



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Daño en el DNA en neuronas: importancia en procesos
neurodegenerativos.**

DNA damage in neurons: importance in
neurodegenerative diseases.

Autora: Dña. Marina Erola Moreno

Director: D. Miguel A. Lafarga Coscojuela

Santander, junio 2019

Agradecimientos

Quiero tomarme la licencia creativa para, en primer lugar, hacer una pequeña reflexión sobre la vida. Es bien conocido por todos que para alcanzar una meta, lo que uno desea, se requiere gran esfuerzo y dedicación. No obstante, en ocasiones cae en olvido una parte variable y azarosa, que quizá sea menos casual de lo que uno quiera reconocer, y es en esta donde tienen cabida todas las personas con las que uno se encuentra a lo largo de su historia. Así pues, me siento en la obligación de agradecer a todos aquellos a los que la vida ha situado en mi trayectoria. Gracias por hacer de mí quien soy ahora.

En especial, quiero agradecer a Miguel por toda la dedicación que ha puesto en este trabajo, porque personas como él, que aman lo que hacen y transmiten ese amor a otros, son aquellas que hacen una distinción en vidas ajenas. Y eso, a mi parecer, es la huella más profunda que un ser humano puede dejar sobre la tierra.

Quiero darle las gracias a mis padres, porque sin saberlo guiaron mis pasos hacia la ciencia y es aquí, donde he descubierto que yace el misterio, que alimenta la curiosidad y crea así el conocimiento. También quiero dar las gracias a mis amigas y compañeras de carrera por el apoyo mutuo que nos hemos brindado, por las risas que nos hemos dibujado cuando la monotonía y presión caía sobre nosotras. Y por último, quiero agradecer a Sara por clarificar mi visión cuando esta se torna borrosa y tener la capacidad de calmar el mar cuando este se agita.

ÍNDICE

PALABRAS CLAVE	5
ABSTRACT	7
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. METODOLOGÍA	9
3. NÚCLEO CELULAR	9
3.1. Envoltura nuclear.....	10
3.1.1. Lámina nuclear	11
3.1.2. Complejo nuclear del poro	13
3.2. Transcripción de DNA y procesamiento de RNA	15
3.3. Compartimentos nucleares	17
3.3.1. Nucleolo	18
3.3.2. Cuerpos nucleares de Cajal	21
3.3.3. “Speckles” nucleares	23
4. ESTRUCTURA DE LA CROMATINA	24
4.1. Niveles de plegamiento del DNA	24
4.2. Eucromatina y heterocromatina.....	26
4.2.1. Eucromatina	26
4.2.2. Heterocromatina	27
4.3. Dominios asociados topológicamente (TADs).....	28
5. DAÑO Y REPARACIÓN DEL DNA.....	30
5.1. Introducción.....	30
5.2. Mecanismos de reparación del daño en el DNA: la vía NHEJ	32
6. DAÑO EN EL DNA Y NEURODEGENERACIÓN	35
6.1. Daño en el DNA y envejecimiento neuronal	35
6.2. Daño en el DNA en las enfermedades neurodegenerativas.....	38
6.2.1. Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con DSBR	39
6.2.2. Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con SSBR	40
6.2.3. Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con NER.....	41

6.2.4. Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la expansión de repeticiones de trinucleótidos	42
6.2.5. Otras enfermedades neurodegenerativas	43
7. RESPUESTA NEURONAL AL DAÑO EN EL DNA.....	45
7.1. Estructura del núcleo neuronal: Organización de la cromatina.....	45
7.2 Reparación del daño en el DNA neuronal: focos de lesión transitorios y permanentes.....	48
7.2.1. Respuesta al daño del DNA	48
7.2.2. Organización espaciotemporal y dinámica de los focos de lesión en neuronas: focos transitorios y permanentes	49
7.3 Organización de la cromatina en los focos de lesión permanente.....	51
7.4 Influencia del daño en el DNA sobre la expresión génica	52
7.5 Asociación espacial de los focos de daño permanente con microambiente de represión transcripcional	54
7.6 Identificación de las secuencias de DNA más vulnerables al daño en el DNA y su implicación en procesos neurodegenerativos	55
8. BIBLIOGRAFÍA.....	59

PALABRAS CLAVE

DDR	Respuesta al daño del DNA (“DNA damage repair”)
NHEJ	Reparación por unión de extremos no homólogos (“Non homologous end joining”)
CB	Cuerpos de Cajal
SN	Speckles nucleares
NETs	Proteínas transmembrana
MNI y MNE	Membrana nuclear interna y externa de la envoltura nuclear
NPCs	Complejo del poro nuclear
Nups	Nucleoporinas
TAD	Dominio asociado topológicamente
LAD	Dominios de cromatina asociados a lámina nuclear
LOCKDs	<i>Grandes dominios de organización de la cromatina (“Large organized chromatin k domains”)</i>
HATs / HDACs	Histona acetiltransferasas / deacetilasa
HDMs	Histona desmetilasas
CBEs	Elementos aislantes (“Chromatin boundary elements”)
CTCF	Factor de unión a secuencia específica CCCTC-
snoRNP	Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas
snRNP	Ribonucleoproteínas nucleares
UsnRNAs	Molécula de RNA rica en uracilo
DSB / SSB	Rotura de doble hebra / de hebra simple (“Double-stranded break” / “single-stranded break”)
DSBR / SSBR	Reparación de la rotura de doble hebra / de hebra simple
HR	Recombinación homóloga
NER	Reparación por excisión de nucleótidos

BER	Reparación por excisión de bases
γH2AX	H2AX fosforilada, marcador de daño en el DNA
ATM	Proteína quinasa "Ataxia telangiectasia mutada"
TP53BP1 o 53BP1	"Tumor protein P53 binding protein", proteína implicada en la vía NHEJ
AT	Ataxia telangiectasia
ATLD	"Ataxia telangiectasia like-disease"
NBS1	"Nijmegen breakage syndrome"
AOA1	Apraxia oculomotora
APTX	Aprataxina
SCAN1	Neuropatía axonal
CS	Síndrome de Cockayne
TTD	Tricotiodistrofia
XP	Xeroderma pigmentosa
HD	Enfermedad de Huntington
FXS	Síndrome de X frágil
AD	Enfermedad de Alzheimer
PD	Enfermedad de Parkinson
ALS	Esclerosis lateral amiotrófica
IRIF	Focos inducidos por radiación ("Irradiation induced foci")
PDDF	Focos de lesión permanente ("Persistent DNA damage foci")
IR	Radiación ionizante
ME	Microscopía electrónica
MO	Microscopía óptica

ABSTRACT

Neurons are highly vulnerable to DNA damage by genotoxic agents. These could be endogenous, for example by oxidative stress produced by oxidative mitochondrial metabolism; or exogenous, such as ionizing radiation (IR) or chemotherapeutic drugs. Neurons are cells with a high metabolic and transcriptional rate whose genomic information are at high risk of being damaged, particularly by the generation of double strand breaks (DSBs). To avert the detrimental effects of DNA damage in genome stability, neurons perform a complex and robust DNA damage repair response (DDR), without triggering apoptosis, which prevent the production of aberrant mRNA and protein encoded by the damaged genes. Importantly, neurons are post-mitotic cells that cannot use a sister chromatid as a template to DNA repair by the homologous recombination pathway. Consequently, DNA damage in neurons is repaired by non homologous end joining (NHEJ), an error prone mechanism. Nevertheless, defects in reparation cause less genomic instability than unrepaired strand breaks. Consequently, a defective DDR leads to an accumulation of unrepaired DNA damage and therefore loss of genomic integrity. Recent experimental evidences suggest that persistent damage or defective DDR underlie brain aging and neurodegenerative diseases. Understanding how neurons tolerate persistent DNA damage without triggering apoptosis, as well as defining the genomic regions that are more vulnerable to DNA damage, is essential to find new potential targets for neurodegenerative diseases.

RESUMEN

Las neuronas son células muy vulnerables a sufrir daños en el DNA por agentes genotóxicos. Estos pueden ser endógenos, por el estrés oxidativo que se produce durante el metabolismo oxidativo mitocondrial; o bien exógenos, como los generados por radiación ionizante o agentes quimioterápicos. Las neuronas, al ser células con un elevado metabolismo, presentan un alto riesgo de sufrir daños en su material genético, particularmente roturas de la doble cadena del DNA (DSBs). Estas lesiones producen una gran inestabilidad genómica, por lo que las neuronas activan complejos mecanismos de reparación (“DNA damage repair”, DDR) que, sin desencadenar la apoptosis, evitan la transcripción de un DNA dañado, lo cual impide la formación de proteínas anómalas. Como peculiaridad, las neuronas son células post-mitóticas, por lo que no poseen una cromátida hermana que sirva como molde para su reparación. Por ello, el DNA neuronal se repara mediante la unión de extremos no homólogos (“non-homologous end-joining”, NHEJ), mecanismo con una alta tasa de error. No obstante, la reparación anómala genera menos inestabilidad que la persistencia del daño. De esta forma, una alteración en los mecanismos de reparación, conduce a una acumulación de DNA dañado no reparado y, por tanto, a una pérdida de la integridad genómica. Así, el daño persistente o la alteración de la

DDR parece ser la base del envejecimiento neuronal, así como de diversas patologías neurodegenerativas. Por ello, es fundamental entender cómo toleran las neuronas la acumulación del DNA dañado sin desencadenar la apoptosis, así como estudiar si existen regiones genómicas más vulnerables a sufrir daño en el DNA, presumiblemente implicadas en la fisiopatología de procesos neurodegenerativos, que puedan ser potenciales dianas terapéuticas. —

1. INTRODUCCIÓN

El núcleo celular incluye varios compartimentos dinámicos, no limitados por membrana, que están implicados en la replicación, transcripción y reparación del DNA, así como en el procesamiento y transporte de RNAs. Así, el compartimento cromosómico, donde se localizan los cromosomas interfásicos, contiene la cromatina con sus dos componentes, eucromatina y heterocromatina. Por su parte, el compartimento intercromosómico engloba varios subcompartimentos, particularmente el nucleolo, los cuerpos nucleares de Cajal, los “speckles nucleares” y otros cuerpos nucleares (Proudfoot et al., 2002; Misteli, 2005; Berciano et al., 2002; Lafarga et al., 2017). Las neuronas poseen una cromatina predominantemente laxa, en forma de eucromatina, que es muy proclive a sufrir daños que alteren su estructura, como son las DSBs, debido a su conformación “abierta” que facilita el acceso a agentes genotóxicos endógenos y exógenos. Esta conformación “abierta” de la cromatina es necesaria para mantener una elevada tasa de transcripción. Por otra parte, la intensa actividad del metabolismo oxidativo requerida para sostener la bioenergética neuronal, produce niveles altos de especies reactivas de oxígeno (ROS) que, potencialmente, son muy dañinas para el DNA (Soria et al., 2012; Casafont et al., 2011).

Este trabajo de revisión se centra en la respuesta neuronal al daño en el DNA y en sus diferentes vías de reparación. Prestaremos especial atención a los estudios realizados en un modelo experimental de neuronas ganglionares y de la corteza cerebral de ratas que han sido expuestas a una dosis subletal (4 Gy) de radiaciones ionizantes (IR) con rayos X, dosis que mantiene la supervivencia neuronal y permite estudiar la organización y dinámica nuclear de la DDR (Casafont et al., 2011; Mata-Garrido et al., 2016, 2018). La IR genera DSBs, que se pueden visualizar con inmunocitoquímica por la formación de focos nucleares inmunomarcados para la forma fosforilada de la histona H2AX (γ H2AX), marcador del daño del DNA. En neuronas, las DSBs se reparan por la vía NHEJ. En respuesta a las DSBs, las quinasas ATM y DNA-PK fosforilan la histona H2AX en el sitio de lesión y reclutan los factores necesarios para la reparación (Fernandez-Capetillo et al., 2004). La eucromatina neuronal es muy vulnerable al daño en el DNA (DSBs), pero, como contrapartida, permite un rápido acceso a la maquinaria de reparación gracias a su conformación abierta. Cuando se activa la NHEJ se generan numerosos y pequeños IRIF (“irradiation-induced foci”) γ H2AX-positivos en los sitios de DSBs, al tiempo que se inhibe la

transcripción global de la célula para evitar la expresión de mRNAs y proteínas aberrantes. La mayoría de estos IRIF son transitorios y desaparecen 24h después de la inducción del daño, recuperándose también la práctica totalidad la tasa de transcripción. Sin embargo, los DSBs que no han sido reparados o que son irreparables se agrupan en unos pocos focos en los que persiste la señalización del daño, denominados focos persistentes de daño en el DNA (“persistent DNA damage foci”, PDDF). Tales focos se aíslan de la eucromatina adyacente y adoptan una conformación especial de la cromatina para silenciar los genes dañados, mantener la estabilidad genómica y no interferir con la expresión de los genes no dañados, permitiendo la supervivencia neuronal (Mata-Garrido et al., 2016, 2018). No obstante, la acumulación de daño en el DNA subyace en el envejecimiento neuronal y juega también un importante papel en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas (Madabhushi et al., 2014; Casafont et al., 2011).

2. METODOLOGÍA

Este Trabajo de Fin de Grado (TFG) ha sido planteado en forma de revisión bibliográfica, basándose fundamentalmente en artículos indexados en PubMed y páginas dedicadas al núcleo celular y al daño en el DNA. En particular, la bibliografía revisada se ha centrado en: **i)** características del núcleo celular, especialmente de la estructura de la cromatina; **ii)** vías de reparación del daño del DNA, prestando especial atención a la NHEJ, mecanismo principal por el cual se repara el DNA en neuronas; **iii)** implicación del daño en el DNA en el envejecimiento neuronal y en las enfermedades neurodegenerativas; **iv)** respuesta al daño del DNA en neuronas: organización de los focos de lesión y reparación del DNA en compartimentos específicos de cromatina; **v)** identificación de secuencias de DNA más vulnerables al daño y su implicación en enfermedades neurodegenerativas. Dicha revisión ha sido complementada con el análisis con microscopía electrónica de un modelo experimental de ganglio raquídeo, del que se han obtenido algunas de las imágenes presentadas en este TFG. –

3. NÚCLEO CELULAR

El núcleo celular es característico de las células eucariotas y es aquí donde se almacena la información genética (Fig.1). El núcleo está limitado por la envoltura nuclear y se organiza en múltiples compartimentos nucleares, no limitados por membrana, que están implicados en las funciones nucleares, tales como la replicación y transcripción del DNA, procesamiento y exportación de RNAs, biogénesis de ribosomas en el nucleolo y reparación del daño en el DNA. Los compartimentos nucleares incluyen el dominio cromosómico, constituido por los territorios cromosómicos -el subvolumen nuclear ocupado por cada cromosoma en la interfase- y el dominio intercromosómico en el que se localizan el nucleolo, los cuerpos nucleares de Cajal (“Cajal bodies” en la

literatura internacional), las áreas de factores de “splicing” (“Nuclear speckles”) y otras estructuras nucleares como los cuerpos PML (“promyelocytic Leukemia”) y los clastosomas (Berciano et al., 2002; Lafarga et al., 2009; Moore & Proudfoot, 2009; Spector & Lamond, 2011).

3.1. Envoltura nuclear

La envoltura nuclear (NE) se compone de una doble membrana que delimita el compartimento nuclear del compartimento citoplasmático. Tenemos así la membrana nuclear interna (MNI), la membrana nuclear externa (MNE) y, entre ambas, el espacio perinuclear que se continua con el lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER). La MNI está en contacto por su cara nucleoplásmica con la lámina nuclear, estructura que forma parte del citoesqueleto de filamentos intermedios que son polímeros de las proteínas denominadas láminas, mientras que la MNE se continua con el RER. La NE está interrumpida por pequeñas aperturas conocidas como complejos del poro nuclear, responsables de regular el tránsito núcleo-citoplasma de RNAs y proteínas (Talamas & Capelson, 2015) (Fig.2 y 3).

Durante años se ha creído que la NE era simplemente una barrera que protegía el genoma. Sin embargo, ahora sabemos que junto con las proteínas transmembrana (NETs), las proteínas solubles asociadas, la lámina nuclear y el complejo del poro, está implicada en funciones celulares como la organización del genoma, la migración y posicionamiento de los cromosomas en el espacio nuclear, la regulación del ciclo celular, la señalización y la diferenciación celular (Gomez-Cavazos & Hetzer, 2012).

De esta forma, cuando se requiere reprimir o facilitar la transcripción de un gen, se produce una modificación en la composición de la NE. Así, las NETs se reorganizan generando un cambio en las interacciones con la lámina nuclear y

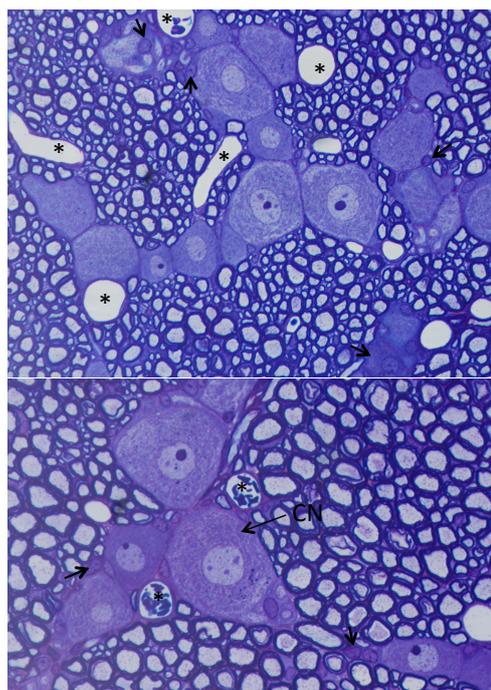


Figura 1. Neuronas de ganglio sensitivo. Se distinguen los somas neuronales por su prominente núcleo en el que se distingue un gran nucleolo, que frecuentemente aparece en la periferia. Además, se observan los cuerpos de Nissl (CN), como gránulos basófilos dispersos por el citoplasma. Entre los cuerpos neuronales, dando soporte estructural, se disponen células de la glía (flecha). Los axones neuronales se observan en cortes transversales, en los que la mielina aparece muy basófila. Asterisco: vasos. Imagen de ME con tinción azul de toluidina cedida por Lafarga M.

con la cromatina de forma directa (Talamas & Capelson, 2015). De modo que cuando se requiere silenciar un gen, éste interacciona con las diferentes estructuras de la NE promoviendo una compactación de la cromatina en la periferia nuclear. Esto es fundamental en la diferenciación celular ya que se crean patrones característicos en la disposición espacial del genoma y de sus territorios cromosómicos en cada tipo celular; así como también es importante en distintos estados patológicos en los que se encuentra modificada esta organización. Así, en estudios realizados en células pulmonares (neumocitos) y hepáticas (hepatocitos) de ratón se ha visto que el cromosoma 5 tiende a situarse en la periferia nuclear de los neumocitos, mientras que toma una disposición central en el núcleo de los hepatocitos (Parada et al., 2004). Además, se ha demostrado que la disposición periférica observada en los neumocitos está favorecida por su interacción directa con cinco NETs (NET 5, NET 29, NET 39, NET 45, NET 47). Por tanto, es evidente que las NETs están directamente implicadas en la formación de los patrones específicos de organización cromosómica en los distintos tipos celulares (Zuleger et al., 2013).

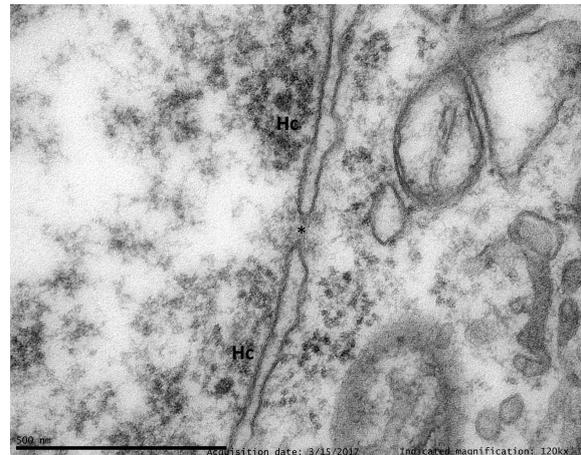


Figura 2. Estructura de la envoltura nuclear. Se encuentra separando el nucleoplasma (izquierda) del citoplasma (derecha). En su porción nucleoplásmica, se diferencia la MNI, a la que se asocian dominios de heterocromatina (Hc). En su porción citoplásmica, se distingue la membrana nuclear externa. Entre ambas, el espacio perinuclear. Asterisco: NPC, donde se distingue una porción central más pálida donde se sitúan las Nups FG.

El receptor de la lámina B (LBR) es un tipo de proteína transmembrana que interactúa de forma directa con la lámina B y la HP1 (proteína de la heterocromatina 1), interaccionando así de forma indirecta con la heterocromatina. No obstante, recientemente se ha observado mediante “arrays” de las colas peptídicas de diversas histonas, que el dominio nucleoplásmico de LBR también se une a marcas específicas de heterocromatina como H4K20me2, H4K20ac, H4R19me2, H4R20me2 (Hirano et al., 2012).

3.1.1. Lámina nuclear

La lámina nuclear es una malla de filamentos intermedios tipo V que recubre la cara nucleoplásmica de la MNI, está compuesta por láminas de las que existen cuatro tipos: A, B1, B2 y C. Las láminas A y C son dos isoformas del transcrito de un mismo gen (*LMNA*), mientras que las láminas B1 y B2 se transcriben de dos genes distintos (*LMNB1* y *LMNB2*). Cada tipo celular expresa distintos

niveles de cada lámina y, además, su concentración influye en el proceso de diferenciación celular. Su función es la de dar soporte estructural al núcleo, pero además, junto a las NETs, es responsable de la organización espacial del genoma (Ho & Lammerding, 2012).

En la mayor parte de los tipos celulares, la heterocromatina adopta una disposición periférica, distribución que aumenta con el grado de diferenciación celular. Esto se ha puesto en evidencia gracias a la inmunoprecipitación y posterior secuenciación masiva de los “grandes dominios de organización de la cromatina” (LOCKDs, “*large organized chromatin k domains*”), que son dominios con abundantes marcas de histonas modificadas, particularmente la H3K9me2, características de la heterocromatina. Se ha visto que la presencia de LOCKDs aumenta de un 17,5-24% en células troncales humanas a un 39,3-44,8% en células diferenciadas (Wen et al., 2009, 2012). Los LOCKDs, además, se solapan con los “dominios de cromatina asociados a lámina nuclear (LADs)”, particularmente a la lámina B1 (“*lamin B1 associated chromatin domains*”), lo que indica que la lámina B1 es responsable de la disposición periférica de la heterocromatina. Asimismo, los LADs parecen estar formados en su mayor parte por genes silentes, lo que apoya la idea de que la lámina nuclear es una zona de represión transcripcional (Amendola & Van Steensel, 2014; Peric-Hupkes et al., 2010) (Fig.16).

En el proceso de diferenciación celular se producen modificaciones en la distribución de la heterocromatina. Así, existe tanto en células madre como en células diferenciadas un patrón característico de LADs periféricos. No obstante, con cada etapa de la diferenciación se produce una reorganización de los mismos, dando lugar a cambios en la expresión génica que tienen como finalidad perder las propiedades de pluripotencialidad, para así poder expresar genes específicos del tipo celular (Peric-Hupkes et al., 2010).

