

ORGANIZACIÓN INTRANUCLEAR DE PROTEÍNAS SR EN VERTEBRADOS

María de Lourdes Segura-Valdez*, Cristina Negrete García, Yamilka Rodríguez Gómez¹, Ana Sáenz Ochotorena¹, Reyna Lara Martínez**, José de Jesús Moncayo Sahagún², Claudina María Gómez Arizmendi, Luis F. Jiménez-García***

*Laboratorio de Nanobiología Celular, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM. Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F. E-mails: *mlsv@hp.fcencias.unam.mx,*

***rlm@hp.fcencias.unam.mx, ***lfjg@hp.fcencias.unam.mx. Dirección permanente: ¹Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba; ²Colegio de Ciencias y Humanidades-Oriente, UNAM.*

RESUMEN

En eucariotes, el mRNA se forma a partir de un transcrito primario o pre-mRNA que madura mediante tres pasos que son la 7-metil-guanilación del extremo 5', la poliadenilación del extremo 3' y el splicing o corte de intrones y ligado de los exones resultantes. Estos pasos requieren de diversos factores cuya organización celular observada con el microscopio de epifluorescencia corresponde a una distribución intranuclear conocida como patrón moteado (speckles), que incluye regiones de distribución concentrada (motas) y difusa en el nucleoplasma. La morfología de este patrón cambia en función de la actividad transcripcional y de splicing tanto en células en cultivo como en tejidos de mamíferos. En este trabajo utilizamos inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales contra la familia de factores de splicing SR y mostramos que este patrón moteado también se presenta en células de tejidos de otros vertebrados como peces, anfibios, reptiles, aves y en otros cordados como el *Balanoglossus*. Los resultados muestran que el patrón moteado también es característico de cordados no mamíferos.

Palabras Clave: Núcleo, proteínas SR, speckles, splicing, vertebrados.

ABSTRACT

In eukaryotes, mRNA is produced as a primary transcript or pre-mRNA which matures in a three step process: 1st) addition of the 7 meG group to end 5'; 2nd) end 3' polyadenylation; 3rd) splicing. For these steps to take place, several factors are required. The cellular organization of such factors corresponds to a distribution called speckled pattern as observed by means of an epifluorescence microscopy. In addition, the morphology of this pattern presents some changes in relation to transcriptional and splicing activities in both culture and tissue cells. In the study reported here, we employed indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies against SR proteins. It was shown that the speckled pattern is present in the cells of all vertebrates analyzed. Moreover, the pattern is also present in the hemichordate *Balanoglossus*. The results suggest that the speckled pattern may be a nuclear characteristic of nonmammal chordates.

Key Words: Nucleus, SR proteins, speckles, splicing, vertebrates.

INTRODUCCIÓN

En eucariotes, la expresión de genes tiene lugar a través de la síntesis de una molécula precursora de mRNA (pre-mRNA) que requiere, de manera esencial, ser procesada para su maduración, salida del núcleo y traducción a proteína en el citoplasma. El proceso de

maduración incluye la adición de un “capuchón” de 7 metil-guanosina en el extremo 5', la adición de una secuencia de adeninas (~250 bp) en el extremo 3' y la eliminación de intrones y unión de exones a través del splicing. El proceso de splicing ocurre mediante dos pasos de transesterificación que requieren de la participación de múltiples factores proteicos y de RNAs que se ensamblan secuencialmente en una estructura ribonucleoproteica conocida como spliceosoma¹. Entre estos

factores que intervienen en el splicing se encuentran las snRNPs (U1snRNP–U6snRNP) y las proteínas no-snRNP. Estas últimas están formadas por dos familias: a) la familia HnRNPs y b) la familia de proteínas SR, ricas en serina y arginina que les confiere la capacidad de asociarse con otros factores de splicing y son reguladas por fosforilación².

El mapeo a nivel celular se realiza utilizando marcaje con anticuerpos o sondas que reconocen factores de splicing, el arreglo de estos factores se observa en forma de un patrón que consta de zonas de intensa marca y que corresponde a las motas (“speckles”) embebidas en un ambiente de tinción homogénea y difusa (patrón difuso)¹⁻⁴. Por microscopía electrónica, también por inmunomarcaje, se sabe que esas regiones corresponden a cúmulos de partículas ribonucleoproteicas conocidas como gránulos de intercromatina y fibras de pericromatina⁵.

