

T - proc - 21/109

T
16
45

Organización Estructural y Regulación de la Expresión de los Cistrones Ribosómicos

Por

Federico Zurita Martínez

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 19-1-98
ENTRADA NUM. 108

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 014681495
Nº Copia 121231072

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada

1997

UNIVERSIDAD DE GRANADA
26 DIC. 1997
COMISION DE DOCTORADO

Organización Estructural y Regulación de la Expresión de los Cistrones Ribosómicos

Por

Federico Zurita Martínez

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada

--1997--



Organización Estructural y Regulación de la Expresión de los Cistrones Ribosómicos

Por

Federico Zurita Martínez

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada

--1997--

Organización Estructural y Regulación de la Expresión de los Cistrones Ribosómicos

Dirigida por:



Fdo. Rafael Díaz de la
Guardia Guerrero



Fdo. Miguel Burgos Poyatos

Memoria que, para aspirar al grado de Doctor en Ciencias, presenta el licenciado D. Federico Zurita Martínez. Departamento de Genética, Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

Granada, 26 de diciembre de 1997.



Fdo. Federico Zurita Martínez

Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada

--1997--


Parte de los resultados de esta tesis han sido presentados a las **XXIX Jornadas de Genética Luso-Españolas**, celebradas en Lérida en octubre de 1994, y publicados en la revista **Heredity** (Zurita, F., Sánchez, A., Burgos, M., Jiménez, R., Díaz de la Guardia, R. 1997. Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and in situ hybridization. *Heredity* **78**, 229-234). Otros han sido enviados para su publicación a la revista **Journal of Cell Science**.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los Dres. R. Díaz de la Guardia y M. Burgos Poyatos por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo. Su labor como directores ha sido perfecta. Su amistad ha supuesto una motivación.

Al Dr. Rafael Jiménez Medina por los innumerables consejos y sugerencias que han sido imprescindibles para que esta Tesis pudiera llegar a buen puerto. Pero sobre todo por el referente que ha significado para mí su extraordinaria valía humana y científica.

A mi compañera Saida Stitou, porque, aunque siempre tuviera ocupados los vasos de precipitado y las probetas, ha hecho mucho más llevaderos los momentos difíciles que han surgido en estos años.

A Sebastián Cuadros Plata, por su apoyo y amistad.

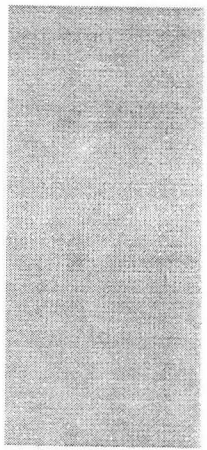
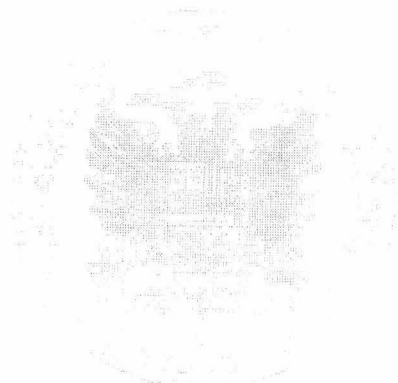
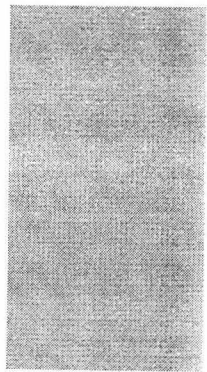


A la memoria de mi padre, del que tanto aprendí
A mi familia
Pero, sobre todo, a Geli

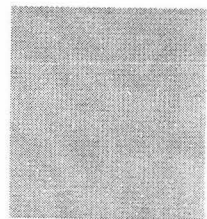
ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
LOCALIZACIÓN DE LAS REGIONES CROMOSÓMICAS RESPONSABLES DE LA FORMACIÓN DEL NUCLEOLO. (REGIONES NOR).	4
ESTRUCTURA DE LOS GENES RIBOSÓMICOS	6
EL PROMOTOR DE LOS GENES RIBOSÓMICOS	11
TRANSCRIPCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS RRNAS	12
TERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN	14
REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN	16
PROCESAMIENTO DE LOS RRNAS	18
VARIABILIDAD EN EL NÚMERO DE COPIAS DE LOS GENES RIBOSÓMICOS	19
VISUALIZACIÓN DE LAS REGIONES NORS.	22
VARIABILIDAD EN EL TAMAÑO Y NÚMERO DE LAS NORS MITÓTICAS.	25
RELACIÓN ENTRE CONSTRICCIONES SECUNDARIAS Y TINCIÓN CON PLATA	26
COMPETENCIA NUCLEOLAR	28
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y METODOS	37
OBTENCIÓN DE PLACAS METAFÁSICAS	37
TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA	41
<i>Destinción de las preparaciones previamente teñidas con NO₃Ag.</i>	42
HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	43
<i>Sonda utilizada para la hibridación.</i>	43

<i>Obtención de bacterias competentes</i>	43
<i>Transformación de las bacterias con el plásmido que contiene la sonda</i>	44
<i>Preparación de ADN plasmídico a pequeña escala</i>	45
<i>Marcaje de la sonda</i>	47
<i>Precipitación del ADN_r marcado</i>	49
<i>Comprobación de la eficacia de marcado (Dot blot)</i>	50
<i>Hibridación</i>	51
TINCIÓN SIMULTÁNEA NOR-BANDAS G.-	53
MÉTODOS ESTADÍSTICOS	54
RESULTADOS	55
ESTUDIO DE NORS HOMÓLOGAS EN <i>T. OCCIDENTALIS</i> MEDIANTE TINCIÓN ARGÉNTICA E HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	55
<i>Estudio paralelo</i>	56
<i>Estudio secuencial</i>	59
ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE TAMAÑOS ENTRE LAS SEÑALES AG E HIS	64
ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CONSTRICCIÓN SECUNDARIA Y SEÑAL HIS	71
ESTUDIO DE NORS HOMÓLOGAS Y NO HOMÓLOGAS EN <i>E. QUERCINUS</i> MEDIANTE TINCIÓN ARGÉNTICA E HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	72
DISCUSION	87
Conclusiones	107
Apéndice de datos	110
BIBLIOGRAFIA	118



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Fontana (1781) fue el primer autor que describió unos cuerpos oviformes, dentro de los núcleos de las células epidérmicas que observaba con el microscopio. Valentin (1836) introdujo el término nucleolo para referirse a esas estructuras densas, esféricas y constantes que se localizan en el interior de los núcleos. Al ser la estructura más patente de los núcleos de células no mitóticas, los estudios fueron tan numerosos que una revisión de Montgomery del año 1899 citaba ya 700 referencias.

Heitz (1931) y Barbara McClintock (1934), relacionan regiones cromosómicas concretas con el desarrollo del nucleolo, llamando a esas regiones organizadores nucleolares. Este concepto general, formulado hace más de sesenta años, sigue vigente hoy día: una región organizadora del nucleolo (NOR) es una región cromosómica específica, responsable de la formación del nucleolo en interfase. Quince años después, Caspersson (1950) relacionó el tamaño del nucleolo con los niveles de síntesis de RNA y proteínas, lo que constituyó una de las primeras observaciones sobre la citofisiología del nucleolo. Unos treinta años después del histórico trabajo de Barbara McClintock, Perry (1962), aportó las primeras pruebas de que en los nucleolos tiene lugar la síntesis de los rRNA irradiándolos con luz ultravioleta. Actualmente la definición de Heitz y McClintock puede ser

especificada en términos moleculares, diciendo que las NOR son las regiones cromosómicas que contienen los rDNA (Perry, 1962).

Wellauer y Dawid (1974) demostraron que los nucleolos son los orgánulos donde se lleva a cabo el procesamiento de los pre-RNA y el ensamblaje de los ribosomas.

Localización de las regiones cromosómicas responsables de la formación del nucleolo. (Regiones NOR).

En 1964, Ferguson-Smith localizó la región concreta de los cromosomas humanos responsable de la formación del nucleolo estudiando espermatocitos en estadio de paquitene. Un año más tarde, Rittosa y Spiegelman (1965) demostraron que el organizador nucleolar del cromosoma X *de Drosophila melanogaster* contiene el DNA complementario del rRNA.

En los cromosomas metafásicos de la mayoría de los organismos, estas regiones organizadoras del nucleolo, se visualizan como una especie de interrupciones o "gap", a las que se denominó constricciones secundarias (Heitz, 1931; McClintock, 1934), presentes en una o varias parejas de cromosomas. Estas constricciones secundarias, cuando son visibles, se corresponden con zonas del cromosoma donde la cromatina está descondensada. De hecho, en especies que presentan un único par de

constricciones secundarias, lo que supone un carácter primitivo del cariotipo, son éstas el lugar donde se forma el nucleolo.

El análisis ultraestructural de los nucleolos interfásicos (Goessens, 1984) de células de mamífero evidencia que éstos poseen tres subestructuras que, de acuerdo con su aspecto al microscopio electrónico se han denominado:

a) Centros fibrilares (CFs): contienen los rDNA (como se pone de manifiesto mediante hibridación in situ con sondas de rDNA), la RNA pol I y la topoisomerasa I (que se ponen de manifiesto con anticuerpos monoclonales). De esta manera, es muy probable que sea en los centros fibrilares donde se sintetiza el pre-rRNA o transcrito primario (Mierre y Stahl, 1978).

b) Componente fibrilar denso (CFD): en esta estructura se ha puesto de manifiesto la presencia de fibrilarina, una proteína asociada con la ribonucleoproteína nuclear pequeña U3, que se requiere en una etapa temprana del procesamiento del pre-RNA (Kass y Sollner-Webb, 1990).

c) Componente granular (CG): contiene las partículas precursoras de los ribosomas, en estadios tardíos de maduración, antes de ser exportados al citoplasma.

El nucleolo presenta una apariencia distinta a través de las sucesivas etapas del ciclo celular. Es muy prominente en la interfase, empieza a desaparecer cuando los cromosomas comienzan a condensarse y reaparece en la telofase.

Resumiendo, la NOR es por definición la región del cromosoma que contiene los genes responsables de la síntesis de las moléculas de rRNA, y el nucleolo es una estructura que contiene a esta región cromosómica, además del material acumulado alrededor de la NOR, principalmente el rRNA y sus precursores, así como las proteínas ribosómicas (Warner, 1979; Jordan, 1987).

Estructura de los genes ribosómicos

Son genes que se encuentran repetidos en un rango que oscila entre las 100 y las 5000 copias por genoma haploide en la mayoría de las especies eucariotas estudiadas (Long, 1980). No obstante, se han descrito especies en las que el número de repeticiones de genes rRNA es inferior a 100, y otras en las que es superior a 5000. Estos genes se localizan en unas agrupaciones o nichos ("clusters") donde las unidades de transcripción están organizadas en tándem (una a continuación de otra). Durante la interfase, estas regiones NORs están contenidas dentro de los nucleolos.

A principios de los años 60 Yankofsky y Spiegelman (1962) inmovilizaron DNA desnaturalizado en una membrana de nitrocelulosa e incubaron dicha membrana con rRNA marcado radiactivamente, con lo que consiguieron medir la cantidad de rDNA complementario al rRNA, constituido por dos componentes, el 18S y el 28S. Gillespie y Spiegelman (1965)

mejoraron la técnica eliminando el RNA no unido, mediante sucesivos lavados, con lo que la estimación del número de genes fue más exacta. Los estudios para estimar el número de copias fueron muy numerosos a partir de entonces (Buongiorno-Nardelli y col., 1972; Hsu y col., 1975).

Los genes ribosómicos presentan por tanto el fenómeno denominado repetición de dosis, al igual que los genes que codifican las histonas, esto es, genes que se presentan en muchas copias por núcleo. Parece probable que en el transcurso de la evolución de los eucariotas, y debido a la mayor masa celular que contienen con respecto a procariotas, se requerirían grandes cantidades de ciertos productos génicos, particularmente aquellos que desempeñan funciones estructurales. Esta mayor demanda de producto génico sólo se podría satisfacer por incremento en número, de esos genes particulares, ya que una única copia no sería suficiente para producirlo en el tiempo apropiado. Como ejemplo de lo dicho, la amplificación del rDNA en oocitos de *Xenopus* (Brown y Dawid., 1968), representa un mecanismo especializado que permite la producción de una suficiente cantidad de un determinado producto génico satisfaciendo así un requerimiento fisiológico particular. Quizás, la característica más extraordinaria de los genes redundantes es su organización en nichos o agrupaciones. Esta organización característica, que persiste a través de la escala filogenética, probablemente confiera ciertas ventajas evolutivas como puede ser la regulación más fácil de la expresión.

Los genes rDNA han jugado un papel central en la historia de la Biología Molecular. Por ser genes que se encuentran tan altamente repetidos y tan activamente transcritos su patrón básico de organización y la producción de rRNA pudieron ser descritos antes incluso de la llegada de la tecnología del DNA recombinante.

Los genes rDNA de *Xenopus* fueron los primeros en ser aislados (Birnstiel y col., 1968) y clonados (Morrow y col., 1974). También fueron los primeros en los que la actividad transcripcional fue visualizada al microscopio electrónico, observándose los rDNA como hebras largas y continuas de las que transversalmente salían los transcritos nacientes, dándole al conjunto un aspecto de "árbol de navidad" (Miller y Beatty, 1969).

Los genes 18S y 28S fueron los primeros en ser descritos (Yankofsky y Spiegelman, 1962). Ya Pène y col. en 1968 habían sugerido que el rRNA 5.8S y el rRNA 28S eran transcritos como parte de la misma molécula precursora en células de la línea HeLa. Estudios posteriores (Birnstiel y col. 1972; Clarkson y col. 1973) establecieron que las frecuencias de reiteración entre los 5.8S y los 28S eran similares. Esos descubrimientos indicaban que el rRNA 5.8S se formaba en cantidades equimoleculares con el 18S y el 28S. En 1974 Speir y Birnstiel localizaron el rRNA 5.8S entre el 18S y el 28S en *X. laevis*. La unidad de transcripción incluye por tanto el gen pre-rRNA, que contiene las secuencias codificantes para los tres rRNA (18S, 5.8S, y 28S, en este orden) y un espaciador que separa esta unidad de transcripción de la

siguiente. Las unidades repetidas presentan una polaridad cabeza a cola en los genomas de casi todos los organismos, aunque existe una ordenación excepcional en el rDNA de *Acetabularia exigua* (Berger y col.,1978) donde alternan unidades de transcripción con configuración cabeza a cola y cola a cola. Las tres secuencias codificantes que forman la unidad de transcripción están flanqueadas y separadas por unos segmentos denominados espaciadores transcritos, externos e internos respectivamente cuyas secuencias varían de unas especies a otras. La región comprendida entre las unidades de transcripción repetidas puede variar en longitud, desde unas pocas, hasta cerca de 30 Kb, y fue denominada espaciador no transcrito (NTS). Este nombre obedece al hecho de que, aparentemente, estas regiones no se transcribían ya que al microscopio electrónico se observaron interrupciones entre unidades de transcripción consecutivas (Miller, 1969).

Se pensó que estos espaciadores podrían estar implicados en la recombinación, reparación y evolución de las familias de genes ribosómicos (Fedoroff, 1979). Actualmente se sabe, no sólo que estas regiones espaciadoras sí son transcritas, aunque el transcrito es tan corto que no se observaba al microscopio electrónico, sino que la transcripción de esta región es esencial para la regulación de la expresión del rDNA. Por ello actualmente se les denomina espaciadores intergénicos (IGS), regiones muy poco conservadas entre las distintas especies. (Fig. 1).



Figura 1.- Estructura de los genes ribosómicos

Estos espaciadores intergénicos contienen unos promotores que flanquean y transcriben unas secuencias intensificadoras de la transcripción ("enhancers") que terminan unas 60 pb antes del siguiente gen (McStay y Reeder, 1990). En su extremo 3' el espaciador es colindante con el promotor de la unidad siguiente y en su extremo 5' con la señal de terminación de la transcripción de la unidad que le precede. Aunque todos los promotores localizados en los espaciadores son potencialmente activos, cuando se inicia la transcripción en alguno de ellos el espaciador se comporta como una única unidad de transcripción, ya que el inicio de la transcripción en un promotor, silencia los promotores situados hacia su extremo 3'. Se han descrito elementos intensificadores a más de 250 pb hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción en el rDNA humano (Smale y Tjian, 1985) y ratón (Sollner-Webb y Tower, 1986). Estas secuencias también aumentan varias veces los niveles de transcripción in vivo. De lo anteriormente expuesto, se concluye que en realidad se trata de dos unidades de transcripción por cada unidad repetida, una unidad de transcripción que incluye la región codificante de los tres rRNA, y otra que incluye el espaciador intergénico que contiene las secuencias intensificadoras.

La unidad de transcripción del pre-rRNA tiene un tamaño aproximado de 8 kb en levaduras, *Drosophila* y ranas, pero es más larga en aves (10.5 kb) y aún más larga en mamíferos (13 kb). En algunos casos, la unidad repetida también codifica el rRNA 5S, sintetizado por la RNA pol III, pero en general el pre-rRNA y los genes 5S de eucariotas no están ligados.

El promotor de los genes ribosómicos

Para determinar la extensión del promotor de los genes ribosómicos (la región que se une a la RNA pol I) se construyeron series de mutantes de delección en dirección de 5'-3' utilizando rDNA de distintas especies: *Xenopus* (Moss, 1982), ratón (Grummt, 1982), humanos (Learned y col., 1983), *Drosophila* (Kohorn y Rae, 1983) *Acanthamoeba* (Iida y col., 1985). Los datos acumulados de los estudios en esas especies, sugieren un modelo general para la estructura del promotor de los genes ribosómicos que permite unificar resultados: existe un "dominio proximal del promotor" contenido dentro de la región que se extiende desde 40 nucleótidos antes del primer transcrito (-40) hasta aproximadamente 5 después del mismo (posición +5), y que une productivamente los factores de transcripción necesarios, siendo suficiente para una iniciación eficiente de la transcripción en la mayoría de las reacciones optimizadas in vitro. Además, existe en el promotor un dominio

que se extiende en dirección 5' hasta aproximadamente el nucleótido -120. Mutaciones puntuales inducidas en rDNA de *Xenopus*, humano y ratón (ver revisión de Sollner-Webb y Tower, 1986) han puesto de manifiesto que las regiones comprendidas entre los nucleótidos -150 y -110 y entre los -40 y +10, provocan un decremento considerable en los niveles de transcripción, mientras que mutaciones en el segmento comprendido entre esas dos regiones tienen efectos menos drásticos. Estos datos sugieren que los dominios "proximal" y "aguas arriba" hacia 5' están separados por una región donde la secuencia tiene menos importancia. De un total de 60 posiciones examinadas, solamente cambios en las posiciones -7, -16, y -25 reducen la actividad transcripcional. Esta estructura es coherente con un modelo en el que los factores de transcripción reconocen el dominio principal del promotor solo en una de las caras de la hélice del rDNA (Kishimoto y col., 1985).

Transcripción y procesamiento de los rRNAs

Franze-Fernandez, y Fontanive-Senguesa (1973) y Hastie y Mahy (1973) descubrieron, en distintas especies, una localización nucleolar preferencial de una RNA pol resistente a la toxina fúngica alfa amanitina, sugiriendo que éste enzima es el responsable de la síntesis de rRNA. Posteriormente, a este enzima se le denominó RNA pol I. Esta numeración se

refiere al orden en el que se produce la elución de cada proteína cuando se cromatografía un extracto nuclear en una columna de intercambio iónico al ir aumentando la fuerza iónica del tampón de elución.

La transcripción de los genes ribosómicos, actualmente denominados genes de clase I, es la única función conocida de la RNA pol I (Chambon, 1975) y, a diferencia de la transcripción que llevan a cabo las RNA pol II y III, la transcripción de los genes de clase I no se ve afectada por la presencia de la toxina alfa amanitina.

El tamaño aproximado del enzima es de 500.000 daltons y está formado por dos subunidades grandes, que forman el núcleo o "armazón" del enzima, y de ocho a doce subunidades pequeñas, tres de ellas comunes a las tres polimerasas. Sólo este enzima, es capaz de catalizar la transcripción de los agrupamientos de los genes rDNA. Este enzima está asociado a los nucleolos, y sólo puede ser aislado a partir de ellos, a diferencia de las polimerasas II y III que tienen localización nucleoplásmica.

El primer gen clonado de rDNA que dió evidencias directas de una transcripción correcta fue de *Xenopus laevis*. Trendelenburg y Gurdon (1978) microinyectaron una unidad repetida clonada de rDNA dentro del núcleo de oocitos de esta especie y analizaron la cromatina resultante a microscopio electrónico. Se detectaron plásmidos con unidades de transcripción de, aproximadamente, la misma longitud que las de los genes rDNA endógenos, lo que sugería que los genes rDNA clonados eran capaces de dirigir

completamente la transcripción.

La polaridad de la transcripción siempre se produce según el siguiente orden: extremo 5'-región no conservada-RNA 18S-región no conservada-RNA 5.8S-región no conservada-RNA 28S-extremo 3'. Esta polaridad es universal, incluyendo bacterias y la mayoría de los genes ribosómicos de los orgánulos, donde moléculas análogas sustituyen al 18S y al 28S. El genoma mitocondrial de levaduras constituye, por el momento, la única excepción, ya que los genes ribosómicos están separados por otros genes.

Terminación de la transcripción.

Se conoce la existencia de secuencias en el DNA que se unen a proteínas responsables de la terminación de la transcripción. Aunque el mecanismo preciso es desconocido, la terminación de la transcripción en los genes de clase I no se debe a un bloqueo único provocado por el complejo terminador-proteína de unión, sino que la terminación parece implicar una interacción específica entre la polimerasa y la proteína terminadora, ampliamente conservada desde el punto de vista evolutivo (desde levaduras hasta mamíferos) (Kuhn y col., 1990). En *Xenopus laevis* existe un único terminador en el extremo 3' de la región que codifica el precursor del rRNA. Sin embargo, este elemento contiene una mutación puntual que, aunque

permite la formación del extremo 3', impide que la polimerasa se libere, permitiéndole así seguir transcribiendo a través de los espaciadores intergénicos, hasta que encuentra un nuevo elemento de terminación, totalmente activo, localizado cerca del extremo 5' del promotor del siguiente gen (Reeder, 1990). En este sistema, la señal que indica la terminación de la transcripción está contenida en una secuencia de 18pb, muy conservada, denominada caja Sal I (Grummt y col., 1986). Aunque ésta es capaz de causar terminación de la transcripción por sí misma, la presencia de regiones ricas en T, antes y después, contribuye a una terminación más exacta, que tiene lugar generalmente dentro de un grupo de timinas que preceden a las cajas Sal I. La capacidad terminadora de la caja Sal I desaparece si se producen en ella pequeñas deleciones, inserciones, sustituciones, o si se invierte la secuencia. Es característico de las secuencias terminadoras tener una localización próxima al promotor de la siguiente unidad repetida. Si se eliminan o alteran estas secuencias terminadoras, se reduce en gran medida la transcripción a partir de la posición +1 del núcleo del promotor del siguiente gen, ya que éste es invadido por la polimerasa que avanza desde la unidad de transcripción anterior interrumpiendo o dañando la formación de complejos de transcripción estables. Se ha demostrado, en varios sistemas, que los promotores de la pol I pueden ser protegidos de este fenómeno si tienen una secuencia terminadora activa localizada cerca de su extremo 5'. Así, todos los vertebrados examinados tienen un terminador activo localizado

justo antes del promotor del gen siguiente. En la rana se ha demostrado que la interacción entre el terminador y la proteína terminadora unida a él, requiere el mantenimiento de un espacio preciso y específico entre la secuencia terminadora y el promotor siguiente, y se ha sugerido que esos dos elementos han evolucionado conjuntamente interactuando como un único complejo macromolecular.

