

00346

9  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
División de Estudios de Posgrado

ANALISIS DE LA DISTRIBUCION DEL RNA  
INTRANUCLEAR Y DEL U14 snRNA MEDI-  
ANTE HIBRIDACION *IN SITU*  
FLUORESCENTE Y ULTRAESTRUCTURAL

T E S I S  
Que para obtener el grado académico de  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)

p r e s e n t a  
BIOL. GABRIEL LOPEZ VELAZQUEZ

Director de Tesis: DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA

México, D. F.

1999

27A561

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 y mis hermanas.  
A Kayani y a Silvia.*

*Para hacer algo hay que querer mucho.  
Para querer apasionadamente hay que creer con locura.*  
\* Regis Debray, hablando del Che

## Agradecimientos:

A todos mis sinodales que aportaron valiosas correcciones al trabajo escrito.

Al Instituto Nacional de Pediatría y especialmente a las doctoras Alessandra Carnevale y Sara Frías por su apoyo para culminar con este trabajo.

Al laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias y a todo su personal que han sido un fuerte pilar para mi formación científica.

Al personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica del INP, Angélica, Rosa y Gloria, quienes me apoyaron en su momento y con quienes estoy especialmente agradecido.

A la Dra. Lorena Orozco y su personal del laboratorio de Biología Molecular del INP, donde aprendí a extraer DNA y la técnica de PCR.

Muy especialmente a mi amigo y colega Miguel Ángel Alcántara (el Dr. Alcántara) por su apoyo incondicional y su sincera amistad.

A la Dra. Irma Villalpando y al personal de su laboratorio en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, donde aprendí a desarrollar el northern blot.

Muy especialmente a mi amigo Horacio Villafán, que con su dedicación y tenacidad me enseñó a ser estricto en mis experimentos y en mi trabajo.

A la Dra. Annie Pardo y el personal del laboratorio de Bioquímica de la Fac. de Ciencias de la UNAM, donde desarrollé la mayor parte de los cultivos celulares y la extracción de RNA.

Muy especialmente a mi amiga y maestra Remedios Ramírez, por compartir conmigo sus valiosos conocimientos y guiarme por buen camino en los momentos difíciles.

A Daría e Isabel, que siempre me apoyaron cuando tuve alguna dificultad para desarrollar mi trabajo en su laboratorio.

A Pepe por ayudarme con la densitometría.

A la Dra. Guadalupe Zavala, que me enseñó las técnicas de cultivo de células y cuyas enseñanzas he apreciado en mucho a lo largo de mi vida académica.

Al Dr. Antonio Lazcano, por sus valiosísimas enseñanzas y por su amistad.

A Arturo Becerra, por ayudarme a resolver todos mis llos filogenéticos y por su apreciable amistad.

A la Dra. Lourdes Segura, por sus valiosas observaciones a mi trabajo, por su disposición a ayudarme y por su gran amistad.

A todos mis amigos que siempre me impulsaron en los momentos difíciles, Ariel, Jesús, Rosario, Rocío, y Silvia.

Muy especialmente a la persona que ha sufrido y gozado como yo y junto a mí los fracasos y triunfos. A mi mejor amiga y compañera, gracias Chiviz.

A mi amigo y maestro, de quien he aprendido desde lo sencillo hasta lo complejo. A un ser humano excepcional y que admiro como científico y como persona, a mi maestro el Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Este trabajo de tesis se llevó a cabo en instalaciones de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto Nacional de Pediatría. Se contó con el apoyo de una beca para estudios de postgrado de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM.

## Indice

	página
<b>I Resumen</b>	4
<b>II Introducción</b>	5
<b>II.1 El RNA es un polímero de Ribonucleótidos</b>	5
<b>II.2 Existen diferentes clases de RNA</b>	6
<b>II.3 El mRNA es procesado en sus extremos 5' y 3'</b>	7
<b>II.4 Splicing</b>	9
<b>II.5 Los componentes moleculares del splicing se conjuntan en el Spliceosoma</b>	10
<b>II.6 El ciclo del spliceosoma</b>	12
<b>II.7 Los rRNAs se forman a partir del gen rDNA</b>	15
<b>II.8 El pre-rRNA es procesado para ser funcional</b>	16
<b>II.9 Los snoRNAs están involucrados en el procesamiento de los pre-rRNAs</b>	16
<b>II.10 Existen dos familias de snoRNAs</b>	19
<b>II.11 SnoRNAs intrónicos</b>	21
<b>II.12 El U14 snRNA fue el primer snoRNA intrónico en describirse</b>	22
<b>II.13 El núcleo celular se encuentra compartimentalizado en dominios funcionales</b>	23
<b>II.14 Estructuras ribonucleoproteicas</b>	24
<b>II.14.1 Fibras pericromatinianas</b>	24
<b>II.14.2 Gránulos pericromatinianos</b>	25
<b>II.14.3 Gránulos intercromatinianos</b>	26
<b>II.14.4 Cuerpos espiralados</b>	27
<b>II.14.5 Nucléolo</b>	29

<b>III Objetivos</b>	33
<b>IV Material y Métodos</b>	34
<b>IV.1 Células</b>	34
<b>IV.2 Microscopía electrónica</b>	34
<b>IV.3 Extracción de DNA genómico</b>	35
<b>IV.4 PCR</b>	35
<b>IV.5 Ensayo de restricción</b>	36
<b>IV.6 Extracción de RNA total</b>	37
<b>IV.7 Marcado de la sonda para Northern blot</b>	39
<b>IV.8 Northern blot</b>	39
<b>IV.9 Densitometría</b>	40
<b>IV.10 Marcado de la sonda para hibridación <i>in situ</i></b>	41
<b>IV.11 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente y ultraestructural</b>	41
<b>IV.12 Análisis de secuencias Nucleotídicas</b>	44
<b>V Resultados</b>	45
<b>V.1 Extracción de DNA genómico</b>	45
<b>V.2 Sonda de gDNA</b>	45
<b>V.3 Localización de RNA total</b>	45
<b>V.4 Amplificación de sonda para el U14 snRNA mediante PCR.</b>	50
<b>V.5 Detección del snoRNA U14 <i>in vitro</i>.</b>	52
<b>V.6 Densitometría.</b>	52
<b>V.7 Cálculo del área bajo la curva</b>	53
<b>V.8 Detección del U14 snRNA <i>in situ</i>.</b>	54

<b>V.9 Análisis filogenético de la secuencia del snoRNA U14.</b>	56
<b>VI Discusión y conclusiones</b>	60
<b>VI.1 El uso de sondas de gDNA permite localizar estructuras nucleares con RNA</b>	60
<b>VI.2 La hibridación <i>in situ</i> ultraestructural con sondas de gDNA puede usarse para analizar el metabolismo de los RNAs intranucleares</b>	62
<b>VI.3 La hibridación <i>in situ</i> ultraestructural localiza de manera directa ácidos nucleicos en partículas nucleares</b>	65
<b>VI.4 El U14 snRNA está vinculado al metabolismo del mRNA y del rRNA</b>	67
<b>VI.5 El U14 snRNA se encuentra en partículas que morfológicamente corresponden a los cuerpos espiralados (CBs)</b>	68
<b>VI.6 La sonda del U14 snRNA generada por PCR localiza la expresión del U14 en células en cultivo y tejidos.</b>	69
<b>VI.7 El análisis filogenético de la molécula del U14 sugiere que la aparición de diferentes copia del U14 en vertebrados y plantas se dio por eventos de duplicación reciente de genes.</b>	71
<b>VII Referencias</b>	73
<b>Lista de abreviaturas</b>	82



## Resumen

De manera general, se conoce la composición molecular y la dinámica de la organización funcional del núcleo celular en mamíferos. Sin embargo, aún falta evidencia de la función de estructuras como los cuerpos espiralados (coiled bodies, CBs), los gránulos pericromatinianos (GPCs) y el nucléolo. En este trabajo, se describe el desarrollo de una técnica para localizar RNA mediante el uso de sondas biotinadas de DNA genómico (gDNA) e hibridación *in situ* ultraestructural. El tamaño de la sonda se controla con el tiempo de digestión en la reacción de marcado por *nick translation*. Con digestiones de menor tiempo, las sondas hibridaron preferentemente en las regiones fibrilares, mientras que con tiempos mayores se marcaron también componentes granulares, incluyendo los GPCs. Proponemos que este método permite analizar el procesamiento de los RNAs intranucleares. Las zonas fibrilares representarían sitios con RNA en estados tempranos de maduración, y las zonas granulares sitios más avanzados de procesamiento. Además, analizamos la organización del compartimento nucleolar. Para ello, se estudió un RNA nucleolar codificado en intrones (U14 snRNA) en diferentes especies y tejidos, usando sondas generadas por PCR. Por densitometría se detectó mayor expresión en testículo de embrión de ratón. Por hibridación *in situ* fluorescente en células HeLa, el U14 snRNA se observó en los nucléolos y en partículas nucleares morfológicamente equivalentes a CBs. Por microscopía electrónica se localizó principalmente en el componente fibrilar denso del nucléolo (DFC). Un análisis filogenético de las secuencias de U14 snRNA publicadas en GenBank muestra un comportamiento parecido a moléculas como el rRNA. El análisis del árbol filogenético generado por el método de parsimonia, sugiere que las diferentes copias de U14 snRNA surgieron como eventos de duplicación reciente de genes.

## II. Introducción

### II.1 El RNA es un polímero de ribonucleótidos

En la década de los años 1920, el medio científico se percató de la existencia de dos tipos de ácidos nucleicos, el ácido desoxiribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA). Durante algún tiempo se pensó que el DNA era propio de los animales y el RNA de las plantas, idea que se abandonó en los años 30's cuando se acumularon pruebas de que tanto el DNA como el RNA son universales en los seres vivos (en Freeland, 1981).

El RNA es un polímero no ramificado de ribonucleósidos monofosfatados, los cuales se unen entre sí por enlaces fosfodiéster. El conjunto de una base nitrogenada, una pentosa y un grupo fosfato, es denominado nucleótido, y los nucleótidos son los monómeros que conforman al RNA (y al DNA). Las principales diferencias entre DNA y RNA son 2 (fig.1); 1) la presencia en el RNA de un grupo hidroxilo (-OH) unido al carbono 2 (posición 2') del azúcar ribosa. La ausencia de este -OH en el DNA es la esencia del nombre de su azúcar desoxiribosa; y 2) la ausencia de la base timina en el RNA, sustituida por una pirimidina muy relacionada, el uracilo (en Farrell, 1993).

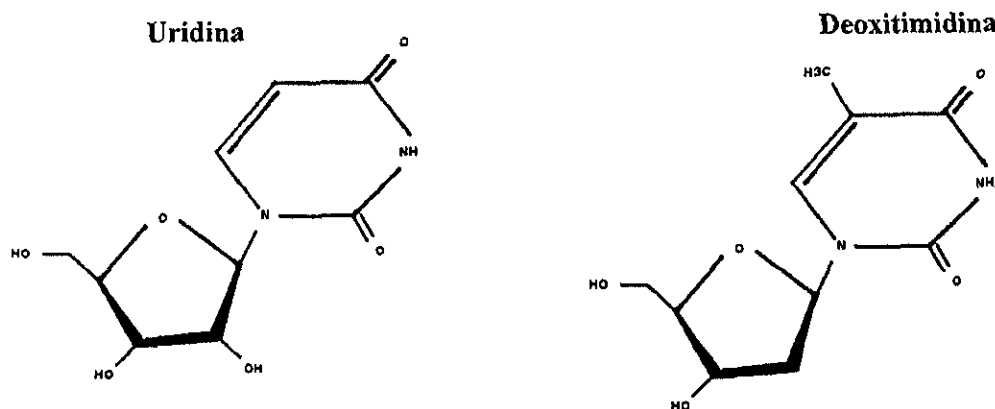


Figura 1: Las dos principales diferencias entre el DNA y RNA se esquematizan en la uridina y la deoxitimidina

El RNA producto de la transcripción puede ser usado por la célula de manera directa o en forma de RNA mensajero (mRNA), el cual es traducido a proteínas (en Kendrew y Lawrence, 1994). El RNA es único entre las macromoléculas biológicas ya que puede codificar información genética, sirve como un componente estructural abundante en la célula y también posee actividad catalítica. Aunado a esto, la proporción total de nucleótidos que son incorporados al RNA durante la interfase es 20 veces mayor que los incorporados al DNA durante la fase S del ciclo celular (en Alberts *et. al.*, 1994).

## II.2 Existen diferentes clases de RNA

En todos los seres vivos que se han descrito hasta el momento, existen al menos tres distintos grupos de moléculas de RNA reportados: los RNA ribosomales (rRNAs), RNA de transferencia (tRNA) y los mRNA. Como se muestra en la tabla 1, el conocimiento de la variedad de estas moléculas ha ido creciendo conforme se avanza en su estudio.

RNA	Diferentes tipos presentes en células	Longitud aproximada en nucleótidos
tRNA	40-60	75-90
5S rRNA	1-2	120
5.8S rRNA*	1	155
Subunidad pequeña rRNA	1	1600-1900
Subunidad grande rRNA	1	3200-50000
mRNA	Miles	variable
hnRNA*	Miles	variable
scRNA	Decenas	90-330
snRNA*	Decenas	58-220
snoRNA*	Decenas	80-340

Tabla 1. Diferentes clases de RNAs descritos en organismos vivos. \* presentes sólo en eucariontes. (Modificado de Berg y Singer, 1992).

En organismos eucariontes se han descrito tres enzimas oligoméricas homólogas que sintetizan RNA a partir de un molde de DNA, denominadas RNA polimerasas (RNA pol) (en Roeder, 1996). La RNA pol I se encarga de transcribir los genes del rRNA. La RNA pol II sintetiza los precursores de los mRNA, los snRNAs (RNAs pequeños nucleares) U1 a U5 y los snRNAs intrónicos, también conocidos como snoRNAs (RNAs pequeños nucleolares) (Solner-Webb, 1993; en Roeder, 1996). La RNA pol III transcribe los tRNAs, el rRNA 5S y otros RNAs pequeños como el U6 y el 7SLRNA (en Alberts, *et al.*, 1994).

### II.3 El mRNA es procesado en sus extremos 5' y 3'

En casi todos los mRNAs de eucariontes, su extremo 5' presenta una estructura 'cap' del tipo  $m^7GpppN^m pN^m p$  (fig. 2)(Shatkin, 1976; Banerjee, 1980).

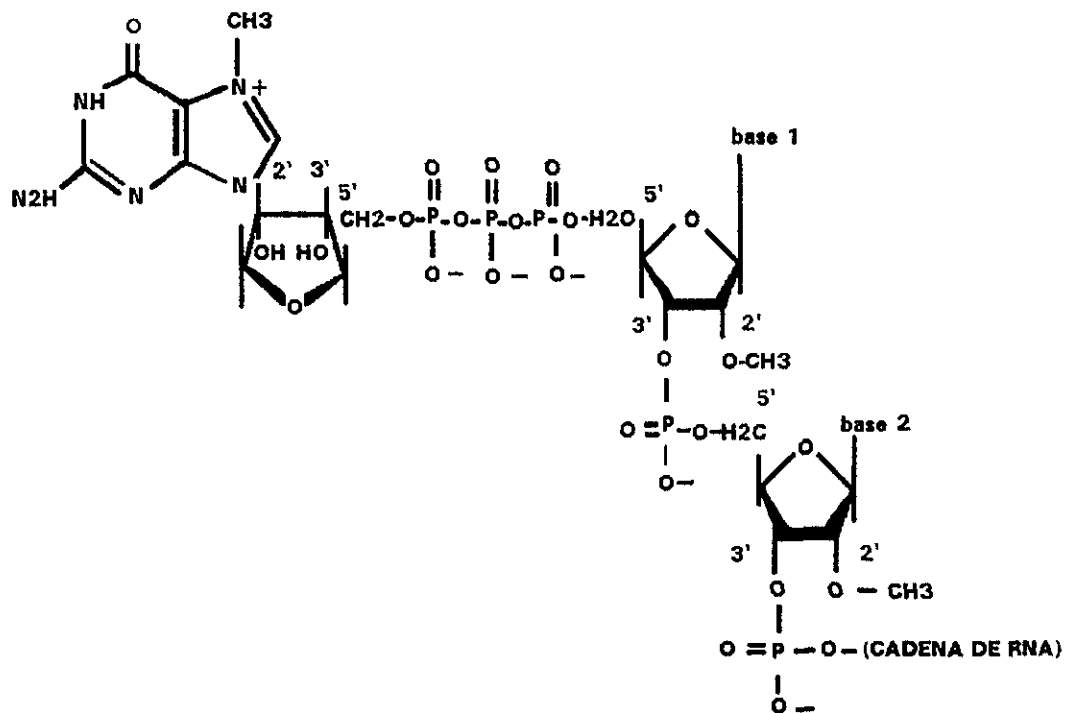


Figura 2: Estructura cap tipo  $m^7GpppN^m pN^m p$  (Cap2).

Los caps se adicionan a los pre-mRNAs en el núcleo celular durante las fases iniciales de la transcripción y antes de que otros eventos de procesamiento tomen lugar, incluyendo la metilación, la poliadenilación, y el *splicing*. Con la sola excepción (conocida) de un mRNA del virus Sindbis (HsuChen y Dubin, 1976), todos los mRNAs celulares y virales examinados contienen un solo grupo metilo en el residuo de guanina (G) terminal, mientras que los nucleótidos adyacentes sufren O-metilación en el carbono 2', la cual puede extenderse de manera variable en la cadena nucleotídica. Esta propiedad es la base de la siguiente nomenclatura:  $m^7GpppN$  (Cap0),  $m^7GpppN^m$  (Cap1) y  $m^7GpppN^mpN^m$  (Cap2). Los grupos metilo en Cap0 y Cap1 son adicionados en el núcleo celular, mientras que el metilo adicional de Cap2 es un evento el citoplasmático (en Enright y Sollner-Webb, 1994).

La importancia biológica de esta estructura parece estar basada en el grupo N-7 metilo del extremo 5' terminal, que incrementa la estabilidad del mRNA al protegerlo de la degradación exonucleolítica 5'-3' (Furuichi, *et. al.*, 1977). Incluso la precisión y eficiencia del *splicing* son incrementadas por la presencia de estas modificaciones (Konarska, *et. al.*, 1984), así como también en la exportación hacia citoplasma (Lewis e Izaurralde, 1997).

Por su parte, el extremo 3' terminal se modifica por un proceso en dos pasos:

- 1) El pre-mRNA es cortado endonucleolíticamente en un sitio 3' específico corriente abajo (downstream) de la secuencia codificante; y 2) el fragmento 5' corriente arriba (upstream) es extendido por la adición de aproximadamente 200 residuos de adenina (A) (poliadenilación), mientras que el fragmento downstream es degradado. Ambas reacciones dependen de dos secuencias presentes en el pre-mRNA: la secuencia AAUAAA altamente conservada de 10-30 nt upstream del sitio de corte, y una o varias de aproximadamente 50nt

downstream de este sitio. Estas secuencias en downstream no han sido bien definidas y pueden ser ricas en GU o en U.

## II.4 Splicing

Los genes partidos (split genes), están formados por secuencias alternadas de exones e intrones y fueron descritos por vez primera en adenovirus (Berget y Sharp, 1977; Gelinás, *et. al.*, 1977), pero rápidamente se empezó a demostrar que son una característica común de los genes celulares, especialmente los eucariontes.

Los intrones son aquellas secuencias de los genes que se encuentran copiadas dentro del transcrito primario (pre-mRNA), pero son eliminadas del transcrito maduro (mRNA). El término exón define a las secuencias del pre-mRNA que son incluidas en el mRNA (en Lamond, 1993; en Alberts, *et. al.* 1994). Se piensa que todos los intrones de los pre-mRNAs nucleares son removidos, antes de salir del núcleo, por un mecanismo en dos pasos (transesterificaciones) dependiente de energía (ATP), conocido como *splicing*.

El *splicing* es un paso integral en la expresión genética de las células eucariontes, debido a que la remoción de los intrones es esencial para producir mRNAs funcionales. Además se piensa que puede estar vinculado a la regulación de la expresión genética (Maniatis, 1991).

El primer paso del *splicing* implica un corte en el sitio de corte 5', el cual produce un exón con un extremo libre 3'-OH terminal (exón 1). El extremo 5' del intrón es unido, mediante un enlace 2'-5' fosfodiéster, a una adenina localizada dentro del mismo intrón (sitio de

empalme o branchpoint). Esto forma una estructura intermedia conocida como lazo (*lariat*), que contiene al intrón junto con el exón 2 unido a su extremo 3'. En el segundo paso el intrón es cortado en el sitio de corte 3' y el exón 1 y 2 se unen por un enlace 3'-5' fosfodiéster (fig.4) (en Moore, *et. al.*, 1993; en Lamond, 1993).