La presencia del patrón moteado en núcleos de células de mamíferos en cultivo está bien documentada. Además, en la literatura existen varios trabajos publicados en los que se muestran, mediante diferentes ensayos experimentales, que la morfología de las motas o “speckles” varía de acuerdo con la actividad transcripcional y de splicing, lo que ha permitido generar un modelo que propone que, en células transcripcionalmente activas, las motas son irregulares de forma y están embebidas en un ambiente difuso abundante; por el contrario, si la célula es inactiva en transcripción, las motas son redondas, compactas y brillantes y el patrón difuso es menos evidente o no se presenta⁶⁻⁸. Recientemente la presencia del patrón moteado ha sido documentada también para células que forman parte de un tejido. Más aún, la morfología de estos dominios nucleares también cambia con la actividad de transcripción y splicing de la célula durante el ciclo estral de la rata⁹.

Los trabajos anteriores muestran que la morfología de los dominios intranucleares relacionados con el splicing están organizados en forma de un patrón moteado (“speckled pattern”) tanto en células en cultivo como en células en tejidos de mamíferos. Sin embargo, no se conoce si este patrón se presenta en células de otros vertebrados.

En este trabajo mostramos que el patrón moteado está presente en diferentes tipos celulares de varios tejidos provenientes de pollo, lagartija, sapo y ranas, pez óseo, lamprea y el hemicordado *Balanoglossus*. Los resultados permiten ampliar la presencia de esta estructura celular en otros grupos de animales diferentes de los mamíferos y que pertenecen al Orden de los Cordados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico. Se obtuvieron porciones de tejido hepático e intestinal de pollo de engorda (*Gallus domesticus*), lagartija (*Sceloporus bicanthalis*), sapo (*Bufo marinus*), pez óseo (*Salmo sp.*), gónadas de rana (*Eleutherodactylus riparius*);

notocorda, espina dorsal e hígado de lamprea (*Lampetra geminis*) y el hemicordado balanogloso (*Balanoglossus*). Las muestras fueron procesadas con las técnicas convencionales para histología con inclusión en parafina, con modificaciones. Brevemente las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS (Phosphate Buffered Saline), deshidratadas en alcoholes graduales, aclaradas en xilol e incluidas en parafina. De los bloques de tejido se obtuvieron cortes de 3 a 5 µm de espesor y se montaron en portaobjetos silanizados (Sigma).

Inmunodetección. Se llevó a cabo de acuerdo con procedimientos descritos anteriormente⁹. Brevemente, en la inmunofluorescencia indirecta, se utilizó el anticuerpo monoclonal 3C5¹⁰ contra la familia de proteínas SR (proporcionado por el Dr. D. Spector, del Cold Spring Harbor, New York) y como anticuerpo secundario un anti-IgG de ratón acoplado con fluoresceína (Dako). En los ensayos con los tejidos de lamprea y lagartija, se realizó inmunolocalización indirecta con enzimas cromogénicas utilizando el mismo anticuerpo primario y anti-IgG de ratón acoplado con fosfatasa alcalina, como anticuerpo secundario. Para revelar la reacción se utilizó Fast-Red como cromógeno. Ambos procedimientos incluyeron un pre-tratamiento enzimático con proteinasa K (Dako). Las preparaciones con inmunofluorescencia se montaron con vectashield (Vector) y se observaron con un microscopio óptico con aditamento de epifluorescencia (Nikon, Eclipse E800). Dado que el precipitado que se obtiene de la interacción entre la fosfatasa alcalina y el cromógeno Fast Red produce una fuerte fluorescencia roja¹¹, el registro de los resultados obtenidos en las muestras en las que se utilizó detección cromogénica se realizó tanto en campo claro como con epifluorescencia. En todos los casos, las imágenes se registraron digitalmente con una cámara CCD (3CCD, MTI) acoplada al microscopio con el programa FlashPoint 3D FPG.

RESULTADOS

En todos los tipos celulares de los diferentes organismos estudiados se observó el patrón moteado o speckled para los factores de splicing (Figura 1). Las motas presentan variaciones en tamaño y forma, así como, en intensidad de marcaje (Figura 1 o, p, q, r). La región del nucléolo se presenta negativa a la tinción y las motas se encuentran embebidas en un ambiente de marcaje difuso. Estos resultados son similares tanto con marca fluorescente como cromogénica. A pesar de los diferentes tamaños celulares, el patrón moteado persiste.

