

11281  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

---

**ORGANIZACIÓN DE LOS FACTORES DE MADURACION  
DEL RNA PRE-MENSAJERO EN DISTINTOS TIPOS  
CELULARES DIFERENCIADOS EN TEJIDOS**

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN:  
LABORATORIO DE MICROSCOPIA CONFOCAL  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**T E S I S PROFESIONAL**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ROCIO | GEORGE TELLEZ**

**MEXICO, D.F. 2002**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**

11281

22

*Organización de los factores de maduración  
del RNA pre-mensajero en distintos tipos  
celulares diferenciados en tejidos*

*Alumno*

*Rocío George Téllez*

*Tutor*

*Dr. Luis Felipe Jiménez García*

*Comité Tutorial*

*Dr. Alfonso Cárabez Trejo*

*Dr. Alfredo Feria Velasco*

*Este trabajo fue realizado en:  
laboratorio de Microscopía Confocal  
Departamento de Biología Celular  
Facultad de Ciencias, UNAM.*

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# *Dedicatoria*

*a Ariel el amor de vida*

*a mi hijo Lucien, que después de conocer a mi esposo es la cosa mas maravillosa y mágica que ha ocurrido en mi vida.*

*con mucho amor a Irene y Javier, padres maravillosos y como siempre, sin ellos esto no hubiera sido posible.*

*a Irma y Juan Manuel, por su amor y por que son como mis segundos padres.*

*a Claudian, Fabis y Metzli, espero que entiendan porque.....*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Indice

	Pag.
INDICE	1
SUMMARY	3
RESUMEN	4
LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	8
Transcripción	8
- RNA polimerasas	10
- <i>Splicing</i>	11
Dominios nucleares involucrados en el metabolismo del pre-mRNA	17
- Cúmulos de gránulos intercromatinianos	17
- Fibras pericromatinianas	17
- Cuerpos de Cajal.	18
Organización de los factores de <i>splicing</i> (motas ó compartimientos de factores de <i>splicing</i> , SCFs)	20
Funciones de las motas o SFCs	23
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
METODOLOGÍA	26
- Animales	26
- Inmunofluorescencia	27
- Análisis cuantitativo de la forma de las motas	30
RESULTADOS Y DISCUSION	31
- Los patrones moteados ( <i>speckles</i> o SCFs) están presentes en células diferenciadas de diversos órganos y en varios tipos celulares de un mismo órgano	31
- Los patrones moteados ( <i>speckles</i> o SFCs) varían en el núcleo de células útero	

en diferentes etapas del ciclo estral	37
- El patrón moteado ( <i>speckles</i> o SFCs) en células uterinas varía dependiendo del estado transcripcional, después de la castración y de la inyección de estradiol	42
- Modelaje de los patrones moteados (SFCs) de distintos tipos celulares.	
Estereo-imagenes.	46
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS	53
REFERENCIAS	54
AGRADECIMIENTOS	59



# Summary

In the mammalian cell nucleus, splicing factors are distributed in nuclear domains known as speckles or splicing factor compartments (SFCs). In cultured cells, these domains are dynamic and reflect transcriptional and splicing activities. We used immunofluorescence and confocal microscopy to monitor whether splicing factors in differentiated cells display similar features. Speckled patterns are observed in rat hepatocytes,  $\beta$ -cells, bronchial and intestine epithelia and also in three cell types of the uterus, and the number, distribution and sizes of the speckles vary among them. In addition, we studied variations in the circular form (shape) of speckles in uterine cells that are transcriptionally modified by hormone. During the estral cycle, in proestrus speckles are irregular in shape while in diestrus I they are rounded. Experimentally, in castrated rats, luminal epithelial cells show a pattern where speckles are dramatically rounded, but they recover their irregular shape rapidly after an injection of estradiol. The same results were observed in muscle and gland epithelial cells of the uterus. We conclude that different speckled patterns are present in various cells types in differentiated tissues and that these patterns change in the uterus depending upon the presence or absence of hormones such as estradiol.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Resumen

En el núcleo de mamíferos, los factores de *splicing* están distribuidos en dominios conocidos como *speckles* o compartimientos de factores de *splicing* (SFCs). En células en cultivo, estos dominios son altamente dinámicos y reflejan la actividad transcripcional y el *splicing*. En el presente trabajo se utilizó inmunofluorescencia y microscopía de barrido laser confocal (CMLS) para monitorear si los factores de *splicing* en células diferenciadas despliegan características similares. El patrón moteado es observado en hepatocitos de rata, células  $\beta$ , epitelio bronquial e intestinal; así como tres tipos celulares de útero. El número, distribución y tamaño de las motas varía entre ellos. Adicionalmente, estudiamos la variación en la circularidad de las motas en células de útero, células que son transcripcionalmente modificadas por acción hormonal. Durante el ciclo estral, en proestro las motas son de forma irregular (MC= 0.512963), mientras que en Diestro I son redondeadas (MC = 0.799547). Experimentalmente, en células del epitelio luminal de ratas castradas muestran un patrón en donde las motas son dramáticamente redondeadas (MC= 0.873050), pero recobran su forma irregular rápidamente después de una inyección de 17  $\beta$ -estradiol (MC=0.470394). Los mismos resultados fueron observados en miometrio y epitelio glandular. Por lo tanto diferentes patrones de motas están presentes en células diferenciadas de diversos tejidos y dicho patrón es alterado en el útero por modificaciones transcripcionales inducidas por acción hormonal.

# *Lista de Figuras, Tablas y Gráficas*

FIGURA O TABLA	TITULO	PAGINA
Figura 1	Diagrama de flujo de la información genética	9
Figura 2A	Diagrama de <i>splicing</i> del RNA pre mensajero	13
Figura 2B	Modelo para la función de la RNA pol II	15
Figura 2C	Modelo para la función de las proteínas SRm	15
Figura 3	Compartimientos subnucleares del metabolismo del RNA pre mensajero	19
Figura 4	Inmunolocalización y diagrama de los motas o SFCs	20
Figura 5	Modelo de la dinámica de las motas o SFCs	21
Figura 6	Diagrama de los ciclos de fosforilación/ desfosforilación de los dominios SR de los factores de <i>splicing</i>	22
Figura 7	Esquema de las funciones propuestas para las motas (SFCs)	23
Figura 8	Corte óptico obtenido por microscopía confocal de una inmunofluorescencia con el anticuerpo 3C5 contra proteínas SR en hígado de rata	32
Figura 9	Corte óptico de páncreas de rata, obtenido por microscopía confocal de una inmunofluorescencia con el anticuerpo 3C5 contra proteínas SR	33
Figura 10	Tipos de epitelio inmunomarcados con el anticuerpo 3C5 contra proteínas SR	35
Figura 11	Corte transversal de útero de rata. Hematoxilina - Eosina 40X	37
Figura 12	Corte óptico de útero de rata, obtenido por microscopía confocal.	38
Figura 13	Reconstrucción tridimensional de útero de rata	38

Figura 14	Corte óptico posterior a una inmunofluorescencia con el anticuerpo 3C5, contra proteínas SR en útero de rata, en diferentes etapas del ciclo estral	40
Figura 15	Corte óptico posterior a una inmunofluorescencia con el anticuerpo 3C5 contra proteínas SR en útero de rata, castradas y tratadas con hormona	43

### **Modelaje de los patrones intranucleares de los factores de splicing (motas o SFCs) en distintos tipos celulares**

Figura 16	Hepatocito	47
Figura 17	Célulaβ pancreática	47
Figura 18	Epitelio bronquial	48
Figura 19	Epitelio intestinal	48
Figura 20	Epitelio luminal uterino de rata en proestro y diestro I	49
Figura 21	Epitelio glandular de útero de rata en proestro y diestro I	50
Figura 22	Miometrio de rata en proestro y diestro I	51
Tabla 1	RNA polimerasas en Eucariontes	10
Tabla 2	Factores de Transcripción	11
Tabla 3	Cinasas y fosfatasa de los factores de <i>splicing</i>	16
Tabla 4	Animales	26
Tabla 5	Características de las motas (SFCs) de varios tipos celulares	34
Gráfica 1	Factor de forma de las motas en distintas condiciones hormonales, correspondientes a distintas etapas del ciclo estral	41
Gráfica 2	Factor de forma de las motas en distintas condiciones hormonales, correspondientes a ratas castradas y tratadas con hormona	44

# Lista de Abreviaturas

CBs	Cuerpos de Cajal
CMLS	Microscopía de barrido láser confocal
CTD	Dominio carboxilo terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FPCs	Fibras pericromatinianas
hnRNA	RNAs heterogéneos nucleares
IG	Gránulos intercromatinianos
IGCs	Cúmulos de gránulos intercromatinianos
MC	Medida de circularidad
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
N.A.	No determinado
PAB	Proteína de unión a la poly(A)
Pre-mRNA	Ácido ribonucleico pre-mensajero
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RNP	Ribonucleoproteico
SFCs	Compartimientos de factores de <i>splicing</i>
snRNA	Ácido ribonucleico pequeño nuclear
SR	Serina /Arginina
RNA pol	RNA polimerasa
TAP	Proteína de enlace a la caja TATA
TBST	Amortiguador de Tris salino
TF	Factor de transcripción
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia

# Introducción

El núcleo es un organelo altamente compartimentalizado involucrado en el almacenamiento del DNA y en los primeros pasos de la expresión génica. Estos pasos incluyen la síntesis, procesamiento y transporte hacia el citoplasma de los diferentes tipos de RNA requeridos para la síntesis de proteínas y otras funciones; mediante los procesos de Transcripción y Traducción, procesos que juntos constituyen el "Dogma Central" de la genética (fig 1).

## Transcripción

La transcripción es una reacción de polimerización en la cual un nucleótido individual se enlaza secuencialmente en una cadena. Este mecanismo requiere de RNA polimerasas, del molde de DNA, de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , y adenosina, guanosina, citosina y uridin trifosfato para que a partir de una hebra de DNA por acción de una RNA polimerasa específica genere uno de los cuatro diferentes tipos de RNA.

1) RNA ribosomal (rRNA). Esta clase de RNA es ensamblado, junto con numerosas proteínas para formar los ribosomas. Los

ribosomas se acoplan con el mRNA y forman un dominio catalítico dentro del cual el tRNA entra con sus aminoácidos unidos.

2) RNA de transferencia (tRNA). Esta clase de RNA pequeño, forma enlaces covalentes con un aminoácido individual y reconoce la secuencia codificante del mRNA para lograr la correcta inserción de aminoácidos en la elongación de la cadena polipeptídica.

3) RNA pequeño nuclear (sn-RNA). Esta clase de RNA tiene varios roles en el procesamiento de otras clases de RNA; mRNA, tRNA y rRNA que son producidos como moléculas precursoras largas conocidas como transcritos primarios. Estos son procesados dentro del núcleo hacia moléculas funcionales que son exportadas al citosol; por ejemplo varios snRNA forman parte del *spliceosoma* que participa en la conversión del RNA pre-mensajero en mRNA por *splicing*.

4) RNA mensajero (mRNA). Esta clase de RNA es el templado génico utilizado por la maquinaria traduccional para determinar el orden de los aminoácidos incorporados en la elongación de un polipéptido dentro del

proceso de traducción:

Las moléculas de RNA tienen una variedad de papeles en las células, como ha sido descrito con anterioridad. Además, existe un gran número de evidencias que implica

al RNA en la regulación biológica y catálisis. Interesantemente, el RNA es el único polímero biológico que sirve tanto en la catálisis (como proteínas) y como almacén de información (como DNA); por esta razón, ha sido postulado que moléculas de

## Dogma Central de la Genética

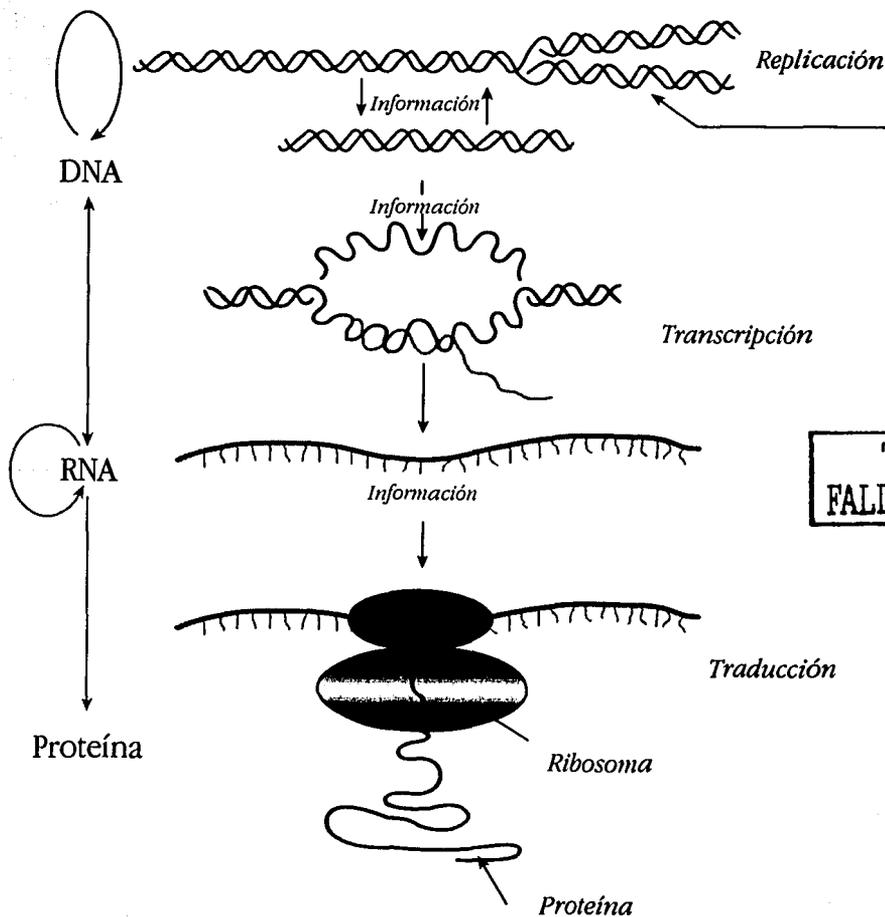


Figura 1.- Diagrama del flujo de la información genética.

RNA, ó moléculas parecidas al RNA, fueron la base en la vida temprana en la evolución.

### RNA Polimerasas

Las RNA polimerasas (RNA pol) se encuentran dentro del tipo de proteínas más grandes y complejas de los organismos vivos. Estas enzimas son similares en su estructura en procariontes y eucariontes. Cada polimerasa consiste de dos sub-unidades polipeptídicas grandes y alrededor de 6 a 10 chicas. Típicamente las sub-unidades grandes y algunas chicas forman un complejo enzimático que es capaz de transcribir cualquier secuencia de DNA de

manera natural o artificial en una copia de RNA. En procariontes todos los tipos de RNA son sintetizados por un solo tipo de RNA Polimerasa. En contraste, en los eucariontes existen tres tipos de RNA pol denominados I, II y III. Cada una es responsable de la síntesis de distintos tipos de RNA (Tabla 1). La RNA pol II se localiza en el núcleo, fuera del nucléolo y es responsable de la síntesis del pre-mRNA y algunos snRNAs involucrados en el *splicing*. Esta polimerasa no puede enlazarse por ella misma y por lo tanto, requiere de factores proteicos (factores de transcripción), que son agregados en un orden específico al promotor e interactúa con la RNA Pol II (tabla 2).

Tabla 1.- RNA polimerasas de eucariontes

Tipo de RNA polimerasa	Tipo de RNAs que transcribe	Requerimientos iónicos
RNA pol I	- RNAs: 28s, 18s y 5.8s	Mg <sup>2+</sup>
RNA pol II	- RNAs - Muchos snRNAs	Mg <sup>2+</sup>
RNA pol III	- RNAs: 5s - Un snRNA (uósnRNA) - scRNAs - tRNAs	Mn <sup>2+</sup>

Tabla 2.- Factores de transcripción

Factor de Transcripción y orden de acción durante la transcripción	Características de enlace
1.- TFIID	Se enlazan a la secuencia TATA; esta secuencia está presente en todos los genes eucariontes y es conocida como TATA box. TFIID esta compuesto por la proteína de enlace a la TATA box (TAP) y mas de otras ocho subunidades.
2.- TFIIA	Estabiliza en enlace del TFIID; previene la inhibición de la disrupción del complejo TDFIID.
3.- TFIIB	
4.- TFIIF - RNA	
Complejo polimerasa II	
5.- TFIIE,TFIIH; TFIJ	Estos factores pueden ser incluidos en este orden, para que la transcripción ocurra.

La transcripción procede en tres distintas fases; la primera es la fase de iniciación (enlace de la RNA pol al molde de DNA), la segunda corresponde al proceso de elongación (nucleótidos son agregados al molde de DNA), y finalmente concluye con la terminación (las enzimas y el RNA son liberados del molde de DNA).

Esta fase del procesamiento de información génica puede y es regulada por diversos factores, dependiendo de la línea celular de que se trate. Un ejemplo de dichos factores es el caso de las hormonas esteroideas. Desde los años 60s se ha sugerido que este tipo hormonal puede regular la expresión génica a nivel transcripcional. Observaciones de la concentración nuclear de estradiol [<sup>3</sup>H] en células

blanco por medio de autorradiografía apoyan lo sugerido acerca del efecto genómico de las hormonas esteroideas. De hecho, se han observado cambios dramáticos en la tasa de síntesis de RNA en útero, posterior a la administración de estradiol (Hamilton, 1968; Gorski y Gannon, 1976).

### Splicing

Todos los transcritos primarios producidos en el núcleo son procesados para producir moléculas de RNA funcionales para su exportación al citoplasma. Estos transcritos, pertenecen a la clase de RNAs heterogéneos nucleares (hnRNA), debido a su heterogeneidad en tamaño y localización

nuclear dentro de la célula. No obstante, no todos los hnRNAs son convertidos en mRNA. De hecho, una fracción substancial nunca es transportada hacia el citoplasma y es degradada en el núcleo (Salditt-Georgieff y Darnell, 1982). El pre-mRNA está sujeto a un gran número de modificaciones co y posttranscripcionales. Estas incluyen el *capping del extremo 5'*, poliadenilación del extremo 3', y la remoción de intrones y ligado de exones resultantes por medio del *splicing* (Minvielle-Sebastia y Keller 1999; Fortes, *et al.* 1999).

Muchos genes eucarióticos se encuentran interrumpidos por intrones. El transcrito primario debe ser procesado para remover los intrones y unir las secuencias codificantes en una molécula de RNA continua, antes de que el pre-mRNA sea transportado del núcleo al citoplasma, donde es traducido. El *splicing* del pre-mRNA por lo tanto es un proceso biológico fundamental en células eucarióticas, y es predomina-

temente co-transcripcional (Beyer y Osheim, 1988; Báuren y Wieslander, 1994; Neugebauer y Roth, 1997). En este proceso están involucrados un gran número de factores y puede ser dividido conceptualmente en dos etapas distintas. El paso inicial es el reconocimiento de la secuencia intrónica conservada cerca del sitio de corte 5' y región de *branchpoint* por un grupo de factores de *splicing*; esto es seguido por el ensamble del *spliceosoma*, en donde ocurren reareglos acompañados de 2 pasos químicos de remoción del intrón. En el primer paso se generan dos intermediarios: el exon 1 liberado y el lazo o *ariat-exón 2*; en el segundo paso, el exón 1 ataca el sitio de *splicing* 3' para generar los productos del *splicing*: exones 1 y 2 liberados y el intrón en forma de lazo (fig. 2). Los dos pasos catalíticos se llevan a cabo en el complejo C del *spliceosoma* (Burge et al., 1999; Reed, 2000).