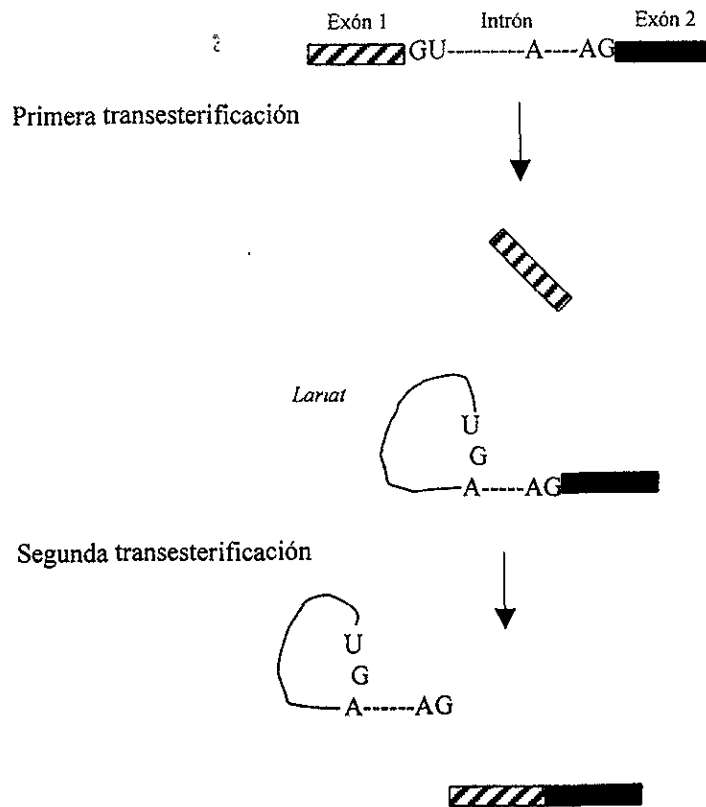


Figura 4: El proceso de *splicing* es una doble transesterificación que corta los intrones y une los exones.

## II.5 Los componentes moleculares del splicing se conjuntan en el spliceosoma

El spliceosoma, como el ribosoma, está compuesto por subunidades de RNA-proteínas (ribonucleoproteínas) llamadas partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares (small nuclear ribonucleoproteins ó snRNPs ó “snurps” ), denominadas U1, U2 y [U4/U6.U5] (Lührmann, *et. al.*, 1990; Moore, *et. al.*, 1993; Lamond, 1993). Antes de que la catálisis del

*splicing* se desarrolle, las snRNPs, junto con factores de *splicing* no-snRNPs, se ensamblan en el pre-mRNA para formar el spliceosoma. Se genera un spliceosoma por separado en cada intrón del pre-mRNA (Lamond, 1993) y se sabe que gran parte del *splicing* que realiza la célula es cotranscripcional (Baurén y Wieslander, 1994). Ahora se sabe también que esto es debido a que los factores de maduración del pre-mRNA son reclutados hacia los sitios de transcripción activa (Jiménez-García y Spector, 1993).

Cada subunidad de snRNP del spliceosoma contiene uno o más snRNAs y un grupo de proteínas snRNP. Un grupo de proteínas llamadas "Sm" o proteínas "core", forma un centro común en cada partícula snRNP. Este centro está compuesto por ocho polipéptidos pequeños denominados B, B', D1, D2, D3, E, F y G, los cuales pesan entre 9 y 29kDa. Estos polipéptidos interactúan con la secuencia consenso 5'-PuA(U)<sub>n</sub>GPu-3', presente en los snRNAs U1, U2, U4 y U5 (en Lamond, 1993).

La composición proteica del spliceosoma cambia durante el curso de su formación. Al menos 20 de las proteínas encontradas en los complejos de *splicing* no corresponden a los factores mencionados previamente. Estos factores han sido llamados SAPs (Spliceosomal Associated Proteins), y están incluidas varias hnRNPs. De los factores de *splicing* no-snRNP, sólo el U2AF, el ASF/SF2 y el SC35 han sido clonados y se ha demostrado *in vitro* que son esenciales para el *splicing* (Krainer, *et. al.*, 1991; Ge, *et. al.*, 1991; Fu y Maniatis, 1992a; Zamore, *et. al.*, 1992). Estas proteínas comparten uno o varios motivos de reconocimiento de RNA (RRM), los cuales están involucrados en la unión con los RNAs (Kenan, 1991). Cada uno de ellos también posee una región rica en residuos de serina y arginina llamada motivo Sr.



Las proteínas con motivo Sr pueden jugar un papel importante en la regulación del *splicing* alternativo (Lamond, 1993). Por ejemplo, la concentración de proteínas con motivo Sr ASF/SF2 o SC35 afecta *in vitro* la utilización relativa de los sitios de *splicing* alternativo en el pre-mRNA (Maniatis, 1991; Fu *et. al.*, 1992b). Trabajos recientes muestran que las snRNPs U11/U12 y un conjunto de proteínas (algunas se comparten con el spliceosoma mayor) forman, en metazoarios, lo que se ha denominado spliceosoma menor, el cual procesa cierta clase de intrones raros de pre-mRNAs nucleares (Will, *et. al.*, 1999).

## II.6 El ciclo del spliceosoma

El ciclo del spliceosoma se describió originalmente con base en la cinética de aparición de sus diferentes complejos *in vitro* (en Moore y Sharp, 1993) (Fig. 5). Primero se forma un complejo que tiene como sustrato el pre-mRNA y contiene a la snRNP U1. De la unión de este complejo con el pre-mRNA depende que prosiga el ensamblaje de los demás componentes del spliceosoma (Ruby y Abelson, 1988). La unión de la snRNP U1 implica el apareamiento de bases entre la secuencia del intrón en su extremo 5', en la unión con el exón, y una secuencia complementaria en el extremo 5' terminal del U1 snRNA.

La snRNP U1 promueve la unión estable de la snRNP U2 para formar el complejo A (fig. 5). La unión de la snRNP U2 es dependiente de ATP y de un apareamiento de bases entre el intrón y una secuencia complementaria en el U2 snRNA (Wu y Manley, 1989). Este apareamiento ocurre en el sitio de formación del *lariat* y puede contribuir con la selección del residuo de adenina en el intrón para formar la estructura de empalme. En la unión estable de la snRNP U2 también participa el factor de *splicing* U2AF (Ruskin *et. al.*, 1988) al igual que el SF1 y SF3 (Krämer y Utans, 1991).

En el último paso del ensamblaje del spliceosoma, está involucrada la unión de una snRNP triple, la [U4/U6.U5] (B1 en la fig. 5). Aquí se da un rearrreglo de los apareamientos de bases entre el intrón y los snRNAs de la manera en que a continuación se explica.

El U5 snRNA interactúa con las secuencias 5' y 3' de los exones, la asociación del U1 se desestabiliza, el U5 se une al extremo 5' del intrón y la hélice U4/U6 se desaparea parcialmente resultando en la asociación del U6 con él, formando un complejo U2/U4/U6. Finalmente la snRNP U4 se libera dejando un complejo U2/U6 con el U2 unido al branchpoint y el U6 asociado al extremo 5' del intrón (B2 en la fig. 5). En este paso se promueve la primera transesterificación por el ataque nucleofílico de la G del sitio 5' de *splicing* contra la A del branchpoint (B2 y C1 en fig. 5) (en Moore *et. al.*, 1993).

En la siguiente etapa se lleva a cabo la segunda transesterificación y la unión de los exones (C2, fig. 5). Después es liberado el mRNA y se forma un complejo que retiene al intrón en forma de lazo (I, fig. 5). La liberación del intrón promueve el desensamblaje del complejo del spliceosoma y sus componentes son reutilizados para eventos de maduración posteriores (en Moore *et. al.*, 1993).

De los datos recientes se sabe que existe una gran cantidad de snoRNAs codificados en intrones de mensajeros de otros genes (Maxwell y Fournier, 1995), y los eventos en los que podría vincularse el proceso de liberación de los snoRNAs se esquematiza de manera hipotética en la figura 5. Estos procesos se señalan con flechas punteadas y con los números 1, 2, y 3 para señalar las posibles opciones propuestas (ver Leverrete, *et. al.* 1992).

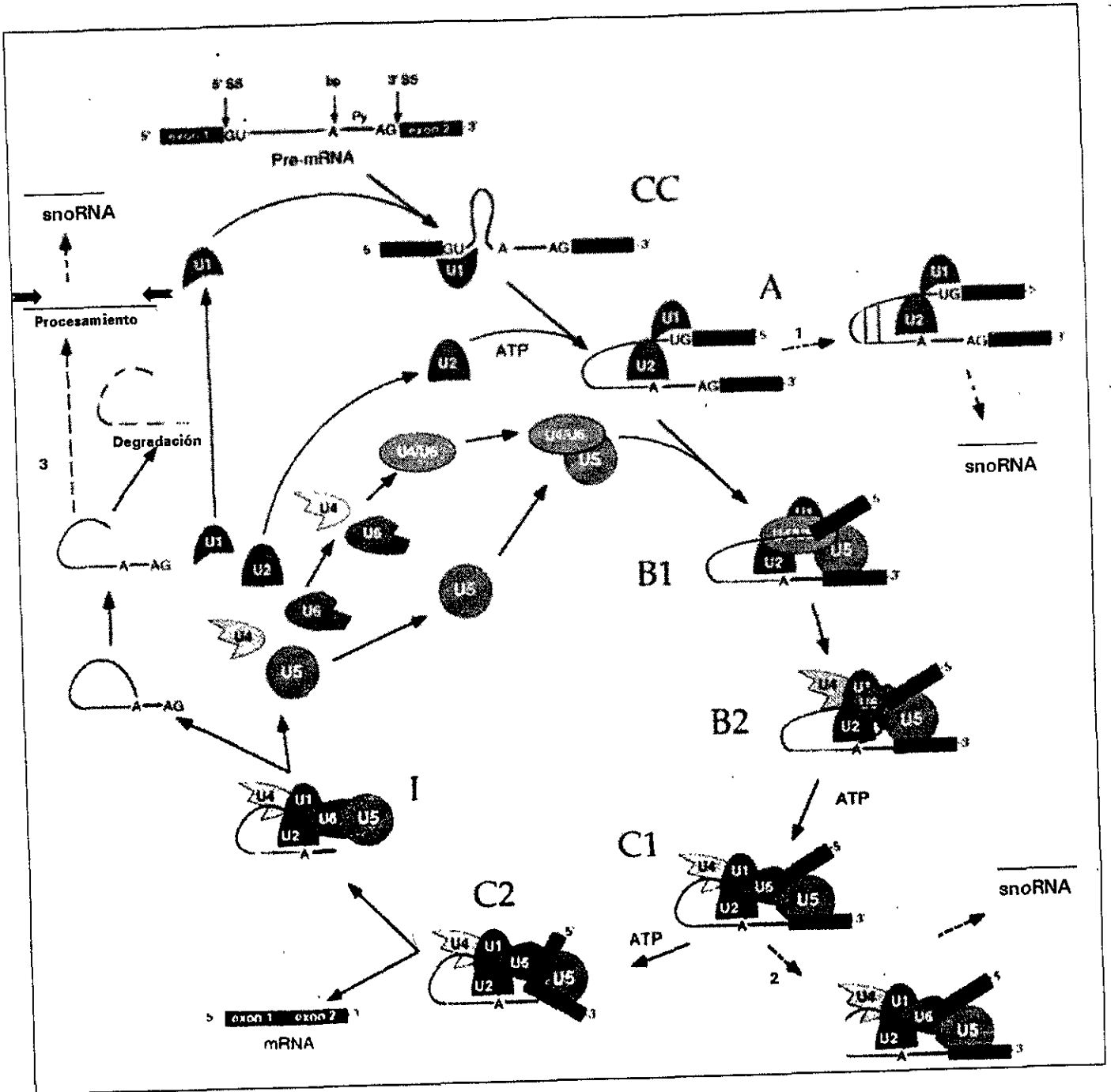


Figura 5: El ciclo del spliceosoma. Se muestran todos los complejos que intervienen en la formación del spliceosoma (CC, A; B1, B2, C1, C2, I) y que han sido aislados bioquímicamente de ensayos *in vitro*. También se esquematizan tres posibles sitios en los que el procesamiento de los intrones puede estar generando la liberación de snoRNAs. En 1 se esquematiza la posibilidad de que el snoRNA sea liberado tomando de intermediarios en el proceso de liberación de los *splicing*. En 2 se sugiere un procesamiento esperado por la presencia de intermediarios en el proceso de liberación de los RNAs. En 3 se propone que no todos los intrones liberados del *splicing* son degradados, sino que pudieran ser procesados por un mecanismo no conocido del todo hasta ahora. Las flechas punteadas representan los procesos hipotéticos 1, 2, y 3. Modificado de Moore, *et. al.*, 1993, Leverete, *et. al.*, 1992; y Brown y Shaw, 1998.

## II.7 Los rRNAs se forman a partir del gen rDNA

Todos los organismos vivos contienen rRNAs formando parte de sus ribosomas, lo cual hace que estas moléculas sean de gran importancia como marcadores filogenéticos (ver Woese, 1987). El gen que contiene las secuencias para rRNA (rDNA) se presenta en muchos organismos como una unidad de transcripción que contiene un inicio de la transcripción que controla la expresión de los diferentes rRNAs que formarán el ribosoma. Aunque de maneras y disposiciones diferentes en el genoma, este arreglo se ha detectado desde bacterias (en Busch y Rothblum, 1982) hasta mamíferos y plantas.

En vertebrados el gen de rDNA contiene la unidad de transcripción con espaciadores externos e internos, más las secuencias para los rRNAs 18S, 5.8S y 28S; esta unidad se encuentra en aproximadamente 200 copias en *tandem* localizadas en el nucléolo, y cada unidad de transcripción está separada por un espaciador no transcrito (NTS) (fig. 6).

La unidad de transcripción en la rata, por ejemplo, consta de un sitio de inicio a la transcripción precedido por una caja TATA. Inmediatamente al sitio de transcripción sigue una secuencia de 4400 pb denominada espaciador transcrito externo 5' (ETS 5'). 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 el ITS 2, con 765 pb, seguido del rRNA 28S con 4802 pb. Finalmente se encuentra el ETS 3' con 500 pb, que precede al siguiente NTS de 24000 pb (en Segura-Valdez, 1996).

## II.8 El pre-rRNA es procesado para ser funcional

El procesamiento del pre-rRNA se ha detectado tanto en procariontes como en eucariontes (en Busch y Rothblum, 1982; Potter, *et. al.*, 1995; Belfort y Weiner, 1997). Este procesamiento incluye la metilación de varias ribosas, la pseudouridinación y finalmente una serie de cortes en la molécula del pre-rRNA. Con respecto a este último punto, se sabe que en vertebrados se produce de la siguiente forma:

Después de formarse el precursor 47S conteniendo todas las formas de rRNAs y los ETSs e ITSs, se forman dos precursores intermediarios, 46S y 45S los cuales pierden parte del ETS 5' y el ETS 3' respectivamente (fig. 6). La eliminación de la parte restante del ETS 5' genera el precursor 41S. Después se libera el 18S dejando un precursor 36S, que al eliminar el ITS1 produce un precursor 32S conteniendo el 5.8S, 28S y el ITS2. En el siguiente paso se generan los cortes que liberan a los tres rRNAs. Como se puede ver en la figura 6, también existe la propuesta de una vía alternativa con precursores 34S, 32S y 20S (en Enright y Sollner-Webb, 1994).

## II.9 Los snoRNAs están involucrados en el procesamiento de los pre-rRNAs

Existen más de 100 snoRNAs (también llamados UsnoRNAs por su alto contenido en uracilos) presentes en organismos eucariontes (Maxwell y Fournier, 1995; Nicoloso, *et. al.*, 1996; Ganot, *et. al.*, 1997). Debido a su purificación a partir de fracciones nucleolares, se sugiere una relación con la biogénesis de los ribosomas. De esta creciente lista de snoRNAs,

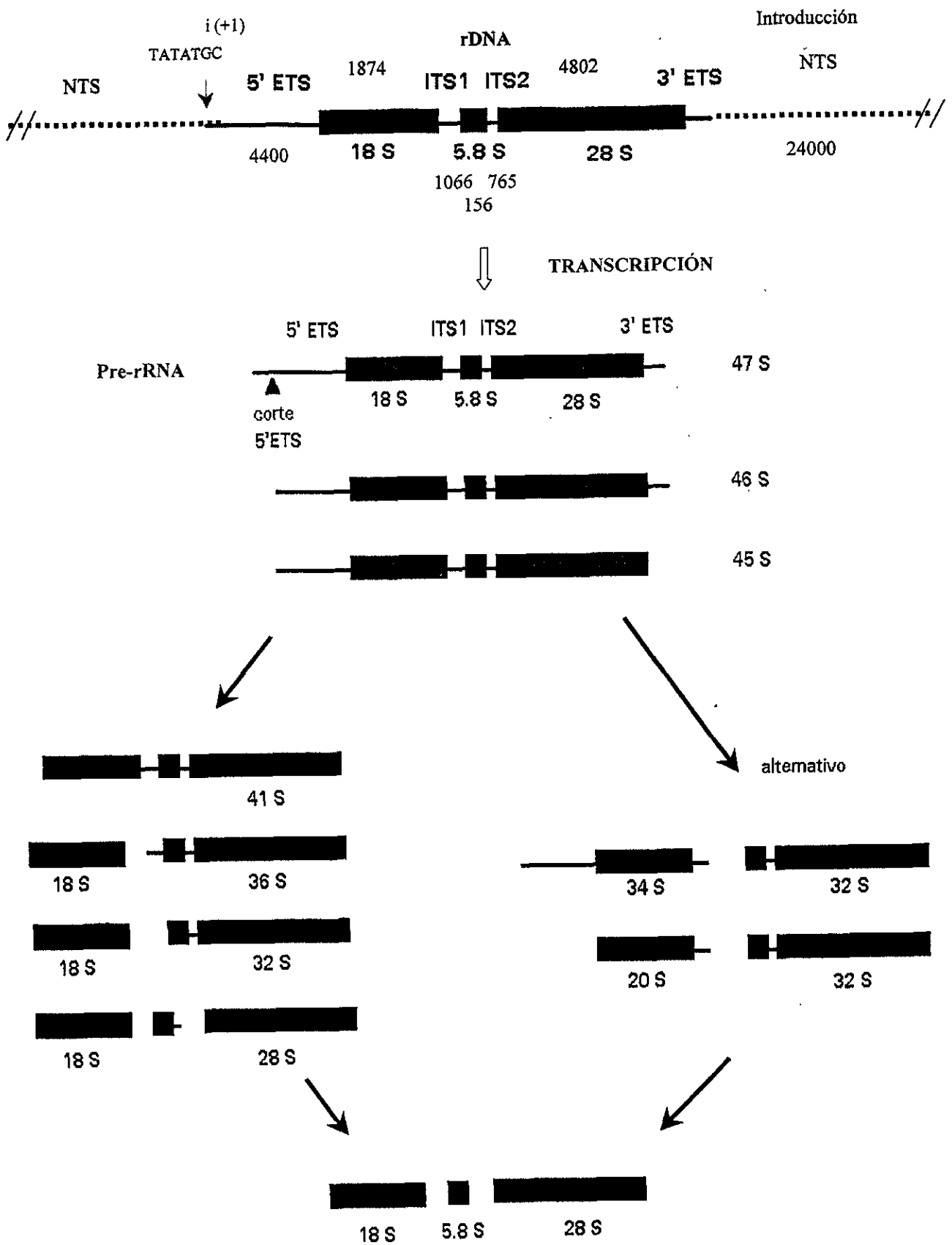


Figura 6: Procesamiento del pre-rRNA en vertebrados. El diagrama representa el procesamiento del pre-mRNA, a partir de la unidad de transcripción de rDNA, utilizando los datos provenientes de rata, ratón, humano, rana y otras especies de vertebrados; los coeficientes de sedimentación de los intermediarios corresponden a ratón. Se presentan dos vías alternativas. (modificado de Jiménez-García, 1988; Enright y Sollner-Webb, 1994)

se ha demostrado su papel esencial en el procesamiento del pre-rRNA por el U3, U14 (conservados en la escala filogenética de eucariontes), el U8 (mamíferos) y el snR30 (levaduras) (en Maxwell y Fournier, 1995). El U3, U14, así como el U17, E3 y posiblemente el U22, se postulan como necesarios para los cortes en el ETS 5'. El U8 y el MRP/7-2 se cree que participan en la liberación del 5.8 S y los precursores de la subunidad grande del rRNA (en Brown y Shaw, 1998). Se ha propuesto también que en conjunto con la fibrilarina y otras proteínas nucleolares, los snoRNAs como el U3 y el U14 podrían formar un complejo molecular del tipo del spliceosoma, denominado procesosoma (en Maxwell y Fournier, 1995), y participar en eventos de corte como se muestra en el siguiente esquema:

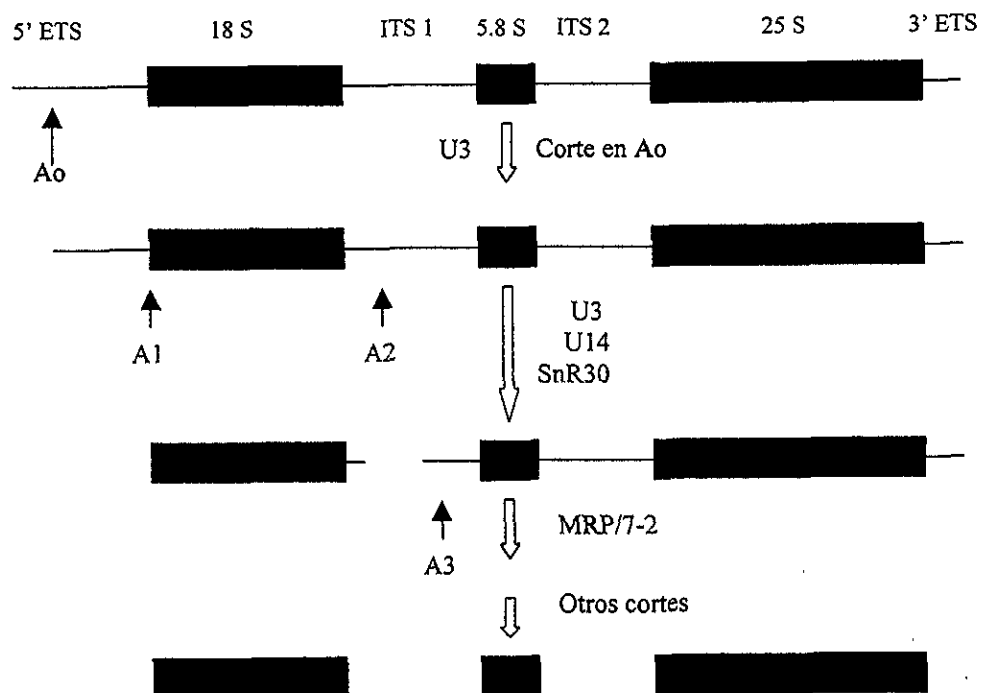


Figura 9: Esquema que propone la intervención de snoRNAs en el corte del pre-rRNA en levaduras (tomado de Liang y Fournier, 1995).

