2).

3.10. La nucleogénesis es útil para estudiar relaciones espacio-temporales de ácidos nucleicos y proteínas nucleolares

Cuando la célula se divide, el nucléolo se disgrega en profase y parte de los componentes nucleolares se asocian a los cromosomas mitóticos condensados mientras que otros componentes se dispersan en el citoplasma. Durante la telofase el nucléolo se reorganiza a partir del organizador nucleolar (NOR) y de los cuerpos prenucleolares (PNBs), una vez que se ha reactivado la transcripción del rRNA en los NOR. Este proceso se conoce como nucleogénesis. Durante la nucleogénesis, los PNBs se forman por coalescencia de material nucleolar disperso. Estos

cuerpos luego se asocian con el NOR una vez que se inicia la síntesis de pre-rRNA. La reconstrucción del nucléolo requiere de la reactivación de la transcripción, pues se ha observado que si ésta es inhibida después de la mitosis, la reasociación de los PNBs al NOR no se lleva a cabo y no se reconstruye el nucléolo (en Jiménez García, 1988; Ochs y col., 1985b)

Como en la telofase el NOR es el sitio hacia donde confluyen los PNBs en una forma ordenada y secuencial, tal vez los PNBs contienen moléculas que se asocian con la transcripción y procesamiento del pre-rRNA, de igual manera, en forma ordenada y secuencial. Entonces, esta etapa final de la mitosis, en la que el nucléolo se reconstruye, representa un sistema útil para estudiar asociaciones temporales y espaciales entre los elementos que intervienen en la transcripción y el procesamiento del rRNA.

3.11. La distribución de DNA y RNA nucleolares se puede estudiar por hibridación *in situ*

El descubrimiento de que el mensaje genético está escrito en un código de cuatro letras tiene una profunda influencia en todas las áreas de la biología. La capacidad para leer ése mensaje mediante secuenciamiento del DNA ha llevado a una técnica de gran poder para los biólogos trabajando en campos tan diversos como medicina o agricultura. Esta técnica es la hibridación de ácidos nucleicos, es decir la formación de dobles cadenas entre dos secuencias nucleotídicas complementarias (Hames y Higgins, 1985).

A finales de los años 60 varios grupos desarrollan, de manera independiente, la técnica de hibridación *in situ* y con ésta la oportunidad de visualizar los ácidos nucleicos subcelularmente, estos grupos son el de Gall y Pardue en 1969; John y col. en 1969; y Buongiorno-Nardelli y Amaldi, 1969. La técnica se desarrolla a partir de los principios que se siguen en la hibridación en filtros (electrotransferencia Southern y northern) (Volkers y col., 1989; Southern, 1985).

La hibridación de ácidos nucleicos es el método más poderoso para detectar y cuantificar secuencias de DNA y RNA específicas. Las reasociaciones de cadenas complementarias para formar estructuras duplex pueden ser llevadas a cabo en una variedad de formas: ya sea con RNA o DNA en solución y DNA de una sola cadena inmovilizado en agar o filtros de nitrocelulosa, o bien químicamente unidos a una matriz insoluble. Alternativamente el apareamiento puede ocurrir en solución y la doble cadena resultante puede ser adsorbida en hidroxapatita (Rigby y col., 1977).

El proceso que involucra todos los métodos basados en la hibridación molecular fué descrito por primera vez por Marmur y Doty en 1961 (en Southern, 1985). A partir de este descubrimiento se establecen dos hechos importantes: (a) las dos secuencias involucradas en la formación de la doble hélice pueden tener solo un grado de complementaridad y (b) la estabilidad del doblete formado depende la de extensión de la complementaridad (Southern, 1985).

La reasociación de ácidos nucleicos involucra la incubación de moléculas de una sola cadena bajo condiciones de fuerza iónica y

temperatura, las cuales favorecen la formación de dobletes de cadenas base-apareadas (Young y Anderson 1985)

Todas las metodologías que emplean el proceso de hibridación de ácidos nucleicos comprenden básicamente del uso de un fragmento de DNA de una sola cadena marcado específicamente *in vitro* (la "sonda"), la cual reacciona y se une con su cadena de DNA complementaria. Los híbridos son visualizados utilizando métodos de detección que reconocen específicamente la marca de dicha "sonda" de DNA (Volkers, y col., 1989).

Cualquier forma de ácido nucleico puede ser usada como "sonda" para hibridación, de tal manera que pueden ser utilizados fragmentos de DNA, de RNA o bien oligonucleótidos. La elección de la sonda depende de los siguientes factores (Arrand, 1985):

- i. la estrategia de hibridación;
- ii. la disponibilidad de la fuente del material a usar como sonda.

Si la secuencia de la sonda deriva o se encuentra introducido en un genoma pequeño, tales como virus bacteriófagos o plásmidos, la purificación es simple y la amplificación es buena. De tal modo que, 1mg de un plásmido recombinante de 4Kb de longitud puede ser preparado de unos cuantos litros de cultivo de bacterias y éste podría contener 250 µg de sonda de una kilobase de longitud.

La detección de fragmentos específicos de DNA en células y tejidos por medio de la hibridación molecular *in situ* es una técnica recientemente desarrollada con un gran potencial debido a su alta especificidad (Volkers y col., 1989). Con ella es posible detectar secuencias de ácidos nucleicos en el interior de las células, en compartimientos subcelulares (mitocondria,

cloroplasto, núcleo, nucléolo) y aún subnucle(ol)ares, y/o en extendidos de cromosomas metafásicos.

3.11.1. Marcado de la sonda.

Independientemente del método de hibridación, uno de los requerimientos imprescindibles de esta técnica es el marcado de la sonda. Existen varios métodos que se utilizan para marcar ácidos nucleicos. Sin embargo, uno de los más utilizados es el de "Nick Translation" (movimiento o translación de fragmentos).

Rigby *et al.* (1977) demostraron que el método de marcado denominado de "nick translation" es eficiente y reproducible. No altera las características originales del DNA sin marcar. El método se basa en la actividad de las enzimas DNasa y DNA polimerasa. La primera hace cortes puntuales en la molécula de DNA (fragmentos, "nicks") y la segunda repara estos cortes, pero no solo introduce un nucleótido en el punto donde hubo el daño sino que continúa recorriendo el corte a lo largo de la molécula e introduciendo nucleótidos hasta que encuentra una señal de término (que puede ser el final de la molécula, en el caso de las sondas).

Como ya se mencionó, la reacción de "Nick translation" involucra la acción de dos enzimas. 1) La DNasa I (Desoxiribonucleasa pancreática de bovino), una endonucleasa que hidroliza DNA de una o dos cadenas a una compleja mezcla de mono u oligo nucleótidos con terminación fosfato-5'. 2) La DNA polimerasa I de *Escherichia coli*. La DNasa I ataca, de manera independiente, cada cadena de DNA, resultando en fragmentos o "nicks" de una sola cadena. Los sitios de corte están distribuidos al azar y el grado de hidrólisis (o "nicking") puede ser controlado con la concentración de la

DNasa I. La holoenzima DNA polimerasa I cataliza la reacción de acoplamiento y la adición de secuencias de residuos de nucleótidos a la cadena 3'-hidroxiterminal de un "nick" (fragmento) con la eliminación de unidades de nucleótidos del 5'-fosfato terminal. Con deoxinucleósidos trifosfato (marcados isotópicamente o no isotópicamente) como sustratos, los preexistentes, nucleótidos no marcados en el templado de DNA, son reemplazados por los marcados (isotópicamente o no isotópicamente) por acción de la DNA polimerasa (Rigby *et al.*, 1977, Chan y McGee, 1990).

Debido a que la hibridación molecular *in situ* se origina a partir de hibridación en sustratos inertes, el marcado de la sonda se llevaba a cabo regularmente utilizando la incorporación de nucleótidos modificados con un radioisótopo. Sin embargo, debido a la naturaleza radiactiva de los isótopos, ésta es una técnica muy riesgosa y sobre todo no permite la detección con alta resolución que permita la localización de secuencias en células individuales, por lo que ha ido disminuyendo el uso de la marca radioactiva para la hibridación *in situ*. Además, la sensibilidad de las sondas marcadas con biotina puede ser igual a las marcadas con azufre 35 (Chan y McGee, 1990).

Actualmente el marcado de las sondas para hibridación *in situ* se realiza utilizando precursores no isotópicos como nucleótidos análogos modificados con la vitamina biotina o con el esteroide digoxigenina. Este tipo de marcado tiene la ventaja adicional de que la detección se puede llevar a cabo de diferentes maneras.

En el caso de la biotina, la detección se basa en la alta afinidad que la proteína avidina y la estreptavidina presentan por la molécula de biotina

(P.M.=66,000; pI=10.5). Esta afinidad es extremadamente alta (para la avidina la afinidad es $K_d=10^{-15}$ M) la cual es casi equivalente a una unión covalente. La avidina, que es una glicoproteína presente en la clara del huevo, presenta como desventaja que, en condiciones fisiológicas, su porción de carbohidrato puede unirse a ciertas lectinas, y debido a sus cargas positivas puede también unirse a biomoléculas cargadas negativamente (tales como los ácidos nucleicos). Todas estas propiedades intrínsecas a la naturaleza de la molécula reducen la especificidad de la avidina. Por el contrario, la estreptavidina (P.M.=60,000), la cual es una proteína secretada por *Streptomyces avidinii*, no tiene una porción de carbohidrato y tiene un pI neutro. Por lo tanto, su especificidad por la biotina es mucho más alta, por lo que su uso se ha difundido más (Chan y McGee, 1990).

La estreptavidina o la avidina pueden estar acopladas a una enzima cromógena (peroxidasa, fosfatasa alcalina) para su detección al microscopio de luz (ML), a un fluorocromo (fluoresceína o rojo Texas) para su detección por microscopía de fluorescencia (MF) o bien a partículas de oro coloidal de un tamaño determinado para su detección al microscopio electrónico de transmisión (MET). La detección puede también llevarse a cabo utilizando un anticuerpo antibiotina acoplado a enzimas, fluorocromos y/o partículas de oro coloidal.

La digoxigenina, que es un esteroide que se encuentra naturalmente solo en dos especies de plantas del género *Digitalis*, se detecta también con un anticuerpo acoplado a un fluorocromo o a un compuesto que pueda visualizarse por color (enzimas cromógenas), e incluso a partículas de oro coloidal. Este tipo de marca es mejor que la que se realiza con biotina,

porque disminuye el ruido de fondo que se produce por la presencia de biotina endógena en algunos tejidos (Boheriger, 1989).

En general, la marca no isotópica presenta una ventaja más: permite la doble localización en la misma célula. Por ejemplo, se pueden localizar un ácido nucleico y una proteína, utilizando fluorocromos diferentes o bien tamaños de partículas de oro coloidal de distinto diámetro, cuando se trabaja con microscopía electrónica de transmisión.

En la actualidad, en muchos laboratorios se realiza hibridación *in situ* casi de rutina con el microscopio de luz, pero aún presenta muchos problemas para llevarla a cabo a nivel ultraestructural. Por esta razón es que una de las intenciones del trabajo fue establecer un protocolo general para llevar a cabo la hibridación *in situ* y poder detectarla a nivel de microscopía electrónica de transmisión.

3.11.2. Factores que afectan la tasa de hibridación.

Según Young y Anderson (1985), la tasa a la que las cadenas complementarias de ácidos nucleicos forman dobletes base-apareados estables depende de una serie de factores que se clasifica como concernientes al estado de los ácidos nucleicos, las condiciones de incubación y los métodos de detección usados. De acuerdo a la revisión hecha por estos autores, se describen a continuación los que se consideran como los factores más importantes:

a) **Longitud de los ácidos nucleicos.** Experimentalmente se ha encontrado que la tasa de realineación es proporcional a la raíz cuadrada de la longitud

de los fragmentos de ácidos nucleicos, por lo que mientras más largo es dicho fragmento la eficiencia de hibridación disminuye considerablemente.

b). Composición base. Con relación a este punto, los autores mencionan que aunque no hay mucha información sobre este factor, puede no ser tomado en cuenta.

c). Fuerza iónica. Al parecer se ha demostrado que la tasa de reasociación depende en gran medida de la concentración del ion sodio. En concentraciones arriba de 0.2 M la tasa de reasociación es proporcional al cubo de la fuerza iónica.

d). Viscosidad. A este respecto mencionan que es importante distinguir entre "*viscosidad microscópica y macroscópica*". La primera se refiere al microambiente que rodea a las bases del ácido nucleico. La "*viscosidad macroscópica*" es dependiente de la presencia de polímeros incluyendo al DNA que no tienen efecto sobre el microambiente. La tasa de renaturalización es inversamente proporcional al incremento en la "*viscosidad microscópica*" mientras se incrementa en un 50% y hasta de 1-6 veces cuando se incrementa la viscosidad macroscópica, por ejemplo por la adición de polímeros inertes como Ficoll o Sulfato de Dextrán. Este incremento se atribuye a la exclusión del DNA de un volumen sustancial de la solución por la adición del polímero, resultando en un incremento en la concentración efectiva del DNA por lo que la adición de esos polímeros también incrementa la tasa de hibridación. El sulfato de dextrán es el más ampliamente utilizado.