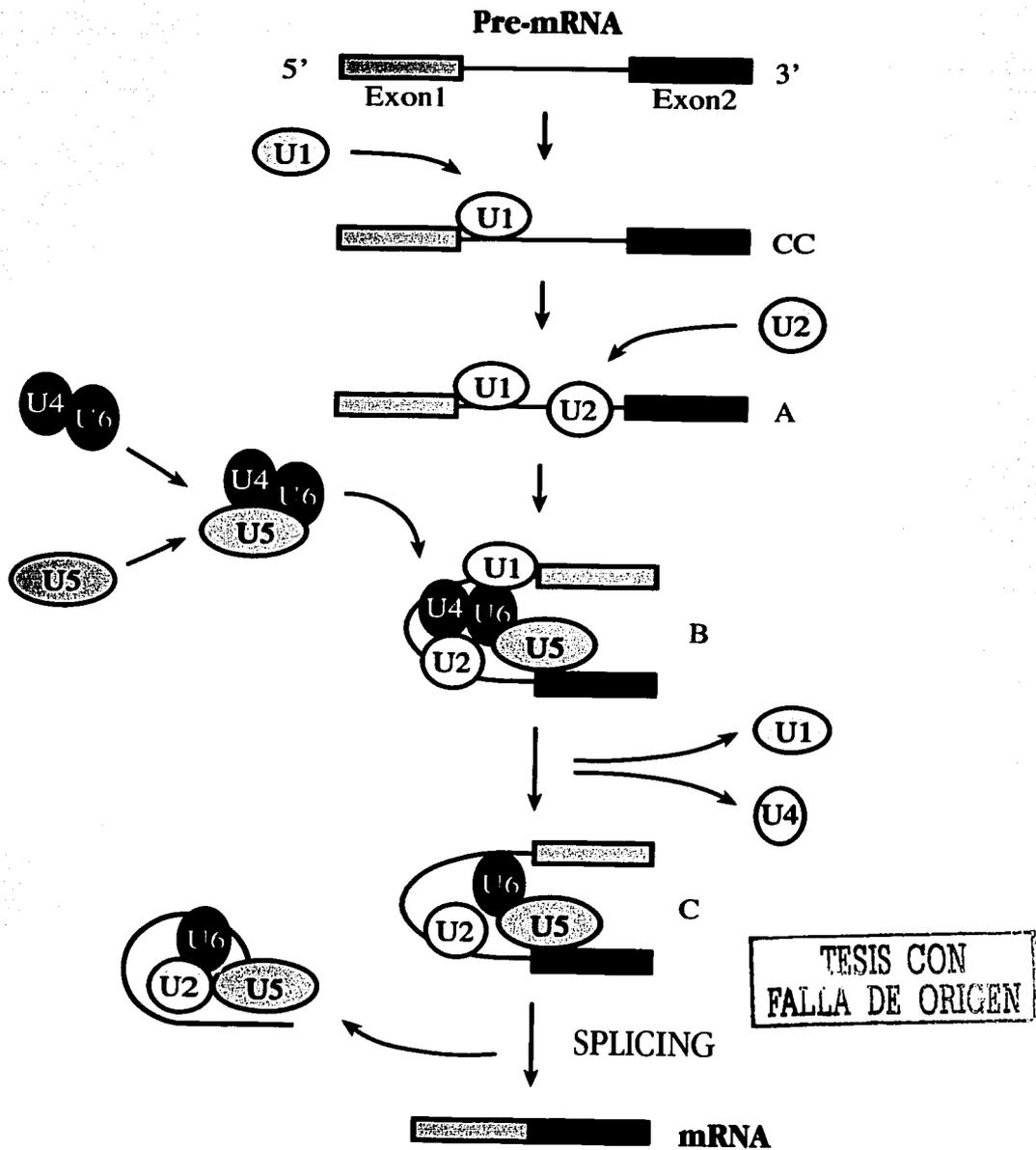


Figura 2A.- Diagrama del *splicing* del RNA pre mensajero (tomada de Beggs Lab Home page).

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 da una especificidad adicional debido a secuencias presentes en los exones (enhancers). Durante el ensamblaje del *spliceosoma* y 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 remoción 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 RNAs pre mensajeros producidos durante la transcripción por la RNA 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 RNA pre mensajero para formar el *spliceosoma*. Este ensamblaje ocurre de manera ordenada y culmina en la remoción de los intrones y el ligado de los exones; El

*spliceosoma* es construido de la siguiente manera; primero el U1 snRNP reconoce secuencias en el sitio de *splicing* 5' en RNA pre mensajero; posteriormente U2 snRNP se une al sitio de ramificación. Una vez ocurrida dicha unión, el complejo pre-ensamblado U4/U6/U5 se asocia a los snRNPs ya unidos y al pre-mRNA con el U5 e interactúa 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 el U4 sale dejando un complejo U2/U6 con U2 unido al punto de ramificación y U6 asociado al extremo 5' del intrón. Esta interacción altamente organizada de los RNAs y proteínas es lo que permite a la maquinaria celular de *splicing* que los intrones del RNA pre mensajero sean eliminados de forma correcta (fig. 2A).

Una familia de factores de *splicing* denominados proteínas SR está involucrada en este mecanismo a través de sus motivos altamente conservados de reconocimiento del RNA y el dominio SR con múltiples repeticiones de serina y arginina (Misteli et al., 1997); los cuales son fosforilados por cinasas específicas como la SRPKs, CLKs, PITSLRE, PIKs o defosforilados por fosfatasas como la PP1, PP2A, PP2C (ver Misteli, 2000) (Tabla 3). Los motivos de reconocimiento para el RNA se unen a

secuencias de RNA de una manera coordinada para determinar la eficiencia del *splicing* y comprometer a los RNA pre mensajero en el evento de *splicing* (Fu, 1993). Los dominios SR median interacciones proteína-proteína en los diferentes

pasos del ensamblaje del *spliceosoma* (Tronchere et al., 1997) (figura 2B, C). Los factores SF2/ASF y SC35 están involucrados en la selección del sitio de *splicing* 5' de RNA pre mensajeros con *splicing* alternativo.

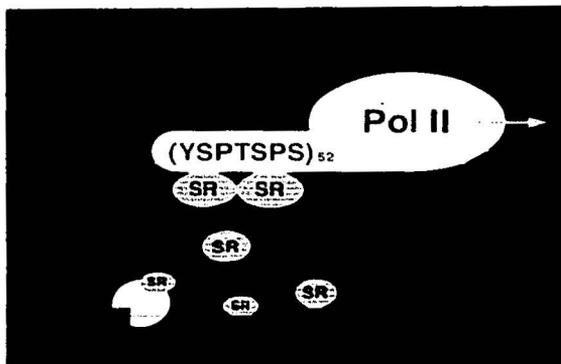


Figura 2B

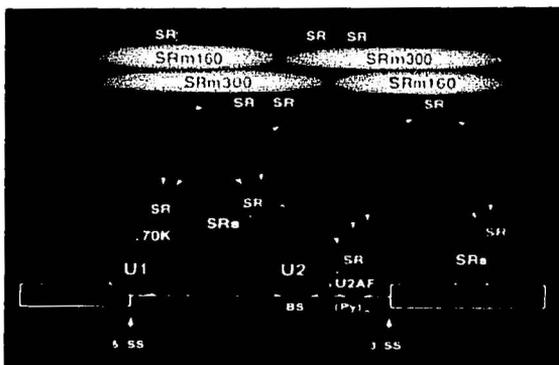


Figura 2C

Figura 2B.- Modelo para la función de la RNA pol II asociada a proteínas SR en el *splicing*.  
 C.- Modelo para la función de las proteínas SRm 160/300 en el *splicing*. Tomado de Blencowe Lab.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 3.- Cinasas y Fosfatasa de los factores de *splicing* (tomado de Misteli, 2000).

	Localización en los Compartimientos de Splicing (SFCs)	Substratos	Referencias
SRPK-1	+	Proteínas SR	Gui et al., 1994
		Proteínas parecidas a las SR	
SRPK-2	+	Proteínas SR	Kuroyanagi et al., 1998;
		Proteínas parecidas a las SR	Wang et al., 1998.
Clk/Sty1	+	Proteínas SR	Colwill et al., 1996
		Proteínas parecidas a las SR	
Clk/Sty2	+	Proteínas SR	Duncan et al., 1998
Clk/Sty3	+	Proteínas SR	Duncan et al., 1998
PITSLRE	+	N.D.	Loyer et al., 1998
PIP	+	N.D.	Boronenkov et al., 1998
Topoisomerasa I	-	Proteínas SR	Rossi et al., 1996
U1-70k Kinase	N.D.	U1-70K	Woppmann et al., 1993
<i>S. pombe</i> Prp4p	-	Proteínas SR	Gross et al., 1997
<i>S. pombe</i> Dsk 1p	-	Proteínas SR	Takeuchi and Yanagida, 19
		Proteínas parecidas a las SR	
<i>S. cerevisiae</i> Sky 1p	N.D.	Proteínas SR	Siebel et al., 1996
	-	Proteínas parecidas a las SR	Misteli and Spector, 1996
PP1-activity	N.D.	Proteínas SR	Mermoud et al., 1992
PP2-activity	-	Proteínas SR	Mermoud et al., 1994
SCF1 (PP2Cy)		N.D.	Murray et al., 1999

### **Dominios nucleares involucrados en el metabolismo del RNA-pre mensajero(pre-mRNA).**

El mantenimiento y replicación del DNA, la producción y el transporte de las diferentes clases de RNA, así como la regulación y coordinación de estos procesos requiere de numerosas macromoléculas, muchas de las cuales se encuentran compartimentalizadas en dominios morfológicamente reconocibles. El nucléolo es el dominio en donde se realiza la síntesis de RNA pre-ribosomal y su maduración (fig. 3A); por otra parte, los compartimentos involucrados en la síntesis y procesamiento del RNA pre-mensajero son los cúmulos de gránulos intercromatinianos (IGCs); también conocidos como Compartimentos de Factores de *Splicing* (SFCs) (fig. 3C), regiones pericromatinianas (fibras) y cuerpos de Cajal (fig. 3B).

### **Cúmulos de gránulos intercromatinianos (IGCs)**

Ultraestructuralmente los IGCs se definen como estructuras irregulares que miden de 0.3 a 1.8  $\mu\text{m}$  (Thiry, 1993) y están compuestos por numerosos gránulos esféricos denominados gránulos intercromatinianos (IG), con un diámetro entre 20 - 25 nm (Monneron y Bernhard, 1969; Spector, 1993). Estos gránulos fueron identificados por primera vez por Swift en 1959, y han sido observados como partículas solitarias.

Los IG se encuentran interconectados en algunos sitios por fibrillas de entre 9 y 10 nm (Moneron y Bernhard, 1969).

Los IG están enriquecidos en ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (sn RNPs) y factores de *splicing* no ribonucleoprotéicos (no-snRNP) pertenecientes a la familia de proteínas SR, con la excepción de la UsAF (Zamore y Green, 1991). Estos gránulos están igualmente enriquecidos en RNA poli (A) y en proteína II enlazada a Poli (A) (PABII), pero no contienen ciertos tipos de proteínas hnRNP; Los gránulos intercromatinianos no son marcados después de pulsos cortos de uridina [ $^3\text{H}$ ]. La naturaleza de los gránulos parece ser mantenida por interacciones del tipo RS-RS entre sus componentes y la hiperfosforilación de las proteínas SR en sus dominios RS rompe esta interacción, resultando en el fraccionamiento de los gránulos (Sacco-Bubulya 2000, comunicación personal). Estos IGCs han sido recientemente purificados de hígado de ratón y ahora se sabe que contienen al menos 75 proteínas (Mintz *et al.*, 1999). Los IGCs son sitios de almacenamiento, ensamblaje y/o modificación de los factores de *splicing*. No obstante, el *splicing* no ocurre dentro de estas estructuras.

### **Fibras Pericromatinianas**

Las fibras pericromatinianas (FPCs) se localizan sobre la superficie de los IGCs y sobre la superficie de la cromatina conden-

sada así como en forma difusa a través del nucleoplasma (ver Fakan y Puvion, 1980). El proceso de maduración del pre-mRNA se lleva a cabo en las FPCs 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;) y de que los factores de *splicing* se asocian a las FPCs en cuanto estas se empiezan a formar liberándose de la misma una vez que se ha completado el proceso de maduración (Visa et al., 1996; Wurtz et al., 1996). Estas fibras son rápidamente marcadas con uridina [<sup>3</sup>H], lo cual sugiere que estas estructuras representan los sitios donde se localiza RNA recientemente transcrito (Fakan, 1994).

Una de las funciones que se ha propuesto para este arreglo es que 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) de manera que 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 algu-

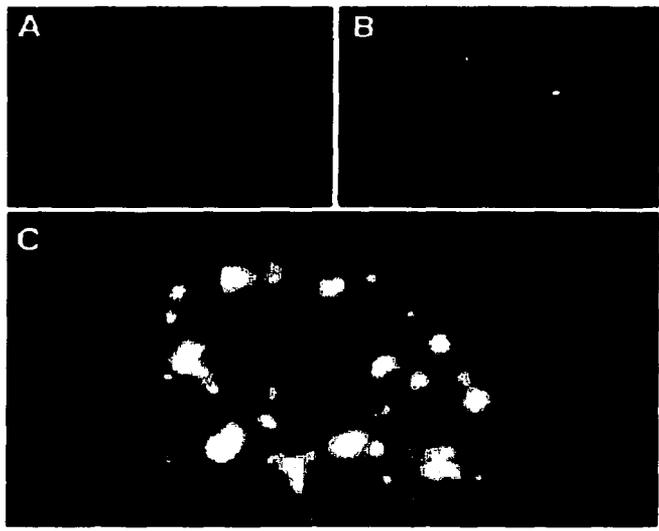
nas secuencias que intervendrán en interacciones moleculares y otras secuencias permanecen en el interior del gránulo.

## **Cuerpos de Cajal**

Los cuerpos de Cajal (CBs), también conocidos como cuerpos espiralados (Gall et al., 1999), son una clase de cuerpos nucleares altamente conservados en plantas y animales tanto en morfología como en composición. Los CBs varían en tamaño (0.2 - 1.5  $\mu\text{m}$ ) y en número (1 - 10) en diferentes tipos celulares y bajo distintas condiciones de crecimiento. Estos cuerpos nucleares están enriquecidos en muchos epitopes nucleares incluyendo factores de procesamiento y transcripción del RNA. Contienen antígenos nucleolares como la fibrilarina y Nopp 140, numerosos snRNPs del *splicing* y un autoantígeno humano, coilina p-80, la cual es usada como marcador específico de estas estructuras (ver Matera, 1999), contiene ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNPs), pero no contienen rRNA, pre-mRNA, DNA ni factores de *splicing* no-snRNP (proteínas SR). Adicionalmente se han localizado diversas cinasas en estos cuerpos, como la protein cinasa A, CDK7, CDK2 entre otras. Por lo anterior no parecen ser sitios de *splicing* o producción de ribosomas; las evidencias muestran que los cuerpos de Cajal juegan un papel en el control de la producción y o transporte de snRNPs. En algunos

tipos celulares se ha observado una asociación dramática entre los cuerpos de Cajal y los *loci* de los genes del snRNA, lo que ha sugerido que estos cuerpos pueden

proveer de un mecanismo de retroalimentación negativa para modular la expresión de genes snRNA (Matera, 1998).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 3.- Inmunolocalización de compartimientos subnucleares de síntesis y maduración del RNA . A) nucléolo, B) Cuerpos de Cajal y C) Motas ó SFCs (gránulos intercromatinianos).

## Organización de los factores de *splicing* (Patrones moteados o SCFs)

Mientras que los mecanismos moleculares y bioquímicos del *splicing* del pre-mRNA han sido extensamente caracterizados, la organización subcelular es menos entendida. No obstante, se conoce ampliamente que en el núcleo de mamíferos los factores de *splicing* están concentrados en cerca de 20 a 50 compartimientos nucleares conocidos como motas (*speckles*) o compartimientos de factores

de *splicing* (SFCs) (fig. 4A y B), los cuales corresponden ultraestructuralmente a los IGCs (Spector, 1993). Adicionalmente, los factores de *splicing* están presentes de manera difusa en el nucleoplasma, en estructuras que corresponden a fibras pericromatinianas cuando son observadas por microscopía electrónica y éstas incorporan uridina tritiada sumamente rápido (Spector et al., 1993; Fakan, 1994).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

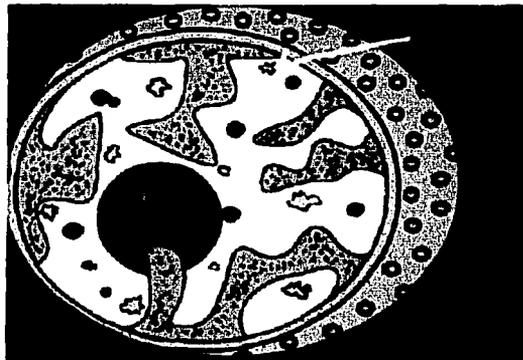


Figura.- 4.- A) Inmunolocalización de los compartimientos de los factores de *splicing*, motas o SFCs, con el anticuerpo 3C5 contra proteínas de la familia SR. B) Diagrama de un núcleo en donde se muestran las motas.

Un modelo dinámico para la coordinación de la transcripción y el *splicing*, propone que los factores de *splicing* son reclutados a los sitios de transcripción activa en procesos mediados por fosforilación/desfosforilación tanto de los factores de *splicing*, como del dominio carboxilo terminal de la subunidad grande de la RNA polimerasa II (Misteli y Spector, 1999). Adicionalmente un aspecto que está comenzando a ser explorado, es el mecanismo por el cual estos compartimentos nucleares son mantenidos. Una idea propuesta es que las motas o SFCs son el reflejo de la actividad transcripcional y *splicing*. El aislamiento de los IG muestra que contienen una gran variedad de factores de *splicing* además de varios factores de los cuales no se conoce su función (Mintz *et al.*, 1999). Además, el patrón moteado es un reflejo del estado constante de asociación/disociación de factores

entre el nucleoplasma y las motas o SFCs (Phair y Misteli, 2000).

Para apoyar este modelo, se ha demostrado que el nivel de transcripción de una célula causa una redistribución de los factores de *splicing* en el núcleo (Spector *et al.*, 1993). En una célula transcripcionalmente activa, los genes están asociados con la periferia de los SFCs, el RNA es madurado en los sitios de transcripción y liberado rápidamente (fig. 5a); posterior a la inhibición de la transcripción, los factores de *splicing* se acumulan en los SFCs y los genes típicamente se encuentran alejados de ellos (fig. 5b); finalmente, cuando se provoca sobreexpresión génica en la célula o los genes contienen gran cantidad de genes que contienen intrones, pueden ser liberados de los sitios de transcripción y se mueven alrededor de los SFCs (Melcak, 2000) (fig. 5c).

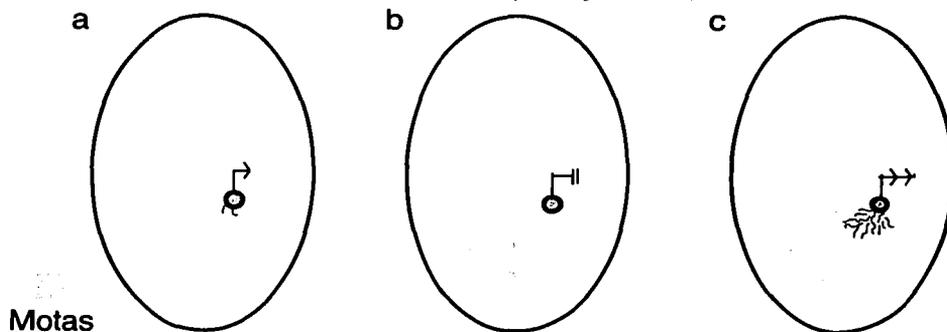


Figura 5.- Modelo de la dinámica de las motas o SFCs dependiendo de la actividad transcripcional de la célula. a) transcripción activa; b) transcripción inactiva; c) sobreexpresión.

Después de una infección por adenovirus, o por una transfección transitoria con un plásmido que contiene una porción del gen de  $\beta$ -tropomiosina, la distribución y morfología de las motas cambian (Jiménez-García y Spector, 1993). Estos datos sugieren un mecanismo de reclutamiento que regula la localización de la transcripción y de los factores de *splicing* en respuesta a la iniciación de la activación de la transcripción (Jiménez-García y Spector, 1993; Misteli *et al.*, 1997). De hecho, ha sido demostrado que estos procesos dependen de la presencia de los

intrones (Huang y Spector, 1996) y de los ciclos de fosforilación/desfosforilación de los factores (Misteli y Spector, 1996) (fig.6).

En contraste, el silenciamiento de la transcripción de genes endógenos por tratamientos con inhibidores de la transcripción tales como la  $\alpha$ -amanitina, o por microinyección de oligonucleótidos contra el U1 snRNA para inhibir el *splicing*, causa el redondeo y agrandamiento de las motas y la acumulación de los factores de *splicing* (SFCs) (Spector *et al.*, 1993).

