



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**DISFUNCION NUCLEOLAR EN EL CANCER:
PAPEL FUNDAMENTAL DE LA BIOGENESIS
DE RIBOSOMAS EN LA REGULACION DE LA
PROLIFERACION DE LAS CELULAS
TUMORALES**

NUCLEOLAR DYSFUNCTION IN CANCER:
RIBOSOME BIOGENESIS AS A CONTROL
MECHANISM OF TUMOR CELL PROLIFERATION

Autora: Iris Paz Alonso González

Director: Miguel Lafarga Coscojuela

Codirectora: Teresa Berciano Blanco

Santander, Junio 2017

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a mi director de TFG, Miguel Lafarga, y a Maite Berciano por toda la ayuda y tiempo que me han ofrecido, así como por su labor docente y humana a lo largo de todos estos años en la facultad.

Quiero dar las gracias a mis amigas y amigos por aparecer en mi vida, por seguir a mi lado y por apoyarme incondicionalmente.

Y gracias a mis padres, Blanca y Gerardo, por estar siempre a mi lado, por creer en mi y por enseñarme a ser una persona mejor y a no rendirme jamás.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 5 |
| RESUMEN | 6 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 7 |
| 2. METODOLOGÍA | 7 |
| 3. ORGANIZACIÓN DEL NÚCLEO CELULAR: COMPARTIMENTOS NUCLEARES | 7 |
| 3.1. Territorios cromosómicos | 8 |
| 3.2. Cuerpo nuclear de Cajal | 10 |
| 3.3. Áreas de Factores de Splicing (“Nuclear Speckles”) | 11 |
| 3.4. Envoltura nuclear | 13 |
| 4. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL NUCLEOLO | 14 |
| 5. LAS REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO (NOR’s) | 17 |
| 6. REPROGRAMACIÓN O DESDIFERENCIACIÓN EN LAS CELULAS TUMORALES | 19 |
| 7. NUCLEOLO Y CÁNCER | 32 |
| 8. EL NUCLEOLO COMO DIANA EN LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER | 40 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 44 |

ABREVIATURAS

AgNORs: NORs marcados selectivamente con plata

CBs: cuerpos nucleares de Cajal

CF: centros fibrilares

CFD: componente fibrilar denso

CG: componente granular

EGF: factor de crecimiento epidérmico

ERK: “extracelular regulated kinase”

GTP: guanosina trifosfato

HATs: histona acetiltransferasas

hTERT: transcriptasa inversa de la telomerasa humana

IGCs: agregados de granulaciones intercromatínicas

NADs: dominios asociados al nucléolo

NCL: nucleolina

NCP: complejo del poro nuclear

NORs: regiones organizadoras del nucleolo

NPM o B23: nucleofosmina

NSL: secuencia de localización nuclear

pb: pares de bases

Pol I / II / III: RNA polimerasa I / II / III

RNPs: ribonucleoproteínas

rP: proteínas ribosomales

RPL: subunidad grande del ribosoma

RPS: subunidad pequeña del ribosoma

SAGE: Serial Analysis of Gene Expression

SMN: factor de supervivencia de las motoneuronas

snoRNPs: ribonucleoproteínas nucleolares de pequeño tamaño

snRNPs: ribonucleoproteínas nucleares de pequeño tamaño

TOP: terminal oligopyrimidine

UBF: “upstream binding factor”

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

RESUMEN

Durante el pasado siglo, el aumento del tamaño y número de nucléolos (AgNORs) en las células tumorales ha sido utilizado como marcador celular en el diagnóstico del cáncer. El nucleolo es la factoría para la biogénesis de ribosomas, donde se produce la síntesis de los rRNAs y el ensamblaje de las partículas pre-ribosomales. Esta función es dependiente de la RNA polimerasa I (pol I) y está estrictamente regulada para mantener una proliferación y crecimiento celular coordinados. Los genes supresores de tumores que codifican p53 y pRb ejercen una regulación negativa sobre la transcripción de la pol I, por lo que sus mutaciones o inactivación epigenética generalmente producen hiperactivación (“up-regulation”) de esta polimerasa con aumento de la síntesis de rRNAs. Los genes *MYC* y *PTEN*, reguladores clave de la biogénesis de ribosomas, aparecen frecuentemente sobreexpresados en células tumorales. Su expresión alterada incrementa la biogénesis de ribosomas y promueve el crecimiento y proliferación de las células tumorales. Los componentes del complejo de la pol I se están utilizando como dianas terapéuticas en el cáncer. Existe una nueva generación de fármacos, como CX-3543 y CX-5461, aún en fase de ensayo clínico, que inhiben la actividad de la pol I a distintos niveles.

Palabras clave: nucléolo, cáncer, biogénesis de ribosomas, RNA polimerasa I, p53.

SUMMARY

During the last century, the increase of size and number of nucleolus (AgNORs) has been used as a cellular marker in some cancer diagnosis. The nucleolus is the factory of ribosomes biogenesis, where the synthesis of rRNAs and the assembly of pre-ribosomal particles take place. This function is dependent on the activity of the RNA polymerase I (pol I), and is tightly regulated to assure a coordinated cellular growing and proliferation. The tumor suppressor genes that encode p53 and pRb are negative regulators of pol I transcription. Therefore, mutations or epigenetic inactivation of these genes commonly increase the activity (“up-regulation”) of the pol I and, consequently, the synthesis of rRNAs. This may result in an increase in number and size of nucleoli. In the same way, *MYC* and *PTEN* genes, driver regulators of ribosomes biogenesis, are also frequently overexpressed in tumor cells. Their overexpression is a direct, reliable indicator of altered ribosomal biogenesis activation, by increasing the rRNAs and ribosomal proteins in tumor cells. Components of the pol I complex are used as targets in cancer chemotherapy. A new generation of pol I molecular-targeted drugs have been designed for cancer treatment. They include CX-3546 and CX-5461 currently used in clinical trials.

Key words: nucleolus, cancer, ribosomal biogenesis, RNA polymerase I, p53.

1. INTRODUCCIÓN

Este trabajo revisa la complejidad de los mecanismos que conectan la biogénesis de los ribosomas en el nucléolo con el cáncer. La primera descripción de la relación entre nucléolo y cáncer se remonta a 1896 cuando el histólogo italiano Pianese demuestra que la hipertrofia nucleolar y las irregularidades en la morfología del nucléolo son signos de malignidad celular. En la actualidad sabemos que los cambios morfológicos y funcionales del nucléolo en las células tumorales son la consecuencia de una mayor demanda de biogénesis de ribosomas, para sostener el crecimiento y la proliferación celular, y de alteraciones en los mecanismos que regulan el ciclo celular. De hecho, la inactivación por mutaciones o silenciamiento epigenético de dos supresores de tumores, p53 y pRB, ambos reguladores negativos de la transcripción de los genes ribosomales, estimula la biogénesis de ribosomas y promueve el crecimiento tumoral (Weinberg, 2007). Por tanto, la evaluación del tamaño del nucléolo, de su morfología y de la tasa de síntesis de rRNAs proporciona una información importante sobre el comportamiento de una población tumoral y puede tener relevancia para el pronóstico clínico (Derenzini y cols., 2017). Finalmente, recientes estudios están abriendo un nuevo horizonte en el tratamiento del cáncer mediante la utilización de drogas, como el CX-5461, que utilizando como diana el nucléolo impiden la formación del complejo de iniciación de transcripción de la RNA polimerasa I y regulan a la baja la biogénesis de ribosomas (Hein y cols., 2013)

2. METODOLOGÍA

El presente TFG se plantea como una revisión bibliográfica, fundamentalmente de artículos indexados en PubMed. Particularmente, se ha revisado bibliografía sobre la i) la estructura y función del nucléolo, ii) las bases celulares de la carcinogénesis, especialmente las relacionadas con el crecimiento y la proliferación celular, iii) el papel de supresores de tumores (p53 y pRb) y oncogenes (*cMYC*) en la regulación de la función nucleolar, iv) las características del nucléolo en las células tumorales y v) el nucléolo como diana terapéutica en el cáncer. La revisión bibliográfica se ha complementado con el análisis con microscopía óptica y electrónica de muestras experimentales de células tumorales. Algunas de las imágenes obtenidas han servido para ilustrar este trabajo.

3. ORGANIZACIÓN DEL NÚCLEO CELULAR: COMPARTIMENTOS NUCLEARES

El núcleo es una estructura característica de las células eucariotas. Constituye el almacén genético celular, ejerciendo un importante papel regulador de las funciones celulares y, muy especialmente, del control de la expresión de los genes. En su interior se llevan a cabo procesos tan importantes como la replicación y transcripción del DNA, así como el procesamiento de varias categorías de RNAs, incluyendo pre-mRNAs, pre-rRNAs, snRNAs y tRNAs. Su

tamaño, por tanto, depende de la cantidad de copias génicas que alberga, la ploidia, determinado por el número de juegos de cromosomas, así como por la actividad transcriptional global que regula la cantidad de moléculas de RNA y proteínas que se acumulan en el núcleo (Misteli y Spector, 2011).

El núcleo está compartimentalizado en un dominio cromosómico, en el que cada uno de los cromosomas interfásicos ocupa un espacio determinado, y el dominio intercromosómico, un espacio dispuesto entre los territorios cromosómicos donde se organizan varios compartimentos de naturaleza proteica o ribonucleoprotéica (Cremer y Cremer, 2006, Misteli y Spector, 2011). Tales compartimentos poseen una estructura, organización molecular y función bien definidas. Las más relevantes son el nucléolo, los cuerpos nucleares de Cajal ("Cajal bodies", CBs) y las áreas de factores de "splicing" ("nuclear speckles") o agregados de granulaciones intercromatínicas a nivel ultraestructural (Fig.1)

Para preservar el microambiente nuclear y el genoma, el núcleo está delimitado por una envoltura nuclear. Curiosamente, corresponde a Cajal (1910) la primera descripción de la envoltura nuclear compuesta por una doble membrana, como queda reflejado en todos sus dibujos del núcleo celular en diferentes tipos celulares. Aunque la visualización de la doble membrana no es posible con el poder de resolución de la microscopía óptica, probablemente Cajal pudo descubrirla por la dilatación del espacio perinuclear (entre las dos membranas) que producen algunas técnicas de fijación. La envoltura nuclear presenta en toda su superficie múltiples complejos de poro nuclear, a través de los cuales se produce un flujo selectivo de moléculas entre el núcleo y el citoplasma, ejerciendo así un importante papel regulador a nivel de la expresión génica (Misteli y Spector, 2011).

3.1. Territorios cromosómicos

El material genético nuclear aparece en forma de cromatina, pero cada cromosoma de la interfase ocupa un subvolumen nuclear denominado territorio cromosómico. La distribución espacial de los territorios cromosómicos no se produce al azar, sino que tiende a establecer una topología nuclear característica en cada tipo celular. Esto determina la existencia de relaciones o asociaciones específicas entre cromosomas, la comunicación intercromosomal, que juega un papel importante tanto en la biología normal, particularmente en la regulación de la expresión génica, como en las translocaciones cromosómicas entre territorios cromosómicos adyacente que se produce en el cáncer (Misteli y Spector, 2011).

Los territorios cromosómicos sólo pueden visualizarse con técnicas de hibridación *in situ* utilizando sondas específicas para cada cromosoma. Por ello, con las técnicas convencionales de microscopía óptica y electrónica, los territorios cromosómicos no individualizados configuran la cromatina. Está compuesta por el DNA de los cromosomas, histonas y otras múltiples proteínas no histonas que se asocian al DNA. La cromatina puede ser de dos tipos: heterocromatina, altamente condensada, transcripcionalmente inactiva y localizada preferentemente en la periferia nuclear, y la eucromatina, con un patrón elemental de condensación del DNA. Estos dos tipos de cromatina

reflejan distintos niveles de plegamiento del DNA. El nivel más elemental son las cadenas polinucleosomales formadas por la doble hélice de DNA enrollada alrededor de un octamero de histonas (en cada octamero se integran dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4), formando el nucleosoma, o unidad fundamental de la cromatina, que incluye 146 pb de DNA enrollado 1.7 veces alrededor de las 8 histonas. Las histonas son proteínas globulares con gran afinidad para interactuar intranucleosomalmente entre si y con el ADN que las envuelve. A su vez, los nucleosomas están separados por un ADN espaciador de 10-16 pb (Alberts y cols., 2015).

Esta cadena polinucleosomal constituye el máximo grado de descondensación o relajación de la cromatina donde puede producirse la transcripción activa. En el siguiente grado de condensación, estas cadenas polinucleosomales se asocian a la histona H1, formando fibras cromatínicas, de aproximadamente 30 nm de diámetro, que son transcripcionalmente silentes. A su vez, el plegamiento de las fibras cromatínicas inducido por la histona H1 y por otras proteínas, como las proteínas de la heterocromatina (HP1), forma dominios de cromatina muy condensada que conocemos como heterocromatina (Alberts y cols., 2015; Misteli y Spector, 2011).

Desde el punto de vista funcional y de las secuencias génicas que posee, la heterocromatina se organiza en heterocromatina constitutiva, formada por secuencias repetidas no codificantes de DNA, conocidas como DNA satélite, que corresponden a las regiones centroméricas y teloméricas. Una segunda configuración, denominada heterocromatina facultativa corresponde a genes silentes, reprimidos, que codifican proteínas. El patrón de heterocromatina facultativa se establece durante la diferenciación celular y es característico de cada tipo celular.

Un aspecto esencial de la cromatina es la regulación epigenética de la expresión génica mediada por modificaciones pos-traduccionales de las histonas nucleosomales. Estas modificaciones en determinadas regiones génicas son imprescindibles para la regulación de la transcripción, el silenciamiento génico, la heterocromatinización o la reparación del ADN (Munshi y cols, 2009). De este modo, las histonas sufrirán procesos de acetilación, metilación o ubiquitinación, modificando su afinidad por el DNA (Peterson y Lanie, 2004; Ma y cols., 2011; Batta y cols., 2011). Con carácter general, la acetilación de las colas de lisinas en las histonas nucleosomales H3 y H4 relaja la interacción de los nucleosomas con el DNA generando una configuración abierta de la cromatina que favorece al acceso de los factores de transcripción y la expresión de los genes. Por el contrario, la trimetilación de determinadas lisinas de las histonas H3 y H4, tales como H3K9me3, H3K27me3 y H4K20me3, induce la condensación de la cromatina y se asocia a represión transcripcional.

La localización espacial de los cromosomas y la formación de bucles o lazos de fibras cromatínicas o cadenas polinucleosomales, tienen una importante relación con la regulación génica. Los bucles de DNA activados transcripcionalmente aparecen asociados a los complejos del poro nuclear, generando dominios rápidos de ensamblaje de la maquinaria de transcripción necesaria para la síntesis y procesamiento ulterior de RNAs, y su posterior exportación al citoplasma. En este contexto, se ha descrito la presencia de factorías de

transcripción, donde varios bucles de fibras cromatínicas, conteniendo genes activos, convergen en el espacio en microdominios donde se concentra la maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa II para ser transcritos de manera coordinada. También es importante señalar que se ha sugerido que estos bucles tienen “memoria” transcripcional para una rápida y eficiente activación de sus genes en respuesta a sucesivas señales activadoras de la expresión génica (Misteli, 2007; Schneider y Grosschedl, 2007; Moore y Proudfoot, 2009; Meldi y Brickner, 2011). Esta característica es de vital importancia en células con una alta tasa de actividad transcripcional y que presentan un patrón de transcripción acoplado al complejo del poro nuclear.

3.2. El cuerpo nuclear de Cajal (“Cajal body”, CB)

Es una organela esférica nuclear del dominio intercromosómico descubierta por Santiago Ramón y Cajal en 1903 en varios tipos neuronales de diferentes especies de mamíferos. Inicialmente, Cajal la describe como una estructura argilofila de forma esférica y textura homogénea, de aproximadamente 0.5-1 μm de diámetro localizada libremente en el nucleoplasma o asociado al nucléolo. Cajal considero que estaba relacionada con el nucléolo, por lo que la denominó “cuerpo accesorio” del nucléolo (Cajal, 1910; Lafarga y cols., 2009). En estudios posteriores, demostró que es una estructura constante en la mayoría de tipos neuronales y que presenta variaciones tanto en el número como en el tamaño, dependiendo de la población neuronal (Cajal, 1910). En la década de los 50, el equipo de Barr realizó varios estudios, donde se confirmaban las observaciones de Cajal, y se demostraba la ausencia de DNA en el cuerpo accesorio, aportando las primeras evidencias de su comportamiento dinámico en respuesta a los cambios de la expresión génica asociados con la axotomía (Lafarga y cols., 2009; 2016).

Posteriormente, en 1969, con la incorporación de las técnicas de microscopía electrónica al estudio del núcleo celular, Monneron y Bernhard describen un cuerpo nuclear formado por hebras densas arrolladas de material fibrilar denso, que denominaron “coiled body”. Estos investigadores desconocían los artículos de Cajal, y presentaron el “coiled body” como una estructura nuclear novedosa. En 1983, Lafarga y sus colaboradores adaptaron el método de nitrato de plata reducido para su aplicación en la microscopía electrónica, demostrando que el cuerpo accesorio de Cajal y el “coiled body” de Monneron y Bernhard eran la misma estructura (Lafarga y cols., 2009). Sería en 1999 cuando la comunidad científica internacional reconociese el descubrimiento de Cajal, por lo que el cuerpo accesorio paso a denominarse “Cajal body” (CB).

Un avance fundamental para conocer la importancia funcional de esta organela ha sido su estructura molecular. En la década de los 90 hubo un gran progreso en el conocimiento de la composición molecular de CB que dio importantes pistas acerca de la funcionalidad de esta organela. La identificación de un marcador específico para el cuerpo nuclear de Cajal, la coilina (Machyna y cols., 2013), y el desarrollo de nuevas sondas de hibridación, permitieron localizar en el CB factores implicados en el “splicing” de los pre-mRNAs incluyendo los U snRNAs espicosomales, proteínas del “splicing” (complejo Sm) y las propias

ribonucleoproteínas espliceosomales (snRNPs). Posteriormente, se demostró que el CB presenta el factor de supervivencia de las motoneuronas (SMN), íntimamente relacionado con la biogénesis de los snRNPs en el citoplasma y con su destino nuclear al CB. Tras múltiples estudios en diferentes líneas celulares y animales, se ha revelado que el factor SMN y sus proteínas asociadas, normalmente colocalizan con la coilina y snRNPs en el CB (Lafarga y cols., 2009; 2016). También son diana del CB una gran familia de ribonucleoproteínas nucleolares de pequeño tamaño (snoRNPs) y de RNAs pequeños asociados al CB (scaRNAs) (Machyna y cols., 2013). Además, las nuevas moléculas identificadas en el CB abren una nueva puerta a las expectativas funcionales para esta organela. Por ejemplo, la presencia del RNA de la telomerasa, de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) y de las subunidades catalíticas de la telomerasa (TERC, diskarina y TCAB1) (Cioce y Lamond, 2005). El CB también asocia determinados loci génicos, particularmente de las histonas, y concentra moléculas requeridas para el procesamiento de los pre-mensajeros de las histonas (Machyna y cols., 2013). Posteriormente se ha demostrado que algunos CBs contienen SUMO1, un modificador pos-traducciona, además de que la sumoilación de las proteínas SMN es crucial para la organización del CB (Tapia y cols., 2014). La función mejor conocida del CB es el ensamblaje y maduración de snRNPs y snoRNPs requeridas para el splicing de los pre-mRNAs y el procesamiento de los pre-rRNA, respectivamente (Machyna y cols., 2013; Lafarga y cols., 2016).

