

**Mecanismos neuronales de neurodegeneración y neuroprotección: disfunción de la biogénesis de ribosomas y alteraciones de la maquinaria de síntesis de proteínas**

Neuronal mechanisms of neurodegeneration and neuroprotection: ribosome biogenesis dysfunction and protein synthesis machinery alterations

An electron micrograph showing a large, dark, roughly circular structure, likely a ribosome, with a granular texture. The structure is centered in the frame. To the left of the main structure, there is a smaller, similar-looking structure. The background is light gray with some noise.

CB

No

**Autor:** Jennifer Martínez Miguel

**Director:** Miguel Lafarga Coscojuela

**Codirectora:** M<sup>a</sup> Teresa Berciano Blanco

Santander, Junio 2017



## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	9
METODOLOGÍA.....	9
ORGANIZACIÓN DE LOS COMPARTIMENTOS NUCLEARES.....	10
Territorios cromosómicos.....	11
Cuerpos nucleares de Cajal.....	11
Áreas de factores de splicing.....	12
EL NUCLEOLO.....	12
Estructura y organización espacial del nucleolo.....	13
Transcripción nucleolar de los genes ribosomales.....	14
Regulación del ciclo celular.....	15
Nucleolo y estrés celular.....	16
MAQUINARIA CITOPLASMÁTICA DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....	18
Estructura y organización de los polirribosomas y del retículo endoplásmico granular.....	18
Mecanismo de traducción.....	19
ORGANIZACIÓN DEL NUCLEOLO Y DE LA MAQUINARIA DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN NEURONAS.....	20
El nucleolo.....	20
La maquinaria de síntesis de proteínas: sustancia o grumos de Nissl.....	22
DISRUPCIÓN NUCLEOLAR Y DE LA MAQUINARIA DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN CUADROS DE LA NEUROLOGÍA.....	25
Introducción.....	25
Estrés nucleolar y p53.....	27
Nucleolo y enfermedades neurodegenerativas.....	28

La enfermedad de Alzheimer.....	29
La enfermedad de Parkinson (EP) y enfermedades por repeticiones de trinucleótidos.....	31
La esclerosis lateral amiotrófica.....	33
La atrofia muscular espinal (AME).....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	41

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a mi director y co-directora de TFG, Miguel Lafarga y M<sup>a</sup> Teresa Berciano, respectivamente, por transmitir su pasión por la Biología Celular desde el primer día de clase y por enseñar con tanta ilusión este pequeño pero a la vez extenso mundo. Agradecerles su guía y dedicación en esta aventura.

En segundo lugar, agradecer a mis padres por su incondicional apoyo, por su sacrificio y por su cariño durante estos años. Gracias por enseñarme que el esfuerzo merece la pena.

Y por último agradecer a mi pareja, por estar siempre ahí, por ayudarme a creer en mí misma y a sobrevivir a los malos días.



## **ABREVIATURAS**

**RNA:** ácido ribonucleico

**rRNA:** ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal

**ATP:** adenosín trifosfato

**REG:** retículo endoplasmático granular o rugoso

**EA:** enfermedad de Alzheimer

**EH:** enfermedad de Huntington

**EP:** enfermedad de Parkinson

**ELA:** esclerosis lateral amiotrófica

**AME:** atrofia muscular espinal

**RNA pol I:** RNA polimerasa I

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**mRNA:** ácido ribonucleico mensajero

**tRNA:** ácido ribonucleico de transferencia

**snRNA:** ácido ribonucleico nuclear pequeño

**CB:** cuerpos nucleares de Cajal

**snoRNPs:** ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas

**snRNPs:** ribonucleoproteínas nucleares pequeñas

**SUMO:** "Small Ubiquitin-like modifier"

**SMN:** factor de supervivencia de las motoneuronas

**NORs:** regiones organizadoras nucleolares

**rDNA:** ácido desoxirribonucleico ribosomal

**UBF:** "upstream binding factor"

**CF:** centros fibrilares

**CFD:** componente fibrilar denso

**CG:** componente granular

**TBP:** "TATA" binding protein

**NPM:** nucleofosmina

**NADs:** dominios de cromatina asociados al nucleolo

**LSU:** subunidad ribosomal grande

**PTM:** modificaciones post-traduccionales

**ncRNAs:** RNA no codificante

**miRNAs:** micro ARN

**NLS:** secuencia de localización nuclear

**REL:** retículo endoplásmico liso

**GTP:** guanosín trifosfato

**SRP:** partícula de reconocimiento de la señal

**UPR:** "unfolded protein response"

**NFT:** ovillos neurofibrilares

**NPM3:** nucleoplasmina 3

**SGs:** gránulos de estrés



## **RESUMEN**

El nucleolo es un compartimento nuclear no delimitado por membrana que es conocido por su función en la biogénesis de ribosomas. Sin embargo, en los últimos años varios estudios han revelado un amplio espectro de funciones mucho más complejas, tales como la regulación del ciclo celular, sensor de daño en el DNA, procesamiento de pre-mRNAs y ncRNAs y coordinación de la respuesta celular a estrés. Teniendo en cuenta que el nucleolo controla así la fisiología y homeostasis celular, cabe esperar que su integridad funcional sea crucial para la supervivencia neuronal. Además, las alteraciones celulares y moleculares que se acompañan de disfunción y estrés nucleolar causan una alteración de la biogénesis de ribosomas y de la maquinaria de síntesis de proteínas. Por ello, las alteraciones nucleolares representan una pieza importante en la fisiopatología de varias enfermedades neurodegenerativas humanas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la atrofia muscular espinal. Esta revisión bibliográfica pretende analizar las múltiples funciones del nucleolo, su relación con las alteraciones de la maquinaria de síntesis de proteínas y la visión en conjunto de su implicación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y de sus características distintivas.

## **ABSTRACT**

The nucleolus is a non-membrane bound nuclear compartment best known for its role in ribosome biogenesis. Nevertheless, in the past years several studies have revealed a much wider and complex range of functions, such as cell cycle regulation, DNA damage sensing, pre-mRNA and ncRNAs processing and coordination of the cellular response to stress. Taking into account that the nucleolus controls cellular homeostasis and physiology, it's functional integrity is crucial for neuronal survival. Moreover, cellular and molecular alterations that are accompanied by nucleolar dysfunction and consequently nucleolar stress, cause impaired ribosomal biogenesis and an altered protein synthesis machinery. Therefore, they play a key role in the physiopathology of several human neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy. This review aims to go over the several functions of the nucleolus, its relation to the altered protein synthesis machinery and their overall implication in the development of several human neurodegenerative diseases and their hallmarks.



## **1. INTRODUCCIÓN**

El nucleolo es la estructura más prominente del núcleo celular y su función más relevante es la síntesis de los RNAs ribosomales (rRNA) y su ensamblaje con proteínas ribosomales para formar las partículas pre-ribosomales. Éstas se transportan al citoplasma donde se ensamblan en los ribosomas. Pero, además de ser la factoría para la biogénesis de ribosomas, el nucleolo juega un papel importante en la respuesta al estrés celular.

Las neuronas tienen una elevada actividad transcripcional y son las células que producen más variedad de mensajeros. La alta demanda de traducción, para sostener el árbol dendrítico, el transporte axonal y la actividad sináptica, necesita de una gran actividad de biogénesis de ribosomas. De hecho, la función del nucleolo, conjuntamente con la actividad bioeléctrica neuronal y el transporte intracelular, especialmente axonal, son las funciones que consumen más ATP. En las neuronas, el tamaño y la organización estructural del nucleolo se correlacionan estrechamente con la organización citoplasmática de la maquinaria de síntesis de proteínas, particularmente con su desarrollo y con la distribución de los polirribosomas libres y asociados a las cisternas del REG (Peters et al., 1991; Pena et al., 2001).

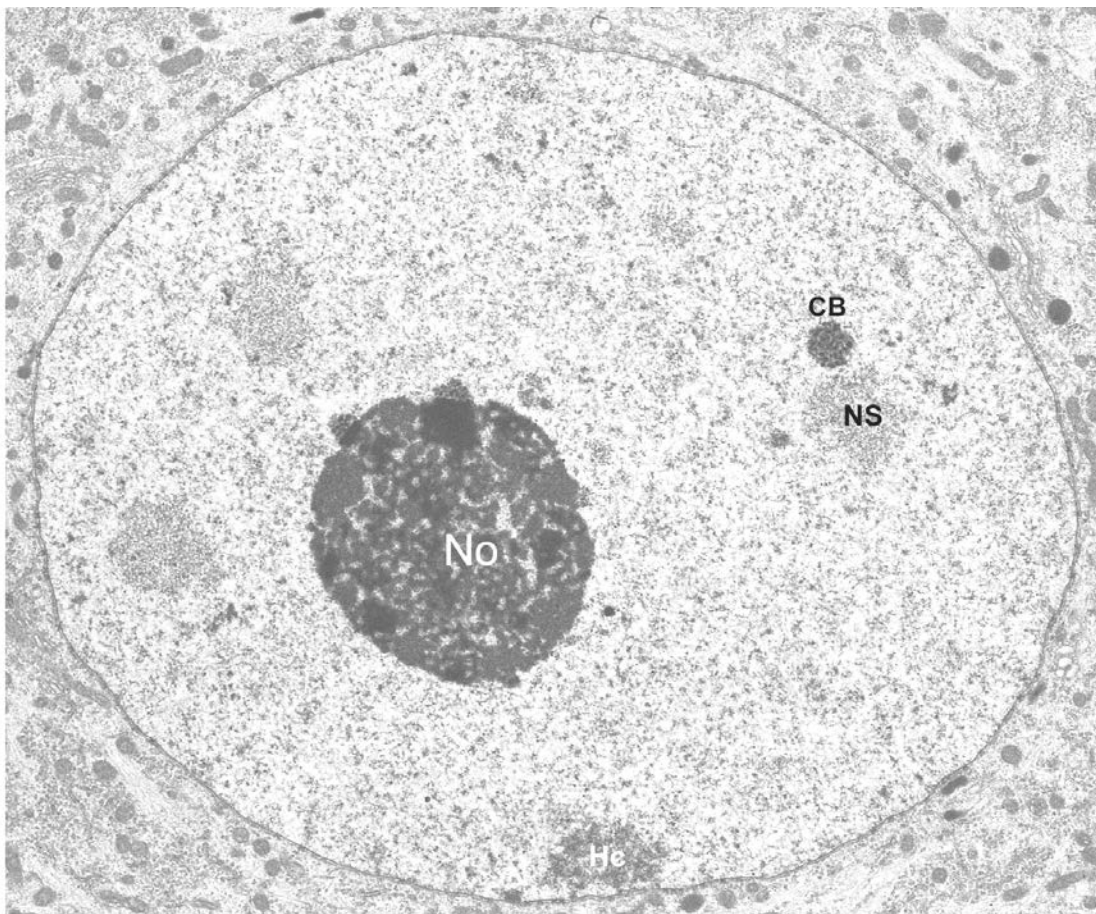
La muerte neuronal es un componente esencial de múltiples procesos neurodegenerativos, tales como Alzheimer (EA), Huntington (EH), Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y atrofia muscular espinal (AME). Sin embargo, los progresos en el conocimiento de los mecanismos de muerte neuronal en modelos experimentales animales no han repercutido, de manera significativa, en el desarrollo de tratamientos neuroprotectores. Entre los mecanismos afectados en la neurodegeneración la inhibición de la biogénesis de ribosomas asociada a la disfunción nucleolar se ha documentado en la mayoría de los cuadros neurodegenerativos. Por ello, en la actualidad la potenciación de la actividad del nucleolo en la biogénesis de ribosomas, mediante la estimulación del complejo de transcripción de la RNA polimerasa I (RNA pol I) está emergiendo como una nueva aproximación terapéutica.

## **2. METODOLOGÍA**

El presente TFG se plantea como una revisión bibliográfica, fundamentalmente de artículos indexados en PubMed, de la maquinaria de biogénesis de ribosomas y de síntesis de proteínas en el contexto global de la organización de los compartimentos nucleares y del citoplasma. El estudio se focaliza en modelos neuronales, analizando especialmente la reorganización y disfunción del nucleolo y de la maquinaria de síntesis de proteínas en enfermedades de la motoneurona (ELA, AME) y en otros cuadros neurodegenerativos. La revisión bibliográfica se ha complementado con el análisis con microscopía óptica y electrónica de muestras experimentales de motoneuronas de ratones con ELA o AME. Algunas de las imágenes obtenidas han servido para ilustrar este trabajo.

### 3. ORGANIZACIÓN DE LOS COMPARTIMENTOS NUCLEARES

El núcleo está delimitado por la envoltura nuclear, formada por las membranas interna y externa, los complejos del poro nuclear y la lámina densa nuclear. Contiene la información genética en los cromosomas y está subdividido en compartimentos nucleares no limitados por endomembranas. En él se produce la replicación (síntesis) del DNA, la transcripción (síntesis) de RNAs (mRNA, rRNA, tRNA y snRNA) y el procesamiento (maduración) y transporte de RNAs. Cabe destacar, que el procesamiento de los pre-mRNAs incluye tres etapas: i) la formación de una caperuza de metilguanosa en el extremo 5', ii) el "splicing" que permite eliminar los intrones (no codifican) y empalmar los exones y iii) la poliadenilación, que consiste en la adición de una cola de poliadeninas (poly (A) RNA) en el extremo 3' necesaria para la exportación y estabilidad de los mRNAs. Estas funciones nucleares se producen en compartimentos nucleares que incluyen los territorios cromosómicos, el nucleolo, los cuerpos nucleares de Cajal ("Cajal bodies", CBs en la literatura internacional) y las áreas de factores de "splicing" ("Nuclear speckles") (Fig. 1).



**Figura 1. Organización nuclear.** Imagen de ME de la organización de los compartimentos nucleares incluyendo el nucleolo (No), un cuerpo nuclear de Cajal (CB), varias áreas de factores de "splicing" (NS) y heterocromatina (He). Neurona sensitiva del ganglio del trigémino de la rata.

La transcripción de los genes ribosomales, la maduración de los pre-rRNAs y el ensamblaje de los rRNAs con proteínas para formar las partículas pre-

ribosomales se produce en el nucleolo, que representa la factoría central para la biogénesis de ribosomas. Posteriormente, en el citoplasma, los mRNAs se traducen en la maquinaria de traducción, que está formada por polirribosomas libres y acúmulos de cisternas de retículo endoplásmico granular (REG), una estructura muy prominente en las neuronas donde forma los grumos de Nissl.

### **Territorios cromosómicos**

Es el volumen que ocupa cada cromosoma en la interfase y su distribución no se produce al azar, existiendo una topología nuclear preferente en la organización espacial de los cromosomas en cada tipo celular.

Estructuralmente corresponde a dominios de cromatina, un complejo de DNA, histonas y otras proteínas asociadas. Estos dominios pueden ser de dos tipos: heterocromatina o eucromatina, que dependen del nivel de plegamiento de la molécula de DNA. Por un lado, la heterocromatina es cromatina condensada, transcripcionalmente silente, que puede ser facultativa (genes que no se expresan codificantes de proteínas) o constitutiva (DNA que no codifica proteínas, esencialmente telomérico y centromérico). Por otro lado, la eucromatina es cromatina descondensada y su DNA puede ser activo o inducible para la transcripción. Además, la relación eucromatina/heterocromatina es un índice de actividad transcripcional.