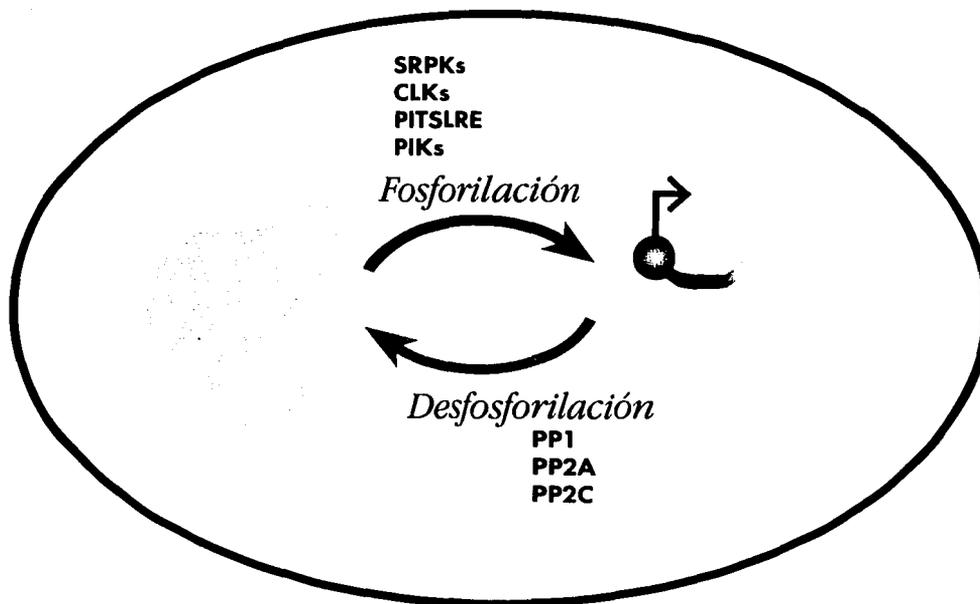


Figura 6.- Diagrama de los ciclos de fosforilación/desfosforilación de los dominios SR de los factores de *splicing*.

La fosforilación *in vitro* de los dominios SR puede incrementar las interacciones entre las proteínas que contienen dominios SR (Wang et al., 1998) y evita su unión no específica al RNA (Tacke et al., 1997). Por otra parte, la desfosforilación de las proteínas SR parece ser importante en la resolución del *spliceosoma* de generar productos libres de intrones (Cho et al., 1997). Por lo anterior, el ciclo de fosforilación-desfosforilación de los dominios SR parece regular el ciclo del *splicing* (en Yeakley et al., 1999).

Por otra parte, recientemente se ha sugerido que el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad grande de la RNA polimerasa II (RNA pol. II) une la maquinaria transcripcional con la maquinaria de procesamiento del RNA. Al parecer el CTD se encuentra hipofosforilado durante la iniciación e hiperfosforilado durante la fase de elongación de la transcripción. Las enzimas que participan en el procesamiento del extremo 3' y 5' se asocian con la forma hiperfosforilada y ambos procesos se inhiben cuando el CTD se elimina o se trunca (Cho et al., 1997).

## **Funciones de los compartimentos de los factores de *splicing* (SFCs)**

Una de las funciones que ha quedado clara desde que se conoce la compartimentalización de los factores de maduración del pre-mRNA, es que estos compartimentos funcionan como medio o mecanismo para controlar la concentración de factores de *splicing* en el nucleoplásmo y por lo tanto los sitios de transcripción y *splicing*. Balanceando la concentración de estos factores, se puede contribuir a optimizar la eficiencia del *splicing in vivo* (fig. 7a). Una segunda posibilidad es el reciclamiento o reactivación de los factores de *splicing*; los factores de *splicing* tienen una vida media larga y solo del 10 al 20% de cualquiera de los factores de *splicing* es utilizado en la reacción de *splicing* (Misteli unpublished in Misteli, T. 2000) (fig. 7b), por lo tanto cada molécula participa en muchas reacciones de *splicing* durante su vida media y pueden ser recicladas. Lo anterior concuerda con el hecho de que el reciclamiento involucra ciclos de fosforilación reversible, la cual tiene lugar en los SFCs. La tercera

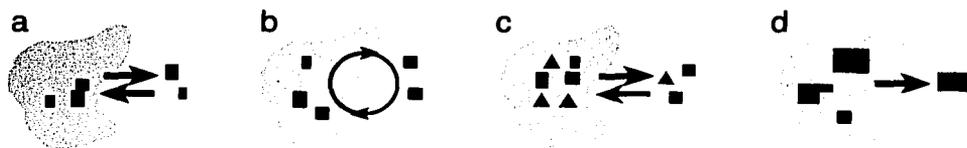


Figura 7.- Esquema de las funciones propuestas para las motas (SFCs). De Misteli 2000.

función en donde las motas o SFCs están involucradas es en la regulación de las proporciones de los factores de *splicing* (fig. 7c) y finalmente estarían participando en el ensamblaje de la maquinaria de transcripción y/o procesamiento del RNA (fig. 7d).

Un punto para ser posteriormente reflexionado y probado es el siguiente, las técnicas de microscopía electrónica revelan que las motas o SFCs consisten en cúmulos de GI, en donde cada gránulo tiene un diámetro de aproximadamente 20 nm. Basados en consideraciones morfológicas y de localización proteica en los ovocitos de anfibios, se propone, por analogía con los ribosomas, que cada gránulo representa un transcriptosoma en el cual está contenida toda la maquinaria de transcripción y

procesamiento del RNA (Gall *et al.*, 1999).

Hasta ahora, muchos estudios de la organización dinámica de los factores de *splicing* han sido realizados en líneas celulares en cultivo. En el presente trabajo estudiamos la distribución de los factores de *splicing* en células diferenciadas presentes en varios tejidos de rata, que despliegan programas transcripcionales diferentes. Estudiamos la presencia de los patrones moteados (motas o SFCs) en distintos tipos celulares. Adicionalmente monitoreamos las variaciones en este patrón como consecuencia de una variación cíclica en la transcripción como resultado de la disponibilidad de hormonas, o por las variaciones inducidas experimentalmente controlando la acción de las hormonas sobre distintos tipos celulares de útero de rata.



# Objetivos

## OBJETIVO GENERAL

Conocer la organización intranuclear de los factores de *splicing* del RNA pre-mensajero, no-snRNPs, en diferentes tipos celulares diferenciados y conocer si su distribución cambia dependiendo del estado transcripcional.

## Objetivos Particulares

- Conocer la organización de los factores de *splicing* no - snRNPs en diferentes tipos celulares de rata Sprague-Dawley.
- Analizar la distribución de los factores de *splicing* no-snRNPs en células sometidas a cambios hormonales cíclicos, como epitelio luminal, glandular y miometrio de útero de rata Sprague-Dawley en las cuatro etapas del ciclo estral.
- Estudiar la distribución de factores de *splicing* no - snRNPs en células de epitelio luminal, glandular y miometrio de útero de rata Sprague-Dawley ovariectomizada y sometidas a tratamientos hormonales con 17- $\beta$  estradiol.

# Metodología

## Animales

Muestras de tejido pancreático, hepático, pulmonar e intestinal se obtuvieron de seis ratas macho adultas de 200 a 250 gr. Las muestras fueron procesadas por técnicas histológicas estándar, obteniéndose finalmente cortes de 3  $\mu\text{m}$  para inmunofluorescencia (diagrama de flujo 1). Los cortes fueron montados en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina al 10%. Adicionalmente se utilizaron 28 ratas hembras vírgenes de 200 a 250 g; las cuales fueron mantenidas en condiciones estándar con libre acceso al alimento y al agua (tabla 4).

Mediante un frotis vaginal a las 13 hrs. del día, fue determinada cada etapa del ciclo estral. Posteriormente 20 animales, cinco de cada etapa del ciclo estral (proestro, estro, diestro I y diestro II) fueron anestesiadas con pentobarbital sódico para poder realizar la disección de los úteros derecho e izquierdo también a las 13 horas del día.

Para estudiar las variaciones bajo diferentes condiciones hormonales, 8 ratas fueron anestesiadas con pentobarbital

Tabla 4      Número y condiciones de los animales utilizados en el estudio

N	Etapa del ciclo estral
5	Proestro (13 hrs)
5	Estro (13 hrs)
5	Diestro I (13 hrs)
5	Diestro II (13 hrs)
N	Ovarioectomizadas 21 días
3	Tratadas con vehículo
5	Tratadas con una dosis única de 4 $\mu\text{g}$ de 17 $\beta$ estradiol 30 min antes del sacrificio.
28	

sódico para realizar ovariectomía bilateral y después de 21 días, se tomaron muestras de útero de tres ratas y a las 5 restantes se les aplicó intraperitonealmente una dosis única de 4µg de 17-β estradiol por cada 100 gr de peso corporal del animal. 30 minutos después de dicha aplicación se realizó la deca-

pitación del animal y se procedió a diseccionar los úteros. Las muestras obtenidas de los seis lotes fueron procesadas histológicamente hasta su inclusión en parafina (diagrama de flujo 1). Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 3µm de grosor para efectuar los ensayos de inmunofluorescencia.

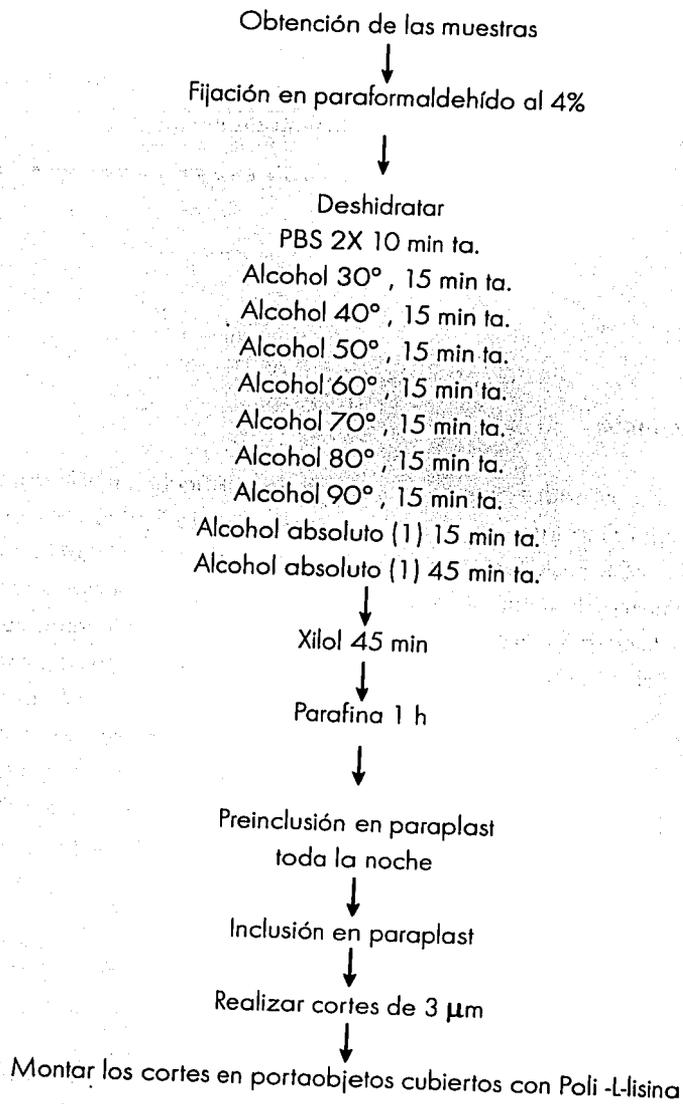


### **Inmunofluorescencia**

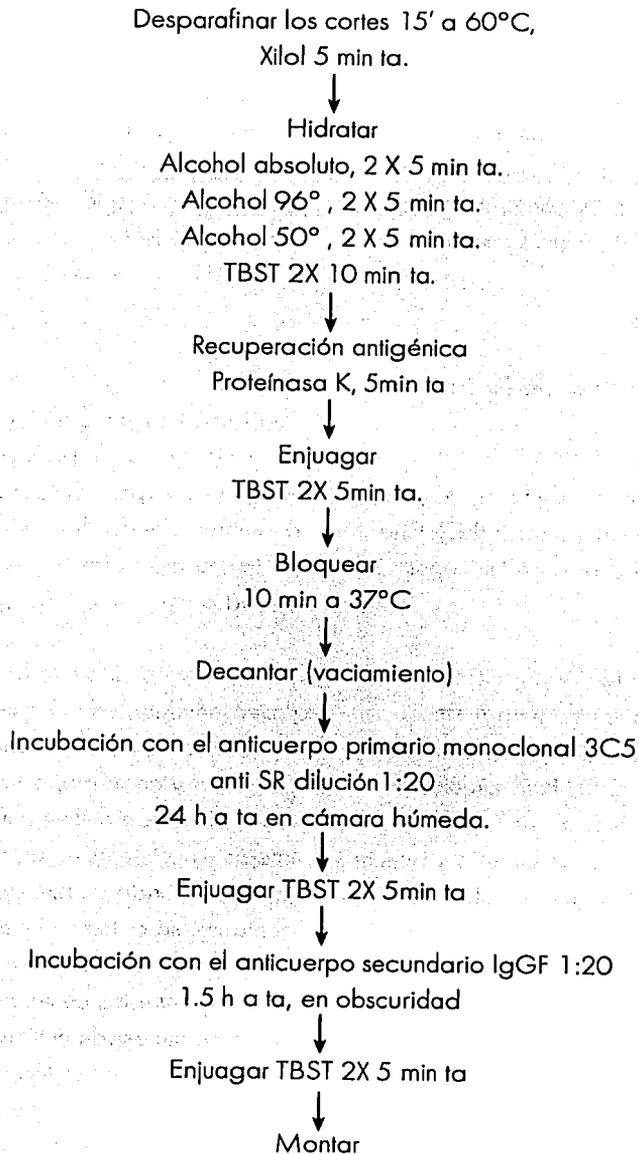
Las muestras de tejido utilizadas en este estudio, fueron desparafinadas y rehidratadas hasta TBST. Posteriormente se aplicó un procedimiento de recuperación antigénica con proteinasa K (Proteinasa K lista para usarse, Dako 53020) por 5 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos fueron incubados con el anticuerpo primario monoclonal 3C5 contra proteínas de la familia SR diluido en TBST 1:20 por 24 h a 4° C

(Turner y Franchi, 1987; donado por el Dr. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory), las muestras fueron posteriormente incubadas con anti IgG acoplado a fluoresceína como anticuerpo secundario diluido 1:20 en TBST (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc 41845) por hora y media a temperatura ambiente en completa oscuridad. Las muestras fueron montadas con un medio de montaje especial para fluorescencia (DAKO)(diagrama de flujo 2).

## Diagrama de flujo 1.- Protocolo para la técnica histológica



## Diagrama de flujo 1.- Protocolo para Inmunofluorescencia



Nota: Todos los enjuagues fueron realizados tanto por inmersión como por chorreo

Las muestras inmunomarcadas fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia y posteriormente analizadas en un microscopio Confocal Nikon PCM 2000 ó Zeiss LSM 510. Las observaciones fueron realizadas a 20X para panoramas. Para realizar la colección de los cortes ópticos se utilizó el objetivo 64X con un factor de amplificación de 4.68, para lograr imá-

genes a 300X. El procesamiento de las imágenes fue generado a partir de la colección de cortes ópticos de 100 nm a lo largo de 3  $\mu$ m. Las secuencias obtenidas fueron analizadas, reconstruidas tridimensionalmente y modeladas utilizando los software IPLab, MED-X y T3D respectivamente para el microscopio Nikon y Pascal para el microscopio Zeiss.

### **Análisis Cuantitativo de la forma de las motas**

Para cuantificar la forma de las motas, se utilizó el criterio de circularidad (FC). Este factor de circularidad está definido por  $C = 4\pi A/P^2$  donde:

A = área

P = perímetro de la región de interés.

Para círculos continuos se tiene  $A = \pi r^2$  y

$P = 2\pi r$  (r es el radio del círculo), entonces

FC está dado por  $C = 1$ . Para círculos en imágenes digitales esto no es siempre verdadero. Para este tipo de círculos y teniendo un buen algoritmo que calcule estos dos parámetros (A y P), el FC esta entre 0 y 1 ( $0 < C < 1$ ). Para calcular el factor de circularidad de las motas, se desarrolló un algoritmo robusto con respecto al cálculo del perímetro y área que define a la mota. El algoritmo fué escrito en IDL, en una estación de trabajo Indigo II de Silicon Graphics, para lo cual, se definió el término vecindad de un pixel.

Sea I una imagen binarizada, formada de 0's y 1's, y sea un pixel p contenido en la imagen I y cuyas coordenadas son (x,y). Definimos la vecindad 4-vecinos de p ( $V_4(p)$ ) como aquellos pixeles cuyas coordenadas son (x+1,y), (x-1,y), (x,y-1), (x,y+1).

El algoritmo está formado de 3 etapas de procesamiento, en la primer etapa se determina el contorno, en la segunda el perímetro y en la etapa final el área de la mota. El contorno determina la región de interés y no interés en el caso particular la mota y el fondo; habiendo determinado el contorno, se calcula el perímetro de la siguiente manera: se suman los segmentos de línea entre los centros de los pixeles del contorno sucesivamente que son 4-vecinos al fondo, es decir se toman los pixeles del contorno cuya 4-vecindad de un pixel de borde tiene al menos un pixel que esta en el fondo, esta suma determina con buena aproximación el perímetro. Después, se cal-

cula el área, contando los pixeles que están dentro del contorno que define la mota. Para terminar, el algoritmo fue probado en imágenes digitales conteniendo formas de círculos y de otras formas obteniendo una validación aceptable para este tipo de imágenes. Posteriormente se aplicó el

algoritmo a 100 núcleos de cada uno de los ensayos. El procedimiento fue segmentar cada una de las motas contenidas en 100 núcleos, de cada uno de los ensayos, los valores obtenidos se obtuvieron el promedio y desviación estándar.

---

## Resultados y Discusión

**Los patrones moteados (Speckles o SCFs) están presentes en células diferenciadas de diversos órganos y en varios tipos celulares de un mismo órgano.**

Para probar si el patrón moteado descrito para células en cultivo está también presente en células diferenciadas de diversos tejidos, diseñamos estudios de inmunofluorescencia para detectar factores de *splicing* del RNA pre - mensajero (proteínas SR) con el anticuerpo monoclonal 3C5. El patrón moteado intranuclear es observado en todos los tipos celulares analizados es decir, hepatocitos, células  $\beta$  pancreáticas, células epiteliales de intestino, epitelio bron-

quial y tres tipos celulares de útero (epitelio luminal, glandular y miometrio), similar a lo observado en células en cultivo. No obstante el número y la forma de las motas varía dependiendo del tipo celular (Tabla 5). Los hepatocitos presentan de 6 a 14 motas con un valor promedio de circularidad (MC) de 0.581167 (Figs. 8,16), mientras que los núcleos de las células  $\beta$  contienen entre 5 a 12 motas, con medida de circularidad promedio de 0.479584 (Figs. 9,17).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

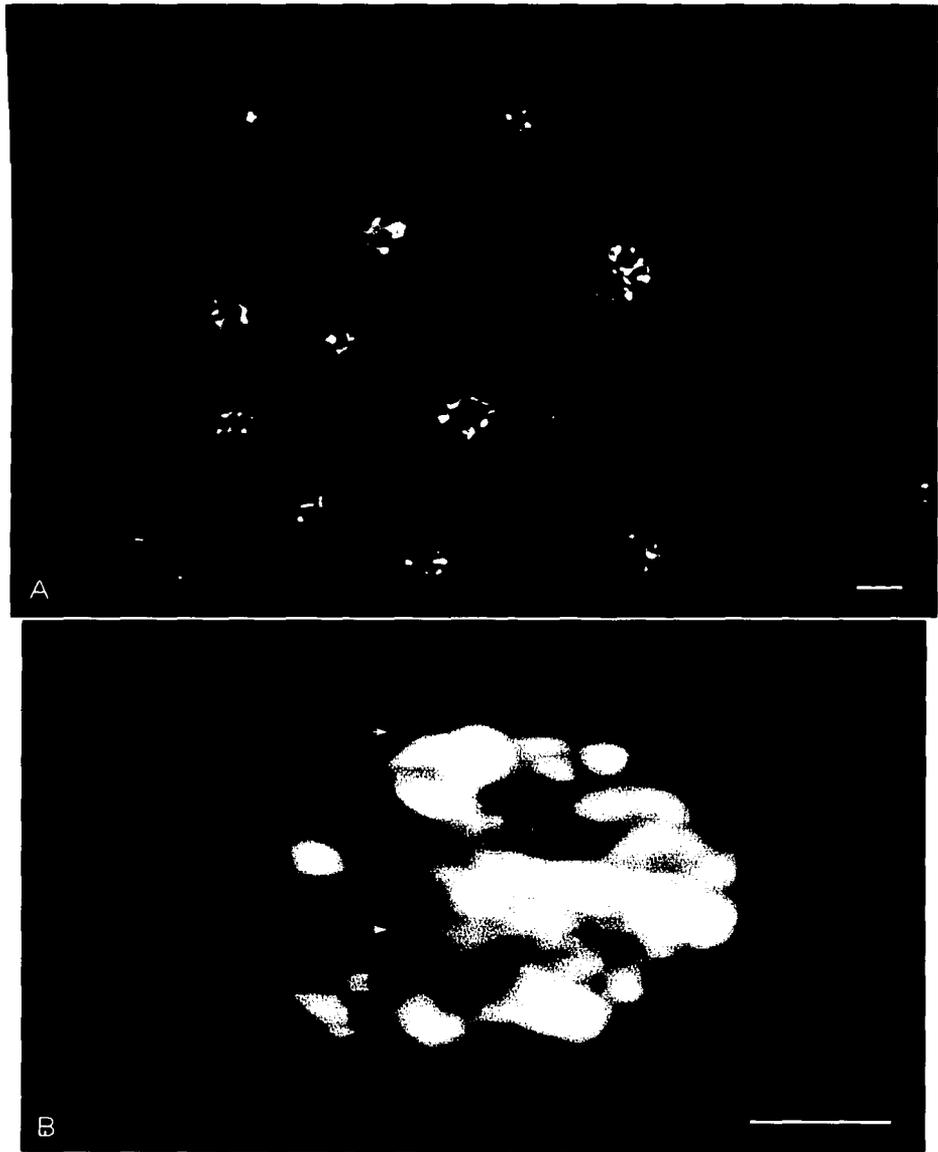


Figura 8.- A) Corte óptico obtenido por microscopía confocal de una inmunofluorescencia con el anticuerpo 3C5 contra proteínas SR en hígado de rata, en donde se observa el patrón moteado intranuclear. B) Distribución espacial de los factores de *splicing* no-snRNPs en motas o SFCs (flechas). Se observa el típico patrón moteado, la fracción difusa es muy conspicua (cabeza de flecha). Reconstrucción del núcleo de hepatocito. (n) nucléolo. Barra 15  $\mu\text{m}$ .