## II.10 Existen dos familias de snoRNAs

Todos los snoRNAs conocidos en levaduras y vertebrados, a excepción del MRP/7-2, pueden agruparse dentro de dos grandes clases (Balakin *et. al.*, 1996). Una clase está definida por la presencia de las cajas conservadas C y D (Maxwell y Fournier, 1995; Nicoloso *et. al.*, 1996) y la otra por el triplete conservado ACA (Ganot, *et. al.*, 1997).

Todos aquellos snoRNAs, tanto de levaduras como vertebrados, que no poseen las cajas C y D (con la excepción del MRP/7-2), contienen un triplete ACA de nucleótidos conservados, localizado tres nucleótidos antes del extremo 3' terminal. Análisis por mutación demostraron que la caja ACA, en conjunto con un segmento en hélice corriente arriba, son necesarias para la acumulación del snoRNA de levadura, snR11 (Balakin, *et. al.*, 1996). Se sabe que los snoRNAs ACA reportados en levaduras, se encuentran asociados a las proteínas nucleolares NOP1 (fibrilarina) y GAR1. A diferencia de la fibrilarina, que se ha reportado asociada con un gran número de snoRNAs, parece ser que GAR1 es específica de los snoRNAs con caja ACA (Balakin, *et. al.*, 1996).

Aunque aún no se ha demostrado del todo, se ha propuesto la intervención de los snoRNAs de la familia ACA en la pseudouridinación del pre-rRNA (Bousquet-Antonelli, *et. al.*, 1997; Ganot, *et. al.*, 1997). Experimentos en levaduras con un gen GAR1 termosensible muestran que la falta de esta proteína bloquea completamente la pseudouridinación del pre-rRNA, mientras que la 2'-O-metilación del pre-rRNA y la pseudouridinación de los tRNAs no fueron afectadas (Ganot, *et. al.*, 1997).



La mayoría de los snoRNAs reportados hasta el momento contienen dos secuencias conservadas llamadas cajas C (UGAUGA) y D (CUGA). Estas cajas siempre aparecen juntas y son necesarias para la estabilidad metabólica de los snoRNAs (Maxwell y Fournier, 1995) y para el procesamiento de los miembros de esta familia codificados en intrones (Caffarelli, *et. al.*, 1996).

Se ha propuesto que los miembros de esta familia funcionan como guías, junto con la fibrilarina, para dirigir las 2'-O- metilaciones del pre-rRNA (Nicoloso, *et. al.*, 1996). De esta manera, el apareamiento de la caja D estaría a 5 nucleótidos del sitio de metilación (fig. 10) (Maden y Hughes, 1997). Aunque hasta el momento no se conoce el papel que juegan las metilaciones post-transcripcionales del pre-rRNA, se sabe que todas las metilaciones se llevan a cabo en regiones conservadas de la secuencia del rRNA (Maden y Hughes, 1997).

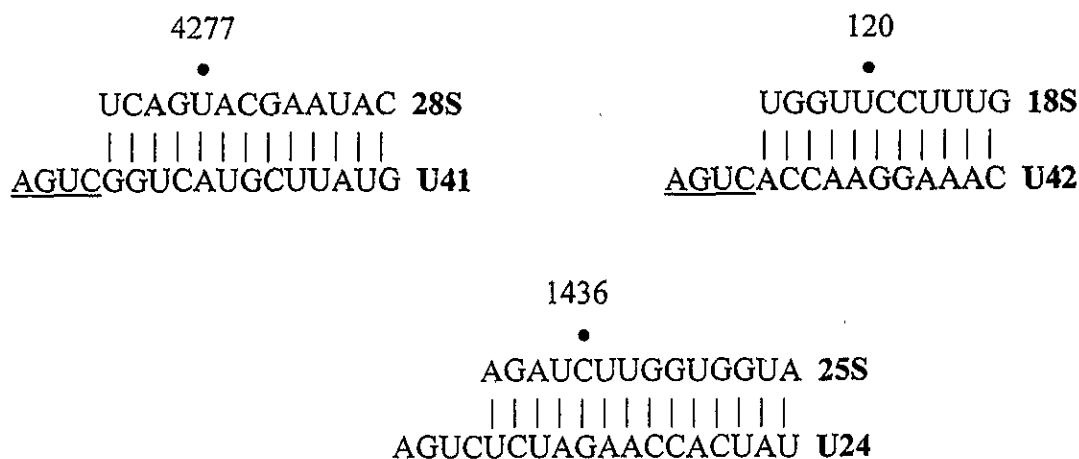


Figura 10: Ejemplos de complementariedad entre snoRNAs y regiones de los rRNAs 28S y 18S de humano (arriba) y 25S de *Saccharomyces cerevisiae* (abajo). En cada caso la caja D se encuentra subrayada y un círculo relleno muestra el nucleótido con la 2'-O-metilación, el cual coincide con la posición número 5. (tomado de Maden y Hughes, 1997).

## II.11 SnoRNAs intrónicos

En vertebrados, la mayoría de los snoRNAs de la familia ACÁ son derivados de intrones de genes de proteínas. También un gran número de los snoRNAs de la familia C/D proviene de intrones. No obstante, tanto en levaduras como en plantas parecen estar codificados en genes independientes. Algunos de los genes hospederos codifican proteínas que están involucradas con el nucléolo o con el ensamblaje de los ribosomas (tabla 2), sugiriendo que la expresión coordinada de las proteínas y los snoRNAs puede ser requerida para la biogénesis de los ribosomas (Maxwell y Fournier, 1995), y de manera más amplia sugiere también un vínculo entre el metabolismo de los mRNAs y de los rRNAs. El extremo de este arreglo en intrones lo constituye el pseudogen UHG, ya que parece existir solo para producir 10 snoRNAs (U22 a U31), dado que su producto final después del splicing no presenta un marco de lectura abierto (Tycowski, *et. al.*, 1996).

SnoRNAs codificados en intrones de genes de proteínas ribosomales o nucleolares		
snoRNA	Gen de proteína ribosomal	Gen de proteína nucleolar
U14	S3	
U15	S3, S1	
U16	L1	
U18	L1	
U20		nucleolina
U21	L5	
U23		nucleolina
U24	L7	
U32	rpL13a	
U33	rpL13a	
U34	rpL13a	
U35	rpL13a	
U36	rpL7a	
U38	rpS8	
U39	rpS8	
U40	rpS8	
U73	S3a	

Tabla 2: snoRNAs intrónicos de genes de proteínas ribosomales o nucleolares. A excepción del U23, todos pertenecen a la familia C/D.

## II.12 El U14 snRNA fue el primer snoRNA intrónico en describirse

El U14 snRNA también conocido como U14 snoRNA ó UsnoRNA, fue descrito por Maxwell y Martin (1986) como un RNA de bajo peso molecular con coeficiente de sedimentación 4.5S. Existen unas 20,000 copias de la molécula por célula (Sollner-Webb, 1993; Maxwell y Fournier, 1995).

En las primeras indagaciones, llamó la atención su propiedad para formar híbridos tanto con mRNAs como con rRNAs. Esta propiedad llamó más la atención cuando se supo que el 4.5 hybRNA de ratón (llamado así en aquel entonces) presentaba secuencias homólogas en otras especies, y además formaba híbridos con el rRNA 18S (Trinh-Rohlik y Maxwell, 1988).

Debido a su presencia en un amplio rango de organismos eucariontes, desde protistas como *Giardia lamblia*, levaduras, anfibios, reptiles, plantas y mamíferos, se le conoce como un snoRNA evolutivamente conservado (Niu, *et. al.*, 1994; en Maxwell y Fournier, 1995)

El análisis de la secuencia del U14, así como el uso de librerías genómicas, mostró que se encontraba codificado en los intrones 5, 6 y 8 del gen para la proteína hsc70 de ratón (fig.19) (Liu y Maxwell, 1990) y de otros vertebrados, así como en los intrones 3 y 4 de la proteína S13 en *Xenopus leavis*, y 3 y 5 de la misma proteína en humano (ver Maxwell y Fournier, 1995). Los estudios realizados microinyectando las regiones amplificadas de cada copia del U14 de la hsc70, mostraron que es resultado de un procesamiento de los intrones, llevado a cabo en el núcleo celular e independientemente del *splicing* (Leverrete, *et. al.*,

1992; Barbhaiya *et. al.* 1994). También en levaduras se postula un procesamiento postranscripcional del U14 (Balakin, *et. al.*, 1994).

Empleando técnicas de RT-PCR con oligos de las regiones conservadas del U14 de ratón y levaduras, fue posible amplificar y caracterizar los genes de U14 en plantas. Estos genes se transcriben como transcritos policistrónicos en papa y maíz (Leader, *et. al.*, 1994). A partir de estos descubrimientos se ha conocido más acerca de la distribución *in situ* del U14 en plantas a nivel de microscopía confocal, encontrándose en el componente fibrilar denso (DFC) del nucléolo y en algunas vesículas nucleolares, de manera muy similar a la distribución del U3. Ni el U3, ni el U14 han sido encontrados en cuerpos espiralados (coiled bodies) de plantas (Beven, *et. al.*, 1996).

Hasta el momento no se ha demostrado del todo el paso del procesamiento del rRNA en el cual interviene el U14. Como ya se mencionó, algunos grupos lo vinculan con el corte del ETS 5', mientras que en otros casos se asegura que participa en el proceso de 2'-O-metilación del pre-18S (Dunbar y Baserga, 1998; Watkins, *et. al.*, 1998). Tampoco se conocen las estructuras nucleares que están relacionadas con su maduración y transporte al nucléolo así como su distribución a nivel de microscopía electrónica.

## **II.13 El núcleo celular se encuentra compartamentalizado en dominios funcionales.**

En 1831 Robert Brown describió la existencia de un pequeño 'glóbulo' dentro de las células, de material relativamente denso, al cual llamó núcleo (en Asimov, 1985). La organización funcional del núcleo ha sido motivo de gran número de estudios, muchos de

los cuales tienden a proponer la disposición organizada en tiempo y espacio de los eventos vinculados con el procesamiento de la información genética (ver Spector, 1993; Jiménez-García y Spector, 1993; Raska, 1995; Pennisi, 1997; Lamond y Earnshaw, 1998).

El desarrollo del método de tinción preferencial para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969) marcó un gran avance en el estudio de las partículas relacionadas con el metabolismo del RNA en eucariontes. Se sabe que las fibras pericromatinianas, los gránulos pericromatinianos y los gránulos intercromatinianos están presentes en animales, plantas y hongos, con características y distribución similares en los tres grupos (Jiménez-García, *et al.*, 1989).

El conocimiento que se ha generado con respecto a estos procesos ha llevado a proponer que el núcleo celular de mamíferos se encuentra compartimentalizado en dominios con estructura y función determinada (fig. 11) (Spector, 1993, Raska, 1995, Lamond y Earnshaw, 1998).

## **II.14 Estructuras ribonucleoproteicas**

### **II.14.1 Fibras pericromatinianas**

Las fibras pericromatinianas (PF) fueron descritas por Monneron y Bernhard (1969). Su diámetro varía de 30 a 50 Å. Pueden encontrarse fibras entremezcladas con gránulos pericromatinianos y transiciones de fibras a gránulos. Ensayos con autorradiografía de alta resolución muestran que pulsos de tan sólo dos minutos con [<sup>3</sup>H]-uridina, presentan marca

sobre las PF, las cuales se encuentran esparcidas por el nucleoplasma (Fakan y Bernhard, 1971; Fakan y Nobis, 1978).

Estas estructuras son sensibles a RNasa y su aparición es inhibida por pre-tratamientos con actinomicina-D (Miyawaky, 1974) o  $\alpha$ -amanitina (Petrov y Sekeris, 1971). La extracción de RNA de fracciones nucleares enriquecidas con fibras pericromatinianas, mostraron la presencia de RNAs de diferentes tamaños, denominados RNAs heterogeno-nucleares (hnRNA) (Bachellerie, *et. al.*, 1975).

Estos trabajos llevan a la conclusión de que las PF son los elementos estructurales que contienen el RNA transcrito de la región pericromatiniana (Fakan y Puvion, 1980). La localización de factores de *splicing* en estas fibras (Fakan, *et. al.*, 1984; Spector, *et. al.*, 1991) apoyan fuertemente la existencia de pre-mRNA en proceso de maduración en esta región del núcleo.

#### **II.14.2 Gránulos pericromatinianos**

Los gránulos pericromatinianos (PCG) son estructuras ribonucleoproteicas de entre 30 a 50nm de diámetro, con un halo claro de 25nm, que se localizan generalmente en el borde de la cromatina compacta (Monneron y Bernhard, 1969). Están formados por fibras de 12 a 15 Å, enrolladas irregularmente y embebidas en una matriz difusa (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971).

Los gránulos de los anillos de Balbiani, presentes en las glándulas salivales de *Chironomus thumi*, son el equivalente morfológico de los PCG, salvo por la ausencia de halos claros en los mismos (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971; Fakan y Puvion, 1980). Estudios diversos proponen fuertemente que los PCG así como los gránulos de Balbiani son sitios que contienen mRNA y están involucrados en su procesamiento y/o almacenaje (para revisión ver Vázquez-Nin y Echeverría, 1996). No obstante, existe poca evidencia de esto y no se tienen estudios con hibridación *in situ* ultraestructural que apoyen ésta idea.

### II.14.3 Gránulos intercromatinianos

Los gránulos intercromatinianos (ICG) tienen un diámetro de 20 a 25nm y pueden estar interconectados por PFs formando una especie de malla tridimensional (Puvion y Moyne, 1981; Spector, 1990). En núcleos de mamíferos se presentan como cúmulos de forma irregular localizados en la región intercromatiniana. Por el contrario, en plantas no forman cúmulos y son escasos y dispersos (Jiménez-García, *et. al.*, 1989).

Anticuerpos contra snRNPs muestran un patrón moteado ('speckled pattern') sobre un patrón difuso que tiñe el nucleoplasma (Spector, 1993). El patrón difuso se atribuye a la interacción de las snRNPs con los RNAs nacientes (en , Lamond y Earnshaw, 1998). El patrón moteado corresponde a los cúmulos de ICG y a las PF (Spector, *et. al.*, 1991).

Se sabe que muchos de los componentes que son esenciales para el *splicing* están presentes en los ICG, o al menos asociados a ellos. Estos incluyen hnRNPs (Fakan, *et. al.*, 1984), los snRNAs U1 y U2 (Carmo-Fonseca, *et. al.*, 1992; Huang y Spector, 1992), el SC35 (Fu y

Maniatis, 1990), RNA recién sintetizado (Fakan, *et. al.* 1976), RNA con poly (A) (Carter, *et. al.*, 1991) y pre-mRNAs específicos (Huang y Spector, 1991).

La localización de los factores de *splicing* es dinámica e involucra el tráfico entre subestructuras nucleares. El uso de la proteína fusionada SF2-GFP ha permitido observar *in vivo* esta organización, corroborando que los factores de *splicing* se dirigen desde los ICG hacia los sitios de transcripción activa (Misteli, *et. al.*, 1997).

#### II.14.4 Cuerpos espiralados

Existen en el espacio intercromatiniano diversas estructuras heterogéneas cuya función específica se desconoce, y se han agrupado con el término general de cuerpos nucleares. El término incluye estructuras como los cuerpos nucleares en forma de anillo, los cuerpos PML, los organelos esfera, gemas y cuerpos espiralados.

De todos, los cuerpos espiralados (coiled bodies, CBs) son los más estudiados al momento. Los CBs fueron descritos por primera vez por Santiago Ramón y Cajal utilizando técnicas de impregnación de plata en neuronas, y los denominó cuerpos intranucleares accesorios, destacando también su estrecha relación con el nucléolo (Ramón y Cajal, 1903).

Monneron y Bernhard (1969) los describieron a nivel de microscopía electrónica como cuerpos esféricos de 0.5-1.5 $\mu$ m de diámetro, compuestos de fibras enrolladas y empaquetadas densamente, positivos a la técnica de EDTA, que es preferencial para ribonucleoproteínas.



Los CBs son organelos nucleares universales que se han encontrado tanto en células animales (Raska, *et. al.*, 1990; Andrade *et. al.*, 1991) como en plantas (Lafontaine, 1965; Moreno Díaz de la Espina, *et. al.*, 1982, Chamberland y Lafontaine, 1993).

Estudios recientes han demostrado que los CBs pueden ser identificados por microscopía de fluorescencia usando anticuerpos o sondas contra snRNPs. El uso de sondas contra snRNPs los marca como puntos focalizados más brillantes (en ocasiones más que las speckles) (en Bohmann, *et. al.*, 1995). El suero de pacientes con enfermedades autoinmunes como la cirrosis biliar primaria y el síndrome de Sjögren, reconocen un autoantígeno común de 80 kDa. Debido a su tamaño y localización específica en CBs, este autoantígeno se ha denominado p80 coilina (p80 coilin) (Andrade, *et. al.*, 1991; Bohmann, *et. al.*, 1995).

Los CBs contienen las snRNPs U1, U2, U4, U5 y U6. Con el uso de la microscopía de fluorescencia se ha demostrado que tanto anticuerpos comunes como específicos contra snRNPs colocalizan en los CBs junto con la proteína p80 coilina (Raska, *et. al.*, 1990; Andrade *et. al.*, 1991; Carmo-Fonseca, *et. al.*, 1991; Huang y Spector, 1992; Matera y Ward, 1993). Sin embargo se debe tomar en cuenta que una fracción relativamente pequeña del total de las snRNPs del *splicing* está concentrada en los CBs en un tiempo determinado (Matera y Ward, 1993).

Se han encontrado varias proteínas nucleolares en los CBs, entre las que se cuentan la fibrilarina, Nopp140, NAP57, SSB1 y la proteína ribosomal S6 (Raska, *et. al.*, 1990, 1991; Meier y Blobel, 1994; Jiménez-García, *et. al.*, 1994, Beven, *et. al.*, 1996). También se ha detectado mediante hibridación *in situ*, la presencia del U3 snoRNA (Jiménez-García, *et.*

*al.*, 1994), aunque parece ser que no hay rRNA presente (Carmo-Fonseca, *et. al.*, 1993; Jiménez-García, *et. al.*, 1994). No presentan factores de *splicing* como el SC35, ni tampoco pre-mRNA o poly(A). Cuando la transcripción y el *splicing* son bloqueados, los CBs se dispersan y las snRNPs se concentran en los cúmulos de ICG (en Lamond y Earnshaw, 1998). La función de los CBs aún se desconoce.

#### II.14.5 Nucléolo

El mejor ejemplo de la subcompartimentalización del núcleo celular es el nucléolo. A pesar de no estar rodeado por una membrana, el nucléolo de mamíferos se encuentra bien diferenciado del resto del nucleoplasma bioquímica y funcionalmente. Fue descrito por primera vez por Felice Fontana en 1781 en células epiteliales de descamación de la anguila (en Segura-Valdez, 1996).

En el nucléolo se lleva a cabo la síntesis y procesamiento del rRNA y se forman los pre-ribosomas (en Raska, 1995) (ver fig. 6). Recientemente también se le ha implicado en el procesamiento y exportación de algunos mRNAs. En particular se cree que participa en la biosíntesis del RNA de la partícula de reconocimiento de señal (7SL RNA), en el procesamiento del U6 snRNA y también de algunos precursores de tRNAs (Pederson, 1998).

Al final de la mitosis, en telofase, el nucléolo se reorganiza alrededor de las secuencias repetidas de DNA ribosomal (rDNA) conocidas como región del organizador nucleolar (NOR) (McClintock, 1934) y de los cuerpos prenucleolares (PNBs), una vez que se ha

reactivado la transcripción del rRNA en los NOR; a este proceso se le conoce como nucleogénesis (en Segura-Valdez, 1996).

Ultraestructuralmente, el nucléolo está compuesto de 5 regiones: 1) componente fibrilar denso (DFC), 2) centros fibrilares (FC), 3) componente granular (GC), 4) vacuolas nucleolares y 5) cromatina perinucleolar (en Spector, 1993). La mayoría de los trabajos se refieren solo a los tres primeros por ser los componentes ribonucleoproteicos.

En la siguiente tabla se muestran de manera resumida las características de los componentes ribonucleoproteicos del nucléolo (modificado de Jiménez-García, 1988 y de Segura-Valdez, 1996).