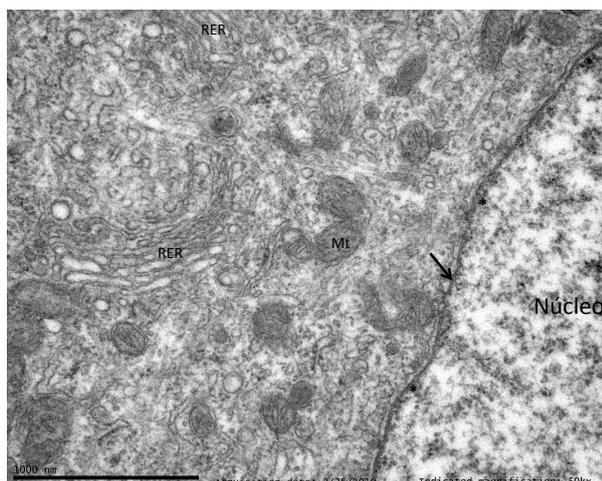


Figura 3. Envoltura nuclear separando el citoplasma del nucleoplasma. A la izquierda se encuentra el citoplasma, donde se observan numerosas mitocondrias (Mt), así como cortes horizontales y sagitales del retículo endoplásmico rugoso (RER). A la derecha se dispone el núcleo, en el que predomina cromatina en su forma laxa; aunque se observan pequeños dominios de heterocromatina asociados a la envoltura nuclear (asterisco). Patrón de cromatina característico en las neuronas. Flecha: envoltura nuclear.

Sin embargo, no siempre encontramos este patrón de distribución de la cromatina nuclear. En un estudio genético llevado a cabo en ratones, Solovei et al. (2013) han demostrado que en el núcleo de los bastones de la retina de mamíferos nocturnos existe un patrón de cromatina invertido. En este caso, la eucromatina está dispuesta en la periferia, mientras que la heterocromatina se encuentra en el interior celular. Esta peculiaridad le concede mayor capacidad para la transmisión lumínica, lo que adapta a estos animales para la visión nocturna. Este grupo descubrió que en estos núcleos celulares la expresión de LBR y lámina A/C estaba ausente, mientras que en otros tejidos y en bastones de animales diurnos alguna de estas dos proteínas es expresada. Además, vieron que al modificar la expresión de LBR en los bastones de los ratones transgénicos, la heterocromatina adoptaba la conformación periférica típica. Por tanto, las láminas A y C, así como el LBR están también implicados en la disposición periférica de la heterocromatina (Amendola & van Steensel, 2014).

3.1.2. Complejo nuclear del poro

Los complejos del poro nuclear (NPCs) son estructuras multiprotéicas que forman canales selectivos semipermeables a lo largo de la envoltura nuclear, facilitando así el intercambio nucleocitoplasmático de moléculas. El NPC está compuesto por múltiples copias de unas 30 proteínas diferentes llamadas nucleoporinas (“Nups”), que se disponen dando lugar a una estructura con una alta simetría rotacional, muy conservada a lo largo de la evolución. El núcleo del NPC está constituido por una estructura en forma de anillo, embebida en la envoltura nuclear, que se dispone alrededor de un canal central. A su vez, este anillo se ancla a distintas estructuras accesorias que son, una malla de Nups ricas en repeticiones de fenilalanina-glicina (“FG Nups”) que rellena el canal central, los filamentos citoplasmáticos y la cesta nuclear que se extienden al citoplasma y nucleoplasma, respectivamente (D’Angelo and Hetzer, 2008) (Fig.4). Es interesante señalar que, mientras las Nups que conforman el anillo central son componentes estables de la estructura, las que forman parte de la cesta nuclear o las FG-Nups son altamente dinámicas. Estas últimas pueden pasar a formar parte de la estructura del NPC o bien dejar de hacerlo en pocos segundos (Rabut et al., 2004).

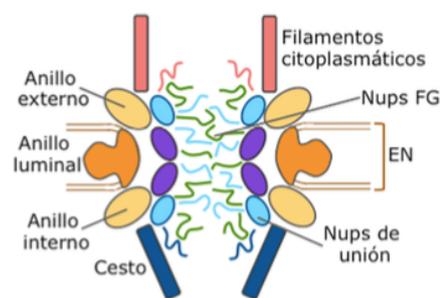


Figura 4. Estructura del NPC: Organización de las Nups. Las malla de FG Nups se dispone ocupando el canal central, extendiéndose hacia el citoplasma, donde se asocia a los filamentos citoplasmáticos, y hacia el nucleoplasma, donde se une a la cesta nuclear. Imagen tomada de Mata-Garrido J, 2016.

Hay evidencia de que la presencia de un tipo u otro de Nups está relacionada con la diferenciación celular y algunos estados patológicos de la célula. Por ejemplo, Nup133, un tipo de Nup estable que forma parte del anillo de NPC ha demostrado ser necesaria para la diferenciación neuronal en ratones. En ratones transgénicos en los que se ha mutado ambos alelos de Nup133, se ha visto que las células madre neuronales no son capaces de diferenciarse a neuronas, provocando así la muerte del ratón (Lupu et al., 2008).

Gracias a su papel en el transporte nucleocitoplasmático, el NPC juega un papel fundamental en la regulación génica, ya que controla la importación de factores de señalización y transcripción que ingresan en el núcleo, así como la exportación de mRNAs recién sintetizados. Además, las Nups de forma individual están implicadas en la organización del genoma y la expresión génica por su unión directa con regiones específicas de la cromatina (Talamas & Capelson, 2015). Así, en múltiples estudios realizados en genomas de distintas especies, se ha encontrado que las Nups se unen tanto a regiones de la cromatina con genes activos como a genes silentes.

El NPC se asocia con regiones de cromatina descondensada transcripcionalmente activa. Esto es la base de la hipótesis de activación génica (“gene gating hypothesis”), la cual se basa en la interacción de los NPCs con la eucromatina, lo que permite el acoplamiento entre transcripción y una rápida exportación del mRNA naciente a nivel del NPC (Blobel, 1985). En estudios con levaduras se ha demostrado que la interacción genoma-NPC implica componentes del complejo histona acetiltransferasa (HAT) SAGA, responsables de la acetilación características de la eucromatina (Rodríguez-Navarro et al., 2004), los complejos TREX2 y THO-TREX que se unen a la cesta nuclear para permitir la exportación del mRNA naciente (Rougemaille et al., 2008), y el factor de transcripción Put3.

A esta interacción eucromatina-NPC se le ha atribuido, además, un papel en la “memoria” epigenética. Así, se ha demostrado en levaduras que los genes *INO2*, *GAL* y *HXK1* permanecen asociados al NPC, una vez inducidos, durante varias generaciones después de ser reprimidos. Esto es importante, ya que esta asociación facilita la transcripción durante la reinducción de los mismos (Light et al., 2010), suponiendo una forma de marcar los genes que van a ser posteriormente reactivados.

Asimismo, el NPC se une a regiones con genes transcripcionalmente inactivos y a elementos aislantes de la cromatina (CBEs, “chromatin boundary elements”) como el factor CFCT. Los CBEs son fundamentales para mantener una correcta organización de la cromatina en el núcleo del tipo celular específico, así separan distintas regiones de cromatina como son la eucromatina de la heterocromatina o entre TADs (“dominios asociados topológicamente”, véase más adelante). Recientemente, se ha demostrado que Tpr, Nup de la cesta

nuclear en mamíferos, está implicada en delimitar regiones de eucromatina de las transcripcionalmente inactivas (Krull et al., 2010). La caída en los niveles de Tpr resulta en la pérdida de las regiones de eucromatina asociadas al NPC, dando lugar a una expansión de los dominios de heterocromatina en el núcleo celular. Por tanto, el NPC participa de forma directa en la formación y mantenimiento de la eucromatina, así como regula la transcripción de la misma.

3.2. Transcripción de DNA y procesamiento de RNA

En el interior del núcleo se lleva a cabo la transcripción de los genes que codifican proteínas que está gobernada por la RNA polimerasa II (RNA pol II) y genera un transcrito primario (pre-mRNA) que experimenta un procesamiento cotranscripcional. Así, el pre-mRNA necesita ser modificado antes de ser traducido a proteínas. Este procesamiento incluye la modificación de ambos extremos, mediante la formación de una caperuza de metilguanósina en el extremo 5' ("capping") y de una cola de poli (A) en el extremo 3' (poliadenilación), además de una tercera modificación, el "splicing", que consiste en la eliminación de los intrones y el empalme de exones (Fig.5). Estos procesos madurativos están acoplados a la transcripción. Este procesamiento cotranscripcional está mediado y coordinado por el dominio C-terminal (CTD) de la RNA polimerasa II que, sucesivamente, recluta distintos factores implicados en las distintas etapas del procesamiento de pre-mRNAs. Durante el proceso de transcripción múltiples complejos de RNA polimerasa II se disponen a lo largo del gen (Cooper & Hausman. La célula 6ª edición, 2014).

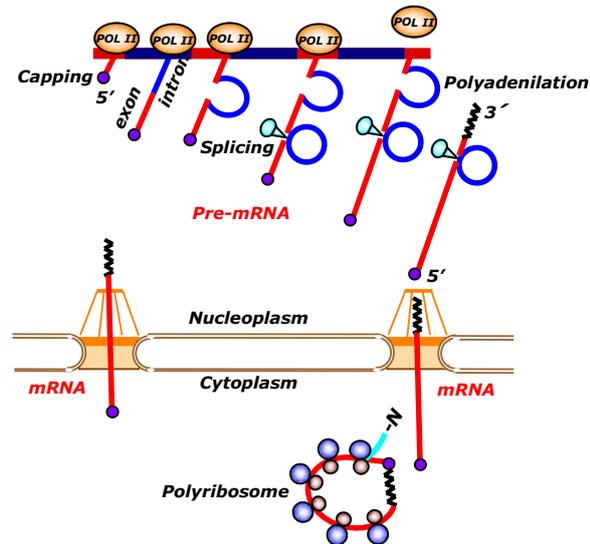


Figura 5. Procesamiento cotranscripcional del pre-RNA. Para completar su maduración experimentan tres modificaciones: la adición de la caperuza de 7-metilguanósina en el extremo 3', la eliminación de intrones mediante el splicing y la adición de una cola poli-A en el extremo 5'. Imagen obtenida de Berciano & Lafarga, 2012.

Durante el procesamiento cotranscripcional, en primer lugar se modifica el extremo 5' del transcrito mediante la adición, tras los 20-30 primeros nucleótidos de RNA, de una caperuza de 7-metilguanósina. Esta estructura se forma en una reacción de tres fases. La primera fase se inicia por acción de una RNA 5' trifosfatasa, que hidroliza el enlace trifosfato del primer nucleótido, transformándolo en un enlace difosfato. Después, una guaniltransferasa une

una molécula de GMP mediante un enlace 5'-5' trifosfato. Por último, una metiltransferasa metila la posición N7 de la molécula de GMP, dando así una 7-metilguanósina. Esta modificación estabiliza el RNA, protegiéndolo de la actividad de las 5'-3' exonucleasas, y es necesaria para el reconocimiento por el ribosoma en la traducción (Proudfoot et al., 2002).

En segundo lugar, el transcrito se genera a partir de un gen codificante para proteínas que está interrumpido por regiones no codificantes. Por ello es necesario que durante la transcripción se eliminen estas regiones –intrones–, para así obtener un mRNA funcional. Este proceso es mediado por un complejo llamado espliceosoma, formado por cinco ribonucleoproteínas nucleares (snRNP) y proteínas ricas en serina y arginina (SR), todas ellas actuando como factores de “splicing”. Los intrones poseen tres secuencias muy conservadas: el sitio de “splicing” 3’ (3’SS), el sitio de “splicing” 5’ (5’SS) y el “branch point” (BP) que es una secuencia situada cerca del extremo 3’. Estas son reconocidas por el espliceosoma y son necesarias para que el “splicing” se produzca de manera efectiva. La reacción se lleva a cabo en dos fases, en primer lugar se escinde el extremo 5’ y en una segunda fase el extremo 3’. Así, la primera fase comienza cuando la snRNP U1 reconoce el 5’SS, al cual se une provocando la escisión del extremo 5’. Posteriormente, la snRNP U2 reconoce la secuencia BP, a la que se une. La snRNP U2 interacciona, a su vez, con el complejo formado por las snRNP U4/U6. Esta interacción produce la escisión del complejo provocando la liberación de la snRNP U4. Por su parte, la snRNP U6 (formando un complejo con la snRNP U2) se une a la secuencia 5’SS, dando lugar a un bucle o lazo intrónico. Por tanto, las snRNP U2 y U6 son los responsables de poner en contacto el extremo 5’ y el BP. En la segunda fase, la snRNP U5 reconoce el 3’SS y lo corta, uniéndolo a el 5’SS. Por otra parte, la

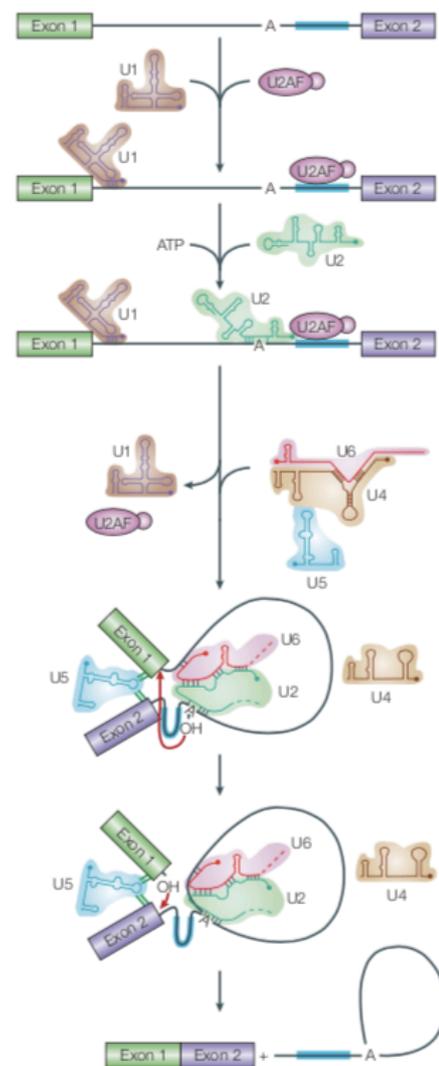


Figura 6. Formación del espliceosoma durante el proceso de splicing. Fase 1: reconocimiento del extremo 5’ del intrón y escisión mediante la actividad nucleasa de U1. Fase 2: reconocimiento y escisión del extremo 3’ por U5. U5 además posee actividad ligasa que une los extremos de los exones. Esquema tomado de Patel & Steitz, 2003; doi: 10.1038/nrm1259

snRNP U5 también tiene actividad ligasa, siendo responsable de la unión de ambos exones (Patel & Steitz, 2003). Este mecanismo de corte y empalme permite que a partir de un pre-mRNA se generen distintas isoformas de mRNAs que darán lugar a diferentes proteínas (Fig.6).

Por último, el extremo 3' del pre-RNA también debe ser protegido de la acción de las nucleasas y esto lo hace mediante la adición de una cola poli (A). Cuando la RNA polimerasa II se encuentra con la secuencia AAUAAA, señal de poliadenilación, ésta es reconocida por el CPSF (factor estimulador de la poliadenilación por escisión) que está asociado al CTD de la RNA polimerasa II. Esto estimula el CstF (Factor de estimulación del corte) y ambos factores promueven la acción de las endonucleasas CFI y CFII que cortan el extremo 3', a unos 10-30 nucleótidos corriente arriba desde el motivo AAUAAA. Una vez cortado, los factores se disocian y la poli(A) polimerasa, que solo acepta moléculas de ATP, añade una cola de unos 100 a 200 nucleótidos de adenina. Las colas de poli (A) tienen también un papel importante en la regulación de la traducción, ya que, dependiendo de la longitud de las mismas, el mRNA será traducido. Así, colas de poli (A) largas se traducirán, mientras que aquellas más cortas no lo harán y destinan el mRNA a la degradación (Proudfoot et al., 2002).

Este procesamiento del RNA que ocurre de forma simultánea a la transcripción, es posible únicamente en células eucariotas gracias a la membrana nuclear, que ofrece una separación entre el compartimento nuclear donde se lleva a cabo la transcripción del DNA y la maquinaria de traducción del RNA que se encuentran en el compartimento citoplasmático. En procariontes, al no existir una división entre ambos espacios, la traducción está acoplada a la transcripción por lo que no son posibles estas modificaciones cotranscripcionales. Además, la existencia del compartimento nuclear permite la regulación de la propia transcripción a través de la interacción con proteínas citoplasmáticas que pueden estimularla o inhibirla al ser importadas al núcleo. Por todo esto, el núcleo juega un papel fundamental en la regulación de la expresión génica (Cooper & Hausman, 2014).

3.3. Compartimentos nucleares

La organización nuclear en compartimentos ha demostrado aumentar la eficiencia de los procesos celulares, ya que se favorece la interacción, en tiempo y espacio, de los numerosos factores implicados en la replicación y reparación del DNA, así como en la síntesis de RNA y la maduración de ribonucleoproteínas (RNP) (Fig.7). Esto se produce por el aumento en la concentración de moléculas, requeridas para un proceso bioquímico dado, en un subcompartimento concreto. Sorprendentemente, la importancia de la compartimentalización no comienza a apreciarse hasta los años 90, cuando se desarrollan extensos estudios con técnicas inmunocitoquímicas y de hibridación

in situ que permiten localizar secuencias específicas de proteínas y ácidos nucleicos (Misteli, 2005).

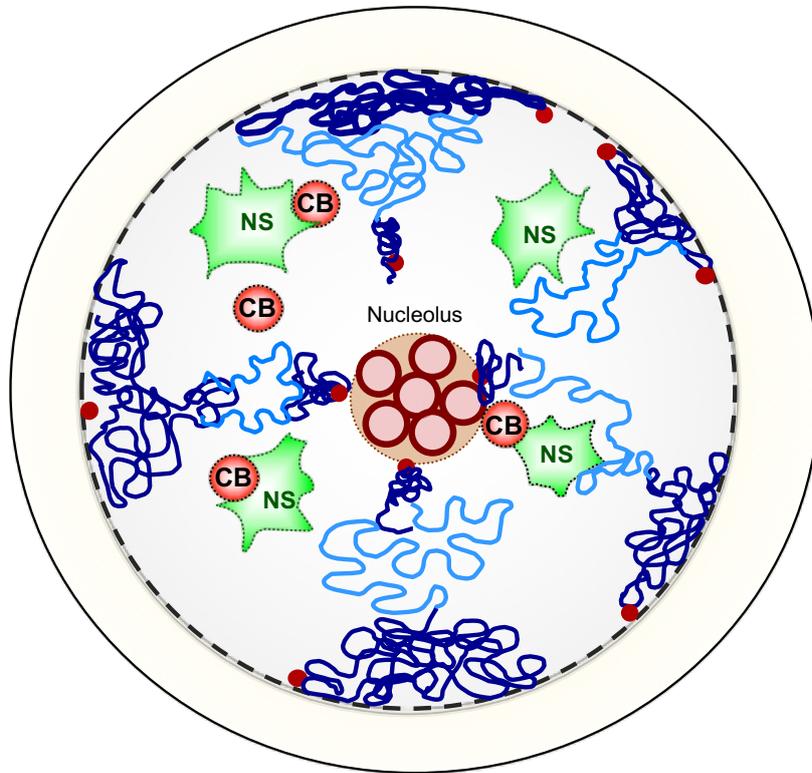


Figura 7. Compartimentos nucleares. La línea discontinua corresponde a la envoltura nuclear que delimita el núcleo del citoplasma. En azul encontramos los territorios cromosómicos, correspondiendo el azul oscuro a dominios de heterocromatina y el azul claro a dominios de eucromatina. Asociados a estos últimos, encontramos las factorías de transcripción: los cuerpos de Cajal (CB) y los speckles nucleares (NS), los cuales, a su vez, poseen una estrecha relación espacial. En el centro se dispone el nucleolo, al que se asocian dominios de heterocromatina. Asimismo, en la periferia encontramos dominios de heterocromatina en íntima relación con la envoltura nuclear. Imagen obtenida de Lafarga M & Berciano M.T. (2014).

3.3.1. Nucleolo

El nucléolo es el compartimento más prominente del núcleo y es responsable de la organización de los genes ribosomales formando repeticiones en “tándem” de DNA ribosómico (rDNA), llamados regiones organizadoras nucleolares (NORs) que están distribuidos en los cromosomas acrocéntricos (Fatica and Tollervy, 2002). Su principal función es la de sintetizar y procesar el RNA ribosomal (rRNA), para su posterior ensamblaje en subunidades ribosomales. La biogénesis de rRNA se produce con la transcripción de los genes

ribosomales (rDNA) por la RNA polimerasa I, lo que da lugar a un transcrito precursor, el pre-rRNA 45S. Éste, es procesado y cortado por una ribonucleasa para dar lugar a los pre-rRNAs 28S, 18S y 5.8S. El procesamiento post-transcripcional del pre-rRNA 45S está guiado por ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNPs) que participan en la maduración mediante dos modificaciones esenciales, la metilación de ribosas y la conversión de uridinas en pseudouridinas en los tres tipos de rRNAs. Una vez modificados, los rRNAs 28S, 18S, 5.8S y 5S, este último de origen extranucleolar, se combinan con proteínas ribosomales - también importadas desde el citoplasma- para formar las partículas pre-ribosomales pre-40S y pre-60S, que serán exportadas al citoplasma mediante señales de exportación nuclear presentes en las proteínas de las subunidades (McStay & Grummt, 2008).

Este complejo proceso de biogénesis de ribosomas es llevado a cabo en distintos subcompartimentos del nucleolo, que pueden distinguirse por su morfología con el microscopio electrónico. Éstos son los centros fibrilares (FCs), el componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y los intersticios. El CFD rodea los FCs formando su conjunto una unidad funcional de transcripción nucleolar, donde se produce la síntesis y procesamiento inicial de los rRNA. Entre estas unidades se dispone el CG y el intersticio. La organización de estos subcompartimentos se relaciona con la actividad celular. Así, cuando una célula presenta una elevada actividad transcripcional, muestra

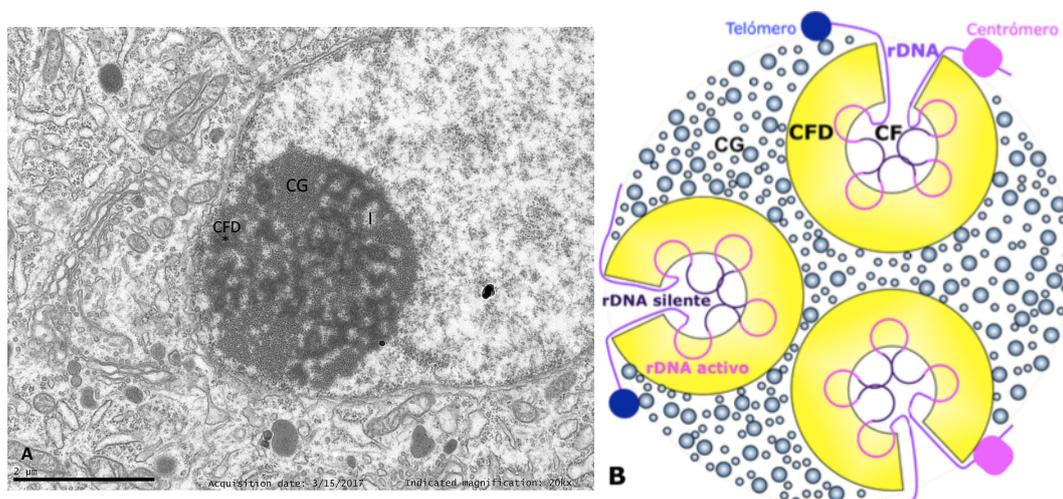


Figura 8. Estructura nucleolar. A: Imagen de microscopio electrónico donde aparece un nucleolo asociado a la periferia nuclear. Disposición muy frecuente en las neuronas, puesto que se sintetizan elevadas concentraciones de ribosomas para suplir la alta tasa transcripcional de este tipo celular. Se visualizan los subcompartimentos nucleolares: el centro fibrilar (asterisco), el centro fibrilar denso (CFD), el centro granular (CG) y el intersticio (I). Se trata de un núcleo neuronal, por lo que presenta abundantes dominios de eucromatina, mientras que los dominios de heterocromatina son escasos, situándose asociados al nucleolo y a la MNI. **B:** Esquema de un nucleolo y sus subcompartimentos. La línea violeta corresponde al DNAr que se introduce en el CF, distinguiendo una línea de color oscuro correspondiente al DNAr silente y una línea de color rosa que se continúa con el CFD, la cual se corresponde con el DNAr activo. Esquema obtenido de Mata-Garrido J, 2016.

numerosos CFs pequeños distribuidos por todo el nucléolo (Raska et al., 2006) (Fig.8-a).

