

00346

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DISTRIBUCION DE FACTORES DE  
SPLICING EN VERTEBRADOS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)  
P R E S E N T A  
Q.F.B. MARIA CRISTINA NEGRETE GARCIA

DIRECTORA: DRA. MARIA DE LOURDES SEGURA VALDEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F.

2005

m345713



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.

# **DISTRIBUCION DE FACTORES DE *SPLICING* EN VERTEBRADOS**

Maestría en Ciencias (Biología Celular), Facultad de Ciencias,  
UNAM  
Abril, 2005

Presenta: Q.F.B. María Cristina Negrete García

Directora: Dra. María de Lourdes Segura Valdez

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Dra. Ma. de Lourdes Segura Valdéz, por todas sus enseñanzas, por la transmisión de sus conocimientos de forma incondicional, pero sobre todo por el apoyo, confianza y paciencia que siempre me mostró, ya que sin su ayuda no hubiera podido culminar este trabajo.
- Al Dr. Luis Felipe Jiménez García quién con sus sugerencias siempre tan inteligentes y llenas de disposición, hizo de este trabajo un gran trabajo.
- Al Dr. David Spector (Cold Spring Harbor Laboratory) y al Dr. Luis Felipe Jiménez García por la donación del anticuerpo monoclonal 3C5.
- A la Dra. Vilma Maldonado, al Dr. Carlos Ramos y a la M. en C. Martha Montaña por las sugerencias en la revisión de esta tesis.
- A Lupita Hiriart por su valiosa ayuda en la inclusión y corte de todas y cada una de las muestras empleadas en este trabajo.
- A Reyna Lara por brindarme su ayuda en la impresión de esta tesis.

A ti Lourdes y a ti Luis porque si no hubiera sido por ustedes nunca hubiera logrado hacer de esto una realidad. Agradezco a la vida el haberlos conocido y contar con su amistad ya que no nada más en mi carrera profesional me han apoyado, sino también en mi vida personal. Gracias en especial a ti Lourdes por dedicar un poco de tu tiempo en escucharme y darme esos consejos tan atinados en los momentos más críticos de mi vida.

**A Mara y Daniel** quienes son la razón de mí ser.

A todas aquellas personas que creen en mí, por que de forma directa o indirecta son las que me estimulan para continuar.

# INDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
I. INTRODUCCIÓN	
I.1. Proceso de Transcripción	9
I.2. Procesamiento del pre-mRNA	11
I.2.1. UsnRNPs	
a. Biogénesis	14
b. U6snRNA	15
I.2.2. Organización celular	17
I.2.3. Proteínas SR	
a. Estructura	17
b. Grupo SF2/ASF	18
c. Grupo SC35	19
d. Función	19
I.2.4. Acoplamiento de la transcripción al <i>splicing</i>	20
I.2.5. Acoplamiento del <i>splicing</i> al mecanismo de exportación del mRNA	23
I.2.6. Proceso de <i>splicing</i>	24
I.2.7. Modelo de ensamblado del <i>spliceosoma</i>	26
I.3. Organización Nuclear	
I.3.1. Núcleo	28
I.3.2. <i>Speckles</i>	29
I.3.3. Gránulos intercromatinianos y fibrillas pericromatinianas	33

I.3.4. Cuerpos de Cajal	34
II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	
II.1. Generalidades de los Cordados	36
II.2. Origen de los Cordados	38
II.3. Características generales de los vertebrados	39
III. OBJETIVOS	
III.1. General	41
III.2. Particulares	41
IV. HIPÓTESIS	42
V. METODOLOGÍA	43
VI. RESULTADOS	46
VI.1. <i>SPECKLES</i> EN AVES	46
VI.2. <i>SPECKLES</i> EN ANFIBIO	51
VI.3. <i>SPECKLES</i> EN PEZ ÓSEO	56
VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	61
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

# ABREVIATURAS

CB	Cuerpos nucleares, Cuerpos de Cajal
CBC	Complejo de Unión a la Caperuza
CBP	Complejo de Unión a la proteína
CFI	Factor de Corte I
CGI	Cúmulos de Gránulos Intercromatinianos
CPN	Complejo de Poro Nuclear
CPSF	Factor de Especificidad de Corte y Poliadenilación
CstF	Factor Estimulador de Corte
CTD	Dominio Carboxilo Terminal
EJC	Complejo de Unión de Exones
ESE	Enhancer contenido en el Exon
FPC	Fibrillas Pericromatinianas
GIC	Gránulos Intercromatinianos
Gem	Cuerpo Nuclear constituido por proteína SMN
m7G-cap	Caperuza de 7 metil guanosina
n	Nucléolo
NLS	Señal de localización Nuclear
PAP	Poli A Polimerasa
PHAX	Adaptador fosforilado para la exportación del RNA
pre mRNA	Precursor del RNA mensajero
PML	Oncoproteína de Leucemia Promielocítica
rRNA	RNA ribosomal
snoRNA	Pequeñas Ribonucleoproteinas nucleolares
tRNA	RNA de transferencia
RNPs	Ribonucleoproteinas
RRM	Motivo de Reconocimiento al RNA
SC-35	Componente Spliceosomal 35
SFC	Compartimiento de Factores de <i>Splicing</i>

SMN	Proteína asociadas a enfermedades degenerativas “Survival of Motor Neuron”
SR	Serina- Arginina
TAF	Factor Asociado a la Transcripción
TBP	Proteína de Unión a la Transcripción
TBS-T	Buffer de Tris Salino más Tween 20
UsnRNAs	Pequeños RNAs ricos en Uridina
UsnRNPS	Pequeñas RNPs ricos en Uridina

## RESUMEN

En eucariontes, el mRNA se produce a partir de la maduración de un precursor intranuclear denominado pre-mRNA. La maduración lleva consigo los pasos de metilación en el extremo 5', la poliadenilación en el extremo 3' de la molécula y el *splicing*, es decir, la eliminación de intrones y ligado de los exones. Este último proceso se lleva a cabo con la participación de un gran número de moléculas entre las que se encuentran los UsnRNAs y proteínas asociadas, así como proteínas fosforiladas. Estudios hechos por inmunofluorescencia, en células de mamíferos, usando anticuerpos contra algunos factores de *splicing* participantes en la síntesis del pre-mRNA, han revelado una distribución de estos componentes moleculares en forma de un patrón moteado (*speckled*) y una tinción nucleoplásmica difusa que excluyen la región del nucléolo. A nivel de microscopía electrónica el patrón moteado corresponde a cúmulos de gránulos intercromatinianos y el patrón difuso, a fibrillas pericromatinianas. Como es bien conocido estas *speckles* participan en el metabolismo del RNA, por lo que es de gran trascendencia conocer la organización estructural de las proteínas contenidas en estos dominios nucleares. Se sabe que las *speckles* son estructuras dinámicas que responden a la acción del proceso de transcripción en el núcleo.

Aunque la mayoría de los estudios sobre la organización dinámica de los factores de *splicing* se han hecho sobre líneas celulares en cultivo, recientemente se ha observado que este patrón se presenta también en células que forman parte de un tejido y que al igual que lo observado en células en cultivo, la morfología de estas estructuras depende de la actividad transcripcional y de *splicing*.

Para conocer si la organización celular de los factores de *splicing* es similar en el resto de los vertebrados, en este trabajo se analizó, por inmunofluorescencia, la distribución de las proteínas SR en células del tejido hepático y células del intestino de aves, anfibios y peces. Los resultados indican la presencia del patrón moteado en todos los tipos celulares analizados por lo que se concluye que esta organización celular de los factores de *splicing* es característica del grupo de los vertebrados y no es exclusivo de los mamíferos. Estudios adicionales en el laboratorio indican la misma situación en reptiles y lampreas.

# I. INTRODUCCIÓN

La expresión génica de organismos eucarióticos es un multiproceso complejo donde interviene un gran número de componentes de forma acoplada y orquestada en diferentes niveles. Inicialmente el mecanismo por el cual es regulado dicho proceso, tanto para eucariontes como procariontes, es la transcripción.

## I.1. PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN

En la mayoría de los casos, la transcripción inicia en una secuencia específica del DNA “molde” o en sitios alternativos a unos pocos pares de bases de distancia. Este proceso involucra las etapas de inicio, elongación y terminación de una molécula precursora, cuyo proceso de maduración es el siguiente gran nivel del control de la expresión de un gen (Maniatis & Reed, 2002).

A diferencia de los procariontes, en los que la transcripción sólo involucra a una enzima denominada RNA polimerasa, los núcleos de todas las células eucariontes examinados hasta el presente (vertebrados, *Drosophila*, levaduras, vegetales etc.) contienen tres RNA polimerasas; la I, II y III, cada una de las cuales cataliza la transcripción de genes que codifican diferentes clases de RNA, resultando, en el caso de la transcripción por RNA polimerasa II, una molécula inmadura de pre-mRNA (precursor de RNA mensajero).

La RNA polimerasa I (pol I), se encuentra en el nucléolo y es la responsable de la síntesis del precursor del RNA ribosomal (pre-RNAr). La RNA polimerasa II (pol II) se localiza en el nucleoplasma y transcribe los pre-mRNA y de algunos tipos de RNA pequeños (U1, U2, U3, U4, U5 etc.). Para que la RNA-pol II pueda dar inicio a la síntesis del pre-mRNA, se requieren de diferentes factores auxiliares que actúan como elementos de control, localizados hacia la izquierda del sitio de inicio de la transcripción denominados caja TATA, caja CAAT y TAF entre algunos otros. Estos elementos interactúan con otros factores conocidos como TBP (proteínas de unión al promotor), TAF (factores asociados a TBP), TFIIA, TFIIB (factores de transcripción de la polII) y el TFIIF que funciona como helicasa, permitiendo el ensamble molecular de todos los factores con la doble cadena de DNA y favoreciendo la participación de la pol II. Este gran complejo molecular es

estabilizado por un último factor, el TFIIE promoviendo así el inicio de la síntesis del pre-mRNA.

La RNA polimerasa III (pol III), actúa fuera del nucléolo y transcribe los genes que codifican los RNA de transferencia (tRNA), el rRNA 5,8S y una colección completa de RNAs pequeños U6, 7sK, 8-2, Y1-5 y el 7SL que actúa como una partícula de reconocimiento de la secuencia señal de proteínas que se translocan hacia el lumen del retículo endoplásmico rugoso (en **Agredano-Moreno y cols., 2003**).

Las tres polimerasas contienen 2 subunidades grandes y de 12 a 15 subunidades pequeñas. Las RNA polimerasas de eucariontes poseen subunidades esenciales o centrales que guardan homología de secuencia con el núcleo polimerásico de *Escherichia coli* ( $\alpha_2 \beta\beta'$ ), pero poseen de 4 a 7 subunidades específicas que no se encuentran en las polimerasas de esta bacteria ni en la de levaduras. La polimerasa se desplaza en la dirección 3' a 5' a lo largo del molde de la cadena de DNA, ensamblando una cadena complementaria antiparalela de RNA que crece desde el extremo terminal 5' en dirección 3'.

La RNA polimerasa II es un complejo enzimático multiproteico, que posee en el extremo carboxilo de la subunidad más grande, un segmento de 7 aminoácidos que se repite varias veces. Ni la pol I ni la pol III poseen estas unidades repetitivas. Esta secuencia repetitiva compuesta por Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser se denomina dominio carboxilo terminal CTD (en **Lodish y cols., 2000**). Tanto el dominio CTD de la RNA polimerasa II de la subunidad grande como los factores de elongación, participan en el proceso de acoplamiento entre la maquinaria de la transcripción y el procesamiento del pre-mRNA. Un gran número de estudios han demostrado que el CTD participa en la regulación y en el proceso de ensamble de los diferentes componentes de la transcripción (**Bentley, 1999; Maniatis & Reed, 2002**).

Para su buen funcionamiento el CTD consiste de 27 heptapéptidos repetidos en levaduras y de 52 en humanos, así como de un sitio específico de fosforilación y desfosforilación (**Dahmus, 1996; Cho y cols., 2001**), de ahí que se sugiera que puede haber una hipofosforilación durante el inicio de la transcripción y una hiperfosforilación durante la fase de elongación (**Misteli, 2000; Price, 2000**).

Anteriormente se pensaba que cuando el CTD sufría alguna deleción o era severamente mutilado, tanto la transcripción como la elongación se inhibían completamente. Sin

embargo recientemente se ha reportado que algunas deleciones en el sitio CTD no inactiva la transcripción, pero sí disminuye significativamente la eficiencia del procesamiento postranscripcional del pre-mRNA. En algunos estudios se ha sugerido que los dominios del CTD participan de forma individual en cada una de las diferentes etapas de la transcripción e incluso parece tener el tamaño y flexibilidad suficiente para interactuar con sus múltiples componentes (Maniatis & Reed, 2002).

El proceso de transcripción culmina con la mayoría de los diferentes RNAs (mRNA, rRNA, tRNA), y con la producción de una molécula precursora el pre-mRNA, el cual una vez que ha madurado, es exportado hacia el citoplasma para su traducción.

## **I.2. PROCESAMIENTO DEL PRE-MRNA**

El proceso de maduración del pre-mRNA involucra una serie de transformaciones que incluyen:

- i. encapuchamiento (*capping*) o mutilación del extremo 5'
- ii. *splicing* (eliminación de intrones y pegado de exones)
- iii. poliadenilación en el extremo 3'

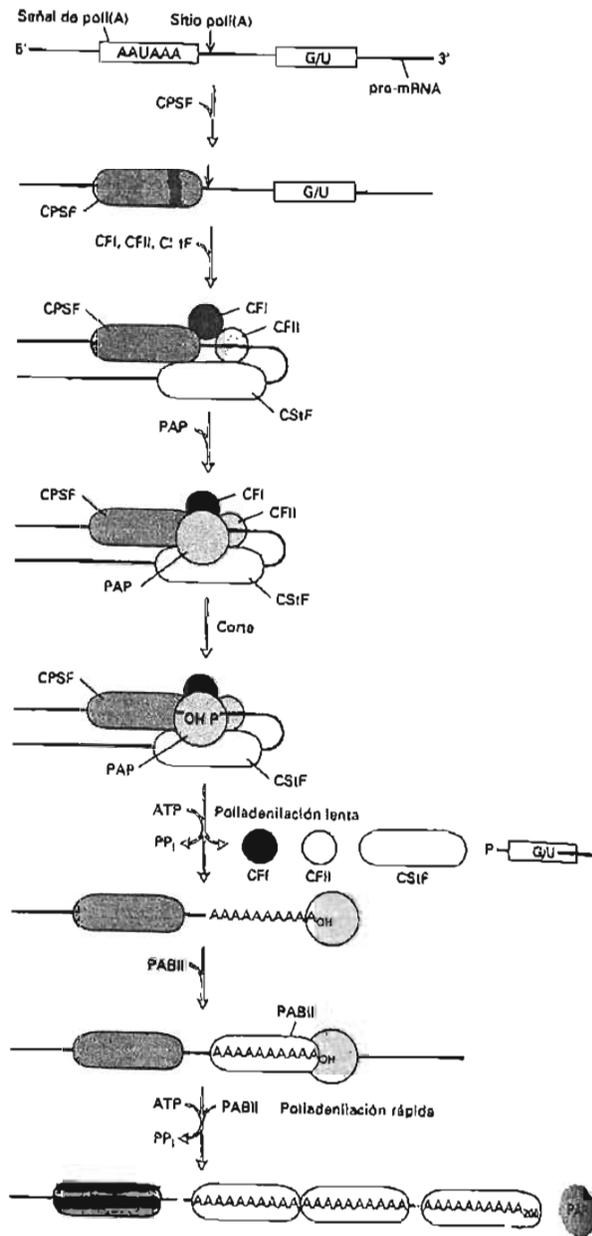
El *capping* toma lugar entre el inicio de la transcripción y el proceso de elongación, es decir cuando el pre-mRNA cuenta con sólo 20 a 40 nucleótidos de longitud.

Durante el inicio de la transcripción la serina-5 del heptapéptido repetido del CTD es fosforilado (Cho y cols., 2001; Trigon y cols., 1998). Esta fosforilación activa una cascada de eventos que promueven la disociación del CTD de los factores de inicio de la transcripción, el reclutamiento de la maquinaria del *capping* y el cambio alostérico de la enzima encapuchadora (Komarnitsky y cols., 2000; Schroeder y cols., 2000; Cho y cols., 1998). El proceso de desfosforilación de la serina 5 y la consecuente liberación de la enzima encapuchadora, promueven ahora la fosforilación de la serina-2, originando así el reclutamiento de los factores involucrados en los pasos restantes del procesamiento del RNA (Wada y cols., 1998; Kim & Sharp, 2001).

El *splicing* del pre-mRNA se encuentra también acoplado al proceso de **elongación** a través de interacciones entre la maquinaria del *splicing* y el factor de elongación de la

transcripción TAT-SF el cual se encuentra recluido por P-TEFb, que en células de mamífero actúa como una cinasa de la serina 2 del CTD.

La maquinaria de la **poliadenilación** se asocia a la de transcripción a través de interacciones entre el CTD y algunos de sus componentes. En células animales todos los mRNA, excepto los de las histonas, poseen una cola de poli(A) 3'. El modelo del proceso de poliadenilación (**ver fig.1**), nos indica que inicialmente un factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF) de 360 kDa, forma un complejo inestable con la señal de poli(A) rica en AU hacia 5'. Enseguida por lo menos tres proteínas adicionales, un heterotrímero llamado factor estimulador de la escisión (CStF), el factor de escisión I (CFI) y el factor de escisión II (CFII), se unen al complejo CPSF-RNA. La interacción entre el CStF y la señal poly(A) rica en GU o en U estabiliza el complejo multiproteico. Por último, una poli(A) polimerasa (PAP) se une al complejo antes de que pueda producirse el corte. Tras la escisión en el sitio de poli(A), la poliadenilación acontece en dos fases; la primera de ellas es estimulada por la PABII donde se da una adición lenta de los primeros 12 residuos de adenina; y la segunda donde la PAP promueve la polimerización rápida de hasta 200 a 250 de éste nucleótido.



**Fig. 1** Modelo de poliadenilación en el pre-RNA<sub>m</sub> de células de mamífero. El factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF) se une a una señal de poliadenilación AAUAAA. El CSIF interactúa con una secuencia rica en GU en 3'. La unión de poli(A) polimerasa (PAP) estimula el corte en poli(A). La unión de PABII a la cola corta de poli(A) inicial, acelera la velocidad de adición por la PAP. Después de 200-250 residuos de A añadidos, la PABII envía una señal a la PAP para que ésta detenga la polimerización (Modificado de Lodish y cols., 2000).

### 1.2.1. UsnRNPs

La compleja maquinaria macromolecular (spliceosoma) que cataliza el splicing del pre-mRNA, está formada de varias subunidades de ribonucleoproteínas (RNPs), llamadas UsnRNPs (pequeñas RNPs ricas en uridina) y numerosos factores de splicing del tipo no-snRNP. Cada partícula de UsnRNP consiste de una molécula de UsnRNA, complejada con un grupo de 7 proteínas Sm o Sm-like, más varias proteínas específicas. Las principales UsnRNPs spliceosomales U1, U2, U4, U5 y U6 son las responsables del splicing de la gran mayoría de los intrones tipo U2 del pre-mRNA. Hay otro grupo menos abundante de snRNPs U11, U12, U4atac y U6atac, que corta a los intrones tipo U12. Las UsnRNPs como lo veremos más adelante tienen una gran participación durante el proceso de splicing (Will & Lührmann, 2001).

La biogénesis de las UsnRNPs es un proceso complejo (ver fig. 2), que a la fecha no se ha esclarecido completamente. Los UsnRNAs, con excepción de U6 y U6atac, son transcritos por la RNA pol II como snRNAs con nucleótidos adicionales en el extremo 3' y una caperuza de m7GpppG (m7G-cap) en el extremo 5'. Los pre-UsnRNAs deben ser exportados al citoplasma para iniciar el proceso de ensamble. El proceso de exportación de U1, U2, U4 y U5 snRNAs es dependiente de varios factores que incluyen a la m7G-cap, el complejo de unión a la caperuza (CBC) conformado por dos proteínas de unión la CBP20 y CBP80 y, el adaptador PHAX (adaptador fosforilado para la exportación del RNA) que se une tanto al CBC como a los UsnRNAs (CBC/UsnRNAs) funcionando así como intermediario para su unión con el receptor de exportación CRM1/Exportina 1 (Xpo1). El CRM1 junto con Ran-GTP, exporta los UsnRNAs recién transcritos hacia el citoplasma (Hamm & Mattaj, 1990; Izaurrealde y cols., 1997). Para que este complejo de exportación sea activo es necesario la fosforilación de PHAX en el núcleo, y su subsecuente desfosforilación en el citoplasma con hidrólisis de GTP que promueva la señalización correcta en la salida del UsnRNA y la inactivación por desensamble del complejo de exportación. Ya en el citoplasma los UsnRNAs interaccionan de una forma ordenada con 7 proteínas Sm, B/B', D3, D2, D1, E, F, y G para formar una estructura core (complejo SMN –survival of motor neurons-).