En la eucromatina hay cadenas polinucleosomales, que son el segundo nivel de plegamiento del DNA (siendo el primero el filamento de DNA desnudo) y fibras cromatínicas aisladas (tercer nivel de plegamiento del DNA donde la cadena polinucleosomal se pliega de forma helicoidal o en zigzag). Tiene un tamaño de 10nm y es una cadena en la que aproximadamente por cada 200 pares de nucleótidos se asocia una partícula, el nucleosoma. A su vez, cada nucleosoma está formado por 8 histonas (dos de cada una de las siguientes, H2A, H2B, H3 y H4), que son proteínas básicas que forman un enlace muy fuerte con los grupos fosfato del DNA. La transcripción sólo se produce en las cadenas polinucleosomales.

### **Cuerpos nucleares de Cajal (“Cajal bodies” CBs)**

Fueron descubiertos por Cajal (1903, 1910; Lafarga et al., 2016) en neuronas utilizando su proceder del nitrato de plata reducido. Son sitios de maduración de snRNPs (“small nuclear ribonucleoproteins”) y snoRNPs (“small nucleolar ribonucleoproteins”) necesarias para el procesamiento de mRNAs y rRNAs, respectivamente. El cuerpo nuclear de Cajal (CB) se localiza libre en el nucleoplasma o asociado al nucleolo y está formado por hebras densas enrolladas embebidas en una matriz amorfa. Concentra una proteína estructural que sirve de marcador, la coilina, una proteína nucleolar, la fibrilarina, el factor de supervivencia de las neuronas motoras (SMN), snRNPs espliceosomales y snoRNPs, y aunque carece de DNA, su ensamblaje es dependiente de transcripción.

Los CBs son ubicuos. El tamaño y número de CBs es dependiente de transcripción y varía durante el ciclo celular, alcanzándose el máximo número en el periodo “S” del ciclo celular. Los CBs se desensamblan durante la mitosis

y se reforman en G1 temprano. Además los CBs son móviles, se ha demostrado que hacen largos movimientos durante la interfase, relacionándose espacialmente con el nucleolo, una interacción esencial para la transferencia de snoRNPs al nucleolo.

Los CBs están implicados en la fisiopatología de cuadros neurodegenerativos, especialmente en enfermedades de la motoneurona como la atrofia muscular espinal y la esclerosis lateral amiotrófica, en las que la pérdida de CBs produce una severa alteración del splicing de los pre-mRNAs (Lafarga et al., 2016).

### **Áreas de factores de “splicing” (“nuclear speckles”)**

Fueron descubiertas por Cajal (1910) quién las denominó “grumos hialinos” por presentar una textura homogénea con técnicas de impregnación argéntica. Son sitios de depósito de factores para el procesamiento de los mRNAs (factores de “splicing”), de forma que almacenan estos factores para su distribución a los sitios de transcripción, donde se ensamblan en el espliceosoma. A nivel de microscopía electrónica, cada área está formada por un agregado de granulaciones intercromatínicas que concentran dos tipos de factores de splicing: snRNPs y proteínas SR (ricas en “serina/arginina”). No son sitios de transcripción y carecen de DNA (Lamond & Spector, 2003).

## **4. EL NUCLEOLO**

Es un compartimento nuclear carente de membrana, multifuncional y altamente especializado en la transcripción de los genes ribosomales que codifican los rRNAs 28S, 18S y 5,8S. La concentración de genes ribosomales, pre-rRNAs y proteínas reguladoras en el compartimento nucleolar aumenta la eficiencia y la especificidad de los procesos de síntesis y procesamiento de los rRNAs y el ensamblaje de pre-ribosomas.

Las células diploides humanas tienen aproximadamente 400 copias de genes ribosomales, los cuales se localizan en las regiones organizadoras nucleolares (NORs) de los cromosomas (10 en células humanas). Por lo tanto, una NOR es un segmento del cromosoma que contiene múltiples copias de genes ribosomales ordenados en tándem. Estos genes activos convergen en el nucleolo, de forma que se puede decir que los nucleolos se ensamblan alrededor de una NOR o varias NORs activas que pueden converger en un solo nucleolo (Hernandez-Verdun et al., 2010). Además cabe señalar que, al final de la mitosis, cuando la transcripción del rDNA finaliza, los NORs que estaban activos están directamente implicados en el reensamblaje de los nucleolos (Hernandez-Verdun et al., 2010). Los inactivos quedan “atrapados y silenciados” en la heterocromatina.

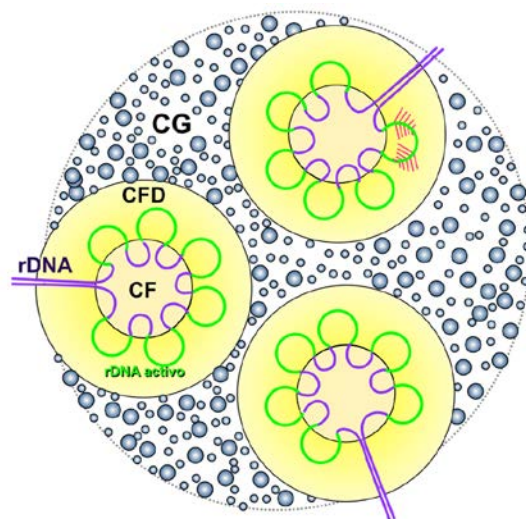
Durante el ciclo celular, los nucleolos se ensamblan al final de la mitosis (telofase), son activos durante la interfase y desensamblan al principio de la mitosis (Hernandez-Verdun et al., 2010). El aumento de CDK1/ciclina B dispara la represión de la transcripción de rRNA y el desensamblaje nucleolar. Algunos factores quedan asociados a las NORs y otros se desplazan a la periferia cromosómica o son liberados. Durante la telofase, cuando la actividad CDK1/ciclina B disminuye se reforman los nucleolos, reclutándose los factores

reguladores de la transcripción como UBF (“upstream binding factor”) y reanudándose la transcripción de los genes ribosomales y la biogénesis de ribosomas (Lam and Trinkle-Mulcahy, 2015).

La mayor parte de las células diploides tienen de 1 a 3 nucleolos debido a la convergencia de los NORs en el espacio. Además, durante la diferenciación se produce una reducción del número de nucleolos, razón por la que cuando las células tumorales se dediferencian adquieren múltiples nucleolos. Se ha propuesto que el nucleolo es una estructura formada como consecuencia de la transcripción de los genes ribosomales que determina la acumulación local de rRNAs y multitud de proteínas reguladoras y de asociación con los rRNAs para formar la partículas pre-ribosomales. De hecho, la configuración y el tamaño de los nucleolos están relacionados con la producción de ribosomas y la actividad celular (Hernandez-Verdun et al., 2010). Por lo tanto se puede decir, que el tamaño del nucleolo refleja la tasa de síntesis y procesamiento de rRNAs.

### Estructura y organización espacial del nucleolo

El nucleolo tiene 4 componentes estructurales: centros fibrilares (CF), componente fibrilar denso (CFD), componente granular (CG) e intersticios nucleolares (Fig. 2). Los centros fibrilares (CFs) son áreas circulares de naturaleza fibrilar y baja densidad electrónica, que almacenan moléculas implicadas en la transcripción como la RNA pol I, DNA topoisomerasa I, TBP (“TATA” binding protein”), UBF y pre-rRNAs en distintas fases de procesamiento. El componente fibrilar denso (CFD) rodea a los CFs y contiene la maquinaria de transcripción activa, incluyendo la RNA pol I, nucleolina, fibrilarina, snoRNPs y los transcritos primarios. Además, tiene una elevada densidad electrónica por su textura compacta (Hernandez-Verdun et al., 2010) y acumula el rRNA primario 45S. Es importante señalar que los genes rDNA silentes se sitúan en la zona central de los CFs mientras que los activos se disponen en la periferia y se extienden en el CFD. El componente granular (CG) está compuesto por gránulos distribuidos de forma laxa (Hernandez-Verdun et al., 2010) y está formado por partículas de RNPs en las que los rRNAs 28S, 18S, 5,8S y 5S se ensamblan con proteínas ribosomales para formar las subunidades de los ribosomas. Además, concentra la proteína B23 o nucleofosmina (NPM), que tiene un papel crítico en el ensamblaje final y exportación de las partículas preribosomales.



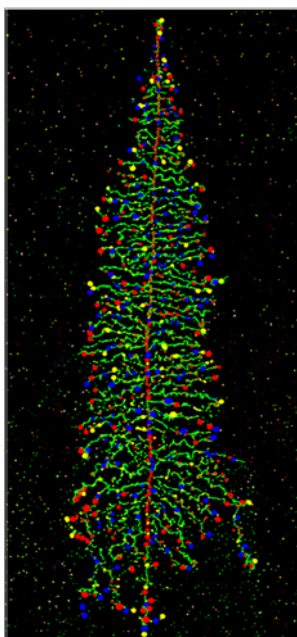
**Figura 2. Compartimentos del nucleolo.** Esquema representativo de la típica organización nucleolar: centros fibrilares (CF) rodeados por componente fibrilar denso (CFD) junto con gránulos intercalados del componente granular (CG). El rDNA de los NORs está representado en el CFD en su forma activa (líneas verdes) y en el CF en su forma inactiva (líneas violetas).

En la actualidad conocemos el mapa espaciotemporal de la biogénesis ribosomal. Así, los sitios activos de transcripción de la RNA pol I están localizados en la interfase entre los CFs y CFDs, el procesamiento temprano de pre-RNAs ocurre en los CFDs y el procesamiento tardío y el ensamblaje de las subunidades ribosomales en el GC. La parte no transcrita de rDNA, así como los complejos de RNA pol I y la maquinaria de transcripción están localizados en los CFs, de forma que la variabilidad en número y volumen de estos se correlaciona con la actividad transcripcional (Hernandez-Verdun et al., 2010).

En la mayoría de las células se observa una capa de heterocromatina en la periferia nucleolar, los “dominios de cromatina asociados al nucleolo” (NADs), demostrando el gran contenido de DNA en la periferia en comparación con el interior del nucleolo. Recientemente estos dominios fueron aislados, secuenciados y caracterizados en células humanas, de forma que diferentes familias de genes y ciertas repeticiones de DNA satélite fueron identificadas como los principales componentes de los NADs. También se ha caracterizado en la periferia del nucleolo un dominio específico, el compartimento perinucleolar (PNC), que está asociado con un locus específico del DNA y está altamente enriquecido en proteínas de unión a RNA y transcritos generados por la actividad de la RNA polimerasa III (Hernandez-Verdun et al., 2010).

Respecto a la disposición espacial del nucleolo, en eucariotas superiores los nucleolos están frecuentemente localizados cerca de la envoltura nuclear, localización que podría facilitar el tránsito de pre-ribosomas directamente desde el nucleolo al citoplasma. También hay casos en los que los nucleolos localizados centralmente están directamente conectados al citoplasma a través de invaginaciones de la envoltura nuclear llamadas "canales nucleolares", que están provistos de numerosos poros nucleares. En cualquier caso esta topología nucleolar se corresponde con un posible rol en exportación de ribosomas (Hernandez-Verdun et al., 2010).

### Transcripción nucleolar de los genes ribosomales



La transcripción produce un transcrito primario 45S que contiene las secuencias de los rRNAs 18S, 5,8S y 28S, de forma que cada gen ribosomal codifica dichos rRNAs. Así, cada gen activo transcribe múltiples copias de rRNA 45S simultáneamente, lo que produce la imagen de “Christmas tree” de la transcripción nucleolar (Fig. 3). La transcripción está gobernada por la RNA pol I y el factor de transcripción UBF y ocurre en el borde entre el CF y el CFD. El rRNA 45S sufre modificaciones de metilación y pseudouridinación dirigidas por snoRNPs, de forma que el transcrito primario de la RNA pol I, el pre-rRNA 45S, sufre una extensa modificación post-transcripcional (incluyendo la metilación de la ribosa y la isomerización de la uridina a pseudouridina) que son necesarias para la correcta organización estructural y funcional del rRNA

**Figura 3.** Imagen de microscopía electrónica que ilustra el “Christmas tree” de la transcripción de un gen ribosomal en el nucleolo.



maduro (Hetman and Pietrzak, 2012). Además, se corta para generar los rRNAs 18S, 5,8S y 28S que se transfieren al CG.

En resumen, las proteínas ribosomales empiezan a ensamblarse en el transcrito naciente, que junto con una gran variedad de factores accesorios, estimulan los subsecuentes pasos de la maduración, incluyendo el procesamiento del pre-rRNA y la exportación nuclear (Hetman and Pietrzak, 2012).

Posteriormente, el ensamblaje de la pre-LSU (“large ribosomal subunit”) en el nucleolo implica la incorporación del rRNA 5S, que es un transcrito de genes no nucleolares, localizados en la eucromatina, dependiente de la RNA polimerasa III y que se incorpora en el CG (Hetman and Pietrzak, 2012). Los 4 tipos de rRNAs se ensamblan con proteínas ribosomales, un proceso que está regulado por la B23/nucleofosmina (chaperona).

Los factores de transcripción basales, TIF-1A, SL1 y UBF, son esenciales para la transcripción mediada por la RNA pol I y parecen ser modulados por diferentes vías en respuesta a cambios ambientales. Un elemento clave en esta modulación es la vía mTOR, que promueve la síntesis de pre-RNAs regulando la localización y/o la actividad de TIF-1A, UBF y SL1. La inactivación de mTOR por privación nutricional o por rapamicina, da lugar a una disminución de la transcripción de pre-RNAs y por lo tanto a una producción ribosomal disminuida (Boulon et al., 2010).

Varios estudios han demostrado que la estimulación de la transcripción del rDNA es suficiente para aumentar el proceso de biogénesis ribosomal al completo, acelerando el crecimiento y la proliferación. Esta transcripción está regulada a nivel de la RNA poli I, pero también a través de mecanismos epigenéticos que afectan al número de genes transcripcionalmente activos. Por ejemplo, la silenciamiento epigenético del nucleolo incluye metilación de CpG en promotores de rDNA. En este contexto, los factores de crecimiento y aporte de nutrientes aumentan la actividad de la RNA pol I, mientras que los factores estresantes la disminuyen. Muchos de estos efectos están mediados por señalización con quinasas, incluyendo regulación positiva a través de la ya mencionada vía mTOR y ERK1/2 y regulación negativa por JNK y AMPK. Además, la acetilación de reguladores de la transcripción de rDNA aporta otro punto de regulación positiva (Hetman and Pietrzak, 2012).

### **Regulación del ciclo celular**

Durante el ciclo celular se produce una demanda variable de biogénesis de ribosomas regulada por la actividad del nucleolo. Así, la mayor demanda se produce al final de G1 y durante el periodo S para sostener el rápido crecimiento celular previo a la entrada en la mitosis.

Las modificaciones post-traduccionales (PTM) son probablemente los cambios más dinámicos observados en la célula. Sabemos que en el nucleolo se producen dos PTMs, SUMOilación y fosforilación, de algunas proteínas que regulan su actividad funcional. Por ejemplo la SENP5 es una proteasa SUMO-específica localizada predominantemente en el nucleolo cuya desactivación da

lugar a alteraciones en la división celular, lo que sugiere un papel del nucleolo regulando la SUMOilación de proteínas que afectan la progresión del ciclo celular durante la división celular. Otro ejemplo sobre la fosforilación sería la regulación del estado de fosforilación de factores clave responsables para la progresión del ciclo celular a través del almacenamiento y la distribución de la fosfatasa PP1 (Boisvert et al., 2007).

