



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Los gránulos de *Lacandonia*

Caracterización por medio de inmunolocalización e hibridación *in situ* ultraestructural y aislamiento de una fracción enriquecida en gránulos

TESIS

Que para obtener el grado académico de:

29/11/97

DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

presenta:

LOURDES TERESA AGREDANO MORENO

Dir. de Tesis

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Los gránulos de *Lacandonia*

Caracterización por medio de inmunolocalización e hibridación *in situ*
ultraestructural y aislamiento de una fracción enriquecida en gránulos

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microscopía Confocal y en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM bajo la dirección del Dr. Luis Felipe Jiménez García.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por dirigirme la tesis y por su apoyo incondicional durante el desarrollo de la misma.

A la Dra. Estela Sánchez Quintanar y al Dr. Alfonso Carabez Trejo por sus valiosas sugerencias durante el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana, a la Dra. Ma. de Lourdes Segura Valdez, a la Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla y a la Dra. Vilma Maldonado Lagunas por revisar el manuscrito y por sus sugerencias para mejorarlo.

Al Dr. Antonio Lazcano Araujo del Laboratorio de Microbiología y al Dr. Alfonso Torreblanco del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por permitirme usar su equipo de laboratorio para realizar la extracción de DNA.

A la Biol. Ana Velasco Velasco por asesorarme en la extracción de DNA.

A la Universidad Nacional Autónoma de México donde me he formado profesionalmente.

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin y a la Dra. Olga Echeverría del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM por su apoyo en el desarrollo de la tesis.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) por otorgarme una Beca durante el primer año de desarrollo de la tesis.

ÍNDICE	2
RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	7
<i>Lacandonia schismatica</i>	
El núcleo interfásico de <i>L. schismatica</i>	9
- Cromatina	
- Estructuras no ribonucleoproteicas	
- Estructuras ribonucleoproteicas	
Procesamiento del pre-mRNA	12
- "Capping"	
- "Splicing"	
- Poliadenilación	
Estructuras intranucleares propuestas como sitios de almacén y/o transporte de mRNAs	19
- Gránulos de Balbiani (Beermann y Bahr, 1954)	
- Gránulos pericromatinianos (Watson, 1962)	
- Gránulos de <i>Lacandonia</i> (Jiménez-García <i>et al.</i> , 1992)	
OBJETIVOS	31

MATERIALES Y MÉTODOS	32
<ul style="list-style-type: none">- Microscopía electrónica- Inmunolocalización ultraestructural- Extracción y marcado de DNA genómico de <i>L. schismatica</i>- Hibridación <i>in situ</i> ultraestructural de RNA total- Aislamiento de los gránulos de <i>Lacandonia</i>	
RESULTADOS	45
<ul style="list-style-type: none">- Abundancia de los gránulos de <i>Lacandonia</i> en diferentes etapas del desarrollo de la flor- Localización de proteínas SR en los gránulos de <i>Lacandonia</i>- Detección de RNA total y poly(A)⁺RNA en los gránulos de <i>Lacandonia</i>- Aislamiento de los gránulos de <i>Lacandonia</i>	
DISCUSIÓN	54
<ul style="list-style-type: none">- La abundancia de los gránulos de <i>Lacandonia</i> varía durante el desarrollo de la flor- Los gránulos de <i>Lacandonia</i> contienen proteínas SR- Presencia de poly(A)⁺RNA en los gránulos de <i>Lacandonia</i>- Obtención de una fracción enriquecida en gránulos de <i>Lacandonia</i>	
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	63

-Artículo:

Agredano-Moreno, LT and Jiménez-García, LF. 2000. New evidence that *Lacandonia* granules are ultrastructurally equivalent to perichromatin and Balbiani ring granules. Biol. Cell. 92: 71-78.

Lista de abreviaturas

BRs	Anillos de Balbiani
GB	Gránulos de Balbiani
GICs	Gránulos intercromatinianos
GL	Gránulos de <i>Lacandonia</i>
CTD	Dominio carboxilo terminal de la subunidad grande de la RNA polimerasa II
GPCs	Gránulos pericromatinianos
CPSF	Factor de especificidad del rompimiento/poliadenilación
CstF	Factor de estimulación del rompimiento
CF I	Factor de rompimiento I
CF II	Factor de rompimiento II
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
FPCs	Fibras pericromatianas
HnRNPs	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares
MRNA	RNA mensajero
PAB II	Proteína II de unión a poly(A)
PAP	poly(A) polimerasa
PAP II	Proteína II de unión a Poly(A)
Pol II	RNA polimerasa II
Pre-mRNA	RNA pre-mensajero
Pre-rRNA	RNA pre-ribosomal
PBS	Amortiguador de Fosfatos Salino
PTA	Tinción de ácido fosfotúngstico
RNPs	Ribonucleoproteínas
SnRNA	Ácido ribonucleico pequeño nuclear
SnRNPs	Partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares
TBST	Amortiguador de Tris salino

RESUMEN

Los gránulos de *Lacandonia* (GL) son partículas ribonucleoproteicas extranucleolares de 32 nm de diámetro, que se localizan en los núcleos de la planta *Lacandonia schismatica*. Los GL son intermedios en tamaño y distribución entre las partículas nucleares conocidas como los gránulos intercromatinianos (GIs) y los gránulos pericromatinianos (GPCs). Los estudios citoquímicos e inmunocitoquímicos, indican que los GL son equivalentes a los GPCs y a los gránulos de los anillos de Balbiani (GB), característicos de los núcleos de mamíferos y dípteros, respectivamente. Para proporcionar evidencias adicionales de esa equivalencia, en este trabajo empleamos hibridación *in situ* e inmunolocalización ultraestructural para detectar la presencia de poly(A)⁺RNA y proteínas SR en los gránulos de *Lacandonia*, pues esos elementos moleculares están presentes en los GB y en los GPCs, respectivamente. Además, analizamos la cantidad de gránulos de *Lacandonia* durante el desarrollo de la flor, para establecer si su comportamiento es similar al de los GPCs. Finalmente, para iniciar estudios sobre el conocimiento detallado de su composición, se obtuvo una fracción enriquecida en GL. Los resultados indican que los GL contienen proteínas SR y poly(A)⁺RNA y que su número varía durante el desarrollo, lo que refuerza que son estructuras equivalente a los GPCs y los GB. La presencia de poly(A)RNA⁺ en los GL y en los GPCs, apoya la hipótesis de que estas partículas contienen mRNAs. Finalmente, la obtención de una fracción enriquecida en GL, permitirá en un futuro conocer su composición precisa y su función.

Summary

Lacandonia granules (LG), are 32 nm in diameter extranucleolar ribonucleoproteic particles found in the nuclei of the plant *Lacandonia schismatica*. LG are intermediate in size and distribution between the nuclear particles known as interchromatin granules (ICGs) and perichromatin granules (PCGs). Cytochemical and immunocytochemical studies show that LG are equivalent particles to PCGs and Balbiani granules (BG), present in mammalian and dipteran nuclei, respectively. With the purpose of provide additional evidence of that equivalence, in the present work we detect the presence of poly(A)⁺RNA and SR proteins by means of ultrastructural *in situ* hybridization and immunolocalization similarly as focused in GB and GPCs respectively. Also, we analyzed the amount of LG during flower development, with the purpose of know if their behavior is similar to GPCs. Finally, to know more about their composition, we obtained a fraction enriched in LG. The results show that LG contain SR proteins and poly(A)⁺RNA and that their density change during development. These finding support that these particles are equivalent to PCGs and BG. The presence of poly(A)⁺RNA in LG and PCGs, supports the suggestion that these particles contain mRNA. Finally, an enriched fraction of LG will allow in the future to know their precise composition and function.

INTRODUCCIÓN

Lacandonia schismatica

Lacandonia schismatica E Martínez & CH Ramos (Lacandoniaceae: Triuridales), es una planta endémica y rara (Diario Oficial, 1994) descubierta por Esteban Martínez en 1985 en el sotobosque de la selva Lacandona y descrita por él mismo y por Clara Ramos en 1989. Únicamente se ha encontrado en dos localidades de la Selva Lacandona. La primera se sitúa en el borde de la zona núcleo de la Reserva Integral de la Biosfera Montes Azules en el Municipio Ocosingo, Crucero Corozal, a 170 Km al sureste de Palenque, camino a Boca Lacatum, sobre la carretera fronteriza del Sur, Chiapas, México (15°45'08"N y 90°56'00"O) (Martínez y Ramos, 1989). La segunda localidad está dentro de la Reserva de Montes Azules, cerca de la Colonia Benito Juárez Miramar (16° 12'N y 91°13'O) (Reyes-García y Souza, 1995).

Su principal característica morfológica es la inversión espacial de los verticilos sexuales, con los estambres ocupando la parte central de la flor, rodeados por numerosos ovarios (Cronquist, 1988; Márquez-Guzmán et al., 1989; Martínez y Ramos, 1989; Martínez, 1994). Esta característica la hace única entre las angiospermas y ha motivado numerosos estudios para conocer su biología.

L. schismatica es una planta saprófita de aproximadamente 9 cm de altura, que no realiza fotosíntesis (Martínez y Ramos, 1989; Jiménez-García et al., 1998). Presenta una micorriza

vesículo-arbuscular (Palacios-Mayorga y Pérez-Silva, 1993). Tiene nueve cromosomas en el complemento haploide; el cual se caracteriza por presentar cuatro pares de cromosomas grandes y cinco pares de cromosomas pequeños (Davidse y Martínez, 1990). También se ha descrito un nuevo tipo de fecundación para la familia Lacandoniaceae, en la cual en pre-antesis los granos de polen germinan dentro de la antera; los tubos polínicos crecen entre las células del receptáculo y después se dirigen hacia los óvulos. Solo uno de ellos entra al saco embrionario por el micrópilo a través de una de las sinérgidas, presentándose la doble fecundación en lo que se conoce como reproducción cleistogámica (Márquez-Guzmán et al., 1993). La fecundación cleistogámica podría explicar la falta de variación génica encontrada en su localidad principal (Coello et al., 1993; Vazquez-Santana et al., 1998). La estructura celular de esta especie se ha estudiado con el microscopio electrónico de transmisión y con microscopía de fuerza atómica. El aparato de Golgi, las mitocondrias y el retículo endoplásmico de *L. schismatica* son similares a otras especies de plantas (Jiménez-García et al., 1998). El estudio del núcleo celular se ha abordado a nivel de microscopía electrónica con estudios citoquímicos, inmunocitoquímicos y de hibridación *in situ* (Jiménez-García et al., 1992; Agredano-Moreno et al., 1994; Agredano-Moreno y Jiménez-García 2000) y se han llevado a cabo los primeros estudios al microscopio de fuerza atómica de la estructura nuclear con cortes semifinos sin teñir de núcleos de ovarios de esta especie (Jiménez-García et al., 1998; Jiménez-García y Fragoso-Soriano, 2000).

El núcleo interfásico de *L. schismatica*

A nivel ultraestructural, se ha observado que el núcleo celular de *L. schismatica* presenta una doble envoltura nuclear a cuya cara interna se encuentra adosada la lámina nuclear, la cromatina presenta un patrón reticulado, componentes no ribonucleoproteicos y componentes ribonucleoproteicos (RNPs). La estructura general de los núcleos de esta especie es similar a la de las especies con un patrón reticulado (Jiménez-García et al., 1992). Sin embargo, hay variaciones importantes en la organización ultraestructural de los componentes RNPs nucleares, ya que no se encuentran las partículas ribonucleoproteicas típicas de los núcleos de animales y plantas como son los gránulos pericromatinianos y los gránulos intercromatinianos, presentes en los espacios pericromatiniano e intercromatiniano, respectivamente. En el caso de *L. schismatica* ambos dominios están ocupados por partículas intermedias en tamaño y distribución entre los gránulos mencionados anteriormente y a las que se han denominado “gránulos de *Lacandonia*” (Jiménez-García et al., 1992).

- Cromatina

El núcleo interfásico de *L. schismatica* es de tipo reticulado, es decir, con segmentos de heterocromatina formando una red en el nucleoplasma. En la periferia de la cromatina compacta se observa cromatina semicompacta formando delgadas hebras que se extienden hacia el espacio intercromatiniano (Jiménez-García et al., 1992; Agredano-Moreno et al., 1994). La naturaleza desoxirribonucleoproteica de la red se puso de manifiesto primero al microscopio óptico con la tinción de Feulgen específica para DNA y posteriormente al

microscopio electrónico con la tinción del ácido fosfotúngstico (PTA) preferencial para DNA y con inmunolocalización ultraestructural utilizando un anticuerpo que reconoce DNA. La red de cromatina se ha observado también mediante el análisis de cortes semifinos de núcleos de ovarios de *L. schismatica* al microscopio de fuerza atómica (Jiménez-García et al., 1998; Jiménez-García y Fragoso-Soriano 2000).

- Estructuras no ribonucleoproteicas

En los núcleos de esta especie se encuentran estructuras tipo complejo sinaptonémico (Jiménez-García et al., 1992), similares morfológicamente a los complejos sinaptonémicos típicos de la profase meiótica descritos por primera vez por Moses (1965). Al microscopio electrónico se observan como estructuras claras de aproximadamente 40 nm de ancho que se extienden a lo largo de la heterocromatina y que contienen un material fibroso. Con el tratamiento de EDTA preferencial para ribonucleoproteínas se observa una franja delgada de RNPs en la periferia del espacio claro de esta estructura (Agredano-Moreno et al., 1994). La ultraestructura de las estructuras tipo complejo sinaptonémico es similar a la de un complejo sinaptonémico típico pero a diferencia de estos últimos, no tiene la estructura tripartita característica de los complejos sinaptonémicos (Esponda, 1977).

- Estructuras ribonucleoproteicas

El componente ribonucleoproteico más conspicuo en los núcleos de esta planta es el nucléolo. Los núcleos de *L. schismatica* generalmente presentan dos nucléolos esféricos y compactos

con los componentes característicos de los nucléolos típicos como los centros fibrilares, el componente fibrilar denso, el componente granular y los centros fibrilares heterogéneos (Jiménez-García et al., 1992). El componente fibrilar del nucléolo de células de tejidos de animales y plantas contienen los genes ribosómicos (rDNA 18s, 5.8s y 28s), la RNA polimerasa I, las proteínas del organizador nucleolar que se tiñen con plata, fibrilarina y las fosfoproteínas C23 y B23 y puede ser el sitio donde se lleva a cabo la actividad transcripcional más abundante y el procesamiento temprano del pre-rRNA. El componente granular representa el sitio de procesamiento más tardío, maduración y almacenamiento de pre-ribosomas (Jiménez-García, et al., 1998).

En los núcleos de *L. schismatica* se observan fibras pericromatinianas (FPCs) que son estructuras ribonucleoproteicas localizadas en la periferia de la cromatina compacta. Las FPCs son estructuras universales que incorporan uridina tritiada rápidamente y que representan la contraparte morfológica de los transcritos nacientes de las moléculas de pre-mRNA (Bachelierie et al., 1975; Fakan et al., 1976; Fakan, 1994). En *L. schismatica* las FPCs se observan en el dominio pericromatiniano en continuidad con las partículas ribonucleoproteicas denominadas gránulos de *Lacandonia* con las cuales forman un arreglo fibrogranular.

También se observan en los núcleos de esta especie los cuerpos de Cajal. Estas estructuras RNPs fueron descubiertas hace casi 100 años por Santiago Ramón y Cajal (Ramon y Cajal, 1903) quien les dio el nombre de cuerpos accesorios del nucléolo. Recientemente, Gall (2000) los renombró "cuerpos de Cajal" en honor a su descubridor y están presentes en muchas

especies (en Matera, 1999). La importancia de estas estructuras radica en que contienen elementos relacionados con la maduración del pre-mRNA y del pre-rRNA como son la proteína nucleolar fibrilarina, las proteínas de la región del organizador nucleolar (NOR), la DNA topoisomerasa I , los snRNPs U1, U2, U4, U6 y U7, el factor auxiliar de “splicing” U2AF del snRNP U2 (Zhang et al., 1992), la proteína ribosomal S6 y el U3 snRNA (Jiménez-García et al., 1994) . En *L. schismatica* se observan como estructuras EDTA positivas que se contrastan con la tinción de plata para la región del organizador nucleolar (Jiménez-García et al., 1992).

Otro tipo de cuerpos nucleares presentes en los núcleos de *L. schismatica* son las estructuras anulares. Estas tienen un diámetro de 0.5 μm y consisten de un anillo externo denso al haz electrónico que rodea a una parte central de menor densidad electrónica enriquecida en ribonucleoproteínas (RNPs). Se localizan en el nucleoplasma o bien en estrecha asociación con el nucléolo (Jiménez-García et al., 1992). El anillo externo contiene snRNPs lo que sugiere que estas estructuras participan en el metabolismo del pre-mRNA (Agredano-Moreno et al., 1994).

Procesamiento del pre-mRNA

En eucariontes, la expresión génica es un proceso que involucra varios eventos, entre los que se encuentran la transcripción, la adición de un “cap” en el extremo 5', el “splicing” y el procesamiento del extremo 3' de los pre-mRNAs. Hasta hace pocos años, estos eventos eran considerados procesos independientes. Sin embargo, actualmente hay evidencias del

acoplamiento de los procesos de transcripción, “capping”, “splicing” y poliadenilación (Minvielle-Sebastia y Keller 1999).

- “Capping” del extremo 5’

La estructura llamada “cap” se encuentra en el extremo 5’ de todos los mRNAs que se han observado en las células eucariontes. El componente más distintivo del “cap” es un nucleótido de guanina (G) al cual se ha añadido un grupo metilo. El “capping” ocurre casi inmediatamente después de que aproximadamente 30 nucleótidos de RNA se han sintetizado e involucra la condensación del grupo trifosfato al extremo 5’ del transcrito naciente. El “cap” del extremo 5’ juega un papel importante en la iniciación de la síntesis de proteínas y al parecer también protege al transcrito de RNA creciente de la degradación. La adición de la guanina terminal 5’ es catalizada por la enzima guanidil transferasa. La reacción total puede representarse como una condensación entre el GTP y el extremo 5’ trifosfato original del RNA.

La primera metilación ocurre en todos los eucariontes y consiste en la adición de un grupo metilo en la posición 7 de la guanina terminal. La enzima responsable de esta metilación se llama guanina-7-metiltransferasa. El siguiente paso es añadir otro grupo metilo a la posición 2'-O de la penúltima base (la cual es la primera base original del transcrito antes de que se hicieran las modificaciones). Esta reacción es catalizada por la enzima 2'-O-metiltransferasa. Este es el principal tipo de “cap” en todos los eucariontes. En una pequeña minoría de casos se añade otro grupo metilo a la segunda base. Esto ocurre únicamente cuando esta posición es

ocupada por una adenina. La reacción involucra la adición de un grupo metilo en la posición N⁶. La enzima responsable actúa únicamente sobre un sustrato de adenosina que ya tiene el grupo metilo en la posición 2'-O. En algunas especies se añade un grupo metilo a la tercera base del mRNA "capped" (Lewin, 1997).

Estudios recientes sugieren que el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad grande de la RNA polimerasa II puede estar involucrado en coordinar la transcripción con la adición de un "cap" de 5' metilguanósina (McCracken et al., 1997 a). La enzima RNA guanidiltransferasa y la enzima guanina-7-metiltransferasa interactúan físicamente con la forma fosforilada de la CTD.

- "Splicing"

Los RNAs pre-mensajeros (pre-mRNAs) contienen secuencias de intrones que deben ser removidas ("splicing"), antes de que el pre-mRNA sea transportado del núcleo al citoplasma donde es traducido. El "splicing" se lleva a cabo en dos pasos catalíticos. En el primero, un residuo de adenosina localizado en el elemento de secuencia conocido como secuencia "branchpoint", cerca del extremo 3' del intrón, realiza un ataque nucleofílico sobre el sitio 5' de "splicing". Esta reacción genera dos intermediarios: el exon 1 liberado y el lazo o "lariat"-exon 2. En el segundo paso, el exon 1 ataca el sitio 3' de "splicing" para generar los productos del "splicing": exones 1 y 2 liberados y el intrón en forma de lazo (en Burge et al., 1999).

Los dos pasos catalíticos se llevan a cabo en el "spliceosoma", que es un complejo multi-componente que se ensambla en una serie de pasos. El complejo E, ATP-independiente se forma en etapas tempranas del "splicing". Los complejos A, B y C son ATP-dependientes y se ensamblan subsecuentemente. Los dos pasos catalíticos se llevan a cabo en el complejo C (Reed, 2000).

La alta fidelidad en el reconocimiento del sitio de "splicing" involucra interacciones RNA-proteína, proteína-proteína y RNA-RNA. Las interacciones entre estas moléculas se establecen en los tres elementos de secuencia de los intrones: el sitio de "splicing" 5', la secuencia de ramificación y el dinucleótido AG de la región de pirimidinas en el sitio de "splicing" 3'. En los metazoarios se presenta una especificidad adicional debido a ciertas secuencias presentes en los exones ("enhancers"). Durante el ensamblaje del "spliceosoma" y durante los dos pasos catalíticos del "splicing", cada uno de los elementos de secuencia es reconocido varias veces, incrementando la fidelidad de la reacción (Reed, 2000).