Las proteínas Sm forman tres complejos heteroméricos (PuAU<sub>4-6</sub>GPu) distintos, antes de unirse al sitio Sm conservado de U1, U2, U4 y U5. Una vez que se ensambla el core de UsnRNP y proteínas Sm, el casco de m<sup>7</sup>G del snRNA es transformado a 2,2,7 trimetil guanosina (m<sup>3</sup>G) por una metil transferasa, lo que promueve la maduración del extremo 3' de los UsnRNAs.

Para la importación y ensamble de los UsnRNPs es necesaria una señal de localización nuclear (NLS) formada a partir de la caperuza m<sup>3</sup>G-cap y el dominio core de las proteínas Sm. La m<sup>3</sup>G-cap es reconocida específicamente por la Snurportina -1 la cual interactúa con la importina β. Adicionalmente parece ser que se requiere de otro factor de importación que interacciona con la NLS, pero su descripción y naturaleza molecular no ha sido aún identificada.

Los UsnRNAs son internamente modificados en varias regiones, primero por pseudouridinación y segundo por 2'-ortometilación. En el caso de U2 snRNP humano, es prerequisite que se den modificaciones post-transcripcionales para el ensamble de una partícula funcional. Lo que no se conoce es, si las modificaciones de U1, U2, U4 y U5 se realizan en el citoplasma o en el nucleoplasma. La asociación de proteínas específicas a las UsnRNPs complementa el proceso de biogénesis (Paushkin y cols., 2002; Will & Luhrmann, 2001). El complejo SMN no se libera de las UsnRNPs aún después de ensamblado el core de Sm, por lo que permanece presente durante y después de la hipermetilación de la caperuza, y hasta antes de su importación hacia el citoplasma. Por lo tanto, se piensa que dicho complejo está también involucrado en la biogénesis del core de las snRNPs en el citoplasma (**ver fig.2**).

La atrofia espinal muscular es una enfermedad neurodegenerativa letal que resulta de mutaciones ó deficiencia en la función del complejo SMN. En estudios recientes se presentan evidencias de que los cuerpos de Cajal participan activamente en el control de la producción y/o transporte de las snRNP (Gall, 2000 & Melki, 1997).

Para el caso del **U6snRNA**, se sabe que es transcrito por la RNA pol III y adquiere una caperuza γ-monometil; además se cree que el ensamble de U6 se realiza totalmente en el núcleo celular. El U6 snRNA carece de un sitio Sm, por lo que la síntesis del U6 snRNP involucra la asociación de 7 proteínas LSm (Like Sm) LSm2, LSm3, LSm4, LSm5, LSm6, LSm7, LSm8, un tracto de uridinas en 3' y el U6 snRNA (He & Parker, 2000).

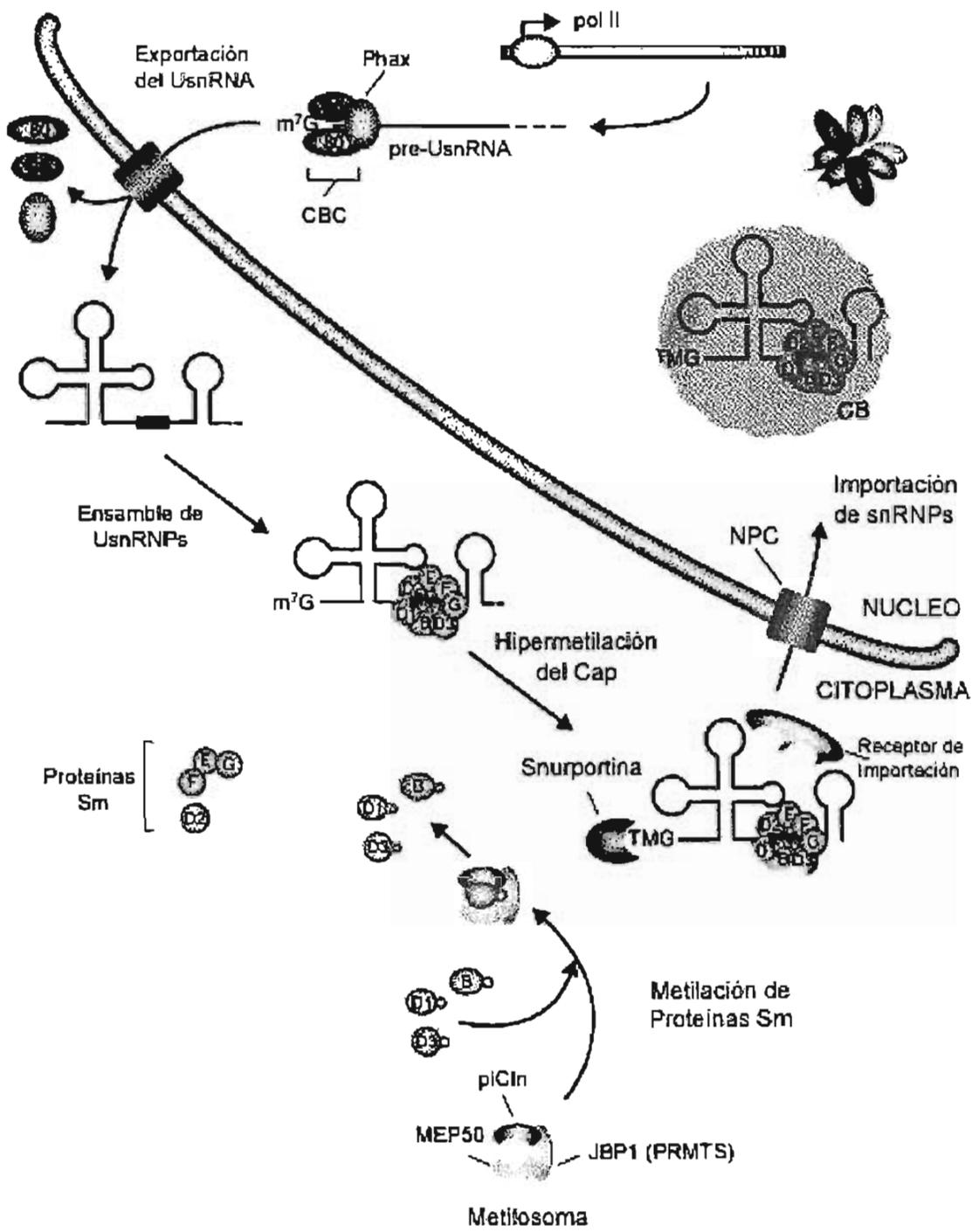


Fig. 2 Representación esquemática de la biogénesis de las UsnRNPs. Los UsnRNAs, con excepción de U6 y U6atac, son transcritos por la RNA pol II como snRNAs con nucleótidos adicionales en el extremo 3' y una caperuzas de m<sup>7</sup>GpppG (m<sup>7</sup>G-cap) en el extremo 5'. Los pre-UsnRNAs deben ser exportados al citoplasma para iniciar el proceso de ensamble (Modificado de Paushkin y cols. 2002.)

## **1.2.2. ORGANIZACIÓN CELULAR DE LAS snRNPs**

Las snRNPs se encuentran organizadas con una distribución específica dentro del núcleo, conformando lo que se conoce como patrón moteado *-speckles-* (Spector y cols., 1983). Estudios realizados con microscopía electrónica e inmunofluorescencia usando anticuerpos dirigidos a los snRNPs y a SC-35 (complejo *spliceosomal* 35), demostraron que el patrón moteado corresponde a estructuras llamadas gránulos intercromatinianos y fibrillas pericromatinianas (Spector y cols., 1983; Fakan y cols., 1984; Puvion y cols., 1984; Spector, 1990; Spector y cols., 1991, Lamond & Spector, 2003).

En ensayos de inmunolocalización el uso de anticuerpos dirigidos a las proteínas Sm han mostrado a las snRNPs a nivel nuclear como un patrón moteado y difuso a la vez. Se dice que la región brillante o moteada, corresponde a la interacción de las snRNPs con estructuras subnucleares que incluyen principalmente cúmulos de gránulos intercromatinianos, fibrillas pericromatinianas y cuerpos de Cajal. En cuanto a la región difusa nucleoplasmica se cree que corresponden a las snRNPs que se encuentran involucradas de forma activa en el proceso de *splicing* de los transcritos tempranos (Sleeman & Lamond, 1999).

## **1.2.3. PROTEÍNAS SR**

### ***a). Estructura***

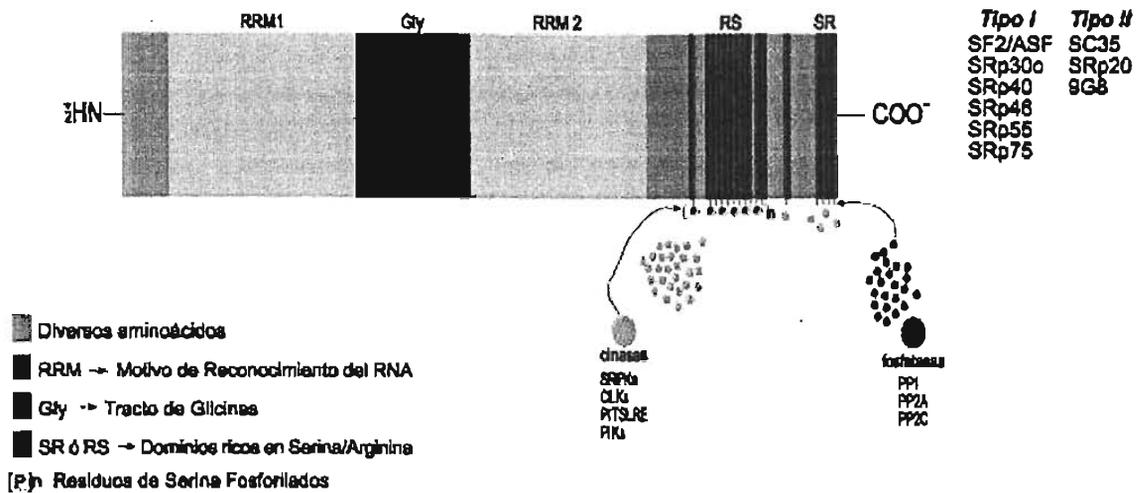
Las proteínas SR (Serina-Arginina) son una familia de factores nucleares que participan en el *splicing* del pre-mRNA. Es un grupo de proteínas (ver fig. 3), altamente conservadas desde los metazoarios (Manley & Tacke 1996), son caracterizadas por la presencia de una o dos copias de motivos de reconocimiento al RNA (RRM) y un dominio carboxilo terminal rico en residuos de serina y arginina (dominio RS). Son proteínas relacionadas entre sí por su arreglo característico de sus dominios, por su similitud en sus secuencias y por sus actividades bioquímicas semejantes. Las proteínas SR interactúan con el pre-mRNA durante las etapas tempranas de ensamble del *spliceosoma* y estimulan la unión de las partículas snRNPs U1 al sitio de corte 5' y de U2AF al sitio de corte 3' (Cáceres y cols., 1997). De acuerdo con su estructura se dividen en 2 grupos: SF2/ASF y SC35.

### ***b). Grupo SF2/ASF***

SF2/ASF es una proteína de 28kDa que en ensayos *in vitro*, muestra una actividad esencial en el *splicing* constitutivo del pre-mRNA; además, se ha observado que la concentración de dicho factor influye en la selección del sitio de corte.

SF2/ASF es una proteína de 248 aminoácidos, dos motivos de RRM separados por una bisagra rica en glicinas y un dominio carboxilo terminal rico en argininas y serinas (ver fig.3).

El primer RRM situado en el extremo amino terminal, es una región altamente conservada de aproximadamente 80 AA, la cual está presente con una o varias copias dentro de las grandes familias de proteínas de unión al RNA, muchas de las cuales están involucradas en el procesamiento del pre-mRNA y del pre-rRNA, tal es el caso de los snRNPs, de las proteínas hnRNP y de la proteína de unión a la cola poly-A. El segundo dominio RRM de SF2/ASF es atípico, y muestra poca conservación en su secuencia, incluye un heptapéptido constante (SWQDLKD) que constituye una característica única para ésta clase de proteínas. Por el extremo carboxilo se encuentra un dominio rico en argininas y serinas (RS ó SR) con una periodicidad característica. Mientras que el RRM amino terminal y el dominio RS son esenciales para la actividad del *splicing* constitutivo, el dominio RS es indispensable para el *splicing* alternativo *in vitro*. Adicionalmente se ha reportado que RRM1 y RRM2 sinergizan el efecto de unión al RNA (Cáceres & Krainer, 1993).



**Fig 3** Modelo estructural de una proteína SR del grupo SF2/ASF. Participan activamente en las interacciones entre el pre-RNA y el spliceosoma (Tomado tesis M. en C. Lara-Martínez R. 2003).

### c). Grupo SC-35

La descripción del factor de *splicing* SC-35 (componente *spliceosomal* 35) se obtuvo gracias a la purificación de un anticuerpo monoclonal dirigido a una fracción proteica del *spliceosoma* de mamíferos. SC-35 es requerido para el ensamble del *spliceosoma* de mamíferos y fue localizado en la región moteada del nucleoplasma (Fu & Maniatis, 1990; Spector y cols., 1991).

El gene SC35/PR264 se encuentra altamente conservado en pollo y humanos (Fu & Maniatis, 1992), y codifica para tres isoformas de mRNA transcritos por procesos de *splicing* alternativo.

SC-35 tiene un solo motivo de reconocimiento al RNA (RRM) en el extremo amino terminal y un dominio RS en el extremo carboxilo (Graveley, 2000). SF2/ASF y SC-35 guardan sólo un 31% de identidad en su secuencia de aminoácidos, sin embargo ambos presentan actividades similares en ensayos *in vitro* (Fu & Maniatis, 1992).

### d). Función

El ensamble del *spliceosoma* es en parte facilitado por el grupo de proteínas SR. Los motivos RRM participan en la unión con el RNA, determinan y promueven la especificidad

de cada una de las proteínas SR y sus dominios son requeridos para las interacciones proteína-proteína.

Las proteínas SR se acumulan sustancialmente en las estructuras nucleares conocidas como *speckles*; Las cuales funcionan como sitios de almacén y/o de reciclaje para los diferentes factores de *splicing* (Misteli & Spector, 1998). En ensayos de cotransfección publicados por Cáceres y cols. (Cáceres y cols., 1997), mostraron evidencias de que los dominios RS tienen capacidades diferentes para dirigir la localización de las proteínas SR en las *speckles*. Estos mismos autores también reportaron que algunas proteínas SR, pero no todas, tienen la capacidad de “brincar” del núcleo al citoplasma y viceversa.

En mamíferos las proteínas SR participan en los procesos de *splicing* constitutivo y alternativo, identificándose al menos 10 diferentes proteínas SR en el complejo del *spliceosoma* humano, y ninguna en el grupo de las levaduras (Fu, 1995; Tacke & Manley, 1999; Graveley, 2000). Por otro lado el proceso de *splicing* se ve favorecido por el reconocimiento del grupo de proteínas SR sobre los sitios “enhancers” contenidos en los exones (ESEs) del pre-mRNA (Blencowe, 2000). De igual forma se puede ver reprimido por interacciones con elementos o sitios conocidos como silenciadores (Tacke & Manley, 1999).

Adicionalmente, el alto grado de degeneración en los motivos de reconocimiento al RNA de las proteínas SR, pueden provocar uniones traslapadas, así que la especificidad de unión la confiere las diferentes afinidades entre dichas proteínas y las demás moléculas participantes (Hastings & Krainer, 2001).

Algunos reportes previos demostraron que el dominio SR del grupo SF2/ASF es necesario para el *splicing* constitutivo *in vitro*, y para la viabilidad celular *in vivo* (Graveley, 2000). Sin embargo, un estudio del año 2000 (Zhu & Krainer, 2000) reportó que dicho dominio no es requerido para el *splicing in vitro* de todos los pre-mRNA.

#### **I.2.4. ACOPLAMIENTO DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN AL *SPLICING***

El proceso de *splicing* está acoplado al de elongación por las interacciones entre la maquinaria del *splicing* y el factor de elongación TAT-SF1, el cual es activado por el

factor P-TEFb que promueve el reclutamiento de los factores de *splicing* en el pre-mRNA. Adicionalmente el factor de elongación TFIIS, muestra su alta capacidad de asociación con un complejo de alto peso molecular contenido en la RNA pol II y en varios de los factores de *splicing* (Robert y cols., 2002).

Los pre-mRNA producidos por la transcripción de la polimerasa II, contienen secuencias conservadas en el sitio de corte 5' y otra cercana al sitio de corte 3' llamada "branch point" o "punto de separación". Estas secuencias conservadas son reconocidas por las snRNPs y las no-snRNPs ya que ambas se ensamblan sobre el pre-mRNA para formar el *spliceosoma*. Existen evidencias donde demuestran que el proceso de *splicing* está perfectamente acoplado con la transcripción (ver fig. 4), tal es el caso de las interacciones físicas y funcionales entre el complejo de preiniciación y la familia de las proteínas SR de las cuales los residuos de serina y arginina se unen específicamente a las secuencias exónicas, conocidas como "enhancers" de *splicing* lo que hace que se recluyan a la maquinaria de transcripción. El coactivador PGC-1 es un ejemplo de proteína similar a las SR, que participa en el acoplamiento entre el *splicing* y la transcripción, contiene un dominio RS y un dominio de unión al RNA, el cual es recluido y activado por PPAR $\gamma$  y otros receptores nucleares. La proteína PGC-1 colocaliza con los factores de *splicing* en el núcleo e interactúa directamente con las proteínas SR *in vitro*. La proximidad de estas proteínas al pre-RNA naciente durante la transcripción es lo que puede promover el inicio del proceso de *splicing*.

Los mRNAs son transportados del núcleo al citoplasma por una maquinaria conservada desde las levaduras a los seres humanos, la cual está acoplada tanto física como funcionalmente a la factoría del *splicing* del pre-RNA. Como ya es bien sabido durante la expresión de genes codificadores de proteínas, los pre-mRNAs son transcritos en el núcleo y realizan varios pasos de procesamiento, que incluyen el *capping*, *splicing* y *poliadenilación*, originando un mRNA maduro que es entonces transportado al citoplasma por un complejo de poro nuclear (CPN). Durante el proceso de la expresión de genes, se sabe de la existencia de verdaderas fábricas que controlan dicho proceso, en las cuales se encuentran acopladas a diferentes maquinarias.

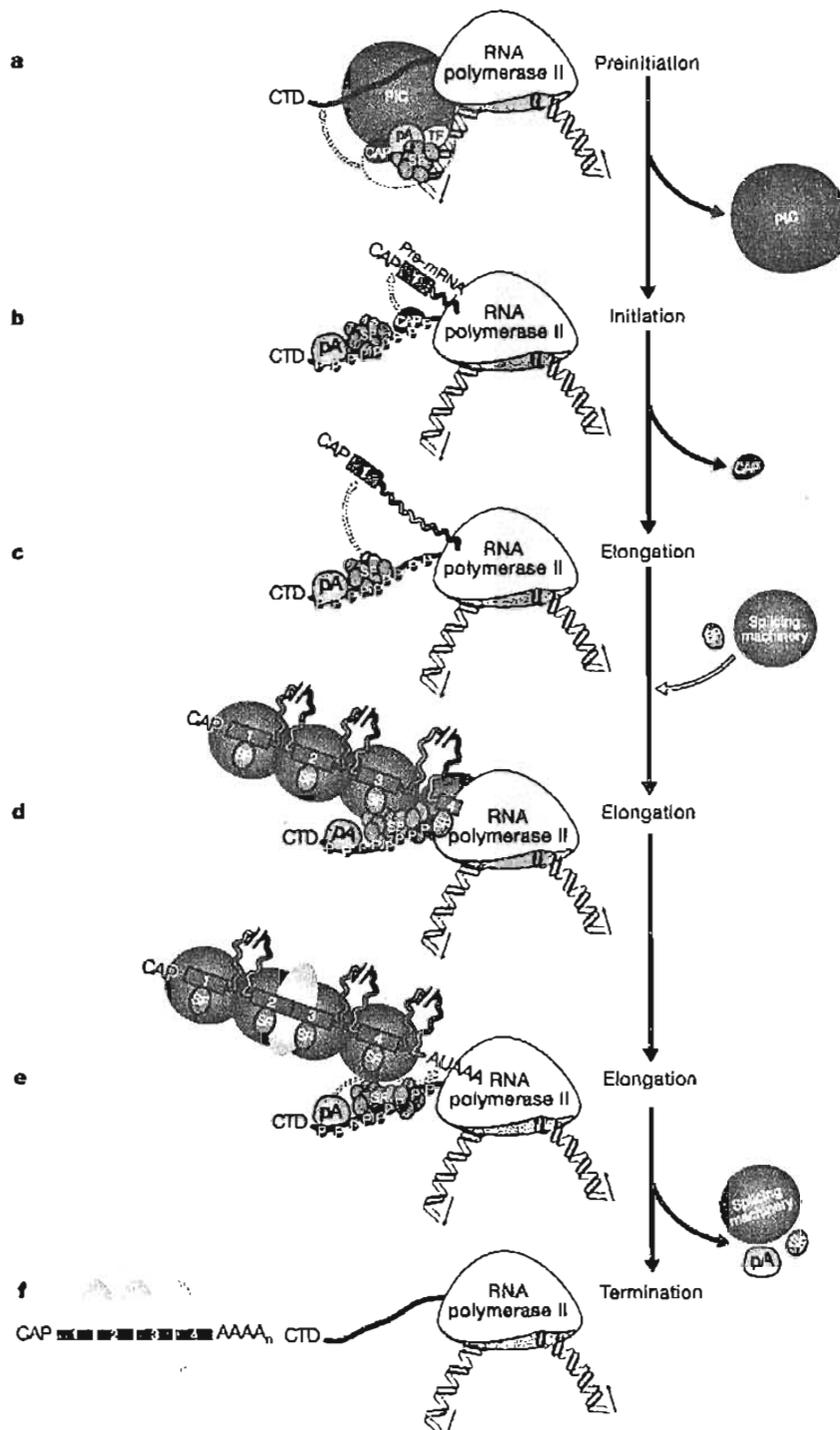


Fig. 4 Diagrama de acoplamiento de las diferentes etapas del proceso de la expresión génica. Se muestran las maquinarias involucradas en la transcripción, capping, splicing y poliadenilación. Los oвалos naranjas sobre los exones cortados representan los mRNA formados durante el splicing. PIC, complejo de preiniciación; TF, factores de transcripción; CTD, dominio terminal carboxilo; CAP, factor de encapsamiento; SF, factores de splicing; pA, factor de poliadenilación; P CTD fosforilado (Modificado de Maniatis & Reed 2002).

