



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Análisis de la localización y dinámica de la  
fibrilarina**

Tesis que presenta

Cecilia Aquino Pérez

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2016



*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Cecilia Aquino Pérez titulado “Análisis de la localización y dinámica de la Fibrilarina”, fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas en la línea Morfogénesis y regulación génica, en el laboratorio N°23 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

---

Dr. Manuel Martínez Estévez  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 19 de Octubre del 2016.



## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_

Cecilia Aquino Pérez



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Estudio funcional de la unión entre fibrilarina y fosfolípidos de inositol involucrados en la síntesis de ARN ribosomal”, bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna (CONACyT, número 176598).



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Dirección adjunta de Posgrado y Becas, por haberme otorgado la beca nacional (Nº338240) para mis estudios de posgrado nivel Maestría, así como al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por las instalaciones prestadas, tanto para el desarrollo de mi trabajo experimental como para el curso del material académico, apoyos sin los cuales la realización de esta tesis y la culminación de mis estudios de Maestría habrían sido imposibles.

A la Dirección de Docencia del Centro de Investigación Científica de Yucatán y a la oficina de Vinculación y Movilidad Estudiantil, por el apoyo recibido en forma de becas (Nº290936 y Nº291062) para la realización de dos estancias de investigación (Agosto – Septiembre, 2015 y Mayo – Julio, 2016), ambas en el *Institute of Molecular Genetics of the ASCR* en Praga, República Checa. En dichas estancias se realizó el trabajo en células humanas, la obtención de imágenes en microscopios de superresolución (Figuras 3.18, 3.19, 3.20, 3.21 y 3.29) y los experimentos de fotoblanqueo (Figuras de la 3.30 a la 3.35).

A mi asesor el Dr. Enrique Castaño de la Serna, por darme la oportunidad de unirme a su equipo de trabajo y brindarme su apoyo, y ser mi guía desde los principios de mi formación como científica, por creer en mí y darme la oportunidad de formar parte de su equipo y contribuir, aunque sea con una pequeña pieza del rompecabezas que intenta descifrar. A la Dra. María de Lourdes Miranda Ham por su apoyo, paciencia y tiempo dedicados a mi formación científica, por proporcionarme herramientas clave para el desarrollo de mi proyecto, por mostrarme que el camino de la ciencia no es fácil, pero es inmensamente gratificante. A la Dra. Ileana Echevarría Machado, por su excelente disponibilidad para resolver mis dudas y su apoyo incondicional en todo momento, ya fuera con material y equipos para mis experimentos o asesorías personales en su oficina. Gracias a ambas por ser una figura modelo de lo que aspiro lograr profesionalmente. Al Dr. Dimitris Georgellis, que desde lejos aportó ideas y opiniones fructíferas para mi proyecto y mi formación profesional. Y en conjunto, gracias a mi comité tutorial, por estos 2 años de trabajo, que si bien no fueron fáciles, fueron productivos y laboralmente estimulantes.

A la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, por su apoyo como coordinadora del posgrado en Ciencias Biológicas con opción en Bioquímica y Biología Molecular, por ser un ejemplo de temple y fortaleza. Gracias al M. en C. Armando Muñoz Sánchez, por su invaluable ayuda y excelentes consejos.

A la M. en C. Ángela Kú González, por su amistad y apoyo, tanto laboral como moral. A la Ing. Wilma Aracely González, por su apoyo logístico y de trabajo en el laboratorio. A la M. en C. Lizbeth A. Castro Concha, por el material y las explicaciones proporcionadas, por su amabilidad, gentileza y paciencia. Al Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata de la Unidad de Biotecnología y a su estudiante de doctorado el M. en C. Samuel Gamboa, ya que sin su valiosa ayuda y excelente disposición no habría sido posible la culminación de mi trabajo experimental.

Y por último, Al equipo de trabajo del laboratorio 23 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por apoyar muy a su estilo, y compartir los días de trabajo, las fallas, los errores y los aciertos.



## **DEDICATORIAS**

La realización de esta tesis no habría podido llevarse a cabo sin el apoyo incondicional de mi familia. Le dedico ésta tesis a mi padre, el M. en C. Abraham Aquino Carreño, por todo su amor y por la educación que me ha dado durante toda mi vida. Gracias por ayudarme a forjar un pensamiento crítico, escéptico y científico, por darme el sentido de responsabilidad con mi comunidad y con la naturaleza, por enseñarme a amar y apreciar todas las formas de vida que hay en este planeta, por mostrarme que siempre hay algo más que descubrir, algo más que observar, algo más que aprender. Gracias por las largas caminatas en las tardes con nuestra amada mascota, en las que charlábamos de ciencia y la vida, de tus experiencias pasadas, de tu juventud y de mi futuro y de cómo trabajar día a día para así poder lograr mis sueños.

También dedico ésta tesis a mi madre, Gloria Esther Pérez Torres, de quien aprendí a siempre dar lo mejor de mí en todo trabajo, proyecto, tarea, en demostrar en cada pequeño detalle toda mi capacidad. Gracias por haber sido y seguir siendo mi mejor amiga, mi protectora y por siempre tener una sonrisa y un gesto amable para sanar y alegrarme el día. Siguiendo tu ejemplo, aprendí a manejarme siempre por los valores de honestidad, rectitud, objetividad y congruencia en mi pensar y actuar, y sobre todo, aprendí que la dulzura y la amabilidad son grandes fortalezas. Gracias por todo tu inmenso amor, pues es gracias a ese amor es que he logrado todo lo que soy hasta este día.

---

---

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES .....	3
1.1 EL NÚCLEO, CENTRO DE INFORMACIÓN DE LA CÉLULA .....	3
1.2 ORGANIZACIÓN INTERNA DEL NÚCLEO: REGIONES INTRANUCLEARES .....	4
1.3 LA DINÁMICA NUCLEAR IMPLICA LA INTERACCIÓN ENTRE LOS DOMINIOS INTRANUCLEARES.....	9
1.4 EL NUCLEOLO .....	10
1.4.1 BASES ESTRUCTURALES DEL NUCLEOLO.....	11
1.4.2 DINÁMICA DEL NUCLEOLO.....	14
1.5 LOS CUERPOS CAJALES, DOMINIOS PLURIFUNCIONALES.....	14
1.5.1 LA DINÁMICA DE LOS CUERPOS CAJALES .....	16
1.6 EL NUCLEOLO Y LOS CUERPOS CAJALES.....	16
1.7 LA FIBRILARINA .....	18
1.7.1 FUNCIONES DE LA FIBRILARINA .....	18
1.7.2 DOMINIOS DE LA FIBRILARINA .....	19
1.7.3 LA FIBRILARINA EN PLANTAS .....	20
1.7.4 DINÁMICA DE LA FIBRILARINA ENTRE EL NUCLEOLO Y LOS CUERPOS CAJALES.....	21
1.8 ESTUDIO DE LA DINÁMICA PROTEICA POR MEDIO DE REPORTEROS FLUORESCENTES Y TÉCNICAS DE FOTOBLANQUEO.....	22

---

---

1.8.1 FRAP: ENSAYO DE RECUPERACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DESPUÉS DE FOTOBLANQUEO .....	23
1.8.2 MODELOS CINÉTICOS DE DIFUSIÓN PROTEICA O CURVAS DE RECUPERACIÓN DE LA FLUORESCENCIA .....	24
HIPOTESIS .....	26
OBJETIVOS GENERALES .....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
JUSTIFICACIÓN .....	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
CAPÍTULO II.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
2.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE LA FIBRILARINA .....	29
2.1.1 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE FIBRILARINA REPORTADAS EN PLANTAS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS .....	29
2.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR BINARIO PK7RWG2,0::CCFIB PARA LA EXPRESION DE LA FIBRILARINA DE <i>C. CHINENSE</i> ACOPLADA A UNA RFP .....	30
2.2.1 OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA DE FIBRILARINA DE <i>CAPSICUM</i> .....	30
2.2.2 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE FIBRILARINA DE <i>C. CHINENSE</i> .....	30
2.2.2.1 LIGACIÓN DE PRODUCTO DE PCR EN PJET1.2/BLUNT®.....	31
2.2.2.2 SECUENCIACIÓN DE CLONAS POSITIVAS Y VERIFICACIÓN DE INTEGRIDAD DEL INSERTO.....	31
2.2.3 CONSTRUCCIÓN DE VECTOR PK7RWG2.0::CCFIB UTILIZANDO LA TECNOLOGÍA GATEWAY.....	32

---

---

2.2.3.1 SECUENCIACIÓN DE VECTOR BINARIO PK7RWG2::CCFIB Y VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL INSERTO.....	33
2.3 MODELOS CELULARES .....	34
2.3.1 CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE <i>C. CHINENSE</i> .....	34
2.3.1.1 ORIGEN Y MANTENIMIENTO .....	34
2.3.1.2 CURVA DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE <i>C. CHINENSE</i> .....	34
2.3.1.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>C. CHINENSE</i> .....	36
2.3.1.4 INMUNOFUORESCENCIA EN CÉLULAS DE CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE <i>C. CHINENSE</i> .....	36
2.3.1.5 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DEL CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>C. CHINENSE</i> CON EL VECTOR PK7RWG2.0::CCFIB.....	37
2.3.1.5.1 OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>C. CHINENSE</i> Y TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO EN PRESENCIA DE PEG O POR SONICACIÓN	37
2.3.1.5.2 OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS DE TEJIDO FOLIAR DE <i>CAPSICUM</i> Y TRANSFORMACIÓN POR POLIETILAMIDA (PEI) O LIPOFECTAMINA.....	39
2.3.1.5.3 TRANSFORMACIÓN DE TEJIDO FOLIAR DE <i>CAPSICUM</i> POR <i>AGROBACTERIUM</i> PORTADOR DEL VECTOR BINARIO PK7RWG2,0::CCFIB .....	40
2.3.2 CULTIVO DE CÉLULAS HUMANAS (HELA) .....	42
2.3.2.1 RESIEMBRA Y MANTENIMIENTO .....	42
2.3.2.2 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS HELA CON EL VECTOR PSTR-FIBRILARINA_GFP Y SUS DERIVADOS MUTANTES.....	42
2.3.2.3 INMUNOLocalización EN CÉLULAS HELA .....	43
2.4 ENSAYOS DE RECUPERACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DESPUÉS DE FOTOBLANQUEO (FRAP).....	44

---

---

2.4.1 FOTOBLANQUEO Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE CÉLULAS VIVAS EN CÉLULAS HELA .....	44
2.4.2 OBTENCIÓN DE LAS CURVAS DE MODELAJE CINÉTICO DE DIFUSIÓN PROTEICA .....	44
2.4.2.1 OBTENCIÓN DE LOS COEFICIENTES DE FLUORESCENCIA RELATIVA (RFI), MEDIA MÁXIMA ( $T_{1/2}$ ) Y VALORES PORCENTUALES DE LAS FRACCIÓNES MÓVIL E INMÓVIL .....	45
2.4.2.2 OBTENCIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN (D) .....	46
2.4.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO, COMPARACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....	46
CAPÍTULO III.....	49
RESULTADOS .....	49
3.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA FIBRILARINA.....	49
3.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR BINARIO PK7RWG2,0::CCFIB QUE EXPRESA A LA FIBRILARINA DE <i>C. CHINENSE</i> ACOPLADA A RFP.....	51
3.2.1 OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA DE FIBRILARINA DE <i>C. ANNUUM</i> .....	51
3.2.2 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE FIBRILARINA DE <i>C. CHINENSE</i> .....	53
3.2.2.1 CLONACIÓN DE LA SECUENCIA DE FIBRILARINA DE <i>C. CHINENSE</i> EN PJET1.2/BLUNT® .....	54
3.2.2.2 SECUENCIACIÓN DE CLONAS POSITIVAS Y ANÁLISIS DE INTEGRIDAD DE LAS SECUENCIAS .....	55
3.2.3 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR PK7RWG2,0::CCFIB .....	60
3.2.3.1 SECUENCIACIÓN DEL VECTOR BINARIO PK7RWG2,0::CCFIB Y VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL INSERTO.....	63
3.3 MANTENIMIENTO DE LOS MODELOS CELULARES .....	64

---

---

3.3.1 CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE <i>C. CHINENSE</i> .....	64
3.3.1.1 CURVA DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE <i>C. CHINENSE</i> .....	64
3.3.1.2 PARÁMETROS DE CRECIMIENTO .....	67
3.3.1.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE <i>C. CHINENSE</i> .....	67
3.4 ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	70
3.4.1. CÉLULAS DE <i>C. CHINENSE</i> .....	70
3.4.2. CÉLULAS HELA .....	72
3.4.3 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DEL CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>C. CHINENSE</i> CON EL VECTOR PK7RWG2.0::CCFIB.....	75
3.4.3.1 OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>C. CHINENSE</i> ..	75
3.4.3.2 TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO EN PRESENCIA DE PEG O POR SONICACIÓN.....	77
3.4.3.3 OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS DE TEJIDO FOLIAR DE <i>CAPSICUM</i> .....	81
3.4.3.4 TRANSFORMACIÓN POR PEI Y LIPOFECTAMINA.....	82
3.4.3.5 TRANSFORMACIÓN DE TEJIDO FOLIAR DE <i>CAPSICUM</i> POR <i>AGROBACTERIUM</i> PORTADORA DEL VECTOR BINARIO PK7RWG2,0::CCFIB.....	84
3.5 IMPLEMENTACIÓN DE ENSAYOS DE RECUPERACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DESPUÉS DE FOTOBLANQUEO (FRAPS).....	88
3.5.1 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DEL CULTIVO DE CÉLULAS HELA CON EL VECTOR PSTR-FIBRILARINA_GFP Y SUS DERIVADOS MUTANTES EN EL DOMINIO GAR .....	88
3.5.2 OBTENCIÓN DE LAS CURVAS DE MODELAJE CINÉTICO DE DIFUSIÓN PROTEICA .....	90
3.5.3 OBTENCIÓN DE LOS COEFICIENTES DE MEDIA MÁXIMA ( $T^{1/2}$ ), COEFICIENTES DE DIFUSIÓN Y VALORES PORCENTUALES DE LAS FRACCIÓNES MÓVIL E INMÓVIL.....	95

---

---

CAPÍTULO IV .....	101
DISCUSIÓN GENERAL .....	101
4.1 LA FIBRILARINA SE INTERCAMBIA ENTRE EL NUCLEOLO, EL NUCLEOPLASMA Y LOS CUERPOS CAJALES .....	102
4.2 EL NUCLEOLO EN EL AMBIENTE NUCLEAR .....	103
CAPÍTULO V .....	105
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	105
5.1 CONCLUSIONES.....	105
5.2. PERSPECTIVAS .....	106
BIBLIOGRAFÍA.....	107

---

---

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Esquematización de las regiones intranucleares que conforman el núcleo .....	4
<b>Figura 1.3</b> Representación esquemática de la estructura y dominios de la fibrilarina. ....	20
<b>Figura 1.4</b> La fibrilarina viaja entre los nucleolos y los CBs .....	21
<b>Figura 1.5</b> Representación gráfica de un experimento de FRAP y de los datos que pueden obtenerse a partir de él. ....	24
<b>Figura 1.6</b> Diagrama de flujo que esquematiza la estrategia experimental para analizar la dinámica de la fibrilarina en células de <i>C. chinense</i> y HeLa.....	27
<b>Figura 2.1</b> Cebadores específicos para llevar a cabo la recombinación sitio específica de la fibrilarina dentro del primer vector de expresión pDONR221.....	32
<b>Figura 2.2</b> Esquema que ilustra el proceso de recombinación sitio específica. ....	33
<b>Figura 2.3</b> Obtención de protoplastos para la transformación por choque térmico. ....	38
<b>Figura 2.4</b> Obtención de protoplastos a partir de tejido foliar y transformación empleando PEi y Lipofectamina en presencia del vector pK7RWG2,0::CcFib.....	40
<b>Figura 2.5</b> Transformación de tejido foliar de <i>Capsicum</i> utilizando a <i>Agrobacterium</i> portador del vector pK7RWG2,0::CcFib. ....	41
<b>Figura 2.6</b> Esquemas de las mutaciones puntuales dentro del dominio GAR de la fibrilarina silvestre (WtHFIB) y su expresión acoplada a GFP. ....	42
<b>Figura 2.7</b> Selección de las regiones de interés (REI) durante un análisis de una película de FRAP en el software ImageJ FiJi®. ....	45
<b>Figura 3.1</b> Análisis filogenético de secuencias de fibrilarinas en 52 organismos vegetales .....	50

---

<b>Figura 3.2</b> Secuencia completa de la fibrilarina de <i>C. annuum</i> .....	51
<b>Figura 3.3</b> Secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia codificante de la fibrilarina de <i>C. annuum</i> .....	52
<b>Figura 3.4</b> Extracción de ARN total (A) y amplificación de la secuencia de fibrilarina (B). 53	
<b>Figura 3.5</b> Verificación de la transformación con el producto de ligación de fibrilarina-pJET1.2/blunt®.....	54
<b>Figura 3.6</b> Ensayo de restricción en las clonas seleccionadas.....	55
<b>Figura 3.7</b> Alineamiento de la secuencia obtenida de la clona número 8 con la secuencia de <i>C. annuum</i> .....	56
<b>Figura 3.8</b> Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de <i>C. annuum</i> y la obtenida por traducción <i>in silico</i> de <i>C. chinense</i> .....	57
<b>Figura 3.9</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de fibrilarinas de <i>C. annuum</i> y <i>C. chinense</i> con las de otras especies pertenecientes a la familia <i>Solanaceae</i> .....	59
<b>Figura 3.10</b> Fenograma de las fibrilarinas reportadas para la familia <i>Solanaceae</i> .....	60
<b>Figura 3.11</b> Amplificación de la secuencia de fibrilarina de <i>C. chinense</i> para agregar los extremos attB1 y attB2 de recombinación sitio específica.....	61
<b>Figura 3.12</b> Verificación de las reacciones de recombinación por amplificación del inserto .....	62
<b>Figura 3.13</b> Alineamiento entre la secuencia de fibrilarina de <i>C. chinense</i> y la secuencia recombinada en el vector binario PK7RWG2,0::CcFib.....	63
<b>Figura 3.14</b> Patrón de crecimiento del cultivo de células en suspensión de <i>C. chinense</i> . 65	
<b>Figura 3.15</b> Células de 8 días de <i>C. chinense</i> observado en el campo de luz visible por microscopia confocal (40X).....	67

---

<b>Figura 3.16</b> Células de <i>C. chinense</i> tratadas con DAPI para la detección de ácidos nucleicos.....	68
<b>Figura 3.17</b> Células de <i>C. chinense</i> tratadas con calcoflúor para la detección de paredes celulares .....	69
<b>Figura 3.18</b> Ensayo de inmunofluorescencia de células en suspensión de <i>C. chinense</i> empleando DAPI para ácidos nucleicos (461 nm - azul), anti-fibrilarina (555 nm - rojo) y Dominio PH (637 nm - verde) para detección de fosfoinosítidos. ....	71
<b>Figura 3.19</b> Ensayo de inmunofluorescencia en células HeLa transformadas con el vector pSTR-Fibrilarina_GFP .....	72
<b>Figura 3.20</b> Inmunodetección de fibrilarina nativa en células HeLa.....	73
<b>Figura 3.21</b> Inmunodetección de fibrilarina nativa en células HeLa transformadas con el vector pSTR-Fibrilarina_GFP que expresa WtHFIB. ....	74
<b>Figura 3.22</b> Protoplastos de células de <i>C. chinense</i> tenidos con azul de Evans para evaluación de viabilidad.....	76
<b>Figura 3.23</b> Transformación de protoplastos por choque térmico en presencia de PEG .	78
<b>Figura 3.24</b> Transformación de protoplastos por Sonicación.....	80
<b>Figura 3.25</b> Protoplastos de tejido foliar de <i>Capsicum</i> observados en el campo de luz visible. ....	81
<b>Figura 3.26</b> Transformación de protoplastos con PEi.....	82
<b>Figura 3.25</b> Transformación de protoplastos con Lipofectamina .....	83
<b>Figura 3.28</b> Protoplastos de tejido foliar de <i>Capsicum</i> transformado con <i>Agrobacterium</i> portador del vector pK7RWG2,0:CcFib.....	85
<b>Figura 3.29</b> Inmunodetección de fibrilarina nativa en células HeLa transformadas con el vector binario pK7RWG2,0::CcFib .....	87

---

---

<b>Figura 3.30</b> Expresión de la fibrilarina humana silvestre (WtHFIB) y mutantes R15A, R34A, R45A y RTA a partir de su expresión acoplada a una GFP y morfología de los núcleos.....	89
<b>Figura 3.31</b> Modelos cinéticos de difusión proteica obtenidos por medio de la implementación de FRAP en células HeLa expresando la fibrilarina silvestre o WtHFIB acoplada a GFP en CBs y nucleolos.....	90
<b>Figura 3.32</b> Modelos cinéticos de difusión proteica obtenidos por medio de la implementación de FRAP en células HeLa expresando la fibrilarina mutante R15A acoplada a GFP en CBs y nucleolos.....	91
<b>Figura 3.33</b> Modelos cinéticos de difusión proteica obtenidos por medio de la implementación de FRAP en células HeLa expresando la fibrilarina mutante R34A acoplada a GFP en CBs y nucleolos.....	92
<b>Figura 3.34</b> Modelos cinéticos de difusión proteica obtenidos por medio de la implementación de FRAP en células HeLa expresando la fibrilarina mutante R45A acoplada a GFP en CBs y nucleolos.....	93
<b>Figura 3.35</b> Modelos cinéticos de difusión proteica obtenidos por medio de la implementación de FRAP en células HeLa expresando la fibrilarina mutante RTA acoplada a GFP en CBs y nucleolos.....	94
<b>Figura 3.36</b> Vidas medias de WtHFIB y mutantes .....	95
<b>Cuadro 3.1</b> Promedios de vida media y coeficientes de difusión de cada grupo de experimentos y análisis de Scheffé.....	97
<b>Figura 3.37</b> Velocidad de difusión (coeficiente de difusión) de la fibrilarina silvestre (WtHFIB) y sus mutantes en $\mu\text{m}^2/\text{s}$ .....	98
<b>Cuadro 3.2</b> Valores porcentuales de las fracciones móvil e inmóvil para WtHFIB y sus mutantes.....	99

---

---

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro 3.1</b> Promedios de vida media y coeficientes de difusión de cada grupo de experimentos y análisis de Scheffé.....	120
<b>Cuadro 3.2</b> Valores porcentuales de las fracciones móvil e inmóvil para WtHFIB y mutantes.....	122

---

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ADNr</b>	Acido desoxirribonucleico ribosomal
<b>APl</b>	Leucemia promielocítica aguda
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>ARNt</b>	Ácido ribonucleico de transferencia
<b>ATP</b>	Adenosin Trifosfato
<b>BLAST</b>	Herramienta básica de búsqueda por alineamiento local
<b>BLASTn</b>	Herramienta básica de búsqueda por alineamiento local con nucleotidos
<b>CaFib</b>	<i>Capsicum annum</i> fibrilarina
<b>CcFib</b>	<i>Capsicum chinense</i> fibrilarina
<b>CB</b>	Cuerpo Cajal
<b>CDS</b>	Secuencia de ADN codificante
<b>CTV</b>	Cultivo de tejidos vegetales
<b>D</b>	Coeficiente de difusión
<b>DAG</b>	Diacil-glicerol
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DPBS</b>	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>FRAP</b>	Recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo
<b>GAR</b>	Dominio rico en Glicinas y argininas
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HIPK</b>	Proteínas cinasas de interacción con homodominio
<b>HFIB</b>	Fibrilarina humana
<b>IC</b>	Índice de crecimiento
<b>IGCs</b>	Agregados de gránulos inter cromáticos
<b>iFRAP</b>	Recuperación inversa de la fluorescencia después de fotoblanqueo
<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5-trisfosfo
<b>NCBI</b>	Centro nacional de información biotecnológica

---

<b>NORs</b>	Regiones Organizadoras del nucleolo
<b>OPT</b>	Oct1/PTF/transcripcionales
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEi</b>	Polietilamida
<b>PF</b>	Peso fresco
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PML</b>	Leucemia promielocítica
<b>PNC</b>	Compartimento perinucleolar
<b>PODs</b>	Dominios oncogénicos PML
<b>PS</b>	Peso seco
<b>RBM</b>	Motivo de unión al ARN
<b>REI</b>	Región de interés
<b>RFI</b>	Intensidad de fluorescencia relativa
<b>RNPs</b>	Ribonucleoproteínas
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SAM</b>	S-adenosil metionina
<b>SAM68</b>	Src-Associated substrate in Mitosis of 68 kDa
<b>scaRNAs</b>	Pequeños ácidos ribonucleicos de los cuerpos Cajales
<b>snRNPs</b>	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
<b>snoRNPs</b>	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares
<b>td</b>	Tiempo de duplicación



---

## RESUMEN

El núcleo es el centro de información de la célula eucariota, siendo un organelo que provee del espacio necesario para la expresión de la mayoría de las funciones genómicas de la célula. Está conformado por regiones donde se conglomeran poblaciones moleculares que desempeñan actividades nucleares específicas, tales como la transcripción, la replicación, la regulación del ciclo celular, la biogénesis ribosomal, etc. Estas funciones le confieren al núcleo un carácter dinámico, pues requieren de un recambio y flujo constante de moléculas para mantener su equilibrio y optimizar sus procesos, por lo que entender su dinámica es fundamental para comprender la actividad nuclear. Es por esto, que los estudios detallados de la dinámica nuclear y estructura nos permitirán entender con mayor precisión cómo es que este organelo coordina y desempeña sus funciones. Este trabajo se enfocó en analizar la localización y dinámica de la fibrilarina, así como de las mutantes derivadas de ésta en el nucleolo y los cuerpos Cajales. Los modelos experimentales fueron cultivos de células HeLa y de *Capsicum chinense*. Para este fin, se utilizó el ensayo de recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP por sus siglas en inglés). Usando modelos cinéticos de difusión proteica, se observó que la fibrilarina silvestre (WtHFIB) es altamente móvil en el nucleolo y los cuerpos Cajales, presentando un coeficiente de difusión de 0.008 y 0.02  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , respectivamente, encontrando diferencias ( $p = 2.2 \times 10^{-16}$ ) con los coeficientes de difusión de sus versiones mutantes.

---

---

## ABSTRACT

The nucleus is the eukaryotic cell's information center, it is an organelle that provides the space needed for the expression of most of the cell's genomic functions. It is constituted by regions composed of characteristic molecular populations, which confer them with a specific function. These intranuclear regions compartmentalize processes, such as transcription, replication, cell cycle regulation and ribosomal biogenesis, among others. The above mentioned functions give the nucleus a dynamic character, which means, molecules that compose it and the activities they carry on conform a nuclear dynamic, which until these days has not been fully understood. By these means the study of nuclear structure and dynamics results in great relevance, since its comprehension will allow us to understand with more precision how this organelle coordinates all of its functions. In this work we will focus on the dynamic analysis of fibrillarin and mutants derived of it in the nucleolus and the Cajal bodies. The implemented models are HeLa cells cultures and a *Capsicum chinense* cell suspension culture. The fluorescent recovery after photobleaching Assay or FRAP was implemented for this mean. By applying kinetic protein diffusion models, we observed that wild type fibrillarin (WtHFIB) is highly mobile in the nucleolus and Cajal bodies, presenting a diffusion coefficient of 0.008 and 0.02  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , respectively, finding differences ( $p = 2.2 \times 10^{-16}$ ) in diffusion coefficient values between its mutants.

---

### INTRODUCCIÓN

El núcleo es un organelo característico de las células eucariotas, que provee del espacio necesario para la expresión de la mayoría de las funciones genómicas, como lo son el almacenamiento y la replicación del ADN, la transcripción selectiva de genes, el procesamiento del ARNm, su exportación, la biogénesis ribosomal, y la regulación del ciclo celular, entre otros. Estas funciones son básicas para la vida y se llevan a cabo tanto en núcleos de células animales como de células vegetales. Estos procesos tienen lugar en gran parte por medio de interacciones moleculares entre proteínas y moléculas de diversa índole (Mohamad y Boden, 2010).

La organización interna del núcleo es clave para el correcto funcionamiento de la célula. Esta organización consiste en el agrupamiento de moléculas diversas como ADN, ARN, lípidos y proteínas en regiones específicas, de acuerdo a su actividad, conformando las regiones intranucleares. Estas regiones se distinguen con base en su morfología y composición, encontrándose pues en movimiento constante, cambiando su tamaño y forma, resultado del flujo y recambio de sus moléculas (Mohamad y Boden, 2010). Las actividades que desempeñan las regiones intranucleares se ven determinadas por la naturaleza de las moléculas que entran y salen de ellas. Entender la naturaleza de este flujo de moléculas es fundamental para comprender la actividad del núcleo y es lo que comprende el estudio de la dinámica nuclear (Nagata y Takeyasu, 2007).

El análisis de la dinámica nuclear se realiza *in vivo* y consiste en la expresión de una o varias proteínas nucleares de interés acopladas a una molécula reportera fluorescente para posteriormente realizar su rastreo por medio de microscopía de fluorescencia. En este trabajo, el enfoque fue observar y analizar la localización y la dinámica de la fibrilarina, proteína nuclear esencial para la vida (Amin *et al.*, 2007), que se encuentra en el nucleolo y los cuerpos Cajales, utilizando la técnica de “recuperación de la fluorescencia después de foto blanqueo” (FRAP, por sus siglas en inglés) (Axelrod *et al.*, 1976). Además, se llevó a cabo la clonación y análisis de la fibrilarina de *Capsicum chinense* (CcFib).



## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1 EL NÚCLEO, CENTRO DE INFORMACIÓN DE LA CÉLULA

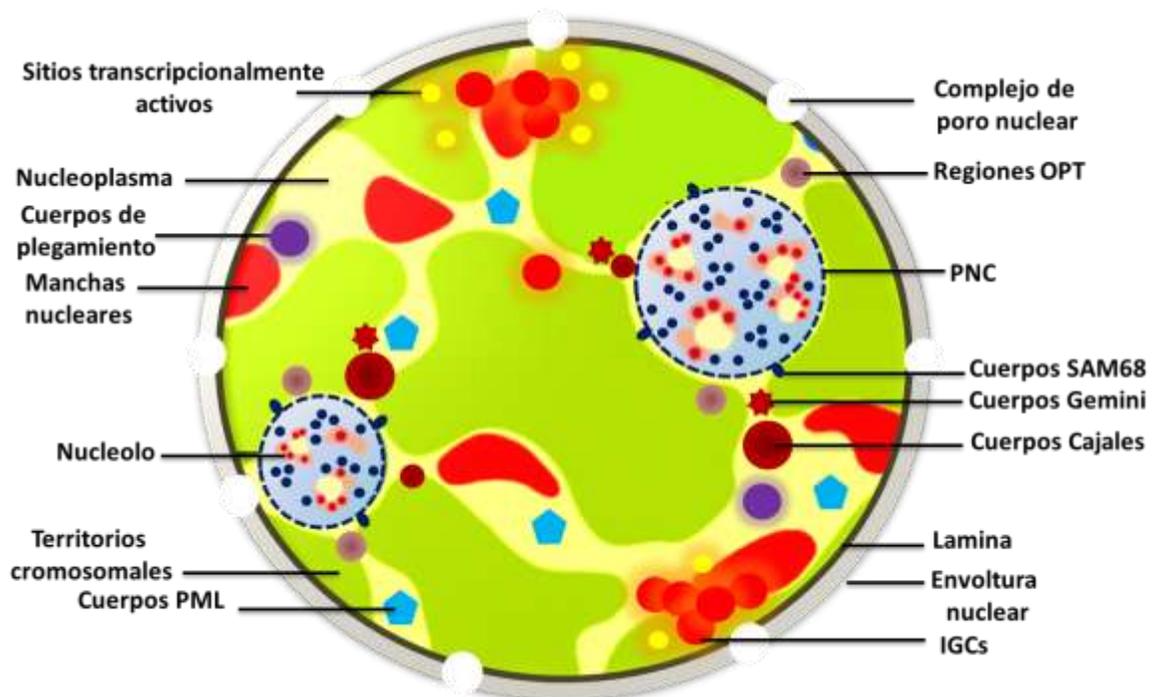
El núcleo es un organelo característico de las células eucariotas. Su principal función es resguardar el genoma, controlar las actividades de la célula por medio de la regulación de la expresión genética (Dundr y Misteli, 2001) y separar los procesos de transcripción de la síntesis proteica. El núcleo fue observado por primera vez en células animales por Antonie van Leeuwenhoek en 1682, y posteriormente descrito en células vegetales por Brown en 1831 (Harris, 1999). Fue considerado un compartimento de carácter estático, cuya única función era separar el contenido genético del resto de los componentes celulares. Más tarde, este organelo atrajo mucha atención por su fascinante comportamiento y belleza durante la mitosis, además de sus evidentes papeles en los procesos de fertilización y la herencia (Spector, 1993). Su estudio se convirtió en un campo de gran interés para la comunidad científica.

Hoy en día se sabe que el núcleo en interface tiene una intrincada organización, la cual es clave para el correcto funcionamiento de la célula (Cremer *et al.*, 2000; Lamond y Earnshaw, 1998). Esta organización consiste en el agrupamiento de moléculas de diversa índole, como ADN, ARN, lípidos y principalmente proteínas en diversas regiones de acuerdo a su actividad (Matera, 1999).

Las regiones intranucleares se identifican como conjuntos de agregados moleculares, morfológicamente distintos, cuyos componentes se concentran de manera específica de acuerdo a sus funciones dentro del núcleo (Gasser, 2002; Spector y Lamond, 2001). En los años recientes, elucidar la composición molecular de estos dominios ha sido uno de los temas de mayor relevancia en el estudio de la bioquímica y biología molecular de la célula (Spector y Lamond, 2001). Sin embargo, no sólo se busca la descripción de la composición de estos dominios, sino también comprender los mecanismos por los cuales estas regiones interactúan entre sí, abriendo paso al estudio del movimiento y recambio de moléculas en el núcleo (Nagata y Takeyasu, 2007).

## 1.2 ORGANIZACIÓN INTERNA DEL NÚCLEO: REGIONES INTRANUCLEARES

La organización del núcleo en regiones intranucleares es clave para el funcionamiento correcto de la célula (Figura 1.1). Las regiones intranucleares son morfológicamente distintas y están conformadas por agregados moleculares de proteínas, lípidos, ARN y ADN que se concentran de acuerdo a su función (Lamond y Earnshaw, 1998). La acumulación de estas moléculas en las distintas regiones intranucleares podría ayudar a generar una alta concentración local de componentes específicos, y por lo tanto aumentar la eficiencia de las reacciones y actividades nucleares (Wei *et al.*, 2003). Consecuentemente, vías específicas de acumulación y recambio deben operar dentro del núcleo para controlar la formación y el mantenimiento de las regiones intranucleares, además de dirigir sus componentes moleculares a sus sitios de acción (Lamond y Sleeman, 2003). Actualmente se construyen perfiles moleculares de cada una de las regiones intranucleares de acuerdo a los componentes identificados dentro de ellas, así como algunas de las funciones que desempeñan.



**Figura 1.1** Esquematización de las regiones intranucleares que conforman el núcleo. Modificado de Schmitz y Herrmann, 2008; Spector y Lamond, 2001.

Como se puede observar en la figura 1.1, el núcleo está separado del resto del citoplasma por la membrana nuclear (línea externa), que es contigua al retículo endoplásmico (Lamond y Sleeman, 2003; Spector y Lamond, 2001). En esta membrana se localizan los poros nucleares, a través de los cuales ocurre el transporte de proteínas y los ARNm (Stoffler *et al.*, 1999). En la capa interna de la envoltura nuclear se encuentra la lámina nuclear, la cual provee anclaje a los cromosomas, además de contar con *foci* asociados a la replicación del ADN (Moir *et al.*, 2000). La composición de la lámina nuclear es distinta en células animales y vegetales; en las plantas no hay presencia de los ortólogos que han sido reportados en metazoos como componentes de la lámina nuclear. Sin embargo, se ha descrito la existencia de proteínas homólogas (Moir *et al.*, 2000). Estas estructuras externas apoyan activamente las funciones del genoma, tanto en el aspecto estructural, como en la regulación del transporte bidireccional y el anclaje de los cromosomas en interfase (Lamond y Sleeman, 2003).

La mayoría del volumen nuclear está ocupado por el genoma (o cromatina). El núcleo está organizado en regiones denominadas territorios cromosomales que tienen una estructura que se asemeja a una esponja, a través de la cual varias proteínas pueden difundir (Lamond y Sleeman, 2003; Cremer y Cremer, 2001; Spector y Lamond, 2001). A cada territorio cromosomal le corresponde un cromosoma específico y tiene un posicionamiento preferencial. Los cromosomas más ricos en genes activos (eucromatina) tienden a localizarse en el centro del núcleo, mientras que aquellos con menos o nula actividad transcripcional (heterocromatina) se observan en la periferia del mismo (Parada y Misteli, 2002; Croft *et al.*, 1999). Esto a su vez, se ve reflejado en la ausencia de movimientos de la cromatina a gran escala en el núcleo interfásico (Vazquez *et al.*, 2001; Abney *et al.*, 1997).

Asociados a la heterocromatina pericentromérica, se han observado los denominados cuerpos PcG, los cuales contienen proteínas del grupo “polycomb” (Saurin *et al.*, 1998). Estos cuerpos pueden variar en número (de dos a varios cientos) y tienen un tamaño entre 0.2 y 1.5  $\mu\text{m}$ . Aún se desconoce si estas regiones están relacionadas con el silenciamiento genético o funcionan como regiones de almacenamiento.

Los factores de splicing que se encargan del procesamiento del pre-ARNm se observan concentrados en las manchas nucleares o *speckles*, así como distribuidos de manera difusa en el nucleoplasma (Spector, 1993). Las manchas nucleares más grandes corresponden a los conglomerados de granulos intercromáticos (IGCs por sus siglas en inglés). Estos conglomerados miden entre 0.8 y 1.8  $\mu\text{m}$  de diámetro y están compuestos por partículas de 20 a 25 nm que parecen estar conectadas entre sí. Se ha propuesto que los IGCs están involucrados en el ensamblaje y/o modificación de los factores de splicing, los cuales son posteriormente enviados a los sitios transcripcionalmente activos. Estos sitios pueden localizarse en el nucleoplasma, en la periferia de los IGCs o en varios miles de *foci* activos.