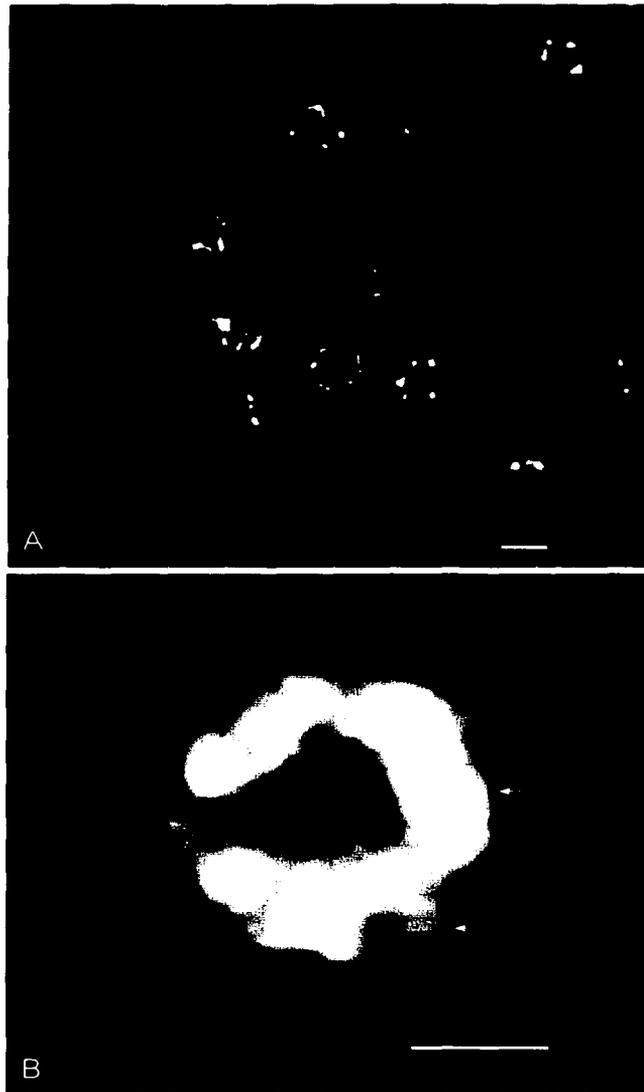


Figura 9.- A) Corte óptico de páncreas de rata, obtenido por microscopía confocal de una inmunofluorescencia con el anticuerpo 3C5 contra proteínas SR, en donde se observa el patrón moteado intranuclear. B) Reconstrucción de un núcleo de célula  $\beta$  en donde se observa la distribución espacial de los factores de *splicing* no-snRNPs en motas o SFCs (flechas). Se observa también la fracción difusa (cabeza de flecha). Barra 15  $\mu$ m.

### Tabla 5.- Características de las motas (SFCs) de varios tipos celulares

Tabla 5.- Características de las motas (SFCs) de varios tipos celulares

Tipo celular	Número de motas		Forma de las motas (MC)	
Célula $\beta$ pancreática	6 - 14		0.581167	
Hepatocitos	5 - 12		0.479584	
UTERO	P	DI	P	DI
Célula de epitelio luminal	2 - 3 grandes 9 - 25 chicas	14 - 19	0.512963	0.799547
Célula de epitelio glandular	6 - 23	4 - 21	0.456616	0.824835
Miometrio	9 - 16	3 - 6	0.457182	0.834037

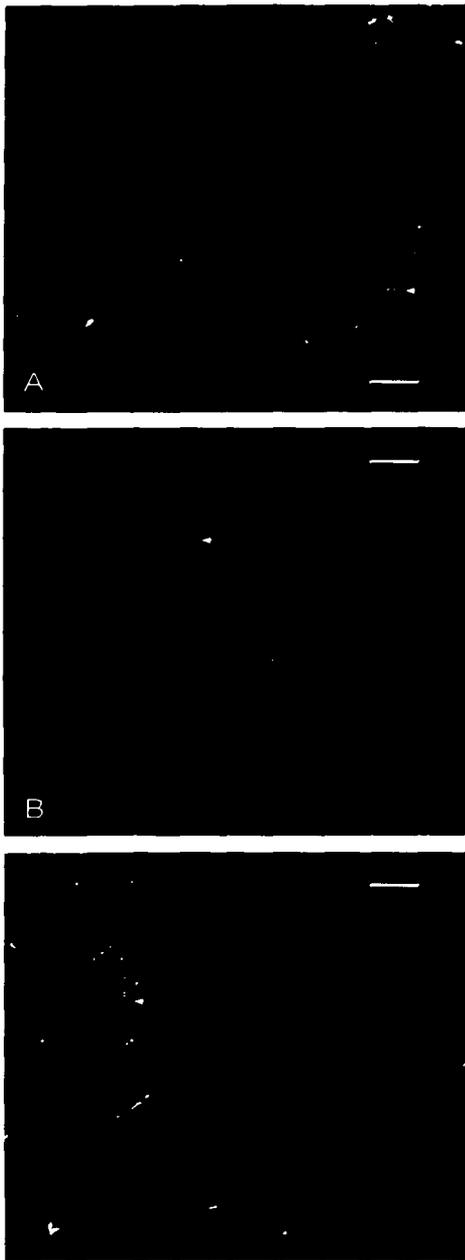
MC = Medida de circularidad

Como se puede observar en la figura 10, en tres tipos de epitelio, A) epitelio intestinal, B) bronquial y C) endometrial, también se presenta el patrón moteado. El patrón es diferente en cada uno de los epitelios.

Hemos demostrado que los factores de *splicing* se distribuyen en un patrón moteado dentro del núcleo de células diferenciadas de diferentes tejidos, similar a lo observado en células en cultivo. Sin embargo, estos patrones muestran diferencias en número, forma y distribución. Hepatocitos, células  $\beta$ , varios epitelios (intestino delgado, luminal y glandular uterino y bronquial), así como miometrio contienen un patrón moteado diferente uno de otro. Estudios

previos en células de mamífero en cultivo han demostrado que los factores de *splicing* se localizan en dominios moteados o SFCs (ver Spector, 1993; Sleeman y Lamond, 1999, Misteli, 2000). Estos dominios son altamente dinámicos y participan en la coordinación de la transcripción y *splicing*.

Para analizar si los patrones moteados están presentes en varios tipos celulares dentro de un mismo órgano, seccionamos úteros de rata y diseñamos estudios de inmunofluorescencia con el anticuerpo 3C5. En las figuras 12, 20, 21 y 22 se observa que el patrón moteado está presente en el núcleo de tres tipos celulares de útero, y son diferentes uno de otro.



De hecho, los diferentes tipos celulares pueden ser distinguidos en la imagen de fluorescencia. Claramente se define el epitelio luminal y glandular, así como el miometrio. El análisis cuantitativo que evalúa las características del patrón, como son forma y número de las motas, se muestra en la tabla 5.

Estudios previos en células de mamífero en cultivo han demostrado que los factores de *splicing* del pre mRNA están presentes en dominios moteados o SFCs (ver Spector, 1993; Sleeman and Lamond, 1999; Misteli, 2000). Estos dominios son compartimientos altamente dinámicos, los cuales participan en la coordinación de la transcripción y el *splicing*. Ha sido observado *in vivo* que estos factores son reclutados de los SFCs a los sitios de transcripción. Esto sugiere que una de las funciones de los SFCs es el almacenar los componentes de la maquinaria de *splicing*, lo cual a su vez es evidencia que apoya el modelo de que los factores de *splicing* son reclutados de los dominios moteados o SFCs hacia los sitios de transcripción activa (ver Misteli et al., 1997) en un proceso dependiente de la presencia de intrones (Phelan et al., 1993; Huang and Spector, 1996).

Figura 10.- Cortes ópticos de tres tipos de epitelio de rata A) intestinal, B) bronquial y C) endometrial, obtenidos por microscopía confocal. Inmunomarcaje con el anticuerpo 3C5 contra proteínas SR, en donde se observa la distribución de los factores de *splicing* del pre-mRNA (flechas)

La observación de que 1) el patrón moteado cambia de una forma irregular a motas redondeadas dependiendo de la actividad transcripcional (ver Spector *et al.*, 1993), 2) a pesar de la alta movilidad de las proteínas nucleares, el patrón moteado se mantiene (Misteli *et al.*, 1997; Phair y Misteli, 2000), y 3) que existe evidencia de la existencia del patrón moteado en células de hígado de ratón (Mintz *et al.*, 1999) incita a explorar si en diferentes tipos celulares de tejidos en un organismo despliegan un patrón característico. Es conocido que todas las células en un tejido tienen un programa transcripcional similar (Potten, 1997) que es adquirido durante la diferenciación y es expresado durante su estado diferenciado. Por lo tanto, es posible que el patrón moteado se defina dependiendo del programa transcripcional final en un tejido específico. En el presente trabajo mostramos de hecho que este puede ser el

caso. Primero, todas las células estudiadas tienen patrón moteado y segundo, un estudio cuantitativo de los diferentes patrones moteados indican diferencias en el número y la forma de las motas. Nuestra hipótesis es que los diferentes patrones son obtenidos durante la diferenciación desde etapas muy tempranas del desarrollo ontogenético. Estudios previos muestran que en estadios embrionarios tempranos (estadio de 2 células), en ambos pronúcleos aparentemente existe un arreglo similar de los factores de *splicing* a manera de puntitos discretos (Ferreira y Carmo-Fonseca, 1996). Mas recientemente (Pena *et al.*, 2001), han demostrado que en las neuronas del ganglio trigeminal también se observa un patrón moteado usando anticuerpos anti-snRNPs. Por lo tanto nuestros resultados están de acuerdo en la existencia de los patrones moteados en varios tipos celulares y que las diferencias entre los patrones pueden ser detectadas.

**Los patrones moteados (speckles o SFCs) varían en el núcleo de células de epitelio luminal de útero en diferentes etapas del ciclo estral**

En el útero (fig. 11), el epitelio luminal y glandular, así como el miometrio presentan patrón moteado (fig. 12 y 13), en cortes ópticos y en reconstrucción de una secuencia de cortes. Para analizar si este patrón varía en distintos estados de actividad trans-

cripcional en células presentes en tejido, estudiamos los cambios ocurridos durante el ciclo estral, en donde la transcripción normalmente varía en respuesta al estímulo de varias hormonas, incluyendo el estradiol.

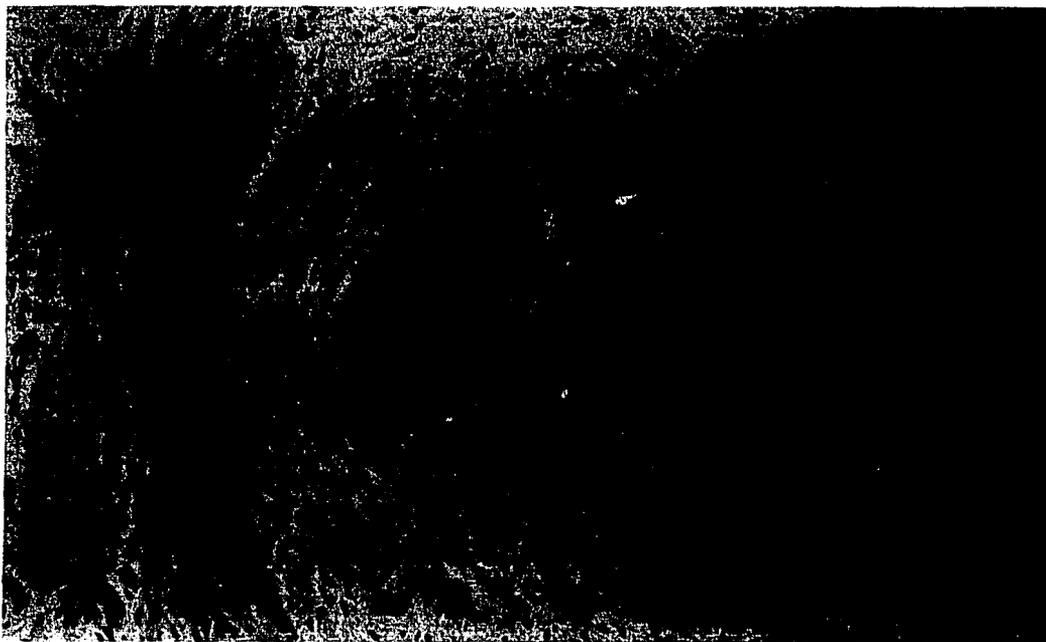


Fig 11.- Corte transversal de útero de rata en donde se observan los tres tipos celulares: epitelios luminal (EL), epitelio glandular (EG) y miometrio (M). Hematoxilina-Eosina, 40 X.



Figura 12.- Corte óptico de útero de rata obtenido por microscopía confocal. Inmunomarcaje con el anticuerpo 3C5 contra proteínas SR. Epitelio luminal (flecha pequeña), epitelio glandular (flecha grande.) y miometrio (cabeza de flecha), mostrando el patrón moteado intranuclear. Barra corresponde a 40  $\mu$ m.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Figura 13.- Reconstrucción tridimensional de útero de rata, obtenida por microscopía confocal. Se observa la distribución de los factores de *splicing* del RNA pre mensajero dentro del nucleoplasma. Epitelio luminal (flecha pequeña), epitelio glandular (flecha grande.) y miometrio (cabeza de flecha). Barra 40 $\mu$ m.

En proestro, cuando la concentración hormonal en sangre es alta; las motas son irregulares en su forma (MC= 0.512963) mientras que son muy redondeadas (MC= 0.799547) durante el diestro I, cuando las concentraciones de estradiol están en su valor más bajo. En proestro observamos de 2 a 3 motas grandes y de 9 a 25 motas pequeñas, las cuales son heterogéneas en su forma; en el nucleoplasma, una fracción difusa es observada. Las motas pueden ser desde triangulares hasta de cualquier otra forma excepto circular. En Diestro I, el patrón moteado es más o menos uniforme,

presentándose de 14 a 29 motas esféricas, las cuales son homogéneas en tamaño y muy numerosas como en la etapa de proestro. En el nucleoplasma la fracción difusa no está presente (fig. 14).

Observamos los mismos cambios en el epitelio glandular (proestro, MC=0.456616; diestro I, MC=0.824835) y miometrio de útero de rata (proestro, MC=0.457182; diestro I, MC=0.834037), es decir, las motas son irregulares en su forma en proestro y esféricas en Diestro I (fig. 14 y gráfica I).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

PROESTRO

DIESTRO I

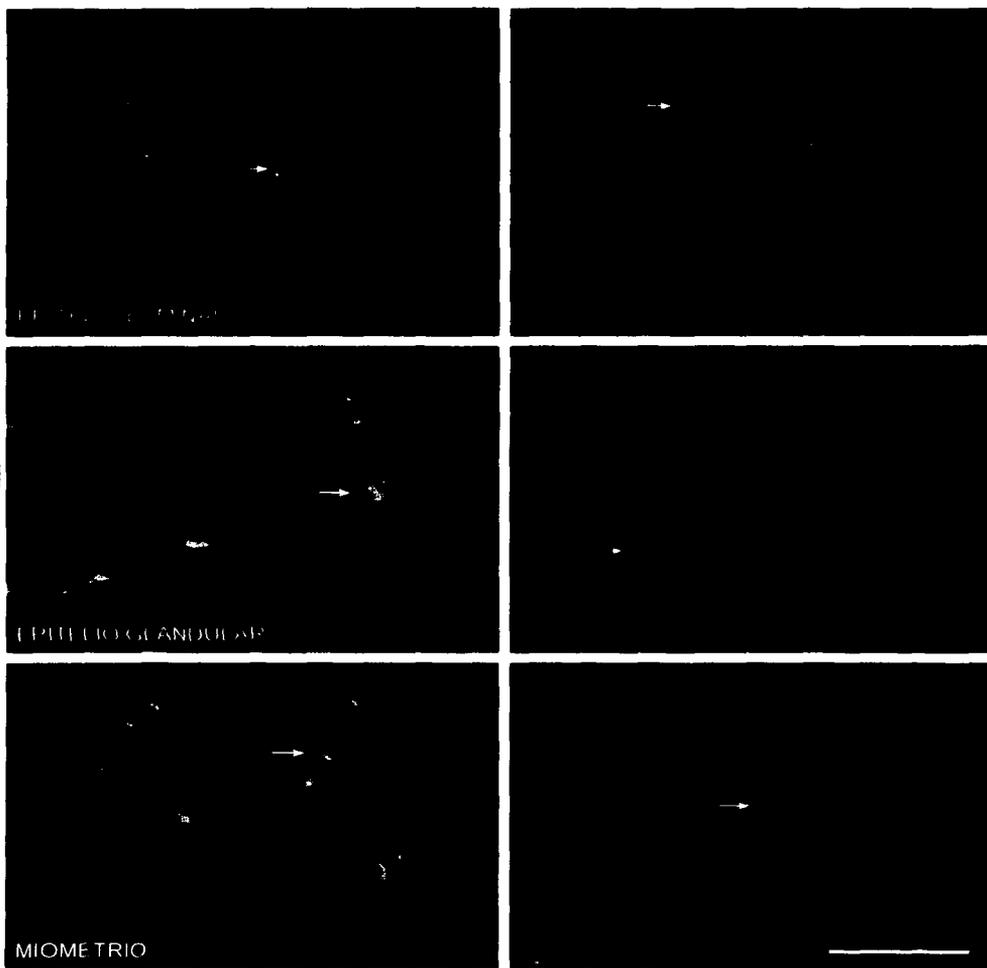
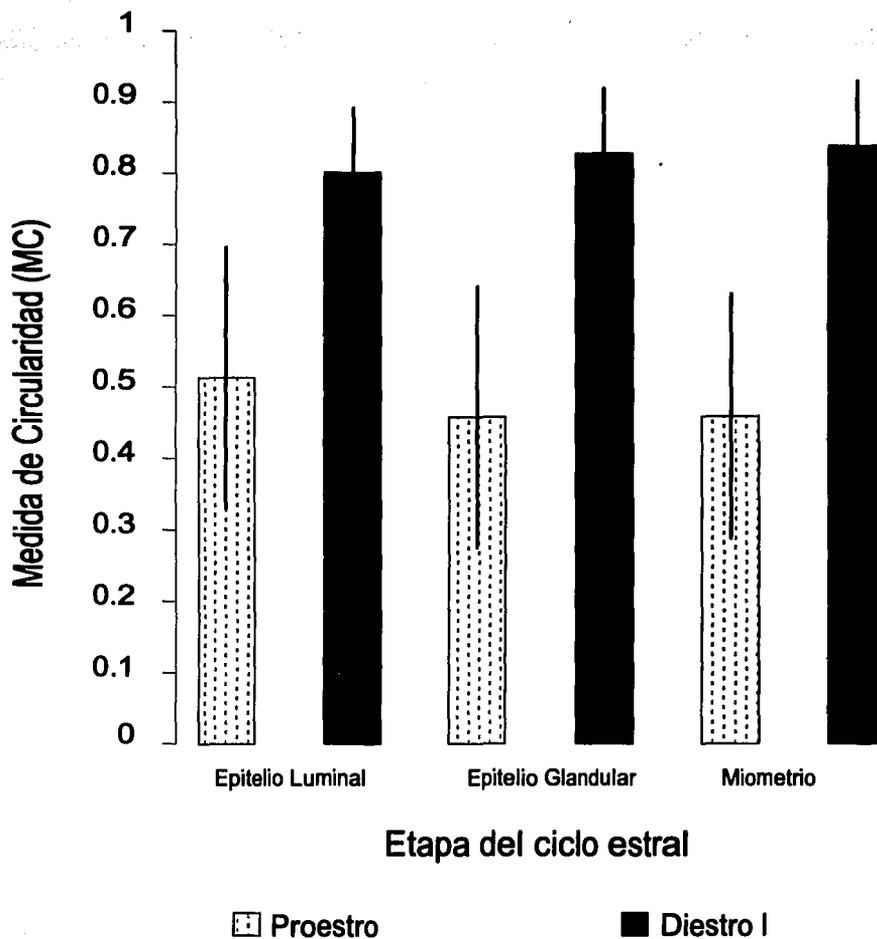


Figura 14.- Corte óptico posterior a una inmunofluorescencia con el anticuerpo 3C5 anti-proteínas SR en útero de rata durante diferentes etapas del ciclo estral. En proestro células de epitelio luminal, glandular y miometrio muestran un patrón con motas de forma irregular (flechas) (MC= 0.5). Durante diestro I, los tres tipos celulares muestran un patrón en donde las motas son redondeadas (flechas) (MC=0.8). Barra 10  $\mu$ m.