### **I.2.5. ACOPLAMIENTO DEL SPLICING AL MECANISMO DE EXPORTACIÓN DEL MRNA**

Este proceso involucra el reclutamiento del factor de exportación Aly con la proteína spliceosomal UAP56. Tanto en *Saccharomyces cerevisiae* como en metazoarios, Aly interactúa directamente con Tap, la cual junto con su proteína de unión p15 se asocia con las proteínas del CPN y formar así un receptor de exportación general de mRNA (**ver fig. 5**). Estos y otros estudios nos indican que existe una maquinaria conservada para la exportación del RNAm. Recientemente se publicó que en el grupo de los metazoarios la maquinaria de exportación UAP/Aly/Tap y otros componentes de las mRNP están específicamente recluidos a 20 nucleótidos río arriba de las uniones exon-exon (EJC) formando un gran complejo, que además contiene varias proteínas involucradas en la degradación de los mRNAs con codones de paro (stop) prematuros y, que participa de forma activa en el metabolismo del mRNA. Este mismo grupo de investigadores también describió el mecanismo de unión del EJC, en el cual mencionan la participación de 9 proteínas que interactúan con el extremo 5' exónico, y que durante el proceso de unión intervienen las proteínas p170, p95, p57, el complejo Aly y un miembro de la familia de las proteínas SR, la SRp20 (**Reichert y cols., 2002, Reed, 2003**). Una vez formado el EJC, éste solamente adquiere la capacidad de asociarse con los mRNAs que están unidos a la proteína cap (CBP80) en el núcleo, pero no con los que se encuentran unidos con la proteína cap citoplásmica (eIF4E).

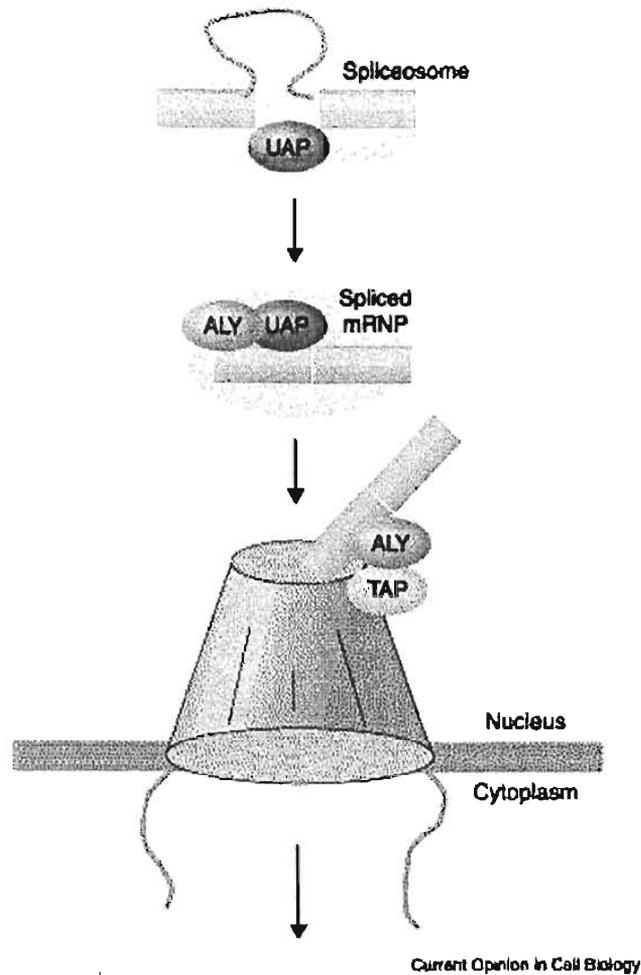


Fig. 5 Maquinaria de exportación del RNAm acoplada al proceso de splicing. UAP56 el cual está presente en el spliceosoma recluye a Aly durante el splicing (Tomada de Reed R. 2003).

### I.2.6. PROCESO DE *SPLICING*

El *splicing* del pre-mRNA se realiza en el núcleo mediante un proceso de doble transesterificación (ver fig. 6) dependiente de energía. Durante el primer paso del *splicing*, un residuo de adenosina, localizado cerca del extremo terminal 3' del intron y dentro de la región *branchpoint*, inicia un ataque nucleofílico al sitio de corte 5', esta reacción genera dos intermediarios, un exon 1 libre y un exon 2 en forma de lazo. En el paso dos, el exon 1 ataca el sitio de corte 3' originando los productos finales del *splicing*, el exon cortado y el

intron en forma de lazo. Este proceso de dos pasos se realiza en la estructura llamada *spliceosoma* (Reed, 2000). El *spliceosoma* es un complejo conformado por un gran grupo de componentes que incluyen las partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares o UsnRNPs (U1, U2, U4/U6 y U5), los polipéptidos que forman las hnRNPs y finalmente un gran número de factores que no forman UsnRNPs pero que son esenciales en dicho proceso (Lewin, 2000); de éstas últimas, la mayoría pertenece al grupo de proteínas de la familia SR; sin embargo, a la fecha el total de proteínas que constituye un *spliceosoma* funcional no ha sido determinado.

La precisión y eficiencia del proceso de *splicing* es atribuida a varios elementos de secuencia tipo cis y a factores trans-actantes; entre estos últimos se incluyen a los UsnRNPs *spliceosomales* y a una multitud de factores de *splicing*, los cuales tienen contacto específico y dinámico con los elementos cis del pre-RNA<sub>m</sub>. Los elementos cis incluyen secuencias consenso en los sitios de corte 5' y 3', el punto de bifurcación, el tracto de polipirimidinas, los elementos enhancer y una secuencia silenciadora (Miriami y cols., 2002).

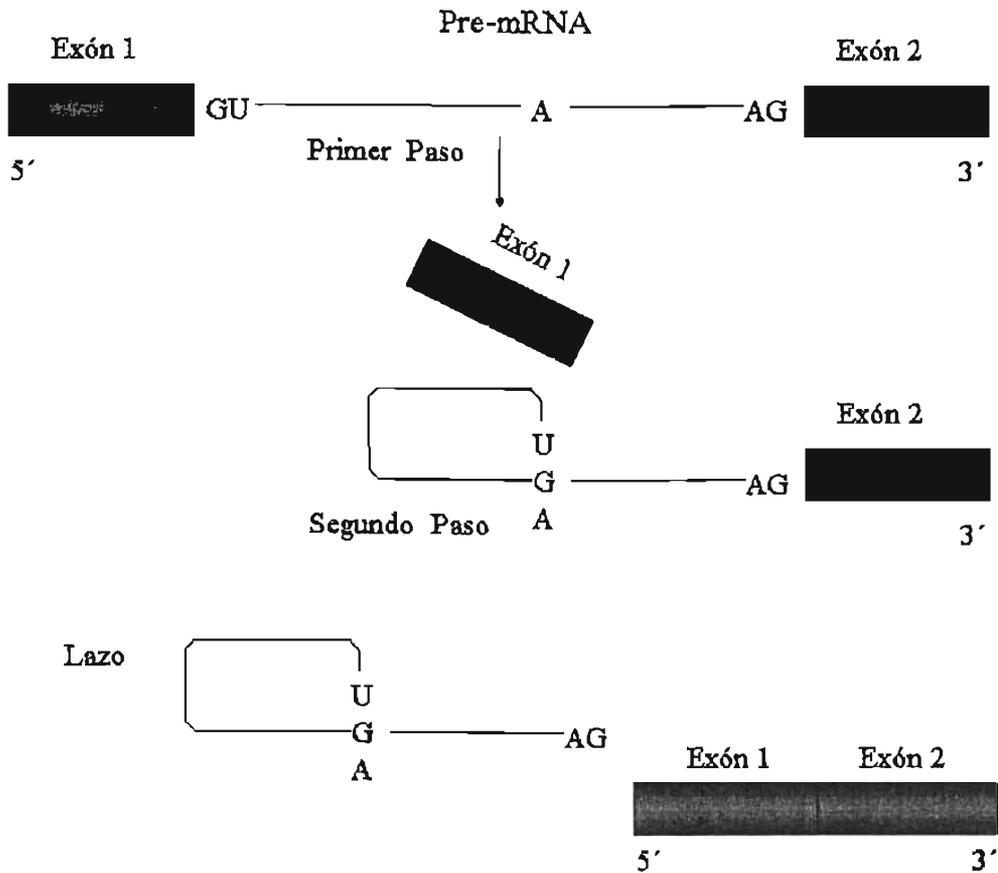


FIG. 6 Diagrama del procesamiento o *splicing* del pre-mRNA (Tomado de Cortés-Hermosillo 2003).

### 1.2.7. MODELO DE ENSAMBLADO DEL *SPLICEOSOMA*

El *spliceosoma* es una estructura dinámica que origina múltiples cambios conformacionales y estados de ensamble y desensamble durante el proceso de *splicing*. La maquinaria de dicho proceso es altamente conservada desde *S. cerevisiae* hasta los mamíferos. De un total de 145 proteínas humanas asociadas al *spliceosoma*, a la fecha sólo 90 han sido bien identificadas (Zhou y cols., 2002)

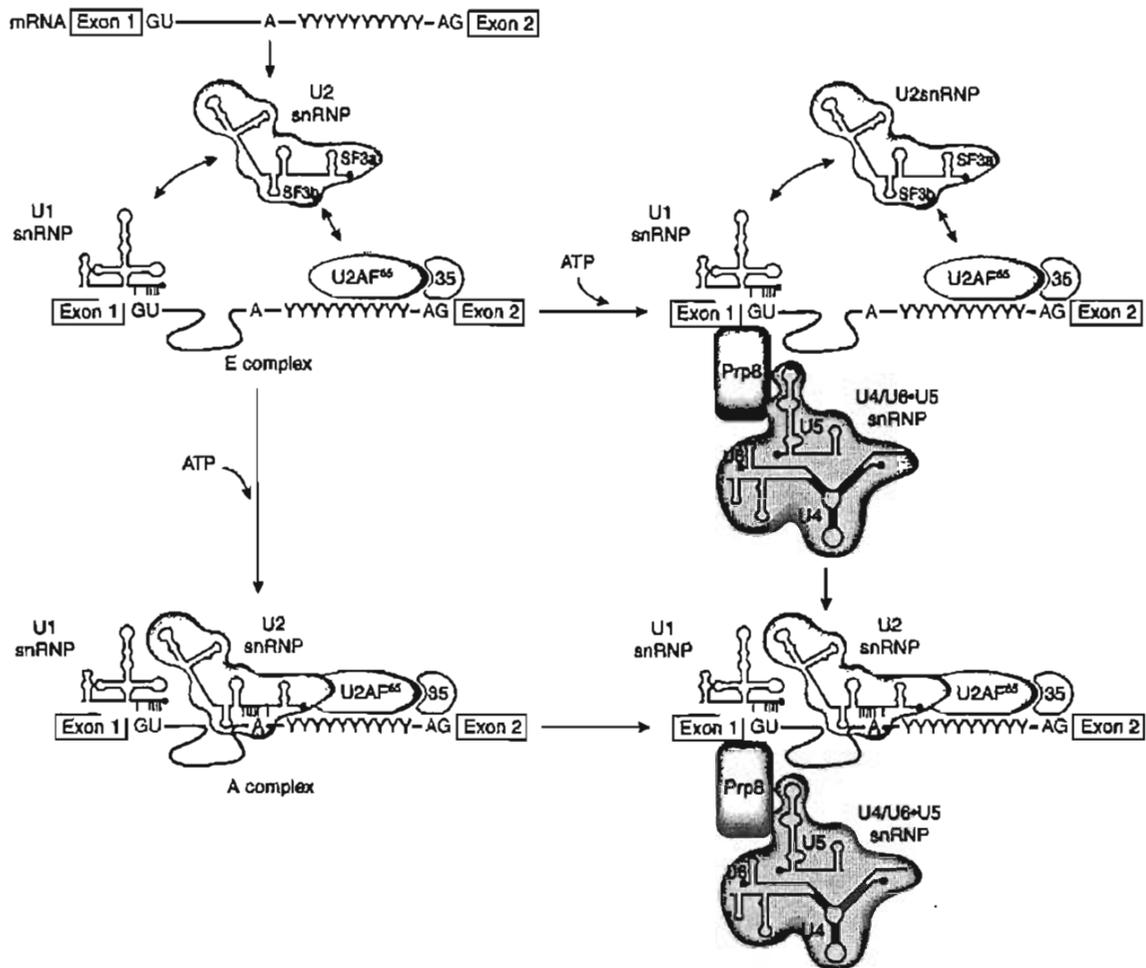
La mayoría de las proteínas específicas de metazoarios participan en el reconocimiento y unión de los exones. El ejemplo mejor caracterizado es el de la familia de las proteínas SR, las cuales comprenden al menos 10 proteínas en el *spliceosoma* humano, pero ninguna en

levaduras. Las proteínas SR son requeridas tanto para el reconocimiento del sitio de corte como para el *splicing* alternativo (Fu, 1995; Graveley 2000; Tacke & Manley, 1999).

El *spliceosoma* actúa sobre los diferentes tipos de uniones entre RNA-RNA, RNA-proteína y proteína-proteína, cortando y uniendo de forma ordenada y precisa los intrones y los exones (Hastings & Krainer, 2001).

Para un *splicing* eficiente, la mayoría de los intrones requieren de un sitio de corte 5' (5'ss) conservado, una secuencia de ramificación ó separación conocida como branch point (BPS), una extensión de polipirimidinas y finalmente, un sitio de corte 3' (3'ss). Como ya lo hemos mencionado, el ensamble del *spliceosoma* sobre el pre-mRNA es un proceso ordenado con la participación de diferentes intermediarios.

Inicialmente se forma el **complejo E**, el cual involucra el reconocimiento del sitio 5'ss por U1, así como la asociación y apareo de factores no-snRNPs como lo son las proteínas SR y un factor auxiliar denominado U2 (U2AF) el cual se une a la región de polipirimidinas y al 3'ss. Enseguida se da un apareo de bases entre U2 snRNA y la secuencia de ramificación (BPS), dando lugar a la formación del **complejo A**, siendo éste último evento ATP dependiente. De forma subsiguiente se produce una asociación entre U4/U6 y U5 con el pre-mRNA formando el **complejo B** para finalmente originar el **complejo C** que nace del remodelamiento de las uniones RNA-RNA y RNA-proteína creando así el *spliceosoma* con actividad catalítica.



Current Opinion in Cell Biology

**Fig. 7** Ensamble del spliceosoma. En el complejo E, en una reacción ATP-independiente U1 se une al sitio 5' (GU) y U2 lo hace cerca del 3' (AG) del pre-RNA<sub>m</sub>, tal vez por interacción entre SF3b y el heterodímero U2AF y/o U1 originando el complejo A. En una reacción ATP-dependiente el trimero U4/U6-U5 se une a la región 5' con interacciones parciales entre Prp8 y el pre-RNA<sub>m</sub>, finalmente U2 se une al BPS de forma muy estable (Tomado de Hastings & Krainer 2001).

De forma más detallada (**ver fig. 7**), primero el U1 snRNP reconoce las secuencias en el sitio de corte 5' sobre el pre-mRNA. Segundo, el U2 snRNP se une a la región de ramificación, para que automáticamente se asocie el complejo pre-ensamblado de U4/U6/U5, donde específicamente U5 interacciona con los extremos 5' y 3' de los exones, por lo que la asociación con U1 es desestabilizada, U5 se une a la terminal 5' del intrón y la hélice conformada por U4/U6 se desaparece parcialmente favoreciendo la asociación de U6 con U2 formando el complejo U2/U4/U6. Finalmente U4 se desprende del complejo

dejando solamente a U2/U6 unido al sitio de ramificación por el lado de U2 y U6 queda asociado al extremo 5' del intrón. Así el complejo U2/U6-pre-mRNA es el que presumiblemente actúa como sitio activo del *spliceosoma*.

Además de los snRNPs, un gran número de factores proteicos son requeridos para el ensamble del *spliceosoma* y para el *splicing*. Así tenemos que los factores proteicos U2AF (Ruskin y cols., 1988; Zamore & Green, 1989) SF1 y SF3 (Krämer & Utans, 1991) son requeridos para la unión de U2 con el sitio de separación del intrón. Otros dos factores no-snRNP, SF2/ASF (Krainer y cols., 1990) y SC-35 (Fu & Maniatis, 1990; Spector y cols., 1991) son necesarios para el inicio del *splicing* y el ensamble del *spliceosoma*, además de estar involucrados en la selección del sitio de corte 5' del proceso de *splicing* alternativo (Ge & Manley, 1990; Krainer y cols., 1990; Fu & Maniatis, 1992).

En estudios *in vivo* se ha descrito que no todos los factores de *splicing* se encuentran siempre unidos al pre-mRNA y ensamblados en el *spliceosoma* de forma activa; por lo que el uso de anticuerpos dirigidos a algún factor de *splicing* en ensayos de inmunolocalización no sólo son capaces de detectar al *spliceosoma* en los sitios de *splicing*, sí no que también lo pueden hacer sobre alguno de los componentes del proceso de ensamble, transporte o almacén del *spliceosoma*.

## **I.3. ORGANIZACIÓN NUCLEAR**

### **I.3.1. NÚCLEO**

El núcleo fue la primera estructura intracelular descrita, cuya presencia en la célula fue generalizada por Robert Brown (en Harris, 1999). Hay dos aspectos fundamentales de la arquitectura nuclear, que son esenciales para el entendimiento de su función. Primero, el núcleo contiene distintos subcompartimientos; y segundo, el núcleo es un orgánulo altamente dinámico (Dundr & Misteli 2001). El compartimiento nuclear mejor conocido es el nucléolo, sitio en el cual se lleva a cabo la síntesis del rRNA.

Estructuralmente, el núcleo es un compartimiento celular limitado por una cisterna interrumpida por poros, que contiene el material genético constituido por el ácido desoxirribonucleico (DNA), los componentes necesarios para la síntesis y procesamiento del RNA y eventualmente para la duplicación del DNA (en Vázquez-Nin y cols., 2003).

Una de las principales diferencias que existen entre los orgánulos citoplasmáticos y los compartimientos nucleares, es que éstos últimos no cuentan con una membrana bien definida, lo que ha causado dudas sobre su formación y mantenimiento *in vivo*. Una de las hipótesis que se maneja para darle explicación a dicha cuestión es que las proteínas contenidas en los diferentes compartimientos se encuentran en constantes procesos de asociación y disociación lo que les confiere un flujo continuo. Por ejemplo se calcula que para el factor de *splicing* SF2/ASF el tiempo de residencia en los SFCs (compartimientos de factores de *splicing*), no va más allá de los 45 segundos, y que al menos 10 000 moléculas de dicho factor se pierden por segundo en cada célula, lo cual da como resultado un recambio total de factores en tan sólo dos minutos. Estas observaciones correlacionan con el proceso de auto-ensamble en el cual las proteínas interactúan una con otra, lo que se traduce en formación de estructuras bien definidas (Phair & Misteli, 2000).