El secuestro de ciertas proteínas es otro mecanismo de regulación nucleolar durante el ciclo celular. Así, la transcripta inversa, un componente esencial de la telomerasa, se mantiene dentro de los nucleolos unida a la nucleolina hasta que los telómeros son replicados. Esto es importante porque la pérdida de este secuestro podría ser un importante indicador diagnóstico de células anormales. (Boisvert et al., 2007)

### **Nucleolo y estrés celular**

La respuesta de estrés celular está normalmente acompañada de dramáticos cambios en la organización y composición del nucleolo (Boulon et al., 2010). De hecho se ha consolidado el concepto de “estrés nucleolar” para referirse a las alteraciones nucleolares producidas por la severa inhibición de la actividad de la RNA pol I. En este sentido, un fenómeno bien conocido es la “segregación nucleolar” causada por daño en el DNA y/o inhibición transcripcional. Esta segregación está caracterizada por la condensación y la subsecuente separación del CFD y CG, junto con la formación de “caperuzas perinucleolares” constituidas por proteínas nucleolares como UBF, proteínas nucleoplásmicas y la coilina, una proteína estructural de los CBs. Es importante diferenciar la “segregación nucleolar” de la “fragmentación nucleolar”. Esta última ocurre como consecuencia de la inhibición de RNA polimerasa II (pero no de la I), o de determinadas proteína quinasas que regulan la función del nucleolo, y da lugar a desensamblaje de los CFs (Boulon et al., 2010).

Un aspecto importante relacionado con el estrés celular es la bioenergética celular y su importancia para la función del nucleolo. La biogénesis ribosomal es un proceso que consume grandes cantidades de energía y que además está muy acoplada al crecimiento celular. En algunas células tumorales se ha estimado que aproximadamente el 80% de la energía celular se destina a la biogénesis de ribosomas. En condiciones de estrés celular que afectan al ciclo celular o al estado metabólico de la célula, la alteración de la biogénesis ribosomal es una estrategia para preservar la homeostasis energética celular. Esta alteración de la biogénesis ribosomal puede ocurrir a varios niveles que incluyen la regulación de la transcripción dependiente de la RNA pol I y el procesamiento de rRNAs. Es interesante señalar que los cambios en las condiciones de crecimiento celular provocan, principalmente, un cambio en la tasa de transcripción de genes ya activos, más que la activación de genes silentes (Boulon et al., 2010).

La regulación de respuesta a estrés del nucleolo implica la proteína p53. Los niveles de p53 se mantienen bajos en condiciones normales mediante su interacción con la ubiquitina ligasa HDM2, que ubiquitila p53 y la destina a su degradación por el proteasoma (Boulon et al., 2010). Los mecanismos

nucleolares para estabilizar y activar p53 en respuesta al estrés celular pueden clasificarse en 3 categorías: alteraciones de interacciones proteína-proteína, prevención de la exportación nuclear de p53-HDM2 y cambios en el perfil traduccional. Se ha observado que la mayor parte de tipos de estrés celular que incrementan la estabilidad de p53 también están relacionados con la destrucción de la integridad nucleolar, llevando a la hipótesis de que el nucleolo es un sensor de estrés celular. Entre los mecanismos de estabilización de p53 que implican cambios en la interacciones proteína-proteína (Boulon et al., 2010) destaca la regulación a la alza de p14/ARF, una proteína supresora tumoral, que se une a HDM2 y bloquea su interacción con p53. Por ejemplo, cuando se produce un estrés oncogénico o genotóxico, los niveles de p14ARF (que se mantienen bajos en condiciones de normalidad) se elevan, estabilizando así p53 y por lo tanto evitando la proliferación de células con DNA dañado. El mantenimiento de altos niveles de p14ARF por un periodo corto de tiempo se consigue favoreciendo su localización intranucleolar, a través de interacciones con B23/NPM que evita que se asocie con ubiquitina ligasas. Así, se ha propuesto que en respuesta a varios estímulos la p14/ARF secuestra la HDM2 en los nucleolos, evitando así la degradación de p53 por el proteasoma. La estabilización de p53 promueve su actividad, bien de parada del ciclo celular o bien de activación de la apoptosis. Además, también se ha propuesto que p14ARF podría regular la biogénesis de ribosomas retrasando el procesamiento temprano de los precursores de los rRNAs mediante su interacción con B23/NPM (Boisvert et al., 2007). Por otra parte, p53 activa puede actuar como un regulador negativo de la transcripción del la RNA pol I en el nucleolo, inhibiendo al factor de transcripción UBF, lo que dará lugar a una disminución en la biogénesis ribosomal (Boulon et al., 2010).

Otro componente de la respuesta nucleolar al estrés celular es la captura e inmovilización de varias proteínas citoplasmáticas y nucleares dentro del nucleolo. Este secuestro nucleolar es llevado a cabo a través de la inducción de la transcripción, mediada por la RNA pol I, de ncRNAs ("non-coding RNA") largos estrés-específicos. De esta manera los transcritos interaccionan directamente con proteínas que contienen una secuencia de detención nucleolar. Así, este secuestro temporal permite una rápida y reversible inhibición de su actividad y, consecuentemente, de numerosos procesos celulares en respuesta a estrés (Lam and Trinkle-Mulcahy, 2015).

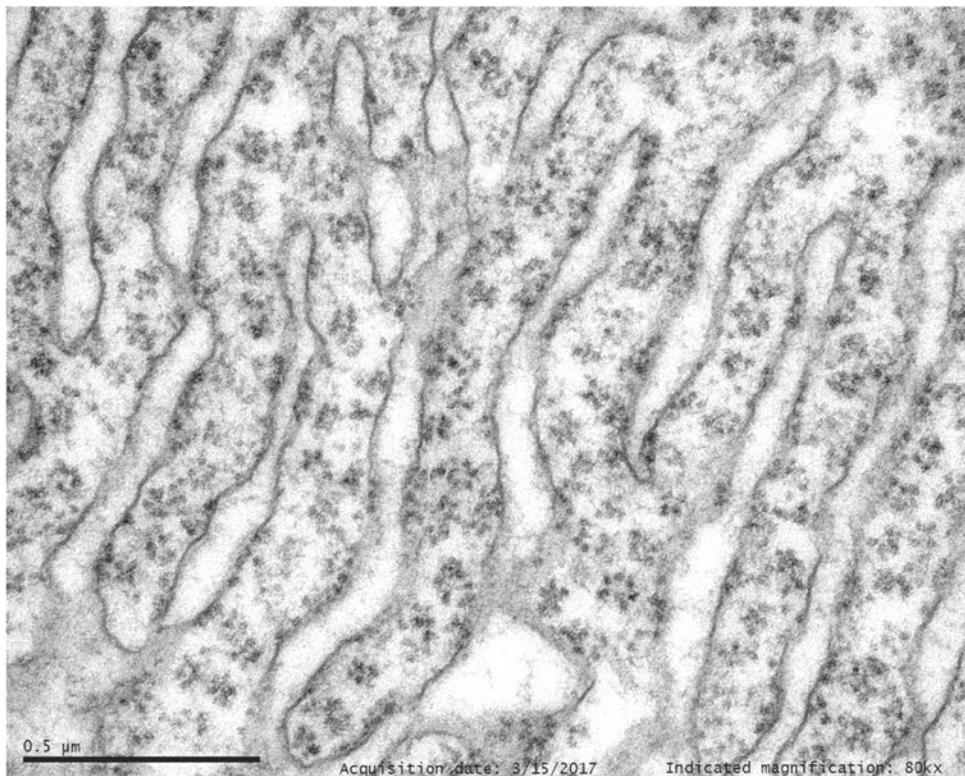
También debemos destacar el posible papel de los miRNAs. Aunque primariamente se pensó que su función era exclusivamente citoplasmática, recientemente se han localizado miRNAs en el núcleo y nucleolo. Los miRNAs son pequeños RNAs que unidos a mRNAs pueden dirigir su represión post-transcripcional vía RNA. Además los miRNAs nucleares contribuyen a regular la estabilidad de los transcritos primarios, modular el splicing alternativo e inducir alteraciones epigenéticas. Existen evidencias experimentales de que el estrés celular puede provocar la translocación de estos miRNAs del nucleolo al citoplasma, sugiriendo este hecho que el nucleolo podría funcionar como un lugar de detención para miRNAs, manteniéndolos inactivos hasta que sean liberados en respuesta al estrés (Lam and Trinkle-Mulcahy, 2015).

## 5. MAQUINARIA CITOPLASMÁTICA DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

### Estructura y organización de los polirribosomas y del retículo endoplásmico granular

Cada célula metabólicamente activa posee varios millones de ribosomas, de forma que un número variable de ellos junto con una molécula de mRNA forman un polirribosoma. Cada ribosoma tiene dos subunidades, pequeña y grande. La pequeña (40S) contiene el rRNA 18S y aproximadamente 33 proteínas, mientras que la subunidad grande (60S) contiene los rRNAs 5S, 5,8S y 28S, y 49 proteínas. La cantidad de ribosomas que posee un polirribosoma depende de la longitud del mRNA a traducir. Todos los polirribosomas son activos en traducción. Además, en el citosol hay un depósito dinámico de subunidades de los ribosomas que se ensamblan cíclicamente en polirribosomas libres y asociados al REG (Alberts et al., 2015).

Los polirribosomas presentan dos configuraciones: libres y asociados a las cisternas del retículo endoplásmico granular (REG) (Fig. 4). Estas configuraciones determinan el destino celular de las proteínas que producen y muchas proteínas poseen una señal de localización que marca su destino. Las proteínas producidas en polirribosomas libres son proteínas i) nucleares, portadoras de una secuencia de localización nuclear (NLS), ii) citosólicas (enzimas y subunidades del citoesqueleto como actina, tubulina, etc), iii) mitocondriales y iv) de los peroxisomas. Mientras que las proteínas producidas en el REG se transportan al complejo de Golgi, donde se clasifican y se distribuyen a dos compartimentos: vesículas de secreción y lisosomas.



**Figura 4. Polirribosomas y REG.** Imagen de ME que muestra las cisternas del retículo endoplásmico rugoso (REG) junto con polirribosomas asociados y libres en una neurona motora.

Cabe destacar que el retículo endoplásmico incluye la envoltura nuclear, el retículo endoplásmico granular (REG), con ribosomas asociados, y el retículo endoplásmico liso (REL), sin ribosomas. En su conjunto forma una red tridimensional y dinámica que se extiende por el citoplasma. Además, tanto el REG y como el REL experimentan cambios dinámicos en función de la actividad celular, existiendo procesos de crecimiento/expansión y decrecimiento que están guiados por los microtúbulos (Pollard et al., 2017).

El REG tiene una configuración en cisternas aplanadas, aisladas o agrupadas en pilas, y, menos frecuentemente, en túbulos. Las cisternas del REG están formadas por endomembranas (70% proteínas y 30% lípidos) que delimitan un espacio, la luz de la cisterna. Los polirribosomas asociados al REG sintetizan proteínas que son transferidas a la luz de la cisterna. El REG está muy desarrollado en las células glandulares secretoras de proteínas, en las células plasmáticas (producen inmunoglobulinas) y en las neuronas.

Algunas células, como los linfocitos, tienen ribosomas aislados (monoméricos o monorribosomas) que no se ensamblan al mRNA. En ausencia de mRNA, los monorribosomas son inactivos en traducción, de forma que representan una maquinaria inactiva, pero preparada para su rápida activación o reflejan un proceso de degeneración celular.

### **Mecanismo de la traducción**

El proceso de traducción requiere de la participación de tres tipos de RNAs: mRNAs, rRNAs y tRNA. Los mRNAs modificados (formación de la caperuza, splicing y poliadenilación) ya maduros, con una secuencia corta que no se traduce (5' UTR y 3' UTR) en los extremos, se exportan al citoplasma. Los mRNAs son reconocidos por la subunidad pequeña del ribosoma. La traducción comprende 3 etapas: iniciación, elongación y terminación. La iniciación requiere de la participación de factores de iniciación de eucariotas (eIFs), el aminoacil-tRNA de la metionina (iniciador), la subunidad pequeña del ribosoma y el codón de iniciación AUG (metionina), que establece el "marco de lectura" del mRNA (Alberts et al., 2015; Pollard et al., 2017).

En el citosol, el eIF2 unido a GTP interacciona con el aminoacil-tRNA de la metionina y este complejo a su vez, se une a la subunidad pequeña del ribosoma (sitio P). El eIF4E se une a la caperuza de metilguanosa del mRNA que se va a traducir y atrae a la subunidad pequeña que se desplaza a lo largo del 5' UTR mRNA hasta encontrar el codón de iniciación (AUG). El codón siguiente al de la metionina es ocupado por el aminoacil-tRNA portador de un anticodon complementario (sitio A). La peptidil-transferasa (ribozima) de la subunidad grande del ribosoma cataliza la transferencia de la metionina al 2º aa del 2º tRNA para formar un enlace peptídico, de esta manera se produce el desplazamiento del ribosoma, primero de la subunidad grande y después de la pequeña, hasta el siguiente codón del mRNA produciéndose la elongación. Hay 3 codones de terminación (UAA, UAG y UGA) que no son reconocidos por los tRNAs y señalizan la parada de la traducción. De esta manera, cuando el ribosoma se desplaza a un codón de terminación, un factor de liberación se

une al sitio A y la peptidil-transferasa cataliza la adición de una molécula de H<sub>2</sub>O para formar el extremo COOH y liberar el péptido (Alberts et al., 2015).

La síntesis de proteínas en el REG requiere de una “secuencia señal” en el péptido nascente y de la partícula de reconocimiento de la señal (SRP), formada por un RNA 7S pequeño asociado a 6 proteínas. La primera fase de la elongación se produce en el citosol hasta que se expone la secuencia señal, momento en el que la SRP interacciona con esta secuencia y con la subunidad grande del ribosoma, parando transitoriamente la traducción. La SRP se une al receptor de la SRP de la membrana para anclar el ribosoma a la superficie del REG. Así, la SRP se disocia y el ribosoma se une al complejo translocador de proteínas Sec61. Este complejo es muy abundante y se visualiza como partículas intramembranas. La entrada de la secuencia señal en este canal acuoso reanuda la traducción, produciéndose la transferencia del péptido a la luz del REG durante la traducción, el llamado transporte cotraduccional. Al final, la peptidasa señal corta la secuencia señal y libera la proteína. Algunas proteínas producidas en el REG no se transfieren a la luz y se integran directamente en la bicapa lipídica. Este proceso de inserción está mediado por una secuencia de parada de la transferencia (hidrófoba), de forma que la interacción de esta secuencia con el complejo Sec61 cambia la configuración y descarga la proteína en la bicapa lipídica (Alberts et al., 2015; Pollard et al., 2017).

En la luz del REG hay proteínas en tránsito al Golgi y proteínas residentes, que poseen una secuencia de retención en el REG. Las proteínas en tránsito sufren modificaciones de glicosilación y plegamiento dirigido por chaperonas residentes, para adquirir la correcta estructura tridimensional. De esta manera, la proteína disulfuro isomerasa cataliza la oxidación de grupos SH (sulfidilo) de la cisteína a enlaces disulfuro S-S. Además, las proteínas Bip (“binding protein”) y las activadas por Ca<sup>++</sup>, calnexina y calreticulina, participan en el control del plegamiento. Así, en el REG hay un control de calidad, si se acumulan proteínas mal plegadas se produce la UPR (“unfolded protein response”), que induce la fosforilación de eIF2 y la parada de la traducción. En los procesos neurodegenerativos (Alzheimer, Parkinson) se producen alteraciones en el plegamiento de proteínas en el REG de determinadas poblaciones neuronales. Estas alteraciones causan una inhibición de la traducción con desintegración del REG. La disrupción del REG altera la síntesis de proteínas y conduce a la neurodegeneración (Alberts et al., 2015; Pollard et al., 2017).