Por estas razones, en la actualidad la mezcla de hibridación incluye además de fragmentos de sonda de tamaño pequeño (entre 200 y 500 pares

de bases), sulfato de dextrán para incrementar la viscosidad macroscópica, citrato de sodio salino muy concentrado (20X SSC) para incrementar la fuerza iónica. Además de albúmina de suero bovino (BSA) y DNA de esperma de salmón o tRNA de bacteria para disminuir las reasociaciones inespecíficas.

4. OBJETIVOS

Los objetivos generales de este trabajo fueron: (1) estudiar las relaciones espacio-temporales entre algunos de los elementos que intervienen en la síntesis y procesamiento del pre-rRNA y (2) establecer un protocolo general para hibridación no isotópica *in situ* a nivel ultraestructural.

Para cumplir con estos objetivos se propusieron como objetivos más específicos:

- ◆ Amplificar por medio de técnicas de ingeniería genética las sondas moleculares utilizadas en esta investigación.
- ◆ Localizar el U3snRNA y el rRNA durante mitosis, para establecer sus relaciones espacio-temporales con el rDNA, por medio de hibridación no isotópica *in situ* y microscopía de fluorescencia.
- ◆ Conocer la distribución subnucleolar del rDNA por medio de hibridación ultraestructural *in situ* no isotópica.

5. METODOLOGIA

5.1. Células.

Se utilizaron células humanas HeLa (no. 2 CCL, ATCC) y células de rata NRK 52-E (ATCC CLR 1571) creciendo en cubreobjetos de vidrio por 2 a 3 días, con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) adicionado con glutamina, ácido pirúvico y suero fetal de ternera al 10 %.

5.2. Tinción de plata.

Se llevó a cabo de acuerdo con Goodpasture y Bloom (1975), con algunas modificaciones sencillas (Jiménez-García y col., 1989).

5.3. Anticuerpos.

Se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo R288 contra la proteína p80 coilina (Andrade y col., 1993), en una dilución de 1: 100. Contra la proteína ribosómica S6, se usó un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce el péptido sintético RRLSSLRASTSKASESSQK (Chan y Wool, 1988), a una dilución de 1:200. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con FITC o con rojo de Texas a una dilución de 1: 20.

5.4. Inmunotransferencia.

La electroforesis en gel y el análisis tipo western se realizó de acuerdo con Chan y Pollard (1992).

5.5. Sondas.

— Sonda de rata para el rDNA que incluye los extremos 3' del rRNA 18S, el rRNA 5.8S, el extremo 5' del rRNA 28S y los dos espaciadores internos transcritos (Rothblum y col., 1982). Esta sonda está inserta en el plásmido p-59 que a su vez es un fragmento EcoRI-Bam HI de 3.6 kb del fago lambda ChR-B4 que está clonado en el vector pBR322.

— Sonda humana de U3snRNA que es un fragmento HindIII-EcoRI de 4 kb de la clona hU3-1. Contiene la secuencia completa del U3snRNA humano.

La amplificación molecular de las sondas se llevó a cabo por medio de la transformación bacteriana (*Escherichia coli* cepa Sf8, proporcionada por el Dr. Fernando Montiel, Fac. de Química, U.N.A.M.). Con este procedimiento se pone en contacto a las bacterias con los plásmidos en presencia de cloruro de calcio y se facilita su introducción a las células por medio de un choque térmico (42°C). Para la purificación del plásmido con el inserto se empleó la técnica que involucra lisis alcalina (utilizando lisozima), extracciones con isopropanol, fenol-cloroformo y precipitaciones con acetato de sodio y etanol. La fracción plasmídica se resuspende y almacena en agua desionizada estéril en condiciones de congelación (en Pérez, 1994)

5.5.1. Marcado de la Sonda.

Las sondas se marcaron por "nick translation" en presencia de Bio-11-dUTP, dATP, dCTP, dGTP 50 mM. El tamaño de los fragmentos resultantes se corroboró por electroforesis en geles de agarosas al 1%. La reacción de "nick translation" se detuvo cuando los fragmentos de la sonda alcanzaron el tamaño de unos 200 pares de bases.

Una vez obtenidas las sondas en abundancia, e inmediatamente previa a la reacción de hibridación, se procedió a purificar el DNA marcado, para eliminar los nucleótidos no incorporados, haciéndolo pasar por una columna de Sephadex G-50 (Boehringer) y concentrarlo en un desecador de DNA Speed-Vac (Savant). El DNA liofilizado se rehidrató con los componentes de la mezcla de hibridación y se almacenó a -20°C.

5.5.2. Verificación del marcado por transferencia de punto ("dot blot").

Para corroborar que la marca se incorporó al DNA de la sonda y que puede ser visualizada aún en bajas concentraciones, se colocaron gotas de soluciones con diferentes concentraciones del DNA marcado sobre papel de nitrocelulosa y después de fijarlo con calor a 176°C, se procedió a someter la membrana a la reacción de detección con el complejo ABC (que contiene avidina o estreptavidina acoplada a peroxidasa). El resultado debe ser la formación del complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa que se visualiza como un precipitado de color café que puede intensificarse debido a que es osmiofílico.

5.6. Análisis tipo northern.

Este ensayo se realizó de acuerdo con Xie y Rothblum, (1991). Se llevaron a cabo experimentos de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) para estudiar la distribución de rRNA y U3snRNA y para microscopía electrónica de transmisión (MET) para conocer la localización de los genes rDNA.

5.7. Hibridación *in situ* con enzimas cromógenas.

Para la localización del rDNA con microscopía de luz (ML), se utilizó la sonda y la técnica descritas anteriormente, empleando para la detección el complejo ABC (Jiménez-García y col., 1989).

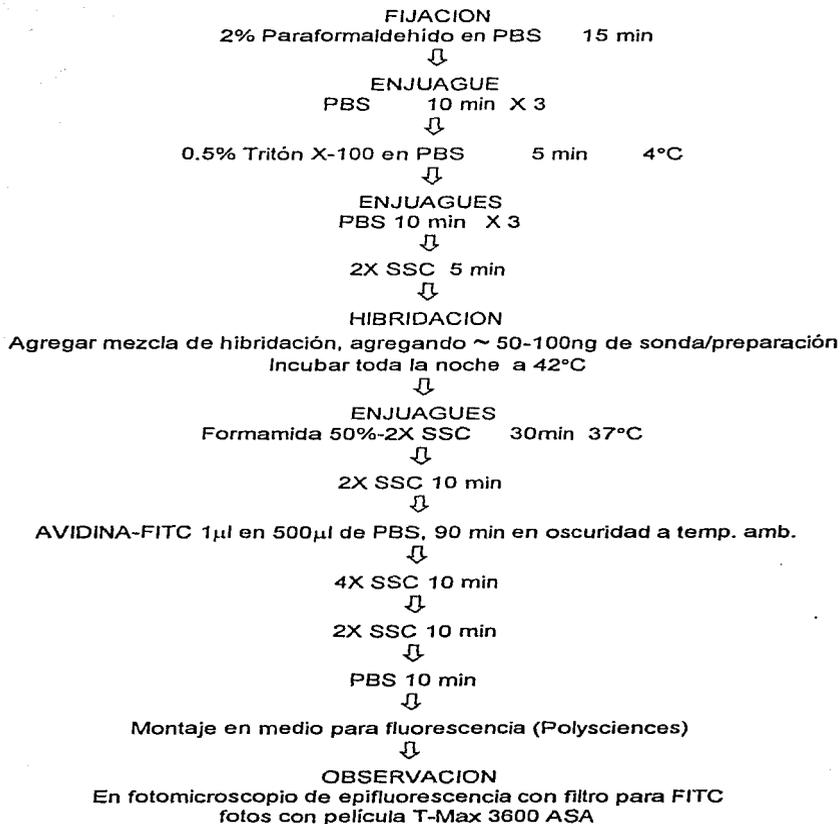
5.8. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

La distribución del rRNA y del U3snRNA durante interfase y mitosis, con especial énfasis en la telofase, se llevó a cabo por medio de hibridación *in situ*, en células de cultivos subconfluentes, con sondas biotinadas del gen para U3snRNA de humano y de rDNA de rata. La detección se realizó con microscopía de fluorescencia a través de estreptavidina acoplada con FITC o con Rojo de Texas. Las células utilizadas fueron: epiteliales normales de riñón de rata (NRK) y HeLa humanas en cultivo (secuencia descrita en el cuadro 2).

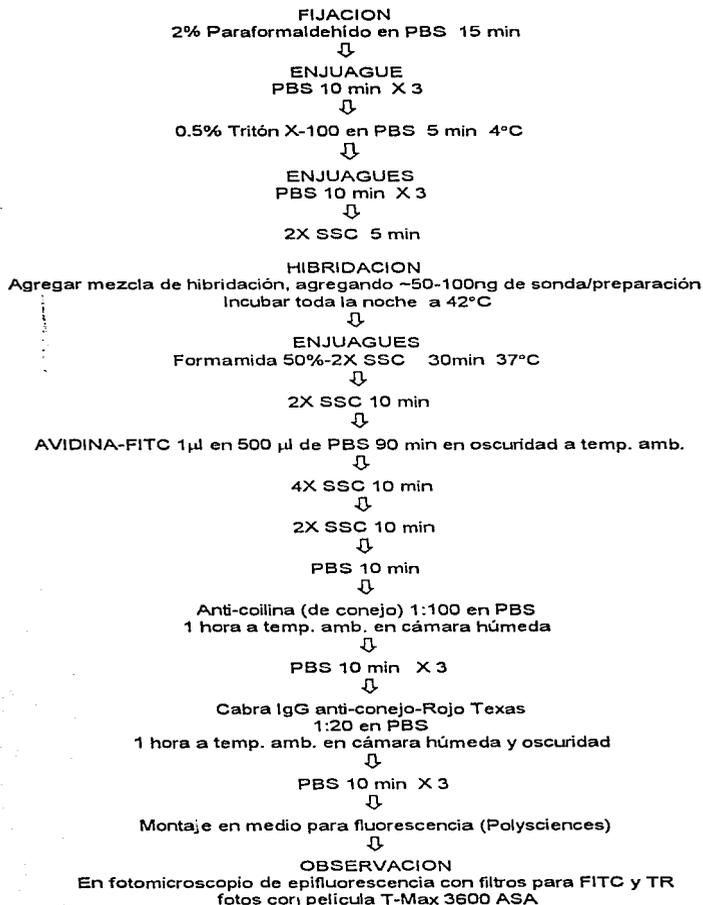
5.9. Hibridación *in situ* en combinación con inmunolocalización.

Colateralmente con la hibridación *in situ*, se llevaron a cabo también experimentos de inmunofluorescencia para detectar la proteína p80-coilina (marcador específico de los cuerpos espiralados) y la proteína estructural del ribosoma S6 (de la subunidad pequeña). Así mismo, para poner en evidencia los PNBs y el NOR se llevó a cabo tinción de plata de acuerdo con el método de Goodpasture y Blume (1975) para organizador nucleolar. Esta tinción contrasta también los cuerpos espiralados (CB=coiled bodies) (secuencia descrita en el cuadro 3).

Cuadro 2. HIBRIDACION FLUORESCENTE *in situ* (FISH)



Cuadro 3. HIBRIDACION FLUORESCENTE *in situ* SEGUIDA DE INMUNOFLUORESCENCIA



5.10. Hibridación *in situ* para microscopía electrónica de transmisión (MET).

La técnica de hibridación *in situ* a nivel ultraestructural se probó tanto previa como posterior a la imbibición de las muestras en los medios de inclusión ("pre-" y "post-embedding", respectivamente). A su vez, ésta se realizó tanto en células en cultivo como en tejido hepático de rata.

Para el procedimiento de hibridación previa a la inclusión en resina ("pre-embedding") se utilizó una línea celular comercial, ya establecida, de hígado humano embrionario. Las células se cultivaron en cajas de petri de un material especial que permite el precesamiento convencional de las muestras para microscopía electrónica de transmisión, sin manipularlas fuera de las cajas de cultivo, hasta el momento de obtener los cortes.