La eliminación de los intrones y el ligado de los exones resultantes es catalizada por partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas (snRNPs) y por factores de "splicing" que no forman snRNPs. Los pre-mRNAs producidos durante la transcripción por la RNA polimerasa II (pol II) contienen secuencias conservadas en los sitios de "splicing" 5' y 3' y una región conservada cerca del sitio de "splicing" 3' llamada punto de ramificación ("branchpoint"). Estas secuencias conservadas son reconocidas por los snRNPs y los factores esenciales de "splicing" que no forman snRNPs cuando se ensamblan en el pre-mRNA para formar el "spliceosoma". Este ensamblaje ocurre de manera ordenada y culmina con la remoción de los

intrones y el ligado de los exones. Primero el U1 snRNP reconoce secuencias en el sitio de “splicing” 5' en el pre-mRNA. Posteriormente U2 snRNP se une al sitio de ramificación. Después de la unión de los snRNPs U1 y U2, el complejo pre-ensamblado U4/U6/U5 se asocia a los snRNPs ya unidos y al pre-mRNA con el U5 interactuando con las secuencias exónicas 5' y 3'. Posteriormente la asociación de U1 se desestabiliza, U5 se une al extremo 5' del intrón y la hélice U4/U6 se desaparece parcialmente resultando en la asociación de U6 con U2 formando un complejo U2/U4/U6, finalmente U4 sale dejando un complejo U2/U6 con U2 unido al punto de ramificación y U6 asociado al extremo 5' del intrón. Es esta interacción ordenada de los RNAs y proteínas lo que permite a la maquinaria celular de “splicing” que los intrones del pre-mRNA sean eliminados de forma correcta.

Las proteínas SR se encuentran entre los factores de “splicing” mejor caracterizados que no forman snRNPs. Son importantes en el ensamblaje del “spliceosoma” y en el “splicing”. Contienen uno o dos motivos de reconocimiento del RNA y un dominio SR con múltiples repeticiones de serina y arginina. Los motivos de reconocimiento para el RNA se unen a secuencias de RNA de una manera coordinada para determinar la eficiencia del “splicing” (Chandler et al., 1997) y comprometer a los pre-mRNA en el evento de “splicing” (Fu, 1993). Los dominios SR modulan interacciones proteína-proteína en los diferentes pasos del ensamblaje del “spliceosoma” (Tronchere et al., 1997). Los factores SF2/ASF y SC35 están involucrados en la selección del sitio de “splicing” 5' de pre-mRNAs con “splicing” alternativo.

En la mayoría de los casos, el “splicing” del pre-mRNA ocurre de manera co-transcripcional en el sitio de transcripción (Baurén y Wieslander, 1994). Las proteínas SR son activas en el evento de “splicing” y también en procesos post-“splicing” como el transporte del mRNA a través del núcleo y en la translocación de estas partículas por el poro nuclear. El ciclo de fosforilación-desfosforilación de los dominios SR parece regular el ciclo del “splicing” (en Yeakley et al., 1999).

- Poliadenilación

En el extremo 3' de casi todos los mRNAs eucariontes se encuentra una cola de poly(A), la cual está involucrada en todos los aspectos del metabolismo del mRNA. Se genera por un rompimiento endonucleolítico y por la adenilación secuencial que genera una cola de poly(A). Se ha propuesto que esta estructura proporciona estabilidad al mRNA, promueve la eficiencia en la traducción de los mRNAs y también tiene un papel en el transporte de los mRNAs procesados del núcleo hacia el citoplasma. En la naturaleza, la poliadenilación es un proceso coordinado o acoplado con el “splicing”.

Recientemente se han identificado la mayoría de los factores involucrados en el procesamiento del extremo 3'. Hay elementos de secuencia en el pre-mRNA que especifican el sitio de rompimiento y adición de la cola de poly(A) en los mRNAs y que flanquean el sitio del ataque endonucleolítico (en Colgan y Manley, 1997). Casi todos los mRNAs contienen una secuencia señal de poliadenilación que consiste del hexanucléotido AAUAAA que se localiza de 10 a 30 bases río arriba del sitio de rompimiento/ poliadenilación y es uno de los

elementos de secuencia conocidos más conservados. Otro elemento de secuencia es un motivo rico en GU localizado 20-40 bases río abajo del sitio de rompimiento. A diferencia de AAUAAA, GU se encuentra en aproximadamente 70% de los pre-mRNAs de mamíferos y es más variable en composición de secuencia y se caracteriza por uno o varios segmentos de más de 5 residuos consecutivos de U interrumpidos por un residuo de G.

Por otra parte, se requiere un complejo de factores que constituyen la maquinaria de poliadenilación y la mayoría de los cuales consisten de varias subunidades. El factor de especificidad del rompimiento/poliadenilación (CPSF), el factor de estimulación del rompimiento (CstF), los factores de rompimiento I y II (CF I y CF II) y la proteína II de unión a poly(A) (PAB II). Hay un límite superior de 200 a 300 residuos en la longitud de las colas de poly(A) en los mRNAs.

El procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA se lleva a cabo en dos pasos: el rompimiento endonucleolítico en un sitio específico (el sitio poly(A)) que es seguido por la adición lenta de aproximadamente 10 residuos de adenosina al producto de rompimiento río arriba "upstream" (oligoadenilación) y posteriormente la corta cola de oligo (A) se elonga rápidamente. Antes del rompimiento, el pre-mRNA es reconocido por el factor de especificidad de la poliadenilación y rompimiento (CPSF) y por CstF.

Se han llevado a cabo experimentos de hibridación *in situ* utilizando sondas de oligo(dT) en diferentes tipos celulares a nivel de microscopía óptica y electrónica para localizar el poly(A)⁺RNA en el núcleo celular (Carter et al., 1991, 1993; Visa et al., 1993; Huang et al.,

1994; Visa et al., 1993; Fay et al., 1997; Calado y Carmo-Fonseca, 2000). En estos estudios se observa que se localiza en el citoplasma y en el nucleoplasma . En este último hay dominios donde la concentración es mayor. Estos dominios, en células animales, se denominan "speckles" que corresponden, a nivel del microscopio electrónico a las fibras pericromatinianas, a los acúmulos gránulos intercromatinianos y a una parte de la población de gránulos pericromatinianos.

La poliadenilación ocurre aproximadamente 7 minutos antes de que el mRNA se incorpore a los polisomas, lo que sugiere que después de la adición de la cola de poly(A), los mRNAs son rápidamente exportados al citoplasma (revisado en Lewin 1980). Sin embargo, Huang et al., en 1994 observaron que una parte de la población de RNA poliadenilado permanece en las "speckles" cuando las células son pre-tratadas con inhibidores de la transcripción por varias horas. Estos resultados implican que las "speckles" contienen una población de poly(A)RNA estable distinta a la de los mRNAs que son rápidamente exportados al citoplasma. Se desconoce el papel de esta fracción de RNA (Huang et al., 1994).

Estructuras intranucleares propuestas como sitios de almacén y/o transporte de mRNAs

Las moléculas de pre-mRNA tienen su contraparte morfológica en las fibras pericromatinianas que son sintetizadas y procesadas en la periferia de la cromatina compacta. El proceso de maduración del pre-mRNA se lleva a cabo en las FPCs en el dominio pericromatiniano en un proceso simultáneo a la transcripción (co-transcripcional). A nivel

ultraestructural, hay evidencias de que las proteínas hnRNPs se agregan a las fibras de manera co-transcripcional (Economides y Pederson, 1983; Matunis et al., 1993; Visa et al., 1996) y de que los factores de "splicing" se asocian a las FPCs en cuanto éstas se comienzan a formar, liberándose de la misma una vez que se ha completado el proceso de maduración (Visa et al., 1996; Wurtz et al., 1996). En mamíferos y en el díptero *Chironomus* se ha observado que las FPCs se pliegan o enrollan formando gránulos ribonucleoproteicos (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971), los cuales ya no contienen factores de "splicing", lo que sugiere que contienen el mensaje maduro (mRNAs) para las proteínas.

Hay evidencias recientes de que las proteínas hnRNPs están involucradas en el "splicing" del pre-mRNA así como en el transporte del mRNA hacia el citoplasma. El empaquetamiento del transcrito en una fibra y posteriormente en un gránulo RNP parece ser importante para asegurar el transporte eficiente. Los componentes proteicos y la molécula de RNA que conforman el gránulo no están organizados de una manera azarosa ya que las proteínas se unen al RNA de una manera secuencia dependiente (en Dreyfuss et al., 1993). Cuando la fibra RNP se pliega, los gránulos adquieren una forma característica (Skoglund et al., 1986). La molécula de RNA está organizada de una manera específica en el gránulo, exponiendo algunas secuencias que intervendrán en interacciones moleculares y otras secuencias permanecen en el interior del gránulo.

Los gránulos RNPs producto del enrollamiento de las FPCs han recibido diferentes nombres de acuerdo a su localización intranuclear o al nombre de la especie en donde han sido descritos. Así, en mamíferos se llaman gránulos pericromatinianos (GPCs) debido a su

localización en la periferia de la cromatina compacta. En *Chironomus* se denominan gránulos de Balbiani (GB) ya que se encuentran en los anillos de Balbiani de los dípteros y por último, en la planta *L. schismatica* se denominan gránulos de *Lacandonia* (GL) porque se observaron por primera vez en los núcleos de esta especie (Jiménez-García et al., 1992; Agredano-Moreno et al, 1994). Es importante mencionar que los GL no son privativos de esta planta y que su presencia está muy generalizada en las plantas con núcleos reticulados como *G. biloba* (J. Jiménez y Jiménez-García com. pers.). Los tres tipos de partículas mencionadas representan un compartimiento intranuclear de almacén y/o transporte de mRNAs con base en sus características citoquímicas e inmunocitoquímicas. Los GB, los GPCs y los GL se describen en detalle a continuación.

- Gránulos de Balbiani (Beermann y Bahr, 1954)

En *Chironomus tentans* hay tres “puffs” de tamaño excepcional que se han estudiado de manera particular y que se denominan anillos de Balbiani (BRs). Los genes de los BRs tienen un tamaño de 35-40 kb y codifican una proteína muy abundante de la saliva con una masa molecular de aproximadamente 10^6 Da. Los genes BR presentan cuatro intrones pequeños: tres próximos al extremo 5' y uno próximo al extremo 3' con un exón ininterrumpido de 26-38 kb a mitad del gen que codifica la mayor parte de la longitud del transcrito. Los genes BR han sido ampliamente utilizados en estudios ultraestructurales para conocer el flujo del RNA desde su sitio de síntesis, hacia el nucleoplasma, poro nuclear y por último al citoplasma, ya que la síntesis del RNA y los pasos en el proceso de ensamblaje del producto de la

transcripción se pueden monitorear en las micrografías electrónicas de genes BR activos extendidos en la superficie de una rejilla e *in situ* dentro del núcleo celular.

El producto de la transcripción de los genes BR de las glándulas salivales de *C. tentans* es una molécula de RNA que se asocia con proteínas para formar un filamento ribonucleoproteico delgado. Posteriormente el filamento se enrolla formando una fibra y después se compacta en una fibra aún más gruesa. Durante el proceso de transcripción, esta fibra densa crece en longitud y al mismo tiempo se pliega formando un gránulo. El producto final es un gránulo de aproximadamente 50 nm de diámetro (Skoglund et al., 1986), que se conoce como “gránulo de Balbiani”. En la envoltura nuclear, los gránulos de los anillos de Balbiani se elongan y penetran el centro del poro en forma de un “bastón” de aproximadamente 20 nm de diámetro (Stevens y Swift, 1966).

Los gránulos de Balbiani fueron descritos por Beer mann y Bahr en 1954 en los núcleos de los cromosomas politénicos de *Chironomus*. Son partículas esféricas de 30 a 50 nm de diámetro, que pueden estar en contacto estrecho con las bandas de cromatina activa o dispersos en el nucleoplasma. Son partículas ribonucleoproteicas (Monneron y Bernhard, 1969) sensibles a la digestión con pronasa seguida de RNasa (Stevens y Swift, 1966; Vázquez-Nin y Bernhard 1971). Los gránulos de los anillos de Balbiani contienen un RNA de 75 S muy grande que codifica para una proteína grande de la saliva.

Beer mann sugirió que representan RNAs mensajeros (mRNAs) debido al papel fisiológico de los “puffs” en relación con varias etapas del desarrollo del organismo. Los gránulos de

Balbiani se originan en los “puffs” o anillos de Balbiani y en bandas con cromatina extendida, migran por el nucleoplasma hasta la envoltura nuclear donde se desenrollan en fibras RNPs que aparecen dentro de los poros. Estas observaciones permitieron formular la hipótesis de que los gránulos pericromatinianos y los gránulos de Balbiani son partículas de almacenamiento y/o transporte intranuclear de RNA que incorporan uridina tritiada después de una corta administración de esta sustancia a la larva de *Chironomus* (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971).

La estructura tridimensional de los gránulos de Balbiani se ha analizado en tomografías al microscopio electrónico. A 8.5 nm de resolución, las partículas se presentan como una cinta ribonucleoproteica de 25-60 nm de ancho y de 10-15 nm de grosor que adopta una conformación tipo anillo. A una resolución de 7 nm, el filamento delgado observado durante el ensamblaje se presenta como el principal componente del gránulo (Lonroth et al., 1992), este último, se pliega de manera compleja formando una serie de dominios pequeños. La estructura de los gránulos de Balbiani cambia drásticamente durante su translocación a través del complejo de poro nuclear (Stevens y Swift, 1966).

Los gránulos de Balbiani en proceso de formación se marcan en ocasiones en la periferia con el anticuerpo anti-snRNPs y los gránulos libres en el nucleoplasma no se marcan, lo que sugiere que estos últimos representan mRNAs que carecen de intrones (Vázquez-Nin et al., 1990). Estos resultados han sido apoyados por estudios moleculares (Baurén y Wieslander, 1994).

Hasta el momento se han aislado y caracterizado tres proteínas que se unen al RNA de los gránulos de los anillos de Balbiani: la proteína Hrp36 (Wurtz et al., 1996), la proteína Hrp45 (Wurtz et al., 1996) y la proteína Hrp23 (Sun et al., 1998). La proteína hrp36, se añade a estas partículas de manera simultánea a la transcripción y acompaña al gránulo en el nucleoplasma a través del poro nuclear y se incorpora en los polisomas. La proteína hrp45 es miembro de la familia de proteínas SR de factores de “splicing”, Hrp45 es liberada cuando la partícula entra al canal central del complejo de poro nuclear por lo que se ha propuesto que está involucrada en el “splicing” y en eventos post-“splicing” como el transporte de los mRNAs en el nucleoplasma. Hrp23 es otro componente de los gránulos de Balbiani que al igual que las proteínas ya mencionadas se une a la fibra co-transcripcionalmente. Esta proteína es liberada antes o durante la unión de la partícula al complejo de poro nuclear.

El aislamiento de estas partículas en 1990 por Wurtz et al., permitió hacer una caracterización bioquímica de los mismos. Los gránulos de Balbiani sedimentan en gradientes de sacarosa con un pico de 300S. También presentan un pico en gradientes de CsCl con una densidad de 1.45 g/cm^3 , lo que indica que están compuestos de 40 % de RNA y 60 % de proteína, correspondiendo a una molécula de 75 S RNA de 12 megadaltones y un contenido total de proteínas de 18 megadaltones (Wurtz et al., 1990).

- Gránulos pericromatinianos (Watson, 1962)

Los gránulos pericromatinianos (GPC) fueron descritos por primera vez por Watson en 1962. Son partículas ribonucleoproteicas con un diámetro de 30 a 50 nm que se localizan en la

periferia de cúmulos de cromatina compacta. Están rodeados generalmente por un halo claro de aproximadamente 25 nm de diámetro y están formados por fibras enrolladas de entre 10 y 30 Å de grosor. Monneron y Bernhard en 1969 sugirieron que estas partículas representan RNAs mensajeros (mRNAs). El estudio comparativo de los núcleos de las células de glándulas salivales de *Chironomus* y de hepatocitos de rata, permitió establecer la equivalencia de los gránulos de Balbiani de *Chironomus* con los gránulos pericromatinianos de los núcleos de las células de vertebrados. Dicha comparación se basó en la morfología, estructura y en las características citoquímicas y autorradiográficas de ambas partículas.

Los gránulos pericromatinianos son sensibles a la digestión de pronasa seguida de RNAsa e incorporan uridina tritiada (Vázquez-Nin y Bernhard 1971). La administración y supresión de estradiol *in vivo* (Vázquez-Nin et al., 1978) o *in vitro* (Vázquez-Nin et al., 1979), sugirió que los gránulos pericromatinianos constituyen un almacén de mRNAs en equilibrio entre la síntesis (transcripción) y su salida al citoplasma. El estradiol aumenta la velocidad de salida de los mRNAs con una cinética más rápida que con la que se produce el incremento de la transcripción, efectos similares a los producidos por la hormona en condiciones normales durante el ciclo estral (Echeverría et al., 1980). Experimentalmente la testosterona ejerce acciones similares sobre los núcleos de las células epiteliales de la próstata ventral (Echeverría et al., 1991).

El número de gránulos pericromatinianos varía durante la diferenciación celular en animales (Vázquez-Nin et al., 1980; Zavala et al., 1992; Zavala y Vázquez-Nin, 1997; Zavala y Vázquez-Nin, 2000). Por ejemplo, las células de etapas muy tempranas en la formación de la

notocorda se caracterizan por la presencia de abundantes gránulos pericromatinianos. Por el contrario, en estadios más avanzados, el número de gránulos pericromatinianos disminuye. Estos cambios coinciden con eventos importantes de la diferenciación y la maduración celular (Zavala y Vázquez-Nin, 2000). En el caso de las células nerviosas, durante la transformación de neuroblastos a neuronas maduras, los gránulos pericromatinianos muestran un marcado incremento que se mantiene hasta el momento de la eclosión (Vázquez-Nin et al., 1980).

Se ha propuesto que los gránulos pericromatinianos (GPCs) de mamíferos, invertebrados y algunas plantas y hongos, así como los gránulos de Balbiani (GB) de los núcleos politénicos de dípteros, representan un sitio de almacén y/o transporte de mRNAs (Vázquez-Nin et al., 1990). Sin embargo, a la fecha solamente se ha realizado un estudio de aislamiento de GPCs de mamíferos en organismos tratados con drogas que inhiben la transcripción (Daskal, 1981; Heinrich y Northemann, 1981). La dificultad principal la representa el escaso número de estas estructuras subnucleares en tejidos en diferenciación o crecimiento. La hipótesis propuesta por Monneron y Bernhard de que los gránulos pericromatinianos representan mRNAs ha sido apoyada por numerosos estudios.

- Gránulos de *Lacandonia* (Jiménez-García et al., 1992)

Los gránulos de *Lacandonia* fueron descubiertos por Jiménez-García et al., en 1992 en los núcleos de *L. schismatica*. Actualmente se sabe que no son una característica privativa de esta especie siendo su distribución muy amplia en las plantas con núcleos reticulados (Jiménez Jaime y Jiménez-García com. pers). Son partículas ribonucleoproteicas (RNPs)

extranucleolares muy abundantes con un diámetro de ~32 nm e intermedios en tamaño y distribución entre los gránulos intercromatinianos (GICs), característicos de animales y propuestos como sitios de almacén y/o ensamblado de factores de “splicing” y los gránulos pericromatinianos (GPCs) característicos de mamíferos y algunas plantas (Jiménez-García et al, 1992). Los gránulos de *Lacandonia* son sensibles a la digestión enzimática con proteasa seguida de RNAsa y no contienen snRNPs lo que los hace equivalentes a los GPCs. Dadas sus características citoquímicas e inmunocitoquímicas, se ha propuesto que los gránulos de *Lacandonia* son estructuras intranucleares equivalentes a los GPCs y a los GBs (Jiménez-García et al., 1992, Agredano-Moreno et al., 1994), es decir, representan un tercer tipo de partícula involucrada en eventos post-transcripcionales de la expresión génica tales como almacenamiento y/o transporte de RNAs mensajeros (mRNAs).

Con el propósito de aportar evidencias adicionales de equivalencia entre los gránulos de *Lacandonia*, los gránulos de Balbiani y los gránulos pericromatinianos, en este trabajo analizamos la presencia de poly(A)⁺RNA en los gránulos de *Lacandonia* por medio de hibridación *in situ* ultraestructural con una sonda de oligo dt₂₀. Si los gránulos de *Lacandonia* contienen poly(A)⁺RNA, se fortalecería la hipótesis de que estas partículas son dominios intranucleares enriquecidos en mRNAs.

Además, analizamos el comportamiento de los gránulos de *Lacandonia* en diferentes etapas del desarrollo de la flor con el propósito de aportar evidencias adicionales de similitud entre estos últimos y los gránulos pericromatinianos, ya que como mencionamos anteriormente, el número de gránulos pericromatinianos varía durante la diferenciación celular en animales (Vázquez-Nin et al., 1980; Zavala et al., 1992; Zavala y Vázquez-Nin, 1997; Zavala y Vázquez-Nin, 2000).

Las proteínas SR se unen a la fibra del pre-mRNA a lo largo del exón de manera co-transcripcional para participar en el evento de “splicing” y acompañan al gránulo de Balbiani, producto del enrollamiento de estas fibras, en su trayectoria desde los sitios de transcripción hasta el poro nuclear, por lo que se ha propuesto un papel post-“splicing” para estas proteínas (Visa et al., 1996). En este trabajo, analizamos la presencia de proteínas SR en los gránulos de *Lacandonia* por medio de inmunlocalización ultraestructural utilizando el anticuerpo 3C5 para determinar si contienen proteínas SR.

Se ha propuesto que los gránulos pericromatinianos (GPCs) de mamíferos, invertebrados y algunas plantas y hongos, así como los gránulos de Balbiani (GB) de los núcleos politénicos de dípteros, representan un compartimiento intranuclear de almacén y/o transporte de mRNAs (Vázquez-Nin et al., 1990). Sin embargo, a la fecha solamente se ha realizado un estudio de aislamiento de GPCs de mamíferos en organismos tratados con drogas que inhiben la transcripción (Daskal, 1981; Heinrich y Northemann, 1981). La dificultad principal la representa el escaso número de estas estructuras subnucleares en tejidos en diferenciación o crecimiento. En el caso de los GB, se ha avanzado más en su caracterización. Por ejemplo, se conoce que algunos GB derivados de “puffs” específicos, que se expresan en el IV estado larvario de *Chironomus* contienen un mRNA muy grande a partir del cual se sintetiza una proteína muy abundante de la saliva.