El rDNA presente en los CFs puede estar transcripcionalmente activado o inhibido, lo cual define su disposición en la unidad. De esta forma, los genes inactivos se sitúan, preferentemente, en la zona central mientras que los genes que van a ser transcritos se disponen en la periferia, extendiéndose en el CFD. Es por ello que la transcripción tiene lugar en el límite entre el CF y CFD (Fig.8-b). En los CFs se almacenan moléculas implicadas en la transcripción del rDNA, como son la RNA polimerasa I, la TBP (“TATA binding protein”) y el factor de transcripción UBF (“upstream binding factor”), ambos necesarios para la formación del complejo de pre-iniciación de la RNA polimerasa, y la DNA topoisomerasa I (Moss, 2004; Nomura et al., 2004).

Los CFD, por su parte, están constituidos por fibrillas compactadas en las que se disponen los genes ribosomales activos. En esta región se acumulan moléculas de pre-rRNA recién sintetizado y es aquí donde tienen lugar los primeros pasos de su procesamiento. Con este fin, los CFD albergan las moléculas necesarias en el procesamiento de estos pre-rRNA: snoRNPs, los “proceosomas” que son complejos macromoleculares de RNPs, productos génicos y los transcritos primarios de 45S rRNA. Además, destaca la presencia de dos enzimas: la disquerina/NAP57, con actividad pseudouridina sintetasa, y la fibrilarina, con actividad rRNA metiltransferasa. Éstas llevan a cabo la pseudouridinación y metilación de los pre-RNA, dos modificaciones post-transcripcionales necesarias para la acción de la ribonucleasa sobre el pre-rRNA 45S, que será escindido en rRNAs 18S, 28S y 5.8S (Sweet et al., 2008; Montanaro et al., 2008). Estos tres rRNAs se ensamblan en el CFD y, especialmente, en el CG con los proceosomas formando la subunidad pequeña (40S) y grande (60S) del ribosoma. Existen dos tipos de proceosomas, los pequeños que se localizan en el CFD, constituidos por U3 snoRNAs, y los grandes que se sitúan en el CFD y el CG. Así, el rRNA 18S unido al proceosoma pequeño forma la subunidad pre-ribosomal 40S, mientras que los rRNAs 28S, 5.8S, junto con el 5S, se unen al proceosoma grande formando la subunidad pre-ribosomal 60S (Sirri et al., 2008).

El CG está compuesto por gránulos de 15-20 nm de diámetro que están, a su vez, formados por las subunidades 40S y 60S pre-ribosomales. Aquí finaliza el ensamblaje de estas subunidades y es donde se almacenan a la espera de ser exportadas al citoplasma (Raska et al., 2006). En el CG se encuentra la proteína B23 o nucleofosfomina (NPM) que es fundamental para el ensamblaje de las subunidades, actuando como endonucleasa, ribonucleasa y chaperona (Boisvert et al., 2007). Además, la NPM pertenece a la familia de proteínas ácidas “hub” que tienen la capacidad de interactuar con diferentes moléculas transportándolas o reclutándolas desde o hacia el nucléolo. De esta forma, la

exportación de las subunidades pre-ribosomales depende de la acción de la NMP (Emmott & Hiscox, 2009).

Una función fundamental del nucléolo es la de anclar dominios de heterocromatina, lo cual es esencial para mantener la estabilidad génica, además de inhibir la transcripción de las secuencias genómicas que requieren estar silenciadas para un correcto desarrollo y funcionamiento celular. Esto ocurre gracias a la interacción de NMP, la proteína aislante CTCF y la proteína nucleolina (Padeken et al., 2013). La nucleolina es una chaperona que, además, actúa junto a NMP en la síntesis y maduración de los ribosomas (Lee et al., 1992). Estudios en *Drosophila* han demostrado que la proteína “nucleoplasmina-like” (NLP), homóloga a la NMP en humanos, tiene la capacidad de unión a histonas específicas de la heterocromatina (Namboodiri et al., 2003). Así, la NMP, la CTCF y la nucleolina forman una plataforma de interacción con la heterocromatina centromérica, principalmente, y de otras regiones que requieren estar transcripcionalmente inactivas. Este es caso del cromosoma X que permanece inactivo en las células de las hembras. Este se une a la periferia nucleolar, gracias a la acción de un RNA no codificante (ncRNA) llamado Xist. La depleción de este ncRNA resulta en la pérdida del estado de heterocromatina de este cromosoma y, por tanto, de su silenciamiento (Zhang et al., 2007).

3.3.2. Cuerpos nucleares de Cajal

El cuerpo nuclear de Cajal (“Cajal body” – CB) es una organela esférica del núcleo que carece de DNA, descubierta por Santiago Ramón y Cajal en 1903. En microscopía electrónica, se visualiza como una estructura formada por hebras arrolladas de material fibrilar denso, que Monneron y Bernhard (1969) denominaron “coiled body” (Fig.9). El CB se dispone libre en el nucleoplasma o, frecuentemente, asociado al nucleolo y existe una variación en su número y tamaño según la población neuronal. Aquellas poblaciones que tengan mayor actividad metabólica y bioeléctrica y, por tanto, mayor tasa de transcripción, tendrán mayor número de CBs (Lafarga et al., 2009, 2017). El CB está implicado

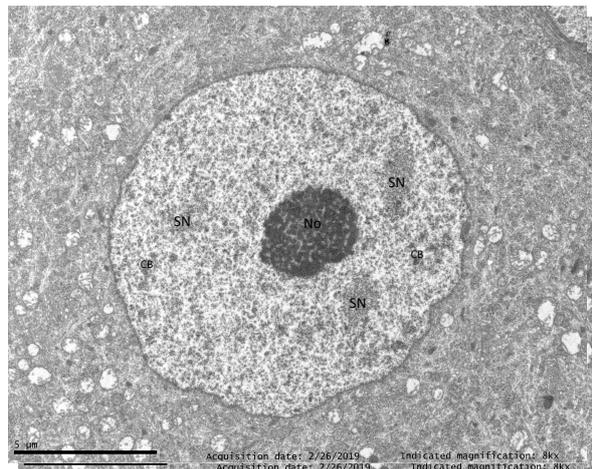


Figura 9. Organización de los compartimentos del dominio inter cromosómico de una neurona. Se observa un nucleolo prominente central (No), varios speckles nucleares de gran tamaño (SN) y, asociados a ellos, los cuerpos de Cajal (CB). El tamaño y el número de estas estructuras se debe a la gran actividad transcripcional de las neuronas.

en la biogénesis de snRNPs y snoRNPs, la maduración de histonas y en la regulación de la telomerasa.

Los snRNPs están formados por proteínas del complejo Sm y RNAs pequeños nucleares ricos en uridinas (“Small Nuclear RNAs, UsnRNAs). Ambos componentes son ensamblados en el citoplasma por el complejo SMN que actúa de chaperona, formando el pre-snRNPs. El SMN está formado, a su vez, por la proteína de supervivencia de motoneuronas (“survival of motor neuron”, SMN) y una familia de proteínas llamadas Gemins (Li et al., 2014).

El proceso de biogénesis de snRNPs es complejo y presenta etapas citoplasmáticas y nucleares, siendo clave el papel de SMN. En el citoplasma, el complejo SMN interacciona y se une al complejo Sm formado por un anillo de siete proteínas (Will and Lüthmann, 2001). En el núcleo se transcribe el UsnRNA, que será exportado al citoplasma donde se une al complejo

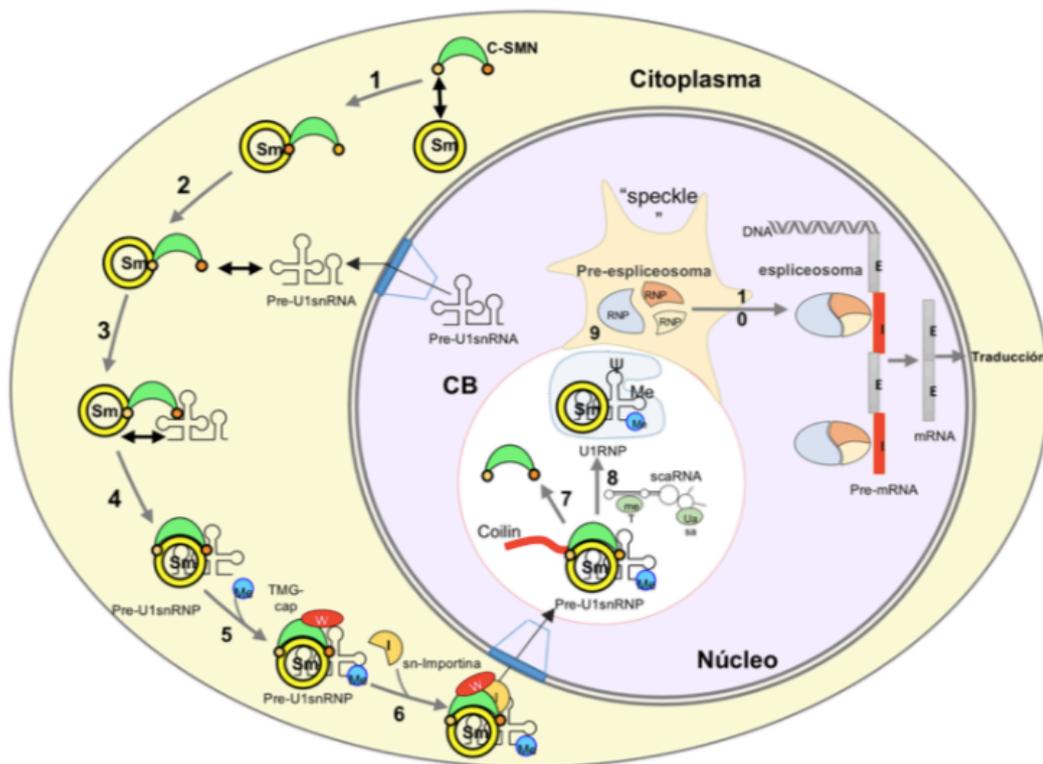


Figura 10. Biogénesis de los snRNPs. En el citoplasma, se esquematiza la interacción del complejo SMN/Sm con el pre-UsnRNA, que da lugar al pre-U1snRNP, y su modificación TMG-cap, que le permite interactuar con la proteína importina, gracias a la cual se introduce en el interior nuclear. En el nucleoplasma, el pre-U1snRNP interactúa con la proteína coilina, la que le permite el acceso al CB. Aquí, el c-SMN se desensambla, dando lugar al pre-snRNP, que comienza su maduración gracias a los scaRNA. Los snRNP maduros se almacenan en los speckles nucleares, donde se ensambla el pre-spliceosoma. El ensamblaje del spliceosoma maduro tiene lugar, como se observa en el esquema, en los focos activos de transcripción. Esquema obtenido de Mata-Garrido J, 2016.

multiprotéico SMN/Sm para formar una pre-snRNP. Seguidamente, al UsnRNA se le incorpora una caperuza de trimetilgunosina en el extremo 5'. Una vez se produce esta modificación, gracias a la interacción de la proteína WRAP53 con SMN, la pre-snRNP interacciona con una importina específica que dirige su importación nuclear para su reclutamiento en el CB (Nizami et al., 2010; Henriksson and Farnebo, 2015). El reclutamiento de la pre-snRNP en el CB está mediado por la interacción SMN con la proteína coilina del CB. Así, una vez en el CB, el SMN que “ha cumplido su función” se desensambla de la pre-snRNP. En el CB culminan dos etapas madurativas de las snRNPs mediadas por la acción de scaRNAs (“small cajal bodies RNAs”). Particularmente, los scaRNAs guían los procesos de 2-O' metilación y la pseudouridinación necesarias para la formación de snRNPs maduras (Xu et al., 2005). Estas snRNPs espliceosomales se transfieren a los “speckles nucleares” donde se almacenan transitoriamente y pre-ensamblan para ser finalmente destinados y ensamblados en el espliceosoma, la maquinaria molecular que gobierna el “splicing”, en los sitios de transcripción activa (Fig.10).

Es interesante el papel de la proteína WRAP53, facilitando interacciones proteína-proteína y proteína-RNA, además de favorecer el reclutamiento de determinados factores en el CB, telómeros y sitios de daño del DNA (DSBs “double-strand break”). Por tanto, WRAP53 es fundamental para el correcto funcionamiento de la DSBR (“double-strand break repair”) (Venteicher et al., 2009; Henriksson et al., 2014).

3.3.3. “Speckles” nucleares

Los “speckles” nucleares (NS) o agregados de granulaciones intercromatínicas (“interchromatin granule clusters”, IGCs), a nivel ultraestructural, son regiones nucleares donde se concentran los factores de “splicing”, principalmente snRNPs espliceosomales y proteínas de la familia SR, ricas en residuos de arginina y serina. Además de los factores de splicing de los pre-RNAm, destacan otras proteínas, como los factores de transcripción, factores de procesamiento del extremo 3', el factor de iniciación de la transcripción eucariota eIF4E, la proteína eif4AIII que inhibe el proceso de transcripción y proteínas estructurales. Asimismo,

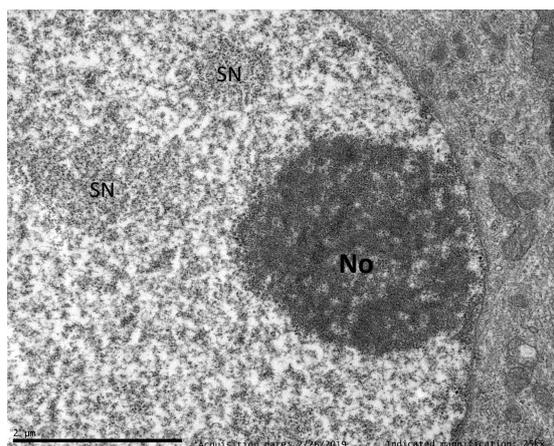


Figura 11. Speckles nucleares en un núcleo neuronal. Se observa un núcleo de predominio eucromático, con un prominente nucleolo (No) asociado a la envoltura nuclear. En el nucleoplasma, se distinguen los speckles nucleares (SN) por su aspecto granulado.

los NS poseen abundantes quinasas (Cik/STY, hPRP4 y PSKHI) y fosfatasa (PI), que fosforilan y desfosforilan estos factores de splicing en función de los requerimientos transcripcionales (Spector & Lamond, 2011). Por tanto, los NS tienen una función reguladora del splicing co-transcripcional, así como de la propia transcripción (Misteli et al., 1997).

Son estructuras muy dinámicas, su tamaño, aspecto y número varían según el tipo celular e incluso entre distintas células de un mismo tipo, dependiendo de la tasa de transcripción (Fig.11). Su función principal es la de almacenar, preensamblar y modificar los factores de splicing, permitiendo así que estos sean transportados a zonas transcripcionalmente activas donde sean requeridos (Lamond & Spector, 2003). La disposición espacial de los NS no es aleatoria, sino que se localizan preferentemente en zonas con una alta tasa de expresión génica (Shopland et al., 2003). Así, se ha visto que genes que comparten maquinaria de transcripción se disponen alrededor de un mismo NS. Por ello, se considera que el NS genera un microambiente en la eucromatina que facilita la transcripción de los genes espacialmente asociados a este dominio nuclear. Además, los CB y los NS se encuentran frecuentemente asociados en el espacio, lo cual facilita el intercambio molecular entre ambos (Lafarga et al., 1998; Matera and Wang, 2014).

4. ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

4.1. Niveles de plegamiento del DNA

El DNA es la molécula que almacena la información necesaria para la supervivencia celular. Gracias a ella la célula realiza sus funciones vitales, transmitiendo esta información a las células hijas. El DNA presenta distintas conformaciones que aseguran una correcta expresión de los genes según el momento del ciclo celular en el que se encuentre.

La estructura básica del DNA eucariota está compuesta por el nucleosoma: una doble hebra de DNA enrollada negativamente alrededor de un núcleo de histonas, el cual está formado a su vez por dos dímeros H3-H4 y dos dímeros H2A-H2B (Soria & Polo, 2012). El DNA nucleosomal incluye unas 147 pares de bases en 1,7 vueltas, que se

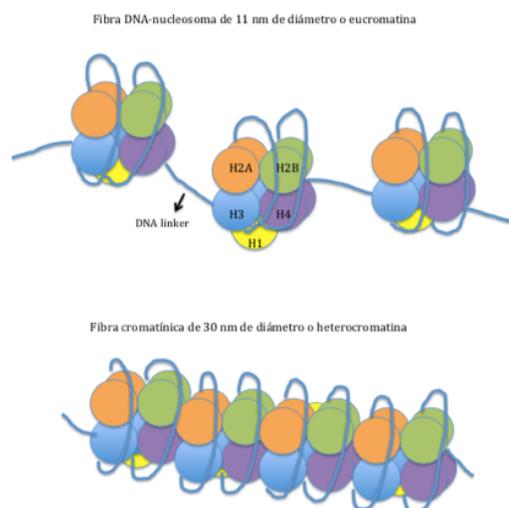


Figura 12. Estructura del nucleosoma. Su núcleo está formado por dos dímeros H3-H4 y dos dímeros H2A-H2B. Alrededor, se dispone una hebra de DNA de 147pb. Entre los nucleosomas existe una separación de 10-80 pb (DNA-linker). Cuando el nivel de compactación aumenta, el DNA linker disminuye, haciendo que los nucleosomas se encuentren más próximos.

continúa con el siguiente DNA nucleosomal por un DNA espaciador, de entre 10-80 pares de bases, asociado a una histona H1. (Vergara & Gutierrez, 2017) (Fig.12). Esta estructura, formada por sucesivos nucleosomas interconectados por el DNA espaciador, adopta la forma de “collar de perlas”, de 11nm de diámetro, y se conoce como cadena nucleosomal.

Las histonas de la cadena nucleosomal pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, por ejemplo en la H1, que promueven su plegamiento en estructuras de orden superior y permiten, en último término, la segregación de los cromosomas en la división celular. Así pues, se forma en primer lugar la fibra cromatínica de 30nm de diámetro. La hélice que conforma, llamada solenoide, se compone de unos 6 nucleosomas por vuelta. (Ghirlando & Felsenfeld, 2013). La fibra cromatínica puede experimentar plegamientos adicionales y adoptar una conformación cerrada y compacta de heterocromatina. Tanto la fibra de 11 nm como la de 30 nm corresponden a la conformación de la cromatina durante la interfase.

Para describir la estructura de la fibra cromatínica de 30 nm se han propuestos dos modelos. El primero propone una hélice con un único inicio en el que cada nucleosoma interacciona con el quinto o sexto siguiente. En el segundo modelo se describe una hélice con dos puntos de inicio donde los nucleosomas interaccionan de dos en dos, formando un zig-zag. (Yusuf et al., 2018).

Cuando la célula entra en mitosis los niveles de compactación aumentan progresivamente formándose fibras de 300 nm, 700 nm y 1400 nm. La fibra de 300 nm se conoce como cromonema en los cromosomas mitóticos, correspondiendo con el cromosoma desespiralizado. El siguiente nivel de plegamiento es una fibra de 700 nm de diámetro que, a su vez, sufre plegamientos adicionales para formar el cromosoma metafásico de 1400 nm (Alberts et al., 2015) (Fig.13).

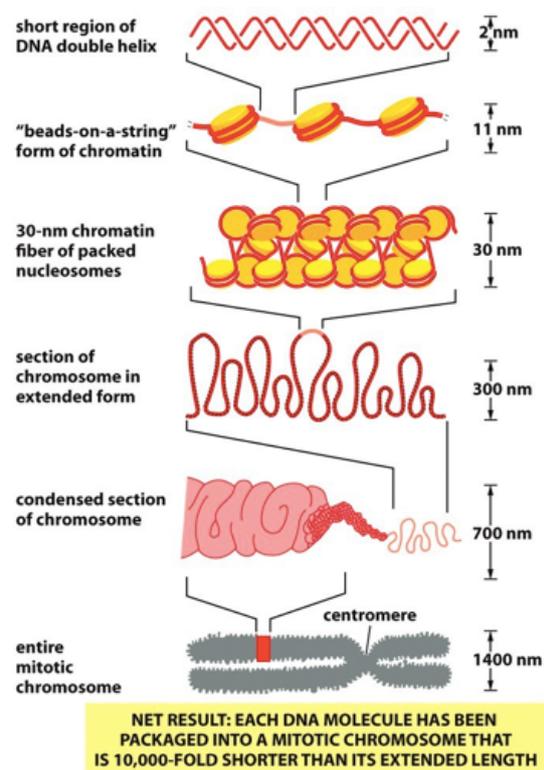


Figura 13. Niveles de plegamiento de la cromatina. De arriba hacia abajo tenemos: la doble hebra de DNA, el primer nivel de compactación en nucleosomas (11nm), la fibra helicoidal de cromatina (30nm), el cromosoma desespiralizado (300nm), el cromosoma condensado (700nm) y el cromosoma mitótico completo (1400nm). Imagen obtenida de Alberts et al., quinta edición.

Por tanto, la cromatina es una estructura dinámica que adopta distintas conformaciones según los requerimientos funcionales de la célula. Así, se ve influida por la expresión génica y sus cambios son de vital importancia para la reparación, señalización y restricción del daño en el DNA. Estas modificaciones se producen gracias a las chaperonas de las histonas que regulan la posición de las histonas; las variantes de histonas que se incorporan a la cromatina según el contexto transcripcional; las modificaciones post-traduccionales de las histonas, especialmente metilación y acetilación, y el remodelamiento de cromatina dependiente de ATP (Pan et al., 2014).