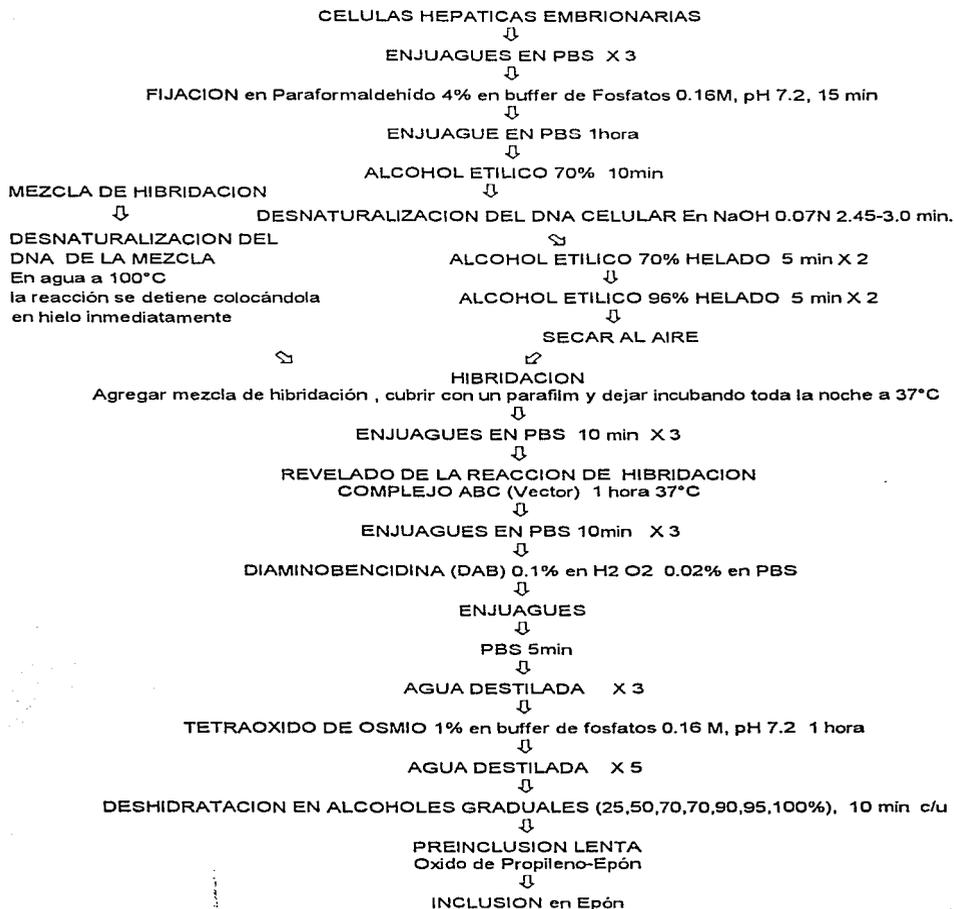
Una vez que se obtiene un cultivo subconfluyente de las células (2-3 días), se fijan, durante una hora a temperatura ambiente, con una solución fijadora de paraformadehído al 4% en buffer de fosfatos (0.16M, pH 7.2), posteriormente se enjuaga tres veces en el mismo buffer y se procede a desnaturalizar el DNA de las células, por métodos químicos, agregando una solución de hidróxido de sodio al 0.07N. Finalmente, se incuba durante 24 horas a 37°C con la mezcla de hibridación que contiene:

- 10 µl de DNA de la sonda (~100 ng / preparación)
- 10 µl de Albúmina de suero bovino (BSA) al 2%
- 16 µl de Sulfato de Dextrán al 50%
- 8 µl de 20 X Citrato de sodio salino (SSC)
- 10 µl de DNA de esperma de salmón 0.2 mg/ml

El DNA de la mezcla de hibridación se desnaturaliza con métodos físicos, sumergiéndola en agua en ebullición (~ 100°C) durante 10 min.

La reacción de hibridación se revela con el complejo ABC (kit de la marca Vector que contiene avidina acoplada con peroxidasa) y para visualizarla se agrega diaminobencidina (Polysciences) al 0.1%. Las muestras se postfijan con tetraóxido de osmio al 1%, en el mismo buffer del primer fijador, para incrementar la marca (el complejo biotina-avidina-peroxidasa es osmiofílico). El desarrollo de la reacción se controla con el ML y se detiene, agregando agua destilada, una vez que se considera que la marca positiva es visible y aún no es perceptible el ruido de fondo. Posteriormente, se continúa con el procedimiento habitual para MET, se deshidrata en alcoholes graduales desde 70% hasta 100%, pasando también por óxido de propileno, óxido de propileno-epón 1:1, como solución de preinclusión, hasta llegar a inclusión en resina epóxica. De las placas de resina que se obtienen con esta técnica se toma una porción de células con un sacabocado, se adhiere a un bloque común de resina y se procede a obtener los corte ultrafinos, los cuales se montan en una rejilla de cobre cubierta con formvar y se observan directamente al MET sin contraste adicional que pudiera enmascarar la señal. La secuencia de este procedimiento se resume en el cuadro 4.

Cuadro 4. HIBRIDACION *in situ* PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA
 Método previo a la imbibición ("pre-embedding")



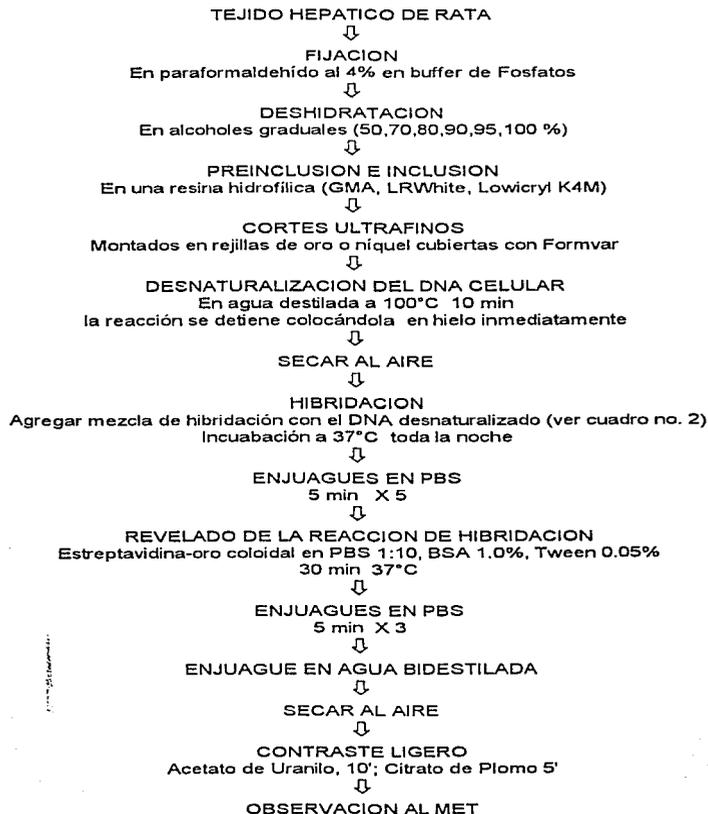
Para el método de hibridación posterior a la imbibición ("post-embedding") se utilizó hígado de rata normal que se procesó, con las técnicas convencionales para MET, fijando también con paraformaldehído al 4% en el mismo buffer, durante una hora, y con las variantes de no postfijar con osmio e incluir en resinas hidrofílicas (glicolmetacrilato (GMA), Lowicryl K4M y LRWhite). La reacción de hibridación se llevó a cabo en cortes ultrafinos montados en rejillas de oro o níquel cubiertas con formvar y empleando la siguiente mezcla de hibridación:

- 3.0 μ l de DNA de sonda (~ 30 ng por rejilla)
- 2.5 μ l Formamida
- 2.5 μ l 20X SSC
- 5.0 μ l Sulfato de Dextrán al 50%
- 4.0 μ l DNA de esperma de salmón 0.2 mg/ml

En términos generales para la reacción de hibridación (la secuencia se resume en el cuadro 5) se procedió de la siguiente manera: se utilizan las mismas proporciones en la mezcla de hibridación. Tanto el DNA de las células como el de la mezcla de hibridación se desnaturaliza con calor. Sobre una gota de la mezcla ya desnaturalizada, se coloca una rejilla que previamente fue colocada en agua destilada hirviendo. La reacción de hibridación se incubó a 37°C durante 24 horas en una cámara húmeda y se revela con una solución de estreptavidina acoplada con partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro (Sigma).

Se aplica un breve contraste adicional con soluciones contrastantes convencionales (acetato de uranilo y citrato de plomo, 10 y 5 min. respectivamente).

Cuadro 5. HIBRIDACION *in situ* PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA
Método posterior a la imbibición ("post-embedding")



6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Los genes de rDNA se localizan en el componente fibrilar denso (DFC) en nucléolos de hepatocitos de rata.

Se han establecido las condiciones que se requieren para llevar a cabo la hibridación *in situ* no isotópica a nivel ultraestructural utilizando sondas biotinadas. Previamente a la reacción de hibridación, se verificó la eficiencia de los métodos de amplificación de la sonda por métodos de transformación bacteriana y su purificación (Fig. 6), así como el marcado y tamaño adecuados de la sonda por medio de electroforesis en geles de agarosa y columna de Sephadex G50 (Fig. 7). Los mejores resultados se obtienen cuando la reacción de hibridación se hace posterior a la imbibición del tejido en resina ("post-embedding"), es decir sobre cortes ultrafinos montados en rejillas, y la detección se lleva a cabo con estreptavidina acoplada a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro.

Anteriormente se ha utilizado con éxito el plásmido p59 como sonda para la detección de rDNA en microscopía de luz (Jiménez García y col., 1989). En este trabajo mostramos resultados de la localización del gen por hibridación ultraestructural *in situ*. Inicialmente, como experimento testigo, se realizó hibridación *in situ* con ML, mediante la utilización del sistema de detección a base del complejo avidina-biotina peroxidasa. Los genes se localizaron exclusivamente en el nucléolo individual de células PtK2 de epitelio renal de marsupial, o de cada uno de los tres nucléolos de las células NRK, también epiteliales de riñón pero de rata (Fig. 8). No se apreció marca en el nucleoplasma o en el citoplasma.

Antes de llevar a cabo hibridación ultraestructural *in situ*, se realizó una inmunolocalización de DNA en cortes de hígado de rata incluido en glicol metacrilato (GMA), para conocer la fracción total de DNA intranucleolar detectable por microscopía electrónica (Fig. 9). Además del DNA presente en la cromatina perinucleolar, que es abundante, se observó la presencia de marcado intranucleolar principalmente en el componente fibrilar denso (Fig. 9, cabezas de flecha) del nucléolo adyacente a los centros fibrilares (Fig. 9, flecha). Una vez conociendo que la fracción de DNA era abundante en cortes, se investigó qué porción de ese DNA correspondía al rDNA. Mediante hibridación ultraestructural *in situ* aplicada a cortes de tejido hepático de rata incluido en GMA y tratados con RNasa, se localizó el rDNA en el componente fibrilar denso del nucléolo (Fig. 10). En la Fig. 10a, se observa la presencia de rDNA en el componente fibrilar denso del nucléolo (cabezas de flecha), en tanto que los centros fibrilares (flecha) y el componente granular se aprecian sin marca. A mayores aumentos, se repite el patrón observado (Fig. 10b-d). Con tratamientos previos de DNasa I, la marca se observa en el componente fibrilar denso y en el componente granular (Fig. 11a). Esa marca corresponde a rRNA. Pre-tratamientos de doble digestión *i.e.* DNasa I seguida de RNasa A (Fig. 11b), impiden el marcado en el nucléolo. Otros autores (Thiry y Goessens, 1992; Puvion-Dutilleul y col., 1991a) lo han descrito en los centros fibrilares (FCs) en células murinas tumorales de Ehrlich y HeLa, respectivamente. Nuestros resultados apoyan sin embargo, otra serie de evidencias (Wachtler y col., 1990; 1992), que indican que en espermatoцитos y linfocitos humanos, el rDNA también se encuentra en el DFC. Aunque aún existe discrepancia entre los autores, se ha logrado un consenso en cuanto a que la localización de los genes rDNA intranucleolares ocurre en el componente

fibrilar, ya sea componente fibrilar denso o centros fibrilares. La discrepancia en estos resultados nos lleva a proponer que la localización del rDNA depende probablemente del tipo celular y/o del estado fisiológico de la célula y del nucléolo.