Por la abundancia de los gránulos de *Lacandonia* y por el tamaño de estos en los núcleos de *Lacandonia*, proponemos su aislamiento y caracterización parcial. Si los gránulos de *Lacandonia* contienen mRNA, representarían un tercer tipo de estructura nuclear relacionada con la regulación postranscripcional de la expresión del mRNA. Pensamos que la obtención de una fracción enriquecida en gránulos de *Lacandonia*, facilitaría la demostración, en un futuro, de la presencia o ausencia de mRNAs, aspecto que ha sido difícil de abordar en otros sistemas por la cantidad relativamente pequeña de partículas en condiciones normales.

Durante el desarrollo de la presente tesis no fue posible coleccionar plantas de *Lacandonia schismatica* en la selva Lacandona por la situación política que se vive en la zona y por la dificultad para conseguir los permisos de colecta, ya que esta planta es, como se mencionó

anteriormente, una especie endémica y rara, y por lo tanto, está protegida por las leyes de nuestro país. Además, para la obtención de núcleos aislados necesitaríamos por lo menos 2 gramos de tallos, botones florales y flores, los cuales son muy pequeños y se requerirían varias plantas con lo que posiblemente se podría afectar la ecología de la población. Por lo anterior, para la obtención de fracciones enriquecidas en gránulos de *Lacandonia*, utilizamos hojas jóvenes de la planta *Ginkgo biloba*. Esta última, tiene núcleos reticulados y contiene abundantes gránulos de *Lacandonia* (Jiménez y Jiménez-García com. pers), por lo que resulta un buen modelo para el estudio de estas partículas.

Los gránulos de *Lacandonia* en *Ginkgo biloba*

De manera paralela al desarrollo de la presente tesis, el M. en C. Jaime Jiménez, tesista de Doctorado del Dr. Luis Felipe Jiménez García, encontró que los gránulos de *Lacandonia* no son una característica privativa de la planta *L. schismatica* ya que se encuentran en los núcleos de muchas otras plantas entre las que se encuentran *G. biloba* y el helecho *Adiantum capillus-veneris* (tesis en preparación). Debido a la dificultad para disponer de plantas de *L. schismatica*, en el presente trabajo se utilizó inicialmente el helecho *A. capillus-veneris*. Sin embargo, se presentaron problemas metodológicos para obtener fracciones nucleares puras libres de cloroplastos debido a que el tamaño de ambos componentes celulares es muy similar. Por lo anterior, en el presente trabajo se utilizó a *G. biloba* como modelo de estudio ya que los núcleos de esta especie contienen abundantes gránulos de *Lacandonia* y la obtención de fracciones puras de núcleos es relativamente sencilla.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- a) Conocer la composición y aislar los gránulos de *Lacandonia*
- b) Analizar si los GL son equivalentes a los GPCs y a los GB

Objetivos particulares

1. Determinar si los GL contienen mRNA
2. Estudiar si los GL contienen factores de procesamiento de pre-mRNA
3. Estudiar si la cantidad de GL varía durante el desarrollo
4. Aislar los GL

Metas:

- Determinar si los GL contienen poli-A por medio de hibridación *in situ* ultraestructural utilizando sondas de oligo-T

- Determinar si los GL contienen factores de procesamiento de pre-mRNA por inmunolocalización ultraestructural utilizando el anticuerpo anti proteínas SR

- Aislar una fracción enriquecida de GL a partir de hojas de *G. biloba*

MATERIALES Y MÉTODOS

Microscopía Electrónica

Fragmentos de flores de *L. schismatica* en etapas pre-antesis y post-antesis se fijaron en una mezcla de glutaraldehído al 6% y paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos salino (PBS) (pH 7.2), durante una hora a temperatura ambiente. Se llevó a cabo una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% durante toda la noche. Las muestras se deshidrataron en concentraciones graduales de etanol al 30, 50, 70, 80, 90 y 96 % durante 5 minutos cada uno y en etanol absoluto con tres cambios de 5 minutos cada uno. Se hicieron tres cambios de 5 minutos cada uno en óxido de propileno que actúa como agente intermediario entre el etanol y la resina epóxica. Las muestras se colocaron en una mezcla de óxido de propileno- resina epóxica en una proporción 1:1 durante toda la noche y por último se incluyeron en resina epóxica y se polimerizaron en una estufa a 60°C durante 24 horas. Se obtuvieron cortes de 60 a 90 nm de grosor en un ultramicrotomo Reichert Ultracut E, se montaron sobre rejillas de cobre de 200 mesh y se contrastaron a temperatura ambiente con acetato de uranilo al 3% y citrato de plomo al 0.3% durante 20 minutos. Finalmente las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM10 operando a 80 kV.

Se cuantificó el número de gránulos de *Lacandonia* por μm^2 durante el desarrollo de la flor en células somáticas del receptáculo y tegumentos de los ovarios en etapas pre-antesis y post-antesis. La cuantificación se llevó a cabo en micrografías (positivos) con un aumento final de 40,000 x.

Inmunolocalización ultraestructural

Fragmentos de botones florales de *L. schismatica* se procesaron para su inclusión en la resina Lowycriil K4M (Roth, 1986) como se ilustra en el diagrama de flujo 1. Se obtuvieron cortes ultrafinos de ovarios de *L. schismatica* de 60 a 90 nm de grosor que se colocaron en rejillas de oro cubiertas con formvar. Las rejillas se flotaron en amortiguador de Tris salino (TBST) conteniendo 20 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 20 mM de azida de sodio, Tween-20 al 1.0 %, suero de albumina de bovino (BSA) al 10% y suero normal de cabra (NGS) durante 60 minutos. Posteriormente las rejillas se incubaron en el anticuerpo monoclonal anti-SR 3C5 (Turner y Franchi, 1987), donado por D. Spector (CSHL), diluido 1:30 en TBST a 4°C por 16 horas en una cámara húmeda. Las rejillas se lavaron por goteo en TBST durante 15 minutos, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario cabra-anti-ratón IGM (goat-anti-mouse IGM), acoplado a partículas de oro coloidal de 10 nm y diluido 1:10 en TBST. Después de la incubación las rejillas se enjuagaron en TBST durante 15 minutos y 10 minutos en agua desionizada. Los cortes montados en las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo al 3% y citrato de plomo al 0.3% durante 20 minutos y se observaron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM10 operando a 80 kV.

Extracción y marcado de DNA genómico de *L. schismatica*

La extracción de DNA se hizo de acuerdo a Sambrook, et al., 1989, con las siguientes modificaciones: se molió 1.0 gramo de flores en anthesis, botones florales y tallos de *L. schismatica* con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. Se añadieron 10 ml de

buffer de extracción (100 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoetanol M y 1.3 % SDS) y el homogenado se incubó a 65°C durante 10 minutos. Se añadieron 3.3 ml de acetato de potasio y se incubó 30 minutos en hielo. Se centrifugó a 4°C en una ultracentrifuga Beckman modelo L5-50B con un rotor tipo 50.2 Ti a 18 000 r.p.m. (108,720 g). El sobrenadante se filtró por 5 capas de gasas esteriles en un tubo conteniendo 10 ml de isopropanol frío. Se mezcló y se dejó reposar por 1 hora a -20°C. Se colectó el DNA y se transfirió a 350 μ l de buffer de dilución (50 mM Tris y 10 mM EDTA). Se añadieron 2 μ l de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó 30 minutos a 37°C. Se precipitó el DNA añadiendo 37.5 μ l de acetato de sodio y 500 μ l de isopropanol frío. La mezcla se dejó reposar 2 horas a -20°C. Finalmente el DNA se colectó, se enjuagó cuatro veces en etanol al 80%, se resuspendió en Buffer TE (10 mM Tris y 1 mM EDTA) y se almacenó a 4°C. El proceso se resume en el diagrama de flujo 2.

La sonda se marcó por el método de "nick translation". A 3 μ l de sonda (DNA total) se añadieron 5 μ l dNTP, 32 μ l H₂O y 5 μ l enzimas (DNAsa I, DNA polimerasa I). Se llevó a cabo una digestión diferencial a 16°C durante 4 horas. Posteriormente la reacción se detuvo colocando la mezcla anterior en hielo. Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1 % con el propósito de verificar el tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos y se detuvo la reacción cuando los fragmentos alcanzaron un tamaño de ~125 pb. La sonda marcada se almacenó a 4°C (Diagrama de flujo 3).

Hibridación *in situ* ultraestructural de RNA total

La hibridación *in situ* de RNA total se llevó a cabo de acuerdo a López-Velázquez et al., (1998). Se utilizó como sonda DNA total de *L. schismatica*. La sonda se marcó por el método de “nick translation” en presencia de Bio-11-dUTP, dATP, dCTP, dGTP 50 mM (ver diagrama de flujo 2). La reacción de “nick translation” se detuvo cuando los fragmentos de la sonda alcanzaron el tamaño de ~125 pares de bases. A 10 µl de la sonda marcada por el método de “nick translation” se añadieron 10 µl de formamida y 1 µl de tRNA competidor de *Escherichia coli* (mezcla de reacción 1). La sonda se desnaturizó durante 4 minutos a 90°C e inmediatamente se colocó en hielo para evitar la re-naturalización de los fragmentos de DNA. A la mezcla de reacción 1 se añadió la mezcla de reacción 2 que contiene: 4 µl de sulfato de dextran al 50%, 4 µl de albumina de suero de bovino (BSA) al 5 %, y 2 µl de 20xSSC. La reacción de hibridación se llevó a cabo en cortes ultrafinos montados en rejillas de oro cubiertas con formvar que se flotaron sobre la mezcla de hibridación (mezcla 1 + mezcla 2).

La reacción de hibridación se incubó a 37°C durante 24 horas en una cámara húmeda y se reveló con una solución de estreptavidina acoplada a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro (ver diagrama de flujo 4).

Hibridación *in situ* de poly(A)⁺RNA

La hibridación *in situ* de poly(A)⁺RNA se realizó de acuerdo a Huang et al. (1994), con algunas modificaciones. Se utilizó como sonda un oligo dT 20 mer dT₂₀ marcado con biotina (Boheringer). Se obtuvieron cortes ultrafinos de 60 a 90 nm de grosor de ovarios de *L. schismatica* procesados con Lowicryl (ver diagrama de flujo 1) y se montaron en rejillas de oro cubiertas con formvar. Las rejillas se flotaron en 10 µl de la mezcla de hibridación conteniendo oligo dT_[20], 2XSSC, 1 mg/ml de tRNA, 10% de sulfato de dextran y 25% de formamida. La hibridación se llevó a cabo a 42°C en una cámara húmeda toda la noche. Después de la hibridación, las rejillas se enjuagaron en 4XSSC durante 15 minutos y se incubaron en estreptavidina conjugada con partículas de oro coloidal de 10 nm, diluida 1:20 (Sigma) en 4XSSC a 4°C durante la noche. Posteriormente las rejillas se enjuagaron tres veces durante cinco minutos cada uno en 4XSSC, en PBS tres veces durante 5 minutos cada uno y por último se lavaron en agua desionizada durante cinco minutos cada uno. Las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron al microscopio electrónico.

Aislamiento de los gránulos de *Lacandonia*

El aislamiento de los gránulos de *Lacandonia* se llevó a cabo de acuerdo a Sambrook, et al., 1989, modificado como sigue: se lavaron 6 g de hojas de *G. biloba* con agua corriente y posteriormente con agua desionizada estéril. Se sumergieron en acetona y se agitaron durante 5 minutos. Se eliminó la acetona y las hojas se molieron en mortero con nitrógeno líquido

hasta obtener un polvo fino. Se añadió el buffer de aislamiento de núcleos (BAN) que contiene sacarosa 1M, Tris-HCl pH 7.2, MgCl₂ 5 mM y β-mercaptoetanol 2 mM. Se pulverizó el tejido con el buffer. El homogenado se filtró por 3 capas de gasas húmedas estériles. Posteriormente se centrifugó a 900 r.p.m. en una centrifuga Universal 16R con un cabezal Hettich 1617, durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en buffer de lavado nuclear (se prepara igual que el anterior sólo que a éste se le añadió Tritón X-100 al 0.5 %) y se centrifugó a 900 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. El paso anterior se repite una vez más. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 ml de BAN. Se prepararon gradientes de percoll del 40, 60 y 80%. Este último se colocó sobre un colchón de sacarosa 3 M. La muestra se colocó en la parte superior del gradiente discontinuo y se centrifugó a 3, 500 r.p.m. en una centrifuga Universal 16R y un cabezal Hettich 1617, durante 25 minutos. Los núcleos se colectaron de la banda obtenida entre el Percoll del 80 % y el colchón de sacarosa 2 M y se centrifugaron a 2 500 r.p.m. durante 5 minutos. Por último, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500 µl de agua con DEPC y se almacenó a -70°C. El proceso se resume en el diagrama de flujo 5.

Las fracciones nucleares enriquecidas en gránulos se fijaron en glutaraldehído al 6% en PBS durante 30 minutos y se lavaron tres veces en PBS. Se llevó a cabo una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% durante 30 minutos. Las muestras se deshidrataron en concentraciones graduales de etanol al 70, 80 y 96% durante 5 minutos en cada uno. Posteriormente se hicieron tres cambios de 5 minutos cada uno en óxido de propileno. La preinclusión se hizo en una mezcla de resina epóxica-óxido de propileno en una proporción

1:1 durante 12 horas. Por último la inclusión se llevó a cabo en resina epóxica a 60°C durante 24 horas. El procesamiento para el microscopio electrónico de las fracciones nucleares enriquecidas en gránulos se resume en el diagrama de flujo 6.

Procesamiento de fragmentos de botones florales para su inclusión en Lowicryl K4M

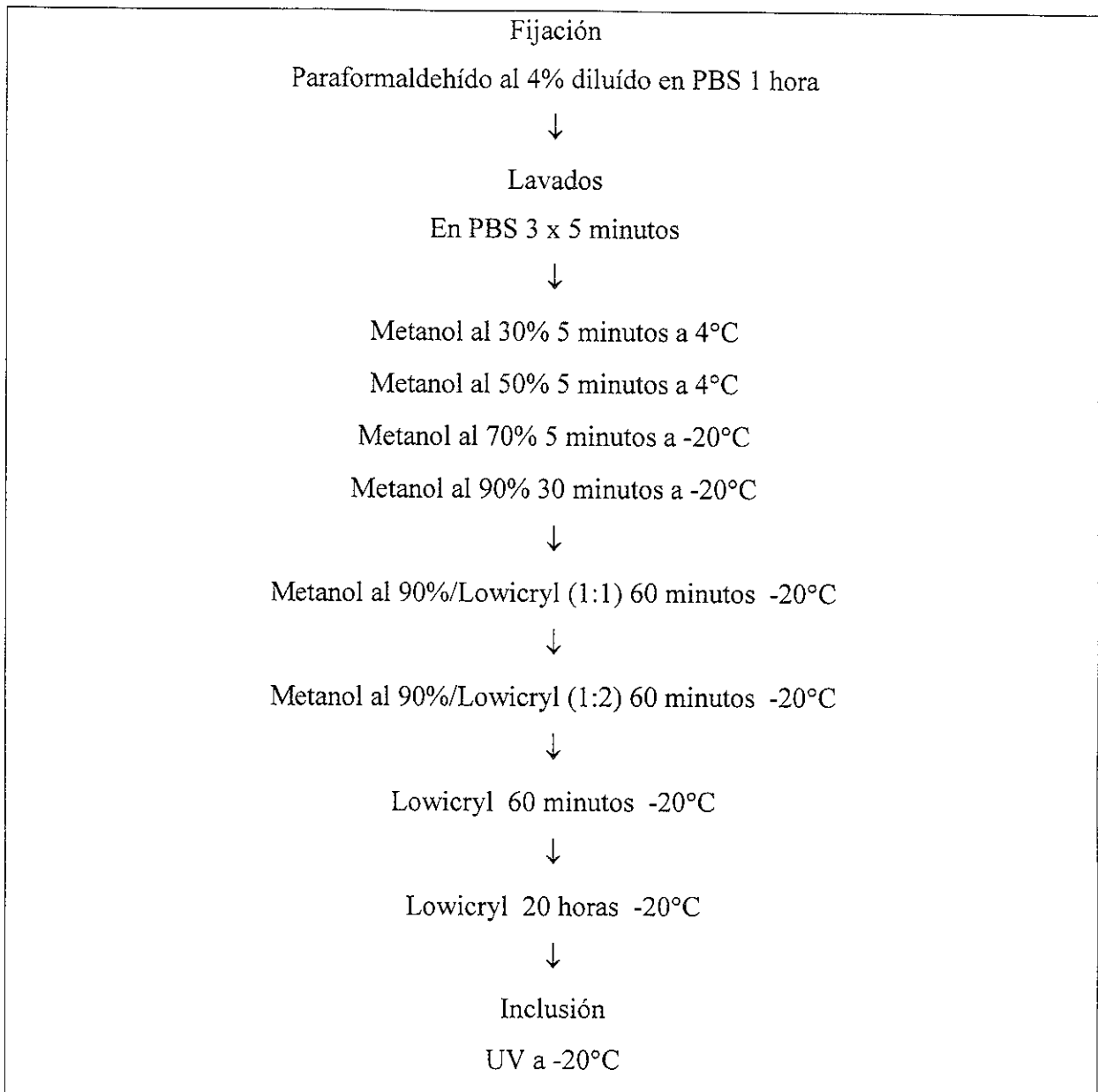


Diagrama de flujo 1

Extracción de DNA genómico

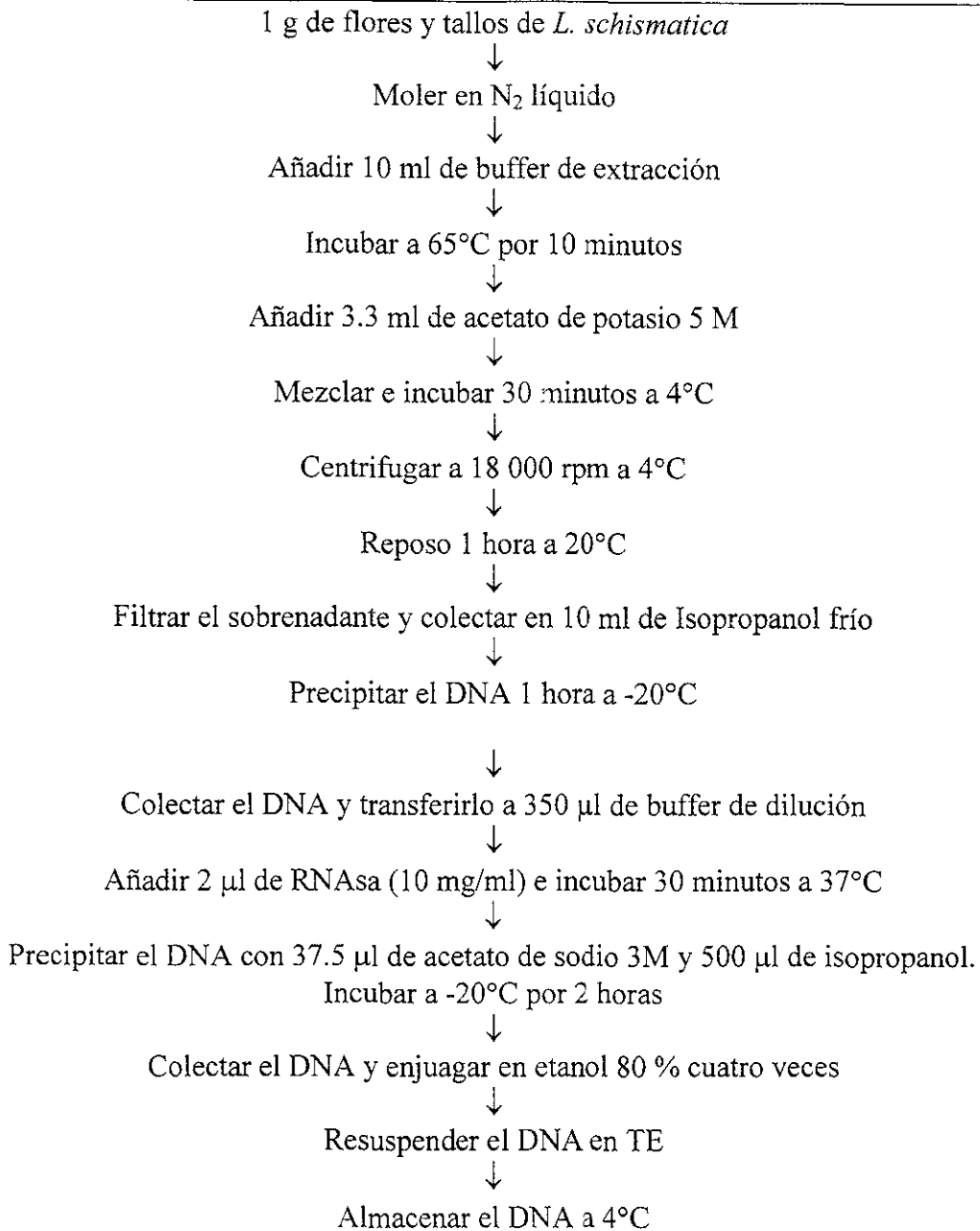


Diagrama de flujo 2

Marcado de la sonda por el método de "nick translation"