La presencia de diferentes compartimientos dentro del núcleo, y el total desconocimiento en la organización de la gran multitud de componentes que participan en los procesos nucleares, es que presupone la existencia de una matriz nuclear aunque a la fecha sólo se trata de una hipótesis de gran controversia (Nickerson, 2001).

En estudios con microscopía de fluorescencia se ha demostrado la presencia de estructuras nucleares bien definidas, entre las que destacan las *speckles*, las *paraspeckles*, el nucléolo, los cuerpos de Cajal, *gems* y los cuerpos de leucemia promielocítica (PML). De estas estructuras, las *speckles* se han asociado al metabolismo del pre-mRNA.

### **I.3.2. SPECKLES**

El término *speckle* fue acuñado inicialmente en 1961 por J. Swanson Beck cuando hizo estudios de inmunoreactividad sobre tejido de hígado de rata y suero de individuos con enfermedades autoinmunes (Beck, 1961).

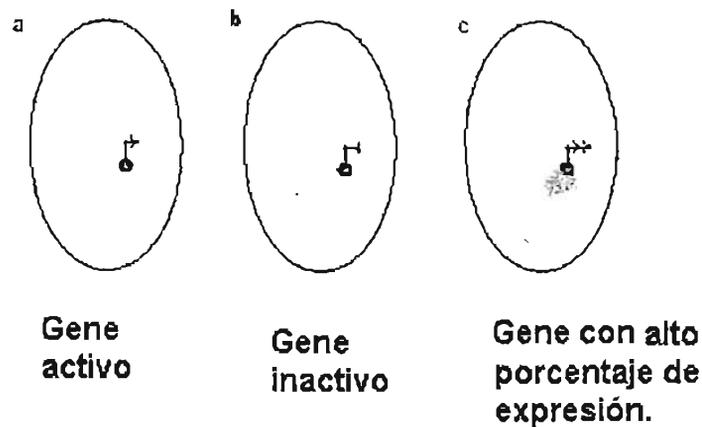
El primer enlace entre el *splicing* del pre-mRNA y las *speckles* fue a partir del uso de anticuerpos específicos a los factores de *splicing* para determinar la distribución de los snRNPs (Lerner y cols., 1981; Spector y cols., 1983). Las *speckles* o motas, que actualmente se le conocen también como compartimientos de factores de *splicing* (SFCs) (Spector, 1993) ocupan aproximadamente el 20% del espacio nuclear y se definieron así por su alto contenido de factores de *splicing* (Spector y cols., 1991), además de varias

cinasas, CLK/STY, PRP4 y PSKH1, y fosfatasas PP1 que regulan los mecanismos de fosforilación y desfosforilación de la maquinaria del *splicing* (Lamond & Spector 2003). Las *speckles* son estructuras dinámicas, las cuales pueden variar en tamaño, forma y número de acuerdo a los niveles de expresión de genes y a la capacidad de respuesta a señales metabólicas; así pues, existen estudios donde se bloqueo el proceso de transcripción, inhibiendo la actividad de la RNA pol II con  $\alpha$ -amanitina, lo que originó un reclutamiento de factores de *splicing*, creando un grupo de motas más largas y más redondas (Carmo-Fonseca y cols., 1992; Spector y cols., 1993, Misteli y cols., 1997), haciendo suponer que las *speckles* no son directamente sitios de *splicing*, si no mas bien sitios de almacén, ensamble y modificadores de los factores de *splicing*. En contraste cuando se incrementó la expresión de genes con gran número de intrones, o cuando se promovió la transcripción como en el caso de una infección viral, se redujo la cantidad de factores de *splicing* en las *speckles* y se redistribuyeron en sitios nucleoplasmáticos de una forma difusa. Así que, se dice que los componentes de las *speckles* pueden estar en continuo recambio con los sitios de genes activos (Lamond & Spector 2003). Se cree que una de las funciones de las *speckles* o de los SFC es participar en los sitios de ensamble de la maquinaria de la transcripción, además de ser sitios de almacén que regulan el reciclaje y la concentración de los factores de *splicing*.

En el año 2000 Mintz y Spector reportaron que las *speckles* se encuentran compartamentalizadas en numerosos subdominios denominadas *subspeckles*, en las cuales encontraron la presencia de proteínas SR, snRNPs y una proteína procesadora del extremo 3' (PABII), lo que los hizo concluir, que las *speckles* mantienen un alto grado de organización y que participan de forma activa en los sitios de transcripción.

Existen algunos estudios que nos indican los diferentes cambios que se producen durante el proceso de la transcripción (ver fig. 8), tal es el caso de la redistribución de los factores de *splicing*, cuando se infectan células con un agente viral, se produce una gran cantidad de transcritos, lo que origina un reclutamiento de los factores de *splicing* a los sitios de transcripción y *splicing* viral (Bridge y cols., 1993; Jiménez-García & Spector 1993). Por el contrario, el tratamiento de las células con choque térmico y/o con inhibidores de la transcripción, causa el reclutamiento de los factores de *splicing* en los SFCs y por ende

incrementan su tamaño, en este caso los genes son típicamente encontrados a gran distancia (Spector y cols., 1991; Melcak y cols., 2000). En estudios hechos *in vivo* por microscopía tiempo-pausa, se demostró que los factores de *splicing* pueden ser recluidos de los SFCs a los sitios de transcripción, visualizando los factores de *splicing* del pre-mRNA de forma directa (Misteli y cols., 1997). Estas evidencias y otras más indican que los factores de *splicing* pueden ser recluidos de los SFCs a los sitios de transcripción *in vivo* lo que sugiere que estos compartimientos pueden funcionar como sitios de ensamblaje y de almacén de los componentes del *spliceosoma*.

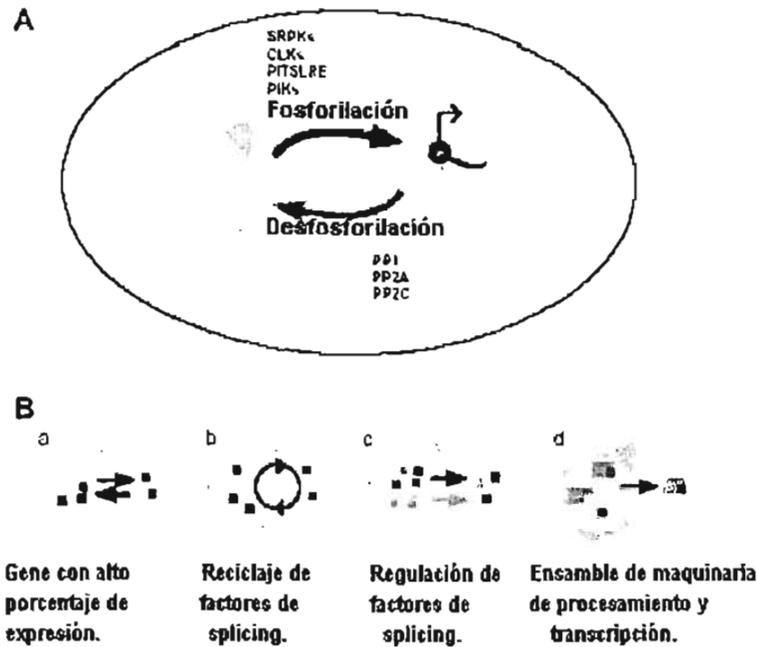


**Fig.8** Posición relativa de los sitios de transcripción y de los SFC. (a) La mayoría de los genes activos se asocian a la periferia de los SFC. (b) Cuando se inhibe la transcripción los factores de *splicing* se acumulan los SFC se alargan y redondean y el gene se aleja de la *speckle*. (c) Los RNAs no procesados de genes activos o de genes que contienen grandes cantidades de intrones, pueden ser liberados de los sitios de transcripción y moverse hacia los SFC. (Modificada de Misteli 2000).

Partiendo de la idea de que los SFCs son los sitios blanco para el proceso de la transcripción, la pregunta inminente es ¿qué señales o mecanismos se despliegan para activar dichos compartimientos?

Gracias a la descripción de una protein-kinasa llamada SRPK-1 (proteína SR cinasa-1) con capacidad de fosforilar solamente a las proteínas SR y de activarse al inicio de la fase de mitosis (M) del ciclo celular, es que se pudo presuponer un posible mecanismo de liberación por fosforilación de los factores de *splicing* y por ende el desensamblaje de los SFCs (Gui y cols., 1994). Gracias a trabajos hechos con células vivas y microscopía

tiempo-pausa, se demostró que la liberación de los factores de *splicing* de los SFCs se veía bloqueada en presencia de inhibidores de cinasas (Misteli & Spector 1997); de esta forma se sugiere que la distribución de los factores de *splicing* es controlada por ciclos de fosforilación y desfosforilación (ver fig. 9).



**Fig. 9 (A)** Mecanismos de localización de los F. de splicing. La fosforilación y la desfosforilación de las proteínas SR es obligada para el reclutamiento y liberación de los SFC. **(B)** Funciones de los SFC. (a) Control de la cantidad de F. de splicing en el nucleoplasma optimiza eficiencia de splicing. (b) Reciclaje de los F. de splicing. (c) Control de la relación relativa de los F. de splicing en el nucleoplasma para modular la selección del sitio de corte. (d) Sitio de ensamble de complejos proteicos que contiene componentes de la maquinaria de procesamiento y transcripción del RNA y así promover su acoplamiento. (Modificado de Misteli 2000).

El proceso de fosforilación de las proteínas SR está involucrado directamente con el mecanismo de importación nuclear de dichas moléculas después de su síntesis, o durante su trayecto núcleo-citoplasma. Ahora bien, si la fosforilación promueve la liberación de los factores de *splicing*, entonces se puede predecir que la desfosforilación promueve su asociación. Esta aseveración se sustentó con los estudios de Mermoud y cols., en 1994 donde demostraban que las fosfatasas PP1 y PP2A eran necesarias para la reacción de *splicing* in vitro. Además recientemente se ha identificado a otra fosfatasa, PP2C y como componente del complejo del *spliceosoma* (Murray y cols., 1999).

Los factores de *splicing* del tipo no-snRNP como el SC-35 muestra una distribución moteada en el núcleo que es colocalizada con los snRNPs (Fu & Maniatis, 1990; Spector, 1990; Spector y cols., 1991; Huang & Spector, 1992). En el núcleo los snRNPs y U2AF se encuentran concentrados en cuerpos de Cajal, sin embargo SC-35 no (Lamond & Carmo -Fonseca 1993). Existen estudios de inhibición del proceso de *splicing* realizados *in vitro* e *in vivo*, donde empleando diferentes clases de oligonucleotidos y anticuerpos a snRNAs específicos (Padget y cols., 1983; Krämer y cols., 1984; Krainer & Maniatis, 1985), han mostrado que los snRNAs son esenciales en el proceso de *splicing*, además identifica las regiones específicas de los snRNAs participantes en dicho proceso (O'Keefe y cols., 1994).

### **I.3.3. GRÁNULOS INTERCROMATINIANOS Y FIBRILLAS PERICROMATINIANAS**

En estudios por microscopía electrónica con anticuerpos anti-snRNP y anti-SC-35, se señaló que el patrón moteado corresponde a las estructuras nominadas gránulos intercromatinianos (GIC) y fibrillas pericromatinianas (FPC) (Spector y cols., 1983; Fakan y cols., 1984; Puvion y cols., 1984; Spector, 1990; Spector y cols., 1991), donde los gránulos intercromatinianos pueden representar a los sitios activos y/o de almacenamiento de los factores de *splicing*, y las fibrillas pericromatinianas a los transcritos nacientes del pre-RNAm. Se ha propuesto que los sn-RNPs de los cúmulos de gránulos intercromatinianos (CGI) se mueven hacia los sitios de transcripción activa para en seguida cortar el transcrito naciente del pre-mRNAm (Jiménez-García & Spector, 1993); acontecimientos que apoyan la hipótesis de que las diferentes proyecciones en las imágenes del patrón moteado, refleja la organización de los factores de *splicing* y la posibilidad de que sea un proceso dinámico que representa el estado fisiológico de la célula.

También por microscopía electrónica, se ha definido la estructura de los SFCs, y se dice que las regiones centrales consisten de agrupaciones de gránulos de 20 a 25 nm de diámetro, conocidos como gránulos intercromatinianos (GIC) unidos por fibrillas muy delgadas (Monneron & Bernhard, 1969), los cuales contienen numerosos factores que están involucrados en la síntesis y procesamiento del RNA, entre sus constituyentes se

encuentran snRNPs, proteínas SR y la forma hiperfosforilada de la subunidad grande de la RNA pol II. Aunque los factores de *splicing* se localizan en estos cúmulos, la síntesis del pre-mRNA no ocurre ahí, ya que en algunos estudios hechos por inmunocitoquímica, quedo demostrado que no contienen DNA (Spector, 1990 y Sacco-Bubulya y cols., 2002). Por otro lado, se ha reportado poca o nula incorporación de uridina tritiada en las regiones internas de dichos gránulos, lo que refleja una velocidad de recambio muy baja de las especies de RNA existentes en estos sitios (Fakan & Puvion, 1980). Inicialmente Mintz y cols., en el 99 purificaron un aproximado de 76 proteínas de los CGI de hígado de ratón; sin embargo, más recientemente se hizo el análisis proteómico de una fuente similar (Lamond & Spector, 2003) y reveló un aproximado de 136 proteínas, además de factores de transcripción, factores involucrados en el inicio de la traducción, proteínas ribosomales y proteínas estructurales como laminina A y actina asociada a los snRNPs.

En cuanto a las FPC, se han localizado en la periferia de la cromatina condensada y de forma dispersa en los espacios intercromatinianos. Estas fibrillas tienen un diámetro aproximado de 3 a 5 nm pero en algunos casos pueden alcanzar hasta 20 nm. En contraste con los GIC, las fibrillas se marcan rápidamente con uridina tritiada lo que sugiere la presencia de altas concentraciones de pre-mRNA (Fakan y cols., 1976). Las FPC contienen todas las snRNPs, las no-snRNPs y las hnRNPs, lo cual sugiere que son sitios de transcripción y procesamiento del pre-mRNA por lo que se cree que representan a los transcritos nacientes (Fakan, 1994).

Paralelamente hay estudios por hibridación *in situ*, donde se sugiere que el *splicing* de la mayoría de los genes se desarrolla en la periferia de los SFCs (Zhang y cols., 1994; Huang & Spector, 1996), sitio donde también se han localizado histonas acetiladas, lo que indica un proceso de transcripción activa (Hendzel y cols., 1998).

#### **1.3.4. CUERPOS DE CAJAL**

Son una clase de cuerpos nucleares que contienen snRNPs y un autoantígeno humano llamado p80-coilina, el cual es ampliamente usado como marcador específico de estas estructuras. Los cuerpos de Cajal, inicialmente llamados cuerpos espiralados (CB), varían

de tamaño entre 0.2 – 1.5  $\mu\text{m}$  y en número entre 1-10 en los diferentes tipos celulares y bajo diferentes condiciones de crecimiento. Contienen antígenos nucleolares, como la fibilarina, Nopp140 y pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNP), pero no contienen rRNA, pre-mRNA, DNA o proteínas SR. En estudios recientes se presentan evidencias de que los cuerpos de Cajal participan en el control de la producción y/o transporte de las snRNP (Spector, 2001). También en algunos tipos celulares se han asociado con los genes de los snRNA regulando su expresión por retroalimentación. Dado que los cuerpos de Cajal contienen componentes de los complejos de transcripción de las tres RNA polimerasas así como del snRNA U7, se ha propuesto que están involucrados en el procesamiento del pre-mRNA de las histonas. Además existen evidencias recientes donde se propone que los CB pueden representar los diferentes estados de maduración de los snRNAs en el núcleo (Carmo-Fonseca, 2002 y Carmo-Fonseca y cols., 2002).

## II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Hasta hace algunos años, se habían reportados estudios sobre la organización dinámica de los factores de *splicing* llevados a cabo en cultivo de líneas celulares de mamífero. Sin embargo, el grupo de Jiménez-García en el 2002 (George-Téllez y cols., 2002) estudió la distribución de los factores de *splicing* en las células de diversos tejidos de rata con diferentes programas de actividad transcripcional, ellos reportan la presencia del patrón moteado en diversos tipos celulares que extiende las observaciones de cultivo a células en tejido. La pregunta que resta es, conocer sí en otros vertebrados ocurre lo mismo y no sólo en mamíferos. De aquí que el objetivo primordial de este trabajo fue estudiar el hígado e intestino de especies diferentes de vertebrados (peces, anfibios y aves), que representan tres de las principales líneas evolutivas de los vertebrados.

de tamaño entre 0.2 – 1.5  $\mu\text{m}$  y en número entre 1-10 en los diferentes tipos celulares y bajo diferentes condiciones de crecimiento. Contienen antígenos nucleolares, como la fibilarina, Nopp140 y pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNP), pero no contienen rRNA, pre-mRNA, DNA o proteínas SR. En estudios recientes se presentan evidencias de que los cuerpos de Cajal participan en el control de la producción y/o transporte de las snRNP (Spector, 2001). También en algunos tipos celulares se han asociado con los genes de los snRNA regulando su expresión por retroalimentación. Dado que los cuerpos de Cajal contienen componentes de los complejos de transcripción de las tres RNA polimerasas así como del snRNA U7, se ha propuesto que están involucrados en el procesamiento del pre-mRNA de las histonas. Además existen evidencias recientes donde se propone que los CB pueden representar los diferentes estados de maduración de los snRNAs en el núcleo (Carmo-Fonseca, 2002 y Carmo-Fonseca y cols., 2002).

## II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Hasta hace algunos años, se habían reportados estudios sobre la organización dinámica de los factores de *splicing* llevados a cabo en cultivo de líneas celulares de mamífero. Sin embargo, el grupo de Jiménez-García en el 2002 (George-Téllez y cols., 2002) estudió la distribución de los factores de *splicing* en las células de diversos tejidos de rata con diferentes programas de actividad transcripcional, ellos reportan la presencia del patrón moteado en diversos tipos celulares que extiende las observaciones de cultivo a células en tejido. La pregunta que resta es, conocer si en otros vertebrados ocurre lo mismo y no sólo en mamíferos. De aquí que el objetivo primordial de este trabajo fue estudiar el hígado e intestino de especies diferentes de vertebrados (peces, anfibios y aves), que representan tres de las principales líneas evolutivas de los vertebrados.

## II.1. GENERALIDADES DE LOS CORDADOS

Los vertebrados son un *subphylum* de animales que, junto con los cefalocordados (anfioxos) y los urocordados (tunicados), pertenecen al *phylum* de los Cordados, los cuales comparten, al menos en alguna etapa de su vida, características definitorias que los unen y los distinguen del resto de los *phyla* (Fig 10):

- notocorda
- hendiduras faríngeas
- cordón nervioso tubular y dorsal
- cola postnatal

A primera vista, las diferencias entre los tres *subphyla* son más aparentes que las semejanzas que los unen. Algunos cordados son terrestres y la mayoría utiliza mandíbulas para alimentarse. La mayoría de los vertebrados tienen un endoesqueleto, el cual consiste en un sistema de elementos internos rígidos de hueso o cartílago bajo la piel, este sistema participa en la locomoción, el soporte y la protección de órganos delicados. Los cefalocordados y los urocordados son todos animales marinos, y todos carecen de esqueleto (óseo y cartilaginoso), su sistema de soporte puede implicar varillas de colágena. Estos organismos, son animales suspensívoros, fabrican una pegajosa banda de moco que extrae el alimento de las corrientes de agua que pasan por un sistema filtrador.

Los vertebrados son animales que tiene cordón nervioso en posición dorsal rodeado de un material de soporte denominada columna vertebral de donde proviene su nombre, la cual constituye parte de un esqueleto interno. Este esqueleto está usualmente formado por hueso y cartílago y sirve como sitio de anclaje a los músculos. En la mayoría de los procesos de desarrollo de los vertebrados, el esqueleto se forma primero de cartílago el cual es reemplazado por hueso, después del nacimiento. Todos los vertebrados terrestres tienen los mismos huesos en sus esqueletos y las diferencias entre los grupos de estos vertebrados provienen de las modificaciones de huesos existentes para desarrollar una función especial, las alas, por ejemplo. Los tipos de modificaciones incluyen la fusión de varios huesos en uno solo, el acortamiento o la elongación de huesos, etc.