4.2. Eucromatina y heterocromatina

4.2.1. Eucromatina

La eucromatina o cromatina “abierta” es de vital importancia para los procesos de transcripción, replicación, así como de reparación del DNA. Gracias a su conformación laxa, la maquinaria necesaria para estas actividades puede acceder fácilmente a la hebra de DNA y hacer su función. Por contrapartida, la hace vulnerable a agentes genotóxicos tanto endógenos, como las especies reactivas de oxígeno (ROS), que son productos del metabolismo celular, o exógenos como las radiaciones ionizantes y los agentes quimioterápicos (Casafont et al., 2011).

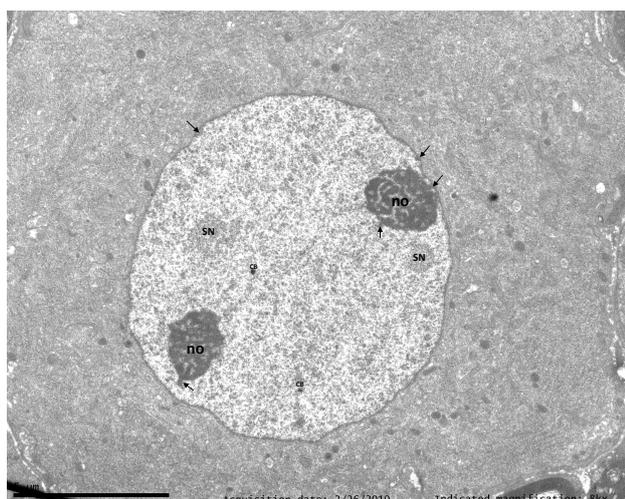


Figura 14. Patrón de predominio eucromático. Imagen de ME en la que se observa un núcleo neuronal con dos nucleolos, ocupado en su mayoría por una estructura dispersa que corresponde a la eucromatina. Asociados al nucleolo y a la periferia nuclear encontramos dominios de heterocromatina, que se observa como una estructura compacta señalada con flechas. SN: speckles nucleares; CB: cuerpos de Cajal; No: nucleolo.

En los núcleos neuronales este es el tipo de cromatina predominante, ya que estas células tienen una elevada tasa de expresión génica. Por tanto, reconoceremos estos núcleos en microscopía óptica por sus extensas áreas pálidas y en microscopía electrónica por la presencia de una estructura altamente dispersa, descondensada (Mata, 2016) (Fig.14).

Este tipo de cromatina se caracteriza por un patrón de histonas específico que consiste en la hiperacetilación de las histonas nucleosomales (H3,H4,H2A,H2B), por la actividad de histonas acetil-transferasas (HATs), y la

trimetilación de la histona 3 en distintos residuos (H3K4me3, H3K36me3 y H3K79me3) por histona metil-transferasas (HMTs) (Jasencakova et al., 2000; Castillo-Aguilera et al, 2016). La metilación es una modificación que se suele producir en los residuos de lisina que forman parte de las colas de las histonas, aunque también se ha visto en residuos de arginina. Las HMTs encargadas de estas modificaciones pueden añadir uno, dos o tres grupos metilo. Este proceso es reversible por la actividad de las histona-desmetilasas (HDMs) que disocian los grupos metilo.

4.2.2. Heterocromatina

La heterocromatina tiene una conformación más compacta (Fig.15), lo que hace difícil el acceso de factores reguladores de la transcripción, y es transcripcionalmente inactiva. Se han descrito dos tipos de heterocromatina, la facultativa y la constitutiva. El primero alberga genes que se encuentran silenciados en el transcurso de la diferenciación celular por no ser necesarios en el fenotipo concreto; sin embargo, puede pasar a la conformación de eucromatina cuando sea necesaria la expresión de dichos genes. Por el contrario, la heterocromatina constitutiva se halla permanentemente silenciada y generalmente no posee secuencias génicas codificantes, estando formada mayoritariamente por secuencias repetidas de DNA (DNA satélite) de las regiones pericentroméricas y teloméricas.

En la mayor parte de los metazoos, las secuencias de las regiones teloméricas están conservadas y enriquecidas en la histona H3K9me3. Los telómeros están protegidos por el DNA telomérico, formado por múltiples repeticiones de un hexanucleótido, y un complejo proteico, llamado “shelterina”, que se acopla al extremo libre de los telómeros y evita que la maquinaria de respuesta al daño del DNA se active al reconocer el final de las hebras de DNA. La conservación de estas secuencias de DNA y la unión de las proteínas del complejo shelterina hace pensar que la regulación epigenética de dichas regiones no es vital para su función. Las regiones pericentroméricas, sin embargo, no están tan conservadas por lo que en ellas los cambios epigenéticos cobran mayor peso (Alberts et al., 2015).

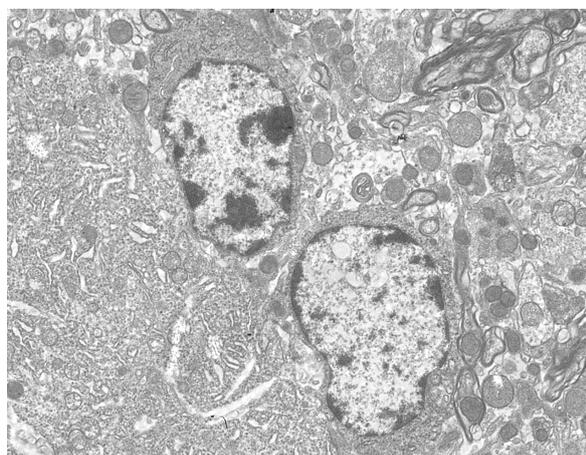


Figura 15. Dominios de heterocromatina. Imagen de ME de células gliales. Se observan extensos dominios de heterocromatina, altamente compactada, que se asocian preferentemente a la periferia nuclear.

La heterocromatina, al igual que la eucromatina, presenta un patrón específico de histonas. En este caso, se caracteriza por una hipoacetilación global de las histonas nucleosomales y trimetilación de la histona H4 en la lisina 20 (H4K20me3) y de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9me3), en el caso de la heterocromatina constitutiva, y en la lisina 27 (H3K27me3) en la facultativa. Esto hace que la cromatina se compacte, evitando el acceso de los factores reguladores de la maquinaria de transcripción y produciendo en consecuencia un silenciamiento génico.

La hipoacetilación se lleva a cabo por enzimas deacetilasas (HDACs). En mamíferos las más conocidas son las HDAC1, HDAC2 y las sirtuinas deacetilasas (SIRT) dependientes de NAD⁺ de las que existen 7 tipos (SIRT 1-7). Éstas actúan sobre un amplio espectro de sustratos. Por ejemplo, el papel de SIRT 1 en la regulación de la cromatina se demuestra porque su deficiencia produce cambios epigenéticos en la célula, presentando aumento en la acetilación de la histona H4 en la lisina 16 (H4K16ac) y desmetilación en H3K9 y H4K20 (Alberts et al., 2015; Mata, 2016).

Además de la metilación en histonas, podemos encontrar metilación del DNA que suele darse en regiones ricas en uniones de citosina con guanina mediante un enlace fosfato, conocidas como islas CpG, aunque también se produce en regiones no CpG de células madre embrionarias. Estas regiones CpG suponen un gran porcentaje de promotores y en ellas se produce una desmetilación de las citosinas cuando existe una activación de la expresión génica (Fatemi et al., 2005). Las enzimas que llevan a cabo la metilación del DNA son las DNA metiltransferasas (DTM 1, 3A y 3B). La DTM 1 se encarga de propagar los patrones de metilación hereditarios mientras que la 3A y 3B metilan DNA *de novo* (Fatemi et al., 2005).

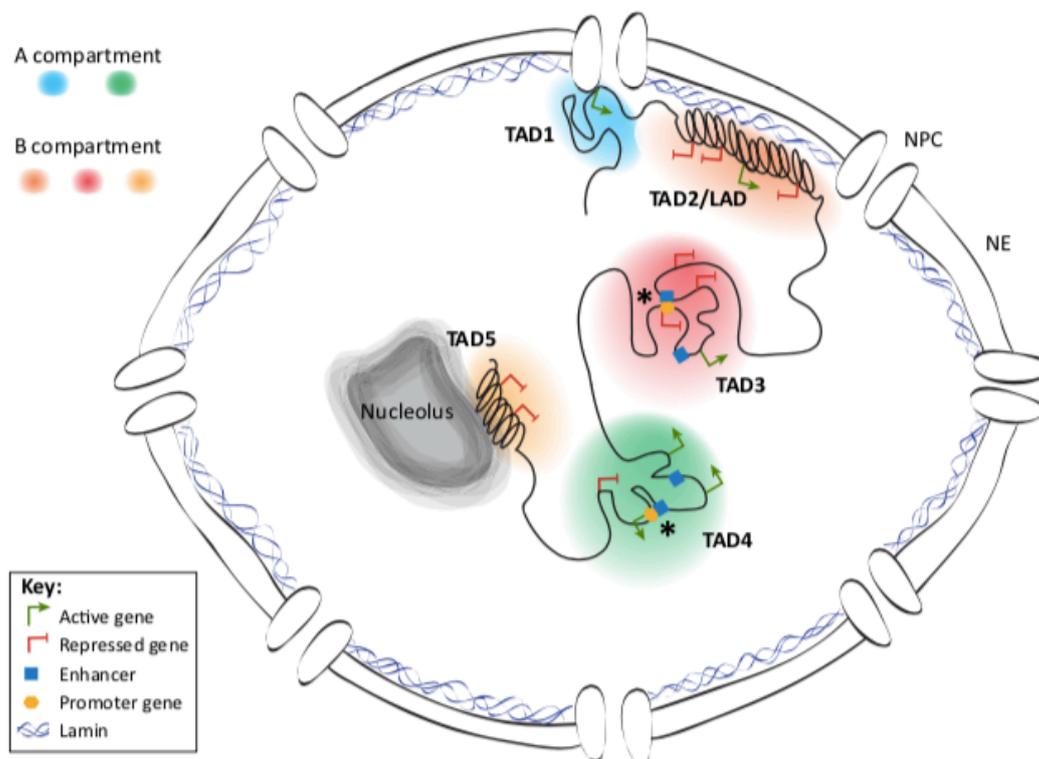
Unido a estos cambios epigenéticos, la proteína de la heterocromatina 1 (HP1 α , HP1 β , HP1 γ) se une a la histona H3K9me3 y a otros factores que ayudan a la regulación de la heterocromatina, la expresión génica, la respuesta al daño del DNA (DDR) y a la diferenciación y regulación del ciclo celular. Esta proteína, en sus distintas isoformas, al igual que la histona H3K9me3, es un marcador muy conservado de la heterocromatina (Raurell-Vila et al., 2017).

4.3. Dominios asociados topológicamente (TADs)

Durante la interfase, la eucromatina y heterocromatina se pliegan en dominios de unas 500 Mb, llamados dominios topológicamente asociados (TADs), tomando así una distribución en el núcleo que las hace características del tipo celular al que pertenecen (Fig.16). La cromatina en los TADs forma bucles que permiten la interacción intracromosómica, haciendo posible el encuentro entre promotores y “enhancers” que se hallan distantes en la secuencia lineal del DNA, pero que en el espacio tridimensional se encuentran próximos. Por tanto,

estos territorios enriquecidos en interacciones génicas son de vital importancia en la regulación de la expresión génica tanto en la transcripción como en la replicación.

La organización de los TADs depende de la interacción de la cromatina con proteínas barrera que los delimitan, siendo especialmente relevantes las cohesinas y el factor CFCT. Este último cuenta con 11 dominios de zinc que se unen a la secuencia específica CCCTC- en una única dirección (Adriaens et al., 2018). Se ha propuesto que las cohesinas y CTCF son las responsables de la



Trends in Genetics

Figura 16. Organización de la cromatina en TADs. Estos se pueden dividir en dos compartimentos: **A** que corresponde a dominios transcripcionalmente activos -euromatina- y **B** que son dominios inactivos -heterocromatina-. Dentro de los TADs se producen numerosas interacciones dinámicas entre enhancers y promotores que facilitan la activación o inhibición de la transcripción génica. Los TADs asociados a la lámina interna se conocen como LADs. Es importante destacar que un LAD puede estar formado por varios TADs o bien un TAD puede contener varios LADs. Imagen tomada de Gonzalez-Sandoval and Gasser, 2016; doi: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.05.004>

formación de bucles de cromatina por su unión a dos loci cromosómicos. Además, CTCF establece la barrera de separación entre TADs adyacentes. Curiosamente, las zonas que flanquean estas proteínas barrera o aislantes poseen un patrón peculiar de los nucleosomas, caracterizado por la metilación de la histona H3K4me3 y/o la presencia de variantes de histona como la H2AZ,

por lo que podrían ser un factor adicional implicado en la formación de estos dominios (Oomen et al., 2019) (Fig.17).

La alteración del factor CFCT o de la secuencia CCCTC- a la que se une, provoca la pérdida de los límites de estos dominios, encontrándose interacciones aberrantes entre promotores y “enhancers” de distintos TADs que resultan en una función celular alterada (Adriaens et al.,2018). Se ha visto que esto sucede en células tumorales, originando una pérdida de su regulación. Sin embargo, las consecuencias de estas alteraciones en células post-mitóticas como las neuronas, es aún imprecisa, apuntando hacia un posible papel en la neurodegeneración.

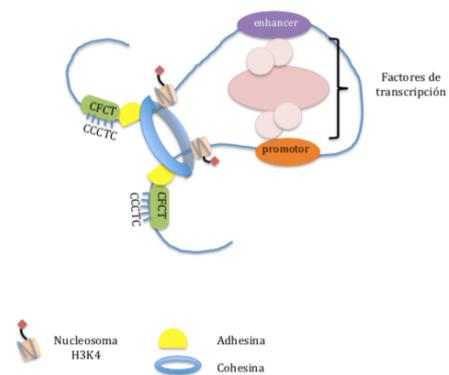


Figura 17. Estructura de un TAD. Las adhesinas, unen dos regiones cromosómicas distantes mediante la formación de un bucle, que es mantenido gracias al anillo de cohesinas. Estas regiones están delimitadas de otros TADs por el factor CTCF que se une a la región CCCTC- del DNA

5. DAÑO Y REPARACIÓN DEL DNA

5.1. Introducción

El DNA es una molécula susceptible al daño generado por distintas fuentes, conocidas como agentes genotóxicos. En primer lugar, tenemos una fuente endógena, el metabolismo mitocondrial, que genera especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno y lípidos peroxidados como residuos. Esta es la principal fuente de daño en el DNA neuronal, debido a la gran demanda metabólica que posee el cerebro. Se estima que el 25% de glucosa y el 20% de oxígeno corporal son utilizados en la función cerebral. Las lesiones más comunes producidas por estos agentes en el DNA son la pérdida de bases púricas o pirimidínicas (abasic sites, AS), la oxidación de bases y las roturas de hebra única (single-strand breaks, SSBs). Por otra parte, tenemos una fuente exógena, por ejemplo la radiación ionizante, ultravioleta, el humo del tabaco o los fármacos quimioterápicos. La radiación UV y el humo del tabaco son los agentes ambientales que producen daño en el DNA con mayor frecuencia, afectando principalmente a las células de la piel y pulmonares, respectivamente. El sistema nervioso central está protegido por el cráneo y la barrera hematoencefálica, siendo más difícil el daño neuronal por estos agentes exógenos; aunque se ha demostrado que la radiación ionizante y algunos fármacos quimioterápicos son capaces de llegar al DNA neuronal y dañarlo (Pan et al., 2014). Por su parte, las neuronas del sistema nervioso periférico, que están desprovistas de barrera hematoencefálica, son más vulnerables al daño en el DNA inducido por los fármacos antineoplásicos. Este efecto

genotóxico queda reflejado, por ejemplo, en la inducción de neuropatías periféricas producidas por la disfunción de las neuronas de los ganglios raquídeos.

Los agentes genotóxicos generan daño en distintos tipos de moléculas, además del DNA; por ejemplo proteínas y lípidos, pero éstas pueden volver a sintetizarse. Sin embargo, el daño en el DNA puede causar mutaciones en regiones transcripcionalmente activas, resultando en una alteración de la expresión génica que puede conducir a la producción de mRNAs y proteínas aberrantes. Por tanto, el daño en el DNA generará una inestabilidad en el genoma, pudiendo alterar la función celular y, en último término, poniendo en peligro la supervivencia celular (Madabhusi et al., 2014). Es por ello que existen mecanismos muy rigurosos para detectar y reparar eficazmente el daño en el DNA celular, fenómeno conocido como respuesta al daño del DNA celular (DNA damage response, DDR).

La DDR no solo detecta y repara el daño, sino que además pone en marcha otros procesos celulares, tales como cambios en la transcripción, remodelación de la cromatina, modificaciones del ciclo celular y/o apoptosis. Para ello se requieren elaborados cambios epigenéticos en las histonas y la cromatina, de manera que los múltiples procesos implicados en la DDR se coordinen para generar una respuesta dinámica y lo más eficaz posible. Así, ante un daño en el DNA la cromatina se hace más accesible, laxa y abierta, señalizando dicho daño y favoreciendo el reclutamiento de la maquinaria molecular de reparación para, posteriormente, tomar una conformación cerrada y evitar la transcripción de una región aún dañada (Soria et al., 2012).

El papel de la DDR es claramente beneficioso para evitar alteraciones mayores en la función celular; sin embargo, consume mucha energía, por lo que una hiperactivación de la misma puede también generar daños. Se estima que para reparar una única DSB se necesitan unas 104 moléculas de ATP (Pan et al. 2014).

Una de las principales características de la DDR es que no se trata de un mecanismo único, sino que según el tipo de lesión que se produzca, distintos mecanismos de detección y reparación se pondrán en marcha. Por ejemplo, la exposición a la radiación UV produce dímeros de timina que son reparados mediante un mecanismo llamado "nucleotide excision repair" (NER). Sin embargo, el mismo tipo de lesión también se puede reparar por otros mecanismos dependiendo del momento del ciclo celular en el que se encuentre, el estado madurativo o el tipo celular. Así, por ejemplo, las roturas de doble hebra ("Double-strand breaks", DSBs) son generalmente reparadas por la unión de extremos no homólogos ("nonhomologous end joining", NHEJ); sin embargo, en la fase S o G2 del ciclo celular se pueden reparar por recombinación

homóloga (“homologous recombination”, HR) al tener una cromátida hermana que pueda ser usada como molde (Madabhushi et al., 2014).

5.2. Mecanismos de reparación del daño en el DNA: la vía NHEJ

La DDR consiste en la detección del daño, el procesamiento de los extremos en el caso de tratarse de una rotura de una o de las dos hebras, la reposición de los nucleótidos lesionados, la religación de los extremos y la restauración de la cromatina al estado previo a la lesión. Aunque esto último se ha visto que no siempre ocurre, en ocasiones la cromatina presenta cambios persistentes en su conformación (Pan et al., 2014).

Existen cuatro tipos principales de mecanismos de reparación del DNA, cada uno correspondiente a un tipo de daño concreto. La reparación por escisión de bases (BER) es un mecanismo que repara daños producidos por modificación en las bases, por ejemplo debido a oxidación, alquilación, deaminación o pérdida de la base. El componente básico de este mecanismo son las DNA glicosilasas que detectan la base modificada y la escinden (Lindahl, 1974).

Otro tipo es la reparación por escisión de nucleótidos (NER). Este mecanismo se activa por modificaciones que distorsionan la doble hélice, como los enlaces cruzados causados por la radiación UV, agentes químicos o especies reactivas de oxígeno. Esta forma de activación la hace muy versátil para actuar frente a distintos tipos de lesiones. En mamíferos, este mecanismo se ha subdividido en dos tipos, la GG-NER (“Global-genome nucleotide excision repair”), que reconoce lesiones a lo largo de todo el genoma, y la TC-NER (“Transcription-coupled NER”), que tan solo reconoce el daño en el DNA cuando se produce en sitios activos de transcripción y comporta un bloqueo de la RNA polimerasa II. Cabe destacar que la GG-NER se atenúa con la diferenciación en muchos tipos celulares, incluyendo las neuronas, permaneciendo la TC-NER como mecanismo preferente de reparación del DNA (De Laat et al., 1999).

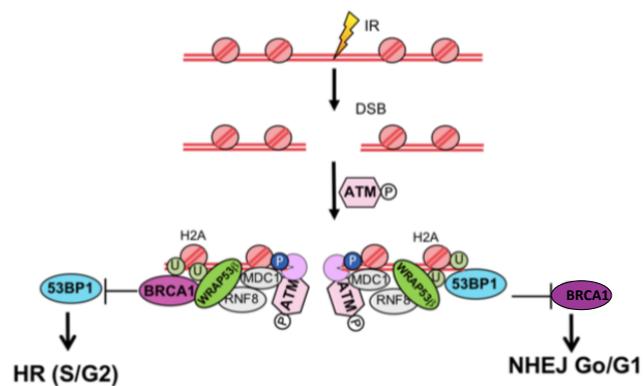


Figura 18. Esquema de la DSBR. Ante un daño en el DNA, como el producido por radiación (IR), se genera una rotura de doble hebra (DSB). Esto genera la fosforilación de la proteína ATM, la cual fosforila la histona H2A, creando un sitio de unión para MDC1. MDC1 a su vez recluta el complejo MRN que estabiliza el lugar de la rotura. Posteriormente se fosforilan distintos sustratos, que llevarán a la unión de 53BP1 o BRCA1 al lugar de la rotura. Cuando 53BP1 se une, desencadena la vía NHEJ; mientras que cuando es BRCA1 la que se une, se lleva a cabo la reparación homóloga (HR). Esquema obtenido de Mata-Garrido J, 2016.

La rotura de las hebras de DNA se reparan por otros mecanismos. La rotura de hebra única, SSB tiene su propia ruta de reparación en la que lo más importante es procesar los extremos de tal forma que se puedan ligar. Para ello, se necesita un extremo 3' hidroxilo y un extremo 5' fosfato. Sin embargo, en determinadas ocasiones los SSBs pueden transformarse en DSBs, utilizando otro mecanismo para su reparación. Estas situaciones son, por ejemplo, la presencia de varios SSBs cercanos, la activación de la maquinaria de transcripción o replicación en un lugar con SSB y la formación de "R-loops", híbridos de RNA y la cadena no-molde del DNA en las horquillas de transcripción (Jackson, 2002).

Los DSBs son extremadamente dañinas para la célula por la gran inestabilidad genómica que producen, pudiendo dar lugar a recombinaciones génicas inapropiadas o reorganizaciones cromosómicas con severas alteraciones funcionales que predisponen a la tumorigénesis e incluso pueden inducir la muerte celular. Este tipo de lesiones tienen dos mecanismos de reparación ("double stranded break repair", DSBR): la reparación homóloga (HR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Fig.18). La HR tiene lugar únicamente en la fase S y G2 del ciclo celular, y utiliza una cromátida hermana como molde para una reparación sin errores de la secuencia lesionada. Sin embargo, las células post-mitóticas, como las neuronas, están paradas en el periodo G0 del ciclo celular y carecen de cromátidas hermanas que sirvan de molde para la reparación fidedigna del DNA dañado. En este caso, la reparación se realizará empalmando los extremos rotos mediante la vía de reparación NHEJ. Esta vía es muy eficiente y opera en todas las fases del ciclo celular, siendo especialmente importante en G1 y G0 (Madabhushi et al., 2014).