Los factores de transcripción y splicing también suelen acumularse en las regiones Oct1/PTF/transcripcionales, las cuales se abrevian como OPT. Estas regiones miden de 1.0 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y contienen en su mayoría transcritos recién sintetizados (Pombo *et al.*, 1998; Grande *et al.*, 1997). Las regiones OPT aparecen en la fase G1 del ciclo celular, generalmente cerca del nucleolo y desaparecen cuando la célula entra en la fase S. Su función es desconocida.

Los factores de splicing también pueden ser encontrados en los cuerpos Cajales (**Cajal bodies** o CBs por sus siglas en inglés). Previamente conocidos como cuerpos enroscados (Gall, 2001), estas pequeñas y dinámicas regiones intranucleares tienen un diámetro de 0.2 a 1.5  $\mu\text{m}$  y se considera que participan activamente en la biogénesis de las ribonucleoproteínas nucleares y nucleolares (snRNPs y snoRNPs por sus siglas en inglés, respectivamente) y en su tráfico través del núcleo. Los snRNAs U1, U2, U4/U6 y U5 (que forman parte del espliceosoma), U7 snRNP involucrado en el procesamiento del extremo 3' de las histonas, así como U3 y U8 snoRNPs, involucrados en el procesamiento del pre-ARNr, pueden localizarse concentrados dentro de los CBs. Se ha propuesto que estos factores transitan a través de los CBs en su ruta hacia las manchas nucleares (snRNPs) o los nucleolos (snoRNPs). Adicionalmente, se ha reportado que los CBs suelen asociarse con *loci* de histonas, así como los conglomerados de los genes que codifican para los U1, U2 y U3 snoRNPs (Matera, 1999).

Los cuerpos gemini (llamados “gemelos” de los CBs) pueden observarse en el nucleoplasma y suelen coincidir o estar adyacentes a los CBs, dependiendo de la línea celular examinada. Los cuerpos gemini se caracterizan por la presencia de la proteína SMN (**S**urvival **M**otor **N**euron) y el factor Gemin2 asociado (Matera, 1999). Ambos factores están involucrados en el ensamblaje y maduración de los snRNPs. Notablemente, la atrofia muscular espinal, una enfermedad degenerativa que afecta a las neuronas, es el resultado de niveles reducidos, o una mutación, en la proteína SMN.

Otros factores involucrados en el plegamiento y poli-adenilación del pre-ARNm tienen una distribución difusa en el núcleo, pero pueden concentrarse en *loci* específicos de 0.3 a 1.0 µm de diámetro llamados cuerpos de plegamiento (*cleavage bodies*) (Schul *et al.*, 1996). Estas estructuras suelen estar cercanas a los CBs, a excepción de aquellos que contienen ARN recién sintetizado.

El nucleolo es la región intranuclear donde se lleva a cabo la síntesis del ARN ribosomal, su procesamiento y ensamblaje en las subunidades ribosomales (Spector, 1993), y es también la estructura más prominente dentro del núcleo. La mayoría de las células de mamíferos contiene entre 1 y 5 nucleolos, cada uno con un diámetro entre 0.5 y 5 µm. El compartimento perinucleolar (**P**eri**N**ucleolar **C**ompartiment o PNC por sus siglas en inglés) y los cuerpos SAM68 (Huang, 2000) han sido identificados como estructuras únicas que están asociadas a la superficie del nucleolo y considerados actores principales en el metabolismo del ARN. Los cuerpos SAM68 suelen tener un diámetro entre 0.25 y 1.0 µm y aparecen de 1 a 10 por nucleolo. El PNC contiene una serie de pequeños ARNs, transcritos por la ARN polimerasa III, y varias proteínas asociadas (Huang *et al.*, 1997). Los cuerpos SMA68 contienen varias proteínas de unión al ARN que cuentan con un dominio GSG, también conocido como activador del ARN y transductor de señales (**S**ignal **T**ransduction and **A**ctivation of **R**NA o STAR por sus siglas en inglés). Aunque las funciones del PNC y los cuerpos SAM68 no han sido comprendidas del todo, es importante notar que éstos están presentes predominantemente en células cancerosas, y rara vez se identifican en células primarias (Lamond y Earnshaw, 1998).

Los cuerpos de leucemia promielocítica (**P**romyelocytic **L**eukemia o PML por sus siglas en inglés) varían entre 0.3 y 1.0 µm en diámetro (Maul *et al.*, 2000). Un núcleo de célula de

mamífero contiene entre 10 y 30 cuerpos. A éstos también se les ha denominado como ND10, cuerpos Kr o Dominios promielocíticos oncogénicos (*Promyelocytic Oncogenic Domains* o PODs por sus siglas en inglés). Se ha sugerido que participan en la regulación de la transcripción y están involucrados durante las infecciones virales, además de concentrar cinasas nucleares de la familia HIPK. Los individuos que padecen leucemia promielocítica aguda presentan una translocación en el gen PML, en la cual se fusiona con el gen que codifica para el receptor de ácido- $\alpha$  retinoico, lo que produce la expresión de proteínas fusionadas. Las células que contienen esta translocación presentan cuerpos PML fragmentados, esparcidos a través del nucleoplasma.

El fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, comúnmente conocido como PIP2, está localizado principalmente en las membranas celulares, suele unirse con varias proteínas, regulando su actividad. PIP2 es degradado por acción de la fosfolipasa C (PLC) a inositol 1,4,5-trisfosfo (IP3) y a diacil-glicerol (DAG). El IP3 suele liberarse al citoplasma causando la movilización de iones  $Ca^{2+}$ , mientras que el DAG permanece unido a la membrana donde activa a la proteína cinasa C, lo que produce una respuesta celular específica. Se han detectado fosfoinosítidos, PIP2 en particular, dentro del núcleo, donde regula algunas funciones que realizan las manchas nucleares (Fraschini *et al.*, 1999). Recientemente, se demostró que PIP2 se une al factor de transcripción UBF, formando un complejo con la ARN Polimerasa I en el promotor de los genes ribosomales (Sobol *et al.*, 2013). Aunado a esto, el agotamiento de PIP2 resulta en la reducción de la actividad transcripcional de la ARN Polimerasa I.

La idea que prevalece actualmente es que los dominios intranucleares están asociados a *loci* genéticos específicos y que las interacciones entre ellos son dinámicas, respondiendo rápidamente a señales celulares (Dundr y Misteli, 2001).

### 1.3 LA DINÁMICA NUCLEAR IMPLICA LA INTERACCIÓN ENTRE LOS DOMINIOS INTRANUCLEARES

El núcleo es una estructura dinámica ya que las regiones que lo componen se encuentran en movimiento constante, cambiando su tamaño y forma, debido al flujo y recambio constante de sus moléculas en respuesta a señales celulares (Nagata y Takeyasu, 2007). Como claro ejemplo de esta dinámica, están las proteínas y los complejos ARN-proteína que se encuentran en un flujo constante entre el núcleo y el citoplasma, así como los ARNm y los ribosomas recién ensamblados que son exportados de sus sitios de síntesis en el núcleo al citoplasma. En cambio, todas las proteínas y factores nucleares que se sintetizan en el citoplasma (histonas, reguladores de la transcripción y factores de splicing, etc.) se importan al núcleo. Por lo antes mencionado, se considera que la dinámica nuclear es el resultado de procesos de recambio, exportación e importación de moléculas y complejos, todo con la finalidad de permitir y aumentar la eficiencia de sus procesos biológicos (Chubb y Bickmore, 2003).

La dinámica de las regiones intranucleares se ha podido observar y estudiar gracias a técnicas de microscopía de fluorescencia que permiten visualizar proteínas nucleares *in vivo* (Nagata y Takeyasu, 2007). Las técnicas de obtención de imágenes por microscopía con reporteros fluorescentes han hecho posible la observación y el estudio de las moléculas nucleares en tiempo real (Nagata y Takeyasu, 2007).

Los dominios intranucleares están siempre en movimiento, ya sea por difusión simple dentro de un área restringida o mostrando una cinética dependiente del gasto de energía (Calapez *et al.*, 2002) Este trabajo se ha enfocado en dos dominios intranucleares que son altamente dinámicos y están relacionados directamente entre sí: los CBs y el nucleolo.

### 1.4 EL NUCLEOLO

El nucleolo es la estructura más prominente dentro del núcleo y es claramente distinguible del resto de las regiones intranucleares, gracias a su iridiscencia (Janicki y Spector, 2003; Olson, 2001; Scheer y Hock, 1999). Como se mencionó anteriormente, el nucleolo es la región intranuclear donde ocurre la biogénesis ribosomal (Spector, 1993); sin embargo, se ha reportado que contiene algunas moléculas relacionadas con la regulación del ciclo celular, extensión del plazo de vida de la célula y regulación del proceso de apoptosis (Guarente, 2000; Visintin y Amon, 2000; Cockell y Gasser, 1999).

Desde 1960, se determinó que el nucleolo es el sitio donde ocurre la biogénesis ribosomal (Fatica y Tollervey, 2002; Olson y Dundr, 2001). En células metabólicamente activas, ya sea de animales, plantas o levaduras, el nucleolo alberga alrededor de 250 copias de los genes ribosomales activos, los cuales son responsables de prácticamente la mitad de la producción de ARN total de la célula (Warner *et al.*, 1972). Estos genes ribosomales están localizados en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos en mamíferos o en las constricciones secundarias de los cromosomas satelitados en plantas (Cermeño *et al.*, 1984). Estos sitios genómicos pueden ser detectados en cinco pares de cromosomas metafásicos denominados regiones organizadoras del nucleolo (***Nuclear Organizing Regions*** o NORs por sus siglas en inglés). Los NORs pueden ser visualizados por medio de tinción argéntica, debido a la abundancia de proteínas argiofílicas asociadas (Cermeño *et al.*, 1984).

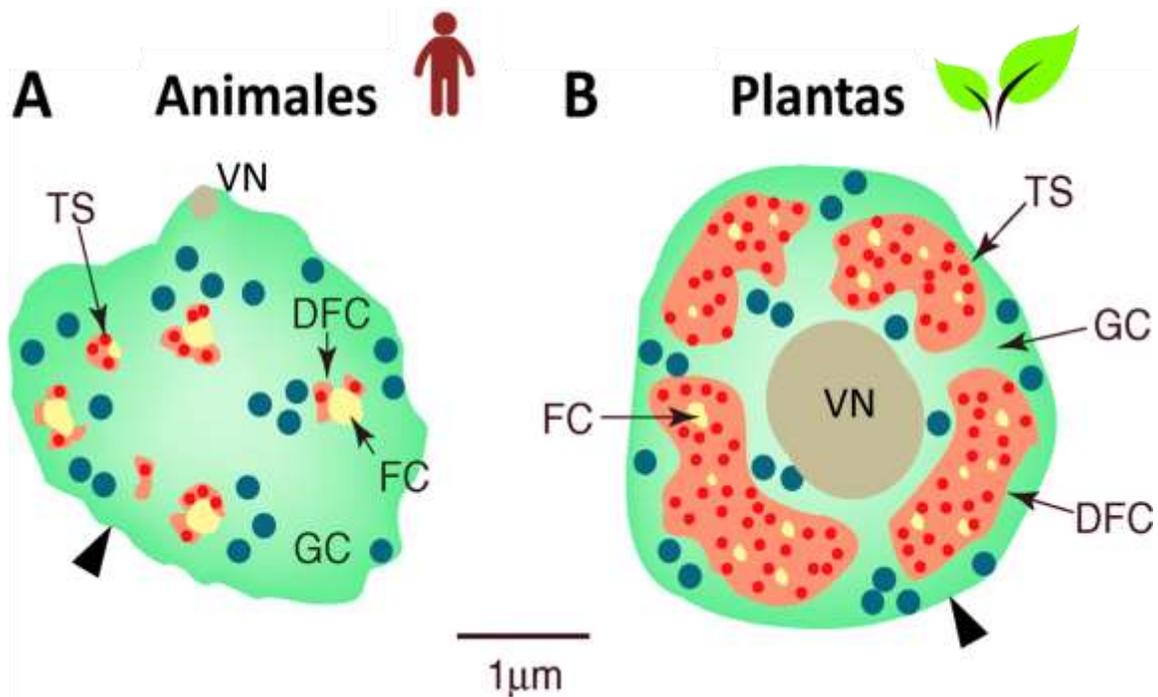
Recientemente, se demostró que el nucleolo está involucrado en otras funciones celulares, además de la biogénesis ribosomal (Olson y Dundr, 2005; Carmo-Fonseca *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2000). Esta premisa se basa en la presencia de ribonucleoproteínas de reconocimiento de partículas conocidas como partículas de reconocimiento de señales (***Signal Recognition Particles*** o SRPs por sus siglas en inglés), así como del ARN que las reconoce. Ambos se localizan en sitios no asociados a la biogénesis ribosomal, además de proteínas que interaccionan con virus y ARNm poliadenilados (Politz *et al.*, 2002). Aunado a esto, existe la posibilidad de que al menos un ARNt sea procesado en el nucleolo (Jarrous *et al.*, 1999) y que el spliceosoma de U6 se localice en algún momento en el nucleolo para ser sometido a metilaciones y

pseudouridilaciones (Ganot *et al.*, 1999). El nucleolo también podría participar en la exportación y/o degradación del ARNm (Sidebottom y Harris, 1969).

#### 1.4.1 Bases estructurales del nucleolo

Según Mèlèse y Xue, el nucleolo se conforma a sí mismo en el acto de construir un ribosoma, siendo la expresión visible de la actividad de los genes ribosomales (Hadjiolov, 1985). La morfología del nucleolo representa en muchos aspectos la naturaleza de la expresión genética de cada célula. La mayoría de las células de mamíferos contiene de 1 a 5 nucleolos, cada uno con un diámetro entre 0.5 y 5  $\mu\text{m}$  (Busch y Smetana, 1970). Consecuentemente, el tamaño y apariencia del nucleolo varía en relación a la actividad celular, actividad metabólica, proliferación y diferenciación.

En el nucleolo existen tres componentes específicos bien delimitados, los cuales pueden ser identificados al observarlo por medio de microscopía electrónica (Warner, 1999). Estas regiones se clasifican de la siguiente manera: una región ligeramente obscurecida conocida como componente fibrilar (*Fibrillar Component* ó FCs por sus siglas en inglés), que a su vez está rodeada por el componente fibrilar denso (*Dense Fibrillar Components* ó DFCs), el cual puede distinguirse por su mayor concentración de partículas. Estas dos regiones se encuentran embebidas en una región rica en pequeñas partículas, conocida como el componente granular (*Granular Components* ó GCs) (Scheer y Hock, 1999). En la figura 1.2 se muestran los esquemas de los nucleolos de células animales y vegetales. En ambos casos, el nucleolo presenta tres componentes: el componente fibrilar (FC; área amarilla), el componente fibrilar denso (DFC; área rosada) donde están embebidos los sitios transcripcionalmente activos y el componente granular (GC; área aqua) el cual rodea al resto de los componentes (Scheer y Hock, 1999). Dentro del GC se encuentran los sitios de heterocromatina (círculos azules), compuestos de genes ribosomales organizados en tándem. Las cabezas de flecha marcan la periferia nucleolar donde se suele localizar el PNC, el cual a su vez, es rico con heterocromatina.



**Figura 1.2** Organización estructural del nucleolo y comparación entre las estructuras nucleolares de células animales y vegetales. Modificado de Shaw y Brown, 2004.

Dentro del nucleolo, la distribución de las maquinarias que se encuentran involucradas de forma sucesiva en la biogénesis ribosomal se correlaciona con los diferentes pasos del procesamiento. El componente fibrilar (FC) es considerado el equivalente en interfase de las NORs, que son regiones que están enriquecidas con componentes de la ARN polimerasa I y factores de transcripción involucrados en la transcripción del ADN ribosomal (como UBF y la ADN topoisomerasa I). Se considera que la transcripción y el procesamiento del ARN ribosomal ocurre en el DFC; éste suele marcarse fuertemente con anticuerpos que reconocen factores de procesamiento del pre-ARN ribosomal, como la fibrilarina, la nucleolina y U3 snoRNA (Ginisty *et al.*, 1998; Puvion-Dutilleul, 1991; Ochs *et al.*, 1985). El componente granular (GC) está compuesto de partículas pre-ribosomales en diferentes estados de maduración y factores de ensamblaje de las subunidades ribosomales grandes y pequeñas, como B23 y Nop52 (involucradas en los pasos intermedios y finales de la biogénesis ribosomal) (Gautier *et al.*, 1994), rodeando al DFC y al FC (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000; Scheer y Hock, 1999).

Se ha hipotetizado que la transcripción del ADN ribosomal tiene lugar en el FC (o en la frontera entre el FC y el DFC) y que los transcritos de ARN ribosomal son subsecuentemente procesados y modificados en el DFC (Scheer y Hock, 1999). El ARN ribosomal procesado es entonces ensamblado con las proteínas ribosomales en el GC para conformar las subunidades ribosomales (Scheer y Hock, 1999).

Además de estos tres componentes, dentro del nucleolo es posible observar cromatina condensada en pequeños agregados por medio de microscopía de barrido (Junera *et al.*, 1995). La cantidad global de cromatina intranucleolar es probablemente baja, ya que la tinción de ADN por medio de DAPI excluye al nucleolo. Un cuarto componente es la vacuola nucleolar (NV), la cual ha sido observada en algunos nucleolos de plantas y otros organismos. Hasta ahora la función concreta de la vacuola nucleolar se desconoce (Wei *et al.*, 2003).

Además de las funciones antes mencionadas que se atribuyen a cada componente del nucleolo, se ha reportado que también está involucrado en otros procesos, como el silenciamiento genético, la progresión del ciclo celular, la senescencia y la biogénesis de snARNs y ARNs de transferencia (Cockell y Gasser, 1999).

Avances recientes en microscopía de luz polarizada y en particular, empleando reporteros fluorescentes en células vivas han revelado que muchos de los componentes dentro del nucleolo no son estáticos, sino que tienen un carácter dinámico (Chen y Huang, 2001; Dundr y Misteli, 2001; Reits y Neefjes, 2001).

### 1.4.2 Dinámica del nucleolo

El nucleolo es una estructura dinámica que atraviesa por diferentes ciclos de ensamblaje y desintegración durante cada ciclo celular. Después de la mitosis en núcleos en telofase, el ensamblaje del nucleolo en los NORs es dependiente de la producción de ARNr. Después, el nucleolo permanecerá estable siempre y cuando la transcripción de los genes ribosomales continúe (Lamond y Earnshaw, 1998). A pesar de esta estabilidad estructural, los estudios de fotoblanqueo muestran que muchas proteínas nucleolares, algunos snRNPs y snoRNPs no están permanentemente anclados dentro del nucleolo, sino que tienen una gran tasa de recambio entre distintas regiones intranucleares (Lamond y Sleeman, 2003).

Adicionalmente, la identificación de las proteínas compartidas entre el nucleolo y algunas regiones intranucleares permite proponer que interactúan de manera física entre sí (Spector y Lamond, 2001). La pregunta es si dichas regiones y el nucleolo están funcionalmente involucrados y por ende, están en constante comunicación. El mejor ejemplo son los CBs, los cuales fueron descubiertos en el núcleo neuronal y fueron descritos como un “cuerpo accesorio” del nucleolo (Gall, 2003; Gall, 2000; Matera, 1999).

### 1.5 LOS CUERPOS CAJALES, DOMINIOS PLURIFUNCIONALES

Los cuerpos Cajales son dominios intranucleares que fueron observados y descritos en 1903 por el neurólogo español Santiago Ramón y Cajal (Gall, 2003). Estudios posteriores describieron la presencia de CBs en los núcleos animales y vegetales, demostrando que se trata de una estructura conservada (Bassett, 2012). Después de esto, los CBs permanecieron prácticamente ignorados hasta principios de los noventa, cuando comenzó la caracterización molecular de sus componentes.

Dicha caracterización determinó que los CBs son concentrados de una plétora de proteínas de control del ciclo celular, factores de transcripción basales, snRNPs y pequeños ARNs de los CBs (**Small Cajal RNAs** o *scaRNAs* por sus siglas en inglés) con los que presentan complementariedad de secuencias (Andrade *et al.*, 1991; Raska *et al.*, 1991). En esta plétora proteica, se encuentra la coilina, la cual fue descrita como el componente más abundante de los CBs (Matera y Shpargel, 2006; Andrade *et al.*, 1991;

Raska *et al.*, 1991) y su anticuerpo de reconocimiento, p80 coilina, se utiliza como su marcador (Raska *et al.*, 1990).

La coilina contiene dominios de localización nuclear y nucleolar: un dominio rico en arginina y glicina, similar al dominio GAR de la fibrilarina, así como un dominio de auto-interacción que facilita la formación de CBs (Hebert y Matera, 2000). La formación de los CBs depende, en parte, de los dominios de auto interacción y las modificaciones postraduccionales de la coilina. La hiper-fosforilación reduce de manera considerable la auto interacción presente entre coilinas, lo que lleva al desmantelamiento de los CBs durante la mitosis (Hebert y Matera, 2000). La función biológica de la coilina dentro de los CBs sigue siendo un misterio. Se ha propuesto que la coilina tiene un papel en el mecanismo que se encarga de la detección y/o reparación de las estructuras centroméricas inestables durante la interfase (Morency *et al.*, 2007) y que su tinción difusa en el nucleoplasma es evidencia de una actividad independiente a los CBs que aún no ha sido descrita (Matera y Frey, 1998).

Se ha reportado la presencia de CBs adyacentes a los *loci* de los genes codificantes para histonas en células humanas y murinas (Matera, 1999). Además de estos *loci*, los *clusters* de genes codificantes para los snoRNAs U1, U2 y U3 colocalizan con los CBs en células humanas en interfase (Matera y Frey, 1998).

Aunque las bases biológicas para entender las asociaciones observadas entre los CBs y los *locis* mencionados anteriormente permanecen inciertas, ha habido cierto progreso en el entendimiento de los mecanismos por los cuales estas interacciones tienen lugar. Una de ellas es que los CBs se observan en estos *loci* cuando éstos están transcripcionalmente activos (Frey *et al.*, 1999). Esto sugiere que los CBs podrían facilitar la comunicación entre la maquinaria de ensamblaje de los snRNPs y los transcritos recién sintetizados. Otros descubrimientos determinan que los CBs son reclutados simultáneamente por varios *loci* (Frey *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1995), lo que da lugar a la posibilidad de su participación en la regulación con retroalimentación coordinada (Matera *et al.*, 1995).

### 1.5.1 La dinámica de los cuerpos Cajales

Un supuesto importante en el modelo de reclutamiento de los CBs y su posible participación en los procesos antes descritos es que éstos deben ser capaces de moverse. Observaciones hechas en células vivas de coílina fusionada con una GFP demostraron que los CBs son estructuras que pueden moverse hacia y a través del nucleolo, o de manera adyacente al PNC (Platani *et al.*, 2000; Boudonck *et al.*, 1999), transportarse a través del nucleoplasma. Ocasionalmente dos CBs pueden llegar a fusionarse o un sólo CB puede dividirse en dos cuerpos individuales (Lamond y Sleeman, 2003; Platani *et al.*, 2000), fenómeno conocido como “budding off” (Snaar *et al.*, 2000).

Aunque es posible que los CBs tengan la capacidad de moverse independientemente, no hay que dejar de lado la posibilidad de que podrían estar anclados a la cromatina de una manera ATP-dependiente y ser transcripcionalmente dependientes (Platani *et al.*, 2002). Se han observado proteínas nucleolares en los CBs, por lo que se considera que existe un intercambio activo entre el nucleolo y los CBs (Platani *et al.*, 2000), además de que una de las principales funciones del CB parece ser la maduración de los complejos snRNPs y snoRNPs. Éstos al ser recién sintetizados, se acumulan de manera transitoria antes de concentrarse ya sea en las manchas nucleares o en el nucleolo, respectivamente.

Los datos previos permiten especular que la dinámica que presentan los CBs se trata de un mecanismo regulado y relevante para los procesos nucleolares.

### 1.6 EL NUCLEOLO Y LOS CUERPOS CAJALES

Como se mencionó anteriormente, los CBs se encuentran cerca del nucleolo o unidos físicamente a él (Sleeman *et al.*, 1998; Bohmann *et al.*, 1995). Una función alternativa, pero no mutuamente excluyente, de la actividad de los CBs es que podrían ser los sitios de ensamblaje para las maquinarias de transcripción que trabajan en el nucleolo (Gall, 2000; Hebert & Matera, 2000). La observación de que factores involucrados en la transcripción, ensamblaje de la cola de poli A, splicing, poliadenilación y plegamiento del pre-ARNm se envían hacia los CBs en el ovocito (Gall *et al.*, 1999) permite sugerir que la maquinaria de la ARN polimerasa II se pre-ensamblan en los CBs junto con otros

elementos de la maquinaria de procesamiento para formar grupos de subunidades transcripcionalmente competentes, definidos como transcriptosomas de la ARN polimerasa II. La existencia de estas maquinarias acopladas fue descrita recientemente (Bentley, 1999; Jackson *et al.*, 1998).

La localización de algunos de los componentes de las ARN polimerasa I y ARN polimerasa III en CBs indica que éstos podrían funcionar como una plataforma de ensamblaje para los transcriptosomas (Gall, 2000; Gall *et al.*, 1999) que serían enviados al nucleolo. Se ha propuesto que la fibrilarina funciona como un eslabón molecular entre el nucleolo y el CB, actuando como un chaperón para otras moléculas (Isaac *et al.*, 1998). Esta proteína ha sido observada de manera transitoria en los CBs y a su vez, con un carácter más estable en el nucleolo, donde presenta una distribución específica.

### 1.7 LA FIBRILARINA

El nucleolo está conformado en parte por proteínas que participan en la biogénesis ribosomal, siendo una de ellas la fibrilarina (Amin *et al.*, 2007; Goessens, 1984). Esta metiltransferasa es requerida para consolidar la morfología normal del núcleo y regular el correcto desarrollo celular (Amin *et al.*, 2007).

La fibrilarina se localiza dentro del nucleolo, específicamente dentro del DFC y en las fronteras que lo separan del FC (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1997), donde participa en los primeros pasos de la transcripción del pre-ARN ribosomal formando parte del complejo U3 snoRNP, responsable de la metilación de los sitios específicos 2'-O-ribosa y de su plegamiento (Amin *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2001; Fatica *et al.*, 2000; Hernandez-Verdun, 1991; Ochs *et al.*, 1985). En esta región, la fibrilarina interactúa con PIP2 (Sobol *et al.*, 2013; Yildirim *et al.*, 2013).

La fibrilarina está presente en todos los organismos eucariotas, presentando en general una secuencia y estructura conservadas. Se presentan varias copias de su gen en los genomas de plantas (Rodriguez-Corona *et al.*, 2015) y además, se encuentra también en arqueas.

#### 1.7.1 Funciones de la fibrilarina

La fibrilarina es una metiltransferasa que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil metionina (SAM) al grupo 2'-hidroxi de la ribosa blanco en el pre-ARNr (Zhang *et al.*, 2013). Se divide en dos secciones generales: el extremo N-terminal y el dominio metiltransferasa o C-terminal, tiene una masa molecular similar entre diversas especies (33 – 36 kDa) y está involucrada en múltiples aspectos de la biogénesis del ARNr (Eichler y Craig, 1994). Es una proteína altamente conservada desde el punto de vista evolutivo, con base en su secuencia de aminoácidos, estructura y función (Reichow *et al.*, 2007; Pih *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Aris y Blobel, 1991). En la figura 1.3 se presenta un esquema de la estructura y dominios de la fibrilarina.

### 1.7.2 Dominios de la fibrilarina

- Dominio GAR

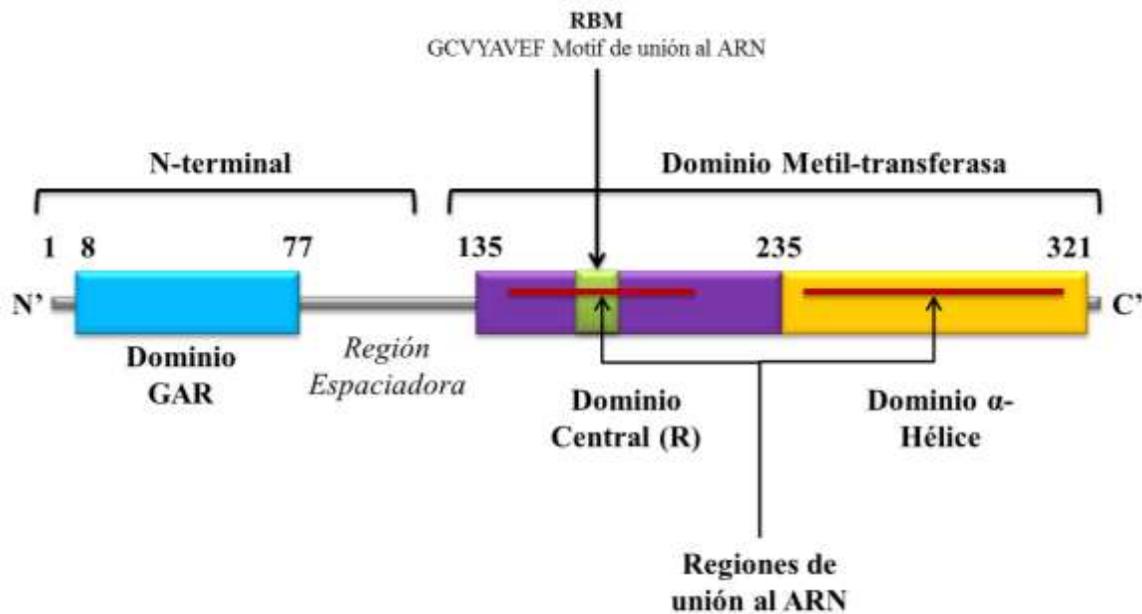
El extremo N-terminal, compuesto de 80 residuos, comprende un sitio rico en glicina y arginina, conocido como dominio GAR (Aris y Blobel, 1991; Lapeyre *et al.*, 1990). Este dominio es metilado en sus residuos de arginina (Ochs *et al.*, 1985) y es responsable de la interacción entre la fibrilarina con las proteínas SMN y la RNA DEAD box helicasa (cuyo nombre proviene de la abreviatura de su motivo de aminoácidos característico: Asp-Glu-Ala-Asp) (Jones *et al.*, 2001; Nicol *et al.*, 2000). El dominio GAR está ausente en la fibrilarina de arqueas (Lapeyre *et al.*, 1990). En la figura 1.3 se observa que el extremo N-terminal está conformado por el dominio GAR que está delimitado con un bloque azul y la región espaciadora que se muestra en una barra gris.

- Motivo de unión al ARN (**RNA Binding Motif** o RBM por sus siglas en inglés)

Está localizado en el centro de la proteína, se trata de una secuencia de alrededor de 90 residuos aminoacídicos que asemeja el dominio RBM de varios snRNPs, el cual junto con el dominio C-terminal  $\alpha$ -hélice constituyen un dominio similar a metiltransferasa que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil metionina (SAM) (Wang *et al.*, 2000; Aris y Blobel, 1991). En la figura 1.3 se aprecia que el dominio metiltransferasa está compuesto por el dominio central (R) marcado con un bloque morado y el dominio  $\alpha$ -hélice marcado con un bloque amarillo. Dentro del dominio central se encuentra el motivo RBM o de unión al ARN conformado por el octámero GCVYAVEF; a su vez, las barras rojas marcan las zonas de unión específica al ARN.

- Dominio C-terminal rico en  $\alpha$ -hélices

Compuesto por alrededor de 30 residuos, se considera que este dominio es el responsable de la localización de la fibrilarina a los CBs. Sin embargo, el destino final de la fibrilarina estará condicionado, en ambos casos, por la presencia de las regiones de unión al ARN (Snaar *et al.*, 2000). La presencia de las regiones de unión al ARN parecen ser un prerrequisito para que la fibrilarina pueda dirigirse a sus regiones intranucleares (CBs y nucleolos) de manera correcta (Snaar *et al.*, 2000).



**Figura 1.3** Representación esquemática de la estructura y dominios de la fibrilarina (los números representan el número de los aminoácidos en la secuencia que componen los dominios). Modificado de Loza-Muller *et al.*, 2015; Rakitina *et al.*, 2011.

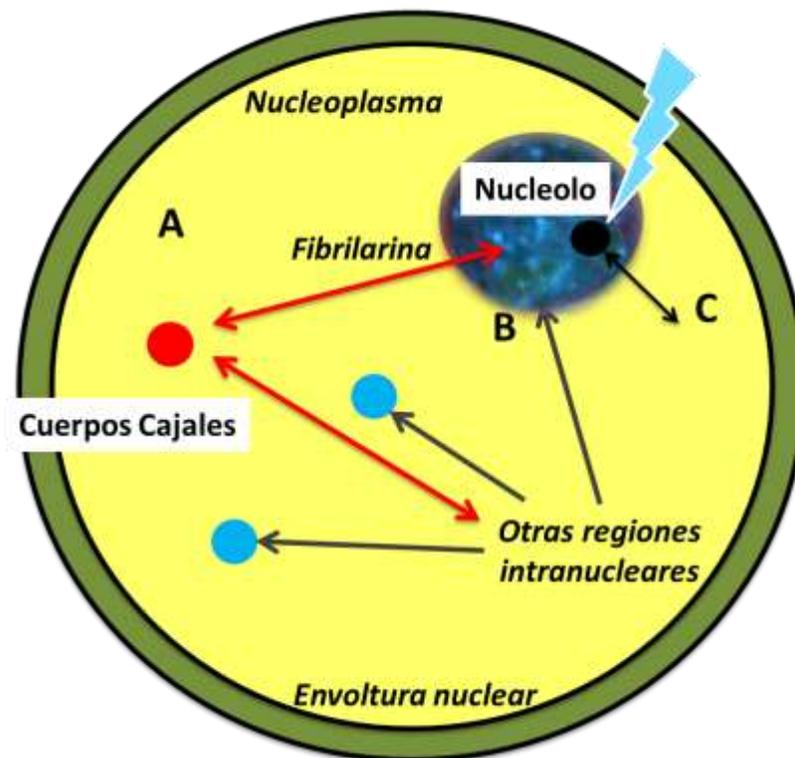
### 1.7.3 La fibrilarina en plantas

En plantas, la fibrilarina fue identificada en primera instancia como un mediador de la maquinaria de transcripción de la ARN polimerasa II (Backstrom *et al.*, 2007). Se han determinado dos sitios de unión al ARN en las dos fibrilarinas reportadas en *Arabidopsis thaliana* (Rakitina *et al.*, 2011). La fibrilarina de plantas está también involucrada en el procesamiento del ARN ribosomal (Saez-Vasquez *et al.*, 2004).

En el ciclo de vida de los umbravirus, se ha descrito que se requiere a la fibrilarina para su proliferación. Se observa que la fibrilarina se redistribuye en el citoplasma tras la infección y participa en la formación de ribonucleoproteínas virales que permiten su transporte a través del floema, resultando en la infección sistémica de la planta (Kim *et al.*, 2007).

#### 1.7.4 Dinámica de la fibrilarina entre el nucleolo y los cuerpos Cajales

Se ha propuesto que la fibrilarina funciona como un eslabón molecular entre los nucleolos y los CBs (Platani, 2000; Isaac *et al.*, 1998). Como se observa en la figura 1.4-A, el movimiento de la fibrilarina en cuestión de segundos, a través del nucleoplasma de los nucleolos hacia los CBs y viceversa, sugiere que ésta se transporta entre ambas regiones más de una vez durante su periodo activo (Gall, 2000). Dicho transporte podría suceder después de cada acto funcional, por ejemplo, un suceso de transcripción o al terminar el procesamiento del pre-ARN ribosomal (Chen y Huang, 2001). Por otro lado, en la figura 1.4-B se esquematiza cómo la fibrilarina dispersa en el nucleoplasma se dirige al nucleolo donde se concentra en mayor cantidad (Snaar *et al.*, 2000). En la figura 1.4-C se observa que después de un evento de fotoblanqueo, la fibrilarina presenta tasas de recambio entre el nucleolo y las zonas circundantes, esto se ha demostrado por medio de ensayos de fotoblanqueo (Snaar *et al.*, 2000).



**Figura 1.4** La fibrilarina viaja entre los nucleolos y los CBs. Modificado de Nagata y Takeyasu, 2007.

Las proteínas nucleolares fibrilarina, nucleolina y B23 son consideradas de movimiento relativamente rápido, en comparación con las proteínas estructurales como las histonas (Chen y Huang, 2001; Phair y Misteli, 2000) así como las proteínas de los compartimentos perinucleares (Huang *et al.*, 1998). Por otro lado, los factores de transcripción CF, SF2/ASF, SC35 (Phair y Misteli, 2000) y las proteínas presentes en los CBs, coilina y SMN presentan un movimiento rápido, similar al de la fibrilarina (Handwerger *et al.*, 2005; Sleeman *et al.*, 2003).

### **1.8 ESTUDIO DE LA DINÁMICA PROTEICA POR MEDIO DE REPORTEROS FLUORESCENTES Y TÉCNICAS DE FOTOBLANQUEO**

El desarrollo de una variedad de acarreadores y reporteros fluorescentes, en conjunto con el mejoramiento de los equipos de microscopía y las técnicas de obtención de imágenes, han permitido importantes e interesantes avances en el estudio de la dinámica nuclear.

Entre los principales reporteros fluorescentes están los agentes intercalantes de afinidad exclusiva al ADN, como DAPI, Hoechst, YOYO-1, entre otros. Las ventajas de estos acarreadores químicos son: i. la mayoría tiene un efecto mínimo o nulo en la viabilidad de las células; ii. su tamaño es tan pequeño que pueden cruzar tanto la membrana plasmática como la pared celular fácilmente y difundirse a través de la célula, y iii. pueden usarse para la obtención de imágenes de células *in vivo*. Para el estudio de la dinámica proteica, la proteína GFP y sus derivados han sido las herramientas más útiles.

Una de las principales técnicas especializadas en el estudio de la dinámica de proteínas dentro del núcleo es el ensayo de recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP, por sus siglas en inglés). Los análisis de FRAP pueden medir la movilidad intranuclear de proteínas marcadas con reporteros fluorescentes (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2001). Esta tecnología aplicada al estudio de la dinámica nuclear y su compartimentalización ha ayudado a comprender la dinámica de diferentes componentes nucleares como histonas, factores de transcripción, proteínas que interaccionan con el ADN y ARN, factores de splicing y receptores nucleares (Phair, 2001).