# CHORDATA MH, ToL

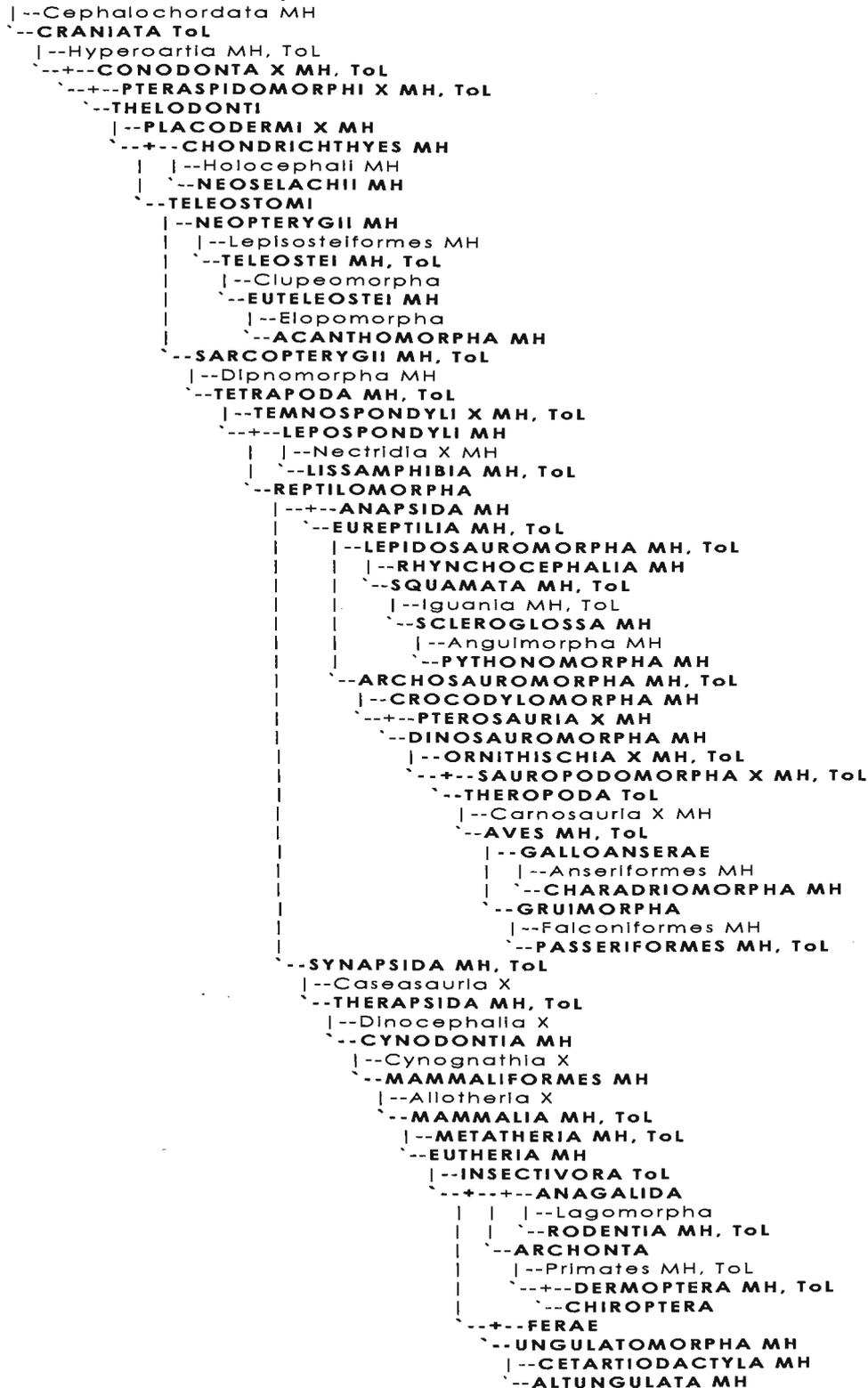


Fig.10. Cladograma que muestra la clasificación actual de los Cordados.

Los vertebrados son un grupo de organismos que se encuentran desde los trópicos hasta las regiones polares ocupando tanto entornos marinos y dulciacuícolas o terrestres, los mares más profundos hasta las altas montañas e incluso los espacios aéreos ya que solo los vertebrados y los insectos son los únicos grupos de animales que tienen la capacidad de volar. Sin embargo, aunque los vertebrados representan una enorme variedad de modos de vida, no constituyen ni el mayor ni el más diverso de los *Phyla* animales (**Kardong, 1999 y Gore, 2004**).

En gran medida nuestro interés por este grupo de organismos, los vertebrados, es un tanto egoísta pues radica en el hecho de que pertenecemos a este *Phylum* por lo que estudiar a los Cordados nos acerca temas relacionados con nosotros mismos.

## **II.2. ORIGEN DE LOS CORDADOS**

Descifrar el origen de los cordados se dificulta debido a la ausencia de registro fósil de sus antecesores los cuales tenían cuerpos blandos. No obstante se cree que los cordados aparecen en el período Cámbrico, hace unos 544 millones de años.

Los cordados tienen una cavidad interna llena de líquido, llamada *celoma*. Junto con otros animales que poseen también celoma forman el grupo de los celomados. Entre los grupos de animales celomados existen dos líneas evolutivas, aparentemente distintas e independientes: los protostomados, que entre otros agrupa a los moluscos, anélidos y artrópodos; y los deuterostomados, dentro de los que se encuentran los equinodermos, los protocordados y los cordados además de otros grupos menores (**Kardong, 1999**).

Las rutas evolutivas de invertebrados avanzados hacia cordados primitivos ha sido sujeto de muchos estudios y vigorosas discusiones. Los cordados son categorizados como deuterostomados que incluye a los Pogonóforos, Quetognatos, Equinodermos, Hemicordados y Cordados (Urocordados, Cefalocordados y Vertebrados), aunque recientemente, algunos estudios han forzado a categorizar a los Pogonóforos como cercanos a los Anélidos y los Quetognatos permanecen como un misterio en términos de ancestros (**Wada & Satoh 1994**).

En la actualidad, a pesar de la ausencia de un registro fósil claro, se reconoce que la historia de los vertebrados podría haber iniciado con *Pikaia gracilis*, un pre-vertebrado, al parecer el primero con notocorda, ubicado taxónomicamente en el *phylum* de los Cordados.

### **II.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VERTEBRADOS**

Son organismos segmentados, provistos de cabeza, tronco y cola; cráneo en cuyo interior se aloja el encéfalo; típicamente provistos de huesos dérmicos; notocordio en el embrión y a veces también en el adulto; éste también posee siempre columna vertebral formada por cartílagos o por huesos de sustitución; típicamente con dos pares de apéndices en el tronco; branquias o pulmones derivados de la faringe; celoma bien desarrollado; circulación cerrada; corazón con dos, tres o cuatro cámaras; excreción mediante pronefros, mesonefros o metanefros; sistema endócrino complejo; sexos normalmente separados; diversos sistemas de fecundación; huevos de regulación y desarrollo de diferentes tipos.

Este grupo de organismo incluye: Agnatos, vertebrados sin mandíbulas; Placodermos, grupo extinguido de peces acorazados con mandíbulas; Osteictios, peces óseos; Condroictios, peces cartilagosos; Anfibios, anfibios; Reptiles, reptiles, Aves, aves; Mamíferos, mamíferos (**ver fig 10**).

Como se detallará más adelante, el interés de este trabajo es el estudiar, en dos tipos celulares (hepáticas e intestinales), el comportamiento estructural de los factores de splicing que se sabe que en núcleos de células de mamíferos, se organizan en forma de un patrón moteado y detectar si este comportamiento se presenta en otros vertebrados. En este contexto es que se seleccionaron como grupos de interés a los peces óseos, como organismos que habitan el medio acuático; los anfibios, por ser el grupo que ocupa tanto el medio acuático como el terrestre y las aves por ser los que ocupan el espacio aéreo y presentan por tanto una gran movilidad.

Aunque los vertebrados presentan cuatro tejidos básicos: epitelial, conjuntivo, muscular y nervioso, en este trabajo decidimos hacer nuestras observaciones en núcleos de células del epitelio intestinal y células que forman el tejido hepático ya que consideramos que de necesitar ampliar nuestros estudios a otros grupos de organismos, estas dos estructuras, tubo digestivo y una glándula accesoria, estarán presentes y serán accesibles sin mucha dificultad, que en otros grupos de organismos de niveles de organización más bajos.

Por tanto, de manera muy general, a continuación se describirán las características generales tisulares de estas estructuras:

El aparato digestivo de los vertebrados está formado por un conducto largo muscular modificado (tubo digestivo) que se extiende desde la boca hasta el ano. A lo largo de este tubo se vierten diferentes secreciones, una producidas por glándulas que se localizan en su propia pared y que forman la saliva, el jugo gástrico o el intestinal, y otras glándulas como el hígado y páncreas que están alejadas del tubo digestivo y mantienen su comunicación por medio de largos conductos aportando su producto al intestino delgado.

El tubo digestivo, como ya se mencionó, comienza con la boca y en él se distingue una cavidad bucal, una faringe, un esófago, un estómago y un intestino, soliendo comunicar éste último con el exterior por la abertura posterior de una cloaca, cámara que también recibe los conductos urinarios y genitales. El tubo digestivo está formado de mesénteron, y está tapizado por un epitelio de origen endodérmico. En los peces y los embriones de las formas superiores, la faringe comunica con el estómago a través del esófago. El intestino es más o menos convoluto, por lo que tanto el estómago como el intestino son considerablemente más largos que la cavidad abdominal que los alberga. El epitelio y el tejido conjuntivo que tapiza al tubo digestivo, forma en conjunto, la membrana mucosa, que a veces contiene agrupaciones de glándulas tubulares. Las funciones digestivas y otras, de éstas glándulas pueden variar según los animales de que se trate.

También como ya se mencionó, existen dos glándulas digestivas accesorias, el hígado y el páncreas, situadas en la cavidad abdominal. Ambas desarrolladas como evaginaciones del intestino, pero difiriendo mucho entre sí cuando están completamente desarrolladas. El hígado es un órgano rojo oscuro, de tamaño relativamente grande y con diversas funciones. El hígado es la glándula más grande de todo el organismo. Está cubierto por una delgada cápsula de tejido conectivo fibroso que penetra al parénquima y lo divide en lóbulos y lobulillos. Está formado por una masa de células poliédricas con numerosos espacios intercelulares que reciben la bilis segregada por las células, la cual pasa a los conductos hepáticos. Este órgano se encuentra irrigado por la arteria hepática, recibe sangre venosa proveniente del tubo digestivo páncreas y bazo a través de la vena porta. El hígado es el primer órgano expuesto a los compuestos tóxicos ingeridos. Tiene la capacidad de degradar sustancias tóxicas, pero si éstas sobrepasan su capacidad, los compuestos tóxicos lesionan al órgano.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la distribución de los factores de *splicing* (no snRNPs) en tejido hepático e intestinal de vertebrados no mamíferos y discutir los resultados en función del patrón moteado o en “*speckles*” descrito para mamíferos.

#### **III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar, por inmunofluorescencia, la distribución intranuclear de las proteínas SR que detecta el anticuerpo 3C-5, en tejido hepático e intestinal de:
  - ◆ Aves (*Gallus domesticus*) (pollo de engorda)
  - ◆ Anfibios (*Bufo marinus*) (Sapo),
  - ◆ Peces (*Salmo* sp.) (Trucha arcoiris),
  
- Determinar si la distribución de las proteínas SR, en estos organismos, es similar a la descrita para núcleos de células de mamíferos.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Como el procesamiento postranscripcional del "*splicing*" es un fenómeno presente en todos los eucariontes y sus componentes moleculares están conservados en la evolución y en particular en vertebrados, la organización celular de los mismos debe ser similar al patrón moteado observado en células de mamíferos.

## V. METODOLOGÍA

**Procesamiento y obtención de muestras.** Se obtuvieron muestras de tejido hepático e intestinal de ejemplares vivos de especies de diferentes grupos de vertebrados (peces, anfibios y aves). Estas muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% en buffer de fosfato salino (PBS) durante 1 hora a 4°C y se enjuagaron tres veces en PBS por 10 minutos cada una. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en soluciones de alcoholes graduales (50%, 70%, 80%, 96%) y xilol al 100%, por 1 hora en cada solución para, finalmente, incluirlas en parafina. De los bloques de parafina se obtuvieron cortes 3 a 5 µm de grosor que se montaron en portaobjetos tratados con silano (Sigma).

**Inmunofluorescencia indirecta.** La detección de los factores de *splicing* se realizó con el anticuerpo monoclonal 3C5, el cual muestra reactividad hacia una familia de proteínas de *splicing* del grupo SR, y que fue donado amablemente por el Dr. David Spector (Cold Spring Harbor Laboratory). Cabe señalar que existen reportes donde se demuestra que este tipo de anticuerpo es suficiente para marcar los factores de *splicing* presentes en los speckles nucleares (Cáceres y cols., 1997). Se procedió como se describe brevemente a continuación: Los cortes fueron desparafinados en una estufa a 59°C y una inmersión en xilol por 5 min, posteriormente se rehidrataron en soluciones de alcoholes graduales (100%, 96% y 50%) y agua desionizada. Las muestras hidratadas se sometieron a un pre-tratamiento de recuperación antigénica con Proteinasa K (1µg/ml en Tris-HCl 0.01 M, pH 8) por 10 min. Después de enjuagar con solución de TBST, se bloqueó el tejido con suero de caballo al 5%, para en seguida incubar toda la noche a 4°C el anticuerpo primario (3C5) diluido 1:20 en cámara húmeda. La inmunodetección se llevó a cabo una vez que se retiró el anticuerpo primario enjuagando tres veces por 5 min (cada vez) con TBST, y colocando el anticuerpo secundario (anti-Inmunoglobulinas totales de ratón) acoplado con el fluorocromo FITC (DAKO) a la dilución recomendada. La incubación se llevó a cabo por 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad y en cámara húmeda. Finalmente, las muestras se lavaron tres veces con TBST, por 5 minutos (cada vez). Las preparaciones se montaron con medio de montaje para fluorescencia (con anti-fading) (Vector) y se sellaron con

barniz de uñas. La observación y registro fotográfico se llevó a cabo en un microscopio de epifluorescencia Nikon modelo E-800 con una cámara digital (MTI 3CCD) acoplada. De forma simultánea se hizo en todos y cada uno de los diferentes tejidos, controles de reacción los cuales consistieron en omitir el anticuerpo primario.

**PROCESAMIENTO CONVENCIONAL PARA MUESTRAS HISTOLÓGICAS INCLUIDAS EN PARAFINA**

Fijación en Paraformaldehído al 4% en buffer PBS



Deshidratación en alcoholes graduales (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% y Xilol)



Inclusión en Parafina



Obtención de cortes de 3-5  $\mu\text{m}$  montados en portaobjetos cubiertos con Silano (Sigma)



Desparafinización y rehidratación de las muestras  
Xilol, Alcohol 100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%, agua corriente



Secar al aire y almacenar hasta la inmunolocalización



**INMUNOLocalización Fluorescente**

Hidratación en TBS



Pretratamiento con Proteinasa K 10' a temperatura ambiente



Lavar en TBS



Bloquear con Suero Normal de Caballo 5% en TBST 15' a temperatura ambiente



Incubación en el anticuerpo primario 3C-5 diluido 1:10 con la solución bloqueadora, en cámara húmeda, a 4 C, toda la noche



Lavar con TBST 3 X 10'



Incubación con el anticuerpo secundario Anti-Igs de ratón acoplado con FITC, en cámara húmeda, en oscuridad, a 4 C, durante toda la noche



Lavar con TBST 3 X 10'



Montar con medio de montaje para fluorescencia, sellar con barniz de uñas



Observación y captura digital de imágenes con microscopio de epifluorescencia Nikon E-800

**Fig. 11.** Diagrama de flujo para ilustrar el protocolo general para el inmuno marcaje fluorescente de las proteínas SR con el anticuerpo 3C-5

## **VI. RESULTADOS**

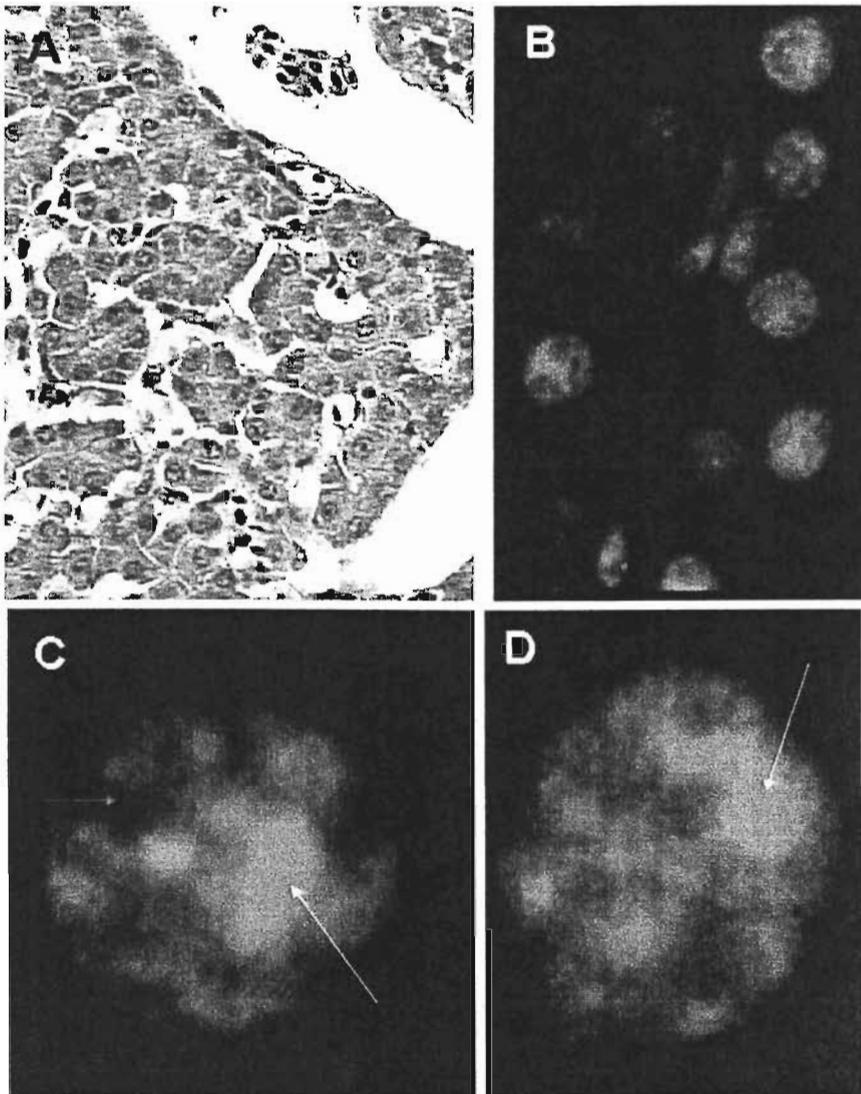
Los factores de splicing no UsnRNPs, correspondientes a las proteínas de la familia SR se organizan dentro de los núcleos de aves, anfibios y peces óseos, en un patrón moteado.

La localización de estos factores se realizó por inmunofluorescencia con el anticuerpo 3C-5 desarrollado por **Turner & Franchi (1987)** y donado por el Dr. David Spector (Cold Spring Harbor Lab), el cual detecta proteínas nucleares del tipo no snRNPs.