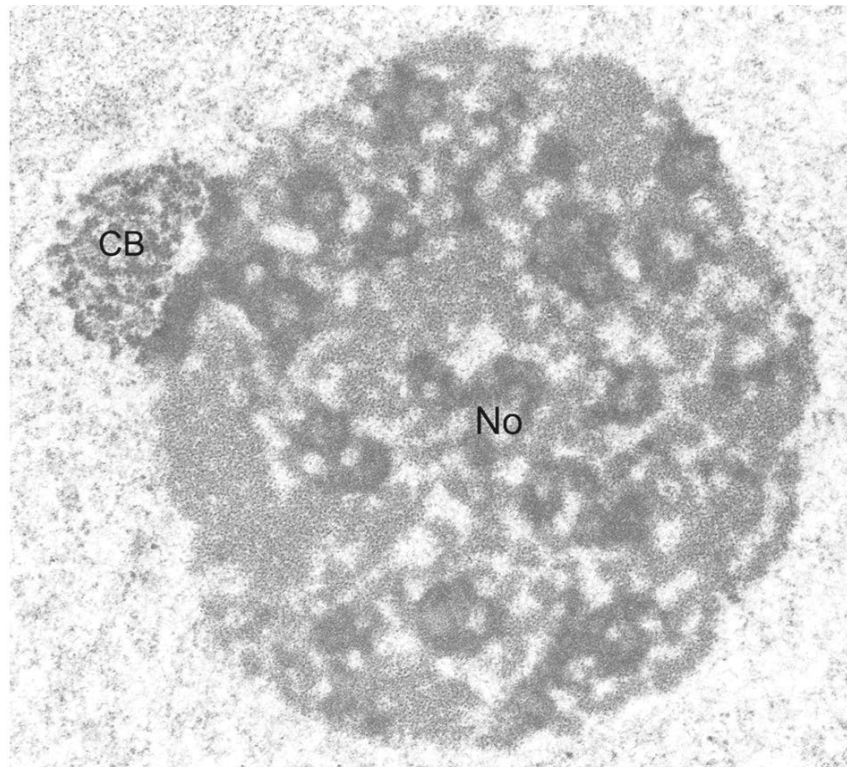
## **6. ORGANIZACIÓN DEL NUCLEOLO Y DE LA MAQUINARIA DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN NEURONAS**

### **El nucleolo neuronal**

En preparaciones de tejido nervioso teñidas con colorantes básicos, como el violeta de cresilo, o con marcadores fluorescentes que se unen al RNA, como el yoduro de propidio, el nucleolo aparece como una estructura muy prominente, redondeada, bien definida e intensamente marcada por su elevada concentración de rRNAs. Destaca claramente sobre un nucleoplasma pálido

producido por la configuración dispersa, eucromática, de la cromatina (Fig. 5). La mayoría de las neuronas de proyección y neuronas sensoriales son mononucleoladas, por ejemplo el 66% de las neuronas del ganglio del trigémino de la rata poseen un único nucleolo. No obstante la incidencia de neuronas con dos o más nucleolos es mayor en neuronas de pequeño tamaño que en las grandes, indicando una menor tendencia a la fusión de los NORs durante la diferenciación en G1 temprano en las primeras (Pena et al., 2001; Palanca et al., 2014). La mononucleolación permite la concentración de genes ribosomales activos y factores reguladores de la transcripción y procesamiento de rRNAs en un único compartimento, favoreciendo las colisiones intermoleculares necesarias para las interacciones RNA-proteínas requeridas en el proceso de biogénesis de ribosomas. El gran tamaño del nucleolo neuronal se correlaciona directamente con la actividad transcripcional de los genes ribosomales que produce una gran acumulación de pre-rRNAs y rRNAs y de proteínas ribosomales que interaccionan con el rRNA (Palanca et al., 2014).

**Figura 5.** Tomado de Palanca et al., 2014. BBA. Elsevier. Imagen de ME que muestra un nucleolo (No) conformado por numerosos centros fibrilares (CFs) envueltos en componente fibrilar denso (CFD) y masas de componente granular (CG). Asociado observamos un cuerpo nuclear de Cajal (CB).



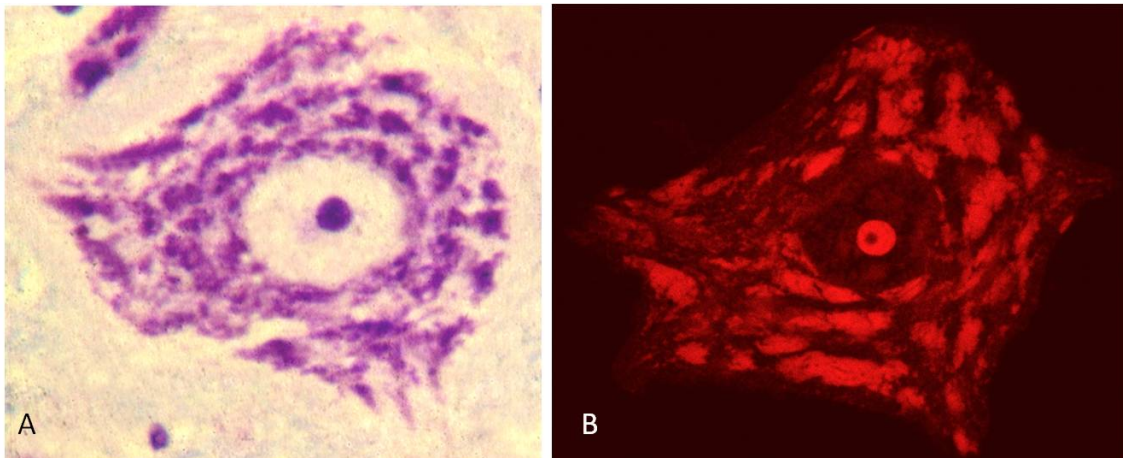
Desde el punto de vista ultraestructural, existen dos configuraciones del nucleolo neuronal. La inmensa mayoría de las neuronas, incluyendo las neuronas de proyección y las neuronas sensitivas, poseen una configuración reticulada. Se caracteriza por la presencia de numerosos CFs pequeños rodeados por una cápsula de CFD, que corresponden a unidades de transcripción CF/CFD (Smirnov et al., 2015), e interconectados por hebras de este mismo componente. Alrededor se disponen áreas irregulares de CG de tamaño muy variable. El cuerpo nucleolar incluye numerosos intersticios que dan un aspecto reticulado al nucleolo. El número de CFs está directamente relacionado con el tamaño neuronal y es un fiel indicador de la actividad global de transcripción nucleolar (Berciano et al., 2007; Raska et al., 2006). Asociados

a la superficie del nucleolo se encuentra la hetercromatina perinucleolar, preferentemente constituida por regiones centroméricas y teloméricas de varios cromosomas, y con gran frecuencia se asocian también CBs (Peters et al., 1991; Lafarga et al., 2016). Se considera que la íntima interacción entre el CB y el nucleolo en neuronas es esencial para la transferencia de snoRNPs, ensambladas en el CB, al nucleolo, donde operan en el procesamiento de los pre-rRNAs (Fig. 4). Las snoRNPs dirigen dos modificaciones pos-transcripcionales: la metilación de residuos de ribosa y la conversión de uridinas en pseudouridinas (Lafarga et al., 2016).

Aunque la configuración típica del nucleolo neuronal es la descrita previamente, las microneuronas, como los granos del cerebelo, poseen micronucleolos con un CF único que ocupa gran parte del volumen nucleolar dando un patrón de nucleolo anular. La presencia de un solo CF y el reducido tamaño del nucleolo reflejan una tasa muy baja de transcripción de los genes ribosomales lo que es consistente con el escaso desarrollo de la maquinaria de síntesis de proteínas en esta población neuronal (Lafarga et al., 1989).

### **La maquinaria de síntesis de proteínas: sustancia o grumos de Nissl**

En preparaciones de microscopía óptica teñidas con colorantes básicos como azul de toluidina, violeta de cresilo o azul de metileno, o con ioduro de propidio para el marcaje citoquímico fluorescente del RNA, el citoplasma de las neuronas presenta un componente intensamente basófilo conocido como sustancia o grumos de Nissl (Fig. 6).

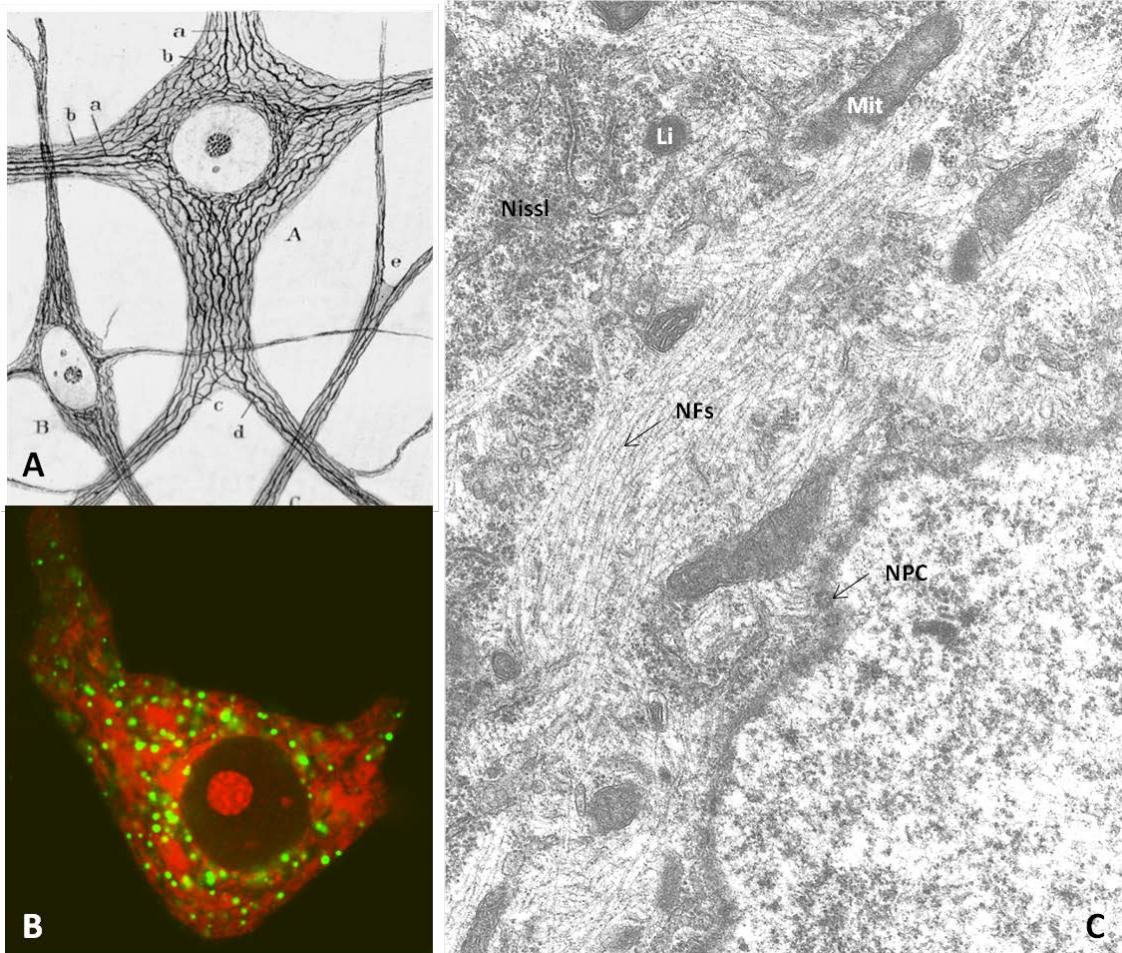


**Figura 6. Grumos de Nissl.** A Imagen de una motoneurona de rata teñida con violeta de cresilo al MO. Se visualizan estructuras teñidas en el citoplasma que corresponden a las zonas de la sustancia de Nissl. B. Tinción citoquímica con ioduro de propidio que marca el rRNA presente en la sustancia de Nissl y en el nucleolo.

Este componente es más llamativo en la grandes motoneuronas de la médula espinal o del tronco cerebral, porque en estas células la sustancia de Nissl tiene la forma de grandes bloques romboidales separados entre sí por citoplasma teñido más tenuemente. Estas regiones entre los grumos de Nissl sirven de paso para los haces de neurofilamentos y albergan también otras organelas como mitocondrias, complejos de Golgi y lisosomas (Fig. 7). La sustancia de Nissl no está confinada al soma neuronal, también está presente en las dendritas, particularmente en los troncos dendríticos gruesos que se



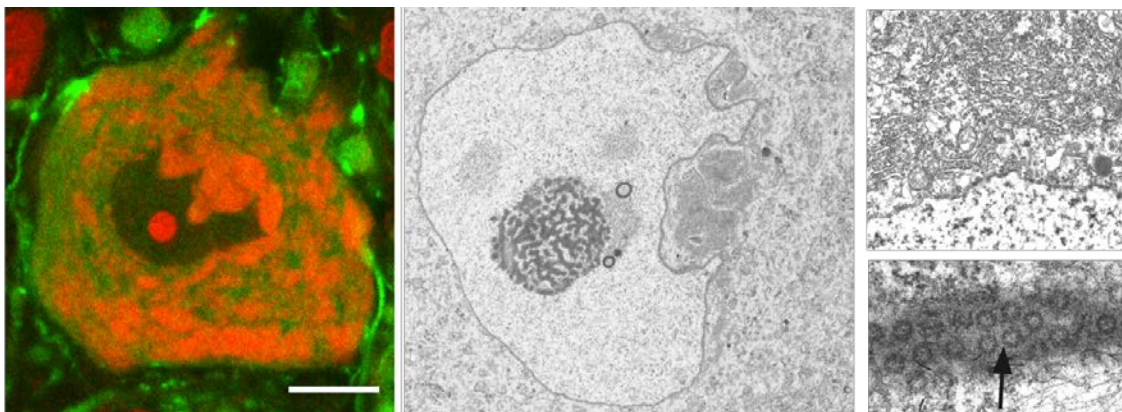
comportan como una extensión del soma neuronal (Peters et al., 1991). Los diferentes modelos de la sustancia de Nissl son característicos de los distintos tipos de neuronas, lo que está probablemente relacionado con el patrón específico de producción de proteínas. Además, la sustancia de Nissl es muy dinámica y su organización depende del estado metabólico de la neurona.



**Figura 7.** A. Dibujo de Cajal que ilustra la distribución de las neurofibrillas en neuronas. B. Imagen de de inmunofluorescencia para la catepsina D (lisosomas) contrastada con yoduro de propidio que demuestra la distribución de los lisosomas entre los grumos de Nissl. C. Detalle de una imagen al ME de una motoneurona de rata, que muestra la presencia de haces de neurofilamentos (NFs) en los espacios entre el RER de los grumos de Nissl. Se aprecian otras estructuras como mitocondrias (Mit), lisosomas (Li) y complejos del poro nuclear (NPC) en la envoltura nuclear.