### 1.8.1 FRAP: Ensayo de recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo

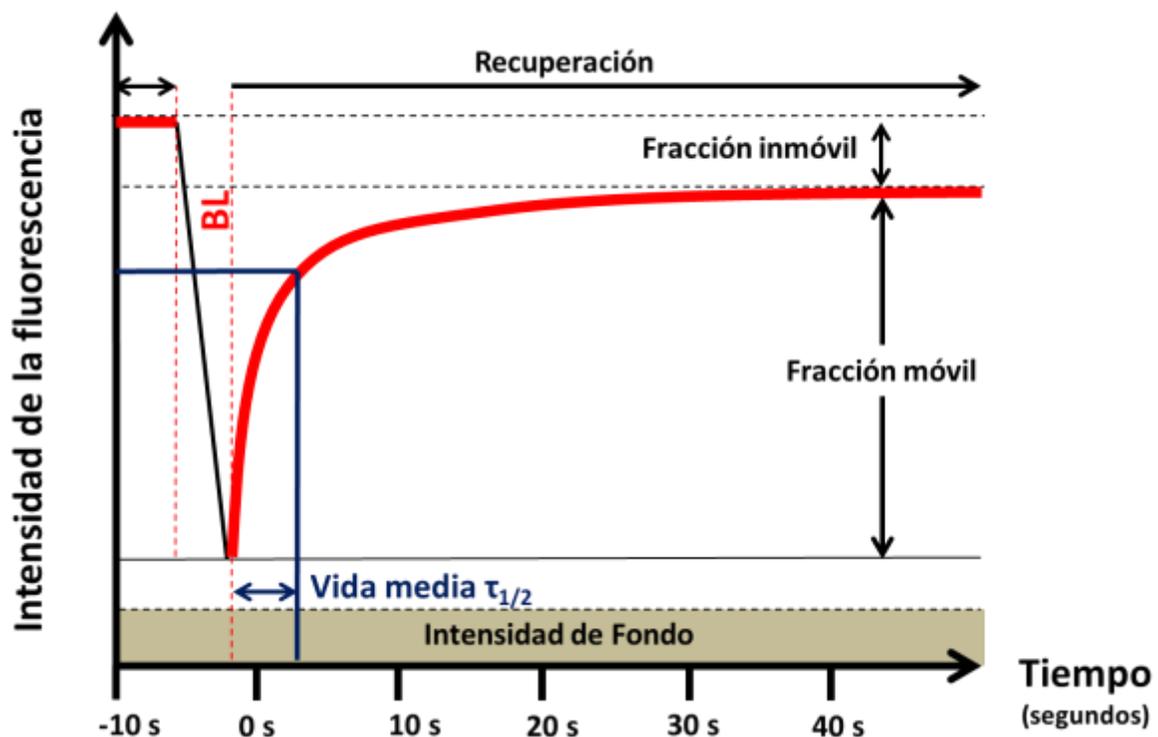
La recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo (*Fluorescence Recovery After Photobleaching* o FRAP por sus siglas en inglés) se utiliza para cuantificar la movilidad de moléculas de interés dentro de las células vivas. La dirección y sentido del movimiento de dos moléculas marcadas con un fluoróforo en regiones de  $\sim 10 \mu\text{m}^2$  dentro de una misma célula pueden ser observadas y descritas empleando este análisis (Axelrod *et al.*, 1976).

En un experimento de FRAP convencional, se selecciona una región de interés (REI) donde se expresa una proteína que ha sido acoplada a un reportero fluorescente. Ésta es blanqueada por medio de uno o múltiples disparos de luz de alta energía. Después, la región blanqueada es monitoreada para cuantificar la recuperación de la fluorescencia en función del tiempo. El proceso de recuperación ocurre por reemplazo del fluoróforo en la zona blanqueada por transporte lateral de la superficie circundante. Los datos obtenidos por FRAP se analizan por medio de modelos cinéticos de difusión proteica o curvas de recuperación de la fluorescencia (Axelrod *et al.*, 1976).

Debido a que la REI sometida a blanqueo está compuesta por una fracción móvil y otra inmóvil, la curva de recuperación no siempre alcanzará el nivel de intensidad fluorescente original. El nivel que alcanza la meseta suele estabilizarse en un nivel menor al determinado antes del blanqueo lo cual se debe a que sólo se recuperará la fluorescencia de la fracción móvil. Por lo tanto, es importante considerar que la fracción inmóvil de la REI no contribuye a la recuperación de la fluorescencia, y al mismo tiempo, no proporciona sitios de entrada libres para la entrada de proteínas fluorescentes no blanqueadas que podrían migrar de otras regiones intranucleares (Bellmann, 1974). Tomando esto en cuenta, las mediciones obtenidas a partir de la cuantificación de la fracción móvil, proporcionan un perfil real de la dinámica de la proteína de interés.

### 1.8.2 Modelos cinéticos de difusión proteica o curvas de recuperación de la fluorescencia

Los modelos cinéticos de difusión proteica o curvas de recuperación de la fluorescencia permiten la interpretación gráfica de un experimento de FRAP. Como se esquematiza en la figura 1.5, antes de comenzar el experimento, se determina la fluorescencia inicial del REI y se le otorga el valor de 1.0. El REI es fotoblanqueado completamente y monitoreado durante el transcurso del tiempo (s) para registrar un incremento consecuente de la fluorescencia, el cual será representado por un valor de media máxima o  $\tau_{1/2}$  el cual provee la información necesaria para determinar un coeficiente de difusión. La recuperación de la fluorescencia se ve reflejada en una curva logarítmica. Esta curva alcanza una meseta una vez que la recuperación ha llegado a su máximo, dicha meseta nos permite diferenciar una fracción móvil (Y) e inmóvil ( $X - Y$ ) (Axelrod *et al.*, 1976).



**Figura 1.5** Representación gráfica de un experimento de FRAP y de los datos que pueden obtenerse a partir de él.

Para calcular el porcentaje de recuperación se emplea la fórmula:  $(Y/X) \times 100 = \%$  de recuperación. En la figura 1.5, la cantidad de fluorescencia perdida por fotoblanqueo es X y la cantidad recuperada es Y. En la práctica, el porcentaje de recuperación casi nunca alcanza el 100 %. La movilidad de la molécula se ve determinada por la pendiente de la curva (Fritzsche y Charras, 2015). Mientras la pendiente sea más pronunciada, la recuperación de la fluorescencia será más rápida y por lo tanto, las moléculas se moverán con mayor rapidez.

### **HIPOTESIS**

1. La fibrilarina es una proteína nuclear que se localiza principalmente en el nucleolo y en los CBs, donde presenta una dinámica específica que se verá alterada por la presencia de mutaciones puntuales que afectarán su interacción con fosfoinosítidos nucleares.
2. La fibrilarina de *C. chinense* mantiene una localización similar a la de la fibrilarina humana bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

### **OBJETIVOS GENERALES**

1. Comparar la dinámica de la fibrilarina humana silvestre con mutantes puntuales del dominio GAR en células HeLa.
2. Determinar la localización de la fibrilarina de *Capsicum chinense*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Localizar a la fibrilarina nativa y quimérica en ambos modelos.
2. Describir la dinámica de la fibrilarina de *C. chinense* en células de chile transformadas transitoriamente con el vector pK7RWG2,0::CcFib.
3. Describir la dinámica de la fibrilarina humana silvestre y sus mutantes implementando el análisis de FRAP.

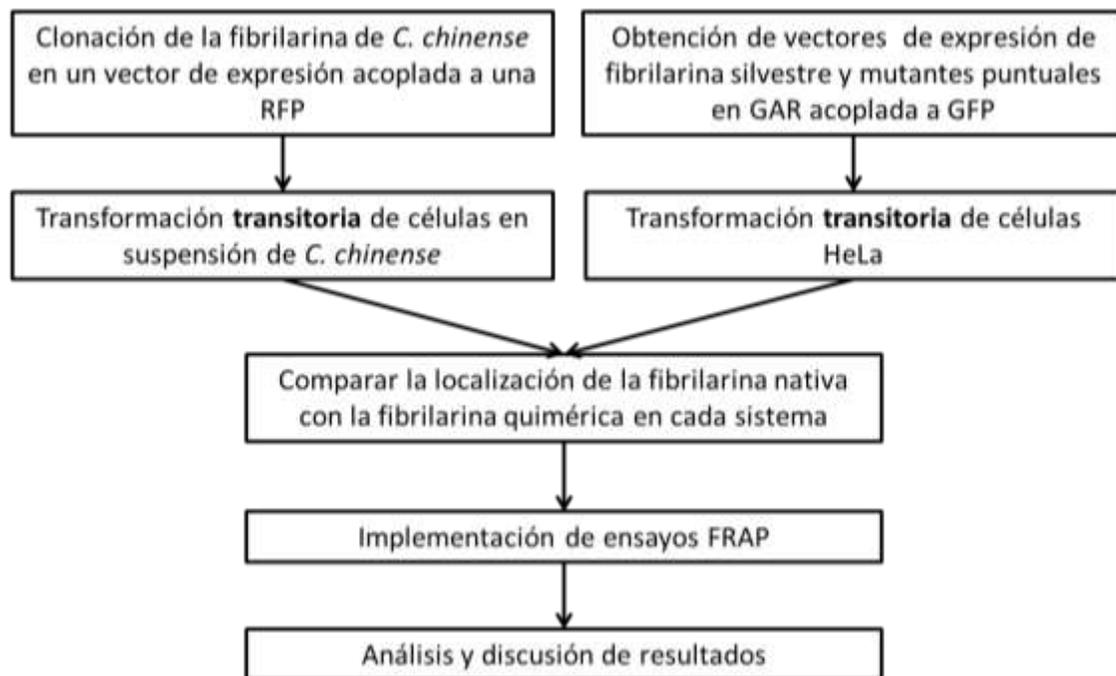
### **JUSTIFICACIÓN**

La interacción de la fibrilarina con diversos fosfoinosítidos difiere en organismos vegetales y animales. Además, se desconocen los efectos que los fosfoinosítidos nucleares podrían tener sobre el carácter dinámico de la fibrilarina. Considerando que la generación de mutaciones puntuales en los residuos que interaccionan con fosfoinosítidos dentro del dominio GAR de la fibrilarina tendrá un efecto en su dinámica entonces será posible recopilar información que ayude a comprender a mayor detalle la naturaleza de esta proteína nuclear y cuáles son las pautas que rigen sus funciones y comportamiento.

---

**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

Para llevar a cabo este estudio se siguió la estrategia experimental mostrada en la figura 1.6, el cultivo de células en suspensión de *C. chinense* fue proporcionado por el laboratorio de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham. El cultivo de células HeLa fue proporcionado por el *Institute of Molecular Genetics of the ASCR*.



**Figura 1.6** Diagrama de flujo que esquematiza la estrategia experimental para analizar la dinámica de la fibrilarina en células de *C. chinense* y HeLa.



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE LA FIBRILARINA

##### 2.1.1 Alineamiento de secuencias de fibrilarina reportadas en plantas y análisis filogenéticos

Se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de secuencias de fibrilarina reportadas en plantas en las bases de datos de NCBI, Pepper Genome®, Sol Genomics Network® y Spud DB®. Se obtuvieron un total de 52 secuencias con el nombre de fibrilarina o como “probable mediador de la transcripción de la ARN polimerasa II”.

Utilizando estas secuencias de aminoácidos en formato FASTA, se realizó un alineamiento empleando el software MEGA 6.06® y el método *MUSCLE* “*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*”. Este alineamiento utilizó la función “*Best DNA, protein model*” empleando el método estadístico de máxima similitud para determinar al modelo de sustitución *Jones-Taylor-Thornton* con distribución gama (JTT+G) como el más apto para el análisis. Con esta información, se realizó un análisis de reconstrucción filogenética empleando el método de Bootstrap con 1000 réplicas. Se utilizó el método de *Nearest-Neighbor-Interchange* para generar un árbol base por *Neighbor Joining*.

Los alineamientos se utilizaron para cuantificar los porcentajes de similitud entre las secuencias. Posteriormente, este mismo método se utilizó para realizar alineamientos para cada dominio por separado con la finalidad de determinar qué dominios de la fibrilarina presentaban más diferencias y cuáles tenían un mayor grado de similitud. Para identificar la extensión de los dominios, se tomó como base la secuencia de aminoácidos de la fibrilarina 1 reportada para *A. thaliana* (Rakitina *et al.*, 2011).

## 2.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR BINARIO pK7RWG2,0::CcFib PARA LA EXPRESION DE LA FIBRILARINA DE *C. chinense* ACOPLADA A UNA RFP

### 2.2.1 Obtención de la secuencia de fibrilarina de *Capsicum*

La secuencia de fibrilarina reportada para el género *Capsicum* se obtuvo de la base de datos Pepper Genome©, donde está representado el genoma completo de *C. annuum* variedades Zunla y Glabriusculum-Chiltepin. Empleando la secuencia de fibrilarina de *A. thaliana* (Rakitina *et al.*, 2011), se realizó un BLASTn (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool-**N**ucleotides) en la base de datos CDS (**C**oding **D**NA **S**equence) para encontrar la secuencia del ADN codificante. De esta forma se obtuvo el locus del gen: Capana03g002188 [mRNA] locus=Chr03:52710946:52714135:-. En la dirección antes mencionada, se encontró la secuencia del ARNm para la fibrilarina de *C. annuum* en la base de datos de CDS específica para el cromosoma 3.

### 2.2.2 Amplificación de la secuencia de fibrilarina de *C. chinense*

Utilizando como base a la secuencia de la fibrilarina de *C. annuum*, se diseñaron cebadores específicos para amplificar esta secuencia en *C. chinense*. Las secuencias de cada cebador fueron las siguientes: **CaFib\_Fwd.**- 5'ATG GTT GCA CCA ACT AGA GGT3'. **CaFib\_Rvs.**- 5'GGC AGC AGC CTT TTG CTT CTT3'. Los cebadores fueron analizados en el software FastPCR® previo a ser sintetizados.

Se realizó una extracción de ARN total de *C. chinense*, el cual se utilizó para sintetizar ADNc de cadena sencilla con el kit M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA®). El ADNc obtenido fue amplificado por medio del siguiente programa de PCR: La muestra fue sometida a una desnaturalización inicial de diez minutos a 94°C. Inmediatamente, se prosiguió a 35 ciclos compuestos por las siguiente serie de temperaturas un minuto a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 60°C (alineamiento) y 30 segundos a 72°C (extensión). Transcurridos los 35 ciclos se pasó a una extensión final de diez minutos a 72°C. El producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 1% (p/v); La banda esperada de 945 pb fue cortada y purificada.

### **2.2.2.1 Ligación de producto de PCR en pJET1.2/blunt®**

El producto de PCR fue ligado en el vector pJET1.2/blunt® (ThermoScientific®). Células competentes de *E. coli* cepa DH5α fueron transformadas con el producto de ligación y sembradas en placas con ampicilina para su incubación durante 16 horas a 37°C. Se seleccionaron 10 colonias, producto de la transformación, para extraer el plásmido por medio de minipreps. Los productos de extracción fueron analizados en un gel de agarosa, donde se seleccionaron cinco clonas candidatas para digestión con la enzima Bgl II, que libera el inserto completo.

### **2.2.2.2 Secuenciación de clonas positivas y verificación de integridad del inserto**

Las clonas que resultaron positivas después de la digestión fueron enviadas al Instituto de Genómica de la Universidad de Clemson (CUGI), Carolina del Sur para su secuenciación por medio de Sanger Sequencing®.

El resultado de la secuenciación de cada clona fue analizado por medio de un alineamiento independiente con la secuencia de fibrilarina de *C. annuum* (Pepper Genome®). Una vez que se determinó qué clona contaba con la secuencia integrada, tanto ésta como la secuencia de *C. annuum*, fueron sometidas a una traducción *in silico* para alinear las secuencias de aminoácidos resultantes. Una vez que se contó con la secuencia de *C. chinense*, se realizaron dos análisis filogenéticos adicionales: uno comparando a la fibrilarina de *C. chinense* con el resto de las Solanáceas y otro comparándola con la fibrilarina humana, de *Arabidopsis* y de levadura.

Una vez que se determinó qué clona contaba con el inserto completo, se realizó una estandarización de PCR utilizando dicho vector (pJET-CcFib) como template y se almacenaron alícuotas de la cepa transformada y del vector puro como reserva.

### 2.2.3 Construcción de vector pK7RWG2.0::CcFib utilizando la tecnología GATEWAY

Para introducir la secuencia de la fibrilarina de *C. chinense* (clonada en pJET1.2/blunt®) dentro del vector binario pK7RWG2.0, se utilizó la tecnología GATEWAY de recombinación sitio específica. Como se puede apreciar en la figura 2.1, se añadieron las cajas parciales **12 attB1** (A AAA AGC AGG CT kozak: A ACC) y **GGGG-attB2** (AGA AAG CTG GGT) a los cebadores CcFib\_Fwd y CcFib\_Rvs, respectivamente.

#### CcFib\_FWD-attB1

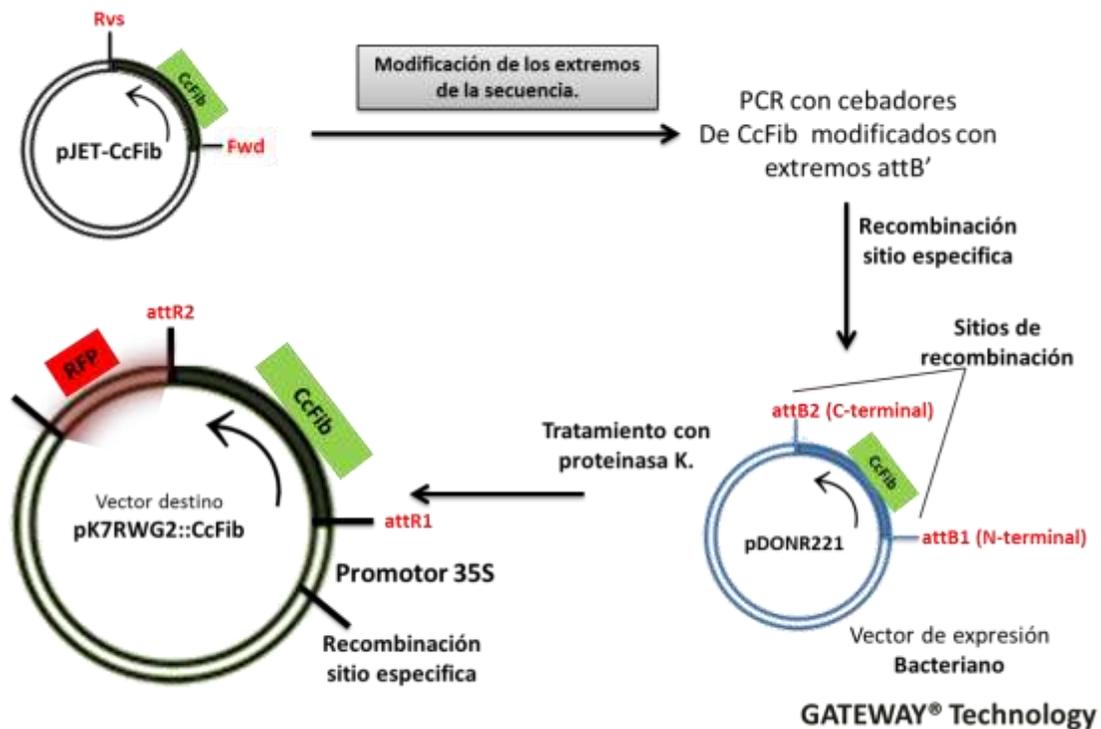


#### CcFib\_RVS-attB2 (Secuencia complementaria de CcFib)



**Figura 2.1** Cebadores específicos para llevar a cabo la recombinación sitio específica de la fibrilarina dentro del primer vector de expresión pDONR221.

Se llevó a cabo una primera PCR utilizando el vector pJET1.2/blunt® con la secuencia de fibrilarina de *C. chinense* como template y los cebadores CcFib\_FWD-attB1 y CcFib\_RVS-attB2. El producto de PCR obtenido fue empleado para la recombinación sitio específica con el vector de expresión bacteriana pDONR221 como destino, como se muestra en la figura 2.2.



**Figura 2.2** Esquema que ilustra el proceso de recombinación sitio específica.

El vector pDONR221 fue utilizado para transformar células de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ , posteriormente se purificó el vector y verificó la presencia del inserto por medio de PCR. Se llevó a cabo una segunda recombinación sitio específica hacia el vector destino pK7RWG2.0, vector binario de expresión acoplada a una RFP. Dicho vector fue almacenado en bacterias DH5 $\alpha$  para su posterior purificación y secuenciación.

### 2.2.3.1 Secuenciación de vector binario pK7RWG2::CcFib y verificación de la integridad del inserto

Después de su purificación, el producto final del proceso de recombinación sitio específica fue analizado por secuenciación Sanger. Los candidatos seleccionados para secuenciar fueron aquellos que resultaron positivos después de ser analizados por PCR.

Los resultados de la secuenciación fueron alineados respecto a sus secuencias de pares de bases y de aminoácidos de manera independiente, con la secuencia de fibrilarina de *C. chinense*.

## **2.3 MODELOS CELULARES**

### **2.3.1 CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE *C. chinense***

#### **2.3.1.1 Origen y mantenimiento**

El cultivo en suspensión de *C. chinense* Jacq. proveniente de callos inducidos a partir de tejido foliar, fue establecido en el laboratorio de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Se utilizó medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 2,4-D (1 mg/ml) y cinetina (1 mg/ml). Se establecieron las condiciones del cultivo a una temperatura de 25 °C, en agitación constante de 100 rpm y en condiciones de luz continua. Para su mantenimiento, el cultivo fue subcultivado cada 21 días en medio MS enriquecido fresco.

#### **2.3.1.2 Curva de crecimiento del cultivo en suspensión de *C. chinense***

Para determinar el crecimiento del cultivo en suspensión de *C. chinense*, se realizaron curvas en las que se indicó el aumento de biomasa en la suspensión, tomando muestras por triplicado para peso fresco y peso seco cada dos días durante 40 días. Para determinar el peso fresco se filtró el contenido completo de un matraz de cultivo por medio de vacío. El material biológico fue pesado y posteriormente colocado en la estufa a 50 °C durante 48 horas para su deshidratación total. Después se determinó el peso seco de las tres replicas biológicas. Al mismo tiempo, se midió el pH de cada matraz para registrar los cambios en este parámetro.

Los datos registrados se graficaron para la obtención de la curva de crecimiento característica de este cultivo, la cual se utilizó para calcular el índice de crecimiento (IC) y la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ). El índice de crecimiento (IC) es la estimación relativa de la capacidad de crecimiento de un cultivo, correlaciona los datos de biomasa obtenidos durante el tiempo de toma de muestras con las condiciones iniciales. Se calcula como el rango de la biomasa inicial y acumulada. En el caso de  $\mu$  se refiere a la pendiente de la curva y se define como el rango de incremento de biomasa en una población celular por unidad de concentración de biomasa. Este valor fue utilizado posteriormente para calcular el tiempo de duplicación (td) del cultivo (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006). Las

fórmulas utilizadas para calcular estos parámetros fueron las siguientes:

Índice de crecimiento (para peso fresco o seco):

$$GI = \frac{W_F - W_0}{W_0}$$

Dónde:

$W_f$  = Peso final

$W_0$  = Peso inicial

Tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ):

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t}$$

Dónde:

$x_0$  = Peso inicial o densidad celular inicial

$x$  = biomasa en el tiempo  $t$

$t$  = tiempo de cultivo transcurrido (días o 24 horas)

Tiempo de duplicación ( $td$ ):

$$dt = \frac{\ln 2}{\mu}$$

### **2.3.1.3 Caracterización morfológica de las células en suspensión de *C. chinense***

Para obtener una caracterización morfológica básica de las células en suspensión, se utilizó un cultivo de dos semanas después de la resiembra. Se tomaron 500 µl de células disgregadas, colocandolos en un tubo eppendorf y se agregaron dos µl de DAPI (100 mg/ml) para la observación de núcleos. La muestra se incubó con agitación y en luz continua durante una hora. En paralelo, se realizó otra preparación, pero a ésta se añadieron dos µl de calcoflúor y se incubó durante una hora bajo las mismas condiciones para la observación de pared celular. Las muestras se prepararon en laminillas previamente tratadas con poli-L-lisina, utilizando mowiol al 10% (v/v) para montar el cubreobjetos y se dejaron secar 12 horas. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio confocal. Se tomaron fotografías en el campo de luz visible, en el campo de 461 nm para detección de núcleos (ácidos nucleicos) marcados con DAPI y pared celular en aquellas marcadas con calcoflúor, y en 700 nm, para detección de autofluorescencia.

### **2.3.1.4 Inmunofluorescencia en células de cultivo en suspensión de *C. chinense***

Se utilizó una muestra de un g de peso fresco de células en suspensión para el tratamiento de inmunofluorescencia. Cada muestra fue sometida a una deshidratación en gradiente de alcohol, comenzando con alcohol al 30% (v/v) y aumentando la concentración cada hora en un 10% (v/v) hasta llegar a etanol absoluto (100% v/v), proceso que tomo ocho horas. Inmediatamente se prosiguió con una incubación en butanol durante seis horas. La inclusión en parafina se llevó a cabo realizando tres cambios de parafina cada dos horas para eliminar el butanol. Los bloques de parafina fueron etiquetados por día de toma de muestra y almacenados para la posterior realización de cortes.

Se realizaron los cortes de cada muestra por triplicado para posteriormente ser sometidas a desparafinación. Para llevar a cabo el marcaje fluorescente de las células en suspensión de *C. chinense*, las muestras fueron incubadas con tres anticuerpos primarios durante 12 horas a 4 °C: Anti-fibrilarina de ratón, anti Dominio PLC y anti Dominio PH para identificación de fosfoinosítidos. Posteriormente se realizó la incubación con anticuerpos secundarios obtenidos de conejo durante dos horas a 25 °C.

Luego de la incubación con los anticuerpos, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS, retirando el exceso de la solución por pipeteo. Las muestras se montaron con mowiol + DAPI al 10%. Posteriormente, se dejaron secar durante 12 horas para su observación al microscopio (555 nm para fibrilarina y 647 nm para PLC y PH).

### **2.3.1.5 Transformación transitoria del cultivo de células en suspensión de *C. chinense* con el vector pK7RWG2.0::CcFib**

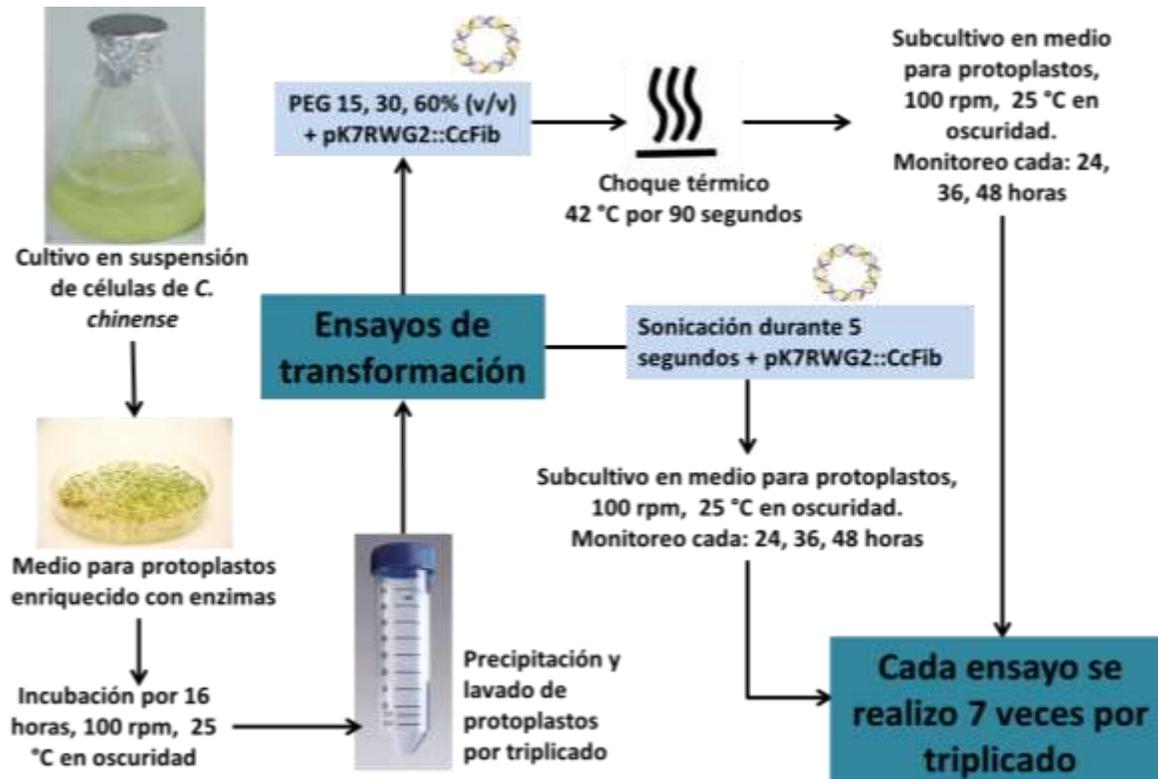
Para la transformación transitoria del cultivo en suspensión de *C. chinense* se probaron los siguientes métodos:

#### **2.3.1.5.1 Obtención de protoplastos de células en suspensión de *C. chinense* y transformación por choque térmico en presencia de PEG o por sonicación**

Se filtró la totalidad del paquete celular de un matraz de cultivo en suspensión de *C. chinense* en condiciones estériles. Se colocó un gramo de estas células en una caja de Petri con 10 ml de medio para protoplastos (sorbitol 450 mM, KCl 123 mM, sacarosa 87  $\mu$ M, CaCl<sub>2</sub> anhidrido 6 mM, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 625  $\mu$ M, MES 5 mM, pH 5.6). El medio fue enriquecido con un coctel enzimático conformado por 0.01 g de celulasa, 0.001 g de pectinasa y 0.001 g de driselasa. El cultivo fue incubado a 25 ° C durante 16 horas a 100 rpm en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los protoplastos fueron lavados por triplicado. Después de su sedimentación el medio fue retirado por pipeteo y reemplazado por medio para protoplastos libre de enzimas. Los protoplastos fueron teñidos con azul de Evans y observados al microscopio para determinar su viabilidad.

Los protoplastos obtenidos fueron utilizados para los ensayos de transformación por choque térmico en presencia de PEG o por sonicación. Como se esquematiza en la figura 2.3, se utilizaron tres concentraciones de PEG (15, 30 y 60% v/v) en presencia de 100  $\mu$ g del vector pK7RWG2::CcFib, el choque térmico a 42 ° C fue de 90 segundos. En el caso de la transformación por sonicación, los protoplastos fueron colocados en tubos eppendorf a los que les adicionó espermidina 10% (v/v), EDTA 10 mM y 100  $\mu$ g del vector pK7RWG2::CcFib. Fueron sometidos a sonicación en baño húmedo durante cinco segundos. Después de ambos tratamientos, los protoplastos fueron subcultivados en

cajas Petri con medio para protoplastos libre de enzimas. Se tomaron muestras de cada tratamiento después de 24, 36 y 48 horas de incubación para buscar evidencia de transformación. Cada ensayo de transformación fue repetido siete veces por triplicado.

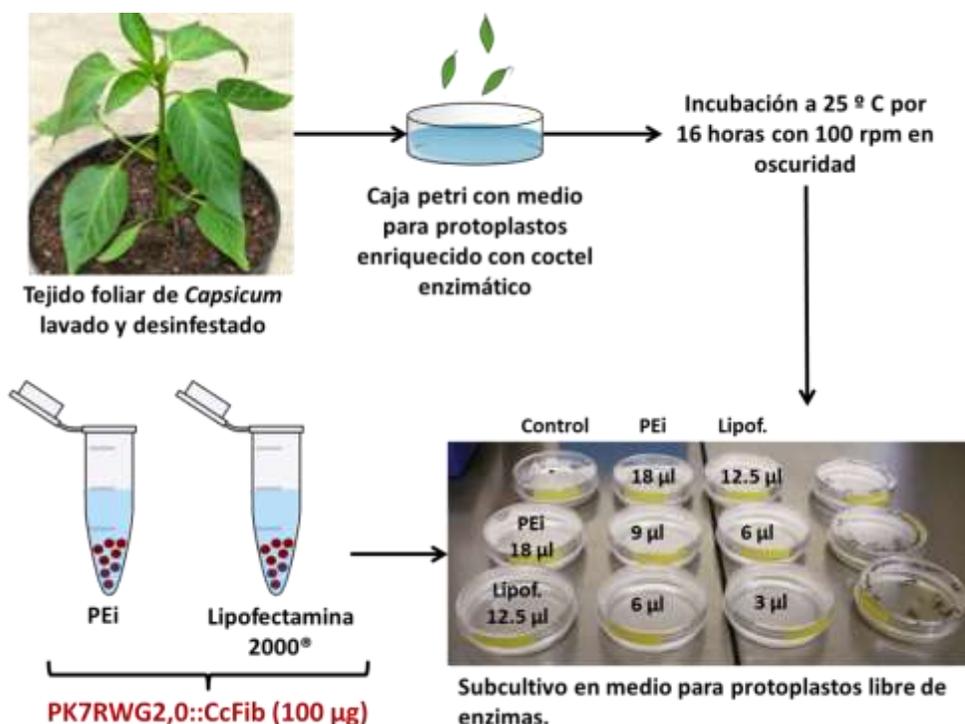


**Figura 2.3** Obtención de protoplastos para la transformación por choque térmico (42°C por 90 segundos) en presencia de tres concentraciones de PEG y sonicación durante 5 minutos. Ambos tratamientos en presencia del vector pK7RWG2:CcFib.

### **2.3.1.5.2 Obtención de protoplastos de tejido foliar de *Capsicum* y transformación por Polietilamida (PEi) o lipofectamina**

Para la obtención de protoplastos a partir de tejido foliar, se cortaron hojas jóvenes de una planta juvenil de *Capsicum*, como se muestra en la figura 2.4 las hojas fueron lavadas con jabón y agua destilada y desinfectadas con lavados de cloro comercial al 50% por triplicado. El tejido foliar fue seccionado y colocado en cajas de Petri con medio para protoplastos enriquecido con el coctel enzimático previamente descrito e incubado a 25°C durante 16 horas a 100 rpm en oscuridad. Posterior a la incubacion, se retiraron los restos de tejido foliar del medio y se recuperaron los protoplastos para ser lavados por triplicado con medio para protoplastos libre de enzimas.

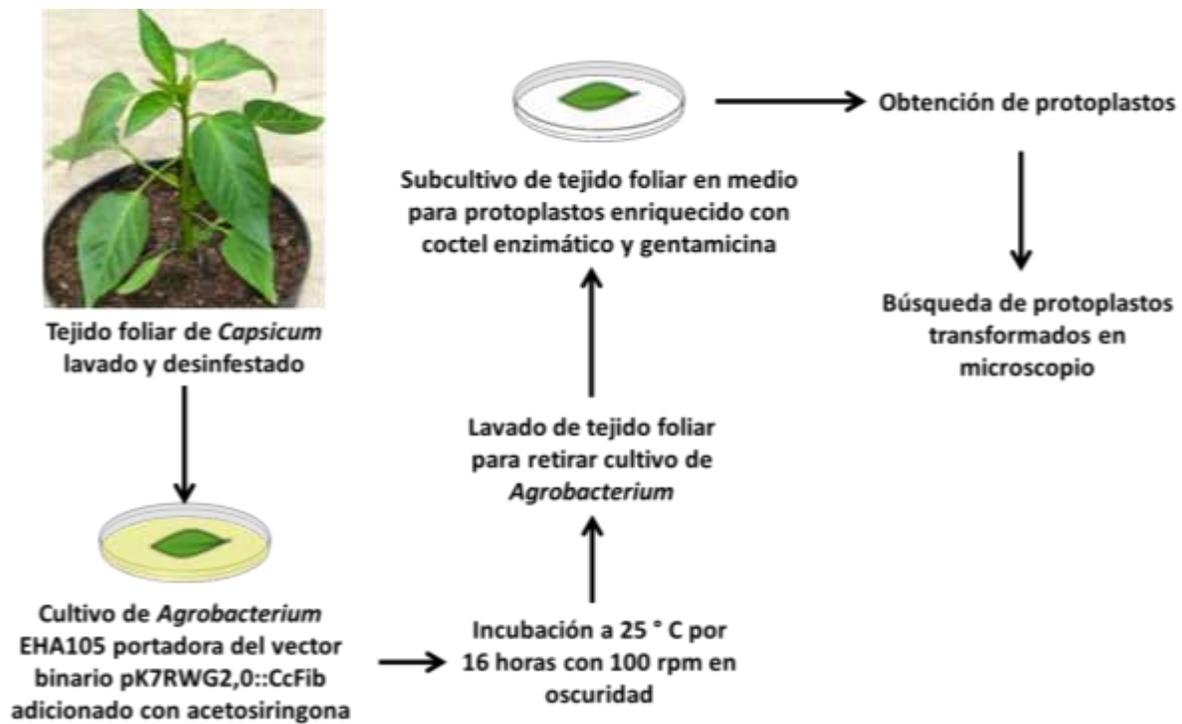
Los cocteles de transformación se prepararon de la siguiente manera: en tubos eppendorf con 1 ml de medio para protoplastos se colocaron tres concentraciones de PEi y tres de lipofectamina más 100 µg del vector pK7RWG2::CcFib. Las mezclas fueron homogeneizadas con un vortex durante 60 segundos e incubados cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron colocados en cajas de Petri pequeñas. El paquete de protoplastos lavado fue subcultivado en dichas cajas. Se tomaron muestras de cada tratamiento después de 24, 36 y 48 horas de incubación para buscar evidencia de transformación. Cada ensayo de transformación fue repetido siete veces por triplicado.



**Figura 2.4** Obtención de protoplastos a partir de tejido foliar y transformación empleando PEi y lipofectamina en presencia del vector pK7RWG2,0::CcFib.

### 2.3.1.5.3 Transformación de tejido foliar de *Capsicum* por *Agrobacterium* portador del vector binario pK7RWG2,0::CcFib

Para la transformación de tejido foliar de *Capsicum* empleando como agente de transfección a *Agrobacterium* (cepa EHA105 + vector pch32) portadora del vector pK7RWG2,0::CcFib (figura 2.5), se colocaron pedazos de hoja en un medio de cultivo de *Agrobacterium* (36 horas) enriquecido con acetosiringona y los antibióticos rifampicina (100 mg/L), espectinomomicina (50 mg/L) y tetraciclina (10 mg/L). Después de 16 horas de incubación a 25°C con 100 rpm en oscuridad, se lavó el tejido foliar y se retiró el cultivo bacteriano. El tejido foliar fue subcultivado en medio para protoplastos enriquecido con el coctel enzimático para obtención de protoplastos y gentamicina (10 mg/L) para la eliminación de trazas de *Agrobacterium*. A partir de este subcultivo se obtuvieron protoplastos que fueron observados al microscopio en busca de evidencia de transformación.