En la Figura 1a se observa un núcleo de una célula epitelial del balanogloso. El marcado fluorescente incluye motas discretas en un nucleoplasma marcado intensamente. En lamprea (Figura 1b-d), con marcado cromogénico, las motas en varios tipos celulares incluyendo notocorda (Figura 1b), hígado (Figura 1c) y cuerda dorsal (Figura 1c), son discretas. En células del epitelio del intestino (Figura 1f) y en hepatocitos (Figura 1g) de pez óseo, se presenta este mismo patrón, aunque hay diferencias en el tamaño de las motas. En ovario de rana (Figura 1h), intestino

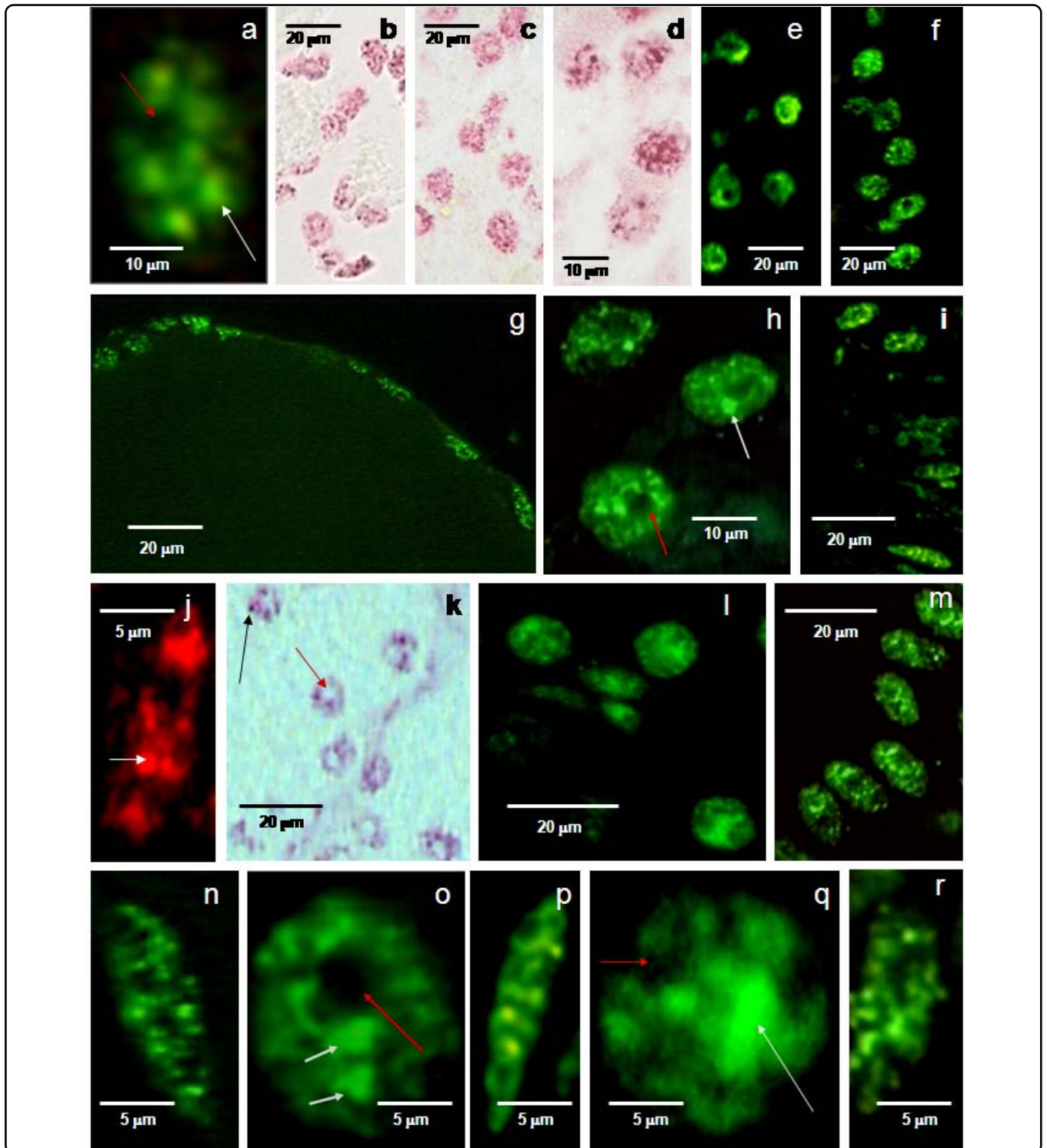


Figura 1. Inmunolocalización fluorescente y cromogénica de factores de splicing en diferentes tejidos de varios vertebrados y de balanoglosso. a) Epitelio corporal de balanoglosso (*Balanoglossus*); b) notocorda, c) hígado y d) cuerda dorsal de lamprea (*Lampetra geminis*); e) hígado e f) intestino de pez óseo (*Salmo* sp.); g) ovario de rana (*Eleutherodactylus riparius*); h) hígado e i) intestino de sapo (*Bufo* sp.); j) intestino e k) hígado de lagartija (*Sceloporus bicanthalis*); l) hígado e m) intestino de ave (*Gallus gallus*). La inmunodetección se realizó con fluorocromos (a, e, f, g, h, i, l y m) y con enzimas cromogénicas (b, c, d, j y k), utilizando el cromógeno Fast Red. Las imágenes que se muestran en n-r ilustran el detalle del patrón moteado en núcleos individuales: célula epitelial de ovario de rana (n); hepatocito y célula del epitelio intestinal de sapo (o y p, respectivamente); y hepatocito y célula epitelial del intestino de ave (q y r, respectivamente). En todas las imágenes la región de los nucléolos muestran negatividad a la reacción (flecha roja) y el tamaño, forma, distribución y número de las motas varía (flechas blancas) aún en un mismo tipo celular.”

(Figura 1i) e hígado (Figura 1j) de sapo, las motas se definen más. En reptiles como la lagartija (Figura 1k, l) tanto en células epiteliales como en hepatocitos, utilizando marcaje cromogénico, también se presentan motas discretas, tanto en observación con epifluorescencia (Figura 1k) como en campo claro (Figura 1l). En aves ocurre lo mismo (Figura 1m-n). Se muestra un núcleo representativo de balanogloso (Figura 1o), pez óseo (Figura 1p), rana (Figura 1q), lagartija (Figura 1r) y ave (Figura 1s).

DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizaron anticuerpos monoclonales¹⁰ contra los factores de splicing de la familia SR en diferentes tejidos de varios vertebrados y se muestra que en el núcleo se presenta una distribución que corresponde al patrón moteado observado en células de mamíferos. Los criterios para afirmar que se trata de un patrón moteado auténtico son los siguientes: 1) la distribución de la marca es intranuclear, 2) el marcaje no incluye al nucléolo, 3) la marca se presenta como dos regiones intranucleares: una de marca intensa en regiones discretas (motas o "speckles") y otra en forma de tinción difusa en la que están embebidas las regiones de mayor concentración (patrón difuso). Además, a pesar de que no se conoce el estado transcripcional de cada tipo celular, se observó que la marca se presenta en algunas células en forma de motas irregulares o bien redondas, como lo que se observa en células en cultivo, con diferente actividad transcripcional o en células sometidas a diferente ambiente hormonal¹⁻⁹. Estudios posteriores con el microscopio electrónico podrán revelar si el patrón moteado observado en estos grupos de vertebrados, también están formados por partículas ribonucleoproteicas. Trabajos previos de otros investigadores sugieren que este puede ser el caso¹². En efecto, se ha observado que en el núcleo de gran cantidad de especies, las ribonucleoproteínas intranucleares son diversas, e incluyen partículas fibrosas y granulares, algunas de las cuales podrían corresponder a las descritas en células de mamíferos. Por ejemplo, las fibras pericromatinianas están presentes en todas las especies estudiadas a la fecha¹². Este tipo de fibras corresponde a la parte difusa del patrón moteado^{1,4}. Sin embargo, la parte de las motas, que corresponde a los llamados gránulos de intercromatina, no ha sido observada en otros animales. Estudios con el microscopio electrónico de transmisión y técnicas de detección de ribonucleoproteínas podrá ayudar a conocer si las motas de las especies usadas en este estudio contienen gránulos de intercromatina o se puede tratar de otras partículas nucleares similares presentes en el grupo de las plantas, como los gránulos de *Lacandonia*¹³.