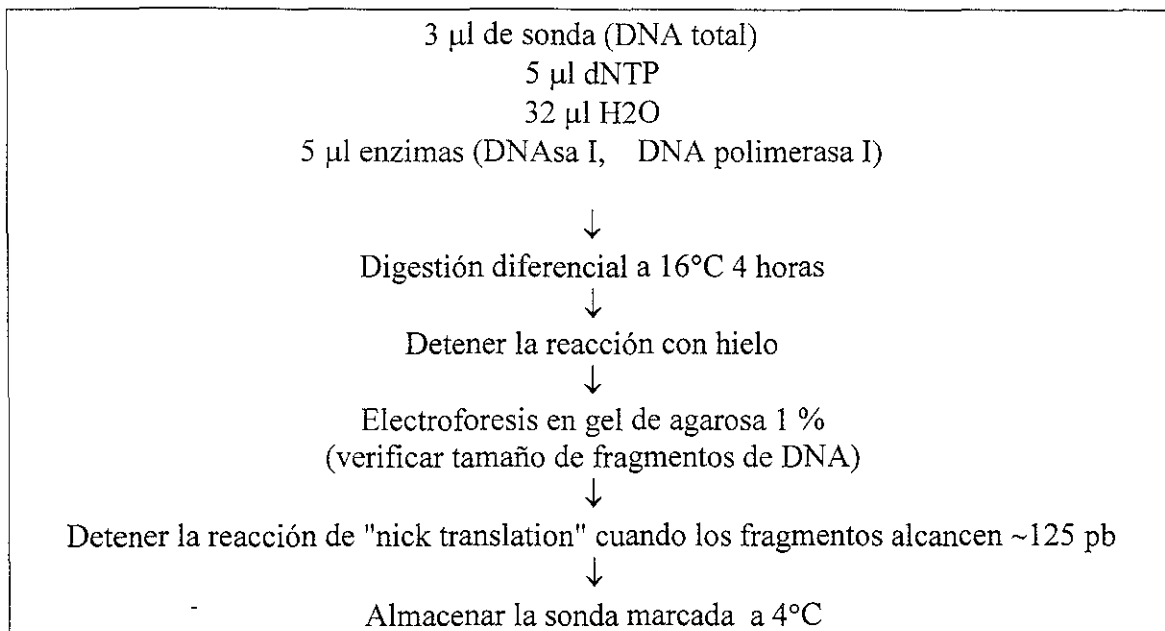


Diagrama de flujo 3

Hibridación *in situ* ultraestructural de RNA total

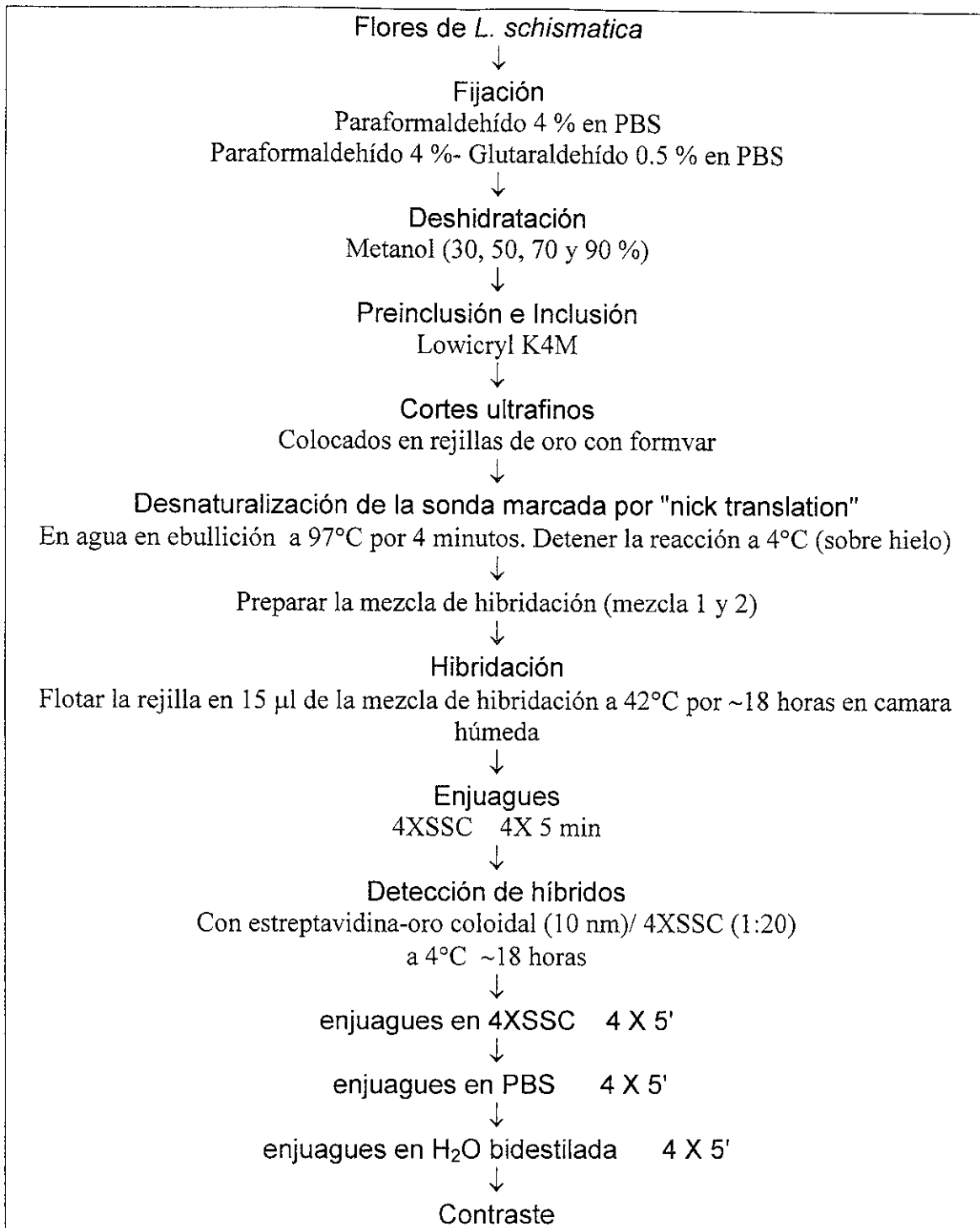


Diagrama de flujo 4

Aislamiento de los gránulos de *Lacandonia*

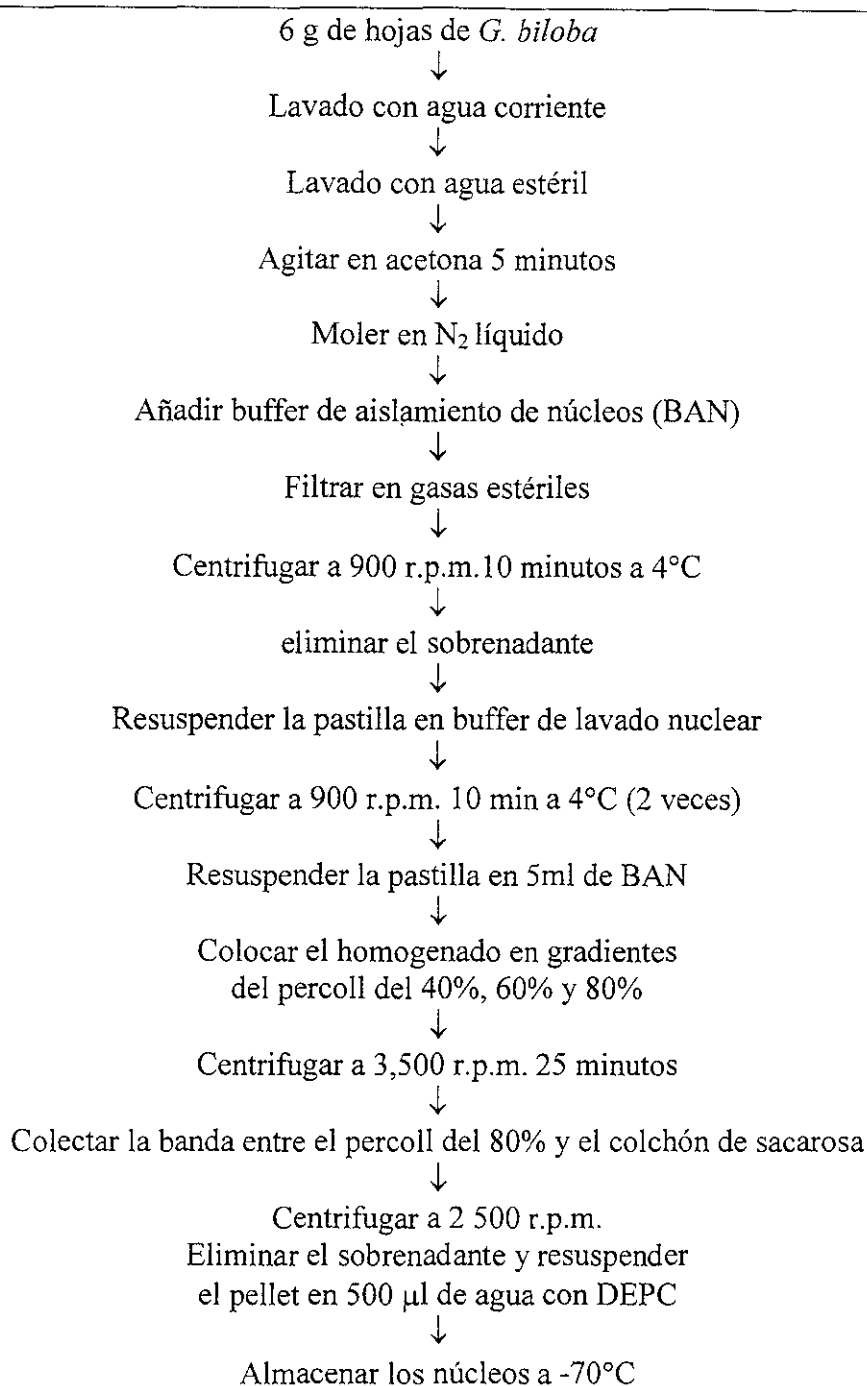


Diagrama de flujo 5

Procesamiento para MET de las fracciones nucleares enriquecidas en gránulos

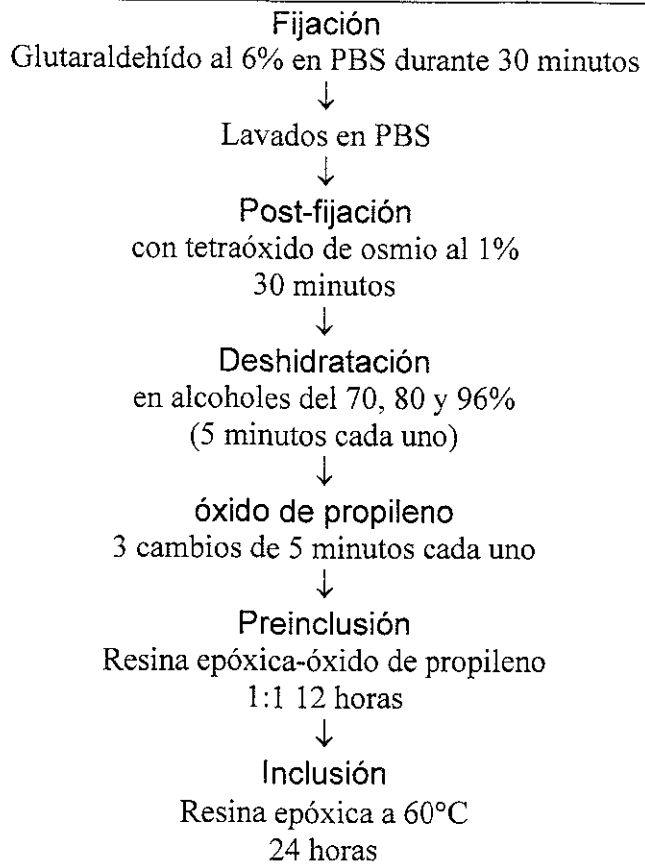


Diagrama de flujo 6

RESULTADOS

Detección de RNA total y poly(A)⁺RNA en los gránulos de *Lacandonia*

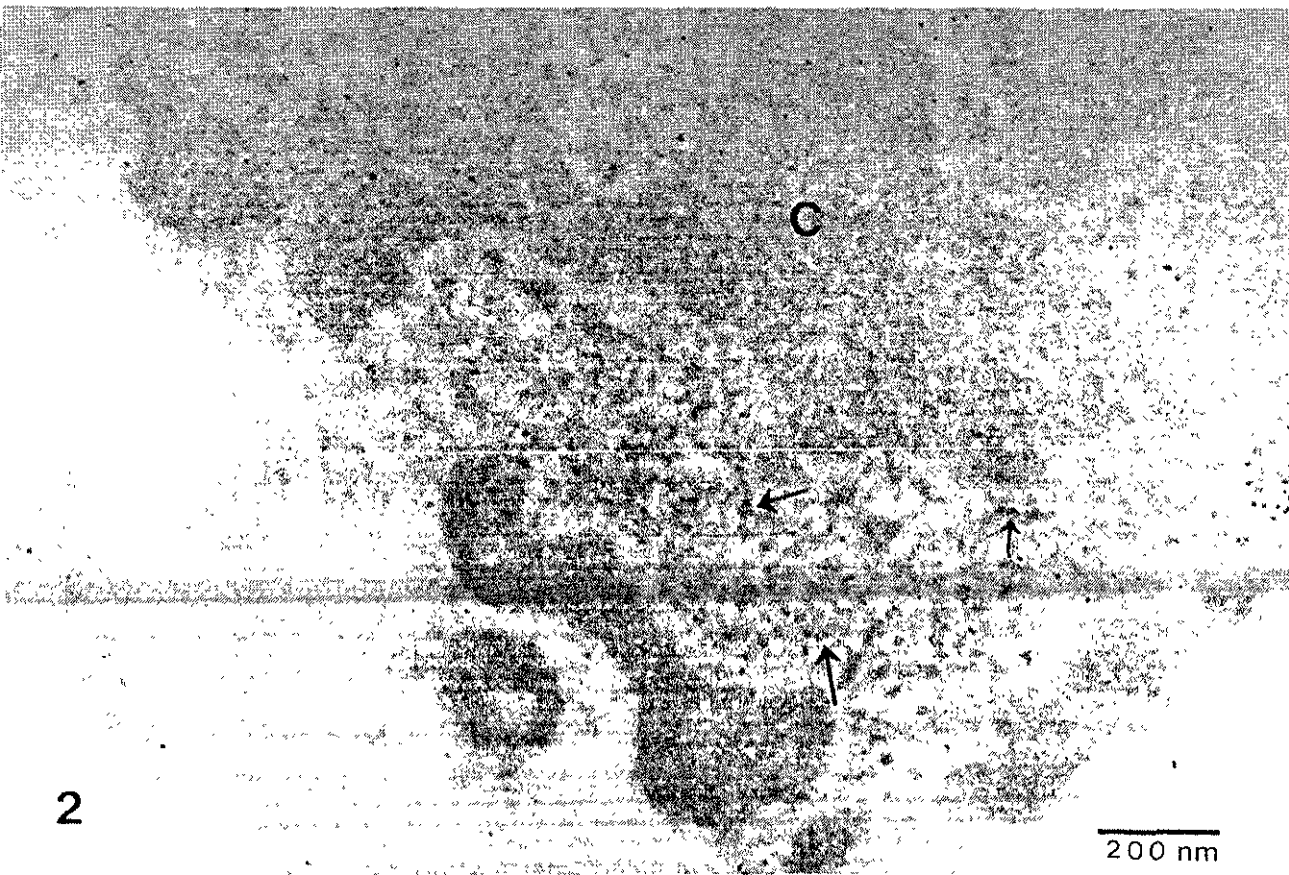
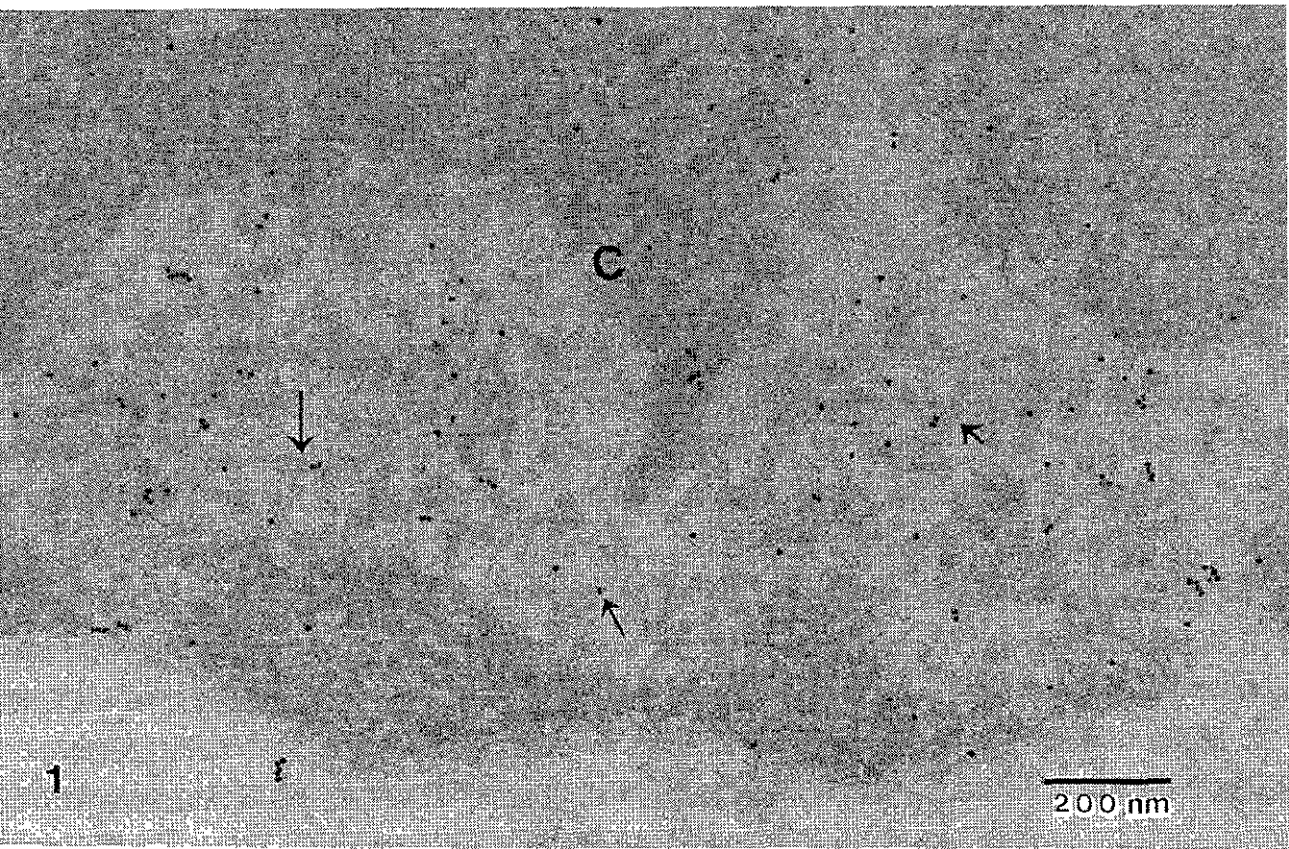
Por medio de hibridación *in situ* ultraestructural usando como sonda DNA total marcado de *L. schismatica*, se obtiene un marcado intenso en el nucleoplasma y en particular en los gránulos de *Lacandonia* y en las fibras que los interconectan en los núcleos de ovarios de *L. schismatica* incluidos en la resina Lowycriil K4M (Figura 1).