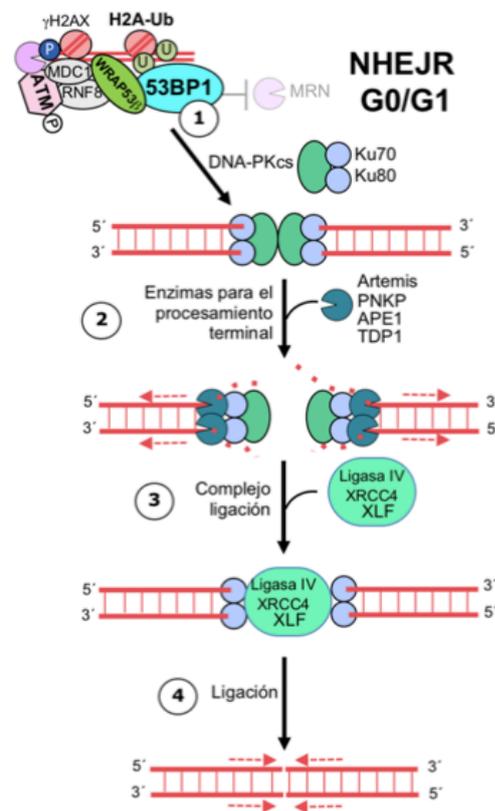


Figura 19. Esquema de la vía c-NHEJ. En esta vía, el heterodímero Ku70/80 se une a ambos extremos del DSB, sirviendo de plataforma para el ensamblaje del resto de componentes de la DSBR. Así, la DNA-PKcs se une a la estructura y se autofosforila, lo cual recluta nucleasas encargadas de procesar los extremos. Una vez procesados, se une al lugar el complejo ligasa IV/XRCC4/XLF, que une ambos extremos. Esquema obtenido de Mata-Garrido J, 2016.

La vía NHEJ es la principal estrategia para reparar DSBs en las células de mamíferos, a pesar de su gran tendencia a producir errores y pequeñas deleciones de nucleótidos que afectan al marco de lectura en la transcripción. Se han descrito dos tipos de NHEJ, la clásica o NHEJ canónica (c-NHEJ) y la NHEJ alternativa (alt-NHEJ); la segunda con una tasa de errores aún mayor que la primera. Sin embargo, su importancia es crucial, puesto que la rotura en sí produce mucha más inestabilidad en el genoma que las posibles mutaciones debidas a su reparación aberrante (Della-Maria et al., 2011).

La reparación c-NHEJ se activa por la unión de la proteína 53BP1 a la histona H2A ubiquitinada en el sitio de lesión del DNA. La reparación se inicia por un complejo proteico en forma de anillo, el heterodímero Ku70/80, que se une a ambos extremos rotos del DNA. Esta unión sirve como plataforma molecular para el ensamblaje de otros componentes de la maquinaria de reparación del DNA que promueven el alineamiento de los dos extremos terminales del DNA. Así, las proteínas ku del complejo ku70/80 interactúan, entre otras, con la quinasa DNA-PK. En particular, la subunidad catalítica de la DNA-PK (DNA-PKcs) juega un papel fundamental en la vía NHEJ. Las moléculas DNA-PKcs pueden interactuar formando un puente molecular entre los extremos del DSB. Esta unión, sinapsis, induce la autofosforilación de DNA-PKcs y la fosforilación por esta quinasa de otras proteínas de la ruta NHEJ a las que activa. Así son reclutadas nucleasas como ARTEMIS, PNPK, APE1 y TDP1/2 que se encargan de procesar los extremos, escindiendo los extremos 3' y 5' dañados. Esta etapa no es necesaria si los extremos 3' hidroxilo y 5' fosfato están expuestos. En ocasiones, además de la escisión es necesario añadir nucleótidos y para ello se recluta la DNA polimerasa IV, uniendo nucleótidos al extremo 3' de la hebra. Una vez procesados, se

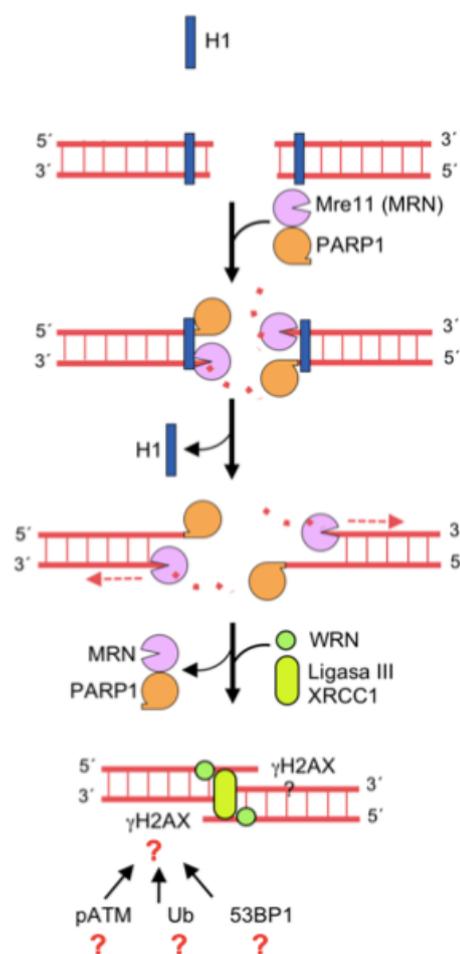


Figura 20. Esquema de la vía alt-NHEJ. La activación se lleva a cabo mediante la modificación de la H1, lo que produce la captación de PARP1 al lugar del daño. PARP1 activa el complejo MRN, necesario para el procesamiento de los extremos del DSB. Una vez procesados, son unidos por la acción del complejo ligasa 3/XRCC1. Imagen obtenida de Mata-Garrido J, 2016.

requiere la religación de los extremos para reparar la rotura del DNA, proceso mediado por la actividad de la ligasa IV, que forma un complejo con otras proteínas como XRCC4 y XRCC4-like factor (XLF) (Madabhushi et al., 2014) (Fig.19).

La reparación c-NHEJ es de vital importancia para la estabilidad genómica y su activación es inmediata, a los pocos segundos de producirse el DSB. Sin embargo, no siempre es posible su puesta en marcha, por lo que existen alternativas, como la alt-NHEJ. Los mecanismos enzimáticos responsables de esta vía han sido menos estudiados (Fig.20), aunque se conoce que la histona H1 está implicada en su activación y se cree que la PARP1 (poli ADP-ribosa polimerasa 1) juega un papel similar al de la DNA-PK en la c-NHEJ. Mediante la unión de cadenas de poli ADP-ribosa (PAR), la PARP1 activaría las enzimas necesarias para esta vía, entre ellas el complejo MRN (formado por Mre11, Rad50 y Nbs1) del que forma parte la endonucleasa Mre11 - que escinde nucleótidos del extremos 5' permitiendo el procesamiento de los extremos dañados-. Posteriormente la fusión la llevará a cabo en este caso la ligasa III, que forma un complejo con la proteína XRCC1 (Della-Maria et al., 2011).

6. DAÑO EN EL DNA Y NEURODEGENERACIÓN

6.1. Daño en el DNA y envejecimiento neuronal

El envejecimiento neuronal se debe fundamentalmente a una inestabilidad en el genoma causada por tres factores principales: acumulación de daño en el DNA, reparaciones aberrantes del daño y cambios en la organización de la cromatina (Madabhushi et al. 2014) (Fig.21).

Estudios recientes muestran que la propia actividad fisiológica neuronal, como por ejemplo la generada durante el aprendizaje, produce DSBs transitorias que, normalmente, son reparados en menos de 24 horas, por lo que la formación de DSBs depende en gran medida de la actividad neuronal (Pan et al. 2014). Si este daño no es reparado adecuadamente, se acumula, produciendo una gran inestabilidad genómica, que al mantenerse en el tiempo se convierte en uno de los factores implicados en el envejecimiento. Además del daño en el DNA, otros constituyentes y procesos celulares se ven afectados por el envejecimiento celular; sin embargo, éstos pueden ser reparados y restituidos con mayor facilidad (Chow & Herrup, 2015).

Es destacable que el envejecimiento neuronal se acompaña de una reducción significativa en la expresión de genes con funciones críticas para la homeostasis neuronal, tales como los que controlan la plasticidad sináptica, concomitantemente con un aumento del daño en el DNA en promotores de genes que se inducen por estrés oxidativo. Ante una lesión en una región transcripcionalmente activa, la RNA polimerasa II se detiene en la horquilla de

transcripción y, si no se repara, puede activar la apoptosis mediada por p53, una proteína que actúa como un “guardián del genoma”. Otra de las alteraciones ocurridas durante la transcripción está relacionada con la hebra de RNA nascente, que puede introducirse en la doble hebra de DNA y combinarse con la hebra no transcrita, dando lugar a los llamados R-loops que son híbridos de DNA/RNA. El RNA es mucho más sensible a los daños, por lo que la forma de procesarlos es transformándolos en SSBs o DSBs (Pan et al., 2014).

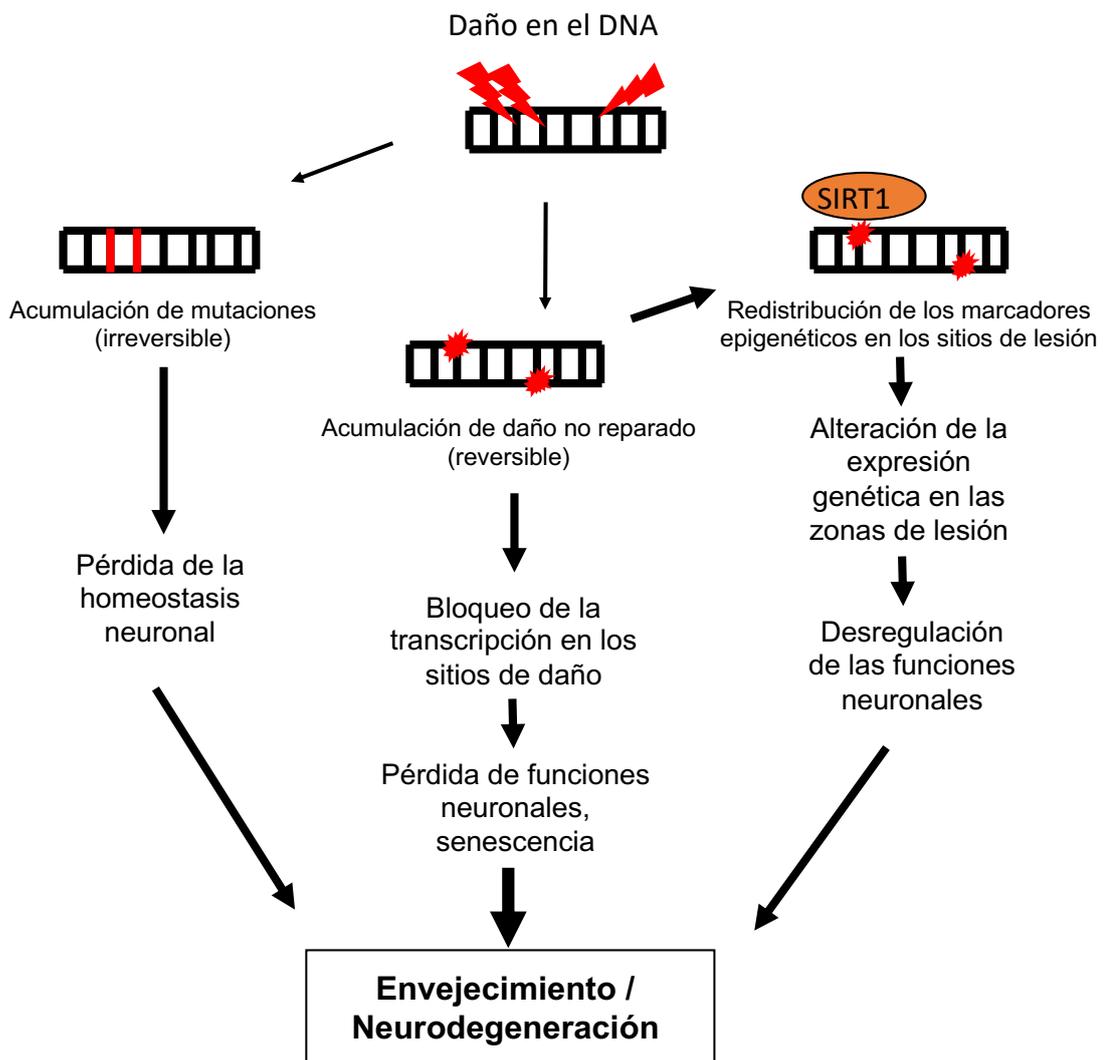


Figura 21. Consecuencias del daño en el DNA en el envejecimiento y la neurodegeneración. Una reparación errónea del DNA (**izquierda**), da lugar a mutaciones que se propagan dando lugar a una pérdida de la homeostasis neuronal. Estas mutaciones se pueden producir en genes que codifican para componentes de las rutas de reparación del DNA, lo que provoca una gran inestabilidad genómica. En otros casos, el DNA no es reparado (**centro**) por una deficiente DDR, esto provoca un bloqueo de la transcripción, que conlleva una disminución en las funciones neuronales en la que los genes afectados están implicados. El daño en el DNA también implica una modificación del marco epigenético, lo que afecta a la expresión génica.

Además, a esta progresiva acumulación del daño se suma una menor reparación global del genoma. Así, en neuronas envejecidas se ha observado una disminución en la actividad de enzimas necesarias para la DDR, por ejemplo, en las DNA-glicosilasas responsables de la reparación por escisión de bases, y la DNA-PK implicada en la NHEJ (Madabushi et al., 2014). Sin embargo, esta disminución en la reparación parece selectiva, siendo más eficiente la reparación de genes transcripcionalmente activos. Además, el patrón transcripcional de dos neuronas cualesquiera es completamente distinto, por lo que las regiones con daño no reparado en el DNA varían mucho de una célula a otra. Sumado a esto, si las neuronas activas sufren más daño y reparaciones que aquéllas menos activas, también veremos grandes diferencias en la acumulación de daño con el paso del tiempo. Todo esto crea una cierta vulnerabilidad en determinadas regiones en las que encontraremos neuronas más envejecidas que en otras. Estos distintos patrones de daño tienen gran interés, dada su estrecha relación con los distintos fenotipos existentes en las diferentes enfermedades neurodegenerativas (Chow & Herrup, 2015).

En ocasiones, el daño es reparado pero de forma aberrante, por lo que se acumulan mutaciones permisivas que contribuyen a la inestabilidad genómica al generar mRNAs y proteínas anormales que pueden conducir a una disfunción neuronal. Es importante señalar que la reparación aberrante del DNA es irreversible, mientras que la acumulación de lesiones no reparadas es reversible (Madabushi et al., 2014). Una vez se ha producido una mutación, ésta se propaga, lo que se conoce como variación en el número de copias (CNVs), que no es más que una alteración de la secuencia génica - ya sea por inserción, duplicación, deleción, inversión y/o traslocación-. Se ha observado, mediante tecnologías de secuenciación genómica avanzadas, que las neuronas post-mortem presentan un elevado número de CNVs comparado a las que aparecen en otras células o en progenitores neuronales (Pan et al., 2014). Además, cuando una CNV se presenta en genes que codifican para factores de la DDR encontramos un envejecimiento prematuro, siendo evidencia directa de su implicación en la neurodegeneración (Madabushi et al., 2014).

Recientemente se ha descubierto que durante la reparación del daño al DNA se sintetizan pequeñas hebras de RNA (miRNAs) que parecen reclutar factores modificadores de la cromatina y proteínas señalizadores de las DBSs. Además, algunas proteínas de unión a RNA, como FUS y RBMX, son rápidamente reclutadas en los sitios de daño mediante PARP1 y contribuyen también a regular la reparación de DSBs (Pan et al., 2014). Por tanto, su alteración también estará implicada en una respuesta al daño ineficaz.

Durante la DDR se producen cambios en la conformación de la cromatina, que por una parte permiten el acceso a la maquinaria de reparación mediante la relajación de la estructura, mientras que, por otro lado, compactan aquellas

zonas que contienen genes dañados, evitando su expresión y la posible producción de proteínas aberrantes. Así, una vez reparado el daño la cromatina vuelve a su conformación original, previa a la lesión. Sin embargo, esto no siempre es así, pudiendo quedar, como “memoria” celular del daño en el DNA, una alteración persistente en los patrones epigenéticos de expresión génica. Por otro lado, el daño puede no ser reparado, permaneciendo la señalización del mismo a través de una redistribución de SIRT-1, enzima encargada de la deacetilación de histonas para la conformación de heterocromatina. Estos mismos cambios se han visto en cerebros envejecidos de modelos animales (Madabushi et al., 2014).

Los cambios degenerativos, asociados a la inestabilidad genómica dependiente de la acumulación de lesiones en el DNA, finalmente llevan a una pérdida de sinapsis o de arborización dendrítica, dando como resultado una atrofia cerebral típica del envejecimiento, además de desencadenar un estado proinflamatorio crónico. Así mismo, se puede producir la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas y no funcionales (Chow & Herrup, 2015) que pueden contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

6.2. Daño en el DNA en las enfermedades neurodegenerativas

La generación de lesiones en el DNA y su reparación son procesos que ocurren constantemente y forman parte de la fisiología normal del núcleo. No obstante, cuando el balance entre ambos procesos se descompensa comienza a acumularse DNA no reparado que lleva a una progresiva pérdida de la función neuronal. Así, cuando existe una alteración en alguno de los factores que hacen posible una correcta reparación del daño, se acumulan lesiones que pueden desembocar en una enfermedad neurodegenerativa (Kirkwood, 2005).

Esta relación entre la alteración de la reparación del DNA y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas se ha puesto de manifiesto gracias a diversos estudios en ratones transgénicos portadores de déficits en determinados componentes de la DDR. Por ejemplo, el estudio de Vegh et al. (2012), en el que se observa la pérdida de Ercc1 (proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1) que es un componente esencial en múltiples rutas de reparación como en la BER, NER y DSB. En este modelo experimental, se observó que los portadores de esta mutación en heterocigosis desarrollaban un fenotipo neurodegenerativo, mientras que los homocigotos morían durante la gestación.

De la misma forma, se ha demostrado experimentalmente que la deficiencia en Ku70, Ku80 o LIG4, todos ellos factores implicados en la NHEJ, conduce a una apoptosis masiva en neuronas postmitóticas, una vez que han alcanzado su estado maduro; mientras que las células progenitoras neuronales no se ven afectadas. Esto recalca la gran importancia de este mecanismo de reparación,

el cual es absolutamente necesario para la supervivencia neuronal (Chow & Herrup, 2015).

6.2.1. Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con DSBR

Es importante destacar que son varias las enfermedades relacionadas con un déficit en la reparación de DSBs. Una de las más estudiadas es la ataxia telangiectasia (AT). Es una enfermedad autosómica recesiva causada por una mutación en ATM (ataxia telangiectasia mutada), una proteína que, en respuesta a DSBs, fosforila la histona H2AX (γ H2AX), TP53B1 (“tumor protein P53 binding protein”) y NSB1, un componente del complejo MRN necesario para una correcta activación de la NHEJ. En estos pacientes encontramos una inactivación de p53 con aumento de las DSBs que dan lugar a radiosensibilidad, inmunodeficiencia y una predisposición a la transformación maligna tumoral. Además, se acompaña de síntomas neurológicos característicos secundarios a la atrofia cerebelosa: déficits en el movimiento y la coordinación desde muy jóvenes, apraxia oculomotora y disartria. (White&Vijg, 2016; Madabushi et al., 2014). La enfermedad “ataxia telangiectasia like” (ATLD) cursa con la misma fisiopatología, pero de una forma más tardía. Su causa subyace en una mutación en MRE11, proteína del complejo MRN que se compone además por RAD50 y NBS1. Una vez reconocida la lesión este complejo se une a ella reclutando más factores implicados en la reparación.

Por otra parte, mutaciones en NBS1 producen otra enfermedad llamada síndrome Nijmegen (“Nijmegen breakage syndrome, NBS”) que, en lugar de presentar atrofia cerebelosa, se caracteriza por una marcada microcefalia. No obstante, sí que comparte la radiosensibilidad, inmunodeficiencia y predisposición a malignizar con la AT y la ATLD (Digweed&Sperling, 2004).

Es interesante la diferencia entre estas enfermedades, ya que las tres afectan la actividad ATM. Sin embargo, mientras que la AT y la ATLD evitan la apoptosis, permitiendo la supervivencia de neuronas dañadas, el NBS desencadena la muerte celular generando microcefalia (Madabushi et al., 2014) (Fig.22).

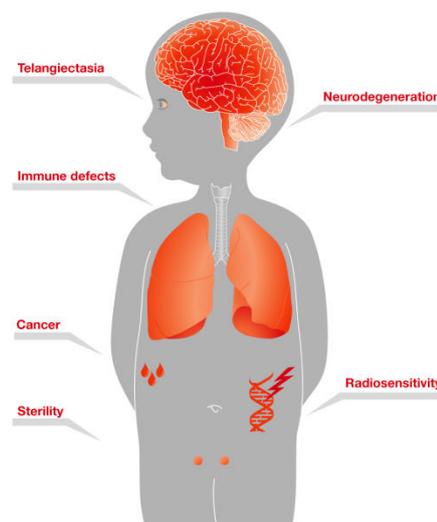


Figura 22. Características de un paciente con ataxia telangiectasia. De forma común, todas las enfermedades causadas por una alteración en la DSBR causan inmunodeficiencia, radiosensibilidad, un aumento del riesgo a padecer cáncer y neurodegeneración. En el caso de los pacientes con AT y ATL la neurodegeneración se manifiesta principalmente en forma de atrofia cerebelosa, mientras que en el NBS cursan con microcefalia. Imagen obtenida de McKinnon, 2004.

Junto al NBS, hay otras tres enfermedades que por déficits en factores de reparación de DSBs cursan con microcefalia. Este es el caso del síndrome de Seckel producido por una mutación en ATR, una proteína quinasa que señala los DBSs. El síndrome LIG4 también cursa con esta característica, pero en este caso la mutación es en la ligasa 4 o también llamada XRCC4 que es la encargada de religar los dos extremos de la rotura. El síndrome XLF afecta la proteína XLF ("XRCC4-like factor") que también interviene en la unión de los extremos (Pan et al., 2014).