Así, los clásicos estudios de comienzos del siglo XX demostraron que cuando la función neuronal se ve seriamente afectada, como por ejemplo en la axotomía de las motoneuronas, el patrón de la sustancia de Nissl se altera dramáticamente produciéndose su disolución, un proceso conocido como “cromatolisis”. En este modelo experimental, 3 o 4 días después de la axotomía, el pericarion se hincha y el núcleo se hace excéntrico. Al mismo tiempo los grumos de Nissl comienzan a fragmentarse, un proceso que va incrementando la palidez del citoplasma al difuminarse el material basófilo (Peters et al., 1981). Al llegar a la semana post-axotomía, los grumos de Nissl han desaparecido de la zona central del citoplasma y están confinados a una región marginal, un proceso conocido como cromatolisis central. Si la neurona sobrevive porque se está produciendo la regeneración axonal, su recuperación está caracterizada por la aparición de material basófilo en el polo del núcleo

que está mirando al centro celular, “la caperuza perinuclear basófila” (Fig. 8). Durante la segunda semana, la basofilia en el citoplasma aumenta y el núcleo vuelve a su posición central. Los grumos de Nissl reaparecen primero como pequeños agregados que aumentan progresivamente en tamaño hasta que se restablece el patrón habitual de la neurona entre las 4 o 12 semanas post-axotomía. En esta fase la regeneración puede estar todavía activa en el extremo dañado del axón pero aparentemente el soma neuronal ha recuperado su estructura y función (Peters et al., 1991). De hecho, los estudios con autorradiografía a nivel de microscopía óptica, utilizando uridina o leucina marcadas con tritio como precursores del RNA y proteínas, respectivamente, demostraron que la respuesta regenerativa a la axotomía incluye un incremento en la síntesis de RNA que se ve reflejada en el aumento del tamaño del nucleolo y se acompaña de un aumento del RNA citoplasmático, hasta 2 veces lo normal, y de la síntesis de proteínas (Palanca et al., 2014). La caperuza perinuclear basófila, que es considerada un signo precoz de recuperación neuronal, favorece la transferencia directa de mRNAs al citoplasma para su traducción en el compartimento perinuclear (Figura 7, Riancho et al., 2014). En esta fase regenerativa la mayor parte del rRNA se encuentra en forma de polirribosomas libres. Teniendo en cuenta todos estos cambios regenerativos, la respuesta cromatolítica al daño axonal no debería considerarse un fenómeno degenerativo sino, dependiendo del contexto neuronal en el que se produce, un proceso restaurativo de la homeostasis neuronal. Este modelo de regeneración en la axotomía experimental revela que el patrón de Nissl de una neurona es dinámico y refleja la actividad de síntesis de proteínas.



**Figura 8. Caperuza perinuclear basófila.** Disfunción de motoneurona (A) y neurona sensitiva ganglionar (B) ilustrando la redistribución reactiva de la maquinaria de síntesis de proteínas como una caperuza en un polo nuclear (detalle en C) provisto de invaginaciones de la envoltura nuclear. Panel D muestra la elevada densidad de poros nucleares en los pliegues de la envoltura nuclear.

Con la microscopía electrónica, la sustancia de Nissl está formada por combinaciones variables de polirribosomas libres y cisternas de REG. En las neuronas grandes, como las motoneuronas espinales, el REG está dispuesto en formaciones ordenadas de cisternas casi paralelas, apiladas unas encima de otras, con intervalos regulares entre ellas, aunque las anastomosis entre cisternas son frecuentes (Peters et al., 1991; Palanca et al., 2014; Riancho et al., 2014). Las superficies externas de las membranas que limitan estas cisternas están cubiertas de ribosomas organizados en filas o espirales de polirribosomas. Además, una fracción importante de ribosomas se encuentra

libre en el citoplasma. Tales ribosomas tienden a estar organizados en rosetas de polirribosomales localizados en los espacios intercisternales (Peters et al., 1991). La estructura de la sustancia de Nissl en las células nerviosas difiere mucho de la encontrada en el citoplasma de las células glandulares productoras de proteínas (Pollard et al., 2017). Por ejemplo, en las células de páncreas exocrino las membranas de las cisternas están regularmente decoradas con numerosos polirribosomas y solo una pequeña proporción de ellos se encuentran libres. En este caso, la asociación preferente de los polirribosomas con el REG puede correlacionarse con la producción de proteínas de secreción que son depositadas en el lumen del REG y están destinadas a ser secretadas por célula. Sin embargo, en la mayoría de las neuronas solo una parte pequeña de la producción de proteínas está dedicada a la actividad secretora, esencialmente a la biogénesis de neuropéptidos que se liberan en la sinapsis. Otra fracción de proteínas producidas en el REG son proteínas de membrana, que se insertan en la misma por un mecanismo de secreción constitutiva, e hidrolasas lisosomales.

La mayor parte de las proteínas sintetizadas en neuronas se producen en polirribosomas libres y están destinadas al mantenimiento y renovación del citoplasma, así como a las funciones nucleares. En ellas, destacamos las i) proteínas citosólicas, muchas de ellas enzimas implicadas en múltiples rutas del metabolismo neuronal, como la glicolisis, la vía de las pentosas o la síntesis y degradación de neurotransmisores, ii) las subunidades del citoesqueleto (tubulinas y neurofilamentos), iii) proteínas mitocondriales, iv) proteínas ribosomales y v) proteínas nucleares portadoras de una secuencia de localización nuclear (Bear et al., 1998). Finalmente, una fracción de las proteínas neuronales se transporta por el axón como un componente del flujo axónico. Se estima que más del 98% de las proteínas de los terminales sinápticos se originan en el soma neuronal y se transporta por flujo axónico. Finalmente, estudios bioquímicos han estimado que las neuronas renuevan aproximadamente un tercio de sus proteínas cada día. Este “turnover” tan rápido se relaciona con la actividad bioeléctrica neuronal y con la gran intensidad de su metabolismo oxidativo que inactiva muchas proteínas por oxidación (Haines, 2002).

## **7. DISRUPCIÓN NUCLEOLAR Y DE LA MAQUINARIA DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN CUADROS DE LA NEUROPATOLOGÍA.**

### **Introducción**

Es bien conocido que las neuronas dependen de la actividad de traducción para sostener su compleja morfología y actividad sináptica. Por ello, cabe esperar que si la síntesis de proteínas se reduce por la acción de diversos factores patogénicos se pueda inducir mecanismos de neurodegeneración. De hecho, la hipótesis de que un defecto en la biogénesis de ribosomas subyace en procesos neurodegenerativos fue ya propuesta por Johnson y Strehler (1972) hace más de 40 años. Más recientemente, se han ido descifrando algunos de los mecanismos celulares y moleculares que operan en la disfunción del nucleolo y de la maquinaria de síntesis de proteínas en diversos cuadros de la neuropatología (ver Tabla 1), especialmente en la enfermedad de

Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica y atrofia muscular espinal (Hetman and Pietrzak, 2012).

Enfermedad	Evidencias de disfunción nucleolar		
	Morfológicas	Bioquímicas	Genéticas/epigenéticas
<b>Enfermedad de Alzheimer</b>	Tamaño nucleolar reducido en neuronas cerebrocorticales, del hipocampo y del núcleo de Meynert	Oxidación de rRNA aumentada y fallo ribosomal en el hipocampo y/o córtex cerebral	Hipermetilación de CpG en el promotor de rDNA en el córtex cerebral
<b>Síndrome ANE</b>	-	-	Mutación inactivadora del factor de la biogénesis nucleolar de la subunidad grande, RBM28, que produce la enfermedad
<b>Síndrome de Bowen-Conradi</b>	-	-	Mutación inactivadora del factor de la biogénesis nucleolar de la subunidad pequeña, EMG1, que produce la enfermedad
<b>Síndrome de cockayne</b>	-	-	Mutación inactivadora de los mediadores de la NER y los cofactores de Pol1: CSB,XPB t XPD, que produce la enfermedad
<b>Enfermedad de Huntington</b>	-	-	Transcripción nucleolar y niveles/actividad de UBF reducidas en células del cuerpo estriado de ratón con una mutación asociada a (EH), la <i>Htt</i> , y en el cuerpo estriado de ratones transgénicos que sobreexpresaban un fragmento mutante de la <i>HTT</i> humana (línea R6/2)
<b>Enfermedad de Parkinson</b>	Tamaño nucleolar reducido y reducción del marcador nucleolar B23 en neuronas de la sustancia negra	-	Inactivación del coactivador de pol1, TIF1A, en neuronas dopaminérgicas dando lugar a degeneración de neuronas de la sustancia negra en ratones.
<b>Síndrome de Prader-Willi.</b>	Tamaño nucleolar disminuido en las neuronas de pacientes con PWS y en ratones transgénicos PWS-like	-	Microdelecciones en el cromosoma 15 en la región PWS que selectivamente rompe el cluster de genes de snoRNA <i>SNORD116 (HBII-85)</i> , son suficientes para producir las características clave de la enfermedad.
<b>Síndrome de Rett</b>	Tamaño nucleolar disminuido en el modelo de ratón de síndrome de Rett con inactivación de <i>Mecp2</i>	-	-
<b>Suicidio con historia de abusos en la infancia</b>	-	Niveles disminuidos de 18S rRNA en el hipocampo de afectados	Hipermetilación de CpG en el promotor de rDNA en el hipocampo de afectados

**Tabla 1. Tomado de: Hetman and Pietrzak. Trends in Neurosciences. 2012; 35(5):305-314.** Evidencias que apoyan el papel del nucleolo en la disfunción de trastornos neurológicos.

Las enfermedades neurodegenerativas generalmente cursan con alteraciones severas de la proteostasis, es decir del ciclo de biogénesis y degradación de proteínas, así como de su control de calidad (Sala et al., 2016). Estas alteraciones inducen respuestas de estrés celular, esencialmente “estrés nucleolar” y “estrés del retículo endoplasmático (RE)” con activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, “unfolded protein response”).

Además, frecuentemente se acompañan de la formación de agregados anormales de proteínas que han experimentado modificaciones post-traduccionales, dando lugar a conformaciones anómalas y, eventualmente, a la formación de fibrillas que incapacitan la función del RE y alteran el sistema ubiquitina-proteasoma. Así, la acumulación intra- o extracelular de agregados de proteínas, junto con la producción y acumulación de especies oligoméricas son características de la EA, EP, ELA y la enfermedad de Huntington, entre otros cuadros neurodegenerativos (Garcia-Esparcia et al., 2015; Sala et al., 2016).

### **Estrés nucleolar y p53**

El mantenimiento de la estructura del nucleolo es dependiente de la actividad transcripcional de los genes ribosomales (Raska et al., 2006; Baltanás et al., 2010). Esto hace que el nucleolo sea un indicador muy sensible de cualquier perturbación de la síntesis de rRNAs asociada a la respuesta de estrés celular. De hecho, la organización de los componentes del nucleolo en modelos neuronales es dependiente de transcripción (Hetman and Pietrzak, 2012; Palanca et al., 2014). Los mecanismos patogénicos que inhiben la actividad transcripcional del nucleolo, mediante la inactivación del ensamblaje y actividad del complejo de la RNA pol I, producen una respuesta genéricamente identificada como “estrés nucleolar”. Esta respuesta conduce a la expresión anormal de rRNAs, con disfunción de la biogénesis de ribosomas y reducción de la síntesis de proteínas y, en última instancia, a la muerte celular (Boulon et al., 2010). El estrés nucleolar se está convirtiendo en un importante sensor de muchas condiciones patológicas como la neurodegeneración y ha sido documentado en algunos casos como la enfermedad de Alzheimer, ataxia cerebelosa y atrofia muscular espinal. (Baltanas et al., 2011; Garcia-Esparcia et al., 2015; Tapia et al., 2017).

La organización estructural del nucleolo permite alojar un importante número de proteínas y RNAs con importantes papeles en varios procesos celulares. Por lo tanto, la perturbación de la dinámica de ensamblaje nucleolar inducida por diferentes factores patogénicos ejerce profundos efectos en varias funciones celulares (Parlato and Kreiner, 2012).

La principal función reguladora asociada a la alteración dinámica de las proteínas nucleolares está conectada a la respuesta de estrés nucleolar e implica, entre otros mecanismos, la liberación al nucleoplasma de subunidades de proteínas ribosomales nucleolares. En respuesta a condiciones adversas, deficiencias metabólicas o estrés oxidativo, la síntesis de rRNA se regula a la baja por mecanismos que incluyen la inactivación factores de transcripción y modificaciones epigenéticas. Además, la alteración de la biogénesis ribosomal libera proteínas ribosomales al nucleoplasma donde interfieren con la actividad de la ubiquitina-ligasa E3, MDM2. Normalmente, esta enzima ubiquitila a p53 y favorece su degradación por el proteasoma, pero esta función se ve alterada por la liberación nucleoplasmática de proteínas ribosomales que se unen a MDM2 e interfieren su actividad. Esto da lugar a la estabilización y acumulación de p53, que eventualmente dará inicio a programas transcripcionales y no-transcripcionales que pueden conducir a la reparación de las lesiones celulares

o, en última instancia, a la activación de la apoptosis. Por lo tanto, al detectar señales de estrés celular y transmitir las al sistema de estabilización de p53, el nucleolo tiene un papel fundamental como “sensor de estrés” (Boulon et al., 2010; Parlato and Kreiner, 2012).

Recientemente, se han hallado en el GC del nucleolo RNAs pequeños no codificantes (ncRNAs) que regulan la traducción del mRNA. Aunque no se conoce el papel de estos transcritos en el nucleolo, se podría especular que la regulación del procesamiento y localización de los microRNAs (miRNAs) es un mecanismo adicional de acoplamiento entre la actividad nucleolar y la regulación de la síntesis proteica. Además recientemente también se ha demostrado que ciertos estímulos estresantes, como la acidosis, inducen inmovilización nucleolar de determinadas proteínas en tránsito por el nucleolo mediante su interacción con ncRNAs largos. Estas ideas y la creciente evidencia del papel de los ncRNAs en el desarrollo y plasticidad neuronal, apoyan un nexo entre el nucleolo y los ncRNAs en la supervivencia y actividad neuronal (Parlato and Kreiner, 2012).

Respecto al papel de p53, durante el ciclo celular, p53 organiza la respuesta al daño en el DNA, incluyendo la detención del ciclo celular, la reparación del DNA y/o la apoptosis. Varios eventos intracelulares pueden activar p53 en células no proliferantes, incluyendo roturas del DNA, inhibición del proteasoma, bloqueo de la exportación nuclear, inhibición transcripcional y/o desorganización nucleolar. (Kalita et al. 2008; Palanca et al., 2014).

En el caso de la respuesta neuronal a la injuria, especialmente al daño en el DNA, sabemos que la activación de la apoptosis neuronal es bloqueada por los inhibidores de la transcripción o de la traducción. Por lo tanto, es necesaria la expresión *de novo* de genes codificantes de proteínas, cuya transcripción es mediada por la RNA pol II, para que se produzca la apoptosis neuronal inducida por daño neuronal. En consonancia con esta noción, se ha demostrado que el daño en el DNA neuronal bloquea selectivamente la transcripción llevada a cabo por la RNA pol I al mismo tiempo que activa la apoptosis dependiente de p53. De forma que la muerte celular mediada por p53 se ha asociado con la capacidad de p53 para inducir la expresión de genes “de muerte celular” como *Bax* o *Noxa*. El papel crítico de la expresión génica en la apoptosis neuronal inducida por la inhibición de la RNA pol I, indica la necesidad de una transcripción mediada por RNA pol II íntegra. Por lo tanto, el daño en el DNA que activa la apoptosis por este mecanismo podría ser relativamente selectivo para loci de rDNA sin incluir genes regulados por la RNA pol II. La posibilidad de que el daño del DNA induce muerte neuronal a través de la inhibición de la transcripción de ciertos loci génicos, que sirven como sensores de integridad genómica, implica que las intervenciones que tengan el objetivo de repararlos pueden ofrecer una neuroprotección efectiva. (Kalita et al., 2008)

### **Nucleolo y enfermedades neurodegenerativas**

Las mutaciones que causan un grupo importante de enfermedades neurodegenerativas impiden la transcripción de los genes ribosomales lo que

sugiere que la disfunción nucleolar está implicada en la patogénesis de enfermedades por repeticiones de poliglutamina y en ciertas formas de esclerosis lateral amiotrófica (Parlato and Kreimer, 2013). Las proteínas y RNAs mutados pueden interferir directamente con la actividad de la RNA pol I, reduciendo la tasa de transcripción del rDNA (Parlato and Bierhoff, 2015) (Tabla 1).