**Figura 2.5** Transformación de tejido foliar de *Capsicum* utilizando a *Agrobacterium* portador del vector pK7RWG2,0::CcFib.

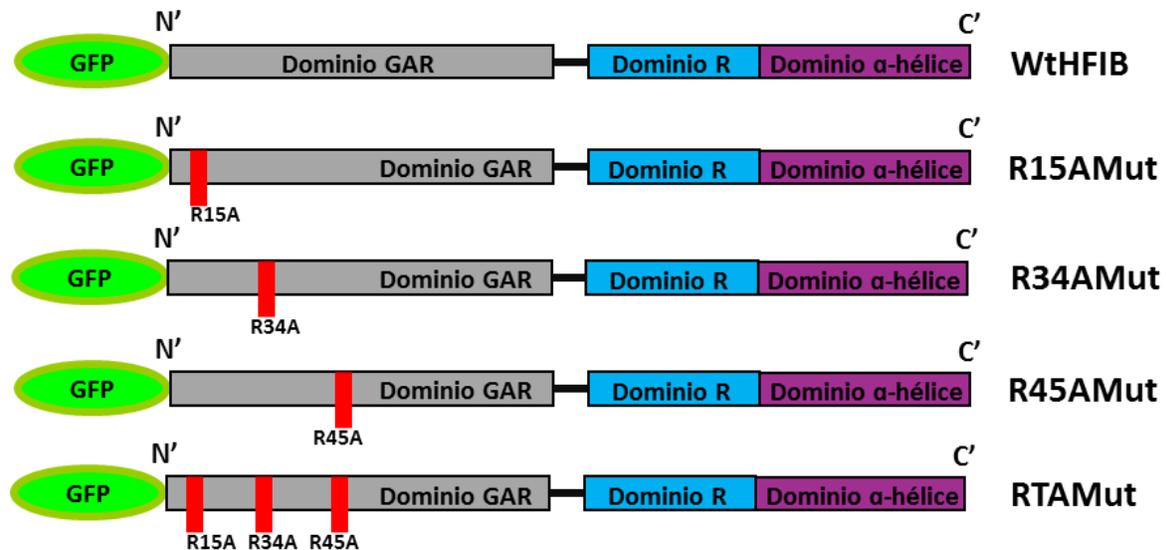
## 2.3.2 CULTIVO DE CÉLULAS HUMANAS (HeLa)

### 2.3.2.1 Resiembra y mantenimiento

Las células HeLa fueron incubadas 24 horas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich®) enriquecido con 10% de suero fetal bovino a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para permitir un evento de división (Jacobson y Ryan, 1982). Después fueron sometidas a un tratamiento con tripsina para resembrarlas en cajas de Petri para su mantenimiento. Aquellas células destinadas para los experimentos de inmunolocalización fueron resembradas en cajas de Petri con cubreobjetos de vidrio circulares.

### 2.3.2.2 Transfección transitoria de células HeLa con el vector pSTR-Fibrilarina\_GFP y sus derivados mutantes

La transfección se llevó a cabo empleando el vector de expresión de fibrilarina humana acoplado a GFP (pSTR-fibrilarina\_GFP) y sus derivados mutantes, los cuales se muestran en la figura 2.6.



**Figura 2.6** Esquemas de las mutaciones puntuales dentro del dominio GAR de la fibrilarina silvestre (WtHFIB) y su expresión acoplada a GFP. Los aminoácidos que se seleccionaron para mutación fueron los conservados entre las fibrilarinas de *H. sapiens*, *A. thaliana* y *S. cerevisiae*.

La mezcla de transfección se preparó en un tubo eppendorf con un ml de medio DMEM adicionado con PEi al 0.06% y 10 µg del vector puro, y se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente (25°C). Las células HeLa, previamente tratadas con tripsina, fueron colocadas en cajas de Petri con fondo de vidrio para microscopio y se les adicionó la mezcla de PEi con el vector pSTR-fibrilarina\_GFP por goteo. Los cultivos de células en transfección fueron incubados durante 48 horas a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.3.2.3 Inmunolocalización en células HeLa**

La preparación de las células HeLa para su fijación y tratamientos de inmunofluorescencia se realizó de la siguiente manera: se colocaron tres cubreobjetos circulares en el fondo de cajas de Petri para cultivo de células animales y se les añadió medio DMEM enriquecido con 10% de suero fetal bovino. Las células HeLa previamente transfectadas con el plásmido de expresión de fibrilarina humana pSTR-fibrilarina\_GFP fueron sembradas e incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Se verificó una confluencia del 80% sobre los cubreobjetos para llevar a cabo el cambio del medio DMEM por formalina para la fijación de las células durante 15 minutos. Se realizaron tres lavados con PBS + tween 1% (v/v).

Después de este tratamiento, las muestras fueron incubadas con cuatro anticuerpos primarios durante 12 horas a 4 °C: Anti-fibrilarina, anti-GFP de ratón, anti Dominio PLC y anti Dominio PH para identificación de fosfoinosítidos. Después de la incubación, las células fueron lavadas con solución salina de fosfato adicionada con Tween 20 (PBST) por triplicado. Los anticuerpos secundarios fueron adicionados de la siguiente manera: el anticuerpo secundario para anti-GFP, anti-Dominio PLC y anti-Dominio PH se seleccionó con una fluorescencia de 647 nm, mientras que para anti-fibrilarina fue de 555 nm (cada anticuerpo secundario se agregó por separado). Las células fueron incubadas en oscuridad durante tres horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron lavadas por triplicado con solución salina de fosfato (PBS) y se montaron con mowiol al 10% y DAPI para su posterior observación en el microscopio de fluorescencia de ajuste acústico-óptico con división de haz, Leica TCS SP5 A OBS TANDEM, Alemania.

## **2.4 ENSAYOS DE RECUPERACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DESPUÉS DE FOTOBLANQUEO (FRAP)**

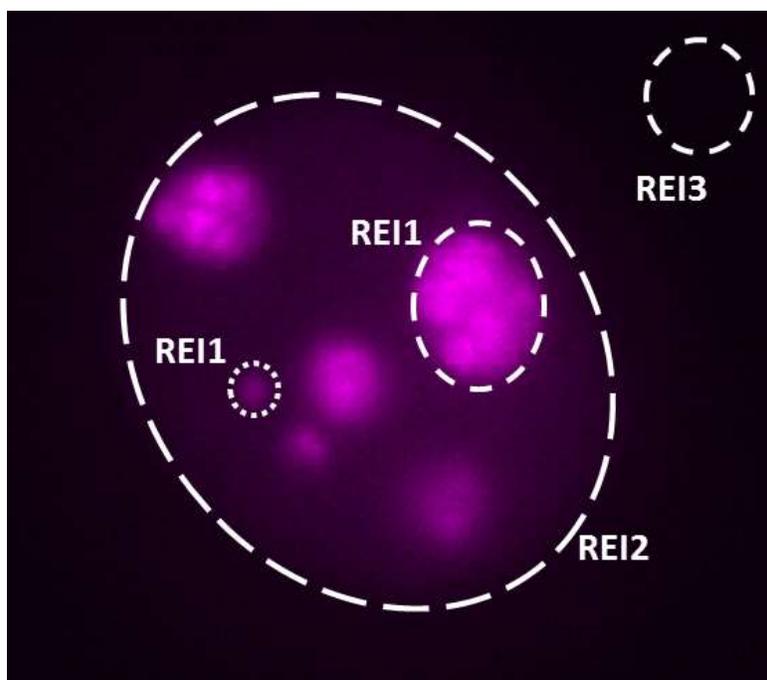
### **2.4.1 Fotoblanqueo y obtención de imágenes de células vivas en células HeLa**

Una vez transcurridas 48 horas después de la transfección, las células HeLa fueron lavadas y el medio DMEM fue reemplazado por medio Dulbecco de solución salina incolora (DPBS). Los experimentos de FRAP y la obtención de imágenes se realizaron en un microscopio de superresolución OMX DeltaVision®. Las cajas de Petri con fondo de vidrio fueron colocadas dentro de la cámara de flujo de CO<sub>2</sub> a 37°C, mientras que el resto de las muestras se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Durante el análisis de FRAP, las imágenes fueron tomadas antes, inmediatamente después y en intervalos de 20 segundos después del blanqueo para los nucleolos y en intervalos de 10 segundos para los CBs.

### **2.4.2 Obtención de las curvas de modelaje cinético de difusión proteica**

Para llevar a cabo la normalización de las curvas de difusión proteica y analizar los datos crudos de cada experimento fotocinético, se utilizó el software ImajeJ FiJi®. Con las películas obtenidas de cada experimento de FRAP, se recreó cada experimento en el software. Como se esquematiza en la figura 2.7, el área fotoblanqueada se redibujó e identificó como la región de interés 1 (REI1), después se seleccionó el núcleo completo como referencia de fluorescencia de fondo (REI2) y por último, se determinó una región fuera de la célula, carente de fluorescencia para usarse como testigo negativo durante la cuantificación (REI3).



**Figura 2.7** Selección de las regiones de interés (REI) durante un análisis de una película de FRAP en el software ImageJ Fiji®. REI1 representa la zona blanqueada; REI2 representa el total de la zona fluorescente, y REI3 es una zona libre de señal fluorescente.

#### 2.4.2.1 Obtención de los coeficientes de fluorescencia relativa (RFI), media máxima ( $\tau_{1/2}$ ) y valores porcentuales de las fracciones móvil e inmóvil

La intensidad de la fluorescencia relativa (RFI) en los análisis de FRAP fue calculada con la siguiente fórmula:  $RFI = (Ne_t/N1_t) / (Ne_0/N1_0)$ , por medio del software Image J Fiji®.  $Ne_t$  corresponde a la intensidad media del cuerpo blanqueado en varios puntos después del blanqueo; dichos valores fueron utilizados para la construcción de las curvas de difusión proteica.  $N1_t$  es la media de la intensidad del testigo no blanqueado en los puntos de tiempo correspondientes.  $Ne_0$  es la intensidad media del cuerpo blanqueado antes del blanqueo.  $N1_0$  es la intensidad media de un cuerpo control no blanqueado dentro del mismo núcleo antes del blanqueo. Cuando  $Ne_0/N1_0$  es igual a  $Ne_t/N1_t$ , es decir cuando RFI equivale a 1, se ha logrado recuperar el 100% de la fluorescencia del cuerpo blanqueado. Los valores de  $Ne_t$  de las imágenes obtenidas inmediatamente después del blanqueo fueron ajustados a 0 o empleadas en su valor original. En ambos casos, se

obtuvo el mismo tipo de dinámica durante la recuperación de la fluorescencia con pequeñas fluctuaciones en las tasas al principio de la recuperación. Por lo tanto, se interpretó el valor de  $N_{e_i}$  como 0 inmediatamente después del blanqueo para presentar los datos obtenidos en este trabajo. Empleando esta ecuación se toman en consideración las fluctuaciones en la recuperación de la fluorescencia que podrían ocurrir en la subsecuente toma de imágenes. Las medias de intensidad en las áreas de interés en las imágenes, incluyendo antes, inmediatamente después y una serie de puntos después del blanqueo fueron tomadas bajo las mismas condiciones. La intensidad fluorescente relativa de un nucleolo y de un CB sin tratamiento fueron usados como testigos.

Para obtener el valor numérico de la media máxima, la fracción móvil y la fracción inmóvil de cada curva se aplicó la siguiente ecuación exponencial a la curva normalizada: *Media máxima* =  $\tau_{1/2} = \ln 0.5 / -\tau$ . Los coeficientes armarios pueden ser empleados para calcular los siguientes parámetros de la curva de FRAP:  $A$  = Fracción móvil,  $A-1$  = Fracción inmóvil.

### 2.4.2.2 Obtención del coeficiente de difusión (D)

El coeficiente de difusión (D) fue calculado empleando la siguiente formula (Chen y Huang, 2001):

$$D_{r_n} = 0.224 \frac{r_n^2}{\tau_{1/2}}$$

Se emplearon los valores obtenidos de media máxima en cada uno de los experimentos de FRAP realizados para obtener una media (nucleolo y CBs por separado), la cual fue utilizada para reemplazar el valor  $\tau_{1/2}$  en la ecuación, mientras que el valor  $r^2$  fue reemplazado por la longitud del haz de luz de alta energía (1  $\mu\text{m}$ ). Se obtuvo un valor de coeficiente de difusión para el nucleolo y otro para el cuerpo Cajal.

### 2.4.2.3 Análisis estadístico, comparación e interpretación de los resultados

Las películas de FRAP y los datos numéricos recopilados durante los experimentos *in vivo*

fueron procesados en el software ImageJ®. El análisis estadístico implementado para determinar la existencia de diferencias significativas entre la dinámica de las fibrilarinas mutantes y su comparación con la fibrilarina silvestre fue la de prueba H de Kruskall-Wallis. En dicho análisis, se compararon los grupos de valores de vida media obtenidos para WtHFIB y para cada mutante, comparando CBs y nucleolos por separado. Las hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_a$ ) que se manejaron en este análisis estadístico fueron las siguientes:

$H_0$  = Las medias muestrales son iguales.

$H_a$  = Las medias muestrales son diferentes.

Como prueba *post hoc*, se realizó un análisis de Scheffe ( $\alpha=0.05$ ), para comparar cada grupo de datos y determinar qué tan semejantes son los valores entre sí.



## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA FIBRILARINA

Como se puede apreciar en la figura 3.1, el análisis filogenético que se realizó utilizando las 52 secuencias encontradas para fibrilarina en plantas mostró una agrupación con base en algunas de las principales familias botánicas de las Eudicotiledóneas (*Cucurbitaceae*, *Solanaceae*, *Fabaceae* y *Brassicaceae*). En la parte superior del árbol, se observan agrupadas las plantas identificadas como monocotiledóneas, presentando la mayor distancia en sus nodos con respecto al enraizamiento del árbol, esto permite interpretar que la comparación entre fibrilarinas de plantas corrobora la diversificación genética más reciente de este grupo monofilético. Dicha observación corresponde de igual manera en orden descendiente para el resto de las familias botánicas previamente mencionadas pertenecientes al grupo de las eudicotiledóneas, siendo este un grupo polifilético.

El organismo vegetal más antiguo (desde el punto de vista evolutivo) que se empleó en este análisis fue el musgo *Physcomitrella patens*, el cual resultó cercano a la gimnosperma *Picea sitchensis*, siendo ambos los únicos organismos no angiospermas del análisis. Es importante recalcar, que la localización de estos organismos dentro del árbol aparece más cercana al grupo de las monocotiledóneas, pero esto no marca una diversificación evolutiva cercana, sino una similitud conservada en las secuencias de sus fibrilarinas.

En el caso de las Solanáceas, se observó que las distancias presentes entre los géneros son pequeñas, especialmente para los géneros *Capsicum* y *Nicotiana* donde las secuencias quedaron en distancias muy cercanas, esto permite considerar que la función y composición de la fibrilarina en estos dos géneros está altamente conservada. Por lo tanto, las observaciones realizadas en el género *Capsicum* podrían extrapolarse al género *Nicotiana*.



## 3.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR BINARIO pK7RWG2,0::CcFib QUE EXPRESA A LA FIBRILARINA DE *C. chinense* ACOPLADA A RFP

### 3.2.1 Obtención de la secuencia de fibrilarina de *C. annuum*

Como resultado del alineamiento de las secuencias, se observó que la fibrilarina de *C. annuum* carecía de un fragmento de 168 pb, que correspondería a la zona codificante para el dominio de interacción con ARN. Para verificar si la falta de este fragmento se trataba de un error, se llevó a cabo un BLASTn en el genoma completo de *C. annuum*. Se utilizó la secuencia carente del fragmento más las secuencias de las nueve Solanáceas utilizadas en el alineamiento. El análisis permitió identificar una secuencia dentro del genoma de *C. annuum* idéntica a la reportada para el gen de fibrilarina, la cual puede observarse en la figura 3.2, donde si se presenta el fragmento de 168 pb faltante. Se realizó esta corrección y se obtuvo una secuencia codificante de 945 pb, codificante para un total de 315 aminoácidos.

#### Oligo CcFib FWD

ATGGTTGCACCAACTAGAGGTCGTGGAGGTGGCGGATTCAGGGGTGGTAGAGGAGATGGAGGAGGAAGAGGAGGAC  
 GTGGTGGTAGAGGTGGTTTCAGCGGTGGAAGAGGAGGTTTTGGTAGTGGAGGAAGTGGGATGAAGCGAGGTGGTGG  
 GAGAGGAGGAGGCAGAGGCGGTAGAGGTGGAGGAAGGGGACGTGGTGGAGGAGGAATBAAGGGTGGTAGTAAGGT  
 TATAGTGGAGCCTCATAGACATGGAGGTGTGTTTATTGCTAAGGGTAAGGAAGATGCACTTTGTACCAAGAATTTGGTACC  
 TGGTGAAGCTGTCTACAATGAGAAGAGAATCTCTGTTCAGAATGAGGATGGAACAAAGGTTGAGTATAGAGTGTGGAAT  
 CCTTCCGTTCCAAGTTAGCAGCTGCAATTCTGGAGGAGTTGATGATATTTGGATTAACCAGGTGCTCGTGCCTTTACC  
 TGGGTGCTGCTCAGGAACAACAGTATCTCATGTCTCAGACCTTGTGGTCTGATGGTGTGGTATATGCTGTTGAATTTT  
 TCACAGAAGTGAAGGGACTTGGTGAACATGGCCAAGAAGCGCACTAATGTTATCCCATTATTGAGGATGCTAGACACC  
 CAGCAAATACAGAATGCTTGTGCGGAATGGTGGATGTGATATTTCTGATGTTGCTCAGCCTGATCAGGCAAGAATTTAG  
 CTCTGAATGCATCATACTTCTTAAAAGCTGGAGGTCACCTTTGTATATCAATCAAGGCAAAGTGCATAGATTCAACCGTGCC  
 AGCGGAGGCCGTATTTGCTCAGGAAGTGAAGAAGCTTCAAGCGGAGCAGTTTAAACCTATTGAGCAGGTCACCTTTGAG  
 CCTTTGAAAAGGACCATGCCTGTGTTGTTGGTGCCTATCTTGTGCCAAGAAGCAAAGGCTGCTGCCTAG

#### Oligo CcFib RVS

**Figura 3.2** Secuencia completa de la fibrilarina de *C. annuum*. La secuencia tiene una longitud de 945 pares de bases. Las flechas y las letras en negritas indican las secuencias seleccionadas para el diseño de los cebadores Fwd y Rvs para la amplificación de este gen por PCR.

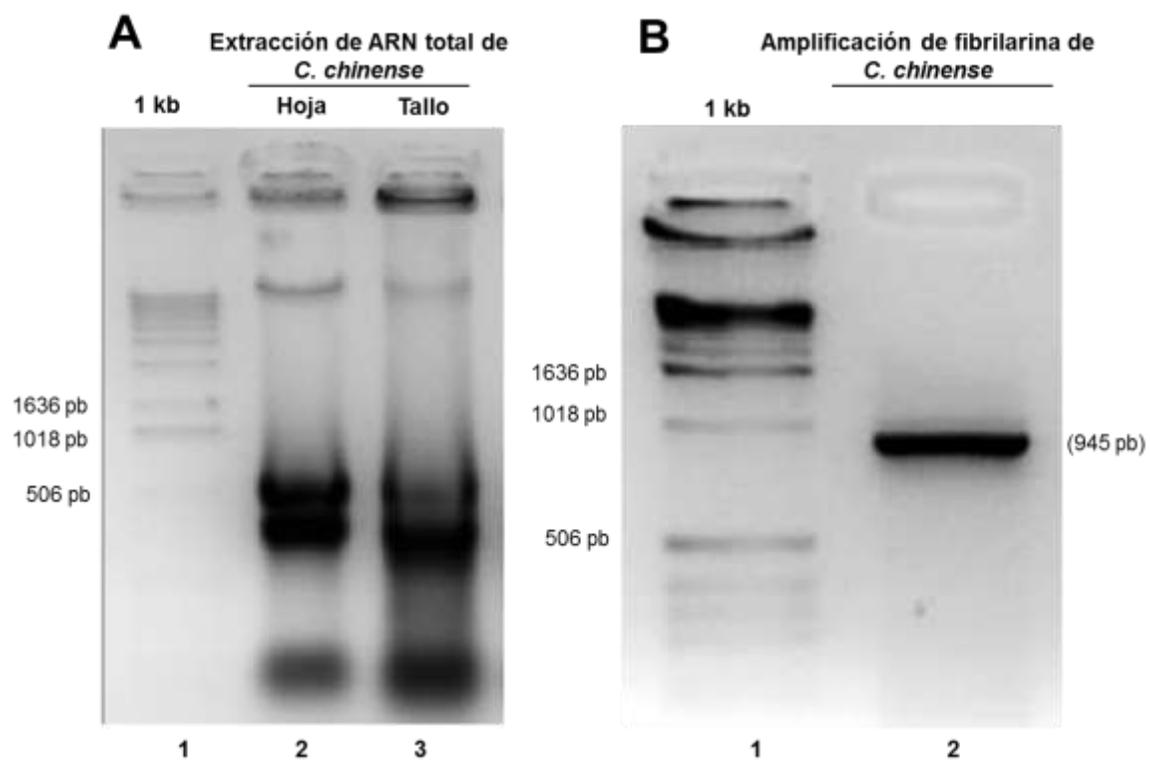
Una vez obtenida la secuencia completa de la fibrilarina de *C. annuum* a partir de la base de datos, se realizó una traducción *in silico* la cual puede observarse en la figura 3.3, con la finalidad de conocer su secuencia de aminoácidos y para ser usada como referencia al probar la integridad de la secuencia de fibrilarina de *C. chinense* que se clonaría.

```
MVAPTRGRGGGGFRGGRGDGGGRGGRGGRGGFSGGRGGFGSGGSGMKRGGGRGGGRGGR  
GGGRGRGGGGXKGGSKVIVEPHRHGGVFIKGGKEDALCTKNLVPGEAVYNEKRISVQNEGDGKVE  
YRVWNPFRSKLAAAILGGVDDIWIKPGARVLYLGAASGTTVSHVSDLVGPDGVVYAVEFSHRSGR  
DLVNMAKKRTNVIIEDARHPAKYRMLVGMVDVIFSDVAQPDQARILALNASYFLKAGGHFVISIK  
ANCIDSTVPAEAVFAQEYVKKLQAEQFKPIEQVTLEPFERDHACVVGAYLVPKKQKAAA
```

**Figura 3.3** Secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia codificante de la fibrilarina de *C. annuum*.

### 3.2.2 Amplificación de la secuencia de fibrilarina de *C. chinense*

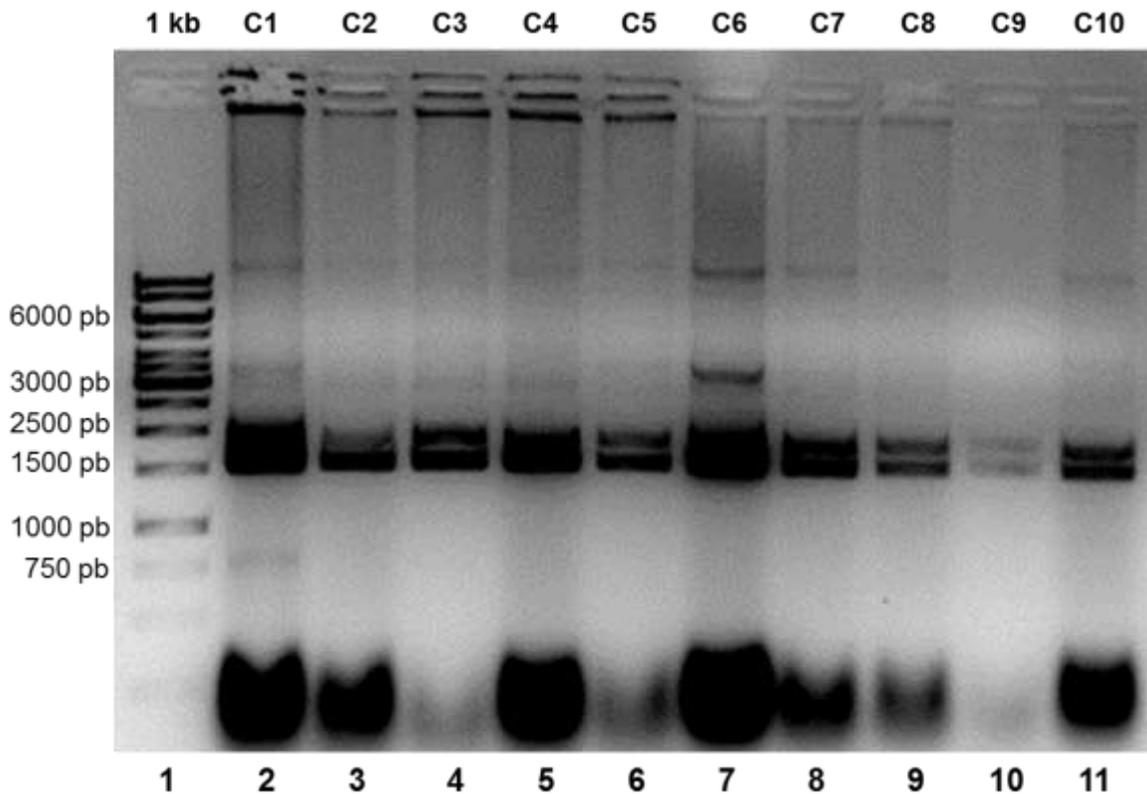
Como se puede observar en la figura 3.4-A, el ARN extraído de hoja fue mejor en comparación con el de tallo, por lo que fue este ARN el que se utilizó para la síntesis de ADNc. Después se realizó la amplificación de la secuencia de fibrilarina de *Capsicum*. En la figura 3.4-B se puede observar una banda cercana a 1018 pb, que correspondería al tamaño de la banda esperada (945 pb). Este producto de PCR fue purificado y ligado en el vector pJET1.2/blunt®.



**Figura 3.4** Extracción de ARN total (A) y amplificación de la secuencia de fibrilarina (B).

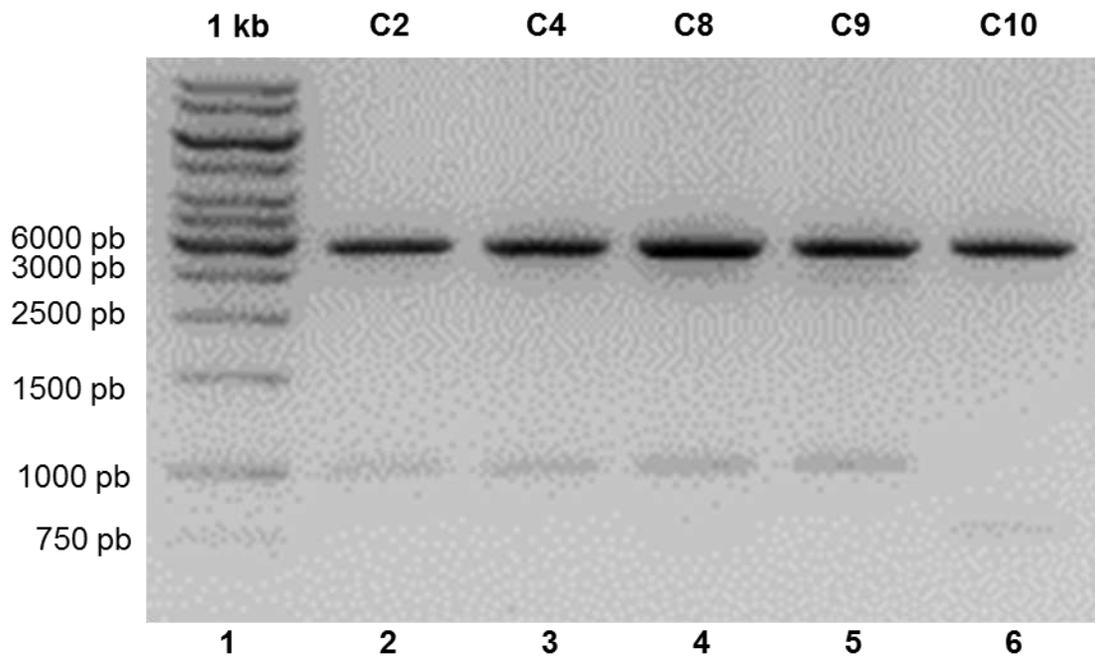
### 3.2.2.1 Clonación de la secuencia de fibrilarina de *C. chinense* en pJET1.2/blunt®

Posterior a la ligación de la secuencia de la fibrilarina en pJET1.2/blunt® y a la transformación exitosa de *E. coli* cepa DH5α con el producto de ligación, se eligieron 10 colonias para extracción de plásmido por medio de Miniprep, como se muestra en la figura 3.5.



**Figura 3.5** Verificación de la transformación con el producto de ligación de fibrilarina-pJET1.2/blunt®.

De las 10 clonas verificadas, se eligieron cuatro clonas (núm. 2, 4, 8 y 9) para realizar una digestión con Bgl II y así verificar la presencia del inserto. En la figura 3.6 se observan las cuatro clonas analizadas, en las cuales apareció la banda del tamaño esperado. Las cuatro clonas fueron secuenciadas para verificar la identidad del inserto.



**Figura 3.6** Ensayo de restricción en las clonas seleccionadas. La digestión de los vectores se llevó a cabo con la enzima Bgl II, la cual libera el inserto ligado en pJET1.2/blunt®.

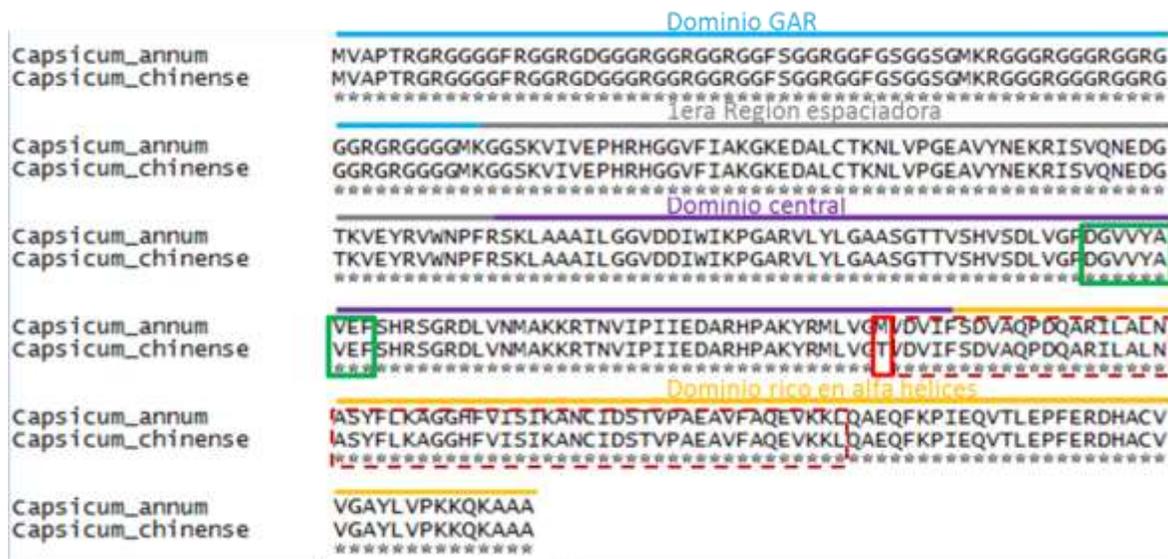
### 3.2.2.2 Secuenciación de clonas positivas y análisis de integridad de las secuencias

De las cuatro clonas secuenciadas, la número ocho presentó la secuencia de fibrilarina completa. Esto se verificó al alinear este resultado con la secuencia de *C. annum*, como se observa en la figura 3.7. Esta secuencia fue identificada como la fibrilarina de *C. chinense*.

Capsicum_annum Capsicum_chinense	ATGGTTGCACCAACTAGAGGTCGTGGAGGTGGCGGATTCAGGGGTGGTAGAGGAGATGGA ATGGTTGCACCAACTAGAGGTCGTGGAGGTGGCGGATTCAGGGGTGGTAGAGGAGATGGA *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	GGAGGAAGAGGAGGACGTGGTGGTAGAGGTGGTTTCAGCGGTGGAAGAGGAGGTTTTGGT GGAGGAAGAGGAGGACGTGGTGGTAGAGGTGGTTTCAGCGGTGGAAGAGGAGGTTTTGGT *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	AGTGGAGGAAGTGGGATGAAGC GAGGTGGTGGGAGAGGAGGAGGCAGAGGC GGTAGAGGT AGTGGAGGAAGTGGGATGAAGC GAGGTGGTGGGAGAGGAGGAGGCAGAGGC GGTAGAGGT *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	GGAGGAAGGGGACGTGGTGGAGGAGGAATGAAGGGTGGTAGTAAGGTTATAGTGGAGCCT GGAGGAAGGGGACGTGGTGGAGGAGGAATGAAGGGTGGTAGTAAGGTTATAGTGGAGCCT *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	CATAGACATGGAGGTGTGTTTATTGCTAAGGGTAAGGAAGATGCAC TTTGTACCAAGAAT CATAGACATGGAGGTGTGTTTATTGCTAAGGGTAAGGAAGATGCAC TTTGTACCAAGAAT *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	TTGGTACCTGGTGAAGCTGCTTACAATGAGAAGAGAATCTCTGTTCAGAATGAGGATGGA TTGGTACCTGGTGAAGCTGCTTACAATGAGAAGAGAATCTCTGTTCAGAATGAGGATGGA *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	ACAAAGGTTGAGTATAGAGTGTGGAATCCTTTCCGTTCCAAGTTAGCAGCTGCAATTCCT ACAAAGGTTGAGTATAGAGTGTGGAATCCTTTCCGTTCCAAGTTAGCAGCTGCAATTCCT *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	GGAGGAGTTGATGATATTTGGATTAACCAGGTGCTCGTGCTCTTTACC TGGGTGCTGCT GGAGGAGTTGATGATATTTGGATTAACCAGGTGCTCGTGCTCTTTACC TGGGTGCTGCT *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	TCAGGAACAACAGTATCTCATGCTCAGACC TTGTTGGTCTGATGGTGTGGTATATGCT TCAGGAACAACAGTATCTCATGCTCAGACC TTGTTGGTCTGATGGTGTGGTATATGCT *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	GTTGAATTTCTCACAGAAGTGAAGGGAC TTGGTGAACATGGCCAAGAAGCGCAC TAAT GTTGAATTTCTCACAGAAGTGAAGGGAC TTGGTGAACATGGCCAAGAAGCGCAC TAAT *****▲*****▲*****▲*****▲*****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	GTTATCCCATTATTGAGGATGCTAGACACCCAGCAAAAATACAGAATGCTTGTCTGGAATG GTTATCCCATTATTGAGGATGCCAGACATCCAGCAAAAATACAGAATGCTGTTTGAAGC *****▲*****▲*****▲*****▲*****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	GTGGATGTGATATTTCTGATGTTGCTCAGCCTGATCAGGCAAGAATTTTAGCTCTGAAT GTGGATGTGATATTTCTGATGTTGCTCAGCCTGATCAGGCAAGAATTTTAGCTCTGAAT *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	GCATCATACTTCTTGAAGCTGGAGGTCAC TTTGTTATATCAATCAAGGCAAACTGCATA GCATCATACTTCTTGAAGCTGGAGGTCAC TTTGTTATATCAATCAAGGCAAACTGCATA *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	GATTCAACC GTGCCAGC GGAGGCCG TATTTGCTCAGGAAGTGAAGAAGCTTCAAGC GGAG GATTCAACC GTGCCAGC GGAGGCCG TATTTGCTCAGGAAGTGAAGAAGCTTCAAGC GGAG *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	CAGTTTAAACCTATTGAGCAGGTCAC TCTTGAGCCTTTTGAAGGGACCATGCC TGTGTT CAGTTTAAACCTATTGAGCAGGTCAC TCTTGAGCCTTTTGAAGGGACCATGCC TGTGTT *****
Capsicum_annum Capsicum_chinense	GTTGGTGCCATCTTGTGCCAAAGAAGCAAAAGGCTGCTGCC TAG GTAGGTGCCATCTGTTGCCAAAGAAGCAAAAGGCTGCTGCC TAG *****▲*****▲*****

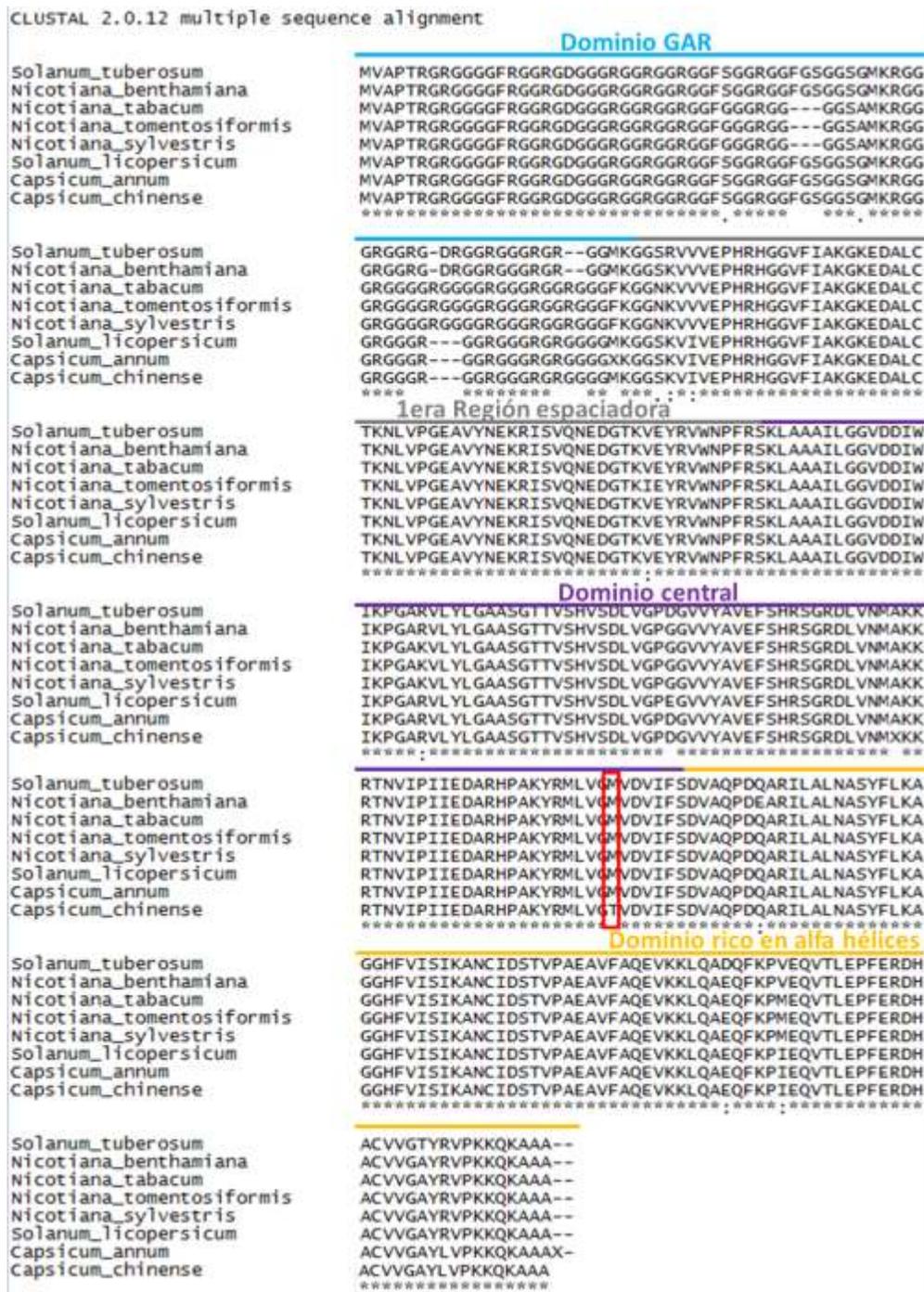
**Figura 3.7** Alineamiento de la secuencia obtenida de la clona número 8 con la secuencia de *C. annuum*. Entre ambas secuencias se detectaron 12 diferencias, las cuales se observan marcadas con las cabezas de flecha roja. Para entender mejor las implicaciones de estas diferencias, fue necesario hacer una traducción *in silico*.