A pesar de ser un dominio que concentra múltiples componentes para la biogénesis de mRNAs y rRNAs no es un sitio de transcripción ni de “splicing”, como demuestra la ausencia de hnRNPs o poli (A) RNAs (Cioce y Lamond, 2005). El estudio en células vivas de proteínas del CB unidas a proteínas fluorescentes ha permitido conocer que esta organela tiene un importante dinamismo molecular y sus componentes moleculares están en flujo constante con el nucleoplasma. La relación espacial y física de los CBs con otros cuerpos nucleares como los “speckles” nucleares, el nucléolo, los telómeros y los cuerpos nucleares PMLs ha permitido proponer la existencia de un tráfico molecular activo entre el CB y dichos dominios nucleares (Cioce y Lamond, 2005). En la actualidad, las funciones mejor conocidas del CB son la biogénesis de snRNP espliceosomales, snoRNPs nucleolares y U7 snRNPs, estas últimas requeridas para el procesamiento de los mRNAs de las histonas. Además, en las células troncales con actividad telomerasa el CB está implicado en el ensamblaje del complejo de la telomerasa (machyna y cols., 2013; Lafarga y cols., 2016).

3.3. Áreas de Factores de Splicing

Los agregados de granulaciones intercromatínicas o “nuclear speckles” fueron descritas por Swift en 1962. Se denominaron de este modo ya que a nivel ultraestructural aparecen constituidas por gránulos muy electrodensos. Su organización espacial es difusa en todo el nucleoplasma, excluyendo el nucléolo, o puede aparecer formando agregados de granulaciones intercromatínicas (IGCs). Estas IGCs están constituidas por factores de “splicing” y mRNAs poliadenilados, por lo que en la actualidad las áreas IGCs se denominan áreas de factores de “splicing” o “nuclear speckles”. Estos dominios no incorporan

uridina triatida y carecen de DNA, o que indica que claramente no son sitios de transcripción activa (Lamond y Spector, 2003). Sin embargo, la localización en la periferia de los speckles de múltiples genes activos en transcripción, ha servido para proponerlos como depósitos moleculares dinámicos que suministran factores de “splicing” a los genes activos a los que se asocian (Lamond y Spector, 2003).

El estudio de incorporación de 5'-fluorouridina ha revelado que el proceso de transcripción nuclear ocurre en sitios concretos del espacio nuclear. Estos sitios concentran complejos de la RNA polimerasa II y factores de transcripción que llevan a cabo la transcripción de varios genes que convergen en estas denominadas factorías de transcripción (Iborra y cols., 1996; Lafarga y cols., 2016). En este contexto, la dinámica del splicing de los pre-mRNAs incluye tres etapas esenciales que requieren de la participación de los CB, speckles nucleares y factorías de transcripción. A saber, el ensamblaje y maduración de las snRNPs espliceosomales en los CBs, su transferencia a los nuclear speckles, donde se asocian con proteínas SR (ricas en serina y arginina), que son también factores de splicing, y se pre-ensambla el espliceosoma. Finalmente, los factores de splicing se transfieren desde los speckles nucleares a los sitios de transcripción, especialmente a la factorías de transcripción, donde se ensamblan en el espliceosoma que dirige el splicing co-transcripcional de los pre-mRNAs.

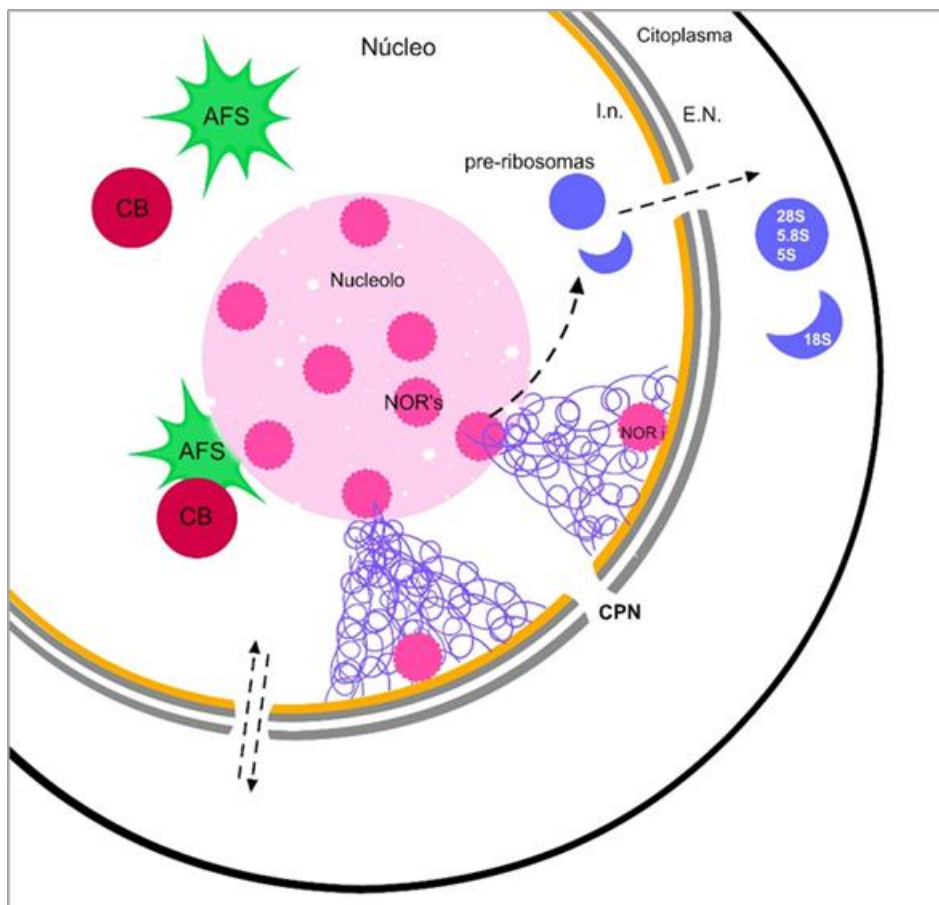


Figura 1. Compartimentos del núcleo celular. Se identifican el nucléolo, que comprende los NOR's, así como los cuerpos nucleares de Cajal (CB) y las áreas de factores de “splicing” (AFS) asociados. Aparece representada la formación y exportación de las subunidades de los ribosomas.

3.4. Envoltura nuclear

La envoltura nuclear es una estructura compleja altamente organizada, cuya función principal es asegurar la estabilidad genómica, la replicación del ADN y la expresión génica. La microscopía electrónica revela que está formada por dos membranas entre las que se delimita el espacio intermembranoso o perinuclear. La membrana externa, que se continua con las cisternas del retículo endoplasmico rugoso o granular, al que se asocia funcionalmente, y la membrana interna, asociada a la lámina nuclea, constituida por una red de filamentos intermedios, la lamina densa nuclear, que se organiza en una densa red que proporciona soporte estructural e interacciona molecularmente con los dominios nucleoplasmáticos de determinadas proteínas que sirven de anclaje directo e indirecto de la cromatina periférica (Alberts y cols., 2015).

Funcionalmente, se ha demostrado que determinadas mutaciones en alguno de los componentes de la lámina nuclear conllevan la aparición de graves enfermedades clínicas como cardiomiopatías, lipodistrofias o progeria. De este modo, la organización laminar juega un importante papel en la regulación de la actividad transcripcional del DNA (Misteli y Spector, 2011).

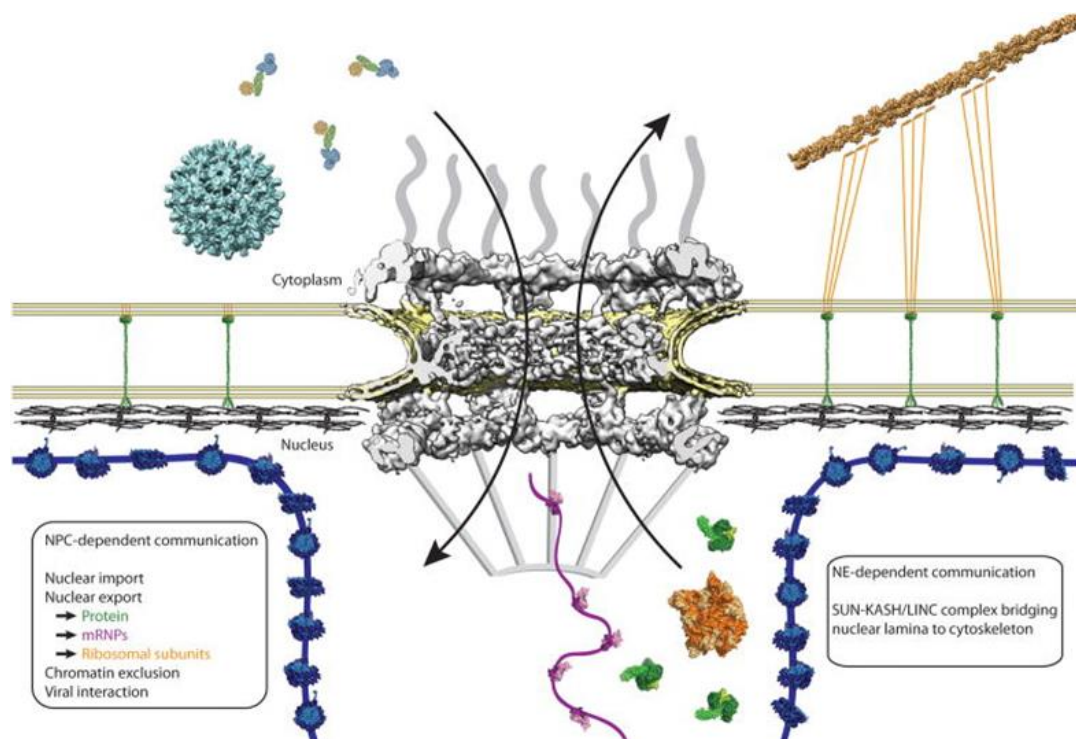


Figura 2. Función del complejo del poro nuclear (NCP) en el transporte núcleo-citoplasma. El NCP coordina los procesos de importación y exportación nuclear de diversas proteínas, RNPs y las subunidades de los ribosomas. También está involucrado en los fenómenos de exclusión de la cromatina y media en determinadas interacciones virales. Tomado de K. E. Knockenhauer y T. U. Schwartz, Cell, 2016.

En toda su extensión, la envoltura nuclear presenta unos complejos macromoleculares que la atraviesa, denominados poros nucleares. Son estructuras cilíndricas huecas de simetría octagonal en la que se diferencia un anillo central flanqueado por ocho filamentos polarizados hacia el citoplasma y el nucleoplasma. El número de poros nucleares varía dependiendo de la célula,

así como de su actividad transcripcional. Se ha visto que las células de mamíferos con una alta actividad transcripcional, como las neuronas de Purkinje, llegan a tener hasta 22 poros/ μm^2 (Fig.2)

El complejo del poro nuclear está constituido por al menos 30 tipos diferentes de nucleoporinas. Todas ellas tienen múltiples sitios de interacción molecular destinados a favorecer la propia organización estructural y a generar un tráfico bidireccional altamente selectivo para el paso de macrocomplejos entre el núcleo y el citoplasma, pero a su vez, favorece el paso de pequeñas moléculas y péptidos hidrofóbicos (Misteli y Spector, 2011).

A los complejos de nucleoporinas se asocian proteínas de interacción que contribuyen a seleccionar el tráfico de determinadas moléculas que precisarán, independientemente de su tamaño, una secuencia de localización nuclear (NSL). Las proteínas etiquetadas por las señales de localización nuclear pueden ser transportadas a través de los complejos del poro nuclear. El tráfico está regulado por importinas y exportinas y la proteína Ran de unión a GTP. Durante la importación de proteínas, la importina específica reconoce la secuencia de localización nuclear a través de la interacción con Ran. Dicha interacción está regulada por la hidrólisis de GTP, mediada por enzimas de la propia envoltura nuclear, que inducen un cambio de conformación en el propio complejo de poro nuclear, facilitando el paso de la proteína al interior del núcleo. Además, recientemente se ha demostrado que determinados genes silentes que han sido expresados recientemente, aparecen asociados a nucleoporinas, “preparados” para su rápida reactivación en el momento que interactúan con el complejo del poro nuclear. Además, estos genes permanecen asociados a factores implicados en la transcripción y procesamiento cotranscripcional de los mRNAs (Misteli y Spector, 2011; Alberts y cols., 2015)

En resumen, se ha demostrado que la envoltura nuclear y sus componentes intervienen activamente en la correcta integración de las funciones celulares con su entorno, regulando la expresión génica que garantiza una determinada expresión fenotípica celular.

4. ESTRUCTURA Y FUNCION DEL NUCLEOLO

El nucléolo es la mayor organela nuclear donde se produce la biogénesis de ribosomas a partir del rADN nucleolar. Este proceso implica la síntesis y procesamiento de los pre-rRNAs, así como el ensamblaje final de los pre-ribosomas.

El rDNA está representado por genes ribosomales repetidos en tándem y separados por secuencias de espacios intergénicos (IGS). Varias de estas repeticiones forman las regiones organizadoras del nucléolo (NOR's), que, en la especie humana, se localizan en los brazos cortos de los cinco cromosomas acrocentricos: 13, 14, 15, 21 y 22 (varía según las especies animales). Sólo los genes activos de varios NORs convergen a nivel del nucléolo, mientras que los genes inactivos quedan “atrapados” en la heterocromatina. Se estima que hay aproximadamente 400 genes ribosomales en el genoma diploide humano, pero

este número varía entre individuos, ya que no todos los NORs participan necesariamente en la transcripción. De hecho el número de NORs que operan en la transcripción nucleolar está bajo control epigenético (McStay y Grummt 2008; Schelesinger y cols., 2009; Shiao y cols., 2011). La función esencial del nucléolo es la biogénesis de los ribosomas, un complejo proceso que requiere una serie de etapas consecutivas: i) la activación y transcripción de los genes ribosomales para generar transcritos primarios de pre-rRNA 45S, ii) el corte de los pre-rRNA 45S en 28S, 18S y 5.8S, iii) la modificación pos-transcripcional de los rRNAs mediada por metilación de residuos de ribosa y conversión de uridinas en pseudouridinas, y iv) el ensamblaje de los rRNAs 28S, 18S, 5.8S y 5S (este último de de origen extranucleolar) con proteínas ribosomales. A partir de los cuales se formarán las subunidades grande (60S) y pequeña (40S) del ribosoma, que serán exportadas al citoplasma mediante señales de exportación nuclear presentes en las proteínas del complejo de la subunidad (McStay y Grummt 2008). De este modo, el tamaño y la estructura del nucléolo dependerá del nivel de producción de ribosomas que tiene lugar en una célula determinada. Así, la presencia de un único nucléolo favorece el reclutamiento de los genes ribosomales activos y de la maquinaria transcripcional y de procesamiento de los rARN en un único dominio nuclear, incrementando la eficiencia en la biogénesis de ribosomas al facilitar las interacciones moleculares (Raska y cols., 2006; Hernandez-Verdun y cols., 2010).

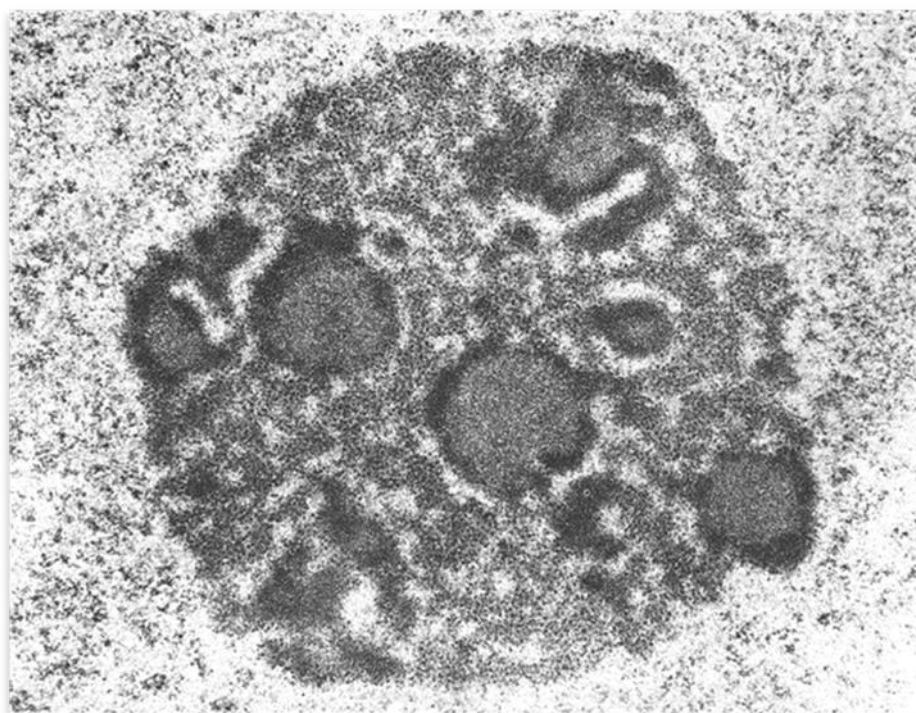


Figura 3. Morfología del nucléolo. Se aprecian los diferentes compartimentos del nucléolo: los centros fibrilares (CF), el componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y los intersticios nucleolares. Tomado de Fawcett D., *The Cell*, Saunders, 1981.

La microscopía electrónica ha revelado que el nucléolo está formado por cuatro subcompartimentos bien definidos donde tienen lugar cada una de las fases de la biogénesis ribosomal. Dichos compartimentos son: los centros fibrilares (CF), el componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y los

intersticios nucleolares (Fig.3). La organización de estos componentes está directamente relacionada con la actividad celular. Cuando una célula es muy activa transcripcionalmente, muestra numerosos CFs pequeños distribuidos por todo el nucleolo. Cada CF está rodeado por una cápsula de CFD constituyendo una unidad de transcripción nucleolar (FC/CFD) (Smirnov y cols., 2016). Entre estas unidades de transcripción se dispone el CG y los intersticios nucleolares. Es muy frecuente que a la superficie del nucléolo se asocie una masa de hetercromatina perinucleolar que preferentemente concentra regiones no codificantes, centroméricas y teloméricas, de varios cromosomas, así como algunas copias de genes ribosomales inactivos.

En las unidades de transcripción CF/CFD tiene lugar la biogénesis y procesamiento temprano de los rRNAs. En los CFs se localiza el rDNA_silente, situado preferentemente en la zona central del CF, mientras que el rDNA activo aparece en la periferia y se extiende hacia el CFD, donde tiene lugar la transcripción, entre el CF y el CFD (Hozak y cols., 1994; Mosgoeller y cols., 2001; Casafont y cols., 2006). Además, en los CFs se almacenan moléculas necesarias para la transcripción como el factor de transcripción UBF, la RNA polimerasa I, la TBP y la DNA topoisomerasa I. La RNA polimerasa I se asocia al cofactor UBF para la transcripción. Funcionalmente, los CFs son organizadores estructurales del rDNA y dominios de almacenamiento transitorio de la maquinaria de transcripción de los genes ribosomales.