### **VI.1 SPEKCLEs EN AVES**

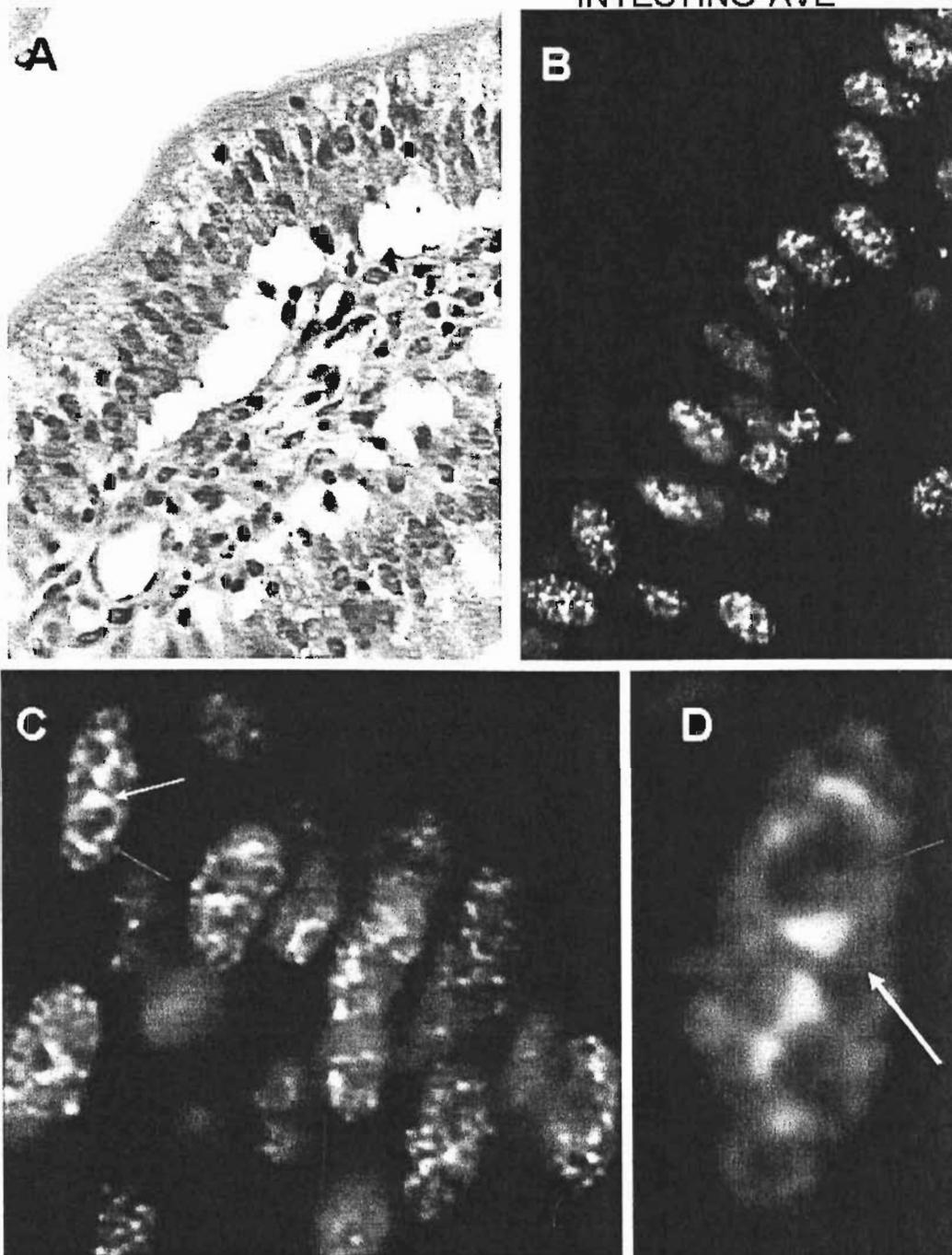
Las **figuras 12 y 13** muestran la distribución del inmunomarcaje fluorescente con el anticuerpo 3C-5 en tejido hepático e intestinal, respectivamente. Esta distribución que corresponde a la localización de proteínas SR, como puede observarse (**figs. 12B-D y 13B-D**) se presenta como zonas con tinción muy intensa a manera de motas (flechas blancas) y zonas de tinción más difusa que excluyen al nucléolo. Esta tinción se observó siempre positiva y con el patrón descrito en todos los tipos celulares excepto en eritrocitos que solo ocasionalmente mostraron inmunomarcaje positivo, sin embargo el patrón de tinción si era el mismo. En las **figuras 12B, 12C y 13B** se puede apreciar que la forma, el número y distribución de las motas varía de célula a célula y que el patrón difuso que rodea las motas está siempre presente. En las figuras 12C y 13C, incluso, los núcleos de estos hepatocitos presentan zonas de motas que no pueden distinguirse como entidades discretas o si forman parte de una gran mota de bordes muy irregulares. Las **figuras 14 y 15** son ampliaciones de núcleos de un hepatocito y una célula del epitelio intestinal respectivamente en las que se puede apreciar que cualitativamente, el tamaño e intensidad de la tinción varía de mota a mota. En las **figuras 12A y 13A** se muestran imágenes del tejido hepático (**fig. 12A**) e intestinal (**fig. 13A**) con la tinción general de Hematoxilina y Eosina que muestra la morfología general de los tejidos.

## HÍGADO-AVE

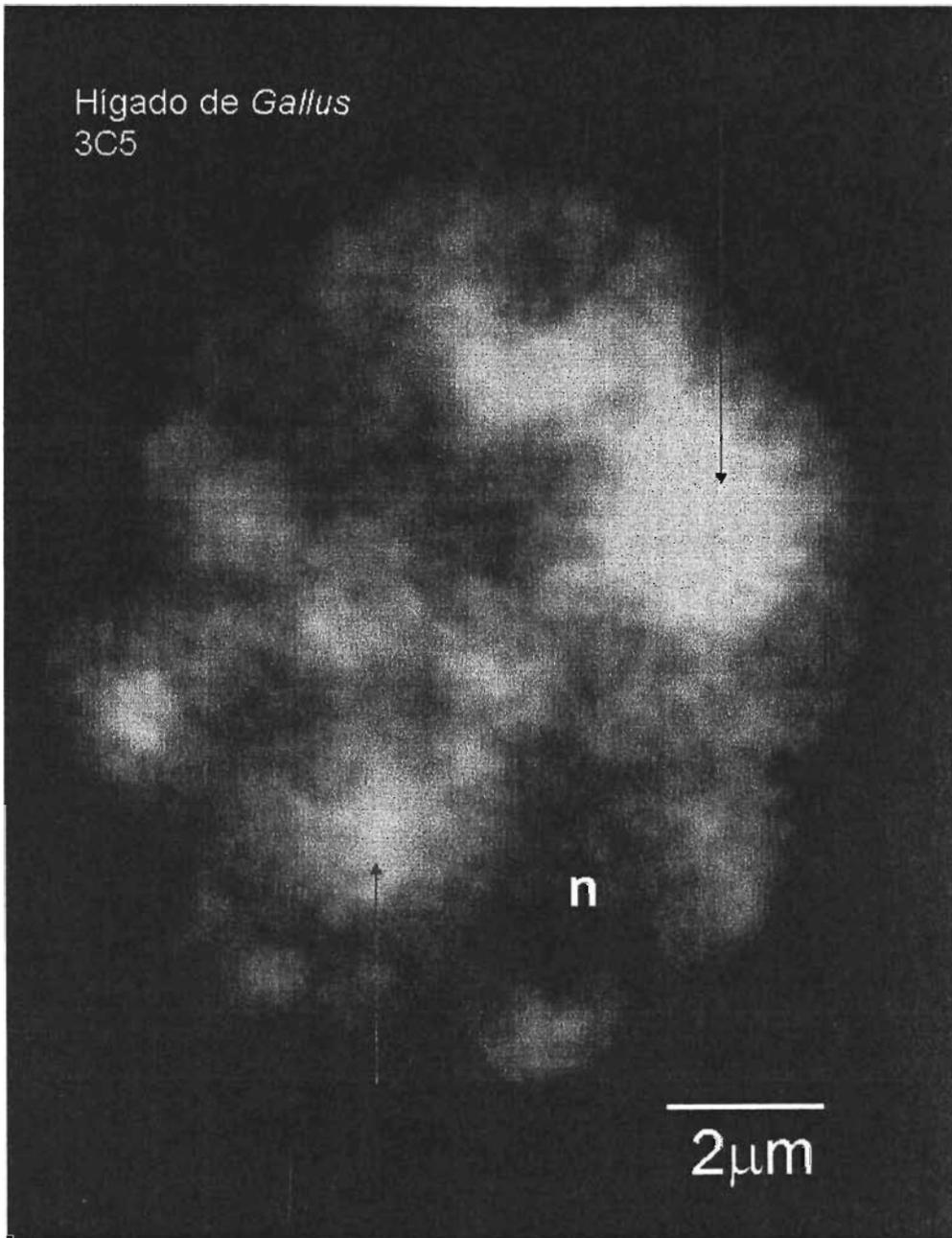


**Fig.12** Inmunofluorescencia con anti-3C5 sobre tejido hepático de ave (*Gallus*). **A)** Tinción con HE. **B)** Patrón moteado “difuso” con respecto al resto de los tejidos estudiados. **C y D)** Células individuales donde se muestra más evidente la difusión de las motas. Flechas blancas señalan motas; flecha roja, nucléolo.

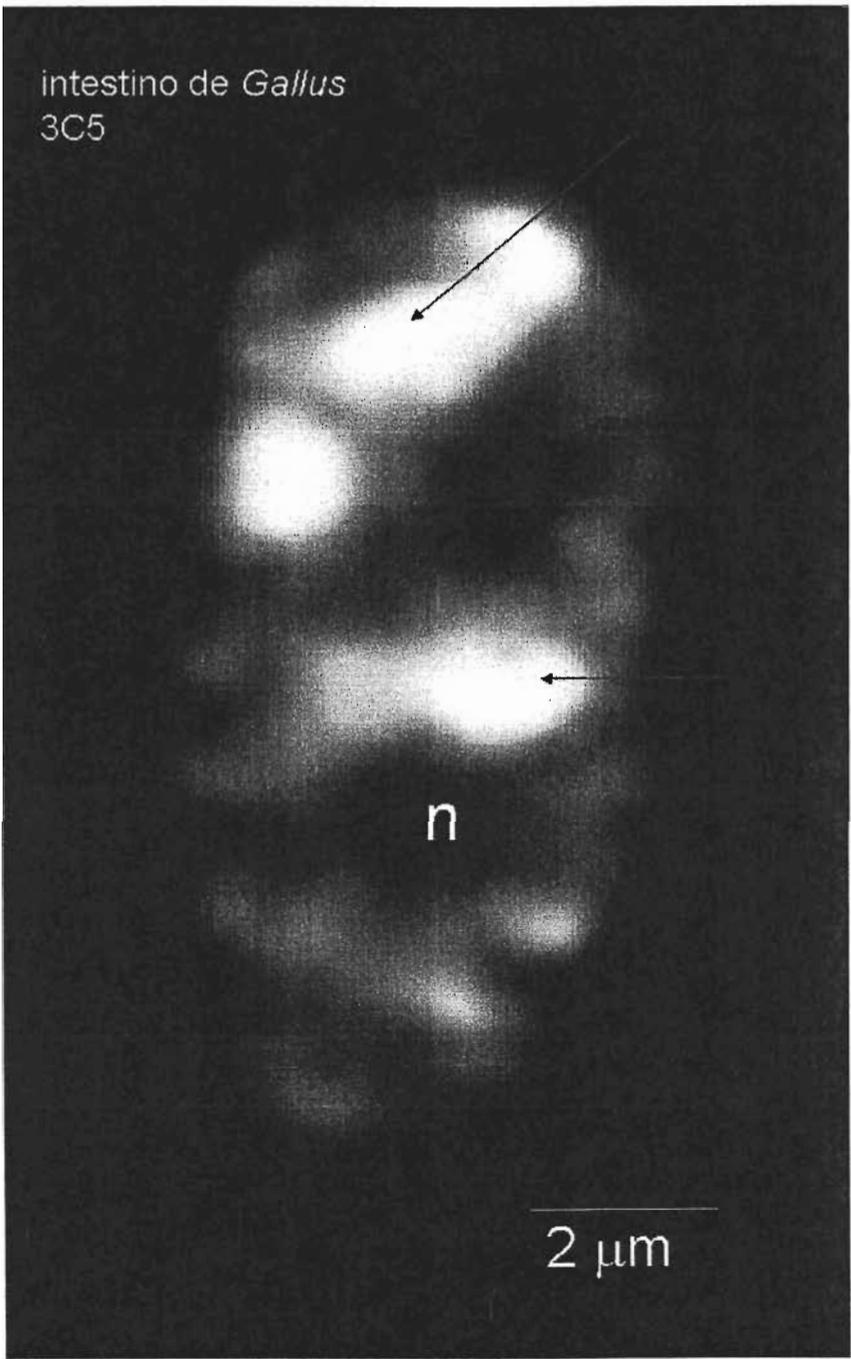
## INTESTINO-AVE



**Fig.13** Inmunodetección con anti-3C5 en intestino de ave (*Gallus*). **A)** Tinción con H-E. **B)** Patrón moteado fino y brillante de las proteínas SR positivas. **C y D)** Acercamiento y amplificación de células francas positivas. Variabilidad en cuanto a forma y número de las "speckles". Se señalan las motas o "speckels".



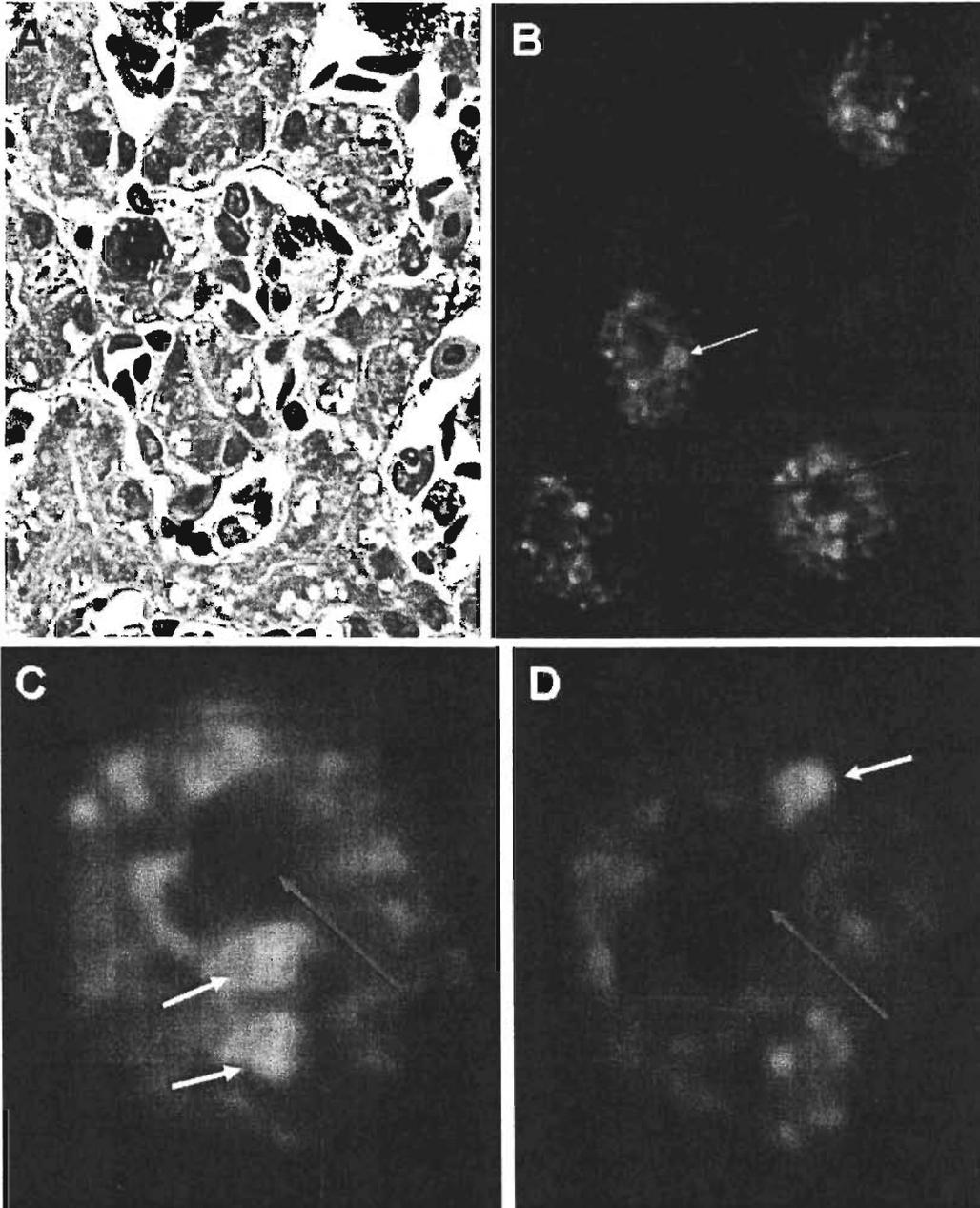
**Fig.14** Amplificación de (12D). Núcleo de célula hepática de ave (*Gallus*). Las flechas señalan las “motas”.



**Fig.15** Amplificación de (13D). Célula intestinal de *Gallus*.  
Las flechas señalan las *speckles*.

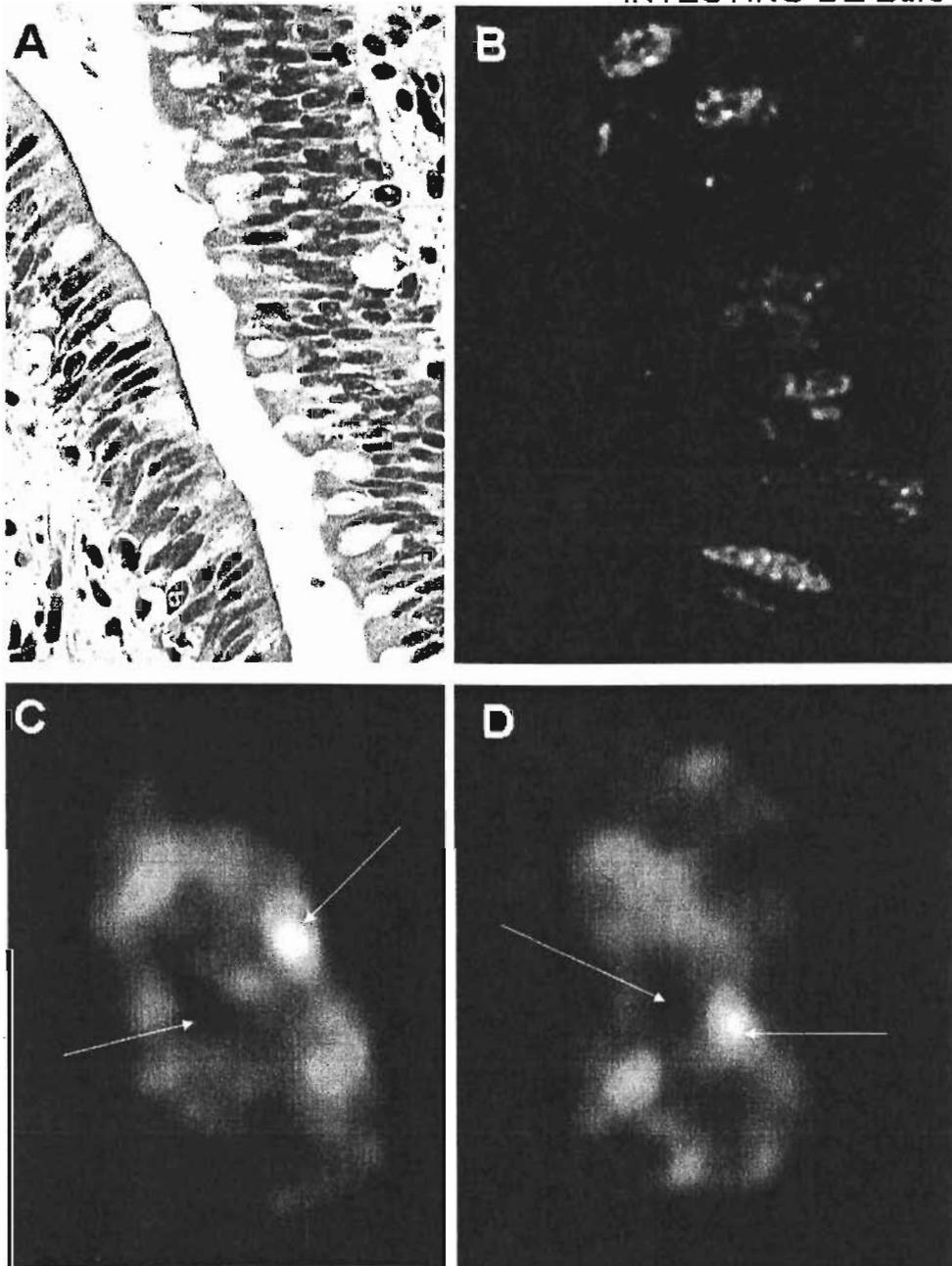
## VI.2 SPECKLES EN ANFIBIO

En las figuras 16 y 17 se muestra que, al igual que los núcleos de células de ave, las células hepáticas (**fig. 16**) e intestinales (**fig. 17**) del anfibio *Bufo* las proteínas SR presentan una distribución en forma de un patrón moteado correspondiente a zonas de tinción muy intensa (flechas blancas) rodeadas de zonas de tinción difusa que también excluyen al nucléolo (flechas rojas). La **figura 18** muestra una amplificación de un núcleo de hepatocito y la **figura 19** de un núcleo de célula del epitelio intestinal de anfibio en donde la flecha blanca señala una mota y la flecha roja la región del nucleolo negativa a la inmunotinción. En las figuras 16A y 17A se muestran imágenes del tejido hepático e intestinal respectivamente, teñido con Hematoxilina y Eosina para mostrar la estructura general de estos tejidos.