Los diversos estudios sobre la localización del rDNA en nucléolos han utilizado diferentes técnicas y modelos de estudio. En general, los nucléolos pueden ser de tipo reticulado, en donde predomina el DFC, o bien de tipo anular, en donde se observa un gran FC y escaso DFC. Además, las técnicas usan diferente tipo de resina de inclusión y diferente sistema de detección de los híbridos. Aquí, se ha usado resina GMA y detección de híbridos por medio de estreptavidina conjugada con oro coloidal de 10 nm de diámetro. Además, este estudio difiere de otros en que aquí se ha utilizado un nucléolo de tipo reticulado, en donde el componente fibrilar denso es abundante y fácilmente reconocible. Si los genes ribosómicos estuvieran solamente restringidos a los centros fibrilares, este tipo de nucléolo mostraría un patrón de marcado en el cual habría pocas áreas con granos de oro, que representaría a los centros fibrilares, pues es esa la disposición que tienen en los nucléolos reticulados (Fig. 5). En lugar de ese patrón, se encontró marca en el componente fibrilar denso, a lo largo de todo el nucléolo, aunque parece haber mayor marca alrededor de los centros fibrilares. Anticuerpos contra DNA mostraron el mismo patrón (Fig. 9). A pesar de la localización de los genes de rDNA en los diferentes compartimientos del nucléolo, no queda resuelto el problema de si éstos son activos o inactivos. Hay sin embargo, algunas comunicaciones de la localización de rRNA por hibridación ultraestructural *in situ* en el componente fibrilar denso, (Escaig-Haye y col., 1989) lo que concuerda con

los hallazgos de incorporación de uridina tritiada en el mismo componente después de pulsos cortos (Goessens, 1984; Wachtler, 1990). Además de los estudios autoradiográficos que indican la actividad transcripcional del rDNA en el componente fibrilar denso, los estudios de hibridación *in situ* han demostrado la presencia de U3snRNA en el mismo compartimiento (Puvion-Dutilleul y col., 1991b, 1992; Fischer y col., 1991), sugiriendo que los primeros eventos de maduración del pre-rRNA ocurren también en el componente fibrilar denso.

Figura 6. Amplificación de sondas de DNA por clonación de plásmidos en bacterias. Selección de colonias transformadas por resistencia a antibiótico (a) y crecimiento en medio líquido para amplificar el plásmido con el gen de interés (b).

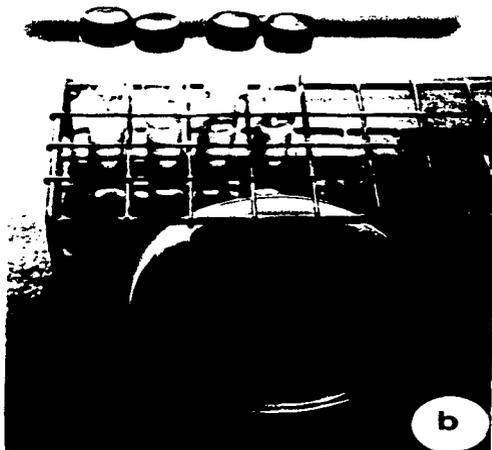


Figura 7. Marcado de la sonda. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA marcado con biotina por "nick translation" para verificar el tamaño adecuado (de 100 a 500 pb) de los fragmentos generados (a). "Dot blot" de una sonda marcada (rDNA) para verificar la incorporación de nucleótidos biotinados (b).

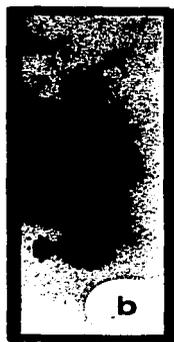
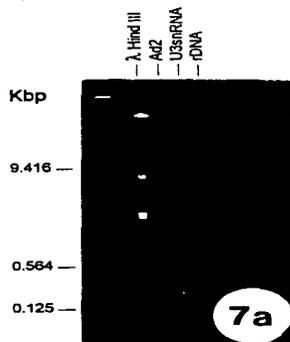


Figura 8. Localización de rDNA en células PtK2 (a y b) y NRK (c). Hibridación *in situ* no isotópica al microscopio de luz con sondas biotinadas y sistema de detección a base del complejo avidina-biotina-peroxidasa. Las flechas indican la señal en los nucléolos individuales de células PtK2 o en los tres nucléolos de células NRK. a) campo claro y b) el correspondiente contraste de fases para PtK2. c) es campo claro de NRK. La barra es de 20 μm en a) y en b); en c) es de 10 μm .

Figura 9. Inmunolocalización ultraestructural de DNA en hepatocitos de rata. Dentro del nucléolo, la señal se observa principalmente en la región fibrilar densa (DFC, cabezas de flecha) cercana a los centro fibrilares (flecha). Fuera del nucléolo, la marca se observa en la cromatina perinucleolar (pnc). Acetato de uranilo-citrato de plomo. X 58 000.

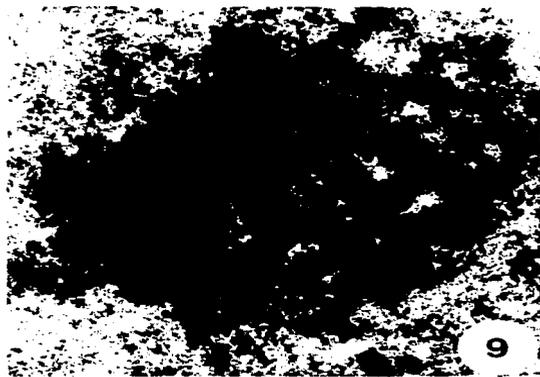
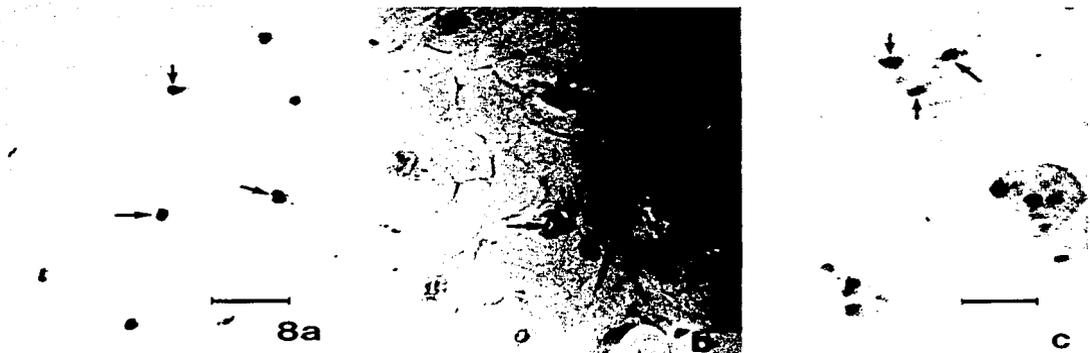


Figura 10. Localización de rDNA en hepatocitos de rata tratados con RNasa A por hibridación *in situ* ultraestructural. Los diferentes campos (a-d) muestran señal intensa en el componente fibrilar denso (DFC) del nucléolo (cabezas de flecha) cercano a los centro fibrilares (flechas). Los intersticios (i) en el nucléolo así como la cromatina (ch), la cromatina perinucleolar (pnc) y el citoplasma (cy) no muestran marca apreciable. a) X 61 740; b) X 86 240; c) X 80 360; d) X 86 240.

DFC

10a

DFC

b

pnc

ch

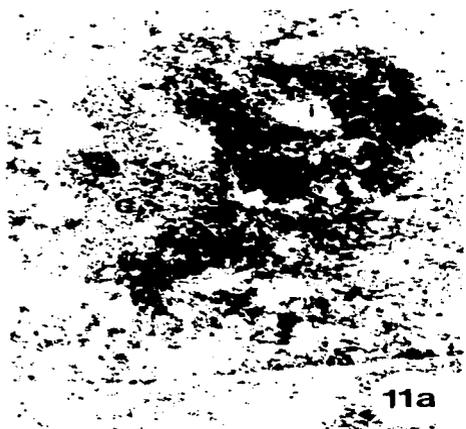
cy

c

pnc

d

Figura 11. Localización de rDNA en hepatocitos de rata tratados con DNasa I (a) o RNasa A seguida de DNasa I (b) por hibridación *in situ* ultraestructural. En a) la señal, correspondiente al rDNA, se observa en el componente fibrilar denso (DFC) y en el componente granular (G) del nucléolo, pero no en los intersticios (i) o en los centros fibrilares (flecha). En b) no se observa marca. X 80 000.



6.2. En interfase, el rRNA se localiza en el nucléolo. El U3snRNA y la proteína S6 se localizan en el nucléolo y en los cuerpos espiralados.

Por FISH se determinó la distribución de rRNA y U3snRNA. El rRNA se localiza en nucléolos y citoplasmas de células HeLa y NRK en interfase (Figs. 12a y 13a). El U3snRNA se localiza en nucléolos en ambos tipos celulares (Figs. 12b y 13b) y en pequeños cuerpos adyacentes (Figs. 12b y 13b, flechas). Para conocer si estos cuerpos pequeños, redondos y cercanos al nucléolo correspondían a cuerpos espiralados, se realizaron experimentos de doble marcado *i.e.* hibridación *in situ* para detectar U3snRNA e inmunolocalización de la proteína coilina (Andrade y col., 1991, 1993) en las mismas células. Los pequeños cuerpos contienen U3snRNA y coilina (Fig. 14, flechas), es decir, los cuerpos espiralados contienen U3snRNA. Para determinar la especificidad de la sonda y descartar hibridación inespecífica en estos cuerpos se realizó un análisis tipo Northern utilizando extractos de RNA total de células HeLa y la misma sonda de U3snRNA (Fig. 15). La electrotransferencia northern indica que la sonda es específica para U3snRNA. Posteriormente se analizó si los cuerpos espiralados también contenían rRNA mediante el mismo procedimiento de doble marcado pero utilizando la sonda de rDNA en lugar de la de U3snRNA. No se encontró rRNA colocalizando con los cuerpos espiralados (Fig. 16, flechas).

La presencia de U3snRNA en cuerpos espiralados difiere de otras comunicaciones (Carmo-Fonseca y col., 1992, 1993). La diferencia puede deberse a que la señal para U3snRNA en cuerpos espiralados es muy débil en comparación con la del nucléolo o a que la detección llevada a cabo en

el presente trabajo abarca la secuencia completa del U3snRNA en tanto que la de esos autores solo detecta 15 nucleótidos. En un trabajo reciente (Azum-Gelade, 1994) también se encontró U3snRNA en pequeños cuerpos cercanos al nucléolo. Aunque los autores no realizaron doble localización la señal seguramente corresponde a cuerpos espiralados.

Los cuerpos espiralados fueron observados a principios de siglo (Ramón y Cajal, 1903) mediante impregnaciones argénticas. Por entonces se les dió el nombre de cuerpos accesorios del nucléolo. En 1969 (Monneron y Bernhard, 1969), mediante microscopía electrónica re-describieron como ribonucleoproteínas intranucleares que se denominaron cuerpos espiralados. Posteriormente se sugirió que los cuerpos accesorios y los cuerpos espiralados eran la misma estructura (Hardin y col., 1969) aunque ésto se demostró trece años después (Seite y col., 1982; Lafarga y col., 1983). Los cuerpos espiralados se han descrito también en plantas (Moreno Díaz de la Espina, 1982) y en células transformadas son abundantes (Spector y col., 1992). Los cuerpos espiralados contienen una proteína específica llamada coilina o p80 (Andrade y col., 1991) cuya secuencia del gen se conoce. Se cree que intervienen en la función nucleolar por su cercanía a este organelo y porque se tiñen con la técnica del Ag-NOR (Raska y col., 1991) además de contener fibrilarina. Para demostrar si los cuerpos contienen además elementos nucleolares que no tienen relación con el procesamiento del pre-rRNA, como la proteína ribosomal S6, se realizó inmunofluorescencia doble utilizando anticuerpos contra S6 y coilina en células HeLa (Fig. 17). Los resultados indican la presencia de S6 en cuerpos espiralados (Fig. 17, cabezas de flecha). Mediante electrotransferencia western se demostró la especificidad del anticuerpo (Fig. 18, carril 4). Además de contener factores nucleolares

responsables del procesamiento del pre-rRNA y del ensamblado del ribosoma, los cuerpos espiralados contienen factores del procesamiento del pre-mRNA (Fakan y col., 1984; Carmo-Fonseca y col., 1991; Spector y col., 1992). Sin embargo, los cuerpos espiralados no contienen todos los factores del procesamiento del pre-rRNA, no contienen DNA ni incorporan uridina tritiada (Moreno Díaz de la Espina, 1982).