Por su parte, el CFD está constituido por fibrillas densamente compactadas donde se dispone gran parte de los genes ribosomales activos. Además, alberga componentes de la maquinaria de transcripción como la RNA polimerasa I, las snoRNPs, “proceosomas”, productos génicos y los transcritos primarios (45S rRNA). Entre sus proteínas, destacan la chaperona Nopp140, la pseudouridina sintasa disquerina/NAP57 y la rRNA metiltransferasa fibrilarina. Estas enzimas van a llevar a cabo la pseudouridinación y metilación de los pre-rRNAs, dos modificaciones post-transcripcionales fundamentales para la escisión del pre-rRNA 45S en rRNAs 18S, 28S y 5.8S y su maduración (McStay y Grummt 2008).

El CG tiene una ultraestructura formada por las subunidades pequeñas y grandes pre-ribosomales. En este subdominio es donde tiene lugar el ensamblaje de los rRNAs 18S, 28S y 5,8S, así como del rRNA 5S sintetizado en la cromatina, con proteínas ribosomales para formar las subunidades o partículas pre-ribosomales (Fig. 4). En este proceso, la fosfoproteína B23/nucleofosmina (NPM) tiene un papel esencial, además de ejercer de endonucleasa, ribonucleasa y chaperona (Boisvert y cols., 2007).

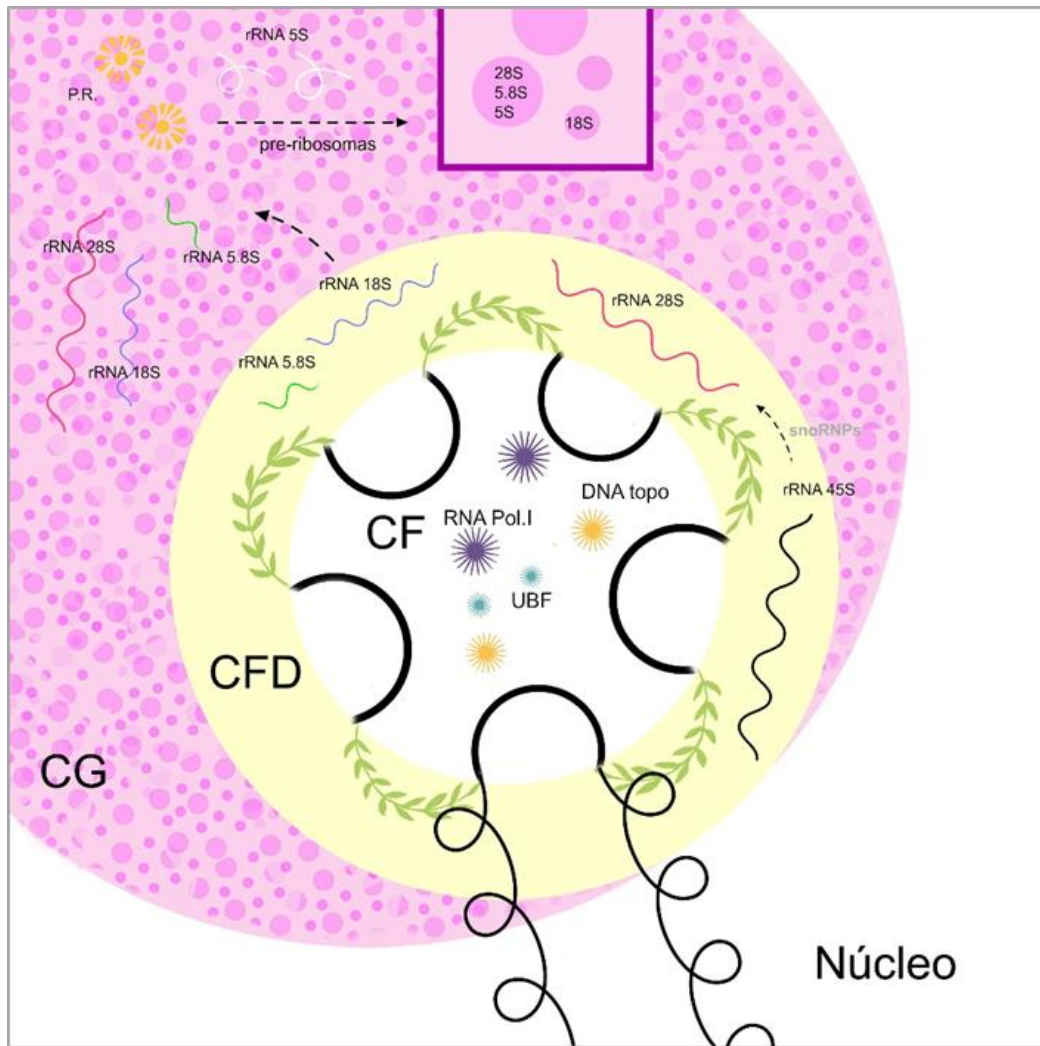


Figura 4. Organización de la transcripción nucleolar en los NOR's. Esquema de los procesos de transcripción y procesamiento de los rRNAs a nivel del nucleolo, donde intervienen diferentes moléculas y la maquinaria transcripcional de la RNA pol I.

Aunque la función principal del nucléolo es generar ribosomas, tiene también importantes funciones en la regulación de la mitosis, la progresión del ciclo celular y la proliferación, la respuesta al estrés celular, el proceso de carcinogénesis y la biogénesis de múltiples ribonucleoproteínas (RNPs) de pequeño tamaño. Además, estudios recientes han revelado que el nucléolo juega un importante papel en otros procesos biológicos como el envejecimiento, la inactivación del cromosoma X y la replicación viral (Visintin y cols., 1999; Boisvert y cols., 2007; Zhang y cols., 2007; Ganley y cols., 2009).

5. LAS REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLEOLO (NOR's)

Las células humanas en los brazos cortos de cinco cromosomas acrocéntricos (Fig. 5) albergan repeticiones del rDNA que se localizan en tándem en los denominados NOR's (McStay y Grummt 2008). Son secuencias génicas que codifican los rRNAs y están directamente relacionadas con la función y

organización del nucléolo (McClintock 1934). Además las regiones adyacentes al rDNA parecen contribuir a la formación y regulación de los NOR's.

Las secuencias distales y proximales que flanquean los genes ribosomales aparecen conservadas a lo largo de los cinco cromosomas acrocéntricos, lo que nos hace pensar que son regiones que sufren una gran recombinación génica. Son un conjunto genómico similar a la eucromatina, pero con diferentes funciones génicas. Las secuencias proximales, centroméricas, aparecen duplicadas de forma semejante a los centrómeros adyacentes (She y cols, 2004), por lo que es muy improbable que contengan elementos específicos que participen en la función nucleolar. Estas secuencias van a estar altamente recombinadas con otras regiones pericentroméricas o centroméricas, pudiendo ser responsables de las translocaciones Robertsonianas que aparecen en las regiones pericentroméricas de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. Las secuencias distales son repeticiones teloméricas de mayor tamaño, que aparecen localizadas en el brazo corto del cromosoma acrocéntrico como una secuencia única, que sí está implicada en la funcionalidad y regulación del nucléolo. Aparecen localizadas en la heterocromatina perinucleolar, por lo que se plantea que jueguen un importante papel como "centro de control" de los NOR's, determinando el estado transcripcional del rDNA.

Los NORs activos forman el nucléolo, mientras que los inactivos forman conjuntos de rDNA silente que no participan en la formación del nucléolo. El rDNA inactivo transcripcionalmente está preferentemente localizado en la periferia del nucléolo, donde frecuentemente se visualiza como agregados de heterocromatina perinucleolar denominados NADs (dominios asociados al nucléolo). Durante la mitosis, los NOR's son regiones muy compactadas por la UBF, que entrelaza el rDNA para dar la típica apariencia de cromosomas metafásicos, en los cuales forma la constricción secundaria (Mais y cols., 2005; McStay y Grummt, 2008).

En las células humanas, aproximadamente 300-400 repeticiones de rDNA aparecen distribuidas por los cinco NOR's de los cromosomas acrocéntricos (Henderson y cols., 1972; Schmickel, 1973; Stults y cols., 2008). En la mayoría de células los NOR's permanecen activos y convergen en el espacio para formar de uno y tres nucléolos (Dundr y cols., 2002; Andersen y cols., 2005; Sirri y cols., 2008). Cuando las células se encuentran en fase de crecimiento exponencial, hay un gran aumento de la demanda de ribosomas, lo que refleja que el nucléolo es el responsable directo de la regulación del crecimiento celular. Durante años se ha estado investigando la relación entre el crecimiento anormal del nucléolo y la proliferación celular en las células tumorales. Recientemente se ha demostrado el papel de determinados genes supresores de tumores y oncogenes en la regulación transcripcional de rDNA (Budde y Grummt, 1999; Hannan y cols., 2000; Grummt, 2003; Grandori y cols., 2005), así como una relación directa entre el aumento de transcripción del rDNA y el desarrollo de malignidad celular (Bywater y cols., 2012). Por otra parte, el rDNA presenta un alto grado de inestabilidad genómica, haciéndolo muy susceptible a agentes genotóxicos y factores ambientales como el envejecimiento. De este modo, los NORs son identificados en tumores sólidos como "puntos calientes" de recombinación génica (Stults y cols, 2009).

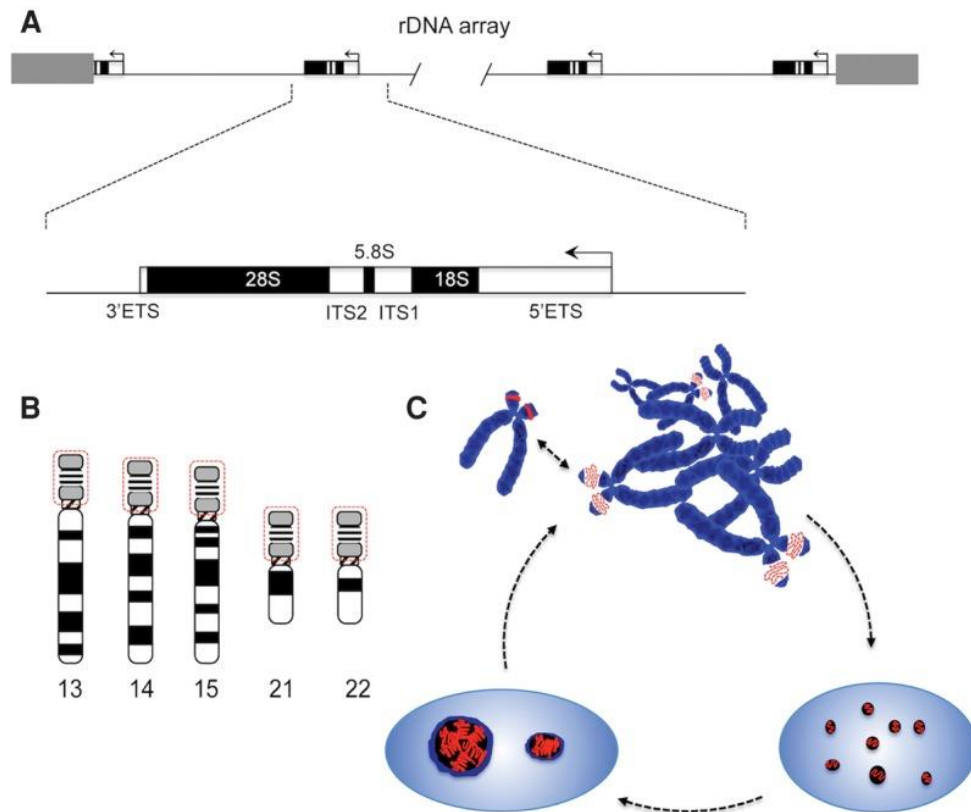


Figura 5. Localización de los NORs en las células humanas. (A) Esquema del rDNA que muestra las secuencias codificadoras del pre-rRNA y que serán transcritas por la RNA Pol I. (B) Localización de los NORs en los cromosomas acrocentricos. (C) Durante la división celular, el nucleolo desaparece, y los NORs son observados como espacios "sin cromatina condensada" en los cromosomas en metafase, a diferencia del resto de DNA. Los NORs silenciados (rojo) no contribuyen a la formación del nucléolo. Tomado de McStay B., Genes & Development, 2016.

Por lo tanto, el papel de los NOR's es fundamental en la formación y función del nucleolo, centrando su actividad en la biogénesis de ribosomas, pero muchos aspectos de su formación, organización y funcionamiento están aún por dilucidar. De hecho, en múltiples estudios se han relacionado los NOR's con múltiples patologías asociadas a alteraciones del núcleo celular y el proceso de carcinogénesis.

6. REPROGRAMACION O DESDIFERENCIACION EN LAS CELULAS TUMORALES

El cáncer es una enfermedad de los genes que altera la conducta y el microambiente celular. Determinadas mutaciones y alteraciones epigenéticas en los oncogenes y genes supresores de tumores ("driver genes") suponen una ventaja selectiva y esencial para el proceso de carcinogénesis, favoreciendo la proliferación y expansión clonal en los sucesivos ciclos celulares (Fig. 6). Así, la progresión tumoral implica una expansión clonal que sigue un patrón de evolución Darwiniana. El avance tumoral requiere la acumulación de múltiples mutaciones y cambios epigenéticos que van a permitir a las células evadir los mecanismos supresores de crecimiento, dotándolas de una capacidad de replicación ilimitada que les confiere una gran capacidad invasora y metastásica.

Además, estas células presentan una resistencia característica a las señales de muerte celular mediadas, especialmente, por la proteína p53, un guardián del genoma que actúa como supresor tumoral (Weinberg, 2007; Vogelstein y Kinzler, 2004; Hanahan y Weinberg, 2011).

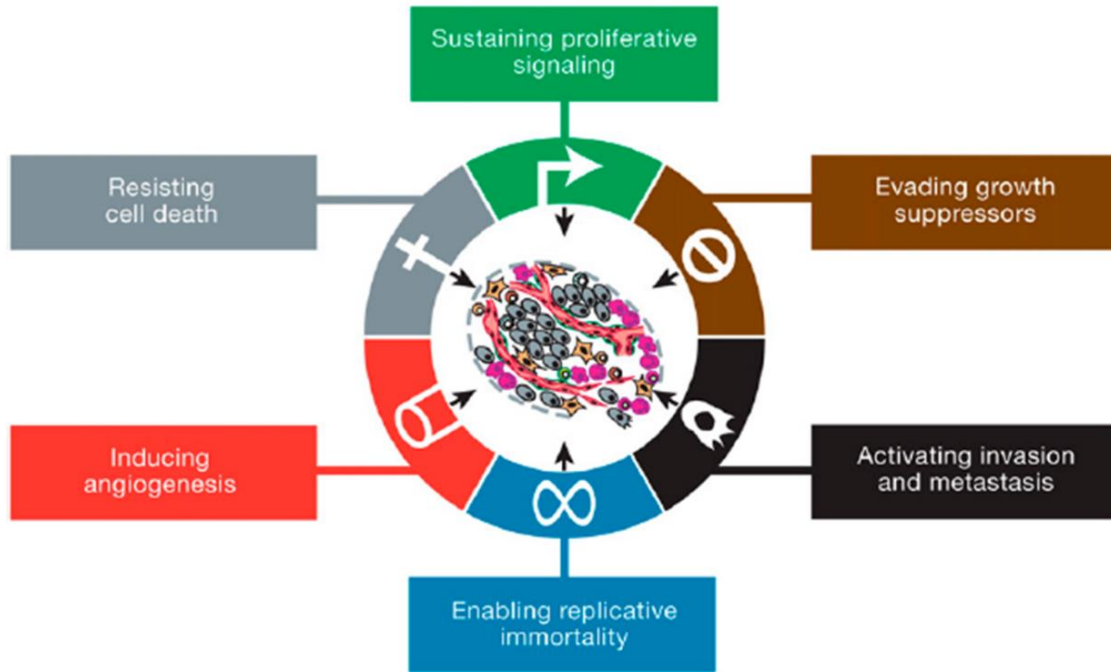


Figura 6. Propiedades de las células tumorales. La ilustración muestra seis características esenciales de las células tumorales. Se incluye el mantenimiento sostenido de las señales de proliferación, la falta de respuesta a factores supresores del crecimiento, la activación de la invasión celular y de las metástasis, la adquisición de una capacidad ilimitada de replicación, la activación de la angiogénesis y la resistencia a las señales de muerte celular. Tomado de Hanahan D. y Weinberg R.A., Cell, 2011.

Las células tumorales malignas tienen unas características especiales que han sido esquematizada en el clásico estudio de Hanahan y Weinberg (2011). Entre ellas debemos destacar las siguientes en el campo de la biología celular (Fig. 7). Algunas de las características que, a nivel celular, se presentan en las células tumorales son las siguientes:

- Disfunción del ciclo celular: transición G1-S
- Alteraciones de la diferenciación celular o reprogramación:
 - Predominio de polirribosomas libres
 - Desregulación del nucléolo: aumento de la síntesis de ribosomas
 - Cambios estructurales y epigenéticos de la cromatina
- Alteraciones de la polaridad y adhesión intercelular: uniones adherentes y tipo "gap"

- Inestabilidad cromosómica:
 - Alteración de los telómeros
 - Translocaciones entre cromosomas
 - Aneuploidia

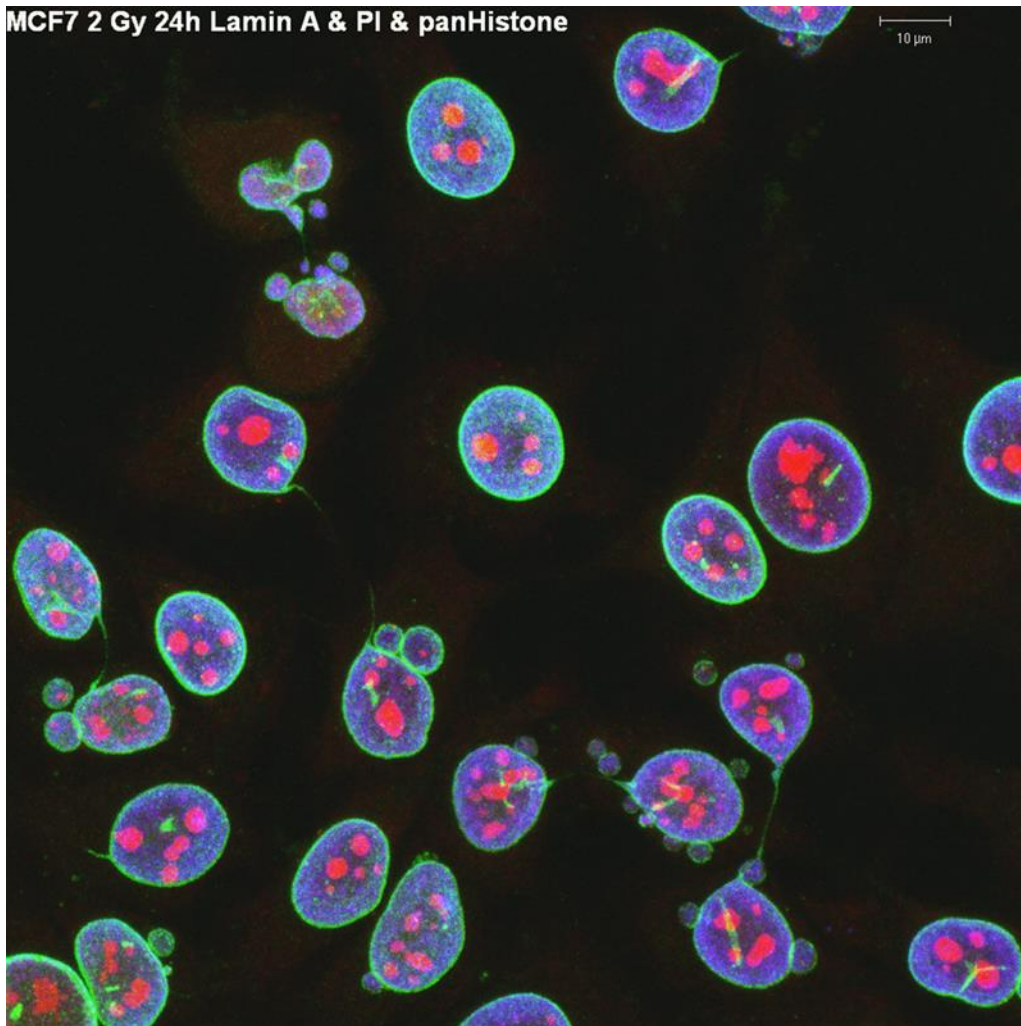


Figura 7. Células tumorales de la línea MCF7 derivada del carcinoma de mama. Se aprecian cambios característicos de células tumorales, como el aumento en el número de nucléolos, presencia de núcleos dismórficos y micronúcleos.