<b>Componente</b>	<b>Contenido</b>	<b>Función</b>
<b>CENTROS FIBRILARES</b>  Semitransparente a los electrones. Fibras de 5nm	Contiene rDNA en la periferia, RNA pol I, UBF, proteínas Ag-NOR, fibrilarina y fosfoproteína C23 ETS5' en la periferia	Quizá almacenamiento de factores de la transcripción del pre-rRNA.
<b>COMPONENTE FIBRILAR DENSO</b>  Fibras abundantes de 4-8nm de espesor.	Proteínas Ag-NOR: fibrilarina, C23 y B23, RNA pol I, UBF. ETS 5', ITS 1 e ITS 2 U3 snoRNA	Es el sitio en donde tiene lugar la actividad transcripcional más abundante y el procesamiento temprano del pre-rRNA.
<b>COMPONENTE GRANULAR</b>  Gránulos de 15 a 20nm de diámetro	Abundante en la fosfoproteína B23 y cantidades pequeñas de ETS5', ITS1, ITS2, U3snoRNA y fibrilarina.	ES el sitio de procesamiento tardío del pre-rRNA y del almacenamiento de pre-ribosomas.

Tabla 3: Componentes del nucléolo

## II.14.6 Compartimento perinucleolar

Recientemente se describió un nuevo compartimento perinucleolar (PNC) (en Lamond y Earnshaw, 1998). El PNC es una estructura nuclear individual localizado en la periferia del nucléolo y que se encuentra predominantemente en células transformadas. Se ha reportado que el PNC contiene varios snRNAs transcritos por la RNA pol III, y dos proteínas hnRNPs. (Ghetti, *et. al.*, 1992; Matera, *et. al.*, 1995; Timchenko, *et. al.*, 1996; Huang, *et. al.*, 1997). Se sabe que este compartimento incorpora Br-UTP y CTP conjugado con fluorescencia. La incorporación es dependiente de energía y se interrumpe en presencia de RNasa A. Lo único que se puede deducir hasta el momento de estos hallazgos es que este compartimento esta relacionado con el metabolismo del RNA nuclear (Huang, *et. al.*, 1998).

A partir de los datos mostrados con respecto al núcleo celular y de la subcompartimentalización morfológica y molecular que presenta, el siguiente esquema pretende conjuntar la información que hasta el momento se tiene.

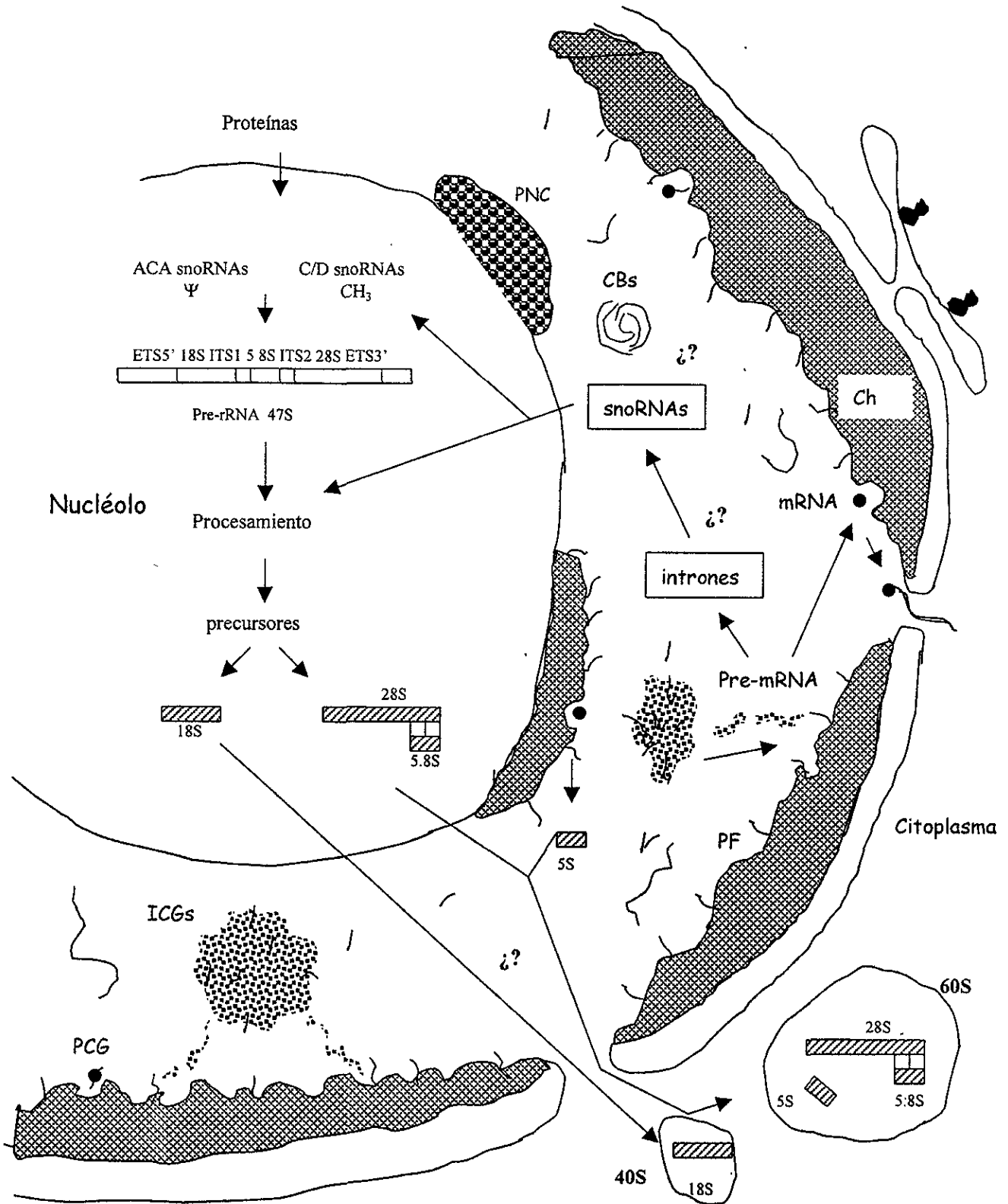


Figura 11: Dinámica funcional del núcleo celular interfásico de mamíferos. Los símbolos (¿?) representan las estructuras que aún no se definen dentro de la vía, o la vía misma. Ch: cromatina compacta, PF, fibras pericromatinianas, PCG: gránulos pericromatinianos, ICG: gránulos intercromatinianos, PNC: compartimento perinucleolar, CBs: cuerpos espiralados.

### III Objetivos

III.1 Analizar mediante hibridación *in situ* fluorescente y ultraestructural la distribución del RNA intranuclear.

III.2 Desarrollar un método que permita analizar a nivel ultraestructural y de manera directa las partículas nucleares que contienen RNA.

III.3 Utilizando sondas de gDNA analizar las partículas nucleares que intervienen en el metabolismo de los mRNAs.

III.4 Localizar mediante hibridación *in situ* fluorescente y ultraestructural la distribución del U14 snRNA.

III.5 Generar sondas de DNA por PCR para localizar *in vitro* e *in situ* al U14 snRNA.

III.6 Analizar la molécula del U14 snRNA como un posible marcador molecular para estudios filogenéticos.

## IV Material y Métodos

### IV.1 Células

Se trabajó con dos líneas celulares transformadas: La línea NRK-52E, que son células epiteliales de riñón de rata normal, y la línea HeLa, (carcinoma cervicouterino humano).

Ambas líneas celulares se cultivaron en medio RPMI (Sigma) suplementado con L-glutamina, aminoácidos no esenciales y suero fetal bovino al 10% (Gibco). Las células se desarrollaron hasta llegar a subconfluencia en cajas de 6 pozos estériles y sobre cubreobjetos de vidrio del número 1 (estos cubreobjetos fueron tratados previamente con una mezcla de ácido clorhídrico y sulfúrico concentrados. Por una hora se sumergieron en la mezcla y después fueron lavados con agua corriente hasta obtener un pH neutro y se almacenaron en etanol 96%) para su posterior utilización a manera de monocapa adherida al vidrio.

### IV.2 Microscopía electrónica.

Pequeños fragmentos de hígado de ratón (*Mus musculus*) no mayores de 1mm de diámetro fueron fijados en una mezcla de paraformaldehído 4%-glutaraldehído 0.5% o en paraformaldehído 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó buffer de fosfatos salino (PBS) pH 7.3 para diluir estos fijadores. Después de que las muestras se lavaron con PBS, fueron deshidratadas con metanol e incluídas en la resina hidrofílica Lowicryl K4M a  $-20^{\circ}\text{C}$  de acuerdo a protocolos ya descritos (Roth, 1986). La polimerización se llevó a cabo con luz ultravioleta a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Se obtuvieron cortes ultrafinos de aproximadamente 60nm de grosor y se montaron en rejillas de oro para

microscopía electrónica cubiertas con una membrana de resina formvar. Las observaciones fueron hechas en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM-10.

### IV.3 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA se llevó a cabo como se describe en Sambrook y cols. con algunas modificaciones. Se hizo la disección del bazo de ratón y se seccionó inmediatamente en un microtomo de congelación (Cryocut 1800, Reichert-Jung) a  $-17^{\circ}\text{C}$  para obtener cortes de  $20\mu\text{m}$  de grosor. Se utilizaron aproximadamente 30 cortes por extracción. La extracción se llevó a cabo incubando los cortes durante toda la noche en un buffer SDS-Proteínasa K a  $42^{\circ}\text{C}$  y después se usó fenol-cloroformo. El DNA se precipitó con NaCl y etanol 100% a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El DNA fue resuspendido en buffer TE obteniendo una concentración de  $1.75\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La integridad del DNA fue analizada con geles de agarosa al 0.7%. La concentración fue medida por absorbancia a una longitud de onda de 260nm. Se consideró como pureza óptima cuando la relación  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  dio como resultado 1.8.

Buffer de lisis:		Buffer TE (Tris-EDTA):	
Tris	10mM	Tris-HCl	10mM
EDTA	10mM	EDTA	10mM
NaCl	50mM	*El pH se ajusta a 8.0	
SDS	0.2%	con HCl.	
Proteínasa K	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$		

### IV.4 PCR

Se utilizó la técnica de PCR para amplificar la región del intrón 5 del gen para la proteína hsc70 de ratón. Se usaron los primers GAGCTGAACAAGAGCATTAAC (forward) y TGTCTCCAGATAGAATGGC (reverse) a una concentración de  $3\text{ ng}/\mu\text{l}$  para



obtener un amplificado de 292pb. La mezcla para la reacción incluyó 10mM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 3.5mM de MgCl<sub>2</sub>, buffer de amplificación 10X (50mM KCl + 10mM Tris-HCl pH 9.0), 150mg/ml de BSA (albúmina), DMSO al 5% (dimetilsulfóxido), 2.5U de Taq polimerasa (Amplitaq, Perkin Elmer™) y 10ng/μl de gDNA de ratón como molde, toda la mezcla se llevó a un volumen final de 50μl con H<sub>2</sub>O cbp. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador modelo 980 (Perkin Elmer™) con las siguientes condiciones:

95°C - 5min  
 95°C -45seg } 40 ciclos  
 63°C - 3min }  
 72°C-4min

El amplificado se corrió en un gel de agarosa al 2.5 %, obteniendo una banda cercana a los 300pb, la cual fue cortada del gel e incubada durante toda la noche en H<sub>2</sub>O dd para eluir el DNA amplificado, recuperando aproximadamente 2ng/μl de amplificado. Esta concentración de amplificado fue usada como molde para reamplificar con las mismas condiciones arriba descritas.

#### IV.5 Ensayo de restricción.

Para corroborar que el amplificado obtenido era la secuencia esperada se siguieron dos criterios. El primero fue el patrón de corrimiento electroforético del amplificado comparado con la banda de 300pb del marcador de peso molecular (leader 100pb). El segundo fue su patrón de restricción con la enzima Alu I.

Para determinar la enzima de restricción que se debía utilizar y el tamaño de los segmentos resultantes, se empleó el programa de cómputo Webcutter versión 2.0 (<http://firstmarket.com/firstmarket/cutter/cut2.html>). Este programa permite realizar un mapa de restricción de la secuencia en cuestión, eligiendo una o varias (e incluso todas) enzimas de restricción de su banco de datos. El resultado nos indica cuantas bandas y de cuantos pares de bases esperamos usando una determinada enzima.

El amplificado se incubó durante toda la noche a 37°C con la enzima Alu I. Se verificó el resultado en un gel de agarosa 2.5%, corriendo el amplificado y la muestra restringida en carriles contiguos bajo las condiciones antes descritas. El patrón de restricción con esta enzima genera una banda de 230pb, fácil de distinguir del amplificado original.

#### **IV.6 Extracción de RNA total**

Se llevó a cabo la extracción de RNA mediante la aplicación de Trizol (Chomczynski and Sacchi, 1987, modificada utilizando Trizol), para su posterior uso en el Northern blot. Todo el material usado debe ser previamente esterilizado y el agua que se emplea en las soluciones debe tratarse con DEPC (dietilpiricarbonato) que es un inhibidor de RNasas:

Agregar 1ml de trizol por cada 100mg de tejido e incubar 5min a temp. amb.



Adicionar 400µl de cloroformo frío y agitar vigorosamente



Centrifugar a 10000rpm en tubos corex a 4°C durante 15min



Recuperar la fase acuosa y transferirla a otro tubo



Adicionar isopropanol frío en volumen igual al recuperado de la fase acuosa



Incubar a temp. amb. durante 5min



Centrifugar a 10000rpm en tubos corex a 4°C durante 15min



Decantar suavemente el sobrenadante. Esperar 5 min con el tubo invertido sobre un papel absorbente



Agregar al botón 1ml de etanol 75% frío y resuspender



Centrifugar a 10000rpm en tubos corex a 4°C durante 10min



Decantar suavemente el sobrenadante



Resuspender en 40µl de TE



Medir absorbancia a 260 y 280nm

#### IV.7 Marcado de la sonda para Northern blot.

Se utilizó un kit basado en el método de Random Primer (Gibco BRL) para marcar la sonda de U14 de 292pb. La mezcla para la reacción contiene 25ng de sonda desnaturalizada (10min 70°C y enfriar en hielo), dATP, dGTP, dTTP (0.5mM, 2µl de cada uno), Random Primers (18 OD<sub>260</sub>/ml hexámeros de deoxiribonucleótidos, 15µl), 50µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (5µl), fragmento Klenow de la DNAPoll , 1µl (3U/µl), se adiciona H<sub>2</sub>O para llevarlo a un volumen de 50µl y se incuba a 25°C durante 1h (Feinberg AP and Vogelstein B, 1983). La reacción se detiene con 5µl de stop buffer (Na<sub>2</sub> EDTA, 0.2M, pH 7.5).

#### IV.8 Northern blot.

El RNA obtenido de la extracción con trizol fue cuantificado por espectrofotometría y corrido en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

##### Gel para RNA

1g	agarosa
75ml	H <sub>2</sub> O (DEPC) (se agrega 1ml de DEPC a 1litro de H <sub>2</sub> O, se agita de 2 a 3 hrs protegido de la luz y se deja reposar toda la noche, después se esteriliza)
8.3ml	MOPS 12X (3-ácido N-morfolino propanosulfónico 0.24M, acetato de sodio 0.06M, Na <sub>2</sub> EDTA 0.12M)
16.25ml	formaldehído 37%

Se mezcla la agarosa con el H<sub>2</sub>O (DEPC) y se funde (horno de micro-ondas 1min). Ya que se fundió, se completa el volumen inicial con H<sub>2</sub>O (DEPC). Se agrega el MOPS 12X y después el formaldehído previamente calentado a 70°C.

En cada pozo se cargó una mezcla de 13µl de buffer de carga para RNA (Sigma), 10µg de RNA y H<sub>2</sub>O (DEPC) a fin de completar 26µl. Se corrió a 14 Volts durante toda la noche a temperatura ambiente. El gel se tiñó con bromuro de etidio para constatar la integridad del RNA y después se transfirió a una membrana de nylon usando buffer TAE 1X a 4°C

durante toda la noche con un voltaje de 15 Volts. Al final se lavó con 2Xssc, se horneó durante 2hrs a 80°C y se almacenó a 4°C hasta su uso para la hibridación.

La membrana con el RNA transferido de células HeLa, células NRK, ovario de ratón adulto, testículo y timo de embrión de ratón (17 días), ovario de embrión de pollo (13.5 días) e hígado de ratón adulto, fue puesta en una bolsa de plástico con una mezcla de prehibridación a 42°C durante 18hrs (25mM de buffer de fosfatos pH 6.5, 5Xssc, Ficoll 0.2%, PVP 0.2%, formamida 50% y 200µg/ml de DNA de esperma de salmón).

Después de la prehibridación se abrió la bolsa y se agregaron 44µl de la sonda marcada ( $12 \times 10^6$  CPM, como se recomienda para las sondas marcadas con el kit de Gibco antes mencionado). La sonda fue previamente desnaturalizada calentándola a 70°C durante 10min. La membrana se incubó durante 36hrs. a 37°C. Se hicieron dos lavados finales en 0.1xSSC, pH 7.0, conteniendo 0.1% SDS a 55°C (ver Trinh-Rohlik and Maxwell, 1988).

#### **IV.9 Densitometría**

La medición densitométrica de las bandas obtenidas con el ensayo de Northern usando el amplificado de 292pb del intrón 5 de la hsc70 fue realizada con un densitómetro Hoefer Scientific Instruments modelo GS300. Se hizo la medición de intensidad de cada banda con valores de transmitancia y se obtuvo el valor del área bajo la curva de cada una de ellas para después calcular el porcentaje de área correspondiente a cada banda.

#### **IV.10 Marcado de la sonda para hibridación *in situ***

Tanto la sonda de U14 como el gDNA fueron marcados por el método de *nick translation* utilizando el sistema de marcaje BioNick (Gibco BRL) para incorporar nucleótidos biotinados (Langer, *et. al.*, 1981). En la reacción se adicionan dNTP's 0.2mM, 0.1mM de bio-14-dATP, 0.5 unidades/ $\mu$ l de DNA polimerasa I de *Eschericia coli* y 0.0075 unidades/ $\mu$ l de DNasa I de páncreas bovino.

Se marcó aproximadamente 1 $\mu$ g de sonda por cada reacción, dejando incubar a 16°C durante 1h, 2hrs y 2 ½hrs. El tamaño de la sonda (entre 100 y 500 pb para el gDNA) fue monitoreado mediante electroforésis en gel de agarosa al 1%.

#### **IV.11 Hibridación *in situ* fluorescente y ultraestructural**

Tanto para la localización del U14 snoRNA como para la sonda total de gDNA se utilizaron los siguientes protocolos de hibridación:

### Hibridación *in situ* fluorescente

Células NRK o células HeLa  
↓

Lavar con PBS pH7.4  
↓

Fijación: Paraformaldehído 4% en PBS

15 min , temp. Ambiente

↓

PBS 3 cambios de 5 min. cada uno

↓

Tritón X-100, 0.5% en PBS

4 min. a 4°C

↓

PBS 3 cambios de 5 min. cada uno

↓

Solución salina concentrada 2X (2X ssc) 5 min.

↓

Incubar con mezcla de hibridación  
en cámara húmeda toda la noche a 42°C

↓

4X ssc 3 cambios de 5 min c/u

↓

Estreptavidina-FITC : 4Xssc, 1:20

2 ½ hrs. Temp. Amb. Oscuridad

↓

4Xssc 3 cambios de 5 min. c/u

↓

Montar en medio antioxidante

### Hibridación *in situ* ultraestructural

Cortes ultrafinos (hígado de ratón)  
montados en rejillas de oro cubiertas con formvar



Solución salina concentrada 2X (2X ssc) 5 min.



Incubar con RNasa libre de DNasa

1 h. 37°C



2X ssc 3 cambios 5 min. c/u



Incubar con mezcla de hibridación  
en cámara húmeda toda la noche a 42°C



4X ssc 3 cambios de 5 min c/u



Estreptavidina-oro (10nm): 4Xssc, 1:20

Toda la noche a 4°C



4Xssc 3 cambios de 5 min. c/u



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 cambios 5 min. c/u



Acetato de uranilo 5% 5min.



Mezcla de hibridación: 10 µl de sonda marcada (conteniendo 200ng de sonda de U14 o 1000ng de gDNA)  
10 µl de formamida desionizada  
2 µl de tRNA de levadura (10 mg/ml)  
Se hace una mezcla que es calentada a 70°C durante 10 min. o en agua hirviendo 4 min. Al cumplirse el tiempo se pone rápidamente a enfriar en hielo y se mezcla con:  
2 µl de 20X SSC  
4 µl de BSA 5%  
4 µl de sulfato de dextran 50%

#### IV.12 Análisis de secuencias nucleotídicas

Para la obtención de las secuencias reportadas de diferentes especies para el U14 snoRNA se utilizó el Entrez Browser (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/nucleotide/html>) provisto por el National Center for Biotechnology, el cual tiene acceso directo al GenBank Sequence Database.

Después de la recopilación de las secuencias de U14 reportadas, se procedió con el alineamiento de las mismas utilizando para ello el programa Clustal W 1.7 para alineación múltiple de secuencias (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>).

El árbol filogenético se generó utilizando el paquete Phylip (Phylogeny Inference Package).

## V Resultados

**V.1 Extracción de DNA genómico.** Mediante la utilización de cortes por congelación y la extracción con fenol cloroformo, se logró obtener DNA genómico con buena integridad cercano a la banda de 23kb (fig. 12) del marcador de peso molecular y con una concentración de 1.7 $\mu$ g/ $\mu$ l. Así mismo la extracción de DNA se llevó a cabo en diferentes tejidos tanto de rata como ratón (fig. 12).