6.2.2. Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con SSBR

Al igual que el daño producido por DSBs, el generado por SSBs es también sumamente importante ya que éste, a pesar de causar menos inestabilidad genómica, es tres veces más frecuentes en el sistema nervioso que el producido por DSBs. Las alteraciones en su mecanismo de reparación también se relacionan con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Así la ataxia con apraxia oculomotora (AOA1) es producida por mutaciones en el gen de la aprataxina (APTX) que codifica una proteína que permite la unión de los extremos de la cadena lesionada de DNA al interactuar con XRCC1/LIG3 y PARP1, dos factores implicados en la SSBR. AOA1 al igual que AT produce ataxia, apraxia oculomotora y atrofia cerebelosa, además de presentar deterioro cognitivo, hipoalbuminemia e hipercolesterolemia. Sin embargo, AOA1 no presenta radiosensibilidad ni predisposición a desarrollar cáncer (Fig.23). Otra enfermedad mucho menos frecuente es la ataxia espinocerebelosa con neuropatía axonal (SCAN1), que es producida por

una mutación en la tirosil-DNA fosfodiesterasa 1 (TDP1) que es una enzima encargada de hidrolizar enlaces fosfotirosina en el extremo 3'. Este tipo de enlaces son generados cuando la actividad de la topoisomerasa 1 (TOP1) es abortada. La TOP1 produce roturas transitorias en la hebra de DNA y se une a su extremo 3' a través de residuos tirosina para inducir la relajación de la hebra de DNA y permitir que la RNA polimerasa pueda progresar a lo largo del molde de DNA y llevar acabo la transcripción. El déficit de TDP1 impide la reparación de las lesiones ocasionadas por la actividad fisiológica de la TOP1, lo que conduce a la acumulación de daño en el DNA. En la ataxia espinocerebelosa

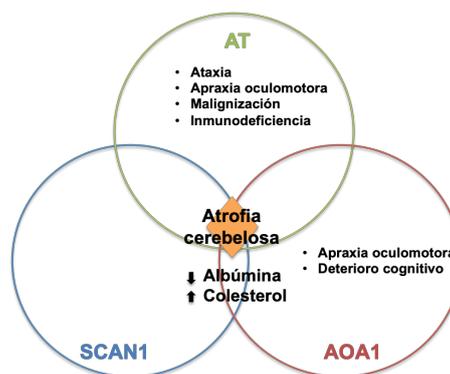


Figura 23. Esquema de alteraciones en la SSBR y DSBR. AT, AOA1 y SCAN1 comparten como manifestación común la atrofia cerebelosa. A diferencia de AT, en la que los pacientes presentan alteraciones en la inmunidad y cáncer, AOA1 y SCAN1 están más restringidas al SNC.

los pacientes presentan atrofia cerebelosa, sin deterioro cognitivo ni apraxia oculomotora, y tampoco exhiben tendencia a malignizar. No obstante, sí presentan discreta hipercolesterolemia e hipoalbuminemia (Madabhushi et al., 2014; Pan et al., 2014).

6.2.3. Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con NER

Mutaciones en componentes de esta ruta de reparación también se han visto relacionados con varias enfermedades como la xeroderma pigmentosa (XP), el síndrome Cockayne (CS) y la tricotiodistrofia (TTD). Estas tres enfermedades están caracterizadas por fotosensibilidad, además de presentar alteraciones neurológicas (Fig.24).

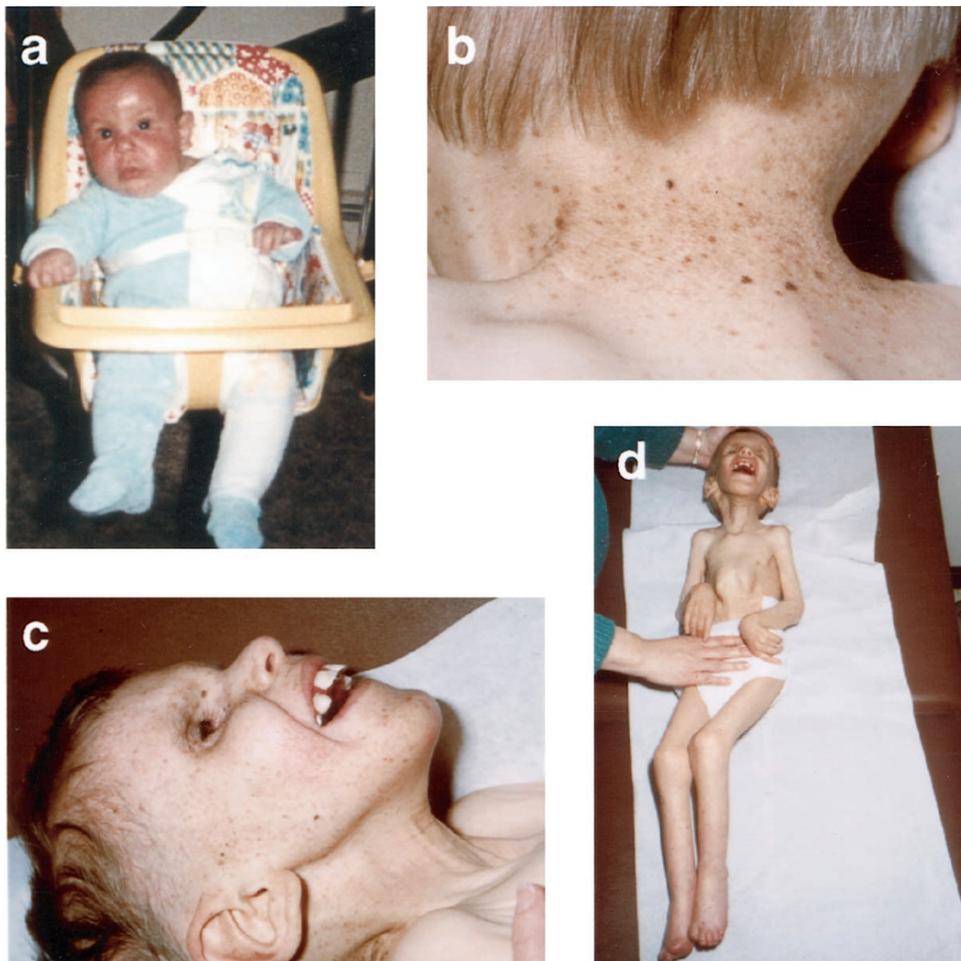


Figura 24. Fenotipo de xeroderma pigmentoso y síndrome de cockayne. **A.** Niño de 4 meses con XP que debuta con una quemadura severa. **B.** Lesiones cutáneas típicas del XP: atrofia cutánea, efélides, maculas hipopigmentadas y telangiectasias. **C.** Microcefalia y facies típica de los pacientes con CS. **D.** Caquexia y distonia en un paciente de 6 años con CS. Imágenes obtenidas de Rapin et al., 2000.

La XP se produce por una mutación en el gen que codifican la proteína XPA que sirve como proteína estructural para el ensamblaje de otros componentes de la ruta NER (GG-NER y TC-NER), tales como XPB y XPD, dos DNA helicasas que también pueden encontrarse mutadas en esta enfermedad. Asimismo, también podemos tener alteradas XPF y XPG que son endonucleasas implicadas en el procesamiento del DNA a través de la vía NER. Estos pacientes tienen mayor tendencia a padecer distintos tipos de cáncer, además de presentar manifestaciones neurológicas en un 25% de los casos, siendo característica la microcefalia y el retraso mental. Sin embargo, la mutación en XPC que es una proteína encargada de señalar la lesión en GG-NER no provoca síntomas neurológicos, lo que nos señala la importancia de la TC-NER en la reparación del DNA neuronal (Anttinen et al., 2008).

Los pacientes con CS pueden tener mutaciones en XPB o XPD y manifiestan un fallo del desarrollo, acompañado de envejecimiento prematuro y neurodegeneración progresiva. Por su parte, los pacientes con TTD presentan otros tipos de mutaciones en el gen XPD, dando en un 80% de los casos síntomas neurológicos como microcefalia y retraso mental (Madabhushi et al., 2014; Kralund et al., 2013).

6.2.4. Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la expansión de repeticiones de trinucleótidos

Existen varias enfermedades que tienen como causa una expansión de repeticiones de trinucleótidos. Las más conocidas son la enfermedad de Huntington (HD) y el síndrome de X frágil (FXS).

La HD es una enfermedad autosómica dominante que se debe a una repetición de CAG en el gen de la huntingtina (HTT) que se expande con el paso del tiempo. En esta enfermedad el síntoma clave es la disquinesia; sin embargo, también presentan alteraciones cognitivas y neuropsiquiátricas que pueden debutar mucho antes que los movimientos coreiformes. El gen HTT codifica una proteína, la huntingtina, que en respuesta al daño en el DNA colocaliza con la proteína ATM, una quinasa implicada en la señalización del daño que constituye un componente esencial de la DDR (Maiuri et al., 2019). Se ha demostrado que la expansión de CAG en la mutación del gen HTT puede deberse a los mecanismos de reparación BER o TC-NER. En este contexto, se ha demostrado que la pérdida de 7,8-dihidro-8-oxoguanina-DNA glicosilasa, una enzima de BER, en modelos animales con HD produce una supresión en la expansión de trinucleótidos. Asimismo, la supresión de CSB, una proteína específica de TC-NER, estabiliza la expansión (Pan et al. 2014).

El FXS es una enfermedad ligada al cromosoma X causada por una expansión de CGG en el extremo 5'UTR del gen FMR1 ("fragile X mental retardation 1"). Se caracteriza por retraso mental en diferentes grados, aumento del volumen

testicular y dismorfias faciales. De la misma forma que ocurre en HD, la expansión de CGG parece tener una relación con los mecanismos de reparación del DNA. Se ha visto que la pérdida de LIG4, una DNA-ligasa necesaria para la c-NHEJ, aumenta la expansión de CGG. Por tanto, en este caso es probable que la causa de la expansión sea una alteración en los mecanismos de reparación, en lugar de ser producto de los mismos como ocurre en HD (Gazy et al., 2018).

6.2.5. Otras enfermedades neurodegenerativas

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo que se acompaña de alteraciones conductuales. La AD, también conocida como demencia senil de tipo Alzheimer, ocurre generalmente en pacientes mayores de 65 años, por lo que ya existe una base de alteraciones genómicas propias del envejecimiento. Se ha demostrado que en los pacientes con AD existe un aumento del daño en el DNA y una disminución de las proteínas implicadas en la reparación de DSBs, como la DNA-PKcs, y en la BER (Herrup et al., 2013). Sin embargo, esto también ocurre en el envejecimiento normal, por lo que hay que discernir si estos hallazgos están implicados directamente en la etiopatogenia de la enfermedad.

Para profundizar en esta hipótesis se han realizado estudios en el modelo murino p25/Cdk5. Cdk5 es una proteína quinasa que necesita la ciclina p35 como unidad catalítica para así fosforilar la proteína ATM. Esta ciclina, en condiciones de neurotoxicidad, se degrada dando lugar a la ciclina p25 que se une a Cdk5 cambiando la especificidad del complejo y su localización celular. En este caso, los ratones presentan características similares a los pacientes con AD, como el depósito de β -amiloide, los ovillos neurofibrilares de tau, la astrogliosis, la reducción de las sinapsis y la pérdida neuronal. Al hacer un análisis comparativo entre los ratones p25/Cdk5 presintomáticos y los que ya presentaban signos patológicos se vio un incremento de DSBs en los segundos. Por tanto, es evidente que la persistencia de DSBs sin reparar juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Madabhushi et al. 2014). Sobre la base de este descubrimiento, se ha investigado por qué se acumulan DSBs en estos ratones p25/Cdk5, observándose que existe una inhibición de las histona deacetilasas HDAC1 y SIRT1, lo que aumenta la acetilación de histonas y hace al DNA más susceptible al daño (Chow & Herrup, 2015). De esta forma, la pérdida del patrón de hipoacetilación, además de aumentar la susceptibilidad por la conformación laxa de la cromatina, permite que el daño en el DNA se perpetúe dando lugar a mayor inestabilidad genómica.

La segunda patología neurodegenerativa más frecuente es la enfermedad de Parkinson (PD) que se caracteriza por alteraciones motoras a causa de una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. En este

caso se ha visto que existe daño en el DNA sin reparar, no por una alteración en las proteínas implicadas en la DDR, sino por una disfunción mitocondrial que provoca estrés oxidativo y alteraciones metabólicas. Así una respiración mitocondrial ineficaz provoca un daño directo en el DNA, además de poder alterar los mecanismos de reparación del mismo (Pinto et al., 2018). Las mutaciones en los genes *PRKN* y *PINK1* son, entre otros factores, responsables de la acumulación de mitocondrias alteradas que producen un estrés oxidativo que conduce a la forma familiar de PD (Finsterer 2011). De la misma forma, algunas toxinas ambientales, como es el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), tienen un efecto neurotóxico sobre las neuronas dopaminérgicas al inhibir la cadena de transporte de electrones mitocondrial y aumentar la generación de ROS. Esto provoca unos síntomas muy similares a los que aparecen en la enfermedad de Parkinson (Bose & Beal, 2016).

Otra enfermedad en la que se ha demostrado un claro papel de los DSBs y de alteraciones en la DDR en su patogenia es la esclerosis lateral amiotrófica (ALS). Ésta puede ser esporádica (90% de los casos) o familiar (10%). ALS es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las neuronas motoras del córtex, tronco del encéfalo y médula espinal dando lugar a la denervación del músculo estriado y por tanto causando una atrofia muscular progresiva (Kwiatkowski et al., 2009).

Mutaciones en la proteína FUS (“Fused in sarcoma”) se han relacionado con las formas familiares de la enfermedad (fALS). FUS es una proteína de unión a DNA/RNA que está implicada en la señalización de la DDR. Así al producirse un daño en el DNA es fosforilada por ATM y DNA-PKcs promoviendo el reclutamiento de XRCC1/LIG3 a través de PARilación (Poli-ADP Ribosilación) que es llevada a cabo por PARP1. Estas son proteínas implicadas en las vías SSBR y alt-NHEJ, por lo que la mutación de FUS conllevara una alteración de las mismas. FUS además posee dominios de interacción con la histona deacetilasa HDAC1, que son los que encontramos mutados en muchas de las fALS. Este hecho, puede indirectamente modular la reparación del DNA, ya que HDAC1 es necesaria para que la cromatina cambie de conformación y así pueda permitir el acceso a la maquinaria de reparación (Wang et al., 2018).

Otra proteína de unión a DNA/RNA, TDP-43 (“TAR DNA-binding protein 43”), también ha sido implicada en la patogenia de fALS. TDP-43 se localiza normalmente en el núcleo, sin embargo en los casos con fALS la proteína se transloca al citoplasma (Mackenzie et al., 2010). En un estudio llevado a cabo por Mitra et al. (2018) se demuestra que en células madre derivadas de motoneuronas que carecen de TDP-43 existe un aumento de DSBs y una disminución en la activación de la vía NHEJ debida a un menor reclutamiento de XLF/LIG4.

7. RESPUESTA NEURONAL AL DAÑO EN EL DNA

7.1. Estructura del núcleo neuronal: Organización de la cromatina

La arquitectura nuclear es específica del tipo celular y del estadio madurativo en el que se encuentre, además puede verse alterada de diversas formas ante distintos estados fisiopatológicos. Su organización es fundamental, puesto que de ella dependen las funciones celulares. De esta forma, la estructura nuclear está determinada por la organización de los cromosomas en territorios específicos, la posición de los genes dentro de los cromosomas y la distribución de los cuerpos nucleares. La función nuclear depende de esta organización, asegurando una adecuada interacción entre los distintos compartimentos nucleares (Takizawa and Meshorer, 2008).

En general, el núcleo neuronal se identifica por el predominio de eucromatina, su prominente nucléolo y las granulaciones intercromatínicas, donde reside la maquinaria de “splicing”. Además, el cuerpo o soma neuronal presentan un citoplasma característico, debido a una amplia distribución de la maquinaria de traducción formando la sustancia de Nissl. El núcleo está ocupado por un gran volumen de eucromatina, que se extiende entre el nucleolo y la periferia, donde existe un ambiente permisivo para la transcripción. En cambio, la heterocromatina supone una mínima parte del volumen nuclear, disponiéndose asociada al nucléolo y a la lámina nuclear de la MNI (Fig.25). Este patrón se explica por la elevada actividad transcripcional que presentan las neuronas (Sarkander & Uthoff, 1976). Por esta razón, el DNA neuronal es altamente

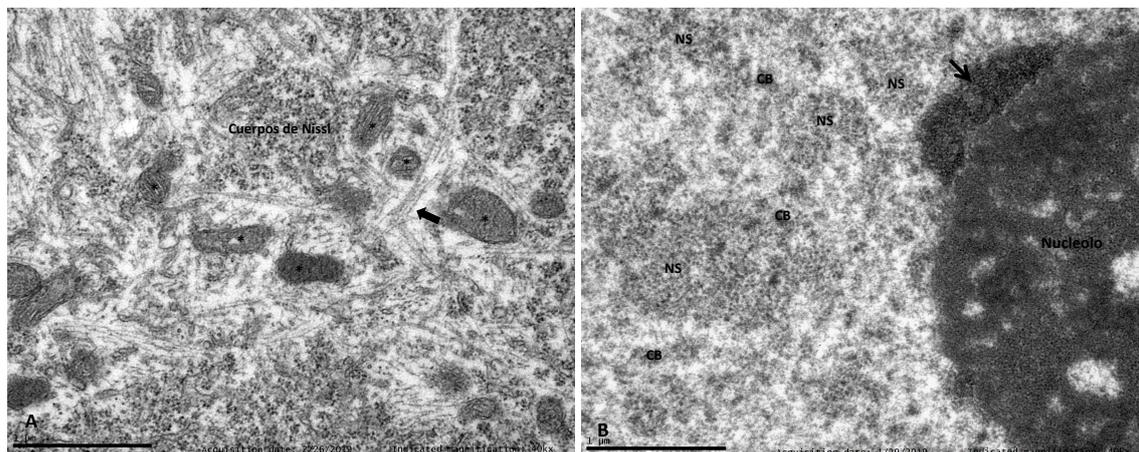


Figura 25. Estructura neuronal. **A.** El citoplasma es abundante en orgánulos, entre las que destaca un gran número de mitocondrias (asterisco), dado su elevado metabolismo energético. Asimismo, presenta abundantes cuerpos de Nissl, que corresponden a RER donde se lleva a cabo la traducción de proteínas. Entre los orgánulos, se distribuyen elementos del citoesqueleto que dan aportan soporte estructural, denominados neurofibrillas (flecha). **B.** Núcleo neuronal, en el cual se observa la distribución dispersa de la cromatina (eucromatina), entre la que se disponen los gránulos intercromatínicos (NS y CB). Asociada al nucléolo, se encuentran dominios de cromatina altamente compactados (flecha: heterocromatina).

susceptible a sufrir DSBs, ya que la conformación abierta de la cromatina facilita el acceso a agentes genotóxicos (Mata-Garrido et al., 2016; Misteli & Soutoglou, 2009).

Los cambios que se producen en la estructura y organización de la cromatina son estudiados con diferentes aproximaciones metodológicas que demuestran una gran reorganización de los dominios de heterocromatina durante la diferenciación neuronal. En ESCs (“embryonic stem cells”) indiferenciadas aparecen pocos focos de gran tamaño, en ESCs derivadas de progenitores neuronales se disponen en numerosos focos pequeños, mientras que en las neuronas maduras aparece pocos focos altamente compactados (Aoto et al., 2006; Meshorer and Misteli, 2006). Mediante estudios con enzimas de restricción se pueden observar los cambios en la longitud de repetición del nucleosoma (“nucleosome repeat length”, NRL), que es el espacio correspondiente al DNA espaciador entre dos nucleosomas. La modificación del NRL esta directamente relacionado con cambios en la expresión génica, de tal forma que cuando disminuye su longitud, la cromatina aumenta su compactación, generando un silenciamiento génico. Esto se produce durante la diferenciación neuronal y el envejecimiento, así como en enfermedades neurodegenerativas (Jaeger and Kuenzle, 1982; Berkowitz et al., 1983). Por ejemplo, se ha visto que, al comparar sujetos sanos con pacientes con EA, existe en los últimos una menor sensibilidad a la nucleasa microcócica, la cual se encarga de cortar el DNA espaciador (Lewis et al., 1981; Lukiw et al., 1990). La sensibilidad a esta nucleasa depende directamente del NRL, por lo que una disminución en su longitud conllevara una menor sensibilidad. Este hallazgo demuestra una disminución de los NRL en los pacientes con AD, lo que parece indicar una disminución de la actividad transcripcional y esto, en último término, se traduce en un deterioro de la actividad neuronal.

Estos estudios, y otros, revelan un elevado dinamismo de la estructura de la cromatina, la cual se modifica con los cambios morfológicos y funcionales de células o tejidos. Esto ocurre de forma fisiológica durante los distintos estadios de la diferenciación celular, así como en determinadas condiciones fisiopatológicas, por ejemplo, en enfermedades neurodegenerativas. No obstante, antes de producirse grandes cambios en la conformación de la cromatina, aparecen modificaciones más sutiles: cambios en la posición espacial de distintas regiones de los cromosomas, de diferentes “loci” de genes e incluso de cromosomas completos (Takizawa and Meshorer, 2008).

Como se ha comentado anteriormente, la posición de los cromosomas en el espacio nuclear no es al azar, sino que se disponen en territorios cromosómicos altamente regulados que aseguran una correcta función celular. Para estudiar la topografía cromosómica, se pueden utilizar dos regiones compuestas de secuencias repetitivas que son fácilmente detectables mediante inmunofluorescencia e hibridación *in situ* durante la mitosis y la interfase, estas

son los centrómeros y los telómeros (Misteli, 2005). De esta forma, se ha visto que, en las células de Purkinje los centrómeros, al igual que los telómeros, se encuentran agrupados en forma de heterocromatina, situándose en la periferia y asociados al nucléolo. Además, los centrómeros de algunos cromosomas - como es el caso del cromosoma 2 y el 11 en las células de Purkinje-, se disponen en proximidad formando un patrón característico, mientras que en las células granulares del cerebelo este patrón es completamente distinto, lo que indica que estos patrones son específicos del tipo celular (Vadakkan and Li, 2006). Es interesante señalar que esta disposición, en las células de Purkinje - célula post-mitótica-, de los centrómeros en forma de heterocromatina es la que poseen al salir del ciclo celular. Por el contrario, en otros tipos celulares, como los fibroblastos, los centrómeros no se encuentran siempre agrupados, sino que cambian su conformación según la fase del ciclo celular en la que se encuentren, para así facilitar la replicación del DNA (Martou and Boni, 2000; Bartholdi, 1991). Estos resultados demuestran la importancia de la localización nuclear de los cromosomas y sugieren que los dominios cromosómicos son móviles, pudiendo reorganizarse en el interior nuclear.

Esto cobra vital importancia en respuesta al daño en el DNA ya que, con el fin de facilitar la reparación de las lesiones en el DNA y evitar la inestabilidad genómica, se generan reorganizaciones cromosómicas en el interior nuclear. Así, ante un DSB “se reactiva” el ciclo celular, pasando de G0 a G1 (Casafont et al., 2011). Sin embargo, la entrada en la fase G1 no supone una reactivación efectiva del ciclo celular como tal, ya que no llega a pasar a la fase S. La transición G0-G1 está inducida por la expresión de la ciclina D -un marcador de la fase G1 y regulador de la progresión a fase S-, pero con la ausencia de expresión de ciclina E -un marcador de la fase S y G2-. Por tanto, esta entrada en fase G1 sin activación franca del ciclo celular, posiblemente se trate de un mecanismo para facilitar la reorganización cromosómica en el espacio, favoreciendo la movilización de regiones cromosómicas dañadas hacia ambientes de represión transcripcional, así como un modo de inducir la expresión de las proteínas necesarias para la DSBR y facilitar su interacción con el DNA lesionado.

De la misma forma, cambios en la posición espacial de los “loci” génicos en el interior nuclear también siguen una regulación estricta. Por ejemplo, en las células de Purkinje, el gen *Plc3* aumenta progresivamente su expresión entre el día 2 y 7, por lo que debe cambiar su posición desde la periferia, donde existe un ambiente represivo, hacia el interior nuclear entre el día 3 y 5. En cambio, un gen con expresión constante, como *Ror*, no cambia su posición (Martou and Boni, 2000). Por tanto, el reposicionamiento de genes está directamente relacionado con su expresión. Así pues, la reorganización de regiones genómicas tiene como objetivo modular la expresión de la información genética contenida en las mismas.