Es importante destacar que en el cáncer hay una desregulación del ciclo celular y que múltiples oncogenes y genes supresores de tumores afectan especialmente a la transición G1-S del ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2009). En efecto, la síntesis de DNA se produce en la fase S, donde algunos oncogenes y genes supresores de tumores ejercen una actividad reguladora fundamental. Cabe destacar la vía del retinoblastoma (pRb) reguladora de la transición G1-S, donde agentes mitogénicos, tales como los factores de crecimiento, inducen la activación de complejos ciclina D/Cdk4,6 que fosforilan e inactivan la pRb (supresor tumoral). La pRb inactivada libera la represión del factor de transcripción E2F, que estimula la expresión de genes que codifican

proteínas esenciales para la progresión del periodo S (Weinberg, 2007; Hanahan y Weinberg, 2011). Un ejemplo típico de la disfunción G1-S en el cáncer lo ofrece el carcinoma de cérvix uterino. En el epitelio del exocervix normal la expresión de Mcm5, una helicasa del complejo de replicación del DNA, se localiza en el estratos basal y parabasal, donde hay una actividad proliferativa fisiológica. Sin embargo, en el carcinoma de cérvix de grado alto todas las células del epitelio plano poliestratificado expresan Mcm5, indicando que tienen la maquinaria de replicación del DNA activada (Williams y cols, 1998).

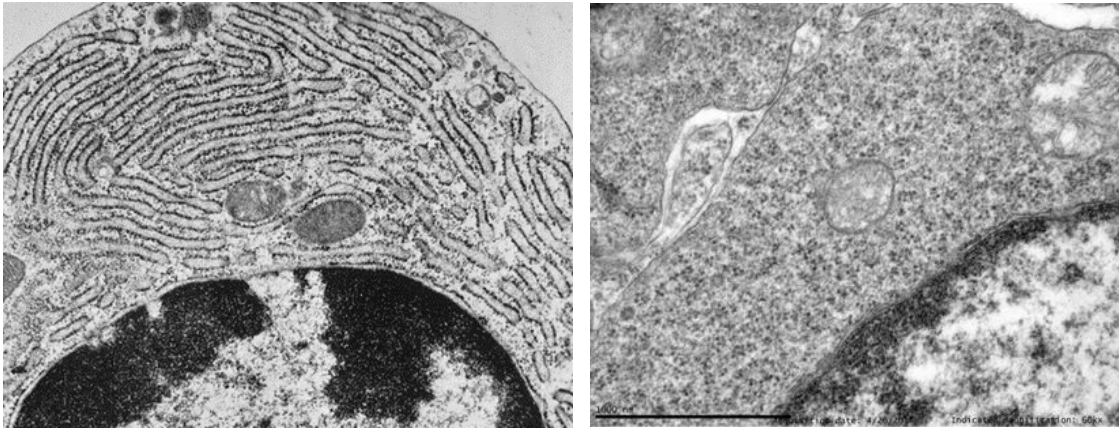


Figura 8. Imagen microscópica de una célula normal (A) con una disposición característica de las cisternas del REG; y de una célula cancerígena (B) donde se observa un aumento de los polirribosomas libres en el citoplasma en respuesta a la elevada demanda de síntesis de proteínas de las células cancerígenas. (A) Tomado de Fawcett D. W., *The Cell*, Saunders, 1981; (B) Berciano MT y Lafarga M, 2014

Otro acontecimiento importante en el mecanismo de la carcinogénesis es la dediferenciación o reprogramación celular. Así, la traducción y biogénesis ribosomal son procesos celulares esenciales que permanecen estrictamente controlados a diferentes niveles. Varios genes supresores tumorales y oncogenes parecen estar relacionados con formación aberrante de ribosomas maduros y determinados factores de traducción que llevan a cabo la formación de proteínas anómalas. De este modo, la alteración de uno o más mecanismos de control en la biosíntesis de proteínas están asociados a alteraciones en el ciclo celular y a la desregulación del crecimiento celular. Es bien conocido que ciertos genes que codifican supresores tumorales, como la pRb y p53, y el factor oncogénico c-Myc están relacionados con la alteración de la maquinaria de síntesis proteica y la posterior progresión tumoral de las células. De hecho, el patrón de retículo endoplásmico granular característico de las células diferenciadas tiende a sustituirse por un patrón de polirribosomas libres (Fig. 8) que favorece la síntesis de proteínas implicadas en el ciclo celular (Weinberg, 2007). Sin embargo, aunque varios estudios han relacionado dicha desregulación de la síntesis de proteínas con el cáncer, aun debemos establecer si esto repercute directamente en un incremento de la susceptibilidad al cáncer y bajo qué circunstancias.

Los ribosomas maduros llevan a cabo la traducción del mRNA celular mediante un proceso altamente coordinado en la célula eucariota. Además, desde hace tiempo se sabe que en las células tumorales la maquinaria de traducción celular aparece alterada. Ya, en la década de los setenta, se reconoció que

determinados cambios a nivel del nucléolo eran marcadores fiables de la transformación tumoral de las células. De hecho, se ha demostrado que numerosos oncogenes y supresores tumorales están directamente relacionados con la producción de ribosomas o la iniciación de la traducción proteica. Estos descubrimientos plantean la posibilidad de que la alteración en determinados componentes de la maquinaria de síntesis proteica y su regulación aberrante durante la traducción puedan promover la transformación tumoral celular (Fig. 9).

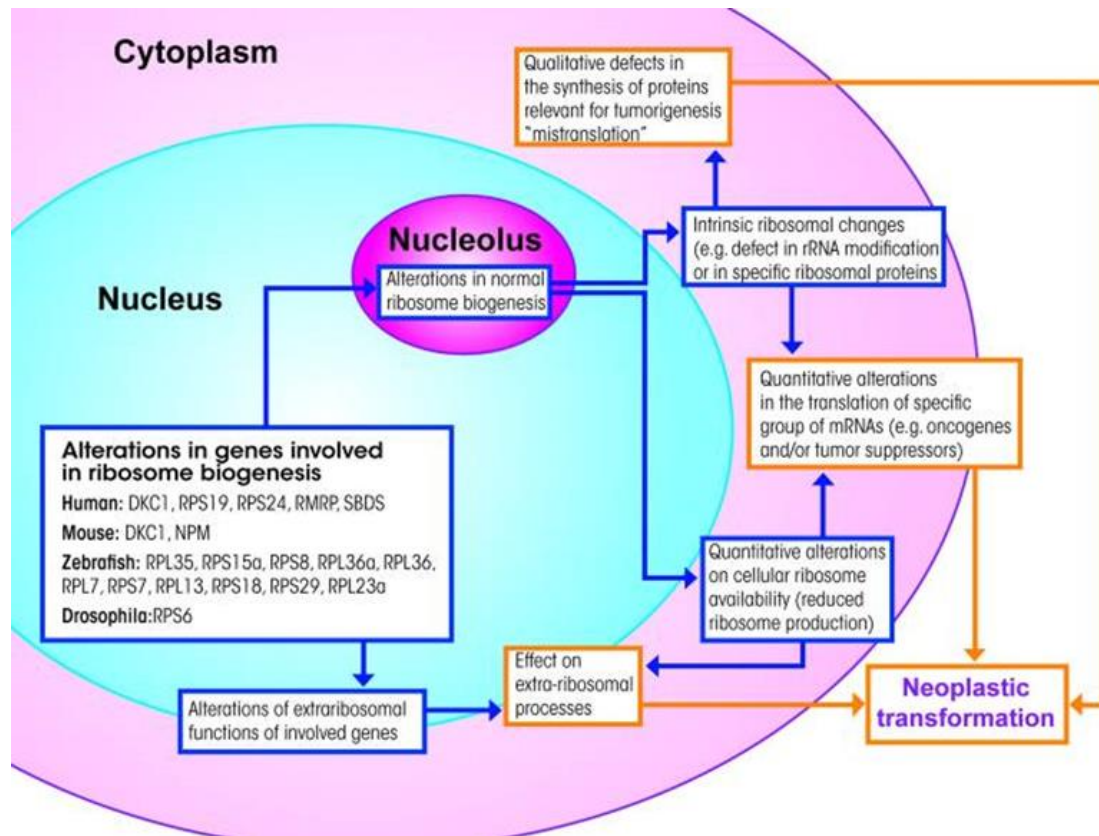


Figura 9. Representación esquemática de la disfunción del nucléolo y de la biogénesis de ribosomas en transformación neoplásica. A las alteraciones intrínsecas que sufren los ribosomas se asocian múltiples cambios cuantitativos y cualitativos derivados de la propia actividad de los ribosomas. Tomado de Montaro y cols., Am. J. Pathology, 2008.

En la actualidad conocemos que determinadas mutaciones en genes que codifican proteínas directamente relacionadas en la biogénesis ribosomal están asociadas al cáncer y a otras enfermedades en humanos. Por ejemplo, el gen *DKC1* aparece mutado en pacientes con disqueratosis congénita, una enfermedad que se caracteriza por un envejecimiento prematuro y un aumento de la susceptibilidad tumoral (Ruggero y Pandolfi., 2003). *DKC1* codifica una enzima que cataliza modificaciones pos-transcripcionales requeridas para la maduración de los rRNAs. Igualmente, las mutaciones en los genes que codifican la proteína ribosomal S19 han sido identificadas en otros síndromes asociados a un aumento de la susceptibilidad tumoral.

El crecimiento y la proliferación celular están relacionados con cambios en la tasa de producción de ribosomas. Durante G1 hay un aumento de la síntesis de rRNA y del ensamblaje de ribosomas. Estos cambios son indispensables para el

aumento en la síntesis proteica que se produce durante el final de G1 y el periodo S. Por lo tanto, existe una relación entre el ciclo celular y la producción de ribosomas. Este balance se mantiene gracias a la existencia de diferentes puntos de control que regulan la tasa de traducción de mRNAs durante las distintas fases del ciclo celular. En las células cancerígenas, este balance puede estar alterado, generando una desregulación de la síntesis de rRNA (Ruggero y Pandolfi, 2003).

El primer paso para la biogénesis de ribosomas es la síntesis de rRNAs. Este paso depende de la regulación de la Pol I que transcribe el rDNA a nivel del nucléolo. La síntesis de rRNA puede ser inducida por estímulos extracelulares, como los factores de crecimiento, en momentos concretos cuando la célula necesita crecer y proliferar. La síntesis de rRNA es máxima en la fase S, y permanece inhibida durante la mitosis para reanudarse de nuevo durante G1. Estas fluctuaciones en la síntesis de rRNA dependen de la actividad de la Pol I. El factor de transcripción UBF (“upstream binding factor”) de los genes ribosomales es clave en la regulación de la síntesis de rRNA, ya que modula el funcionamiento de la Pol I. Además, algunos oncogenes y supresores tumorales regulan directamente la síntesis de rRNA mediante la potenciación o inhibición del UBF. Este factor se une a dos regiones del promotor de rDNA, que además son reconocidas por la Pol I. La fosforilación de UBF, en respuesta a un estímulo externo, es uno de los factores reguladores esenciales para la síntesis de rRNA. Estudios experimentales han demostrado que la cantidad de pre-rRNA en células que expresan una forma mutada, no fosforilada, de UBF se reduce a la mitad con respecto a las células que expresan la forma silvestre, no mutada, de UBF, con la consiguiente disminución del crecimiento celular. La fosforilación de UBF es llevada a cabo por varias quinasas y modifica su capacidad para unirse al rDNA y/o a las proteínas mediadoras en dicha interacción. Dicha fosforilación depende directamente de estímulos extracelulares y de la progresión del ciclo celular, por lo que en células quiescentes el UBF aparece poco fosforilado, siendo transcripcionalmente inactivo (Ruggero y Pandolfi, 2003). Por lo tanto, la fosforilación de UBF representa un punto de convergencia para varias proteínas reguladoras del ciclo celular que modulan la síntesis de rRNA. Ciertos proto-oncogenes están directamente relacionados con la regulación de la actividad del UBF.

La primera proteína identificada en la regulación de la actividad del UBF fue la CK2 (“casein kinase 2”), que aparece sobreexpresada en ciertos cánceres como leucemias y tumores sólidos (Fig. 10). Esta proteína está relacionada con el proceso de tumorigénesis, al interaccionar directamente con componentes de la maquinaria del ciclo celular (Ruggero y Pandolfi, 2003).

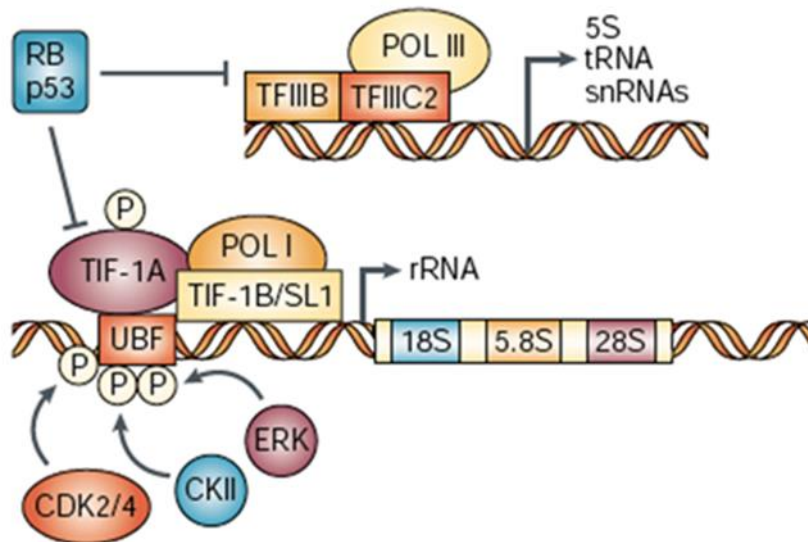


Figura 10. Esquema de la regulación de la actividad de Pol I y Pol III por pRb y p53. pRb y p53 regulan negativamente la actividad de la Pol I y Pol III. Tanto pRb como p53 interfiere en el ensamblaje de la maquinaria de transcripción, inhibiendo la interacción entre TIF-IB y SL1, evitando la acción de UBF. Además, ambas proteínas reprimen el factor de transcripción TFIIIB, inactivando a la Pol III. Por lo tanto, la inactivación de RB y p53, alteran los componentes de la maquinaria de síntesis proteica, produciendo un aumento de la síntesis de ribosomas. Tomado de Ruggero y Pandolfi, Nat. Rev. Cancer, 2003.

Las quinasas regulan la fosforilación del UBF en momentos específicos del ciclo celular, por lo que su sobreexpresión en el cáncer está directamente implicada en la desregulación de la síntesis de rRNA mediante procesos que aún no son bien conocidos. Por lo tanto, si las células cancerígenas han perdido el control del ciclo celular, la desregulación de la síntesis del rRNA podría ser por una alteración que promueve proliferación celular. En las neoplasias, sin embargo, una desregulación de la actividad del UBF aparece como resultado directo de una sobre estimulación externa. Así, el UBF, por sí mismo, ejerce un estímulo directo sobre la maquinaria que inicia el proceso de tumorigenesis. En este sentido, se ha demostrado que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) señala, mediante una vía extracelular, la activación de la quinasa ERK (“extracelular regulated kinase”), que regula directamente la actividad del UBF, y por tanto actúa como un regulador positivo de la síntesis de rRNA. Las quinasas ERK1/2 fosforilan el UBF en dos dominios específicos, produciendo una desregulación en la transcripción ribosomal. Estos dominios están, por tanto, bajo control directo de ciertas señales extracelulares. La fosforilación del UBF por la ERK es uno de los mecanismos que controla la síntesis de rRNA mediante señales extracelulares de crecimiento. De hecho, la disminución de síntesis de rRNA durante la mitosis y en células paradas en G1 es resultado de la defosforilación del UBF por parte de las fosfatasa en momentos concretos del ciclo celular. Dichas fosfatasa son responsables directas de la supresión de la actividad de UBF, y por lo tanto son claves para prevenir la biogénesis ribosomal inapropiada durante la división celular (Ruggero y Pandolfi, 2003).

Existen evidencias experimentales de que la fosfatasa supresora tumoral PP2A media en la defosforilación del UBF. La desregulación de esta fosfatasa en células cancerígenas puede afectar severamente a la coordinación entre la

síntesis de rRNA y la progresión del ciclo celular. Las fluctuaciones en la síntesis de rRNA ocurren bajo ciertas condiciones que alteran el crecimiento celular y se correlaciona con la actividad del factor iniciador de la transcripción TIF-IA, que ejerce de puente entre la Pol I y el complejo de iniciación de la transcripción en el promotor de rDNA. TIF-IA es fosforilado en múltiples dominios por determinadas quinasas a través de diferentes señales extracelulares (Fig. 10).

Otro de los factores que median en la regulación de la síntesis de rRNAs dependiente de UBF es la pRb. El gen que codifica la pRb aparece alterado con frecuencia en los tumores humanos. Su función como supresor tumoral ha sido atribuida a su capacidad para regular el ciclo celular, reprimiendo la actividad del factor de transcripción E2F que controla la expresión de genes del periodo S. Además, varios estudios han demostrado que el pRb regula el crecimiento celular y la proliferación mediante la inhibición de la producción de rRNAs. En particular, la interacción de pRb con UBF previene el reclutamiento de cofactores necesarios para la actividad de Pol I, como TIF-IB/SL1. Otras proteínas de la familia del pRb tienen también la capacidad de inactivar directamente a UBF (Weinberg, 2007).