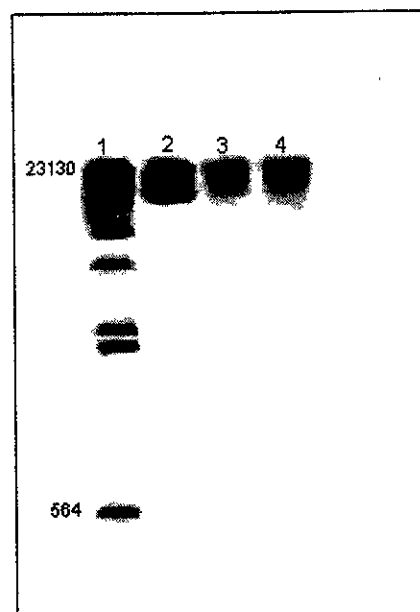


Fig.12. Electroforésis en gel de agarosa 0.7%. Carril 1: $\lambda$  Hind III; 2:gDNA hígado de rata; 3 gDNA bazo de rata; 3: gDNA bazo de ratón.

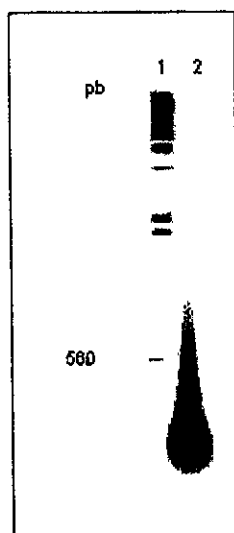


Fig.13. Agarosa 1%. 1: $\lambda$  Hind III; 2:gDNA marcado por nick translation

**V.2 Sonda de gDNA:** El gDNA fue utilizado como sustrato para la DNA pol I para incorporar bio-14-dATP por nick translation y así utilizarlo como sonda de hibridación. El curso de la reacción fue vigilado mediante electroforésis en agarosa obteniendo fragmentos de entre 125 y 500pb aproximadamente (fig 13).

**V.3 Localización de RNA total:** Usando como sonda el gDNA marcado con biotina y utilizando el protocolo para la hibridación *in situ* fluorescente y ultraestructural se llevó a cabo la localización del RNA total. A nivel de microscopía de luz y con tiempo de 1h en la reacción de nick translation, se observa una localización preferentemente en el núcleo con

poca o casi ninguna señal en el nucléolo. También se ve señal difusa en el citoplasma aunque de menor intensidad que en el núcleo (fig.14).

A nivel ultraestructural se tuvieron resultados diferentes dependiendo del tiempo transcurrido durante la reacción de marcaje por nick translation. Así, en los tres tiempos analizados se encontró señal preferentemente en el núcleo en la región del nucleoplasma y como era de esperarse la cromatina compacta se encontró sin señal (figs. 15, 16, 17).

Con tiempos cortos de digestión (1h) en el marcaje de la sonda se encontró señal principalmente en nucleoplasma, poca en el nucléolo y poca también en citoplasma. La señal en el núcleo se localiza preferentemente en las regiones fibrilares y con la cromatina compacta excluída de señal (fig.15). La señal encontrada en nucléolo se observó hacia los componentes fibrilares (fig. 15).

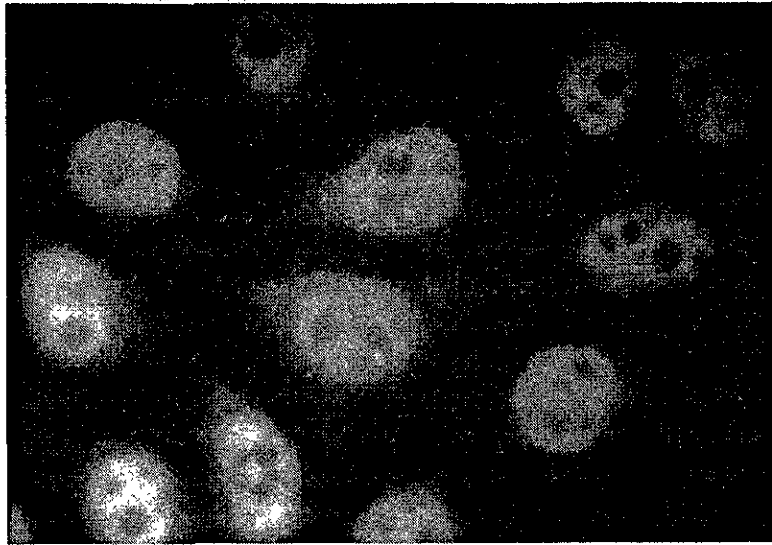


Fig.14. Localización de RNA total en células HeLa mediante hibridación *in situ* fluorescente. La señal se localiza principalmente en el núcleo, con citoplasma y nucléolos mostrando poca intensidad.

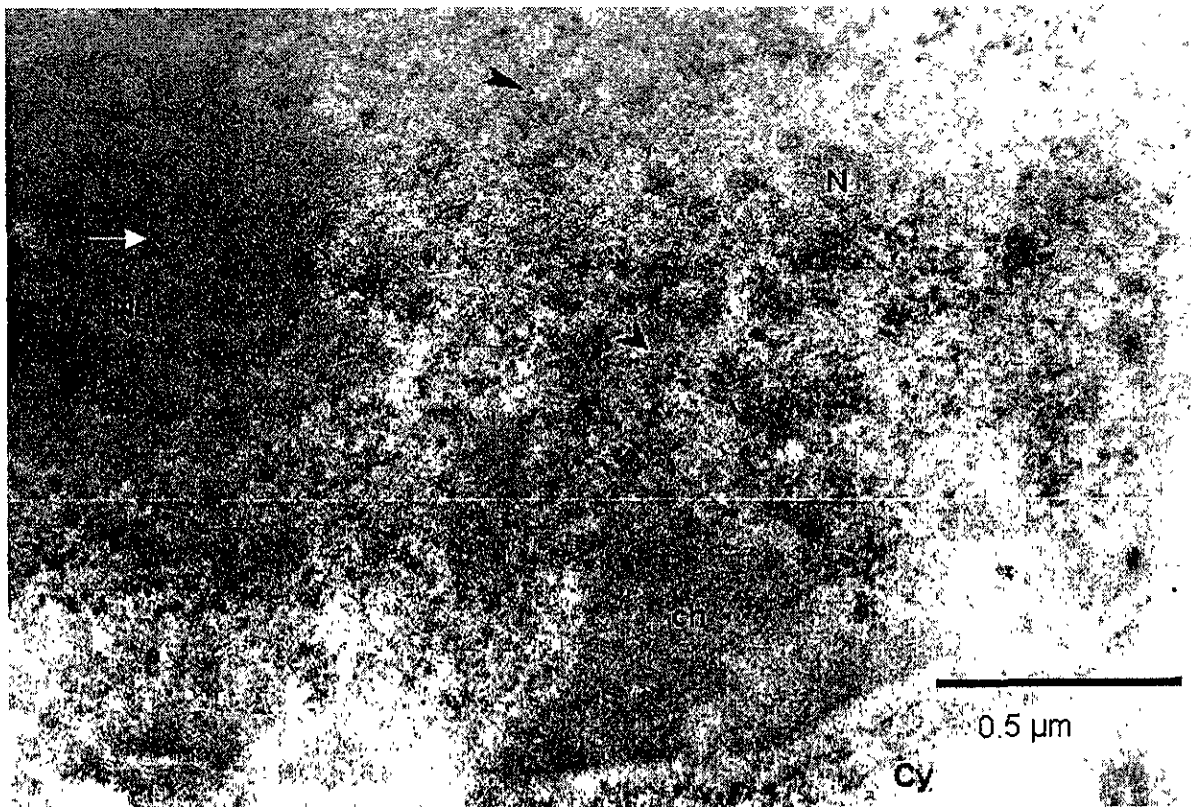


Fig. 15. Núcleo celular interfásico de hepatocito de ratón. Hibridación *in situ* usando gDNA como sonda. La reacción de nick translation transcurrió por 1h. La cromatina compacta se encuentra libre de señal (ch) mientras que las zonas fibrilares (cabezas de flecha) del nucleoplasma presentan la mayor parte de las partículas de oro. El nucléolo (Nu) presenta señal en sus componentes fibrilares (flecha).

Conforme el tiempo de la reacción de marcaje fue aumentando, se notó un incremento en la señal (fig. 16). Los tiempos más prolongados de marcaje también mostraron la aparición de señal en los elementos granulares del núcleo como son los gránulos intercromatinianos y los gránulos pericromatinianos (fig 17).

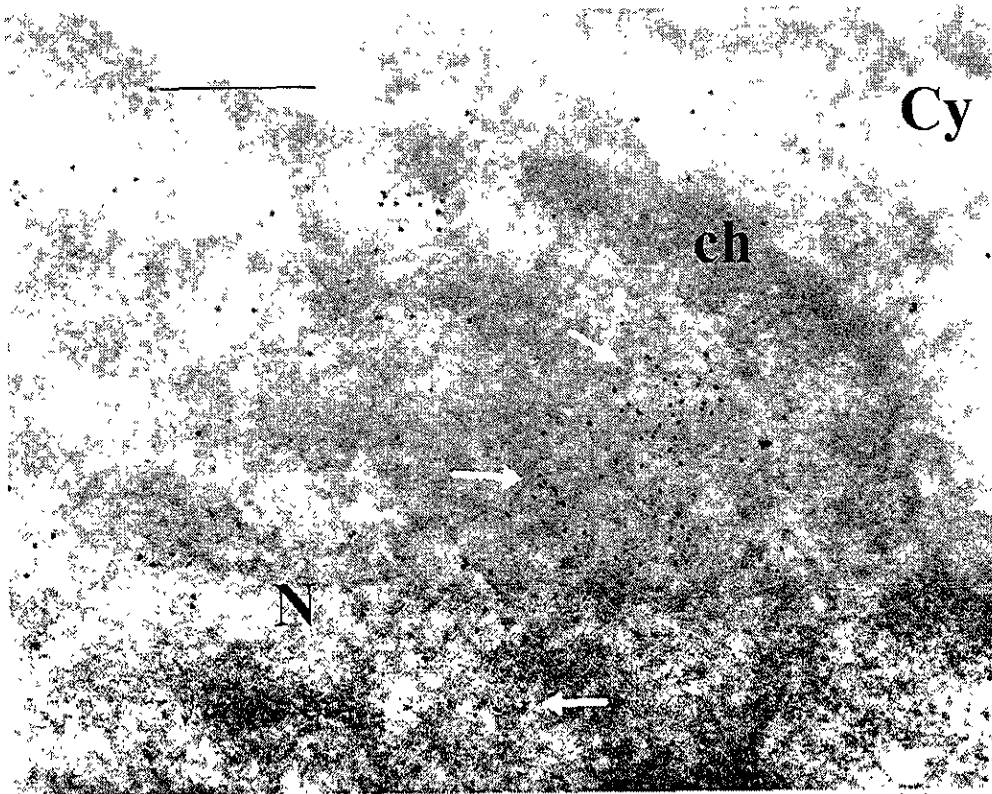


Fig.16. Hibridación *in situ* usando como sonda gDNA con 2 hrs. de marcaje por nick translation. Las flechas muestran la señal con granos de oro que aumenta con relación al tiempo durante el cual transcurre la reacción de marcaje. N: núcleo, ch: cromatina compacta, Cy: citoplasma. Barra 200nm.

Como se mencionó en material y métodos, al incubar con RNasa antes del proceso de hibridación la señal presente en las células es prácticamente nula (fig. 18).

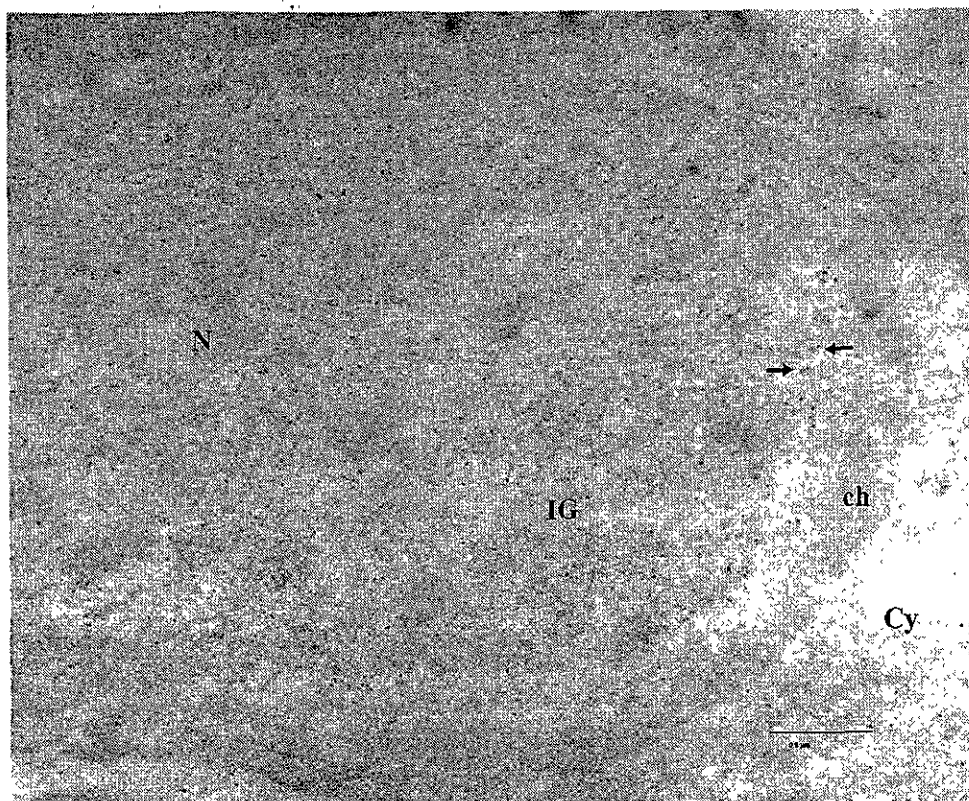


Fig.17. Hibridación *in situ* ultraestructural en hígado de ratón usando gDNA como sonda. El gDNA fue marcado por nick translation durante 2 ½ hrs. Las flechas muestran los gránulos pericromatinianos con señal. N: núcleo, ch: cromatina, IG: gránulos intercromatinianos, Cy: citoplasma. Barra 0.5µm.

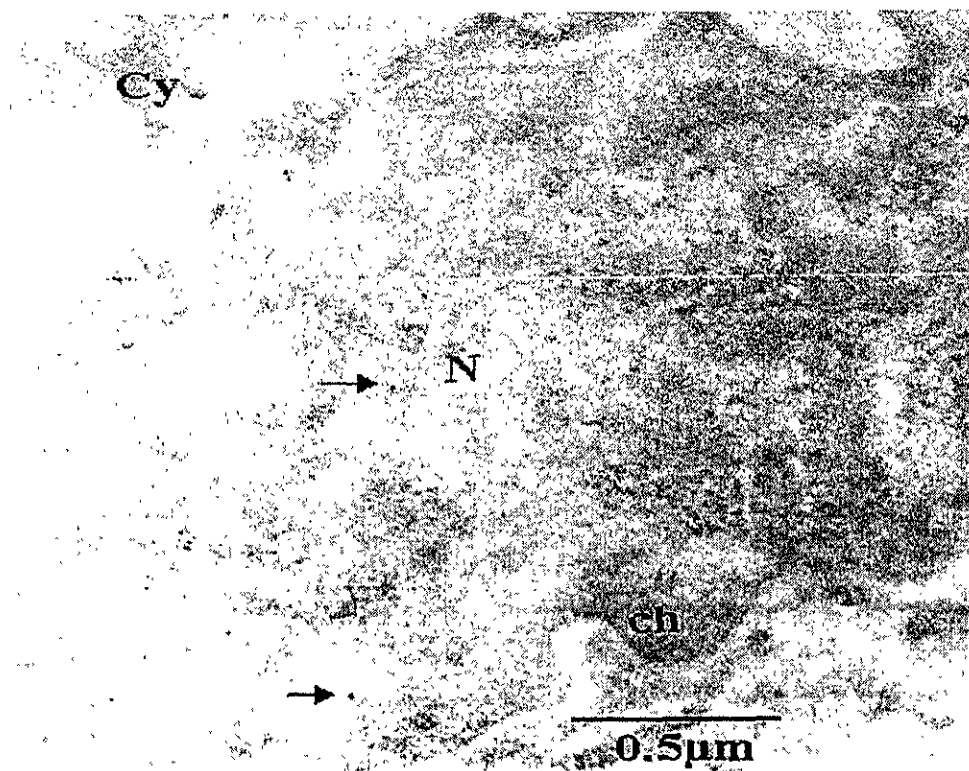


Fig.18: Incubación con RNasa antes de llevar a cabo la hibridación. La poca señal detectada se señala con flechas.

#### V.4 Amplificación de sonda para el U14 snRNA mediante PCR.

Mediante el análisis de la secuencia del U14 snRNA de ratón se determinó que el amplificado esperado usando los primers mencionados en material y métodos era el siguiente:

(Mapa físico modificado de Dworniczak y Mirault, 1987)

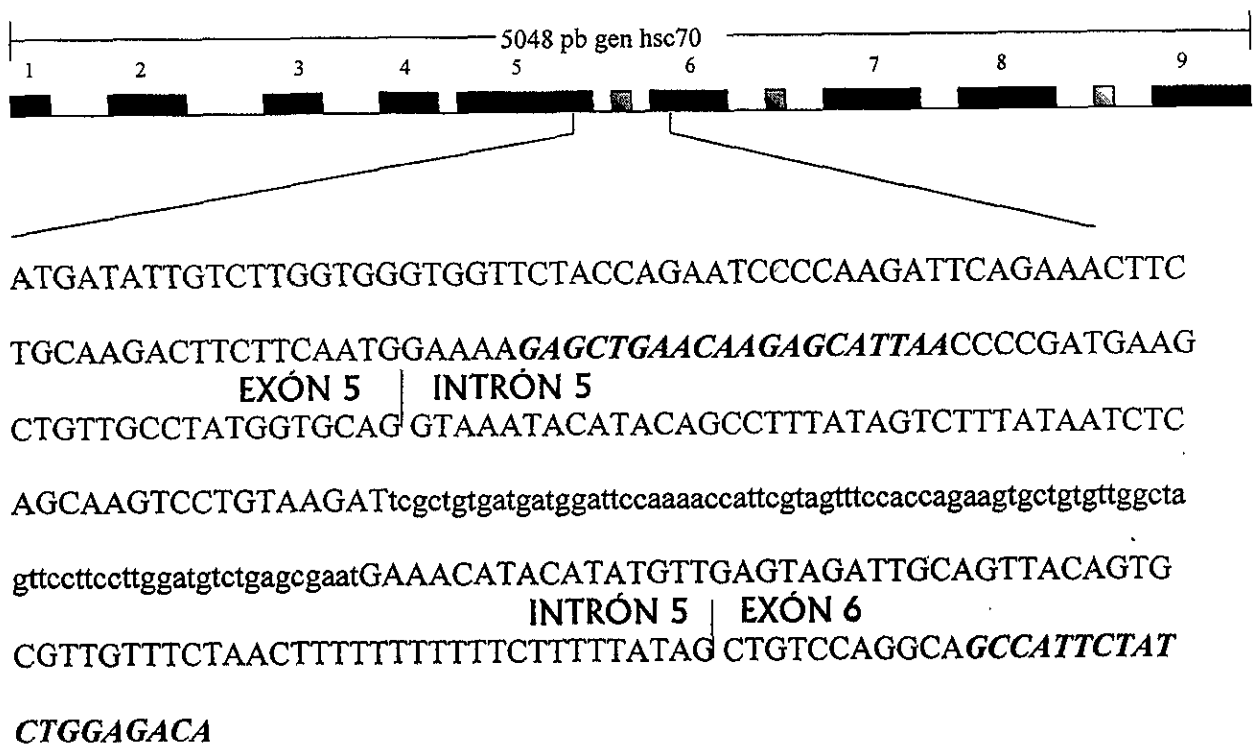


Fig. 19. Representación del mapa físico del gen para la proteína hsc70 y de la secuencia comprendida entre el exón 5 y 6, la cula contiene la secuencia codificante del snoRNA U14. Exón, ■ U14, \_ intrón. Las letras itálicas representan los primers y las minúsculas representan la región que codifica al U14.

El mapa de restricción con la enzima Alu I se llevó a cabo en primera instancia con el programa Webcutter 2.0:

```

      Alu I                               Alu I
GAGC*TGAACAAGAGCATTAAACCCCGATGAAGC*TGTTGCCTATGGTGCAGGT
AAATACATACAGCCTTTATAGTCTTTATAATCTCAGCAAGTCCTGTAAGATTCCG
CTGTGATGATGGATTCCAAAACCATTCGTAGTTTCCACCAGAAGTGCTGTGTTG
GCTAGTTCCTTCCTTGGATGTCTGAGCGAATGAAACATACATATGTTGAGTAGA
      Alu I
TTGCAGTTACAGTGCGTTGTTTCTAACTTTTTTTTTTTCTTTTTATAGC*TGTC
GGCAGCCATTCTATCTGGAGACA
  
```

Debido a lo anterior, se esperaban 4 segmentos después de incubar con Alu I, la cual reconoce la secuencia AG/CT. Los segmentos esperados eran de 4, 28, 230 y 30 pb, de los cuales la banda de 230 pb sería fácilmente reconocida en un gel de agarosa 2.5%.