Gráfica 1.- Factor de forma de las motas en distintas condiciones hormonales, correspondientes a distintas etapas del ciclo estral, en donde se observa que la forma de las motas de las células uterinas correspondientes a la etapa de proestro tienen valores de circularidad alejados de uno (motas irregulares), mientras que en Diestro I, los valores de MC están muy cercanos a uno (motas redondeadas).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **El patrón moteado (speckles o SFCs) varía en células uterinas después de la castración y de la inyección de estradiol**

Para observar si los cambios en los patrones moteados se deben a la acción de hormonas específicas presentes a lo largo del ciclo estral, evaluamos la variación de dicho patrón en células de epitelio luminal de endometrio después de realizar castración en las ratas y subsecuentemente la inyección de  $17\beta$  estradiol. La figura 15 nos muestra que 21 días después de la castración de los organismos, la distribución de los factores de *splicing* en el nucleoplasma de las células de epitelio luminal de endometrio es similar a lo observado en diestro I, es decir el patrón está formado por 10 a 17 motas sumamente redondeadas con un factor de circularidad de 0.873050. Por otra parte, después de la administración de una dosis única de  $17\beta$  estradiol, las motas recuperan su forma irregular ( $MC=0.470394$ ) y el nucleoplasma muestra una fracción difusa dentro de los 30 minutos próximos a la administración de la hormona.

Como lo observado durante el ciclo estral, las células del epitelio glandular y el miometrio uterino también muestran variaciones similares. En los organismos castrados, en el epitelio glandular las motas son redondas ( $MC=0.894769$ ) y recobran su forma irregular ( $MC=0.699574$ ) después

de 30 minutos de la administración del  $17\beta$  estradiol. En el caso del miometrio, después de la castración el valor de circularidad promedio es de 0.879004 y después de la administración del estradiol es de  $MC=0.468323$  (fig. 15 y gráfica 2).

Nosotros mostramos que el patrón moteado en las células de epitelio luminal de útero de rata cambia debido a modificaciones en la transcripción por acción hormonal, similar a lo ocurrido en células en cultivo en diferentes condiciones experimentales en donde la actividad transcripcional es modificada. Las células uterinas son blanco de la acción de hormonas ováricas. Se sabe que los estrógenos juegan un papel muy importante en la sincronización de múltiples eventos celulares e induce la expresión de RNAm de genes específicos (Spornitz et al., 1994; Tomomi et al., 1997)

Primero, probamos que existe una variación del patrón moteado durante el ciclo estral. En ratas, así como en otros vertebrados, el epitelio luminal uterino se encuentran bajo el estímulo de diferentes niveles de hormona a lo largo de las etapas del ciclo estral (Anderson et al., 1975; Paris et al., 1984; Rambo y Szego, 1983; Tachi, 1984; Vázquez Nin et al., 1978, 1979, 1991;

## CASTRADAS

## 17 $\beta$ ESTRADIOL

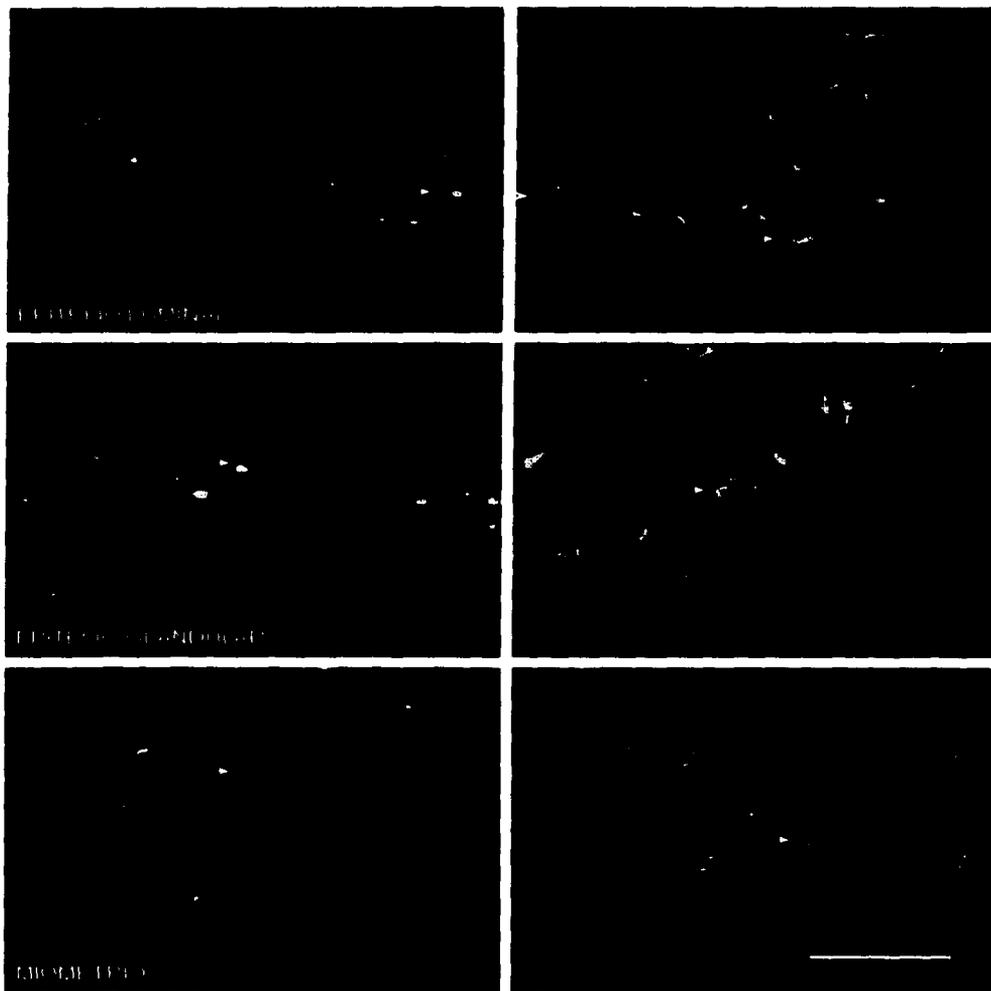
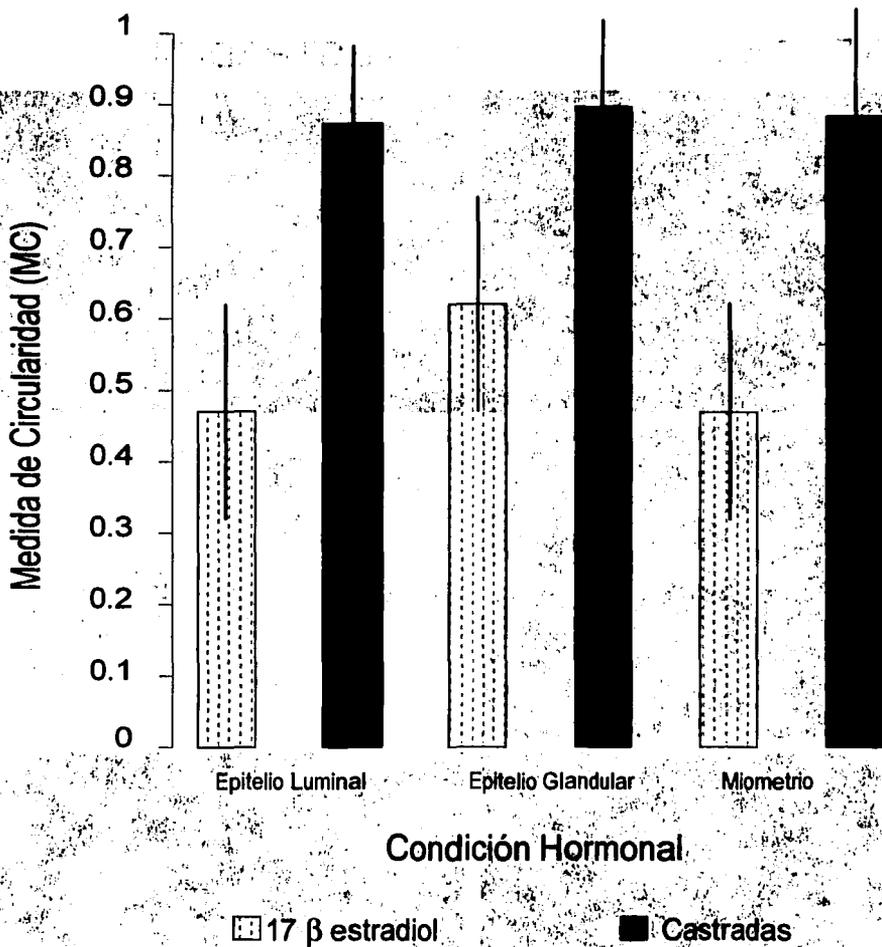


Figura 15.- Corte óptico después de una inmunofluorescencia contra proteínas SR en útero de ratas castradas y tratadas con 17- $\beta$  estradiol. Posterior a la castración la distribución de los factores de *splicing* en epitelio luminal, glandular, así como en miometrio es en motas sumamente redondeadas (flechas) (MC=0.9). Después de 30 minutos del tratamiento hormonal, las motas recobran su forma irregular (flechas) (MC=0.5) y el nucleoplasma muestra tinción difusa. Barra 10  $\mu$ m.



Gráfica 2. - Factor de forma de motas o (SFCs) en distintas condiciones hormonales, en donde se observa que la forma de las motas de las células uterinas de ratas tratadas con hormona, tienen valores de circularidad alejados a uno (motas irregulares), mientras que en las ovariectomizadas tienden a valores de circularidad, tienen valores de MC cercanos a uno (motas redondeadas).

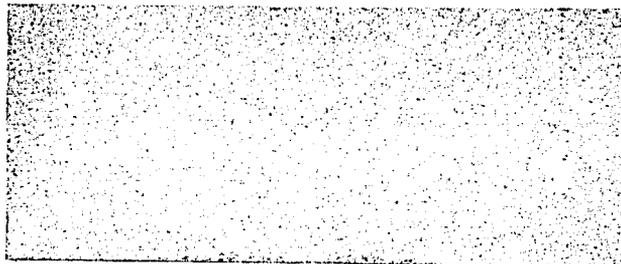
Echeverría et al., 1980 a, b). Durante el estado de proestro, el nivel de estrógenos circulante se encuentra en su valor más alto, mientras que durante diestro I se presenta su valor más bajo. En el presente estudio, encontramos que el número, la forma y el tamaño de las motas cambia durante el ciclo estral. En diestro I son redondas pero recuperan su estado irregular en la etapa de proestro. Las características de las motas ciclan de acuerdo al estado transcripcional de las etapas de ciclo estral.

Segundo, para confirmar experimentalmente que las variaciones en patrón moteado observadas durante el ciclo estral, son resultado de la acción de hormonas específicas y no por otros factores presentes en sangre, castramos a las ratas para suprimir la acción hormonal en el útero. En estas condiciones, después de 21 días, los factores de *splicing* en las células epiteliales se distribuyen en un patrón con motas muy redondeadas; resultado de la ausencia de transcripción inducida por hormonas, similar a lo observado en la etapa de diestro I. Con la finalidad de inducir la transcripción, por hormonas, inyectamos una dosis de  $17\beta$  estradiol, que es una forma altamente soluble del estradiol y analizamos el patrón moteado en las células

epiteliales lumbales de útero. Los factores de *splicing* recuperan rápidamente (30 minutos después de la administración de la hormona) su distribución en motas irregulares y con una fracción difusa muy conspicua. Nuevamente, esta recuperación del patrón es paralela a la ocurrida durante la etapa de proestro. Es sabido que la transcripción es inducida rápidamente después de aplicar una inyección intraperitoneal de hormona en ratas castradas (Vázquez Nin et al., 1979). Es interesante notar que en el útero, el epitelio glandular y células del miometrio también muestran la misma variación del patrón intranuclear de los factores de *splicing*, es decir, las motas (SFCs) son redondas durante diestro I y en ratas castradas y, ellas recobran su forma irregular durante proestro y después de la estimulación hormonal. Una explicación para estas observaciones es que los tres tipos celulares, epitelio luminal, glandular y miometrio son blanco de la acción de los estrógenos. Trabajos previos han sugerido que no solo las células de epitelio luminal responden a dicho estímulo, sino también las del epitelio glandular (Williams y Rogers 1980). Además, una acción postranscripcional de los estrógenos ha sido documentada y receptores hormonales han sido encontrados en los tres tipos celulares (Vázquez-Nin et al., 1991).

*Modelaje de los patrones moteados intranucleares (SFCs) de distintos tipos celulares. Estereoimágenes*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



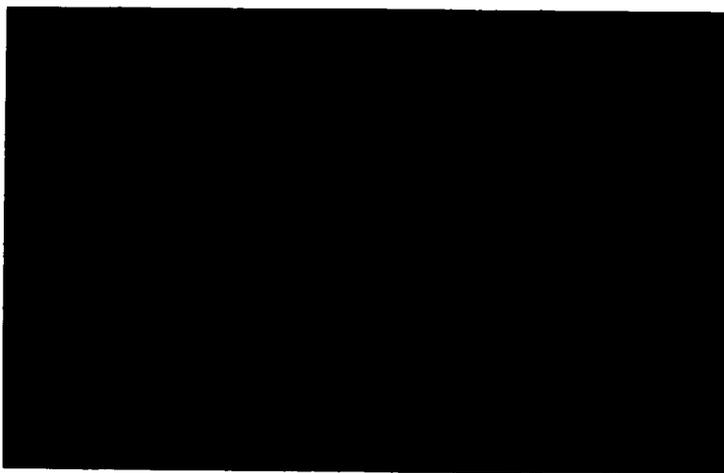


Figura 16.- Hepatocito

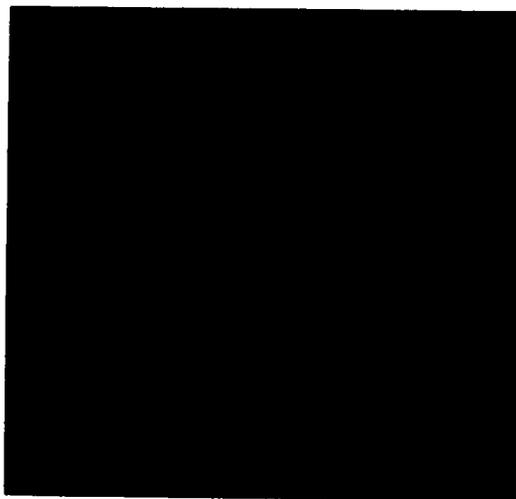


Figura 17.- Célula  $\beta$  pancreática

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

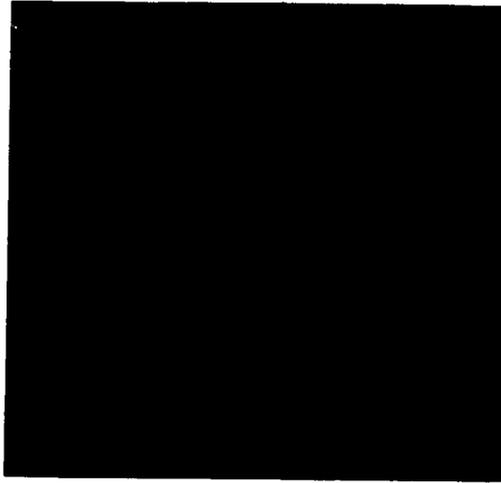


Figura 18.- Epitelio Bronquial

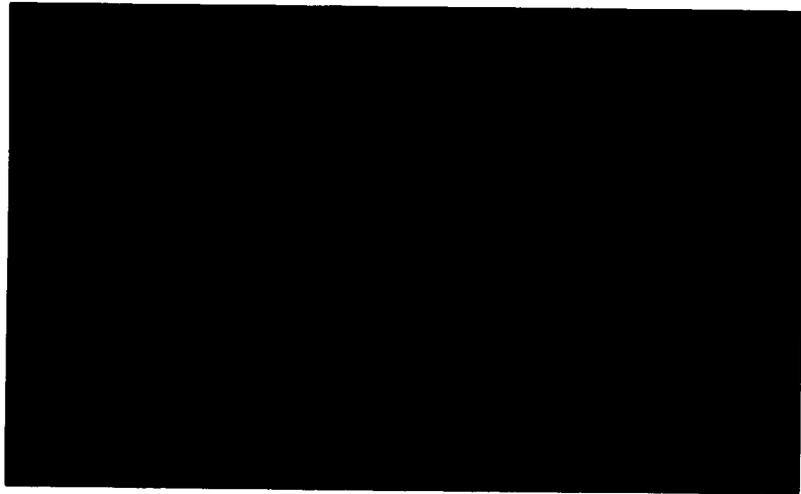
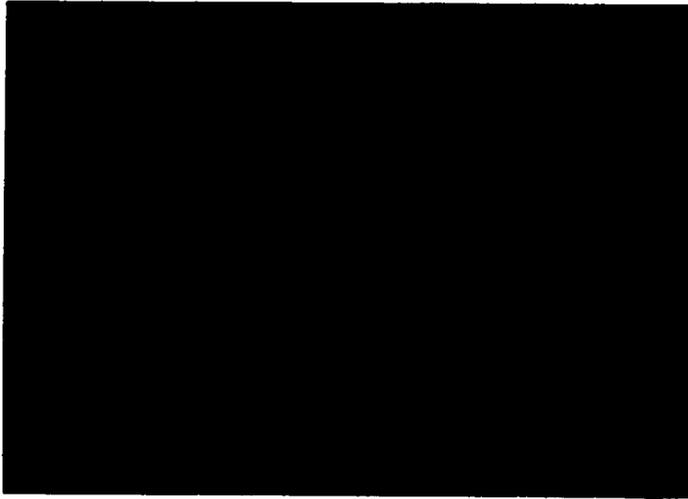
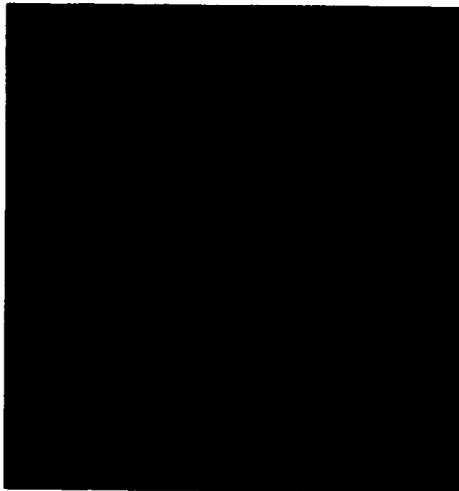


Figura 19.- Epitelio Intestinal

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



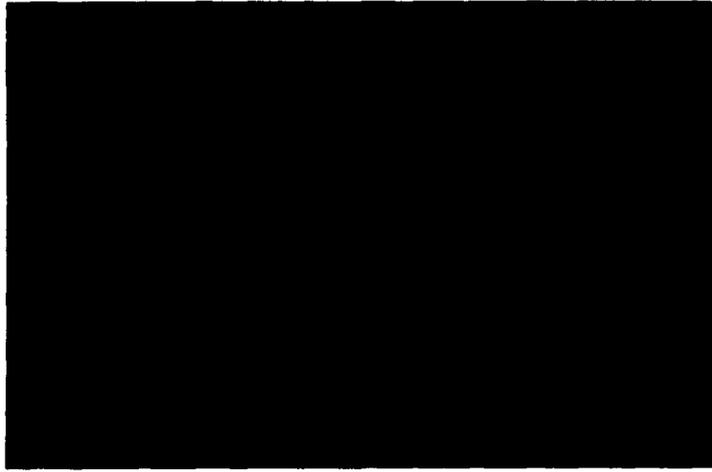
A



B

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 20.- Epitelio luminal de útero. A) Proestro, B) Diestro I



A

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



B

Figura 21- Epitelio glandular de útero. A) Proestro, B) Diestro I



A



B

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 22- Miometrio de útero. A) Proestro, B) Diestro I

# Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio conducen a las siguientes conclusiones:

- Los factores de *splicing* no-snRNPs en células diferenciadas de tejidos se organizan en motas (SFCs), de manera similar a lo observado en células en cultivo. La distribución del patrón moteado varía dependiendo del tipo celular, lo que sugiere que depende de su programa transcripcional final.
- En células de epitelio luminal uterino, el patrón moteado varía dependiendo de la actividad transcripcional, en respuesta al estímulo hormonal cíclico fisiológico o natural a través de las etapas del ciclo estral, así como en respuesta a tratamientos hormonales (castración y administración de 17- $\beta$  estradiol)
- En epitelio glandular y miometrio de útero, los factores de *splicing* se organizan de la misma manera que en las células lumbales y responden de manera similar al estado transcripcional inducido por hormonas.
- Nuestros resultados sustentan el modelo del reclutamiento de los factores de *splicing*, dependiente de la actividad transcripcional propuesto para células en cultivo.