Los cuerpos espiralados entonces contienen factores de maduración tanto del pre-mRNA como del pre-rRNA; sin embargo, no contienen los sustratos pues no se ha demostrado que contengan pre-rRNA ni algún pre-mRNA específico. Esto sugiere un papel importante en el metabolismo del pre-RNA en general, como podría ser el de mediar el intercambio de moléculas entre ambos metabolismos, por ejemplo, transportando U14snRNA. Experimentos recientes indican la presencia de U14 en pequeños cuerpos intranucleolares (Jiménez-García, com. personal).

Figura 12. Localización de rRNA (a) y U3snRNA (b) en células HeLa por hibridación *in situ* fluorescente. El rRNA se observa en los nucléolos y citoplasmas. El U3snRNA se localiza en los nucléolos y en cuerpos pequeños asociados a ellos (flechas).

Figura 13. Localización de rRNA (a) y U3snRNA (b) en células NRK por hibridación *in situ* fluorescente. El rRNA se observa en los nucléolos y citoplasmas. El U3snRNA se localiza en en los nucléolos y en cuerpos pequeños asociados a ellos (flechas).

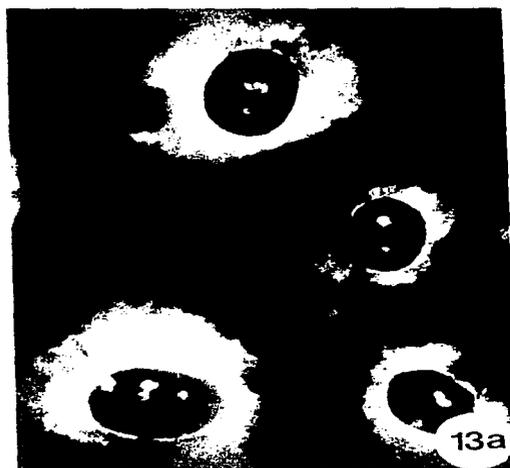
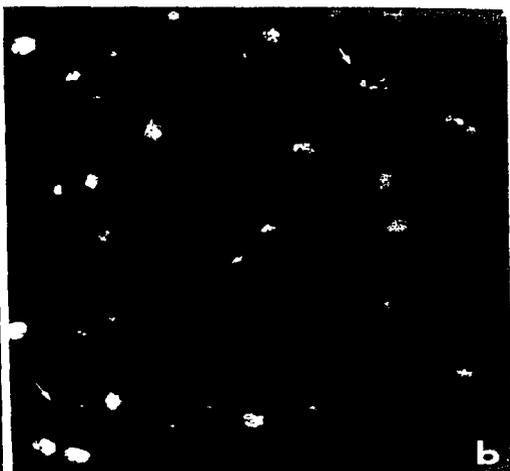


Figura 14. Doble localización de U3snRNA (a-e) y coilina (a'-e') en células HeLa por hibridación *in situ* fluorescente e inmunofluorescencia respectivamente. El U3snRNA se localiza en los nucléolos y en los cuerpos espiralados, donde colocaliza con coilina (flechas).

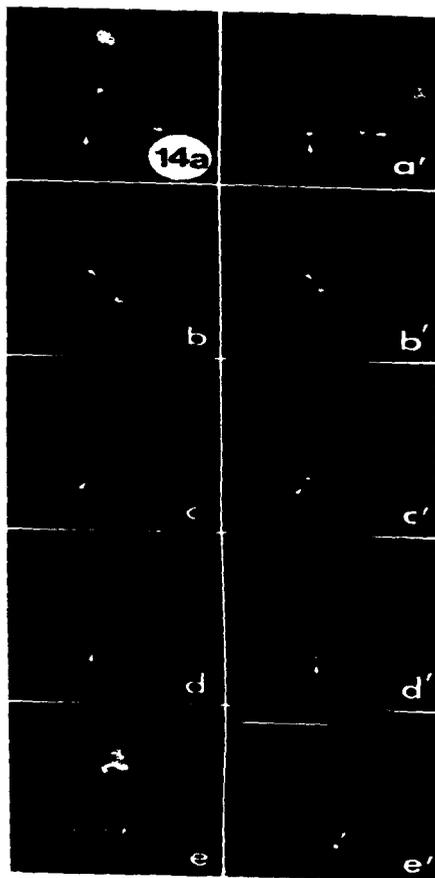


Figura 15. Especificidad de la sonda de U3snRNA analizada por northern blot con RNA total de células HeLa. Independientemente de la cantidad de RNA total cargada en los carriles, la sonda solo detecta una banda, que corresponde al U3snRNA. Se indica la posición del rRNA 5S, otro RNA nucleolar pequeño.

Figura 16. Doble localización de rRNA (a) y coilina (b) en células HeLa por hibridación *in situ* fluorescente e inmunofluorescencia, respectivamente. El rRNA se observa en los nucléolos y en los citoplasmas. La coilina, que marca los cuerpos espiralados (flechas) no contiene cantidades apreciables de rRNA.

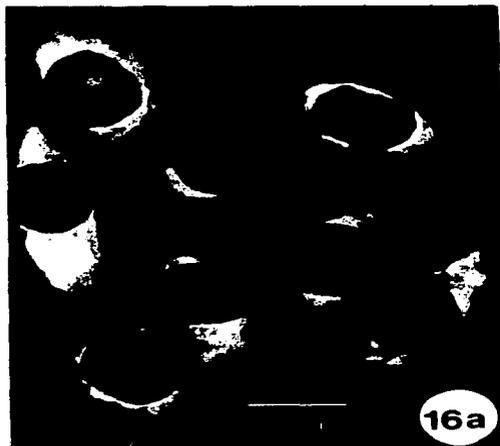
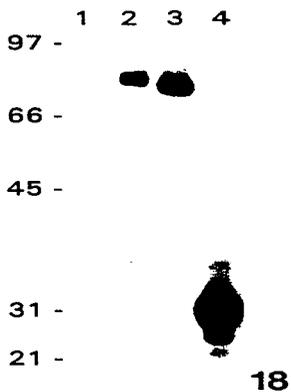


Figura 17. Doble inmunolocalización de la proteína S6 (a) y coilina (b) en células HeLa. La proteína S6 se observa en los nucléolos y citoplasmas, así como en cuerpos espiralados que contienen coilina (cabezas de flecha).

Figura 18. Especificidad de los anticuerpos contra las proteínas S6 y coilina por medio de Western blot en extractos de proteína total de células HeLa. Carril 1 es suero normal humano; carril 2 es anti-coilina de conejo; carril 3 es anti-coilina humana; carril 4 es anti-S6 de conejo.



6.3. El U3snRNA se localiza en cuerpos prenucleolares (PNBs) durante la telofase.

Para conocer el papel de los dos RNAs más abundantes del nucléolo en la formación de este organelo intranuclear, es decir, el papel del rRNA y del U3snRNA, se estudió la distribución de esas moléculas durante la mitosis, con énfasis en la telofase, cuando ocurre la nucleologénesis. Durante la mitosis, los elementos nucleolares se disgregan y se distribuyen a varios sitios: una envoltura cromosómica, los organizadores nucleolares y los cuerpos prenucleolares. Con el objeto de determinar la distribución de los elementos de los nucléolos de las células HeLa, primero se llevó a cabo tinción de plata amoniacal (Goodpasture y Blum, 1975) (Fig. 19). En la Fig. 19a se nota la presencia de plata en los nucléolos interfásicos, principalmente en los componentes fibrilares (cabeza de flecha). Además se observa la tinción de los cuerpos espiralados (flecha cruzada). De profase a telofase (Fig. 19b-e) la tinción se observa en los organizadores nucleolares (cabezas de flecha). En telofase, además del organizador nucleolar, los cuerpos prenucleolares se tiñen fuertemente (flechas). Posteriormente se estudió la distribución de rRNA y de U3snRNA durante la mitosis en células HeLa y NRK por FISH (Figs. 19 y 20). En interfase (Figs. 19f y 20a), el rRNA se localiza en los nucléolos y en los citoplasmas, aunque en los nucléolos algunas áreas discretas no se tiñen (Fig. 19f, cabeza de flecha). De profase a anafase, el rRNA se distribuye en el compartimiento citoplásmico, quedando excluido de los cromosomas (Figs. 19g-i; 20b-d). En telofase, durante la nucleologénesis, además del citoplasma, se marca la región de los organizadores nucleolares (Figs. 19j; 20e, cabezas de flecha), indicando la presencia de pre-rRNA recién sintetizado en los nucléolos en formación,

pero no en los cuerpos prenucleolares (PNBs). Este comportamiento es similar al de la RNA polimerasa I y al del rDNA (Jiménez-García y col.,1989).

Posteriormente se analizó la distribución del U3snRNA en mitosis en ambos tipos celulares (Figs. 19 y 20). En interfase, el U3snRNA se observó en los nucléolos y en cuerpos espiralados (Figs. 19k; 20, flecha cruzada). En células HeLa este RNA presenta un patrón fibrilar, excluyendo algunas zonas discretas que pueden ser centros fibrilares (Fig. 19k, cabeza de flecha). De profase a anafase (Figs. 19l-n; 20g-i), el U3snRNA se dispersa en el citoplasma difusamente. Sin embargo, durante la nucleogénesis en telofase (Figs. 19o; 20j), el U3snRNA se observa ya en organizadores nucleolares (cabezas de flecha) de nucléolos en crecimiento, pero también en cuerpos prenucleolares abundantes (flechas) que se fusionan constantemente a los organizadores nucleolares, especialmente en células NRK, que crecen muy aplanadas. Los cuerpos prenucleolares se distinguen de los organizadores nucleolares porque son más pequeños, no contienen rDNA y no presentan RNA polimerasa I (Jiménez García y col., 1989). La proteína nucleolar fibrilarina, que forma snRNPs con el U3snRNA, tiene el mismo comportamiento (Ochs y col.,1985b; Jiménez-García y col.,1989). Con el objeto de analizar si el comportamiento de las moléculas del procesamiento del pre-rRNA, es decir, el U3snRNA, es exclusivo de la telofase o si cualquier elemento nucleolar involucrado en la biogénesis del ribosoma se comporta de manera similar, se estudió la localización de la proteína ribosómica S6 durante la mitosis en células HeLa (Fig. 21). En interfase (Fig. 21a) la proteína S6 se presenta en los nucléolos, cuerpos espiralados y en los citoplasmas. Esta proteína se localiza difusamente, de profase a telofase, en la porción del citoplasma, excluida de los

cromosomas. En telofase no se encuentra en la región de los organizadores nucleolares hasta que las células han entrado a la etapa G1 del ciclo celular.

Figura 19. Localización de rRNA (f-j) y U3snRNA (k-o) durante la mitosis de células HeLa por hibridación *in situ* fluorescente. a-e) tinción de plata para organizador nucleolar (Ag-NOR) para demostrar la presencia de elementos nucleolares durante la mitosis y en especial durante la nucleologénesis en telofase (e). a,f,k) interfase; b,g,l) profase; c,h,m) metafase; d,i,n) anafase; e,j,o) telofase. Con plata, se tiñen los nucléolos cabeza de flecha) y los cuerpos espiralados en interfase (flecha cruzada). De profase a telofase, la señal se observa en los organizadores nucleolares. En telofase también se aprecia en cuerpos prenucleolares numerosos (flechas en e). El rRNA se observa en nucléolos interfásicos aunque excluye zonas intranucleolares (cabeza de flecha en f). De profase a anafase se dispersa en el citoplasma. Se observa nuevamente en las regiones de los organizadores nucleolares en telofase (cabeza de flecha en j). El U3snRNA se observa en nucléolos interfásicos aunque excluye zonas internas (cabeza de flecha en k). De profase a anafase se distribuye en el citoplasma. En telofase (o) se observa en zonas de organizador nucleolar (cabezas de flecha) y en cuerpos prenucleolares (flechas).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