Del mismo modo que pRb, la proteína p53, codificada por un gen supresor de tumores, tiene la capacidad de inhibir la transcripción mediada por la Pol I a través del bloqueo directo del ensamblaje del complejo de iniciación de la transcripción de la Pol I en el promotor de los genes ribosomales. Tanto las mutaciones del gen *RB1* (pRb) como del gen *TP53* (p53) tienen un efecto sobre la progresión tumoral. Además, p53 y las proteínas de la familia pRb tienen un control sobre la transcripción mediada por la Pol III. Esta enzima cataliza la síntesis de varios RNAs que forman parte de los ribosomas, como el 5S rRNA, así como de los tRNAs que operan en la traducción. Por lo tanto, la pérdida de las pRb y el p53 en células tumorales genera un aumento aberrante de la proliferación, provocando una desregulación en los componentes esenciales de la maquinaria de síntesis proteica. Varios tipos de tumores asocian las mutaciones del gen *Rb* con la incapacidad de la pRb para regular Pol I y Pol III. Así, en el cáncer de pulmón de células pequeñas se ha descrito una mutación puntual del gen *RB1*, que cambia un aminoácido e impide la interacción de pRb con UBF, inhibiendo la actividad transcripcional de la Pol I. Además, la capacidad de pRb de regular negativamente la cantidad de proteínas sintetizadas a través de la modificación de tRNA y rRNA puede aparecer comprometida en algunas lesiones tumorales (Ruggero y Pandolfi, 2003).

Se sabe que el grado de proliferación celular y crecimiento es proporcional a la síntesis de proteínas. Por tanto, la traducción es muy dependiente de la biogénesis de tRNAs y rRNAs. Las proteínas pRb y p53 pueden ejercer sus propiedades como supresores tumorales actuando como reguladores negativos de la actividad transcripcional de Pol I y Pol III, y, consecuentemente, sobre la cantidad de proteínas sintetizadas. La alteración del control de la síntesis proteica se traduce en células más susceptibles a una desregulación en el crecimiento y proliferación celular. Así, la alteración transcripcional de Pol I y Pol III parece ser determinante en el proceso de inicio y progresión tumoral (Diesch y cols., 2014)

Las proteínas ribosomales deben ser ensambladas con los rRNAs en el nucleolo para formar las subunidades grandes y pequeñas de los ribosomas. Dichas proteínas ribosomales presentan dominios clave para la interacción con el rRNA. El estudio estructural de dichos componentes mediante cristalografía de rayos X ha contribuido al conocimiento de las funciones específicas de los diferentes dominios del rRNA, así como de las proteínas ribosomales durante los diferentes pasos de la síntesis proteica. Estas investigaciones han revelado que las proteínas ribosomales funcionan como chaperonas del RNA, pero no solo durante el ensamblaje de las partículas ribosomales, sino también como dominios estabilizadores del rRNA. Además, las proteínas ribosomales pueden coordinar las interacciones entre el ribosoma y el mRNA, e interaccionar con factores de iniciación y elongación. La alteración en la expresión de las proteínas ribosomales parecen estar asociadas a los procesos de tumorigenesis, de hecho, varias proteínas ribosomales pertenecientes a las dos subunidades de los ribosomas aparecen sobreexpresadas en las células tumorales (Ruggero y Pandolfi, 2003; McStay y Grummt, 2008; McStay, 2016).

La expresión de los genes que codifican las proteínas ribosomales es un proceso coordinado, su disfunción puede conllevar una disminución de una de las subunidades ribosomales, que produce una reducción en el número de polirribosomas, así como un defecto del crecimiento celular. Así, la falta de S6, una proteína ribosomal que forma parte de la subunidad 40S, conlleva un defecto en la biogénesis de ribosomas, reduciendo la proliferación celular. El estudio de S6 ha revelado que su fosforilación está estrechamente regulada por señales extracelulares, y que dicho mecanismo se altera en las células tumorales. La fosforilación de S6 parece estar asociada con la traducción de una clase concreta de mRNAs denominada TOP (“terminal oligopyrimidine”) mRNAs. Este tipo de mRNAs codifica proteínas ribosomales, los factores de elongación de la traducción EEF1A1 y EEF2, así como varias proteínas relacionadas con la biogénesis de ribosomas o en el control de la traducción. Las propias proteínas codificadas por los genes TOP actúan como proto-oncogenes, por lo que su desregulación promueve la tumorigenesis (Alberts y cols., 2015).

La proteína S6 es fosforilada cuando las células quiescentes entran en el ciclo celular en respuesta a un mitógeno, ya que sus niveles aparecen aumentados de forma proporcional a los niveles de síntesis de proteínas, por lo que S6 podría ser un importante regulador del crecimiento celular a través de la regulación de la traducción de los TOP mRNAs. Esta hipótesis se basa en estudios donde se ha inactivado la quinasa responsable de la fosforilación de S6, produciendo una disminución del volumen celular y un defecto del crecimiento celular, aunque no altera la traducción de los genes TOP (Takada Kurisaki, 2015). Del mismo modo que el aumento de la actividad transcripcional de Pol I incrementa la síntesis de rRNA, las proteínas ribosomales regulan el número de ribosomas funcionales de la célula (Fig. 11). En las células tumorales hay una sobreexpresión de proteínas ribosomales que determinan la sobre producción de ribosomas. Determinadas proteínas por si solas pueden llevar a dicha sobreexpresión. Por ejemplo, la S3a tiene la capacidad de inducir la transformación tumoral celular a través de su función desreguladora de proteínas anti-apoptóticas, inhibiendo la apoptosis en las células tumorales.

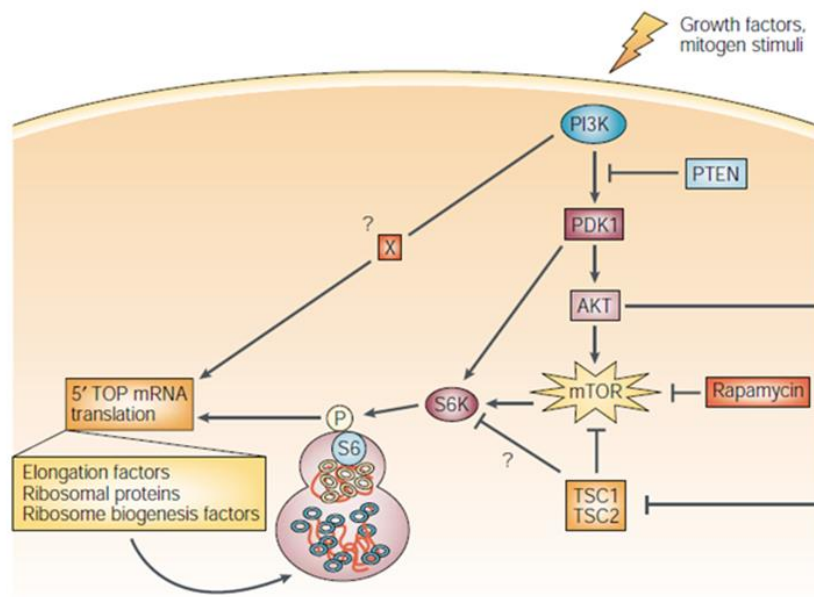


Figura 11. Esquema de la regulación de la síntesis de proteínas por la quinasa PI3K. La activación de la PI3K por diversos factores de crecimiento, produce un aumento de la traducción de mRNAs que contienen un segmento terminal denominado TOP en su extremo 5'. Los genes con esta terminación codifican ciertos componentes del aparato de traducción, proteínas ribosomales y factores de elongación. La activación de mTOR por AKT aumenta la actividad de S6K, encargada de fosforilar la proteína ribosomal S6, activándola. Ésta se encarga de regular la traducción selectiva de mRNAs con 5' TOP a través de ciertos mecanismos que aún no se conocen. Existen otras vías de activación S6, como la de PDK1. La desregulación de la activación de S6 contribuye a la tumorigenesis mediante la vía de PI3K. Por otro lado, TSC1/2, junto con AKT, actúan como antagonistas de la activación de S6K, por lo que las células tumorales presentarían una pérdida de función de estas moléculas, favoreciendo la traducción de 5' TOP, que acaba por generar una síntesis incontrolada de proteínas. Tomado de Ruggero y Pandolfi, Nat Rev Cancer, 2003

Ciertas proteínas ribosomales tienen funciones adicionales, como la S3, que funciona como una endonucleasa III que repara DNA dañado por radiación ultravioleta. Pero el hecho de que estas proteínas no estén asociadas a un tipo tumoral concreto, hace difícil establecer las posibles combinaciones entre proteínas ribosomales y la desregulación de un tipo celular tumoral concreto.

La desdiferenciación en las células tumorales frecuentemente conlleva un aumento del número de nucléolos que puede ser secundario al incremento aberrante de los dominios de eucromatina y a la activación de NOR reprimidos (desrepresión transcripcional). Los genes que llevan a cabo este proceso de modificar la cromatina, aparecen desregulados en el cáncer. El factor MYC, codificado por el proto-oncogen *myc*, se sobreexpresa en muchos tumores y promueve el reclutamiento de histona acetiltransferasas (HATs) en los genes diana portadores de una Caja E e induce la transición de heterocromatina a eucromatina (Verlaxhanova y Knoepfler, 2009). La sobreexpresión del gen *myc* activa la transcripción de genes ribosomales y de genes que codifican proteínas ribosomales, Como consecuencia, se produce la activación de la biogénesis de ribosomas, un proceso esencial para la proliferación y crecimiento de la célula tumoral (Fig. 12). Además, en ese estado de desdiferenciación o reprogramación, se observa una disminución de las cisternas del REG y un aumento de los polirribosomas libres, ya que el crecimiento y proliferación de las

células tumorales son altamente dependientes de proteínas sintetizadas por los polirribosomas libres (Hein y cols., 2013).

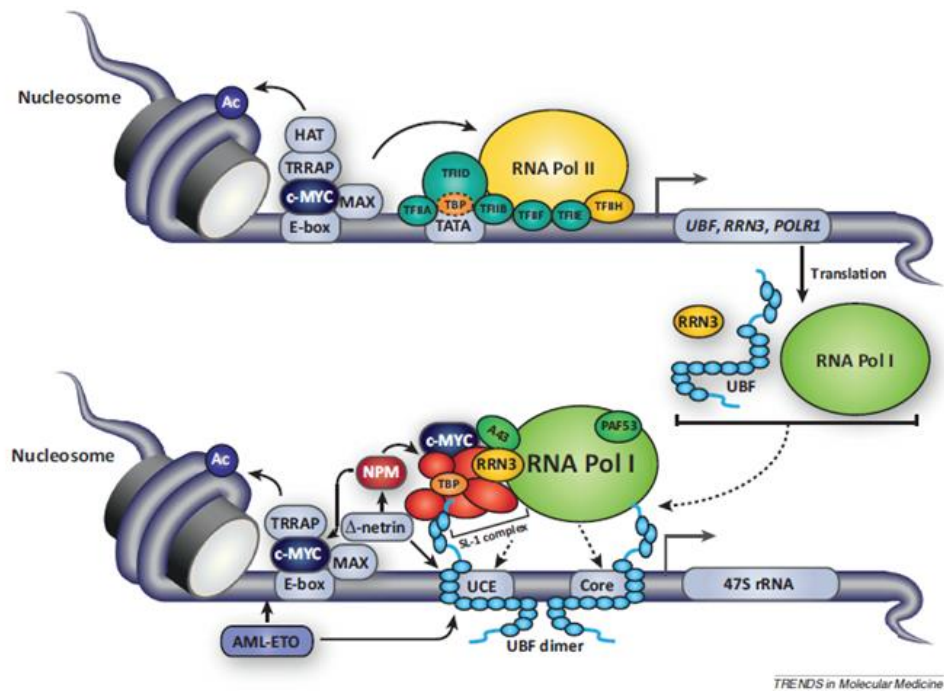


Figura 12. Regulación de la transcripción del rDNA por el oncogen MYC. MYC regula la Pol I a través de su unión al promotor de rDNA, actuando sobre SL1, y alterando la función de ciertos factores de transcripción. Abreviaciones: Ac, acetilación; HAT, histona desacetilasa; NPM, nucleofosmina; UCE, upstream control element; Elementos promotores: E-box, TATA; TF, factor de transcripción. Tomado de Hein y cols. Trends Mol Med, 2013.

La sobreexpresión del gen myc desregula a la alta la síntesis de proteínas ribosomales, produciendo un aumento del tamaño celular, por lo que el gen myc tiene la capacidad de regular la síntesis total de proteínas en la célula (Fig. 13). Dicho aumento del tamaño, se asocia a un aumento del tamaño nucleolar, así como la expresión de varias proteínas ribosomales y nucleolares que están involucradas en la biogénesis de ribosomas. Estos hallazgos se correlacionan con los resultados obtenidos con el programa SAGE (“Serial Analysis of Gene Expression”) en células de neuroblastoma. Al transferir a estas células un oncogen de la familia myc, denominado nmyc, la mayoría de genes que resultaban alterados en estas células codificaban proteínas ribosomales asociadas con las subunidades mayor y menor de los ribosomas. Un segundo grupo de genes desregulados en las células transfectadas con nmyc codifican proteínas nucleolares como la NPM y la nucleolina. Como se ha comentado previamente, estas proteínas son necesarias para el procesamiento del rRNA, por lo que están implicadas en la regulación del ensamblaje de ribosomas y en el transporte entre el nucleolo y el citoplasma de las subunidades ribosomales maduras. Los resultados obtenidos demuestran que los genes de la familia myc son esenciales en la regulación de la síntesis de ribosomas (Ruggero & Pandolfi, 2003).

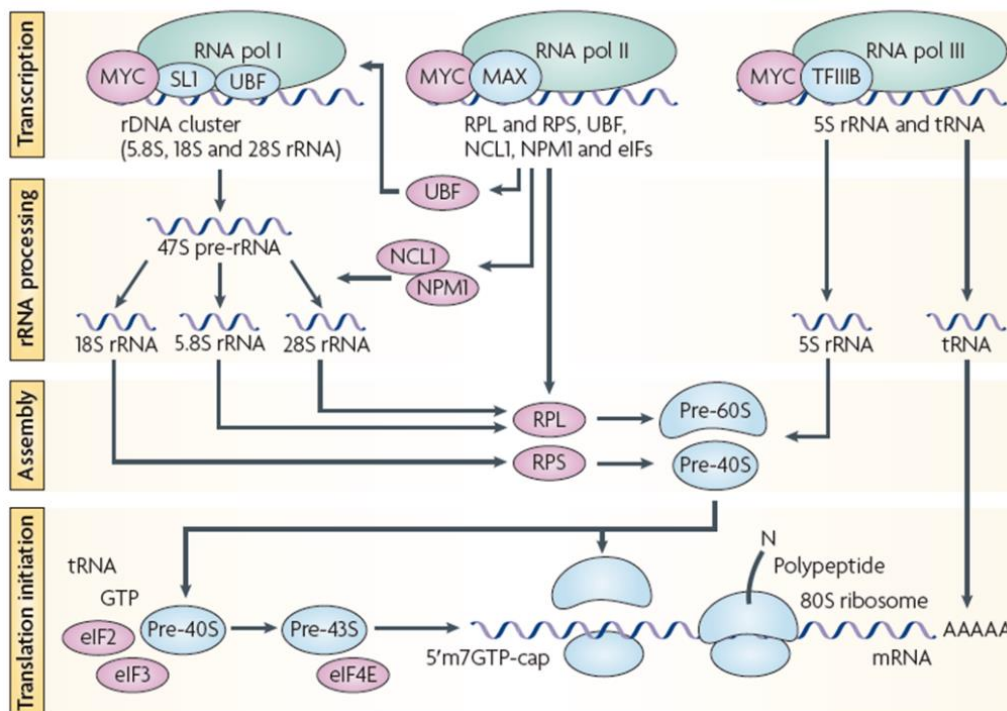


Figura 13. MYC controla múltiples componentes de la biogénesis de ribosomas. MYC regula directamente la expresión de un gran número de proteínas ribosomales, componentes del RNA, y factores auxiliares requeridos para el procesamiento del rRNA, el ensamblaje de ribosomas y la exportación de las subunidades de los ribosomas al citoplasma, así como factores de iniciación para la traducción de mRNAs. La regulación de dichos factores por MYC requiere el reclutamiento de cofactores, el remodelado de la cromatina y la participación de las tres RNA polimerasas. MYC facilita la transcripción por parte de la RNA Pol I, para lo cual precisa la unión de UBF y SL1. MYC activa la transcripción del 5S rRNA y de tRNAs. La unión de MYC con MAX, estimula la transcripción de proteínas, como RPS, RPL, NCL y NPM1, por parte de la RNA Pol II. Dichas proteínas están implicadas en el procesamiento del rRNAs y su exportación. Tomado de Ruggero & Pandolfi, Nature Rev Cancer, 2003.

El gen supresor tumoral PTEN también ha demostrado tener una gran importancia en la regulación del tamaño celular, además de su capacidad para regular la biogénesis ribosomal. PTEN codifica una fosfatasa que desfosforila determinadas moléculas, provocando la represión de la quinasa PI3K, que en condiciones normales aumenta la actividad de la quinasa S6K. Estos procesos están regulados por la quinasa mTOR. PTEN aparece mutado en varios tipos de cáncer, y su pérdida aumenta la actividad quinasa de S6K. La inactivación farmacológica de la vía mTOR reduce la proliferación de células tumorales, además de inhibir la actividad de S6K. Este tipo de fármacos, no son eficaces en los tumores que carecen de un PTEN mutado, lo que demuestra el papel tan relevante de PTEN en la regulación del crecimiento celular a través de la activación de S6K (Fig. 14). Conocer estas vías de acción, nos permitirá en el futuro, desarrollar posibles agentes terapéuticos contra las enfermedades resultantes de dichas alteraciones genéticas.