Regulación de la transcripción

Morgan y col. (1983), observaron que en algunos individuos de *Xenopus laevis* era frecuente la iniciación de la transcripción en los espaciadores intergénicos. Confirmaron que estos sitios de iniciación de la transcripción corresponden a promotores "imperfectamente" duplicados, denominados islas Bam. Moss (1983) inyectó, en oocitos de *Xenopus*, moléculas de DNA recombinante que contenían diferentes cantidades de los, hasta entonces, denominados espaciadores no transcritos. Estos incluían de 0 a 2 copias de un segmento de 1 kb que contenía un promotor duplicado y una secuencia repetida de 60/81 pb (Fig. 2).

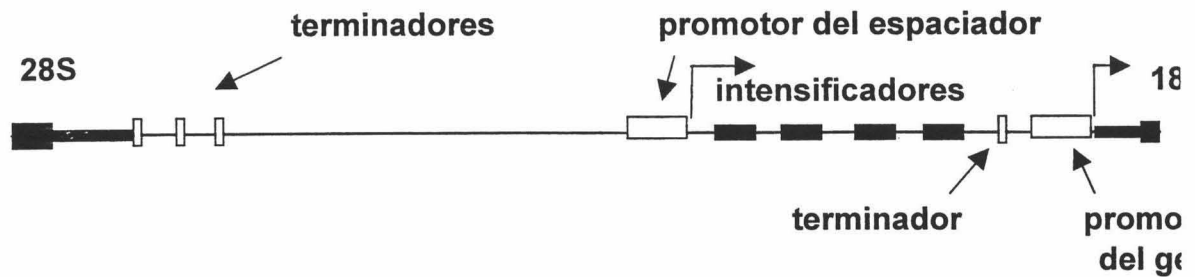


Figura 2.- Estructura del espaciador intergénico

Se observó que los genes con espaciadores largos se transcribieron 10 veces más que los genes con espaciadores pequeños. El efecto estimulador de esas regiones espaciadoras fue también descrito, en embriones de *Xenopus* microinyectados, por Busby y Reeder (1983). Hay datos que apoyan que esos elementos intensificadores repetidos de 60/81 pb pueden actuar uniendo, inicialmente, un factor de transcripción de la RNA pol I. Esta unión aumentaría seguidamente la unión de otros factores al dominio situado a continuación, hacia 3', favoreciendo un deslizamiento o una interacción cooperativa que acercaría estos factores al extremo 5' del promotor del siguiente gen (Mitchelson y Moss, 1987).

Se han aislado al menos dos factores que intervienen en la transcripción del rRNA humano. Uno de ellos, el UBF-1, activa la RNA pol I uniéndose a ambas regiones del promotor, proceso que es potenciado por la unión de un segundo factor, denominado SL-1, al UBF-1 (Reeder, 1989).

Procesamiento de los rRNAs

Este puede ser visto como un proceso similar al procesamiento del mRNA ya que ambos implican la eliminación de secuencias, incluyendo intrones y fragmentos de ambos extremos, tanto el 5' (secuencias "leader") como del 3' (secuencias "trailer"), y ambos procesamientos parecen estar dirigidos por snRNPs (ribonucleoproteínas nucleares pequeñas). La diferencia está en que los exones del rRNA no se unen covalentemente entre sí, sino que funcionan en el ribosoma como RNAs inconexos unidos entre sí por proteínas ribosómicas.

El pre-rRNA o transcrito primario es un precursor de 35-47S (ó 6-15 Kb) que se procesa a través de una serie de digestiones endonucleotídicas (Perry, 1976) dando lugar a los rRNA maduros. El pre-rRNA comienza con un espaciador transcrito y se extiende a través de las regiones 18S, 5.8S y 28S cada una de las cuales está separada por segmentos adicionales de espaciadores transcritos. El pre-rRNA se acompleja con las proteínas ribosómicas inmediatamente después de su síntesis (Madan y col., 1982) , y es procesado, por una ribonucleasa, mediante seis cortes endonucleotídicos originando así los rRNA maduros 5.8S, 18S y 28S. Los segmentos correspondientes a las regiones espaciadoras no se acumulan debido a que son rápidamente digeridos. Las digestiones parecen ser extremadamente específicas, ya que no se ha encontrado una actividad exonucleotídica que sea

responsable de la producción de los extremos 5' y 3' de los rRNA maduros. El hecho de que los rRNA 5.8S, 18S y 28S sean producto de la digestión endonucleotídica de un único transcrito primario asegura que se formen en cantidades equimoleculares y que, por tanto, cada ribosoma contenga una sola molécula de cada uno de los tres rRNA generados al procesarse el pre-RNA.

Aunque, como hemos mencionado, la eliminación de las regiones espaciadoras de este transcrito primario no va acompañada, generalmente, del empalme de los fragmentos de rRNA, el pre-rRNA de *Tetrahymena* constituye una excepción, ya que sí contiene un verdadero intrón, de aproximadamente 400 nucleótidos, que se elimina de forma autocatalítica mediante un proceso de corte y empalme, dando lugar a otro pre-rRNA que sufre la ulterior fragmentación hasta dar lugar a los tres rRNA. Tras el procesamiento, el rRNA 5.8S se une por puentes de hidrógeno a una zona complementaria del rRNA 28S y es así como se presenta en los ribosomas.

Variabilidad en el número de copias de los genes ribosómicos

Birnstiel y col. (1971) observaron que, en general, el número de genes ribosómicos estaba correlacionado con el tamaño del genoma a través de la escala evolutiva. Sin embargo, se había observado una gran variación en el

número de genes rDNA, no sólo entre especies estrechamente relacionadas, sino también entre cepas de la misma especie, tal como se había descrito en *Drosophila melanogaster* (Ritosa, 1969). Además se han descrito diferencias interindividuales en el número de genes rDNA en una variedad de organismos como *Bufo marinus* (Miller y Brown, 1969), humanos (Evans y col., 1974), *Ambystoma mexicanum* (Sinclair y col., 1974), ratón (Henderson y col., 1976), *Rattus norvegicus* (Sasaki y col., 1986), *Salmo irideus* (Schmidtke, 1976), Quelonios (Bickham y Rogers, 1985), etc. Se empezó a pensar que el número de genes ribosómicos podría ser un rasgo polimórfico, que variaba entre individuos de la misma especie.

A pesar de esta gran variabilidad parecía evidente que el número de genes ribosómicos excedía el mínimo requerido para la viabilidad de la célula, al menos en *Drosophila* y en *Xenopus*.

Una situación particular se presenta en plantas, donde se pueden encontrar diferentes niveles de ploidía. En esta situación sería de esperar, por ejemplo, que una especie hexaploide tuviese tres veces más genes ribosómicos que otra diploide. Sin embargo cuando se comparan especies emparentadas filogenéticamente pero con diferentes ploidías, el número de genes rDNA no está correlacionado con el tamaño del genoma, probablemente por la pérdida de copias en las especies poliploides.

Distintas observaciones sugieren que los organismos eucariotas poseen mecanismos de control que mantienen constante el número normal de copias

y permiten alterar dicho número bajo ciertas condiciones. Se conocen numerosos casos de variación en el número de copias de genes ribosómicos, incluyendo los procesos que generan esas variaciones tanto en la línea somática como en la germinal. La alteración de esa redundancia puede originarse por mutaciones tales como intercambios desiguales, más frecuentes en el DNA repetitivo que en el DNA de copia única (Dover y Flavell, 1984) tanto entre cromátidas hermanas como entre cromátidas homólogas y no homólogas, o duplicaciones y deleciones que ocurran dentro de los clusters de rDNA. De hecho, la recombinación puede originar cambios estables y heredables en la redundancia del rDNA, como es el caso del intercambio desigual entre cromátidas hermanas, o la recombinación entre el X y el Y en *Drosophila* (Gillings y col., 1987) y la recombinación intracromosómica inducida por la mutación Rex. Otros procesos producen incrementos no heredables o cambios en la redundancia del rDNA somático.

Se consideran dos hipótesis que intentan explicar cómo se induce o permite la amplificación. Una de éstas hipótesis supone que la amplificación está mediada por una recombinación específica de rDNA, inducida por la deficiencia de rDNA. La otra se elaboró en *Drosophila* (Williams y col., 1990), y supone que la amplificación no depende del número de copias de rDNA presentes, sino de un proceso de recombinación general o de los sistemas de reparación, y se induce o permite gracias a la existencia de apareamientos mediados por el rDNA entre los cromosomas sexuales.

Visualización de las regiones NORs.

Actualmente, existen cuatro métodos que permiten poner de manifiesto las regiones organizadoras del nucleolo o regiones NORs, mediante métodos citológicos:

1) La asociación de una región cromosómica concreta con el nucleolo, durante las profases mitótica o meiótica.

2) La demostración de un grado significativo de asociación entre diferentes cromosomas metafásicos tratados con colchicina. En células humanas se conoce bien la asociación entre regiones satélite de los cinco pares de cromosomas acrocéntricos que son los portadores de NORs. Esta asociación no depende del hecho de que tales NORs sean terminales ya que también se observa en otros organismos en los que las NORs están localizadas intersticialmente, así como en translocaciones de cromosomas humanos donde las NORs han pasado a ser intersticiales.

3) En 1969 Pardue y Gall entre otros autores pusieron a punto una técnica de hibridación de ácidos nucleicos en la que la fase inmovilizada estaba constituida por el DNA de núcleos intactos, o de cromosomas enteros en preparaciones citológicas, que era hibridado con un RNA marcado radiactivamente, lo que permitía detectar los sitios de hibridación por autorradiografía. La técnica, denominada hibridación *in situ*, ha supuesto desde entonces una poderosa herramienta que combina la especificidad de la

reacción de hibridación con una localización citológica precisa.

La ventaja de esta técnica radica en que es lo suficientemente sensible como para detectar NORs que contienen bajo número de copias de rDNA, y en que pone de manifiesto todos los sitios NORs, tanto si han participado como si no, en la formación del nucleolo. Utilizando este método, se ha demostrado que son las constricciones secundarias las regiones que contienen los cistrones ribosómicos.

4) El cuarto y último método en orden cronológico, es la tinción con nitrato de plata (Goodpasture y Bloom, 1975; Howell y Black, 1980; Rufas y col., 1982). Bajo condiciones controladas, la plata se deposita solamente sobre las NORs. Las responsables de esta tinción selectiva son un conjunto de proteínas asociadas con los genes ribosómicos, y cuya cantidad está relacionada con la transcripción de dichos genes y/o la replicación celular. Esas proteínas, llamadas Ag-NORs, se definen como marcadores de genes ribosómicos activos en la interfase precedente (Miller y col., 1976; Howell, 1977, 1982; Hofgärtner y col., 1979). Tienen la capacidad de reducir la plata bajo condiciones ácidas en las que otras proteínas son incapaces de hacerlo (Howell y Black 1980). El interés por estas proteínas aumentó cuando se demostró que la transcripción de los genes ribosómicos dependía de las proteínas Ag-NOR (Miller y col., 1976). Por tanto la tinción positiva Ag-NOR en cromosomas metafásicos es un indicador de que sus genes ribosómicos se han transcrito en la interfase previa. La técnica de la tinción con plata no tiñe

la NOR cromosómica en sí misma, sino el material atrapado en esa región cromosómica que permanece como un residuo del nucleolo.

La afinidad específica de las proteínas Ag-NOR por la plata ha permitido incluso su localización ultraestructural en preparaciones de microscopio electrónico donde se observaron las unidades de transcripción ribosómicas. Estas se localizan en los centros fibrilares y en el componente fibrilar denso de los nucleolos de núcleos interfásicos y están excluidas del componente granular (Hernández-Verdún y col., 1980).

Identificación de las proteínas Ag-NOR: mediante experimentos de "Western blotting" se encontró que la nucleolina purificada es específicamente puesta de manifiesto por la tinción con nitrato de plata (Hernández-Verdún y Roussel, 1995). Utilizando diferentes fragmentos de nucleolina generados por digestion con CNBr y sobreexpresándolos en *E.coli*, estos autores demostraron que lo que confiere a la nucleolina su carácter argirófilo es el extremo aminoterminal. Los autores propusieron que la concentración de aminoácidos ácidos en esta región es la responsable de la tinción argéntica. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que polipéptidos poly L-glu son teñidos por la plata. Fueron identificadas proteínas Ag-NOR en distintos estadios del ciclo celular. Durante la interfase, la mayor parte de las proteínas Ag-NOR son nucleolina y proteína B-23, no implicadas en la transcripción, aunque también están presentes en la maquinaria transcripcional. Durante la mitosis, la mayoría de las proteínas Ag-NOR asociadas con los genes ribosómicos están implicadas

en la transcripción, tales como la subunidad mayor de la RNA pol I, la proteína NOR de 135 kDa, el factor de transcripción UBF y una proteína de 50 kDa. De esta manera, la mayoría de las proteínas asociadas al nucleolo durante la interfase, no son las mismas que las asociadas con los genes ribosómicos durante la mitosis. A pesar de ello, la hipótesis de que las NORs metafásicas teñidas con plata son aquellas que fueron transcripcionalmente activas en la interfase precedente, cobra validez por la naturaleza de las proteínas asociadas a las NORs mitóticas.

Variabilidad en el tamaño y número de las NORs mitóticas.

Hsu y col. (1975), sugirió que los organismos con una única pareja de cromosomas portadores de NORs, son más primitivos que aquellos cuyas NORs están dispersas sobre varios cromosomas. Schmid (1982) indicó que el número de parejas portadoras en vertebrados no mamíferos se restringe a una. Por otra parte, la variabilidad en el número de copias que contienen las NORs se manifiesta, citológicamente, por la presencia de heteromorfismo referido tanto al tamaño como al número de NOR que se pueden poner de manifiesto mediante hibridación *in situ*. La variabilidad interindividual, que afecta al tamaño y al número de NORs teñidas con plata, ha sido descrita en numerosas especies, e interpretada como la expresión de las distintas NORs

en la interfase previa (Schmid, 1982; Sánchez y col., 1989; Suzuki y col., 1990). Por otra parte, la variabilidad que se observa utilizando hibridación *in situ* con sondas de rDNA ha sido explicada por el distinto contenido en número de cistrones ribosómicos, (Wachtler y col., 1986; Suzuki y col., 1990; King y col., 1990, Leitch y Heslop-Harrison, 1992). Schubert y Künzel (1990) propusieron que el tamaño de la señal obtenida por hibridación *in situ* debería estar asociado con el tamaño de la señal de plata, sugiriendo que el número de copias podría estar relacionado con los niveles de expresión.

Relación entre constricciones secundarias y tinción con plata

Henderson (1972), localizó el rDNA en las cinco constricciones secundarias que contiene el complemento cromosómico humano mediante hibridación *in situ*, en 1974, Henderson y col. localizaron los genes ribosómicos en el cariotipo de ratón, y en 1975 Pardue y Hsu los localizaron en el cariotipo del ciervo indio. Asimismo, Czaker y Mayr (1982) establecieron que, en el cerdo doméstico, las NORs están estrechamente relacionadas con las constricciones secundarias de los cromosomas 8 y 10.

Durante la década de los 80 se mantuvo una intensa controversia sobre el significado biológico de la tinción con plata. Mientras que varios autores

defendían la existencia de una correlación directa entre la capacidad de las NORs para teñirse con plata y su nivel transcripcional durante la interfase previa (ver Hubbel, 1985), otros refutaban esta hipótesis basándose en estudios bioquímicos de inhibición de la síntesis de rRNA (Raman y Sperling, 1981; Goessens y Lepoint, 1982; Sánchez-Pina y col., 1984), o demostrando la ausencia de síntesis de rRNA en NORs metafásicos que, no obstante, mantenían la capacidad de teñirse (Hsu y col., 1965; Fan y Penman, 1971; Goessens y Lepoint, 1979; Fakan y Puvion, 1980; Mierre y Stahl, 1981; Risueño y col., 1982). Por otra parte, se demostró que la tinción con plata revela la existencia de cromatina NOR descondensada, que es transcripcionalmente inactiva aunque capaz de activarse (Sánchez-Pina y col., 1984; Medina y col., 1983). En 1988, Jiménez y col. abordaron este problema en dos especies de mamíferos *Talpa occidentalis* y *Eliomys quercinus* que poseen una y dos parejas, respectivamente, de NORs intersticiales. No encontraron constricciones secundarias condensadas que mostraran impregnación por plata, aunque las NORs descondensadas podían presentarlas o no. Concluyeron que el estado descondensado de la cromatina NOR era una condición necesaria, pero no suficiente, para la tinción con plata. La capacidad de una NOR determinada para teñirse, requería por tanto dos requisitos: el primero era evidentemente el estado descondensado de su cromatina; el segundo podría ser su actividad transcripcional en la interfase precedente del ciclo celular.

Competencia nucleolar

Este término fué introducido por Navashin (1934), tras sus estudios en células híbridas de *Crepis*.

Miller (1970), estudió la síntesis de rRNA en mutantes deficientes en cistrones ribosómicos de *Xenopus*, observando que se obtenían tasas transcripcionales normales incluso con la mitad de las copias que poseía el tipo salvaje, concluyendo que la actividad transcripcional por cistrón no era la máxima. Parecía evidente que *Xenopus* poseía un exceso en el número de genes ribosómicos sobre el mínimo requerido para la viabilidad celular. Por otra parte estudiando la síntesis de rRNA en la progenie híbrida de *X. laevis* por *X. mulleri*, Honjo y Reeder (1973) observaron que la expresión del rDNA de *X. laevis* era dominante sobre la de *X. mulleri*. Los autores propusieron dos mecanismos para explicar la expresión preferencial del rDNA de *X. laevis*:

a) Algún(os) producto(s) del rDNA de *Xenopus laevis* funcionarían como un represor de la transcripción del rDNA de *X. mulleri*.

b) El rDNA de *X. laevis* podría tener una afinidad más alta que el de *X. mulleri* por algún factor de transcripción que se encuentra en concentraciones limitantes.

En otro estudio Reeder y Roan (1984) analizaron la expresión del rDNA de *X. laevis* y *X. borealis* en oocitos microinyectados con rDNA de ambas especies y en híbridos interespecíficos demostrando que también aquí

dominaban los rDNA de *X. laevis*. En estadios tempranos del desarrollo de esos híbridos, la síntesis de rRNA a partir del rDNA de *X. borealis* estaba muy disminuida o era prácticamente ausente.

Macleod y Bird (1982), describieron que los genes rDNA de *X. laevis* en la descendencia híbrida obtenida de cruces entre *X. laevis* y *X. borealis*, están organizados en una conformación cromatínica que los hace más sensibles a la digestión por DNAasaI que los rDNA aportados por el progenitor de *X. borealis*. A partir de los datos obtenidos en *Xenopus*, Reeder (1984), propuso un modelo en el que los genes con más repeticiones en los espaciadores intergénicos competirían más eficientemente por algunos factores de transcripción, necesarios para su activación transcripcional, que estarían presentes en concentraciones limitantes. Esta sería la base de la competencia nucleolar, ya que los loci que secuestrarán la mayor parte, o todos, los factores de transcripción dejarían sin posibilidad de activación a los otros loci de la misma célula.

Por otra parte estudiando híbridos inter e intraespecíficos de plantas Reeder (1985) demostró que la dominancia de una NOR sobre otra dependía del incremento de secuencias intensificadoras localizadas en los espaciadores que preceden al promotor y/o los niveles de metilación entre ellos. Asimismo Flavell y col., (1988) estudiaron la metilación de citosinas en los genes ribosómicos del trigo, donde observaron que los organizadores nucleolares localizados en cromosomas distintos exhibían distintas actividades.

Propusieron que el patrón de metilación específico de un locus multigénico estaría influenciado por el número y tipo de genes rRNA presentes en otros loci de la célula. Un sitio CCGG localizado 164 pb hacia el extremo 5' del punto de iniciación de la transcripción, está hipometilado preferencialmente en algunos genes. Los loci dominantes, muy activos, tienen una alta proporción de genes rRNA con residuos de citosina hipometilados, en comparación con los loci recesivos e inactivos. Los autores concluyeron que la metilación de citosinas en el rDNA está sometida a regulación, y que el patrón de metilación está correlacionado con la actividad transcripcional potencial de un gen. Así, el DNA metilado se uniría a proteínas nucleares que secundariamente podrían dificultar la unión de los factores de transcripción y, por tanto, la activación del gen. Haciendo una disección molecular más precisa de los genes ribosómicos humanos, Brock y Bird (1997) han demostrado una clara asociación entre metilación y transcripción. Dentro de cada gen ribosómico, las zonas transcritas aparecen hipometiladas, mientras que las no transcritas están metiladas y separadas por fronteras nítidas de las anteriores.

Thompson y Flavell (1988) también demostraron que los genes ribosómicos dominantes de trigo se encuentran localizados en una conformación cromatínica que muestra más sensibilidad a la DNAasa I que otros genes rRNA. En el trigo, ocurría por tanto lo mismo que en *Xenopus*. Los datos experimentales mostraron que esos sitios sensibles a la DNAasa I no

estaban distribuidos al azar entre genes rRNA de distintos loci. La sensibilidad decrece en el orden 1U (introducido de *A. umbelata*)-1B-6B. La frecuencia de citosinas internas metiladas del tetranucleótido CCGG, en esos tres cromosomas sigue el mismo patrón, con los genes 1U conteniendo la proporción más alta de citosinas hipometiladas. Ya que la actividad de los diferentes loci, varía de la misma forma, los autores concluyeron que en un ambiente genético particular el locus más activo tiene más genes con lugares CCGG hipometilados una conformación cromatínica sensible a la DNAasa I. El cromosoma 1B es parcialmente dominante sobre el 6B a la hora de formar nucleolo, a pesar de tener aproximadamente la mitad del número de copias. Sin embargo, cuando el cromosoma 1B es delecionado, el volumen del nucleolo organizado por el NOR del cromosoma 6B aumenta compensatoriamente. Cuando se deleciona el cromosoma 6B también se incrementa el volumen del nucleolo organizado por el cromosoma 1B. Estos resultados indican que, paralelamente a la deleción de un cromosoma portador de cistrones ribosómicos, las otras NORs del complemento, regulan su actividad de manera que las necesidades fisiológicas de la célula no queden comprometidas. Se concluye entonces que el grado de expresión de una NOR particular depende del ambiente genético, especialmente de la presencia y expresión de otras NORs. Los autores propusieron entonces un modelo donde el número de repeticiones de secuencias intensificadoras, que están localizadas en los espaciadores intergénicos, tendrían un papel

importante en la tasa de expresión de las distintas copias, dada su capacidad para secuestrar factores de transcripción presentes en concentraciones limitantes. Debido a que el volumen del nucleolo organizado por el cromosoma 1B es mayor que el organizado por el cromosoma 6B, y por tanto el cromosoma 1B exhibe una dominancia parcial sobre este, a pesar de tener aproximadamente la mitad del número de copias, los autores concluyeron que la actividad nucleolar está relativamente poco influenciada por el número de genes presentes en un locus particular.

Suzuki y col. (1992), estudiaron los cambios en la capacidad de las NOR de ratón para teñirse con plata. Para ello utilizaron dos cepas y su progenie híbrida, y observaron que la intensidad de la tinción con plata se heredaba de manera estable en la mayoría de los clusters de rDNA, pero en algunos clusters (los del cromosoma 12) se observaba una modulación de la intensidad de la tinción cuando el individuo tenía pocas NORs en los otros cromosomas. Esta modulación parecía obedecer a una activación compensatoria debida al cambio en el estado de transcripción de las otras NORs. Los resultados indicaban que la capacidad del cromosoma 12 para teñirse era genéticamente inestable y que la NOR de este cromosoma se activaría (o inactivaría) dependiendo de los requerimientos celulares de rRNA. Estas activaciones/desactivaciones compensatorias de distintos "clusters" de rDNA sugieren que la célula necesita, de algún modo, un número constante de loci activos. En meristemo de *A. cepa* la tasa de nucleogénesis por cistrón

ribosómico parece ser constante en distintas especies que crecen en condiciones similares, pero esta tasa se modifica en distintas subpoblaciones metabólicamente distintas en la misma raíz (De la Torre, 1975).

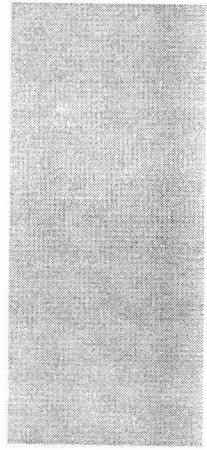
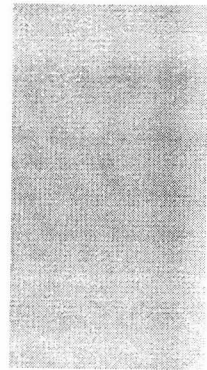
Resumiendo, el patrón de expresión de un "cluster" de rDNA determinado está influenciado por factores como la expresión de otras NORs, número de elementos intensificadores que contengan en los espaciadores intergénicos, o requerimientos metabólicos. El estado de metilación de citosinas internas del tetranucleótido CCGG, y por tanto, de la conformación cromatínica que los hace más o menos sensibles a la digestión por DNAasa I parece ser la consecuencia de la inactivación. Quedaba por dilucidar si el contenido relativo en número de copias de una NOR determinada con respecto a las otras NORs del complemento estaría implicado en el patrón de expresión.

La evaluación citológica de la dominancia de una NOR sobre otra se puede establecer sobre la base de los siguientes criterios:

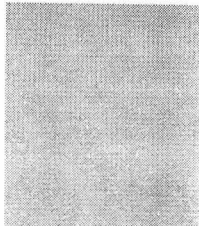
a) Detectando, en las NORs de los cromosomas metafásicos, proteínas retenidas que han interactuado sólo sobre la NOR que se ha activado en la interfase precedente (Hubbel, 1985).

b) Por la eficacia que una NOR exhibe durante el proceso de nucleogénesis que tiene lugar en la transición de telofase a G1.

c) Por el tamaño final conseguido en la interfase por el nucleolo maduro que una NOR sustenta. (Martini y Flavell, 1985).



OBJETIVOS



OBJETIVOS

Desde inicios de los años 60, se ha acumulado una considerable cantidad de conocimientos sobre el contenido en número de copias de los clusters de rDNA de las distintas especies y las tasas de expresión de los mismos. El uso de las técnicas de tinción argéntica y de hibridación *in situ* ha puesto de manifiesto la variabilidad existente en cuanto al tamaño y número de las regiones organizadoras del nucleolo, tanto entre especies distintas, como entre individuos de la misma especie.

Asimismo, se han esclarecido algunos de los mecanismos implicados en la competencia entre las NORs de una misma célula durante la organización del nucleolo. Este estado de conocimientos, nos ha llevado a abordar los siguientes objetivos:

1) Determinar la existencia o no de una relación entre la variabilidad en los niveles de expresión (puesta de manifiesto por la tinción con nitrato de plata) y la variabilidad en cuanto al contenido en cistrones ribosómicos (estimada por el tamaño y número de las señales de hibridación) en distintos individuos. Para ello se compararían las distribuciones de células sometidas a tinción con nitrato de plata con aquellas sometidas a hibridación *in situ*, para determinar la existencia de una posible relación entre ambas distribuciones.

2) Determinar la posible influencia que sobre los niveles de expresión de

una NOR determinada, puede tener la cantidad relativa de cistrones ribosómicos que posee con respecto a las otras NORs del complemento. Para ello sería necesario estimar simultáneamente tanto la cantidad relativa de tales cistrones, como el nivel de expresión de las correspondientes NORs. En consecuencia fue necesario poner a punto una técnica de tinción secuencial, que permitiera observar tanto la señal de hibridación *in situ* como la de tinción con plata en las mismas NORs.

3) Determinar si existe realmente una jerarquía en la expresión de las distintas NORs de una célula y, en su caso, dilucidar el factor o factores que la determinan.

4) Determinar las posibles relaciones causa-efecto que puedan existir entre el grado de condensación de la cromatina NOR, sus niveles de expresión y su contenido relativo en cistrones ribosómicos.

Para llevar a cabo estos estudios hemos escogido dos especies: el topo ibérico (*Talpa occidentalis*) y el lirón careto (*Elimoys quercinus*). *Talpa occidentalis* es un material idóneo para este tipo de estudios, ya que presenta una única pareja portadora de regiones organizadoras del nucleolo, con localización intersticial, lo que supone una identificación precisa de los cromosomas que portan estas regiones, a la vez que una mayor sencillez a la hora de interpretar los resultados. *Elimoys quercinus* supone el siguiente nivel en orden creciente de complejidad: dos parejas portadoras de NORs, también con localización intersticial.



MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y METODOS

Obtención de placas metafásicas.

Para la obtención de las placas metafásicas de las dos especies utilizadas en este estudio se han empleado dos técnicas diferentes:

a) **Preparaciones obtenidas de la médula ósea** de animales a los que previamente se les había practicado un tratamiento con levaduras. El tratamiento con levaduras fue sugerido por Cole y Leavens (1971) como estimulador de la mitosis en tejido hematopoyético de reptiles y anfibios. En el año 1980, Lee y Elder adaptaron esta técnica a micromamíferos, siendo éste último el procedimiento técnico que hemos seguido, con modificaciones menores, y que consta de los siguientes pasos:

1) Mezclar 3.5g de levaduras secas (*Saccharomyces cerevisiae*) y 7g de glucosa en 25ml de agua y poner la mezcla en un baño termostático a una temperatura de 40°C. Una vez que las levaduras han empezado a metabolizar la glucosa, se genera una gran cantidad de espuma que tomamos como indicador de que estas levaduras se han tornado activas.

2) Una vez que las levaduras están activas, se inyecta al animal, por vía subcutánea, en la región dorsal unos 0.2 ml de suspensión por cada 25g de peso corporal.

Los pasos que continúan a partir de aquí detallan la técnica concreta para la obtención de placas metafásicas. Fue descrita por primera vez por Hsu y Patton (1969). Su estandarización depende de la especie que vaya a ser objeto de estudio. No obstante, modificaciones menores, que conciernen a la fisiología particular y metabolismo de la especie en cuestión, permiten sin demasiada dificultad la obtención de preparaciones con abundantes placas metafásicas.

3) 24 horas después de la inyección con levaduras, inyectar al animal, por vía intraperitoneal, una dosis de 0.1 ml por cada 25 gramos de peso corporal de una solución de colchicina al 0.02% en solución salina isotónica de NaCl al 0.9%.

4) A los 30-45 minutos se sacrifica al animal por inhalación de cloroformo y se le extraen los dos fémures.

5) Cortar las epífisis y hacer pasar una solución de KCl al 0.56% (0.75 M) con una jeringa y una aguja de un diámetro apropiado a través de la diáfisis del fémur. Hay que procurar que el paso de la solución a través del canal medular sea violento con objeto de arrastrar todo su contenido. El material se recoge en un tubo cónico de centrifuga. Se añade KCl a este tubo hasta completar un volumen de aproximadamente 8ml, con objeto de que la densidad celular de la suspensión sea baja.

6) Resuspender el material con una pipeta pasteur que lleva una tetina de goma y dejar reposar, con objeto de que sedimenten las partes más

groseras (tejido conectivo u otro material arrastrado durante el proceso de lavado).

7) Someter la suspensión celular a choque hipotónico durante 30min a 4°C.

8) Resuspender suavemente el material y añadir a modo de prefijación, de 0.5 a 1ml de fijador Carnoy modificado (mezcla de metanol y ácido acético en proporción 3:1) con el objeto de evitar la formación de grumos y persiguiendo que las células permanezcan separadas.

9) Centrifugar durante 10' a 900-1000 r.p.m.

10) Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento en un volumen aproximado de 0.1ml. de la solución hipotónica.

11) Añadir, dejando resbalar por las paredes del tubo, unos 6 ml de fijador sobre la suspensión celular concentrada, procurando que no haya mezcla y se forme una interfase.

12) Situar el tubo de centrífuga a 4°C y dejar el tiempo suficiente para que la solución tome un aspecto translúcido. Este tiempo suele oscilar entre 45 min y 1 hora.

13) Resuspender el material. Centrifugar a 900-1000 r.p.m. durante 10 minutos.

14) Decantar el sobrenadante. Resuspender el material en el fijador residual que ha quedado en el tubo, que suele ser un volumen de aproximadamente 0.1ml.

- 15) Añadir otros 6 ml de fijador y resuspender el material.
- 16) Repetir estos dos últimos pasos dos veces más.
- 17) Resuspender el material fijado en un volumen adecuado de fijador.
- 18) Proceder a realizar las extensiones sobre portas fríos y húmedos, previamente desengrasados en una mezcla de alcohol etílico y éter en proporción 3:1.

19) Dejar caer sobre cada porta unas 5-7 gotas de la suspensión y dejar secar al aire.

b) **Cultivos de médula ósea a corto término.** Esta técnica fue utilizada para la obtención de preparaciones de médula ósea de animales que habían muerto espontáneamente durante el periodo de tratamiento con levaduras. Los pasos seguidos son los siguientes:

- 1) extraer los dos fémures del animal y cortar las epífisis distales.
 - 2) Extraer la médula ósea haciendo pasar, con una jeringa y una aguja de diámetro apropiado, medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 15% de suero bovino fetal a través de la diáfisis recogiendo el contenido en un frasco de vidrio borosilicato estéril, con tapón de rosca, completando un volumen total de 5ml.
 - 3) Resuspender el material con ayuda de una pipeta pasteur provista de una tetina de goma.
 - 4) Añadir colchicina a una concentración final de 10 μ l/ml de medio e incubar durante 30 min a 37°C.
-

- 5) Centrifugar 10 min a 900 r.p.m..
- 6) Decantar el sobrenadante.
- 7) Resuspender la suspensión celular.
- 8) Someter a choque hipotónico con KCl 0.75M durante 25 min.
- 9) Centrifugar 10 min. a 37°C.
- 10) Decantar el KCl.
- 11) Resuspender la suspensión celular en el KCl residual que ha quedado (aproximadamente 0.1 ml).
- 12) Proceder a la fijación siguiendo los mismos pasos que en la técnica anterior.

Tinción con nitrato de plata.

La técnica empleada es esencialmente la descrita por Rufas y col. (1982). El protocolo seguido es el siguiente:

- 1) Preparar 200ml de agua desionizada, añadir ácido fórmico hasta que el pH sea de 3.1 ± 0.1 .
- 2) Tomar 300 μ l de esta solución añadir 300 μ g de AgNO₃ en un eppendorf previamente enjuagado en el agua anterior, tomando la precaución de que el nitrato de plata no toque ningún objeto metálico. Envolver el eppendorf en papel de aluminio para evitar el paso de luz.
- 3) Agitar suavemente con objeto de favorecer la suspensión coloidal.

4) Poner sobre la preparación de dos a tres gotas de la solución y dejar caer sobre ella un cubre para que se extienda por toda la preparación.

5) Situar la preparación en una cámara saturada de humedad a 60°C durante varios minutos.

6) Cuando la preparación toma un color dorado se lava rápidamente con agua abundante y se comprueba la tinción al microscopio. Si la tinción es débil la preparación puede tratarse otra vez.

8) Una vez teñida, dejar secar al aire y montar.

Destinción de las preparaciones previamente teñidas con NO_3Ag .

La técnica empleada preserva bastante la morfología de los cromosomas y pone de manifiesto la presencia o ausencia de constricciones secundarias. Consta de sólo cuatro pasos, que son los siguientes:

1) Sumergir la preparación en una solución de Hexaferrocianato potásico al 7.5% durante 4 min.

2) Pasar inmediatamente a una solución de tiosulfato sódico al 20% durante 5 minutos.

3) Lavar abundantemente con agua destilada.

4) Dejar secar al aire.

Hibridación *in situ*

Sonda utilizada para la hibridación.

La sonda utilizada es la p11a.2 (Wahl y col., 1983). Contiene un fragmento de 7.1kb que comprende el extremo 3' del rDNA 18S, el espaciador transcrito interno, y prácticamente la totalidad del rDNA 28S del hamster sirio, clonado en la diana *EcoRI* del cósmido MUA3. Este es un vector derivado de pBR322 en el que las secuencias "cos" han sido insertadas en el gen de resistencia a la ampicilina, por lo que la selección de bacterias transformadas debe hacerse forzosamente en medio con tetraciclina. Con éste plásmido transformamos bacterias de la cepa JM 109 (Md^r, R^r) de *E. coli* siguiendo los siguientes protocolos:

Obtención de bacterias competentes.

1) Sembrar una placa de LB¹ sólido a partir del stock congelado de células e incubar toda la noche a 37°C.

¹ Medio LB: 950ml de H₂O, 10g de bacto triptona, 5g de extracto de levaduras, 10g de NaCl. Añadir 15% de agar si el medio es sólido.

2) Inocular 4ml de LB líquido con una única colonia de la placa anterior e incubar toda la noche a 37°C con agitación.

3) Inocular 40ml de LB con los 4ml anteriores e incubar con agitación a 37°C hasta que la densidad óptica alcance un valor de 0.5.

4) Centrifugar las bacterias durante 10 min a 4100 r.p.m.

5) Decantar el sobrenadante. Resuspender el sedimento en 20ml de CaCl₂ 0.1M estéril e incubar en hielo durante 30 min.

6) Centrifugar a 4100 r.p.m. durante 10 min.

7) Resuspender el sedimento en 4ml de CaCl₂ 0.1M a 0°C (estéril y mantenido en hielo picado). En esta solución las bacterias se pueden almacenar hasta 24 h en frigorífico.

Transformación de las bacterias con el plásmido que contiene la sonda

1) Diluir 1:1000 del plásmido (150ngr/ μ l) en Tris-HCl 50mM a pH=7.2.

2) Añadir 50 μ l de la dilución del plásmido a 300 μ l del medio que contiene las bacterias competentes e incubar en hielo durante 40 min.

3) Incubar a 42°C durante 3 min.

4) Enfriar a temperatura ambiente durante 10 min.

5) Añadir 1ml de medio LB líquido a cada eppendorf e incubar a 37°C

en agitación durante 1 hora.

6) Sembrar placas de LB sólido con 300 μ l de la suspensión bacteriana por placa e incubar toda la noche a 37°C.

7) Tomar una colonia y sembrarla en medio líquido con tetraciclina.

Preparación de ADN plasmídico a pequeña escala

1) Poner 1.5 ml. del cultivo en un eppendorf.

2) Centrifugar durante 30 segundos.

3) Descartar el medio por aspiración, procurando que el sedimento bacteriano quede tan seco como sea posible.

4) Resuspender, agitando vigorosamente, el sedimento bacteriano obtenido en el paso anterior en 100 μ l de solución I¹ a 0°C.

5) Añadir 200 μ l de solución II².

6) Mezclar, invirtiendo el tubo varias veces.

7) Añadir 150 μ l de solución III³. Cerrar el tubo y mantenerlo en posición invertida durante 10 segundos.

8) Centrifugar durante 5 minutos.

¹Solución I: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH=7, EDTA 10 mM.

²Solución II: (OH)Na 0.2 N. SDS 1%.

³Solución III: 60ml de Acetato de potasio 5 M, 11.5ml de Ácido acético, 28.5ml de H₂O.

- 9) Transferir el sobrenadante a otro tubo.
- 10) Añadir un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1). Mezclar por agitación.
- 11) Centrifugar durante 2 minutos.
- 12) Transferir el sobrenadante a otro tubo.
- 13) Precipitar el ADN con dos volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente. Mezclar por agitación.
- 14) Centrifugar 5 minutos.
- 15) Descartar el sobrenadante por aspiración.
- 16) Mantener el tubo en posición invertida sobre un papel de filtro para permitir que el líquido residual resbale por las paredes del tubo.
- 17) Añadir 500 µl de etanol al 70%.
- 18) Centrifugar 5 minutos.
- 19) Dejar secar al aire.
- 20) Resuspender en 50 µl de agua.
- 21) Mezclar por agitación suave.
- 22) Almacenar a -20°C.

Marcaje de la sonda.

La aparición de técnicas de marcaje no radiactivo ha supuesto una considerable expansión de las técnicas de hibridación en general, alcanzando niveles de sensibilidad comparables a las técnicas de marcado radiactivo, usualmente basadas en ^{32}P , ^{35}S ó ^3H , sin los problemas de inestabilidad, alto coste económico y peligrosidad de los materiales radiactivos. En el presente trabajo hemos utilizado un sistema de marcaje no radiactivo que consiste en la incorporación de moléculas de digoxigenina al ADN_r utilizado como sonda. La digoxigenina es un esteroide presente sólo en las plantas del género *Digitalis* y que se suministra unida al dUTP por una molécula espaciadora. El procedimiento utilizado para la incorporación de la digoxigenina al ADN fue el denominado "traslado de la muesca", descrito por Rigby y col. (1977). El fundamento de esta técnica consiste en introducir mellas en cada una de las hebras simples de una doble cadena de ADN mediante cortes endonucleotídicos producidos por el enzima DNAasaI. Estas muescas son reconocidas por la DNA polimerasa I que, con la acción conjunta de su actividad exonucleasa 5'→3' y su actividad polimerasa 5'→3' desplazará la muesca eliminando los nucleótidos en la dirección de avance y rellenando el hueco que ella misma va creando en este proceso, utilizando como molde la cadena complementaria. En la mezcla de reacción se añaden, además de los dos enzimas mencionados, una mezcla de los cuatro

nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y dig-11-dUTP. Las condiciones de la reacción se optimizan para que aproximadamente cada 20 nucleótidos se incorpore un nucleótido modificado, esto es, un resto de dig-11-dUTP. El tamaño de los fragmentos marcados que van a ser utilizados como sonda para la hibridación *in situ*, es un parámetro crítico, y la misma dinámica de la reacción permite controlar este tamaño, variando la concentración de DNAasa.

Para estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos después de la reacción de marcado se toma una alícuota y se somete a electroforesis en gel de agarosa.

Las cantidades de los distintos componentes utilizadas para el marcaje de la sonda de ADNr fueron las siguientes:

1) Tampón (10x)	5 μ l
2) Mezcla de nucleótidos	4 μ l
3) Dig-11-dUTP	2 μ l
4) ADNr	2 μ gr
5) DNA polII (5 unidades/ μ l)	4 μ l
6) DNAasa (dilución 1:1000 de una solución stock 1mg/ml)	5 μ l
7) Agua	28 μ l
Volumen total	50 μ l

La mezcla de reacción se incubaba a una temperatura de 15°C durante dos horas, tras lo cual se añaden 4µl de EDTA 0.5M a pH=8, para detener la reacción.

Precipitación del ADN_r marcado.

1) Para precipitar la sonda hapténizada, añadir después de la reacción de marcado:

-2µl de glicógeno.

-4µl de LiCl 4M.

-100µl de etanol al 100%

2) Incubar toda la noche a -20°C

3) Centrifugar durante 15 min y decantar el sobrenadante.

4) Añadir 100µl de etanol al 70% procurando que resbale por las paredes del tubo eppendorf para evitar turbulencias.

5) Centrifugar durante 5 min.

6) Decantar el etanol y dejar secar al aire.

7) Resuspender la sonda en un volumen de 25µl de una solución de formamida al 50% en 2xSSC¹p.

¹2xSSC: NaCl 0.3M, Citrato sódico 0.03M

Comprobación de la eficacia de marcado (Dot blot).

Para comprobar la eficacia del marcado hemos utilizado una técnica basada en la inmovilización del ADN_r marcado sobre una membrana de nylon.

Inmovilización del ADN:

- 1) Depositar sobre el filtro muestras de 3 μ l de diluciones seriadas en concentraciones decrecientes (1:5).
- 2) Depositar sobre el mismo filtro diluciones seriadas (1:5) de una solución de ADN marcado de concentración conocida.
- 3) Dejar secar la membrana y fijar el ADN a la misma mediante irradiación con ultravioletas.

Detección inmunológica:

- 6) Lavar la membrana con tampón 1¹ durante 2 minutos.
- 7) Incubar durante 1 hora en tampón 2².
- 8) Lavar brevemente con tampón 1.
- 9) Incubar durante 1.5 horas en una dilución 1:5000 de anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina en tampón 2.
- 10) Lavar dos veces en tampón 1, durante 15 minutos cada vez.

¹Tampón 1: 10ml de tris-HCl 1M, 3ml de NaCl 5M. Completar con H₂O hasta 100ml.

²Tampón 2: 70ml de H₂O, 0.5g de reactivo de bloqueo. Completar con H₂O hasta 100 ml.

- 11) Equilibrar la membrana con tampón 3¹ durante 4 minutos.
- 12) Poner la membrana en solución de color² e incubar durante 6-8 horas en la oscuridad.

La comparación de la intensidad de la reacción colorimétrica que se ha producido en el ADNr con la intensidad de la del control, nos permitirá estimar la concentración de ADNr marcado obtenido. Concentraciones de 0.5 ng/ μ l son suficientes para poder llevar a cabo la hibridación *in situ* sobre preparaciones cromosómicas.

Hibridación.

La técnica empleada se utiliza tanto para preparaciones teñidas previamente con NO₃Ag y posteriormente desteñidas, como para preparaciones que no se habían teñido previamente.

Se distinguen tres fases en la realización de la técnica:

a) Preparación del porta

- 1) Lavar 3 veces, 5 min cada vez (3x5 min) en PBS³ sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ a pH=7.4

¹Tampón 3: 70ml de H₂O, 10ml de tris-HCl 1M (p^H=9.5), 2ml de NaCl 5M, 2.5ml de MgCl₂. Completar con H₂O hasta 100 ml.

²Solución de color: 45 μ l de NBT (Nitro Blue Tetrazolium), 35 μ l de X-fosfato, 10ml de tampón 3.

³ PBS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ (10x): Disolver en 800 ml. de agua 80g de ClNa, 2g de KCl, 14.4g de Na₂HPO₄, 2.4g de KH₂PO₄, ajustar el pH a 7.2-7.4. Completar con H₂O hasta 1l.

2) Deshidratar en una serie de concentración creciente de etanol:

a) 2 min en etanol al 70%

b) 2 min en etanol al 80%

c) 2 min en etanol al 95%

3) Dejar secar al aire.

4) Incubar la preparación en cámara húmeda en 2xSSC durante una hora con 1mg/ml de RNAasa en formamida al 50% en 2xSSC a 37°C.

5) Lavar 3x5 min en 2xSSC.

6) Deshidratar en una serie de concentración creciente de etanol:

a) 2 min. en etanol al 70%

b) 2 min. en etanol al 80%

c) 2 min. en etanol al 95%

7) Dejar secar al aire.

b) Hibridación.

8) Poner 5µl de sonda marcada sobre un área delimitada sobre el porta de aproximadamente 4cm².

9) Desnaturalizar simultáneamente el ADN cromosómico y el ADN de la sonda a 80°C durante 2min.

10) Dejar toda la noche renaturalizando a 37°C.

c) Lavados y detección

11) Sumergir la preparación durante 5 min en formamida al 50% en 2xSSC.

- 12) Lavar 2x5 min. en 2 x SSC.
- 13) Sumergir 5 min. en TNT¹.
- 14) Incubar de 45 min. a 1h en TNB². En cámara húmeda a temperatura ambiente.
- 15) Poner la solución de anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP) sobre la preparación e incubar ésta a 37°C durante 1.5h en cámara húmeda.
- 16) Lavar 2x5 min en TNT.
- 17) Lavar 1x5 min en Tampón 3.
- 18) Incubar con la solución de color durante 6-7h en cámara húmeda en la oscuridad.
- 19) Teñir con giemsa al 10% durante 5 min.

Tinción simultánea NOR-Bandas G.-

Esta técnica se ha empleado para la construcción de los cariotipos de las dos especies estudiadas. Las preparaciones tratadas con la técnica de impregnación argéntica descrita anteriormente para la visualización de las regiones organizadoras del nucleolo se sumergen durante 2-3 min. en etanol, tras lo cual se tratan con la siguiente técnica de bandeado G descrita

¹TNT: 0.1M de Tris HCl a pH=7.5, 0.15M de NaCl, 0.05% de Tween 20

²TNB: TNT con 0.5% de reactivo de bloqueo

por (Burgos y col., 1986)

1) Sumergir la preparación en tripsina durante 20-30 segundos, con agitación continua y lavar inmediatamente en agua corriente.

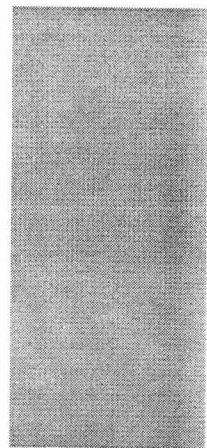
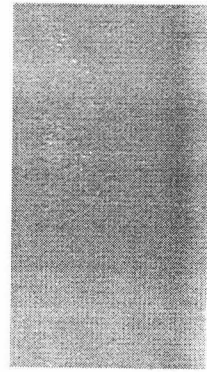
2) Sumergir la preparación en 2xSSC a 60°C durante 1-1,5 min. y lavar en agua destilada

3) Teñir con Giemsa al 10% durante 5 min.

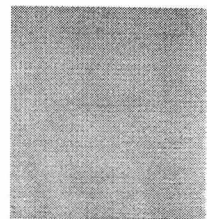
Los tiempos de tratamiento con tripsina y 2xSSC son sólo orientativos, ya que los tiempos óptimos de tratamiento son muy estrictos. Sin embargo, no hay dificultad en obtener el tiempo óptimo después de varios intentos que pueden realizarse de forma fácil y rápida.

Métodos estadísticos

En el presente trabajo se han realizado análisis de Ji-cuadrado simple, Ji-cuadrado de contingencia para la realización de tests de independencia en tablas de dos vías, modelos log-lineales para el análisis de tablas de contingencia de tres vías y análisis de regresión. Todos estos análisis estadísticos se han realizado utilizando el paquete estadístico STATGRAFICS. Los valores de probabilidad de 0.0000 recogidos en muchas de las tablas significan que al menos los cuatro primeros dígitos decimales son 0, y el quinto es menor de 5.



RESULTADOS



RESULTADOS

Estudio de NORs homólogas en *T. occidentalis* mediante tinción argéntica e hibridación *in situ*.

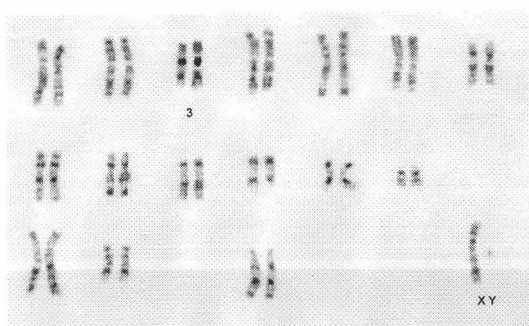


Figura 3.- Cariotipo de *Talpa occidentalis* que muestra bandeo G y tinción con AgNO_3 simultáneamente.

Los nueve individuos de la especie *Talpa occidentalis* analizados en este trabajo, mostraron un cariotipo $2n=34$ con una única pareja de NORs, localizadas intersticialmente, en el par 3 (Fig. 3), de acuerdo con estudios citogenéticos previos (Jiménez y col.,

1984). Esta especie representa, por tanto, un modelo biológico idóneo para estudiar la posible relación entre NORs homólogas, en lo que se refiere a su contenido relativo en cistrones ribosómicos, estado de condensación de su cromatina, y nivel y jerarquía de expresión. Para ello, el estudio se ha abordado en dos fases:

a) un estudio paralelo en el que las técnicas de tinción argéntica e hibridación *in situ* fueron aplicadas a muestras distintas de células y los resultados se analizaron por separado.

b) un estudio secuencial en el que ambas técnicas fueron aplicadas sobre la misma muestra de células y los resultados fueron analizados simultáneamente.

Estudio paralelo.

En primer lugar, analizamos un total de 639 placas metafásicas, pertenecientes a cuatro individuos de la especie *Talpa occidentalis*, mediante la técnica de hibridación *in situ* con una sonda de rDNA. Esto nos permitió localizar las regiones NORs en el cariotipo de esta especie, independientemente de si dichas NORs habían estado activas o inactivas en la interfase previa. Sobre la base del número y tamaño de las señales de hibridación, pudimos distinguir tres tipos de clases celulares (Fig.4):

- 1) células con una única señal.
- 2) células con dos señales de tamaño similar.
- 3) células con dos señales de diferente tamaño.

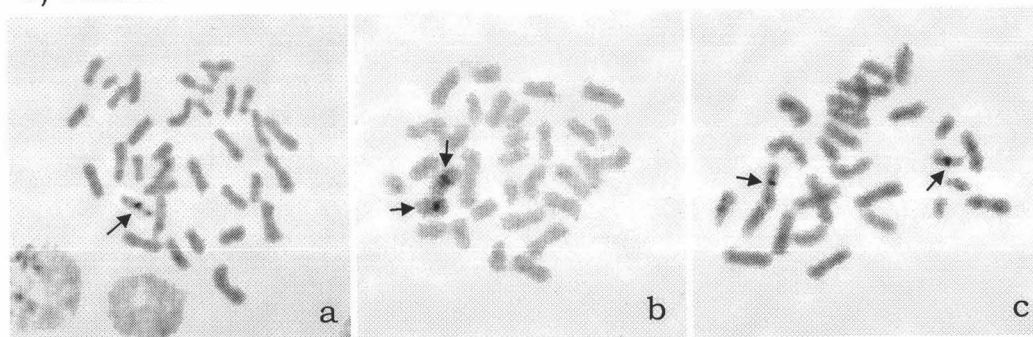


Fig. 4.- Hibridación *in situ* con rDNA. **a)** placa metafásica con una sola señal. **b)** con dos señales iguales. **c)** con dos señales distintas

La tabla 1 muestra el número de células pertenecientes a cada una de las clases celulares observadas en cada individuo. El análisis mediante χ^2 demuestra que la distribución de las tres clases celulares presenta diferencias significativas interindividuales. ($\chi^2 = 62.47$; $P=0.0000$).

Tabla 1.-Distribución de las tres clases celulares de 4 individuos de *Talpa occidentalis* de acuerdo al número y tamaño de las señales HIS.

Individuo	Número de células con		
	Una señal HIS	Dos señales HIS similares	Dos señales HIS diferentes
T-420	2	121	92
T-421	2	67	66
T-422	7	44	29
T-423	1	166	42
%	2.6	60.1	37.3

Paralelamente, analizamos una muestra de 579 placas metafásicas pertenecientes a los mismos individuos, teñidas con NO_3Ag , y establecimos también tres clases celulares (Fig. 5):

- 1) células con una única señal.
- 2) células con dos señales de tamaño similar.
- 3) células con dos señales de distinto tamaño.

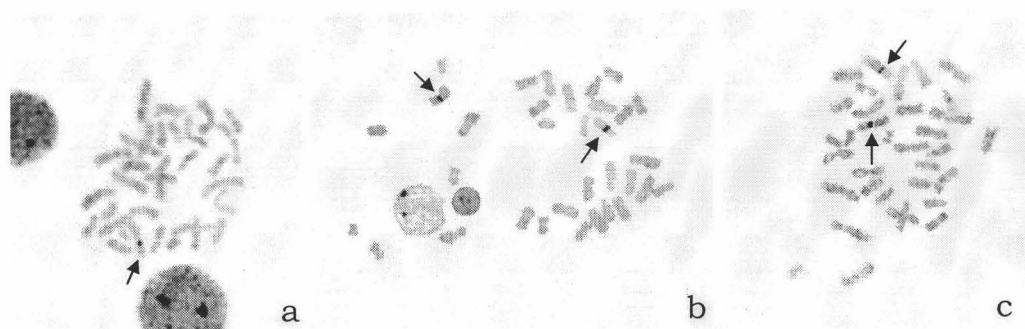


Fig. 5.- Tinción con NO_3Ag . **a)** placa metafásica con una sola señal. **b)** con dos señales iguales. **c)** con dos señales distintas

La tabla 2 muestra el número de células pertenecientes a cada una de las clases celulares observadas en cada individuo. El análisis mediante χ^2 demuestra que la distribución de las tres clases celulares presenta diferencias significativas interindividuales. ($\chi^2 = 44,02$; $P=0.0000$).

Tabla 2.-Distribución de las tres clases celulares de 4 individuos de *Talpa occidentalis* de acuerdo al número y tamaño de las señales Ag.

Individuo	Número de células con		
	Una señal Ag	Dos señales Ag similares	Dos señales Ag diferentes
T-420	57	22	26
T-421	197	35	89
T-422	24	21	26
T-423	37	30	15
%	48.6	24.5	26.9

Finalmente los resultados obtenidos con ambas técnicas, en distintas muestras de cada individuo, fueron analizados en una tabla de contingencia, con respecto a los tres tipos celulares observados. La tabla 3 resume los valores de la χ^2 y el nivel de significación. La existencia de diferencias significativas demuestra que la distribución de las clases

celulares depende de la técnica empleada.

Tabla 3.- Tabla de contingencia obtenida para testar la posible asociación entre la técnica empleada (ISH y Ag-NOR) y los tipos celulares resultantes.

Individuo	Técnica	Número de células con			X ²	P
		Una señal	Dos señales similares	Dos señales distintas		
T-420	ISH	2	121	92	134.85	<0.0001
	Ag-NOR	57	22	26		
T-421	ISH	2	67	66	154.34	<0.0001
	Ag-NOR	197	35	89		
T-422	ISH	7	44	29	17.15	0.0002
	Ag-NOR	24	21	26		
T-423	ISH	1	166	42	106.03	<0.0001
	Ag-NOR	37	30	15		

Estudio secuencial.

Una segunda fase de este estudio en *T. occidentalis* se ha realizado utilizando la técnica de tinción secuencial con NO₃Ag e hibridación *in situ* en una misma muestra de células. Esto permitió estudiar la relación entre el número de copias relativo de una NOR determinada, los niveles de expresión de la misma, y el orden en la jerarquía de expresión. Para ello se analizaron los tamaños relativos de las señales HIS y NO₃Ag. No obstante, para garantizar la validez de estos resultados fue preciso investigar previamente la posible influencia que la tinción con NO₃Ag pudiera tener sobre la distribución de tipos celulares obtenidos posteriormente con HIS durante el procedimiento de tinción secuencial. Con este propósito hicimos un análisis preliminar en dos individuos elegidos al azar (T-426 y T-427), en cada uno de los cuales se estudiaron dos muestras distintas de células.

Sólo una de ellas se tiñó con NO_3Ag y posteriormente las dos fueron tratadas con la técnica de HIS. Las distribuciones de los tipos celulares de ambas muestras (las teñidas previamente con plata y las no teñidas) fueron comparadas en una tabla de contingencia (tabla4).

Tabla 4.- Tabla de contingencia que muestra las distribuciones de tipos celulares, obtenidos mediante HIS y tinción secuencial, de dos individuos de *Talpa occidentalis*. Los valores de Ji-cuadrado muestran la ausencia de interferencia que la tinción con plata podría tener sobre la posterior hibridación *in situ*.

Individuo	Técnica	Número de células con			Estadístico
		Una señal	Dos señales similares	Dos señales diferentes	
T-426	HIS	4	36	18	$\chi^2=0.528$ P=0.7679
	Tinción secuencial	2	34	17	
T-427	HIS	6	8	56	$\chi^2=0.373$ P=0.8298
	Tinción secuencial	9	14	74	

Los valores de la χ^2 revelaron la ausencia de diferencias significativas entre las dos muestras de células en ambos individuos. Concluimos por tanto, que la tinción previa con NO_3Ag no distorsiona los resultados de la subsiguiente HIS, lo que, consecuentemente, da validez a los resultados del estudio secuencial que detallamos a continuación.

Un total de 339 células de cinco individuos fueron analizadas secuencialmente. Las células fueron clasificadas según el número y tamaño relativos de las señales Ag e HIS observadas en los cromosomas portadores

de NORs (par 3). Tal y como muestra la tabla 5, se pueden distinguir 9 clases celulares.

Tabla 5.- Número de células contabilizadas en cinco individuos de *Talpa occidentalis*, clasificadas de acuerdo con el número y tamaño relativo de las señales Ag e HIS obtenidas mediante tinción secuencial

Individuo	Ag	HIS			total
		Una señal	Dos señales similares	Dos señales diferentes*	
T-425	Una señal	6	22	11(8+3)	39
	Dos señales similares	0	17	5	22
	Dos señales diferentes	0	8	3(2+1)	11
Total		6	47	19	72
T-426	Una señal	3	11	11(7+4)	25
	Dos señales similares	0	18	8	26
	Dos señales diferentes	0	11	5(4+1)	16
total		3	40	24	67
T-427	Una señal	9	10	73(70+3)	92
	Dos señales similares	0	3	0	3
	Dos señales diferentes	0	1	1(1+0)	2
total		9	14	74	97
T-428	Una señal	4	4	20(18+2)	28
	Dos señales similares	0	3	8	11
	Dos señales diferentes	0	2	12(10+2)	14
total		4	9	40	53
T-429	Una señal	4	17	8(8+0)	29
	Dos señales similares	0	3	1	4
	Dos señales diferentes	0	6	11(8+3)	17
total		4	26	20	50

*: Los números que se muestran entre paréntesis corresponden a los valores **a)** (izquierda) y **b)** (derecha) que se detallan en el texto a continuación.

En esta tabla se detallan el número de células que muestran una señal, dos de tamaño similar, y dos de tamaño diferente, para ambas técnicas. Es de destacar que todas aquellas células que presentaron una única señal HIS siempre presentaron una única señal de plata, coincidiendo ambas señales en el mismo cromosoma.

Los datos de dos de las casillas correspondientes a las células que mostraron dos señales HIS de diferente tamaño se han desglosado en dos partes. Las células que presentan dos señales de distinto tamaño HIS y una única señal Ag se han dividido en: **a)** células en las que el cromosoma con la NOR con mayor señal de HIS se corresponde con la NOR que se ha teñido con Ag (valor situado en la izquierda del paréntesis) y **b)** células donde ocurre el suceso contrario, es decir, células donde el cromosoma que porta la NOR que presenta la señal de HIS menor es la que ha mostrado tinción Ag (valor situado en la derecha del paréntesis). De la misma forma, las células que muestran heteromorfismo para ambas señales, es decir, dos señales distintas de hibridación y dos señales distintas de Ag se dividen a su vez en dos grupos: **a)** células donde la mayor señal de hibridación se corresponde con la mayor señal de Ag y por tanto la menor señal HIS se corresponde con la menor señal Ag, y **b)** células donde ocurre lo contrario es decir, la mayor señal HIS se corresponde con la menor Ag y la menor señal HIS se corresponde con la mayor señal Ag.

La tabla 5 es una tabla de tres vías en donde las tres variables son: individuo, tipo celular Ag y tipo celular HIS, podemos investigar las relaciones entre dichas variables mediante análisis logarítmico-lineal. Los resultados de este análisis demostraron la existencia de diferencias interindividuales significativas en cuanto a la distribución de los distintos tipos celulares ($\chi^2 = 169.235$, $P=0.0000$), para el modelo de independencia entre la variable individuo y las variables tipo celular Ag y tipo celular HIS. El análisis se repitió aplicando el mismo modelo logarítmico-lineal a varias submuestras obtenidas tras excluir individuos concretos de la muestra inicial. Cuando se excluyeron los datos de individuos que presentaban valores extremos para el porcentaje de células con NORs heteromórficos (células con dos señales diferentes de HIS o Ag-NOR), el modelo logarítmico-lineal no detectó diferencias significativas entre los restantes individuos. Así, la hipótesis de independencia del eje "individuo" respecto a los otros dos no pudo rechazarse al eliminar al individuo T-427 o al T-425 que fueron los que mostraron los porcentajes de heteromorfismo más alto y más bajo respectivamente, (ver tabla 6).

Este hecho sugiere la existencia de una variación continua entre individuos para este carácter.

Tabla 6.- Porcentajes de células que mostraron heteromorfismo en las señales HIS y Ag.

		Individuo				
		T-425	T-426	T-427	T-428	T-429
% de células heteromórficas	HIS	34.7	40.3	85.6	83.0	48.0
	Ag	69.4	61.2	96.9	79.2	92.0

Estudio de la relación de tamaños entre las señales Ag e HIS

Las 339 células analizadas contienen 678 cromosomas potencialmente portadores de regiones NORs. Dado que todas las células fueron sometidas al proceso de tinción secuencial (tinción con NO_3Ag y posterior HIS), esta muestra de cromosomas se analizó estadísticamente para establecer posibles relaciones del número de cistrones ribosómicos con los niveles de actividad transcripcional y con la jerarquía en la activación de las NORs, sobre la base del análisis del tamaño relativo de las señales HIS y Ag.

Consecuentemente, se establecieron nueve tipos cromosómicos que resultan de combinar el tamaño relativo de su señal Ag respecto a la del homólogo (mayor, igual o menor), con el tamaño relativo de su señal HIS

(mayor, igual, o menor) (ver tabla 7).

Tabla 7.- Tablas de contingencia que muestran los datos de los cinco individuos de *Talpa occidentalis* en las que se analiza la posible asociación entre el tamaño relativo de las señales Ag e HIS en los cromosomas de las células tratadas secuencialmente con ambas técnicas.

Individuo	Tamaño relativo de la señal Ag	Tamaño relativo de la señal HIS			Estadístico
		Mayor	Igual	Menor	
T-425	Mayor	16	30	4	$\chi^2=20.6108$ P=0.0004 cc=0.3539
	Igual	5	34	5	
	Menor	4	30	16	
T-426	Mayor	14	22	5	$\chi^2=13.0122$ P=0.0112 cc=0.2975
	Igual	8	36	8	
	Menor	5	22	14	
T-427	Mayor	80	11	3	$\chi^2=184.134$ P=0.0000 cc=0.6978
	Igual	0	6	0	
	Menor	3	11	80	
T-428	Mayor	32	6	4	$\chi^2=47.0555$ P=0.0000 cc=0.5545
	Igual	8	6	8	
	Menor	4	6	32	
T-429	Mayor	20	23	3	$\chi^2=28.0205$ P=0.0000 cc=0.4678
	Igual	1	6	1	
	Menor	3	23	20	

cc: Coeficiente de contingencia

Agrupando los datos en una tabla de tres vías, un análisis logarítmico-lineal demostró diferencias significativas entre individuos con respecto a la distribución de tipos cromosómicos ($\chi^2=240.035$, P=0.0000), para el modelo de independencia entre la variable individuo y las otras dos. La heterogeneidad entre los individuos demostrada en este estudio hizo

necesario analizar por separado, en cada individuo, la relación entre el tamaño de la señal NO₃Ag y la señal de HIS. Estos análisis de contingencia mostrados en la tabla 7 demostraron una asociación significativa entre el tamaño de las dos señales en todos los individuos. Dicha asociación fue especialmente acusada en el individuo T-427.

Se realizó un análisis adicional de los datos contenidos en esta tabla, a partir de los cuales se estableció el número de casos en que los tamaños relativos de ambas señales eran "concordantes" o "discordantes" (tabla 8).

Tabla 8.- Número de cromosomas concordantes y discordantes, observados y esperados, en los cinco individuos de *Talpa occidentalis*, clasificados de acuerdo al tamaño relativo de las señales Ag e HIS obtenidos mediante tinción secuencial.

Individuo		Número de cromosomas concordantes	Número de cromosomas discordantes	Estadístico
T-425	Observados	101	43	$\chi^2=23.36$ P=0.0000
	Esperados	72	72	
T-426	Observados	94	40	$\chi^2=21.76$ P=0.0000
	Esperados	67	67	
T-427	Observados	177	17	$\chi^2=131.96$ P=0.0000
	Esperados	97	97	
T-428	Observados	84	22	$\chi^2=36.26$ P=0.0000
	Esperados	53	53	
T-429	Observados	70	30	$\chi^2=16$ P=0.0000
	Esperados	50	50	

Se han considerado concordantes aquellos casos en que los cromosomas mostraban señales mayores o menores con ambas técnicas, mientras que aquellos en que mostraban la señal mayor con una de las técnicas y la menor con la otra, se consideraron discordantes. Para ello, los

cromosomas sin señal en las células con una sola señal, ya sea Ag o HIS, se incluyeron dentro de la categoría “menor”. Además, se consideró que había casos de concordancia en las células que mostraron dos señales iguales en tamaño para las dos técnicas, y un caso de concordancia y otro de discordancia en las células con dos señales iguales para una de las técnicas y dos señales distintas para la otra. Un análisis de χ^2 simple realizado con estos datos (ver tabla 8) mostró que el número de concordancias fue significativamente mayor que el número de discordancias en los cinco individuos. De nuevo, esta diferencia fue especialmente significativa en el individuo T-427.

En su conjunto estos resultados representan una evidencia directa de la fuerte asociación existente entre el tamaño de la señal de Ag y el tamaño de la señal HIS.

Es interesante señalar que el individuo T-427 muestra el mayor nivel de asociación entre el tamaño de las señales observadas con ambas técnicas, y presenta también el porcentaje más alto de células con NORs heteromórficos, tanto para las señales HIS como para la Ag. Este hecho plantea la cuestión de si el porcentaje de concordancia está relacionado con el porcentaje de células con NORs heteromórficas. Para investigar esta posibilidad realizamos un análisis de regresión que demostró que ambas variables se ajustan a un modelo lineal (coeficiente de correlación=0.9014,

P=0.0438), y aún mejor a un modelo exponencial (coeficiente de correlación=0.9014, P=0.0366; Fig 6).

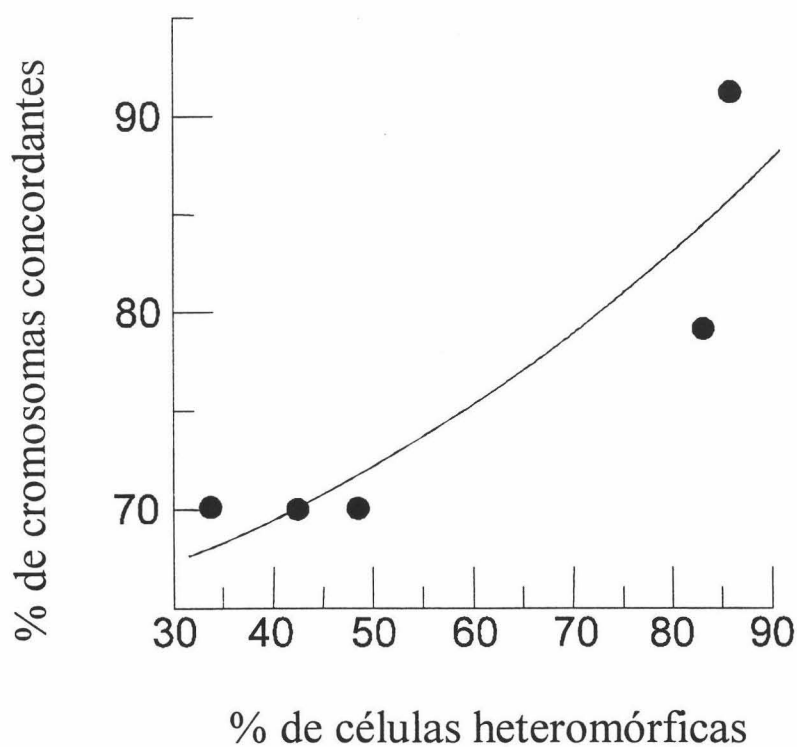


Figura 6.- Correlación exponencial entre los porcentajes de cromosomas concordantes y de células heteromórficas

El individuo T-427 fue también el que mostró mayores diferencias entre ambos homólogos del par 3 en cuanto al tamaño relativo de las señales Ag e HIS. (ver fig. 7g, h, i).

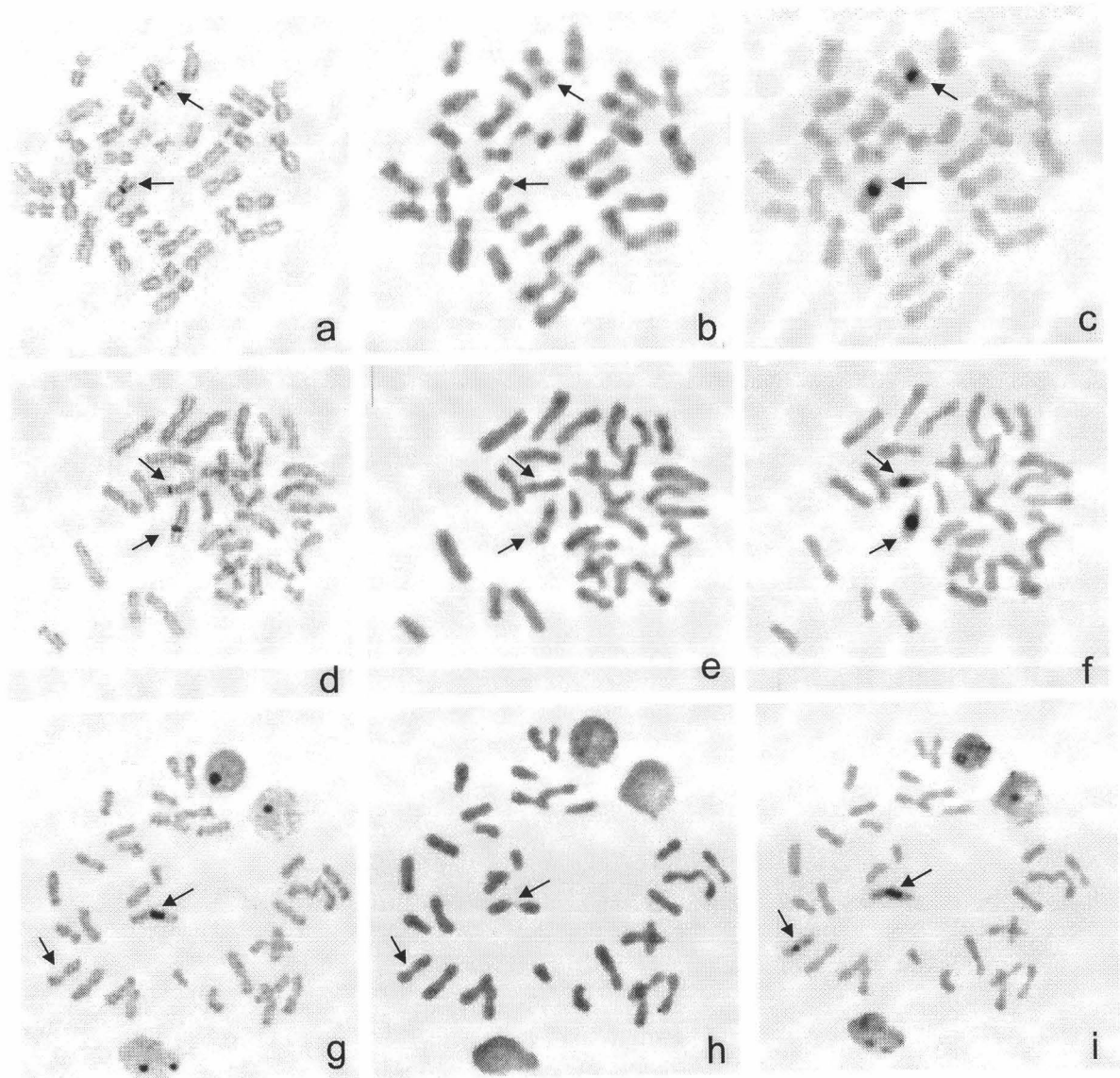


Figura 7.- Tinción secuencial (Ag-HIS) en células de *Talpa occidentalis*. **a)** Célula con dos señales Ag de tamaño similar, **b)** la misma célula desteñida y **c)** HIS en esta misma célula mostrando dos señales de tamaño similar. **d) e) y f)** Tinción secuencial en una célula que muestra dos señales de diferente tamaño con ambas técnicas. **h) i) j)** Tinción secuencial en una célula que muestra una única señal Ag sobre el cromosoma que presenta la señal HIS de mayor tamaño. Las flechas señalan los cromosomas portadores de NOR.

Para investigar la posible relación entre el número de cistrones ribosómicos presentes en las NORs y su orden en la jerarquía de activación, construimos tablas de contingencia donde se consideraron sólo los datos obtenidos de células con dos señales HIS diferentes y una sola señal de Ag, (tabla 9).

Tabla 9.- Tablas de contingencia que muestran los datos de los cinco individuos de *Talpa occidentalis* en las que se analiza la posible asociación entre el tamaño relativo de la señal HIS y el orden en la jerarquía de activación. Esta posibilidad se estudió teniendo en cuenta las células que mostraron dos señales diferentes HIS y una única señal de plata.

Individuo	señal Ag	Tamaño relativo de la señal HIS		Estadístico
		Mayor	Menor	
T-425	+	8	3	$\chi^2=2.9090$ P=0.0881 cc=0.4138
	-	3	8	
T-426	+	7	4	$\chi^2=0.7273$ P=0.3938 cc=0.2631
	-	4	7	
T-427	+	70	3	$\chi^2=119.342$ P=0.0000 cc=0.6761
	-	3	70	
T-428	+	18	2	$\chi^2=22.5000$ P=0.0000 cc=0.6247
	-	2	18	
T-429	+	8	0	$\chi^2=12.2500$ P=0.0005 cc=0.7071
	-	0	8	

cc: Coeficiente de contingencia

Los análisis estadísticos mostraron una asociación significativa en tres de los cinco individuos analizados (T-427, T-428 y T-429), no significativa en T-426 y próxima a la significación en T-425. Es conveniente

señalar que estos dos últimos individuos presentaron los porcentajes más bajos de células con NORs heteromórficas, lo que sugiere que la preferencia de activación de una NOR concreta es tanto menor cuanto menores sean las diferencias de tamaño entre ambos homólogos.

Estudio de la relación entre constricción secundaria y señal HIS.

La posible relación entre la presencia o ausencia, y el tamaño de la constricción secundaria (cromatina NOR descondensada) y la presencia o ausencia de una señal y el tamaño de la señal de HIS fue investigada en 80 células del individuo T-422 y en un total de 45 células del individuo T-427. En cada célula comparamos el tamaño de la constricción secundaria con el tamaño de la señal de hibridación de cada cromosoma con respecto a su homólogo. En el 64% de las células del individuo T-422 el cromosoma con la constricción secundaria mayor, tuvo también la señal HIS mayor. En el 36% restante se observó el fenómeno opuesto, es decir, el cromosoma con la constricción secundaria mayor mostró la señal HIS menor. En el individuo T-427 la constricción secundaria mayor se correspondió con la señal de hibridación más grande en las 45 células analizadas, que mostraron una única constricción secundaria visible.

La tabla 10 resume los resultados obtenidos en el correspondiente recuento. El análisis estadístico demuestra la dependencia entre las dos variables para ambos individuos.

Tabla 10.- Tablas de contingencia que analizan la relación entre la presencia o ausencia de una señal HIS y la presencia o ausencia de una constricción secundaria visible.

		HIS					HIS				
		T-422	+	-	Total			T-427	+	-	Total
CS	+		51	0	51	CS	+	45	0	45	
	-		29	80	109		-	34	11	45	
Total			80	80	160	Total		79	11	90	
$\chi^2=102$ p<0.001					$\chi^2=10.3567$ P=0.0013						

Estudio de NORs homólogas y no homólogas en *E. quercinus* mediante tinción argéntica e hibridación in situ.

Así como la especie *T. occidentalis* supone un modelo ideal para estudiar las relaciones entre NORs homólogas, por poseer una única pareja portadora de NORs, la especie *E. quercinus* representa el modelo más simple para estudiar tales relaciones entre NORs homólogas y no homólogas, en especies con sistemas de NORs múltiples, por poseer sólo dos parejas de cromosomas portadores. De acuerdo con la bibliografía existente al respecto (Sánchez y col., 1989), los individuos de esta especie, analizados en el presente trabajo, presentaron un cariotipo con $2n=48$ cromosomas, de los cuales las parejas 14 y 22 eran portadoras de NORs

localizadas intersticialmente (Fig. 8).

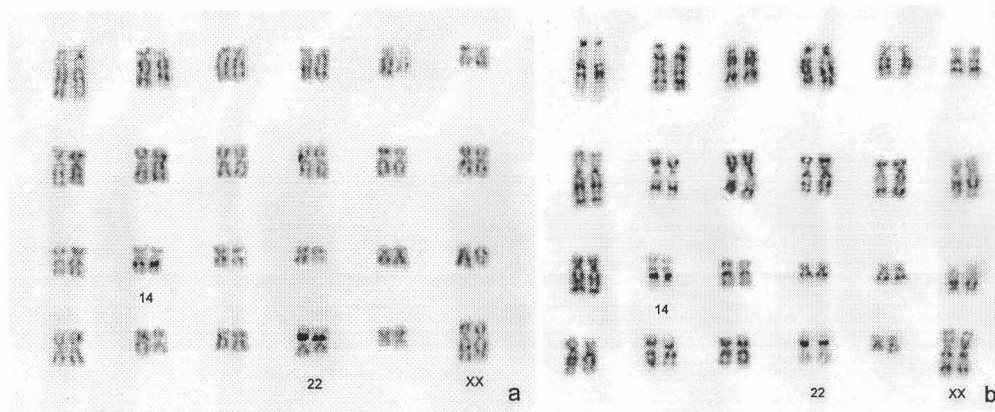


Figura 8.- Cariotipos de *Eliomys quercinus* que muestran: a) cromosomas teñidos con AgNO_3 . b) Cromosomas teñidos con AgNO_3 y tratados con bandas G simultáneamente. Se han numerado las dos parejas de cromosomas portadoras de NOR (14 y 22)

Se analizaron un total de 287 placas metafásicas pertenecientes a cinco individuos de esta especie. Al igual que en *Talpa occidentalis*, no se observó ningún cromosoma que, habiendo mostrado señal de plata, no mostrara posteriormente una señal de hibridación. Este hecho sugiere igualmente en *E. quercinus* que la tinción previa con NO_3Ag no interfiere en la posterior hibridación sobre la misma placa metafásica.

El hecho de presentar dos parejas portadoras de NOR hace que la recogida de datos en esta especie presente ciertas peculiaridades. Para poder establecer las relaciones entre el tamaño, tanto de las distintas señales Ag como de las de HIS, las células analizadas se clasificaron asignándoles una combinación de cuatro dígitos para cada una de las técnicas, cada uno de los cuales corresponde a uno de los cromosomas

portadores de NOR. Estos dígitos arbitrarios van del 1 al 4, correspondiendo el 1 a la señal de mayor tamaño, el 2 a la de un tamaño inmediatamente inferior y así sucesivamente hasta el valor 4, que correspondería a la señal de menor tamaño presente en la célula. Hemos adjudicado los dos primeros dígitos a los cromosomas de la pareja 22, y los dos siguientes a los de la pareja 14. Los cuatro dígitos posibles, tanto para señales Ag como para señales HIS, se darían solamente en aquellas células que presentasen cuatro señales distintas entre sí. En células con cuatro señales, de las cuales dos son iguales entre sí y, por tanto, sólo presentan tres tamaños de NOR diferentes, ningún cromosoma tendría la categoría 4. Por ejemplo, la combinación 1,2,1,3 indicaría que hay dos señales mayores, de tamaño similar, una en un cromosoma 22 y otra en un cromosoma 14, y además, una señal menor en un cromosoma del par 22 y otra aún más pequeña en el cromosoma restante del par 14. De la misma manera, la combinación 1,2,1,1 correspondería a una célula que presentase tres señales iguales y una menor correspondiente a un homólogo del par 22. Una célula con cuatro señales iguales tendría la combinación 1,1,1,1. La figura 9 muestra un ejemplo de varios de estos tipos celulares.

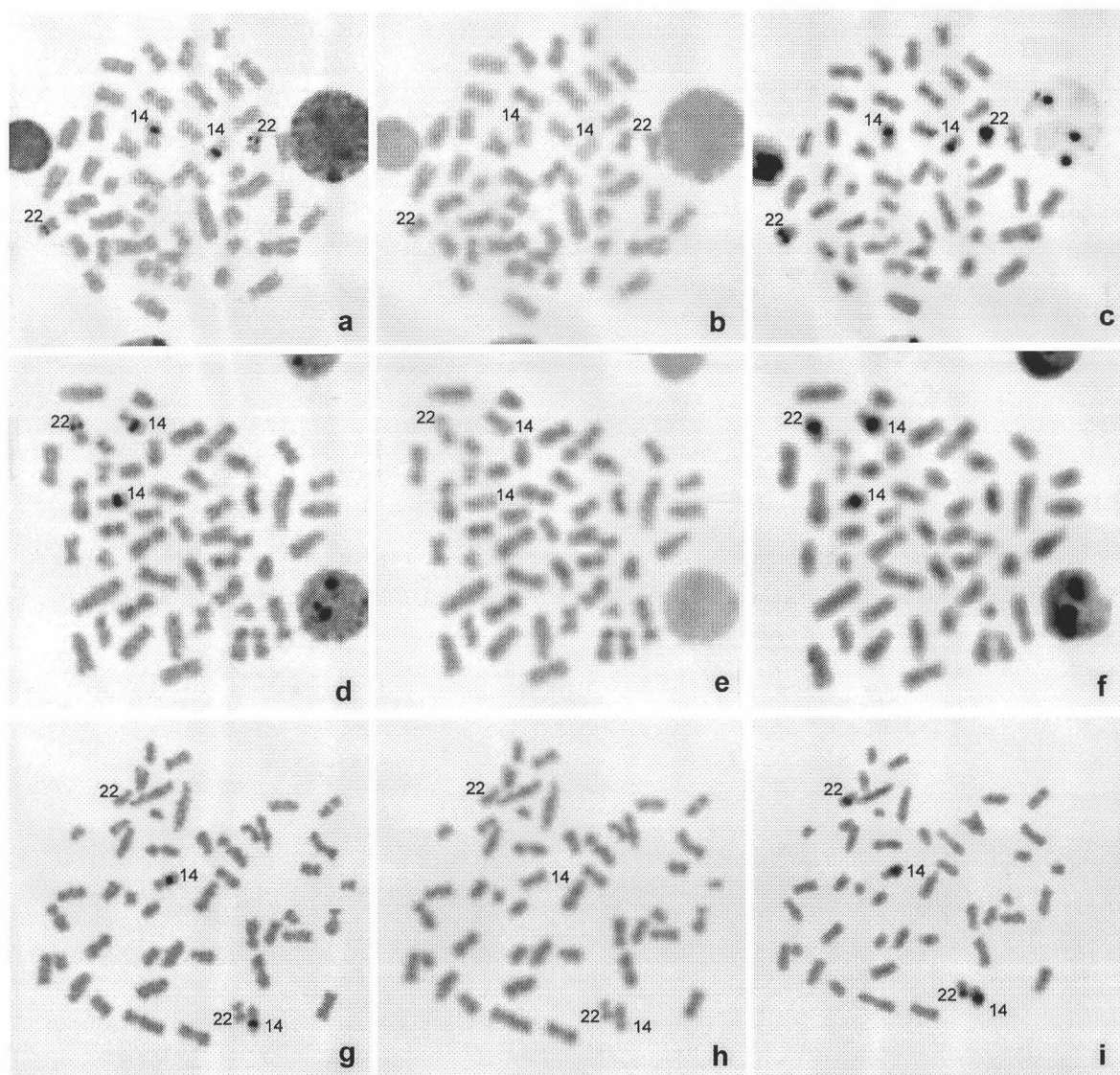


Figura 9.- Tinción secuencial (Ag-HIS) en células de *Eliomys quercinus*. **a)** Célula con 4 señales Ag de tipo 2211, **b)** la misma célula desteñida y **c)** HIS en esta misma célula mostrando que se trata de una célula de tipo 2111. **d) e) y f)** Tinción secuencial en una célula de tipo 5211 para las señales Ag, y de tipo 5111 para las HIS. **h) i) j)** Tinción secuencial en una célula de tipo 5511 para las señales Ag, y de tipo 2212 para las HIS.

No obstante hay que tener en cuenta que estos valores son relativos de unos cromosomas con respecto a otros, dentro de la misma célula y, por tanto, no son válidos para hacer comparaciones entre cromosomas de distintas células. De hecho una señal con categoría 2 en una célula podría ser igual en tamaño absoluto a otra con categoría 1 que pertenezca a una célula distinta. Finalmente a los cromosomas que no mostraron alguna de las señales se les ha asignado el valor 5. Según estos criterios se clasificaron todas las células tanto para las señales HIS como para las señales Ag (ver tablas del apéndice de datos). Con los datos obtenidos, así ordenados, procedimos a establecer las relaciones entre NORs homólogos y no homólogos como veremos a continuación. Para comparar el tamaño relativo de las dos señales pertenecientes a cromosomas homólogos, nos fijamos en los dígitos de uno de los cromosomas de la pareja 22 y lo comparamos con su homólogo procediendo de la misma forma para la pareja 14. Al comparar esos valores, obtenemos la distribución de clases celulares para cada una de las parejas de homólogos por separado. De la misma forma que en *T. occidentalis*, hemos diferenciado nueve clases celulares, para cada par de homólogos considerados independientemente, en función del tamaño relativo de ambas señales. Las Tablas 11 y 12 recogen los datos clasificados de esta forma.

Tabla 11.- Número de células contabilizadas en cinco individuos de *Eliomys quercinus*, clasificadas de acuerdo con el número y tamaño relativo de las señales Ag e HIS obtenidas mediante tinción secuencial. Esta tabla recoge los datos referidos sólo a la pareja 22.

Pareja 22		HIS			total
Individuo	Ag	Una señal	Dos señales similares	Dos señales diferentes*	
EQ-1	Una señal	3	0	11(11+0)	14
	Dos señales similares	0	5	23	28
	Dos señales diferentes	0	2	36(34+2)	38
Total		3	7	70	80
EQ-2	Una señal	32	0	3(3+0)	35
	Dos señales similares	0	2	2	4
	Dos señales diferentes	0	0	6(5+1)	6
total		32	2	11	45
EQ-3*	Una señal	10	1	17(12+5)	28
	Dos señales similares	0	1	2	3
	Dos señales diferentes	0	0	6(4+2)	6
total		10	2	25	37
EQ-4	Una señal	13	3	19(13+6)	35
	Dos señales similares	0	5	10	15
	Dos señales diferentes	0	6	16(12+4)	22
total		13	14	45	72
EQ-5*	Una señal	20	10	17(8+9)	47
	Dos señales similares	0	0	0	0
	Dos señales diferentes	0	0	3(2+1)	3
total		20	10	20	50

*: El individuo EQ-3 mostró, además de las células recogidas en la tabla, 2 células que presentaron señal de hibridación en los cromosomas de la pareja 22 pero ninguno de ellos mostró señal Ag. El individuo EQ-5 mostró además 3 células con una señal HIS en la pareja 22 y una célula con dos señales HIS sin que en ninguna de ellas apareciera señal Ag.

Tabla 12.- Número de células contabilizadas en cinco individuos de *Eliomys quercinus*, clasificadas de acuerdo con el número y tamaño relativo de las señales Ag e HIS obtenidas mediante tinción secuencial. Esta tabla recoge los datos referidos sólo a la pareja 14.

Pareja 14		HIS			total
Individuo	Ag	Una señal	Dos señales similares	Dos señales diferentes*	
EQ-1*	Una señal	6	5	6(6+0)	17
	Dos señales similares	0	4	33	37
	Dos señales diferentes	0	4	19(18+1)	23
Total		6	13	58	77
EQ-2	Una señal	9	1	2(1+1)	12
	Dos señales similares	0	7	7	14
	Dos señales diferentes	0	4	15(14+1)	19
total		9	12	24	45
EQ-3*	Una señal	6	2	9(5+4)	17
	Dos señales similares	0	2	1	3
	Dos señales diferentes	0	4	15(11+4)	19
total		6	8	25	39
EQ-4*	Una señal	16	7	13(7+6)	36
	Dos señales similares	0	4	12	16
	Dos señales diferentes	0	7	12(11+1)	19
total		16	18	37	71
EQ-5*	Una señal	19	6	12(4+8)	37
	Dos señales similares	0	0	2	2
	Dos señales diferentes	0	0	2(2+0)	2
total		19	6	16	41

*: El individuo EQ-1 mostró, además de las células recogidas en la tabla, 3 células que presentaron señal de hibridación en los cromosomas de la pareja 14 pero ninguno de ellos mostró señal Ag. El individuo EQ-3 mostró además 1 célula con una señal HIS en uno de los cromosomas de la pareja 14 sin señal Ag. El individuo EQ-4 mostró una célula sin señales de ningún tipo en la pareja 14. El individuo EQ-5 mostró 12 células con señales HIS pero sin señales Ag.

En estas tablas podemos ver que nos encontramos con células que poseen una única señal HIS y una única señal Ag, células con dos señales de similar tamaño HIS y una única señal Ag, células con dos señales distintas HIS y dos señales distintas Ag, etc. De esta manera hemos obtenido dos tablas en cada individuo, una tabla con la distribución de clases celulares para la pareja 22 y otra con la distribución para la pareja 14.

Los resultados obtenidos fueron analizados para cada una de las parejas consideradas independientemente la una de la otra. Este estudio se realizó mediante un análisis logarítmico-lineal bajo la hipótesis de independencia del eje "individuo" respecto de los otros dos (HIS y Ag). Este análisis demostró diferencias interindividuales significativas en dicha distribución para ambas parejas de cromosomas portadores de regiones NORs ($\chi^2=168$, $P=0.0000$ para la pareja 22; y $\chi^2=118.4$, $P=0.0000$ para la pareja 14).

Las 287 células analizadas contienen 574 cromosomas de cada pareja potencialmente portadores de regiones NORs, lo que supone un total de 1148 cromosomas objeto de estudio. Para analizar la relación de tamaños entre ambas señales tanto en la pareja 22 como en la 14 construimos las tablas 13 y 14 en los que el análisis estadístico demuestra la dependencia de los dos ejes de la tabla, esto es, una asociación

significativa entre el tamaño de las dos señales. Como en *Talpa*, también aquí hemos establecido las relaciones de concordancia y discordancia entre el tamaño de las señales Ag e HIS en cada una de las células analizadas en los cinco individuos de *E. quercinus* (Tabla 15). En este caso podemos cuantificar el número de concordancias y discordancias tanto a partir de los datos resumidos en las tablas 13 y 14 como directamente a partir de las combinaciones de dígitos que definen cada una de las células analizadas.

Tabla 13.- Tablas de contingencia que muestran los datos de los cinco individuos de *Eliomys quercinus* en las que se analiza la posible asociación entre el tamaño relativo de las señales Ag e HIS en los cromosomas de las células tratadas secuencialmente con ambas técnicas.

Pareja 22		Tamaño relativo de la señal HIS			Estadístico
Individuo	Tamaño relativo de la señal Ag	Mayor	Igual	Menor	
EQ-1	Mayor	48	2	2	$\chi^2=98.1381$ P=0.00000 cc=0.6166
	Igual	23	10	23	
	Menor	2	2	48	
EQ-2	Mayor	40	0	1	$\chi^2=120.553$ P=0.00000 cc=0.7567
	Igual	2	4	2	
	Menor	1	0	40	
EQ-3	Mayor	26	1	7	$\chi^2=32.4087$ P=0.00000 cc=0.5519
	Igual	2	2	2	
	Menor	7	1	26	
EQ-4	Mayor	39	8	10	$\chi^2=41.9889$ P=0.00000 cc=0.4751
	Igual	10	10	10	
	Menor	10	8	39	
EQ-5	Mayor	30	10	10	$\chi^2=20.000$ p=0.00001 cc=0.4083
	Igual	0	0	0	
	Menor	10	10	30	

cc: Coeficiente de contingencia

Tabla 14.- Tablas de contingencia que muestran los datos de los cinco individuos de *Eliomys quercinus* en las que se analiza la posible asociación entre el tamaño relativo de las señales Ag e HIS en los cromosomas de las células tratadas secuencialmente con ambas técnicas.

Pareja 14		Tamaño relativo de la señal HIS			Estadístico
Individuo	Tamaño relativo de la señal Ag	Mayor	Igual	Menor	
EQ-1	Mayor	30	9	1	$\chi^2=54.3345$ p=0.00000 cc=0.5107
	Igual	33	8	33	
	Menor	1	9	30	
EQ-2	Mayor	24	5	2	$\chi^2=53.8966$ p=0.00000 cc=0.6120
	Igual	7	14	7	
	Menor	2	5	24	
EQ-3	Mayor	22	6	8	$\chi^2=22.1909$ p=0.0002 cc=0.4706
	Igual	1	4	1	
	Menor	8	6	22	
EQ-4	Mayor	34	14	7	$\chi^2=35.5149$ p=0.00000 c.c=0.4473
	Igual	12	8	12	
	Menor	7	14	34	
EQ-5	Mayor	25	6	8	$\chi^2=18.021$ p=0.012 cc=0.4251
	Igual	2	0	2	
	Menor	8	6	25	

cc: Coeficiente de contingencia

Tabla 15.- Número de cromosomas concordantes y discordantes, observados y esperados, en los cinco individuos de *Eliomys quercinus*, clasificados de acuerdo al tamaño relativo de las señales Ag e HIS obtenidos mediante tinción secuencial.

PAREJA 22				
Individuo		Número de cromosomas concordantes	Número de cromosomas discordantes	Estadístico
EQ-1	Observados	131	29	$\chi^2=65.025$
	Esperados	80	80	p=0.0000
EQ-2	Observados	86	4	$\chi^2=74.7111$
	Esperados	45	45	p=0.0000
EQ-3	Observados	57	17	$\chi^2=21.6216$
	Esperados	37	37	p=0.0000
EQ-4	Observados	106	38	$\chi^2=32.1111$
	Esperados	72	72	p=0.0000
EQ-5	Observados	70	30	$\chi^2=16$
	Esperados	50	50	p=0.0001

PAREJA 14				
EQ-1	Observados	110	44	$\chi^2=28.2857$
	Esperados	77	77	p=0.0000
EQ-2	Observados	74	16	$\chi^2=37.3778$
	Esperados	45	45	p=0.0000
EQ-3	Observados	55	23	$\chi^2=13.1282$
	Esperados	39	39	p=0.0003
EQ-4	Observados	102	40	$\chi^2=27.0704$
	Esperados	71	71	p=0.0000
EQ-5	Observados	58	24	$\chi^2=17.4444$
	Esperados	36	36	p=0.0000

Al comparar los cromosomas homólogos, observamos que el número de concordancias es ligeramente superior en la pareja 22 a la pareja 14, y que ambos son mayores a los observados en *Talpa*.

Para investigar la posible relación entre NORs no homólogos, calculamos el número de concordancias y discordancias que resultan al comparar cada uno de los cromosomas de la pareja 22 con cada uno de los de la pareja 14 (tabla 16).

Tabla 16.- Número de concordancias y discordancias, observadas y esperadas, obtenidas al comparar cada homólogo de cada pareja con ambos homólogos de la otra pareja.

CONCORDANCIAS Y DISCORDANCIAS 22/14				
Individuo		Número de concordancias	Número de discordancias	Estadístico
EQ-1	Observadas	424	156	$\chi^2=123.8$
	Esperadas	290	290	$p<0.001$
EQ-2	Observadas	262	50	$\chi^2=144.1$
	Esperadas	156	156	$p<0.001$
EQ-3	Observadas	158	74	$\chi^2=30.4$
	Esperadas	116	116	$p<0.001$
EQ-4	Observadas	397	149	$\chi^2=112.6$
	Esperadas	273	273	$p<0.001$
EQ-5	Observadas	221	79	$\chi^2=67.2$
	Esperadas	150	150	$p<0.001$

Los resultados muestran que hay significativamente más concordancias que discordancias, al igual que ocurría cuando se

comparaban los dos homólogos de una pareja entre sí.

Por otra parte, la suma de los valores asignados a cada par de homólogos para cada una de las técnicas en cada célula y la posterior comparación de estas sumas nos ha permitido obtener, tanto el número de células donde la pareja 22 contiene mayor, igual o menor número de copias que la 14, como el número de células donde la expresión ha sido asimismo, mayor, menor o igual (tabla 17).

Tabla 17.- Número de células clasificadas según la cantidad relativa de cistrones ribosómicos presentes en cada pareja de cromosomas portadores de NOR, así como según su nivel relativo de expresión

Número de copias	más copias en pareja 22	más copias en pareja 14	igual número de copias
EQ-1	34	15	31
EQ-2	12	32	1
EQ-3	15	18	6
EQ-4	40	20	14
EQ-5	31	20	4
Total	132	105	56

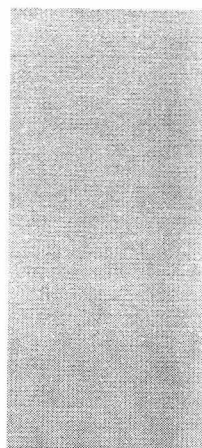
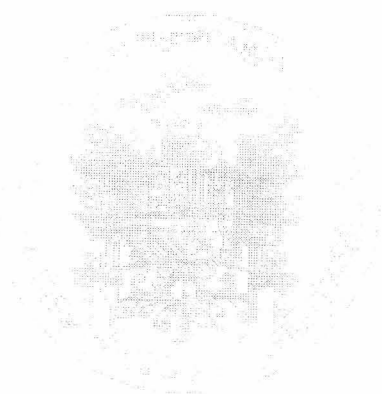
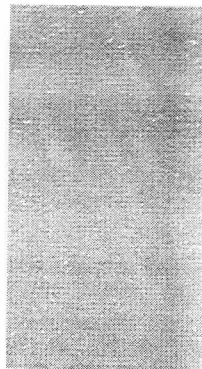
Expresión	más expresión en pareja 22	más expresión en pareja 14	La misma expresión
EQ-1	40	17	23
EQ-2	11	29	3
EQ-3	13	19	6
EQ-4	39	25	11
EQ-5	41	10	4
Total	144	100	44

Los resultados muestran que en tres de los individuos (EQ-1, EQ-4 y EQ-5) hay un número de células mayor donde la pareja 22 contiene mayor número de copias que la pareja 14. En EQ-2 la mayoría de las células tienen un sólo 22 y los dos homólogos del par 14 y como era de esperar son más frecuentes las células donde la pareja 14 tiene mayor número de copias. En EQ-3 son aproximadamente igual de frecuentes las células donde hay más copias en la 22 que aquellas donde hay más copias en la 14.

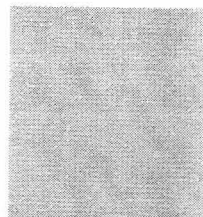
Utilizando el mismo procedimiento hemos obtenido el número de células donde los niveles de expresión alcanzados por la pareja 22 son mayores, menores o iguales a los niveles de expresión de la pareja 14. Los resultados evidencian mayor número de células donde los homólogos de la pareja 22 han mostrado niveles de expresión más altos que los de la pareja 14. Excepto en EQ-2 y EQ-3, que poseen niveles de expresión más altos para el par 14.

Con objeto de comprobar si las diferencias mencionadas, tanto para el número de copias como para la expresión, en los distintos individuos son significativas, se analizaron ambas distribuciones por separado mediante una χ^2 de contingencia. Los resultados permitieron rechazar la hipótesis de independencia del número de copias y de los niveles de expresión respecto al individuo ($\chi^2=58.8$, $P=0.0000$, para el número de copias; y

$\chi^2=51.3$, $P=0.0000$, para los niveles de expresión), por lo que podemos concluir que ambas distribuciones son diferentes en los distintos individuos. Con objeto de comprobar si estas dos distribuciones varían o no de forma paralela, los datos fueron situados en una tabla de tres vías en la que el nuevo eje contemplaba el tipo de señal (HIS y Ag) como representativas del número de copias y de los niveles de expresión respectivamente. La hipótesis de independencia de este tercer eje respecto a los otros dos no pudo rechazarse ($\chi^2=8.8$, $P=0.8436$), por lo que podemos concluir que ambas distribuciones, discurren paralelas, es decir, aquellos individuos que presentaron mayor número células con mayor número de copias en la pareja 22 presentaron asimismo mayor número de células con mayor nivel de expresión en esta misma pareja, ocurriendo lo mismo en lo que se refiere a los que las presentaron en la pareja 14 y, además, las variaciones en la expresión en los diferentes individuos guardan entre sí las mismas proporciones que las variaciones en número de copias.



DISCUSIÓN



DISCUSION

La tinción con nitrato de plata, sobre cromosomas metafásicos, pone de manifiesto las regiones cromosómicas que han organizado el nucleolo en la interfase precedente del ciclo celular. La variabilidad interindividual e intercelular que afecta tanto al tamaño como al número de esas regiones ha sido descrita en muchas especies de insectos (Díez y Puertas, 1986), peces (Gold, 1984; Galleti y col., 1985), anfibios (Schmid, 1982), y mamíferos (Sánchez y col., 1989; Mellink y col., 1994) incluida la especie humana (Mayr y col., 1984).

Los resultados obtenidos en *Talpa occidentalis* cuando las preparaciones cromosómicas fueron teñidas con nitrato de plata, nos indican la existencia de tres clases celulares:

a) Células con una sola señal (48.6%) y por tanto con una sola NOR activa en la interfase precedente.

b) Células con dos señales aproximadamente iguales en tamaño (24.5%) lo que indica que ambas NORs alcanzaron niveles similares de expresión.

c) Células con dos señales de distinto tamaño (26.9%), lo que indica

niveles distintos en las tasas transcripcionales de las dos NORs de una misma célula.

Ya que la presencia o ausencia, y el tamaño relativo, de la señal de plata es un indicador de la actividad transcripcional de las NORs en la interfase previa del ciclo celular (Miller y col, 1976), el heteromorfismo observado en los depósitos de plata de ambas NORs (células donde o bien hay una única señal, o bien dos señales de distinto tamaño), debe ser la consecuencia de diferencias en la actividad transcripcional de los mismos. El hecho de que en aproximadamente la mitad de las células se exprese uno sólo de los alelos, o bien los dos pero uno de ellos a tasas tan bajas que no son detectables por la técnica, sugiere que en esas células, y en esa situación metabólica concreta, la activación de un sólo alelo ha sido suficiente para satisfacer los requerimientos fisiológicos de rRNA.

Por otra parte la técnica de hibridación *in situ*, pone de manifiesto la presencia de cistrones ribosómicos en las NOR con independencia de su estado transcripcional en la interfase previa del ciclo celular. El tamaño relativo de la señal HIS de estas NORs refleja las diferencias existentes en el número de cistrones ribosómicos (Appels y col., 1980; Wachtler y col., 1986; Suzuki y col., 1990; Leitch y Heslop-Harrison, 1992). Por tanto, cuando se visualizaron dos señales HIS en placas metafásicas de *Talpa occidentalis*, el tamaño relativo de estas nos permitió estimar el contenido

relativo de dichos cistrones ribosómicos entre las NORs de ambos homólogos. La utilización de la hibridación *in situ* sobre placas metafásicas de los mismos individuos, nos dió los siguientes resultados:

a) células con una única señal detectable (2.6%), lo que indica que esas células o bien carecen de cistrones ribosómicos en uno de los alelos, o bien tienen un número tan bajo de ellos que escapa a la sensibilidad de la técnica. Esto demuestra que el número mínimo de cistrones ribosómicos requerido para la viabilidad de una célula puede estar localizado en un solo cromosoma de esta especie.

b) Células con dos señales similares en cuanto al tamaño (60.1%) y, por tanto, con un número similar de cistrones ribosómicos en ambas NORs (señales homomórficas). Es el tipo celular más frecuente y podría sugerir una tendencia a nivelar el número de copias existente en ambos alelos.

c) Células con dos señales distintas (37.3%) y, por tanto, con diferente número de copias en ambos alelos (señales heteromórficas). Este hecho se explicaría por los intercambios desiguales entre el DNA repetitivo de cromosomas homólogos que podrían tener lugar durante la recombinación somática.

Estos resultados demuestran claramente la existencia de variabilidad interindividual, intercelular e intercromosómica en *Talpa occidentalis*, tanto para el número de copias como para los niveles de expresión de las NORs.

Dicha variabilidad plantea la cuestión de si las diferencias transcripcionales intercromosómicas (heteromorfismo para señales obtenidas con nitrato de plata) son debidas, al menos en parte, a diferencias en cuanto al contenido en cistrones ribosómicos (heteromorfismo para la señal de hibridación). Cuando se compararon las frecuencias de las distintas clases celulares obtenidas con ambas técnicas en una tabla de contingencia (tabla 3) se observó que las distribuciones de las distintas clases celulares son función de la técnica empleada. La comparación de estos datos sugiere que un número alto de cromosomas portadores de NORs han estado transcripcionalmente inactivos en la interfase precedente del ciclo celular, ya que son muy pocas las células que tienen cistrones ribosómicos en uno sólo de los cromosomas (2.6%) y, sin embargo, un porcentaje alto de las células (48.6%) muestran una única señal de plata. Por tanto, esas frecuencias indican que muchas de las células que han activado uno sólo de los alelos, tienen cistrones ribosómicos en ambas NORs. Quedaba por contestar el interrogante de qué factor o factores determinan que una NOR concreta se active o permanezca inactiva.

Por otra parte, la distribución de células con cromosomas que mostraron señales de hibridación similares (60.1%) difiere significativamente de las células que muestran actividades transcripcionales similares (24.5%). Esto significa que a pesar de tener un

número parecido de cistrones ribosómicos en ambas NORs, muchas de las células no los expresan en cantidades similares. Por tanto, cabe pensar que el nivel de actividad transcripcional de una NOR determinada no depende exclusivamente del número de cistrones ribosómicos que posea un alelo con respecto a otro, ya que, a pesar de tener un número similar de copias en los dos cromosomas, la actividad transcripcional de estos es distinta. Si los niveles de expresión dependieran exclusivamente del número de copias relativo que una NOR posee con respecto a su homóloga, cabría esperar que las frecuencias de células con dos señales similares obtenidas con ambas técnicas fuera parecida. Probablemente, otros factores implicados en la activación de la transcripción puedan contribuir a la variabilidad observada en las regiones NORs.

Las consideraciones anteriores se basan no obstante, en evidencias indirectas y se hizo necesario poner a punto una técnica que permitiera visualizar secuencialmente y sobre los mismos cromosomas, tanto la señal que obtuviéramos con nitrato de plata como la posterior señal que obtuviéramos con hibridación *in situ*. Esto nos permitiría relacionar el nivel de actividad transcripcional de la NOR de un cromosoma concreto con la cantidad de rDNA presente en la misma.

En 1979 Warburton y Henderson describieron una técnica de tinción secuencial con nitrato de plata y posterior hibridación *in situ* (aunque los

autores no presentaron evidencias gráficas de sus resultados). Utilizando su protocolo como punto de partida, nosotros hemos desarrollado una técnica modificada de tinción secuencial que es altamente reproducible en las dos especies de mamíferos estudiadas: *Talpa occidentalis* y *Eliomys quercinus*. Las modificaciones con respecto al protocolo de Warburton y Henderson interesan principalmente a las técnicas de HIS y tinción con nitrato de plata, mientras que hemos conservado el paso intermedio (destinción del nitrato de plata). Con esta técnica analizamos secuencialmente una muestra significativa de células de cinco individuos de *Talpa occidentalis*, lo que nos permitió comparar el tamaño relativo de las señales obtenidas con ambas técnicas. Para que los datos obtenidos con el proceso de tinción secuencial fueran fiables, esto es, para asegurarnos de que la tinción con nitrato de plata no interfería en la posterior HIS, analizamos la variabilidad que mostraron dos individuos de *Talpa occidentalis* tomados al azar para la HIS, y la comparamos con la variabilidad que se observaba en esos mismos individuos cuando las preparaciones habían sido sometidas al proceso de tinción secuencial. La tabla 4 muestra claramente que la tinción previa con nitrato de plata no interfiere en la posterior HIS realizada sobre las mismas células. Otro hecho en favor de esta hipótesis es que cuando una célula presenta una única señal con nitrato de plata en uno de los homólogos y una única señal de

hibridación, estas dos señales siempre están presentes en el mismo cromosoma. No encontramos una sola célula que mostrando una señal de plata, no mostrase su correspondiente señal de hibridación en ninguna de las dos especies analizadas.

La técnica de tinción secuencial nos ha permitido también abordar de nuevo el tema del significado biológico de la tinción con plata en las NORs mitóticas, incluyendo en esta ocasión datos relativos a la posible influencia que sobre el mismo pudiera tener el contenido en cistrones ribosómicos de las citadas NORs. Tal como se indicó en el apartado de Resultados, Jiménez y col. (1988) habían demostrado que el estado descondensado de la cromatina NOR era necesario, pero no suficiente, para que se produjera la tinción con nitrato de plata, sugiriendo así la necesidad de factores adicionales, (probablemente implicados en la activación de la transcripción) para que las NOR de una célula mostraran tinción positiva. Retomando esa línea, hemos estudiado la relación entre el estado descondensado de la cromatina NOR y la presencia o ausencia de señales de hibridación. Nuestros resultados demuestran que:

a) La presencia de una constricción secundaria visible está significativamente asociada a la presencia de una señal HIS.

b) Los cromosomas que no mostraron señal HIS tampoco presentaron previamente una constricción secundaria.

c) Existen cromosomas con señal HIS que sin embargo no mostraron constricción secundaria.

De estas tres observaciones, deducimos que la presencia de cistrones ribosómicos es también necesaria, pero no suficiente, para la formación de una constricción secundaria visible. Los resultados demuestran asimismo una clara asociación entre el tamaño de la constricción secundaria y el tamaño de la posterior señal HIS. A la luz de estos resultados, proponemos que la funcionalidad de las NORs seguiría el siguiente orden cronológico de acontecimientos:

1) Presencia en la NOR de una cantidad mínima de cistrones ribosómicos, detectables por HIS.

2) Descondensación de la cromatina NOR y formación de constricción secundaria visible.

3) Transcripción de esa NOR, a niveles detectables por tinción con plata.

Este modelo también supone que esos pasos deben tener lugar en ese orden concreto. La tinción con plata tiene lugar cuando la cromatina NOR descondensada, contiene cistrones ribosómicos que se han transcrito en la interfase previa. Igualmente, la constricción secundaria se hace visible si la NOR posee una cantidad suficiente de cistrones ribosómicos. Sin embargo, la existencia de una cantidad suficiente de cistrones ribosómicos en una

NOR dada, no asegura la formación de una constricción secundaria visible, de la misma manera que una constricción secundaria visible tampoco asegura la tinción con nitrato de plata de la región NOR. Esta podría ser una causa de la fuerte controversia que ha rodeado al significado de las NORs durante varios años (ver Jiménez y col., 1988).

Volviendo de nuevo a la relación entre el contenido en cistrones ribosómicos de las NORs, y su nivel de expresión, los datos cromosómicos contenidos en la tabla 7 y el número de casos de "concordancia" y "discordancia" que se muestran en la tabla 8, demuestran claramente una asociación directa entre ambas variables. Nuestros resultados son una clara evidencia de que el nivel de actividad transcripcional de una NOR depende directamente del número de cistrones ribosómicos. También se demuestra que se activaba la NOR que presentaba la señal de hibridación mayor (y por tanto mayor número de cistrones ribosómicos), lo que implica que la jerarquía en la activación de las NORs está también condicionada por la cantidad de cistrones ribosómicos que posee. No obstante existe una pequeña proporción de células en todos los individuos donde esta tendencia está invertida. Este hecho sugiere que la región NOR con mayor número de copias será activada probablemente (pero no seguro) de manera preferencial y alcanzará un mayor nivel de expresión que su homólogo con menos número de copias.

El análisis de regresión demostró que, tanto el porcentaje de "concordancias" como el porcentaje de células que muestran una única señal de plata están significativamente correlacionadas con la proporción de células que muestran NORs heteromórficas. Ya que la proporción de células con NOR heteromórficas depende en cada individuo de las diferencias de tamaño entre ambas NORs homólogas (particularmente patente en el individuo T-427), nuestros resultados sugieren: 1) que como previamente habíamos demostrado, existen diferencias interindividuales en el contenido relativo en rDNA entre los dos cromosomas portadores de NOR y 2) que este hecho puede ser la causa primaria de las variaciones interindividuales tanto en el número como en el nivel relativo de expresión de las NORs.

El siguiente nivel en orden creciente de complejidad lo presenta *Elimoys quercinus*, una especie que posee 2 parejas portadoras de NORs. Sánchez y col. en 1989 demostraron la existencia de variabilidad interindividual en cuanto a la expresión de las NORs en una población de esta especie. Los autores analizaron la frecuencia de distintos tipos de células clasificadas según el número de NORs activas que presentaban (1-4) en un total de ocho individuos. Los resultados de este estudio mostraron que determinadas combinaciones de NORs activos aparecían con más frecuencia que otras. Los autores propusieron la existencia de algún tipo de

interacción entre NORs homólogas y no homólogas que determinaría esa frecuencia y orden de activación. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los anteriores en poner de manifiesto esa variabilidad en la expresión de las NORs.

La observación de los resultados obtenidos muestra que la distribución de tipos celulares es cualitativamente similar para cada una de las parejas portadoras (consideradas independientemente) y no difiere entre los distintos individuos. Es decir, considerada una pareja de cromosomas portadores de NORs determinada, los tipos celulares donde la mayor señal de hibridación se corresponde con la mayor señal de plata son más frecuentes que los tipos celulares donde ocurre el fenómeno contrario en todos los individuos y en cada una de las parejas (con la única excepción del tipo celular donde hay dos señales de hibridación y una sola señal de plata en ambas parejas del individuo EQ-5). Esto significa que la NOR que posea mayor número de copias tenderá a expresarse a tasas más altas que su homólogo con menor cantidad de rDNA, tanto en la pareja 22 como en la pareja 14. De la misma forma, en las células con dos señales HIS de distinto tamaño y una única señal Ag, es más frecuente que la señal HIS mayor aparezca en la NOR que se ha expresado. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en *Talpa occidentalis* y, por tanto, apoyan también la hipótesis de que tanto el orden en la jerarquía de expresión

como los niveles relativos de expresión de NORs homólogas están determinados por el contenido relativo en el número de copias que poseen. Así, tanto en la pareja 22 como en la 14 será más probable que el alelo con mayor número de copias se exprese antes, y a tasa más altas que su homólogo.

Si tenemos en cuenta que el porcentaje de células con NORs heteromórficos está correlacionado generalmente con el porcentaje de concordancia al considerar NORs homólogas, tanto en *T. occidentalis* como en *E. quercinus*, no es de extrañar el hecho de que los porcentajes de concordancia entre cromosomas homólogos observados en *E. quercinus* sean similares a los detectados en *T. occidentalis* dado que aquella especie mostró porcentajes de células heteromórficas similares a los de esta. Por tanto concluimos que la relación estructura-función observadas entre las NORs homólogas de las dos parejas portadoras de *E. quercinus* son similares a la observada entre los homólogos de la única pareja portadora de *T. occidentalis*.

Por otro lado, los porcentajes de concordancia obtenidos al comparar el tamaño relativo de los dos tipos de señal (HIS y Ag) en NORs pertenecientes a parejas distintas, resultaron no ser significativamente diferentes a los observados al comparar cromosomas pertenecientes a la misma pareja. En términos de nivel y orden de activación, este hecho indica

que la relación existente entre NORs no homólogas es similar a la que hay entre NORs homólogas, independientemente del número de parejas portadoras de NORs que posea la célula. En consecuencia, todas las consideraciones previas, relativas a la relación entre NORs homólogas, deberían ser también válidas para NORs no homólogas. Así el orden en la jerarquía y los niveles de expresión de una NOR determinada en una especie con un sistema de NORs múltiples dependería principalmente de la cantidad de cistrones ribosómicos que posea, en relación con otras NORs del complemento, independientemente de la pareja a la que pertenezca.

Sánchez y col. (1989) demostraron en *E. quercinus* que determinadas combinaciones de NORs activas aparecían con más frecuencia que otras; por ejemplo, la combinación 22,22,14 era mucho más frecuente que la combinación 22,14,14 (excepto en un individuo) entre las células que habían expresado tres NORs. De igual forma, entre los tipos celulares que habían expresado sólo dos NORs era mucho más frecuente la combinación 22,14 que la 22,22. Puesto que nuestros datos actuales confirman estos resultados, podemos ahora explicarlos sobre la base de las anteriores consideraciones acerca de la relación entre el tamaño y la actividad de las NORs. Así, es probable que la mayor parte de los individuos de la especie *E. quercinus* posean en sus células una jerarquía de tamaños de NOR, cuyo orden se ajuste a la secuencia 22,14,22,14. De acuerdo con esto, entre las

células con tres NORs el caso más probable sería aquél que mostrase los dos 22 y un 14, mientras que aquellos con sólo dos NORs activos, lo más frecuente sería un 22 y un 14.

La activación de la transcripción de los cistrones ribosómicos, y por tanto la expresión de las NORs, requiere la unión de factores de transcripción a los promotores, y además se ha demostrado que la actividad NOR está principalmente regulada a través de la tasa de inicio de la transcripción (Wolf y col., 1980; Dauphinais, 1981; Dembinski y Bell, 1984). Sobre la base de esas consideraciones, nosotros proponemos el siguiente modelo que explica la jerarquía y el nivel relativo de expresión de NORs homólogas y no homólogas, con respecto a cómo, cuándo y a qué nivel tiene lugar esa unión. Este modelo incluye dos etapas sucesivas y es coherente con el conocimiento actual sobre la estructura y función de las NORs.

Etapas 1) En el momento en que se determina el patrón de expresión de las NORs de una célula dada, los factores de transcripción se unirían al azar a los cistrones ribosómicos, de manera que cualquier cistrón tendría la misma probabilidad que otro de captar los factores de transcripción necesarios para su activación y que están en concentraciones limitantes. Como consecuencia de ello, si las NORs de una célula tienen diferente número de cistrones ribosómicos en ambos alelos, el alelo con mayor

número de copias tendría más probabilidad de poseer el cistrón que capte el primer factor de transcripción, siendo por tanto activado preferencialmente. Esto explicaría la jerarquía de activación que hemos observado en *Talpa occidentalis* y *Eliomys quercinus*, donde la NOR con mayor número de copias muestra frecuentemente mayor actividad (mayor señal Ag), en células con NORs heteromórficas. Sin embargo una proporción minoritaria de las células muestra que ha sido la NOR más pequeña (esto es, con menor número de copias que su homóloga), la que ha captado el primer factor de transcripción, y ha sido más activa que la NOR mayor. Ese hecho es también posible según el modelo, aunque menos probable, y explicaría la menor frecuencia de células donde la NOR más pequeña fue activada preferencialmente.

Etapa 2) Una vez unido el primer factor de transcripción disponible, el resto de los factores lo harían de manera cooperativa, de forma que éstos últimos tendrían más afinidad por el promotor que los cistrones adyacentes a aquél que reclutó los primeros factores disponibles. Esto podría ser el resultado de alteraciones en la cromatina NOR, en la estructura del rDNA, o consecuencia de la acción de los intensificadores de la transcripción (ver Sollner-Webb y Tower, 1986). Como consecuencia de la unión cooperativa, habría una fuerte tendencia a que la NOR que unió el primer factor de transcripción sea completamente activada antes de que la NOR homóloga

empiece a captar factores, lo que tendría lugar solamente si la primera NOR fuese incapaz de satisfacer los requerimientos de rRNA de la célula en esa situación fisiológica determinada. La hipótesis de una unión cooperativa es coherente con la mayoría de nuestras observaciones en *Talpa occidentalis* y *Eliomys quercinus*. En el individuo T-427 que presenta una alta proporción de células con NORs heteromórficas, la mayoría de esas células activan sólo la NOR de mayor tamaño (ver tabla 9), un hecho que sería difícil de explicar si la unión no fuera cooperativa. En este individuo es llamativa la diferencia de tamaño entre las dos NORs observada en la mayoría de las células. Igualmente, el modelo es también coherente con los casos de células que mostraban dos señales diferentes de hibridación *in situ* y que habían expresado sus NORs en niveles distintos. La mayoría de esas células presentaron la mayor actividad en el alelo con mayor número de copias. Las células donde ocurrió el fenómeno contrario fueron significativamente menos frecuentes.

Nuestro modelo está también de acuerdo con los resultados de un gran número de estudios moleculares sobre la transcripción de genes ribosómicos en eucariotas. Experimentos *in vitro* han demostrado que cuando un molde de rDNA ha sido expuesto a la maquinaria transcripcional de un extracto celular antes de la adición de un segundo molde, la síntesis de rRNA se produce utilizando como molde sólo el primer

rDNA añadido (Wandelt y Grummt, 1983; Cizewski y Sollner-Webb, 1983). Este hecho indica que los complejos estables de transcripción de rDNA se forman con el primer molde, que secuestra todos los factores de transcripción disponibles. Un fenómeno similar podría ser el responsable de lo que ocurre *in vivo* entre las dos NORs de *Talpa occidentalis* y *Eliomys quercinus* según nuestro modelo.

Además se ha sugerido que las secuencias intensificadoras de los espaciadores entre cistrones ribosómicos (Moss, 1983; Reeder, 1984), funcionarían favoreciendo bien un deslizamiento del complejo de transcripción o bien una interacción cooperativa, lo que influiría en la formación del complejo transcripcional estable (Sollner-Webb y Tower, 1986).

De los resultados obtenidos con la técnica de la tinción secuencial, se concluye que las diferencias intercromosómicas observadas en relación con la actividad transcripcional de las NORs de las dos especies estudiadas son consecuencia directa de diferencias en el contenido relativo de cistrones ribosómicos que esas NORs poseen. Esto está en claro acuerdo con recientes estudios de citogenética molecular (Zatsepina y col., 1996), que muestran que el grado de asociación de las NORs mitóticas a los complejos de transcripción, incluido el factor de transcripción UBF de la RNA poll, está determinado por el número de repeticiones de rDNA presentes en las

NORs, más que por una afinidad diferencial de estas para unir el UBF. Además en células híbridas hamster-ratón, donde no hay eliminación preferencial de los cromosomas de ninguna de las dos especies, los cromosomas de hamster se expresan del orden de cinco veces más que los del ratón (Elicieri, 1972). Este hecho apoya nuestro modelo, sobre todo si tenemos en cuenta que el número de copias por genoma haploide en el hamster es de 250 (Amaldi y col., 1969) mientras que en el ratón es sólo de 100 (Gaubatz y Cutler, 1978), con 6 parejas portadoras cada uno de ellos. Ante este dato cabría esperar que los cromosomas de hamster se expresasen 500/200, es decir 2.5 veces más que los de ratón, pero puesto que la relación entre el número copias y la expresión no es lineal, un proceso de unión cooperativa explicaría fácilmente una expresión cinco veces mayor. Por tanto existiría de hecho una afinidad diferencial de los factores de transcripción por los cistrones de una NOR concreta, pero esta no sería más que una consecuencia directa de las diferencias en contenido de rDNA, existentes entre las distintas NORs.

Se sabe que el complejo de la RNA pol I que permaneció unido a las NORs activas durante la interfase, continúa estándolo durante la mayor parte de la mitosis (desde profase hasta el límite entre anafase y telofase) periodo en que dichas NORs están inactivas (Roussel y col. 1996). Este hecho podría hacer pensar que el ensamblaje de la maquinaria de

transcripción previa a la mitosis podría determinar el patrón de expresión de las NORs antes del comienzo del siguiente ciclo celular. Como consecuencia de ello el patrón de expresión NOR sería heredado de célula a célula, originándose así un grupo clonal de células donde dicho patrón permanecería constante. Abundando aún más en esta idea, si el mismo fenómeno afectase también a las divisiones de la línea germinal, el mismo patrón de expresión podría ser mantenido en sucesivas generaciones de individuos. Sin embargo, la variabilidad interindividual, intercelular e intercromosómica demostrada en una amplia gama de taxones, representa un sólido argumento en contra de esta posibilidad, y sugiere que el patrón de expresión de las NORs es redefinido, no solamente en cada individuo, sino probablemente también en cada célula. De otro modo, los niveles de expresión de una NOR no dependerían en absoluto del número de cistrones que posee, tal como hemos demostrado, sino del estado transcripcional heredado de generaciones celulares precedentes. Por tanto la hipótesis de la herencia de un patrón de expresión NOR mediada por la persistencia de la unión de los complejos de transcripción durante la mitosis es, en nuestra opinión, poco consistente. En consecuencia, la cuestión de cuándo se redefine el patrón de actividad de las NORs permanece sin respuesta por el momento. Aunque se carece por ahora de evidencias experimentales, es posible que el momento apropiado para llevar a cabo dicha redefinición del

patrón de expresión NOR sea la replicación, cuando los factores de transcripción deben ser liberados del DNA para permitir el avance del replisoma.

En conclusión, proponemos un modelo en el que tanto el nivel de expresión de una NOR como su jerarquía de activación, dependen principalmente, aunque no exclusivamente, del número de cistrones ribosómicos que posee en relación con el resto de NORs presentes en la célula, y permite explicar la variabilidad observada en cuanto a su estructura y función.



CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1.-Este estudio ha puesto de manifiesto la existencia de variabilidad interindividual, intercelular e intercromosómica, tanto en el contenido de cistrones ribosómicos como en los niveles de expresión de las NOR en *Talpa occidentalis* y en *Eliomys quercinus*.
- 2.-El procedimiento de tinción secuencial ha demostrado la existencia de un exceso del número de copias sobre el mínimo requerido para la viabilidad de la célula, ya que no todas las NORs presentes en una célula muestran expresión.
- 3.-En *Talpa occidentalis* existe una relación directa entre el número relativo de copias que posee una NOR con respecto a su homóloga y los niveles de expresión que esa NOR puede alcanzar.
- 4.-En esta misma especie existe una relación directa entre el número de copias que posee una NOR respecto a su homóloga y el orden que puede ocupar en la jerarquía de activación .

- 5.-La relación directa entre el número de copias que posee una NORs con respecto a las otras del complemento y los niveles de expresión que esa NOR pueda alcanzar, sigue manteniéndose en *Eliomys quercinus*, una especie con dos parejas portadoras de NORs.

- 6.-La relación directa entre el número de copias que posee una NORs con respecto a las otras del complemento y el orden que puede ocupar en la jerarquía de activación, sigue manteniéndose también en *Eliomys quercinus*.

- 7.-Ambos tipos de relaciones no dependen, por tanto, del par cromosómico concreto en el que esté localizada la NOR.

- 8.-Por primera vez se pone de manifiesto un paralelismo entre los conocimientos moleculares previos sobre regulación de la transcripción de los genes ribosómicos y las observaciones sobre la variabilidad de la expresión NOR que, desde el punto de vista citogenético, ha sido demostrada en un gran número de especies.

9.- Como consecuencia de todo lo anterior, nosotros proponemos un modelo en el que tanto el nivel de expresión de una NOR, como su posición en la jerarquía de activación, dependen principalmente del número de cistrones ribosómicos que posee en relación con el resto de NORs presentes en la célula. Este modelo permite relacionar la estructura y la función de los genes ribosómicos.

Apéndice de datos

EQ-1							
22		22		14		14	
HIS	Ag	HIS	Ag	HIS	Ag	HIS	Ag
3	2	2	2	1	1	1	2
4	1	3	1	1	1	2	1
3	2	1	1	1	2	2	2
3	2	1	1	1	1	2	1
4	4	1	1	2	2	3	3
2	2	1	1	1	1	2	2
3	5	2	1	1	1	2	1
3	1	2	1	1	1	2	1
3	5	1	1	2	1	3	1
2	1	1	1	2	1	3	1
3	2	2	1	1	1	4	3
2	5	1	1	1	1	2	1
2	5	1	1	1	1	2	1
2	5	1	1	2	1	3	1
2	2	1	1	1	1	2	2
4	2	3	3	1	1	2	2
4	3	1	1	2	2	3	2
2	4	1	1	1	2	2	3
2	2	1	2	1	1	2	2
2	1	1	1	1	1	2	1
4	2	1	1	2	2	3	3
3	2	1	1	2	2	4	2
4	2	1	1	2	2	3	2
2	2	1	1	2	2	2	2
2	2	1	1	1	1	2	2
2	2	1	1	2	1	3	1
2	1	1	1	2	1	2	1
2	1	1	1	2	2	3	3
5	5	3	1	1	1	2	1
5	5	1	1	2	1	3	1
5	5	3	3	1	1	2	2
2	1	2	1	1	1	5	5
1	1	3	1	2	1	5	5
2	2	1	1	2	2	5	5
2	2	1	1	2	3	5	5
2	1	1	1	2	1	5	5
2	3	1	1	2	2	5	5
2	1	1	2	2	3	3	2
3	2	1	1	2	3	2	2
2	5	1	1	1	3	3	4
2	2	1	1	2	1	3	2
1	1	1	1	1	1	1	5

EQ-1									
22		22		14		14			
HIS	Ag	HIS	Ag	HIS	Ag	HIS	Ag		
2	3	1	1	2	1	2	2		
2	1	1	1	1	1	2	1		
2	2	1	1	1	1	2	2		
2	1	1	1	1	1	2	1		
2	5	1	1	1	1	2	1		
3	2	1	1	2	2	4	2		
3	2	1	1	2	2	3	2		
4	2	1	1	2	2	3	2		
3	2	1	2	2	1	3	2		
3	1	1	1	2	2	2	2		
3	2	1	1	2	2	3	2		
3	2	1	1	2	2	3	2		
2	1	1	1	3	1	4	2		
2	1	1	1	3	1	3	5		
4	1	1	1	2	1	3	5		
2	1	2	1	1	1	3	1		
4	2	1	1	2	1	3	5		
4	1	2	1	1	1	3	1		
1	1	1	1	1	1	1	5		
4	5	1	1	2	1	3	5		
2	1	1	1	1	1	2	1		
1	1	1	1	2	5	2	5		
3	5	1	1	2	2	4	5		
2	2	2	1	1	2	3	2		
3	2	1	1	2	2	3	2		
3	1	1	1	2	1	4	5		
2	2	1	1	1	5	2	5		
3	1	1	1	1	1	2	1		
2	5	1	1	1	1	2	1		
2	5	1	1	1	2	2	5		
2	1	1	1	3	5	4	5		
4	1	2	1	1	1	3	1		
4	2	1	1	2	2	3	2		
2	2	1	1	3	2	3	2		
2	1	1	1	1	1	3	5		
4	5	2	1	1	1	3	1		
3	2	1	1	2	2	4	5		
2	2	1	1	2	1	3	3		
2	2	2	1	1	1	1	3		

EQ-2										
22			22			14			14	
HIS	Ag		HIS	Ag		HIS	Ag		HIS	Ag
2	5		1	1		3	2		3	3
3	5		1	1		1	5		2	1
2	2		1	1		3	2		4	3
4	3		1	2		2	1		3	2
3	5		2	2		1	1		2	1
2	1		1	1		1	2		3	5
1	1		1	1		2	2		2	2
2	1		1	2		2	1		2	5
3	3		1	1		2	2		3	3
5	5		1	1		2	2		2	2
5	5		2	2		1	1		2	1
5	5		1	1		1	1		2	2
5	5		1	1		1	1		2	1
5	5		1	1		2	1		3	1
5	5		2	2		1	1		2	3
5	5		2	1		1	1		3	1
5	5		3	3		1	1		1	2
5	5		1	1		2	2		3	3
5	5		2	1		1	2		2	3
5	5		1	1		2	2		3	3
5	5		1	3		2	1		2	2
5	5		1	1		1	1		1	2
5	5		2	2		1	1		2	2
5	5		1	1		2	1		2	1
5	5		2	1		1	1		2	1
5	5		1	1		2	1		2	1
5	5		1	1		1	2		2	3
5	5		2	1		1	1		2	1
5	5		1	2		1	2		2	1
5	5		1	2		2	1		3	3
5	5		1	1		1	1		1	1
5	5		1	1		2	1		2	2
5	5		1	1		1	1		1	1
5	5		2	1		1	1		2	2
5	5		1	1		1	2		2	3
5	5		1	2		2	1		3	2
2	3		1	2		1	1		5	5
1	1		1	1		2	2		5	5
2	3		1	1		2	2		5	5
2	1		1	1		2	1		5	5
5	5		2	1		1	1		5	5
5	5		2	2		1	1		5	5
5	5		1	1		2	5		5	5
5	5		2	1		1	1		5	5
5	5		1	1		2	1		5	5

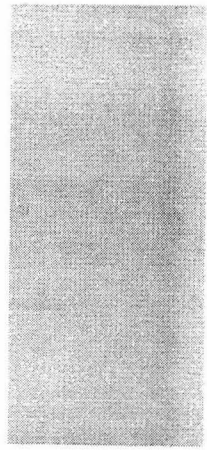
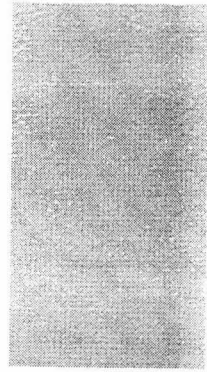
EQ-3									
22		22		14		14			
HIS	Ag	HIS	Ag	HIS	Ag	HIS	Ag		
2	5	2	5	3	1	4	2		
3	5	2	1	1	3	3	2		
2	1	1	5	3	1	4	5		
5	5	2	2	1	1	3	3		
5	5	1	1	1	1	1	5		
2	3	1	1	3	2	4	4		
1	5	1	1	2	1	5	5		
4	4	3	4	1	1	2	2		
3	5	1	1	2	1	5	5		
2	1	1	1	3	1	5	5		
2	2	1	1	2	2	5	5		
2	2	1	3	1	1	3	2		
3	2	1	1	2	1	2	2		
2	5	1	1	1	2	1	2		
5	5	1	1	2	2	3	3		
3	5	2	5	1	1	3	2		
1	5	2	1	2	5	5	5		
4	5	3	2	1	1	2	2		
2	1	1	5	3	2	3	5		
4	5	1	2	2	2	3	1		
4	5	1	1	1	1	3	1		
4	5	3	1	2	1	2	2		
2	1	2	1	1	2	3	3		
4	3	1	3	2	1	3	2		
3	5	3	5	1	1	2	2		
2	5	1	2	3	3	3	1		
5	5	1	1	2	2	3	5		
2	2	1	1	2	2	3	5		
5	5	1	1	1	1	1	1		
5	5	1	3	2	1	2	3		
5	5	1	1	1	3	2	2		
2	2	1	1	1	5	2	3		
2	5	1	1	2	2	3	5		
5	5	2	1	1	5	3	2		
2	5	1	1	3	2	5	5		
4	5	3	2	1	2	2	1		
1	5	2	1	3	1	4	5		
5	5	1	5	2	1	3	2		
5	5	1	1	2	2	5	5		

EQ-4							
22		22		14		14	
HIS	Ag	HIS	Ag	HIS	Ag	HIS	Ag
1	2	3	1	2	2	5	5
5	5	3	5	1	1	2	1
2	5	2	1	1	2	3	2
1	5	2	1	1	2	1	5
2	1	2	1	1	2	3	3
5	5	1	1	1	1	2	2
2	5	1	1	1	1	1	5
2	1	2	1	1	2	3	3
2	5	1	1	2	1	1	5
1	1	1	1	2	2	2	5
3	5	1	1	2	1	4	2
3	5	2	2	1	1	2	5
5	5	2	1	1	1	3	2
5	5	1	1	3	1	2	5
1	5	1	1	1	1	2	5
2	5	1	1	1	1	2	5
2	5	1	2	2	1	2	5
2	1	1	1	2	2	2	3
3	2	1	1	2	2	3	2
5	5	1	1	2	2	5	5
5	5	1	1	2	1	3	2
3	2	1	2	2	1	1	1
2	1	1	1	2	1	5	5
2	1	1	1	3	1	5	5
1	5	1	2	1	2	1	1
2	1	1	1	3	1	3	5
1	5	2	1	1	1	2	1
5	5	2	2	1	1	1	1
5	5	1	1	2	2	5	5
5	5	2	5	1	1	1	1
2	5	1	1	1	2	1	5
2	2	1	1	2	2	3	3
2	5	1	1	3	2	2	5
2	5	1	2	1	1	2	3
3	2	1	1	2	3	3	5
1	3	1	1	2	1	2	2
5	5	2	2	1	1	5	5
3	2	1	1	2	2	2	2
3	1	1	1	2	2	5	5
2	2	1	1	2	1	3	2
5	5	1	2	1	1	2	1
3	5	2	2	1	1	4	1
1	2	1	1	3	2	2	5
5	5	3	2	1	1	2	3
1	5	2	2	1	1	2	1
5	5	1	1	2	2	5	5
2	3	1	2	2	1	2	4

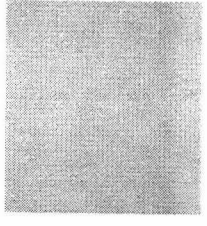
EQ-4										
22			22			14			14	
HIS	Ag		HIS	Ag		HIS	Ag		HIS	Ag
1	5		2	1		1	1		5	5
2	1		1	1		2	1		2	5
2	5		1	1		2	2		3	3
1	1		1	1		1	1		2	1
1	5		2	2		1	1		2	5
2	5		1	1		5	5		5	5
1	2		2	1		1	2		1	3
2	1		1	2		1	2		3	2
2	2		1	1		2	2		3	2
3	2		1	1		2	1		2	3
2	1		1	1		1	5		1	5
4	1		2	1		1	5		3	2
2	1		1	1		2	5		2	5
2	1		1	2		3	3		5	5
2	2		1	1		2	2		2	2
5	5		1	1		2	2		5	5
2	2		1	1		2	2		3	5
2	5		1	1		2	2		5	5
2	2		1	1		3	1		4	1
3	5		1	1		2	2		3	5
5	5		1	2		1	1		5	5
1	2		1	1		1	3		2	3
1	2		1	1		2	2		5	5
1	1		1	1		2	1		2	5
2	2		1	1		2	1		2	2
1	5		2	2		2	1		5	5
1	2		1	1		1	3		5	5

EQ-5							
22		22		14		14	
HIS	Ag	HIS	Ag	HIS	Ag	HIS	Ag
1	5	1	1	2	2	5	5
3	5	1	1	2	2	1	5
5	5	2	1	2	2	1	5
5	5	2	1	3	1	1	5
5	5	1	1	2	2	5	5
5	5	1	1	2	3	3	2
5	5	1	1	2	2	1	5
1	5	1	1	1	1	2	5
1	5	1	1	2	5	5	5
5	5	1	1	2	5	1	5
5	5	2	1	3	2	1	5
5	5	2	5	1	1	1	5
1	3	2	1	3	2	5	5
5	5	1	1	2	2	2	5
2	2	1	1	3	5	4	5
1	5	2	2	1	1	5	5
5	5	1	1	2	2	5	5
5	5	1	1	2	2	5	5
1	5	1	1	2	5	5	5
5	5	1	1	3	1	2	5
1	5	2	1	1	5	5	5
2	5	2	1	1	2	5	5
1	5	2	1	1	2	5	5
1	5	3	2	1	1	5	5
5	5	1	5	2	2	5	5
2	5	1	1	1	5	3	5
3	5	1	5	2	1	5	5
1	5	2	2	1	1	5	5
1	5	1	1	1	2	2	5
5	5	1	1	1	2	1	5
1	5	1	1	1	2	5	5
1	5	1	1	2	2	5	5
3	5	2	1	2	2	1	5
5	5	1	1	2	2	2	5
5	5	1	1	1	2	5	5
5	5	2	1	2	2	1	5
2	5	1	1	5	5	5	5
3	5	2	1	1	5	5	5
5	5	1	1	1	2	5	5
5	5	1	1	1	2	5	5
1	5	4	1	2	2	3	2
1	5	1	1	5	5	5	5
5	5	1	1	2	2	1	5
3	3	2	2	1	1	4	4
1	5	2	1	2	2	5	5
1	5	1	1	2	2	3	5
5	5	1	1	1	5	5	5

EQ-5										
22			22			14			14	
HIS	Ag		HIS	Ag		HIS	Ag		HIS	Ag
1	5		2	1		2	2		5	5
5	5		1	1		2	5		5	5



BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

- Amaldi, F., Giacomoni, D., Zito-Bignami, R.** (1969) On the duplication of ribosomal RNA cistrons in Chinese hamster cells. *Eur. J. Biochem.* **11**, 419-423 .
- Appels, R. Gerlachi, W.L., Dennis, E.S., Swift, H., Peacock, W.J.** (1980). Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma* **78**, 293-311.
- Berger, S., Zellmer, D.M., Kloppstech, K., Richter, G., Dillard, W.L., Schweiger, H.G.** (1978). Alternating polarity in rRNA genes. *Cell. Biol. Int. Rep.* **2**, 41-50
- Bickham, J.W. and Rogers, D.S.** (1985). Structure and variation of the nucleolus organizer regions in turtles. *Genetica* **67**, 171-184.
- Birnstiel, M.L., Speirs, J., Jones, K. & Loening, U.E.** (1968). Properties and composition of the isolated ribosomal DNA satellite of *Xenopus laevis*. *Nature* **219**, 454-463.
- Birnstiel, M.L., Chipchase, and Spiers, J.** (1971). The ribosomal cistrons. *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.* **11**, 351-389.
-

-
- Birnstiel, M., Sells, B.H., Purdon, I.F.** (1972). Kinetic complexity of RNA molecules. *J. Mol. Biol.* **63**, 21-39.
- Brock, G.J., Bird, A.** (1977) Mosaic methylation of the repeat unit of the human ribosomal RNA genes. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 451-456.
- Brown, D.D. and Dawid, I.B.** (1968). Specific gene amplification in oocytes. *Science* **160**, 272-280.
- Burgos, M., Jiménez, R. and Díaz de la Guardia, R.** (1986). A rapid, simple and reliable combined method for G-banding mammalian and human chromosomes. *Stain Technol.* **61**, 257-260.
- Buongiorno-Nardelli, M., Amaldi, F., Lava-Sánchez, P.A.** (1972). Amplification as a rectification mechanism for the redundant rRNA genes. *Nature* **238**, 134-137.
- Busby, S.J., Reeder, R.H.** (1983). Spacer sequences regulate transcription of ribosomal gene plasmids injected into *Xenopus* embryos. *Cell* **34**, 989-996.
- Casperson, T.** (1950) Cell growth and cell function. W.W. Norton and Co. New York, EUA.
- Chambon, P.** (1975). Eukaryotic nuclear RNA polimerases. *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 613-638.
-

-
- Cizewski, V. and Sollner-Webb, B.** (1983). A stable transcription complex directs mouse ribosomal RNA synthesis by RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* **11**, 7043-7056.
- Clarkson, S.G., Birnstiel, M.L., Purdom, I.F.** (1973). Reiterated transfer RNA genes of *Xenopus laevis*. *J.Mol.Biol.* **79**, 391-410.
- Clos, J., Normann, A., Ohrlein, A., Grummt, I.** (1986). The core promoter of mouse rDNA consist of two functionally distinct domains. *Nucleic Acids Research.* **14**, 7581-7595.
- Cole, C.I., Leavens, C.R.** (1971). Chromosome preparations of amphibian and reptiles: improved technique. *Herpetol. rev.* **3**:102.
- Czaker, R. and Mayr, B.** (1982). Comparative studies on the polymorphism of nucleolus organizer regions (NORs) in four breeds of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) with special emphasis on the development of breeds. *Z.Zool.Syst.Evol.Forsch.* **20**, 233-241.
- Dauphinais, C.** (1981). The control of ribosomal RNA transcription in lymphocytes. Evidence that the rate of chain elongation is the limiting factor. *Eur J Biochem* **114**, 487-492.
- De Capoa, A., Felli, M.P., Baldini, A., Rocchi, M., Archidiacono, N., Aleixandre C., Miller, O.J.** (1988). Relationship between the number and function of ribosomal genes. *Human Genet* **79**, 301-304.
-

-
- De la Torre, C., Fernández-Gómez, M.E., Gimenez-Martin, G.** (1975). Rate of nucleologenesis as a measure of gene activity. *Nature* **256**, 503-505.
- Dembinski, T.C. and Bell, P.A.** (1984). Glucocorticoids modify the rate of ribosomal RNA synthesis in rat thymus cells by regulating the polymerase elongation rate. *J. Steroid. Biochem* **21**, 497-504.
- Díez, M. and Puertas, M.J.** (1986). Quantitative analysis of the formation of nucleoli in *Locusta migratoria*. *Can J Genet Cytol* **28**, 207-218.
- Dover, G.A. and Flavell, R.D.** (1984). Molecular coevolution: DNA divergence and the maintenance of function. *Cell* **38**, 622-623.
- Eliceiri, G.L.** (1972) The ribosomal RNA of hamster-mouse hybrid cells. *J. Cell Biol.* **53**, 177-184.
- Evans, H.J., Buckland, R.A., Pardue, M.L.** (1974). Location of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. *Chromosoma* **48**, 405-426.
- Fan, H. and Penman, S.** (1971). Regulation of synthesis and processing of nucleolar components in metaphase arrested cells. *J.Mol.Biol.* **59**, 27-42.
- Fankan, S., Puvion, S.** (1980). Ultrastructural visualization of nucleolar and extranuclear RNA synthesis and distribution. *Int. Rev. Cytol.* **65**, 255-299.
-

- Fedoroff, N.V.** (1979). On spacers. *Cell* **16**, 697-701.
- Ferguson-Smith, M.A.** (1964). The sites of nucleolus formation in human pachytene chromosomes. *Cytogenetics* **3**, 124-134
- Fontana, F.** (1781). Traité sur le venin de la vipère, avec des observations sur la structure primitive du corps animale. Florence.
- Flavell, R.B., O'Dell, M., and Thompson W.F. (1988).** Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in Wheat. *J.Mol.Biol.* **204**, 523-534.
- Franze-Fernandez, M.T., Fontanive-Senguesa, A.V.** (1973) Effect of amino acids on the alpha-amanitin-insensitive RNA polymerase activity in the isolated nuclei of Ehrlich ascites cells. *Biochim. Biophys. Acta* **331**, 71-80
- Galleti, P.M. Jr., Barbosa da Silva, E., Germinaro RJ.** (1985). A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). *Rev Brasil Genet* **8**, 479-484.
- Gaubatz, J.W., Cutler, R.G.** (1978) Age-related differences in the number of ribosomal RNA genes of mouse tissues. *Gerontology* **24**, 179-207.
- Gillespie, D., and Spiegelman, S.** (1965). A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J.Mol.Biol.* **12**, 829-842.
-

- Gillings, M.R., Frankham, R., Speirs, J. and Whalley, M.** (1987). X-Y exchange and the coevolution of the X and Y rDNA arrays in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 116, 241-251.
- Gold, J.R.** (1984). Silver staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American cyprinid fishes. *Copeia*, 1, 33-139.
- Goessens, G. and Lepoint, A.** (1979). The nucleolus organizing regions (NORs): recent data and hypotheses. *Biol. Cell* **35**, 211-220.
- Goessens, G. and Lepoint, A.** (1982). Localization of Ag-NOR proteins in Ehrlich tumour cell nucleole. *Biol. Cell.* **43**, 139-142.
- Goessens, G.** (1984). Nucleolar Structure. *Int Rev Cytol* **84**, 107-158.
- Goodpasture, C. and Bloom S.E.** (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* **53**, 37-50.
- Grummt, I.** (1982). Nucleotide sequence requirements for specific initiation of transcription by RNA polII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6908-6911
- Grummt, I., Rosenbauer, H., Niedermeyer, I., Maier, U., Ohrlein, A.** (1986). A repeated 18 pb sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination. *Cell* **45**, 837-846.
-

-
- Hastie, N.D., Mahy, B.W.** (1973) Effects of -amanitin in vivo on RNA polymerase activity of cultured chick embryo fibroblast cell nuclei: resistance of ribosomal RNA synthesis to the drug. *FEBS Lett.* **32**, 95-99 .
- Heitz, E.** (1931). Die Ursache der gesetzmäßigen Zahl, Lage, Form und Größe pflanzlicher Nucleolen. *Planta* **12**: 775-784.
- Hellings, R.** (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**, 1743-1747.
- Henderson AS, Warburton D, Atwood KC.** (1972). Localization of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**, 3394-3398.
- Henderson, A.S., Eicher, E.M., Yu, M.T., Atwood, K.C** (1974). The cromosomal location of ribosomal DNA in the mouse. *Chromosoma* **49**, 155-160.
- Henderson, A.S., Eicher, E.M., Yu, M.T., and Atwood, K.C.** (1976). Variation in ribosomal RNA gene number in mouse chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* **17**, 307-316.
- Hernández-Verdún, D., Hubert, J., Bourgeois, C.A., Bouteille, M.,** (1980). Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cycle and in other nucleolar structures. *Chromosoma* **79**, 349-362.
-

-
- Hernández-Verdún, D. and Roussel, P.** (1995). Cell biological basis of Ag-NOR staining. *Virchows Arch* **427**, 326-327.
- Hofgätner, F.J., Schmid, M., Krone, W., Zenzes, M.T., Engels, W.** (1979). Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver staining. *Chromosoma* **71**, 197-216.
- Honjo, T. and Reeder, R.H.** (1973). Preferential transcription of *Xenopus laevis* rRNA in interspecies hybrids between *X.laevis* and *X.mulleri*. *J. Mol. Biol.* **80**, 217-228.
- Howell, W.M.** (1977). Visualization of ribosomal gene activity; silver stain proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma* **62**, 361-367.
- Howell, W.M. and Black, D.A.** (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia* **36**, 1014-1015.
- Howell, W.M.** (1982). Selective staining of nucleolus organization regions (NORs). En: *The Cell Nucleus*, Vol.11. pp. 89-142. (eds. H. Bush and Rothblum), New York: Academic Press.
- Hsu, T.C., Arrighi, F.E., Klevecz, R.R. and Brinkley, B.R.** (1965). The nucleoli in mitotic divisions of mammalian cells in vitro. *J. Cell Biol.* **26**, 539-553.
-

-
- Hsu, T.C., Patton, J.L.** (1969) Bone marrow preparations for chromosome studies. En: *Comparative mammalian cytogenetics*, pp 454-460 Ed. K. Benirschke. Springer Verlag. Heidelberg. New York.
- Hsu, T.C., Spirito, S.E., Pardue, M.L.** (1975). Distribution of 18-28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* **53**, 25-36.
- Hubbel, H.R.** (1985). Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technol.*, **60**, 285-294.
- Iida, C.T., Kownin, P., Paule, M.R.** (1985). Ribosomal RNA transcription: proteins and DNA sequences involved in preinitiation complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 1668-1672.
- Jiménez, R., Burgos, M., Diaz de la Guardia, R.** (1984). Karyotype and chromosome banding in the mole (*Talpa occidentalis*) from the south-east of the Iberian peninsula. Implications on its taxonomic position. *Caryologia.* **37**, 253-258.
- Jiménez, R., Burgos, M., Diaz de la Guardia, R.** (1988). A study of the Ag-staining significance in mitotic NORs. *Heredity* **60**, 125-127.
- Jordan, G.** (1987). At the heart of the nucleolus. *Nature* **329**, 489-490.
- Kass, S., and Sollner-Webb, B.** (1990). The first pre-rRNA processing event occurs in a large complex: analysis by gel retardation, sedimentation, and uv cross-linking. *Mol. Cell Biol.* **10**, 4920-4931.
-

-
- King, M., Contreras, N., Honeycutt, R.L.** (1990). Variation within and between nucleolar organizer regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. *Genetica* **80**, 17-29.
- Kishimoto, T., Nagamine, M., Sasaki, T., Takakusa, N., Miwa, T.** (1985). Presence of a limited number of essential nucleotides in the promoter region of mouse ribosomal RNA gene. *Nucleic Acids Res.* **13**, 3515-3532.
- Kohorn, B.D., Rae, P.M.M.** (1983). Localization of DNA sequences promoting RNA polymerase I activity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 3265-3269.
- Kuhn, A., Bartsch, I. and Grummt, I.** (1990). Specific interaction of the murine transcription termination factor TTF1 with class I RNA polymerases. *Nature* **344**, 559-562.
- Learned, R.M., Smale, S.T., Michele, M., Haltiner, M.M., Tjian, R.** Regulation of human ribosomal RNA transcription. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 3558-3562.
- Lee, M.R., Elder, F.F.B.** (1980). Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigation. *Cytogenet. Cell Genet.* **26**:36-40.
- Leitch, I.J. and Heslop-Harrison, J.S.**(1992). Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome* **35**, 1013-1018.
-

-
- Long, E.O., Dawid, I.B.** (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 727-764.
- Madan, B.E., Hall, L.M., Salin, M.** (1982) Ribosome formation in the eucaryotic nucleolus: recent advances from sequence analysis. En: *The Nucleolus*. Pp 87-101. Ed. Jordan, E.G., Cullis, C.A. Cambridge University Press.
- Macleod D., Bird A.** (1982). DNAase I sensitivity and methylation of active versus inactive rRNA genes in xenopus species hybrids *Cell*. **29**, 211-218.
- Martini, G., Flavell, R.B.** (1985) The control of nucleolus volume in wheat, a genetic study at three developmental stages. *Heredity* **54**, 111-120.
- Mayr, B., Schweizer, D., Geber, G.** (1984) NOR activity, heterochromatin differentiation, and the Robertsonian polymorphism in *Sus scrofa* L. *J. Hered.* **75**, 79-80.
- McClintock, B.** (1934). The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Zellforsch* **21**: 294-328.
- McStay, B. and Reeder, R.H.** (1990). An RNA polymerase I termination site can stimulate the adjacent ribosomal gene promoter by two distinct mechanisms in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* **4**, 1240-1252
-

- Medina, F.J., Risueño, M.C., Sánchez-Pina, M.A., Fernandez-Gomez, M.E.** (1983). A study on nucleolar silver staining in plant cells. The role of argyrophylic proteins in nucleolar physiology. *Chromosoma* **88**, 149-155.
- Mellink, C.H.M., Bosma, A.A., De Haan, N.A.** (1994). Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA in situ hybridization signals in six breeds of domestic pig. *Hereditas* **120**, 141-149.
- Miller L., Knowland J.** (1970). Reduction of ribosomal RNA synthesis and ribosomal RNA genes in a mutant of *Xenopus laevis* which organizes only a partial nucleolus. II. The number of ribosomal RNA genes in animals of different nucleolar types. *J. Mol. Biol.* **53**, 329-338.
- Mitchelson, K. and Moss, T.** (1987). The enhancement of ribosomal transcription by the reyalng of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Research.* **15**, 9577-9596.
- Mierre, C., Stahl, A.** (1978). Peripheral RNA synthesis of fibrillar center in nucleoli of Japanese quail oocytes and somatic cells. *J. Ultrastruct. Res.* **64**, 377-387.
- Mierre, C. and Stahl, A.** (1981). Ultrastructural organization, sites of transcription and distribution of fibrillar centers in the nucleolus of the mouse oocyte. *J Cell Sci* **48**, 105-126.
-

-
- Miller, O.L., Beatty, B.R.** (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science* **164**, 955-957.
- Miller, L., Brown, D.D.** (1969). Variation in the activity of nucleolar organizers and their ribosomal gene content. *Chromosoma* **28**, 430-444.
- Miller, D.A., Dev, V.G., Tantravahi, R. and Miller, O.J.** (1976). Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp. Cell. Res.*, 101, 235-243.
- Montgomery, T.H.** (1899). Comparative cytological studies with especial regard to the morphology of the nucleolus. *J. Morphol.* **15**, 265-583.
- Morgan, G.T., Reeder, R.H., and Bakken, A.H.** (1983). Transcription in cloned spacers of *Xenopus laevis* ribosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 6490-6494.
- Morrow, J., Cohen, S., Chang, A., Boyer, H., Goodman, H.M., Hellin, R.B.** (1974). Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**, 1743-1747.
- Moss, T.** (1982). Transcription of cloned *Xenopus laevis* ribosomal DNA microinjected into *Xenopus* oocytes, and the identification of an RNA polI promoter. *Cell* **30**, 835-842.
- Moss, T.** (1983). A transcriptional function for the repetitive ribosomal spacer in *Xenopus laevis*. *Nature* **302**, 223-228.
-

- Navashin, M.** (1934). Chromosome alterations caused by hybridization and their bearing upon certain general genetics problems. *Cytologia* **5**, 169-203.
- Pardue M.L. and Gall J.G.** (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **64**, 600-604
- Pardue, M.L. and Hsu, T.C.** (1975). Locations of 18S and 28S ribosomal genes in the chromosomes of the Indian muntjac. *J Cell Biol* **64**, 251-254.
- Péne, J.J., Knight, E., & Darnell, J.E.** (1968). Characterization of a new low molecular weight RNA in HeLa cell ribosomes. *J.Mol.Biol.* **33**, 609-623.
- Perry, R.P.** (1962). The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **48**: 2179-86.
- Perry, R.P.** (1976). Processing of RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 605-629.
- Raman, R. and Sperling K.** (1981). Pattern of silver staining on NORs of prematurely condensed Muntjac chromosomes following RNA inhibition. *Exp Cell Res* **135**, 373-378.
- Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P.** (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251
-

- Reeder, R.H.** (1984). Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell* **38**, 349-351.
- Reeder, R.H., Roan, J.G.** (1984) The mechanism of nucleolar dominance in *Xenopus* hybrids. *Cell* **38**, 38-44.
- Reeder, R.H.** (1985). Mechanism of nucleolar dominance in animals and plants. *J. Cell Biol.* **101**, 2013-2016.
- Reeder, R.H.** (1989). Regulatory elements of the generic ribosomal gene. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**, 466-474.
- Reeder, R.H.** (1990). rRNA synthesis in the nucleolus. *Trends in Genetics.* **6**, 390-395.
- Risueño, M.C., Medina, F.J. and Moreno Díaz de la Espina, S.** (1982). Nucleolar fibrillar centers in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. *J. Cell Sci.* **58**, 313-329.
- Ritossa, R. and Spigelman, S.** (1965). Localizations of DNA complementary to ribosomal RNA in nucleolus organizer regions of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci. USA* **53**, 737-74.
- Ritossa, F.M., Scala, G.** (1969) Equilibrium variations in the redundancy of rDNA in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **61**, 305-317.
- Roussel, P., Andre, P., Comai, L., Hernández-Verdún, D.** (1996). The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* **133**, 235-246.
-

- Rufas, J.S., Iturra, P., De Souza, W., Esponda, P.**(1982). Simple silver staining procedure for the localization of nucleolus and nucleolar organizers under light and electron microscopy. *Arch Biol* **93**, 267-276.
- Sánchez, A., Burgos, M., Jimenez, R., Díaz de la Guardia, R.** (1989). Quantitative analysis of silver staining of the nucleolar organizing region in *Eliomys quercinus*. *Genome* **32**, 978-982.
- Sánchez, A., Stitou, S., Zurita, F., Jiménez, R., Burgos, M., Díaz de la Guardia R.** (1995). Cytogenetic peculiarities in the Algerian Hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. *Heredity* **75**, 10-16.
- Sánchez-Pina, M.A., Medina, F.J., Fernández-Gómez, M.E., and Risueño, M.C.** (1984). Ag-NOR proteins are present when transcription is impaired. *Biol Cell* **5**, 199-202.
- Sasaki, M., Nishida, C., and Kodama, Y.** (1986). Characterization of silver stained nucleolus organizer regions (Ag-NORs) in 16 inbred strains of the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, **41**, 83-88.
- Schmid, M.** (1982). Chromosome banding in amphibia.VII. Analysis of the structure and variability of NOR's in Anura. *Chromosoma* **87**, 327-344.

Schmidtke, J., Schulte, B., Kuhl, P., Engel, W. (1976) Gene action in fish of tetraploid origin. V. Cellular RNA and protein content and enzyme activities in cyprinid, clupeoid, and salmonoid species.

Biochem. Genet. **14**, 975-980 .

Schwarzacher, H.G. and Wachtler, F. (1983) Nucleolus organizer regions and nucleoli. *Hum Genet* **63**, 83-89.

Shubert, I. and Künzel, G. (1990). Position dependent NOR activity in barley. *Chromosoma* **99**, 352-359.

Sinclair, J.H., Carrol, C.R. and Humphrey R.R. (1974). Variation in rDNA redundance level and NOR length in normal and variant lines of the mexican Axolotl. *J. Cell Sci.* **15**, 239-257.

Smale, S.T., Tjian, R. 1985. Transcription of herpes simplex virus tk sequences under the control of wild-type and mutant human RNA polymerase I promoters. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 352-362.

Sollner-Webb, B. and Tower, J. (1986) Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes. *Ann Rev Biochem* **55**, 801-30.

Speirs, J., Birnstiel, M.L. (1974). Arrangement of the 5.8S RNA cistrons in the genome of *Xenopus laevis*. *J.Mol. Biol.* **87**, 237-256.

-
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Kanehisa, T., and Moriwaki, K.** (1990). Variation in the distribution of the silver staining nucleolar organizer regions on the chromosomes of the wild mouse, *Mus musculus*. *Mol Biol Evol* **7**, 271-282.
- Suzuki, H., Sakurai, S., Nishimura, M., Kominami, R. and Moriwaki, K.** (1992). Compensatory changes in silver stainability of nucleolar organizer regions in mice. *Jap. J. Genet.*, **67**, 217-232.
- Tredelenburg, M.F., Gurdon, J.B.** (1978). Transcription of cloned *Xenopus* ribosomal genes visualised after injection into oocyte nuclei. *Nature* **108**, 453-470.
- Thompson, W.F., Flavell, R.B.** (1988). DNaseI sensitivity of ribosomal RNA genes in chromatin and nucleolar dominance in Wheat. *J.Mol.Biol.* **204**, 535-548.
- Valentin, G.C.** (1836). Repertorium für Anatomie und Physiologie, I. Berlin.
- Wachtler, F., Hopman, A.H., Wiegant, J., Schwarzacher, H.G.** (1986). On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. Studies with a new, non autoradiographic in situ hybridization method. *Expl Cell Res* **167**, 227-240.
- Wahl, G.M., Vitto, L. and Rubnitz, J.** (1983). Co-amplification of rRNA genes with CAD genes in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-resistant Syrian hamster cells. *Mol Cell Biol* **3**, 2066-2075.
-

- Wandelt, C. and Grummt, I.** (1983). Formation of stable preinitiation complexes is a prerequisite for ribosomal DNA transcription in vitro. *Nucleic Acid Res.* **11**, 3795-3809.
- Warburton, D. and Henderson, A.S.** (1979). Sequential silver staining and hybridization in situ on nucleolus organizing regions in human cells. *Cytogenet Cell Genet* **24**, 168-175.
- Warner, J.R.** (1979). Distribution of newly formed ribosomal proteins in HeLa cell fractions. *J. Cell Biol.* **80**, 767-772.
- Wellauer, P.K., Dawid, I.B.** (1974). Secondary structure maps of ribosomal RNA and DNA. I. Processing of *Xenopus laevis* ribosomal RNA and structure of single-stranded ribosomal DNA. *J.Mol.Biol.* **89**, 379-395.
- Williams, S.M., Robins, L.G., Cluster, P.D., Alar R.W., Strobeck, C.** (1990). Superstructure of the Drosophila ribosomal gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3156-3160.
- Wolf, S., Sameshima, M., Liebhaber, S., Schlessinger, D.** (1980). Regulation of ribosomal ribonucleic acid level in growing, 3H-arrested and crisis-phase WI-S8 human diploid fibroblasts. *Biochemistry* **19**, 3484-3490.

Yankofsky, S.A., and Spiegelman, S. (1962).The identification of the ribosomal RNA cistron by sequence complementarity.II. Saturation of and competitive interaction at the RNA cistron. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **48**, 1466-1472.

Zatsepina, O.V., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Mosgoeller, W., Almeder, M., Stefanova, V.N., Jordan, E.G., Wachtler, F. (1996). The RNA-polymerase-I transcription factor UBF and rDNA are located at the same major sites in both interphase and mitotic pig embryonic kidney. *Cytogenet Cell Genet* **73**, 274-278