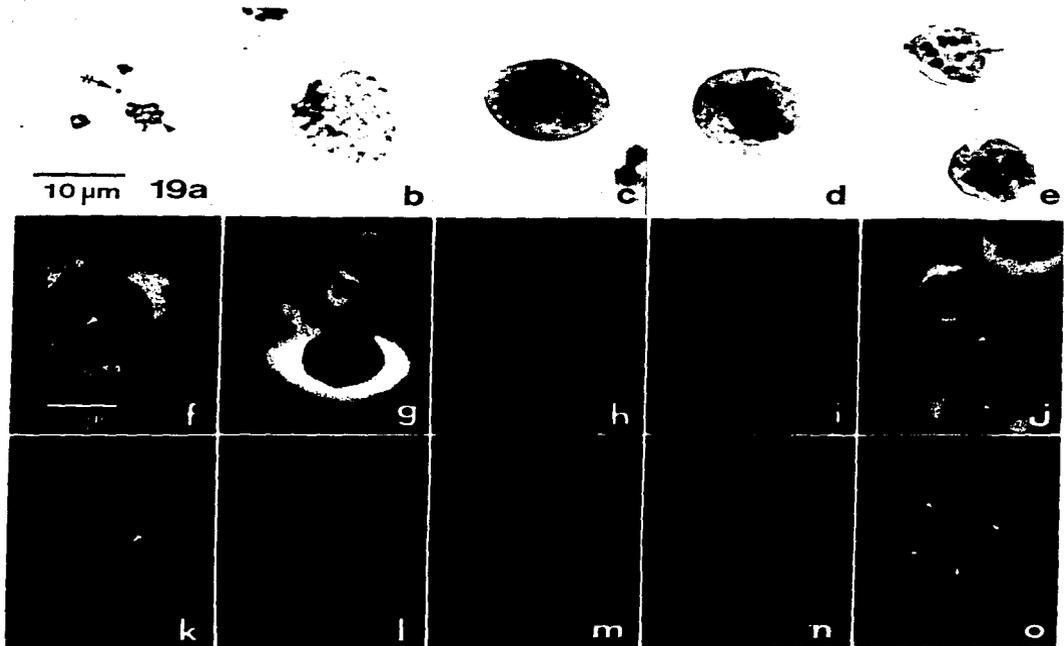
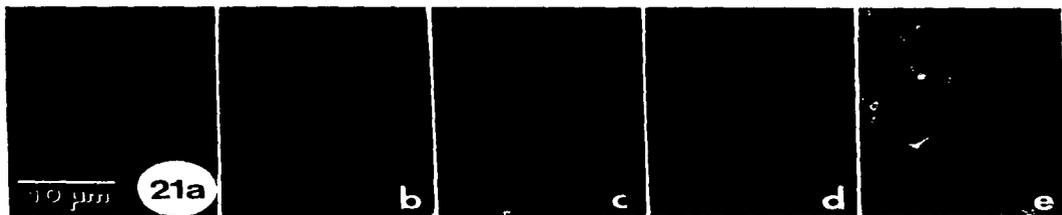
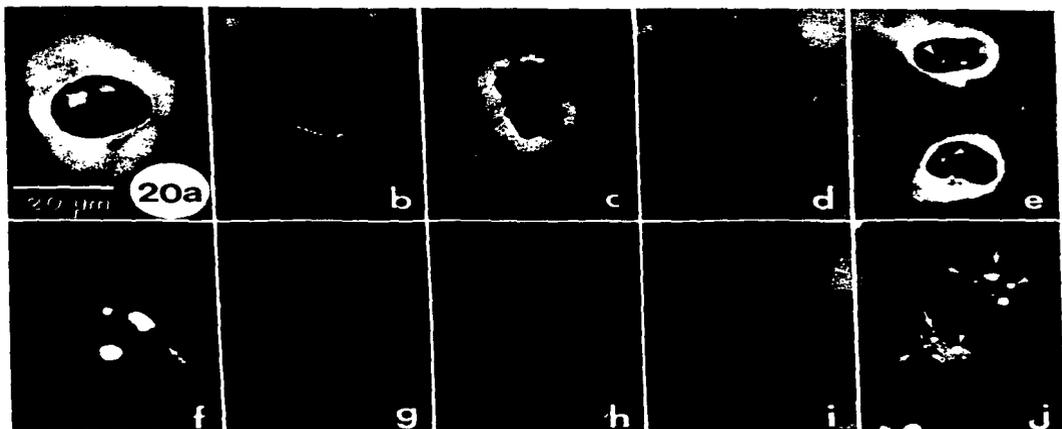


Figura 20. Localización de rRNA (a-e) y U3snRNA (f-j) en células NRK por hibridación *in situ* fluorescente. En interfase, el rRNA se observa en nucléolos y citoplasmas (a). de profase a telofase se observa en citoplasma (b-e). En telofase (e), durante la nucleogénesis, se observa también en las regiones del organizador nucleolar (cabezas de flecha). En interfase (f) el U3snRNA se observa en nucléolos y cuerpos espiralados (flecha cruzada). De profase (g) a anafase (i) se observa en el citoplasma. En telofase (j) se observa en regiones del organizador nucleolar (cabezas de flecha) y en cuerpos prenucleolares (flechas).

Figura 21. Inmunolocalización de la proteína S6 en células HeLa durante la mitosis. En interfase (a) la marca se observa en los nucléolos y en los citoplasmas. De profase (b) a telofase (e) la señal se observa dispersa en el citoplasma.



A pesar de que tanto el rRNA como el U3snRNA se distribuyen difusamente en el citoplasma durante la mitosis, no se encuentran asociados a los cromosomas y únicamente el U3snRNA se localiza en los cuerpos prenucleolares. Otros autores han descrito resultados similares al mismo tiempo que este estudio (Azum-Gélade y col., 1994), en una investigación sobre la redistribución el U3snRNA y fibrilarina en células CHO. Ellos encontraron que las moléculas del U3snRNA persisten durante la mitosis en fuerte asociación con el remanente nucleolar. Las encontraron presentes también en los PNBs y sugieren que podría estar participando en la nucleologenesi promoviénndola al interaccionar con el espaciador externo 5' el pre-rRNA recién sintetizado. Estos resultados sugieren que el rRNA es sintetizado *de novo* en la región del organizador nucleolar (NOR) una vez que el nucléolo empieza a reorganizarse en telofase, mientras que al menos una porción del U3snRNA que se hereda a las células hijas, se asocia al NOR en forma de PNBs.

Los cuerpos prenucleolares son cuerpos fibrosos (Stevens, 1965) ribonucleoproteicos (Risueño y Medina, 1986) que se forman del material nucleolar pericromosómico coalescente. Se fusionan al organizador nucleolar en telofase. Contienen fibrilarina (Ochs y col., 1985b; Jiménez García y col., 1989), proteínas B23 y C23 (Ochs y col., 1985a; 1985b), pero no las proteínas ribosomales S1 (Bell y col., 1992) o S6. Los cuerpos prenucleolares se forman independientemente de la actividad transcripcional de la célula en telofase (Morcillo y col., 1976; Benavente y col., 1987) o de la presencia de rDNA (Bell y col., 1992). Sin embargo, su fusión con los organizadores nucleolares sí depende de la actividad transcripcional de la RNA polimerasa I. El nucléolo se forma solo parcialmente cuando se utiliza actinomicina D o cuando se inyectan

anticuerpos contra RNA polimerasa I (Benavente y col., 1987), lo que sugiere que deben existir moléculas transcritas incompletas que pueden contribuir a la formación del nucléolo (Fan y Penman, 1971). Una vez que comienza la actividad de síntesis de pre-rRNA en el organizador nucleolar, los cuerpos prenucleolares que contienen factores de procesamiento se fusionan a ellos. La herencia materna de factores de procesamiento aseguraría la disponibilidad de moléculas hacia los transcritos recién sintetizados o que pudieran haber quedado incompletos (Fan y Penman, 1971) pero asociados al organizador nucleolar durante la mitosis. El U3snRNA heredado participaría por ello, en el procesamiento de la gran cantidad de transcritos de pre-rRNA que se producen durante la etapa G1 del ciclo celular.

Proponemos que el U3snRNA interviene en las etapas tempranas del procesamiento del pre-rRNA recién sintetizado en telofase y que esas moléculas se mueven hacia los sitios de transcripción activa de pre-rRNA. Esto último representaría una situación análoga a lo que ocurre con el procesamiento del pre-mRNA, en el que se ha sugerido que hay movimiento de factores de procesamiento a los sitios de producción de pre-mRNA por medio de un mecanismo de reclutamiento (Jiménez-García y Spector, 1993). Alternativamente, los factores podrían sufrir movimientos de difusión que permitirían concebir un mecanismo de anclaje por disponibilidad de factores a los sitios de transcripción, haciendo el fenómeno más inespecífico.

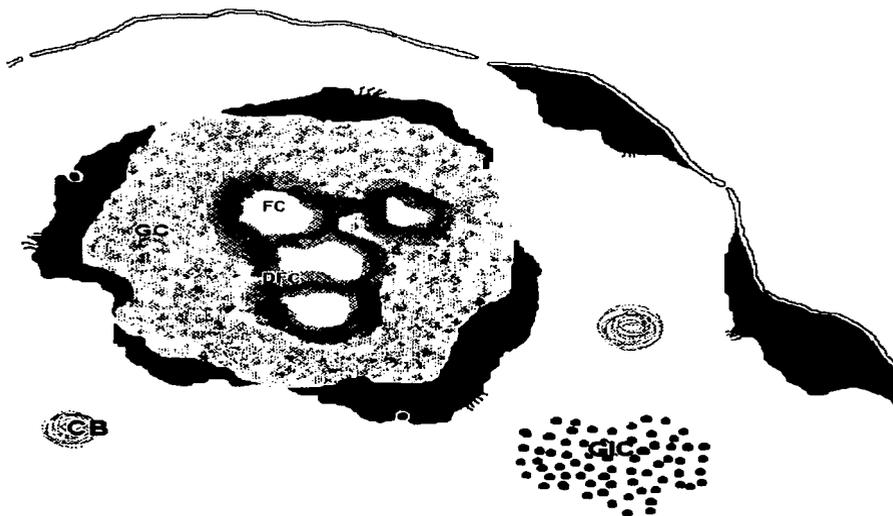


Figura 22. Esquema que muestra los genes rDNA de rata en el componente fibrilar denso del nucléolo. FC, centros fibrilares; DFC, componente fibrilar denso; GC, componente granular; CB, cuerpos espiralados; GIC, gránulos intercromatinianos.

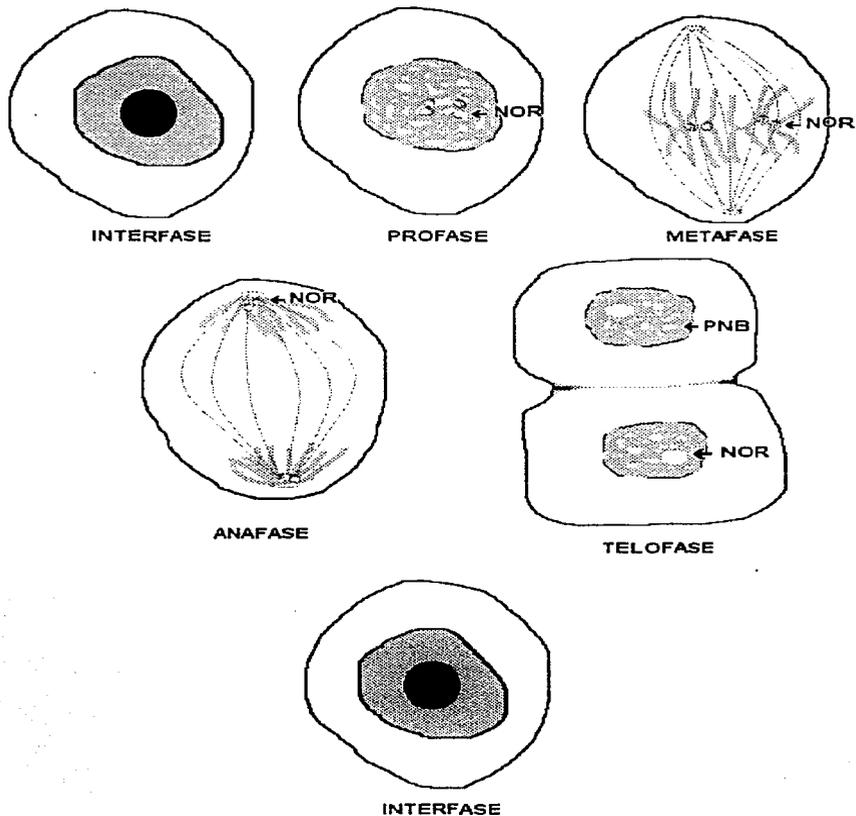


Figura 23. Esquema que muestra la presencia del factor de procesamiento U3snRNA (verde) materno en los cuerpos prenucleolares que se fusionan al NOR en telofase. NOR, región del organizador nucleolar; PNB, cuerpos prenucleolares; (amarillo), localización del rRNA

7. CONCLUSIONES

- ❖ La hibridación ultraestructural *in situ* se puede realizar sobre material fijado con paraformaldehído e incluido en resina GMA, utilizando sondas de rDNA marcadas con biotina. La detección se puede llevar a cabo con estreptavidina conjugada con oro coloidal de 10 nm de diámetro.
- ❖ El rDNA se localiza en el componente fibrilar denso (DFC) de nucléolos de hepatocitos de rata en interfase.
- ❖ El U3snRNA se localiza en los nucléolos y en los cuerpos espiralados en células en interfase. Los cuerpos prenucleolares (PNBs) formados en la telofase, contienen U3snRNA.