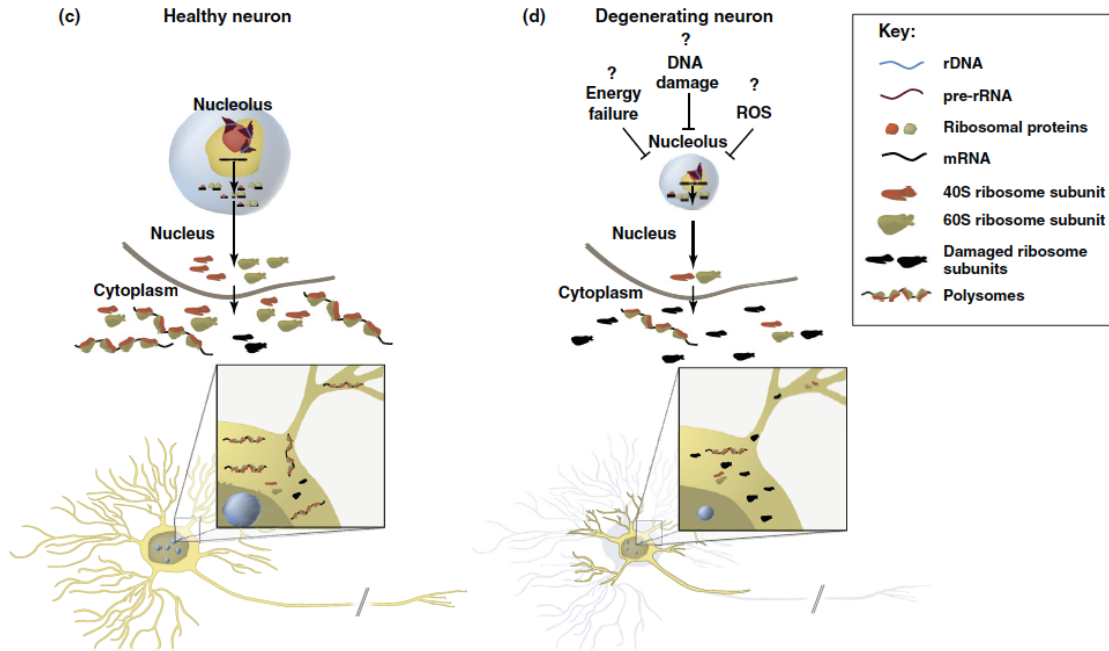
### **La enfermedad de Alzheimer (EA)**

La EA está caracterizada clínicamente por una progresiva pérdida de memoria y un decaimiento cognitivo e histopatológicamente por una atrofia cerebral implicando típicamente al hipocampo y región medial de los lóbulos temporales. Los marcadores neuropatológicos son por un lado, depósitos de proteína Tau fosforilada que forman ovillos neurofibrilares (NFT) y por otro,  $\beta$ -amiloide extracelular que se deposita en forma de placas difusas. En estadios precoces asintomáticos, los NFTs están restringidos al córtex entorrinal y transentorrinal y la región CA1 del hipocampo. Posteriormente, los NFTs se extienden a la amígdala, los núcleos del tronco cerebral y todo el neocórtex. El  $\beta$ -amiloide también se extiende, aunque sigue un patrón diferente, hasta cubrir todo el telencéfalo (Hernández-Ortega et al., 2016).

Diversos estudios han demostrado una reducción del tamaño del nucleolo y del número de ribosomas, así como una masiva oxidación del rRNA, en muestras de hipocampo y corteza cerebral de pacientes con EA. El daño en el rRNA se acompaña de una disminución de la síntesis de proteínas, incluso en estadios tempranos de la enfermedad (Fig. 9). Además, recientemente se ha demostrado la hipermetilación del promotor rDNA en la corteza cerebral, pero no en el cerebelo, de pacientes con EA. Esta modificación sugiere un silenciamiento epigenético de los genes ribosomales, con reducción de la síntesis de rRNAs y, por consiguiente, de la biogénesis de ribosomas. Entre las causas que pueden provocar esta insuficiencia en la función nucleolar se han propuesto el daño oxidativo en el DNA, la activación del estrés oxidativo y las alteraciones en la bioenergética celular con un suministro reducido de ATP (Hetman and Pietrzak, 2012). Respecto a este último mecanismo, algunos autores proponen que el silenciamiento epigenético transitorio de los genes ribosomales puede tener una función neuroprotectora, evitando un excesivo consumo de energía para sostener la biogénesis de ribosomas, una de las funciones neuronales que requieren un suministro muy elevado de ATP (Murayama et al., 2008). En efecto, la reducción del suministro de energía para mantener la biogénesis de ribosomas podría afectar a otras funciones esenciales para la supervivencia neuronal, especialmente en las condiciones desfavorables del metabolismo neuronal asociadas a la EA (Bernstein and Bamburg, 2003).

Otros mecanismos moleculares implicados en la disfunción del nucleolo y de la síntesis de proteínas en la EA, incluyen la expresión aberrante de mRNAs que codifican proteínas esenciales del nucleolo como la nucleolina NPM1/B23 y nucleoplasmina 3 (NPM3), así como el UBTF, con niveles reducidos de sus proteínas. Nucleolina, NPM1/B23 y NPM3 son proteínas nucleolares que actúan como chaperonas de unión a histonas, que son necesarias para la

compactación de la cromatina y la regulación de la transcripción de rRNA. Como se ha comentado anteriormente, UBF es un factor de transcripción de los genes ribosomales, codificado por el gen *UBTF*, asociado a las NOR activas. Su actividad es fundamental para la transcripción del rDNA por la RNA pol I (Raska et al., 2006; Hernández-Ortega et al., 2016).



TRENDS in Neurosciences

**Figura 9.** Tomado de: Hetman and Pietrzak. Trends in Neurosciences. 2012; 35(5):305-314. Modelo hipotético del papel de la insuficiencia nucleolar en la enfermedad de Alzheimer. En neuronas sanas, la correcta biogénesis ribosomal asegura la adecuada renovación de los ribosomas y la normal síntesis de proteínas que es necesaria para el mantenimiento de la sinapsis y de otras funciones celulares. En neuronas en degeneración, la transcripción nucleolar puede estar disminuida por factores como suministro energético limitado, daño en el DNA o activación de señalización de estrés por generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto daría lugar a una disminución de la producción de ribosomas y consecuentemente a una incapacidad para reemplazar los ribosomas con su rRNA dañado por la oxidación (marcados en negro). Como resultado, el número de ribosomas activos disminuiría y la decreciente síntesis de proteínas sería insuficiente para mantener la homeostasis y supervivencia neuronal.

Además varios genes codificantes para proteínas ribosomales también están regulados de forma anómala y los niveles de algunos factores iniciadores de la traducción (eIF2 $\alpha$ , eIF3 $\eta$  y eIF5) y del factor de elongación eEF2, están alterados en la región CA1. Estos hallazgos muestran alteraciones en la maquinaria de síntesis de proteínas en la EA que implican al nucleolo, núcleo y ribosomas en el hipocampo. Cabe destacar que muchas de estas alteraciones ocurren en fases iniciales de la enfermedad, cuando todavía no hay pérdida neuronal y, además, estos cambios podrían estar detrás de la reducción de las ramas dendríticas y de sinapsis en la región CA1 y en el giro dentado (DG) (Hernández-Ortega et al., 2016).

La atrofia del hipocampo, que es un marcador de progresión en la neuroimagen de la EA, se ha interpretado como secundaria a la formación de NFTs y a la atrofia y pérdida neuronal. A su vez, la atrofia neuronal tiene su explicación más plausible en la reducción de la síntesis de proteínas. Algunos estudios han identificado una composición alterada en los ribosomas y una expresión anormal en los niveles de ciertos factores de transcripción, y una síntesis



proteica reducida en áreas corticales de pacientes con una discapacidad cognitiva leve. Las principales modificaciones fueron: niveles reducidos de rRNA y una oxidación de RNA aumentada. Además, la superficie ocupada por los AgNOR, un marcador de la actividad del nucleolo, y la superficie nucleolar total están reducidas sugiriendo silenciamiento epigenético del rDNA, alteraciones que son consistentes con la hipermetilación del promotor rDNA demostrada en muestras de la corteza cerebral de pacientes con EA. En este contexto, el patrón de metilación específica de rDNA podría ser utilizado como marcador de progresión de enfermedad (Parlato and Kreiner, 2012). Estos hallazgos sugieren varios caminos desde el núcleo al nucleolo y de éste al ribosoma que están alterados en el córtex cerebral en la EA. (Hernández-Ortega et al., 2016).

### **La enfermedad de Parkinson (EP) y enfermedades por repeticiones de trinucleótidos**

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la acumulación de una especie oligomérica de  $\alpha$ -sinucleína. En la EP la maquinaria de síntesis de proteínas se encuentra alterada en la sustancia negra y en el córtex cerebral, pero está conservada en el putamen, donde estos oligómeros no han sido detectados (Garcia-Esparcia et al., 2015). La integridad del nucleolo está severamente afectada en las neuronas dopaminérgicas de autopsias de pacientes con EP (Ricker et al., 2011; Parlato and Kreiner, 2013).

Recientes estudios de expresión génica en pacientes con EP identifican niveles reducidos de los mRNAs que codifican las proteínas nucleolares nucleolina, NPM1/B23 y UBF en la sustancia negra, así como disminución del pre-rRNA 45S y de la forma madura rRNA 18S. Esta expresión aberrante de componentes esenciales para la biogénesis de ribosomas se acompaña de una reducción progresiva de mRNAs que codifican algunas subunidades de proteínas ribosomales a medida que avanza la enfermedad. La expresión reducida de estos mRNAs podría estar relacionada con la progresiva pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. También se ha reportado una reducción en los niveles de la proteína nucleolina en consonancia con la disminución de su mRNA. Dado que la nucleolina se localiza fundamentalmente en el componente fibrilar denso del nucleolo, donde contribuye a regular la transcripción y el procesamiento inicial de los rRNAs e interacciona con  $\alpha$ -sinucleína y DJ-1, dos proteínas implicadas en la patogénesis del PK familiar, su reducción puede ser un factor importante en la disfunción nucleolar y en la inducción de estrés nucleolar en la EP (Garcia-Esparcia et al., 2015).

Al contrario que en la sustancia negra, los mRNAs de la nucleolina y NPM1 están incrementados en área 8 del córtex frontal en los estadios 5 y 6 de la EP. Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de nucleolina y de NPM1 es neuroprotectora frente a la toxicidad inducida con rotenona (un tóxico usado para reproducir algunas características de la EP) y el ácido kaínico, se podría pensar que la expresión aumentada de sus mRNAs en el córtex frontal parece ser una respuesta para proteger la síntesis de rRNA y preservar la biogénesis de ribosomas (Garcia-Esparcia et al., 2015).

Por otro lado, en la sustancia negra los niveles de expresión de los factores reguladores de la traducción eIF3 y eEF2 se incrementan marcadamente en los estadios 5 y 6 de la enfermedad. Esto sugiere un intento de activación de la síntesis proteica que podría estar relacionado con un mecanismo compensatorio de las neuronas dopaminérgicas frente a la alteración en la expresión de genes que codifican proteínas ribosomales. Por el contrario, en el área 8 del córtex frontal, se ha observado que el factor iniciador de la traducción eIF3 estaba significativamente disminuido, sugiriendo que el reclutamiento de mRNAs para la traducción por la subunidad pequeña de ribosoma (40S) está inhibido por una expresión disminuida de eIF3. Cabe destacar también que la reducción significativa en la expresión de eEF1A y eEF2, dos proteínas esenciales para la fase de elongación de la síntesis de proteínas, que aumenta con la progresión de la enfermedad, apoya fuertemente la hipótesis de una síntesis alterada de proteínas en el córtex frontal en la EP (García-Esparcia et al., 2015).

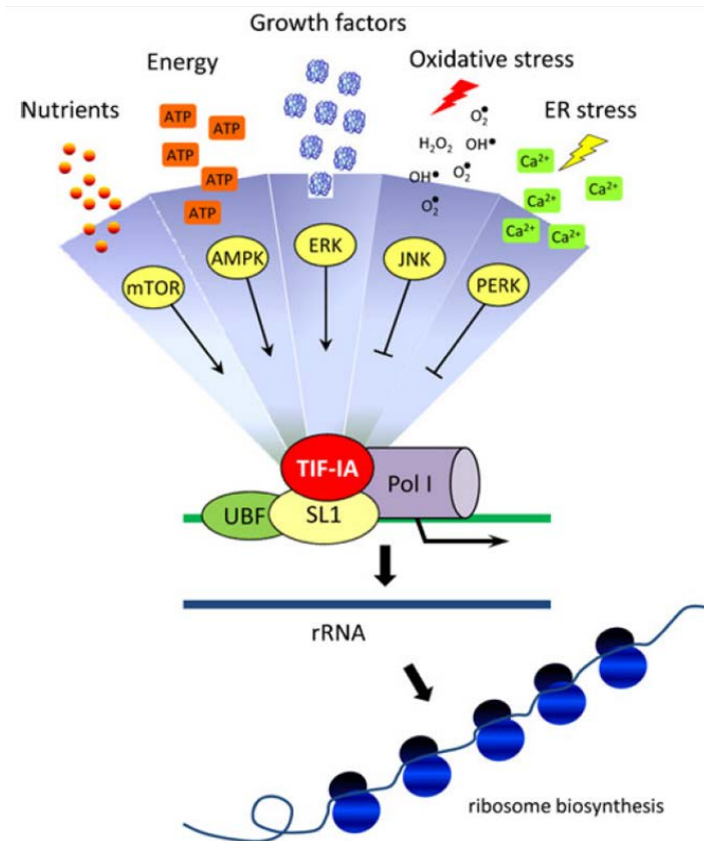
La  $\alpha$ -sinucleína se identifica en el núcleo y es especialmente abundante durante la neurogénesis. Los niveles de  $\alpha$ -sinucleína aumentan acompañando al estrés oxidativo y parecen facilitarlos. Se sabe que la  $\alpha$ -sinucleína se une a las histonas e inhibe su acetilación y, durante estrés oxidativo, reduce la transcripción de genes mitocondriales. La disfunción en la bioenergética mitocondrial impacta directamente sobre la función del nucleolo dado que la biogénesis de ribosomas es una de las funciones celulares que más ATP consume (Parlato and Kreinar 2013). Por otra parte, la alteración de la maquinaria de síntesis de proteínas en la EP se relaciona con la presencia de especies oligoméricas de  $\alpha$ -sinucleína. Es interesante que el análisis de las bandas de  $\alpha$ -sinucleína muestra que son diferentes en la sustancia negra y en el córtex frontal, sugiriendo diferencias regionales en la composición de las especies oligoméricas. Lo que puede significar que representan a su vez, diferencias regionales en el metabolismo de la  $\alpha$ -sinucleína y podría implicar una vulnerabilidad regional específica (García-Esparcia et al., 2015).

En la EP se ha demostrado la activación de la UPR inducida por la acumulación anormal de proteínas en el RE. Los marcadores de esta respuesta (PERK y eIF2 $\alpha$ ) han sido identificados en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra que contenían inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína en fases tempranas de la enfermedad. La expresión de ATF4 y ATF6, dos factores de transcripción que participan en la UPR, está elevada en la sustancia negra en fases avanzadas, apoyando también la activación de la UPR. La inducción de la UPR, se asocia a inhibición de la traducción, mediada por la fosforilación PERK-dependiente del factor eIF2, y representa un claro signo de disfunción de la maquinaria citoplasmática de síntesis de proteínas (García-Esparcia et al., 2015).