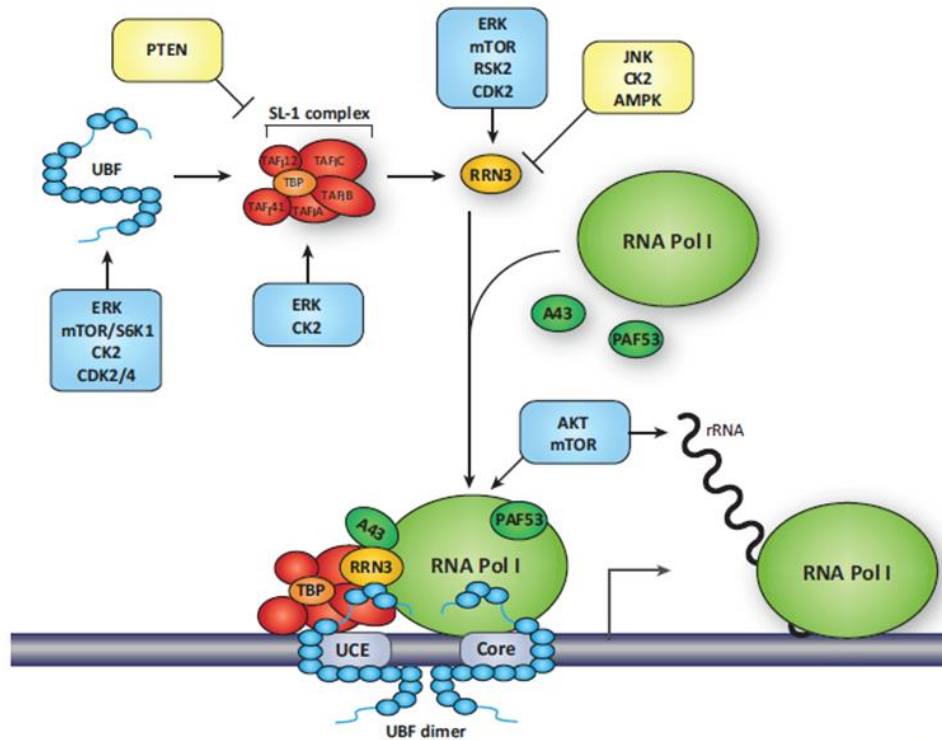


Figura 14. Regulación de la transcripción de rDNA mediante la cascada de señales generadas por los oncogenes y genes supresores tumorales. Las cascadas de señalización como RAS/RAF/ERK y PI3K/AKT/mTOR regulan el complejo de la Pol I, incluido a RRN3, UBF y SL-1 para aumentar la síntesis de rRNA. Estas cascadas de señalización también regulan otros componentes esenciales de la biogénesis de ribosomas, como 5S rRNA. Tomado de Hein y cols, Trends in Medicine, 2013.

Otros genes supresores recientemente descubiertos como los que codifican el complejo TSC1/2, también regulan la actividad de S6K, inhibiéndola. Este complejo está relacionado indirectamente en la inhibición de la actividad de S6K a través de la inhibición de mTOR, por lo que PTEN y TSC1/2 funcionan de forma conjunta para inhibir el crecimiento y la proliferación celular (Ruggero y Pandolfi, 2003).

Los oncogenes y los genes supresores tumorales contribuyen a la progresión del cáncer a través de la alteración de la biogénesis de ribosomas. Un ejemplo es la disqueratosis congénita, donde *DKC1* codifica una enzima que media en la modificación post-transcripcional del rRNA. Esta enfermedad se caracteriza por un envejecimiento prematuro, incluyendo el fallo de la médula ósea y la hiperqueratosis de la piel. Estos pacientes presentan una susceptibilidad a la formación de tumores asociada a la disminución de biogénesis de ribosomas, por lo que se sospecha que la alteración de ribosomas está directamente implicada en la susceptibilidad tumoral observada. Las alteraciones de los ribosomas aparecen en dominios especialmente importantes para interacción de éstos con el tRNA y el mRNA y consisten en un defecto de la pseudouridinación (conversión de uridinas en pseudouridinas), que tendrán un efecto deletéreo sobre la función de los ribosomas, favoreciendo la progresión tumoral.

Varias vías que conducen al aumento de la biogénesis de ribosomas están asociadas al proceso de transformación tumoral. Las alteraciones pueden ocurrir

a nivel a nivel de la transcripción de rRNA o de su posterior modificación, o a nivel del ensamblaje de ribosomas. Como se ha comentado anteriormente, la sobreexpresión de proto-oncogenes como *myc* produce una desregulación a la alta de las proteínas ribosomales y de determinados factores de traducción, por lo que el aumento de la actividad de traducción esta acoplado al aumento de ribosomas. Así, el crecimiento y la proliferación celular están directamente relacionados con la tasa de producción de ribosomas y, consecuentemente, con la tasa de síntesis de proteínas. Además, otra de las consecuencias del aumento de la traducción de mRNAs puede ser el incremento de la síntesis de determinadas proteínas que, en condiciones normales, tienen una expresión baja o moderada. De hecho, la función de la mayoría de oncogenes está estrechamente regulada para prevenir los efectos deletéreos sobre el crecimiento celular. El descubrimiento de la sobreexpresión de determinados componentes de la maquinaria de traducción y su desregulación en las células cancerígenas nos ha permitido abrir nuevas posibilidades terapéuticas para aquellas enfermedades o síndromes con capacidad para sufrir un proceso de carcinogénesis.

Además, de las alteraciones en el ciclo celular, biogénesis de ribosomas y síntesis de proteínas comentadas anteriormente, la disfunción en la expresión génica de los genes "driver" en el cáncer afecta a otros mecanismos celulares esenciales en el proceso de carcinogénesis. Entre ellos, enunciamos las alteraciones en la polaridad y adhesión y comunicación intercelular celular, así como la inestabilidad cromosómica que no son objetivos de esta revisión.

7. NUCLEOLO Y CANCER

En 1896, Pianese observo que las células tumorales se caracterizaban por presentar un nucléolo hipertrófico y de morfología muy irregular en comparación con las células normales. Durante la primera mitad del siglo XX estos hallazgos fueron confirmados y se consideraron una forma de "diagnostico incuestionable de malignidad celular" (MacCarty. 1936). Con posterioridad, se observó que estos cambios también podían tener lugar en células normales, por lo que dejo de ser un criterio diagnóstico (Busch y Smetana, 1970; Koller, 1963). No obstante, el interés sobre el nucléolo ha ido aumentando durante los últimos años en paralelo con el avance del conocimiento científico sobre los mecanismos reguladores de la biogénesis de ribosomas y las alteraciones genéticas y metabólicas que se producen en las células tumorales. A estos avances ha contribuido el desarrollo de nuevas técnicas de biología celular y molecular que permiten caracterizar la organización estructural, molecular y funcional del nucléolo y su respuesta en condiciones experimentales y patológicas (Derenzini y Ploton, 1991; Derenzini y cols., 1990; Ploton y cols., 1986; Trerè, 2000). Tras el descubrimiento del papel regulador negativo de p53 sobre la transcripción de los genes ribosomales, así como de la relación directa entre la desregulación de la síntesis de ribosomas con el aumento del riesgo de desarrollar una transformación celular maligna (Montanaro y cols., 2012), ha aumentado el interés científico por investigar la relación entre la producción de ribosomas y el cáncer.

Los cambios morfológicos y funcionales del nucleolo observados en las células de un tejido tumoral son consecuencia de un aumento de la demanda de la biogénesis de ribosomas y de cambios en los mecanismos de control de la proliferación celular que caracterizan a estas células. La pérdida o alteración en la función de dos importantes proteínas, pRb y p53, que ejercen un papel supresor tumoral, provocan en las células tumorales una desregulación en la biogénesis de ribosomas. La asociación entre cáncer e hipertrofia nucleolar sugiere un papel relevante de ésta en la tumorigenesis. La desregulación en la producción de ribosomas y los cambios estructurales en los ribosomas contribuyen, del mismo modo, a la transformación neoplásica de las células mediante la alteración del balance de las proteínas sintetizadas (Pathol, 2008). Durante años, la relación entre el nucléolo y el cáncer ha sido objetivo de múltiples estudios que, entre otras cosas, han tratado de aclarar si los cambios nucleolares eran consecuencia o la causa de la transformación maligna de las células (Fig. 15).

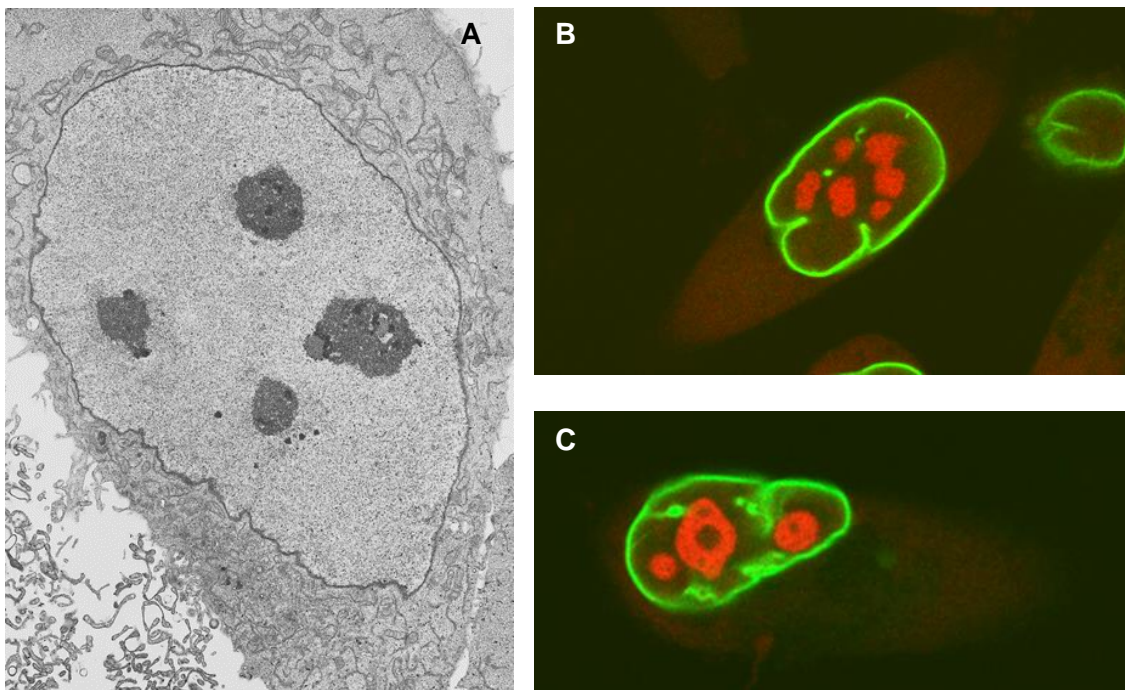


Figura 15. Células tumorales donde se ve un aumento del número de nucleolos como respuesta a una mayor demanda de proteínas. La célula tumoral de la imagen (A) presenta múltiples nucleolos, un patrón predominante de eucromatina y un citoplasma rico en polirribosomas con un REG desorganizado. Las imágenes (B) y (C) son células PC3 de un carcinoma de próstata con un aumento del número de nucleolos (rojo). Cortesía de Suarez, Berciano, Lafarga, Muñoz, 2003.

Como se ha comentado anteriormente, las células tumorales se caracterizan por presentar alteraciones en la expresión de genes supresores tumorales y proto-oncogenes, que son responsables de la proliferación celular desordenada con un aumento del crecimiento celular y desregulación del ciclo celular. Es este contexto, es razonable considerar que los cambios morfofuncionales del nucléolo tienen consecuencias inmediatas sobre la proliferación celular, así como sobre los mecanismos de control que actúan sobre el ciclo celular. La tasa de proliferación celular es muy dependiente de la duración del ciclo celular que, a su vez, depende del tiempo que tarda la célula en pasar por la fase G1. Por lo

general, la sobreexpresión de algunos oncogenes, como el que codifica c-MYC, así como la inactivación de los genes supresores de tumores que codifican p53 y pRb, activan la función del nucléolo, favorecen la biogénesis de ribosomas y reducen la duración de la fase G1. Esta respuesta celular es esencial para satisfacer la elevada demanda de síntesis proteica en las células tumorales que presentan un crecimiento acelerado, dando como resultado un nucléolo hiperactivo e hipertrófico, cuya dinámica tiene un importante papel en el proceso de tumorigénesis (Ruggero y Pandolfi, 2003). Además, se ha observado que la alteración de la función nucleolar, así como los defectos en la biogénesis de ribosomas, tienen un efecto sobre la traducción de mRNAs específicos, que conduce a la expresión de ciertas proteínas implicadas en la transformación neoplásica de los tejidos a nivel celular.

Ciertas proteínas localizadas en el CF/CFD pueden ser marcadas selectivamente con métodos de impregnación argéntica para visualizar mediante microscopía óptica los NORs, tanto en los cromosomas metafásicos como en los nucléolos de la interfase. En estos últimos, se impregnan selectivamente las unidades de transcripción nucleolar (CF/CFD), clásicamente conocidas como AgNORs. El número y el área ocupado por los AgNORs nucleolares está directamente relacionado con el tamaño del nucléolo y con su actividad transcripcional (Fig. 16). Por lo tanto, la cuantificación de los AgNORs nos proporciona un método muy simple para el estudio de los cambios nucleolares en células normales y tumorales (Derenzini y cols., 2009).

El descubrimiento de los AgNORs permitió realizar múltiples ensayos para valorar su utilización en la predicción de la patología tumoral y como factor pronóstico de la enfermedad, incluso en comparación con otros indicadores pronósticos, como la edad del paciente, el estadio tumoral o el tamaño del tumor (Derenzini & cols, 2017). El patrón de AgNORs ha sido utilizado como indicador de la supervivencia en el cáncer de faringe, mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de próstata. Además, se ha utilizado como forma de predecir la respuesta del cáncer al tratamiento con quimioterapia, llegando a ser el mejor indicador de esta respuesta en adultos con leucemia mieloide. De este modo, los AgNORs son una herramienta ampliamente utilizada para el estudio de los cambios en el nucléolo celular en el contexto de una patología tumoral (Maggi & Weber, 2005; Derenzini & cols, 2017).

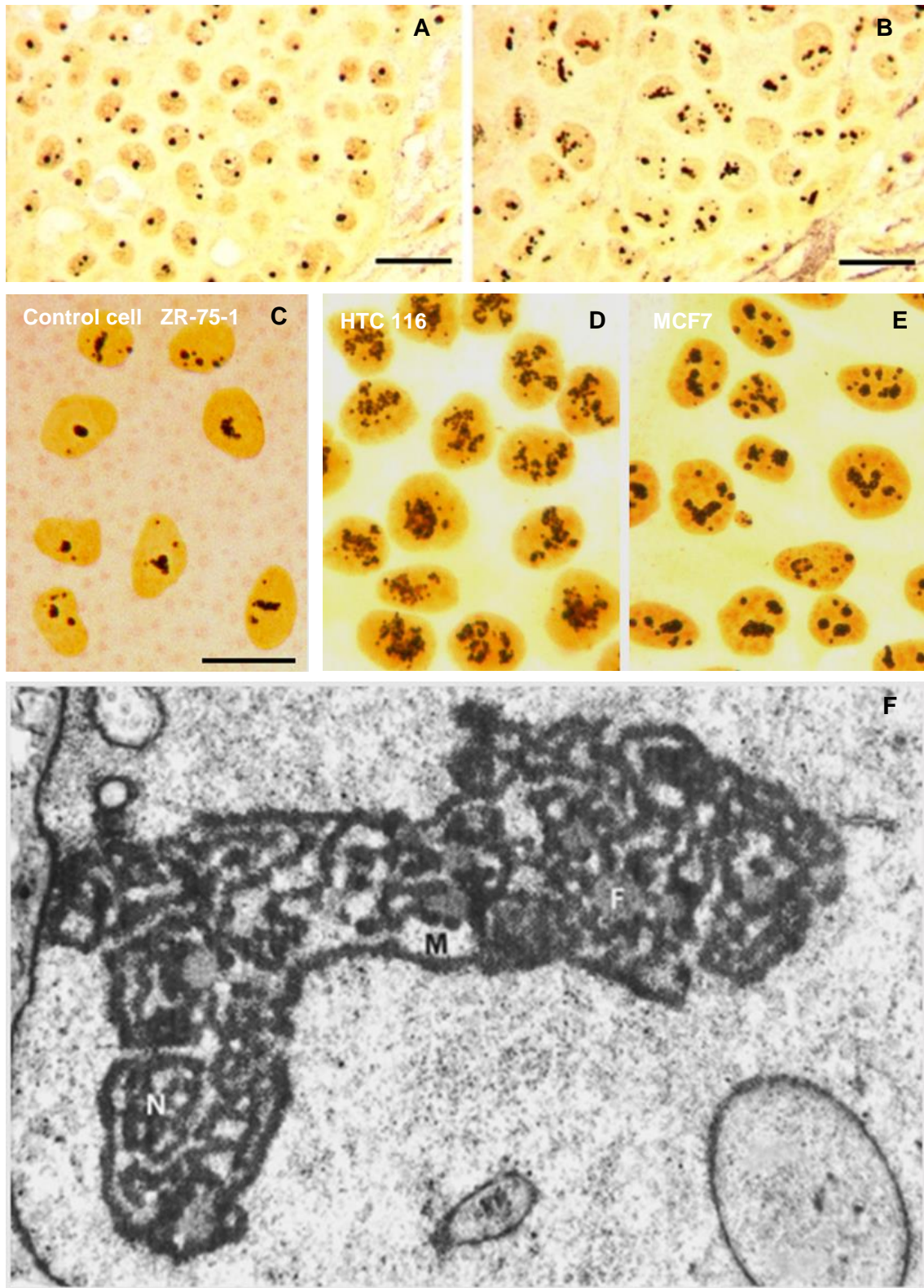


Figura 16. Secciones histológicas de tejidos mamarios marcados con AgNOR, donde el nucléolo aparece específicamente marcado con la plata. La imagen **(A)** representa un tejido normal mientras que la **(B)** corresponde a un carcinoma de mama, donde vemos un incremento de AgNORs en las células tumorales, lo que indica una mayor actividad nucleolar. Distribución de los AgNORs en una célula control **(C)** de una glándula mamaria, y en células de un cáncer de colon **(D)** y de mama **(E)**. La imagen **(F)** representa las alteraciones del nucléolo en una célula cancerígena a MO. Tomado de (A) y (B) Montanaro y cols., 2008; (C-E) Derenzini y cols, 2017; (F) Ghadially F.N., Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix, 1988.

Aunque la hipertrofia nucleolar con el incremento de los CF/CFD (AgNORs) se considera generalmente una característica de las células tumorales (Fig. 16), hay estudios que demuestran que no siempre es así. En efecto, en algunas células tumorales con baja tasa de proliferación tanto el tamaño como la actividad nucleolar pueden estar disminuidos respecto a las células normales. De hecho, los cambios en el nucléolo de las células tumorales están íntimamente relacionadas con el número de células proliferantes dentro del tejido tumoral y la duración del ciclo celular, parámetros cinéticos que, en ocasiones, son altamente variables en los tumores humanos (Ruggero y Pandolfi, 2003). El conjunto de mecanismos responsables de la regulación de la biogénesis de ribosomas, y por tanto, de los consiguientes cambios a nivel del nucléolo, son el resultado de los cambios funcionales que sufren determinados oncogenes y supresores tumorales que controlan la proliferación celular. La gran variabilidad en la penetrancia de dichas alteraciones explica la disparidad de alteraciones que sufre el nucléolo en las células tumorales como respuesta al estrés oncogénico, en el que las proteínas pRb y p53 juegan un papel crucial (Montanaro y cols., 2008). Respecto al papel de p53, el nucléolo actúa como un sensor de estrés, regulando el nivel celular de esta proteína. En respuesta al estrés oncogénico, determinadas proteínas nucleolares (L11 y ARF) viajan del nucléolo al citoplasma donde interactúan con la ubiquitina ligasa Mdm2, impidiendo la ubiquitilación de p53 y su posterior degradación por el proteasoma y estabilizando los niveles de p53 (Fig. 17). Así, la función del nucléolo es crucial para mediar entre las señales de estrés y los niveles de p53, permitiendo a las células llevar a cabo una respuesta adecuada, deteniendo el ciclo celular mediante una señal inducida por p53 (Ruggero y Pandolfi, 2003).