Se sugiere que:

- A) la transcripción del rDNA en forma de pre-rRNA se lleva a cabo en el componente fibrilar denso (DFC) del nucléolo interfásico,
- B) el nucléolo se reconstruye en la telofase al menos por dos vías:
 1. síntesis *de novo* de pre-rRNA en los NORs,
 2. fusión de PNBs con los NORs. Los NOR contienen pre-rRNA recién sintetizado y los PNBs contienen moléculas de su procesamiento como el U3snRNA.
- C) La transcripción y el procesamiento del pre-rRNA están estrechamente asociados espacial y temporalmente. Esto hace posible proponer un

mecanismo de acoplamiento entre la transcripción y el procesamiento basado en el reclutamiento de moléculas de procesamiento de pre-rRNA hacia los sitios de transcripción activa, similar al descrito para mensajeros en células infectadas con adenovirus o transfectadas con genes de beta tropomiosina (Jiménez-García y Spector, 1993).

8. AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por dirigir esta tesis.
- Al Dr. Gerardo H. Vázquez Nin por sus comentarios durante el desarrollo del proyecto y la redacción final de la tesis.
- A la Dra. Olga Echeverría M. por la imagen de anti-DNA ultraestructural en células y por los comentarios y sugerencias a lo largo del trabajo y el escrito final de la tesis.
- A la Dra. Annie Pardo por sus sugerencias y apoyo a lo largo del trabajo y la revisión final de la tesis.
- Al Dr. Moisés Selman por su apoyo académico y revisión de la tesis.
- A la Dra. Rosario Rodríguez por la revisión y sugerencias para mejorar la tesis.
- Al Dr. Emilio Rojas por la revisión y comentarios a la tesis.
- Al Dr. Fernando Montiel por enseñarme los principios de la Biología Molecular en el laboratorio.
- A Guadalupe, Ernestina, Marco y Lourdes por compartir el ambiente de trabajo, el intercambio de ideas y la amistad.
- A la M. en C. Julia Pérez R. por compartir juntas nuestras primeras experiencias en Biología Molecular.
- Al Dr. Robert Ochs por la donación de los anticuerpos contra S6 y collina.
- Al Dr. L.I. Rothblum por la donación del plásmido p59.
- Al Dr. David L. Spector por permitir usar la infraestructura de epifluorescencia de su laboratorio en Cold Spring Harbor Laboratory.
- Al Dr. Ram Reddy por la donación de la sonda de U3snRNA.
- Al Dr. Harris Busch y la Dra. Rose K. Busch que con sus comentarios de aliento dieron un fuerte impulso a este trabajo.
- A PADEP por el apoyo económico para la obtención de materiales para el desarrollo del trabajo y la impresión de la tesis.

9. REFERENCIAS.

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1994. **Molecular Biology of the Cell**. 3rd. ed. Garland, New York.
- Allis, D.D., Ziegler, Y.S., Gorovsky, MA., and Olmsted, J.B., 1982. a conserved histone variant enriched in nucleoli of mammalian cells. **Cell**, **31**:131-136.
- Amiri, K.A. 1994. Fibrillarin-like proteins in the domain Archaea. **J. Bacteriol.** **176**: 2124-2127.
- Andrade, L.E.C., Chan, E.K.L., Raska, Y., Peebles, C.L., Roose, G. and Tan, E.M., 1991. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: Immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. **J. Exp. Med** **173**:1407-1419.
- Andrade, L.E.C., Tan, E.M. and Chan, E.K.L. 1993. Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **90**: 1947-1951.
- Arrand, J.E., 1985. Preparation of nucleic acid probes. En: **Nucleic Acid Hybridisation. A practical approach**, Hames, B.D. and Higgings, S.J. (Eds). IRL Press Lim. Oxford. pp. 17-46.
- Arroua, M.L., Hartung, M., Devictor, M., Berge-Lefrand, J.L. and Stahl, A., 1982. Localization of ribosomal genes by in situ hybridization in the fibrillar centre of the nucleolus in the human spermatocyte. **Biol. Cell** **44**:337-340.

- Azum-Gélade, M.C., Noaillac-Depeyre, J., Caizergues-Ferrer, M. and Gas, N. 1994. Cell cycle redistribution of U3 snRNA and fibrillarin. Presence in the cytoplasmic nucleolus remnant and in the prenucleolar bodies at telophase. **J. Cell Sci.** **107**: 463-475.
- 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
- Belenguer, P., Caizergues Ferrer, M., Labbe, J.C., Doree, M. and Amalric, F., 1990. Mitosis-specific phosphorylation of nucleolin by P34Cdc2 protein kinase. **Molec. cell. Biol.**, **10**:3607-3618.
- Bell, P., Dabauvalle, M.C. and Scheer, U. 1992. In vitro assembly of prenucleolar bodies in *Xenopus* egg extract. **J. Cell Biol.** **118**: 1297-1304.
- Benavente, R., Rose, K.M., Reimer, G., Hagle-Derr, B. and Scheer, U. 1987. Inhibition of nucleolar reformation after microinjection of antibodies to RNA polymerase I into mitotic cells. **J. Cell Biol.** **105**: 1483-1491.
- Boheringer 1989. DNA labeling and detection nonradioactive. Manual del proveedor.
- Borer, A.R., Lehner, C.F., Eppengerger, H.M. and Nigg, E. 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. **Cell**, **56**:379-390.

Buongiorno Nardelli, M. and Amaldi, F. 1969. Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue sections. **Nature**, **225**: 946-947.

Busch, H. and Reddy, R., 1981. RNA and protein components of the nucleolus: use of scleroderma antibodies as probes. En: **Current topics in Rheumatology**. Systemic sclerosis (scleroderma). Black, C.M. and Myers, A.R. (Eds.). pp. 301-307. Gower Medical Publ. Ltd., New York.

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 Nucle(o)lar Workshop, Cracow, Poland, 1985.**

Busch, H. and Rothblum, L. (Eds.), 1982. **The Cell Nucleus. rDNA, Part A.** Academic Press. New York, U.S.A.

Busch, H. and Smetana K., 1970. **The nucleolus.** Acad. Press. New York, U.S.A.

Carmo-Fonseca, M., Ferreira, J., and Lamond, A.I., 1993. Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis. evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. **J. Cell Biol.** **120**: 841-852.

Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Carvalho, M.T. and Lamond, A.I., 1992. Transcription-dependent coocalization of the U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs in coiled bodies. **J. Cell Biol.** **117**: 1-14.

Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Sproat, B.S., Ansorge, W., Swanson, M. and Lamond, A.I., 1991. In vivo detection of snRNP-rich organelles in the nuclei of mammalian cells. **EMBO J.** **10**:1863-1873.

Chan, E.K.L. and y Pollard, K.M. 1992. Autoantibodies to ribonucleoprotein particles by immunoblotting. In: **Manual of Clinical Laboratory Immunology**, 4th. de., Eds. N.R. Rose, E.C. deMacario, J.L. Fahey, H. Friedman and G.M. Penn, Washington D.C: American Society of Microbiology, 755-762.

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.

Chan, P.K., Aldrich, M., Tan, E.M. and Busch, H., 1985. Detection of a 140 kDa nucleolar protein with an anti-PCNA autoantibody. **Cell Biol. Int. Rep.** **9**: 61-68.

Chan, V.T.W., and McGee, J.O'D., 1990. Non-radioactive probes: preparation, characterization, and detection. En: **In situ hybridization. Principles and Practice**. Polak, J.M. and McGee, J.O'D. Oxford Science Publications. New York.

- Chan, Y.L. and Wool, I.G., 1988. The primary structure of rat ribosomal protein S6. **J. Biol. Chem.**, **263**: 2891-2896.
- Chang, J.-H. and Olson, M.O.J., 1990. Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. **J. Biol. Chem.** **265**(30):18227-18233.
- Choubey, D. and Lengyel, P., 1992. Interferon action—nucleolar and nucleoplasmic localization of the interferon-inducible 72-kDa protein that is encoded by the lfi-204 gene from the gene-200 cluster: **J. Cell Bio1.**, **116**:1333-1341 .
- Corben, E., Butcher, G., Hutchings, A., Ellis, b. and Roaberts, K., 1989. A nucleolar matrix protein from carrot cells identified by a monoclonal antibody. **Eur.J. Cell Biol.**, **50**:353-359.
- Crouch, R.J., Kanaya, S. and Earl, P.L., 1983. A model for the involvement of the small nucleolar RNA (U3) in processing eucaryotic ribosomal RNA. **Mol. Biol. Rep.** **9**:75-78.
- Darnell, J., Lodish, H., and Baltimore, D., 1990. **Molecular Cell Biology**. 2nd. Edition. Scientific American Books. N.Y. U.S.A.
- Dumbar, T.S., Gentry, G.A. and Olson, M.O.J., 1989. Interaction of nucleolar phosphoprotein-B23 with nucleic acids. **Biochemistry**, **28**:9495-9501.
- Epstein, P., Reddy, R. and Busch, H. 1984. Multiple states of U3 RNA in Novikoff hepatoma nucleoli. **Biochemistry**, **23**:5421-5425. 301307.

- Escande-Geraud, M.L., Azum., M.C., Tichadou, J.L. and gas, 1985. Correlation between rDNA transcription and distribution of a 100 kDa nucleolar protein in CHO cells. **Expl Cell Res.**, **161**:353-363.
- Escaig-Haye, F., Grigoriev, U., and Fournier, J.G. 1989. Ultrastructural detection of ribosomal RNA in animal cells by *in situ* hybridization on ultrathin sections using a biotinilated probe. **C. R. Acad. Sci. (III)** **309**: 429-434.
- Fakan, S., Leser, G. and Martin, T.E., 1984. Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry in thin sections. **J. Cell Biol.** **98**:358-363.
- Fan, H. and Penman, S. 1971. Regulation of synthesis and processing of nucleolar components in metaphase arrested cells. **J. Mol. Biol.** **59**: 27-42.
- Fontana, F., 1781. **Traité sur le vnin de la vipere, avec des observations sur la structure primitive du corps animale.** Florence, Italy.
- 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**: 378-381.
- Ghisolfi, L., Joseph, G., Erard, M., Escoubas, J.M., Mathieu, C. and Amalric, F., 1990. Nucleolin—pre-rRNA interactions and preribosome assembly. **Molec. Biol. Rep.** **14**:113-114.

- Girard, J.P., Lehtonen, H., Caizerguezferrer, M.A., Amalric, F., Tollervey, D. and Lapeyre, B., 1992. GARI is an essential small nucleolar mp protein required for pre-rRNA processing in yeast. **EMBO J.**, **11**:673-682.
- Goessens, G., 1984. Nucleolar structure. **Int. Rev. Cytol.** **87**: 107-158.
- Goessens, G. and Lepoint, A., 1974. The fine structure of the nucleolus during interphase and mitosis in Ehrlich tumor cells cultivated *in vitro*. **Expl Cell Res.**, **87**:63-72.
- Goodpasture, C. and Bloome, S.E., 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian cells using silver staining. **Chromosoma** **53**:37-50.
- Gorczyca, W., Bruno, S., Melamed, M.R. and Darzynkiewicz, Z., 1992. Cell cycle-related expression of p120 nucleolar antigen in normal human lymphocytes and in cells of HL-60 and MOLT-4 leukemic lines—effects of methotrexate, camptothecin and teniposide. **Cancer Res.**, **52**:3491-3494.
- Gruca, S., Krzyzowska-Gruca, S., Worbrodt, A. and Krawczyk, 1978. Intranucleolar localization of the RNA-polymerase A activity in isolated nuclei of rat liver. **Expl Cell Res.**, **114**:462-467.
- Hadjiolov, A.A., 1985. **The nucleolus and ribosome biogenesis**. Springer-Verlag, New York, U.S.A.

- Hames, B. D. and Higgins, S. 1985. PREFACE En: **Nucleic acid hybridization. A practical approach.** B.D. Hames & S.L. Higgins (Eds.) IRL Press. U.S.A.
- Hardin, J.H., Spicer, S.S. and Greene, W.B., 1969. The paranucleolar structure, accessory body of Cajal, sex chromatin, and related structures in nuclei of rat trigeminal neurons: a cytochemical and ultrastructural study. **Anat. Rec.** **164**:403-432.
- Hernandez-Verdun, D., 1991. The nucleolus today. **J. Cell Sci.** **99**: 465-471.
- Hügler, B., Hazan, R., Scheer, U. and Franke, W.W., 1985. Localization of ribosomal protein S1 in the granular component of the interphase nucleolus and its distribution during mitosis. **J. Cell Biol.**, **100**:873-886.
- Jiménez García, L.F., 1988. **El nucléolo: Relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas.** TESIS DOCTORAL. Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, U.N.A.M.
- Jiménez-García, L.F., Rothblum, L.I., Busch, H. and Ochs, R.L., 1989. Nucleologenesis: use of non-isotopic *in situ* hybridization and immunocytochemistry to compare the localizatiion of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. **Biol. Cell** **66**: 239-246.