7.2 Reparación del daño en el DNA neuronal: focos de lesión transitorios y permanentes

7.2.1. Respuesta al daño del DNA

El daño en el DNA desencadena una serie de mecanismos reparadores que tienen repercusión en la organización nuclear y, consecuentemente, inciden en la regulación de la transcripción y el ciclo celular. De esta forma, durante la DDR se forman dos compartimentos de cromatina, en los cuales tiene lugar el procesamiento de los DSBs. Un compartimento transitorio, que tiende a desaparecer dentro de las 24h de producirse el daño, y otro persistente, donde se acumula el DNA dañado no reparado o irreparable. Ambos compartimentos concentran componentes de la DDR, como γ H2AX, Ub-H2A, pATM y 53BP1, lo que significa que las rutas de señalización del daño en el DNA permanecen activas hasta que la DDR haya concluido (Casafont et al., 2011).

La activación de la DDR se inicia con la fosforilación de la variante de la histona H2A, H2AX, en la serina 139, a una distancia de 4 residuos del extremo carboxi-terminal. La H2AX es una de las variantes de histona más conservadas, representa de un 2-25% del pool de histona H2A. Al producirse DSBs, la forma fosforilada de H2AX, γ H2AX, se presenta en forma de focos nucleares (Fig.26), los cuales alcanzan su máxima expresión a las 0.5h de inducirse el daño en el DNA. La fosforilación de H2AX se extiende a los flancos de lesión del DNA y es llevada a cabo por quinasas de la familia de la fosfatidil inositol 3 quinasa, que son la ataxia-telangiectasia mutada (ATM), ataxia-telangiectasia y Rad3-related (ATR), y la proteína quinasa dependiente de DNA (DNA-PK). Así, γ H2AX actúa como marcador del daño del DNA, además se propaga hasta 1 megabase en los flancos de la lesión con el fin de amplificar la señal de daño y promover el reclutamiento de las moléculas efectoras de la DDR (Rogakou et al., 1998) (Fig.18).

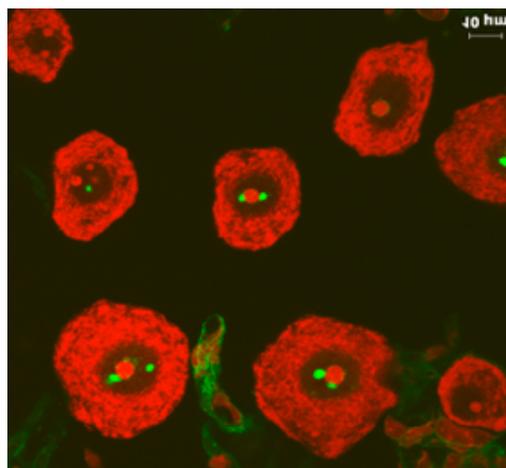


Figura 26. Focos γ H2AX positivo. Se observan neuronas mediante microscopia confocal. En ellas se distinguen varios focos de daño permanente, inmunomarcados con γ H2AX de color verde. Véase como estos se disponen asociados al nucleolo. Imagen obtenida de Lafarga M & Berciano M.T. (2014)

En este contexto, la histona γ H2AX proporciona un sitio de unión para la molécula MDC1 ("Mediator of DNA Damage Checkpoint 1"). MDC1 es una proteína que, mediante la fosforilación de su dominio SDT, recluta al complejo MRN, estabilizando los extremos rotos del DNA. A su vez, el complejo MRN

capta moléculas de ATM fosforilado (pATM), lo que permite la fosforilación de sustratos. Así, el complejo ATM-MRN asociado a MDC1 es el responsable de la propagación de la señal de γ H2AX. MDC1, también recluta la ubiquitina ligasa RNF8, que produce la ubiquitinación de la histona H2A y γ H2AX. RNF8 es transportada al lugar del daño gracias a su unión a WRAP53, que se une al dominio FHA de RNF8 y al motivo WD40 de MDC1. La ubiquitinación de las histonas H2A es fundamental para el reclutamiento de proteínas efectoras de la DSBR, tales como 53BP1, BRCA1 y RAD51, que son ensambladas gracias a su interacción con WRAP53, la cual actúa como estructura mediadora para facilitar la interacción con los factores de la DDR (Henriksson et al., 2014). La interacción de H2A-Ub con una u otra proteína de la DDR, indica la ruta de reparación que se va a llevar a cabo. Así, cuando H2A-Ub interacciona con 53BP1, el DSB se reparará mediante la ruta NHEJ; mientras que cuando interacciona con BRCA1, lo hará mediante la vía HR. En el caso de las neuronas, que son células post-mitóticas, la ruta que se activará será la NHEJ.

7.2.2. Organización espaciotemporal y dinámica de los focos de lesión en neuronas: focos transitorios y permanentes

Para estudiar los focos de lesión neuronal se analizan los patrones de expresión de γ H2AX, como marcador del daño en el DNA, y 53BP1, como factor clave para la reparación del DNA por la vía NHEJ, con técnicas inmunocitoquímicas (Fernández-Capetillo et al., 2004; Dimitrova et al., 2008). Para analizar la respuesta neuronal al daño en el DNA, Casafont et al. (2011) realizaron un estudio en neuronas del ganglio sensitivo de la rata, comparando animales control con ratas que habían sido expuestas a una dosis subletal de radiación ionizante (4Gy) de rayos X y sacrificadas a distintos tiempos post-irradiación (p-IR) (Fig.27). Posteriormente, Mata-Garrido et al. (2018) obtuvieron los mismos resultados en neuronas corticales de ratas y ratones, lo que sugiere que la respuesta al daño en el DNA es universal en las poblaciones neuronales del sistema nervioso, al menos de los mamíferos.

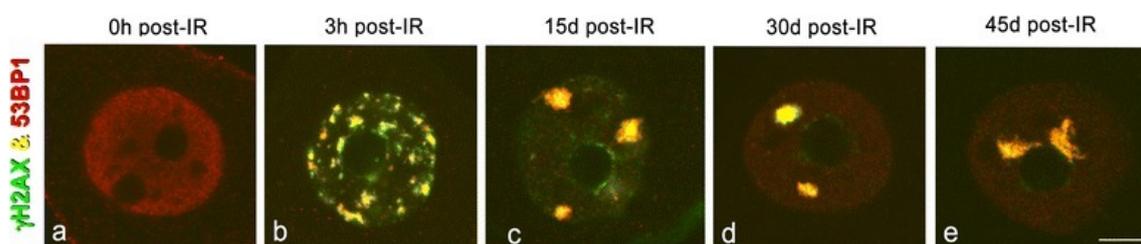


Figura 27. Doble inmunomarcaje para γ H2AX y 53BP1 en neuronas disociadas de ganglio sensorial. A. Neurona control, no radiada, con inmunomarcaje nucleoplásmico difuso para 53BP1 y ausencia de señal para γ H2AX. **B.** A las 3h post-radiación, γ H2AX y 53BP1 se co-localizan en numerosos focos de daño transitorio, que se distribuyen por todo el núcleo a excepción del nucleolo. **C-E.** A los 15, 30 y 45 días post-radiación, aparecen entre 1-3 grandes focos persistentes, intensamente marcados para γ H2AX y 53BP1, que van disminuyendo de intensidad a lo largo del tiempo. Imagen obtenida de Mata-Garrido, 2016.

Así pues, los referidos autores observaron que en las neuronas control γ H2AX era casi indetectable, mientras que existía una expresión difusa en el nucleoplasma de 53BP1. Resulta de gran interés la existencia de una respuesta muy temprana, ya detectable a las 0,5 h p-IR, consistente en la aparición de numerosos focos pequeños ($0,4-1\mu\text{m}^2$), conocidos como “Irradiation induced foci” (IRIF), inmunorreactivos para γ H2AX y 53BP1 y distribuidos por el núcleo con excepción del nucleolo. Este patrón refleja la fosforilación de H2AX en los sitios donde existen DSBs y el reclutamiento de 53BP1 al foco. Progresivamente, en las primeras 24h p-IR, los IRIF dramáticamente disminuyen en número, mientras los que persisten son de mayor tamaño (hasta $2,5\mu\text{m}^2$). Este curso temporal de la respuesta al daño en el DNA pone de manifiesto la existencia de focos transitorios, que desaparecen tras 1 día p-IR, gracias a una DDR rápida y eficaz. A partir del tercer día y hasta el último periodo p-IR analizado (15 días), persisten muy pocos IRIF (de uno a tres), son de gran tamaño (hasta $6,5\mu\text{m}^2$) y se localizan preferentemente asociados al nucléolo (70%) o a la periferia nuclear (25%), dos regiones con un microambiente represivo que se mantienen transcripcionalmente inactivas. Estos focos de daño persistente (“persistent DNA damage foci”, PDDF) son regiones en las que la conformación de la cromatina no puede ser restaurada a su estado nativo, previo al daño, debido a la persistencia de DSBs que son difíciles de reparar o irreparables (Mata-Garrido et al., 2018).

Se ha visto que los focos de lesión en el DNA se producen en el 100% de las neuronas a las 0,5h p-IR y que el porcentaje de neuronas portadoras de PDDF permanece elevado, aproximadamente un 80%, a los 15 días. Estos datos reflejan la existencia, en la mayoría de las neuronas, de dominios con daño en el DNA que no ha sido reparado. Por el contrario, en las neuronas control solo el 5% presentan focos de γ H2AX aislados, lo que probablemente sea producto de un daño endógeno en el DNA (Casafont et al., 2011).

Otra cuestión importante es determinar si la acumulación de lesiones en el DNA, inducidas con la dosis de radiación ionizante utilizada (4 Gy), produce degeneración y apoptosis neuronal. Para ello, se utilizó la tinción convencional con violeta de cresilo de cortes semifinos de $1\mu\text{m}$ de espesor, que demuestra de manera muy precisa la citología neuronal. Este estudio revela la ausencia de cambios significativos en la estructura de las neuronas irradiadas respecto a las no irradiadas control 24h p-IR. Asimismo, se utilizó la técnica TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase -TdT- dUTP Nick-End Labeling”), que marca la fragmentación internucleosomal del DNA en las células que están experimentando la apoptosis. Esta técnica se basa en el reconocimiento de los extremos de los DSBs gracias a la acción de la TdT, que es capaz de catalizar la adición de dUTPs marcados al extremo 3' hidroxilo de la hebra, sin necesidad de cebadores. Las neuronas irradiadas fueron también TUNEL-negativas, corroborando la ausencia de apoptosis (Kyrylkova et al., 2012).

Tomando los resultados del estudio en su conjunto, se evidencia que la radiación genera daño en el DNA que, sin inducir la degeneración y apoptosis, promueve su procesamiento a través de la NHEJ de forma eficiente. Así, a pesar de que el daño no es reparado en su totalidad, se asegura la estabilidad genómica con la formación de PDDF, encargados de aislar el material genético dañado, lo que permite una correcta expresión de los genes intactos y, por tanto, una buena función neuronal (Gómez-Herreros et al., 2014).

7.3 Organización de la cromatina en los focos de lesión permanente

Los PDDF son considerados un compartimento nuclear bien definido, debido a sus claros límites con la eucromatina adyacente (Mata-Garrido et al., 2018).

Con el microscopio electrónico aparecen como áreas nucleoplásmicas bien delimitadas en regiones de eucromatina, pero preferentemente asociadas a microambientes nucleares de represión transcripcional, particularmente el dominio perinucleolar y la periferia nuclear. A mayores aumentos, exhiben una conformación mayoritariamente laxa de la cromatina, que está compuesta por una red de pequeñas fibras de cromatina de 11nm, que permiten una gran accesibilidad a la maquinaria de reparación del DNA, así como algunas “fibras cromatínicas” convencionales de aproximadamente 30nm de diámetro (Mata-Garrido et al., 2016; Dorigo et al., 2004). El estudio inmunocitoquímico ultraestructural con partículas de oro coloidal, pone de manifiesto que esta red laxa de fibras cromatínicas está enriquecida en 53BP1 y WRAP53 (Fig.28 a-b). Así, las partículas de oro decoran fuertemente las fibras de cromatina con el anticuerpo anti-53BP1 y, en menor medida, con el anticuerpo anti-WRAP53.

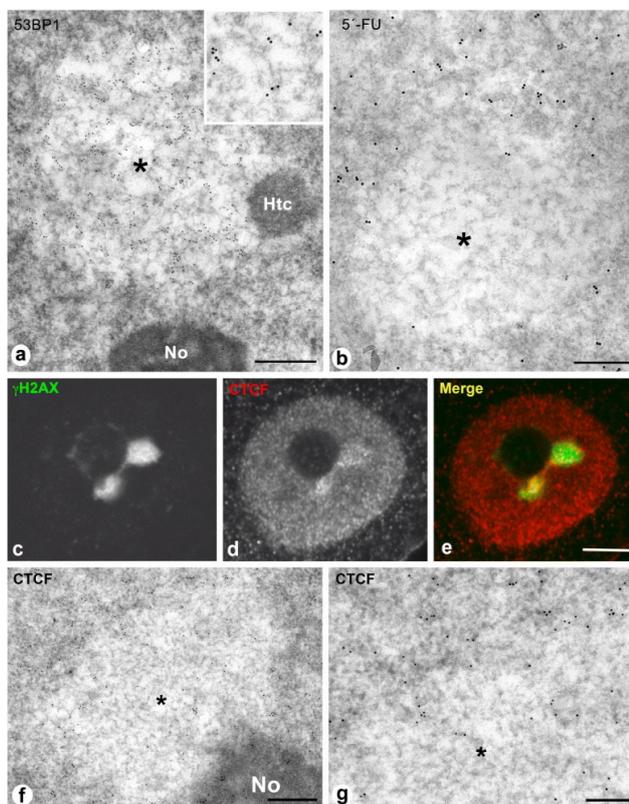


Figura 28. Organización de los PDDF. **A.** Inmunomarcaje con ME para 53BP1 en el interior del PDDF, que se dispone entre dominios de eucromatina, cercanos al nucleolo (No) **B.** Ensayo transcripcional insitu con ME en el que no existe incorporación de 5'FU en el PDDF **C-E.** Inmunomarcaje para γ H2AX, donde se observan dos PDDFs perinucleolares, y para CTCF, distribuido de forma difusa a lo largo del núcleo y concentrado en los límites de los PDDFs. **F-G.** Inmunomarcaje de CTCF en la periferia de los PDDF, aunque se encuentran algunas partículas de oro en el interior del PDDF (asterisco). Imagen obtenida de Mata-Garrido, 2018.

Mientras que 53BP1 es un factor esencial para la reparación del DNA vía NHEJ, WRAP53 es especialmente importante por su implicación en el remodelado permanente de la cromatina, ya que facilita el acceso a los factores de la DDR (Henriksson et al., 2014).

Para comprender los límites entre la eucromatina transcripcionalmente activa y el DNA dañado de los PDDF, se ha estudiado la posible implicación de la proteína CTCF, que actúa como aislante entre diferentes regiones de la cromatina. Así, mediante estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal con anticuerpos dirigidos contra CTCF se observa un patrón nuclear difuso de distribución de CTCF, pero que presenta focos de elevada concentración en la periferia de los PDDF. La concentración de CTCF en la interfase entre el PDDF y la eucromatina adyacente ha sido confirmada a nivel ultraestructural utilizando inmunomarcaje con partículas de oro coloidal (Mata-Garrido et al., 2018) (Fig.28 d-g). Por tanto, la proteína CTCF parece ser necesaria para aislar el DNA no reparado de la eucromatina que lo rodea, y así poder mantener la estabilidad genómica.

7.4 Influencia del daño en el DNA sobre la expresión génica

Existe una estrecha coordinación entre los mecanismos de reparación del DNA y la actividad transcripcional global. Así, se ha visto que la transcripción global del genoma es extremadamente sensible al daño en el DNA. Mediante un ensayo de transcripción *in situ*, Casafont et al., 2011 estudiaron la incorporación de 5'-fluorouridina (5'-FU), un precursor de RNA, en el RNA naciente en ratas control y ratas expuestas a radiación ionizante a diferentes tiempos p-IR. Los resultados indican una caída global en la señal de incorporación de 5'FU a las 0,5h p-IR, tanto nucleolar (síntesis de rRNAs) como extranucleolar, en la eucromatina (síntesis de mRNAs). Existe, por tanto, una inhibición de los complejos de RNA polimerasa I y II y reducción de las factorías de transcripción. En esta fase muy temprana p-IR, las factorías de transcripción preservadas probablemente correspondan a la transcripción de genes directamente implicados en la DDR y en la respuesta de estrés celular. Sin embargo, resulta de gran interés la observación de que la tasa de transcripción global se recupera en más del 90% 24h p-IR. Esta inhibición transitoria de la transcripción global se correlaciona con la aparición de los focos transitorios de daño del DNA (IRIF) en múltiples dominios del genoma y su posterior desaparición (Casafont et al., 2011). Por tanto, las DSBs de los IRIF parecen interferir con la progresión de los complejos de la RNA pol II en la horquilla de transcripción, dando como resultado una parada transitoria de la transcripción hasta que se produzca la reparación del DNA. Esta respuesta es importante para mantener la estabilidad genómica y evitar generar mRNAs y proteínas anómalas.

Así pues, la reparación de los focos transitorios permite la restauración de la tasa de transcripción global y, por ende, el correcto funcionamiento celular. No obstante, a la estabilidad genómica contribuye la formación de los PDDF, donde el material genético dañado, no reparado o irreparable, es aislado evitando la expresión de proteínas aberrantes y manteniendo la supervivencia neuronal. Las neuronas de mamíferos son células diploides, por lo que el bloqueo de la transcripción de genes atrapados en los PDDF puede ser compensado por la expresión de la segunda copia del gen (Mata-Garrido et al., 2018).

Para confirmar el bloqueo de la expresión génica en el interior de los PDDF, Mata-Garrido et al. (2016) han estudiado la expresión génica en los PDDF. Para ello realizaron tres aproximaciones experimentales. Primero, el ensayo de transcripción *in situ* con 5'FU. A nivel ultraestructural reveló una intensa incorporación de 5'FU en los extensos dominios de eucromatina (síntesis de mRNAs), así como en el componente fibrilar denso del nucléolo, donde tiene lugar la transcripción del rDNA para generar los rRNAs. Por el contrario, en los PDDF no se detectó RNA naciente, creándose un límite muy nítido entre la eucromatina transcripcionalmente activa y la inactiva de los PDDF (Fig.

29). Segundo, la tinción preferencial EDTA para ribonucleoproteínas (RNPs), que permite destacar estructuras ricas en RNA, como son el nucléolo, la eucromatina, los CBs y "speckles" nucleares. Con esta técnica, mientras que la eucromatina adyacente a los PDDF aparecía intensamente contrastada por la abundancia de complejos de RNPs, relacionados con el procesamiento y transporte de pre-mRNAs, los PDDF tenían una apariencia electrolúcida debido a la escasa concentración de RNPs. Por último, el análisis de la expresión de la

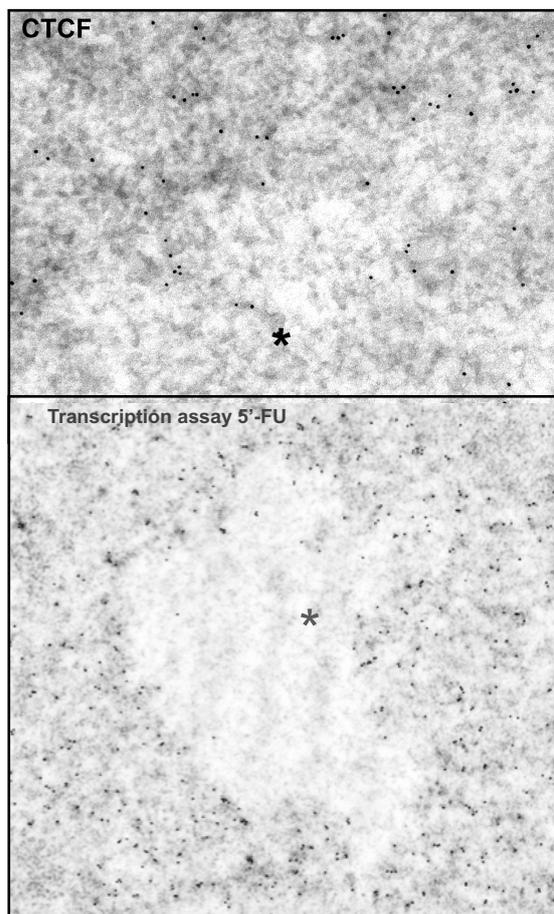


Figura 29. Expresión génica en los PDDF. La imagen inferior, muestra la incorporación de 5'FU al RNA naciente, observándose la ausencia de incorporación en el interior del PDDF (asterisco). Por el contrario, alrededor se observa una captación dispersa por el resto del núcleo, creando una interfase entre el PDDF, donde no existe transcripción, y la eucromatina no dañada de alrededor. En la imagen superior, observamos CTCF, inmunomarcado con partículas de oro coloidal, situado preferentemente en la periferia del PDDF, con alguna partícula adherida en el interior del compartimento. Imagen cedida por Lafarga M.

RNA polimerasa II activa, utilizando el anticuerpo H5 que reconoce la RNA pol II fosforilada en la Ser2, implicada en la fase de elongación de la transcripción. El estudio con inmunoelectrónica de la distribución de esta RNA polimerasa ha revelado la ausencia de marcaje en los PDDF, que si estaba presente en la eucromatina adyacente. Por tanto, a la vista de estos resultados se confirma que los PDDF son regiones en las que existe una clara inhibición de la expresión génica. Asimismo, la región con represión transcripcional corresponde con exactitud a la distribución de γ H2AX, por lo que la expresión de γ H2AX puede ser considerada, no solo un marcador del daño, sino también del silenciamiento génico en las neuronas con daño en el DNA (Mata-Garrido et al., 2018). De acuerdo con la presencia de pATM y Ub-H2A en los PDDF, estudios recientes demuestran que esta inhibición de la transcripción es mediada por la ubiquitinación de la histona H2A de forma ATM-dependiente. Así, la ubiquitinación de H2A por la ubiquitina ligasa RNF8 produce un silenciamiento génico, mientras que la desubiquitinación de H2A supondría una restauración de la transcripción (Shanbhag et al., 2010).