Un excelente modelo experimental para analizar la importancia del estrés nucleolar en la patogénesis de cuadros degenerativos, especialmente de la EP, es el ratón deficiente del factor iniciador de la transcripción nucleolar TIF-IA. Este factor es esencial para el reclutamiento de la RNA pol I en el promotor de los genes ribosomales. TIF-IA es regulado por una gran variedad de proteína quinasas en respuesta a cambios en las concentraciones de ATP (AMPK) y

nutrientes (mTOR), estrés oxidativo (JNK) y estrés del retículo endoplásmico (PERK) (Fig 9). Aunque el knock-out para TIF-1A es letal para el embrión, su inactivación condicional en neuronas dopaminérgicas reprime la vía de señalización mTOR y conduce a un fenotipo similar a la EP. Éste incluye pérdida de dopamina en el estriado, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y alteraciones motoras (Rieker et al., 2011). La represión de mTOR puede ser contrarrestada mediante la delección condicional de la fosfatasa PTEN en las neuronas dopaminérgicas que restablece los niveles de dopamina y ofrece una nueva aproximación terapéutica en la EP (Parlato and Kreiner, 2012).

**Figura 10.** Tomado de Parlato y Kreiner. *J Mol Med.* 2012;91(5):541-547. Esquema de la maquinaria de la RNA pol I en los promotores de rDNA, donde se muestra diferentes señales y vías para la regulación de la actividad de TIF-1A y su repercusión, positiva o negativa, en el control de la actividad e integridad nucleolar.



La actividad nucleolar también se encuentra alterada en las enfermedades por repeticiones de trinucleótidos. Por ejemplo la enfermedad de Huntington está asociada con la expansión en el exón 1 del gen de la huntingtina, lo que da lugar a un tracto de poliglutamina aberrante en la proteína. Numerosos estudios han demostrado que la transcripción de los genes de rRNA está alterada en la enfermedad de Huntington. Entre otros hallazgos, se ha demostrado la presencia de agregados insolubles de huntingtina en el nucleolo. Además, la presencia de agregados es común a otras enfermedades neurodegenerativas (Parlato and Kreiner, 2012).

### La esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

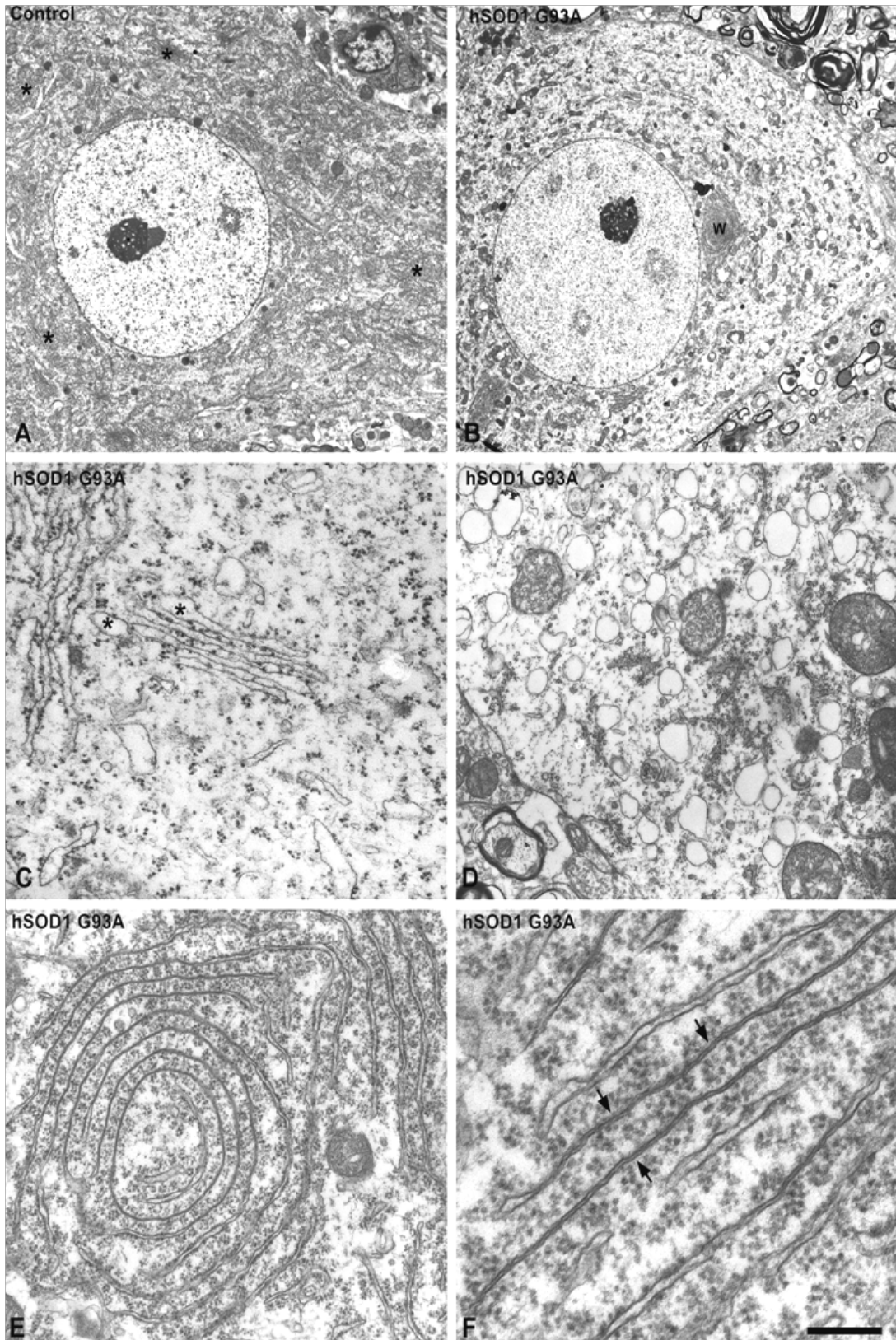
La ELA es una enfermedad degenerativa caracterizada por la degeneración de las neuronas motoras en el asta anterior de la médula espinal, núcleos del tronco cerebral y el córtex cerebral (Riancho et al., 2014). Las características neuropatológicas distintivas en la ELA incluyen dos estadios principales y

secuenciales en las motoneuronas espinales: la progresiva cromatolisis, asociada con degeneración vacuolar del soma y prolongaciones neuronales y formación de inclusiones citoplasmáticas de proteínas ubiquitiladas, y la fase final de neurodegeneración que conduce a la apoptosis (Riancho et al., 2014).

Así, un importante componente en la fisiopatología de la ELA es una respuesta crónica a estrés por parte del RE, dando lugar a una severa disrupción de la proteostasis. Diferentes noxas celulares producen un plegamiento alterado de las proteínas en el RER, con la consiguiente inhibición de la traducción de proteínas. Este proceso se conoce como “estrés del RE”. Como mecanismo compensador, las neuronas activan la UPR que, dependiendo de la naturaleza del daño celular, dará lugar bien a un plegamiento correcto de las proteínas alteradas o bien a la neurodegeneración. Las manifestaciones celulares de estrés del RE crónico son la fragmentación y disolución de las cisternas del RER (cromatolisis) y la acumulación de proteínas mal plegadas y aberrantes en inclusiones citoplasmáticas inmunomarcadas para la ubiquitina. La disolución cromatolítica del RER refleja la disfunción en la síntesis de proteínas que habitualmente precede la apoptosis (Riancho et al., 2014).

Se ha visto que la progresión de la cromatolisis está asociada con la formación en el citoplasma de gránulos de estrés (SGs) enriquecidos en eIF3. En condiciones fisiológicas las tasas de iniciación y silenciamiento de la traducción están en equilibrio y la mayor parte del mRNA citoplásmico está localizado en los polirribosomas. Varios estudios indican que el estrés de RE altera este balance dando lugar a un aumento de la tasa de silenciamiento y a un secuestro del exceso de mRNA disociado de los polirribosomas y de factores reguladores de la traducción en los SGs. Por lo tanto, la formación de los SGs refleja el desensamblaje de los polirribosomas mediado por estrés del RE y el ulterior reclutamiento de algunos mRNAs liberados en los SGs (Riancho et al., 2014).

Estudios previos con microscopía electrónica de las alteraciones del RE en motoneuronas de pacientes con ELA han reportado varios tipos de alteraciones, como la dilatación de las cisternas con disociación de los ribosomas de la membrana del RE (degranulación), acumulaciones de material amorfo dentro de las cisternas y formación ocasional de cuerpos lamelares. El estudio de Riancho (2014), realizado en un modelo murino de ELA, el ratón transgénico SOD1-G93A, incluye, además de estas alteraciones, una fragmentación masiva de las cisternas del RE en pequeñas y numerosas vesículas, que conservan remanentes de polirribosomas unidos a la membrana, en áreas cromatolíticas del citoplasma (Fig. 11). Este estudio también describe la oclusión del lumen de las cisternas RE acompañada de desacoplamiento polirribosomal. En conjunto, estas alteraciones estructurales del RE reflejan una dramática disfunción de la síntesis de proteínas en las áreas cromatolíticas de las motoneuronas espinales (Riancho et al., 2014).



**Figura 11. Tomado de:** Riancho et al. *Frontiers Cell Neurosci.* 2014;8(346). Imágenes de ME de motoneuronas espinales control (B) y de ELA murina (B-F). A. Mientras la motoneurona espinal control ilustra la típica distribución de la sustancia de Nissl, la motoneurona con ELA muestra una extensa área citoplasmática electrolúcida de cromatolisis. C-F. Las alteraciones estructurales en la maquinaria de síntesis de proteínas incluyen pérdida de polirribosomas asociados al REG, (C, degranulación), dilatación y vesiculación de las cisternas (D), colapso de la luz y formación de ordenaciones concéntricas de cisternas (E y F).

Cabe destacar, que en algunos modelos experimentales de axotomía o neurotoxicidad, la cromatolisis es una disfunción reversible de la maquinaria de síntesis de proteínas, indicando la activación de mecanismos de neuroprotección que llevan a la recuperación funcional de la célula. En el modelo murino de ELA, se ha demostrado que la cromatolisis induce mecanismos neuronales compensatorios, que podrían permitir a las neuronas tolerar disfunciones severas de las proteostasis hasta la fase final de activación de la apoptosis. Tales mecanismos incluyen la reorganización perinuclear de la maquinaria de síntesis de proteínas, particularmente la formación de un “casquete perinuclear basófilo”, y el mantenimiento de un patrón de eucromatina transcripcionalmente activa y de la actividad transcripcional del nucleolo necesaria para la biogénesis ribosomal (Riancho et al., 2014).

Una observación importante en las motoneuronas espinales tanto en el modelo murino como en pacientes con ELA es la reorganización de la maquinaria de síntesis de proteínas en la proximidad de la envoltura nuclear, formando un “casquete perinuclear basófilo” en un polo del núcleo (Fig. 8), visible con las tinciones clásicas con anilinas y también con el yoduro de propidio por su enriquecimiento en RNAs. En este contexto, es bien conocido que el entorno de la envoltura nuclear aporta una región especializada para una gran cantidad de funciones celulares, como la transcripción en la periferia nuclear y el tráfico núcleo-citoplasma. Así, en la última década, se ha demostrado la existencia de algunos genes anclados en el complejo del poro nuclear, mediante una secuencia de destino en el DNA que reconoce determinadas nucleoporinas de la “jaula del poro nuclear”. Esta topología nuclear facilita que los transcritos primarios codificados por estos genes sean rápidamente procesados en la vecindad del complejo del poro nuclear y exportados al citoplasma para su traducción (Mekhail and Moazed, 2010). Es interesante destacar que en modelos experimentales, como la axotomía y la inhibición del proteasoma con Bortezomib, se ha descrito una reorganización perinuclear de la maquinaria de síntesis de proteínas, con formación de “casquetes basófilos”, similar a la observada en las motoneuronas murinas y humanas de ELA (Palanca et al., 2014; Riancho et al., 2014). Esta reorganización en respuesta a la axotomía y a la inhibición del proteasoma es transitoria y revierte con la regeneración axonal y con el cese del tratamiento con Bortezomib, cuando las neuronas recuperan su normalidad estructural y funcional. Sin embargo, en las motoneuronas del modelo murino de ELA SOD1-G93A, la acumulación perinuclear del RER parece producirse en la fase neuroprotectora que precede a la fase de neurodegeneración que conduce a la muerte neuronal.

Respecto a la organización estructural y espacial del “casquete basófilo perinuclear” en las motoneuronas de ELA, normalmente ocurre en un polo nuclear provisto de numerosos pliegues de la envoltura nuclear, donde la superficie nuclear aumentada posee una gran densidad de poros nucleares (Fig. 8). Esta organización espacial disminuye la distancia de difusión de los RNAs del núcleo a la maquinaria de síntesis de proteínas, facilitando la traducción perinuclear de los mRNAs. Sobre estas bases celulares, se ha considerado que la reorganización perinuclear de la maquinaria de síntesis de proteínas refleja una respuesta reactiva compensatoria a la cromatolisis, cuya

finalidad es preservar una actividad basal de síntesis de proteínas que permita alargar la supervivencia neuronal (Riancho et al., 2014).

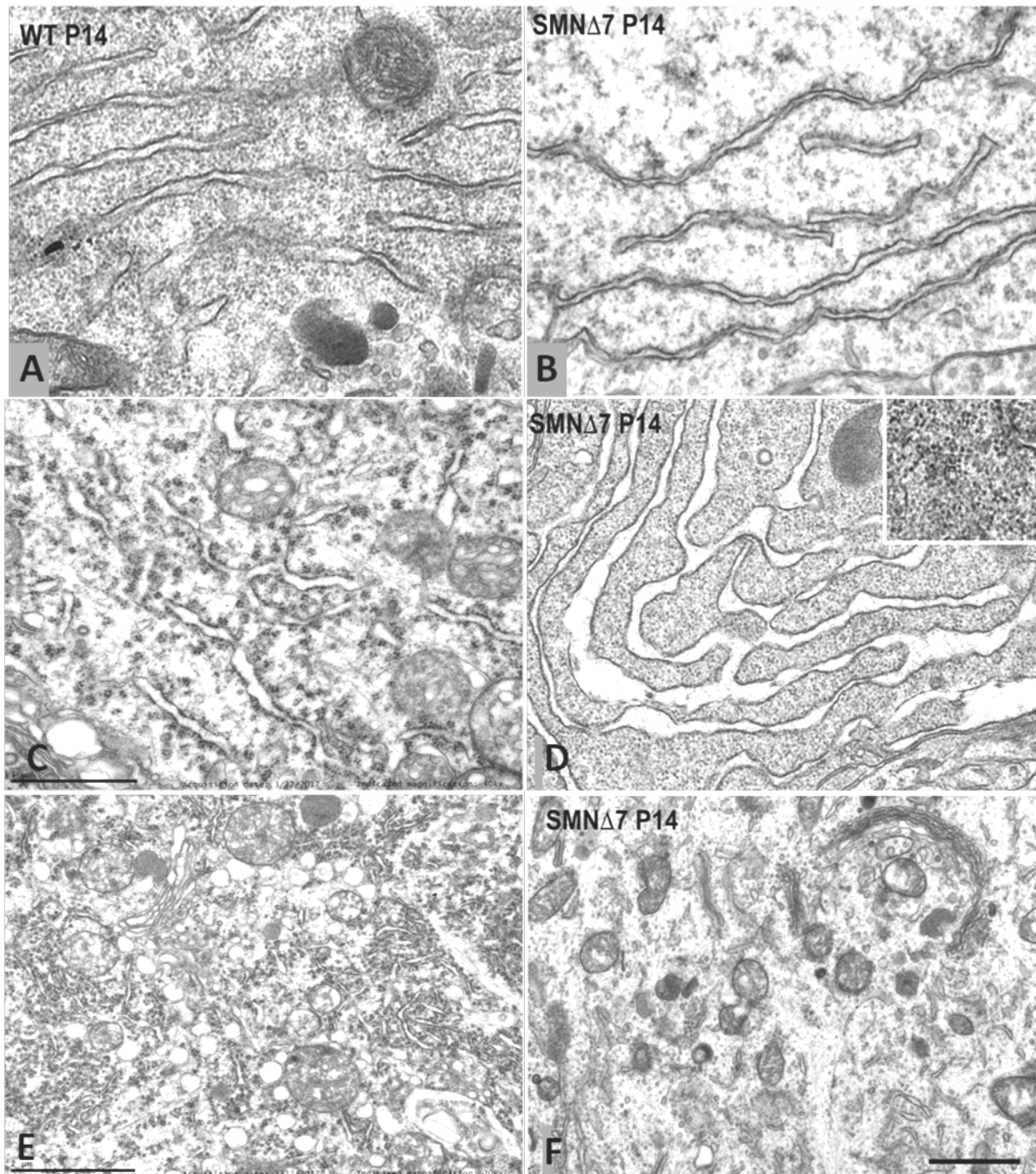
Es destacable el comportamiento de la cromatina y del nucleolo que preservan la organización de la eucromatina y la integridad estructural del nucleolo en las motoneuronas del modelo murino de ELA. Curiosamente, a pesar de las alteraciones en la expresión génica global que debe producirse en las motoneuronas de pacientes y del modelo murino de ELAE, resulta sorprendente la ausencia de signos de heterocromatinización, un marcador de represión transcripcional. Por el contrario, las motoneuronas conservan una configuración predominante de eucromatina permisible para la transcripción, hasta fases muy avanzadas de la neurodegeneración, cuando se dispara el mecanismo de apoptosis. Consistente con esta organización estructural, el ensayo de transcripción *in situ* basado en la incorporación de 5'-FU, un precursor para la síntesis de RNA en el RNA nascente, ha demostrado que la actividad transcripcional está, al menos parcialmente, preservada en las motoneuronas espinales. La alta resolución de la microscopía electrónica demuestra claramente que tanto la transcripción en la eucromatina, correspondiente a genes que codifican proteínas, como la transcripción de genes ribosomales en el nucleolo están preservadas hasta fases avanzadas de neurodegeneración. Pensamos que esta respuesta refleja un mecanismo de neuroprotección importante para activar la expresión de genes implicados en la respuesta de estrés neuronal y en la biogénesis de ribosomas, dos procesos esenciales para la supervivencia neuronal (Riancho et al., 2014).