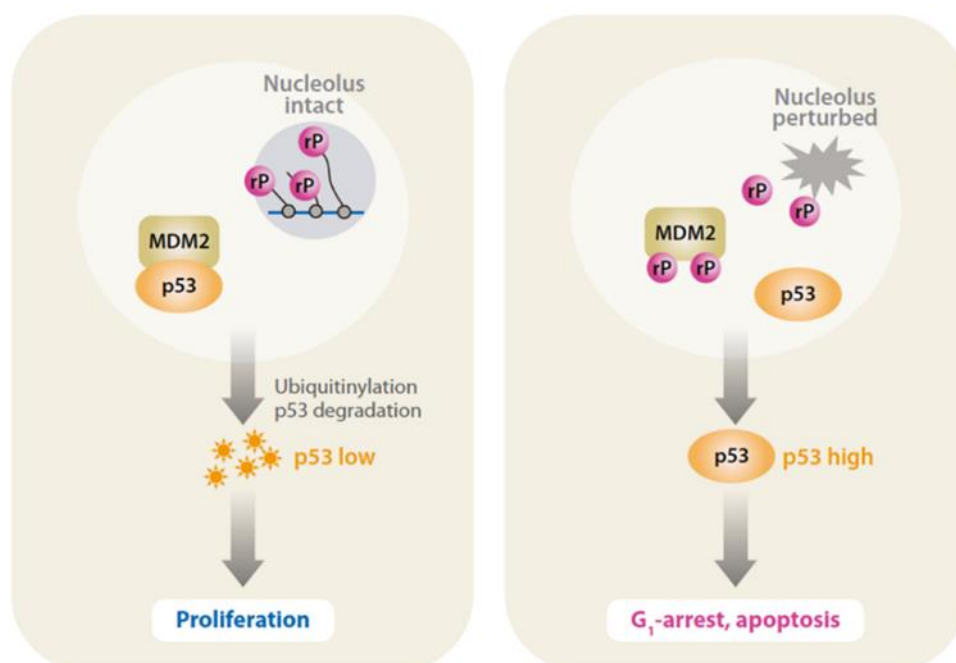


Figura 17. Esquema de como la inactivación del factor de transcripción TIF-1A permite a las células detener el ciclo celular y entrar en apoptosis. En presencia de TIF-1^a, el nucléolo es muy activo en transcripción, y los niveles de p53 se mantienen bajos mediante su ubiquitilación por Mdm2 y degradación por el proteasoma. Cuando las células carecen de TIF-1A, la estructura del nucléolo se ve alterada y las proteínas ribosomales (rP) que permanecen en el citoplasma,

se asocian con Mdm2 para inhibir su actividad. Como consecuencia, la actividad de p53 se ve incrementada, permitiendo a la célula detener su ciclo celular y entrar en apoptosis. Tomado de Drygin y cols., Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010.

El locus INK4a/ARF del genoma humano codifica dos supresores tumorales denominados p16 y p14. Ambas proteínas son esenciales para la coordinación del ciclo celular y prevención de la transformación tumoral. En las células tumorales humanas, la pérdida de INK4a/ARF aparece en segundo lugar, tras la mutación de p53, entre las principales alteraciones genéticas que con más frecuencia se detectan en el cáncer, demostrando la importancia de dicho locus en la prevención de la tumorigénesis. Ciertamente, las proteínas p16 y p14 (ARF) tienen un papel vital en la prevención del cáncer en humanos, aunque existe cierta controversia a la hora de determinar cuál de las dos tiene mayor peso. Mientras ARF es casi indetectable en los tejidos normales, las señales oncogénicas, como las que provocan las oncoproteínas Ras y MYC, producen un aumento dramático de los niveles de ARF dentro del nucleolo. De este modo, ARF se convierte en un sensor crítico de las señales de hiperproliferación (Drygin y cols., 2010).

Durante la activación del ciclo celular la NPM se fosforila por el complejo ciclina E-cdk2 y se transporta del nucléolo al citoplasma. En el ciclo celular la NPM lleva a cabo múltiples funciones entre las que destaca la duplicación de los centrosomas y el mantenimiento de la estabilidad genómica. Aún no está claro si la NPM tiene funciones oncogénicas o supresoras tumorales, pero se sabe que NPM aparece sobre-expresada en varios tipos de cánceres, por lo que puede estar relacionada con el proceso de tumorigénesis. Las células portadoras de una mutación en el gen que codifica NPM presentan un ARF deslocalizado en el citoplasma, por lo que no puede unirse a Mdm2, afectando a los niveles de p53. Además, la inactivación de NPM induce daño en el DNA y altera la duplicación de los centrosomas. Estos datos indican que NPM tiene un papel crítico en el mantenimiento de la función de p53 y de la estabilidad genómica, actuando como supresor tumoral en condiciones normales. Así, su sobreexpresión parece asociarse a un aumento de la proliferación celular y de la formación tumoral. Los estudios realizados sobre tejidos tumorales han demostrado un aumento de los niveles de NPM, correlacionándose con un aumento del crecimiento celular. Por lo tanto, NPM actúa como regulador del ciclo celular y la proliferación mediante la interacción con múltiples proteínas, incluyendo p53, Mdm2 y ARF. En las células cancerígenas, el aumento de NPM aumenta la expresión de determinadas señales de iniciación del cáncer y la tumorigénesis (Drygin y cols., 2010).

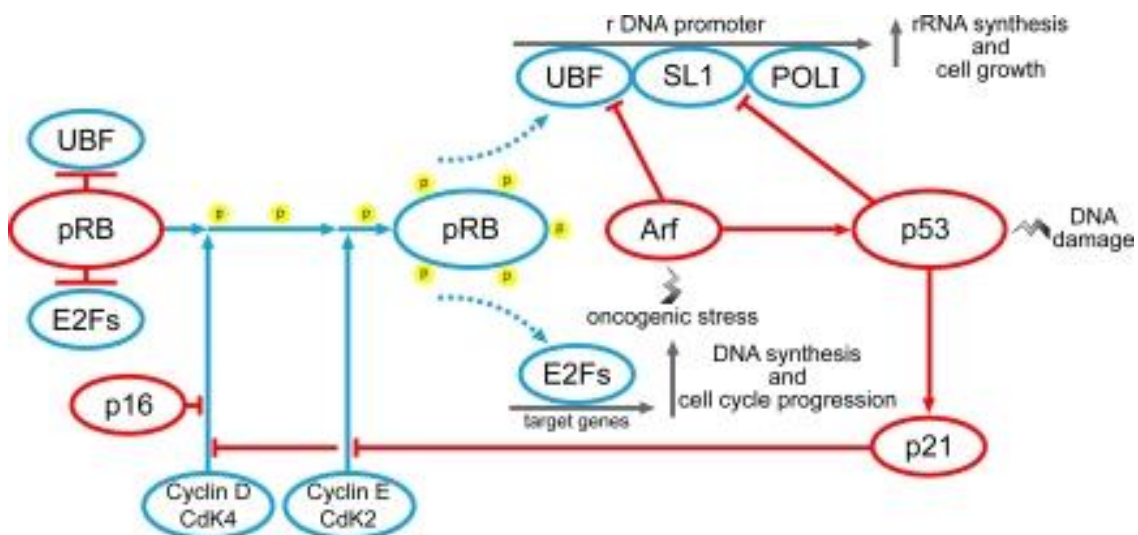


Figura 18. Diagrama simplificado del control de los mecanismos de proliferación y biogénesis de ribosomas por pRb y p53. La forma inactiva de pRb está unida a UBF y E2Fs. Cuando la célula entra en ciclo celular, pRb es fosforilada por Cdk4 y Cdk2, liberando la represión de UBF y E2Fs. UBF, junto a SL1, se unen al promotor de rDNA, permitiendo así su transcripción por la Pol I. El factor de transcripción E2Fs se une al DNA de los genes diana implicados en la progresión de la fase S, permitiendo la progresión del ciclo celular. Si el DNA está dañado, p53 se une a SL1, dificultando su fosforilación mediada por el efecto inhibitorio de p21 sobre Cdk4 y Cdk2, bloqueando así la síntesis de rRNAs. Cdk4 también puede ser bloqueado por p16. La biogénesis de ribosomas también resulta inhibida por ARF, que se une a SL1, estabilizado a p53. Tomado de Montanaro L. y cols, 2008; Am J Pathol, 2008.

Además de ser una factoría de ribosomas, el nucléolo es la diana de proteínas codificadas por genes supresores tumorales y oncogenes, haciendo de esta estructura un centro de control para el correcto funcionamiento celular. Para ello, las células deben generar una correcta respuesta al estrés mediante la modificación de la biogénesis de ribosomas, así como de la expresión de genes supresores tumorales como ARF o p53. La proteína supresora tumoral p53 es la primera molécula que actúa frente al estrés celular producido por la radiación, la hipoxia, las infecciones virales, las señales oncogénicas, etc. Esta proteína tiene niveles variables a lo largo del ciclo celular, siendo máxima durante la mitosis, y mínima durante la fase de activación de la síntesis de rRNA, lo que demuestra su capacidad para regular la organización nucleolar a lo largo de los diferentes estadios del ciclo celular. La capacidad de adaptación del nucléolo a estas circunstancias juega un papel importante en el proceso de la tumorigénesis (Drygin y cols., 2010).

Como hemos visto, los cambios a nivel del nucléolo en las células tumorales reflejan una respuesta adaptativa a las nuevas características funcionales de la célula. Además, es importante destacar el papel del nucleolo en determinadas lesiones tisulares con elevado riesgo de sufrir una transformación maligna. Un ejemplo importante es la enfermedad hepática crónica, causada por el virus de la hepatitis, el abuso de alcohol y errores del metabolismo, que puede derivar en un carcinoma hepático como resultado de las alteraciones genéticas que acontecen en los hepatocitos el transcurso de la enfermedad crónica. Tanto el virus de la hepatitis B (VHB) como de la hepatitis C (VHC) son responsables de la evolución a la cronicidad de la enfermedad hepática. Es importante destacar que proteínas sintetizadas por ambos virus tienen la capacidad de estimular las

RNA Pol I y III, actuando a modo de activadores transcripcionales, además de modular la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular. El proceso de hepatocarcinogénesis que sufren estos pacientes afectados por una infección crónica por el virus VHB está condicionado por la presencia de la proteína HBV X, necesaria para que se produzca la replicación viral, ya que induce la activación del promotor rDNA dependiente de la RNA Pol I, un proceso frecuentemente asociado a la activación de la vía Ras de señalización celular. En este contexto, se cree que el aumento de la producción de ribosomas inducida por las proteínas víricas juega un papel esencial durante la tumorigénesis, aumentando la tasa de proliferación celular. De este modo, las lesiones hepáticas crónicas inducidas por la infección viral, son parcialmente consecuencia de la disfunción nucleolar, haciéndolas susceptibles al proceso de hepatocarcinogénesis (Wang y cols., 1998). La hipertrofia nucleolar que precede al proceso cancerígeno, puede ser independiente de la proliferación celular. De hecho, la mayoría de los hepatocitos en la enfermedad hepática crónica se caracterizan por la presencia de un nucléolo muy aumentado sin que exista proliferación celular. Por ello, la hiperactividad del nucléolo podría contribuir notablemente a la transformación y progresión neoplásica de los hepatocitos afectados con carácter crónico. Además de todos estos procesos, se ha visto que un aumento de la producción de ribosomas, no acoplado con el proceso de división celular, puede alterar los mecanismos de traducción, produciendo variaciones cuantitativas en la síntesis de proteínas específicas que controlan la progresión del ciclo celular, favoreciendo la propia proliferación celular (Derenzini y cols., 2017)

La importancia de relación entre la biogénesis de ribosomas y el cáncer se ha evidenciado, también, a través de una serie de estudios epidemiológicos basados en la relación entre el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y la disminución del riesgo de padecer cáncer (Algra y Rothwell, 2012; Rothwell y cols., 2011, 2012; Thun y cols., 2002, 2012), especialmente en el cáncer de colon (Cao y cols., 2016). Este descubrimiento se basa en el hecho de que el uso de aspirina a dosis terapéuticas ralentiza el proceso de maduración del rRNA, lo que se traduce en una disminución de síntesis de ribosomas en las células humanas. La alteración en la biogénesis de ribosomas se asocia a un impedimento en la degradación de p53 por el proteasoma dependiente de la ubiquitina ligasa Mdm2. Además, un aumento de los niveles de p53 debería contrarrestar el estímulo pro-tumorigénico, generado por la IL-6 durante el proceso inflamatorio, sobre las células epiteliales de la mucosa del colon. Estos resultados son consistentes con el criterio de que la disminución de la actividad de la mayoría de los supresores tumorales conduce a la desregulación de la biogénesis de ribosomas y juega un importante papel en la transformación neoplásica (Derenzini y cols., 2017).

Con toda esta información, se puede concluir que los cambios morfológicos y funcionales que se observan a nivel del nucléolo de las células que conforman un tejido tumoral son el resultado del aumento de las necesidades metabólicas que caracterizan a las células en proliferación. Además, las alteraciones genéticas y epigenéticas que con mayor frecuencia aparecen en los tumores humanos son responsables de la activación de la transcripción de rRNAs. De este modo, es razonable referirnos a este cambio como una forma que tiene el nucléolo de adaptarse a la transformación que están sufriendo las células. Estos

mecanismos adaptativos también se observan en tejidos afectados por determinadas enfermedades con un riesgo elevado de transformación maligna, como es el caso de la enfermedad hepática crónica comentada anteriormente. Así, la biogénesis aberrante de ribosomas es un componente importante en el proceso de carcinogénesis (Montanaro y cols., 2008). En el futuro, la identificación concreta de todos y cada uno de los mecanismos y componentes moleculares y genéticos implicados en estos procesos, nos permitirán desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades con alto riesgo tumoral y el propio cáncer.

8. EL NUCLEOLO COMO DIANA EN LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER

Dado que la desregulación a la alta en la transcripción del rDNA con una transcripción aberrante de la RNA Pol I es una característica del cáncer, los componentes del complejo de la RNA Pol I pueden ser una prometedora diana terapéutica en el cáncer. En este contexto, varias de las terapias actualmente aprobadas para el tratamiento del cáncer tienen como objetivo la inhibición de la síntesis de rRNAs (Drygin y cols, 2010; Hein y cols, 2013). Por otra parte, la transformación celular inducida por oncogenes como c-Myc, podría ser utilizada como una nueva estrategia terapéutica en el cáncer. Es bien conocido que la sobreexpresión de c-Myc induce una vía de señalización dependiente de un aumento de la actividad de la RNA Pol I, acelerando la biogénesis ribosomal. Sin embargo, no es posible atribuir a esta función, por sí sola, la causa de la transformación maligna, pero sí que como un factor esencial en la biogénesis ribosomal.

Entre las drogas utilizadas en la quimioterapia del cáncer, el cisplatino es capaz de inhibir selectivamente la RNA Pol I. El cisplatino es utilizado en múltiples tipos de cáncer, especialmente en carcinomas. La droga se intercala en el DNA, interfiere con la división celular e induce la apoptosis. El estudio de los mecanismos moleculares de acción del cisplatino ha demostrado que tiene una alta afinidad por el UBF, al que secuestra e impide su unión al rDNA y, por consiguiente, su transcripción. De hecho, se ha demostrado una correlación entre los niveles de UBF y la sensibilidad de las células tumorales al cisplatino. En consecuencia, el factor UBF emerge también como una diana terapéutica del cáncer. Otros agentes tales como doxorubicina, la mitoxantrona y la mitomicina-C tienen como diana la producción de ribosomas, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la actividad transcripcional de la RNA Pol I (Drygin y cols, 2010). La actinomicina D, a muy bajas dosis, también inhibe selectivamente la síntesis de rRNA e induce la parada del ciclo y la apoptosis en células tumorales deficientes en pRb o p53 (Tabla 1) (Montanaro y cols, 2007; Lafita-Navarro y cols., 2016).

Los fármacos de la familia de las elipticinas han sido recientemente descubiertos como inhibidores de la transcripción dependiente de la RNA Pol I. Esta droga impide la unión del factor de transcripción SL1 al promotor de los genes ribosomales bloqueando el ensamblaje del complejo iniciador de la transcripción. Se han iniciado ensayos clínicos con estos fármacos, pero no han pasado de la fase II a consecuencia de los efectos adversos que desarrollaban los pacientes. Otra clase de agentes que inhiben el crecimiento celular son el everolimus y

temsirolimus, que alteran la síntesis de ribosomas a través de su acción sobre la actividad de mTOR. Estos fármacos en estudio tienen un efecto inhibitor sobre la síntesis de rRNA y reducen la biogénesis ribosomal a través de la inhibición de la RNA Pol I (Drygin y cols., 2009).

En la última década está apareciendo una nueva generación de fármacos anticancerígenos que han sido diseñados para inhibir de forma selectiva la actividad transcripcional de la Pol I. El más avanzado en su aplicación es el CX-3543 (quarfloxina; Cylene Pharmaceuticals). Esta droga se une a estructuras de cuádruple hélice del DNA (G-cuadruplex DNA) que se forman en regiones ricas en guanina (G-rich) de las repeticiones del rDNA nucleolar. Esta interacción impide la formación del complejo nucleolina-G-cuadruplex DNA y provoca la inhibición de la fase de elongación de la transcripción gobernada por la RNA pol I, la translocación al nucleoplasma de la nucleolina no unida a los G-cuadruplex de rDNA y finalmente la muerte celular por apoptosis. CX-3543 ha completado con éxito los ensayos clínicos de la fase I en pacientes con tumores sólidos (Drygin & cols, 2010). CX-3543 ha sido evaluado como terapia anticancerígena, resultando ser bien tolerado, además de ser clínicamente beneficioso en pacientes con tumores carcinoides y neuroendocrinos en dos ensayos clínicos independientes (Hein y cols., 2013; Drygin y cols., 2009).

Esta última generación de fármacos antineoplásicos con efectos sobre la RNA Pol I incluye también el CX-5461 (Cylene Pharmaceuticals). Este agente impide la unión del complejo transcripcional SL-1/TIF-1B al promotor del rDNA y bloquea la iniciación de la transcripción dependiente de la RNA Pol I, lo que conduce a la inhibición de la proliferación celular (Hein y cols, 2013). La inhibición de la proliferación ha sido confirmada en ensayos preclínicos. Además, CX-5461 tiene una especificidad entre 300-400 veces superior para la RNA Pol I que para Pol II o Pol III. Es importante destacar, que a pesar de la alta tasa de síntesis de ribosomas que presentan las células cancerígenas, la sensibilidad de las mismas a la inhibición de la RNA Pol I varía significativamente entre las diferentes líneas celulares tumorales humanas, siendo los tumores hematológicos con alteración de p53 las más sensibles (Tabla 1). El tratamiento con CX-5461 ha sido muy eficiente en modelos experimentales del linfoma Burkitt en humanos. Los resultados obtenidos con este nuevo fármaco son prometedores, ya que han conseguido una remisión completa de la enfermedad, así como un aumento de la supervivencia a largo plazo en modelos de linfomas B dependientes de MYC. Estos resultados no sólo se relacionan con una disminución en la tasa en la biogénesis de ribosomas, sino también con la activación de p53 y la inducción de apoptosis en las células tumorales. La estabilización de p53 inducida con el tratamiento con CX-5461 se correlaciona con la disrupción del nucléolo. Esto conduce a la liberación nucleolar de determinadas proteínas ribosomales que interactúan con la ubiquitina ligasa de p53, Mdm2, e impiden la ubiquitilación y degradación de p53 (Hein y cols., 2013). Actualmente, el Centro Peter MacCallum de Australia está realizando ensayos clínicos en fase I con este nuevo fármaco en pacientes con cáncer hematológico, evaluando así, el modo en el que la inhibición de la síntesis de ribosomas nos ofrece una nueva vía terapéutica eficaz para la lucha contra el cáncer.