En el alineamiento, se observaron 12 cambios en la secuencia obtenida para *C. chinense* con respecto a la de *C. annum*. Para entender las implicaciones de dichas diferencias, se realizó la traducción *in silico* de la secuencia de *C. chinense* y luego se alineó con la secuencia de aminoácidos previamente obtenida para *C. annum*. Como se observa en la figura 3.8, la extensión en las secuencias de los dominios característicos de la fibrilarina de plantas está delimitada en diferentes colores. El dominio GAR está delimitado en color azul, seguido por la región espaciadora en color gris, conformando el dominio N'-terminal. Seguido se observa el dominio metiltransferasa compuesto por el dominio central en color morado y el dominio rico en alfa-hélices en color amarillo. El cuadro verde dentro del dominio central delimita el octámero DGVVYAVEF característico de las SAM metiltransferasas, mientras que el cuadro rojo punteado delimita la región de unión al ARN. El cuadro rojo pequeño indica un cambio en la secuencia de *C. annum* a una treonina en *C.chinense*. Se obtuvo una identidad del 99.68% entre ambas secuencias.



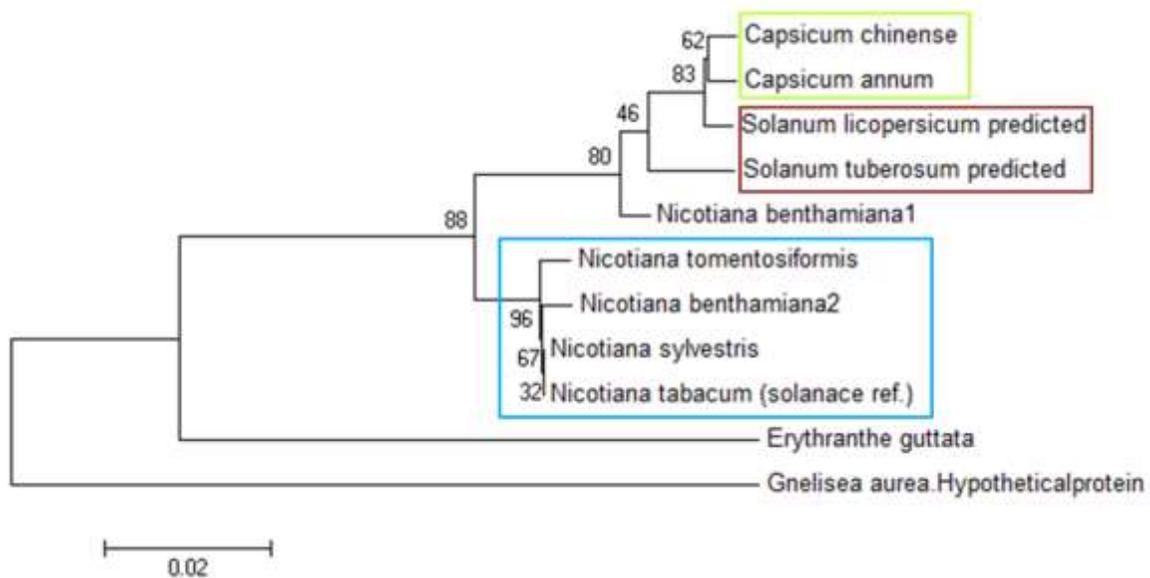
**Figura 3.8** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *C. annum* y la obtenida por traducción *in silico* de *C. chinense*.

En la figura 3.9 se presenta un alineamiento de las secuencias obtenidas para *C. annuum* y *C. chinense* con las reportadas de Solanáceas. Se obtuvo una similitud del 99.68% entre *C. annuum* y *C. chinense*, mientras que la similitud de esta última con el resto de las Solanáceas fue del 96.6%. El cuadro rojo marca el cambio de una metionina por una treonina en la secuencia de *C. chinense*, el cual es el único cambio de la secuencia con respecto al resto de estas fibrilarinas. Para verificar este dato, la secuenciación se repitió 5 veces.



**Figura 3.9** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de fibrilinas de *C. annuum* y *C. chinense* con las de otras especies pertenecientes a la familia *Solanaceae*. Se indica en un cuadro rojo el cambio en la secuencia de *C. chinense*.

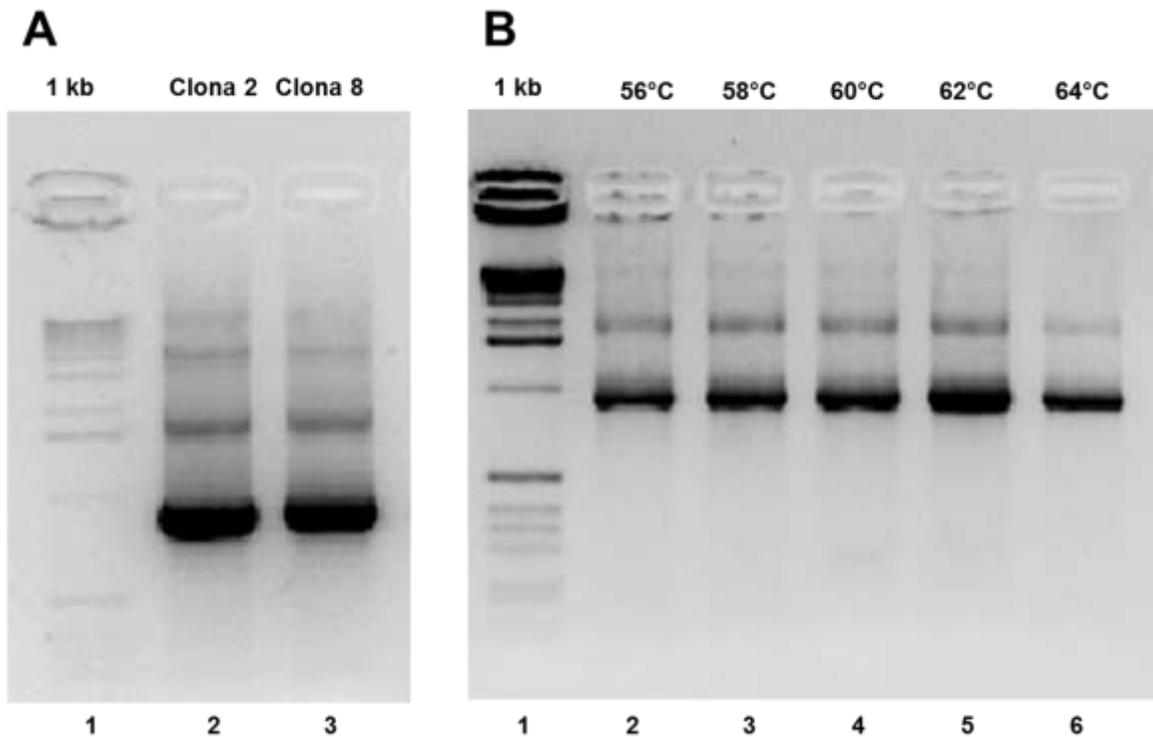
Los porcentajes de similitud por dominios fueron los siguientes: Dominio GAR, 95.7%, región espaciadora, 99.76%, dominio central, 98.1% y Dominio rico en alfa hélices, 98.1%. Tomando en cuenta estos porcentajes, se determinó ver que el dominio GAR fue el menos conservado entre estas secuencias, mientras que la región espaciadora fue la más conservada. Con esta información, se construyó un fenograma para analizar la similitud entre las fibrilarinas de organismos pertenecientes a la familia *Solanaceae*, como se observa en la figura 3.10. En el árbol, se observó que las similitudes entre las secuencias agruparon a los organismos de acuerdo a su género biológico.



**Figura 3.10** Fenograma de las fibrilarinas reportadas para la familia *Solanaceae*.

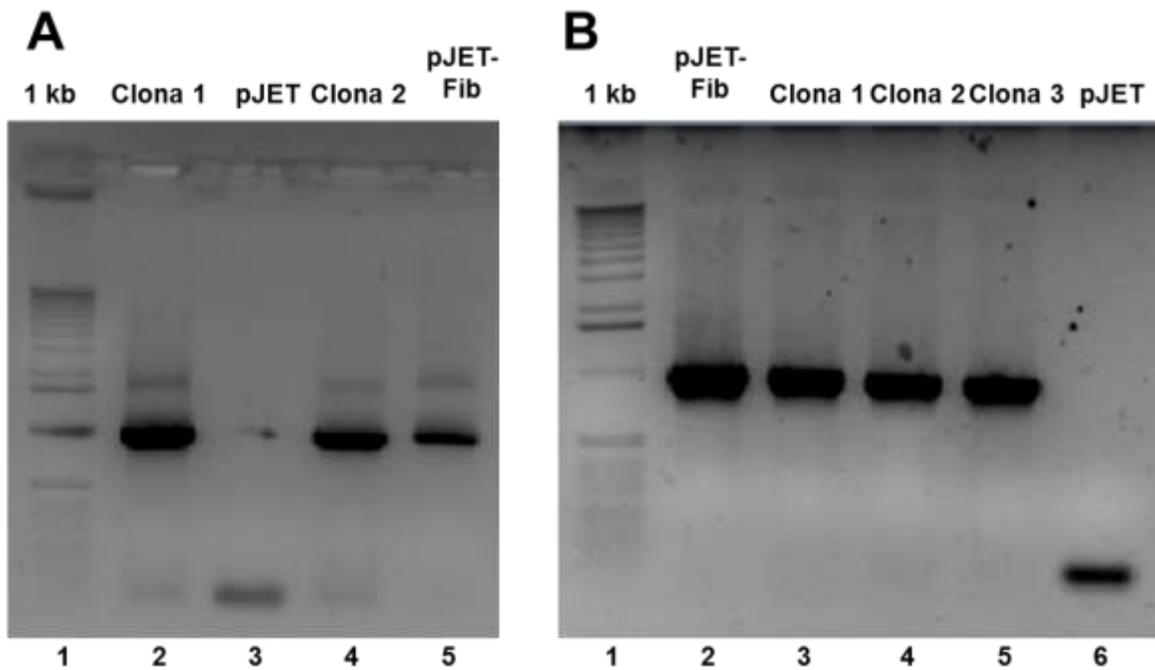
### 3.2.3 Construcción del vector pK7RWG2,0::CcFib

Se llevó a cabo la primera PCR utilizando como templete los vectores pJET1.2/blunt® que contaban con la secuencia de la CcFib ligada (clonas 2 y 8) y los cebadores convencionales para CcFib, como se observa en la figura 3.11. Posteriormente, con los cebadores CcFib\_FWD-attB1 y CcFib\_RVS-attB2, se realizó una PCR con gradiente de temperatura, para determinar empíricamente la temperatura de alineamiento óptima. Se determinó la temperatura de 62°C como la óptima para estos cebadores.



**Figura 3.11** Amplificación de la secuencia de fibrilarina de *C. chinense* para agregar los extremos attB1 y attB2 para recombinación sitio específica. **A.** Productos de amplificación utilizando los vectores pJET1.2/blunt® de la clona 2 y 8. **B.** Segunda amplificación por gradiente de la fibrilarina de *C. chinense*, utilizando el producto de la clona 8 (diluido 1:100) y los cebadores CcFib\_FWD-attB1 y CcFib\_RVS-attB2.

El producto de la segunda amplificación fue purificado y utilizado en la reacción de recombinación sitio específica con el vector de expresión bacteriano pDONR221. El producto de la recombinación se utilizó para transformar células de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  y se seleccionaron dos colonias para la verificación del inserto por PCR, como se observa en la figura 3.12. Posteriormente, se empleó uno de estos vectores pDONR221 para la segunda reacción de recombinación sitio-específica, ahora hacia el vector binario pK7RWG2,0. Se transformó *E. coli* con el producto de ésta y para comprobar la presencia del inserto, se amplificaron tres vectores purificados de las clonas transformadas. Al observar la amplificación del tamaño deseado, las clonas fueron secuenciadas.



**Figura 3.12** Verificación de las reacciones de recombinación por amplificación del inserto. **A.** Amplificación de la secuencia de fibrilarina de *C. chinense* en el vector donador PDONR221::CcFib; Carril 1: marcador de 1 kb. Carriles 2 y 4: vectores pDONR221 purificados. Carril 3: Testigo negativo, vector pJET1.2/blunt® vacío. Carril 5. Testigo positivo, vector pJET1.2/blunt::CcFib. **B.** Amplificación de la secuencia de fibrilarina de *C. chinense* en el vector binario PK7RWG2,0::CcFib; Carril 1: marcador de 1 kb. Carril 2: Testigo positivo, vector pJET1.2/blunt::CcFib. Carriles 3, 4, 5, vectores PK7RWG2,0::CcFib purificados. Carril 6: Testigo negativo, vector pJET1.2/blunt® vacío.

### 3.2.3.1 Secuenciación del vector binario pK7RWG2,0::CcFib y verificación de la integridad del inserto

De las tres clonas secuenciadas, la número tres fue la que presentó la secuencia de aminoácidos completa. Las secuencias tuvieron un porcentaje de identidad del 99.68%, debido al cambio de una valina por una metionina en el aminoácido núm. 223, como se puede observar en la figura 3.13, marcadas con un recuadro rojo.

```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

Capsicum_chinense  MVAPTRGRGGGGFRGGRGDGGGRGGRGGRGGF SGGRGGFGSGGSGMKRGGGRGGGRGGRG
pK7RWG2,0::CcFib  MVAPTRGRGGGGFRGGRGDGGGRGGRGGRGGF SGGRGGFGSGGSGMKRGGGRGGGRGGRG
*****

Capsicum_chinense  GGRGRGGGGMKGGSKVIVEPHRHGGVFIAGKEDALCTKNLVPGEAVYNEKRISVQNEDG
pK7RWG2,0::CcFib  GGRGRGGGGMKGGSKVIVEPHRHGGVFIAGKEDALCTKNLVPGEAVYNEKRISVQNEDG
*****

Capsicum_chinense  TKVEYRVWNPFRSKLAAAILGGVDDIWIKPGARVLYLGAASGTTVSHVSDLVGPDGVVYA
pK7RWG2,0::CcFib  TKVEYRVWNPFRSKLAAAILGGVDDIWIKPGARVLYLGAASGTTVSHVSDLVGPDGVVYA
*****

Capsicum_chinense  VEFSHRSGRDLVNMAKKRTNVIPIIEDARHPAKYRMLVGTVDVVFSDVAQPDQARILALN
pK7RWG2,0::CcFib  VEFSHRSGRDLVNMAKKRTNVIPIIEDARHPAKYRMLVGTVDVVFSDVAQPDQARILALN
*****

Capsicum_chinense  ASYFLKAGGHFVISIKANCIDSTVPAEAVFAQEYVKKLQAEQFKPIEQVTLEPFERDHACV
pK7RWG2,0::CcFib  ASYFLKAGGHFVISIKANCIDSTVPAEAVFAQEYVKKLQAEQFKPIEQVTLEPFERDHACV
*****

Capsicum_chinense  VGAYLVPKKQKAAA
pK7RWG2,0::CcFib  VGAYLVPKKQKAAA
*****

```

**Figura 3.13** Alineamiento entre la secuencia de fibrilarina de *C. chinense* y la secuencia recombinada en el vector binario PK7RWG2,0::CcFib.

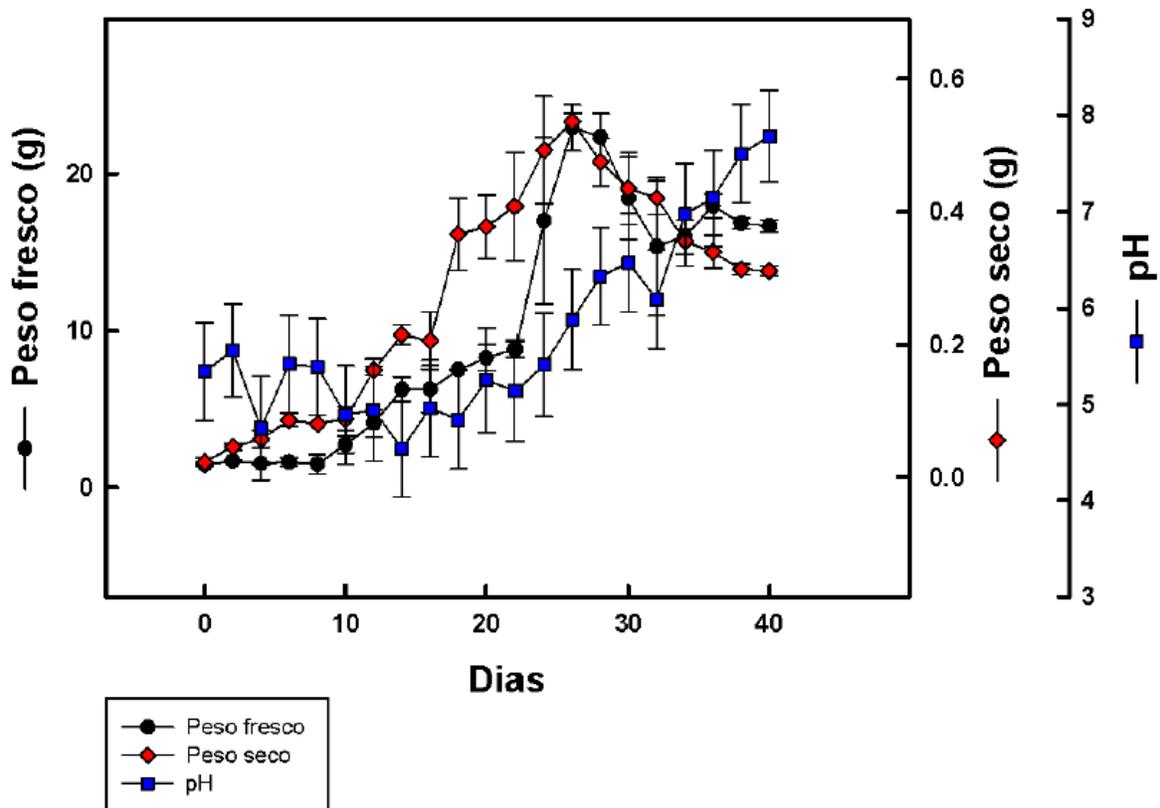
### **3.3 MANTENIMIENTO DE LOS MODELOS CELULARES**

#### **3.3.1 CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE *C. CHINENSE***

##### **3.3.1.1 Curva de crecimiento del cultivo en suspensión de *C. chinense***

El crecimiento en los cultivos de células en suspensión puede ser evaluado en términos de peso fresco (PF) y peso seco (PS), en función del tiempo transcurrido (George *et al*, 2008). Otros parámetros que se pueden incluir en dicha evaluación son fluctuaciones en el pH, la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ), el tiempo de duplicación (td) y el índice de crecimiento (IC) (Loyola-Vargas y Vazquez-Flota, 2006).

Los parámetros más empleados para obtener una curva de crecimiento son el PF y el PS, pues proveen el valor de la biomasa del cultivo en un tiempo determinado. La cuantificación de los cambios en pH y la conductancia del medio donde se desarrollan las células proporcionan información acerca de la actividad metabólica del cultivo. En la figura 3.14 se muestra el patrón de crecimiento del cultivo. La fase adaptativa o de retardamiento duró del día 0 (día de resiembra) al día seis. La fase de crecimiento exponencial tuvo una duración de cinco días, comenzando el día siete y terminando el día once, seguida por la fase de crecimiento lineal, la cual comenzó el día 12 y terminó al día 21 del cultivo (duración de nueve días). Posteriormente comenzó la fase de disminución en el crecimiento del cultivo la cual tuvo una duración de tres días, seguida inmediatamente por la fase estacionaria, la cual abarcó del día 25 al día 35 del cultivo. Después de este lapso, el cultivo perdió su viabilidad.



**Figura 3.14** Patrón de crecimiento del cultivo de células en suspensión de *C. chinense*.

La determinación de la duración de las fases del cultivo se realizó con base en la curva de peso seco en la gráfica (Trejo-Tapia *et al.*, 2003). Bajo las medidas apropiadas de luz, temperatura, aireación y nutrientes disponibles en un medio de cultivo, el patrón de crecimiento de un cultivo en suspensión de células vegetales superiores consistirá de una fase adaptativa, una fase de crecimiento exponencial, fase de crecimiento lineal, fase de crecimiento logarítmico y una fase estacionaria. El crecimiento del cultivo de células en suspensión de *C. chinense* presentó el siguiente patrón de crecimiento:

1. *Fase adaptativa o de retardamiento (Día 0 – 6).*- En este punto las células comienzan una etapa de adaptación al medio de cultivo fresco, en el que incrementan su actividad metabólica y empiezan a realizar división celular activa y duplicar su contenido de ADN. Al final de la fase adaptativa, la mayoría de las células están en la fase S de su ciclo celular (Street, 1973).

2. *Fase de crecimiento exponencial (Día 7 – 11).*- Cuando el cultivo entra en la fase de crecimiento exponencial, la fase predominante del ciclo celular en el que se encuentran las células es la fase G2 (Street, 1973).
3. *Fase de crecimiento lineal (Día 12 – 21).*- Ocurre cuando las células del cultivo se encuentran en división celular rápida, incrementando la biomasa del cultivo. Durante esta etapa, los nutrientes y el carbono disponible en el medio comienzan a agotarse, lo que da entrada a la fase logarítmica, en la cual el metabolismo primario es más activo.
4. *Fase logarítmica (Día 22 – 24).*- El tiempo de generación aumenta debido a que la fase G1 del ciclo celular se vuelve más larga (Street, 1973). En esta fase se puede observar la mayor cantidad de agregación en las células del cultivo.
5. *Fase estacionaria (25 – 35).*- La tasa metabólica de las células baja considerablemente y se observa un incremento de células en fase G1 (Street, 1973). Por otro lado en la fase estacionaria, la energía de la célula se utiliza para el crecimiento/elongación de las células por absorción de agua y en la mayoría de los casos, para producción de metabolitos secundarios (Street, 1973). En esta fase, la agregación celular es mínima.
6. *Pérdida de viabilidad o fase de muerte (Día 35 – 40).*- El cultivo pierde rápidamente su viabilidad por agotamiento total de los nutrientes del medio (Mustafa *et al.*, 2011).

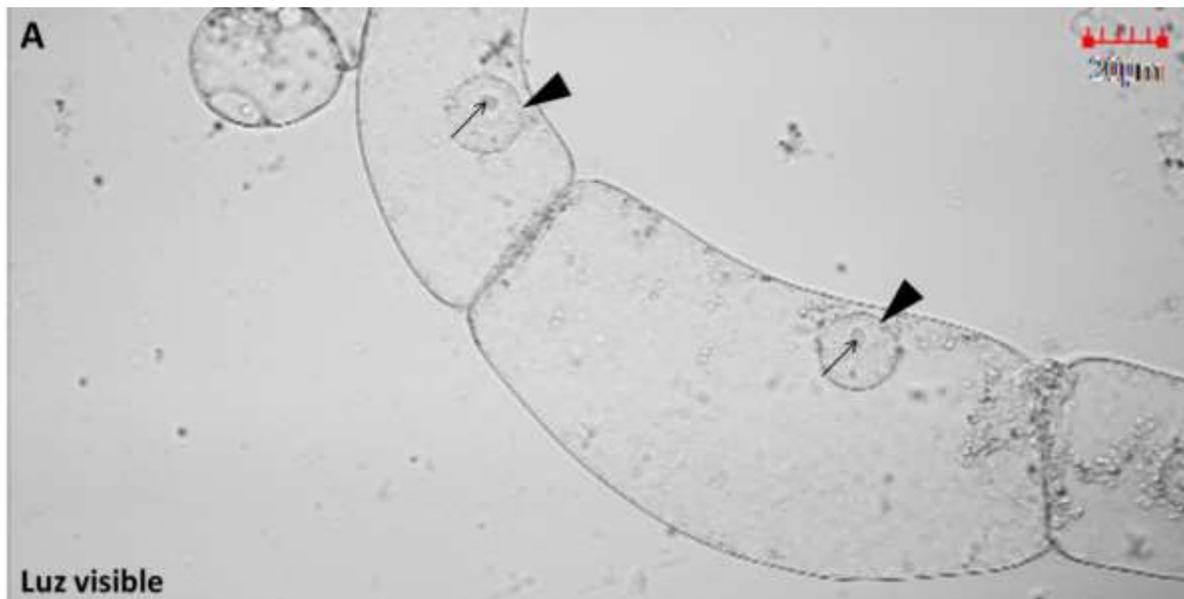
Con base en los estos resultados, se determinó que el periodo adecuado para llevar a cabo la transfección del cultivo era del día 6 al día 11, cuando el cultivo está en la fase de crecimiento exponencial.

### 3.3.1.2 Parámetros de crecimiento

Los parámetros de crecimiento calculados proveyeron de una pauta descriptiva para conocer la naturaleza del cultivo. Los valores obtenidos a partir del peso fresco fueron; un índice de crecimiento (IC) de 10.61 gramos, una tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) de 0.097 gramos por día y un tiempo de duplicación (td) de 14.29 días. En el caso del peso seco, el índice de crecimiento fue de 12.05 gramos, la tasa de crecimiento específica de 0.125 gramos por día y el tiempo de duplicación fue de 5.54 días.

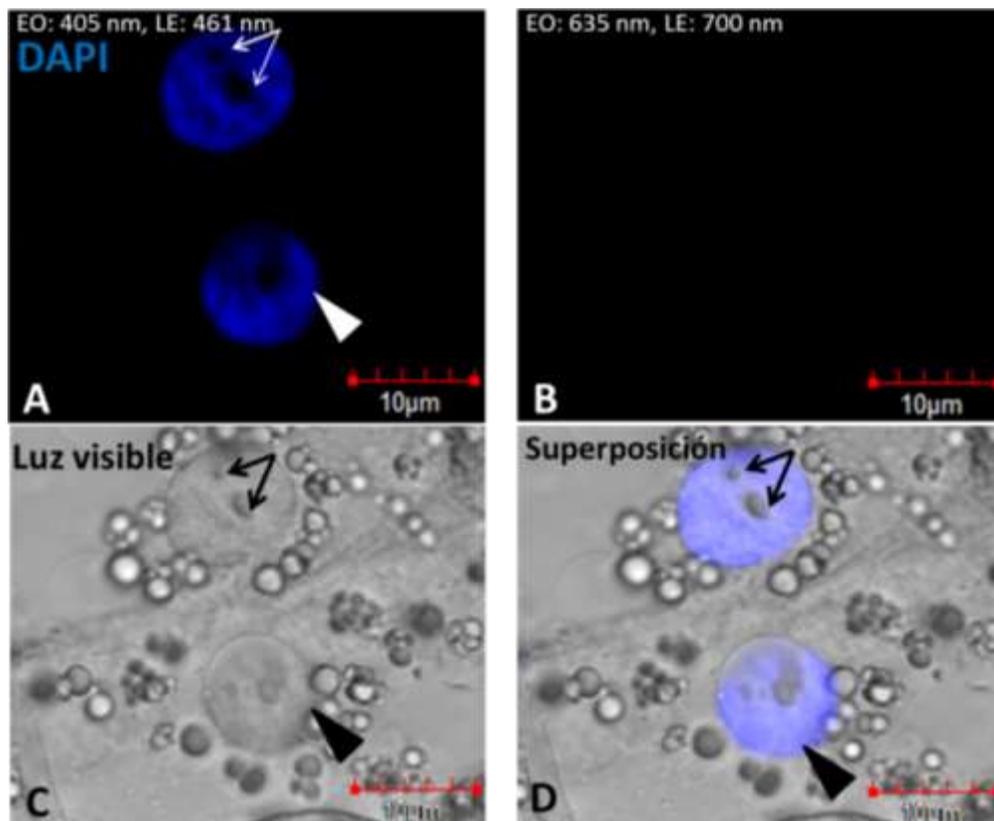
### 3.3.1.3 Caracterización morfológica del cultivo en suspensión de *C. chinense*

Se observó al cultivo de células de *C. chinense* por medio de microscopia confocal. Las observaciones se realizaron en las células libres de tratamiento (Figura 3.15), teñidas con DAPI (Figura 3.16) y teñidas con calcoflúor (Figura 3.17). Como se puede apreciar en la figura 3.15, la principal característica de estas células es su forma globosa, así como la ausencia de clorofila cuando fueron observadas bajo luz visible.



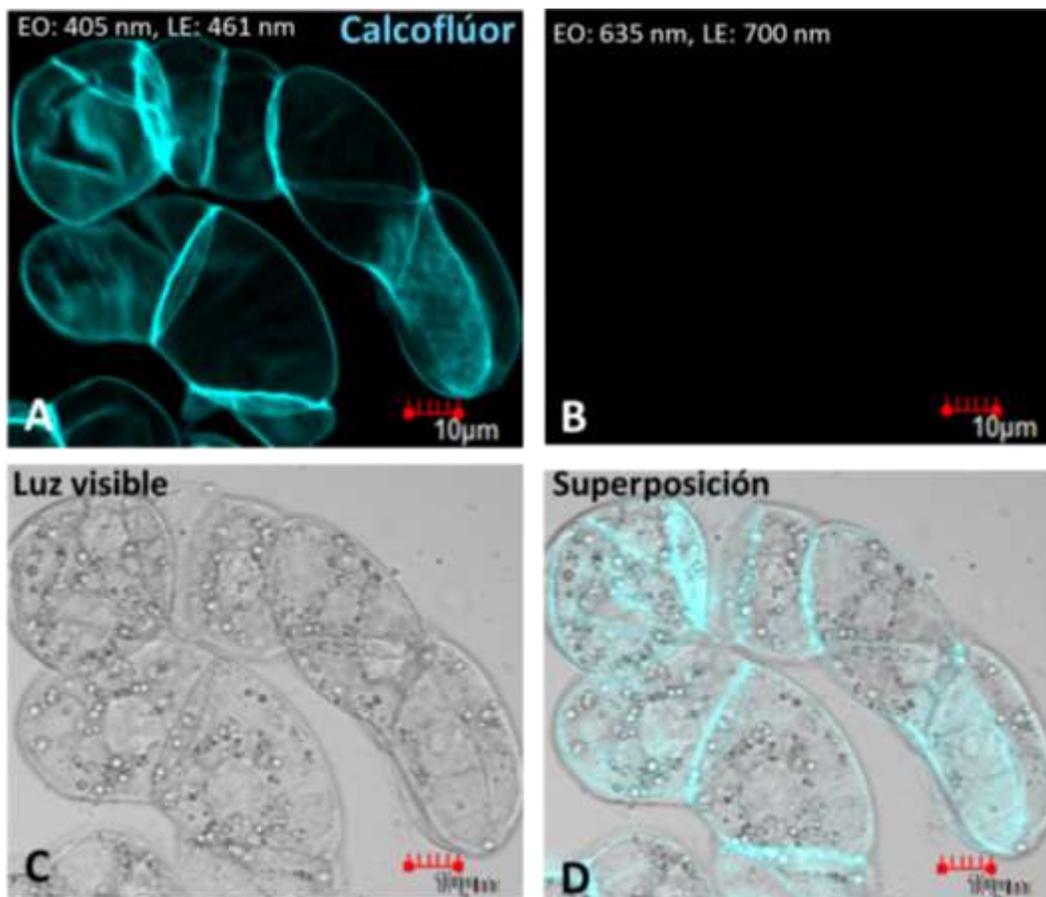
**Figura 3.15** Células de 8 días de *C. chinense* observado en el campo de luz visible por microscopia confocal (40X). Se aprecian las células con una morfología globosa, también se distinguen claramente los núcleos (cabezas de flecha) y sus nucleolos (flechas).

El núcleo de las células pudo ser identificado rápidamente en el campo visible debido a su iridiscencia. Para corroborar la identificación del núcleo y reiterar la identidad de los nucleolos; se realizó una tinción con DAPI. Como se puede observar en la figura 3.16, cada núcleo presenta varios nucleolos, uno de tamaño prominente y varios pequeños en el área circundante. En la figura 3.16-A se observan dos núcleos teñidos con DAPI y en la 3.16-B, se aprecia ausencia de autofluorescencia. En el panel C, de luz visible, se observan los organelos y los núcleos. Por último, en D se aprecia la colocación de los núcleos con la señal emitida por DAPI.



**Figura 3.16** Células de *C. chinense* tratadas con DAPI para la detección de ácidos nucleicos. Se observan los núcleos marcados por una cabeza de flecha y los nucleolos marcados por una flecha. El tamaño estimado para cada núcleo es de 10  $\mu\text{m}$ , mientras que para los nucleolos es entre 1 y 0.3  $\mu\text{m}$ . **A.** Canal para detección de DAPI (461 nm). **B.** Canal para detección de clorofila (700 nm). **C.** Canal de luz visible. **D.** Localización de tinción con DAPI en canal de luz visible.

Para la observación de la pared celular en células de *C. chinense*, se realizó una tinción con calcoflúor. Como se puede observar en la figura 3.17, las paredes celulares delimitan la forma globosa de las células y permiten observar los límites existentes entre ellas. En el panel B se observa ausencia de autofluorescencia, el canal de luz visible (C), se distinguen nuevamente los organelos y los núcleos de las células por iridiscencia. Gracias a la delimitación de las paredes celulares fue posible determinar que cada célula en el cultivo posee solo 1 núcleo.



**Figura 3.17** Células de *C. chinense* tratadas con calcoflúor para la detección de paredes celulares. **A.** Paredes celulares teñidas con calcoflúor, se observan como una recubierta color aqua. **B.** Canal de longitud de onda para detección de clorofila (detección de autofluorescencia). **C.** Canal de luz visible. **D.** Localización de tinción con calcoflúor en canal de luz visible.

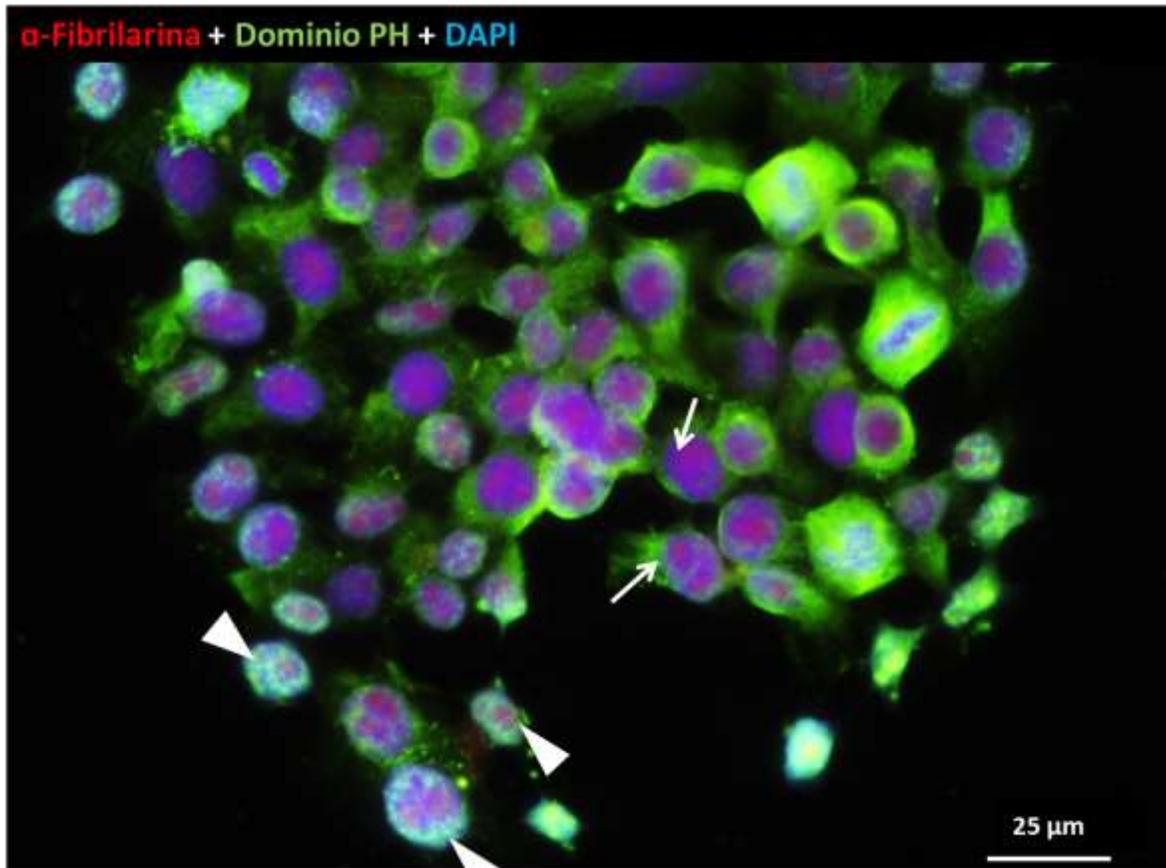
Las morfologías antes descritas fueron características para la fase de crecimiento exponencial (del día 7 al día 11), fase durante la cual los núcleos presentaron su mayor diámetro y las células, su mayor elongación.