Débito a que los factores de *splicing* están distribuidos en patrones moteados en varios tejidos de rata, incluyendo epitelio luminal de útero, y además estos patrones son modificados por acción hormonal, varias preguntas quedan planteadas, como por ejemplo; ¿Cómo es adquirido el patrón moteado durante la diferenciación celular?

# Perspectivas

Los resultados presentados en este estudio demuestran que la organización *in situ* de los factores de *splicing* que no forman snRNPs en un patrón moteado en las células diferenciadas de diversos tejidos de mamíferos, es similar a lo reportado previamente en células en cultivo. Lo anterior plantea entonces realizar una exploración de dicha organización en células de distintos órganos de organismos tanto vertebrados (peces, anfibios, reptiles y aves) como invertebrados (ascidias). Adicionalmente, se propone analizar los cambios en el patrón moteado en distintos tejidos de mamíferos en condiciones patológicas, por ejemplo en la Diabetes Mellitus

La confirmación experimental presentada en este estudio, en el sentido de que la morfología de las motas dentro del patrón moteado cambia dependiendo de la actividad transcripcional de la célula, abre la posibilidad de analizar dicho patrón de acuerdo a la función de la célula diferenciada, ya que ésta condición refleja el programa final de transcripción. Por ello, se podría estudiar si las características de los patrones son específicas para cada tipo celular y reflejan estados de actividad de expresión génica propios.

De acuerdo a los resultados obtenidos y a evidencias adicionales, surge la hipótesis de que los patrones moteados son adquiridos durante etapas tempranas del desarrollo del organismo, por lo que se propone identificar en que momento se establece la organización de los factores de *splicing* en los dominios nucleares "motas"; analizando células de embriones en etapas de blástula y gástrula. Una vez establecida la gástrula, se podrían rastrear líneas celulares derivadas de las tres capas blastodérmicas (endodermo, ectodermo y mesodermo) hasta la diferenciación del tejido.

Todo lo anterior contribuirá a conocer y por lo tanto entender desde un punto de vista integral y dentro de un contexto evolutivo, el significado de la compartimentalización del proceso de *splicing* del pre-mRNA dentro del núcleo celular.

# Referencias

- Anderson, W. A., Kang, Y. H., De-Sombre, E. R. (1975). Estrogen and antagonist induced changes in endometrial topography of immature and cycling rats. *J. Cell Biol.* 64, 692-703.
- Bauren, G., Wieslander, L. (1994). Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell* 76, 183-192.
- Beyer, A. L., and Osheim, Y. N. (1988). Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcription. *Genes Dev.* 2, 754-765.
- 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 Lab. Press, New York.
- 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.
- 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, M. O., Zavala, G., Benítez, A., and Vázquez-Nin, H. G. (1980a). Changes during estrus cycle in the nucleus of endometrial cells of the rat. *Biol. Cell.* 39, 139-142.
- Echeverría, M. O., Vázquez-Nin, H. G. (1980b). A rapid method for the isolation and culture of endometrial epithelial cells responsive to estradiol. *Acta Anat.* 106, 45-56.
- Economides IV, and Pederson T. 1983. In vitro assembly of a pre-messenger ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:4296-4300.
- Fakan, S. (1994). Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol.* 4:86-90.
- Fakan, S. and Puvion E. 1980. The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution, *Int. Rev. Cytol.* 65,255-299.

- Ferreira, J., Carmo-Fonseca, M. (1996). Nuclear morphogenesis and the onset of transcriptional activity in early hamster embryos. *Chromosoma*. 105, 1-11.
- Fortes, P., Bilbao-Cortes, D., Forneron, M., Rigaut, G., Raymond, W., Séraphin, B., and Mattaj, J. (1999). Luc7p, a novel yeast U1 snRNPs protein with a role in 5' splice site recognition. *Genes Dev.* 13 (18), 2425-2438.
- Fu, X. D. (1993). Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins. *Nature* 365:82-85.
- Gall, J. G., Bellini, M., Wu, Z. and Morphy, C. 1999. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol. Biol. Cell* 10, 4385-4402.
- Gall, J. G. 2000. Cajal bodies: The first 100 years. *Annu. Rev Cell Dev. Biol.* 16:273-300.
- Gorski, J. and Gannon, (1976). Estrogen action in the uterus: the requisite for sustained estrogen binding in the nucleus. *Gyn. Oncol.* 2, 248-258.
- Hamilton, T. H. (1968). Control by estrogen of genetic transcription and translation. *Science* 161:649-660.
- Huang, S., and Spector, D. L. (1996). Intron dependent recruitment of pre-mRNA splicing factors to sites of transcription. *J. Cell Biol.* 133, 719-732.
- Jiménez-García, L. F., and Spector, D. L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59.
- Matera, A. G. (1998). Of coiled bodies, gems, and salmon. *J. Cell. Biochem.* 70, 181 - 192.
- Matera, A. G. (1999). Nuclear bodies. Multifaceted subdomains of the interchromatinian space. *Trends 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.
- Melcák, I., Cermanová, •., Jirsová, K., Koberna, K., Malínský, J., and Raška, I. (2000) Nuclear pre-mRNA Compartmentalization: Trafficking of Released Transcripts to Splicing Factor Reservoirs, *Mol. Biol. Cell* 11, 497-510.
- Mintz, P., S. D. Patterson, A. F. Neuwald, C. S. Spahr, and D. L. Spector. (1999). Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J.* 18, 4308-4320.

- Minvielle-Sebastia, L. and Keller, W. (1999). mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr. Opin. In Cell Biol.* 11:352-357.
- Misteli, T., Cáceres, F. J., and Spector, D. L. (1997). The dynamics of pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387, 523-527.
- Misteli, T., and Spector, D. L. (1996). Serine/threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors. *Mol. Biol. Cell* 7, 1559-1572.
- Misteli, T., and Spector, D. L. (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol. Cell* 3, 697-705.
- Misteli, T. (2000). Cell Biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J. Cell Sci.* 113, 1841-1849.
- Monneron, A., and Bernhard, W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27, 266-288.
- Neugebauer, K., and Roth, M. B. (1997). Distribution of pre-mRNA splicing factors at sites of RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 11, 1148-1159.
- Paris, J., Mrena E., Lanquetin, A., Marchal, G. M., and Thevenot, R. (1984). The endometrium of intact or castrated rats. Effects of hormonal stimulation. A scanning electron microscopy study. *Bull. Assoc. Anat.* 68, 211-221.
- Phair, R.D. and Misteli, T. (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 404, 604-609.
- Phelan, A., Carmo-Fonseca, M., Mclauchlan, J., Lamond, A. I. (1993). A Herpes simplex virus type I immediate-early gene product, IE63, regulates small nuclear ribonucleoprotein distribution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90, 9056-9060.
- Pena, E., Berciano, T. M.; Fernández, R., Ojeda, L. J., and Lafarga, M. (2001). Neuronal body size correlates with the number of nucleoli cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Comp Neurol.* 430:250-263.
- Potten, C.S. (1997). *Stem Cells.* Springer. 291 p.
- Rambo, C. O., and Szego, C. M. (1983). Estrogen action at endometrial membranes: alterations in luminal surface detectable within seconds. *J. Cell Biol.* 97, 679-685.

- Reed, R. (2000). Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr. Op. in Cell Biol.* 12:340-345.
- Salditt-Georgieff, M. and Darnell, J.E. (1982). Further evidence that the majority of primary nuclear RNA transcripts in mammalian cell do not contribute to m-RNA. *Mol Cell Biol* 2:701-707.
- 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.
- Sleeman, J. E., and Lamond, A. I. (1999). "Nuclear organization of pre-mRNA splicing factors". *Curr. Opin. Cell Biol.* 11; 372-377.
- Spector, D.L. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9; 265-315.
- Spector, D. L., Okeefe, R. T., and Jimenez-Garcia, L. F. (1993). Dynamics of transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus. *Cold Spring Harbor Symp. Quanti. Biol.* 58; 799-805.
- Spornitz, B. P., Rinderknecht, A., Edelmann, B., Scheidegger, and F. Cairoli. (1994). Ultrastructure as a Basis for Dating of Rat Endometrium. *Anat. Rec.* 238, 163-176.
- Tacke, R., Chen, Y., Manley, J. L. 1997. Sequence-specific RNA binding by an SR proteins requires RS domain phosphorylation: Creation of an SRp40-specific splicing enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94,1148-1153.
- Tachi, S. (1984). Electron microscopic analysis of the effect of progesterone upon the hormone - sensitive solitary cilia and centriolar complexes in the luminal epithelial cells. *Acta Anat.* 169, 45-58.
- Thiry, M. (1993): Differential localization of nucleic acids within interchromatin granule clusters. *Eur. J. Cell Biol.* 62; 229 -240.
- Tronchere, H, Wang, J, Fu, X. D. (1997). A protein related to splicing factor U2AF35 that interacts with U2AF65 and SR proteins in splicing of pre-mRNA. *Nature* 388:397-400.
- Tomomi, Sato., Yugo, Fukazawa., Hiromi, Kojima., Masato, Enari., Taisen, Iguchi., and Yasuhiko, Ohta. (1997). Apoptotic Cell Death During the Estrus Cycle in the Rat Uterus and Vagina. *Anat. Rec.* 248, 76-83.
- 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, H., Echeverría, M. O., Molina, E. and Fragoso, J. (1978). Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Acta Anat.* 102, 308-318.
- Vázquez-Nin, H., Echeverría, M. O., and Pedron, J. (1979). Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. *Biol. Cell.* 35, 221-228.
- Vázquez-Nin, H., Echeverría, M. O., Fakan, S., Thaish, M. A., Wotiz, H. H., and Martin, E. T. (1991). Immunoelectron microscopic localization of estrogen receptor on pre-mRNA containing Constituents of Rat uterine cell nuclei. *Exptl. Cell Res.* 192, 396-404.
- 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.
- Wang, J., Xiao, S.H. Manley, J.L. (1998). Genetic analysis of SR protein ASF/SF2: Interchangeability of RS domains and negative control of splicing. *Genes & Dev* 11,334-344.
- Williams, T., and Rogers, A. W. (1980). Morphometric studies of the response of the luminal epithelium in the rat uterus to exogenous hormones. *J. Anat.* 130, 867-881.
- 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 pre-messenger 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.
- Zamore, P. D. and Green, M. R. (1991). Biochemical characterization of U2 snRNP auxiliary factor: an essential pre mRNA splicing factor with a novel intranuclear distribution. *EMBO J.* 10,207-214.

# Agradecimientos



Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, contar con su apoyo absoluto en todos los aspectos a lo largo de estos años y principalmente le agradezco su amistad y el ser excepcional como tutor.

Al Dr. Alfonso Carabez Trejo, que ha estado presente a lo largo de este proyecto, apoyando en el ámbito académico y personal siempre que lo necesité.

Al Dr. Alfredo Feria Velasco por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial y colaborar en el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Lourdes Segura Valdez por toda su enseñanza y apoyo en el desarrollo del trabajo experimental y por revisar y comentar acerca del escrito.

A los doctores miembros del Jurado por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis y haber aportado comentarios para mejorarla, les agradezco particularmente la disposición que presentaron en todo este proceso.

Alfonso Carabez Trejo  
Alfredo Feria Velasco  
Luis Felipe Jiménez García  
Abraham Landa Piedra  
María Imelda López Villaseñor  
Cristina Revilla Monsalve  
Roman Vidal Tamayo

A Claudia Alarcón por su apoyo como Traductora y Lingüista en el trabajo de publicación de los resultados.

A Guadalupe Hiriart y Rafael Favila, por que además de apoyar con gran capacidad a nivel técnico, son las personas mas amables dispuestas y colaboradoras.

A Adriana Mendoza por proporcionarme muestras del material biológico que fue utilizado en este trabajo.

A la Dra. Marcia Hiriart, Biol. Ma. del Carmen Sánchez Soto, M. en C. Remedios Ramírez Rangel y al Dr. Roman Vidal Tamayo por instruirme y asistirme en las técnicas de cultivo celular y manejo del Microscopio de Barrido Lasser Confocal respectivamente.

A Rosario Ortiz y a Gabriel López, por entender mi manera de ser, por ser mis amigos y por supuesto por colaborar conmigo académicamente cada vez que se presentó la oportunidad.

Al resto de los integrantes del laboratorio de Microscopia Confocal del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias, a Claudina, Lourdes, Reyna, Thelma.

A Leopoldo Santos y al personal del Departamento de Reconstrucción de Imágenes del CNB, Juriquilla UNAM.

A todo el personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias por mantener la infraestructura del laboratorio y permitirme hacer uso de ella.

Al personal del Bioterio de la Facultad de Ciencias

*A mis amigos de siempre, Samuel y Jesús*

*Agradezco muy especialmente y dedico con todo mi amor al resto de mi familia Claudia Alarcón, a Alma Rebollo, Derick, Homero, Horacio, Hugo, Joanidka, Lulú (todos George), Martín y Sebastián Rigoleta y William Larson*

*El desarrollo de este trabajo fue posible gracias a CONACyT-DGEP, por una beca doctoral otorgada y a fondos del proyecto de CONACyT No. 28002-N*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**Biol. Francisco Javier Incera Ugalde**

Jefe de la Unidad de  
Administración del Posgrado  
Presente.

No. EXP. 3931133

Por este conducto me permito enviar a usted la publicación del (a) alumno (a) **ROCIO GEORGE TELLEZ**, requisito indispensable para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biomédicas (Plan 5002).

El artículo del (a) alumno (a) George se denomina "**Cellular Organization of pre-mRNA Splicing Factors in Several Tissues. Changes in the Uterus by Hormone Action**". En dicho artículo la alumna George aparece como primer autor en la Revista Biology of the Cell.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, D.F., a 31 de Octubre del 2001. 53: E1 5- AON 10.

**Dr. Gabriel Roldán Roldán**  
Responsable  
Facultad de Medicina

**Dr. Abel Moreno Cárcamo**  
Coordinador  
Doctorado en Ciencias Biomédicas

UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN DE POSGRADO  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



# Biology of the Cell

REFEREE 2 - 1st reading

TITLE: Cellular Organization of pre-mRNA Splicing Factors in Several Tissues. Changes in the Uterus by Hormone Action

AUTHORS: George-Tellez R, Segura-Valdez ML, Gonzalez-Santos L, Jimenez-Garcia LF

19 pages (32 Ref), 6 Fig

The Ms of *George-Tellez and col* deals with the dynamic and distribution pattern of splicing factor domains, speckles, in relation to transcription rates in a wide variety of materials using immunofluorescence assays and CLSM. This is a relevant topic, the paper is well planned and contains interesting results about the changes that are undergone in the SFCs domains. The list of references is well documented. Then the paper in my opinion can be accepted for publication in *Biology of the Cell* but some revision should be made before publication.

In general the images are of quite good quality reflecting the results described. However Figs 1C and 1D, should be treated in another way to obtain better resolution because the pixels are too prominent; also decreasing the magnification in the printed pictures as well as the contrast, will help.

The contents of the ms are interesting and well written but the english needs to have a slight revision as is indicated in page 2. The rest of the text should be revised in similar manner. Some terms e.g. "rounded" to described the shape of the speckles are not adequate.

The paper merits publication but I suggest these comments are taking into account which will improve the understanding of this Ms.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ACCEPT

Minor revisions

Major revisions

Requires re-review

REJECT

Too preliminary

Low interest

Scientifically flawed

**Cellular Organization of pre-mRNA Splicing Factors in Several Tissues. Changes in the Uterus by Hormone Action**

**George-Téllez R<sup>1</sup>, Segura-Valdez ML<sup>1</sup>, González-Santos L<sup>2</sup>. and Jiménez-García LF<sup>1\*</sup>.**

<sup>1</sup>Electron Microscopy Laboratory and Confocal Microscopy Laboratory, Department of Cell Biology, School of Sciences; National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico; <sup>2</sup>Images Reconstruction Department, Neurobiology Center, Campus UNAM-UAQ, A.P. 1-1141, C.P. 76001, Juriquilla, Querétaro, México.

**Running title:** Speckles in tissues

\*Corresponding author:

Dr. Luis F. Jiménez-García

Laboratorio de Microscopía Electrónica y Laboratorio de Microscopía Confocal

Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM

Circuito Exterior, C.U. México D.F. 04510, México

Tel (5) 6 22 48 27

Fax. (5) 6 22 48 28

Email: [lfig@hp.ciencias.unam.mx](mailto:lfig@hp.ciencias.unam.mx)

## SUMMARY

In the mammalian cell nucleus, splicing factors are distributed in nuclear domains known as speckles or splicing factor compartments (SFCs). In cultured cells, these domains are dynamic and reflect transcriptional and splicing activities. We used immunofluorescence and confocal microscopy to monitor whether splicing factors in differentiated cells display similar features. Speckled patterns are observed in rat hepatocytes,  $\beta$ -cells, bronchial and intestine epithelia and also in three cell types of the uterus. Moreover, the number, distribution and sizes of the speckles vary among them. In addition, we studied variations in the circular form (shape) of speckles in uterine cells that are transcriptionally modified by a hormone action. During proestrus of the estral cycle, speckles are irregular in shape while in diestrus 1 they are circular. Experimentally, in castrated rats luminal epithelial cells show a pattern where speckles are dramatically rounded, but they recover their irregular shape rapidly after an injection of estradiol. The same results were observed in muscle and gland epithelial cells of the uterus. We concluded that different speckled patterns are present in various cells types in differentiated tissues and that these patterns change in the uterus depending upon the presence or absence of hormones such as estradiol.