Experimentalmente se obtuvo el amplificado de 292 pb esperado y el ensayo de restricción corroboró los datos generados con Webcutter (fig. 20).

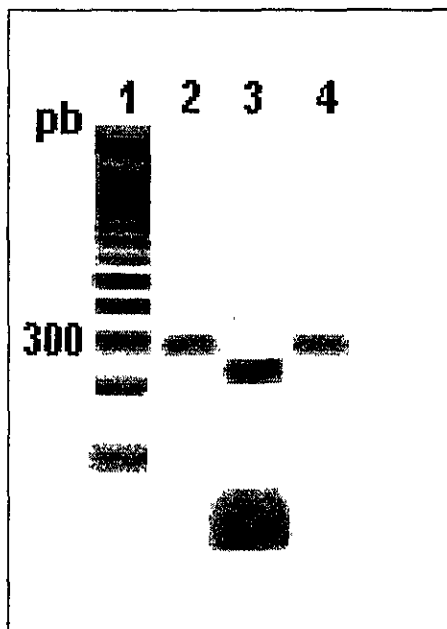


Fig.20. Producto de la reacción de PCR y ensayo de restricción. 1: marcador de peso molecular, 2 y 4: producto de PCR, 3: producto de restricción con Alu I.



### V.5 Detección del snoRNA U14 *in vitro*.

El amplificado de 292pb fue usado como sonda biotinada para localizar el U14 snoRNA *in situ*. También fue usado para localizar *in vitro* este RNA en diferentes tejidos y especies mediante la implementación de un Northern blot (la fig.21 muestra la integridad del RNA total después de la extracción). Este ensayo puso de manifiesto la presencia del snoRNA U14 en ratón, tanto en hígado y ovario de ratón adulto, como en testículo y timo de embrión de ratón de 17 días. De manera similar se puso de manifiesto en células HeLa y en células NRK aunque parece existir diferencias entre de peso molecular entre el RNA detectado en células HeLa y el resto de las muestras. Con respecto a la muestra de ovario de pollo, no se logró localizar el RNA en cuestión (fig. 22).

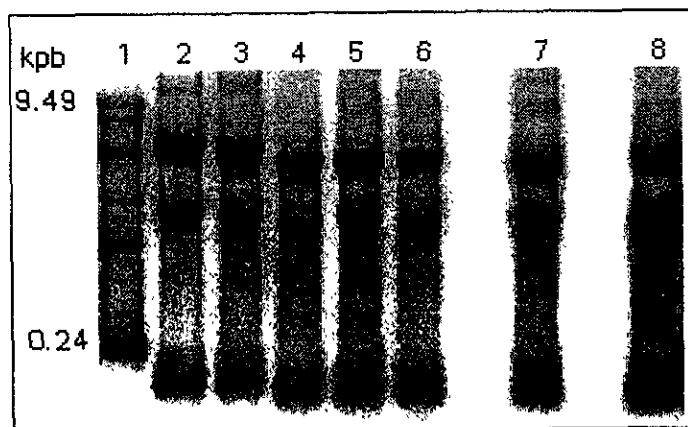


Fig. 21. Extracción de RNA total, se aprecia la integridad del RNA y se distinguen de manera bien definida las bandas correspondientes al 28S, 18S y también una banda menor a las 240 pb correspondiente a los RNAs de bajo peso molecular. En cada carril se cargaron 10 $\mu$ g de RNA. Carril 1: marcador de peso molecular, 2: RNA de células-HeLa, 3: de células NRK, 4: de ovario de ratón adulto, 5: de testículo de embrión de ratón de 17 días, 6: de timo de embrión de ratón, 7: ovario de embrión de pollo (13 días), 8: de hígado de ratón adulto.

### V.6 Densitometría.

Para saber si existe alguna diferencia en la expresión del snoRNA U14 en los diferentes tejidos analizados, se hizo un análisis densitométrico de la placa fotográfica procedente del northern. La figura 23 muestra el perfil densitométrico de todas las muestras excepto la de las células HeLa debido a que el peso molecular es diferente y el análisis es lineal. En la tabla se muestra el porcentaje de área correspondiente a cada una de las muestras presentadas en la gráfica de la figura 23.

Fig. 22: Northern blot usando como sonda el amplificado de 292pb conteniendo la secuencia codificante del snoRNA U14. Los carriles corresponden con los de la figura 21. Los dos asteriscos señalan la posición del rRNA 18S y el asterisco señala la posición del rRNA 16S. Se puede observar la expresión de este RNA en todos los tejidos analizados, excepto en el correspondiente a ovario de embrión de pollo.

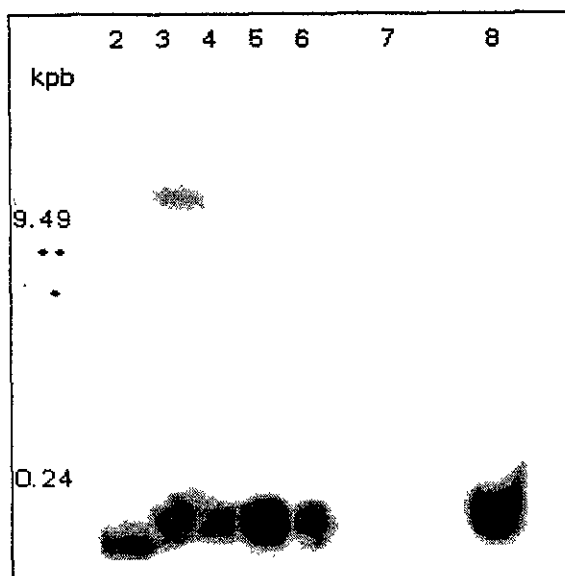
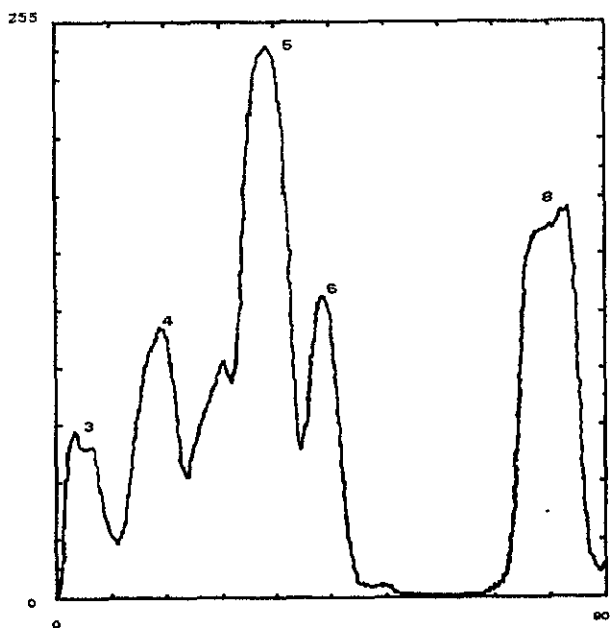


Fig. 23: Perfil densitométrico del Northern blot presentado en la figura 22. Los números de cada pico corresponden con la muestra como se señala en la figura 22. No aparece el pico número 2 ya que no corresponde al peso molecular de las demás bandas.



### V.7 Cálculo del área bajo la curva

n	ALTURA	ANCHO	AREA	%AREA
3	66	101	4879	7.3
4	116	119	9560	14.3
5	244	185	26830	40.2
6	134	301	8263	12.4
8	166	200	17281	25.9

Tabla 4 : Cálculo del área bajo la curva de cada una de las muestras analizadas mediante integración rápida.

De estos resultados se puede notar que el testículo de embrión de ratón de 17 días es el que presenta una mayor expresión de snoRNA U14, seguido de cerca por el hígado de ratón adulto. También se observa que las células NRK lo producen en la menor de las concentraciones y que en embrión de pollo no es detectable.

#### V.8 Detección del U14 snRNA *in situ*.

Mediante el uso de hibridación *in situ* fluorescente se llevó a cabo la detección del U14 snRNA en células HeLa cultivadas en nuestro laboratorio. Como se muestra en la figura 24, la señal se localizó principalmente en los nucléolos de las células en interfase. Aunado a estos resultados, también se detectó señal en algunas partículas nucleares que morfológicamente parecen corresponder a los cuerpos espiralados (CBs), que son abundantes y de aproximadamente una micra de diámetro en las células HeLa (fig. 25).

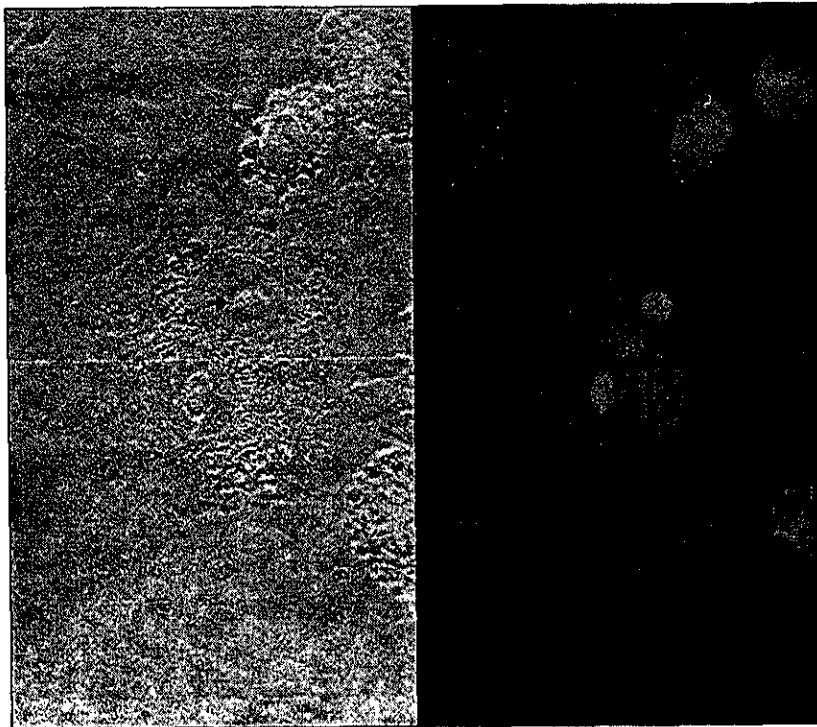


Fig. 24: Hibridación *in situ* fluorescente para localizar el snoRNA U14. La señal se localiza preferentemente en los nucléolos (flechas). Células HeLa. Izquierda contraste de fases; derecha fluorescencia.

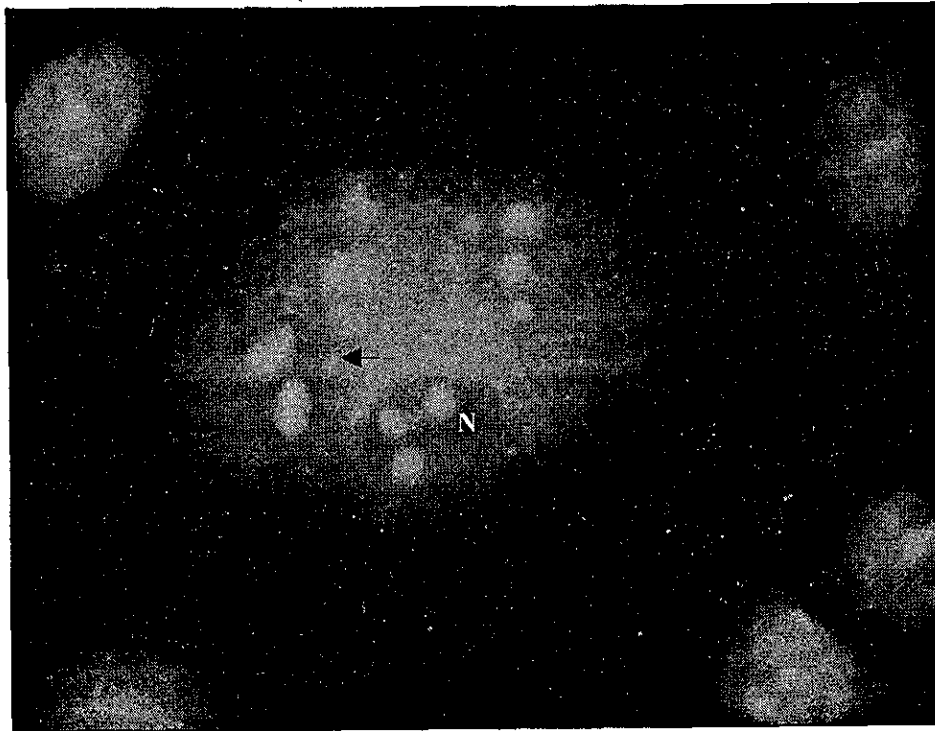


Fig. 25: Localización del snoRNA U14 en células HeLa. La flecha señala una estructura granular del núcleo con las características morfológicas de un cuerpo espiralado. N: núcleo.

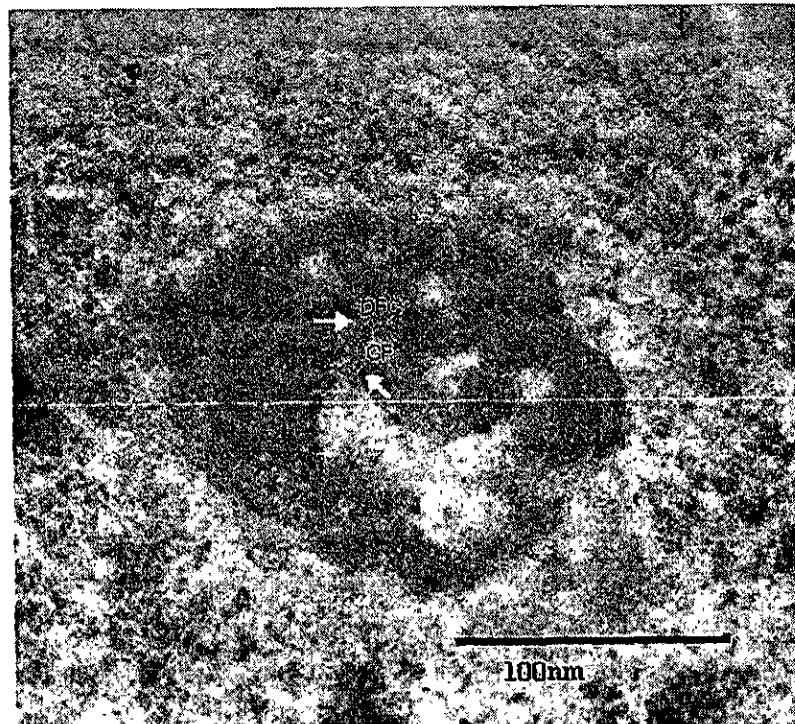


Fig. 26: Localización del snoRNA U14 en nucléolo de hepatocito de ratón. La señal (flechas) se encuentra distribuida principalmente en el componente fibrilar denso (DFC). CF: centros fibrilares.

A nivel ultraestructural se encontró señal hacia la región del componente fibrilar denso del nucléolo (fig. 26).

### **V.9 Análisis filogenético de la secuencia del snoRNA U14.**

Por último se hizo una recopilación de las secuencias del U14 reportadas hasta la fecha para analizarlas después de su alineación utilizando el programa de alineación múltiple Clustal W. Los resultados de la alineación de las secuencias (fig. 27) fueron analizados en el programa Phylip para generar una hipótesis evolutiva de la molécula mediante el método de parsimonia (fig. 28), todo esto con el propósito de evaluar el significado del U14 como un marcador filogenético. Para la generación del árbol mediante el método de parsimonia se tomó como grupo externo a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. A partir de esta hipótesis filogenética, se observa que la molécula del U14 no parece contradecir los árboles generados tomando en cuenta otros caracteres o moléculas, e incluso al revisar la historia natural de las especies implicadas, este árbol es consistente con otras hipótesis evolutivas más robustas (como las generadas con las secuencias de la subunidad pequeña del rRNA).

Con respecto a la historia evolutiva de la molécula *perse*, se puede notar que el árbol filogenético sugiere que la mayoría de estas moléculas han surgido en eventos de duplicación reciente. No obstante estas aseveraciones deben tomarse con cautela dada la longitud de las moléculas de U14, ya que son muy pequeñas como para que los análisis matemáticos a que son sometidas sean lo suficientemente robustos (ver Woese, 1987).



181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270
1 Cricetu	---	---	---	---	ACCTCC	TT-GGATGCTGAG-	240	-TGAC-	---	---	89
2 mouse8	---	---	---	---	ACCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGAC-	---	---	91
3 Hu14s133	CT-	---	---	---	ACCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGAG-	---	---	91
4 Hu14s135	CT-	---	---	---	TTCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGAG-	---	---	92
5 XLS133	---	---	A-	---	ACCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGAG-	---	---	192
6 XLS134	---	---	A-	---	ACCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGAGCA	---	---	96
7 mouse5	---	---	---	---	TCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-CGAA-	---	---	87
8 mouse6	---	---	---	---	TCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-CGAA-	---	---	87
9 XLhsc5	CT-	---	---	---	ACCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-CGAA-	---	---	96
10 XLhsc4	CT-	---	---	T-	ACCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-CGA-	---	---	96
11 XLhsc7	CT-	---	---	C-	ACCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-CGA-	---	---	95
12 Zmu141C	CAGGCTTGAGAGT-	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-GCAATGCA	---	---	129
13 Zmu141B	CAGGCTTGAGAGT-	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-GCAATGCA	---	---	129
14 Hu14s135	CAGGCTTGAGAGT-	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-CCATA	---	---	124
5 XLS133	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-GCGCGCCG-	---	---	124
6 XLS134	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-GCGCGCCG-	---	---	128
7 mouse5	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	140
8 mouse6	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	140
9 XLhsc5	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	128
10 XLhsc4	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	128
11 XLhsc7	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	139
12 Zmu141C	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	139
13 Zmu141B	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	139
14 Zmu141A	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	139
15 Zmu144	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	139
16 Zmu141D	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	139
17 Pu141	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	139
18 Sacharo	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	139
19 schizo	---	---	---	---	CCCTCC	TT-GGATGCTGAG-	---	-TGA	---	---	139
271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360
1 Cricetu	---	---	---	---	89	---	---	---	---	---	360
2 mouse8	---	---	---	---	91	---	---	---	---	---	360
3 Hu14s133	---	---	---	---	91	---	---	---	---	---	360
4 Hu14s135	---	---	---	---	92	---	---	---	---	---	360
5 XLS133	---	---	---	---	192	---	---	---	---	---	360
6 XLS134	---	---	---	---	96	---	---	---	---	---	360
7 mouse5	---	---	---	---	87	---	---	---	---	---	360
8 mouse6	---	---	---	---	87	---	---	---	---	---	360
9 XLhsc5	---	---	---	---	96	---	---	---	---	---	360
10 XLhsc4	---	---	---	---	96	---	---	---	---	---	360
11 XLhsc7	---	---	---	---	95	---	---	---	---	---	360
12 Zmu141C	---	---	---	---	129	---	---	---	---	---	360
13 Zmu141B	---	---	---	---	129	---	---	---	---	---	360
14 Zmu141A	---	---	---	---	124	---	---	---	---	---	360
15 Zmu144	---	---	---	---	124	---	---	---	---	---	360
16 Zmu141D	---	---	---	---	128	---	---	---	---	---	360
17 Pu141	---	---	---	---	140	---	---	---	---	---	360
18 Sacharo	---	---	---	---	128	---	---	---	---	---	360
19 schizo	TTTAATTA	AAATTTTT	TTGTGTTG	TTGG	CTT	172	---	---	---	---	360

Fig. 27: Alineación múltiple de las secuencias de snoRNA U14 de las siguientes especies: Cricet: *Crisetulus griseus*, Hu14s133: Humano intrón 3 de la proteína S13, Hu14s135: humano intrón 5 proteína S13, mouse 5, 6 y 8: intrones 5, 6 y 8 de la proteína cognate hsc70 de ratón, Pu141: *Solanum tuberosum*, Sacharo: *Saccharomyces cerevisiae*, Schizo: *Schizosaccharomyces pombe*, XLhsc4, 5 y 7: *Xenopus laevis* intrones 4, 5 y 7 de la proteína cognate hsc70, XLS133 y 4: *Xenopus laevis* del intrón 3 y 4 de la proteína S13, Zmu144: *Zea mays*.





## VI Discusión y conclusiones

### VI.1 El uso de sondas de gDNA permite localizar estructuras nucleares con RNA

En trabajos anteriores a este, ya se habían utilizado sondas de DNA viral total para localizar *in situ* la presencia del RNA de virus como el Ad2 (Jiménez-García y Spector, 1993; Jiménez-García, *et. al.*, 1993). Sin embargo no se ha reportado antes el uso de sondas de DNA genómico para localizar RNA celular. El uso de sondas de gDNA, extraído con los métodos convencionales de fenol-cloroformo y marcado con biotina por *nick translation*, descrito en este trabajo, permitió la detección ultraestructural *in situ* de partículas nucleares conteniendo RNA.

Se han reportado otras técnicas para localizar de manera preferente el RNA, como es el caso de la tinción para ribonucleoproteínas con EDTA (Bernhard, 1969). También hay otras pruebas que localizan de manera indirecta el RNA, como la del marcado con RNasa (Bendayan, 1981) o con inmunodetección después de incubar con la enzima poliadenilato nucleotidil transferasa (Thiry, 1993).

La hibridación *in situ* es un método diseñado para localizar específicamente y de manera directa, las partículas que contienen secuencias de ácidos nucleicos en los compartimentos celulares (Gall y Pardue, 1969; John, *et. al.*, 1969). RNAs celulares específicos, tales como el rRNA, RNA mitocondrial, UsnRNAs, poly (A), y secuencias Alu, han sido localizadas por hibridación *in situ* ultraestructural con sondas específicas (Puvion-Dutilleul y Puvion, 1996).