### 3.4 ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Los ensayos de inmunofluorescencia para la detección de la fibrilarina nativa (*Wild Type Homo Fibrillarín* o WtHFIB por sus siglas en inglés) y sus mutantes en células HeLa, así como en células de *C. chinense*, permitieron establecer las condiciones para los posteriores análisis de expresión de la fibrilarina acoplada a un reportero fluorescente *in vivo*. Al llevar a cabo el marcaje de la fibrilarina nativa con un anticuerpo fluorescente, se observó que estaba localizada en los nucleolos (Andersen *et al.*, 2002; Ochs *et al.*, 1985) así como también en los CBs y de manera difusa en el nucleoplasma, concordando con lo reportado por Chen y Huang (2001), así como por Snaar y colaboradores (2000).

#### 3.4.1. Células de *C. chinense*.

Como se puede observar en la Figura 3.18, en estos ensayos de inmunofluorescencia, se localizó la señal correspondiente a la fibrilarina en los nucleolos y en los CBs como indica por las flechas blancas, y así como una señal difusa en el nucleoplasma. En las células en metafase, la localización de la fibrilarina fue pericromosomal. En el caso de la señal para el dominio PH se observa una distribución mayoritariamente en el citoplasma; no obstante, también se observó la señal dentro de los núcleos, como se ve indicado por las cabezas de flechas. Cabe señalar que la señal del dominio PH presente dentro de los núcleos también abarcó parte de los nucleolos.

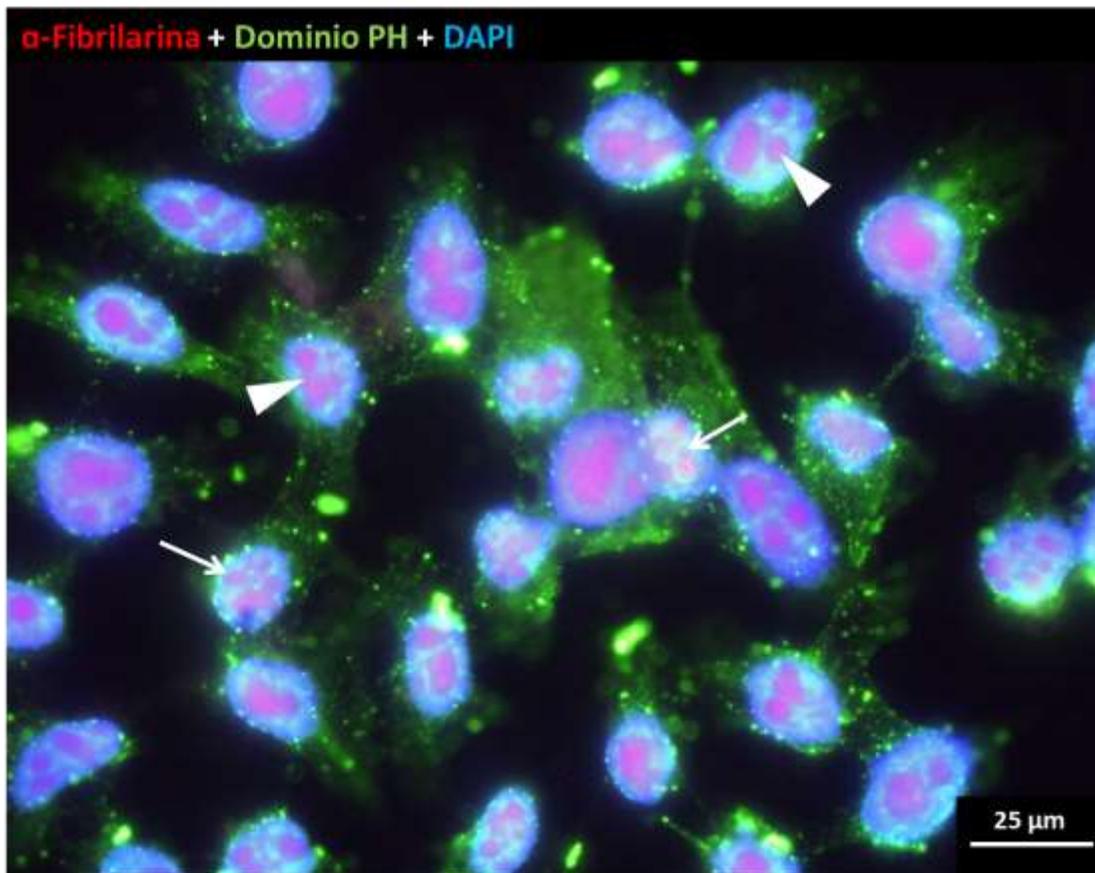


**Figura 3.18** Ensayo de inmunofluorescencia de células en suspensión de *C. chinense* empleando DAPI para ácidos nucleicos (461 nm - azul), anti-fibrilarina (555 nm - rojo) y Dominio PH (637 nm - verde) para detección de fosfoinosítidos.

Estas imágenes proporcionan la pauta principal para determinar que existe colocalización de la fibrilarina y los fosfoinosítidos en el nucleolo de las células de *C. chinense*. Los resultados con los dominios permitieron observar que los fosfoinosítidos presentan una distribución parcial dentro de los nucleolos y circundante en los CBs, lo que podría indicar una interacción entre estas moléculas.

### 3.4.2. Células HeLa

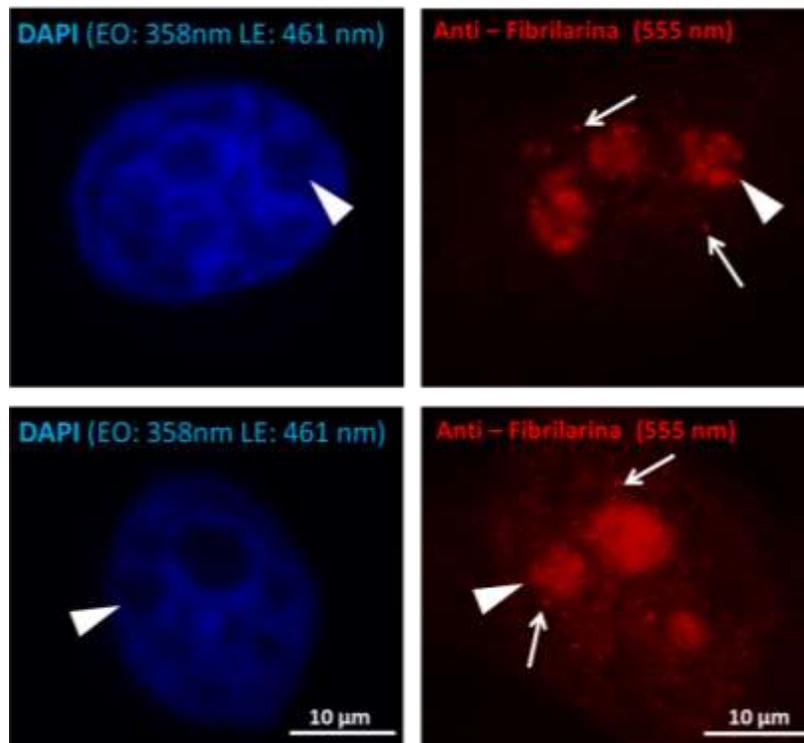
Los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia en células HeLa se muestran en la figura 3.19. Se observa una señal específica de la fibrilarina (rojo), la cual permitió localizarla en los nucleolos y CBs, como se indica por las cabezas de flechas y con una dispersión difusa en el resto del nucleoplasma. En el caso de la señal para la identificación de fosfoinosítidos, se observó una distribución mayoritariamente en el citoplasma; no obstante, también se observó la señal dentro de los núcleos, como se ve indicado por las flechas blancas. Cabe señalar que la señal del dominio PH presente dentro de los núcleos también abarco parte de los nucleolos.



**Figura 3.19** Ensayo de inmunofluorescencia en células HeLa transformadas con el vector pSTR-Fibrilarina\_GFP. Se empleó DAPI para detección de ácidos nucleicos (461 nm - azul), anti-fibrilarina (555 nm - rojo) y Dominio PH (637 nm - verde) para detección de fosfoinosítidos.

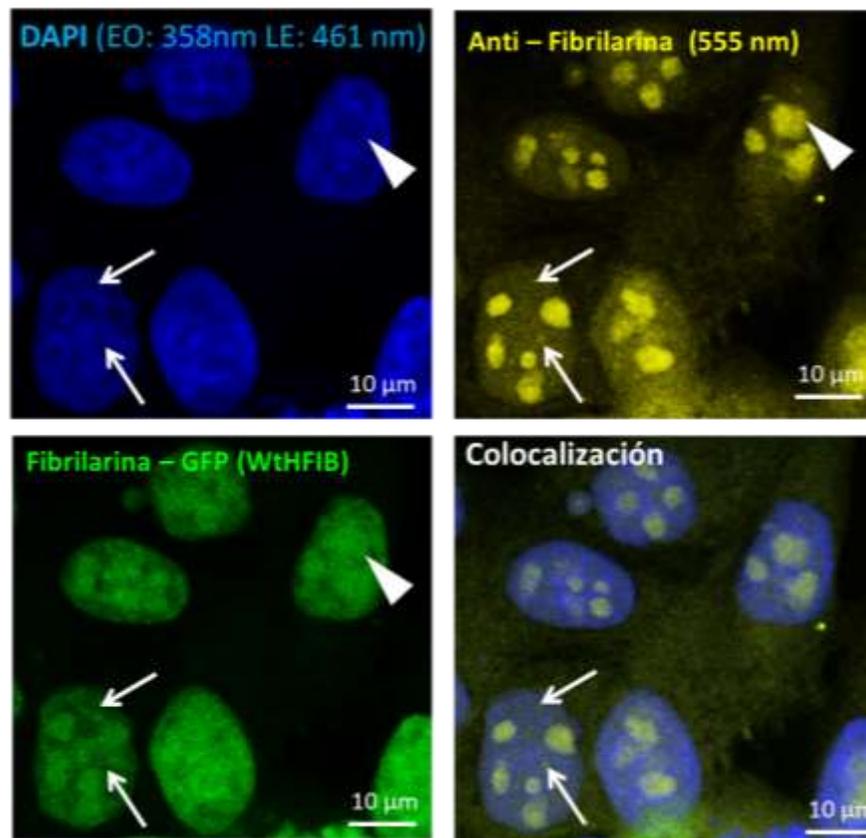
La colocalización de los fosfoinosítidos con la fibrilarina dentro de nucleolos y aledaña a los CBs fue similar en las células HeLa y en las de *C. chinense*. Esta distribución similar podría indicar interacciones similares.

Para observar con mayor detalle la distribución de la fibrilarina nativa dentro de las células HeLa, se llevó a cabo nuevamente una inmunodetección empleando solo el anticuerpo contra fibrilarina. En la figura 3.20 se pueden apreciar los nucleolos (cabeza de flecha) y los CBs (flechas) marcados por la distribución de la fibrilarina nativa. En las células HeLa los nucleolos son prominentes, lo que facilita la observación y delimitación de sus componentes. Por otro lado, los CBs se observan claramente como puntos independientes, pero cercanos a la periferia de los nucleolos.



**Figura 3.20** Inmunodetección de fibrilarina nativa en células HeLa. En el primer canal se puede observar la delimitación de los núcleos y localización de nucleolos (cabeza de flecha) por marcaje con DAPI. En el canal de 555 nm se observa la inmunofluorescencia de la fibrilarina nativa en nucleolos (cabeza de flecha) y CBs (flechas); además de una señal difusa en el nucleoplasma.

Después de la identificación de la fibrilarina nativa en células HeLa, se prosiguió con la inmunodetección de la misma en células transformadas con el vector pSTR-Fibrilarina\_GFP, el cual expresa a la fibrilarina acoplada a una GFP. Esto se realizó con la finalidad de describir la localización, tanto de la fibrilarina nativa como de la fibrilarina quimérica dentro de una misma célula y así confirmar la funcionalidad de esta última. Como se puede apreciar en la figura 3.21 en A (461 nm) se puede observar la delimitación de los núcleos y localización de nucleolos (cabeza de flecha) y CBs (flecha) por marcaje con DAPI. En el canal de 555 nm se registra la inmunofluorescencia de la fibrilarina nativa, mientras que en el de 530 nm, la señal emitida por la expresión de la fibrilarina acoplada a una GFP. En la imagen de colocalización, se determinó que ambas señales colocalizan en nucleolos (cabeza de flecha) y CBs (flechas), además de presentar una señal difusa en el nucleoplasma.



**Figura 3.21** Inmunodetección de fibrilarina nativa en células HeLa transformadas con el vector pSTR-Fibrilarina\_GFP que expresa WtHFIB.

Por medio de los ensayos de inmunofluorescencia en células HeLa, se determinó que la WtHFIB y las mutantes fusionadas a la GFP, así como la fibrilarina nativa se localizan en las mismas regiones del núcleo: los nucleolos y de manera difusa, en el resto del núcleo. Con base en estos ensayos se considera que la fibrilarina acoplada a GFP es funcional, ya que su localización después de la expresión es correspondiente con la de la fibrilarina endógena o nativa.

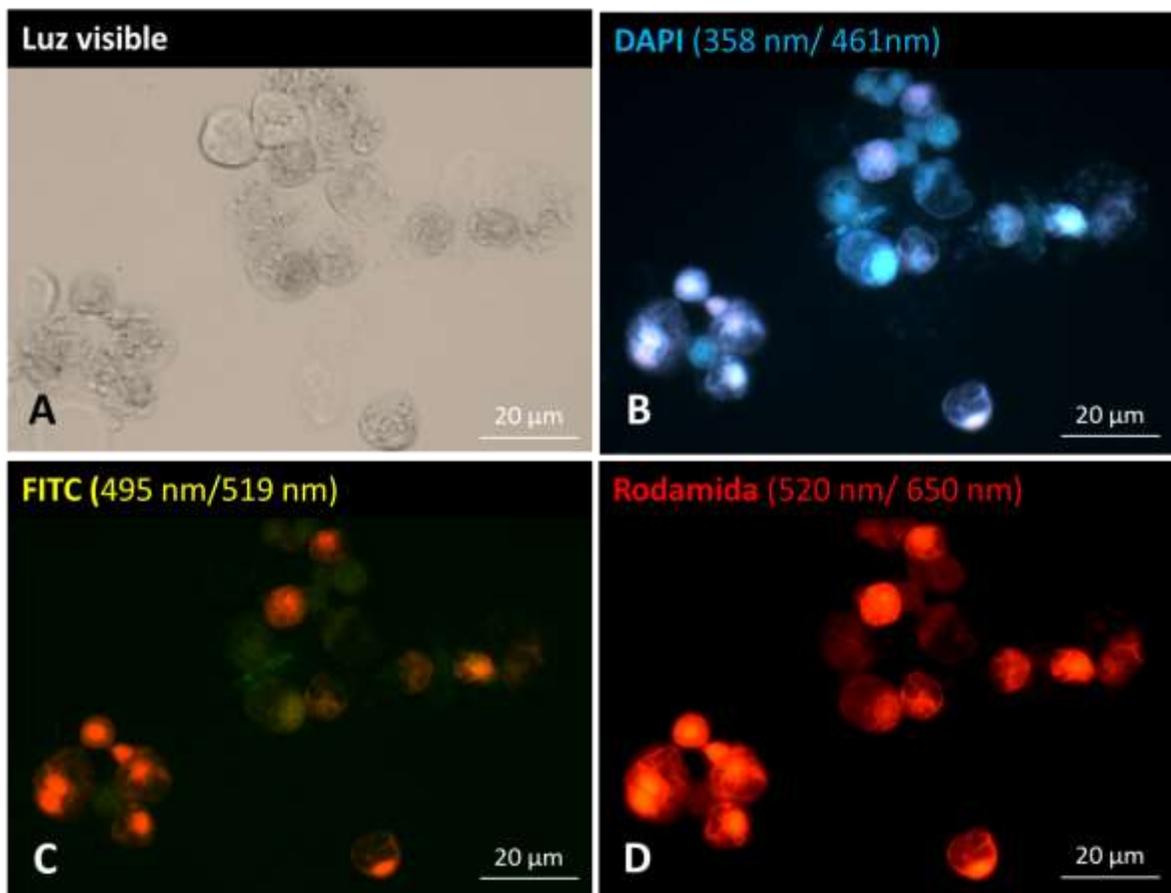
Los ensayos de localización de la fibrilarina en células de *C. chinense* y en células HeLa permitieron establecer las bases para la experimentación *in vivo* sobre esta proteína.

### **3.4.3 Transformación transitoria del cultivo de células en suspensión de *C. chinense* con el vector pK7RWG2.0::CcFib**

#### **3.4.3.1 Obtención de protoplastos de células en suspensión de *C. chinense***

En la figura 3.22 se pudieron registrar los protoplastos obtenidos de células de *C. chinense*. En la figura 3.22-A, se distinguen los protoplastos en el canal de luz visible, presentando una forma esférica de entre 10 y 15  $\mu\text{m}$  de diámetro.

En la figura 3.22-B se observan los núcleos de los protoplastos teñidos con DAPI, con un diámetro de entre 5 y 3  $\mu\text{m}$ . En el canal de FITC (Figura 3.22-C) al realizar la tinción de Evans, los protoplastos no viables aparecen teñidos de color rojo, mientras que los viables presentan autofluorescencia. En el caso del canal de rodamina (Figura 3.22-D), se distinguen con un color rojo intenso a los protoplastos no viables. Se realizó un conteo por campo de los protoplastos para determinar el porcentaje de protoplastos viables sobre el total de los obtenidos y se determinó una eficiencia del 50%.

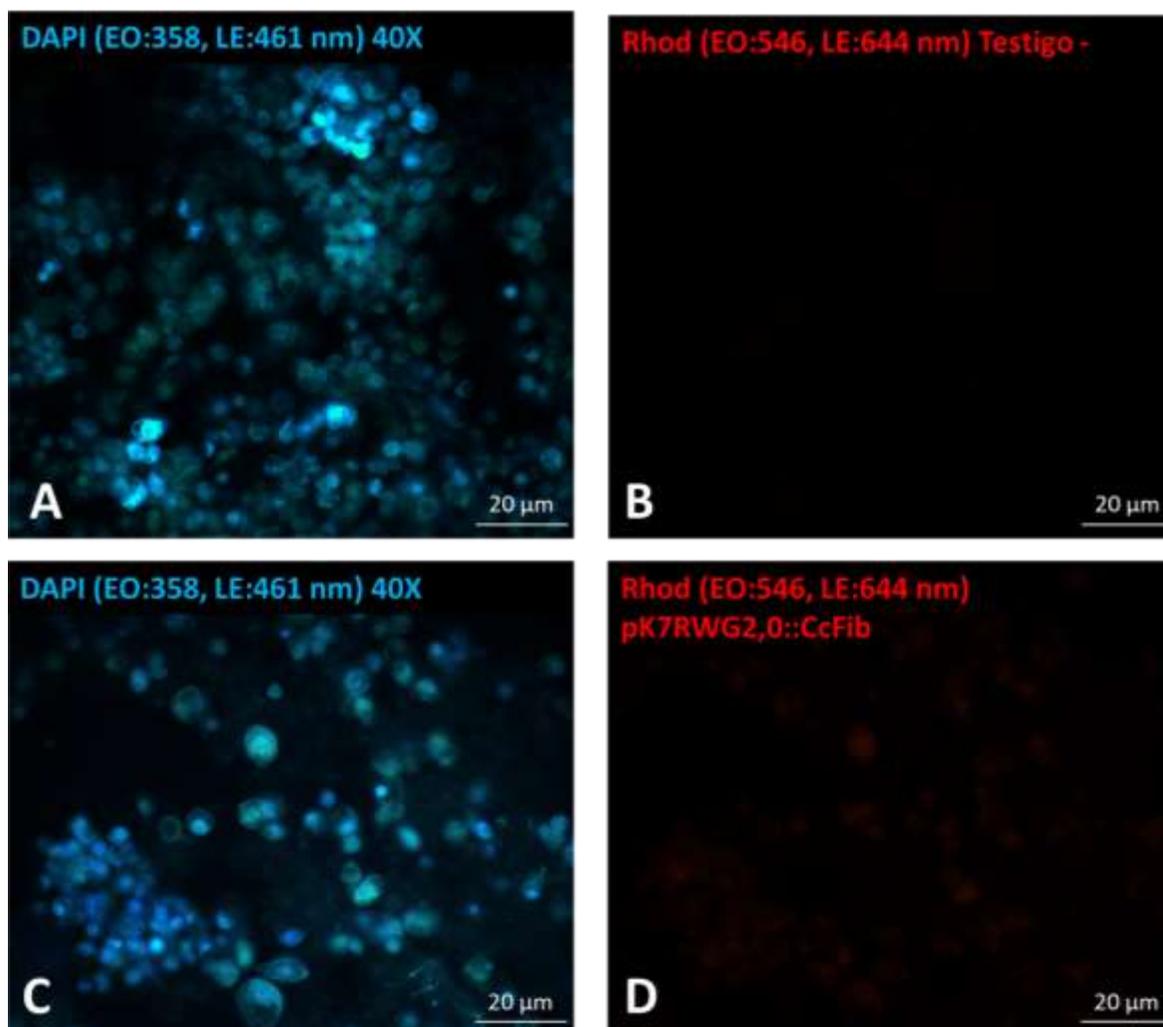


**Figura 3.22** Protoplastos de células de *C. chinense* tenidos con azul de Evans para evaluación de viabilidad. **A.** Canal de luz visible. **B.** Canal de detección de DAPI. **C.** Canal de FITC. **D.** Canal de rodamina.

**3.4.3.2 Transformación por choque térmico en presencia de PEG o por Sonicación.**

Después de la implementación de los métodos de transformación por choque térmico en presencia de PEG, se tomaron muestras de los cultivos de protoplastos. Después de ser fijadas, se montaron con mowiol al 10% (v/v) más DAPI y se analizaron en un microscopio de fluorescencia. En la figura 3.22, se incluyó un testigo negativo de transformación sin vector (A y B), en conjunto con el experimento en presencia del vector (C y D) con fines comparativos.

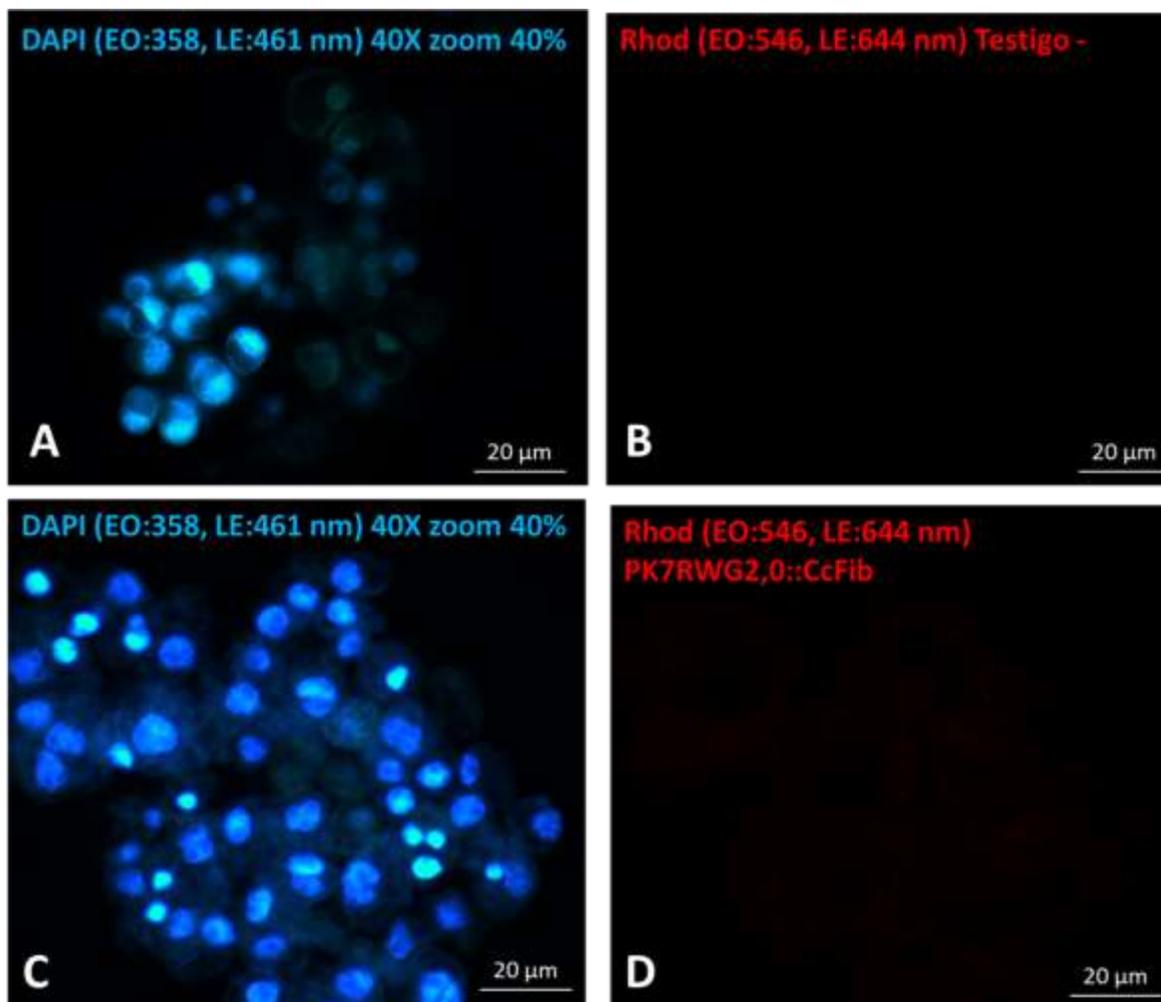
En las figuras 3.22-A y C se observa la tinción con DAPI de los núcleos de los protoplastos. Por otro lado en la figura 3.22-B, se distinguen los protoplastos del testigo negativo bajo el canal de rodamina, donde la señal fluorescente fue nula; Mientras que en la figura 3.22-D se registró la señal obtenida en este mismo canal para el experimento en presencia del vector. Sin embargo, la señal observada no delimita nucleolos o CBs, por lo que se concluyó que este método de transformación no fue efectivo.



**Figura 3.23** Transformación de protoplastos por choque térmico en presencia de PEG. **A.** Tinción con DAPI en testigo negativo. **B.** Observación del testigo negativo en canal de rodamina. **C.** Tinción con DAPI del experimento en presencia de vector. **D.** Observación del experimento en presencia de vector en canal de rodamina.

Después de la implementación del método de transformación por sonicación, se tomaron muestras de los cultivos de protoplastos para fijación y montaje con mowiol al 10% (v/v) más DAPI. Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia. Como se registró en la figura 3.23, se incluyó un testigo negativo de transformación sin vector (A y B) en conjunto con el experimento en presencia del vector (C y D) para comparación de ambos resultados.

En las figuras 3.23-A y C se observan los núcleos tenidos con DAPI. En la figura 3.22-B, los protoplastos del testigo negativo presentaron una señal fluorescente nula bajo el canal de rodamina. Por otro lado en la figura 3.22-D se muestra el experimento en presencia del vector con una señal difusa, que coincide con los protoplastos, pero que no fue similar a la distribución previamente descrita para la fibrilarina. Se concluyó entonces que los intentos de transformación por sonicación tampoco fueron efectivos.

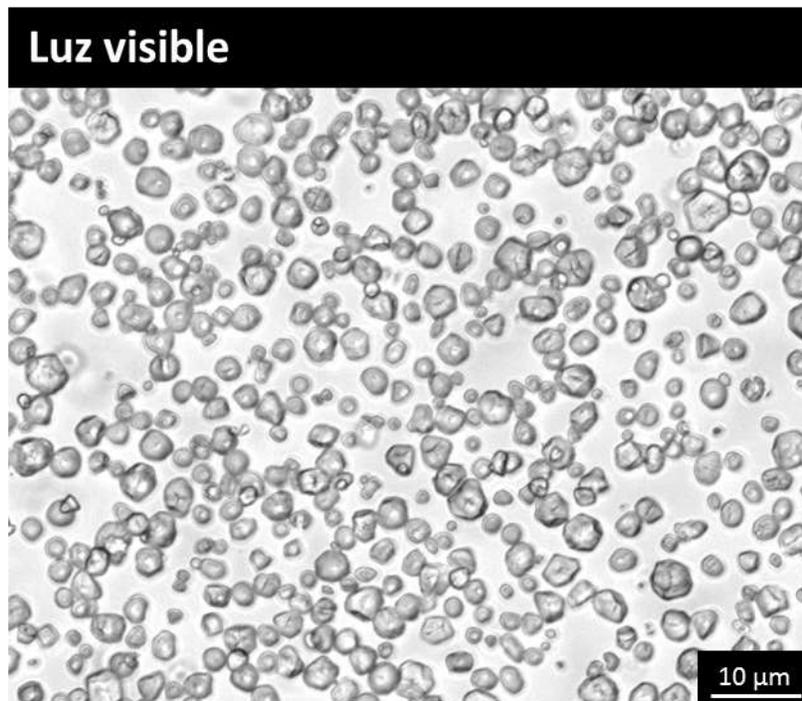


**Figura 3.24** Transformación de protoplastos por sonicación. **A.** Tinción con DAPI del testigo negativo. **B.** Observación del testigo negativo en canal de rodamina. **C.** Tinción con DAPI del experimento en presencia de vector. **D.** Observación del experimento en presencia de vector en canal de rodamina, se detectó una señal difusa en los protoplastos, pero no se apreciaron nucleolos o CBs.

### 3.4.3.3 Obtención de protoplastos de tejido foliar de *Capsicum*

Se obtuvieron protoplastos a partir de tejido foliar de *Capsicum* para probar la eficiencia de la transformación por medio de PEi y Lipofectamina 3000®. Estos experimentos se realizaron en el Institute of Molecular Genetics of the ASCR, donde los cultivos en suspensión de *C. chinense* no estaban disponibles.

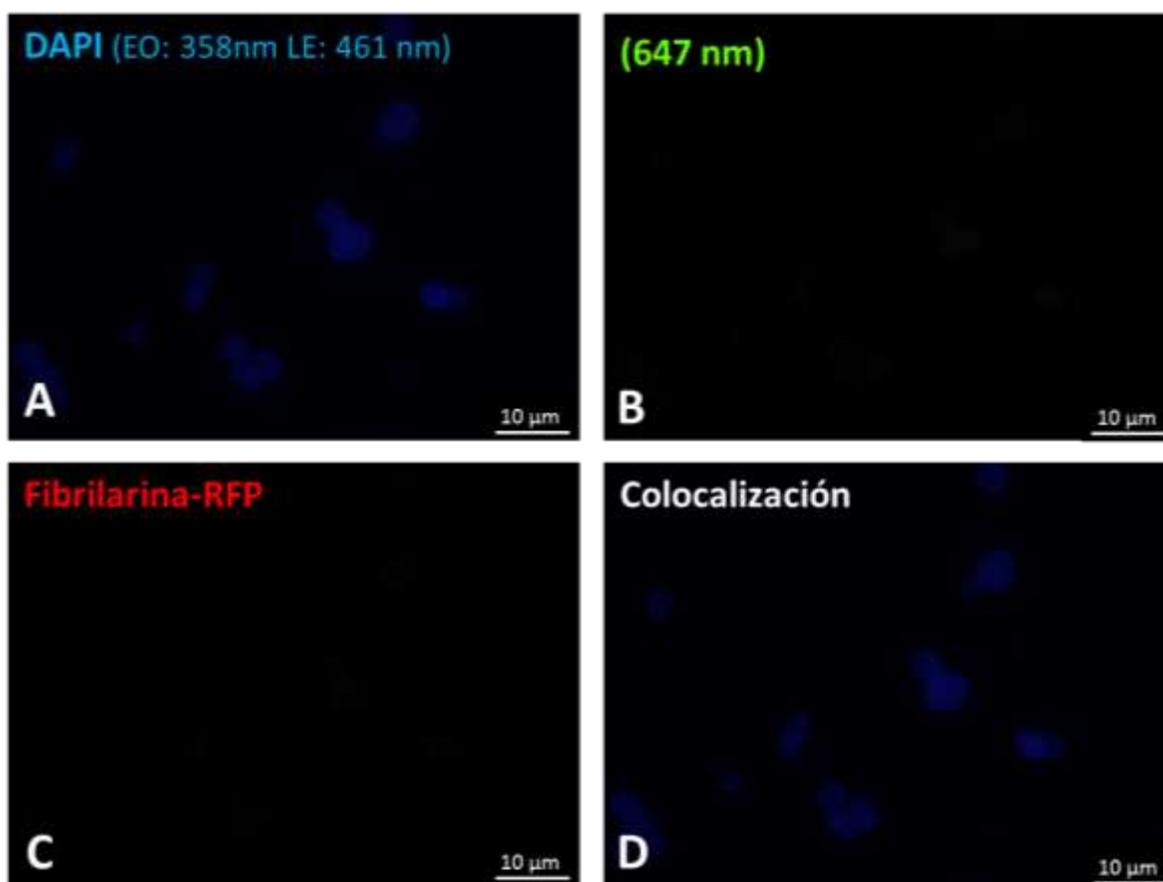
En la figura 3.25 se muestra que los protoplastos obtenidos de tejido foliar no son completamente esféricos, a diferencia de los obtenidos a partir de células en suspensión, presentando un diámetro de entre 5 y 3  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.25** Protoplastos de tejido foliar de *Capsicum* observados en el campo de luz visible.

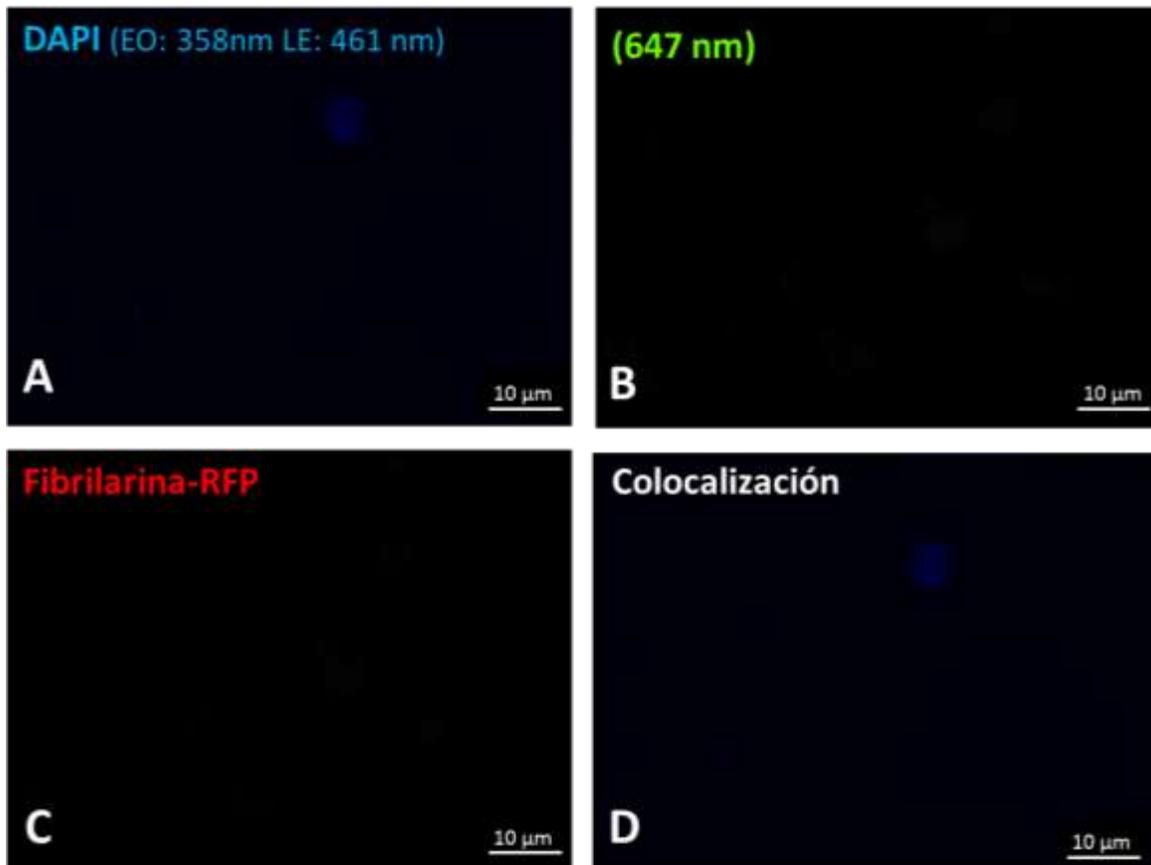
#### 3.4.3.4 Transformación por PEi y lipofectamina

A partir de la implementación de la transformación con PEi de protoplastos obtenidos de tejido foliar de *Capsicum*, se prepararon muestras fijando los protoplastos con formalina y montándolos en mowiol al 10% (v/v) más DAPI. Como se puede apreciar en la figura 3.26- A, la tinción con DAPI permite identificar los núcleos de los protoplastos. En los paneles B y C no se detectó señal fluorescente, por lo que se concluyó que los ensayos de transformación por este medio no fueron exitosos.



**Figura 3.26** Transformación de protoplastos con PEi. **A.** Tinción con DAPI, se observan los núcleos de los protoplastos. **B.** Canal de 647 nm. **C.** Canal de 555 nm para detección de RFP. **D.** Colocalización.

Posterior a la transformación con lipofectamina de protoplastos obtenidos de tejido foliar de *Capsicum*, se prepararon las muestras fijando los protoplastos con formalina y montándolos en mowiol al 10% (v/v) más DAPI. En la figura 3.27-A se observa el núcleo de los protoplastos, mientras que en los canales de 647 nm y 555 nm (RFP) no hubo presencia de señal. El intento de transformación con lipofectamina no fue efectivo.