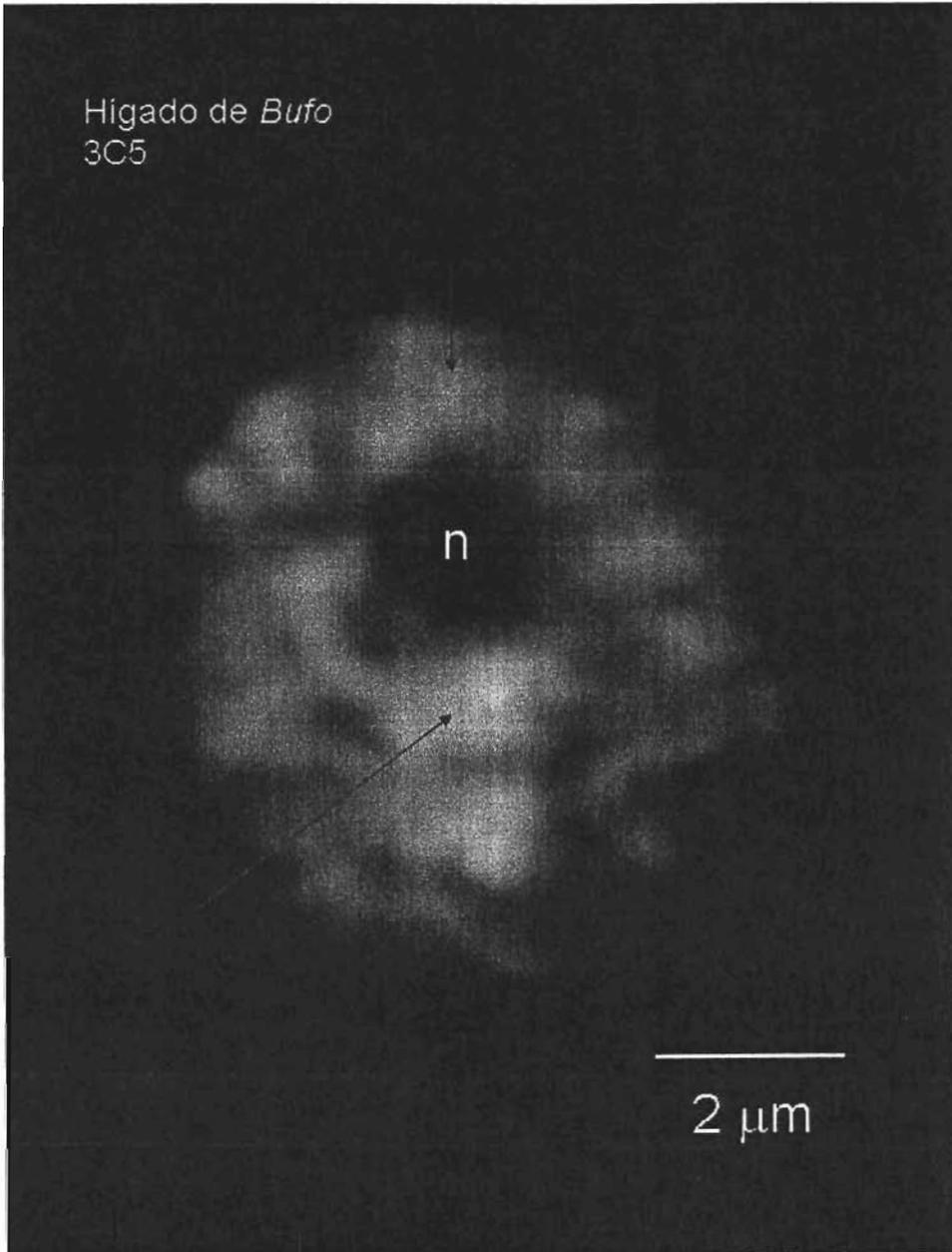


**Fig.16** Inmunofluorescencia con anti-3C5 en tejido hepático de anfibio (*Bufo*). **A)** Tinción con H-E. **B)** Motas inmersas en un ambiente difuso. **C y D)** Amplificación de hepatocitos. Se señala claramente (flechas blancas) la forma irregular de las motas presentes. Flechas rojas nucléolo.

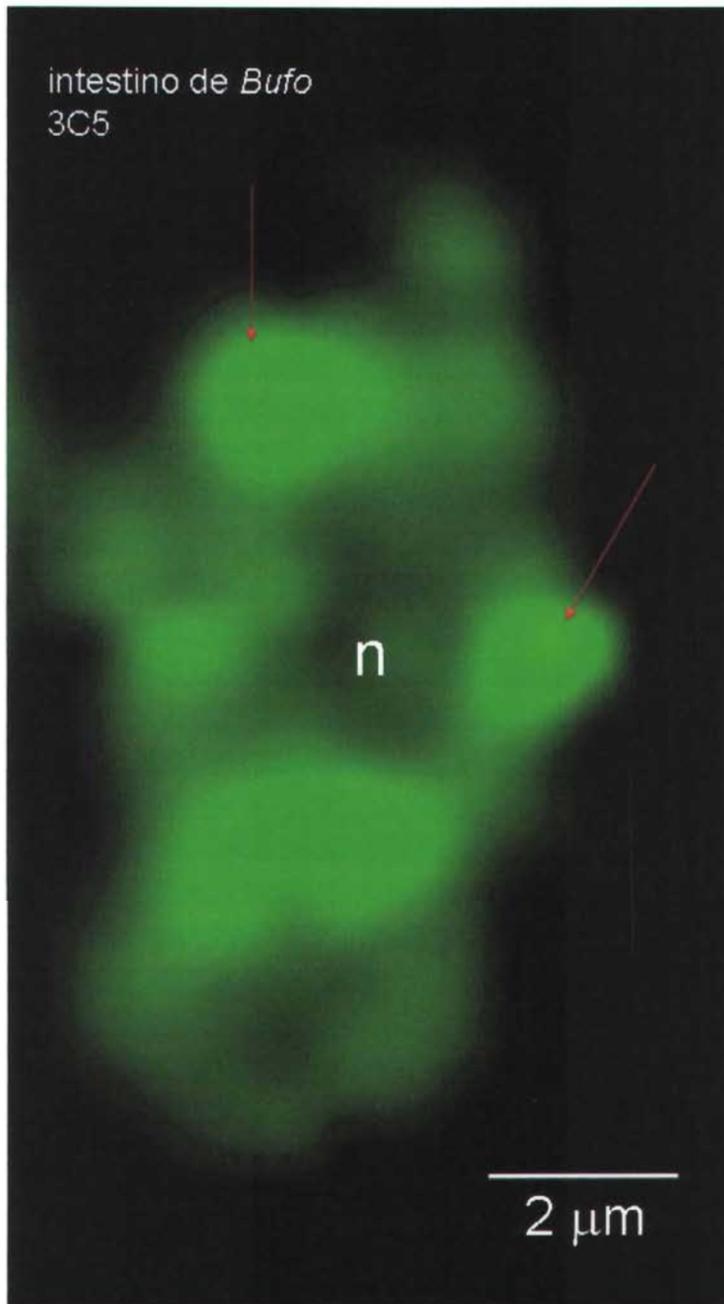
INTESTINO DE *Bufo*



**Fig.17** Inmunodetección con anti-3C5 en intestino de anfibio (*Bufo*). **A)** Tinción con H-E. **B)** Reactividad característica de las proteínas SR. **C y D)** Motas brillantes y casi con una esfericidad perfecta (flechas blancas cortas).



**Fig.18** Amplificación de (16C). Núcleo hepático de anfibio (*Bufo*).  
*Speckles* (flechas rojas).

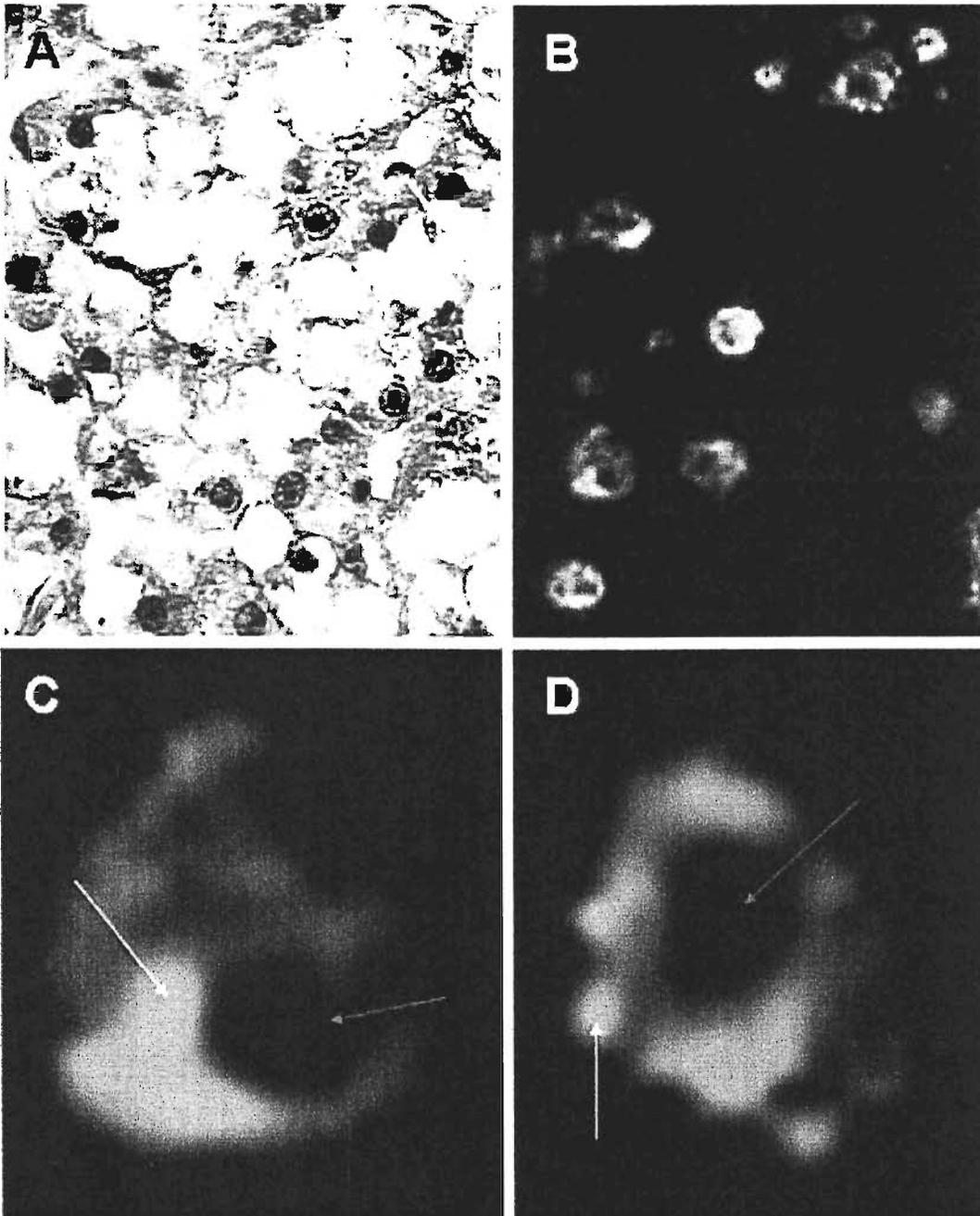


**Fig.19** Amplificación de célula intestinal de anfibio (*Bufo*) positiva a 3C-5. Flechas rojas señalan las “motas”.

### VI.3 SPECKLES EN PEZ ÓSEO

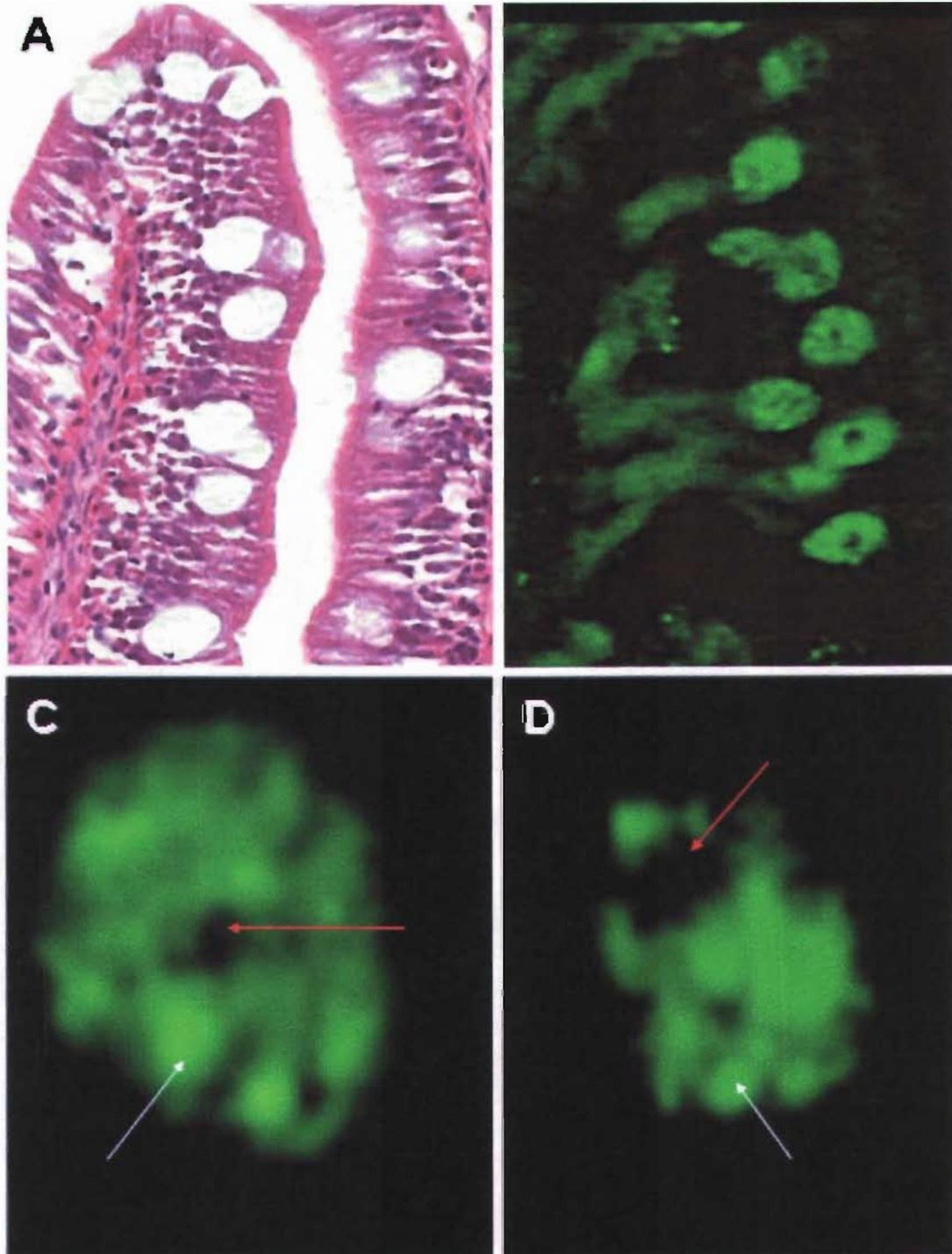
En las figuras 20A y 21A se observa el aspecto general del hígado y el intestino del pez óseo del género *Salmo* teñido con Hematoxilina y Eosina. La inmunolocalización fluorescente de las proteínas SR con el anticuerpo 3C-5 presentó también en estas muestras, una tinción intensa en forma de motas (flechas blancas), una tinción difusa que rodea a éstas pero no ocupa la totalidad del nucleoplasma y que excluye claramente a la región del nucléolo (flechas rojas). Las figuras 22 y 23 son ampliaciones de un núcleo de hepatocito y uno de una célula del epitelio intestinal, respectivamente. Una vez más se puede apreciar, en las figuras 20C y D, 21C y D, así como en las ampliaciones que, de manera cualitativa, la forma, intensidad de la tinción y tamaño de las motas varían, de la misma manera, la extensión de la tinción difusa varían entre núcleos y tipos de células.

## HÍGADO DE *Salmo*

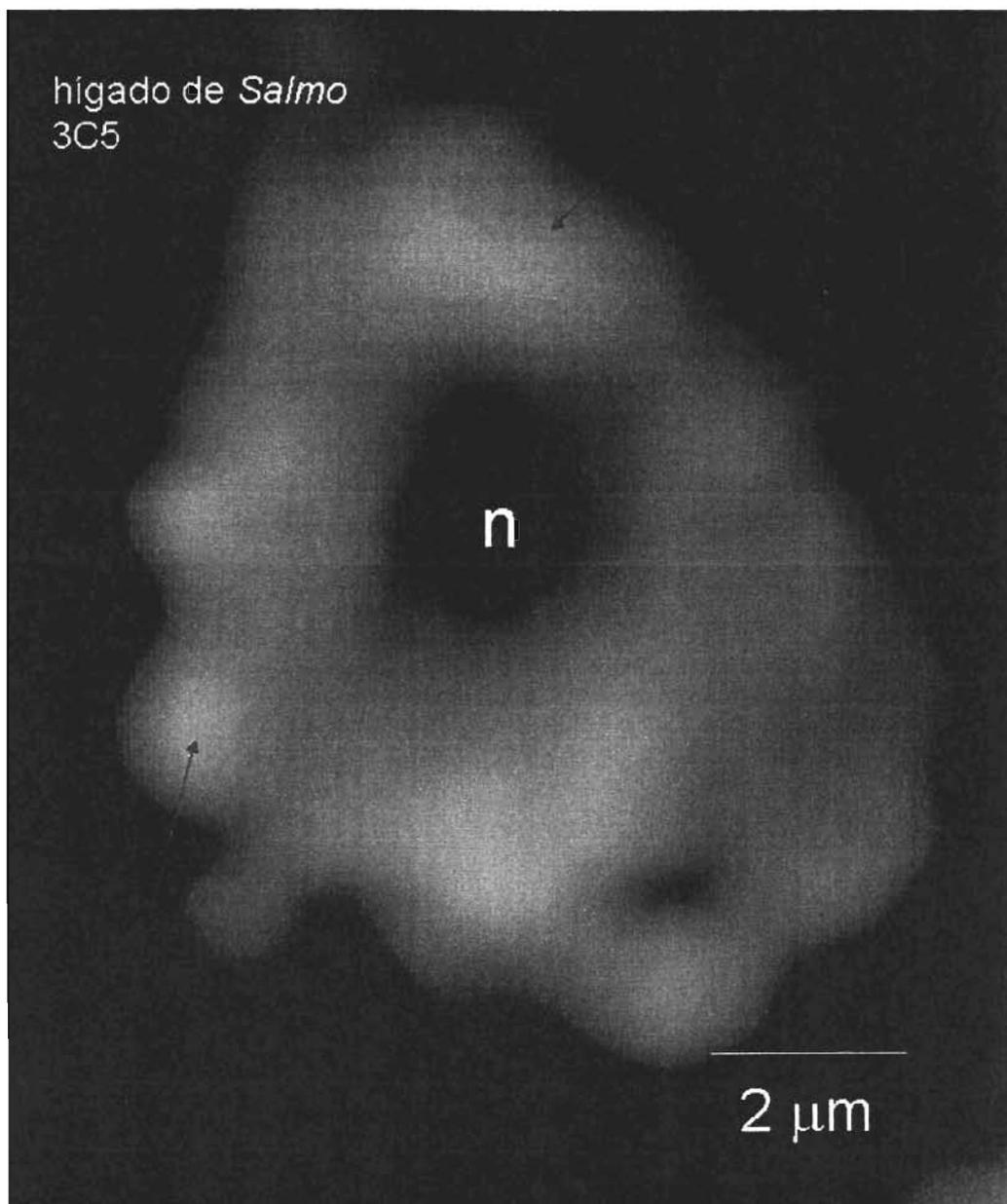


**Fig. 20** Inmunolocalización de proteínas SR en tejido hepático de pez óseo (*Salmo*). A) Tinción con H-E. B) Patrón moteado característico. C y D) Amplificación de un hepatocito positivo, motas de diferente tamaño y número (flechas blancas); flechas rojas señalan nucléo.