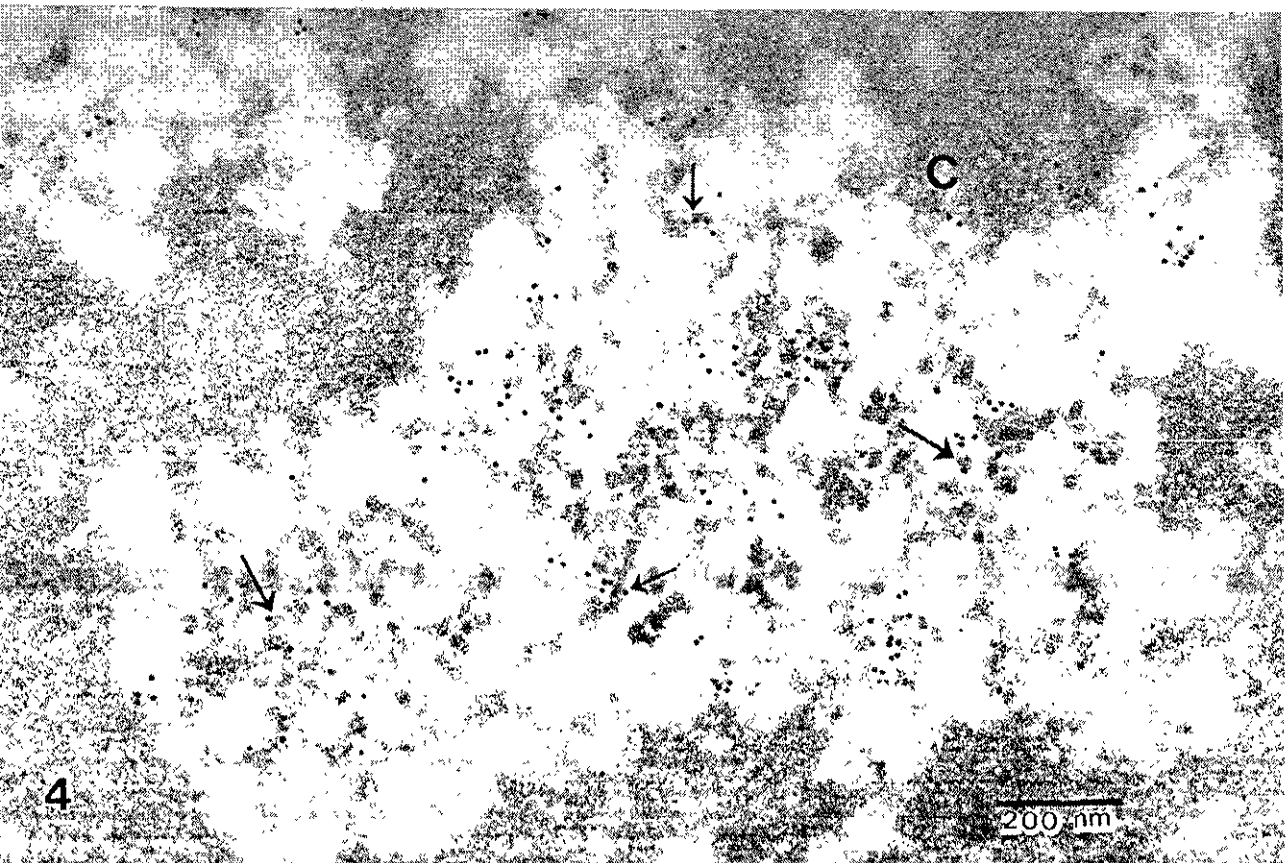
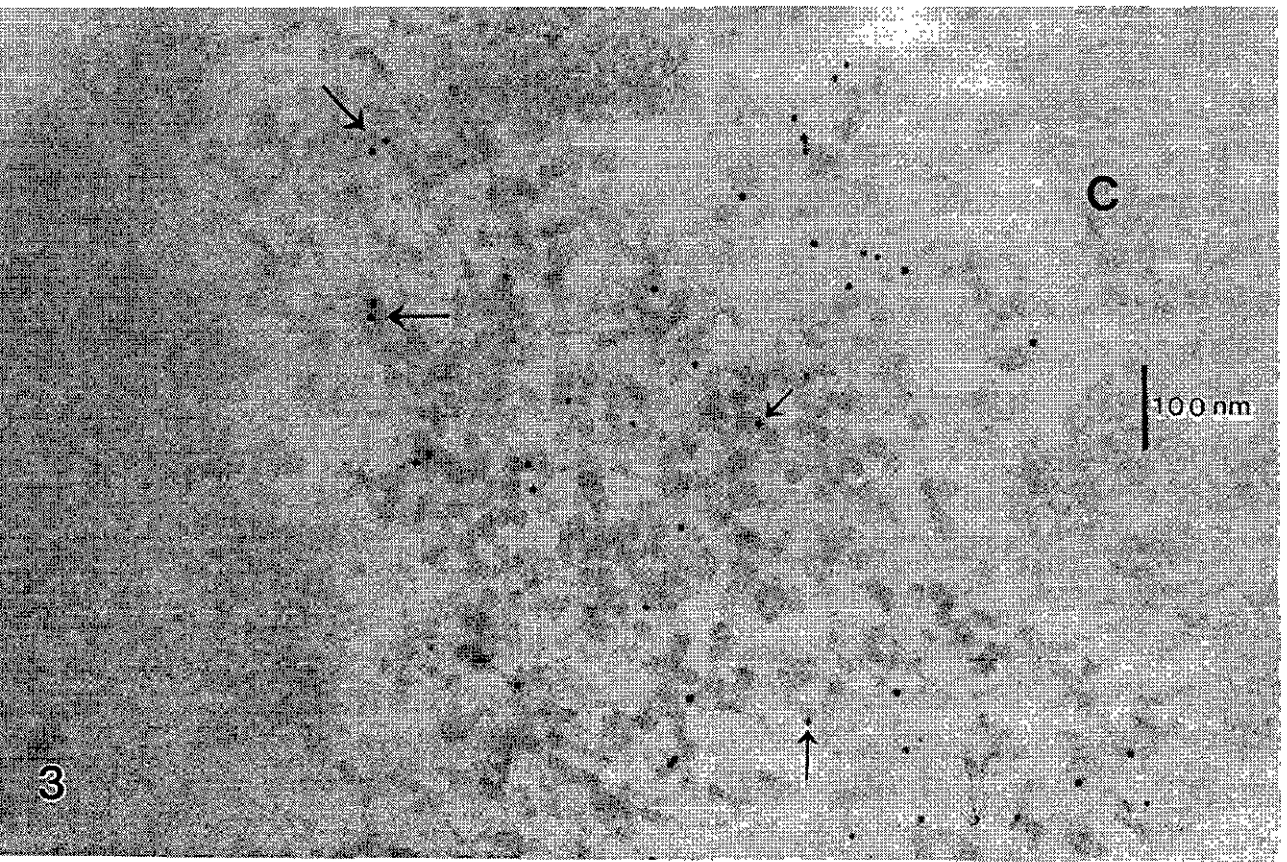
Se observan resultados similares utilizando hibridación *in situ* ultraestructural con una sonda de oligo dT marcada para analizar la presencia de poly(A)⁺RNA en los gránulos de *Lacandonia* (Figuras 2 y 3).

Localización de proteínas SR en los gránulos de *Lacandonia*

Se analizó la presencia de proteínas SR en los gránulos de *Lacandonia* por medio de inmunolocalización ultraestructural en núcleos de *L. schismatica* utilizando el anticuerpo monoclonal 3C5.

En la figura 4 se observa que el marcaje con este anticuerpo se asocia exclusivamente con el nucleoplasma y que es muy abundante en las fibras y en muchos de los gránulos de *Lacandonia* de los núcleos de ovario de *L. schismatica* incluidos en la resina Lowycriil K4M.





Abundancia de los gránulos de *Lacandonia* en diferentes etapas del desarrollo de la flor

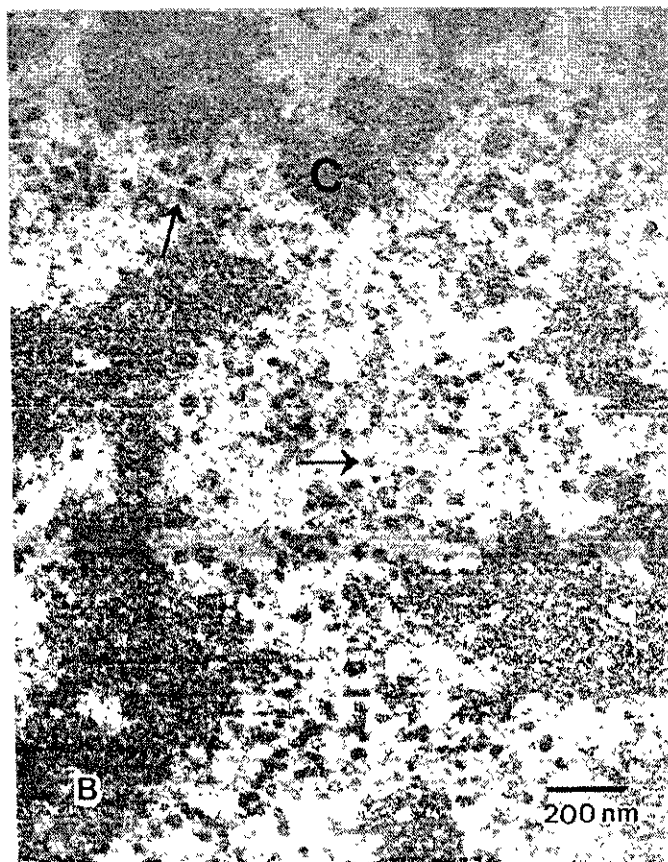
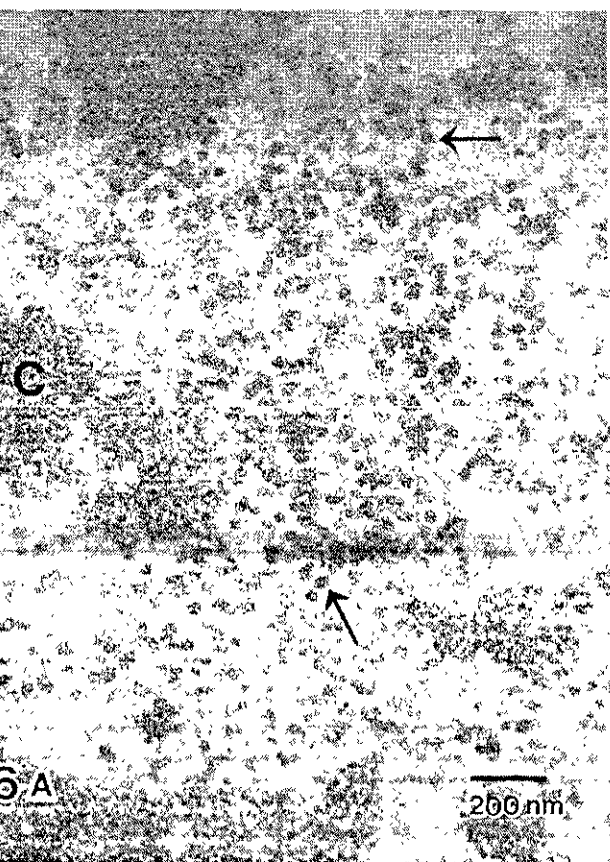
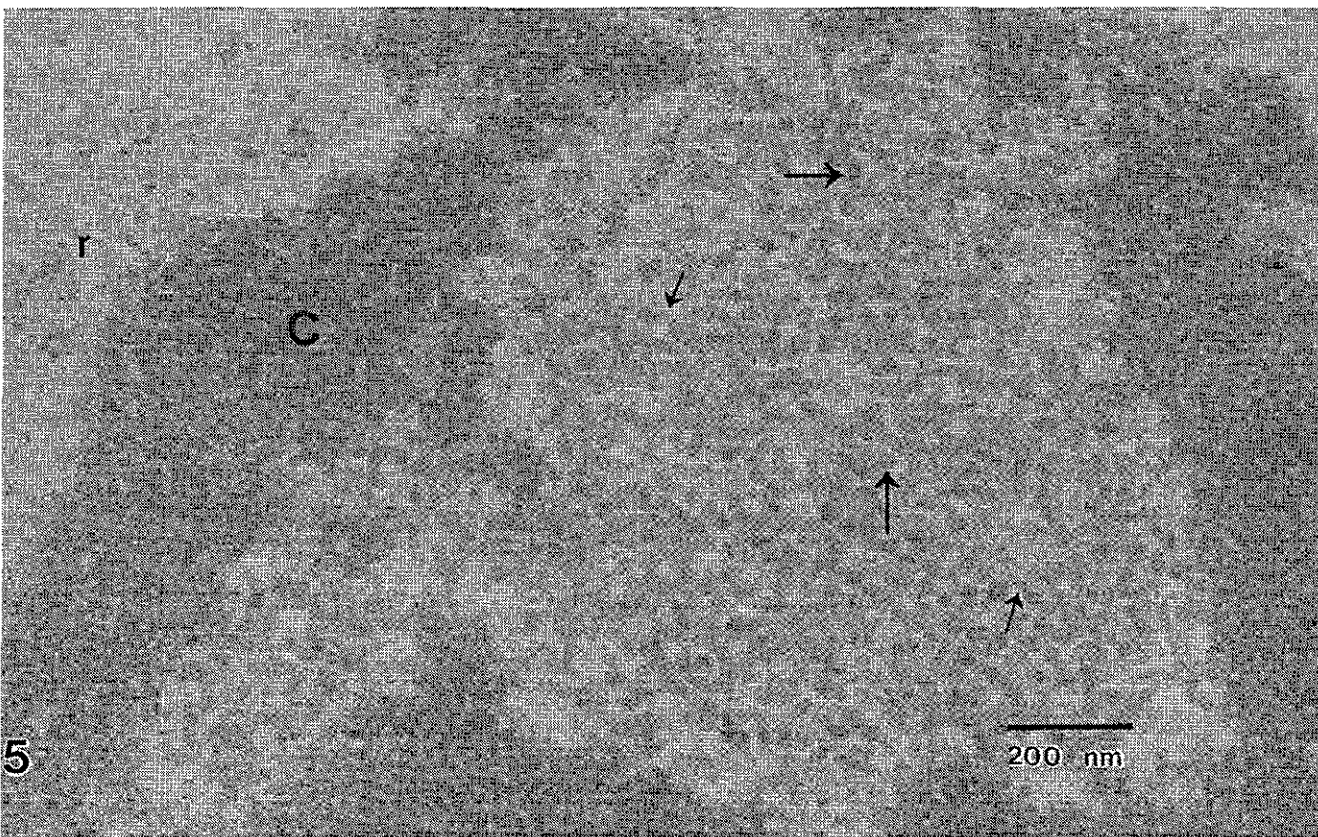
Los gránulos de *Lacandonia* son partículas muy abundantes de 32 nm de diámetro que se localizan en el espacio inter y pericromatiniano de los núcleos de esta especie (Figura 5).

El número de GL varía durante el desarrollo de la flor. El análisis estadístico del número de gránulos de *Lacandonia* durante el desarrollo de la flor indica que estas partículas son más abundantes en etapas pre-antesis (Figuras 6 A y B). La figura 6A corresponde a una etapa pre-antesis en la cual se observa un cúmulo de abundantes gránulos de *Lacandonia* interconectados por fibras. En etapas post-antesis (Figura 6B), se observa una disminución en la abundancia de estos gránulos. La prueba de Cochran (Zar, 1996), indica que el número de GL en etapas pre-antesis ($X=25 \pm 5$ SD) es significativamente mayor que en etapas post-antesis ($X=19 \pm 3$ SD) ($p < 0.05$).

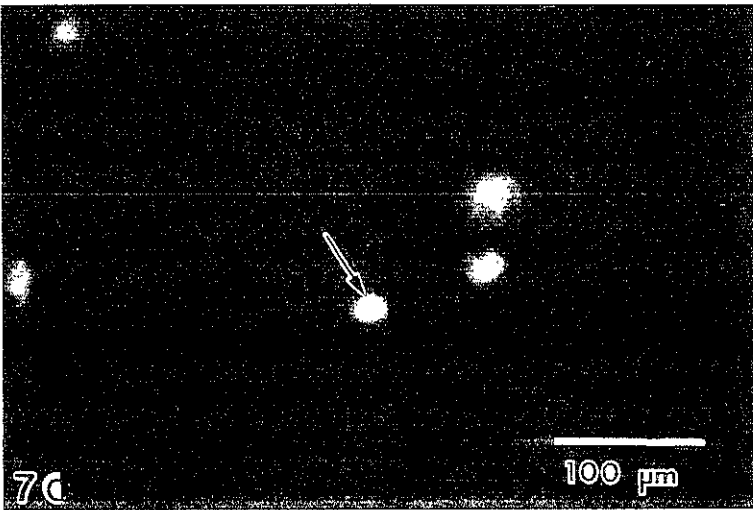
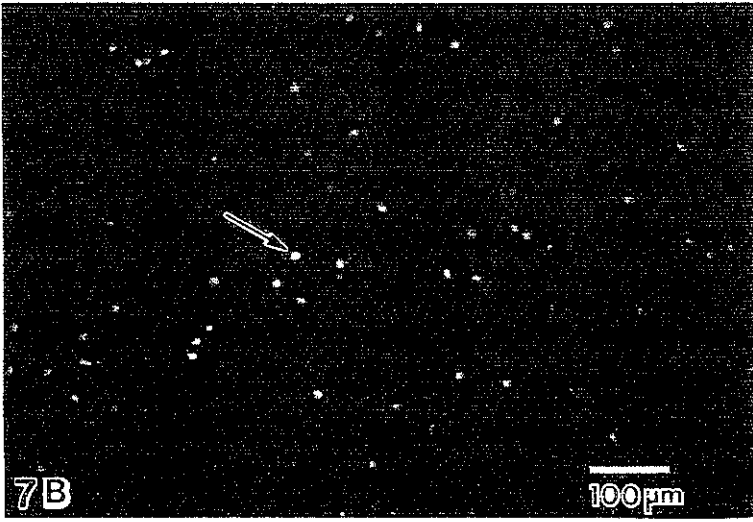
El estudio de la abundancia de los gránulos de *Lacandonia* en diferentes etapas del desarrollo de la flor se llevó a cabo en cortes ultrafinos de núcleos de *L. schismatica* incluidos en resina epóxica.

Aislamiento de los gránulos de *Lacandonia*

El proceso de aislamiento de núcleos de *G. biloba* produce una fracción enriquecida con este organelo, como se aprecia después de la tinción para DNA con DAPI. En la figura 7A y 7B



Figuras 7 A, B y C. Núcleos aislados de *G. biloba* teñidos con DAPI y vistos al microscopio de epifluorescencia. Los núcleos son abundantes (flechas) y libres de cloroplastos (A, B). En (C) se observan núcleos (flecha) con contraste de fases. Se observa el retículo de cromatina.



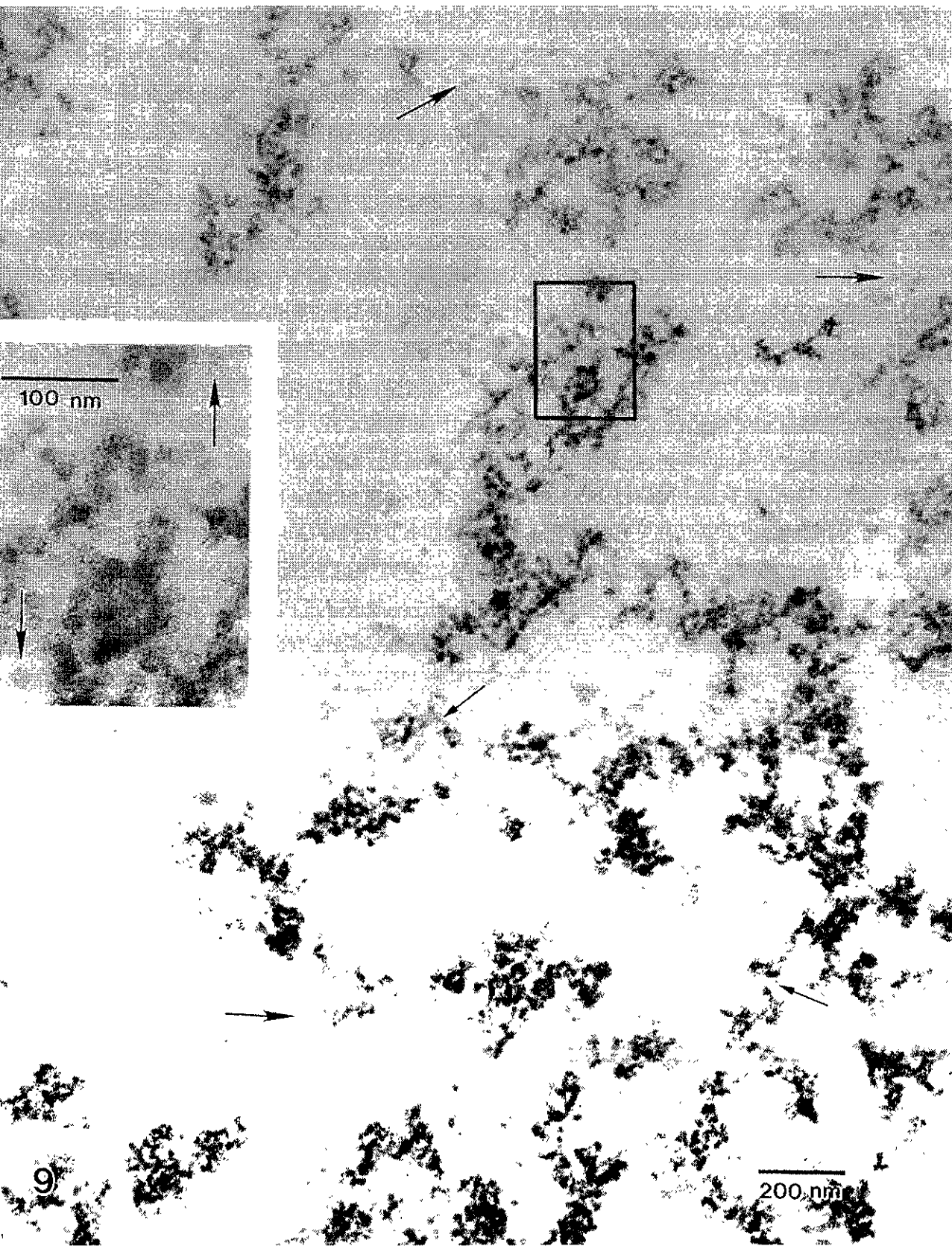
se observa que la fracción de núcleos es muy abundante y no contiene cloroplastos. A mayor aumento y con contraste de fases se observa la cromatina reticulada (Figura 7C).

Con microscopía electrónica de transmisión los núcleos muestran la cromatina y abundantes fibras y gránulos de ~32 nm de diámetro en los espacios intercromatiniano y pericromatiniano. La membrana nuclear se ha fragmentado, por lo que de los núcleos obtenidos se liberan gran cantidad de gránulos interconectados por fibras y también gránulos aislados. El tamaño de éstos es similar al de los gránulos que se encuentran en el núcleo ($X= 32 \pm 3$ SD) (Figura 8). En las fracciones de gránulos se observan agrupaciones fibrogranulares en las que los gránulos se unen entre sí a través de fibras adquiriendo una forma de rosario. Este arreglo constituye el componente mayoritario de las fracciones nucleares obtenidas (Figura 9). En otros casos, los gránulos no se asocian a fibras y se observan como partículas aisladas. En el margen superior izquierdo de la figura 9 se observan a mayor aumento los gránulos aislados y asociaciones fibrogranulares.