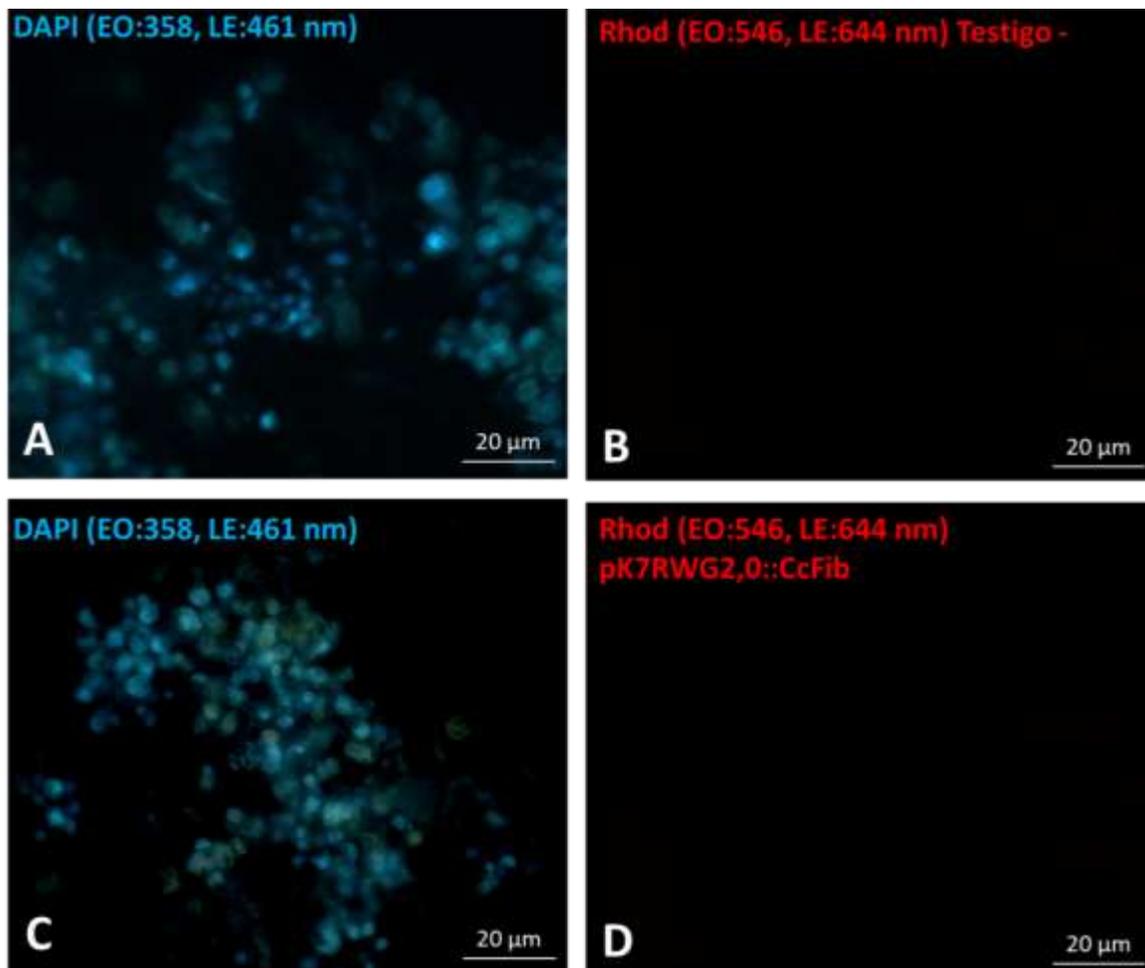


**Figura 3.25** Transformación de protoplastos con lipofectamina. **A.** Tinción con DAPI, se observan los núcleos de los protoplastos. **B.** Canal de 647 nm. **C.** Canal de 555 nm para detección de RFP. **D.** Colocalización.

#### **3.4.3.5 Transformación de tejido foliar de *Capsicum* por *Agrobacterium* portadora del vector binario pK7RWG2,0::CcFib**

Después de que los intentos de transformación previamente presentados no fuesen efectivos, se decidió implementar la transformación de tejido foliar de *Capsicum* empleando *Agrobacterium tumefaciens* portadora del vector pK7RWG2,0::CcFib. El tejido fue lavado cuidadosamente después de la incubación en el cultivo de *Agrobacterium* para ser colocado en la solución enzimática para obtención de protoplastos. Esto para verificar que el tejido había sido transformado.

En las figuras 3.28-A y C se observa el núcleo de los protoplastos por tinción con DAPI. En la figura 3.28-B se muestra el testigo negativo de la transformación, carente de señal fluorescente. Por otro lado, en la figura 3.28-D, no se encontraron indicios de transformación. En conclusión, los intentos de transformación empleando a *Agrobacterium* como vector no fueron efectivos.

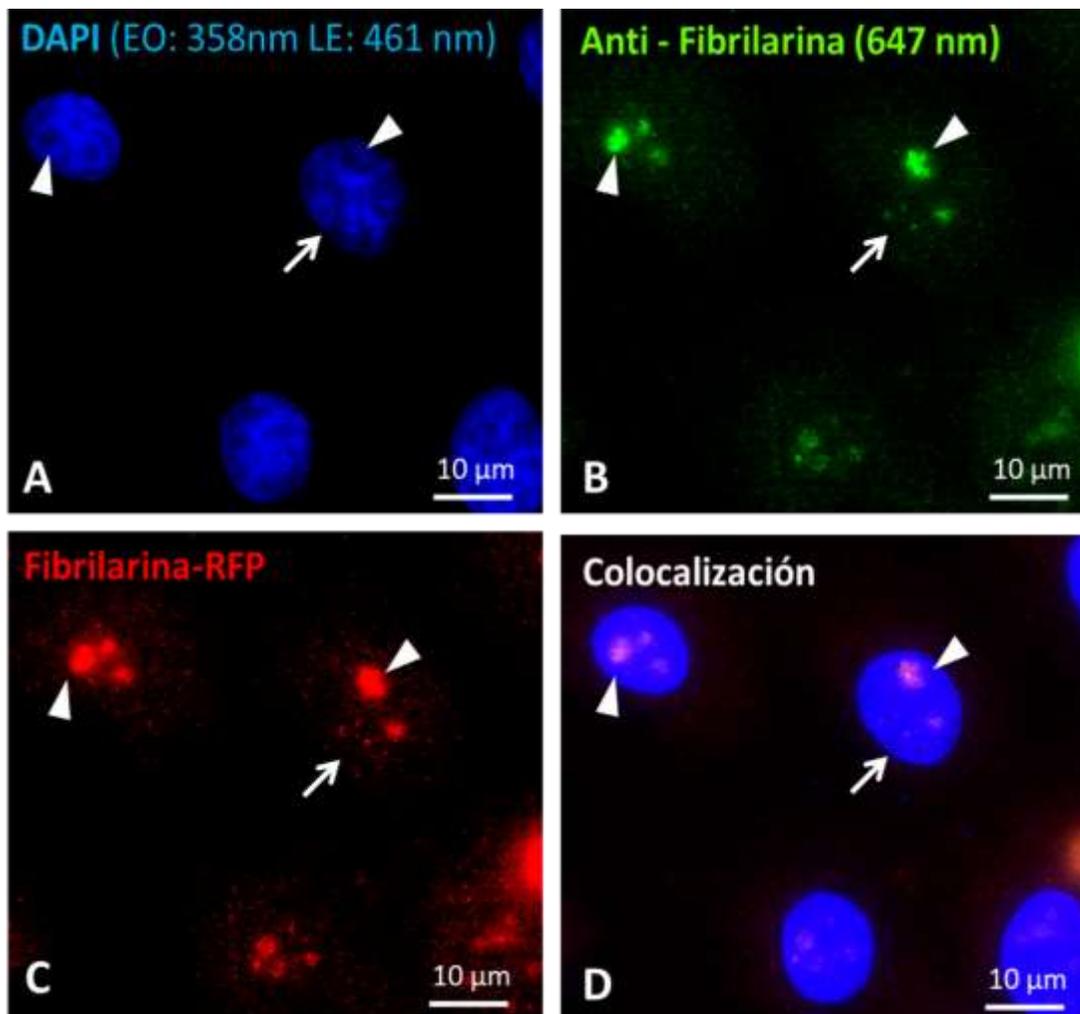


**Figura 3.28** Protoplastos de tejido foliar de *Capsicum* transformado con *Agrobacterium* portador del vector pK7RWG2,0::CcFib. **A.** Tinción con DAPI en testigo negativo. **B.** Observación del testigo negativo en canal de rodamina. **C.** Tinción con DAPI en experimento donde se usó *Agrobacterium* portadora del vector. **D.** Observación del experimento en presencia de vector en canal de rodamina.

Los métodos de transformación implementados no fueron efectivos. Como se puede observar en las figuras 3.23 a 3.28, ninguno de los casos fue positivo para transformación de protoplastos de *C. chinense*. Existe la posibilidad de que los tratamientos fueran inefectivos debido a que la cantidad de vector empleado no fue suficiente. Por lo antes mencionado, los resultados aquí presentados no son concluyentes.

Con base en los resultados anteriores, se decidió transfectar transitoriamente al cultivo de células HeLa con el vector binario pK7RWG2,0::CcFib, para corroborar su funcionalidad.

Las células sometidas a transfección fueron fijadas e incubadas con anticuerpos para detectar a la fibrilarina nativa en el canal de 647 nm. Como se observa en la figura 3.29, las células HeLa fueron transformadas con éxito empleando el vector binario y PEi. En la figura 3.29-A se muestran los núcleos teñidos con DAPI. En la figura 3.29-B (canal de 647 nm) se distinguen la señal emitida por la fibrilarina nativa, mientras que en la 3.29-C (canal de 555 nm) se registra la señal de la fibrilarina quimérica (acoplada a RFP). En la figura 3.29-D se aprecia la colocalización de ambas fibrilarinas presentando una distribución altamente similar, mas no idéntica.



**Figura 3.29** Inmunodetección de fibrilarina nativa en células HeLa transformadas con el vector binario pK7RWG2,0::CcFib. **A.** Núcleos teñidos con DAPI. **B.** Canal de 647 nm donde se observa la fibrilarina nativa. **C.** Canal de 555 nm donde se observa la señal de la CcFib acoplada a la RFP. **D.** Colocalización. Se pueden identificar los nucleolos (cabezas de flecha) y los CBs (flecha).

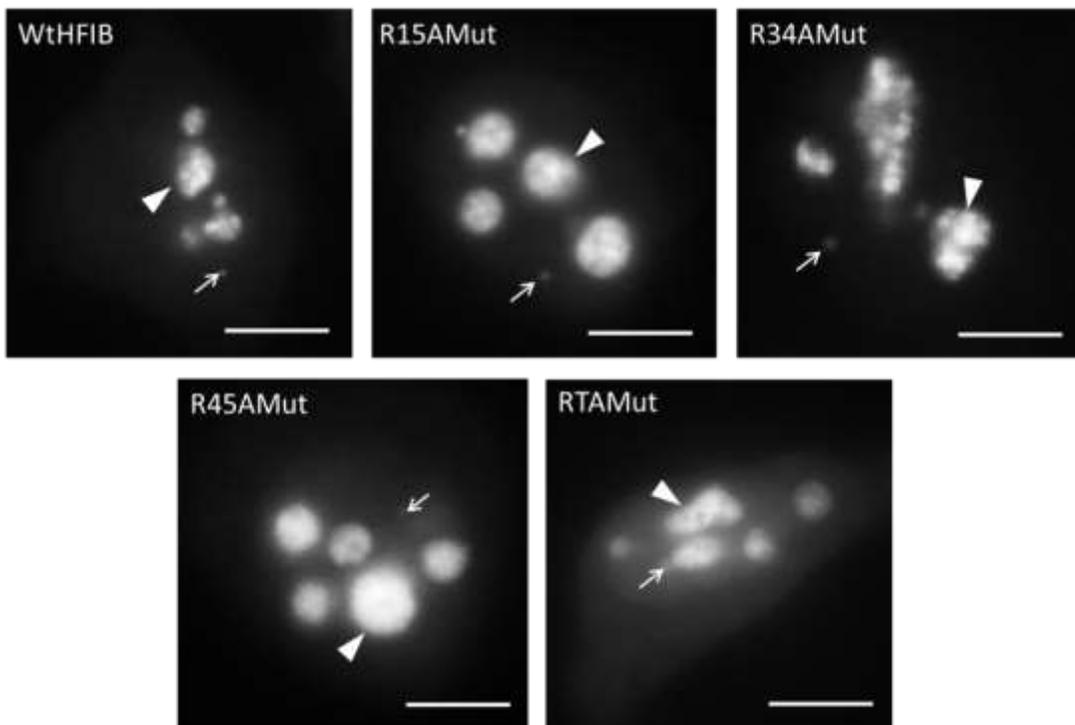
Como se muestra en la figura 3.29, los resultados de transformación de células HeLa con el vector binario pK7RWG2,0::CcFib fueron positivos. Esto permite afirmar que el vector y la fibrilarina que expresan son funcionales y que la inefectividad de la transformación en los protoplastos se debió a fallas técnicas en los protocolos empleados, y no a la funcionalidad del vector.

### **3.5 IMPLEMENTACIÓN DE ENSAYOS DE RECUPERACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DESPUÉS DE FOTOBLANQUEO (FRAPS)**

#### **3.5.1 Transformación transitoria del cultivo de células HeLa con el vector pSTR-fibrilarina\_GFP y sus derivados mutantes en el dominio GAR**

Con la finalidad de estudiar la dinámica de la fibrilarina, se transfectaron células HeLa con el vector pSTR-fibrilarina\_GFP que expresa a la fibrilarina humana acoplada a una GFP, así como con las cuatro versiones mutantes de este vector. Esto se realizó con la finalidad de observar cambios en la dinámica, ya fuese en nucleolos o en CBs que pudiesen generarse por estas mutaciones puntuales.

Las células fueron examinadas 48 horas después del proceso de transfección, de tal manera que los cultivos hubiesen pasado por al menos un evento de división. Todas las fibrilarinas marcadas, tanto la fibrilarina silvestre como sus mutantes, se localizaron en las mismas regiones donde se localizó la fibrilarina nativa. En la figura 3.30 se puede observar la distribución *in vivo* de la WtHFIB acoplada a una GFP, así como las mutantes R15AMut, R34AMut, R45AMut y RTAMut.

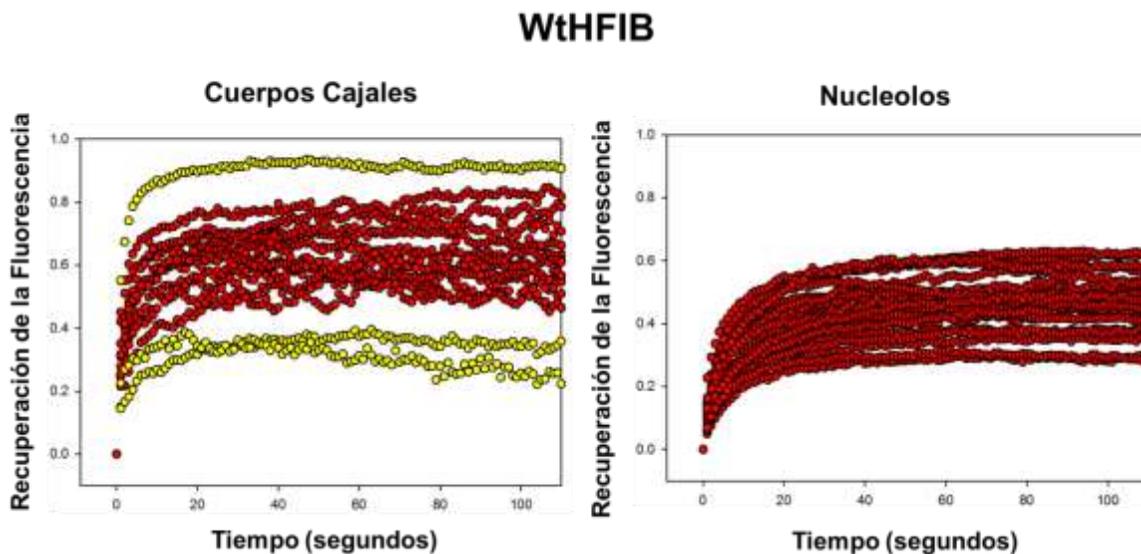


**Figura 3.30** Expresión de la fibrilarina humana silvestre (WtHFIB) y mutantes R15A, R34A, R45A y RTA a partir de su expresión acoplada a una GFP y morfología de los núcleos. Se puede observar que tanto a fibrilarina WtHFIB como sus mutantes, se dirigen a los nucleolos (cabeza de flecha blanca) y a CBs (flechas blancas), conservando una morfología similar.

**3.5.2 Obtención de las curvas de modelaje cinético de difusión proteica**

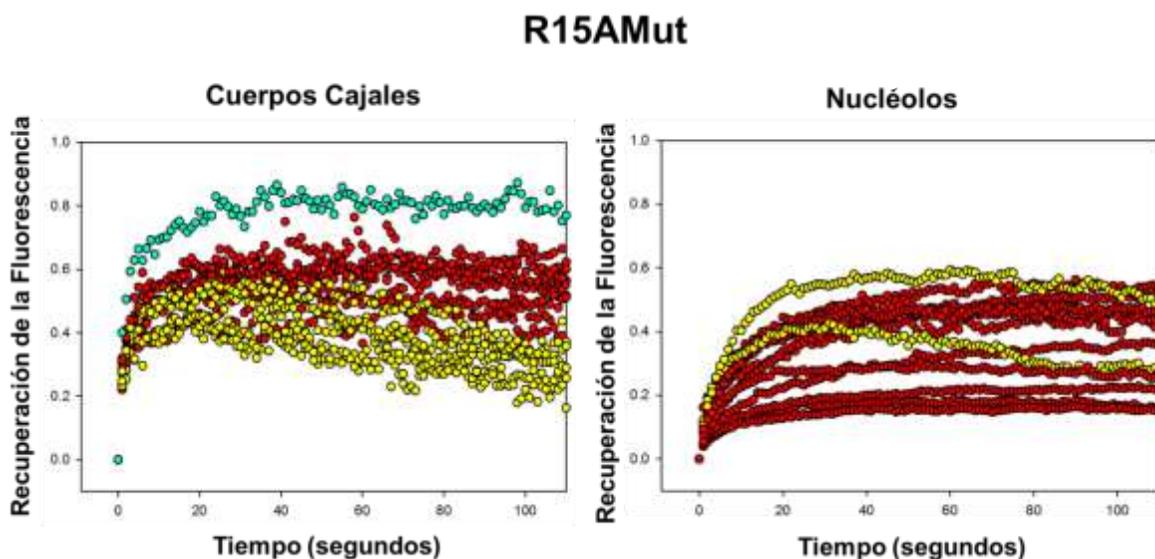
Los experimentos de FRAP fueron registrados en curvas de cinética proteica y en películas que recrean el experimento desde nueve segundos antes del fotoblanqueo de la REI hasta transcurridos 120 segundos de monitoreo de la recuperación de la fluorescencia. En las figuras desde la 3.31 hasta la 3.35 se muestran los resultados de 20 experimentos de FRAP en células que expresaron a la fibrilarina silvestre y sus mutantes acopladas a GFP en nucleolos y CBs.

En la figura 3.31 se observa el comportamiento dinámico de la fibrilarina silvestre (WtHFIB) representado en curvas de cinética proteica. Al comparar el comportamiento de las curvas de recuperación de la fluorescencia, se puede discernir que la fibrilarina silvestre (WtHFIB) presenta una difusión desacoplada en los CBs, mientras que en los nucleolos la difusión es acoplada.



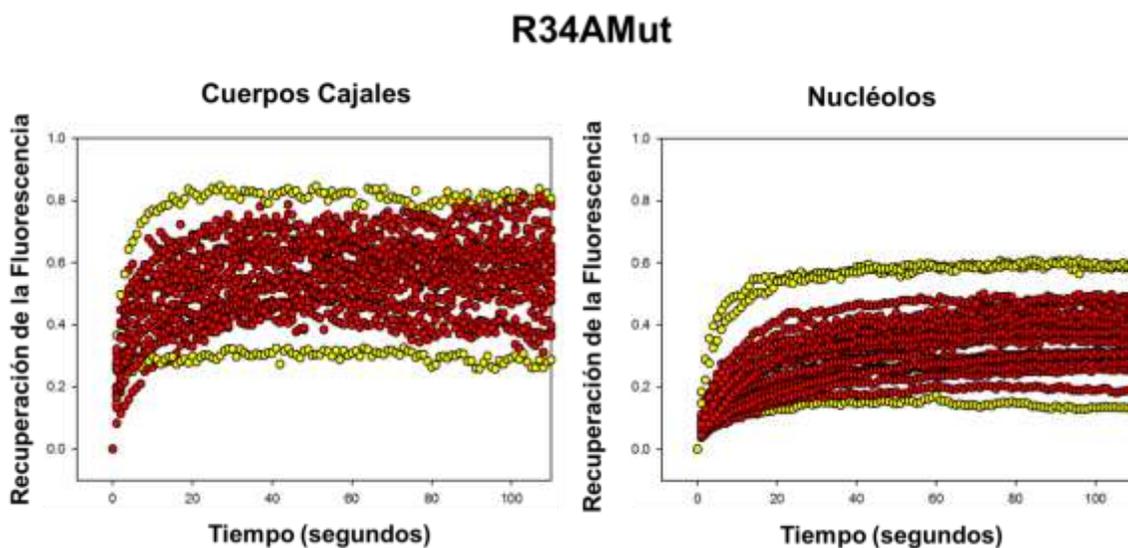
**Figura 3.31** Modelos cinéticos de difusión proteica obtenidos por medio de la implementación de FRAP en células HeLa expresando la fibrilarina silvestre o WtHFIB acoplada a GFP en CBs y nucleolos. Los puntos rojos representan el transcurso de un experimento exitoso, mientras que los amarillos señalan experimentos fuera de rango.

El comportamiento dinámico de la fibrilarina mutante R15A se observa en la figura 3.32. La dinámica de la fibrilarina en los CBs fue más errática en comparación con la dinámica observada en el resto de las fibrilarinas mutantes y la silvestre. Dicho comportamiento errático puede interpretarse como una ineficiencia en la conformación de uniones a otras moléculas o asociación y disociación rápida de la fibrilarina a sus complejos. El comportamiento dinámico de la fibrilarina mutante R15A en los nucleolos fue similar al presentado por la fibrilarina silvestre; sin embargo, el tiempo de difusión fue más largo. Esto podría deberse a que la mutante R15A requiere de más tiempo para formar complejos cuando se encuentra dentro del nucleolo. En ambas gráficas, los puntos amarillos y azules describen experimentos fuera del rango de la ecuación de normalización, resultado de que la célula bajo análisis se moviera por efectos de fototaxis o se desenfocara. Aquellas curvas cuyos puntos aparecen en color amarillo o azul fueron excluidas de los análisis estadísticos para minimizar el rango de error.



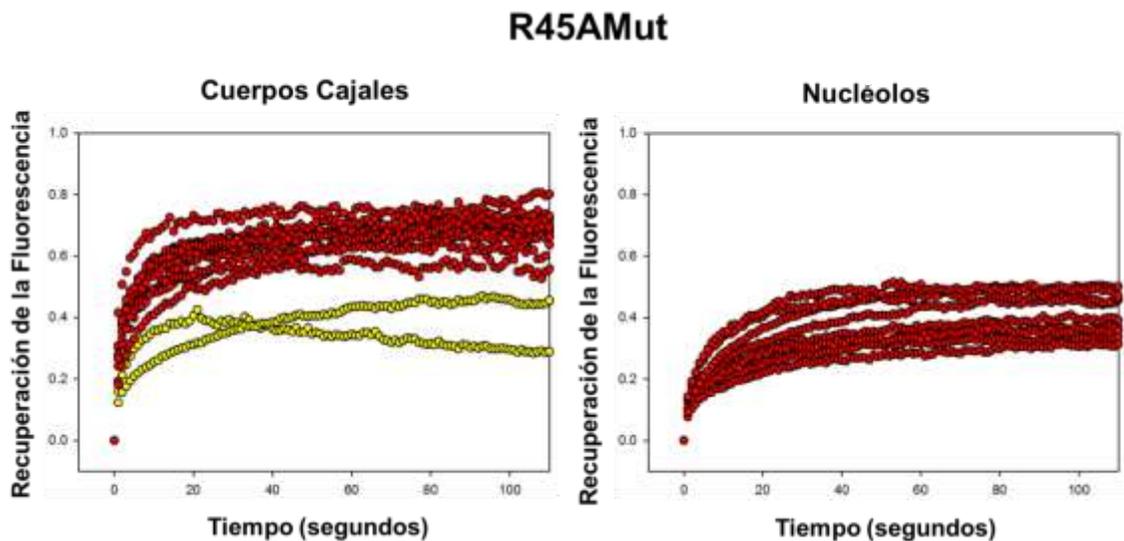
**Figura 3.32** Modelos cinéticos de difusión proteica obtenidos por medio de la implementación de FRAP en células HeLa expresando la fibrilarina mutante R15A acoplada a GFP en CBs y nucleolos. Las curvas amarillas y la curva azul representan experimentos fuera del rango y fueron omitidos en los análisis estadísticos.

El comportamiento dinámico de la fibrilarina mutante R34A puede analizarse al compararse a la figura 3.31 con la figura 3.33. Se determinó que tanto para los CBs como para los nucleolos, no hubieron diferencias entre el comportamiento dinámico de la fibrilarina mutante R34A con respecto a la fibrilarina silvestre (WtHFIB). En el caso de los nucleolos, tampoco hubo un cambio evidente en el comportamiento dinámico de la fibrilarina mutante R34A con respecto a la fibrilarina silvestre y la mutante R15A (figura 3.32), con la cual presentó el mismo comportamiento de difusión acoplada, es decir, esta mutante requiere de más tiempo para lograr integrarse a sus complejos.



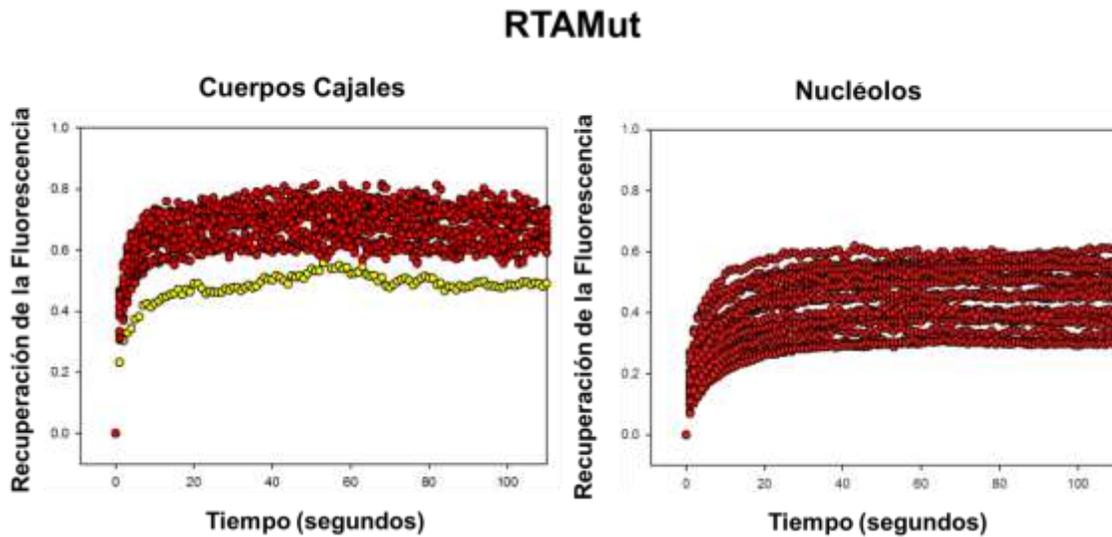
**Figura 3.33** Modelos cinéticos de difusión proteica obtenidos por medio de la implementación de FRAP en células HeLa expresando la fibrilarina mutante R34A acoplada a GFP en CBs y nucleolos. Las curvas amarillas representan experimentos fuera de rango, que fueron omitidos en los análisis estadísticos.

El comportamiento dinámico de la mutante R45A puede observarse en la figura 3.34. Como se puede observar en ambas graficas (CBs y nucleolos) la dinámica es similar o idéntica a aquella presentada por la mutante R34A, pero presentando un rango menor en las vidas medias. De acuerdo a la gráfica de dinámica en nucleolos, en la mutante R34A parece no estar afectando la formación de complejos o la interacción con otras moléculas en gran medida.



**Figura 3.34** Modelos cinéticos de difusión proteica obtenidos por medio de la implementación de FRAP en células HeLa expresando la fibrilarina mutante R45A acoplada a GFP en CBs y nucleolos. Las curvas amarillas representan experimentos fuera de rango, que fueron omitidos en los análisis estadísticos.

El comportamiento dinámico que presentó la triple mutante (RTAMut), como se puede apreciar en la figura 3.35, correspondió a una difusión desacoplada, no sólo para los CBs como ocurrió con el resto de las fibrilarinas mutantes y la silvestre (WtHFIB); sino también para los nucleolos.

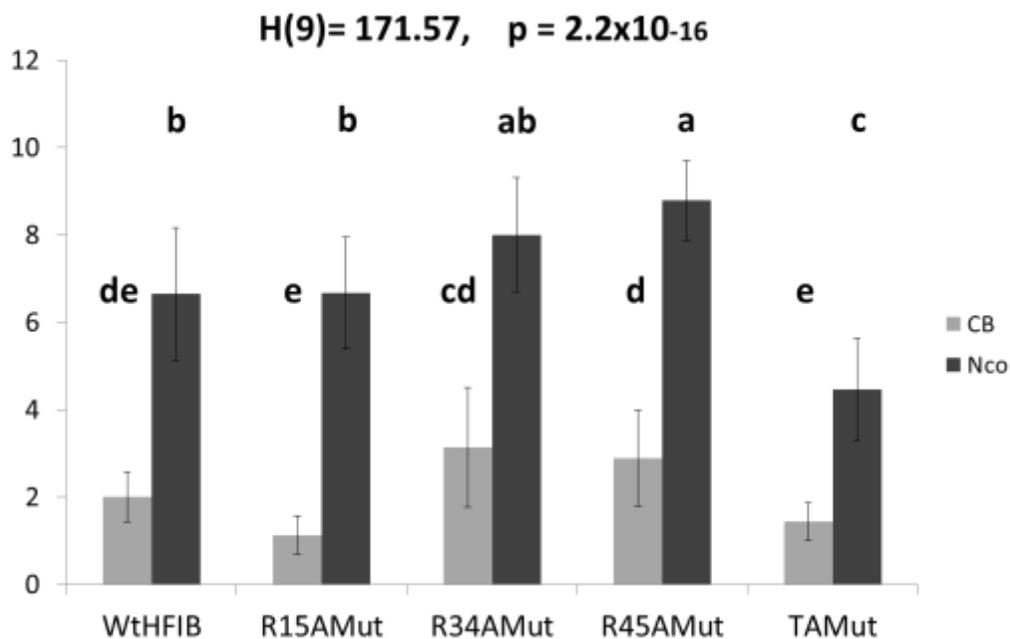


**Figura 3.35** Modelos cinéticos de difusión proteica obtenidos por medio de la implementación de FRAP en células HeLa expresando la fibrilarina mutante RTA acoplada a GFP en CBs y nucleolos. Las curvas amarillas representan experimentos fuera de rango, que fueron omitidos en los análisis estadísticos.

Se puede considerar que este cambio drástico en el comportamiento dinámico de la fibrilarina en los nucleolos se debe a un efecto acumulativo de las tres mutaciones puntuales en el dominio GAR, el cual es responsable del direccionamiento de la fibrilarina hacia los componentes nucleolares donde desempeña sus funciones.

### 3.5.3 Obtención de los coeficientes de Media máxima ( $\tau^{1/2}$ ), coeficientes de difusión y valores porcentuales de las fracciones móvil e inmóvil

Luego del análisis de los datos crudos obtenidos en la cuantificación de la recuperación de la fluorescencia, se procedió a normalizar por separado cada uno de los experimentos para obtener la pendiente de la curva o vida media ( $\tau_{1/2}$ ), así como emplear la meseta de la curva para la obtención de las fracciones móvil e inmóvil. En la figura 3.36 se muestran los promedios de los valores de la vida media obtenidos para WtHFIB y cada mutante. Utilizando estos valores se llevó a cabo la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, con la finalidad de determinar si existían diferencias significativas en las vidas medias de la fibrilarina silvestre y las mutantes, obteniendo un valor de  $p=2.2 \times 10^{-16}$ , rechazando así la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alternativa que postula que existen diferencias entre los valores de vida media ( $\tau_{1/2}$ ) reportados para cada mutante.



**Figura 3.36** Vidas medias de WtHFIB y mutantes. Las barras gris claro corresponden a los CBs, mientras que las barras gris oscuro corresponden a nucleolos (Nco). Los datos representan el valor promedio de 25 repeticiones por región intranuclear y las líneas verticales son las desviaciones estándar.

Los valores graficados en la figura 3.36 corroboran las observaciones realizadas sobre las curvas de cinética proteica. Los valores representados por las barras gris oscuro (correspondientes a los nucleolos) son significativamente mayores a los de las barras gris claro (correspondientes a los CBs). Esto indica que la dinámica que presenta la fibrilarina en los nucleolos es más lenta y estable, que aquella presente en los CBs, lo que se ve reflejado en su tiempo de permanencia dentro de cada uno, pues mientras más grande es el valor de la vida media, el movimiento de la proteína es más lento.

Como se observa en la figura 3.36, la mutación R45A provocó una disminución significativa en la velocidad de la fibrilarina en el nucleolo, seguida por la mutante R34A. Por otro lado, la mutación R15A no generó ningún cambio en la dinámica de la fibrilarina si se compara ésta con la dinámica de la fibrilarina silvestre (WtHFIB).

En contraste con la disminución en la velocidad de movimiento que generaron las mutantes R45A y R34A y el efecto aparentemente nulo de la mutante R15A, la triple mutante (TAMut) generó un aumento significativo en la velocidad de la dinámica de la fibrilarina en el nucleolo, probablemente por un efecto acumulativo de estas mutaciones.

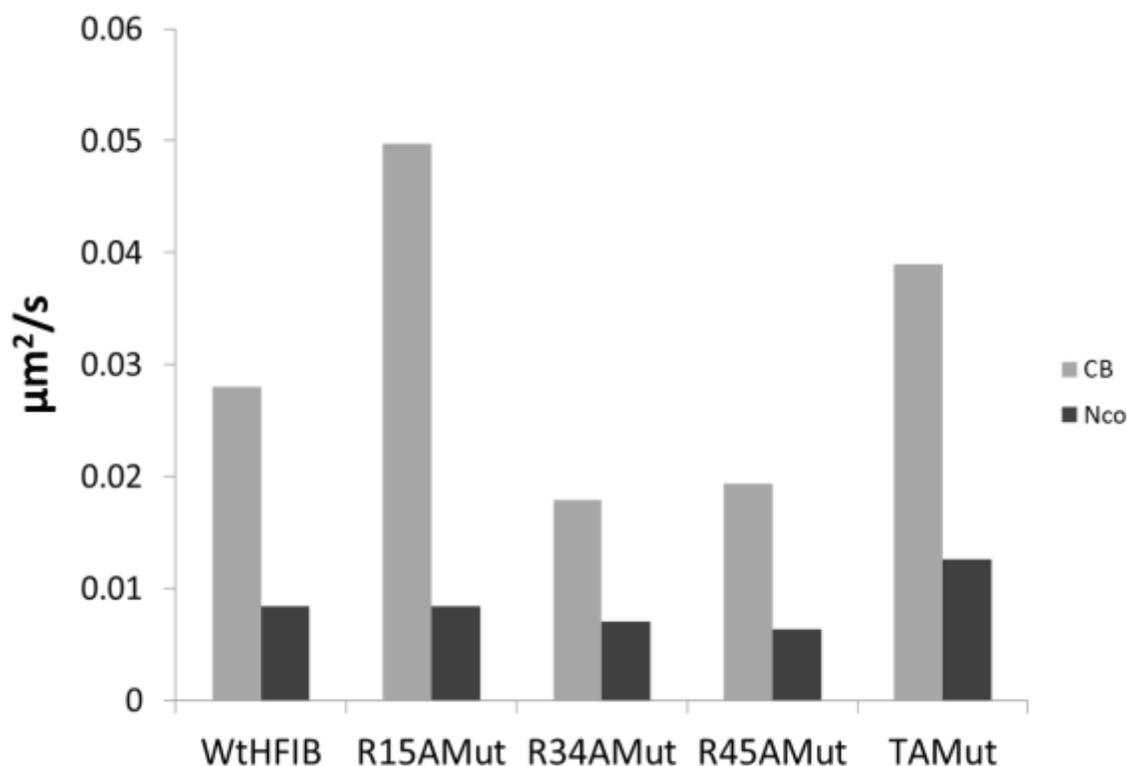
Como prueba *post hoc*, se utilizó el método de Scheffé ( $\alpha=0.05$ ), el cual permite realizar comparaciones múltiples entre los promedios de vida media y los coeficientes de difusión y agruparlos de acuerdo a similitud. Como se puede apreciar en el cuadro 3.1 y de acuerdo a los resultados obtenidos para el nucleolo con la prueba de Scheffé, la dinámica de la fibrilarina triple mutante (RTAMut) es completamente diferente con respecto a la mostrada por WtHFIB y las mutantes R15A, R34A y R45A; esto podría implicar un efecto acumulativo de las tres mutaciones puntuales. Esta observación se corrobora al observar los coeficientes de difusión; RTAMut presenta una velocidad mayor al resto de los casos observados.

En el caso de la dinámica de WtHFIB en los CBs ( $0.027 \mu\text{m}^2/\text{s}$  y  $2.00 \pm 0.57$ ) se observó una disminución de la velocidad de difusión con respecto a las mutantes R34AMut y R45AMut. En el caso de las mutantes R15AMut y RTAMut, hubo un aumento significativo de dicha velocidad ( $0.049 \mu\text{m}^2/\text{s}$  y  $1.43 \pm 0.44$ ;  $0.038 \mu\text{m}^2/\text{s}$  y  $1.12 \pm 0.43$ , respectivamente) (Figura 3.36).