El método que presentamos aquí es específico para localizar RNA, puesto que la reacción de hibridación se lleva a cabo en condiciones no desnaturalizantes. Se debe recordar que la mayoría del DNA se encuentra en doble cadena, y ésta tendría que abrirse (desnaturalizar) para poder ser detectada por hibridación con sondas complementarias. Al analizar los resultados (figs. 15, 16 y 17) se observa la ausencia de señal en la cromatina compacta, lo cual viene a corroborar la especificidad del método. Más aún, al llevar a cabo el ensayo de hibridación *in situ* con una incubación previa con RNasa (fig. 18), se corrobora que la molécula que se detectó en los ensayos anteriores es degradada por este tratamiento.

Este método es al mismo tiempo muy sensible, ya que puede detectar bajas cantidades de RNA en el núcleo. Esto está relacionado de manera muy estrecha con la concentración de sonda utilizada para la hibridación. Como se muestra en los resultados, mientras más concentrada es la sonda, genera una señal más intensa (Figs. 16 y 17).

Como se observa en la figura 15, el nucléolo presenta escasa señal a pesar de que se sabe que existe un gran número de copias de rRNA produciéndose y madurando en él. Esto se explica con base en el punto anterior. Tomando en cuenta que el genoma haploide de humano contiene aproximadamente 3213 megabases (The National Human Genome Research Institute, USA) y el gen de rDNA presenta aproximadamente 2.6 megabases en las 200 copias (incluyendo los espaciadores transcritos) del genoma; la sonda que localiza rRNA representa tan solo un 0.08% del total de la sonda de gDNA utilizada. Por esta razón (baja concentración) es que explicamos la falta de señal en nucléolo.

**VI.2 La hibridación *in situ* ultraestructural con sondas de gDNA puede usarse para analizar el metabolismo de los RNAs intranucleares.**

El método de marcado por *nick translation* está basado en la acción conjunta y secuencial de dos enzimas (Rigby, *et. al.*, 1977). La primera es la DNasa I de páncreas bovino, la cual es una deoxiribonucleasa que tiene como sustrato al DNA de doble cadena. Su mecanismo de acción se da en dos pasos, como se explica en la figura 29, y genera extremos 5' monoesterificados (en Weir, 1993).

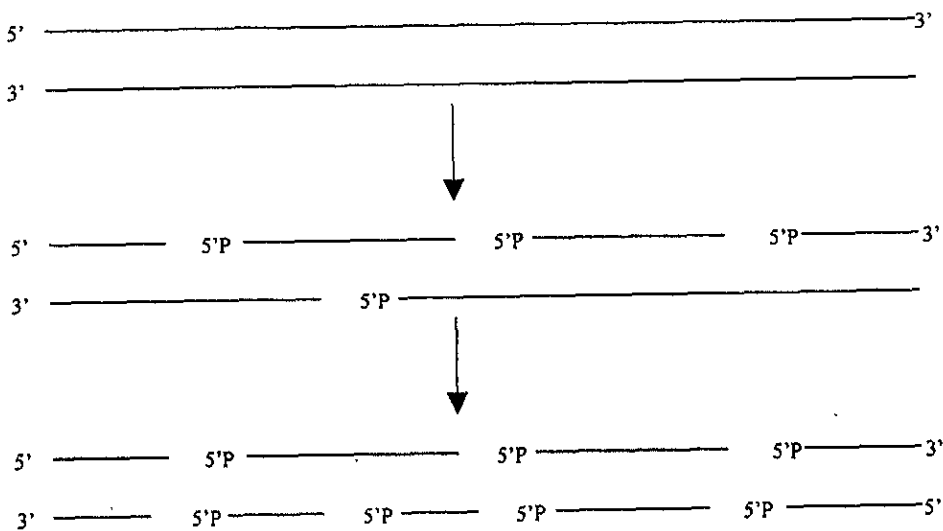


Figura 29: Mecanismo en dos pasos de la DNasa I de páncreas bovino. Esta es la enzima que forma los "nicks" o "pellizcos" que reconoce la DNA pol I. Además en el segundo paso de su reacción genera fragmentos más pequeñas que el sustrato original.

Esta enzima genera el sustrato propicio para la DNA pol I de *Escherichia coli*, la cual reconoce los “nicks” y utiliza los extremos 3’-OH terminal libres. Debido a que es una enzima que esta involucrada en procesos de reparación en *E. coli*, presenta varias propiedades características. Tiene actividad de nucleasa 5’ → 3’, por lo que al reconocer su sustrato empieza a quitar los nucleótidos de la cadena preexistente. Después actúa su propiedad de polimerasa 5’ → 3’, y tomando como molde la cadena complementaria resintetiza la cadena antes degradada usando los nucleótidos trifosfatados (dNTPs) que hay en el medio (fig. 30). De esta propiedad se toma ventaja para los sistemas de marcaje *in vitro*. Al substituir uno de los 4 nucleótidos que forman el DNA por un análogo con isótopos radioactivos o un hapteno, como el caso de la digoxigenina o la biotina, se pueden generar sondas con elementos que los distinguen, y pueden ser localizados después gracias a ésta distinción con el resto de las moléculas.

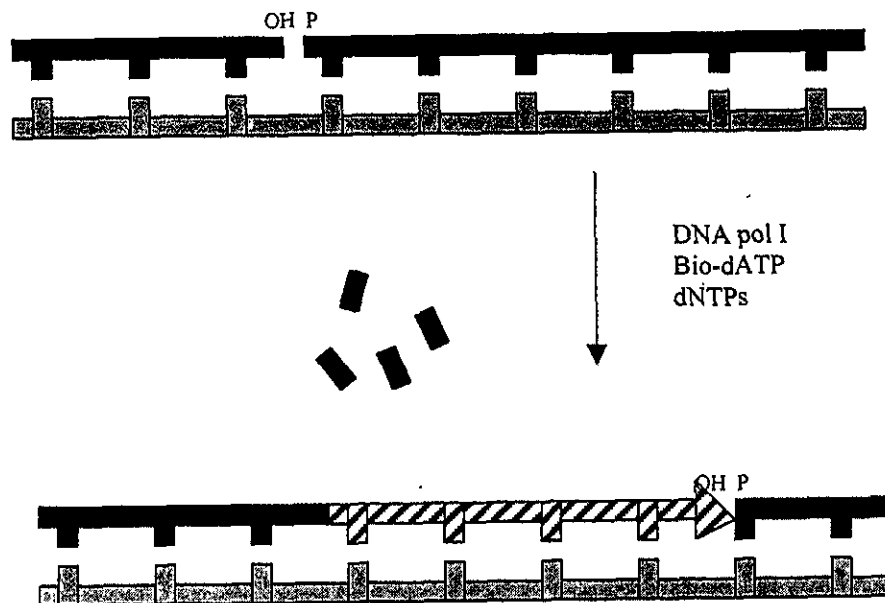


Figura 29: Reacción de *nick translation*. La DNA pol I reconoce los nicks generados por la DNasa I, resintetizando la cadena usando como molde la antiparalela y utilizando los dNTPs del medio. El *nick* se va recorriendo a lo largo de la cadena, de ahí el nombre de *nick translation*.

En el presente trabajo utilizamos marcaje no radiactivo con bio-14-dATP, que lleva incorporada la vitamina biotina (Langer, *et. al.*, 1981). La biotina ha sido ampliamente utilizada para hibridación *in situ* tanto de fluorescencia como ultraestructural (en Segura-Valdez, *et. al.*, 1997) ya que puede ser detectada fácilmente con el uso de avidina o estreptavidina acoplada a fluorocromos o a partículas de oro coloidal.

Al utilizar el gDNA como sustrato para la reacción de *nick translation*, partimos de la idea de que una molécula muy grande terminaría siendo cortada en pedazos más pequeños (que a su vez incorporarían bio-14-dAMP) por la acción de la DNasa I (fig. 29). Esto se corroboró con el gel de agarosa que muestra la generación de fragmentos de entre 100 y 500 pb (fig. 13).

Debido a la manera en que la DNasa genera los fragmentos, es de esperarse que mientras se prolongue el tiempo de la reacción, ésta generará fragmentos cada vez más pequeños. De hecho si la reacción es de tiempos largos y la concentración de la DNasa I es alta, puede llegar a degradar la cadena hasta mononucleótidos (en Weir, 1993). Con base en esto, se plantea que a tiempos más largos de digestión habrá más sitios de corte en el DNA.

Debido a que el DNA de eucariontes se encuentra formado por exones e intrones (pag. 9), nuestro método de marcaje está generando sondas con ambas secuencias, las cuales localizarán preferentemente RNAs precursores (en el caso de mensajeros, pre-mRNAs), esto es, localizarán los RNAs que todavía tienen intrones.

Al extender el tiempo de digestión con la DNasa I, la posibilidad de generar sondas con secuencias de intrones y exones separadas, aumenta. Estas sondas son capaces de unirse tanto a RNAs precursores como maduros (fig. 31). Con base en este razonamiento planteamos que a tiempos cortos de digestión estamos localizando preferentemente sitios donde el RNA se encuentra en estado de menor procesamiento, mientras que con tiempos largos de digestión localizamos además sitios con RNAs en estado de maduración avanzado.

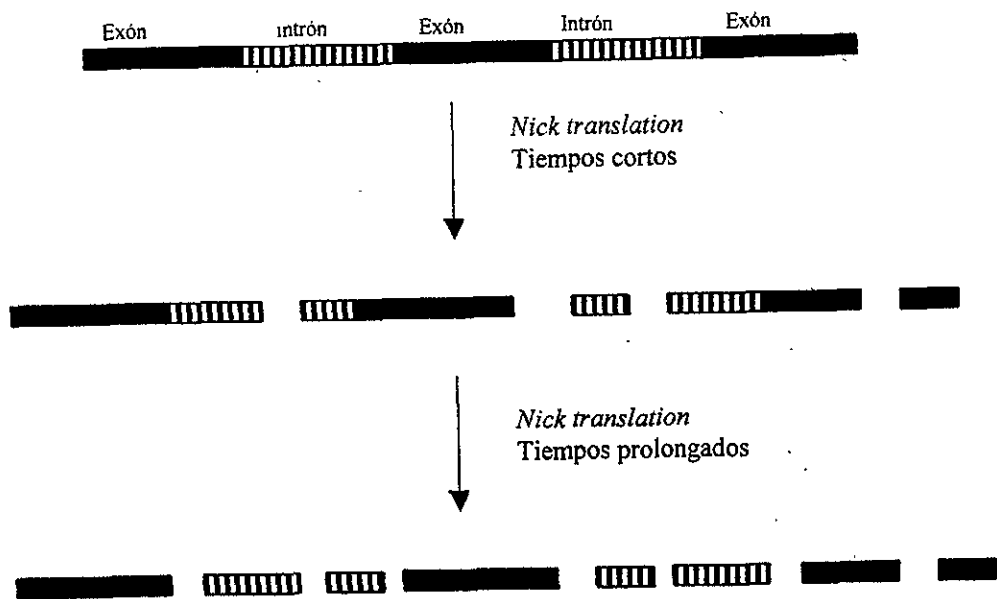


Figura 31: Esquema que muestra la generación de sondas de diferentes tamaños (y secuencias) a partir de gDNA mediante *nick translation*.

### VI.3 La hibridación *in situ* ultraestructural localiza de manera directa ácidos nucleicos en partículas nucleares.

Como ya se mencionó, existen otras técnicas que permiten la localización de manera indirecta de las moléculas de RNA en el núcleo (uso de enzimas e inmunodetección, por

ejemplo). Pero cuando se usan sondas de DNA para hibridación *in situ*, se está detectando de manera directa la secuencia que es complementaria en la célula.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, reportamos la presencia de RNA en subestructuras nucleares en las que previamente se ha corroborado la existencia de tal ácido nucleico. Tal es el caso de las fibras pericromatinianas y los gránulos intercromatinianos, los cuales están involucrados en la dinámica del metabolismo del pre-mRNA, tanto en su transcripción como maduración (ver fig. 11).

Al utilizar sondas generadas con tiempos largos de digestión, reportamos la existencia de señal en los gránulos pericromatinianos, por lo que postulamos que son sitios que contienen RNA en estados de maduración avanzados.

Aunque los PCGs no se han estudiado tan bien como las otras partículas nucleares (PF, ICG y nucléolo), existen líneas de evidencia que apoyan el hecho de que contienen mRNA ya procesado. Recientemente se ha mostrado que mediante el uso de espectroscopía de pérdida de energía, que los PCGs tienen un alto contenido de fósforo (Vázquez-Nin, *et. al.*, 1996).

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los PCGs contienen mRNA maduro y que pueden ser sitios de almacén y/o procesamiento del mismo.

#### VI.4 El U14 snRNA está vinculado al metabolismo del mRNA y del rRNA

La presencia del U14 snRNA en intrones de los genes de mRNAs y su participación en el procesamiento del rRNA ha sido fuertemente apoyada por estudios bioquímicos (Maxwell y Fournier, 1995). En el presente trabajo corroboramos la presencia de la secuencia codificante del U14 en el intrón 5 del gen *hsc70* utilizando oligos que amplifican el intrón completo por PCR (figs. 19 y 20).

Aunado a esto pudimos detectar *in situ* la presencia del U14 en el nucléolo con microscopía de fluorescencia (fig. 24). Además reportamos su localización ultraestructural en la región del componente fibrilar denso del nucléolo (fig. 26), esto ya había sido reportado pero con microscopía confocal, lo cual no provee la resolución que obtuvimos con el microscopio electrónico. Estos datos aportan el sustento morfológico que propone la intervención del U14 en los primeros pasos del procesamiento del pre-rRNA.

Se sabe que el U14 colocaliza en algunos sitios del nucléolo con el U3 (Beven, et. al., 1996) y que ambos están estrechamente involucrados en el procesamiento del 18S (Mougey, et. al., 1993; Maxwell y Fournier, 1995; Gerbi, 1997). Se ha propuesto que ambos interactúan con el pre-rRNA por apareamiento de bases, a diferencia de otros snoRNAs como el U8 (Rivera-Leon y Gerbi, 1997). El U3 además continúa unido por más tiempo con el pre-rRNA ya que se postula que participa en varios pasos de la maduración, a diferencia del U14 que solo participa en los eventos iniciales (Gerbi y Borovjagin, 1997). Es por esta razón que nosotros encontramos al U14 sólo en el DFC del nucléolo, y no en el resto de los componentes nucleolares. Esto apoya una vez más la intervención del U14 en



los eventos tempranos de la maduración del pre-rRNA, los cuales podrían ser el corte del ETS 5' o la pseudouridinación ( $\psi$ ) que también ocurre en los primeros estadios del pre-rRNA.

#### **VI.5 El U14 snRNA se encuentra en partículas que morfológicamente corresponden a los cuerpos espiralados (CBs).**

Los CBs son más comunes en célula transformadas y cancerosas, que en células normales (Spector, *et. al.*, 1992; Ochs, *et. al.*, 1994). Como se muestra en la figura 25, la hibridación *in situ* con la sonda de U14 detectó señal en pequeños cuerpos esféricos de aproximadamente 1 $\mu$ m de diámetro, los cuales corresponden por su morfología, dimensiones y ubicación a los CBs presentes en células HeLa.

Este es el primer reporte de la presencia del U14 en CBs, en contraposición de trabajos que aseguran que no encontrarlo en estas partículas (Beven, *et. al.*, 1996). La misma situación se presentaba con el U3, ya que se afirmaba que no estaba presente en los CBs. No fue sino hasta que se implementó el uso de sondas de DNA con la secuencia completa del U3, que se pudo localizar en pequeñas cantidades en los CBs (Jiménez-García, *et. al.*, 1994).

Se sabe de la presencia de tanto de la fibrilarina como del U3 en CBs, y también se ha propuesto que ambas moléculas en conjunto con el U14 podrían formar un complejo ribonucleoproteico denominado procesoma, el cual actúa en conjunto en el procesamiento del pre-rRNA (Maxwell y Fournier, 1995). La presencia del U14 en los CBs apoyaría la

hipótesis de que la función de los CBs es la de procesamiento y/o transporte de algunos snRNAs involucrados la maduración del rRNA. Recientemente se han detectado los espaciadores intergénicos del RNA policistrónico del U14 de plantas en los CBs, lo cual apoya la idea anterior (Brown y Shaw, 1998).

Estos datos proponen que las cajas con interrogación de la vía de procesamiento y transporte de snoRNAs podrían corresponder al menos en parte o tal vez del todo a los CBs (fig. 11). Cabe mencionar que es necesario combinar el método de hibridación *in situ* con la inmunolocalización de la proteína p80 coilina para corroborar la colocalización de ambas moléculas, trabajo que estamos desarrollando en nuestro laboratorio.

#### **VI.6 La sonda del U14 snRNA generada por PCR localiza la expresión del U14 en células en cultivo y tejidos.**

Utilizando sondas de DNA conteniendo el intrón 5 del gen *hsc70*, logramos detectar la expresión del U14 en diferentes especies, de manera similar a resultados anteriores usando como sonda oligos de las regiones conservadas (Trinh-Rohlik y Maxwell, 1988).

Nuestra sonda heteróloga no logró detectar la expresión del U14 en tejido de ave. Probablemente esto se debió a las diferencias en secuencia que existen entre aves y mamíferos. En el resto de las muestras se detectó la presencia del U14 (fig. 22), no obstante en el caso de las células HeLa la banda se presentó ligeramente con menor peso molecular. La diferencia que existe entre la secuencia del U14 de ratón y humano es de tan solo 3 nucleótidos en longitud y hay doce posiciones en las que no coinciden los nucleótidos entre

ambas (Lui y Maxwell, 1990). A pesar de esto no tenemos elementos para explicar la diferencia en cuanto a la banda detectada en células cancerosas. Probablemente el proceso patológico esté caracterizado también por la falta de reconocimiento de las secuencias conservadas que se propone están vinculadas con la maduración del U14 (Xia y Maxwell, 1997) y que podrían proteger a la molécula de la degradación excesiva por el proceso exonucleolítico involucrado en su maduración (Balakin, *et. al.*, 1996; Ganot, *et. al.*, 1997).

También cabe señalar la presencia de una banda de alto peso molecular que fue detectada en la muestra perteneciente a las células NRK. En este caso puede suceder que nuestra sonda haya reconocido al U14 unido al pre-RNA ya que la banda esta ligeramente por encima de la banda de 9.4 kb, y el precursor 45S pesa aproximadamente 13 kb. La existencia de múltiples sitios de contacto entre el U14 y el pre-rRNA apoya esta conclusión (Liang y Fournier, 1995; Morrissey y Tollervey, 1997).

Con respecto al análisis densitométrico se encontró que la mayor producción de U14 se detectó en tejido de testículo de embrión de ratón (17 días). En este estadio de la vida embrionaria se está a un día del nacimiento, por lo que la elevada producción del U14 podría estar en parte relacionada con los preparativos para tal evento. No obstante, también se trabajó con timo de embrión de la misma etapa y no se encontró esta expresión aumentada. La razón puede deberse a que el testículo embrionario empieza a tener una producción elevada de esteroides a partir del día 12, a diferencia incluso con el ovario que presenta una actividad esteroideogénica baja. Puede ser que el U14 esté vinculado de alguna manera con el metabolismo acelerado de la producción de esteroides, quizá proveyendo de

la cantidad requerida de ribosomas maduros para la traducción de las proteínas vinculadas con tales procesos.

**VI.7 El análisis filogenético de la molécula del U14 sugiere que la aparición de diferentes copias del U14 en vertebrados y plantas se dio por eventos de duplicación reciente de genes.**

Moléculas como el rRNA de la subunidad pequeña de los ribosomas, han sido utilizadas para inferir filogenias (Sogin, *et. al.*, 1986; Woese, 1987). Esto apoya la división de los organismos vivos en tres grandes linajes: Archaea, Bacteria y Eukarya.

Se han utilizado también otras moléculas para distinguir la relación de grupos más cercanos entre sí, y en algunas ocasiones los datos son diferentes a los obtenidos con las secuencias de rRNA (Saccone, *et. al.*, 1995).

Para que una molécula pueda ser usada como marcador molecular debe cumplir con ciertas características.

- A) La molécula debe estar presente en varios grupos, por lo que se puede inferir que todas provienen de un ancestro común.
- B) Alto grado de constancia en la función.
- C) Diferentes posiciones de su secuencia cambian en diferentes proporciones.
- D) Presenta varios dominios.
- E) Facilidad para ser secuenciada
- F) Deben ser suficientemente largas para someterse a un análisis estadístico.

La molécula del U14 cumple con estas características, a excepción de la última. Su presencia desde grupos de eucariontes ancestrales como *Giardia* y su calidad de molécula esencial, así como la presencia de la fibrilarina (proteína nucleolar relacionada con el U3 y el U14) desde el dominio *Archaea* (Agha Amiri, 1994), nos hizo analizar la posibilidad de utilizarla como marcador molecular.

Los resultados nos sugieren la aparición del U14 en plantas y vertebrados como eventos de duplicación reciente de genes, como se ha identificado para otros genes en plantas (Moniz de Sá y Drouin, 1996). También pudimos corroborar que se comporta como otras moléculas (como el rRNA) generando árboles filogenéticos que van de acuerdo con la historia natural de los organismos que lo presentan.