Figura 8. Núcleo aislado de *G. biloba*. Se aprecia la cromatina (C) y abundantes gránulos de *Lacandonia* (flechas largas), interconectados por fibras (flechas cortas). Del núcleo se han liberado abundantes agrupaciones fibrogranulares y gránulos de *Lacandonia* no asociados a fibras. 75, 000 x



Figura 9. Fracción enriquecida en gránulos de *Lacandonia* (flechas largas). Estos permanecen asociados a fibras (flechas cortas) y como partículas aisladas. 73, 000 x. El recuadro indica la zona de fibras y gránulos que se observa a mayor aumento en el extremo superior izquierdo y donde se aprecia la morfología y estructura de los GL. 200, 000 x



DISCUSIÓN

- Presencia de poly(A)⁺RNA en los gránulos de *Lacandonia*

Casi todos los mRNAs de las células eucariontes terminan en una cola de residuos de adenina en el extremo 3' y su presencia es un buen marcador de RNAs maduros. La cola de poly(A)⁺RNA estimula el proceso de traducción y le da estabilidad al mRNA (en Lewis, et al., 1995). En los núcleos de mamíferos, el poly(A)⁺RNA colocaliza con los factores de splicing en el nucleoplasma y citoplasma de mamíferos (Carter et al., 1991; Visa et al., 1993; Huang et al., 1994).

Utilizando hibridación *in situ* ultraestructural y una sonda de poly(dT) biotinada en células HeLa, Visa et al. (1993), encontraron que una parte de la población de gránulos pericromatinianos contiene poly(A)⁺RNA. Debido a que los gránulos de *Lacandonia* presentan un comportamiento citoquímico e inmunocitoquímico similar a los gránulos pericromatinianos, en este trabajo utilizamos hibridación *in situ* ultraestructural con una sonda de oligo dT para detectar si los gránulos de *Lacandonia* contienen poly(A)⁺RNA. Nuestros resultados muestran que las fibras pericromatinianas e intercromatinianas así como gran parte de los gránulos de *Lacandonia* contienen poly(A)⁺RNA, lo que apoya la hipótesis de que estas partículas contienen mRNAs y que son estructuras equivalentes a los gránulos pericromatinianos (Agredano-Moreno y Jiménez-García 2000).

Así mismo, en este trabajo utilizamos hibridación *in situ* ultraestructural usando como sonda el DNA genómico para detectar los dominios enriquecidos en RNA total en los núcleos de *L. schismatica*. El RNA se localiza en el nucléolo, en las fibras y en los gránulos de *Lacandonia*. En 1998, López-Velázquez et al., empleando un procedimiento similar para detectar RNA total en los núcleos de hígado de ratón detectaron marcado con la sonda en el nucléolo, el componente fibrilar y en los gránulos pericromatinianos.

- Los gránulos de *Lacandonia* contienen proteínas SR

Se ha propuesto que los gránulos de *Lacandonia* son estructuras equivalentes a los gránulos de Balbiani, los cuales están enriquecidos en proteínas SR (Visa et al., 1996). Para conocer si los gránulos de *Lacandonia* contienen proteínas SR, en este trabajo llevamos a cabo inmunolocalización ultraestructural con el anticuerpo 3C5 para detectar proteínas SR. Los resultados obtenidos muestran que hay dos componentes enriquecidos en proteínas SR en los núcleos de *L. schismatica*: 1) un gran número de gránulos de *Lacandonia* y 2) las fibras que los interconectan (Agredano-Moreno y Jiménez-García 2000).

Actualmente se sabe que las proteínas SR en los núcleos de los anillos de Balbiani se unen al pre-mRNA a lo largo del exón y lo acompañan en su trayectoria desde los sitios de transcripción hasta el poro nuclear, lo que ha permitido sugerir que estas proteínas son activas no sólo en el evento de “splicing” sino también en procesos post-transcripcionales de la expresión génica como el transporte del mRNA hacia el citoplasma (Alzhanova-Ericsson, et al., 1996). Debido a que los gránulos de *Lacandonia* tienen un comportamiento citoquímico e

inmunocitoquímico similar a los gránulos de Balbiani, sugerimos que las proteínas SR tienen un papel en eventos post-“splicing” en los gránulos de *Lacandonia*, lo que se ve reforzado por el hecho de que las proteínas SR se presentan en muchos de los gránulos ubicados en el nucleoplasma lejos de los sitios de transcripción activa donde ocurre el proceso de maduración de los pre-mRNAs.

- La abundancia de los gránulos de *Lacandonia* varía durante el desarrollo de la flor

Se ha propuesto que los gránulos de *Lacandonia* son equivalentes a los gránulos pericromatinianos. El número de estos últimos varía durante la diferenciación celular en animales (Vázquez-Nin et al., 1980; Zavala et al., 1992; Zavala y Vázquez-Nin, 1997). El comportamiento de los GPCs depende del tejido. Por ejemplo, las células de etapas muy tempranas en la formación de la notocorda se caracterizan por la presencia de abundantes gránulos pericromatinianos, por el contrario, en estadios más avanzados, el número de gránulos pericromatinianos disminuye. Estos cambios coinciden con eventos importantes de la diferenciación y la maduración celular (Zavala y Vázquez-Nin, 2000). Se ha observado un comportamiento muy particular durante la maduración funcional de las neuronas embrionarias y las fibras estriadas durante la sinaptogénesis y en las células epidérmicas. En el caso de las células nerviosas, durante la transformación de neuroblastos a neuronas maduras, los gránulos pericromatinianos muestran un marcado incremento que se mantiene hasta el momento de la eclosión.

En este trabajo analizamos si los gránulos de *Lacandonia* presentan un comportamiento comparable a los gránulos pericromatinianos durante el desarrollo de la flor de *L. schismatica* para lo cual seleccionamos las etapas de pre-antesis (etapa de botón floral, es decir, antes de que la flor abra) y post-antesis (flores abiertas). El análisis estadístico de los resultados utilizando la prueba de Cochran indica que los gránulos de *Lacandonia* son muy abundantes en etapas pre-antesis y que cuando las flores abren su número disminuye. Lo anterior indica que los gránulos de *Lacandonia* se comportan de manera similar a los gránulos pericromatinianos durante el desarrollo y que los cambios en su frecuencia se pueden correlacionar con la producción de proteínas requeridas durante eventos importantes en la maduración de los tejidos florales (Agredano-Moreno y Jiménez-García 2000). En pre-antesis ocurren todos los eventos importantes en el desarrollo de la flor como son la maduración de los carpelos y los granos de polen y el proceso de la fecundación (Márquez-Guzmán et al., 1993). Es en esta etapa cuando los gránulos de *Lacandonia* son abundantes. Por el contrario, su número decrece en etapas post-antesis cuando sólo quedan las paredes de los granos de polen en las anteras, y la flor abre para dispersar los frutos que contienen a las semillas.

- Obtención de una fracción enriquecida en gránulos de *Lacandonia*

En las fracciones de gránulos de *G. biloba* obtenidas se presentan componentes granulares de 32 nm de diámetro de dos tipos: 1) los componentes granulares asociados a fibras que forman agrupaciones fibrogranulares en las que los gránulos se unen entre sí a través de fibras como en las cuentas de un rosario y que constituye el componente mayoritario de las fracciones

nucleares obtenidas y 2) los gránulos no asociados a fibras que se observan como partículas aisladas. Este tipo se presenta en menor proporción.

En las micrografías electrónicas de núcleos *in situ* de *L. schismatica* y *G. biloba* procesados para microscopía electrónica de transmisión, se observan abundantes gránulos de *Lacandonia* asociados a fibras dispuestos en un arreglo fibrogranular y gránulos de *Lacandonia* libres en el nucleoplasma en menor proporción. La organización de los gránulos observados *in situ* en los tejidos de ambas especies y procesados para microscopía electrónica y la organización de los gránulos observada en las fracciones enriquecidas en gránulos es similar. Lo anterior indica que el procesamiento para la obtención de las fracciones enriquecidas en gránulos no es agresivo y permite conservar la organización de dichas partículas.

Por otra parte, el tamaño y forma de los componentes granulares de las fracciones nucleares es similar al de los núcleos *in situ*, lo que indica que hay una buena conservación de las moléculas que componen estas partículas. Además, es muy importante hacer notar que el aislamiento de las fracciones enriquecidas en gránulos corrobora el hecho de que estas partículas son muy abundantes y que representan un buen modelo para analizar la hipótesis de que estas partículas son dominios intranucleares enriquecidos en mRNAs.

En el futuro es necesario analizar la presencia de mRNA en los gránulos de *Lacandonia* por medio columnas de oligo-dT. Si hay mRNA en estas partículas es necesario estudiar la expresión de esos mRNAs en un sistema de traducción *in vitro*.

Este estudio apoya la hipótesis de que estas partículas contiene mRNAs, ya que la hibridación *in situ* ultraestructural con una sonda de poli-T marca muchos gránulos de *Lacandonia* en los núcleos estudiados.

Por otra parte, la obtención de una fracción enriquecida en gránulos permitirá en un futuro estudiar la composición, proporción y organización de las proteínas y el RNA que contienen los gránulos de *Lacandonia* y por lo tanto contribuirá a conocer el papel citofisiológico de estas partículas en los núcleos.

Los estudios citoquímicos, inmunocitoquímicos y de hibridación *in situ* realizados hasta el momento han permitido empezar a dilucidar la composición molecular de estas partículas. Hasta el momento sabemos que estos gránulos: 1) son RNPs, 2) no contienen los factores de “splicing” que forman snRNPs 3) contienen proteínas SR recientemente involucradas en eventos post-“splicing” y 4) contienen poly(A)⁺RNA. Lo anterior sugiere que contienen mRNAs. Sin embargo, es con el análisis bioquímico de las fracciones enriquecidas en gránulos lo que permitirá conocer si son mRNAs y la composición precisa de proteínas y RNA de estas partículas y de las fibras que los interconectan. Además, sería interesante conocer si la composición molecular de los gránulos observados como partículas individuales es la misma que la de los gránulos asociados a las fibras.

Por último, la organización tridimensional de los gránulos y la relación fibra-gránulo es importante para determinar las interacciones moleculares entre ambos componentes y conocer

si los gránulos no asociados a fibras se liberan de estas últimas. El estudio de la relación fibra-gránulo se puede estudiar a mayor resolución con el microscopio de fuerza atómica.

En la tabla que se anexa al final de esta sección se resumen las características de los gránulos de *Lacandonia*, los gránulos de Balbiani y los gránulos pericromatinianos.

GRÁNULOS	PRESENTES EN	LOCALIZACIÓN	TAMAÑO	COMPOSICIÓN MOLECULAR
GRÁNULOS DE LOS ANILLOS DE Balbiani (Beerman & Bahr 1954)	Glándulas salivales de <i>Chironomus</i>	El nucleoplasma que rodea los cromosomas politénicos y a los anillos de Balbiani	~50 nm	-RNPs -Sensibles a la digestión enzimática de pronasa-Rnasa -Se desconoce si contienen poly(A)RNA -Proteínas SR (hrp45, etc)
GRÁNULOS PERICROMATINIANOS (GPCs) (Watson 1962)	Mamíferos	Periferia de la cromatina compacta	30-50 nm	-RNPs -Sensibles a la digestión enzimática de pronasa-Rnasa -RNA -PolyA+RNA -Se desconoce si contienen proteínas SR
GRÁNULOS DE <i>Lacandonia</i> (GLs) (Jiménez-García et al., 1992)	Plantas	Espacio inter y pericromatiniano	~32 nm	-RNPs -Sensibles a la digestión de pronasa-Rnasa -RNA -Poly(A) ⁺ RNA -Proteínas SR

Resumen de las características de los GL, los GPCs y los GB

CONCLUSIONES

1. Los gránulos de *Lacandonia* contienen poly(A)⁺RNA al igual que los GPCs
2. Los gránulos de *Lacandonia* contienen proteínas SR al igual que los GB
3. El número de gránulos de *Lacandonia* es más abundante en etapas pre-antesis y disminuye en etapas post-antesis

Los puntos mencionados anteriormente sugieren que los gránulos de *Lacandonia* son equivalentes a los GPCs y a los GB

4. Una fracción de núcleos de *G. biloba* presenta componentes granulares de ~32 nm diámetro que son morfológicamente similares a los GL.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Agredano-Moreno, L.T., and Jiménez-García, L.F. 2000. New Evidence that *Lacandonia* granules are ultrastructurally related to perichromatin and Balbiani ring granules. *Biol. Cell.* 92:71-78.

Agredano-Moreno, L.T., Jiménez-García, L.F., Echeverría, O.M., Martínez, E., Ramos, C.H., and Vázquez-Nin, G.H. 1994. Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*. *Biol. Cell.* 82:177-184.

Alzhanova-Ericsson, A.T., Sun, X., Visa, N., Kiseleva, E., Wurtz, T., and Daneholt, B. 1996. A protein of the SR family of splicing factors binds extensively to exonic Balbiani ring pre-mRNA and accompanies the RNA from the gene to the nuclear pore. *Genes Dev.* 10:2881-2893.

Bachelierie, J.P., Puvion, E., and Zalta, J.P. 1975. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin RNA protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. *Eur. J. Biochem.* 58:327-337.

Baurén, G., and Wieslander, L. 1994. Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell.* 76:183-192.

Beven, A.F., Simpson, G.G., Brown, J.W.S., and Shaw, P.J. 1995. The organization of spliceosomal components in the nuclei of higher plants. *J. of Cell Science.* 108: 509-518.

Beermann, W., and Bahr, G.F. 1954. The submicroscopic structure of the Balbiani ring. *Exp. Cell Res.* 6:195 - 201

Beermann, W. 1962. In 13. Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie am 3.-5. Mai 1962 in Mosbach/Bden, pp. 64-100, Springer-Verlag, Berlin.

Burge, C.B., Tuschl, T., and Sharp, P.A. 1999. Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome, in Gesteland, R.F., Cech, T.R., and Atkins, J.F. (Eds.), *The RNA World*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Cajal, S.R. 1903. Un sencillo método de coloración del retículo protoplásmico y sus efectos en los diversos órganos nerviosos. *Trab. Lab. Invest. Biol.* 2: 129-221.

Calado, A., and Carmo-Fonseca, M. 2000. Localization of poly(A)-binding protein 2 (PABP2) in nuclear speckles is independent of import into the cell nucleus and requires binding to poly(A)RNA. *J. Cell Sci.* 2000. 113: 2309-2318.

Carter, K. C., Taneja, K.L., and Lawrence, J.B. Discrete nuclear domains of poly (A) RNA and their relationship to the functional organization of the nucleus. 1991. *J. Cell Biol.* 115:1191-1202.

Chandler, S. D., Mayeda, A., Yeakley, J.M., Krainer, A.R., Fu, X.D. 1997. RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 3596-3601.

Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R., Buratowski, S. 1997. MRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 11: 3319-3326.

Coello, G., Escalante, A., and Soberón, J. 1993. Lack of genetic variation in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) in its only known locality. *Ann. Miss.Bot. Gard.* 80:898-901.

Colgan, D.F., and Manley, J.L. 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* 11:2755-2766.

Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. The New York Botanical Garden, New York.

Daneholt, B. 1999. Pre-mRNP particles: From gene to nuclear pore. *Curr. Biol.* 9:R412-R415.

Dantoni, J.C., Murthy, K.G., Manley, J.L., and Tora, L. 1997. Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature.* 389: 399-402.

Daskal, Y., Merski, J.A., Hughes, J.B., and Busch, H. 1975. The effects of cyclohexamide on the ultrastructure of rat liver cells. *Exp. Cell Res.* 93: 395-401.

Daskal, Y., Komaromy, L., and Busch, H. 1980. Isolation and partial characterization of perichromatin granules. *Exp. Cell Res.* 126:39-46.

Daskal, Y.(1981). Perichromatin granules. En *The Cell Nucleus*, vol. VIII. Acad. Press, Inc. New York, U.S.A. 117-137.

Davidse, G. and Martínez, E. 1990. The chromosome number of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Systematic Botany.* 15: 635-637.

Diario Oficial de la Federación (Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos). Tomo CDLXXXVIII Núm. 10. 1994.

Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S., and Burd, C.G. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* 62:289-321.

- Echeverría, O.M., Zavala, G., Benítez, A., and Vázquez-Nin, G.H. 1980. Changes during estral cycle in the nucleus of endometrial cells of the rat. *Biol. Cell.* 39: 139-142.
- Echeverría, O.M., Pagán-Santini, R., and Vázquez-Nin, G.H. 1991. Effects of testosterone on nuclear ribonucleoprotein components of prostate epithelial cells. *Biol. Cell.* 72:223-229.
- Economides IV, and Pedersen, T. 1983. In vitro assembly of a pre-messenger ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:4296-4300.
- Esponda, P. 1977. Fine structure of synaptonemal-like complexes in *Allium cepa* microspores. *Protoplasma* 93:1-6.
- Fakan, S., Puvion, E., and Spohr, G. 1976. Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 99:155-164.
- Fakan, S. 1994. Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol.* 4:86-90.
- Fay, F.S., Taneja, K.L., Shenoy, S., Lifshitz, L., and Singer, R.H. 1997. Quantitative digital analysis of diffuse and concentrated nuclear distributions of nascent transcripts, SC35 and poly(A). *Exp. Cell Res.* 231:27-37.
- Gall, J.G. 2000. Cajal bodies: The first 100 years. *Annu. Rev Cell Dev. Biol.* 16:273-300.
- Heinrich, P.C., and Northemann, W. 1981. The structure of ribonucleoprotein particles from rat liver nuclei. *Molec. Biol. Rep.* 7: 15-24.
- Huang, S., Deerinck, J., Ellisman, M.H., and Spector, D.L. 1994. In vivo analysis of the stability and transport of nuclear Poly(A)⁺RNA. *J. Cell Biol.* 126: 877-899.
- Jiménez-García, L.F., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M.L., Echeverría, O.M., Martínez, E., Ramos, C.H. and Vázquez-Nin, G.H. 1992. The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae:Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle. *Biol. Cell.* 75:101-110.
- Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M. de L., Ochs, R.L., Rothblum, L.I., Hannan, R., and Spector, D.L. 1994. Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 9:955-966.
- Jiménez-García, L.F., Reynoso-Robles, R., Fragoso-Soriano, R., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M. de L., González-Moreno, S., Ramos, C.H., y Martínez, E. 1998. *Biología Celular de Lacandonia schismatica*. Análisis por microscopía electrónica y de fuerza atómica. *Bol. Soc. Bot. México.* 62:5-14.

Jiménez-García, L.F. and Fragoso-Soriano, R. 2000. Atomic force microscopy of the cell nucleus. *J. Struct. Biol.* 129: 218-222.

Lewin. 1997. *Genes VI*. Oxford University Press. pp 171-172.

Lewis, J., Gunderson, S., and Matajaj, I.W. 1995. The influence of 5' and 3' end structures on pre-mRNA metabolism. *J. Cell. Sci. (Suppl)*. 19:13-19.

Lonroth, A., Alexciev, K., Mehlin, H., Wurtz, T., Skoglund, U., Daneholt, B. 1992. Demonstration of a 7-nm RNP fiber as a basic structural element in a premessenger RNP particle. *Exp. Cell Res.* 199: 292-296

López-Velázquez, G., Segura-Valdez, M. de L., Alcántara-Ortigoza, M.A., and Jiménez-García, L.F. 1998. Localization of intranuclear RNA by electron microscopy in situ hybridization using a genomic DNA probe. *Arch. Med. Res.* 29:185-190.

Luehrsen, K.R., Taha, S., and Walbot, V. 1994. Nuclear pre-mRNA processing in higher plants. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 17: 149-193.

Márquez-Guzmán, J., Engleman, M., Martínez-Mena, A., Martínez, E. y Ramos, C.H. 1989. Anatomía reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Ann. Miss. Bot. Gard.* 76:124-127.

Márquez-Guzmán, J., Vázquez-Santana, S., Engleman, M., Martínez-Mena, A. and Martínez, E. 1993. Pollen development and fertilization in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Ann. Miss. Bot. Gard.* 80:891-897.

Martínez, E. y Ramos, C.H. 1989. Lacandoniaceae (Triuridales): una nueva familia de México. *Annals of the Missouri Botanical garden.* 76:128-135.

Martínez, E. 1994. Lacandoniaceae. En: Davidse, G., Sousa, M., Chater, A.O. (Eds). *Flora Mesoamericana*, Vol. 6 Alismataceae a Cyperaceae. UNAM-Missouri Botanical Garden-Natural History Museum, London, 19.

Matera, A.G. 1999. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends. In Cell Biol.* 9: 302-309.

Matunis, E.L., Matunis, M.J.. and Dreyfuss, G. 1993. Association of individual hnRNP proteins and snRNPs with nascent transcripts. *J. Cell Biol.* 121:219-228.

Minvielle-Sebastia, L., and Keller, W. 1999. mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr. Op. in Cell Biol.* 11:352-357.

- Monneron, A., and Bernhard W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27:266-288.
- Moses, M.J. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 215-218.
- Palacios-Mayorga, S., and Pérez-Silva, E. 1993. Endotrophic mycorrhiza in *Lacandonia schismatica*, Lacandoniaceae a new saprophytic angiospermae family. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 35:655-69.
- Politz, J.C., Browne, E.S., Wolf, D.E., and Pederson, T. 1998. Intranuclear diffusion and hybridization state of oligonucleotides measured by fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. 95:6043-6048.
- Politz, J.C., Tuft, R.A., Pederson, T., and Singer, R.H. 1999. Movement of nuclear poly(A)RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr. Biol.* 9:285-291.
- Reed, R. 2000. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr. Op. in Cell Biol.* 12:340-345.
- Reyes-García, A., y Sousa, S.M. 1995. Una nueva localidad para la familia Lacandoniaceae y nuevos registros para la Reserva de Montes Azules, Chiapas, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 57:117-119.
- Roth, J. 1986. Post-embedding cytochemistry with gold-labeled reagents. A review. *J. Microsc.* 143:125.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Vol. 2, Second edition. Cold Spring Harb. Lab. Press; New York 15: 113 p.
- Skoglund, U., Andersson, K., Strandberg, B., and Daneholt, B. 1986. Three-dimensional structure of a specific pre-messenger RNP particle established by electron microscope tomography. *Nature.* 319:560-564.
- Spector, D.L. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 265-315.
- Stevens, B.J., and Swift, H. 1966. RNA transport from nucleus. 1966. RNA transport from nucleus to cytoplasm in *Chironomus* salivary glands. *J. Cell Biol.* 31:55-78.
- Sun, X., Alzhanova-Ericsson, A.T., Visa, N., Aissouni, Y., Zhao, J., and Daneholt, B. 1998. The hrp23 protein in the Balbiani ring pre-mRNP particles is released just before or at the binding of the particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 142:1181-1193.