**Cuadro 1.1** Promedios de vida media y coeficientes de difusión de cada grupo de experimentos y análisis de Scheffé.

<b>Grupos</b>	<b>Región Intranuclear</b>	<b>Promedios Vida media (<math>\tau_{1/2}</math>)</b>	<b>Coeficientes de difusión (<math>\mu\text{m}^2/\text{s}</math>)</b>	<b>Semejanzas (Scheffé)</b>
<b>R45AMut</b>	Nucleolos	8.78 ± 0.92	0.006	a
<b>R34AMut</b>	Nucleolos	7.99 ± 1.31	0.007	ab
<b>R15AMut</b>	Nucleolos	6.66 ± 1.28	0.008	b
<b>WtHFIB</b>	Nucleolos	6.65 ± 1.51	0.008	b
<b>RTAMut</b>	Nucleolos	4.45 ± 1.17	0.012	c
<b>R34AMut</b>	CBs	3.13 ± 1.37	0.017	cd
<b>R45AMut</b>	CBs	2.88 ± 1.10	0.019	d
<b>WtHFIB</b>	CBs	2.00 ± 0.57	0.027	de
<b>R15AMut</b>	CBs	1.43 ± 0.44	0.049	e
<b>RTAMut</b>	CBs	1.12 ± 0.43	0.038	e

El análisis cuantitativo de los experimentos de FRAP en WtHFIB y las mutantes en células HeLa indica que la fibrilarina se intercambia rápidamente entre los CBs, el nucleolo y el citoplasma, a pesar de presentar mutaciones en aquellos aminoácidos conservados en el dominio GAR para *H. sapiens*, *B. oleracea*, *S. cerevisiae* y *A. thaliana*. En la figura 3.37 se comparan los coeficientes de difusión (D) de la fibrilarina silvestre y las mutantes.



**Figura 3.37** Velocidad de difusión (coeficiente de difusión) de la fibrilarina silvestre (WtHFIB) y sus mutantes en  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ .

Los coeficientes de difusión calculados para la fibrilarina silvestre (WtHFIB) coinciden con los reportados por Phair y Misteli en el 2000, los cuales fueron de 0.02 a 0.04  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  para los CBs, mientras que para los nucleolos fue de 0.008 a 0.016  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  (Phair y Misteli, 2000).

La fracción móvil que se obtuvo para WtHFIB y sus mutantes es significativamente mayor en los CBs en comparación con los nucleolos (56.86% contra el 45.75%). Como se observa en el cuadro 3.2, al comparar estos porcentajes con los reportados por Phair y Misteli, 2000 y su fracción inmóvil (43.13% en CBs contra el 54.24% en nucleolo), se observa que la fracción móvil del nucleolo es menor a la fracción móvil del CB en todos los casos.

**Cuadro 3.2** Valores porcentuales de las fracciones móvil e inmóvil para WtHFIB y sus mutantes.

	Nucleolo		CBs	
	Móvil %	Inmóvil %	Móvil %	Inmóvil %
<b>WtHFIB</b>	45.75	54.24	56.86	43.13
<b>R15AMut</b>	41.7	58.3	57.36	42.63
<b>R34AMut</b>	34.85	65.14	51.43	48.56
<b>R45AMut</b>	40.07	59.93	66.23	33.76
<b>RTAMut</b>	43.76	56.23	67.87	32.12

El significado funcional de esta diferencia entre el nucleolo y los CBs aún permanece sin resolver; sin embargo, el valor relativamente bajo de la fracción móvil en el nucleolo podría representar un parámetro de reclutamiento permanente de la fibrilarina en éste (Dundr *et al.*, 2004; Chen y Huang, 2001; Phair y Misteli, 2000; Snaar *et al.*, 2000); así como una permanencia más efímera en los CBs (Misteli, 2001). Esto podría apuntar también a que el tiempo de residencia y la permanencia de la fibrilarina, ya sea en el nucleolo o en los CBs, dependen de interacciones o formación de complejos diferentes para cada región intranuclear. Aunado a esto y mediante la implementación del ensayo iFRAP, se había demostrado que las proteínas nucleolares fibrilarina, Nopp140 y B23 exhibían disociaciones cinéticas similares en los CBs, mientras que en el caso del nucleolo eran significativamente más lentas (Dundr *et al.*, 2004).

La fracción móvil de la fibrilarina podría representar una población de moléculas con funciones distintas a la fracción inmóvil. En el caso de la fracción inmóvil, la fibrilarina podría estar desempeñando actividades enzimáticas estables o bien estructurales formando complejos (Snaar *et al.*, 2000) mientras que en el caso de la fracción móvil, podría encontrarse transportándose como monómero o como un acarreador. De forma alternativa, se puede considerar que la cantidad de fibrilarina en cada dominio intranuclear es distinta, lo que podría apuntar a que algunas de estas moléculas tienen roles estructurales diferentes en CBs y nucleolos (Phair y Misteli, 2000; Snaar *et al.*, 2000).

Es importante tomar en cuenta que la resolución del análisis de FRAP no llega al nivel molecular, por lo tanto los resultados aquí mostrados representan la suma del movimiento de la fibrilarina en todas sus formas posibles: formando parte de diversos complejos proteicos, libre, activada o inactivada. Sin embargo, estos análisis proveen las bases que permitirán profundizar en el estudio de la dinámica nuclear.

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN GENERAL

En los ensayos de inmunofluorescencia realizados tanto en células en suspensión de *C. chinense* como en células HeLa, se pudo observar la señal correspondiente a la fibrilarina en regiones dentro del núcleo que se identificaron como nucleolos (Andersen *et al.*, 2002; Chen y Huang, 2001) y como CBs, además de una señal difusa en el nucleoplasma (Dundr *et al.*, 2004).

La interpretación biológica de la localización y comportamiento dinámicos observados se realizó a partir de la información recopilada durante los experimentos de FRAP en fibrilarina silvestre y sus derivados mutantes en células HeLa exclusivamente, ya que como se mostró con anterioridad, la transformación de células en suspensión y tejido foliar de *C. chinense* no fue exitosa. Los resultados de los análisis de FRAP en fibrilarina humana silvestre y sus derivados mutantes proveen información acerca de su comportamiento molecular dentro de las dos principales regiones intranucleares que habita, el nucleolo y los CBs.

El intercambio entre el nucleoplasma, el nucleolo y los CBs en la escala de segundos sugiere que la fibrilarina se transporta entre ambos dominios intranucleares más de una vez durante su vida, posiblemente después de cada acto funcional, lo que puede tratarse de un ciclo de transcripción, procesamiento de pre-ARNr o transcritos, etc. (Chen y Huang, 2001).

El comportamiento dinámico de la fibrilarina está determinado por la región intranuclear que se encuentre habitando en un determinado momento, ya sea el nucleolo o los CBs. Se observaron dos comportamientos dinámicos diferentes entre la fibrilarina presente en nucleolos y aquella presente en los CBs, comportamientos que prevalecieron a pesar de las mutaciones generadas en el dominio GAR de la proteína. Esta diferencia en el comportamiento dinámico de la proteína se atribuye a que, dependiendo de la región intranuclear hacia donde a fibrilarina se dirija (nucleolo o CB), sus interacciones, tiempo de residencia y formación de complejos será distinta.

Es posible que las mutaciones puntuales generadas en el dominio GAR de la fibrilarina humana provocaran una pérdida en la eficiencia de conformación de complejos o interacción con otras moléculas, siendo estas interacciones distintas en nucleolos y CBs. Este cambio en el comportamiento dinámico permite proponer que la función biológica que desempeña la fibrilarina es distinta en los CBs y en los nucleolos. Esta observación coincide con lo previamente propuesto por Snaar y colaboradores (2000) sobre que la fibrilarina se intercambia rápidamente entre los CBs, el nucleolo y el nucleoplasma.

### **4.1 La fibrilarina se intercambia entre el nucleolo, el nucleoplasma y los cuerpos Cajales**

Se ha propuesto que la fibrilarina funciona como un eslabón molecular entre el nucleolo y el CB, con la posibilidad de funcionar como un chaperón para otras moléculas (Isaac *et al.*, 1998). Algunos autores sugieren la existencia de mecanismos de retención en compartimentos específicos para las proteínas de los CBs y el nucleolo basándose en la naturaleza de las interacciones que pueden tener sus dominios, como lo hicieron Snaar y colaboradores en el 2000 al analizar la dinámica de fibrilarina completa y truncada en células HeLa (Snaar *et al.*, 2000). Dentro de estas interacciones se consideran aquellas que se dan con los fosfoinosítidos nucleares de gran relevancia.

Desde hace algunos años, se sabe que el núcleo contiene una cantidad de lípidos significativa, entre ellos los fosfoinosítidos (Fraschini *et al.*, 1999), aún después de la remoción experimental de la envoltura nuclear. Debido a la falta de estructuras membranales dentro del núcleo, se ha sugerido que moléculas hidrofóbicas son las encargadas de mantener el ambiente interno que favorece la concentración de fosfoinosítidos (Vann *et al.*, 1997). El nucleolo no está separado del nucleoplasma por una membrana; sin embargo, presenta una composición proteína-ácido nucleico única, sus proteínas son ricas en residuos básicos, lo cual les permite translocarse al nucleolo después de unirse a proteínas GTP (Tsai y McKay, 2005). Por lo tanto, debido a su ambiente favorable conformado por proteínas básicas, el nucleolo puede albergar fosfoinosítidos como PIP2. PIP2 se une directamente a la fibrilarina en regiones del núcleo donde ambos colocalizan con transcritos recién sintetizados de genes ribosomales dentro del nucleolo, lo que indica que PIP2 podría estar involucrado tanto en la

transcripción como en el procesamiento temprano del ARN ribosomal (Yildirim *et al.*, 2013) y con base en lo observado en los experimentos antes presentados, podría estar influyendo directamente en su dinámica.

#### **4.2 El nucleolo en el ambiente nuclear**

Se sabe que varios de los dominios intranucleares, si no es que todos, interactúan de manera física con el nucleolo (Spector y Lamond, 2001). La pregunta es si dichos dominios y el nucleolo están funcionalmente involucrados y por ende, están en constante comunicación. El mejor ejemplo es el cuerpo Cajal, el cual fue descubierto en el núcleo neuronal y descrito como un “cuerpo accesorio” del nucleolo (Gall, 2000; Matera, 1999).

La interacción entre el CB y el nucleolo ha sido bien documentada (Pena *et al.*, 2001) además de haberse analizado su dinámica en células vivas (Dundr *et al.*, 2004; Platani *et al.*, 2000; Sleeman y Lamond, 1999). El número de CBs y su relación con el nucleolo en las neuronas se correlaciona con la actividad transcripcional (Pena *et al.*, 2001). El CB es altamente rico en ribonucleoproteínas (snRNPs y snoRNPs), requeridas para la maduración de los pre-ARN ribosomales y los pre-ARN mensajeros, además de compartir proteínas nucleolares como fibrilarina, Nopp 140 y NAP57 (Matera, 1999), así como subunidades de la ARNsa P (Jarrous *et al.*, 1999). Se considera que los CBs funcionan como una plataforma para las vías de biogénesis de los snRNPs y snoRNPs (Matera, 1999); dicha función podría explicar las interacciones preferenciales que existen entre el nucleolo y los CBs. Aunado a esto, se ha demostrado que U3 y U8 se localizan de manera estacionaria en los CBs, previa a su acumulación en el nucleolo (Terns y Dahlberg, 1994). Los CBs tienen un papel principal en el direccionamiento de los snoRNAs dentro del núcleo, y podrían, inclusive ser una escala obligatoria en las vías de biogénesis de las ribonucleoproteínas que llevan a cabo su actividad en el nucleolo (Terns y Dahlberg, 1994).

¿Cómo es que estas maquinarias moleculares alcanzan el lugar correcto en el momento correcto y participan en el correcto ensamblaje de nucleolos funcionales? Es una pregunta que está actualmente en investigación, mediante el análisis de la dinámica de sus proteínas constitutivas y complejos en células vivas.

Existen múltiples estudios que sugieren que los procesos de dinámica nuclear son ATP- o GTP- dependientes (Calapez *et al.*, 2002). También, es factible que los mecanismos de transporte de macromoléculas dentro del núcleo involucren una combinación de difusión pasiva y procesos dependientes de energía (Janicki y Spector, 2003; Parada y Misteli, 2002; Dundr y Misteli, 2001). Sin embargo, la hipótesis que postula la existencia de factores de transporte no puede ser excluida, pues recientemente se demostró, mientras se rastreaban los precursores de U3, que éstos son necesarios en su transporte entre los CBs y el nucleolo (Boulon *et al.*, 2004).

Las proteínas nucleolares fibrilarina, nucleolina y B23 tienen un movimiento relativamente rápido (Chen y Huang, 2001; Phair y Misteli, 2000), así como las proteínas de los compartimentos perinucleares (Huang *et al.*, 1998), los factores de transcripción CF, SF2/ASF, SC35 (Phair y Misteli, 2000) y las proteínas de los CBs: coilina, fibrilarina y SMN (Handwerger *et al.*, 2005; Sleeman *et al.*, 2003).

Entre las proteínas que se mueven rápidamente a través del nucleoplasma, el nucleolo y los CBs, se encuentran UBF1, involucrada en la transcripción del ARN ribosomal, fibrilarina y Rpp29, responsables del procesamiento del pre-ARNr, así como la nucleolina y B23 que participan en el ensamblaje de ribosomas. El rango de los coeficientes de difusión de estas proteínas se encuentran entre 0.020 y 0.14  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  (Chen y Huang, 2001; Phair y Misteli, 2000; Snaar *et al.*, 2000).

La coilina y la SMN, ambas localizadas en los CBs, mostraron diferentes velocidades de recuperación después de fotoblanqueo: la coilina resultó ser 50 veces más rápida que SMN, lo que indica que aunque forman parte del mismo dominio, cada una cuenta con su propia tasa de recambio. Los elevados coeficientes de difusión de estas proteínas indican que no están difundiendo de manera completamente libre en el núcleo. Con base en el modelo de Misteli y colaboradores (Dundr y Misteli, 2001), una menor movilidad podría deberse a una breve interacción entre proteínas nucleares y otros componentes inmóviles (Calapez *et al.*, 2002).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1 CONCLUSIONES

La fibrilarina es una proteína nuclear altamente conservada, la cual presenta una distribución característica dentro del nucleolo, en el componente fibrilar (FC) y el componente fibrilar denso (DFC), además de estar presente en CBs. Esta localización se ve conservada entre plantas y animales, cuyas morfologías nucleolares son distintas. Entre los reinos vegetal y animal, la fibrilarina es una proteína evolutivamente conservada, presentando el menor porcentaje de similitud dentro del dominio GAR, dominio que ha sido relacionado o responsabilizado del comportamiento dinámico de esta proteína.

Mediante la implementación de los análisis de FRAP, se corroboró el carácter dinámico de la fibrilarina en los nucleolos y en los CBs en células humanas (HeLa), sin embargo, no fue posible realizar una descripción de dicha dinámica en el modelo vegetal, pues los intentos de transformación no fueron exitosos. Estos estudios de fibrilarina en células vivas son la base para realizar extrapolaciones sobre cómo su comportamiento dinámico se ve influenciado por su ensamblaje en complejos proteicos, de lo cual depende su interacción con fosfoinosítidos. Es fundamental recalcar que dicha dinámica es diferente en nucleolos y CBs.

Es importante tomar en cuenta que la resolución del análisis de FRAP no llega al nivel individual molecular, por lo tanto los resultados aquí mostrados representan la suma del movimiento de la fibrilarina en todas sus formas posibles: formando parte de diversos complejos proteicos, libre, activada o inactivada. Sin embargo, estos análisis proveen las bases que permitirán profundizar en el estudio de la dinámica nuclear. Las interacciones y formación de complejos entre la fibrilarina y otras proteínas marcan la naturaleza de su dinámica, la cual se ve afectada por las mutaciones puntuales generadas en aminoácidos conservados dentro del dominio GAR, como se demostró en este trabajo.

## 5.2. PERSPECTIVAS

- El vector pK7RWG2::CcFib generado en este trabajo servirá como una herramienta para el estudio de la fibrilarina de plantas, en particular de las Solanáceas pues la similitud presentada entre sus secuencias es de 96.6%.
- Los resultados de dinámica demuestran que hay diferencias en la movilidad de la fibrilarina en los nucleolos y los CBs, lo que podría indicar que la fibrilarina puede interactuar con distintas proteínas. (con los fosfoinosítidos actuando como pegamento). Es por esto que este estudio marca las pautas para entender con qué proteínas interactúa la fibrilarina en el núcleo.
- Las metodologías establecidas y desarrolladas en este trabajo podrán ser implementadas a futuro en los siguientes trabajos de tesis del grupo de investigación, como es el caso de la búsqueda y análisis de secuencias de la fibrilarina en plantas, la obtención de proteínas mutantes y el vector binario de expresión de la fibrilarina de *C. chinense* acoplada a una RFP.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abney, J.R., B. Cutler, M.L. Fillbach, D. Axelrod y B.A. Scalettar (1997). Chromatin Dynamics in Interphase Nuclei and Its Implications for Nuclear Structure. *The Journal of Cell Biology*, 137(7), 1459-1468.
- Amin, M.A., S. Matsunaga, N. Ma, H. Takata, M. Yokoyama, S. Uchiyama, y K. Fukui (2007). Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(2), 320-326.
- Andersen, J.S., C.E. Lyon, A.H. Fox, A.K Leung, Y.W. Lam, H. Steen y A.I. Lamond (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*, 12(1), 1-11.
- Andrade, L. E., E.K. Chan, I. Raska, C.L. Peebles, G. Roos y E.M. Tan (1991). Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J Exp Med*, 173(6), 1407-1419.
- Aris, J.P. y G. Blobel (1991). cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(3), 931-935.
- Axelrod, D., D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson y W.W. Webb (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, 16(9), 1055-1069.
- Backstrom, S., N. Elfving, R. Nilsson, G. Wingsle y S. Bjorklund (2007). Purification of a plant mediator from *Arabidopsis thaliana* identifies PFT1 as the Med25 subunit. *Mol Cell*, 26(5), 717-729.
- Bassett, C.L. (2012). Cajal Bodies and Plant RNA Metabolism. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(3), 258-270. doi:10.1080/07352689.2011.645431
- Bellmann, K. (1974). Jacquez, J. A.: Compartmental analysis. *Biology and Medicine*.

- Elsevier Publ. Co., Amsterdam, New York 1972. XIV, 237 S., 93 Abb., 1 Tab., \$24.35. *Biometrische Zeitschrift*, 16(8), 537-537. doi:10.1002/bimj.19740160811
- Bentley, D. (1999). Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr Opin Cell Biol*, 11(3), 347-351.
- Bohmann, K., J.A. Ferreira y A.I. Lamond (1995). Mutational analysis of p80 coilin indicates a functional interaction between coiled bodies and the nucleolus. *J Cell Biol*, 131(4), 817-831.
- Boudonck, K., L. Dolan y P.J. Shaw (1999). The Movement of Coiled Bodies Visualized in Living Plant Cells by the Green Fluorescent Protein. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 2297-2307.
- Boulon, S., C. Verheggen, B.E. Jady, C. Girard, C. Pescia, C. Paul y E. Bertrand (2004). PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Mol Cell*, 16(5), 777-787.
- Busch, H. y K. Smetana (1970). *The nucleolus*: Academic Press.
- Calapez, A., H.M. Pereira, A. Calado, J. Braga, J. Rino, C. Carvalho y M. Carmo-Fonseca (2002). The intranuclear mobility of messenger RNA binding proteins is ATP dependent and temperature sensitive. *J Cell Biol*, 159(5), 795-805.
- Carmo-Fonseca, M., L. Mendes-Soares y I. Campos (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol*, 2(6), E107-112.
- Cermeño, M. C., J. Orellana, J.L. Santos y J.R. Lacadena (1984). Nucleolar organizer activity in wheat, rye and derivatives analyzed by a silver-staining procedure. *Chromosoma*, 89(5), 370-376.
- Chen, D., y S. Huang (2001). Nucleolar Components Involved in Ribosome Biogenesis Cycle between the Nucleolus and Nucleoplasm in Interphase Cells. *The Journal of Cell Biology*, 153, 169-176.
- Chubb, J.R. y W.A. Bickmore (2003). Considering Nuclear Compartmentalization in the

- Light of Nuclear Dynamics. *Cell*, 112(4), 403-406.
- Cockell, M.M. y S.M. Gasser (1999). The nucleolus: nucleolar space for RENT. *Curr Biol*, 9(15), R575-576.
- Cremer, T. y C. Cremer (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, 2(4), 292-301.
- Cremer, T., G. Kreth, H. Koester, R.H. Fink, R. Heintzmann, M. Cremer y C. Cremer (2000). Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 10(2), 179-212.
- Croft, J.A., J.M. Bridger, S. Boyle, P. Perry, P. Teague y W.A. Bickmore (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol*, 145(6), 1119-1131.
- Dundr, M., M.D. Hebert, T.S. Karpova, D. Stanek, H. Xu, K.B. Shpargel y T. Misteli (2004). In vivo kinetics of Cajal body components. *The Journal of Cell Biology*, 164(6), 831-842.
- Dundr, M. y T. Misteli (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J*, 356(Pt 2), 297-310.
- Eichler, D.C., y N. Craig (1994). Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 49, 197-239.
- Fatica, A., S. Galardi, F. Altieri y I. Bozzoni (2000). Fibrillarin binds directly and specifically to U16 box C/D snoRNA. *Rna*, 6(1), 88-95.
- Fatica, A., y D. Tollervey (2002). Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol*, 14(3), 313-318.
- Fraschini, A., M. Biggiogera, M.G. Bottone y T.E. Martin (1999). Nuclear phospholipids in human lymphocytes activated by phytohemagglutinin. *European journal of cell biology*, 78(6), 416-423.

- Frey, M.R., A.D. Bailey, A.M. Weiner y A.G. Matera (1999). Association of snRNA genes with coiled bodies is mediated by nascent snRNA transcripts. *Curr Biol*, 9(3), 126-135.
- Fritzsche, M. y G. Charras (2015). Dissecting protein reaction dynamics in living cells by fluorescence recovery after photobleaching. *Nature Protocols*, 10(5), 660-680.
- Gall, J.G. (2000). Cajal Bodies: The First 100 Years. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 273 - 300.
- Gall, J.G. (2001). A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. *FEBS Letters*, 498(2-3), 164-167.
- Gall, J. G. (2003). The centennial of the Cajal body. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(12), 975-980.
- Gall, J. G., M. Bellini, Z. Wu, y C. Murphy (1999). Assembly of the Nuclear Transcription and Processing Machinery: Cajal Bodies (Coiled Bodies) and Transcriptosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 4385 - 4402.
- Ganot, P., B.E. Jady, M.L. Bortolin, X. Darzacq y T. Kiss (1999). Nucleolar Factors Direct the 2'-O-Ribose Methylation and Pseudouridylation of U6 Spliceosomal RNA. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), 6906-6917.
- Gasser, S.M. (2002). Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science*, 296(5572), 1412-1416.
- Gautier, T., N. Fomproix, C. Masson, M.C. Azum-Gelade, N. Gas y D. Hernandez-Verdun (1994). Fate of specific nucleolar perichromosomal proteins during mitosis: cellular distribution and association with U3 snoRNA. *Biol Cell*, 82(2-3), 81-93.
- George, E.F., M.A. Hall y G.J.D. Klerk (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3rd ed. Vol. 1). Netherlands: Springer.
- Ghosh, S., R. Ghosh, P. Das y D. Chattopadhyay (2001). Expression and purification of recombinant Giardia fibrillarin and its interaction with small nuclear RNAs. *Protein Expr Purif*, 21(1), 40-48.

- Ginisty, H., F. Amalric y P. Bouvet (1998). Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *Embo J*, 17(5), 1476-1486.
- Goessens, G. (1984). Nucleolar structure. *Int Rev Cytol*, 87, 107-158.
- Grande, M.A., I. van der Kraan, L. de Jong y R. van Driel (1997). Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J Cell Sci*, 110(Pt 15), 1781-1791.
- Guarente, L. (2000). Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev*, 14(9), 1021-1026.
- Hadjiolov, A.A. (1985). *The nucleolus and ribosome biogenesis*: Springer-Verlag.
- Handwerger, K.E., J.A. Cordero y J.G. Gall (2005). Cajal Bodies, Nucleoli, and Speckles in the *Xenopus* Oocyte Nucleus Have a Low-Density, Sponge-like Structure. *Molecular Biology of the Cell*, 16(1), 202-211.
- Harris, H. (1999). *The Birth of the Cell*: Yale University Press, New Heaven.
- Hebert, M.D. y A.G. Matera (2000). Self-association of coilin reveals a common theme in nuclear body localization. *Mol Biol Cell*, 11(12), 4159-4171.
- Hernandez-Verdun, D. (1991). The nucleolus today. *J Cell Sci*, 99(Pt 3), 465-471.
- Huang, S. (2000). Review: perinucleolar structures. *J Struct Biol*, 129(2-3), 233-240.
- Huang, S., T.J. Deerinck, M.H. Ellisman y D.L. Spector (1997). The Dynamic Organization of the Perinucleolar Compartment in the Cell Nucleus. *The Journal of Cell Biology*, 137(5), 965-974.
- Huang, S., T.J. Deerinck, M.H. Ellisman y D.L. Spector (1998). The perinucleolar compartment and transcription. *J Cell Biol*, 143(1), 35-47.
- Isaac, C., Y. Yang y U.T. Meier (1998). Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *J Cell Biol*, 142(2), 319-329.

- Jackson, D. A., F.J. Iborra, E.M. Manders, y P.R Cook (1998). Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Mol Biol Cell*, 9(6), 1523-1536.
- Janicki, S.M., y D.L. Spector (2003). Nuclear choreography: interpretations from living cells. *Curr Opin Cell Biol*, 15(2), 149-157.
- Jarrous, N., J.S. Wolenski, D. Wesolowski, C. Lee, y S. Altman (1999). Localization in the Nucleolus and Coiled Bodies of Protein Subunits of the Ribonucleoprotein Ribonuclease P. *The Journal of Cell Biology*, 146(3), 559-572.
- Jimenez-Garcia, L.F., L.I. Rothblum, H. Busch, y R.L. Ochs (1989). Nucleologenesis: use of non-isotopic in situ hybridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. *Biol Cell*, 65(3), 239-246.
- Jones, K.W., K. Gorzynski, C.M. Hales, U. Fischer, F. Badbanchi, R.M. Terns, y M.P. Terns (2001). Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Biol Chem*, 276(42), 38645-38651.
- Junera, H.R., C. Masson, G. Geraud, y D. Hernandez-Verdun (1995). The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *J Cell Sci*, 108(Pt 11), 3427-3441.
- Kim, S. H., S. MacFarlane, N.O. Kalinina, D.V. Rakitina, E.V. Ryabov, T. Gillespie y M. Taliany (2007). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(26), 11115-11120. doi:10.1073/pnas.0704632104
- Lamond, A.I. y W.C. Earnshaw (1998). Structure and Function in the Nucleus. *Science*, 280(5363), 547-553.
- Lamond, A.I. y J.E. Sleeman (2003). Nuclear substructure and dynamics. *Curr Biol*,

13(21), R825-828.

- Lapeyre, B., P. Mariottini, C. Mathieu, P. Ferrer, F. Amaldi, F. Amalric y M. Caizergues-Ferrer (1990). Molecular cloning of *Xenopus* fibrillarin, a conserved U3 small nuclear ribonucleoprotein recognized by antisera from humans with autoimmune disease. *Mol Cell Biol*, 10(1), 430-434.
- Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp y A. Kenworthy (2001). Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(6), 444-456.
- Loyola-Vargas, V. M. y F. Vazquez-Flota (2006). *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey. pp. 393.
- Loza-Muller, L., U. Rodríguez-Corona, M. Sobol, L.C. Rodríguez-Zapata, P. Hozak, y E. Castaño (2015). Fibrillarin methylates H2A in RNA polymerase I trans-active promoters in *Brassica oleracea*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 976.
- Matera, A.G. y M.R. Frey (1998). Coiled bodies and gems: Janus or gemini? *American Journal of Human Genetics*, 63(2), 317-321.
- Matera, A.G., M.R. Frey, K. Margelot y S.L. Wolin (1995). A perinucleolar compartment contains several RNA polymerase III transcripts as well as the polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I. *J Cell Biol*, 129(5), 1181-1193.
- Matera, A.G., y K.B. Shpargel (2006). Pumping RNA: nuclear bodybuilding along the RNP pipeline. *Curr Opin Cell Biol*, 18(3), 317-324.
- Matera, G. (1999). Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends in Cell Biology*, 9, 302-309.
- Maul, G.G., D. Negorev, P. Bell y A.M. Ishov (2000). Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol*, 129(2-3), 278-287.
- Misteli, T. (2001). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science*, 291(5505), 843-847.

- Mohamad, N. y M. Boden (2010). The proteins of intra-nuclear bodies: a data-driven analysis of sequence, interaction and expression. *BMC Syst Biol*, 4(44), 1752-0509.
- Moir, R.D., M. Yoon, S. Khuon, y R.D. Goldman (2000). Nuclear Lamins a and B1: Different Pathways of Assembly during Nuclear Envelope Formation in Living Cells. *The Journal of Cell Biology*, 151(6), 1155-1168.
- Morency, E., M. Sabra, F. Catez, P. Texier y P. Lomonte (2007). A novel cell response triggered by interphase centromere structural instability. *The Journal of Cell Biology*, 177(5), 757-768. doi:10.1083/jcb.200612107
- Mustafa, N. R., W. de Winter, F. van Iren y R. Verpoorte (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat Protoc*, 6(6), 715-742.
- Nagata, K. y K. Takeyasu (2007). *Nuclear Dynamics. Molecular Biology and Visualization of the Nucleus*. Springer. Japón. pp. 292.
- Nicol, R. L., N. Frey y E.N. Olson (2000). From the sarcomere to the nucleus: role of genetics and signaling in structural heart disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 1, 179-223.
- Ochs, R. L., M.A. Lischwe, W.H. Spohn y H. Busch (1985). Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell*, 54(2), 123-133.
- Olson, M.O. y M. Dundr (2005). The moving parts of the nucleolus. *Histochem Cell Biol*, 123(3), 203-216.
- Olson, M.O., M. Dundr y A. Szebeni (2000). The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol*, 10(5), 189-196.
- Olson, M.O.J. (2001). *Nucleolus: Structure and Function eLS*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Olson, M.O.J. y M. Dundr (2001). *Nucleolus: Structure and Function eLS*: John Wiley & Sons, Ltd.

- Parada, L. y T. Misteli (2002). Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol*, 12(9), 425-432.
- Pena, E., M.T. Berciano, R. Fernandez, J.L. Ojeda y M. Lafarg (2001). Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J Comp Neurol*, 430(2), 250-263.
- Phair, R.D. y T. Misteli (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 404(6778), 604-609.
- Pih, K.T., M.J. Yi, Y.S. Liang, B.J. Shin, M.J. Cho, I. Hwang y D. Son (2000). Molecular Cloning and Targeting of a Fibrillarin Homolog from Arabidopsis1. *Plant Physiology*, 123, 51–58.
- Platani, M., I. Goldberg, A.I. Lamond, y J.R. Swedlow (2002). Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat Cell Biol*, 4(7), 502-508.
- Platani, M., I. Goldberg, J.R. Swedlow y A.I. Lamond (2000). In Vivo Analysis of Cajal Body Movement, Separation, and Joining in Live Human Cells. *The Journal of Cell Biology*, 151, 1561-1574.
- Politz, J. C., L.B. Lewandowski y T. Pederson (2002). Signal recognition particle RNA localization within the nucleolus differs from the classical sites of ribosome synthesis. *The Journal of Cell Biology*, 159(3), 411-418.
- Pombo, A., P. Cuello, W. Schul, J.B. Yoon, R.G. Roeder, P.R. Cook y S. Murphy (1998). Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF, Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle. *Embo J*, 17(6), 1768-1778.
- Puvion-Dutilleul, F. (1991). Simultaneous detection of highly phosphorylated proteins and viral major DNA binding protein distribution in nuclei of adenovirus type 5-infected HeLa cells. *J Histochem Cytochem*, 39(5), 669-680.

- Puvion-Dutilleul, F., E. Puvion y J.P. Bachellerie (1997). Early stages of pre-rRNA formation within the nucleolar ultrastructure of mouse cells studied by in situ hybridization with a 5'ETS leader probe. *Chromosoma*, 105(7-8), 496-505.
- Rakitina, D. V., M. Taliany, J.W.S. Brown y N.O Kalinina (2011). Two RNA-binding sites in plant fibrillarin provide interactions with various RNA substrates. *Nucleic Acids Research*.
- Raska, I., L.E. Andrade, R.L. Ochs, E.K. Chan, C.M. Chang, G. Roos y E.M. Tan (1991). Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Experimental cell research*, 195(1), 27-37.
- Raska, I., R.L. Ochs, L.E. Andrade, E.K. Chan, R. Burlingame, C. Peebles y E.M. Tan (1990). Association between the nucleolus and the coiled body. *J Struct Biol*, 104(1-3), 120-127.
- Reichow, S.L., T. Hamma, A.R. Ferre-D'Amare y G. Varani (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res*, 35(5), 1452-1464.
- Reits, E.A.J. y J.J. Neefjes (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol*, 3(6), E145-E147.
- Rodriguez-Corona, U., M. Sobol, L.C. Rodriguez-Zapata, P. Hozak y E. Castano (2015). Fibrillarin from Archaea to human. *Biol Cell*, 107(6), 159-174. doi:10.1111/boc.201400077
- Saez-Vasquez, J., D. Caparros-Ruiz, F. Barneche y M. Echeverria (2004). A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro. *Mol Cell Biol*, 24(16), 7284-7297.
- Saurin, A.J., C. Shiels, J. Williamson, D.P. Satijn, A.P. Otte, D. Sheer y P.S. Freemont (1998). The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J Cell Biol*, 142(4), 887-898.

- Savino, T. M., J. Gébrane-Younès, J. De Mey, J.B. Sibarita y D. Hernandez-Verdun (2001). Nucleolar Assembly of the Rrna Processing Machinery in Living Cells. *The Journal of Cell Biology*, 153(5), 1097-1110.
- Scheer, U. y R. Hock (1999). Structure and function of the nucleolus. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(3), 385-390.
- Schmitz, M.L. y H. Herrmann (2008). Functional architecture of the cell nucleus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(11), 2041-2043.
- Schul, W., B. Groenhout, K. Koberna, Y. Takagaki, A. Jenny, E.M. Manders y L.de Jong (1996). The RNA 3' cleavage factors CstF 64 kDa and CPSF 100 kDa are concentrated in nuclear domains closely associated with coiled bodies and newly synthesized RNA. *The EMBO Journal*, 15(11), 2883-2892.
- Shaw, P.J. y J.W. Brown (2004). Plant nuclear bodies. *Curr Opin Plant Biol*, 7(6), 614-620.
- Sidebottom, E. y H. Harris (1969). The Role of the Nucleolus in the Transfer of RNA from Nucleus to Cytoplasm. *Journal of Cell Science*, 5(2), 351-364.
- Sleeman, J., C.E. Lyon, M. Platani, J.P. Kreivi y A.I. Lamond (1998). Dynamic interactions between splicing snRNPs, coiled bodies and nucleoli revealed using snRNP protein fusions to the green fluorescent protein. *Experimental cell research*, 243(2), 290-304.
- Sleeman, J.E., y A.I. Lamond (1999). Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Current Biology*, 9(19), 1065-1074.
- Sleeman, J.E., L. Trinkle-Mulcahy, A.R. Prescott, S.C. Ogg y A.I. Lamond (2003). Cajal body proteins SMN and Coilin show differential dynamic behaviour in vivo. *Journal of Cell Science*, 116, 2039-2050.
- Smith, K.P., K.C.Carter, C.V. Johnson y J.B. Lawrence (1995). U2 and U1 snRNA gene

- loci associate with coiled bodies. *Journal of Cellular Biochemistry*, 59(4), 473-485.
- Snaar, S., K. Wiesmeijer, A.G. Jochemsen, H.J. Tanke y R.W. Dirks (2000). Mutational Analysis of Fibrillarin and Its Mobility in Living Human Cells. *The Journal of Cell Biology*, 151, 653-662.
- Sobol, M., S. Yildirim, V.V. Philimonenko, P. Maráček, E. Castaño y P. Hozák (2013). UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity. *Nucleus*, 4(6), 478-486.
- Spector, D.L. (1993). MACROMOLECULAR DOMAINS WITHIN THE CELL-NUCLEUS. *Annual Review of Cell Biology*, 9, 265-315.
- Spector, D.L. y A.I. Lamond (2001). Nuclear Domains. *Journal of Cell Science*, 114, 2891-2893.
- Stoffler, D., B. Fahrenkrog y U. Aebi (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 11(3), 391-401.
- Street, H.E. (1973). *Plant Tissue and Cell Culture* (H. E. Street Ed. Vol. 11). Great Britain: University of California Press.
- Terns, M. P. y J.E. Dahlberg (1994). Retention and 5' cap trimethylation of U3 snRNA in the nucleus. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5161), 959-961.
- Tsai, R.Y. y R.D. McKay (2005). A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol*, 168(2), 179-184.
- Vann, L.R., F.B. Wooding, R.F. Irvine y N. Divecha (1997). Metabolism and possible compartmentalization of inositol lipids in isolated rat-liver nuclei. *Biochem J*, 327(Pt 2), 569-576.
- Vazquez, J., A.S. Belmont y J.W. Sedat (2001). Multiple regimes of constrained chromosome motion are regulated in the interphase *Drosophila* nucleus. *Curr Biol*, 11(16), 1227-1239.

- Visintin, R. y A. Amon (2000). The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(3), 372-377.
- Wang, H., D. Boisvert, K.K. Kim, R. Kim y S.H. Kim (2000). Crystal structure of a fibrillarin homologue from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution. *The EMBO Journal*, 19(3), 317-323.
- Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*, 24(11), 437-440.
- Warner, J.R., A. Kumar, S.A. Udem y R.S. Wu (1972). Ribosomal proteins and the assembly of ribosomes in eukaryotes. *Biochem J*, 129(3), 29P-30.
- Wei, T., H. Baiqu, L. Chunxiang y Z. Zhonghe (2003). In situ visualization of rDNA arrangement and its relationship with subnucleolar structural regions in *Allium sativum* cell nucleolus. *Journal of Cell Science*, 116(6), 1117-1125.
- Yildirim, S., E. Castaño, M. Sobol V.V. Philimonenko, R. Dzajak, T. Venit y P. Hozak (2013). Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in RNA polymerase I transcription. *J Cell Sci*, 126(Pt 12), 2730-2739.
- Zhang, L., J. Lin y K. Ye (2013). Structural and functional analysis of the U3 snoRNA binding protein Rrp9. *Rna*, 19(5), 701-711.