## INTESTINO DE *Salmo*

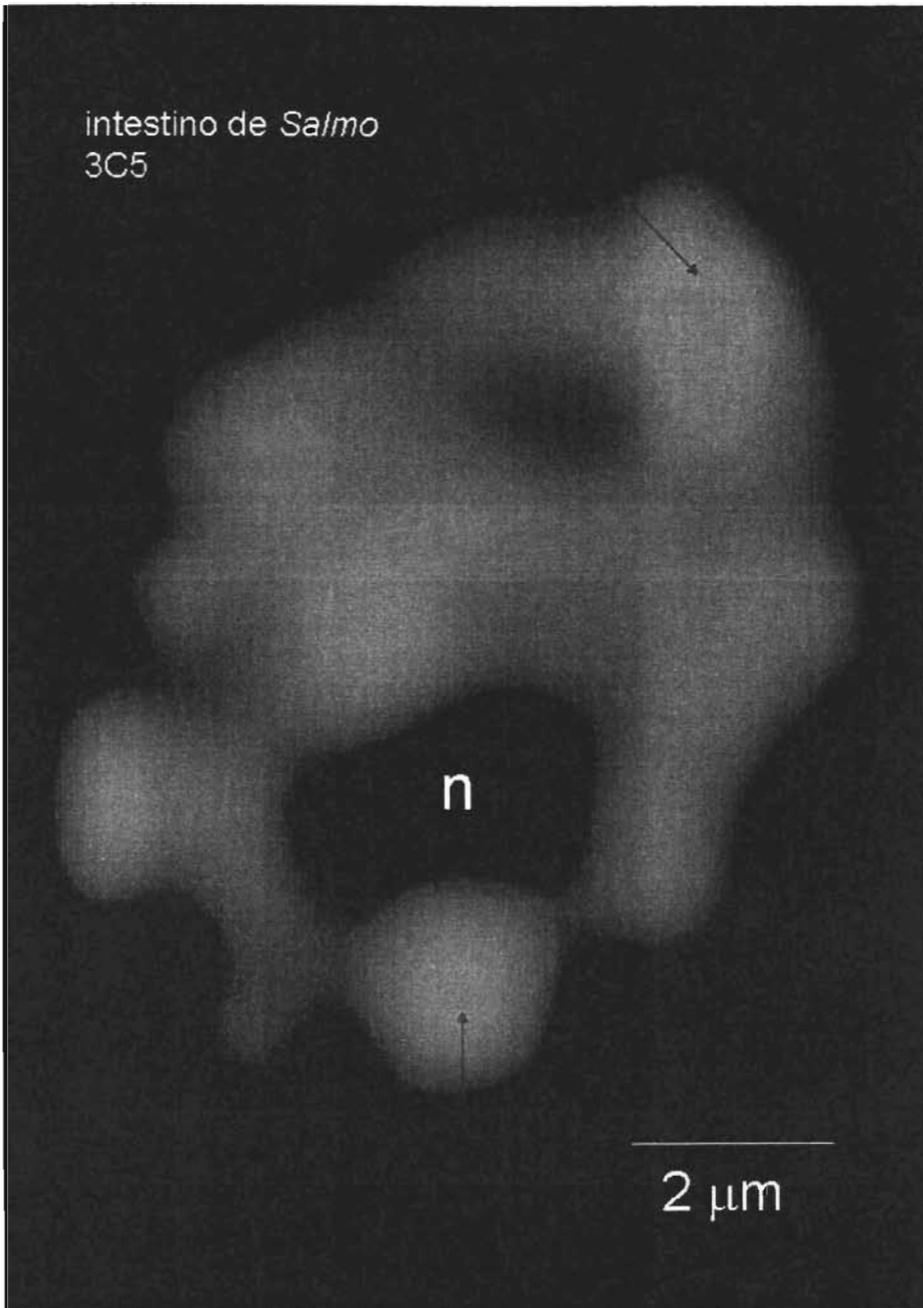


**Fig. 21** Inmunotinción positiva a 3C5 en epitelio intestinal de pez óseo (*Salmo*). **A)** Tinción con H-E. **B)** Obsérvese el gran número de motas en cada una de las células intestinales. **C y D)** Amplificación de célula intestinal individual, dónde claramente se aprecia la diferente morfología de cada una de las motas (flechas blancas).



**Fig. 22** Amplificación de (20D) célula hepática de pez óseo (*Salmo*). Las flechas rojas nos indican la gran variedad en la forma de las motas presentes.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



**Fig. 23** Amplificación de (21C) célula intestinal de pez óseo *Salmo*. Obsérvese la esfericidad casi perfecta de la mota (flecha roja).

## VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### EL PATRÓN MOTEADO EN VERTEBRADOS

El objetivo primordial de nuestro trabajo era conocer la organización de los factores de *splicing* no snRNPs pertenecientes a la familia de proteínas SR con un enfoque evolutivo. De acuerdo con los resultados en este trabajo, se muestra que la distribución intranuclear de factores de *splicing* pertenecientes a la familia de proteínas SR, se presenta en forma de un patrón moteado ya descrito para células en cultivo (Spector, 2001) y de tejidos de mamíferos (George-Téllez y cols., 2002) en los tejidos de varios vertebrados: peces óseos, anfibios y aves.

La distribución de estos factores incluye la presencia de varias zonas de tinción intensa de forma irregular embebidas en una tinción nucleoplásmica más difusa que excluye al nucléolo. Este patrón corresponde al patrón moteado (*speckled*) descrito para células de mamíferos (Spector, 1993). Debido a que la distribución de este patrón, en varios tejidos de peces, anfibios y aves es similar al descrito para mamíferos, se puede extender la presencia del patrón moteado a estos grupos de vertebrados, lo cual sugiere que este dominio estructural se originó por lo menos hace 400 millones de años.

Aún cuando el patrón moteado se había descrito para mamíferos, donde se reporta que su organización depende de la actividad transcripcional y del procesamiento del pre mRNA, no existían datos de qué tan general era esta distribución en otros grupos de vertebrados. En este trabajo mostramos evidencias de que la mayoría de factores de *splicing* está presente efectivamente en otros grupos y muestran un arreglo en motas rodeadas de un patrón de tinción difusa por lo que las observaciones en células en cultivo y en tejidos de mamíferos se pueden hacer extensivas a otros vertebrados. Esto sugiere que la compartimentalización de la maquinaria molecular del *splicing* se debe haber originado antes del surgimiento de los vertebrados.

Varios criterios se deben cumplir para establecer la presencia de un patrón moteado en los vertebrados:

- 1) La inmunolocalización de las proteínas SR después del procedimiento de inmunofluorescencia es intranuclear.
- 2) Las motas de tinción intensa están embebidas en un patrón difuso.
- 3) Las motas tienen forma irregular.
- 4) Varios tipos celulares presentan este patrón moteado.

Asimismo, es interesante que en otros vertebrados la distribución de los factores de *splicing* también se organizan en forma de “motas”. En efecto, estudios recientes del laboratorio indican que este patrón se observa en peces cartilagosos (Raya) (datos no publicados) y en peces Agnatos (*Lampetra*) (Lara-Martínez 2003). Más interesante aún es el hecho de que en otros cordados no vertebrados, como el balanogloso también se presenta el mismo patrón moteado (Moncayo, 2005). En conjunto, estos resultados muestran que los factores de *splicing* arreglados en un patrón moteado es una característica *sine qua non* de los cordados.

## CONCLUSION

En células de peces óseos, anfibios y aves, los factores de *splicing* de la familia de las proteínas SR se agrupa intranuclearmente en un patrón moteado que incluye grandes motas de forma irregular, de fluorescencia intensa, embebidas en un ambiente más difuso que excluye al nucléolo.

Lo anterior sugiere que, la existencia de factores de *splicing* en los dominios nucleares, llamados *speckles*, pueden haber favorecido la compartimentalización intranuclear del procesamiento del pre-mRNA.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Agredano-Moreno LT, Segura-Valdez ML, Zavala-Padilla TG, Jiménez-García LF. 2003:** “El retículo endoplásmico” En. *Biología Celular y Molecular*, Jiménez-García L.F. y Merchant H. Prentice Hall, México. 411-444.
2. **Beck JS. 1961:** Variations in the morphological patterns of “autoimmune” nuclear fluorescence. *Lancet* 1:1203-1206
3. **Bentley D. 1999:** Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA Current Opinion in Cell Biology 11:347-351.
4. **Blencowe BJ. 2000:** Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci.* 25(3)106-10.
5. **Bridge E, Carmo-Fonseca M, Lamond A, Pattersson U. 1993:** Nuclear organization of splicing small nuclear ribonucleoproteins in adenovirus-infected cells. *J Virol* 67:5792-5802.
6. **Cáceres JF, Krainer AR. 1993:** Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. *EMBO J* 12:4715
7. **Cáceres JF, Misteli T, Sreaton GR, Spector DL, Krainer AR. 1997:** Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol* 138:225-238.
8. **Carmo-Fonseca M. 2002:** The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation. *Cell* 108:513-521.
9. **Carmo-Fonseca M, Pepperkok R, Carvalho MT, Lamond AI. 1992:** Transcription –dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs in coiled bodies. *J.Cell Biol* 117:1-14.
10. **Carmo-Fonseca M, Platani Melpomeni, Swedlow JR. 2002:** Macromolecular mobility inside the cell nucleus. *Trends in Cell Biol* 12(11)491-494.
11. **Cho EJ, Kobor MS, Kim M, Greenblatt J, Buratowski S. 2001:** Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev.* 15(24)3319-29.
12. **Cho EJ, Rodriguez CR, Takagi T, Buratowski S. 1998:** Allosteric interactions between capping enzyme subunits and the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 15:3482-7.
13. **Cortés Hermosillo J. 2003:** Acido Ribonucleico, RNA. En “*Biología Celular y Molecular*”, Jiménez-García LF. Merchant H. Prentice Hall, México 23-41.

14. **Dahmus ME. 1996:** Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol Chem* 271:19009-19012.
15. **Dundr M, Misteli T. 2001:** Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J.* 356:297-310.
16. **Fakan S. 1994:** Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol.* 4:86-90.
17. **Fakan S, Lesser G, Martin TE. 1984:** Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J. Cell Biol* 98:358-362.
18. **Fakan S, Puvion E. 1980:** The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int Rev Cytol.* 65:255.
19. **Fakan S, Puvion E, Spohr G. 1976:** Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exp. Cell Res* 99:155.
20. **Fu XD. 1995:** The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA.* 7:663-680.
21. **Fu XD, Maniatis T. 1990:** Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* 343:437-441.
22. **Fu XD, Maniatis T. 1992:** Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science* 256:535-8
23. **Gall JG. 2000:** Cajal bodies: the first 100 years. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:273-300.
24. **Ge H, Manley JL. 1990:** A protein factor, ASF, controls alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* 62:25.
25. **George-Téllez R. 2000:** Organización de los factores de maduración del RNA pre-mensajero en distintos tipos celulares diferenciados en tejidos. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM.
26. **George-Tellez R, Segura-Valdez ML, González-Santos L, Jiménez-García LF. 2002:** Cellular organization of pre-Mrna splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by hormone action. *Biol. Cell* 94:99-108.
27. **Gore PJW 2004:** Ver referencia 2 de cibergrafía.
28. **Graveley BR. 2000:** Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA.* 6(9):1197-211.
29. **Gui JF, Lane WS, Fu XD. 1994:** A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369: 678-682.

14. **Dahmus ME. 1996:** Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol Chem* 271:19009-19012.
15. **Dundr M, Misteli T. 2001:** Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J.* 356:297-310.
16. **Fakan S. 1994:** Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol.* 4:86-90.
17. **Fakan S, Lesser G, Martin TE. 1984:** Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J. Cell Biol* 98:358-362.
18. **Fakan S, Puvion E. 1980:** The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int Rev Cytol.* 65:255.
19. **Fakan S, Puvion E, Spohr G. 1976:** Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exp. Cell Res* 99:155.
20. **Fu XD. 1995:** The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA.* 7:663-680.
21. **Fu XD, Maniatis T. 1990:** Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* 343:437-441.
22. **Fu XD, Maniatis T. 1992:** Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science* 256:535-8
23. **Gall JG. 2000:** Cajal bodies: the first 100 years. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:273-300.
24. **Ge H, Manley JL. 1990:** A protein factor, ASF, controls alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* 62:25.
25. **George-Téllez R. 2000:** Organización de los factores de maduración del RNA pre-mensajero en distintos tipos celulares diferenciados en tejidos. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM.
26. **George-Tellez R, Segura-Valdez ML, González-Santos L, Jiménez-García LF. 2002:** Cellular organization of pre-Mrna splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by hormone action. *Biol. Cell* 94:99-108.
27. **Gore PJW 2004:** Ver referencia 2 de cibergrafía.
28. **Graveley BR. 2000:** Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA.* 6(9):1197-211.
29. **Gui JF, Lane WS, Fu XD. 1994:** A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369: 678-682.

30. **Hamm J, Mattaj IW.** 1990: Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* 63:109-18
31. **Harris H.** 1999: *The birth of the cell*, Yale University Press, New Heaven.
32. **Hastings ML, Krainer AR.** 2001: Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Current Opinion in Cell Biology* 13:302-309.
33. **Hendezel M, Kruhlak M, Bazett-Jones D.** 1998: Organization of highly acetylated chromatin around sites of heterogeneous nuclear RNA accumulation. *Mol Biol Cell* 9:2491-2507.
34. **He W, Parker R.** 2000: Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Curr Opin Cell Biol.* 12:346-50.
35. **Huang S, Spector DL.** 1992: U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles. *PNAS USA* 89:305-308.
36. **Huang S, Spector DL** 1996: Intron-dependent recruitment of pre-mRNA splicing factors to sites of transcription *J. Cell Biol* 131:719-732.
37. **Izaurrealde E, Kutay U, Von Kobbe C, Mattaj IW, Gorlich D.** 1997: The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.* 16:6535-47.
38. **Jiménez-García LF, Spector DL.** 1993: In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73:47-59.
39. **Kardong, KV.** 1999: *Anatomía Comparada. Función, Evolución.* Mc Graw Hill. Interamericana. 2da. Ed. México.
40. **Kim JB, Sharp PA.** 2001: Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. *J Biol Chem.* 13:12317-23.
41. **Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S.** 2000: Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.* 14(19):2452-60.
42. **Krainer AR, Conway GC, Kozak D.** 1990: Purification and characterization of SF2, a human pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.* 6:837.
43. **Krainer AR, Maniatis T.** 1985: Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 42:725-736.

44. **Krämer A, Utans U. 1991:** Three protein factors (SF1, SF3 y U2AF) function in pre-splicing complex formation in addition to snRNPs. *EMBO J.* 10:1503.
45. **Krämer A, Keller BW, Appel K, Lührmann R. 1984:** The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* 38:299-307.
46. **Lara-Martínez Reyna. 2003:** Organización Celular de Factores de *Splicing* en Vertebrados Primitivos. Tesis M en C (Biología Experimental).Facultad de Ciencias UNAM.
47. **Lemmer EA, Lemmer MR, Janeway CA, SteitzJA. 1981:** Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. *PNAS USA* 78:2737-2741.
48. **Lewin B. 2000:** Genes VII. Oxford University Press Inc., New York.
49. **Lodish H, Berck A, Zipursky LS, Matsudaidra P, Baltimore D, Darnell J. 2000:** Biología Celular y Molecular, Edit Panamericana.
50. **Maniatis T, Reed R. 2002:** An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*; 416:499-506. Review.
51. **Manley JL, Tacke R. 1996:** SR proteins and *splicing* control. *Genes Dev* 10:1569-1579.
52. **McCarty M. 2003:** Discovering genes are made of DNA. *Nature* 421:406.
53. **Melcak I, Cermanova S, Jirsova K, Koberna K, Malinsky J, Raska I. 2000:** Nuclear pre-RNA compartmentalization:trafficking of released transcripts to splicing factor reservoirs. *Mol Biol Cell* 11:497-510.
54. **Melki J. 1997:** Spinal muscular atrophy. *Curr Opin Neurol* 10:381-385.
55. **Mermoud JE, Cohen PT, Lamond AI. 1994:** Regulation of mammalian *spliceosoma* assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J.* 13:5679-5688.
56. **Mintz PJ, Spector DL. 2000:** Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles. *J. Struct. Biol.* 129:241-251.
57. **Miriami E, Motro U, Sperling J, Sperling R. 2002:** Conservation of an open-reading frame as an element affecting 5' splice site selection 140:116-122.
58. **Misteli T. 2000:** Cell Biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci* 113:1841-1849.
59. **Misteli T, Cáceres JF, Spector DL 1997:** The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387:523-527

60. **Misteli T, Spector DL. 1997:** Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trend Cell Biol* 7:135-138.
61. **Misteli, T, Spector DL. 1999:** RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol. Cell* 3:697-705.
62. **Moncayo Sahabún, J.J. 2005:** Distribución de Factores de *splicing* en el hemicordado *Balanoglossus* sp. Tesis M en C (Biología). Facultad de Ciencias UNAM:
63. **Monneron A, Bernhard W. 1969:** Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res* 27:266.
64. **Murray M, Kobayashi R, Krainer AR. 1999:** The type 2C Ser/Thr phosphatase PP2Cgamma is a pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev.* 13:87-97.
65. **Nickerson J. 2001:** Experimental observations of a nuclear matrix. *J.Cell Sci* 114:463-474.
66. **O'Keefe RT, Mayeda CL, Sadowski AR, Krainer, Spector DL. 1994:** Disruption of pre-mRNA *splicing* in vivo results in reorganization of splicing factors. *J. Cell Biol* 124:249-260.
67. **Padgett RA, Mount SM, Steitz JA, Sharp PA. 1983:** Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell.* 35:101-107.
68. **Paushkin S, Gubitza KA, Massenet S, Dreyfuss G. 2002:** The SMN complex, an assembly of ribonucleoproteins. *urr Op Cell Biol* 14:305-312.
69. **Phair RD, Misteli T. 2000:** High mobility of proteins in the nucleus of mammalian cells. *Nature* 404:604-609.
70. **Price DH. 2000:** P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.*20(8):2629-34.
71. **Puvion E, Viron EA, Assens C, Ledue EH, Jeanteur P. 1984:** Immunocytochemical identification of nuclear structures containing SnRNPs in isolated rat liver cells. *J. Ultrastruct Res* 87:180-189.
72. **Reed R. 2000:** Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing *Current Opinion in Cell Biology* 12:340-345.
73. **Reed R. 2003:** Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology* 15:326-331.

74. **Reichert VL, Le Hir, Jurica MS, Moore MJ. 2002:** 5'exon interactions within the human spliceosome establish a framework for exon junction complex structure and assembly. *Genes Dev* 16:2778-2791.
75. **Robert F, Blanchette M, Maes O, Chabot B, Coulombe B. 2002:** A human RNA polymerase II-containing complex associated with factors necessary for spliceosome assembly. *J Biol Chem.* 277(11):9302-6.
76. **Ruskin B, Zamore PD, Green MR. 1988:** A factor U2AF, is necessary for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. *Cell* 52:207.
77. **Sacco-Bubulya P, Spector DL. 2002:** Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* 156:425-436.
78. **Schroeder SC, Schwer B, Shuman S, Bentley D. 2000:** Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* 14:2435-40.
79. **Sleeman JE, Lamond AI. 1999:** Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr Biol.* 9:1065-74.
80. **Spector DL. 1990:** Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:147-151.
81. **Spector DL. 1993:** Macromolecular domains within the cell nucleus. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:265-315.
82. **Spector DL. 2001:** Nuclear domains *J. Cell Sci.* 114:2891-2893.
83. **Spector DL, Fu XD, Maniatis T. 1991:** Associations between distinct pre mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J* 10:3467-3481.
84. **Spector DL, O'Keefe RT, Jiménez-García LF. 1993:** Dynamics of transcription and pre-mRNA splicing within within the mammalian cell nucleus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58:799-805.
85. **Spector DL, Schrier H, Busch WH. 1983:** Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol, Cell* 49:1-10.
86. **Tacke R, Manley JL. 1999:** Determinants of SR protein specificity. *Curr Opin Cell Biol.* 3:358-62.

87. **Trigon S, Serizawa H, Conaway JW, Conaway RC, Jackson SP, Morange M. 1998:** Characterization of the residues phosphorylated in vitro by different C-terminal domain kinases. *J Biol Chem* 273(12):6769-75.
88. **Turner B.M. & Franchi L. 1987:** Identification of protein antigens associated with the nuclear matrix and with clusters of interchromatin granules in both interphase and mitotic cells. *J Cell Sci* 87: 269-282.
89. **Vázquez N GH, Echeverría M OM, Jiménez-García LF. 2003:** “El núcleo interfásico, morfología y función. En. *Biología Celular y Molecular*, Jiménez-García LF y Merchant H. Prentice Hall, México. 341-394.
90. **Wada H, Satoh N. 1994:** Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18s rDNA. *PNAS USA* 91:1801-1804.
91. **Wada T, Takagi T, Yamaguchi Y, Watanabe D, Handa H. 1998:** Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *EMBO J.* 17(24):7395-403.
92. **Will CL, Luhrmann R. 2001:** Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 3:290-301.
93. **Zamore PD, Green MR. 1989:** Identification, purification and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 86:9243.
94. **Zhang G, Taneja, KL, Singer RH, Green MR. 1994:** Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei. *Nature* 372:809-812.
95. **Zhou Z., Lawrence JL, Gygi SP, Robin Reed. 2002:** Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome *Nature* 419: 182-185.
96. **Zhu J, Krainer AR. 2000:** Pre-mRNA splicing in the absence of an SR protein RS domain. *Genes Dev.* 14:3166-78.

## **CIBERGRAFÍA**

1. <http://www.fmnh.helsinki.fi/users/haaramo/Metazoa/Deuterostoma/Chordata/Chordata.htm>
2. [http://gpc.edu/~pgore/geology/historical\\_lab/evolutionofvertebrates.htm](http://gpc.edu/~pgore/geology/historical_lab/evolutionofvertebrates.htm)
3. <http://www.paleos.com/Vertebrates/Lists/Cladograms/00Cladograms.html>