La presencia de un patrón moteado para los factores de splicing se ha reportado recientemente para otras especies como la mosca *Drosophila melanogaster* y la planta *Arabidopsis thaliana*¹⁴⁻¹⁵. En *Arabidopsis*, por ejemplo, los primeros reportes indicaron que la morfología del patrón moteado dependía de la actividad transcripcional y de splicing de las células, similar a como ocurre con las células de mamífero¹⁶. Estos datos sugieren la posibilidad

de que la organización intracelular de los factores de splicing en un patrón moteado, incluidas las proteínas SR, puede estar ampliamente presente en los eucariontes.

CONCLUSIÓN

Los factores de splicing no snRNPs pertenecientes a la familia de proteínas SR están presentes en los núcleos de balanogloso, lamprea, pez óseo, anfibios, reptiles y ave. Estos factores se organizan en forma de un patrón moteado similar a lo descrito en células en cultivo y de tejidos de mamífero, lo que permite extender la presencia del patrón moteado a estos grupos de vertebrados y sugerir que el arreglo de los factores de splicing en un patrón intranuclear moteado es una característica que se presenta en todos los núcleos de células de tejidos de los grupos de animales vertebrados y de los cordados.

AGRADECIMIENTOS

El laboratorio tiene financiamiento de DGAPA-UNAM PAPIIT IN-206307. Agradecemos al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM a través del programa de doctorado conjunto con la Universidad de la Habana por su apoyo para los estudios de doctorado de Yamilka Rodríguez Gómez. También a Guadalupe Hiriart y Miguel Gaxiola del INER por el apoyo para realizar las preparaciones histológicas. Al Dr. David L. Spector, del Cold Spring Harbor Laboratory, New York, por el anticuerpo 3C5. Y a la Dra. Maricela Villagrán de la Facultad de Ciencias de la UNAM que amablemente nos proporcionó tejido de lagartija. Y al M. en C. Gerardo Rivas de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por proporcionarnos ejemplares de balanogloso.

REFERENCIAS

1. Jiménez-García, L.F., *et al.* Biología celular del splicing. *Mensaje bioquímico* **31**, 141-156 (2007).
2. Misteli, T. & Spector, D.L. Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trends in Cell Biol* **7**, 135-138 (1997).
3. Mintz, P.J. & Spector, D.L. Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles. *J. Struct. Biol.* **129**, 241-251 (2000).
4. Spector, D.L. Nuclear domains. *J. Cell Sci.* **114**, 2891-2893 (2001).
5. Spector, D.L., Fu, X.D. & Maniatis, T. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J* **10**, 3467-3481 (1991).
6. Jiménez-García, L.F. & Spector D.L. *In vivo* evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* **73**, 47-59 (1993).
7. O'Keefe, R.T., Mayeda, A., Sadowski, C.L., Krainer, A.R. & Spector, D.L. Disruption of pre-mRNA splicing *in vivo* results in reorganization of splicing factors. *J Cell Biol* **124**, 249-260 (1994).
8. Misteli, T., Cáceres, J.F. & Spector, D.L. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* **387**, 523-527 (1997).
9. George-Tellez, R., Segura-Valdez, M.L., González-Santos, L. & Jiménez-García, L.F. Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by

- hormone action. *Biol. Cell* **94**, 99-108 (2002).
10. Turner, B.M. & Franchi, L. 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 (1987).
 11. Murdoch, A., Jenkinson, E.J., Johnson, G.D. & Owen, J.J. Alkaline phosphate-fast red, a new fluorescent label. *J. Immunon. Methods* **132(1)**, 45-49 (1992).
 12. Jiménez-García, L.F., *et al.* Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi, and protoctists. *BioSystems* **22**, 103-116 (1989).
 13. Jiménez-García, L.F., *et al.* The ultrastructural study of the interphase nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle. *Biol Cell* **75**, 101-110 (1992).
 14. Yuan, L., *et al.* Identification of RNA binding sequences of Drosophila SR protein dx16. *Mol. Cell Biochem.* **302**, 119-124 (2007).
 15. Tillemans, V., Leponce, I., Rausin, G., Dispa, L. & Motte, P. Insights into nuclear organization in plants as revealed by the dynamic distribution of *Arabidopsis* SR splicing factors. *Plant Cell* **18**, 3218-3234 (2006).
 16. Fang, Y., Hearn, S. & Spector, D.L. Tissue-specific expresión an dynamic organization of SR splicing factors in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2664-2673 (2004).