### **La atrofia muscular espinal (AME)**

La AME es una patología neuromuscular devastadora causada por la delección o, menos frecuentemente, mutación del gen *SMN1* que codifica el factor de supervivencia de las neuronas motoras (SMN). En su forma más severa, AME tipo I, es la principal causa de mortalidad de base genética en la infancia, generalmente los pacientes no sobreviven más de dos años. La enfermedad se produce por deficiencia de la proteína SMN que provoca la degeneración y muerte de las motoneuronas espinales y, subsecuente, la atrofia y parálisis muscular progresiva. Aunque existe un segundo gen, el *SMN2*, que también codifica SMN, debido a la exclusión del exón 7 por splicing alternativo de la mayoría de sus transcritos primarios, sólo se produce una pequeña fracción de la proteína SMN completa, aproximadamente el 10%. En la AME, el número de copias del gen *SMN2* (de 1 a 8 en la especie humana) tiene una enorme importancia dado que es inversamente proporcional a la severidad de la enfermedad. A menor escala, una deficiente expresión de la proteína SMN se asocia con otras enfermedades de la motoneurona como la esclerosis lateral amiotrófica (Lefevbre et al., 1995; Burghes et al., 2009; Tisdale et al., 2015).

La clínica motora asociada con la degeneración y pérdida de motoneuronas y con la atrofia muscular es la principal característica de la AME. Las bases moleculares de la disfunción de las motoneuronas se han estudiado preferentemente en modelos murinos de AME. El ratón solo posee una copia del gen *Smn*, equivalente al *SMN1* humano. La pérdida de este gen es letal en el embrión. Entre los modelos murinos de la enfermedad humana AME Tipo I,

se han generado ratones transgénicos que tienen dos copias del gen humano *SMN2* y son knock-out del gen *Smn* del ratón. El modelo de AME, conocido como *SMN $\Delta$ 7*, es uno de los más utilizados para estudiar la fisiopatología molecular de la AME (Burghes et al., 2009). Los niveles muy reducidos de SMN en la AME producen tres tipos de alteraciones fundamentales en las motoneuronas espinales: i) patología del splicing de los mRNAs, ii) alteraciones de la traducción y iii) disfunción del transporte axonal. Recientemente también se ha demostrado alteraciones nucleolares.

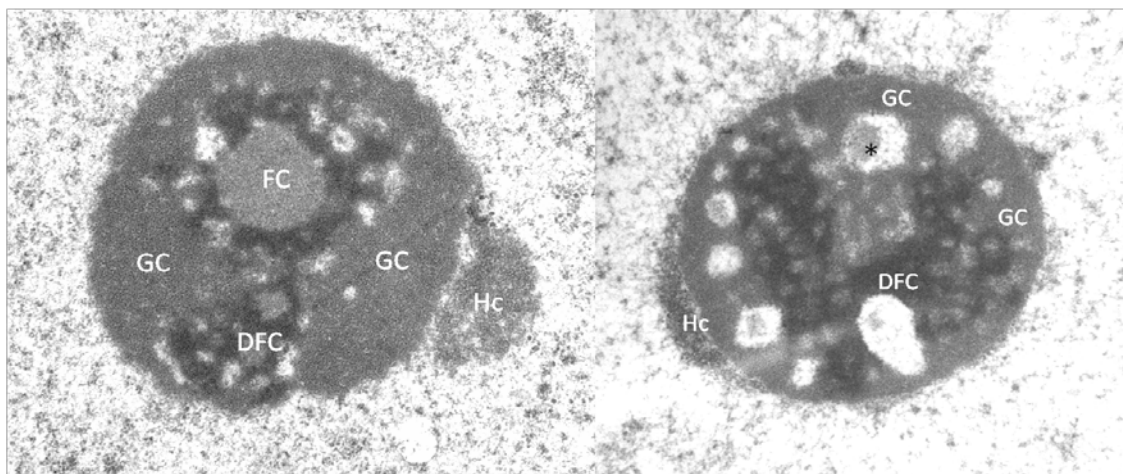


**Figura 12.** Tomado de Tapia et al., *Neurobiol Dis* (2017). Imágenes de ME que muestran las alteraciones del REG en motoneuronas espinales en el modelo murino *SMN $\Delta$ 7* de AME. A. Ordenación en paralelo de cisternas de REG con numerosos polirribosomas libres en los espacios intercisternales en una neurona control. B-F. Ejemplos representativos de alteraciones del REG que incluyen pérdida de polirribosomas (B), ramificaciones de las cisternas (C), dilatación de las cisternas y formación de monorribosomas (D), vesiculación del REG (E) y pérdida de cisternas de REG en un área de cromatolisis (F).



La progresión de la AME cursa con una severa disrupción de la maquinaria de síntesis de proteínas con disolución masiva de los polirribosomas (cromatolisis) en áreas extensas del citoplasma (Fig. 12). Como se ilustra en la Figura 12A, las motoneuronas del ratón silvestre muestran la típica organización de pilas de cisterna de REG entre las que se localizan numerosos polirribosomas libres. Las alteraciones estructurales más relevantes en las motoneuronas del modelo murino de AME incluyen la pérdida de polirribosomas, tanto libres como asociados a las cisternas del REG (Fig. 12B), la profusión de ramificaciones cisternales (Fig. 12C), la existencia de dilataciones de la luz del REG con procesos de gemación vesicular y la formación de monorribosomas residuales (Fig. 12D, E). Cabe destacar que la dilatación de la luz de las cisternas refleja una alteración en el balance iónico que regula la osmolaridad de los compartimentos citoplasmáticos, probablemente por disfunción de las bombas iónicas o por un déficit en la bioenergética celular (Shubin et al., 2016). Por su parte la formación de monorribosomas, que carecen del molde de mRNA, se produce por el desensamblaje de los polirribosomas y se asocia a fases avanzada de degeneración de motoneuronas. Un proceso similar se ha reportado en las células de Purkinje de un modelo murino de ataxia cerebelosa, el ratón *pcd* (“Purkinje Cell Degeneration”, Baltanás et al., 2010).

Sin embargo, a diferencia de las motoneuronas de la ELA murina en la que se preserva la integridad del nucleolo hasta fases muy avanzadas de la enfermedad, en la AME se produce estrés nucleolar con desorganización estructural y funcional del nucleolo (Fig. 13). Estas alteraciones incluyen: i) disminución del número de unidades de transcripción nucleolar (CF/CFD) con formación de CF gigantes aislados, ii) macrosegregación del CG del nucleolo, iii) formación de cuerpos intranucleolares que secuestran proteínas nucleares conjugadas con SUMO1 y iv) reducción de la transcripción nucleolar. En conjunto, estas alteraciones reflejan una severa perturbación de la actividad de la RNA pol I con déficit en la biogénesis de ribosomas. Como consecuencia se produce una severa inhibición de la síntesis de proteínas con cromatolisis masiva que, finalmente, conduce a la muerte de las motoneuronas (Tapia et al., 2012, 2017).



**Figura 11.** Tomado de Tapia et al., *Neurobiology of Disease*, 2017. Microscopía electrónica de las alteraciones nucleolares en motoneuronas del modelo murino SMN  $\Delta$ 7 de AME en el día postnatal 14. A. Nucleolo con un CF gigante y pérdida de CF pequeños. El CG aparece segregado en grandes masas periféricas mientras que el CFD se localiza en la porción ecuatorial del nucleolo asociado a los CF. B. Segregación de los componentes CG y CFD del nucleolo y formación de cuerpos intranucleolares (asterisco), dos manifestaciones características de una severa disfunción nucleolar. GC, componente granular; DFC, componente fibrilar denso; FC, centro fibrilar; Hc, heterocromatina.

En conclusión, la enorme sensibilidad del nucleolo y de la maquinaria de síntesis de proteínas a los agentes patogénicos que inciden en los diferentes cuadros de la neuropatología humana claramente refleja la importancia de estas estructuras para la homeostasis celular y como sensores de la disfunción neuronal. La respuesta neuronal puede incluir una fase neuroprotectora, que intenta mantener la supervivencia neuronal frente al estrés celular producido por los agentes patogénicos, y una fase de neurodegeneración en la que progresan las alteraciones estructurales y funcionales del nucleolo y de la maquinaria de síntesis de proteínas que, finalmente, conducen a la muerte neuronal. Finalmente, consideramos que la modulación de la actividad nucleolar puede ser una aproximación terapéutica válida en procesos neurodegenerativos, como ya se hace en la actualidad en el tratamiento del cáncer con las nuevas generaciones de fármacos.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J, Hunt T. Molecular biology of the cell. 6ª Ed. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015

Baltanás FC, Casafont I, Weruaga E, Alonso JR, Berciano MT, Lafarga M. Nucleolar disruption and Cajal Body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in Purkinje Cells. *Brain Pathol.* 2010;21(4):374-388.

Bear MF, Connors BW, and Paradiso MA. Neurociencia: explorando el cerebro. Barcelona: MASSON-Williams & Wilkins España, 1998.

Bernstein BW. and Bamburg JR. Actin-ATP hydrolysis is a major energy drain for neurons. *J. Neurosci.* 2003;23(1):1-6.

Boisvert F-M, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8(7):574-585.

Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert F-M, Lamond AI. The Nucleolus under Stress. *Mol. Cell.* 2010;40(2):216-227.

Burghes AHM and Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.* 2009;10: 597–609.

Cioce M and Lamond A I. Cajal bodies: A Long History of Discovery. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005;21(1):105-131.

Garcia-Esparcia P, Hernández-Ortega K, Koneti A, Gil L, Delgado-Morales R, Castaño E et al. Altered machinery of protein synthesis is region- and stage-dependent and is associated with  $\alpha$ -synuclein oligomers in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2015;3(1).

Haines DE. Principios de neurociencia. 2ª Ed. Madrid: Elsevier Science, 2002.

Hernández-Ortega K, Garcia-Esparcia P, Gil L, Lucas JJ, Ferrer I. Altered machinery of protein synthesis in Alzheimer's: from the nucleolus to the ribosome. *Brain Pathol.* 2016; 26 (5): 593-605.

Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DLJ. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2010;1(3):415-431.

Hetman M and Pietrzak M. Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends Neurosci.* 2012;35(5):305-314.

Kalita K, Makonchuk D, Gomes C, Zheng J-J, Hetman M. Inhibition of nucleolar transcription as a trigger for neuronal apoptosis. *J Neurochem.* 2008;105(6):2286-2299.

Lafarga M, Casafont I, Bengoechea R, Tapia O, Berciano MT. Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus. *Chromosoma*. 2009;118(4):437-443.

Lam YW and Trinkle-Mulcahy L. New insights into nucleolar structure and function. *F1000Prime Rep*. 2015;7.

Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P and Zeviani M. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80, 155–65.

Mekhail K, Moazed D. The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 8: 692-702.

Murayama A, Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T et al. Epigenetic Control of rDNA Loci in Response to Intracellular Energy Status. *Cell*. 2008;133(4):627-639.

Palanca A, Casafont I, Berciano MT, Lafarga M. Reactive nucleolar and Cajal body responses to proteasome inhibition in sensory ganglion neurons. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1842(6):848-859.

Parlato R and Kreiner G. Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle?. *J Mol Med*. 2012;91(5):541-547.

Parlato R and Liss B. How Parkinson's disease meets nucleolar stress. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1842(6):791-797.

Peters A, Palay Sanford L, Webster H DEF. The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and their Supporting Cells. 3<sup>a</sup> Ed. New York: Oxford University Press; 1991.

Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J, Johnson GT. Cell biology. 3<sup>a</sup> Ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017

Riancho J, Ruiz-Soto M, Villagr a NT, Berciano J, Berciano MT, Lafarga M. Compensatory motor neuron response to chromatolysis in the murine hSOD1<sup>G93A</sup> model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci*. 2014;8(346).

Sala A, Bott L, Morimoto R. Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. *The Journal of Cell Biology*. 2017;216(5):1231-1241.

Shubin AV, Demidyul IV, Komissarov AA, Rafieva LM and Kostrov SV. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*. 2016; 7:55863-55889.

Sia PI, Wood J, Chidlow G, Sharma S, Craig J, Casson R. Role of the nucleolus in neurodegenerative diseases with particular reference to the retina: a review. *Clin. Experiment. Ophthalmol*. 2016;44(3):188-195.

Slomnicki L, Pietrzak M, Vashishta A, Jones J, Lynch N, Elliot S et al. Requirement of neuronal ribosome synthesis for growth and maintenance of the dendritic tree. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(11): 5721-5739.

Tapia O, Bengoechea R, Palanca A, Arteaga R, Val-Bernal JF, Tizzano EF, Berciano MT and Lafarga M. Reorganization of Cajal bodies and nucleolar targeting of coilin in motor neurons of type I spinal muscular atrophy. *Histochem. Cell Biol.* 2012;137, 657–67.

Tapia O, Narcís O, Riancho J, Tarabal O, Pedrafita L, Calderó J, Berciano MT and Lafarga M. Cellular bases of RNA metabolism dysfunction in motor neurons of a murine model of spinal muscular atrophy: role of Cajal bodies and the nucleolus. *Neurobiol Dis.* 2017.

Tisdale S. and Pellizzoni L. Disease Mechanisms and Therapeutic Approaches in Spinal Muscular Atrophy. *J. Neurosci.* 2015; 35, 8691–8700