**Key words.** Splicing factors, cell nucleus, speckles, hormone, uterus,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCTION

Pre-mRNA splicing is a predominantly co-transcriptional event (Beyer and Osheim, 1988; Báuren and Wieslander, 1994; Neugebauer and Roth, 1997) which involves a large number of splicing factors. In the cell nucleus this event occurs within a ribonucleoprotein complex called the spliceosome (Burge et al., 1999). Within the mammalian cell nucleus, the splicing factors are concentrated in about 20-50 nuclear compartments known as speckles or splicing factor compartments (SFCs), that correspond to an ultrastructural domain termed interchromatin granule clusters (IGCs) (Spector, 1993). In addition to being distributed in speckles, splicing factors are diffusely present in the nucleoplasm, in structures that correspond to perichromatin fibers when observed by electron microscopy and that incorporate tritiated uridine very rapidly (Spector et al., 1993; Fakan, 1994).

A dynamic model for the coordination of transcription and splicing proposes that splicing factors are recruited from speckles to active sites of transcription in a process mediated by phosphorylation/dephosphorylation of both, splicing factors and the carboxy terminal domain (CTD) of the largest subunit of RNA polymerase II (Misteli and Spector, 1999). A family of splicing factors termed the SR (Serine/Arginine) proteins are involved in this mechanism through a conserved stretch of serine/threonine residues (Misteli et al., 1997) which are phosphorylated by specific kinases such as SRPKs, CLKs, PITSLRE, PIKs or dephosphorylated by phosphatases like PP1, PP2A, PP2C (see Misteli, 2000).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

In this context, a proposed function for speckles or SFCs is that they act as assembly sites of the transcription/processing machinery, although they also may regulate recycling, concentration or ratio of splicing factors. In addition, an aspect that is being explored is the mechanism by which these nuclear compartments are maintained. It has been suggested that speckled pattern is a reflection of the transcription and splicing activity. Accordingly, isolation of IGCs shows that they contain a variety of splicing factors in addition to several factors of unknown function (Mintz et al., 1999). Furthermore, speckled patterns may be the reflection of the steady state of association/dissociation of factors between the nucleoplasm and the speckles (Phair and Misteli, 2000).

Supporting this model, it has been shown that changes in the transcription level of a cell cause a redistribution of splicing factors in the nucleus (Spector et al., 1993). Upon adenovirus infection, or by transiently transfection with a plasmid containing a portion of the  $\beta$ -tropomyosin gene, the distribution and morphology of speckles change (Jiménez-García and Spector, 1993). This data suggested a recruitment mechanism that regulates the localization of the transcription and splicing factors in response to the initiation of active transcription (Jiménez-García and Spector, 1993; Misteli et al., 1997). In fact, it has been shown that the process depends on the presence of introns (Huang and Spector, 1996) and the phosphorylation-dephosphorylation of factors (Misteli and Spector, 1996). In contrast, transcriptional silencing of endogenous genes by treatment with inhibitors of transcription such as  $\alpha$ -amanitin, or by microinjection of oligonucleotides against the spliceosomal U1 snRNA to inhibit splicing, causes the rounding and enlargement of speckles and the accumulation of splicing factor within them (Spector et al., 1993).

Until now, most studies on the dynamic organization of splicing factors have been made using cell lines growing in culture. Here we study the distribution of splicing factors in differentiated cells present in rat tissues that display different transcriptional activity programs. We study the presence of speckled patterns in liver, pancreas, intestine, bronchus and uterus. In addition, we monitored the variations in the patterns as a consequence of cyclic variation in transcription due to the availability of hormones, or to variations induced experimentally to control the action of hormones in the uterus. We show that speckles or SFCs are present in several differentiated rat tissues and that some features of speckles vary among them. In addition, speckled patterns in the uterus vary depending on the presence or absence of hormones such as estradiol that are known to induce transcription.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Samples from pancreatic, lung, intestine and hepatic tissue were taken from six male rats. The samples were fixed with freshly prepared 4% paraformaldehyde in PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7.4 for 15 min at room temperature. Samples were then processed for histological techniques. Briefly, the samples were dehydrated in a series of graded ethanol at room temperature and embedded in paraplast. 3  $\mu$ m thickness sections were obtained and mounted on poly-L-lysine slides for immunofluorescence microscopy. Additionally, twenty-eight normally cycling female rats (200 - 250 g) kept under standard conditions, with free access to food and water were used in this study. Vaginal smears were taken afternoon at 1 PM and they were used as indicators of estrus cycle stage. After that, twenty animals, five for each cycle stage (proestrus, estrus, diestrus I, and diestrus II) were anaesthetized with pentobarbital and samples of uterus were taken. In order to study speckles variation under different hormonal conditions, eight rats were bilaterally ovariectomized 21 days later. Uterus samples from three rats were fixed while the remaining five were injected intraperitoneally with 4  $\mu$ g estradiol-17  $\beta$ , and uterus samples were fixed 30 min after the treatment.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Immunofluorescence**

The tissue samples utilized in this study were deparafinized and rehydrated. They were maintained in TBST (TRIS-Buffered Saline with Tween 20). Afterwards, a procedure of antigenic recovery was performed with proteinase K (Proteinase K ready to use, Dako 53020) for 5 minutes at room temperature. Then, two rinses of 5 min each with TBST were performed and

tissues were incubated with the 3C5 primary monoclonal antibody against proteins of the SR family at a dilution of 1:20 for 24 hrs at 4° C.

Following two additional 5 min rinses, the samples were incubated with anti IgG secondary antibody coupled to FITC (Jakson ImmunoResearch Laboratories, Inc 41845) diluted 1:20 in PBS, for one and a half hours at room temperature. Subsequently, the samples were rinsed 3 times at 5 min each with TBST, and then mounted in an aqueous medium. The samples were analyzed with a Zeiss epifluorescence microscope and pictures were taken with a confocal microscope.

### **Confocal Laser Scanning Microscopy**

Immunolabeled samples were analyzed using a Nikon PCM 2000 or a Zeiss 510 confocal laser-scanning microscope. For three dimensional reconstruction and modeling, 100 nm optical sections were generated. Sections were then analyzed and images were produced by using Iplab, med-x, and t3d software from Nikon and the software Pascal from Zeiss microscopes.

### **Speckle Shape Quantitative Analysis**

In order to quantitatively determine the shape of the speckles, a computer program was designed to evaluate the circularity (MC) of each speckle, that is, how close to a circle a speckle shape is. This measure is defined by a  $4\pi A/P^2$  function, where A is the area of the region of interest and P is the region perimeter. For a circle,  $MC=1$ . Therefore, the MC for any region shape is  $0 < MC < 1$ . 100 digital images for each assay were analyzed.

## RESULTS

### **Speckled patterns are present in several differentiated cells from different organs**

To test if the speckled pattern described for culture cells is also present in differentiated cells in a variety of tissues, we perform immunofluorescence studies by detecting the SR family of splicing factors with the monoclonal antibody 3C5. Intranuclear speckled patterns are observed in all cell types analyzed, i.e. hepatocytes and  $\beta$ -cells (Fig. 1), intestine, bronchial and uterine luminal epithelia (Fig. 2) and three cell types in the uterus (luminal and gland epithelia, and miometrium cells) (Fig. 3). The number and shape of the speckles vary depending upon the cell type (Table 1). For example, hepatocytes show 6 to 14 speckles with an average value for circularity (MC) of 0.581167, while  $\beta$ -cell nuclei in the pancreas contain between 5 to 12 speckles, with measures of circularity (MC) of an average value of 0.479584.

### **Speckled patterns are present in several differentiated cells from the same organ**

To analyze if speckled patterns are present in several cell types within the same organ, we sectioned several rat uteri and performed immunofluorescence studies with the 3C5 antibody. Fig. 3 shows that speckled patterns are present in the nuclei of every cell type in the organ, and that they seem to be morphologically different from each other. In fact, the different cell types can be distinguished in the fluorescence image, clearly defining the luminal and gland epithelia, and the muscle layer. Quantitative analysis evaluating the number and shape of speckles is shown in Table 1.

### **Speckled pattern varies in epithelial cell nuclei at different stages of the estrus cycle**

In the uterus, luminal and gland epithelia as well as muscle cells present speckled patterns (Fig. 3). To analyze if the pattern varies at different transcriptional stages in cells present in tissues, we studied the changes produced in luminal epithelial cells during the estrus cycle, when transcription normally varies in response to the stimuli by several hormones including estradiol. In proestrus, when hormone concentration in the blood stream is high, speckles are irregular in shape (MC= 0.512963) while they are very rounded (MC = 0.799547) during diestrus I, when estradiol concentration is at its lowest value (Figs 4, 5A). In proestrus we observed 2 to 3 large and 9 to 25 small speckles which are heterogeneous in shape. Within the nucleus a very conspicuous diffuse staining was noted. Speckles may be even triangular or almost any other shape except circular. In diestrus I, the speckled pattern is rather similar, having 14 to 29 spherical speckles which are present in greater numbers than in the proestrus stage. Within the nucleoplasm, the diffuse fraction is not present.

Interestingly, we observed the same changes in gland epithelial cells (proestrus MC=0.456616; diestrus I MC=0.824835) and muscle cells (proestrus MC=0.457182; diestrus I MC= 0.834037) (Figs. 4, 5A ), i.e. speckles are irregular in shape in proestrus and spherical during diestrus I.

### **Speckled pattern varies in uterine cells after castration and injection of estradiol**

To see if the changes in speckled patterns were due to the action of specific hormones, occurring during estrus cycle, we evaluated the speckled pattern variations in luminal epithelial cells after castration and injection of estradiol. Fig. 6 shows that 21 days after castration of the rats, splicing factors distribution in epithelial cell nuclei are similar to diestrus I, i.e., there are very rounded (MC=0.894769) speckles. On the contrary, after administering a single dose of estradiol  $17\beta$ , speckles recover the irregular shape (MC=0.470394) and the nucleoplasm shows diffuse staining within 30 minutes (Figs. 5B, 6).

Also throughout the estrus cycle, gland epithelial and muscle cells also show similar variations (Fig. 6). After castration speckles in gland epithelial cell nuclei are spherical (MC=0.873050) and recover the irregular shape (MC=0.699574) after the estradiol injection. In muscle cells, after castration, MC=0.879004 and after the estradiol injection MC=0.468323.

## **DISCUSSION**

### **Speckled patterns are present in differentiated cells of different tissues**

We have shown that splicing factors are distributed in speckled patterns within the nuclei of differentiated cells from different tissues, similar to what is observed in cultured cells. These patterns however, show differences in number, shape and distribution of speckles or SFCs.

Hepatocytes,  $\beta$ -cells, several epithelial (small intestine, uterine gland, bronchial) and muscle cells contain a speckled pattern that is different from one another. Previous studies on cultures of mammalian cells have demonstrated that the splicing factors for pre-mRNA processing are enriched in speckled domains (see Spector, 1993; Sleeman and Lamond, 1999; Misteli, 2000).

These domains are very dynamic compartments, which participate in coordinating transcription and splicing. It has been observed that the splicing factors are recruited *in vivo* from the speckles to the transcription sites. This suggests that one of the functions of the speckles is the storage of the components of the spliceosome. There is evidence supporting a model whereby splicing factors are recruited from the speckled domains or SFCs to the transcription and splicing sites (see Misteli et al., 1997) in a process depending on the presence of introns (Phelan et al., 1993; Huang and Spector, 1996).

The observation that 1) speckled pattern changes from irregular to rounded speckles depending on the transcriptional activity (see Spector et al., 1993), 2) that in spite of the high mobility of nuclear proteins the SFCs pattern is maintained (Misteli et al., 1997; Phair and Misteli, 2000), and that 3) there is evidence of speckled pattern in mouse liver cells (Mintz et al., 1999), prompted us to explore if in fact different cell tissues in an organism display a characteristic pattern. It is known that all cells in a tissue have a similar transcriptional program (Loeffler and

Potten, 1997) that is acquired during differentiation and is expressed during the differentiated stage. Therefore, it is plausible to expect that the nuclear splicing factors pattern are arranged depending upon the final transcription program in specific tissues. In this paper we have shown that in fact this could be the case. First, all cells from all tissues studied showed a speckled pattern and second, a quantitative study of different patterns indicated differences in the number and shape of speckles. Our hypothesis is that different patterns are obtained during differentiation from very early in the development, where splicing factors would have a more general distribution. In fact, previous studies showed that at early embryonic stages such as the one-cell embryo, both pronuclei display an apparent similar arrangement of splicing factors as a punctate or speckled pattern (Ferreira and Carmo-Fonseca, 1996). Most recently (Pena et al., 2001), it has been shown that rat trigeminal ganglion neurons also display speckled patterns by using anti-snRNPs antibodies. Therefore, our results agree with those by Pena et al. (2001), in showing speckles in several cell tissues and that differences among patterns are detected. It would be interesting to analyze if the characteristics of the patterns are specific for every cell type. Since splicing factors are enriched in these nuclear domains in culture and tissue cells, it would be interesting to study which factors maintain such patterns and to test if phosphorylation /dephosphorylation of splicing factors take an active role.

### **Speckled pattern changes by hormones affecting transcription**

We showed here that speckled pattern in rat uterus epithelial cells changes upon modification of transcription by hormone action, similar to what occurs in culture cells in different experimental conditions where transcriptional activity is modified. Uterine cells are target cells for action of the ovarian hormones. It is known that estrogens play a very important role in the

synchronization of multiple cellular events and induce the expression of mRNA of specific genes (Spornitz et al., 1994; Tomomi et al., 1997).

First, we tested the variations in speckled patterns during estrus cycle. In rats and other vertebrates, uterine epithelial cells are under different levels of hormonal stimuli throughout the stages of the estrus cycle (Anderson et al., 1975; Paris et al., 1984; Rambo and Szego, 1983; Tachi, 1984, Vázquez Nin et al., 1978, 1979, 1991; Echeverría et al., 1980a, b). During the proestrus stage, the level of circulating estrogen is at its highest value, while during diestrus I is at its lowest value. In the present study, we found that the number, shape, and size of the speckles change during the estrus cycle. In proestrus speckles are irregular in form but they become rounded at diestrus I. Speckled pattern is recovered during the next proestrus stage. These observations led us to conclude that in uterine epithelial cells, speckled pattern varies depending upon the transcriptional activity, in response to the natural cyclical hormonal stimuli.

Second, to experimentally confirm that variations in speckled patterns observed during estrus cycle were due to specific hormones and not to other factors present in the blood, we castrated rats to suppress hormone action in the uterus. In these conditions after 21 days, splicing factors in the epithelial cells were distributed in a very rounded pattern of speckles; due to the absence of transcription induced by hormones, similar to what is observed during diestrus I. In order to activate transcription by hormones, we injected a single dose of estradiol 17  $\beta$ , a very soluble form of estradiol, and analyzed the speckled pattern in luminal epithelial cells of the uterus. Splicing factors quickly recover their distribution into irregular speckles and an intense diffuse staining, within 30 minutes after estradiol administration. Again, this recovery of the patterns

parallels the one during the proestrus stage. It is known that transcription is rapidly induced after intraperitoneal injection in castrated rats (see Vázquez Nin et al., 1979). It is interesting to note that, in the uterus, gland epithelial and muscle cells also show the same variation of intranuclear splicing factors patterns, i.e. they are rounded during diestrus I and in castrated rats, and they recover their irregular shape during proestrus and after hormone stimuli. An explanation for these observations is that all three-cell types are responsive to estrogens. Previous studies have suggested that not only luminal epithelial cells are indeed responsive to hormones but that gland cells also show this feature (Williams and Rogers 1980). In addition, a postranscriptional action of estrogens has been documented and hormone receptors have been found in all three cell types (Vázquez-Nin et al., 1991).

Therefore, since the splicing factors are distributed in speckled patterns in several rat tissues, including luminal epithelium in the uterus, where in addition the patterns are modified by hormone action, several questions remain to be explored, as to how a speckled pattern is acquired during cell differentiation, or how speckles have evolved.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Guadalupe Hiriart, Alicia Montoya (INER), Rafael Favila (CNB-UNAM) and Silvia Juárez (FC-UNAM) for technical assistance and Claudina Gómez for the review of the english. Adriana Mendoza (FQ-UNAM) kindly provided us with uterus tissue samples. We also thank Dr. David L. Spector (CSHL) for the 3C5 antibody and Dr. Alfonso Carabez-Trejo for encouragement. Partially supported by CONACyT 28002-N. R. George-Téllez was supported by a CONACyT-DGEP (UNAM) fellowship.

## REFERENCES

- Anderson WA, Kang YH and De-Sombre ER (1975). Estrogen and antagonist induced changes in endometrial topography of immature and cycling rats. *J. Cell Biol.* 64, 692-703
- Bauren G, and Wieslander, L (1994). Splicing of Balbiani ring 1 gene pre - mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell* 76, 183-192
- Beyer AL, and Osheim Y N (1988). Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcription. *Genes Dev.* 2, 754-765
- Burge CB, Tuschl T and Sharp P. A (1999). Splicing of precursors to m RNAs by the spliceosome, in Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F. (Eds), *The RNA World*, 2<sup>nd</sup>. Ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, New York
- Echeverría MO, Zavala G, Benitez A and Vázquez-Nin HG (1980a). Changes during estrus cycle in the nucleus of endometrial cells of the rat. *Biol. Cell.* 39, 139-142
- Echeverría MO, Vázquez-Nin HG (1980b). A rapid method for the isolation and culture of endometrial epithelial cells responsive to estradiol. *Acta Anat.* 106, 45-56
- Fakan S (1994). Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trens Cell Biol.* 4,86-90

Ferreira J, Carmo-Fonseca M (1996). Nuclear morphogenesis and the onset of transcriptional activity in early hamster embryos. *Chromosoma* 105, 1-11

Huang S and Spector DL (1996). Intron dependent recruitment of pre - mRNA splicing factors to sites of transcription. *J. Cell Biol.* 133, 719-732

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

Loeffler M and Potten CS (1997). Stem Cells and celular Pedigrees – a conceptual introduction. In *Stem Cells*. Potten C.S (ed). Accademic Press INC

Mintz P, Patterson SD, Neuwald. AF, Spahr CS and Spector DL (1999). Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J.* 18, 4308-4320

Misteli T, and Spector DL (1996). Serine/threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre - mRNA splicing factors *Mol. Biol. Cell* 7,1559-1572

Misteli T, Cáceres FJ and Spector DL (1997). The dynamics of pre - m RNA splicing factor in living cells. *Nature* 387, 523-527

Misteli T, and Spector DL (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol. Cell* 3, 697-705

Misteli T (2000). Cell Biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J. Cell Sci.* 113, 1841–1849

Neugebauer K, and Roth MB (1997). Distribution of pre – mRNA splicing factors at sites of RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 11, 1148–1159

Phair RD and Misteli T (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 404, 604-609

Paris J, Mrena E, Lanquetin A, Marchal GM and Thevenot R (1984). The endometrium of intact or castrated rats. Effects of hormonal stimulation. A scanning electron microscopy study. *Bull. Assoc. Anat.* 68, 211–221

Phelan A, Carmo-Fonseca M, McLauchlan J and Lamond AI. (1993). A Herpes simplex virus type I immediate-early gene product, IE63, regulates small nuclear ribonucleoprotein distribution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90, 9056–9060

Pena E, Berciano TM, Fernández R, Ojeda LJ and Lafarga M (20001). Neuronal body size correlates with the number of nucleoli cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Comp Neurol.* 430:250–263

Rambo CO and Szego CM (1983). Estrogen action at endometrial membranes: alterations in luminal surface detectable within seconds. *J. Cell Biol.* 97, 679–685

Sleeman JE and Lamond AI (1999). "Nuclear organization of pre-mRNA splicing factors". *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 372-377

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

Spector DL, O'Keefe RT and Jiménez-García LF (1993). Dynamics of transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58, 799-805

Spornitz BP, Rinderknecht A, Edelmann B, Scheidegger and Cairoli (1994). Ultrastructure as a Basis for Dating of Rat Endometrium. *Anat. Rec.* 238, 163-176

Tachi S (1984). Electron microscopic analysis of the effect of progesterone upon the hormone – sensitive solitary cilia and centriolar complexes in the luminal epithelial cells. *Acta Anat.* 169, 45-58

Tomomi Sato, Yugo Fukazawa, Hiromi Kojima, Masato Enari, Taisen, Iguchi, and Yasuhiko, Ohta (1997). Apoptotic Cell Death During the Estrus Cycle in the Rat Uterus and Vagina. *Anat. Rec.* 248, 76-83

Vázquez-Nin H, Echeverría MO, Molina E and Fragoso J (1978). Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. Acta Anat. 102, 308-318

Vázquez-Nin, H, Echeverría MO and Pedron J (1979). Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. Biol. Cell. 35, 221-228

Vázquez-Nin H, Echeverría MO, Fakan S, Thaish MA, Wotiz HH and Martins ET (1991). Immunoelectron microscopic localization of estrogen receptor on pre - mRNA containing constituents of Rat uterine cell nuclei. Exptl. Cell Res. 192, 396-404

Williams T and Rogers AW (1980). Morphometric studies of the response of the luminal epithelium in the rat uterus to exogenous hormones. J. Anat . 130, 867-881

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## Figure legends

Figure 1. Optical sections after immunofluorescence of SR proteins in rat hepatocytes (A) and  $\beta$  cells (C). Intranuclear speckled patterns are observed in both cell types (arrows). Bar is 15  $\mu\text{m}$ . Three-dimensional reconstruction of speckled patterns in hepatocytes (B) and  $\beta$  cells (D) by confocal microscopy. Nucleolus, n. Bar is 5  $\mu\text{m}$ .