Tronchere, H., Wang, J., and Fu, X.D. 1997. A protein related to splicing factor U2AF35 that interacts with U2AF65 and SR proteins in splicing of pre-mRNA. *Nature*. 1997. 388: 397-400.

Turner, B.M., and Franchi, L. 1987. Identification of protein and antigens associated with nuclear matrix and clusters of interchromatin granules in both interphase and mitotic cells. *J. Cell Sci.* 87:269-282.

Vázquez-Nin, G.H., and Bernhard, W. 1971. Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruct. Res.* 36:842-860.

Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., Molina, E., and Fragoso, J. 1978. Effects of ovariectomy and estradiol infection on the nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Acta. Anat.* 102: 308-318.

Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., and Pedron, J. 1979. Effects of estradiol on ribonucleoproteic constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. *Biol. Cell.* 35: 221-228.

Vázquez-Nin, G.H., Ortega-Rangel, J.A., and Echeverría, O.M. 1980. Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo. *Biol Cell.* 39:143-146.

Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., Fakan, S., Leser, G., and Martín, T. 1990. Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus Thummi*. *Chromosoma.* 99:44-51.

Vázquez-Santana, S., Engleman, M., Martínez-Mena, A., and Márquez-Guzmán, J. 1998. Ovule and seed development of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Am. J. Bot.* 85:299-304.

Visa, N., Puvion-Dutilleul, F., Harper, F., Bachellerie, J.P., and Puvion, E. 1993. Intranuclear distribution of Poly(A)RNA determined by electron microscope in situ hybridization. *Exp. Cell Res.* 208:19-34.

Visa, N., Alzhanova-Ericsson, T., Sun, X., Kiseleva, E., Bjorkroth, B., Wurtz, T., and Daneholt, B. 1996. A pre-mRNA-binding protein accompanying the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes. *Cell.* 84:253-264.

Watson, M.L., 1962. Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell Biol.* 13:162-167.

Wurtz, T., Lonroth, A., Ovchinnikov, L., Skoglund, U., and Daneholt, B. 1990. Isolation and initial characterization of a specific premessenger ribonucleoprotein particle. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 831-835.

Wurtz, T., Kiseleva, E., Nacheva, G., Alzhanova-Ericsson, A.T., Rosén, A., and Daneholt, B. 1996. Identification of two RNA-binding proteins in Balbiani ring premessenger ribonucleoprotein granules and presence of these proteins in specific subsets of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles. *Mol. Cell. Biol.* 16:1425-1435.

Yeakley, J.M., Tronchere, E., Olesen, J., Dyck, J.A., Wang, H.Y. and Fu, X.D. 1999. Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine rich pre-mRNA splicing factors. *J. Cell Biol.* 145:447-455.

Zachar, Z., Kramer, J., Mims, I.P., and Bingham, P.M. 1993. Evidence for channeled diffusion of pre-mRNAs during nuclear RNA transport in metazoans. *J. Cell Biol.* 121:729-742.

Zavala, G., Aguilar, X., Jiménez, L.F., Echeverría, O.M. and Vázquez-Nin, G.H. 1992. Changes in the ribonucleoprotein constituents of the nucleus during differentiation of muscle cells in the chick embryo. *Biol Cell.* 76:159-165.

Zavala, G., and Vázquez-Nin, G.H. 1997. Changes of ribonucleoprotein structures of embryonic epidermal cell nuclei during differentiation and maturation. *Biol Cell.* 89:245-255.

Zavala, G., and Vázquez-Nin, G.H. 2000. Analysis of nuclear ribonucleoproteic structures during notochordal cell differentiation and maturation in chick embryos. *The Anatomical Record* 259:113-123.

Zar, J. 1996. *Bioestadística Analysis*. Third edition. Prentice Hall. New York. USA.

TOPIA CENSUS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

New evidence that *Lacandonia* granules are ultrastructurally related to perichromatin and Balbiani ring granules

Aurdes Teresa Agredano-Moreno, Luis Felipe Jiménez-García*

Laboratory of Electron Microscopy and Laboratory of Confocal Microscopy, Department of Biology, Faculty of Sciences, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico

Received 4 August 1999; accepted 14 December 1999

Lacandonia granules are abundant non-typical extranucleolar ribonucleoprotein particles found in the nucleus of *Lacandonia schismatica*, a rare plant showing spatial inversion of sex organs. In the present study, changes in the number of *Lacandonia* granules during flower development, and the presence of SR proteins and poly(A)⁺ RNA in the nuclei of *L. schismatica* were analyzed by electron microscopy, immunoelectron microscopy and ultrastructural in situ hybridization. Our results show an important reduction in the number of *Lacandonia* granules in the nuclei of cells of opened (post-anthesis) in relation to unopened (pre-anthesis) flowers, where granules are very abundant. The SR family of splicing factors and poly(A)⁺ RNA are present in both perichromatin fibers and *Lacandonia* granules. The developmental behavior, the presence of SR proteins, recently involved in post-splicing events, poly(A)⁺ RNA and the reported absence of snRNPs splicing factors in *Lacandonia* granules, suggest that these particles are involved in postranscriptional events as storage and/or transport of mRNAs. A similar situation is present in other nuclear RNP as perichromatin granules present in mammals and Balbiani ring granules of salivary glands of *Chironomus*. Based on similarities in morphological, developmental behavior, immunocytochemistry and in situ hybridization results, we conclude that *Lacandonia*, perichromatin and Balbiani ring granules may be also functionally similar structures. 2000 © Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

Ribonucleoprotein / SR proteins / ultrastructural in situ hybridization / *Lacandonia schismatica* / flower development

1. INTRODUCTION

Lacandonia schismatica (Lacandoniaceae:Triuridales) is an endemic and rare plant species (Diario Oficial, 1994), from the Lacandona Forest in Chiapas, México (Martínez and Ramos, 1989; Martínez et al., 1994; Reyes-García and Sousa, 1995), showing spatial inversion of sexual organs, a characteristic not found in other flow-

ering plants (Martínez and Ramos, 1989; Márquez-Guzmán et al., 1989). This feature has been proposed to be originated as a macroevolution event. For that reason and to try to understand its origin, several studies have been made on its biology, including cell biology studies. Briefly, *L. schismatica* is a saprophyte flowering plant where androecium is surrounded by gynoecium (Martínez and Ramos, 1989; Márquez-Guzmán et al., 1989). An endotrophic mycorrhiza is present (Palacios-Mayorga and Pérez-Silva, 1993). Pollen grains germinate within the anther and its reproduction is cleisto-

*Correspondence and reprints

gamic (Márquez-Guzmán et al., 1993), an aspect that may explain the lack of genetic variation (Coello et al., 1993). It also has a characteristic embryonic sac (Vázquez-Santana et al., 1998). The chromosome number is $n=9$ (Davidse and Martínez, 1990). In the cell structure, normal organelles are evident (Jiménez-García et al., 1998), but no chloroplast and photosynthesis activity are observed. The cell nuclei, however are large and contain reticulated chromatin as in other plants. Interestingly, a new ribonucleoprotein (RNP) particle known as *Lacandonia* granules is present among chromatin strands (Jiménez-García et al., 1992; Agredano-Moreno et al., 1994)

Lacandonia granules are very abundant, 32 nm in diameter intranuclear RNPs. They are intermediate in size and distribution between the well known interchromatin and perichromatin granules found in animal cells. The granules are also present in other members of the same order Triuridales (Jiménez-García et al., 1992). They have been considered structures related to perichromatin and Balbiani ring granules according to their cytochemical and immunocytochemical characteristics (Agredano-Moreno et al., 1994). Here, we present further evidence of this relation, since the number of *Lacandonia* granules varies during different developmental stages of the flower, as observed for perichromatin granules during differentiation of animal cells (Vázquez-Nin et al., 1980; Zavala et al., 1992; Zavala and Vázquez-Nin, 1997). In addition, we present ultrastructural in situ hybridization evidence that they contain poly(A)⁺ RNA as found in some perichromatin granules (Visa et al., 1993), then supporting the notion that these particles may contain mRNA (see Vázquez-Nin and Echeverría, 1996). Furthermore, immunoelectron localization showed that SR proteins, a family of proteins related to splicing and post-splicing events (see Manley and Tacke, 1996), are also present in *Lacandonia* granules, similar to what is found in Balbiani ring granules (Alzhanova-Ericsson et al., 1996).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Electron microscopy

Flowers of *Lacandonia schismatica* in stages pre-anthesis (un-opened, when bud flowers contain pollen grains at the three-cell stage and carpels are at early stage of development) and post-anthesis (opened, when fertilization already occurred and only pollen walls remain in anthers) (Márquez-Guzmán et al., 1993) were fixed for 1 h in a mixture of 6% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde, buffered in PBS (pH 7.2). Postfixation was made in 1% osmium tetroxide overnight. Samples were subsequently dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in an epoxy resin (gly-

cide ether 100, Merck) Thin sections of 60–90 nm thickness were contrasted with conventional uranyl acetate-lead citrate. The number of *Lacandonia* granules in somatic cells from the receptacle or the teguments in the carpels per square micrometer in pre-anthesis and post-anthesis stages, was determined on $\times 40\,000$ electron micrographs. A total of five different nuclei were measured for each stage. Statistical analysis using the Cochran's test was used.

2.2. Immunoelectron microscopy

Fragments of flowers were fixed with a mixture of 0.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde for 1 h at room temperature. Lowicryl K4M embedding was conducted as described (Roth, 1986) 60–90 nm thin sections were collected on formvar coated gold grids. Grids were floated in Tris-buffered saline (TBS) containing 20 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 20 mM sodium azide, 1.0% Tween-20 and 10% bovine serum albumin (BSA), and 10% normal goat serum (NGS) for 60 min. Sections were then incubated in anti-SR monoclonal antibody 3C5 (Turner and Franchi, 1987), diluted 1:30 in TBS at 4°C for 16 h in a humidified chamber. As negative controls, some grids were floated on TBS with no 3C5 antibody. Grids were washed for 15 min in TBS and then incubated with goat-anti-mouse IgM secondary antibody coupled to 10 nm colloidal gold particles, diluted 1:10 in TBS for 1 h at room temperature. After incubation, the grids were rinsed for 15 min in TBS and 10 min with water. Finally, samples were stained with uranyl acetate and lead citrate.

2.3. In situ hybridization of poly(A)⁺ RNA

In situ hybridization to poly(A)⁺ RNA was made as described with modifications (Huang et al., 1994). An oligo dT 20 mer dT₂₀ biotin-labeled (Boehringer) was used as probe for in situ hybridization to poly(A)⁺ RNA. Lowicryl sections were collected on formvar coated gold grids. Grids were floated in 10 μ L of the hybridization mixture containing oligo dT₂₀, 2 \times SSC, 1 mg/mL of tRNA, 10% dextran sulfate, and 25% formamide. Other grids were floated on the hybridization mixture containing no oligo dT 20 mer dT₂₀ as for negative controls. Hybridization was performed at 42°C in a humidified chamber overnight. After hybridization, grids were rinsed in 4 \times SSC for 15 min and then incubated in streptavidin conjugated with 10 nm colloidal gold particles, diluted 1:20 in 4 \times SSC at 4°C overnight. Grids were rinsed three times for 5 min each, PBS three times for 5 min each in deionized water. Uranyl acetate and lead citrate were used for contrast. In addition, in situ hybridization to detect total RNA (López-Velázquez et al., 1998) was performed using genomic DNA from *L. schismatica* as a probe. DNA was extracted according to standard protocols (Sambrook et al., 1989).

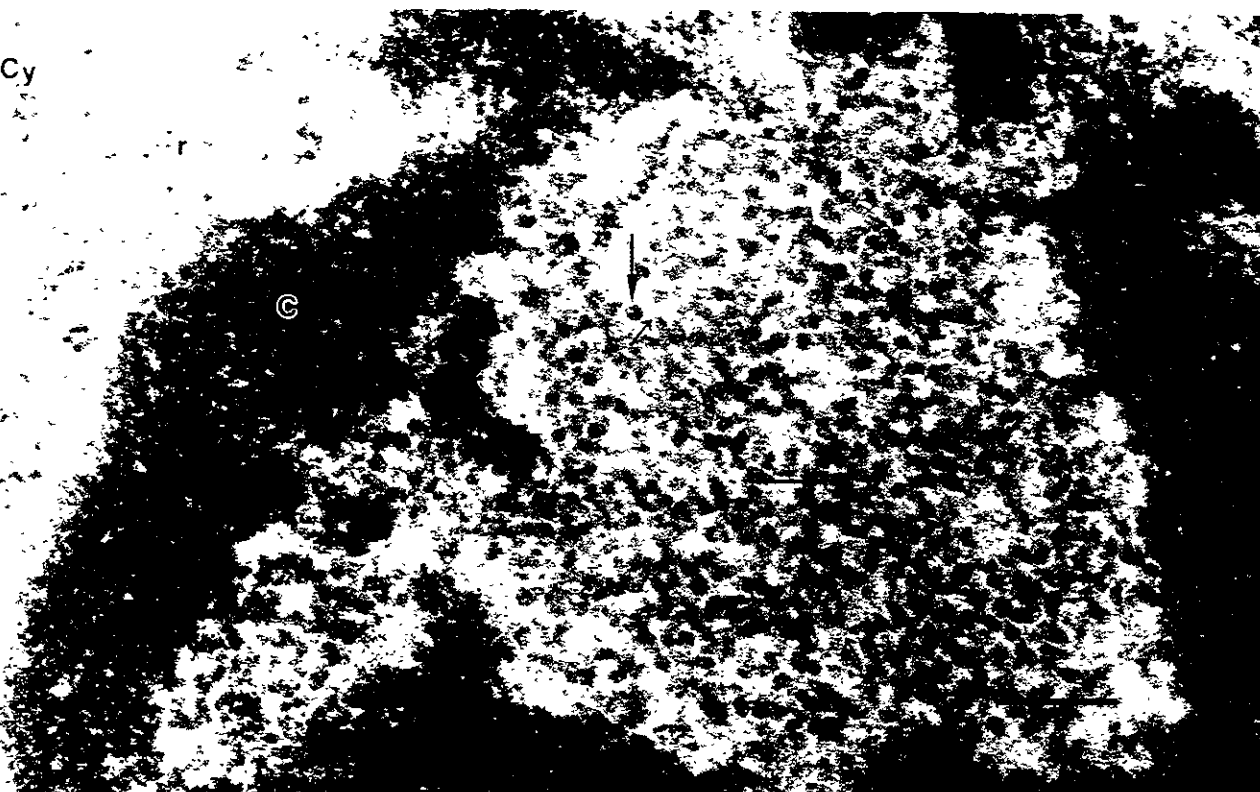


Figure 1. High magnification of *Lacandonia* granules in the interphase nucleus of *Lacandonia schismatica*. Abundant granules (large arrows) interconnected by fibers (small arrows), are seen in the interchromatin and perichromatin space surrounded by the reticulated chromatin (C). Ribosomes (r) are seen in the cytoplasm (Cy). $\times 82\,000$. Bar, 200 nm.

3. RESULTS

3.1. Abundance of *Lacandonia* granules during flower development

Lacandonia granules (Jiménez-García et al., 1992) from several tissues of the plant *L. schismatica* are very abundant 32 nm-diameter RNP intranuclear particles (figure 1). We analyzed their number during flower development. The mean value of granules in pre-anthesis is $\bar{x}=25 \pm 5$ S.D. (figure 2a), a higher value than the mean of $\bar{x}=19 \pm 3$ S.D. found in post-anthesis stages (figure 2b) ($P < 0.05$).

3.2. Localization of SR proteins in *Lacandonia* granules

Another criterion of equivalence of *Lacandonia* granules to perichromatin and Balbiani ring granules we used, was the presence of SR proteins found in the Balbiani granules

(Alzhanova-Ericsson et al., 1996). We analyzed the localization of SR proteins in the nuclei of *L. schismatica* using the anti-SR proteins monoclonal antibody (figure 3). We observed very intense labeling in the nucleus, with no labeling in the chromatin or in the cytoplasm. On the other hand, label was not present in negative controls when first antibody was not used. The labeled non-chromatin regions of the nucleus of *L. schismatica* are domains containing abundant *Lacandonia* granules interconnected with fibers (Jiménez-García et al., 1992). While fibers are very intensively labeled, not all the granules seem to be decorated with gold particles.

3.3. Localization of poly(A)⁺ RNA in *Lacandonia* granules

In the nuclei of *L. schismatica* intense gold labeling after in situ hybridization to poly(A)⁺ RNA was found in the non-chromatin area, including a considerable number of *Lacandonia* granules that were labeled individually.

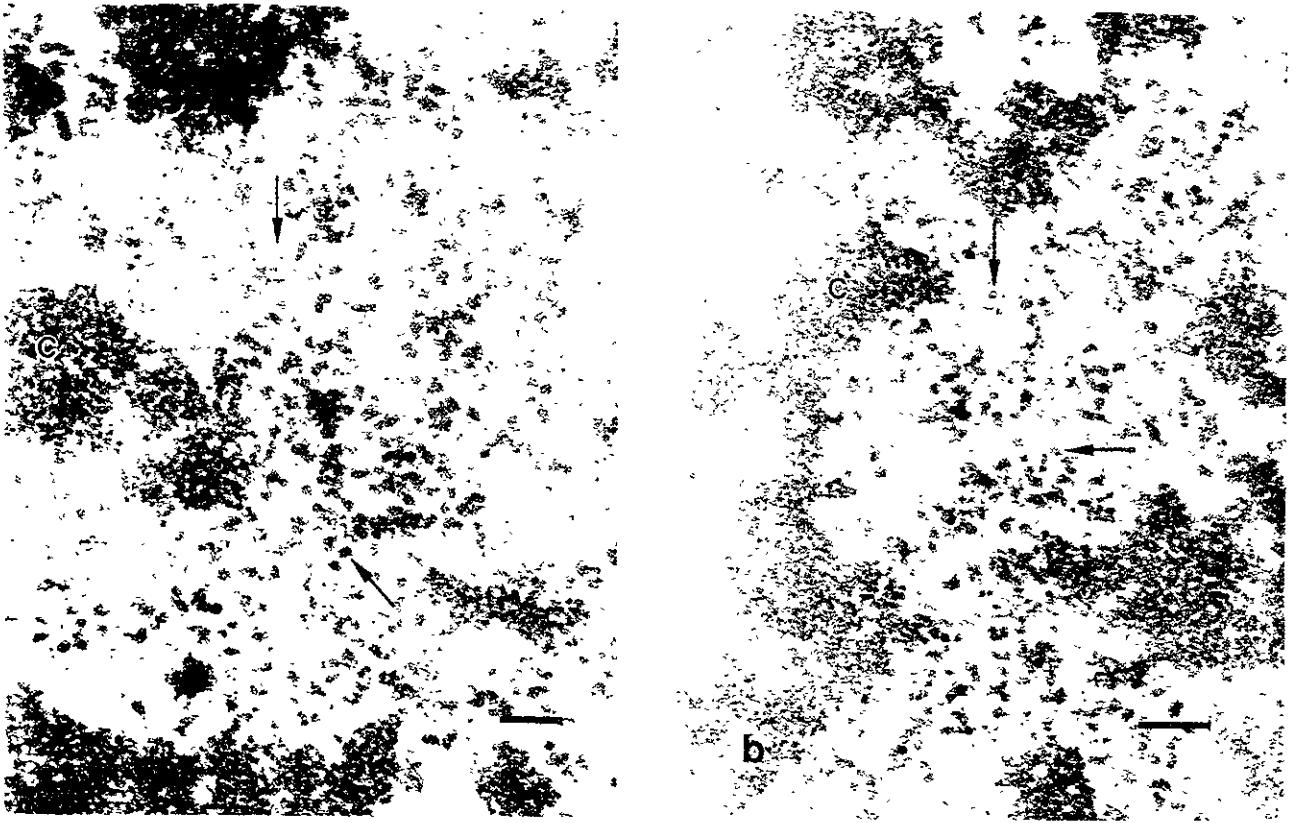


Figure 2. Abundance of *Lacandonia* granules during flower development. In somatic cells from the receptacle or teguments, *Lacandonia* granules (arrows) are more abundant in interphase nuclei of flowers during pre-anthesis (a) than in post-anthesis stages (b). C, chromatin. $\times 52\ 000$. Bar, 200 nm

(figure 4) and associated fibers. With a genomic DNA probe, labeling was found also in *Lacandonia* granules and associated fibers (not shown).