Las terapias que actúan sobre el mecanismo de transcripción mediado por la RNA Pol I presentan ciertas ventajas frente a la quimioterapia o radioterapia que

actualmente se emplean como activadores de p53. Es importante destacar que las terapias que actúan selectivamente sobre la RNA Pol I son significativamente menos tóxicas para el resto de la población de células no tumorales, reduciendo de este modo el riesgo de aparición de tumores secundarios a la acción de estos agentes genotóxicos. De este modo, la estabilización de p53 mediante fármacos no genotóxicos, promete ser una nueva y exitosa vía para el tratamiento de ciertos cánceres. Teniendo en cuenta la gran cantidad de rutas metabólicas y funciones intracelulares, además del papel de p53 como regulador del funcionamiento nucleolar, y su relación con la desregulación celular que presentan las células tumorales, el nucléolo se presenta como una diana clave para las futuras terapias contra el cáncer (Tabla 1; Hein y cols., 2013; Drygin y cols., 2009).

La investigación básica de nuevos compuestos cuya diana es el complejo de la RNA Pol I ha permitido descubrir una nueva molécula de pequeño tamaño con efectos antitumorales, la BMH-21. Este compuesto se une a secuencias del rDNA ricas en GC y reprime la actividad de la RNA Pol I. El mecanismo parece ser dependiente de la degradación por el proteasoma de la subunidad catalítica grande, RPA194, del complejo de la Pol I, lo que potencialmente ofrece una nueva oportunidad terapéutica para el futuro desarrollo (Peltonen y cols., 2014).

| Fármaco | Mecanismo de acción | Impacto sobre la biogénesis de ribosomas | Impacto sobre el nucléolo | Tipo de cáncer |
|-----------------------|--|--|-----------------------------|--|
| Mitomomicina C | Alteración de la hebra de DNA mediante la alquilación de 5-CpG-3 guanósina | Inhibición de la transcripción de la Pol I | Desintegración del nucléolo | Adenocarcinoma, estómago y páncreas, vejiga, mama, cervix, colorectal, cabeza, cuello y cáncer de pulmón no células pequeñas |
| Cisplatino | Alteración del DNA por la alquilación de bases | Inhibición de la transcripción de la Pol I | Desintegración del nucléolo | Testículo, vejiga, pulmón, esófago, estómago, ovario, sarcoma y linfoma |
| Oxaliplatino | Alteración del DNA por la alquilación de bases | Inhibición de la transcripción de la Pol I | Desintegración del nucléolo | Esófago, estómago y carcinoma colorectal |
| Mitoxantrona | Inhibición de la topoisomerasa II | Inhibición de la transcripción de la Pol I | Desintegración del nucléolo | Mama, próstata, hígado, leucemia mieloide y linfoma no Hodgkin |
| Doxorubicina | Inhibición de la topoisomerasa II | Inhibición de la transcripción de la Pol I | Desintegración del nucléolo | Vejiga, mama, estómago, pulmón, ovario, tiroides, leucemia, mieloma y linfoma Hodgkin |
| Camptotecina | Inhibición de la topoisomerasa II | Modulación temprana del procesamiento del rRNA | Desintegración del nucléolo | Ovario, pulmón, colon y cervix |

| | | | | |
|------------------------------------|--|--|---|--|
| Temsirolimus Everolimus | Inhibición de mTOR | Inhibición de la transcripción de la Pol I | No afecta | Carcinoma de riñón, tumores neuroendocrinos de origen pancreático, astrocitoma de células gigantes, cáncer de mama HER2 negativo |
| 5-Fluorouracilo | Incorporación de la timidilato sintetasa al 47S pre-rRNA | Alteración tardía del procesamiento del rRNA | No afecta | Colon, esófago, estómago, recto, mama, vía biliar, cabeza y cuello y carcinomas |
| Homoharringtonina | Inhibición de la translación, evitando la elongación | Alteración tardía del procesamiento del rRNA | No afecta | Leucemia mieloide crónica |
| Actinomicina D | Intercala cadenas dobles de DNA ricas en GC | Inhibición de la Pol I a concentraciones nanomolares | Desintegración del nucléolo | Tumor de Wilms y sarcoma de Ewing |
| CX-3543 | Altera la interacción nucleolina/cuatripletas de G de rDNA | Inhibición selectiva de la Pol I (elongación) | Redistribución de la nucleolina, no afecta a la fibrilarina | Fase clínica I para carcinomas y tumores neuroendocrinos |
| CX-5461 | Inhibe la formación del complejo de pre-inicialización SL-1 del promotor de rDNA | Inhibición selectiva de la Pol I (iniciación) | Desintegración del nucléolo | Fase clínica I para leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple y linfoma |
| Elípticina | Altera el ensamblaje del complejo SL-1 y del complejo promotor del rDNA | Inhibición de la Pol I (iniciación) | No determinado | Fase clínica I y II |

Tabla 1. Quimioterápicos con impacto sobre la biogénesis de ribosomas. Tomado de Hein N. y cols, Trends Mol Med., 2013.

Más de un siglo después de que el italiano Pianese anunciase por vez primera la participación del nucléolo en la carcinogénesis, el estudio del papel del nucléolo en la biología normal y en la patología tumoral y no tumoral ha adquirido una enorme relevancia y ofrece nuevas oportunidades para el diseño de nuevos tratamientos en patologías humanas. El estudio del nucleolo representa un desafío intelectual para los futuros investigadores seducidos por esta intrigante organela esencial para el control de la vida de la célula.

9. BIBLIOGRAFIA

- Alberts B, Johnson A., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2015) *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science.
- Algra AM, Rothwell PM. (2012) Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials. *Lancet Oncol.* 13(5):518-27
- Andersen J.S., Lam Y.W., Leung A.K., Ong S.E., Lyon C.E., Lamond A.I. and Mann M. (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433(7021):77-83
- Batta K., Zhang Z., Yen K., Goffman D.B. and Pugh B.F. (2011) Genome-wide function of H2B ubiquitylation in promoter and genic regions. *Gene Dev* 25(21):2254-2265
- Boisvert F.M., van Koningsbruggen S., Navascues J. and Lamond A.I. (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7):574-585
- Budde A, Grummt I. (1999) p53 represses ribosomal gene transcription. *Oncogene.* 18(4):1119-24
- Bywater MJ, Poortinga G, Sanij E, Hein N, Peck A, Cullinane C, Wall M, Cluse L, Drygin D, Anderes K, Huser N, Proffitt C, Bliesath J, Haddach M, Schwaebe MK, Ryckman DM, Rice WG, Schmitt C, Lowe SW, Johnstone RW, Pearson RB, McArthur GA, Hannan RD. (2012) Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell.* 22(1):51-65
- Cajal SR. (1910) El núcleo de las neuronas piramidales del cerebro humano y de algunos mamíferos. *Trab Invest Biol* 8:27-62
- Cao Y, Nishihara R, Wu K, Wang M, Ogino S, Willett WC, Spiegelman D, Fuchs CS, Giovannucci EL, Chan AT. (2016) Population-wide Impact of Long-term Use of Aspirin and the Risk for Cancer. *JAMA Oncol.* 2(6):762-9
- Cioce M. & Lamond A.I. (2005) Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:105-131
- Cremer T., Cremer M., Dietzel S., Muller S., Solovei I. and Fakan S. (2006) Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18(3):307-316
- Derenzini M, Montanaro L, Treré D. (2009) What the nucleolus says to a tumour pathologist. *Histopathology* 54(6):753-62
- Derenzini M, Pession A, Trerè D. (1990) Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest.* 63(1):137-40
- Derenzini M, Ploton D. (1991) Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol.* 32:149-92

- Derenzini M., Montanaro L. and Tretè D. (2017) Ribosome biogenesis and cancer. *Acta Histochem.* S0065-1281(17)30011-9
- Diesch J, Hannan RD, Sanij E. (2014) Perturbations at the ribosomal genes loci are at the centre of cellular dysfunction and human disease. *Cell Biosci.* 4:43
- Drygin D, Lin A, Bliesath J, Ho CB, O'Brien SE, Proffitt C, Omori M, Haddach M, Schwaebe MK, Siddiqui-Jain A, Streiner N, Quin JE, Sanij E, Bywater MJ, Hannan RD, Ryckman D, Anderes K, Rice WG. (2011) Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res.* 71(4):1418-30.
- Drygin D, Lin A, Bliesath J, Ho CB, O'Brien SE, Proffitt C, Omori M, Haddach M, Schwaebe MK, Siddiqui-Jain A, Streiner N, Quin JE, Sanij E, Bywater MJ, Hannan RD, Ryckman D, Anderes K, Rice WG. (2011) Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res.* 71(4):1418-30
- Drygin D, Rice WG, Grummt I. (2010) The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:131-56
- Dundr M, Misteli T. (2002) Nucleolomics: an inventory of the nucleolus. *Mol Cell.* 9(1):5-7
- Floutsakou I., Agrawal S, Nguyen T.T., Seoighe CI, Ganley A. R. D. & McStay B. (2012) The shared genomic architecture of human nucleolar organizer regions. *Genome Research* 23:2003-2012
- Ganley AR, Ide S, Saka K, Kobayashi T. (2009) The effect of replication initiation on gene amplification in the rDNA and its relationship to aging. *Mol Cell.* 35(5):683-93
- Ghandially F.N. (1988) *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix.* Butterworths.
- Grandori C., Gomez-Roman N., Felton-Edkins Z.A., Ngouenet C., Galloway D.A., Eisenman R.N. and White R.J. (2005) c-MYC binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* 7(3):311-318
- Grummt I., Pikaard CS. (2003) Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(8):641-9
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5):646-74
- Hanahan D. & Weinberg R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70
- Hein N, Hannan K, George A. J., Sanij E. (2013) The nucleolus: an emerging target for cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* 890:1-12

- Henderson AS, Warburton D, Atwood KC. (1972) Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69(11):3394-8
- Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V & Lafontaine D. L. J. (2010) The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *WIREs RNA* 1(3):415-31
- Hernandez-Verdun D. (2011) Structural organization of the nucleolus as a consequence of the dynamics of ribosome biogenesis. *The Nucleolus* 15:3-28
- Hozák P, Cook PR. (1994) Replication factories. *Trends Cell Biol.* 4(2):48-52
- Hozák P, Jackson DA, Cook PR. (1994) Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J Cell Sci.* 107 (Pt 8):2191-202
- Iborra FJ, Pombo A, Jackson DA, Cook PR. (1996) Active RNA polymerases are localized within discrete transcription 'factories' in human nuclei. *J Cell Sci.* 109(6):1427-36
- K. E. Knockenhauer & T. U. Schwartz (2016) The Nuclear Pore Complex as a Flexible and Dynamic Gate. *Cell.* 164(6): 1162–1171
- Klausner Richard D. (2002) The fabric of cancer cell biology – Weaving together the strands. *Cancer Cell* 1:3-9
- Koller PC. (1963) The nucleus of the cancer cell. A historical review. *Exp Cell Res.* 24:SUPPL9:3-14
- Lafarga M., Casafont I., Bengoechea R., Tapia O. and Berciano M.T. (2009) Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus. *Chromosoma* 118(4):437-443
- Lafarga M., Tapia O., Romero AM., Berciano MT. (2016) Cajal bodies in neurons. *RNA Biol* 14:1-14
- Lafita-Navarro M, Blanco R, Mata-Garrido J, Liaño-Pons J, Tapia O, García-Gutiérrez L, García-Alegría E, Berciano MT, Lafarga M, León J. (2016). MXD1 localizes in the nucleolus, binds UBF and impairs rRNA synthesis. *Oncotarget* 7:69536-69548
- Lamond AI, Spector DL. (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(8):605-12
- Ma T., Keller J.A. & Yu X. (2011) RNF8-dependent histone ubiquitination during DNA damage response and spermatogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43(5):339-345
- Machyna M., Heyn P. & Neugebauer K.M. (2013) Cajal bodies: where form meets function. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4(1):17-34

- Maggi Jr. Leonard B., D. Ph and Weber Jason D. (2005) Nucleolar adaptation in human cancer. *Cancer Invest.* 23(7):599-608
- Mais C, Wright JE, Prieto JL, Raggett SL, McStay B. (2005) UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev.*19(1):50-64
- Malumbres M. & Barbacid M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews* 9:153-166
- Montanaro L., Treré D., Derenzini M. (2008) Nucleolus, ribosomes and cancer. *Am J Pathol* 173(2):301-10
- McStay B (2016) Nucleolar organizer regions: genomic 'dark matter' requiring illumination. *Genes & Development* 30:1598-1610
- McStay B. & Grummt I. (2008) The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24:131-57
- McStay B. & Grummt I. (2008) The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Cell Dev. Biol.* 24:131-157
- Meldi L. & Brickner J.H. (2011) Compartmentalization of the nucleus. *Trends Cell Biol* 21(12):701-708
- Misteli T. (2007) Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 128(4):787-800
- Misteli T., Spector D. (2011) *The Nucleolus*. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York
- Montanaro L, Mazzini G, Barbieri S, Vici M, Nardi-Pantoli A, Govoni M, Donati G, Treré D, Derenzini M. (2007) Different effects of ribosome biogenesis inhibition on cell proliferation in retinoblastoma protein- and p53-deficient and proficient human osteosarcoma cell lines. *Cell Prolif.* 40(4):532-49.
- Montanaro L, Treré D, Derenzini M. (2012) Changes in ribosome biogenesis may induce cancer by down-regulating the cell tumor suppressor potential. *Biochim Biophys Acta.*1825(1):101-10
- Montanaro L, Treré D & Derenzini M. (2008) Nucleolus, ribosomes and cancer. *The American Journal of Pathology* 173:301-310
- Moore M.J. & Proudfoot N.J. (2009) Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136(4):688-700
- Mosgoeller W, Schöfer C, Steiner M, Sylvester JE, Hozák P. (2001) Arrangement of ribosomal genes in nucleolar domains revealed by detection of "Christmas tree" components. *Histochem Cell Biol.* 116(6):495-505
- Munshi A., Shafi G., Aliya N. & Jyothy A. (2009) Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* 36(2):75-88

- Németh A & Längst G (2011) Genome organization in and around the nucleolus. *Trends in Genetics* 27(4):149-156
- Peltonen K, Colis L, Liu H, Trivedi R, Moubarek MS, Moore HM, Bai B, Rudek MA, Bieberich CJ, Laiho M. (2014) A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell*. 25(1):77-90.
- Peltonen K, Colis L, Liu H, Trivedi R, Moubarek MS, Moore HM, Bai B, Rudek MA, Bieberich CJ, Laiho M. (2014) A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell*. 25(1):77-90
- Peterson C.L. & Laniel M.A. (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14(14):R546-551
- Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. (1986) Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J*. 18(1):5-14
- Quin Jaclyn E., Devlin Jennifer R., Cameron Donald, Hannan Kate M., Pearson Richard B., Hannan Ross D. (2014) Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842:802-816
- Raska I, Shaw PJ, Cmarko D (2006) New insights into nucleolar architecture and activity. *Int Rev Cytol*. 255:177-235
- Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JF, Meade TW, Mehta Z. (2012) Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet*. 379(9826):1591-601
- Ruggero D., Pandolfi PP. (2003) Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 3(3):179-92
- Schlesinger S., Selig S., Bergman Y. & Cedar H (2009) Allelic inactivation of rDNA loci. *Genes Dev*. 23(20):2437-47
- Schmickel RD. (1973) Quantitation of human ribosomal DNA: hybridization of human DNA with ribosomal RNA for quantitation and fractionation. *Pediatr Res*. 7(1):5-12
- Schneider R. & Grosschedl (2007) Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* 21(23):3027-3043
- Sirri V., Urcuqui-Inchima S., Roussel P. and Hernandez-Verdun D. (2008) Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129(1):13-31
- Smetana K, Gyorkey F, Gyorkey P, Busch H. (1970) Studies on the ultrastructure of nucleoli in human smooth muscle cells. *Exp Cell Res*. 60(2):175-84

- Smirnov E., Cmarko D., Mazel T., Hornáček M., Raska I. (2016) Nucleolar DNA: the host and the guests. *Histochem Cell Biol* 145:359-372
- Stults DM, Killen MW, Pierce HH, Pierce AJ. (2008) Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. *Genome Res.*18(1):13-8
- Stults DM, Killen MW, Williamson EP, Hourigan JS, Vargas HD, Arnold SM, Moscow JA, Pierce AJ. (2009) Human rRNA gene clusters are recombinational hotspots in cancer. *Cancer Res.* 69(23):9096-104
- Takada H., Kurisaki A. (2015) Emerging roles of nucleolar and ribosomal proteins in cancer, development, and aging. *Cell Mol Life Sci.* 72(21):4015-25
- Tapia O., Lafarga V., Bengoechea R., Palanca A., Lafarga M. and Berciano M.T. (2014) The SMN Tudor SIM-like domains is key to SmD1 and coilin interactions and to Cajal body biogenesis. *J Cell Sci.* 127(Pt 5):939-46
- Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst.* 94(4):252-66
- Thun MJ, Jacobs EJ, Patrono C. (2012) The role of aspirin in cancer prevention. *Nat Rev Clin Oncol.* 9(5):259-67
- Trerè D. (2000) AgNOR staining and quantification. *Micron.* 31(2):127-31
- Varlakhanova NV, Knoepfler PS. (2009) Acting locally and globally: Myc's ever-expanding roles on chromatin. *Cancer Res.* 69:7487-90
- Visintin M, Tse E, Axelson H, Rabbitts TH, Cattaneo A. (1999) Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(21):11723-8
- Vogelstein B & Kinzler K. W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* 10(8):789-799
- Vogelstein B., Kinzler KW. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.*10(8):789-99
- Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. (1998) Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol.* 18(12):7086-94
- Weinberg K.A. (2007) *Biology of Cancer.* Garland Science.
- Weipoltssammer K & Schöfer C (2016) Morphology of nuclear transcription. *Histochem Cell Biol* 145:343-358
- Williams GH, Romanowski P., Morris L., Madine M., Mills AD., Stoeber K., Marr J., Laskey RA., Coleman N. (1998) Improved cervical smear assessment

using antibodies against proteins that regulate DNA replication. Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14932-7

Zhang R. & Adams PD. (2007) Heterochromatin and its relationship to cell senescence and cancer therapy. Cell Cycle 6(7):784-9