Figure 2. Optical sections after immunofluorescence of SR proteins and the corresponding phase contrast images in three rat epithelial cell types. (A, A') small intestine, (B, B') bronchus and (C, C') endometrium. A speckled pattern is present in the nuclei of all cell types (arrows). Bars are 10  $\mu\text{m}$ .

Figure 3. Bright field light microscope image of a histological (A) and a confocal section after immunofluorescence of SR proteins in rat uterus (B). Luminal (L, small arrow), gland epithelial (G, large arrow) and miometrium (M, arrowhead) cells show intranuclear speckled patterns in B). At higher magnification, luminal (a), gland (b), and miometrium (c) nuclei show speckles (arrows). A) hematoxylin-eosin staining. Bar is 40  $\mu\text{m}$  in A) and B). Bar is 5  $\mu\text{m}$  in a), b), and c).

Figure 4. Optical sections after immunofluorescence of SR proteins in rat uterus during the estrus cycle. In proestrus luminal, gland and miometrium cells show a pattern with irregular-shaped speckles (arrows) (MC=0.5). During diestrus I, all three cell types show intranuclear pattern where speckles are rounded (arrows) (MC=0.8). Bar is 10  $\mu\text{m}$ .

Figure 5. Quantitative analysis of the shape of speckles in three uterine cell types at different stages of the estrus cycle (Proestrus and Diestrus I) (A); and 21 days after castration and administration of a single dose of estradiol 17- $\beta$  (B).

Figure 6. Optical sections after immunofluorescence of SR proteins in uterus of castrated and estradiol-treated rats. After castration nuclear splicing factors distribution in luminal and gland epithelia, and myometrium display very round speckles (arrows) (MC=0.9). After 30 minutes of estradiol 17- $\beta$  treatment, speckles recover their irregular shape (arrows) (MC=0.5) and the nucleoplasm shows diffuse staining. Bar is 10  $\mu$ m.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

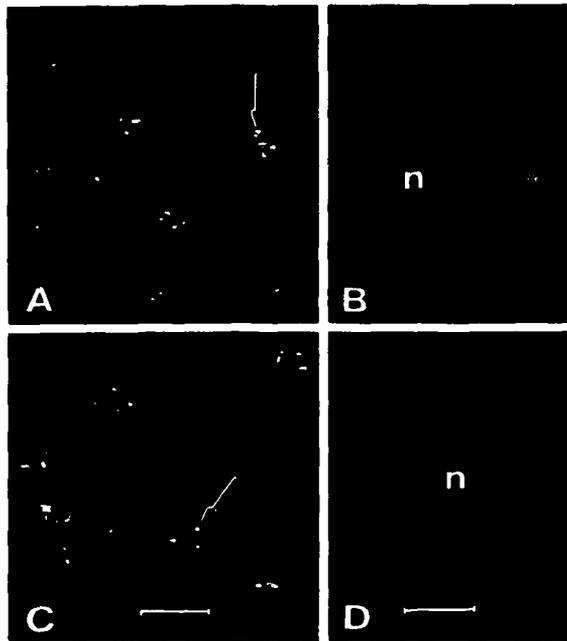


Figure 1

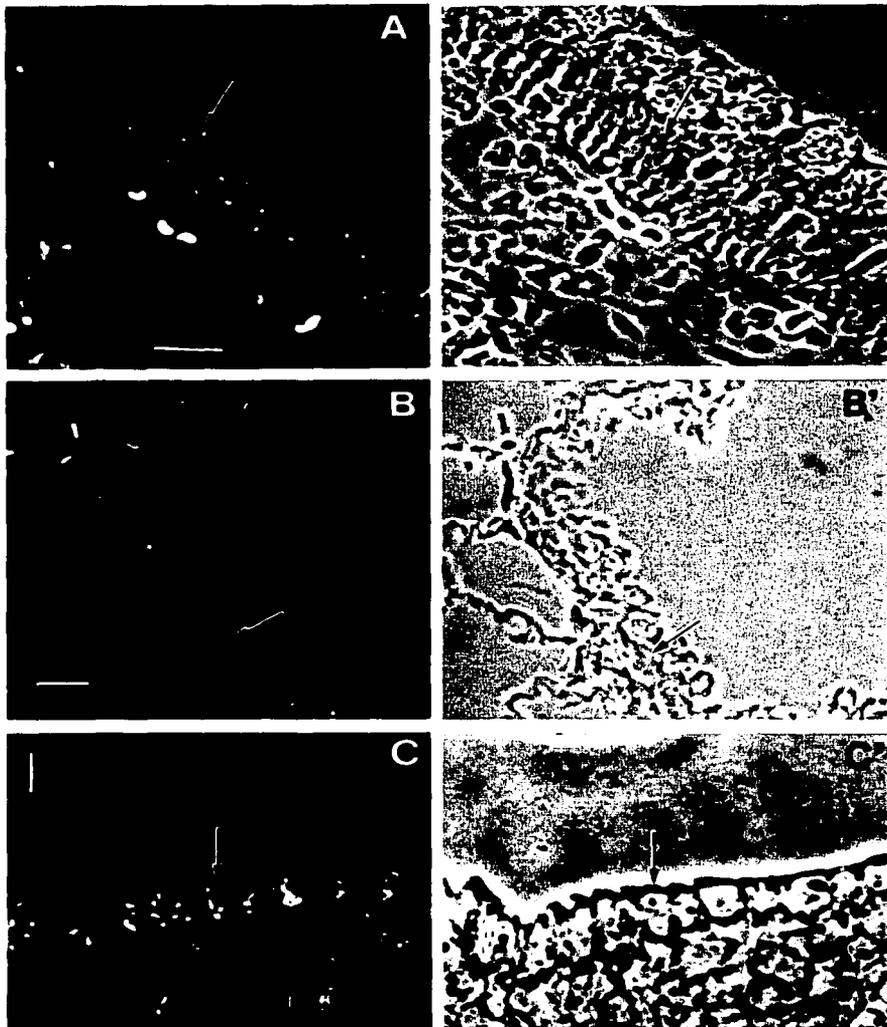
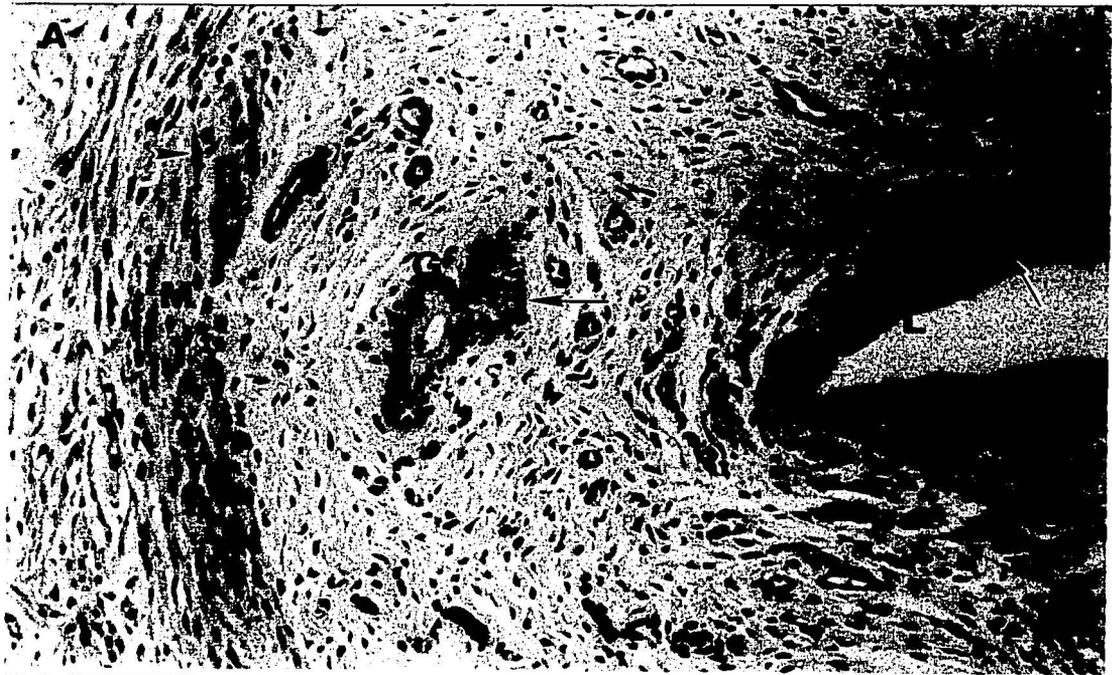
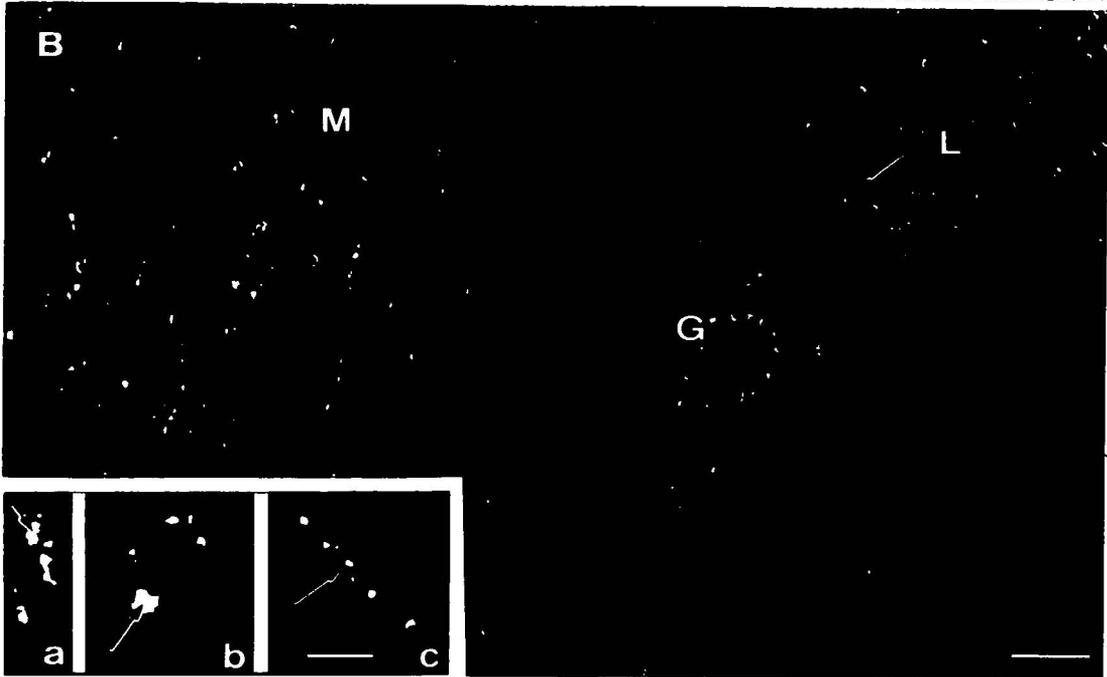


Figure 2

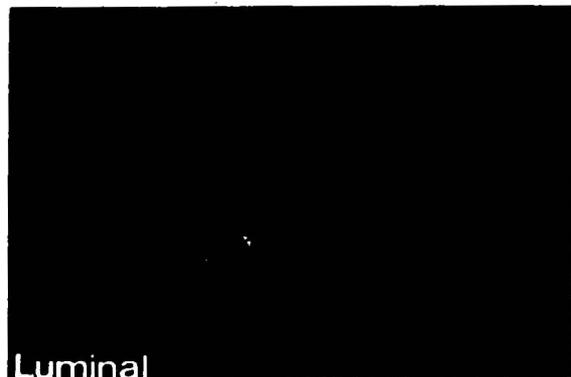


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



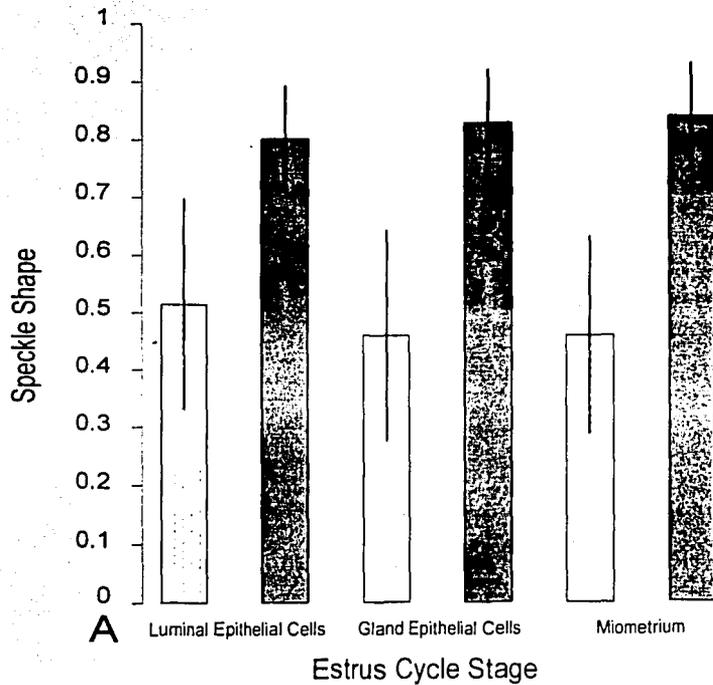
PROESTRUS

DIESTRUS I

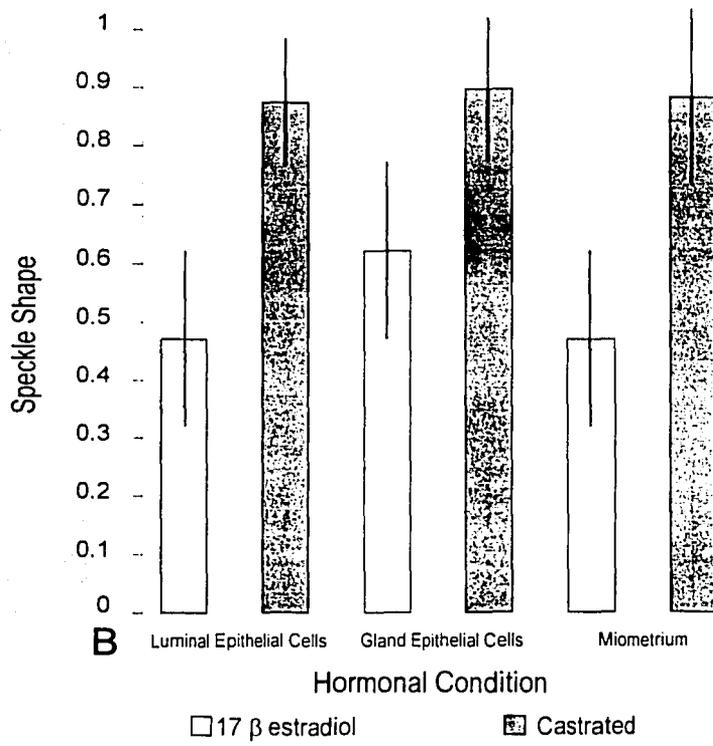


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figure 4



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



CASTRATED

ESTRADIOL

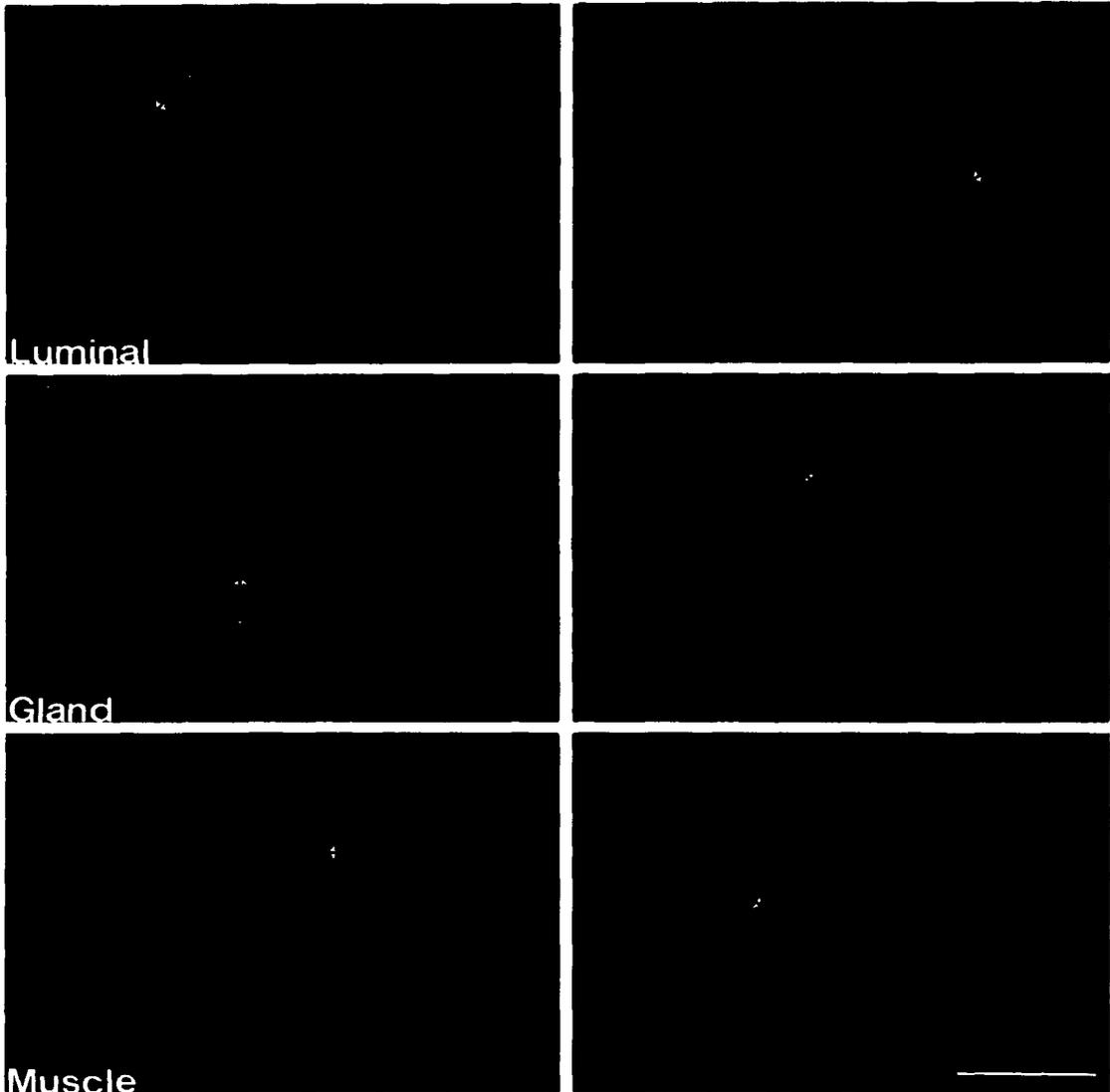


Figure 6

**Table 1.- Speckles features of several cell types.**

<b>Cellular type</b>	<b>Speckles number</b>		<b>Speckles shape (MC)</b>	
Pancreatic $\beta$ Cell	6 - 14		0.581167	
Hepatocytes	5 - 12		0.479584	
<b>UTERUS</b>	<b>P</b>	<b>DI</b>	<b>P</b>	<b>DI</b>
Luminal Epitelial Cell	2 - 3 large 9 - 25 small	14 - 19	0.512963	0.799547
Gland Epithelial Cell	6 - 23	4 - 21	0.456616	0.824835
Miometrium	9 - 16	3 - 6	0.457182	0.834037

MC= Measure of circularity

P= Proestrus

DI= Diestrus I

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN