



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Dpto. de Anatomía y Biología Celular

**Importancia de la metilación y sumoilación de la coilina
y del factor de supervivencia de las motoneuronas
en el ensamblaje del cuerpo nuclear de Cajal**

**Tesis doctoral presentada por Olga Tapia Martínez
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria
Santander, Julio 2009**

D. **MIGUEL LAFARGA COSCOJUELA**, Catedrático del Area de Biología Celular de la Universidad de Cantabria, y Dña. **MARIA TERESA BERCIANO BLANCO**, Catedrática del Area de Biología Celular de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN: Que D. **Olga Tapia Martínez** ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: "Importancia de la metilación y sumoilación de la coilina y del factor de supervivencia de las motoneuronas en el ensamblaje del cuerpo nuclear de Cajal".

Consideramos que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Santander, a 8 de Julio de 2009.

Fdo. Miguel Lafarga Coscojuela

Fdo. M^a Teresa Berciano Blanco

Esta Tesis ha sido financiada con las siguientes ayudas:

- Ayudas a proyectos de Investigación de la Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación Tecnológica (MEC; BFI2008-00172).
- Ayudas del Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED; CB06/05/0037)

A la memoria del Prof. Jesús Soto Torres.

Me acogiste desinteresadamente en tu grupo de Radioactividad Ambiental, sin tu ayuda y apoyo nunca podría haber iniciado mi carrera investigadora con Maite y Miguel. Hasta el último día te interesaste por mí y seguiste de cerca mi trabajo. Por todo esto y mucho más, gracias.

A mi madre

A mi familia Nieva-Tapia

Agradezco, en primer lugar, a mis directores de Tesis, Miguel Lafarga y M^a Teresa Berciano el apoyo, los consejos y la confianza depositados en mí a través de todos estos años. Gracias por todo lo que me habéis enseñado sobre ciencia y, sobre todo, por haberme transmitido vuestra pasión por la Biología Celular.

En segundo lugar, dar las gracias a mis compañeros de laboratorio Iñigo, Rocío y Saray por toda la ayuda incondicional que me han dado siempre y los buenos momentos pasados juntos en el laboratorio. De modo particular agradecer a Rocío todo lo que ha hecho por mí en el ámbito laboral y personal, y todas las horas compartidas que poco a poco han consolidado nuestra amistad.

Al resto del Dpto. de Anatomía y Biología Celular y en especial a Raquel y a Miguel, no sólo por su apoyo técnico, sino por tantos ratos divertidos. Al grupo de Juan Hurlé por su ayuda y amabilidad, Sonia, Montse, Nuria y especialmente Nacho por enseñarme pacientemente la técnica de RT-PCR.

Al grupo de Física Médica donde pasé mi primer año en la Facultad, Pepe, Carmen, Ismael, Luis, Carlos y particularmente a Marta que tantos momentos agradables y peculiares pasamos juntas durante nuestra estancia en Cuba.

A Javier León y Dolores Delgado por haberme permitido utilizar su laboratorio en tantas ocasiones y ser siempre tan agradables conmigo. A todos los "bioquímicos" y en especial a Gabi, a quien siempre recorro con todas mis dudas sobre el western blot y que siempre me ha aclarado.

Al grupo de Piero Crespo y en particular a Adán, que tantas preguntas nos ha resuelto sobre los plásmidos y su transfección.

A Jesús Merino por ayudarme a ponerme en contacto con Jesús Soto. A Samuel Cos y Emilio Sánchez-Barceló, por permitirme aprender las técnicas de cultivos celulares con Jose Antonio en su laboratorio a mi llegada a la Universidad. También agradecer a Manolo González-Carrero y Jesús Navas por su ayuda con la electroporación y transformación bacteriana.

A Vanesa Lafarga por todo lo que me ha enseñado sobre co-inmunoprecipitación de proteínas.

Y por último agradecer a mi madre su apoyo y por creer siempre en mí. A mi padre por su confianza. A mis hermanas y hermanos Emma, Raquel, Cristina, Gerardo y Ricardo. A mi familia Tapia. A mis amigas. Y a Alfonso por el día a día juntos y por la nueva familia que hemos creado.

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCION	5
1.1 EL NUCLEO CELULAR INTERFASICO	7
1.2 TERRITORIOS CROMOSOMICOS	10
1.3 EL NUCLEOLO	16
1.3.1 Relato histórico.....	16
1.3.2 Organización estructural y funcional del nucleolo en la ribogénesis.....	19
1.4 EL CUERPO DE CAJAL	22
1.4.1 Relato histórico.....	22
1.4.2 Papel funcional del CB en la biogénesis de snRNPs y snoRNPs.....	26
1.4.3 La proteína p80-coilina.....	29
1.4.4 La proteína de supervivencia de las motoneuronas (SMN).....	32
1.4.5 Implicación de las proteínas SMN y coilina en la patología del CB.....	33
2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	37
2.1 PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	39
2.2 OBJETIVOS	44
3. MATERIAL Y METODOS	45
3.1 CULTIVOS CELULARES	47
3.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACION	47
3.2.1 Técnica de perfusión.....	48
3.2.2 Disociados neuronales.....	48
3.3 DROGAS Y TRATAMIENTOS	49
3.3.1 5'-Deoxi-5'-metil-thioadenosina (MTA).....	49
3.3.2 Adenosin-2',3'-dialdehido (AdOx).....	49
3.3.3 Estrés osmótico agudo.....	49
3.3.4 Cultivo celular sin metionina extracelular.....	49
3.3.5 Diferenciación de células UR61 a neurona-like.....	50
3.4. MICROSCOPIA CONFOCAL LASER	50
3.4.1 Inmunofluorescencia.....	50
3.4.2 Ensayo de Transcripción "run on" mediante incorporación de 5'-fluorouridina (5'-FU).....	51
3.4.3 Análisis cuantitativo.....	52
3.5. MICROSCOPIA ELECTRONICA	52
3.5.1 Microscopía electrónica de transmisión.....	52
3.5.2 Inmunocitoquímica ultraestructural.....	53
3.6 TRANSFECCION TRANSITORIA DE PLASMIDOS	54
3.7 MUTAGENESIS PUNTUAL DIRIGIDA	55
3.8 ANALISIS DE PROTEINAS POR WESTERN BLOT	56
3.9 INMUNOPRECIPITACION DE PROTEINAS	58

4. RESULTADOS	59
4.1 IMPORTANCIA DE LA METILACION DE LA COILINA EN EL ENSAMBLAJE DEL CB Y PARA SUS INTERACCIONES MOLECULARES	61
4.1.1 Patrones de distribución nuclear de la proteína coilina en las células MCF7 <i>MTAP</i> ^{-/-} de cáncer de mama.....	62
4.1.2 El déficit de CBs y la presencia de coilina en microfocos y en el nucleolo no interfiere con la transcripción en las células MCF7.....	65
4.1.3 El déficit de la enzima MTAP está relacionado con la redistribución de la coilina en microfocos y en el nucleolo.....	66
4.1.4 La coilina metilada se concentra en los CBs y en los microCBs y la no metilada se importa al nucleolo.....	67
4.1.5 Los nucleolos enriquecidos en coilina no concentran snRNPs espliceosomales.....	70
4.1.6 El incremento de MTA causa en las células MCF7 <i>MTAP</i> ^{-/-} el desensamblaje de los CBs y la relocalización nucleolar de la coilina.....	73
4.1.7 La sobreexpresión ectópica de MTAP ^w t en las células MCF7 <i>MTAP</i> ^{-/-} relocaliza la coilina en CBs e impide su destino nucleolar.....	77
4.2 PARTICIPACION DE SUMO1 EN EL ENSAMBLAJE MOLECULAR DEL CUERPO DE CAJAL	79
4.2.1 Las células neurona-like UR61 poseen un subtipo de CBs enriquecidos en SUMO1.....	81
4.2.2 El estrés osmótico induce en los CBs de las neuronas del núcleo supraóptico el reclutamiento transitorio de SUMO1.....	85
4.2.3 La reducción de la actividad metiltransferasa induce localización transitoria de SUMO1 en los CBs de las neuronas del ganglio trigémino..	87
4.2.4 Las proteínas coilina y SMN son sustratos de SUMO1.....	90
4.2.5 Mutaciones puntuales en la SMN de las K119 y K55AK119A modifican su comportamiento en el CB.....	93
5. DISCUSION	99
5.1 IMPORTANCIA DE LA METILACION DE LA COILINA EN EL ENSAMBLAJE DEL CB Y PARA SUS INTERACCIONES MOLECULARES	102
5.2 PARTICIPACION DE SUMO1 EN EL ENSAMBLAJE MOLECULAR DEL CUERPO DE CAJAL	112
6. CONCLUSIONES	119
7. BIBLIOGRAFIA	123

5´-FU: 5´-Fluorouridina
53BP: "p53-binding protein 1"
ActD: Actinomicina D
aDMA: Dimetilación asimétrica de argininas
AdoHcy: Adenosin-homocisteína
AdoMet: Adenosin-metionina
AdOx: Adenosin-2',3'-dialdehído oxidado
ATM: "Ataxia Telangiectasia Mutated"
B23: Nucleofosmina
BRCA1: "Breast cancer associated 1"
CB: Cuerpo de Cajal
CF: Centro fibrilar
CFD: Componente fibrilar denso
CG: Componente granular
Chk2: "Checkpoint kinase 2"
co-IP: Coinmunoprecipitación
Dex: Dexametasona
DSB: Rotura de la doble cadena del DNA
GFP: "Green fluorescent protein"
YH2AX: Variante de histona H2A fosforilada en la serina 139
GT: Ganglio trigémino
HP1: Proteína de la heterocromatina
hTERT: Transcriptasa reversa humana
IgG: Inmunoglobulina
IP: Ioduro de propidio
LMB: Leptomomicina B
MAT: Metionina adenosina transferasa
me(3)H4K20: Histona H4 trimetilada en la lisina 20
meH3K27: Histona H3 metilada en la lisina 27
meH3K36: Histona H3 metilada en la lisina 36
meH3K9: Histona H3 metilada en la lisina 9
Met: Metionina
MMA: Monometilación de argininas
MRN: Complejo trimérico de reparación MRE11, Rad50 y NBS1
MS: Metionina sintasa
MTA: 5'-deoxi-5'-metil-tioadenosina
MTAP: 5'-deoxi-5'-metil-tioadenosina fosforilasa
NAP57: Disquerina
NLS: Señal de localización nuclear

NoEC: Nucleolos enriquecidos en coilina
NoLS: Señal de localización nucleolar
NORs: Regiones organizadoras del nucleolo
NPM: Nucleofosmina o B23
NS: "Nuclear speckles"
PML: "Promyelocytic leukemia"
PRMT: "Protein arginine methyl transferase"
rDNA: DNA ribosomal
RG-box: Dominio arginina/glicina
rRNA: RNA ribosomal
SAHH: Adenosin-homocisteína hidrolasa
scaRNA: "Small Cajal body-specific RNAs"
sDMA: Argininas simétricamente dimetiladas
sDMA-coilina: Coilina simétricamente dimetilada en argininas
SMA: Atrofia muscular espinal
SMN: Factor de supervivencia de las motoneuronas
snoRNP: Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas
snRNP: Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
SON: Núcleo del supraóptico
SUMO1: "Small Ubiquitin-like modifier 1"
SUMO1-NB: Cuerpo nuclear enriquecido en SUMO1
TBP: "TATA-binding Factor"
U snoRNA: RNAs nucleolares pequeños ricos en uridina
U snRNA: RNAs nucleares pequeños ricos en uridina
Ubc9: Conjugasa específica de sumoilación (E2)
UBF: "Upstream binding protein"

1. Introducción

1.1 EL NUCLEO CELULAR INTERFASICO

Los estudios modernos de Biología Celular y Molecular *in situ* demuestran que el núcleo está compartimentalizado en diferentes dominios estructurales y funcionales implicados en la replicación y reparación del DNA, así como en la transcripción y procesamiento de RNAs (Lamond y Earnshaw, 1998; Spector, 2001; Berciano y cols., 2002; Bedford y Clarke, 2009; Moore y Proudfoot, 2009; Lafarga y cols., 2009). La regulación funcional de dichos procesos implica la participación, entre otros factores, de modificaciones epigenéticas del DNA y de modificaciones postraduccionales de proteínas concretas de los compartimentos nucleares, tales como ubiquitilación, proteólisis vía ubiquitina-proteosoma, conjugación con SUMO1 (Small Ubiquitin-Like Modifier) o sumoilación, fosforilación, acetilación, ribosilación y metilación (para revisión, ver Shilatifard, 2008).

Para preservar el genoma el núcleo se rodea de una doble membrana, la envoltura nuclear, cuyas dos membranas, interna y externa, tienen diferente composición molecular. La hoja externa se continúa con el retículo endoplásmico, con el que comparte una organización proteica muy similar. La membrana interna posee proteínas altamente específicas necesarias para establecer interacciones moleculares con los cromosomas y con la lámina nuclear. La organización molecular de la membrana interna es uno de los factores determinantes de la arquitectura nuclear de los cromosomas en la interfase (Cremer y Cremer, 2001). Las membranas de la envoltura nuclear se fusionan en numerosos sitios generando poros donde se ensamblan los complejos del poro nuclear, macrocanales acuosos constituidos por complejos macromoleculares de proteínas llamadas nucleoporinas. Los poros nucleares, además de su función esencial en el tráfico núcleo-citoplasma, son estructuras muy dinámicas implicadas en diversos procesos celulares, tales como la organización del citoesqueleto de la lámina nuclear y el control de la expresión génica (para revisión, ver Guttinger y cols., 2009; D'Angelo y Hetzer, 2009).

La arquitectura nuclear está relacionada con la actividad transcripcional del genoma (Schneider y Grosschedl, 2007). Se caracteriza por su compartimentalización estructural y funcional en dos dominios fundamentales: los territorios cromosómicos ocupados por los cromosomas interfásicos (Cremer y Cremer, 2001; Cremer y cols., 2006), y el dominio intercromosómico o intercromatínico, que incluye distintas estructuras y cuerpos nucleares que participan en el procesamiento de los RNAs (Spector 2001; Lamond y Spector, 2003; Mistelli, 2005). Las estructuras más relevantes del dominio intercromatínico son el nucleolo, los cuerpos de Cajal (CBs), las

áreas de factores de "splicing" o "nuclear speckles" (NS), los cuerpos SUMO-1 (SUMO1-NB), los cuerpos PML ("promyelocytic leukemia") y los clastosomas (Figura 1).

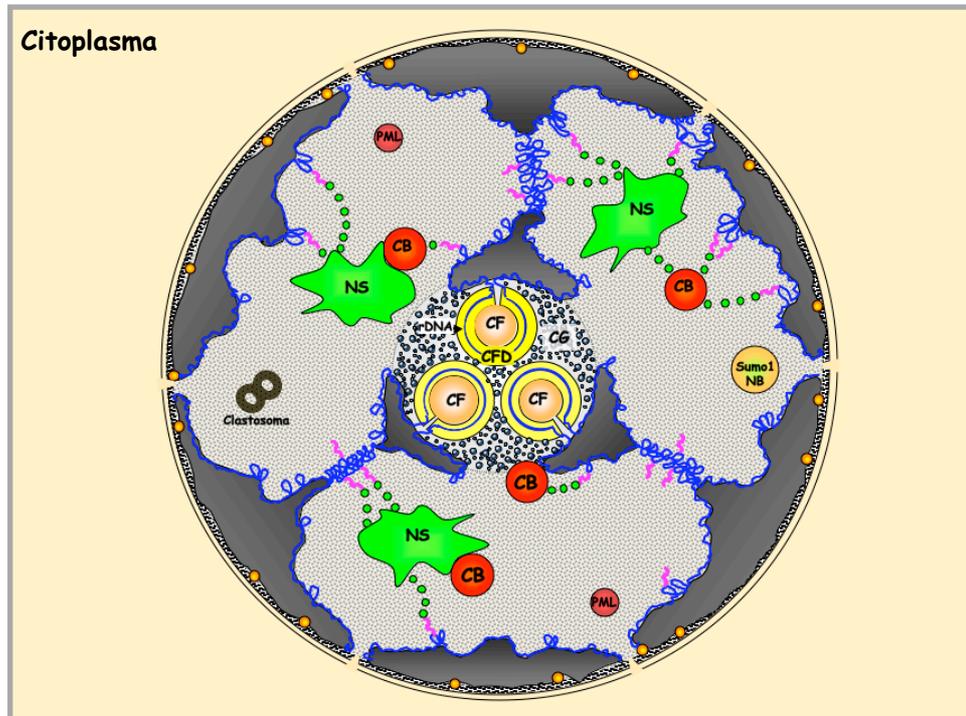


Figura 1. Esquema de los compartimentos nucleares de una célula interfásica. El dominio cromatínico se representa en dos colores, la heterocromatina (gris) y la eucromatina (azul). Los círculos amarillos representan proteínas asociadas a la heterocromatina y a la lámina nuclear. Del territorio intercromatínico se dibuja el nucleolo, que incluye los centros fibrilares (CF), el componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y el rDNA (azul). Además aparecen dibujados los agregados de factores de splicing o "nuclear speckles" (NS) (verde), las fibrillas pericromatínicas (rosa), los cuerpos de Cajal (CBs) en rojo, los cuerpos PML (PML) en naranja, el clastosoma (gris) y los cuerpos nucleares enriquecidos en SUMO1 (SUMO1 NB) en amarillo.

El nucleolo es esencial para la biogénesis de los RNAs ribosomales, pero también participa en el procesamiento de varias categorías de RNAs pequeños, en la regulación del ciclo y crecimiento celular, en la respuesta al estrés celular, y en el depósito reversible de proteínas modificadas por sumoilación (Pederson, 1998; Desterro y cols., 2005; Boisvert y cols., 2007; Casafont y cols., 2007; Emmott y Hiscox, 2009; Stark y Taliansky, 2009).

El cuerpo de Cajal (CB) es una organela nuclear presente en la mayoría de las células eucariotas. Su composición molecular es muy heterogénea y se le atribuyen diferentes funciones, incluyendo la regulación de la expresión de genes que codifican U2 snRNA e histonas (Frey y Matera, 1995; Fernandez y cols., 2002). Sin embargo, la función mejor conocida del CB es la biogénesis de ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) y nucleolares (snoRNPs) de pequeño tamaño, necesarias para el "splicing"

de los pre-mRNAs y el procesamiento de los pre-rRNAs, respectivamente (Cioce y Lamond, 2005; Morris, 2008; Moore y Proudfoot, 2009; Lafarga y cols., 2009).

Las áreas de factores de splicing, "nuclear speckles" (NS) o dominios SC35 (agregados de granulaciones intercromáticas, a nivel ultraestructural), son dominios nucleares enriquecidos en factores de "splicing", particularmente snRNPs y proteínas de la familia SR (ricas en serina y arginina). Además contienen RNAs poliadenilados y varias quinasas que fosforilan factores de splicing (Lamond y Spector, 2003; Hall y cols., 2006). En los NS se produce el almacenamiento y pre-ensamblaje macromolecular de factores de splicing para su ulterior distribución a los sitios activos de transcripción y procesamiento cotranscripcional de los pre-mRNAs, las fibrillas pericromáticas (Fakan, 1994; Pena y cols., 2000), donde debe producirse el ensamblaje final del espliceosoma (Hall y cols., 2006; Moore y Proudfoot, 2009).

Otras organelas nucleares importantes en la regulación transcripcional son los cuerpos nucleares PMLs (para revisión, ver Bernardi y Pandolfi, 2007). Se denominan así porque concentran específicamente la proteína PML, un supresor tumoral que, en la forma conjugada con SUMO, es esencial para el reclutamiento y ensamblaje molecular de otras proteínas del cuerpo PML (Sp100, Daxx, CBP, pCREB), fundamentalmente factores reguladores de la transcripción y proteínas de la vía de reparación del DNA (Dellaire y Bazett-Jones, 2004; Ching y cols., 2005). Los cuerpos PML son estructuras dinámicas que secuestran y liberan determinadas proteínas dependiendo de modificaciones postraduccionales tales como sumoilación/desumoilación y acetilación (Bernardi y Pandolfi, 2007). Desde un punto de vista funcional, participan en la regulación de la transcripción, en la respuesta al daño del DNA, en la regulación de la apoptosis y en el proceso de senescencia celular (Bernardi y Pandolfi, 2007). Recientemente, se les considera reguladores epigenéticos de la expresión génica. De hecho, la pérdida de función de proteína PML, que se produce en diversos tipos de cáncer, impide la regulación epigenética en la fase temprana de la tumorigénesis, conllevando a la inestabilidad genética y a la transformación celular (para revisión, ver Batty y cols., 2009; Torok y cols., 2009).

Recientemente, dos nuevos cuerpos nucleares han sido caracterizados en nuestro laboratorio, el clastosoma (Lafarga y cols., 2002) y los cuerpos nucleares SUMO-1 (Navascues y cols., 2007). El clastosoma (del griego *klastos*, romper y *soma* cuerpo) es una factoría nuclear que concentra proteasomas 20S y 19S, ubiquitina, chaperonas y sustratos del proteasoma (Lafarga y cols., 2002). Los clastosomas son estructuras muy dinámicas que se forman en respuesta a cambios en la expresión

génica, por ejemplo durante la respuesta de estrés celular, que comportan variaciones importantes en la concentración nuclear de proteínas activas, esencialmente factores de transcripción que son sustratos del proteasoma (Lafarga y cols., 2002.; Baltrons y cols., 2008). Por su parte, el cuerpo nuclear SUMO-1 representa una estructura enriquecida en SUMO-1, la enzima específica de sumoilación E2 (Ubc9) y algunos reguladores de la transcripción como CBP y c-Jun (Navascues y cols., 2007). A diferencia de los cuerpos PMLs, los cuerpos SUMO-1 carecen de la proteína PML. Desde el punto de vista funcional se ha sugerido que son sitios de sumoilación de factores reguladores de la transcripción, una modificación que debe favorecer su reclutamiento e inactivación reversible en estos cuerpos nucleares (Navascues y cols., 2007).

1.2 TERRITORIOS CROMOSOMICOS

El dominio cromosómico representa el espacio nuclear donde se organiza el DNA repartido en un número variable de cromosomas específicos de cada especie animal (Cremer y Cremer, 2001). El sub-volumen ocupado por cada cromosoma depende de la cantidad de DNA que contenga y de la actividad transcripcional del mismo (Cremer y cols., 2006). En su conjunto la cantidad total de DNA del dominio cromosómico es enorme y debe de compactarse en el espacio limitado del núcleo celular. La compactación del DNA y, consecuentemente, la regulación génica se consigue haciendo que el DNA forme complejos con una serie de proteínas específicas que dan lugar a la cromatina (revisado por Misteli, 2007; Schneider y Grosschedl, 2007; Munshi y cols., 2009).

El nivel más elemental de condensación del DNA es la cadena polinucleosomal de ~10 nm de diámetro en la que la doble hélice de DNA se enrolla alrededor del octámero de histonas. Cada nucleosoma, unidad fundamental de la cromatina, está constituido por 146 pb de DNA enrollado casi dos veces alrededor de un núcleo globular de cuatro histonas muy básicas (H3, H4, H2A y H2B). A su vez, los nucleosomas están separados por 10-16 pb de DNA espaciador (Alberts y cols., 2008). La cadena polinucleosomal constituye el grado máximo de descondensación o relajación de los dominios cromosómicos del genoma, donde se puede producir la transcripción. Este grado de descondensación representa la eucromatina, cromatina abierta o cromatina inducible. En grados sucesivos de compactación las cadenas polinucleosomales de ~10 nm se pliegan, mediante la interacción con proteínas compactadoras, como la histona

H1, en fibras de 30 y 60-130 nm de diámetro para formar las fibras cromatínicas que configuran la heterocromatina (Schneider y Grosschedl, 2007). En la heterocromatina se organizan secuencias repetidas no codificantes del DNA, la heterocromatina constitutiva, y regiones cromosómicas que incluyen genes codificantes que no se expresan (silenciados), la heterocromatina facultativa (ver Schneider y Grosschedl, 2007; Alberts y cols., 2008; Federova y Zink, 2008) (Figura 1).

A pesar de que la configuración de la cromatina es muy específica de cada tipo celular, la expresión génica de cada cromosoma se adapta a la demanda transcripcional de la célula. Esta plasticidad estructural y funcional es posible gracias a que las células eucariotas han desarrollado diversas estrategias de regulación génica entre las que destacan las modificaciones postraduccionales de las histonas nucleosomales. De hecho, la posibilidad de combinar diferentes modificaciones postraduccionales en residuos específicos de las histonas permite que se induzcan o repriman funciones celulares como la transcripción, silenciamiento génico, heterocromatinización y reparación y replicación del DNA (Alberts y cols., 2008; Munshi y cols., 2009). Entre las modificaciones de las que son objeto las histonas nucleosomales destacan la acetilación y metilación de lisinas (K) y argininas (R), fosforilación de serinas (S) y treoninas (T), ubiquitilación de lisinas, así como la ADP ribosilación (Schneider y Grosschedl, 2007). Estas modificaciones de las histonas permiten su propia autorregulación, a la vez que modulan su interacción con otras proteínas y RNPs (revisado por Munshi y cols., 2009).

La acetilación reversible de la histona H4 en determinadas lisinas regula directamente el remodelamiento de la cromatina y la activación de la transcripción (Carrozza y cols., 2003). De hecho, las propias enzimas acetiltransferasas responsables de la acetilación de histonas actúan como co-activadores transcripcionales. Funcionalmente, la modificación de histonas por acetilación/deacetilación nucleosomal tiene un papel coordinado en la regulación de la expresión génica. Así, la hiperacetilación favorece la expresión génica, mientras que la deacetilación causa silenciamiento (revisado por Perterson y Laniel, 2004; Munshi y cols., 2009).

Al contrario de la acetilación, por lo general la metilación de histonas en lisinas concretas estabiliza la cromatina en estado silente. De hecho en el núcleo interfásico, tanto la eucromatina como heterocromatina constitutiva poseen nucleosomas silentes hipoacetilados y enriquecidos en la histona H3 metilada en la lisina 9 (meH3K9) y en la histona H4 trimetilada en la lisina 20 (me(3)H4K20). Este patrón de metilación de

las histonas H3 y H4 induce su interacción con la proteína de la heterocromatina (HP1), un proceso de gran importancia estructural y funcional. Por una parte, contribuye al mantenimiento de la heterocromatinización en dominios concretos del genoma y, por la otra, favorece la interacción de la cromatina con la lámina nuclear, contribuyendo así a que cada cromosoma se organice espacialmente en su territorio cromosómico (revisado por Misteli, 2007; Schneider y Grosschedl, 2007; Munshi y cols., 2009). Existen diferentes patrones de metilación (mono-, di- y trimetilación) en diferentes lisinas, que varían en función de los dominios génicos y la actividad funcional. En el caso de la heterocromatina constitutiva, permanecen metiladas las histonas meH3K9 y me(3)H4K20, mientras que la meH3K27 es específica de la heterocromatina facultativa (Kourmouli y cols., 2004; Federova y Zink, 2008; Munshi y cols., 2009). Recientemente se ha conocido que la metilación de la histona H3 en la lisina 36 (meH3K36) se asocia específicamente a la fase de elongación de la transcripción y, cotranscripcionalmente, al "splicing" y poliadenilación de los pre-mRNAs (Moore y Proudfoot, 2009).

La fosforilación de histonas nucleosomales también es importante en la regulación de la expresión génica. Así, la fosforilación de las histonas H1 y H3 juega un importante papel en la transcripción y en la mitosis (Ren y Gorovsky, 2001; Allison y cols., 2003). Pero, sin duda, donde la fosforilación de las histonas juega un papel crucial es en la respuesta al daño del DNA. En las histonas nucleosomales del genoma existen ciertas variantes, como son las variantes de la histona H2A que incluyen la H2AX, H2AZ, macroH2A y H2AB (Kamakaka y Biggins, 2005). De este "pool", la H2AX se distribuye regularmente en el genoma y, en los mamíferos, constituye alrededor de un 2% del total de la H2A. En respuesta al daño del DNA la histona H2AX se fosforila en la serina 139 del extremo C-terminal (γ H2AX) (Rogakou y cols., 1998). La rotura de la doble cadena del DNA (DSBs) puede generarse por causas muy diversas, incluyendo la exposición a diversos factores genotóxicos. La formación de DSBs dispara un conjunto de respuestas de estrés celular que incluyen parada del ciclo celular, relocalización de factores reparadores del DNA, inducción de un programa transcripcional específico y, en los casos de daño severo, apoptosis (Paull y cols., 2000; Costelloe y cols., 2006). En los sitios de DSBs se forman focos nucleares de lesión/reparación del DNA. De hecho, la presencia de microfocos nucleares de γ H2AX es la primera evidencia, a nivel celular, de que hay lesión del DNA nuclear, por lo que la expresión de esta variante fosforilada de la histona H2AX se considera el indicador

más sensible de los sitios de rotura del DNA nuclear. Su presencia provoca el reclutamiento de factores implicados en la reparación del DNA (Fernandez-Capetillo y cols., 2004; Fernandez-Capetillo y Murga, 2008; Costelloe y cols., 2006; Abraham, 2006). En el caso de las DSBs generadas por radiaciones ionizantes, se reclutan, entre otros factores, la quinasa pATM ("Ataxia Telangiectasia Mutated"), 53BP1 ("p53-binding protein 1"), el complejo trimérico de reparación MRN (MRE11, Rad50 y NBS1), BRCA1 ("breast-cancer-associated 1") y MDC1 (Celeste y cols., 2003), algunos de los cuales interaccionan molecularmente con la γ H2AX. Además, la γ H2AX parece ser necesaria para amplificar la señal de pequeñas roturas de DSBs, para aproximar los extremos del DNA roto y para coordinar el reclutamiento molecular y el remodelamiento de la cromatina que se produce en los focos de lesión (Costelloe y cols., 2006; van Attikum y Gasser, 2005). La pATM inicia una cascada de fosforilación de varios sustratos que incluyen factores reguladores del ciclo celular esenciales para la respuesta al daño del DNA, tales como la proteína p53, Chk2 ("checkpoint-kinasa 2") y determinadas proteínas del complejo reparador como son BRCA1 y 53BP1 (Kastan y Lim, 2000; Shiloh, 2003; McKinnon, 2004; Costellao y cols., 2006). El ensamblaje y la fosforilación de las proteínas del complejo permiten una rápida respuesta celular de reparación del DNA (revisado por McKinnon, 2004; Peterson y Laniel, 2004; Munshi y cols., 2008).

Otro aspecto importante de la arquitectura nuclear es que los cromosomas no se organizan al azar, sino que forman estructuras altamente ordenadas dentro del espacio 3D del núcleo celular (revisado por Cremer y cols., 2006; Meaburn y Misteli, 2007). Una concepción clásica, pero avalada por estudios recientes de mapeo nuclear de los cromosomas. Estos estudios, que utilizan como modelos biológicos la diferenciación de células de mamíferos, han demostrado que la organización espacial del genoma no es aleatoria y que, dentro de su territorio concreto, los cromosomas disponen de plasticidad suficiente para adaptarse a diversas situaciones de actividad/inactividad transcripcional (Parada y cols., 2004; Cremer y cols., 2006). Como norma general se asume que la cromatina inactiva se localiza preferentemente en la periferia del núcleo, asociada a la envoltura nuclear, mientras que la cromatina transcripcionalmente activa tiende a organizarse en el interior del núcleo. Esta ordenación radial de los cromosomas favorece que la eucromatina se expanda en microdominios del núcleo celular sin provocar cambios dramáticos en la organización estructural de la heterocromatina de cada cromosoma (ver Misteli, 2007; Moore y

Proudfoot, 2009). De hecho, estudios experimentales realizados en nuestro laboratorio que provocan heterocromatinización masiva han contribuido a demostrar que la cromatina puede experimentar cambios dramáticos reversibles en su configuración espacial (Berciano y cols., 2002; Navascues y cols., 2004b; Valero y cols., 2006; Villagra y cols., 2008).

La regulación génica mediada por la localización en el espacio de los cromosomas se complementa con la formación de unidades de eucromatina en forma de bucles o lazos de fibras cromatínicas y/o cadenas polinucleosomales, con una movilidad limitada. Estos bucles cromosómicos han cobrado mucha entidad en la organización funcional del genoma, ya que pueden incluir secuencias silentes, aproximar secuencias localizadas distalmente en el genoma o formar bucles activos de transcripción. La movilidad de estos bucles puede permitir a los loci génicos que contienen explorar su microambiente y, eventualmente, asociarse a una factoría de transcripción (Soutoglou y Misteli 2007). La asociación de bucles cromosómicos con el complejo del poro parece facilitar la exportación nuclear directa de los transcritos al citoplasma. Además, la asociación de bucles, que contienen genes inducibles, con el complejo del poro está relacionada con la memoria transcripcional, un mecanismo que induce un respuesta más rápida de síntesis, maduración y exportación de los transcritos al citoplasma si la célula ya había sido estimulada previamente (revisado por Misteli, 2007; Schneider y Grosschedl, 2007; Moore y Proudfoot, 2009). Otra ventaja de los bucles cromosómicos es que al agruparse espacialmente se favorece la formación de focos o factorías de transcripción donde se ensambla la maquinaria de transcripción necesaria para la síntesis y maduración de diversos tipos de RNAs (revisado por Misteli, 2007).

La actividad transcripcional génica y la distribución de los focos de transcripción ha sido demostrada en nuestro laboratorio en neuronas sensitivas de la rata mediante el ensayo de transcripción in situ basado en la incorporación de 5'-fluorouridina (5'-FU) en los RNAs nacientes. La tasa de incorporación del nucleótido halogenado está directamente relacionada con la actividad transcripcional. Así, un pulso de 30 minutos de 5'-FU es suficiente para detectar la 5'-FU en los focos de transcripción tanto extranucleolares como en el componente fibrilar denso del nucleolo (Casafont y cols., 2006, 2009). La contrapartida ultraestructural de los focos de transcripción son las fibrillas pericromatínicas (Fakan, 1994; Casafont y cols., 2006) en las que, concomitantemente con el proceso de elongación del transcrito primario, se producen las diferentes fases de maduración de los pre-mRNAs, incluyendo la formación de una

caperuza de metilguanosa en el extremo 5', el "splicing" (eliminación de secuencias intrónicas no codificantes) y la poliadenilación en el extremo 3' (revisado por Proudfoot, 2009).

Merece mención a parte, aunque sea muy brevemente, considerar la organización de la cromatina en el interior del nucleolo ya que tiene algunas peculiaridades específicas. Como se comentará en el siguiente apartado, el nucleolo es el compartimento nuclear donde se localizan los genes ribosomales (rDNA). De hecho la cromatina nucleolar es la base estructural y funcional del nucleolo. En este sentido, al nucleolo debería de ser considerado como un subcompartimento del dominio cromosómico. El rDNA del nucleolo está esencialmente representado por genes ribosomales repetidos y ordenados en tándem en las regiones organizadoras del nucleolo (NORs) de determinados cromosomas (Sogo y cols., 1984; Hadjiolov, 1985). El número de cromosomas portadores de NORs es variable entre especies animales, en el hombre solo cinco pares de cromosomas tienen rDNA, lo que indica que las células diploides humanas podrían tener un número teórico máximo de 10 nucleolos. También el número de copias de genes ribosomales en los NORs varía entre especies animales, las células humanas diploides disponen de unas 250 copias distribuidas en las 10 NORs (Spector, 2001). No obstante, en la nucleologénesis no necesariamente participan todas las NORs. Como se representa en la Figura 2, sólo las NORs que se integran en el nucleolo forman en su interior unidades funcionales de transcripción. En estas unidades la tasa de transcripción es muy alta, de tal suerte que en las células activas se estima que más del 60% del total de la síntesis de RNA se produce en el nucleolo (Raska y cols., 2006). Sin embargo, no todos los genes ribosomales del nucleolo están activados transcripcionalmente. La regulación de la transcripción nucleolar ha sido muy enigmática hasta hace unos años, ya que se pensaba que la cromatina nucleolar carecía de nucleosomas lo que hacía muy difícil entender los mecanismos de regulación de la cromatina activa e inactiva. En este sentido, el grupo de Carmo-Fonseca (2000) propone que la expresión del rDNA depende más de cambios en la tasa de transcripción de los genes activos, que de la activación de unidades silentes de rDNA. Además, plantean que los genes del rDNA inactivos adoptan una configuración condensada en heterocromatina, mientras los genes activos formarían dominios de eucromatina (Carmo-Fonseca y cols., 2000). Recientemente se ha demostrado que las secuencias génicas del rDNA adoptan dos configuraciones estructurales y funcionales. Los genes activos no tienen nucleosomas y adquieren una configuración de máxima decondensación en la que se puede producir la transcripción

directa sin modificaciones epigenéticas. Sin embargo, los genes inactivos adquieren configuración nucleosomal similar a la de la heterocromatina extranucleolar (Tremblay y cols., 2009; McKeown y Shaw, 2009). Además, los nucleosomas de la cromatina nucleolar están particularmente enriquecidos en histona H2A (Alvarez y cols., 2006).

1.3 EL NUCLEOLO

1.3.1 Relato histórico

El nucleolo es la estructura más grande del núcleo interfásico visible con la microscopía de luz por su elevado índice de refracción debido a la alta concentración de rRNAs y proteínas que posee. Posiblemente, su tamaño y densidad óptica favorecieron su identificación hace más de dos siglos por Fontana. Posteriormente, Cajal (1903 y 1909) utilizando técnicas argénticas describió el nucleolo de las neuronas como una organela constituida por esférulas argirófilas densamente empaquetadas (de 0.25 a 0.30 μm de diámetro) inmersas en una sustancia amorfa refractaria a las sales de plata, pero de gran afinidad por los colorantes básicos (revisado por Lafarga y cols., 2009). En las primeras décadas del siglo XX el interés por la citología del nucleolo se centró en la variabilidad de su tamaño y morfología en función del tipo celular. En 1934, McClintock propuso que el nucleolo se organizaba en la telofase y que su formación dependía de la actividad de los cuerpos organizadores del nucleolo. Al mismo tiempo se conoció que los cuerpos organizadores del nucleolo correspondían a regiones cromosómicas concretas, lo que permitió proponer, por vez primera, que el nucleolo estaba relacionado con la actividad génica. En 1950 se demostró que en el nucleolo se concentraban RNAs y, en 1960, la técnica de hibridación in situ hizo posible la localización de los genes ribosomales (rDNA) en los cromosomas portadores de NORs. A su vez se desarrollaron los métodos para obtención de extractos nucleolares puros, en los que se caracterizaron bioquímicamente componentes moleculares de esta organela y se estableció que el nucleolo estaba implicado en la síntesis de ribosomas. La incorporación de la microscopía electrónica fue clave para conocer que el nucleolo de las células eucariotas se organiza en cuatro componentes estructurales: i) intersticios nucleolares, que se visualizan como áreas de baja densidad electrónica, ii) los centros fibrilares (CFs), iii) el componente fibrilar denso (CFD), que rodea parcial- o completamente a los CFs, y iv) el componente granular (CG) (Busch y Smetana, 1970) (Figura 2A y B). Desde la década de los 70, las publicaciones científicas acerca

de esta organela fueron muy numerosas, destacando por sus importantes aportaciones la monografía de Hadjiolov (1985) "The nucleolus and ribosome biogenesis". Posteriormente el perfeccionamiento de las técnicas de marcaje a nivel ultraestructural ha permitido descifrar la organización molecular del nucleolo (revisado por Hernandez-Verdun, 2006; Sirri y cols., 2008).

La versión moderna que tenemos del nucleolo añade a su función primaria, la biogénesis de ribosomas, otras funciones tales como la regulación de la mitosis, progresión del ciclo celular y proliferación, respuesta al estrés y a la infección vírica, el proceso de carcinogénesis y la biogénesis de múltiples ribonucleoproteínas (RNPs) de pequeño tamaño (Boisvert y cols., 2007). Además, los avances en el campo de la microscopía confocal, con la expresión ectópica de proteínas fluorescentes, y los estudios de proteómica de extractos nucleolares han contribuido significativamente a conocer la multifuncionalidad del nucleolo. El grupo de Lamond (Dundee, UK), pionero en el campo de la proteómica nucleolar, ha demostrado que los nucleolos aislados continúan transcribiendo el RNA ribosomal, indicando que son estructuras funcional y estructuralmente muy estables. Sin embargo, también observan que sus proteínas están en un estado de flujo continuo (Boisvert y cols., 2007). Recientemente, se han diseñado nuevos protocolos para el análisis por proteómica de nucleolos purificados a gran escala, así como para el seguimiento en células vivas de proteínas nucleolares fluorescentes (Andersen y cols., 2005; Hernandez-Verdun, 2006). Estos estudios han revelado que los compartimentos nucleolares son muy dinámicos y que sus componentes están sometidos a continuo intercambio con el nucleoplasma. Por otra parte, la combinación de proteómica nucleolar con el análisis de proteínas por espectrometría de masas demuestra que, aproximadamente, el 30% de las casi 5000 proteínas identificadas en el nucleolo están funcionalmente relacionadas con la producción de las subunidades del ribosoma. El resto de proteínas, de entidad y función muy diversa, justifican la idea de que el nucleolo tenga funciones adicionales a la biogénesis de ribosomas. Entre las proteínas no ribosomales destacan factores implicados en el procesamiento de mRNAs, en el control del ciclo celular y replicación y en la reparación del DNA. Las nuevas metodologías de análisis del nucleolo han revelado también cambios dinámicos de sus proteínas en diferentes condiciones metabólicas, tales como la inhibición de la transcripción con actinomicina D, la respuesta a la infección viral y la carcinogénesis (Boisvert y cols., 2007; Ahmad y cols., 2009).

Recientemente, ha sido muy importante conocer que en el nucleolo residen

proteínas plurifuncionales o pluriempleadas ("moonlighter") pertenecientes a la familia de proteínas "hub" (proteínas reclutadoras o centralizadoras). En el nucleolo, como en otras organelas no delimitadas por membrana, estas proteínas tienen una gran importancia funcional porque reclutan y estabilizan proteínas específicas sin comprometer su tráfico molecular (Kim y cols., 2008; Emmott y Hiscx 2009; Stark y Talianky 2009). Una característica común de estas proteínas es su capacidad para unir 10 o más ligandos diferentes (proteínas y ácidos nucleicos). Esta propiedad parece deberse a que, por lo general, son proteínas ácidas con una organización estructural desordenada; es decir, disponen de segmentos ricos en aminoácidos ácidos, no completamente plegados, que permanecen flexibles y desordenados. Estos segmentos desordenados confieren a estas proteínas una mayor superficie de interacción con diferentes ligandos, a la vez que favorecen la interacción con secuencias básicas de las proteínas diana (Kim y cols., 2008). Se conocen dos familias de proteínas "hub": dinámicas y estáticas. Las primeras son móviles y se unen a las moléculas diana transportándolas en función de los requerimientos funcionales y del compartimento subcelular donde operen. Las estáticas, cuya misión es más estructural, reclutan simultáneamente moléculas diferentes en un compartimento nuclear concreto (Kim y cols., 2008).

En el nucleolo las proteínas "hub" tienen mucha importancia por ser una organela muy dinámica con determinados componentes moleculares en flujo constante entre el citoplasma, el núcleo y el nucleolo (Boisvert y cols., 2007; Emmott y Hiscx, 2009; Stark y Talianky, 2009). La presencia de proteínas "hub" permite que, en cada compartimento nucleolar, se produzca el tráfico molecular y la interacción con sucesivas proteínas diana. La señalización molecular que regula la importación y/o exportación nucleolar de proteínas no es del todo conocida ya que, a diferencia de la localización nuclear de proteínas, las secuencias que regulan la localización nucleolar (NoLS) no son determinantes de su retención en el nucleolo. Por ejemplo, proteínas que disponen de NoLS como la coilina, cuya secuencia de NoLS está identificada (Hebert y Matera, 2000), no son residentes habituales del nucleolo, mientras que otras que carecen de NoLS, como la nucleolina, son proteínas residentes del nucleolo. En este sentido, Carmo-Fonseca y colaboradores (2000) han propuesto que la localización nucleolar de proteínas puede deberse a su interacción molecular directa o indirecta con el rDNA, con sus transcritos o con determinados componentes protéicos nucleolares. La presencia en el nucleolo de proteínas "hub" añade la posibilidad de que las moléculas diana puedan incorporarse por otros mecanismos de

interacción. Por ejemplo, cuando las proteínas exponen la NoLS, cuya característica común es que son secuencias básicas enriquecidas en los aminoácidos lisina (K) y arginina (R), pueden interactuar fácilmente con los dominios ácidos de los segmentos desordenados de las proteínas "hub". Asimismo, proteínas nucleolares carentes de NoLS pueden importarse al nucleolo unidas a proteínas "hub" que posean NoLS (para revisión, ver Kim y cols., 2008; Okuwaki, 2008; Emmott y Hiscox, 2009).

1.3.2 Organización estructural y funcional del nucleolo en la biogénesis de ribosomas

En las células eucariotas superiores el nucleolo, estructural y funcionalmente, está especializado en la biogénesis de las subunidades de los ribosomas. Un complicado proceso que requiere de i) la transcripción inicial de los genes ribosomales por la maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa I, para generar transcritos primarios de pre-rRNA 47S; ii) el corte del rRNA 47S en las tres categorías de rRNAs nucleolares, 28S, 18S y 5,8S; iii) la modificación post-transcripcional de los transcritos y iv) el ensamblaje de los rRNAs 28S, 18S, 5,8S y 5S, este último de origen extranucleolar, con las proteínas ribosomales para formar la subunidad grande 60S y la pequeña 40S del ribosoma (Raska y cols., 2006) (Figura 5). La localización del rDNA, rRNAs y de la maquinaria molecular del nucleolo ha permitido conocer que dichos procesos ocurren en diferentes subcompartimentos del nucleolo. Con métodos de inmunofluorescencia, utilizando marcadores nucleolares específicos, y microscopía electrónica se distinguen claramente los tres componentes esenciales del nucleolo comentados anteriormente: CF, CFD y CG (Figura 2A y B). En las células de mamíferos estos componentes se distribuyen por todo el nucleolo y su organización varía en función de la actividad transcripcional de los genes rRNA. (Lafarga y cols., 1989, Pena y cols., 2001; Casafont y cols., 2007; Raska y cols., 2006; Boisvert y cols., 2007).

Los CFs aparecen a nivel ultraestructural como áreas redondeadas claras, parcial- o completamente rodeados por el CFD (Risueño y cols., 1982; Ploton y cols., 1987). El número y tamaño de los CFs varía en función del tipo celular y de la actividad metabólica de la célula. Generalmente, las células con una tasa elevada de biogénesis de ribosomas, como las neuronas, poseen numerosos CFs de pequeño tamaño (Figura 2A). Por el contrario, células con reducida actividad transcripcional, como los linfocitos o las neuronas granulares del cerebelo, presentan nucleolos con un CF único y de gran tamaño (Lafarga y cols., 1989; Hozák y cols., 1994). Sin embargo, recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio que las neuronas sensoriales

primarias, metabólicamente muy activas, pueden tener, además de numerosos CFs pequeños, un CF gigante con la misma organización estructural y molecular que los pequeños. Esto sugiere que la presencia de un CFG, por si mismo, no es indicativo de escasa actividad transcripcional (Casafont y cols., 2007). La base estructural de los CFs, y de su interfase con el CFD, es la cromatina nucleolar que alberga el rDNA de las NORs. Cada CF/CFD alberga numerosas copias de genes ribosomales ordenados en tándem (Hadjilov, 1985). El rDNA tiene una tasa de transcripción muy alta (~60% del total de la transcripción), pero no todos los genes que codifican rRNA son activos. Los genes silentes se organizan en la zona central del CF mientras que rDNA activo se dispone en la periferia y se extiende en el CFD, donde se produce la transcripción (Raska y cols., 2006; Boisvert y cols., 2007). En el CF se almacenan transitoriamente diversas moléculas, el factor de transcripción UBF ("Upstream binding factor"), la RNA polimerasa I, algunos pre-rRNAs (especialmente en la periferia), TBP ("TATA binding protein") y DNA topoisomerasa I (revisado por Carmo-Fonseca y cols., 2000; Sirri y cols., 2008; Tremblay y cols., 2009; McKeown y Shaw, 2009). Desde un punto de vista funcional, a los CFs se les considera organizadores estructurales del rDNA y sitios de almacenamiento transitorio de componentes de la maquinaria de transcripción, procesamiento y maduración de los rRNAs (McKeown y Shaw, 2009) (Figura 2).

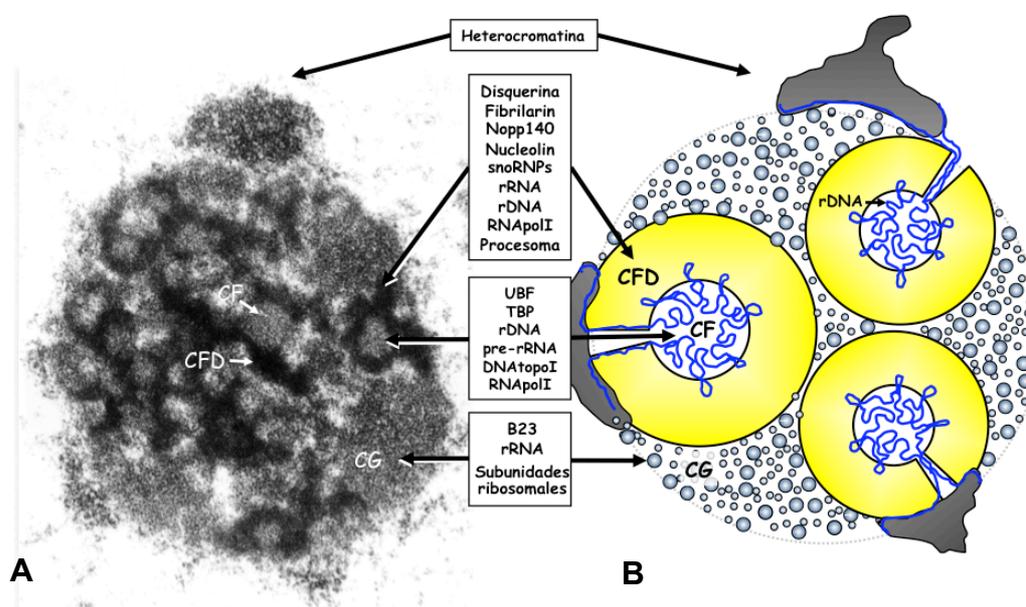


Figura 2. Compartimentos del nucleolo. **A.** Imagen ultraestructural de un nucleolo perteneciente a una neurona del núcleo supraóptico de la rata. Se identifican los tres subcompartimentos canónicos del nucleolo, centros fibrilares (CF), componente fibrilar denso (CFD) y componente granular (CG). **B.** Esquema de un nucleolo en el que se representan los tres subcompartimentos característicos del nucleolo. En el CF las líneas azules representan el rDNA, que parcialmente se expande al borde interno del CFD. En CG los gránulos grises representan las partículas ribosomales grandes y pequeñas. Los recuadros centrales se resumen algunas moléculas que específicamente se localizan en cada compartimento.

El CFD se organiza formando una cápsula total o parcial alrededor de los CFs. El conjunto de CF con el CFD asociado constituye una unidad estructural y funcional del nucleolo, donde se produce la biogénesis y procesamiento inicial de los rRNA, que posteriormente migrarán al componente granular para terminar el ensamblaje de las partículas ribosomales (Ploton y cols., 2000; Raska y cols., 2006). Estas unidades del nucleolo corresponden a las esférulas argirófilas nucleolares descritas por Cajal (1903; revisado por Lafarga y cols., 2009). El CFD está constituido por fibrillas densamente empaquetadas y con elevada densidad electrónica. Alberga i) los genes ribosomales activos, ii) componentes de la maquinaria de transcripción, incluyendo la enzima RNA-polimerasa I y su factor regulador la nucleolina, iii) snoRNAs asociados a proteínas nucleolares (snoRNPs) y iv) "procesomas" (Dragon y cols., 2002; Mongelard y Bouvet, 2006; Sirri y cols., 2008) (Figura 2). Entre las proteínas constituyentes de las snoRNPs tienen particular importancia la chaperona Nopp140, la pseudouridina sintasa disquerina/NAP57 y la rRNA metiltransferasa fibrilarina. Estas enzimas son responsables de la pseudouridinación y metilación de los pre-rRNAs, dos modificaciones postranscripcionales fundamentales para la posterior escisión del pre-rRNA 47S en las tres modalidades de rRNAs 18S, 28S y 5,8S (Sweet y cols., 2008; Montanaro y cols., 2008). De hecho, el déficit de pseudouridinación de los rRNAs, producido por la mutación de la enzima disquerina/NAP57, causa la disqueratosis congénita hereditaria ligada al cromosoma X, en la que se detecta una reducción en la tasa de producción de ribosomas (Boisvert y cols., 2007; Montanaro y cols., 2008). Otros componentes importantes del CFD son los procesomas grandes y pequeños, complejos macromoleculares de RNPs necesarios para la formación de las subunidades del ribosoma (Grandi y cols., 2002). Los procesomas pequeños son responsables de formar la subunidad pequeña del ribosoma, se localizan en el CFD y están constituidos por U3 snoRNAs y las 40 proteínas necesarias para su completo ensamblaje. Los procesomas grandes se comparten con el CG (Sirri y cols., 2008). Las etapas fundamentales de la biogénesis de los RNAs ribosomales que tienen lugar en el CFD se representan en la Figura 5.

El CG se denomina así porque a nivel ultraestructural aparece formando gránulos de 15-20 nm de diámetro que corresponden a las subunidades pequeñas y grandes pre-ribosomales. Funcionalmente, en el CG finaliza el ensamblaje de las subunidades de los ribosomas, particularmente de la grande, además de ser un sitio de depósito de estas subunidades a la espera de su exportación al citoplasma (Raska y cols., 2006). Una proteína característica y funcionalmente muy importante del CG es la

fosfoproteína nucleofosmina (NPM), también conocida como B23, NO38 o numatrina. Es una de las proteínas con mayor "pluriempleo" celular ya que, además de tener un papel crítico en el ensamblaje final y exportación de las partículas pre-ribosomales, actúa como endonucleasa, ribonucleasa y chaperona (Boisvert y cols., 2007). Como chaperona, impide el plegamiento y la agregación anormal de proteínas, interacciona con histonas, DNA y RNA, y participa en el ensamblaje y desensamblaje de la cromatina, así como en el procesamiento de los rRNAs (Huang y cols., 2005; Okuwaki, 2008). Además, se asocia indirectamente con la nucleolina, otra chaperona nucleolar co-remodeladora de la cromatina (Mongelard y Bouvet, 2006). A esta lista hay que añadir su actividad antiapoptótica y su función reguladora de la duplicación de centrosomas, de la actividad de factores supresores tumorales, tales como ARF y p53, y de la proliferación y supervivencia celular (Okuwaki, 2008).

La multifuncionalidad de la NPM/B23 se ha entendido mejor al conocerse que es miembro de la familia de proteínas ácidas desordenadas "hub" (Kim y Gerstein, 2008; Emmott y Hiscox, 2009). Como tal, la NPM/B23 tiene la capacidad innata de interactuar con diferentes moléculas reclutándolas y transportándolas hacia o desde el nucleolo. De hecho, la localización nucleolar de la proteína nucleolina y la exportación de las subunidades ribosomales son procesos dependientes de B23 (Emmott y Hiscox, 2009). Además de las propiedades específicas de las proteínas "hub", la proteína NPM/B23 puede sufrir numerosas modificaciones postraduccionales (fosforilación, ubiquitilación, sumoilación, ribosilación y acetilación), lo que incrementa su potencialidad funcional. Por ejemplo, la sumoilación determina su destino nucleolar y el cumplimiento de algunas de sus funciones nucleolares (Liu y Cols., 2007; Yun y cols., 2008; Emmott y Hiscox, 2009). Un ejemplo muy importante por el que NPM/B23 ha cobrado mucho interés en los últimos años ha sido conocer su sobreexpresión en las células cancerosas y que su mutación o delección se relaciona con la leucemia mieloide aguda y con el síndrome de la mielodistrofia en el que se incrementa la incidencia de carcinogénesis (Yung, 2007; Okuwaki, 2008).

1.4 EI CUERPO DE CAJAL

1.4.1 Relato histórico

El cuerpo de Cajal (CB) es una organela nuclear descubierta por Santiago Ramón y Cajal en 1903 en diversos tipos neuronales y en varias especies de mamíferos

(conejo, perro y humano). Cajal la describe como una estructura nuclear argirófila, de forma esférica y bordes nítidos, de aproximadamente 0,5 a 1 μm de diámetro, con una textura homogénea y localizada en el nucleoplasma (Figura 3). Cajal la bautiza con el nombre de "cuerpo accesorio" del nucleolo. Es curioso, que para el autor este nombre no implica asociación física con el nucleolo. Mas bien, utiliza el término de cuerpo accesorio para referirse a una relación más general con el nucleolo y para diferenciarlo claramente de las esférulas argirófilas descritas por él en el nucleolo (revisado por Lafarga y cols., 2009). En estudios posteriores Cajal (1910) demostró que el cuerpo accesorio es una estructura constante en la mayoría de tipos neuronales y que presenta variaciones en el número y tamaño dependiendo de la población neuronal.

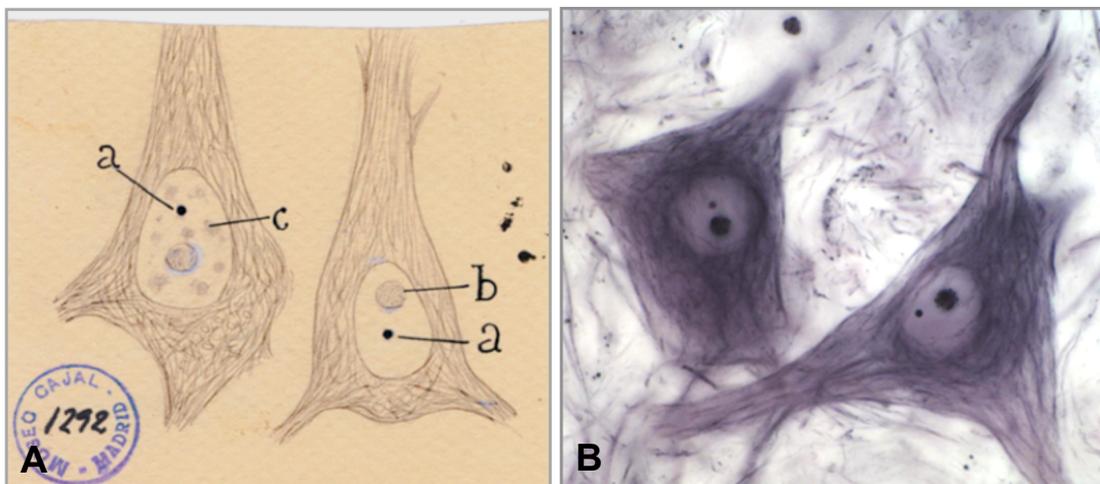


Figura 3. A. Reproducción de un dibujo original de Cajal de dos neuronas piramidales humanas. El autor dibuja en el núcleo el cuerpo accesorio (a), el nucleolo (b) y los grumos hialinos (c) y, en el citoplasma, el citoesqueleto de neurofibrillas. **B.** Microfotografía de neuronas piramidales teñidas con el método de nitrato de plata reducido de Cajal. Aparecen teñidos los mismos componentes celulares, el nucleolo, el CB y las neurofibrillas del citoplasma.

El cuerpo accesorio despertó escaso interés entre los científicos de la época hasta que, en la década de 1950, el equipo de Barr (University Western Ontario), estimulado por la demostración de la cromatina sexual en el núcleo neuronal de las hembras (en la actualidad el cromosoma X inactivo), dedicó un gran esfuerzo al estudio del núcleo neuronal y publicó tres artículos sobre la organización del cuerpo accesorio en neuronas de varios centros nerviosos del gato (para revisión, ver Lafarga y cols., 2009). En estos estudios se confirmaban las observaciones de Cajal, se demostraba la ausencia de DNA (Feulgen negativo) en el cuerpo accesorio y se aportaban las primeras evidencias de su comportamiento dinámico en respuesta a los cambios de la expresión génica asociados con la axotomía (Lafarga y cols., 2009).

Con la incorporación de las técnicas de microscopía electrónica al estudio del núcleo celular, Monneron y Bernhard (1969) describen en hepatocitos un cuerpo nuclear formado por hebras densas arrolladas de material fibrilar denso, que denominaron "coiled body" (de cuerpo arrollado). En su estudio estos investigadores no hacen referencia a los artículos de Cajal (1910), probablemente no los conocían, y presentan el "coiled body" como una estructura nuclear nueva. En 1983, Lafarga y sus colaboradores adaptaron el método del nitrato de plata reducido para su aplicación a la microscopía electrónica y demostraron, en varios tipos neuronales, que el cuerpo accesorio de Cajal y el "coiled body" de Monneron y Bernhard (1969) eran la misma estructura. La reacción argéntica se detectaba específicamente sobre las hebras densas arrolladas del "coiled body", mientras que el material amorfo y de baja densidad electrónica que se dispone entre las hebras densas carecía de afinidad por la plata. Sin embargo, fue necesario esperar hasta 1999 para que la comunidad científica internacional reconociese el descubrimiento a Cajal. Así, en un "EMBO Workshop" sobre la organización funcional del núcleo celular celebrado en Praga en 1999, el profesor Gall (Carnegie Institution of Baltimore), apoyándose en las observaciones de nuestro laboratorio y en las de otros investigadores, propuso como homenaje a Cajal y en reconocimiento a su descubrimiento del "cuerpo accesorio" la adopción del nombre de "Cajal body" (CB) en sustitución de "coiled body", (Carvalho y cols., 1999; Gall, 2000). Desde esta fecha, el nombre de "Cajal body" (cuerpo nuclear de Cajal) ha sido universalmente aceptado en la literatura internacional, incluyendo los textos de Biología Celular (para revisión, ver Lafarga y cols., 2009).

Sin ninguna duda un avance fundamental para conocer la importancia funcional de esta organela ha sido su caracterización molecular. En primer lugar, con el método de EDTA, que contrasta selectivamente estructuras enriquecidas en RNA, se demostró la presencia de RNA en el CB (Monneron y Bernhard, 1969; Lafarga y cols., 1983). Hallazgo que fue confirmado y ampliado por los estudios del laboratorio de Fakan (1984) que demostró, con técnicas de inmunocitoquímica ultraestructural, la presencia de snRNPs en el CB. En esta misma época, la aplicación de la técnica autorradiográfica de incorporación de uridina tritiada a nivel ultraestructural demostró la falta de incorporación del precursor para la síntesis de RNA en el CB (Moreno Díaz de la Espina y cols., 1982), descartando al CB como sitio de transcripción y splicing de los pre-mRNAs.

En la década de 1990 se inicia la era moderna en el estudio del CB al descubrirse en el laboratorio del Dr. Tan (Scripps Institute, La Jolla) que el suero de un paciente con patología autoinmune marcaba específicamente los CBs, por entonces todavía denominados "coiled bodies", en muchos tipos celulares de los vertebrados, invertebrados y plantas (Gall, 2000). La proteína reconocida por el suero autoinmune, con peso molecular de 80 kDa, fue bautizada con el nombre de coilina (de "coiled body", Andrade y cols., 1991). A partir de este descubrimiento, se consiguió clonar el cDNA de la coilina y obtener la proteína recombinante, que sirvió para producir anticuerpos específicos dirigidos contra la coilina. La existencia de un marcador molecular específico del CB representó un gran avance para caracterizar otros componentes moleculares de esta estructura. Así, en la misma década de los noventa, se detectó la presencia en el CB de la proteína nucleolar fibrilarina (para revisión, ver Gall, 2000; Raska y cols., 2006) y el grupo de Angus Lamond (EMBO, Heidelberg), desarrolló métodos de hibridación in situ para detectar snRNAs ricos en uridina (U RNAs). El uso de estas sondas de hibridación reveló que en los CBs se acumulan U1, U2, U4, U5 y U6 RNAs, todos ellos componentes de las snRNPs implicadas en el "splicing" de los pre-mRNAs.

Posteriormente, el grupo del Prof. Dreyfuss (Howard Hughes Medical Institute, Philadelphia) descubre el factor de supervivencia de las neuronas motoras (SMN) y su ensamblaje con otras proteínas para formar el complejo multiproteico SMN, que se une a las snRNPs espliceosomales (Liu y Dreyfuss, 1996). Además, se localizó en el CB el U7 snRNA implicada en el procesamiento específico de los pre-mRNAs de las histonas (Lamond y Carmo-Fonseca, 1993; Gall, 2000). A la lista de RNAs pequeños acumulados en el CB hay que añadir el U3 snoRNA de las snoRNPs. Estas snoRNPs incluyen proteínas implicadas en la biogénesis de ribosomas tales como la Nopp140, fibrilarina y disquerina/NAP57 (Cioce y Lamond, 2005; Raska y cols., 1990). Mas recientemente se ha documentado que el CB está enriquecido en RNAs específicos, los denominados scaRNAs ("small Cajal body-specific RNAs"), que son fundamentales para la maduración de snRNPs y snoRNPs en el CB (Jady y Kiss, 2001). Aunque se ha propuesto que pueden existir diferentes categorías de CBs, las moléculas anteriormente comentadas suelen ser habituales en la mayoría de los CBs. Por eso, a los CB que reclutan dicha batería molecular se les denomina CBs canónicos o maduros. Se interpreta que la concentración de enzimas y sustratos en una misma

estructura nuclear representa un mecanismo celular dirigido a mejorar la eficiencia del ensamblaje y maduración de las snRNPs y snoRNPs en el CB (Kaiser y cols., 2008).

Otro aspecto esencial de los CBs es su comportamiento dinámico en respuesta a cambios de la actividad celular. Estudios realizados en diferentes laboratorios, incluido el nuestro, han demostrado que el tamaño y número de CBs por célula es muy variable y está directamente relacionado con la actividad transcripcional de la célula (Lafarga y cols., 1998; Carmo-Fonseca y cols., 1993; Santama y cols., 1996; Pena y cols., 2001; Berciano y cols., 2007). El seguimiento en células vivas de proteínas del CB fusionadas con proteínas fluorescentes ha permitido conocer que, aunque el CB es una estructura estable, tiene un importante dinamismo molecular y sus componentes moleculares están en flujo constante con el nucleoplasma (Misteli, 2008). Además, el CB se mueve libremente en el nucleoplasma y se relaciona espacialmente con otros compartimentos nucleares, particularmente con el nucleolo, determinados dominios de la cromatina y los cuerpos PML (Platani y cols., 2002; Cioce y Lamond, 2005; Mistelli, 2007; 2008; Berciano y cols., 2007). De hecho, la relación espacial física de los CBs con los cuerpos nucleares PMLs, implicados en la regulación de la transcripción, ha permitido proponer la existencia de un tráfico molecular activo entre el CBs y otros dominios nucleares implicados en la transcripción (Cioce y Lamond, 2005). Finalmente, comentar que el CB establece relaciones espaciales específicas con determinados loci génicos, particularmente del U2 RNA y de las histonas, una asociación que es dependiente de la fase del ciclo celular (para revisión, ver Frey y Matera, 1995; Cioce y Lamond, 2005).

1.4.2 Papel funcional del CB en la biogénesis de snRNPs y snoRNPs

El CB ha sido una estructura nuclear funcionalmente muy enigmática hasta hace unos pocos años. Sin embargo, su composición molecular heterogénea, su relación directa con la actividad transcripcional, su movilidad y su asociación con determinados loci génicos ha permitido involucrar al CB en diferentes funciones, incluyendo i) la regulación de la expresión génica de snRNAs, snoRNAs y de determinadas histonas (Frey y Matera, 1995; Fernandez y cols., 2002); ii) la biogénesis de snRNPs espliceosomales, iii) el procesamiento de los snoRNPs, iv) el ciclo celular y v) la respuesta al estrés celular y al daño en el DNA (Frey y Matera, 1995; Carmo-Fonseca, 2002; Cioce y Lamond, 2005; Cioce y cols., 2006; Morris, 2008). Nosotros vamos a considerar a continuación su implicación funcional en la biogénesis de las snRNPs espliceosomales y de las snoRNPs nucleolares.

La participación del CB en la biogénesis de las diferentes formas de snRNPs esliceosomales es muy importante ya que sus U snRNAs estructurales sufren modificaciones en el CB. Brevemente, la secuencia de acontecimientos sería la siguiente. Primero, tras la transcripción, los U snRNAs (U1, U2, U4 y U5 snRNAs) son exportados al citoplasma donde se modifican postranscripcionalmente por hipermetilación del extremo 5', formándose la caperuza de trimetil-guanosina. Además, en el citoplasma estos U snRNAs se ensamblan con el complejo protéico esliceosomal Sm (SmB/B', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF y SmG). Dicho ensamblaje es dependiente de la interacción con el complejo SMN, compuesto por la proteína de supervivencia de las motoneuronas (SMN) y, al menos, 7 proteínas denominadas "geminis" (Carissimi y cols., 2006). Segundo, una vez ensamblado el complejo pre-snRNP (snRNA/Sm/SMN), la snurimportina/importina-beta dirige su importación nuclear, donde se destina primariamente al CB (Stanek y cols., 2008). La incorporación al CB requiere de la interacción molecular de las pre-snRNPs con la coilina, proteína estructural del CB (Figura 4).

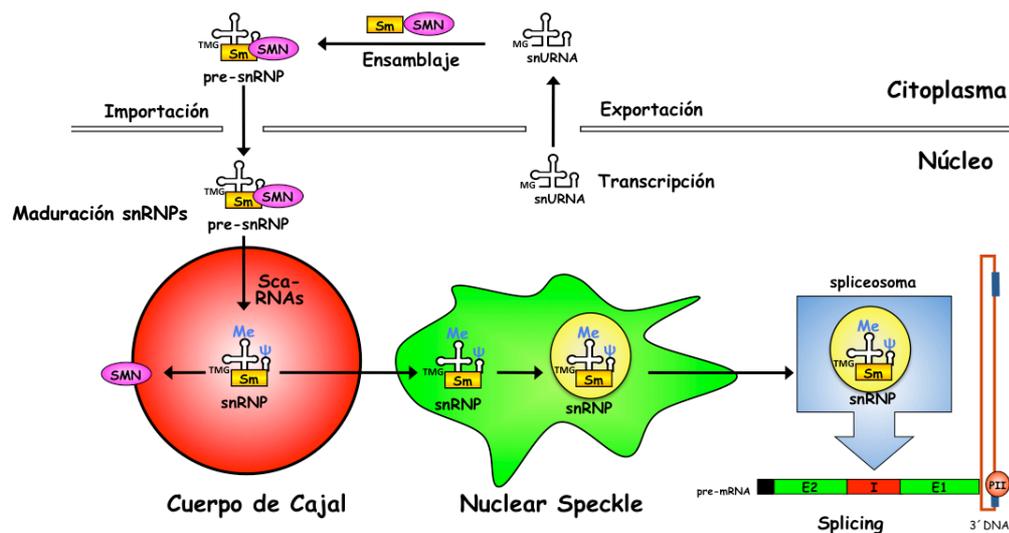


Figura 4. Etapas de la biogénesis de snRNPs esliceosomales. Trás la transcripción, los snRNAs esliceosomales se exportan al citoplasma donde se ensamblan con los complejos SMN y Sm para formar las pre-snRNPs que son reimportadas al núcleo por la importina-beta (no representada) y al CB. En el CB culminan su maduración por metilación y pseudouridinación de los snRNAs. Los scaRNAs dirigen este proceso. Las snRNPs maduras se almacenan transitoriamente en los speckles nucleares. En las fibrillas pericromatínicas las snRNPs se integran en el esliceosoma para participar en el "splicing" de los pre-mRNAs.

Tercer, en el CB la maduración funcional de las pre-snRNPs a snRNPs requiere dos modificaciones en los snRNAs: la 2'-O-metilación en múltiples residuos de ribosas y la conversión de uridinas en pseudouridinas. En estos dos procesos están implicados los scaRNAs o RNAs-guías específicos del CB (Darzcy y cols., 2002; Jady y cols., 2003). La función de los scaRNAs es alinearse, por interacción de pares de bases

complementarias, con las secuencias diana de los snRNAs, facilitando así la modificación enzimática específica en los nucleótidos concretos. Otra modificación que sufren las snRNPs en el CB es la disociación del complejo SMN, para lo cual es muy importante la interacción de las proteínas del complejo Sm con la coilina (revisado por Morris, 2008; Wahl y cols., 2009). Así, las snRNPs activas pueden ser transferidas a los sitios de transcripción donde se ensamblan en el espliceosoma, maquinaria molecular que lleva a cabo el "splicing" de los pre-mRNAs in situ. Otro destino de las snRNPs que salen del CB es su almacenamiento en los "speckles nucleares" (Lamond y Spector, 2003; Lafarga y cols., 2009) (Figura 4).

El CB también participa en la biogénesis de snoRNPs nucleolares. Existen múltiples tipos de snoRNPs que se agrupan en dos familias según el RNA pequeño (snoRNA) que contengan: snoRNPs tipo C/D (metiltransferasas) y snoRNPs del tipo H/ACA (pseudouridina sintasa). La participación del CB en la maduración de snoRNPs comienza con la 2'-O-ribosa-metilación y pseudouridinación, proceso dirigido por enzimas específicas guiadas por los scaRNAs (Matera y cols., 2007). Además, se produce el ensamblaje molecular de las pre-snoRNPs con la chaperona Nopp140 y con otras proteínas específicas. Así, las snoRNPs de la familia C/D se unen a la fibrilarina, mientras que las snoRNPs H/ACA interaccionan con la disquerina/NAP57 (Figura 5).

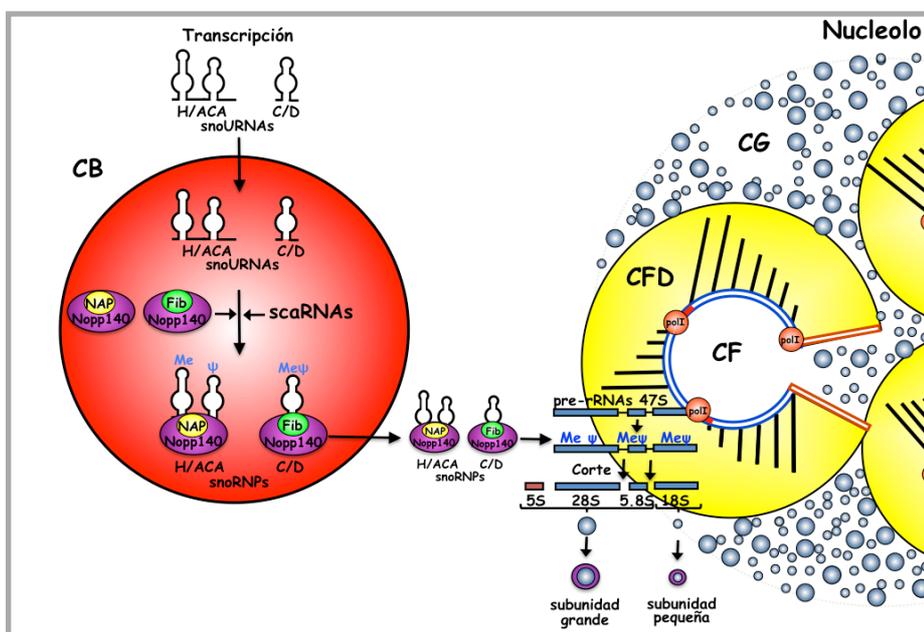


Figura 5. Etapas de la biogénesis de snoRNPs nucleolares. Trás su transcripción los snoRNAs se incorporan al CB donde se modifican por metilación y pseudouridinación y se ensamblan con los complejos Nopp140-fibrilarina y Nopp140-disquerina. Las snoRNPs activas se exportan al CFD del nucleolo donde dirigen la maduración del pre-rRNA 47S por metilación y pseudouridinación. El pre-rRNA 47S maduro es cortado en los RNAs 28S, 5.8S y 18S. Estos transcritos se unen al procesoma para formar la subunidad ribosomal grande y el 18S que junto con el procesoma pequeño formarán la subunidad ribosomal pequeña.

Una vez completada su maduración, las snoRNPs activas son transferidas al nucleolo donde cumplirán su función en el procesamiento de los pre-rRNAs. La fibrilarina actúa como metiltransferasa del pre-rRNA 47S naciente y la disquerina/NAP57 cataliza la conversión de uridinas en pseudouridinas. Estas modificaciones son esenciales para el corte de los pre-rRNAs, proceso que da lugar a los rRNAs 18S, 28S y 5,8S, y para el ensamblaje de estos últimos con los procesomas. El rRNA 18S unido al procesoma forma la subunidad pequeña del ribosoma. Los rRNAs 28S y 5,8S junto con el rRNA 5S se unen al procesoma de la subunidad grande para constituir la partícula mayor del ribosoma (Carmo-Fonseca y cols., 2000; Boisvert y cols., 2007; Sirri y cols., 2008) (Figura 5).

1.4.3 La proteína p80-coilina

Como ya se ha comentado anteriormente la coilina es una proteína ubicua en las células eucariotas que se utiliza como marcador específico de los CBs. Se concentra en las hebras densas arrolladas del CB, además de distribuirse difusamente por el núcleo, excluyendo al nucleolo (Andrade y cols., 1991; Raska y cols., 1991). En condiciones fisiológicas, aproximadamente el 30% de la coilina reside en los CBs mientras que el resto es una fracción nucleoplasmática donde, por el momento, su función es desconocida (Whittom y cols., 2008). Se ha propuesto que, en las células que carecen de CBs, la coilina nucleoplasmática está implicada en las mismas funciones que en el CB pero con menor eficiencia (Klingauf y cols., 2006). Por otro lado, aunque la coilina nucleoplasmática y del CB están en constante equilibrio el tamaño y número de CBs por célula no es dependiente de la concentración nucleoplasmática de coilina (Ogg y Lamond, 2002). Además, en condiciones experimentales, una fracción de coilina puede formar agregados perinucleolares ("perinucleolar caps"), CBs intranucleolares o incluso distribuirse en el interior del nucleolo (Lyon y cols., 1997; Lafarga y cols., 1998, Sleeman y cols., 1998; Shpargel y Matera, 2005). En el CB, la coilina actúa como una proteína estructural que sirve de armazón nucleador de los diversos factores que son reclutados en el CB para desarrollar el amplio rango de funciones de este cuerpo nuclear (Whittom y cols., 2008; Liu y cols., 2009). En este sentido, ratones knockout para el gen de la coilina forman los denominados CBs residuales que, al carecer de coilina, no pueden reclutar snRNPs, SMN y snoRNPs ni, consecuentemente, participar en la biogénesis nuclear de las snRNPs y snoRNPs (Tucker y cols., 2001). La importancia de la coilina para el ensamblaje de los CBs se infiere de la capacidad que

tienen los fibroblastos del ratón knockout de coilina de restituir la formación de CB canónicos al transfectar el gen de la coilina (Tucker y cols., 2001). De igual modo, células HeLa privadas de coilina mediante la expresión de siRNA presentan una total ausencia de CBs canónicos (Lemm y cols., 2006).

La coilina humana es una fosfoproteína de 576 aa con múltiples dominios de interacción molecular (Chan y cols., 1994). El análisis mutacional de la coilina nos ha permitido conocer que el extremo N-terminal posee i) un motivo de oligomerización consigo misma, ii) un dominio de interacción con Nopp140 y con U snRNAs, iii) dos señales de localización nuclear (NLS) y iv) una señal de localización nucleolar habitualmente oculta (NoLS) (Isaac y cols., 1998; Hebert y Matera, 2000). En el extremo C-terminal, la coilina posee el dominio RG (arginina/glicina) de interacción con la proteína SMN y el de interacción con el complejo Sm de las snRNPs espliceosomales (Hebert y cols., 2001; Xu y cols., 2005) (Figura 6).

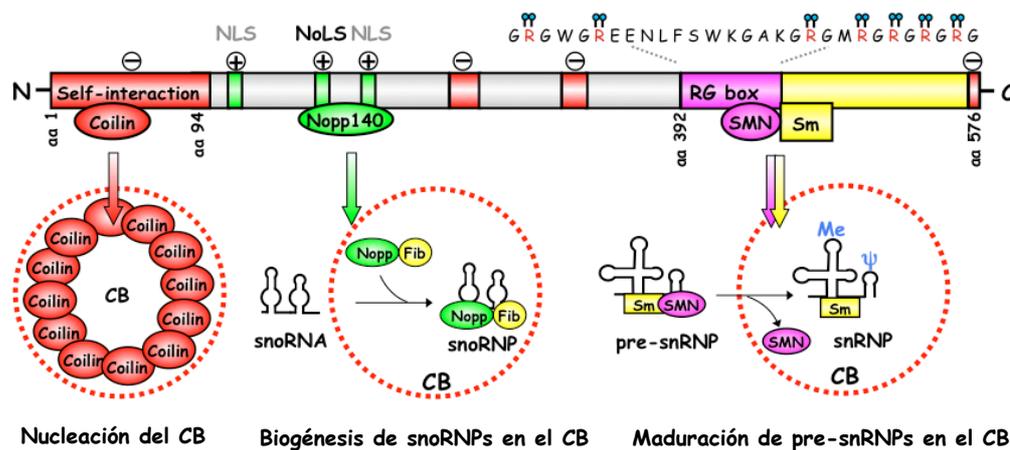


Figura 6. Esquema de los dominios funcionales de la proteína coilina. En el extremo N-terminal, el dominio de autointeracción (rojo), de interacción con la Nopp140 y las secuencias básicas (verde) de las NLS y la NoLS, flanqueadas por dominios fosfoácidos (rojo). El extremo C-terminal contiene el dominio de interacción con la proteína SMN, la caja RG con sDMAs (rosa) y el dominio de interacción con el complejo Sm de las snRNPs espliceosomales. En rojo las zonas ricas en serinas fosforiladas.

La existencia de tantos dominios de interacción molecular permite que la coilina oligomeric para formar la estructura nucleadora del CB necesaria para reclutar los diferentes sustratos que serán enzimáticamente modificados en su interior. Sin embargo, la eficiencia funcional de la coilina requiere que su forma nativa se modifique postraduccionalmente. De hecho, se considera que la adición de grupos fosfato y metilo a la molécula de coilina es imprescindible para desarrollar su multifuncionalidad.

La dependencia de la fosforilación de la coilina en el ciclo vital del CB fue demostrada por primera vez por Carmo-Fonseca y colaboradores (1993). En este estudio los autores demuestran que en interfase la coilina humana contiene al menos 11 residuos de serina fosforilados, de los cuales 6 se encuentran en el extremo C-terminal. La coilina fosforilada tiene capacidad de oligomerización. Por el contrario, la hiperfosforilación de la coilina durante la mitosis reduce su capacidad de oligomerizar y provoca la desintegración de los CBs. Posteriores estudios utilizando fosfomutantes del extremo C-terminal han aportado importantes evidencias de la dependencia de la fosforilación de la coilina para su localización, oligomerización y movilidad (Hearst y cols., 2009). De hecho, para estos autores la fosforilación es imprescindible para la formación de CBs y destacan que el estado hiperfosforilado impide su ensamblaje. Otro aspecto importante es que el estado fosforilado de la coilina impide su localización en el nucleolo. Como hemos comentado anteriormente, la coilina posee una NoLS que le permitiría destinarse al nucleolo. En determinadas situaciones experimentales y patológicas la coilina se recluta en el nucleolo y/o forma CBs intranucleolares (Ochs y cols., 1994; Hebert y cols., 2000). Aunque la NoLS no es del todo conocida, se ha propuesto que en condiciones fisiológicas permanece estructuralmente oculta (Hebert y cols., 2000). Para estos autores, la NoLS de la coilina es una región muy básica, rica en lisinas y argininas, flanqueada por dos dominios muy ácidos de serinas fosforiladas, lo que provoca interacciones electrostáticas entre estas dos regiones que conducen a cambios conformacionales que pueden ocultar la NoLS.

Otra modificación postraduccional clave para la función biológica de la coilina es la dimetilación simétrica de las argininas (sDMA) de la caja RG, ya que determina diferentes procesos de interacción molecular. De hecho, la sDMA de la coilina incrementa su afinidad para interactuar con el dominio TUDOR de la proteína SMN, a la vez que regula su función en la biogénesis de snRNPs (Hebert y cols., 2002; Matera y Shpargel, 2006). En este sentido, la inhibición exógena de la metilación de la coilina con adenosin-2',3'-dialdehído oxidado (AdOx) o con 5'-deoxy-5'-metiltioadenosina (MTA),

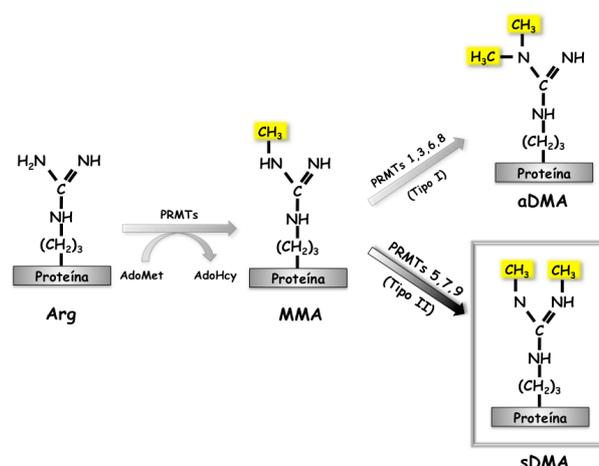


Figura 7. Dimetilación simétrica y asimétrica de proteínas

induce la disociación del factor SMN de los CBs y su ensamblaje en cuerpos nucleares conocidos como gems (gemelos de los CBs) (Hebert y cols., 2002; Navascues y cols., 2004; 2007). Durante la pasada década, se han identificado diez metiltransferasas (PRMTs), de las cuales PRMT5, PRMT7 y PRMT9 catalizan la dimetilación simétrica de argininas (Figura 7). En la actualidad, la única enzima conocida que cataliza la sDMA en la coilina es la PRMT5 (Branscombe y cols., 2001; Boisvert y cols., 2002; Lee y Stallcup, 2009). Otras proteínas dianas de la PRMT5 son la proteína básica de la mielina (Baldwing y Carnegie, 1971), y las proteínas espliciosomales SmB/B', SmD1, SmD3 y Lsm4 (Brahms y cols., 2000, 2001). Por el momento no se conocen desmetilasas de las argininas dimetiladas de la coilina (Bedford y Clarke, 2009).

Otra modificación postraduccional de proteínas que, con carácter general, ha cobrado gran importancia en la última década es la conjugación con SUMO. Aunque por el momento no ha sido demostrado que la coilina esté modificada por sumoilación, la interacción de la coilina con PIASy, una SUMO-E3 ligasa, sugiere una posible participación de SUMO1 en su regulación funcional (Sun y cols., 2005).

1.4.4 La proteína de supervivencia de las motoneuronas (SMN)

La SMN es una proteína de 294 aa que se expresa en todas las células somáticas de vertebrados e invertebrados (Kolb y cols., 2007). Estructuralmente, el extremo N-terminal posee el dominio de interacción con proteínas "geminis" y una secuencia rica en lisinas de interacción con RNAs (K-rich). Tiene un dominio central TUDOR de interacción con las sDMA de la caja RG de la coilina, Sm y fibrilarina. Esta interacción permite el ensamblaje e importación nuclear de las snRNPs y snoRNPs para su maduración en el CB (Shaw y cols., 2008). En el extremo C-terminal expone una secuencia rica en prolina (P-rich) y una caja tirosina-glicina (YG) implicada en su autoensamblaje (Figura 8).

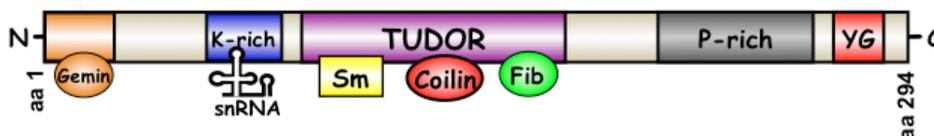


Figura 8. Esquema de los dominios funcionales de la proteína SMN. En el extremo N-terminal, el dominio de interacción con la proteína Gemin2 (naranja), en azul el dominio de interacción con los snRNAs espliceosomales rico en lisinas (K-rich), el dominio TUDOR de interacción con las proteínas del complejo Sm, la coilina y la fibrilarina (morado). En el extremo C-terminal en gris el dominio rico en prolina (P-rich) y la caja tirosina-glicina (YG-box) (en rojo).

En las células, la proteína SMN no se encuentra de forma aislada sino que forma parte del complejo multiproteico SMN constituido por la proteína SMN y siete proteínas asociadas, Gemin 2-8 (Kolb y cols., 2007). El complejo SMN se localiza en el citoplasma y se acumula en el CB. En células fetales y en algunas líneas celulares, el complejo SMN también se concentra en cuerpos nucleares específicos que, por su frecuente yuxtaposición a los CBs, han recibido la denominación de "geminis" de los CBs o "gems" (Liu y Dreyfuss, 1996). La proteína SMN es una proteína esencial en todos los tipos celulares estudiados hasta ahora. Su silenciamiento bien por siRNAs o utilizando animales knockout causa alta mortalidad embrionaria. Se conocen diferentes funciones del complejo SMN. En el citoplasma, el metiloma es responsable de la sDMA de la caja RG de determinadas proteínas del complejo Sm (Friesen y cols., 2001). Dicha metilación es imprescindible para que se produzca la interacción molecular entre los complejos Sm y SMN y su posterior ensamblaje con los U snRNAs espliceosomales (Girard y cols., 2006; Kolb y cols., 2007). Dentro del CB, el complejo SMN interacciona con la coilina, permitiendo la incorporación de las pre-snRNPs para su maduración. Esta interacción molecular regula el número de CBs en función de la demanda celular de biogénesis de snRNPs. De hecho, el silenciamiento de la proteína SMN con siRNAs impide el ensamblaje del complejo Sm con el snRNA e induce la pérdida de CBs canónicos (Girard y cols., 2006). Las funciones nucleares del complejo SMN también están reguladas por su estado de fosforilación. De tal suerte que, dentro del CB, en estado hipofosforilado permanece unido a las pre-snRNPs y para su disociación necesita de la fosforilación de las proteínas SMN y gemin 3 (para más información ver Grimmer y cols., 2005; Petri y cols., 2007).

1.4.5 Implicación de las proteínas SMN y coilina en la patología del CB

Aunque el CB es un compartimento nuclear funcionalmente polifacético, muchas de las funciones que se le atribuyen se fundamentan en su composición molecular, pero la importancia funcional de alguna de ellas no ha sido hasta el momento claramente establecida. La función mejor conocida de los CBs es su papel en la biogénesis de las snRNPs y snoRNPs (Carmo-Fonseca, 2002; Cioce y Lamond, 2005; Morris, 2009). La importancia funcional del CB y de sus componentes en dichos procesos puede entenderse con el estudio de ratones "knockout" para la coilina y en la enfermedad de la atrofia muscular espinal (SMA).

El estudio en ratones knockout realizado en nuestro laboratorio en colaboración con el grupo de Matera (Cleveland, OH) demostró la importancia funcional de la coilina. Los ratones homocigotos eran difícilmente viables y los que sobrevivían presentaban un envejecimiento precoz. El análisis de diferentes tejidos así como de líneas celulares derivadas de estos mutantes revelaron ausencia total de CBs. Las snRNPs y las snoRNPs eran incapaces de reclutarse en dominios nucleares concretos y los núcleos exhibían evidentes signos de heterocromatinización. Sin embargo, cuando las células recuperaban la expresión de la coilina silvestre en experimentos de transfección, la coilina exógena formaba CBs canónicos capaces de reclutar SMN, snRNPs y snoRNPs. Estos resultados han tenido gran repercusión científica ya que, sin ninguna duda, demostraron que la coilina es un componente esencial para la correcta formación y/o mantenimiento del CB. Además, indican que el reclutamiento de proteínas del complejo SMN, de snRNPs y de snoRNPs requiere la presencia nucleadora de la coilina.

La atrofia muscular espinal (SMA) es una enfermedad neuromuscular de base genética de devastadoras consecuencias. En su forma más severa es letal y produce la muerte en los primeros meses de la vida postnatal. Al descubrirse que es una enfermedad genética causada por mutaciones puntuales en el gen *SMN1*, que codifica el factor SMN (Lefevbre y cols., 1994; Liu y Dreyfuss, 1996), se estableció la primera conexión entre el CB y la patología humana. Esta enfermedad se caracteriza por un patrón hereditario autosómico recesivo y se le considera la causa genética más importante de mortalidad infantil. En más del 95% de los casos la etiología se debe a mutaciones puntuales en el gen *SMN1*. A nivel clínico, la enfermedad se caracteriza por degeneración y pérdida de las motoneuronas del asta anterior de la médula espinal. A esto le sigue una parálisis progresiva de las extremidades y del tronco y, en su forma más severa, la muerte en el primer año de la vida. Estudios llevados a cabo en líneas celulares derivadas de pacientes con SMA han demostrado que la severidad clínica está inversamente relacionada con la abundancia de la proteína SMN completa. En la SMA, la proteína SMN es el producto génico de un segundo gen, el *SMN2*, cuyos transcritos primarios mayoritariamente experimentan un proceso de "splicing" que implica la pérdida del exon 7, lo que da lugar a una forma truncada de la proteína SMN carente de funcionalidad (Boisvert y cols., 2002, Wan y cols., 2005; Oskoui y

Kaufmann, 2009). En esta enfermedad la interacción entre los snRNAs esliceosomales y el complejo Sm está condicionada por la reducida disponibilidad de la proteína SMN completa, lo que genera un déficit en la producción de pre-snRNPs que se acompaña de una reducción en la formación de CBs y de alteraciones severas en el procesamiento de los pre-mRNAs de las motoneuronas. Así, en los núcleos de las motoneuronas no hay CBs canónicos y los componentes del CB aparecen segregados en microfocos nucleares (observaciones de nuestro laboratorio). Todo ello demuestra que la SMN es fundamental para la génesis de las pre-snRNPs, en el citoplasma, y para el ensamblaje de los CBs en núcleo celular.

2. Planteamiento del trabajo y Objetivos

2.1 PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Como se ha comentado en el apartado anterior, el CB es una estructura nuclear funcionalmente implicada en la maduración de las snRNPs y snoRNPs, en el procesamiento del extremo 3' del mRNA de las histonas y, muy probablemente, en la regulación de la expresión de genes que codifican determinados snRNAs e histonas. Además, la lista creciente de nuevas moléculas identificadas en el CB abre nuevas expectativas funcionales para esta estructura. Por ejemplo, la presencia del RNA de la telomerasa, de la transcriptasa reversa humana (hTERT) y de la subunidad catalítica de la telomerasa sugiere una posible relación entre el CB y la senescencia celular. Por otra parte, la localización de peroxiredoxina V y p53 en el CB en determinadas situaciones de estrés celular plantea la posibilidad que pueda estar implicado en este proceso. Otra posible función del CB relacionada con el cáncer se fundamenta en la observación de que determinadas proteínas de fusión de células tumorales (por ejemplo, MLL-ELL y TLS-CHOP) se localizan en el CB y alteran su estructura y función (para revisión, ver Cioce y Lamond, 2005).

En la validación funcional del CB han contribuido de forma importante trabajos realizados en nuestro laboratorio en modelos experimentales con animales de laboratorio, en cuadros de la patología humana y en líneas celulares. En su conjunto, estos estudios han aportado pruebas inequívocas de que el CB es una estructura funcionalmente muy dinámica y directamente relacionada con la actividad transcripcional global de la célula (Lafarga y cols., 1991,1998; Pena y cols., 2001; Fernández y cols., 2002; Berciano y cols., 2007). En colaboración con el laboratorio de la Prof. Carmo-Fonseca (IMM, Lisboa), demostramos la localización del factor SMN en los CBs, analizamos la conexión entre la biogénesis de las snRNPs y los CBs y planteamos la relación entre el CB y la patología humana en la atrofia muscular espinal (Carvalho y cols., 1999). Asimismo, el estudio en ratones knockout para la coilina, realizado en nuestro laboratorio en colaboración con grupo del Prof. Matera (Cleveland, OH), ha contribuido a conocer la importancia funcional de la coilina. Los ratones homocigotos (*coilina*^{-/-}) eran difícilmente viables y los que sobrevivían presentaban un envejecimiento precoz. El análisis de diferentes tejidos así como de fibroblastos embrionarios derivados de estos mutantes revelaron la ausencia total de

CBs, la falta de reclutamiento de las snRNPs espliceosomales en dominios nucleares concretos y la heterocromatinización de extensos dominios del genoma (Tucker y cols., 2001). Sin embargo, cuando las células recuperaban la expresión de la coilina silvestre en experimentos de transfección, la coilina exógena formaba CBs canónicos capaces de reclutar SMN y snRNPs (Tucker y cols., 2001). Estos hallazgos, demostraron que la coilina es un componente fundamental para el ensamblaje de CBs y para el reclutamiento de snRNPs.

Trabajos posteriores realizados por el grupo del Prof. Matera y de otros investigadores (Hebert y cols., 2000, 2001, 2002; Shpargel y cols., 2003) han confirmado que el amplio rango de funciones del CB requiere de la participación de la coilina como proteína estructural que sirve de armazón nucleador de diversos componentes del CB. La coilina es una fosfoproteína con múltiples dominios implicados en modificaciones postraduccionales por fosforilación (Carmo-Fonseca y cols., 1993; Hearst y cols., 2009) y metilación (Hebert y cols., 2002; Matera y Sperghel, 2006). Estas modificaciones le confieren la capacidad de autoensamblaje y de nuclear otros componentes moleculares al CB (Shpargel y cols., 2003). De hecho, está demostrado, en modelos experimentales de mutaciones de la coilina, que el reclutamiento de SMN y de snRNPs en el CB es dependiente del dominio de arginina/glicina (caja RG) de la coilina (Hebert y cols., 2001). También se ha señalado que dicha capacidad de interacción es óptima cuando argininas de la caja RG (Hebert y cols., 2002) están simétricamente dimetiladas (sDMA-coilina). Este esfuerzo experimental, que ha dado a la coilina un importante protagonismo funcional, se ha desarrollado en líneas celulares cultivadas que expresan ectópicamente coilina silvestre y diversas formas truncadas/mutadas de la coilina.

En relación con las modificaciones postraduccionales de la coilina, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la hipometilación de proteínas nucleares inducida mediante el tratamiento con MTA provoca segregación de los componentes moleculares del CB en cuerpos nucleares (coilina-positivos/SMN-negativos y SMN-positivos/coilina-negativos), sin capacidad para interactuar con snRNPs espliceosomales y snoRNPs nucleolares (Navascues y cols., 2004). Sin embargo, quedan aspectos muy importantes por conocer. Por ejemplo, demostrar si

en condiciones fisiológicas la coilina endógena en su estado nativo también requiere de la metilación para su localización, estabilización y ensamblaje en el CBs así como, para reclutar la maquinaria enzimática y molecular necesaria para cumplir sus papeles biológicos en el CB. Con la finalidad de aproximarnos a lo que debería de ser el comportamiento fisiológico de la coilina, buscamos un modelo en el que poder investigar la importancia de la metilación endógena, sin necesidad de recurrir a vectores de expresión de formas mutadas o truncadas de coilina.

Sobre la base de todo lo anteriormente comentado, nos planteamos estudiar, como primer objetivo del presente proyecto de Tesis Doctoral, la importancia de la metilación endógena de la coilina para regular su destino nuclear, sus interacciones con otras moléculas del CB y para el ensamblaje de estos cuerpo nucleares. Para lo cual hemos seleccionado la línea celular MCF7 de cáncer de mama humano (Soule y cols., 1973). Estas células son un excelente modelo biológico para investigar el comportamiento de la coilina endógena debido a que tienen deletado el gen que codifica la enzima 5'-metiltioadenosina fosforilasa (MTAP) (Tang y cols., 2000; Basu y cols., 2007). La enzima MTAP cataboliza el metabolito 5'-metiltioadenosina (MTA) en metionina, un proceso de gran importancia fisiológica que permite recuperar metionina para la metilación endógena de ciertas proteínas nucleares por la vía de metilación principal (Walsh, 2006; Lubin y Lubin, 2009). Pero además, el catabolismo de MTA también es muy necesario porque la acumulación celular de este metabolito actúa como inhibidor de las metiltransferasas (PRMTs), produciendo la hipometilación sostenida de algunas proteínas nucleares (Williams-Ashman y cols., 1982; Avila y cols., 2003). Por lo tanto, las células MCF7 deficientes del gen *MTAP* (MCF7 *MTAP*^{-/-}) son un modelo ideal porque, al carecer del gen que codifica MTAP, son más proclives a la hipometilación endógena, dependiente del ciclo de recuperación de metionina. En consecuencia, en las células MCF7 se puede investigar el comportamiento de la coilina en respuesta a dos mecanismos de hipometilación: la acumulación de MTA y el agotamiento del pool de metionina (ver Fig. 1B en la sección de Resultados).

Otra modificación postraducciona de proteínas que ha cobrado gran importancia en la última década es la conjugación con SUMO (Melchoir, 2000; Hay,

2005). La unión covalente de SUMO1 confiere al sustrato la capacidad de modificar sus interacciones moleculares, así como su localización celular y función (Geiss-Friedlander y Melchoir, 2007). Además, la conjugación con SUMO1 puede interferir otras modificaciones postraduccionales de gran importancia o provocar cambios conformacionales de la estructura, y previsiblemente de la función, de las proteínas sustrato (Ulrich, 2009).

Estudios previos realizados en diferentes laboratorios, incluido el nuestro, han demostrado que la agregación específica de algunas proteínas estructurales en determinadas cuerpos nucleares, tales como los cuerpos PML (Zhong y cols., 2000; Bernardi y Pandolfi, 2007), PML-NIs (Villagra y cols., 2006) y SUMO-NBs (Navascues y cols., 2007), depende de la modificación por SUMO1. El requisito para que las proteínas establezcan la unión covalente con SUMO1 es que tengan una secuencia consenso de reconocimiento por SUMO1. Este dominio consiste en varios aminoácidos (aa) alrededor de una lisina que es la que se une SUMO. La secuencia de reconocimiento es Ψ KXE/D, donde Ψ es un aa hidrofóbico grande, K es la lisina modificada por SUMO1, X es un aa cualquiera y E/D pueden ser, alternativamente, el ácido glutámico o el aspártico (Sampson y cols., 2001). La probabilidad de sumoilación de una proteína está muy favorecida cuando se localiza la secuencia consenso en una región desordenada o un bucle del sustrato (Ulrich, 2009).

Actualmente se desconoce si SUMO1 tiene alguna implicación en la biogénesis del CB pero es muy importante investigarlo ya que las modificaciones que imprime SUMO1 al sustrato, de producirse en proteínas fundamentales del CB, podrían ser determinantes en su ciclo de ensamblaje/desensamblaje, en la regulación de las interacciones proteína-proteína dentro del CB y en la estabilidad y actividad funcional de este compartimento nuclear. Por esta razón, en el presente trabajo nos proponemos como segundo objetivo investigar la participación de SUMO1 en la biogénesis de los CBs. Pretendemos investigar si en alguna fase del ciclo de ensamblaje/desensamblaje del CB se produce el reclutamiento de SUMO1 y de componentes de la maquinaria de sumoilación. De ser así, buscar posibles sustratos de SUMO1 en el CB. Como posibles candidatos hemos seleccionado dos proteínas fundamentales para el ensamblaje y estabilidad de los CBs, la coilina y el factor SMN. El interés por la posible sumoilación de la coilina se fundamenta en estudios bioquímicos previos que demuestran la interacción de la coilina con PIASy, una SUMO-

E3 ligasa, lo que sugiere una posible participación de SUMO1 en la regulación de la actividad funcional de la coilina (Sun y cols., 2005). Además, como la coilina es la proteína estructural del CB, análogamente a lo ocurre con la proteína estructural PML de los cuerpos PML (Zhong y cols., 2000; Bernardi y Pandolfi, 2007), su oligomerización y estabilización en el CB podría estar influenciada por su conjugación con SUMO1. Como segundo sustrato putativo de SUMO hemos considerado al factor SMN, que establece múltiples interacciones con proteínas y snRNPs en el CB susceptibles de ser reguladas por procesos de sumoilación (Shaw y cols., 2008; Ulrich, 2009).

Para demostrar la posible participación de SUMO en el ensamblaje de los CBs utilizaremos dos modelos celulares en los que conocemos, por anteriores estudios, que se puede inducir ciclos de ensamblaje/desensamblaje de CBs: i) la diferenciación neurona-like de células UR61 inducida con dexametasona (Guerrero y cols., 1988; Navascues y cols., 2004, 2007) y ii) la respuesta neuronal al estrés hiperosmótico, inducido en las neuronas osmosensitivas del núcleo supraóptico (SON) de la rata (Lafarga y cols., 1998; Berciano y cols., 2002; Villagra y cols., 2008), o al estrés metabólico producido por el tratamiento con AdOx, un inhibidor de las metiltransferasas, en las neuronas del ganglio trigémino (GT) de la rata.

Para profundizar en la mecánica de los procesos de conjugación con SUMO relacionados con el CB y determinar la potencial importancia de determinadas lisinas del factor SMN y de la coilina en la dinámica de los CBs, nos planteamos realizar experimentos de transfección en las líneas UR61 y MCF7. Pretendemos analizar el comportamiento de los CBs en respuesta a la expresión de vectores que codifican potenciales proteínas sustrato de SUMO (coilina y SMN) y proteínas de la maquinaria de sumoilación, tales como SUMO1 activo y la enzima E2 de conjugación con SUMO1 (Ubc9), fusionadas con proteínas fluorescentes (GFP o DsRed). No obstante, a nuestro entender el uso de animales de laboratorio es fundamental para determinar si los mecanismos que subyacen en la formación del CB en las líneas celulares, donde se realizan la inmensa mayoría de los estudios experimentales, son extrapolables a los que operan en los tejidos biológicos de un animal, donde coexisten complejos sistemas de integración tisular y de regulación funcional tanto a nivel sistémico como tisular.

2.2 OBJETIVOS

Los objetivos concretos referidos a la importancia de la metilación y sumoilación de las proteínas coilina y el factor de supervivencia de la motoneuronas (SMN) en el ensamblaje del CB son los siguientes:

2.2.1 Importancia de la metilación de la coilina para el ensamblaje del CB y para sus interacciones moleculares en las células MCF7 *MTAP*^{-/-}

- 1º Investigar el efecto del déficit de *MTAP* sobre la dinámica y organización estructural y molecular de los CBs en las células MCF7 *MTAP*^{-/-}.
- 2º Analizar el efecto de la hipometilación endógena e inducida con inhibidores de las metiltransferasas sobre el destino nuclear de la coilina y sus patrones de ensamblaje en cuerpos nucleares.
- 3º Investigar los efectos de la reposición del gen *MTAP* funcional en células MCF7 *MTAP*^{-/-} transfectadas sobre la organización nuclear de la coilina y de los CBs.

2.2.2 Participación de SUMO1 en el ensamblaje molecular del cuerpo nuclear de Cajal (CB)

- 1º Investigar la presencia y dinámica de SUMO1 en los CBs de distintas líneas celulares, durante la diferenciación neurona-like de las células UR61 y en modelos experimentales neuronales en los que se inducen cambios dramáticos en la expresión génica y reformación de CBs.
- 2º Investigar si dos proteínas esenciales para la organización estructural y funcional del CB, coilina y SMN, son sustratos de SUMO1.
- 3º Intentar identificar las lisinas susceptibles de conjugación con SUMO1 en la coilina y SMN y evaluar el efecto de mutaciones puntuales de estas lisinas sobre la organización y dinámica de los CBs.