4. DISCUSSION

4.1. The number of *Lacandonia* granules varies during flower development in *Lacandonia schismatica*

Since *Lacandonia* granules have been proposed to have similar structures to perichromatin and Balbiani ring granules according to their cytochemical and immunocytochemical features, we investigated if they also behaved as perichromatin granules of animals during development. It has been previously shown that the number of perichromatin granules changes during differentiation in animal cells (Vázquez-Nin et al., 1980;

Zavala et al., 1992; Zavala and Vázquez-Nin, 1997). For example, the number of perichromatin granules increases both in muscle and nerve cells after synaptic contact, perhaps due to an alteration of the rate of transcription to transportation to the cytoplasm of mRNA, that characterizes a new cellular phenotype with a different physiological stage. A similar situation is observed in experiments using endometrial epithelial cells treated with estradiol (see Vázquez-Nin and Echeverría, 1996). These observations support the notion that perichromatin granules play a role in post-transcriptional events as transport of mRNA from the nucleus to the cytoplasm. To test whether *Lacandonia* granules present the same behavior, we analyzed their variation during flower development. We decided to study cells of flowers in pre-anthesis (unopened, bud flowers with pollen grains at the three celled stage) and post-anthesis (opened, at the stage when only pollen walls remain in anthers) stages, because it is now docu-

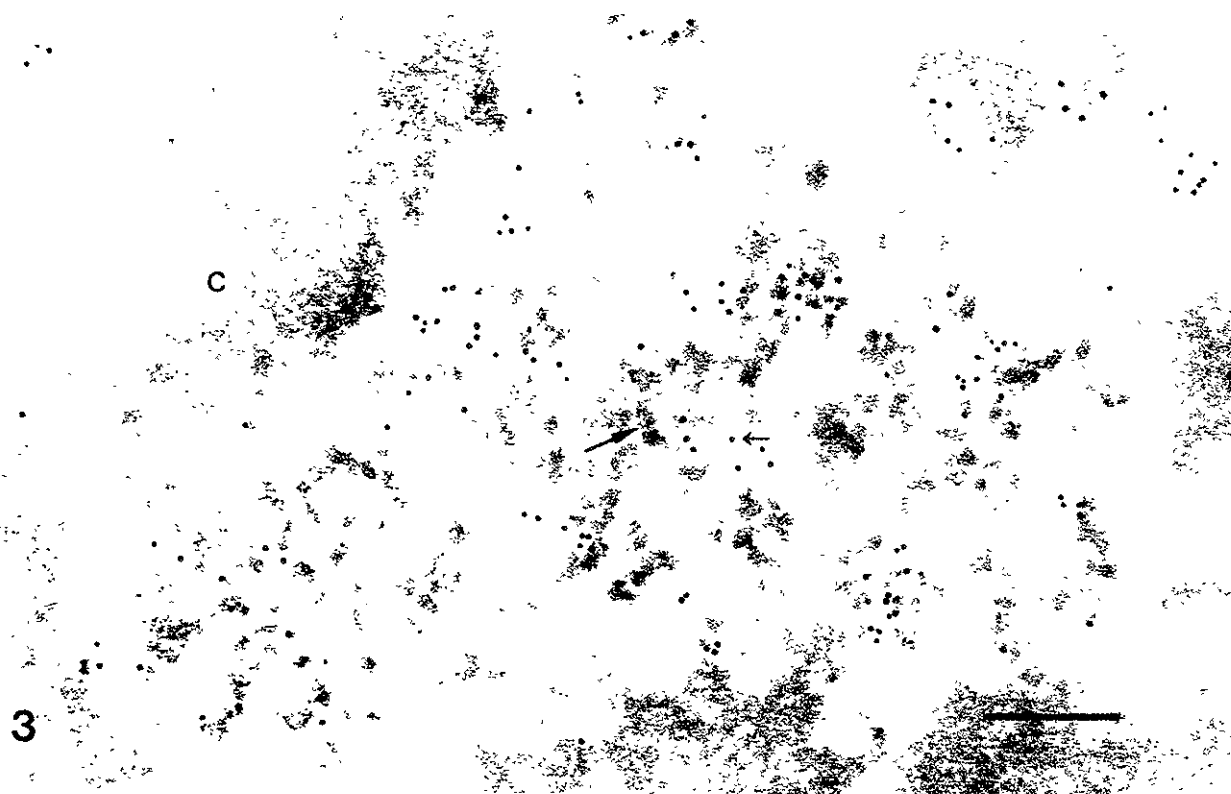


Figure 3. Immunoelectron microscopy localization of SR proteins in the interphase nuclei of *L. schismatica*. Gold particles intensely label *Lacandonia* granules (large arrow) and fibers (small arrow) that interconnect them. Chromatin (C) is not labeled by the 3C5 antibody. $\times 94\ 000$. Bar, 200 nm.

presented that important events such as pollination, fertilization and formation of floral organs in flower development of *L. schismatica* take place in the unopened flower bud (Márquez-Guzmán et al., 1993; Vázquez-Sanana et al., 1998). Expression of flower-specific genes related to these events must be developmentally regulated and we should visualize changes in the abundance of *Lacandonia* granules (proposed as a pull of mRNAs). During flower development *Lacandonia* granules indeed displayed a similar pattern of variation. Results showed that the number of *Lacandonia* granules is more abundant in unopened than in opened flowers so a correlation between the abundance of granules and flowering development is present. We propose that the abundance of *Lacandonia* granules may be developmentally regulated.

2. *Lacandonia* granules contain SR proteins

Lacandonia granules are labeled with a monoclonal antibody to SR proteins. In mammalian cells, splicing fac-

tors include snRNPs and non-snRNP molecules as SC35, SF2/ASF and other SR proteins that are characterized and localized in a speckled pattern in addition to being diffusely distributed in the nuclei. This pattern corresponds to interchromatin granules and perichromatin fibrils. The SR proteins are a family of remarkably conserved essential splicing factors present in a wide range of organisms that vary from *Drosophila* to humans (see Manley and Tacke, 1996). They are involved in both essential and alternative splicing in vitro and/or in vivo (Krainer et al., 1991; Fu et al., 1992; Mayeda et al., 1992; Cáceres et al., 1994). This family shares a similar structural organization, consisting of one or two amino-terminal RNA recognition motifs (RRMs) and an extensively phosphorylated carboxy-terminal domain that is rich in serine/arginine dipeptides (RS domain). It has been proposed that SR proteins could be active not only in splicing but also in other post-splicing processes such as intranuclear transport and translocation through the pore complex (Blencowe et

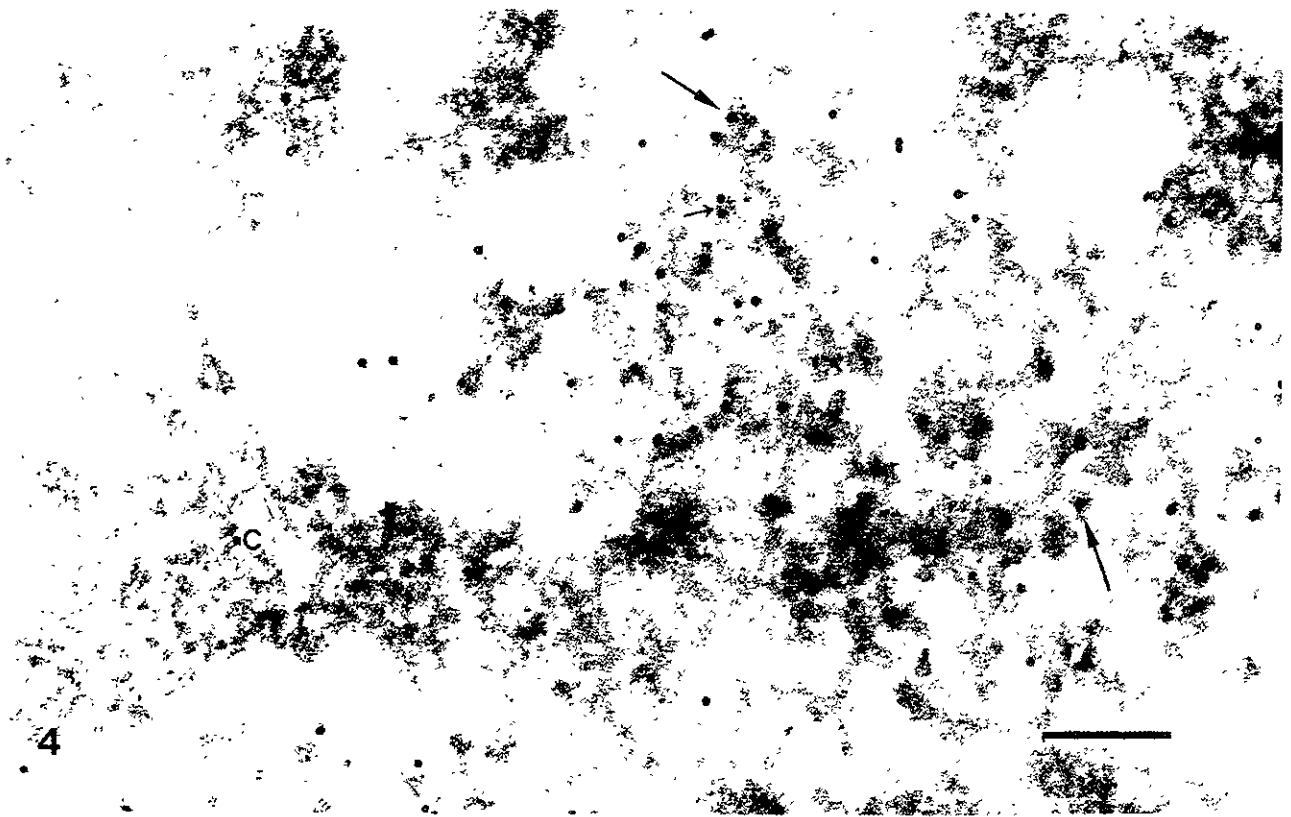


Figure 4. Non-isotopic ultrastructural in situ hybridization to detect poly(A)⁺ RNA in the interphase nuclei of *L. schismatica*. *Lacandonia* granules (large arrows) and fibers (small arrow) in the interchromatin and perichromatin space are intensely labeled. $\times 110\,000$ Bar, 200 nm.

al., 1995; Wang and Manley, 1995; Alzhanova-Ericsson et al., 1996) Studies in mammalian cells and in the salivary glands of the dipteran *Chironomus tentans* support a post-splicing role for SR proteins additional to their splicing role. Some SR proteins stay bound to the splicing complexes through splicing reaction and also remain in the exon-product complex. Overexpression of the SR protein SC35 can inhibit splicing and can result in an accumulation of unspliced pre-mRNA that is transported efficiently into cytoplasm, indicating that SR proteins can affect the stability and/or facilitate transport of pre-mRNA (Wang and Manley, 1995). More recently (Alzhanova-Ericsson et al., 1996), it was found that the protein hrp45, which belongs to the SR family of splicing factors and which is a major component of Balbiani ring granules, stays bound to these particles at multiple sites along exon and accompanies them from the gene to the nuclear pore. In plants, less is known about the structure and function of the sn-

RNPs and non-snRNPs (see Lüehrsen et al., 1994), and only recently members of the SR family of splicing factors have been characterized (Lopato et al., 1996a, b). SR proteins are mostly markers for interchromatin granules and perichromatin fibers (see Spector, 1993). Since *Lacandonia* granules are negative for snRNP (Agregado-Moreno et al., 1994), therefore indicating that they are not interchromatin granules, we tested if they behaved as Balbiani ring granules instead, which also contain SR proteins. In the present work we found that SR proteins in the nucleus of the plant *L. schismatica*, are abundant in the interchromatin and perichromatin region and are component of *Lacandonia* granules. The antibody 3C5 recognizes a family of SR proteins that are evolutionary conserved (Manley and Tacke, 1996); based on that, we used 3C5 antibody to recognize SR proteins in plants. In a previous study we found that in contrast to clusters of interchromatin granules, *Lacandonia* granules do not contain snRNPs (Agregado-Moreno

al., 1994). The presence of SR proteins in perichromatin granules agrees with a role in splicing. However, the presence of SR proteins also in *Lacandonia* granules supports an additional role, as proposed for some SR proteins in mammalian and *Chironomus* cells (Blencowe et al., 1995; Wang and Manley, 1995; Alzhanova-Ericsson et al., 1996). We conclude that SR proteins present in *Lacandonia* granules may play a different role in splicing. This role may be structural or related to post-transcriptional events such as storage and/or transport of mRNAs.

3. *Lacandonia* granules contain poly(A)⁺ RNA

Adding a tail of adenine residues is a characteristic feature of mRNA maturation. It represents a good marker to determine the presence of mature messages. Using poly(A)⁺ RNA has been shown to colocalize with splicing factors in speckles, as well as being diffusely distributed throughout the nucleoplasm and cytoplasm (Carter et al., 1991; Visa et al., 1993; Huang et al., 1994). In the present work, we also used oligo (dT) probes to detect poly(A)⁺ RNA in the nucleus of *L. schismatica* by ultrastructural in situ hybridization. Label was present in perichromatin fibers where transcription and splicing are proposed to take place (see Spector, 1993; Fakan, 1994). In addition, *Lacandonia* granules were also labeled as perichromatin granules (Visa et al., 1993). The presence of poly(A)⁺ RNA in perichromatin and *Lacandonia* granules supports the hypothesis that these granules may contain mRNAs. Poly(A) tails are present in essentially all mRNAs and they have a variety of different functions, such as the control of mRNA turnover and translocation efficiency. Nonetheless, some of the poly(A)⁺ RNA in speckles may be stable and therefore probably does not represent pre-mRNA or mRNA (Huang et al., 1994). In addition, in the present work we performed ultrastructural in situ hybridization by using genomic DNA as a probe, to detect at high resolution the presence of total RNA in RNP particles in the non-chromatin region of the nucleus. In addition to the nucleolus and cytoplasm *Lacandonia* granules are domains enriched in RNA, further supporting the poly(A)⁺ RNA experiments. Recently, this same approach of using total DNA as a probe in high resolution in situ hybridization protocols also supported the idea that perichromatin granules contain RNA (López-Velázquez et al., 1998; Vázquez-Nin et al., 1999). Perichromatin granules are considered RNP particles which contain mature mRNA. In fact, several lines of evidence support this idea (see Vázquez-Nin and Echeverría, 1996). A strong in situ evidence is the presence of poly(A)⁺ RNA in at least a fraction of perichromatin granules (Visa et al., 1993).

We conclude that *Lacandonia* granules are ultrastructurally related to perichromatin and Balbiani

ring granules, based on morphological, developmental behavior, immunocytochemical, in situ hybridization and enzyme sensitivity evidence

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Spector for his generous gift of SR antibody (3C5), J. Márquez-Guzmán, E. Martínez and C.H. Ramos for helpful discussions, Dr. E. Alvarez-Buyilla and F. Vergara for plant material, and A. Velasco-Velasco for molecular biology advice. DGAPA-UNAM supported L.T.A.-M. with a Ph.D. fellowship. This work was partially supported by CONACyT, México (28002N).

REFERENCES

- Agredano-Moreno L.T., Jiménez-García L.F., Echeverría O.M., Ramos C.H., Martínez E., Vázquez-Nin G.H., Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*, *Biol. Cell* 82 (1994) 177-184
- Alzhanova-Ericsson A.T., Sun X., Visa N., Kiseleva E., Wurtz T., Daneholt B., A protein of the SR family of splicing factors binds extensively to exonic Balbiani ring pre-mRNA and accompanies the RNA from the gene to the nuclear pore, *Genes Dev.* 10 (1996) 2881-2893
- Blencowe B.J., Issner R., Kim J., McCaw P., Sharp P.A., New proteins related to the Ser-Arg family of splicing factors, *RNA* 1 (1995) 852-865
- Cáceres J.F., Stamm S., Helfman D.M., Krainer A.R., Regulation of alternative splicing by overexpression of antagonistic splicing factors, *Science* 265 (1994) 1706-1709
- Carter K.C., Taneja K.L., Lawrence J.B., Discrete nuclear domains of poly(A) RNA and their relationship to the functional organization of the nucleus, *J. Cell Biol.* 115 (1991) 1191-1202
- Coello G., Escalante A., Soberón J., Lack of genetic variation in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae, Triuridales) in its only known locality, *Ann. MO Bot. Gard.* 80 (1993) 898-901
- Davidse G., Martínez E., The chromosome number of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae), *Syst. Bot.* 15 (1990) 635-637
- Diario Oficial de la Federación (Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos) Tomo CDLXXXVIII, México, Núm. 10, 1994.
- Fakan S., Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts, *Trends Cell Biol.* 4 (1994) 86-90
- Fu X.D., Mayeda A., Maniatis T., Krainer A.R., 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 (1992) 11224-11228.
- Huang S., Deerinck J., Ellisman M.H., Spector D.L., In vivo analysis of the stability and transport of nuclear poly(A)⁺ RNA, *J. Cell Biol.* 126 (1994) 877-899.
- Jiménez-García L.F., Agredano-Moreno L.T., Segura-Valdez M. de L., Echeverría O.M., Martínez E., Ramos C.H., Vázquez-Nin G.H., The ultrastructural study of the interphase nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae, Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle, *Biol. Cell* 75 (1992) 101-110
- Jiménez-García L.F., Reynoso-Robles R., Fragoso-Soriano R., Agredano-Moreno L.T., Segura-Valdez M. de L., González-Moreno S., Ramos C.H., Martínez E., *Biología celular de Lacandonia schismatica*. Análisis por microscopía electrónica y de fuerza atómica, *Bot. Soc. Bot. Mex.* 62 (1998) 5-14
- Krainer A.R., Mayeda A., Kozak D., Binns G., Functional expression of cloned human splicing factor SF2 homology to RNA-binding

- proteins, U1-70K, and *Drosophila* splicing regulators, Cell 66 (1991) 383-394
- Lopato S, Maveda A, Kraimer A, Barta A, Pre-mRNA splicing in plants. Characterization of Ser⁺/Arg splicing factors, Proc Natl Acad Sci USA 93 (1996a) 3074-3079
- Lopato S, Wagnmann E, Barta A, Characterization of a novel arginine-serine-rich splicing factor in *Arabidopsis*, Plant Cell 82 (1996b) 2255-2264
- Lopez-Velazquez G, Segura-Valdez M de L, Alcántara-Ortigoza M A, Jiménez-García L F, Localization of intranuclear RNA by electron microscopy in situ hybridization using a genomic DNA probe, Arch Med Res 29 (1998) 185-190
- Luchtsen K R, Taha S, Walbot V, Nuclear pre-mRNA processing in higher plants, Progr Nucleic Acid Res Mol Biol 47 (1994) 149-193
- Manley J L, Tacke R, SR proteins and splicing control, Genes Dev 13 (1996) 1569-1579
- Marquez-Guzman J, Engleman E M, Martinez-Mena A, Martínez E, Ramos C H, Anatomía reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae), Ann MO Bot Gard 76 (1989) 124-127.
- Marquez-Guzmán J, Vázquez-Santana S, Engleman E.M., Martínez-Mena A, Martínez E, Pollen development and fertilization in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae), Ann MO Bot Gard 80 (1993) 891-897
- Martínez E, Ramos C H, Lacandoniaceae (Triuridales) una nueva familia de México, Ann MO Bot Gard 76 (1989) 128-135
- Martínez E, Ramos C H, Chiang F, Lista florística de la Lacandona, Chiapas, Bol. Soc Bot Mex. 54 (1994) 99-177
- Mayeda A, Kraimer A R, Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2, Cell 68 (1992) 365-375
- Palacios-Mayorga S, Pérez-Silva E, Endotrophic mycorrhiza in *Lacandonia schismatica*, Lacandoniaceae a new saprophytic angiosperm family, Rev. Latin-Amer Microbiol 35 (1993) 65-69
- Reyes-García A, Sousa S M, Una nueva localidad para la familia Lacandoniaceae y nuevos registros para la Reserva de Montes Azules, Chiapas, Mexico, Bol Soc Bot Méx 57 (1995) 117-119
- Roth J, Post-embedding cytochemistry with gold-labeled reagents A review, J Microsc 143 (1986) 125-137.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T., Molecular cloning. A laboratory manual Vol 2, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, 15 113 p
- Spector D L, Macromolecular domains within the cell nucleus, Annu. Rev Cell Biol 9 (1993) 265-315
- Turner B M, Franchi L., Identification of protein and antigens associated with nuclear matrix and clusters of interchromatin granules in both interphase and mitotic cells, J. Cell Sci. 87 (1987) 269-282
- Vázquez-Nin G H, Ortega-Rangel J.A., Echeverría O M, Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo, Biol Cell 39 (1980) 143-146
- Vázquez-Nin G H, Echeverría O M, The polytene nucleus in morphological, cytochemical and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation, Eur J. Histochem. 40 (1996) 7-16
- Vázquez-Nin G.H, Jiménez-García L F, Echeverría O, Guzmán A, Coeto-Barona G, Nava-Ruiz C, Correlation of the changes of the frequency of perichromatin granules with the RNA content of the interchromatin region of uterine cells in normal and ovariectomized rats. A high resolution in situ hybridization and stereological study, Biol. Cell 91 (1999) 109-115.
- Vázquez-Santana S, Engleman M E, Martínez-Mena A., Márquez-Guzmán J., Ovule and seed development of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae), Am J. Bot. 85 (1998) 299-304.
- Vivian N, Puvion-Dutilleul F, Harper F., Bachellet J P., Puvion E., Intranuclear distribution of Poly(A) RNA determined by electron microscope in situ hybridization, Exp Cell Res. 208 (1993) 19-34
- Wang J, Manley J L, Overexpression of the SR proteins ASF/SF2 and SC35 influences alternative splicing in vivo in diverse ways, RNA 1 (1995) 335-346.
- Zavala G., Aguilar X., Jiménez L.F., Echeverría O M., Vázquez-Nin G.H, Changes in the ribonucleoprotein constituents of the nucleus during differentiation of muscle cells in the chick embryo, Biol. Cell 76 (1992) 159-165
- Zavala G, Vázquez-Nin G.H, Changes of ribonucleoprotein structures of embryonic epidermal cell nuclei during differentiation and maturation, Biol. Cell 89 (1997) 245-255