- Jiménez-García, L.F., and Spector, D.L., 1993. In vivo evidence that transcription and pre-mRNA processing are coordinated by a recruiting mechanism. **Cell** **73**:47-59
- Jiménez-García, L.F., Green, S.R., Mathews, M.B. and Spector, D.L. 1993. Organization of the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI and virus-associated VA RNAI in adenovirus-2-infected HeLa cells. **J. Cell Sci.** **106**: 11-22.
- John, H.L., Birnstiel, M.L. and Jones, K.W., 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. **Nature**, **223**:912-913
- Jordan, E.G., 1991. Interpreting nucleolar structure: where are the transcribing genes?. **Journal of Cell Science** **98**:437-442.
- Kass, S., Tyc, K., Steitz, J., Sollner-Webb, B., 1990. The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the 1st step of preribosomal RNA processing. **Cell** **60**:897-908.
- Lafarga, M., Hervás, J.P., Santa-Cruz, M.C., Villegas, J. and Crespo, D., 1983. The "accessory body" of Cajal in the neuronal nucleus. A light and electron microscopical approach. **Anat. Embryol.** **166**:19-30.
- Leverette, R.D., Andrews, M.T. and Maxwell, E.S. 1992. Mouse U14 snRNA is a processed intron of the cognate hsc70 heat shock pre-messenger RNA. **Cell** **71**: 1215-1221.

- Li, L.L. and Yeh, N.H., 1992. Cell cycle-dependent migration of the DNA-binding protein Ku80 into nucleoli. **Expl Cell Res**, **199**:262-268.
- Liu, J. and Maxwell, E.S.1990. Mouse U14 snRNA is encoded in an intron of the mouse cognate hsc70 heat shock gene. **Nucl. Acids Res.** **18**: 6565-6571.
- Maridor, G. and Nigg., E.A., 1990. CDNA Sequences of Chicken Nucleolin C23 and No38/B23. 2 Major Nucleolar Proteins. **Nucleic Acids Res.**, **18**: 1286.
- Masson, C., Andre, C., Arnoult, J., Geraud, G. and Henandez-Verdun, D., 1990. A 116,000 Mr nucleolar antigen specific for the dense fibrillar component of the nucleoli. **J. Cell Sci.** **95**: 371-381.
- Matsui, S., Fuke, M., Chai, L., Sandberg, A.A. and Ellassouli, S., 1986. N-Band proteins of nucleolar organizers. Chromosomal mapping, subnucleolar localization and rDNA-binding. **Chromosoma** **93**: 231-242.
- Maxwell, E.S. and Fournier, M.J. 1995. The small nucleolar RNAs. **Ann. Rev. Biochem.** **35**: 897-934.
- 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.

- Medina, F. J., 1989 The nucleolus, in the spotlight. Meeting report. Meeting on the nucleolus, toledo (Spain), December 15-18, 1988. **Eur. J. Cell Biol.**, **50**: 244-246.
- Monneron, A. and Bernhard, W., 1969. Fine structural organization of the interphase cell nucleus of some mammalian cells. **J. Ultrastruct. Res.** **27**:266-268.
- Montgomery, T.H. (1898). Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus. **J. Morphol.** **15**: 265-564.
- Morcillo, G., de la Torre, C. and Giménez-Martín, G. 1976. Nucleolar transcription during plant mitosis. **Exp. Cell Res.** **102**: 311-316.
- Moreno Díaz de la Espina, S., Risueño, M.C. and Medina, F.J., 1982. Ultrastructural, cytochemical and autoradiographic characterization of coiled bodies in the plant cell nucleus. **Biol. Cell** **44**:229-238.
- Muller, M.T., Pjund, W.P., Mehta, V.B. and Trask, D.K., 1985. Eukaryotic Type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. **EMBO J.**, **4**: 1237-1243.
- Ochs, R. L., Lischwe, M.A., O'Leary, P. and Busch, H., 1985a. Localization of nucleolar phosphoproteins B 23 and C 23 during mitosis. **Biol. Cell** **54**:123134.

- Ochs, R.L., Lischwe, M.A., Shen, E. Carrol, R.E., and Busch, H., 1985b. Nucleogenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. **Chromosoma**, **92**:330-336.
- 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 desoxyribonucleic acid. **Biochemistry**, **22**: 3345-3351.
- 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.
- Peculis, B.A. and Gall, J.G., 1992. Localization of the nucleolar protein-NO38 in amphibian oocytes. **J. Cell Biol.**, **116**:1-14
- Pérez Ramos, J. 1994. **Localización por hibridación *in situ* de colagenasa y TIMP en el granuloma inducido por carragenina.** Tesis Maestría en Ciencias (Biología), Fac. de Ciencias U.N.A.M.
- Perry, R.P., 1962. The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **48**: 2179-2186
- Pfeifle, J., Boller, K. and Anderer, F.A., 1986. Phosphoprotein pp135 is an essential component of the nucleolus organizer region (NOR). **Expl Cell Res.**, **162**:11-22.

- Potter, S., Durovic, P. and Dennis, P.P. 1995. Ribosomal RNA precursor processing by a eukaryotic U3 small nucleolar RNA-like molecule in an Archaeon. **Science** **268**: 1056-1060.
- Prestayko, A.W., Tonato, M. and Busch, H., 1970. Low molecular weight RNA associated with 28S nucleolar RNA. **J. Mol. Biol.**, **47**:505-515.
- Puvion, E. and Moyne G., 1981. In situ Localization of RNA Structures. En: **The Cell Nucleus** Vol. VIII. Busch, H. Ed. Academic Press. New York, U.S.A.
- Puvion-Dutilleul, F., Bachellerie, J.P. and Puvion, E., 1991a. Nucleolar organization of HeLa cells as studied by in situ hybridization. **Chromosoma** **100**:395-409.
- Puvion-Dutilleul, F., Mazan, S., Nicoloso, M., Christensen, M.E., and Bachellerie, J.P., 1991b. Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution in situ hybridization. **Eur. J. Cell Biol.** **56**: 178-186.
- Puvion-Dutilleul, F., Mazan, S., Nicoloso, M., Pichard, E., Bachellerie, J.P. and Puvion, E., 1992. Alterations of nucleolar ultrastructural and ribosome biogenesis by actinomycin D. Implication for U3snRNP function. **Eur. J. Cell Biol.** **58**: 149-162.
- Ramón y Cajal., S., 1903. Un sencillo método de coloración del retículo protoplásmico y sus efectos en los diversos órganos nerviosos. **Trab. Lab. Invest. Biol.** **2**:129-221.

- Raska, I., Andrade, L.E.C., Ochs, R.L., Chan, E.K.L., Roose, G. and Tan, E.M., 1991. Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. **Exp. Cell Res.** **195**:27-37.
- Raska, I. and Dundr, M., 1993 Compartmentalization of the cell nucleus: case of the nucleolus. En: **Chromosomes Today**, Sunner, A.T. and Chandley, A.C. (eds). Chapman & Hall, London, pp. 101-119.
- Raska, I., Reimer, G., Jarnik, M., Kostrouch, Z. and Raska, Jr. K., 1989. Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar components?. **Biol. Cell**, **65**: 79-82
- Reddy, R., Henning, D. and Busch, H., 1979. Nucleotide sequence of nucleolar U3B RNA. **J. Biol. Chem.**, **254**:11097-11105
- Rigby, P.W.J., Diekmann, M., Rhodes, C., and Berg, P., 1977. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. **J. Mol. Biol.**, **113**: 237-251.
- Risueño, M.C. and Medina F.J., 1986. The nucleolar structure in plant cells. **Cell. Biol. Rev.** **7**: 1-140.
- Risueño, M.C. and Testillano, P.S., 1994. Cytochemistry and Immunocytochemistry of Nucleolar Chromatin in Plants. **Micron**, **25**(4): 331-360
- Rothblum, L.I., Parker, D.L. and Cassidy, B., 1982. Isolation and characterization of rat ribosomal DNA clones. **Gene** **17**: 75-77.

- Scheer, U. and Benavente, R., 1990. Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. **BioEssays** 12: 14-21.
- Scheer, U. and Rose, K.M., 1984. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 81:1431-1435.
- Seite, R., Pebusque, M.J. and Vio-Cigna, M., 1982. Argyrophillic proteins on coiled bodies in sympathetic neurons identified by Ag-NOR procedure. **Biol. Cell** 46:97-100.
- Sharp, P.A. 1994. Split genes and RNA splicing. **Cell** 77: 805-815.
- Sipos, K. and Olson, M.O.J., 1991. Nucleolin propotes secondary structure in ribosomal RNA. **Biochem. biophys. Res. Commun.**, 177:673-678.
- Sommerville, J., 1981. Immunolocalization and Structural Organization of Nascent RNP. en: **The Cell Nucleus** Vol. VIII, Busch, H., Ed. Academic Press, New York, U.S.A.
- Southern, E. M., 1985. INTRODUCTION, en: **Nucleic acid hybridization. A practical approach.** B.D. Hames & S.J. Higgins (Eds.). IRL Press. U.S.A.

- Spector, D.L., Lark, G., and Huang, S., 1992. Differences in snRNP localization between transformed and non transformed cells. **Mol. Biol. Cell.** **3**:555-569.
- Srivastava, M., McBride, O.W., Fleming, P.J., Pollard, H. and Burns, A.L., 1990. Genomic organization and chromosomal localization of the human nucleolin gene. **J. biol. Chem.**, **265**:14922-14931.
- Stevens, B., 1965. The fine structure of the nucleolus during mitosis in the grasshopper neuroblast cell. **J. Cell. Biol.** **24**: 349-368
- 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**:362-365.
- Thiry, M. and Goessens, G., 1992. Where, within the nucleolus, are the rDNA genes located?. **Exp. Cell Res.****200**:1-4.
- Thiry, M. and Thiry-Blaise, L., 1989. In situ hybridization at the electron microscope level: an improved method for precise localization of ribosomal DNA and RNA. **Eur. J. Cell. Biol.** **50**:235-243.
- Volkers, H.H., van de Brink W.J., Leunissen, J.L.M., De Brnbander, M., Zijlmans, H.J.M.A.A., Houtnoff, H.J. & van den Berg, F.F., 1989. DNA *in situ* hybridization: towards a routine technique - New developments in detection methods using AuroProbe One. **Aurofile No. 2** (Abril).

- Wachtler, F., Mosgoller, W., Schwarzacher, H.G., 1990. Electron microscopic in situ hybridization and autoradiography: localization and transcription of rDNA in human lymphocyte nucleoli. **Expl. Cell Res.**, **187**(2):346-348.
- Wachtler, F., Schoffer, C., Mosgoller, W., Weipoltshammer, D., Schwarzacher, H.G., Guichaoua, M., Hartung, M., Stahl, A., Berg,-Lefranc, J.L., González, I. and Sylvester, J., 1992. Human ribosomal RNA gene repeats are localized in the dense fibrillar component of nucleoli: light and electron microscopic in situ hybridization in human Sertoli cells. **Exp. Cell Res.** **198**:135-143.
- Wachtler, F. and Stahl, A. 1993. The nucleolus: a structural and functional interpretation. **Micron**, **24**: 473-505.
- Williams, M.A., Kleinschmidt, J.A., Krohne, G. and Franke, W., 1982. Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of *Xenopus leavis* oocytes identified by gel electrophoresis. **Expl. Cell Res.**, **137**:341-351.
- Xie, W.Q. and Rothblum, L.I., 1991. Rapid small scale RNA isolation from tissue culture cells. **Biotechniques** **12**: 1266-1275.
- Young, B.D. and Anderson, M.L.M., 1985. Quantitative analysis of solution hybridisation. En: **Nucleic Acid Hybridisation. A practical approach**, Hames, B.D. and Higgings, S.J. (Eds). IRL Press Lim. Oxford. pp. 47-72.

Zini, N., Martelli, A.M. Sabatelli, P., Santi, S., Negri, Ricotti, G.C.B.A. and Maraldi, N.M., 1992. The 180-kDa isoform of topoisomerase-II is localized in the nucleolus and belongs to the structural elements. **Expl. Cell Res.**, 200:460-466