A pesar de esto es necesario incursionar en el análisis comparativo de estructuras secundarias (actualmente trabajamos en eso en el laboratorio), ya que parece ser que en moléculas tan pequeñas lo que tiende a conservarse es la estructura secundaria, más que la secuencia (Brown y Pace, 1991)

## Referencias

- Agha Amiri K. (1994). Fibrillar-like proteins occur in the domain Archaea. *J. Bacteriol.* 176: 7, 2124-27.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD, **Molecular Biology of the Cell**, Garland Publishing, USA, 1994, 1294 pp.
- Andrade LEC, Chan EKL, Raska I, Peebles CL, Roos B and Tan EM.(1991). Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body : immunological characterization and cDNA cloning of p80 coilin. *J. Exp. Med.* 173: 1407-19.
- Asimov I. **Introducción a la ciencia II. Ciencias biológicas.** 2ª ed. Orbis, México, 1985, 837pp.
- Bachelier JP, Puvion E, Zalta JP. (1975). Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin RNA protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. *Eur. J. Biochem.* 58: 327-37.
- Balakin AG, Lempicki RA, Huang GM and Fournier MJ. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* U14 small nuclear RNA has little secondary structure and appears to be produced by post-transcriptional processing. *J. Biol. Chem.* 269: 1, 739-46.
- Balakin AG, Smith L and Fournier MJ. (1996). The RNA world of the nucleolus : Two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell*, 86: 823-34.
- Banerjee AK. (1980) 5'-terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.*, 44: 175-205.
- Barbhaiya H, Leverette RD, Liu J and Maxwell ES. (1994). Processing of U14 small nucleolar RNA from three different introns of the mouse 70-kDa-cognate-heat-shock-protein pre-messenger RNA. *Eur. J. Biochem.* 226: 765-71.
- Baurén G and Wieslander L. (1994). Splicing of Balbiani Ring 1 Gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell*, 76: 183-92.
- Belfort M and Weiner A. (1997). Another bridge between kingdoms: tRNA splicing in archaea and eukaryotes. *Cell*, 89: 1003-1006.
- Berg P. and Singer M. **Dealing with genes. The language of heredity.** University Science Books, USA, 1992, pp 50.
- Berget SM and Sharp PA. (1977) A spliced sequence at the 5'-terminus of adenovirus late mRNA. *Brookhaven Sym. Biol.* May 12-20: 29,332-44.

- Bernhard-W. (1969) A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastructural Res.* 27: 250-65.
- Bendayan M. (1981). Ultrastructural localization of nucleic acids by the use of enzyme gold complexes. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 531-
- Beven AF, Lee R, Razaz M, Leader DJ, Brown JSW and Shaw PJ. (1996). The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *J. Cell Sci.*, 109: 1241-51.
- Bohmann K, Ferreira J, Santama N, Weis K and Lamond AI. (1995) Molecular analysis of the coiled body. *J. Cell Sci. Suppl*19: 107-13.
- Bousquet-Antonelli C, Henry Y, Gélunge JP, Caizergues-Ferrer M and Kiss T. (1997). A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs. *EMBO J.* 16: 4769-75.
- Brown JW and Pace NR. (1991). Structure and evolution of ribonuclease P RNA. *Biochimie*, 73:689-97.
- Brown JWS and Shaw PJ.(1998). Small nucleolar RNAs and pre-rRNA processing in plants. *The Plant Cell*, 10: 649-57.
- Busch H and Rothblum L.(eds.). **The Cell Nucleus. rDNA, Part A.**, Academic Press, 1982, New York, USA.
- Caffarelli EA, Fatica S, Prislei E, De Gregorio E, Fragapane P and Bozzoni I. (1996). Processing of the intron-encoded U16 and U18 snoRNAs: The conserved C and D boxes control both the processing reaction and the stability of the mature snoRNA. *EMBO J.* 15: 1121-31.
- Carmo-Fonseca M, Ferreira J and Lamond AI. (1993). Assembly of snRNPs-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure . *J. Cell Biol.* 120: 841-52.
- Carmo-Fonseca M, Tollervy D, Pepperkok R, Barabino SM, Merdes A, Brunner C, Zamore PD and Hurt E (1991). Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery. *EMBO J.* 10: 1, 195-206.
- Carmo-Fonseca M, Pepperkok R, Carvalho MT and Lamond AI. (1992). Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs in coiled bodies. *J. Cell Biol.* 117: 1-14.
- Carter KC, Taneja KL and Lawrence JB (1991). Discrete nuclear domains of poly(A) RNA and their relationship to the functional organization of the nucleus. *J. Cell Biol.* 115: 1191-1202.

Chamberland H and Lafontaine JG. (1993). Localization of snRNP antigens in nucleoli-associated bodies: study of plant interphase nuclei by confocal and electron microscopy. *Chromosoma*, 102: 220-26.

Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 1, 156-9.

Dunbar DA and Baserga SJ. (1998). The U14 snoRNA is required for 2'-O-methylation of the pre-18S rRNA in *Xenopus* oocytes. *RNA*, 4:2, 195-204.

Dworniczak B and Mirault ME. (1987). Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucleic Acids Res.* 15:13, 5181-97.

Enright C and Sollner-Webb B. Ribosomal RNA processing in vertebrates, En Higgins SJ and Hames BD. (eds.) **RNA processing. A practical approach . Vol II.** (1994), Oxford University Press, USA, pp. 135-71.

Fakan S and Bernhard W. (1971). Localization of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Exp. Cell Res.* 67: 129-41.

Fakan S and Nobis P. (1978). Ultrastructural localization of transcription sites and of RNA distribution during the cell cycle of synchronized CHO cells. *Exp. Cell Res.* 113: 327-37.

Fakan S and Puvion E. (1980). The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int. Rev. Cytol.* 65: 255-99.

Fakan S, Leser G and Martin TE. (1984). Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J. Cell Biol.* 98: 358-63.

Farrel RE Jr. **RNA methodologies . A laboratory guide for isolation and characterization.** Academic Press, USA, 1993, 317 pp.

Feinberg AP and Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132:1, 6-13

Freeland JH. **El ADN: clave de la vida.** CONACyT, México, 1981, pp 21.

Fu X-D and Maniatis T. (1990). Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized in discrete regions in the nucleus. *Nature*, 343: 437-44.

Fu X-D and Maniatis T. (1992a). Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science*, 256: 535-38.

Fu X-D, Mayeda A, Maniatis T, and Krainer AR. (1992b). General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities in vitro and both affect alternative 5' and 3' splice site selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 11224-28.



Furuichi Y, LaFiandra A and Shatkin AJ (1977). 5' Terminal structure and mRNA stability. *Nature*, 266:5599, 235-9.

Gall J and Pardue ML (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 63: 378- 81.

Ganot P, Caizergues-Ferrer M and Kiss T. (1997). The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. *Gen. Dev.* 11: 941-56.

Ge H, Zuo P and Manley JL. (1991). Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators. *Cell* 66: 373-82.

Gelinas RE, Chow LT, Roberts RJ, Broker TR and Klessig DF. (1977) The structure of adenovirus type 2 messenger RNAs. *Brookhaven Sym. Biol.* May 12-20: 29, 345-47.

Gerbi SA. (1997). The nucleolus: then and now. *Chromosoma*, 105:385-87.

Gerbi SA and Borovjagin A. (1997). U3 snoRNA may recycle through different compartments of the nucleolus. *Chromosoma*, 105: 401-406.

Ghetti A, Piñol-Romas, Michael WM, Morandi C and Dreyfuss G. (1992). HnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. *Nucleic Acids Res.* 20:14, 3671-8.

HsuChen CC and Dubin DT. (1976). Di-and trimethylated congeners of 7-methylguanine in Sindbis virus mRNA. *Nature* , 264:5582, 190-1.

Huang S and Spector DL (1991). Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors. *Genes Dev.* 5: 2288-2302.

Huang S and Spector DL (1992). U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*89: 305-8.

Huang S, Deerinck TJ, Ellisman MH and Spector DL. (1997). The dynamic organization of the perinucleolar compartment in the cell nucleus. *J. Cell Biol.* 137:5, 965-74.

Huang S, Deerinck TJ, Ellisman MH and Spector DL. (1998). The perinucleolar compartment and transcription. *J. Cell Biol.* 143:1, 35-47.

Jiménez-García LF.(1988) **El nucléolo: Relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas.** TESIS DOCTORAL. Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM.

Jiménez-García LF, Elizundia JM, López-Zamorano B, Maciel A, Zavala G, Echeverría OM and Vázquez-Nin GH. (1989). Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protocists. *BioSystems*, 22:103-16.

Jiménez-García LF and Spector DL. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell*, 73: 47-59.

Jiménez-García LF, Green SR, Mathews MB and Spector DL. (1993). Organization of the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI and virus-associated VA RNA<sub>1</sub> in adenovirus-2-infected HeLa cells. *J. Cell Sci.* 106: 11-22.

Jiménez-García LF, Segura-Valdez M de L, Ochs RL, Rothblum LI, Hannan R and Spector DL. (1994). Nucleologenesis: U3 snRNA containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol. Biol. Cell*, 5: 955-66.

John HI, Birnstiel ML and Jones KW. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223: 912-13.

Kenan DJ, Query CC and Keene JD. (1991). RNA recognition: Towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16: 214-20.

Kendrew J and Lawrence E, eds. **The encyclopedia of molecular biology**. Blackwell Science Ltd, USA, 1994, 1165 pp.

Konarska MM, Padgett RA and Sherr PA (1984). Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. *Cell*, 38:3, 731-6.

Krainer AR, Mayeda A, Kozak D and Binns G. (1991). Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K and *Drosophila* splicing regulators. *Cell* 66: 383-94.

Krämer A and Utans U, (1991). Three protein factors (SF1, SF3 and U2AF) function in pre-splicing complex formation in addition to snRNPs. *EMBO J.* 10: 1503-9.

Lafontaine JG. (1965). A light and electron microscope study of small spherical nuclear bodies in meristematic cells of *Allium cepa*, *Vicia faba* and *Raphanus sativus*. *J. Cell Biol.* 26: 1-17.

Lamond AI. (1993) The spliceosoma. *BioEssays*, 15:9, 595-603.

Lamond AI and Earnshaw WC. (1998) Structure and function in the nucleus. *Science*, 280: 547-87.

Langer PR, Waldrop AA, and Ward DC (1981). Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:11 6633-37.

- Leader DJ, Sanders JF, Waugh R, Shaw P and Brown JW. (1994). Molecular characterisation of plant U14 small nucleolar RNA genes: closely linked genes are transcribed as poly cistronic U14 transcripts. *Nucleic Acids Res.* 22: 24, 5196-5203.
- Leverette RD, Matthew TA and Maxwell ES. (1992). Mouse U14 snRNA is a processed intron of the cognate hsc70 heat shock pre-messenger RNA. *Cell*, 71: 1215-21.
- Lewis JD and Izaurralde E. (1997) The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur J Biochem* 247:2, 461-9.
- Liang WQ and Fournier MJ. (1995). U14 base-pairs with 18S rRNA: a novel snoRNA interaction required for rRNA processing. *Gen. Dev.* 9: 2433-43.
- Liu J and Maxwell ES. (1990). Mouse U14 snRNA is encoded in an intron of the mouse cognate hsc70 heat shock gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 22, 6565-71.
- Lührmann R, Kastner B and Bach M. (1990). Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *Biochem. Biophys. Acta* 1087; 265-92.
- Matera AG and Ward DC. (1993). Nucleoplasmic organisation of small nuclear ribonucleoproteins in cultured human cells. *J. Cell Biol.* 121: 715-27.
- Matera AG, Frey MR, Margelot K and Wolin SL. (1995). A perinucleolar compartment contains several RNA polymerase III transcripts as well as the polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I. *J. Cell Biol.* 129:5, 1181-93.
- Maden BEH and Hughes JMX. (1997). Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem. *Chromosoma*, 105: 391-400.
- Maniatis T. (1991). Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Science*, 251: 33-34.
- Maxwell ES and Fournier MJ. (1995). The small nucleolar RNAs. *Ann. Rev. Biochem.* 35: 897-934.
- Maxwell ES and Matin TE. (1986). A low-molecular-weight RNA from mouse ascites cells that hybridizes to both 18S rRNA and mRNA sequences. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 83:19, 7261-6.
- McClintock B. (1934) The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Z. Zellforsch. Mikr. Anat.* 21: 294-326.
- Meier ET and Blobel G. (1994). MAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria. *J. Cell Biol.* 127: 1505-14.
- Misteli T, Cáceres, JF and Spector DL. (1997). The dynamics of pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*, 387:6632, 523-7.

- Miyawaki H. (1974). Extranucleolar pyroninophilic substances in the liver cell nuclei of starve-refed mice as revealed by non-aqueous negative staining. *J. Ultrastruct. Res.* 47: 255-71.
- Moniz de Sá M and Drouin G. (1996) Phylogeny and substitution rates of Angiosperm Actin Genes. *Mol. Biol. Evol.* 13: 9, 1198-1212.
- Monneron A and Bernhard W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 266-88.
- Moore MJ, Query ChC and Sharp PA. Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome, in: Gesteland RF and Atkins JF, eds. **The RNA World**, 1993, CSHL press, USA, pp.303-357.
- Moreno Díaz de la Espina S, Risueño MC and Medina FJ. (1982). Ultrastructural. Cytochemical and autoradiographic characterization of coiled bodies in the plant cell nucleus. *Biol. Cell*, 44: 229-38.
- Morrissey JP and Tollervey D. (1997). U14 small nucleolar RNA makes multiple contacts with pre-ribosomal RNA. *Chromosoma*, 105: 515-22.
- Mougey EB, Pape LK and Sollner-Webb B. (1993). A U3 small nuclear ribonucleoprotein-requiring processing event in the 5' external transcribed spacer of *Xenopus* precursor rRNA. *Mol. Cell Biol.* 13: 10, 5990-98.
- Nicoloso M, Qu LH, Michot B and Bachellerie JP. (1996). Intron-encoded, antisense small nucleolar RNAs: The characterization of nine novel species points to their direct role as guides for the 2'-O-ribose methylation of rRNAs. *J. Mol. Biol.* 260: 178-95.
- Niu X, Hartshorne T, He XY and Agabian N. (1994). Characterization of putative small nuclear RNAs from *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 66: 49-57.
- Ochs RL, Stein TW and Tan EM. (1994). Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells. *J. Cell Sci.* 107: 385-99.
- Pederson T. (1998) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 26: 17, 3871-76.
- Pennisi E. (1997). How the nucleus gets it together. *Science*, 276: 1495-97.
- Petrov P and Sekeris CE. (1971). Early action of  $\alpha$ -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins, as revealed by electron microscopic observation. *Exp. Cell Res.* 69: 393-401.
- Potter S, Durovic, P and Dennis PP. (1995). Ribosomal RNA precursor processing by a eukaryotic U3 small nucleolar RNA-like molecule in archeon. *Science*, 268: 1056-60.

Puvion E and Moyne G. (1981). Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. *Exp. Cell Res.* 115: 79-88.

Ramón y Cajal S. (1903). Un sencillo método de coloración del retículo protoplásmico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab. Lab. Invest. Biol.* 2: 129-221.

Raska I, Ochs RL, Andrade LEC, Chan EKL, Burlingame R, Peebles C, Groul Dand Tan EM. (1990). Association between the nucleolus and the coiled body. *J. Struct. Biol.* 104: 120-27.

Raska I, Andrade LEC, Ochs RL, Chan EKL, Chang CM, Roos G and Tan EM. (1991). Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp. Cell Res.* 195: 27-37.

Raska I. (1995) Nuclear ultrastructures associated with the RNA synthesis and processing. *J. Cell. Biochem.*, 59: 11-26.

Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C and Berg P. (1977). Labeling deoxiribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-51.

Rivera-León and Gerbi SA.(1997). Delocalization of some small nucleolar RNPs after actinomycin D treatment to deplete early pre-rRNAs. *Chromosoma*, 105: 506-14.

Roeder RG. (1996). Nuclear RNA polymerases: role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription. *Methos Enzymol.* 273, 165-161.

Roth J. (1986). Post-embedding cytochemistry with gold-labeled reagents. A review. *J. Microsc.*, 143: 125.

Ruby SW and Abelson J (1988). An early hierarchic role of U1 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *Science*, 242: 1028-35.

Ruskin B, Zamore PD and Green MR. (1988). A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. *Cell*, 52: 207-19.

Saccone C, Gissi C, Lanave C and Pesole G. (1995). Molecular classification of living organisms. *J. Mol. Evol.* 40: 273-79.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). **Molecular Cloning. A Laboratory Manual.** 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York. CSHL Press, 9:16.

Segura-Valdez M de L. (1996). Disección Molecular del nucléolo *in situ*. Visualización de ácidos nucleicos nucleolares por hibridación in situ fluorescente y ultraestructural. TESIS DOCTORAL. Doctorado en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM, México.

Segura-Valdez M de L, López-Velázquez G y Jiménez García LF. **Hibridación *in situ* ultraestructural**, Ed. Plaza y Valdes, 1997, México.

Shatkin AJ. (1976) Capping of eukaryotic mRNAs. *Cell*, 9:4 PT 2, 645-53.

Sogin ML, Elwood HJ and Gunderson JH. (1986). Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 1383-87.

Sollner-Webb B. (1993). Novel intron-encoded small nucleolar RNAs. *Cell*, 75, 403-405.

Spector DL (1990). Higher order nuclear organization: three dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 147-51.

Spector DL, Fu DX and Maniatis T. (1991). Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J*. 10: 3467-81.

Spector DL, Lark G and Huang S. (1992). Differences in snRNP localization between transformed and non-transformed cells. *Mol. Biol. Cell*, 3: 555-69.

Spector DL. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9: 265-315.

Thiry M. (1993). Immunodetection of RNA on ultrathin sections incubated with polyadenylate nucleotidyl transferase. *J. Histochem Cytochem.* 41: 657-65.

Timchenko LT, Miller JW, Timchenko NA, DeVore DR, Datar KV, Lin L, Roberts R, Caskey CT and Swanson MS (1996). Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res.*, 24: 22, 4407-14.

Trinh-Rohlik Q. and Maxwell ES.(1988). Homologous genes for mouse 4.5S hybRNA are found in all eukaryotes and their low molecular weight RNA transcripts intermolecularly hybridize with eukaryotic 18S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res.* 16:13, 6041-56.

Tycowski KT, Shu MD and Steitz JA. (1996). A mammalian gene with introns instead of exons generating stable RNA products. *Nature*, 379: 464-66- Maden BEH and Hughes JMX. (1997). Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem. *Chromosoma*, 105: 391-400.

Vázquez-Nin GH and Bernhard W. (1971). Comparative ultrastructural study of perichromatin – and Balbiani ring granules . *J. Ultrastruct.* 36:842-60.

Vázquez-Nin GH and Echeverría OM. (1996). The polytene nucleus in morphological, cytochemical, and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. *Eur. J. Histochem.* 40: 7-16.

Watkins NJ, Gottschal KA, Neubauer G, Kastne B, Fabrizio P, Mann M and Lührmann R (1998). Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA-binding protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNP and constitute a common bipartite structure. *RNA*, 4: 12, 1549-68.

Weir AF. Nucleases. An overview. En: Burrell MM (ed.), **Methods in Molecular Biology, Vol. 16: Enzymes of Molecular Biology**, 1993, Humana Press, Totowa, NJ, PP. 7-16.

Will CL, Schneider C, Reed R, and Lührmann R (1999). Identification of Both Shared and Distinct Proteins in the Major and Minor Spliceosomes. *Science*, "84, 5422:2003-2005.

Woese CR. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 52:2, 221-71.

Wu J and Manley JL. (1989). Mammalian pre-mRNA branch site selection by U2 snRNP involves base pairing. *Genes Dev.* 3: 1545-61.

Xia L, Watkins NJ and Maxwell ES. (1997). Identification of specific nucleotid sequences and structural elements required for intronic U14 snoRNA processing. *RNA*, 3: 1, 17-26.

Zamore PD, Patton JG and Green MR. (1992). Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF. *Nature*, 355: 609-614.

## Lista de abreviaturas

7SLRNA	RNA de la partícula de reconocimiento del péptido señal
ASF/SF2	Factor de slicing alternativo/factor de splicing 2
Br-UTP	Bromo uridina trifosfatada
CBs	Coiled bodies
CTP	Citocina trifosfatada
DFC	Componente fibrilar denso
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNasa	Desoxiribonucleasa
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
ETS	Espaciador transcrito externo
FC	Centros fibrilares
FP	Fibras pericromatinianas
GC	Componente granular
GFP	Proteína verde fluorescente
hnRNA	RNA heterógeno nuclear
hnRNP	Ribonucleoproteínas heterógeno nucleares
ICG	Gránulos intercromatinianos
ITS	Espaciador transcrito interno
mRNA	RNA mensajero
NOR	Organizador nucleolar
NTS	Espaciador no transcrito
nt	Nucleótidos
PCG	Gránulos pericromatinianos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNBs	Cuerpos prenucleolares
pre-mRNA	RNA mensajero precursor
rDNA	DNA ribosomal
RNA	Acido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	PCR transcriptasa reversa
SAPs	Proteínas asociadas al spliceosoma
SC35	Componente de 35kD del spliceosoma
scRNA	RNA pequeño citoplásmico
snoRNA	RNA pequeño nucleolar
snRNA	RNA pequeño nuclear
snRNP	Ribonucleoproteína pequeña nuclear
Sr	Dominio serina arginina
tRNA	RNA de transferencia
U2AF	Factor Auxiliar de U2 snRNP
UsnoRNA	RNA pequeño nucleolar rico en uracilo