7.5 Asociación espacial de los focos de daño permanente con microambiente de represión transcripcional

Los PDDF no se distribuyen de forma aleatoria dentro del núcleo, sino que se encuentran preferentemente asociados al nucléolo y, en menor medida, a los dominios de heterocromatina situados en la periferia nuclear, con sólo una mínima proporción de PDDF localizados en el interior del núcleo (Mata-Garrido et al., 2018) (Fig.30 y 31). Asociados al nucléolo y la periferia nuclear, los PDDF están bajo la influencia de un ambiente de represión transcripcional (Politz et al., 2013). En las neuronas de mamíferos, estos ambientes represivos se forman por el agrupamiento de la heterocromatina de las regiones centroméricas y teloméricas en la superficie nucleolar y la periferia nuclear (Akhmanova et al., 2000). Es bien conocido que junto a la heterocromatina se encuentran numerosas proteínas de silenciamiento como la proteína

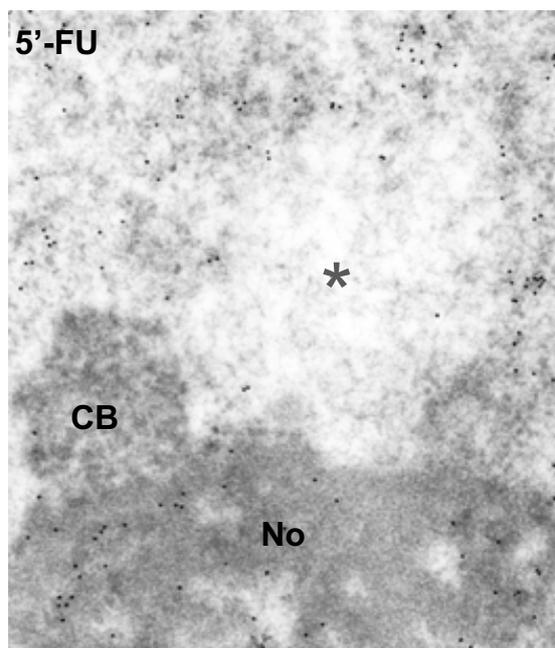


Figura 30. Asociación del PDDF al nucleolo. En esta muestra, el PDDF (asterisco) aparece asociado al nucleolo (No) en un ambiente de represión transcripcional. La eucromatina de su alrededor aparece transcripcionalmente activa, incorporando moléculas de 5'FU. Véase cómo existe inmunomarcaje para 5'FU en el nucleolo, correspondiendo a la transcripción del DNA. CB: Cuerpo de Cajal. Imagen cedida por Lafarga M (Mata-Garrido et al., 2018).

metilada de unión al DNA (“methylated DNA-binding protein”) MeCP2 y los complejos de represión polycomb (PRC1 y PRC2), que pueden silenciar los genes que se encuentren en su proximidad. Así, esta localización de los PDDF facilita el silenciamiento de genes dañados de forma selectiva, lo cual contribuye a preservar la estabilidad genómica. Asimismo, hay evidencia de que las DSBs contenidos en el nucleolo y en la heterocromatina periférica pueden moverse a la periferia de estos compartimentos para así asociarse a la eucromatina, donde hay un ambiente más permisivo que favorece el acceso a los componentes de la DDR (Jakob et al., 2011). Queda por determinar si los PDDF perinucleolares y de la periferia nuclear pueden reclutar DSBs no reparadas del rDNA o de la heterocromatina.

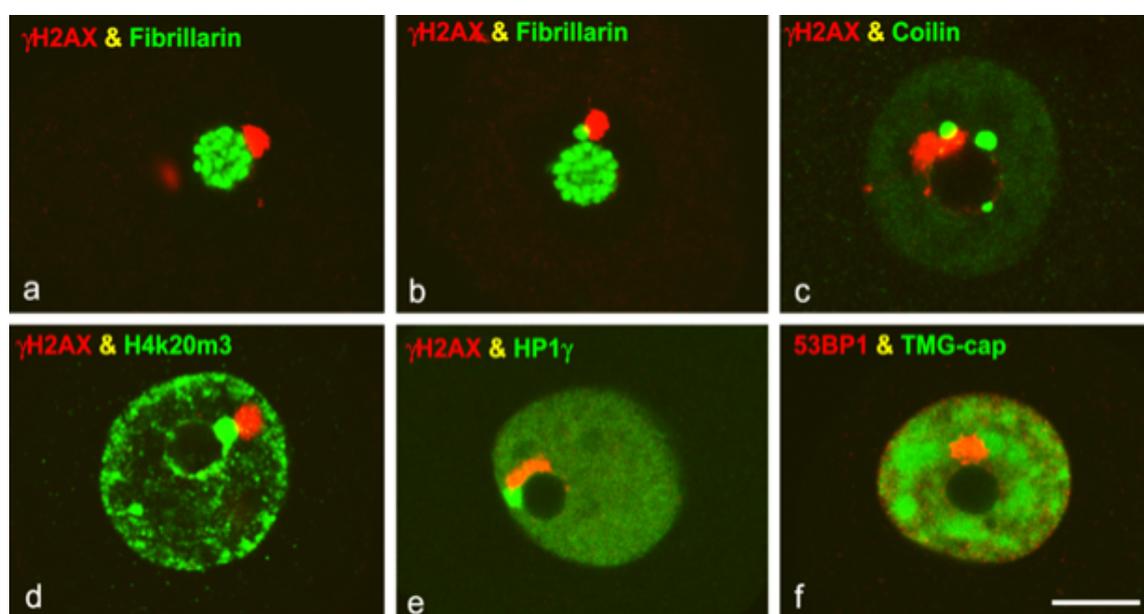


Figura 31. Organización espacial de los PDDF. A y B. Asociación del PDDF al nucleolo. En rojo γ H2AX inmunomarcado en rojo. En verde encontramos la fibrilarina, componente de varias ribonucleoproteínas, entre las que destacan las snoRNPs implicadas en el procesamiento del RNA ribosomal en el nucleolo. **C.** Asociación del PDDF con los cuerpos de Cajal (CB). En verde encontramos inmunomarcada la proteína cóilina, la cual se encuentra en los CB y es necesaria para la biogénesis de los snRNPs. **D y E.** Asociación del PDDF a la heterocromatina. Inmunomarcados en verde encontramos los marcadores de heterocromatina H4K20me3 y HP1 γ . **F.** Asociación del PDDF a los speckles nucleares (SN). Inmunomarcaje de TMG-cap en verde, esta estructura se encuentra en los snRNAs que se almacenan en los SN. Imagen obtenida de Lafarga M & Berciano M.T. (2014).

7.6 Identificación de las secuencias de DNA más vulnerables al daño en el DNA y su implicación en procesos neurodegenerativos

Con el fin de conocer si existen secuencias más vulnerables a sufrir una lesión, se han estudiado las secuencias contenidas en los PDDF, comparando los resultados de neuronas que han sido irradiadas con neuronas control. Para ello, Mata-Garrido et al. (2018) realizaron un estudio de inmunoprecipitación de cromatina asociado a una PCR cuantitativa (ChIP-qPCR) para analizar las

secuencias de DNA asociadas a la histona γ H2AX, un marcador de lesión en el DNA. Así, en primer lugar, se fijan las uniones proteína-proteína y proteína-DNA con formaldehído, lo cual evita redistribuciones en las histonas durante el proceso de preparación de la muestra. En segundo lugar, las células se lisan y la cromatina se fragmenta mediante sonicación o mediante enzimas de restricción. Con los fragmentos de DNA-proteína se lleva a cabo la inmunoprecipitación con anticuerpos anti- γ H2AX. Una vez obtenidos estos fragmentos inmunomarcados, las uniones DNA-proteína estabilizadas con formaldehído son revertidas con una reacción térmica a 65°C (Dubrana, 2001). Así pues, el DNA liberado es por último amplificado mediante PCR y secuenciado.

De esta forma, Mata-Garrido et al. 2018 observaron que el 90% de las secuencias de DNA unidas a γ H2AX encontradas en las neuronas irradiadas también estaban presentes en las neuronas control, lo que confirma la existencia de regiones genómicas más vulnerables, con mayor susceptibilidad a sufrir daños en el DNA o más refractarias a su reparación. El análisis de las secuencias, además reveló que muchas de ellas contenían o se encontraban cercanas a genes con funciones esenciales para la homeostasis neuronal, tales como la neurotransmisión, la plasticidad sináptica, la ruta de la pentosa-fosfato, la ruta autofágica-lisosomal y el control de calidad de las proteínas. De gran interés fue la identificación de 16 genes que aparecen catalogados en OMIM (“Online Mendelian Inheritance in Man”) por su implicación en enfermedades genéticas, la mayoría relacionados con enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas (Fig.32). Entre ellos, y por su especial importancia en neuropatología, voy a comentar 4 de los genes más vulnerables al daño en el DNA o refractarios a su reparación que están enriquecidos en los PDDF, a saber, *epm2a*, *serpini1*, *il1rap1* y *scn4a*.

El gen *epm2a* que codifica para la proteína laforina, una glicógeno fosfatasa, implicada en la autofagia. Una alteración de *epm2a*, produce una acumulación de poliglucosanos, dando lugar a la enfermedad de Lafora. Esta es un tipo de epilepsia mioclónica progresiva, que se manifiesta durante la adolescencia con crisis generalizadas tónico-clónicas, mioclonias, ausencias, “drop attacks” y alucinaciones visuales. Esta enfermedad produce una neurodegeneración que conduce a la muerte prematura del paciente hacia los 10 años (Aguado et al., 2010).

Otro caso es el del gen *serpini1* que codifica para la proteína neuroserpina, un inhibidor de la serin-proteasa. Cuando este gen está dañado se produce una acumulación de esta proteína, provocando la encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión de neuroserpina (“Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies”, FENIB), que se caracteriza por una epilepsia mioclónica progresiva de aparición en la tercera década de la vida y demencia de tipo frontal en la quinta década (Zarranz; Neurología, 6º edición 2018).

Gen	Proteína codificada	Relación con patología humana
<i>aga</i>	Aspartilglucosaminidasa	Aspartilglucosaminuria
<i>appl2</i>	Proteína adaptadora, con un dominio central de interacción PH, un dominio C-terminal fosfotirosina (Ptb) y un dominio cremallera de leucina	Adicción a sustancias
<i>cdh10</i>	Cadherina 10	Autismo
<i>epm2a</i>	Laforina glucanofosfatasa	Enfermedad de Lafora
<i>fbxo30/fbxw7</i>	Proteína 7 con repetición f-box/WD	Glioma, inestabilidad genómica
<i>gria1</i>	Receptor glutamato 1	Esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno depresivo, trastornos de aprendizaje y memoria
<i>gria2</i>	Receptor glutamato 1	Esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno depresivo
<i>htr1a</i>	Receptor de serotonina 5-HT-1A	Esquizofrenia y trastorno depresivo
<i>il1b</i>	Interleuquina 1	Enfermedad de Alzheimer
<i>il1rap1</i>	Proteína accesoria del receptor de interleuquina 1	Autismo, retraso mental
<i>lbr</i>	Receptor lamina B	Síndrome de Reynolds
<i>rab38</i>	Proteína relacionada con Ras Rab38	Demencia frontotemporal
<i>scn4a</i>	Subunidad alfa del canal de sodio 1.4	Parálisis periódica hiperkalemica, miotonía agravada por potasio, parálisis periódica hipokalemica, paramiotonía congénita, miotonía fluctuante, mioclonía
<i>serpini1</i>	Neuroserpina	Encefalopatía familiar con inclusiones de neuroserpina
<i>sugct</i>	Succinil-CoA; Glutarato-CoA transferasa	Migraña
<i>tkt</i>	Transketolasa	Síndrome de Wernicke-Korsakoff, encefalopatía de Wernicke

Figura 32. Esquema de los genes contenidos en secuencias vulnerables al daño. Secuencias inmunomarcadas con γ H2AX en los PDDF de neuronas corticales, que han sido relacionadas con enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas en humanos. Esquema obtenido de Mata-Garrido et al., 2018

El gen *il1rap1*, también encontrado en estas secuencias, codifica una proteína accesoria del receptor de interleuquina 1, y su alteración ha demostrado estar implicada en el retraso mental asociado al cromosoma 21, así como en algunos fenotipos del espectro autista, en los cuales existe retraso mental. Se ha observado que el *il1rap1* situado a nivel post-sináptico, media el impulso excitatorio mediante la interacción con la proteína presináptica tirosina fosfatasa (TPT). Por lo tanto, cuando este receptor se ve alterado, se genera una disfunción sináptica que es el sustrato de estas dos enfermedades (Hayashi et al., 2013).

Por su parte, el gen *scn4a*, que codifica la subunidad alfa 1.4 del canal de sodio, también se ha visto relacionado con secuencias vulnerables al daño. Las alteraciones en este canal, produce varios fenotipos de afectación de la musculatura esquelética, bien sean aumentando o disminuyendo la actividad de este canal. Así, una elevada actividad del canal, genera un aumento en la excitabilidad muscular, pudiendo producir miotonía, miotonía agravada por K^+ y paramiotonía congénita. La miotonía se presenta en forma de rigidez muscular, ya que se producen contracciones involuntarias, que permanecen durante

varios segundos tras haber cesado el movimiento voluntario. Generalmente, la rigidez es mayor al iniciar el movimiento, pero ésta va disminuyendo con la actividad. Por el contrario, los pacientes con paramiotonias son aquellos en los que la rigidez empeora con la actividad muscular repetida. El descenso en la actividad del canal, produce una disminución de la excitabilidad muscular, generando parálisis periódicas, que a su vez pueden ser hipercalémicas e hipocalémicas. La parálisis periódica consiste en periodos de debilidad que puede ir desde moderada a severa, debidas a una despolarización sostenida de la fibra muscular, lo que inactiva los canales de sodio. Un episodio típico se instaura en unos minutos pudiendo durar desde horas hasta unos pocos días, siguiéndose de una recuperación espontánea. No obstante, muchos pacientes desarrollan de forma tardía, alrededor de la cuarta década de vida, una debilidad permanente que progresa lentamente. En los casos de parálisis periódica hipercalémica, los ataques suelen asociarse a niveles de K^+ elevados en suero ($K^+ > 5mM$), y se suelen asociar a miotonia, que suele manifestarse antes de la parálisis. En los casos de parálisis periódica hipocalémica, los ataques se desencadenan por una disminución de los niveles de K^+ en suero ($K^+ < 3mM$), generalmente provocado por vómitos, diarreas o un aumento de la ingesta de carbohidratos, y a diferencia de la hipercalémica, no asocia miotonia (Cannon, 2017).

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Adriaens C et al. Blank spots on the map: some current questions on nuclear organization and genome architecture. *Histochem Cell Biol.* 2018; 150:579-592. doi: 10.1007/s00418-018-1726-1

2. Aguado C et al. Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy. *Hum Mol Genet.* 2010; 19:2867–2876. doi: 10.1093/hmg/ddq190

3. Akhmanova A et al. Characterisation of transcriptionally active and inactive chromatin domains in neurons. *J Cell Sci.* 2000; 113:4463-74.

4. Amendola M, van Steensel B. Mechanisms and dynamics of nuclear lamina-genome interactions. *Curr opin in cell biol.* 2014; 28:61-68. doi: 10.1016/j.ceb.2014.03.003

5. Anttinen A et al. Neurological symptoms and natural course of xeroderma pigmentosum. *Brain.* 2008; 131:1979-89. Doi: 10.1093/brain/awn126

6. Aoto T et al. Nuclear and chromatin reorganization in the MHC-Oct3/4 locus at developmental phases of embryonic stem cell differentiation. *Dev Biol.* 2006; 298:354-67. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.04.450

7. Bartholdi MF. Nuclear distribution of centromeres during the cell cycle of human diploid fibroblasts. *J Cell Sci.* 1991; 99:255-63

8. Berciano MT et al. Structural and functional compartmentalization of the cell nucleus in supraoptic neurons. *Microsc Res Tech.* 2002; 56:132-42. doi: 10.1002/jemt.10013

9. Berkowitz E.M et al. Chromatin structure in neuronal and neuroglia cell nuclei as a function of age. *J. Neurochem.* 1983; 41:516-523.

10. Blobel G. Gene gating: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82:8527–8529.

11. Boisvert F et al. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8:574-85. doi: 10.1038/nrm2184

12. Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2016;139 Suppl 1:216-231. doi: 10.1111/jnc.13731.

13. Cannon SC. Sodium Channelopathies of Skeletal Muscle. *Handb Exp Pharmacol.* 2018; 246:309–330. doi:10.1007/164_2017_52

14. Casafont I et al. Effect of ionizing radiation in sensory ganglion neurons: organization and dynamics of nuclear compartments of DNA damage/repair and their relationship with transcription and cell cycle. *Acta neuropathol.* 2011; 122:481-93. doi: 10.1007/s00401-011-0869-0
15. Castillo-Aguilera O et al. DNA Methylation Targeting: The DNMT/HMT Crosstalk Challenge. *Biomolecules.* 2017; 7:3. doi:10.3390/biom7010003
16. Chow H, Herrup K. Genomic integrity and the ageing brain. *Nat Rev Neurosci.* 2015; 16:672-84. doi: 10.1038/nrn4020
17. Cooper GM & Hausman RE. La célula, 6ª edición. 2014
18. D'Angelo MA & Hetzer MW. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol.* 2008; 18:456–466. doi: 10.1016/j.tcb.2008.07.009
19. Dimitrova N et al. 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature.* 2008; 456:524–528. doi: 10.1038/nature07433
20. Digweed M & Sperling K. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA repair (Amst).* 2004; 3:1207-17. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.004
21. De Laat WL et al. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & Development.* 1999; 13: 768-785.
22. Della-Maria J et al. Human Mre11/human Rad50/Nbs1 and DNA ligase IIIalpha/XRCC1 protein complexes act together in an alternative nonhomologous end joining pathway. *J Biol Chem.* 2011; 286:33845–33853. doi:10.1074/jbc.M111.274159
23. Dubrana K. Examining the distribution of telomeric and DNA repair proteins by ChIP and real-time PCR. *Mapping protein/DNA interactions by cross-linking [internet].* 2001; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7102/>
24. Emmott E, Hiscox JA. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep.* 2009; 10:231–238. doi:10.1038/embor.2009.14
25. Fatemi M et al. Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic acids research.* 2005; 33: 176. doi: 10.1093/nar/gni180

26. Fatica A & Tollervey D. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14:313-8. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00336-8
27. Fernández-Capetillo O et al. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst).* 2004; 3: 959-67. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.03.024
28. Finsterer MD. Parkinson's Syndrome and Parkinson's Disease in Mitochondrial Disorders. *Movement disorders.* 2011; 26: 784-91. doi: 10.1002/mds.2365
29. Gazy I et al. Double-strand break repair plays a role in repeat instability in a fragile X mouse model. *DNA Repair (Amst).* 2018; 74:63-69. doi: 10.1016/j.dnarep.2018.12.004
30. Ghirlando R, Felsenfeld G. Chromatin Structure Outside and Inside the Nucleus *Biopolymers.* 2013; 99:225-232. doi:10.1002/bip.22157
31. Gonzalez- Sandoval A, Gasser SM. On TADs and LADs: Spatial control over gene expression. *Trends in genetics.* 2016; 32: 485-495. doi: 10.1016/j.tig.2016.05.004
32. Gomez-Cavazos JS, Hetzer MW. Outfits for different occasions: tissue-specific roles of Nuclear Envelope proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2012; 24:775-83. doi: 10.1016/j.ceb.2012.08.008
33. Gómez-Herreros F et al. TDP2 protects transcription from abortive topoisomerase activity and is required for normal neural function. *Nat genet.* 2014; 46: 516-21. doi: 10.1038/ng.2929
34. Hayashi T et al. IL1RAPL1 associated with mental retardation and autism regulates the formation and stabilization of glutamatergic synapses of cortical neurons through RhoA signaling pathway. *PLoS One.* 2013; 8: e66254. doi: 10.1371/journal.pone.0066254
35. Henriksson S et al. The scaffold protein WRAP53 β orchestrates the ubiquitin response critical for DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* 2014; 28:2726–2738. doi:10.1101/gad.246546.114
36. Henriksson S, Farnebo M. On the road with WRAP53 β : guardian of Cajal bodies and genome integrity. *Front Genet.* 2015; 6:91. doi:10.3389/fgene.2015.00091
37. Herrup K et al. Beyond Amyloid: Getting Real about Non-Amyloid Targets in Alzheimer's Disease. *Alzheimers Dement.* 2013; 9: 452-458. doi: 10.1016/j.jalz.2013.01.017

38. Hirano Y et al. Lamin B Receptor Recognizes Specific Modifications of histone H4 in Heterochromatin Formation. *The journal of biological chemistry*. 2012; 287: 42654–42663. doi: 10.1074/jbc.M112.397950
39. Ho CY, Lammerding J. Lamins at a glance. *J Cell Sci*. 2012; 125:2087–2093. doi:10.1242/jcs.087288
40. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*. 2002; 23:687-96. doi: 10.1093/carcin/23.5.687
41. Jaeger AW, Kuenzle CC. The chromatin repeat length of brain cortex and cerebellar neurons changes concomitant with terminal differentiation. *EMBO J*. 1982; 1:811–816.
42. Jakob B et al. DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39:6489–6499. doi:10.1093/nar/gkr230
43. Jasencakova Z et al. Histone H4 Acetylation of Euchromatin and Heterochromatin Is Cell Cycle Dependent and Correlated with Replication Rather Than with Transcription. *The plant cell*. 2000; 12, 2087–2100
44. Kirkwood TBL. Understanding the odd science of aging. *Cell*. 2005; 120: 437–447. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.027
45. Kralund HH et al. Xeroderma Pigmentosum-Trichothiodystrophy overlap patient with novel XPD/ERCC2 mutation. *Rare Dis*. 2013; 1:e24932. doi:10.4161/rdis.24932
46. Krull Set al. Protein Tpr is required for establishing nuclear pore-associated zones of heterochromatin exclusion. *EMBO J*. 2010; 29:1659–1673. doi:10.1038/emboj.2010.54
47. Kwiatkowski TJ jr et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009; 323:1205-8. doi: 10.1126/science.1166066
48. Kyrlykova K et al. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*. 2012; 887:41-7. doi: 10.1007/978-1-61779-860-3_5
49. Lamond AI, Spector DL. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4:605-12. doi: 10.1038/nrm1172
50. Lafarga M et al. Acute osmotic/stress stimuli induce a transient decrease of transcriptional activity in the neurosecretory neurons of supraoptic nuclei. *J Neurocytol*. 1998, 27:205-17.

51. Lafarga M et al. Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus. *Chromosome*. 2009, 118:437-43. doi: 10.1007/s00412-009-0212-x
52. Lee, W.C et al. NSR1 is required for pre-rRNA processing and for the proper maintenance of steady-state levels of ribosomal subunits. *Mol Cell Biol*. 1992; 12: 3865–3871
53. Lewis P.N et al. Changes in chromatin structure associated with Alzheimer's disease. *J. Neurochem*. 1981; 37:1193-1202
54. Li DK, Tisdale S, Lotti F, Pellizzoni L. SMN control of RNP assembly: from post-transcriptional gene regulation to motor neuron disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 32:22–29. doi:10.1016/j.semcdb.2014.04.026
55. Lindahl T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974; 71:3649–3653.
56. Light, W. H et al. Interaction of a DNA zip code with the nuclear pore complex promotes H2A.Z incorporation and INO1 transcriptional memory. *Mol Cell*. 2010; 40: 112–125. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.007
57. Lukiw WJ et al. Cytoskeletal messenger RNA stability in human neocortex: studies in normal aging and in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*. 1990; 55:81-8
58. Lupu F et al. Nuclear pore composition regulates neural stem/progenitor cell differentiation in the mouse embryo. *Dev Cell*. 2008; 14:831–842. doi:10.1016/j.devcel.2008.03.011
59. Mackenzie IR et al. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol*. 2010; 9:995-1007. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70195-2.
60. Madabhushi R et al. DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron*. 2014; 83:266–282. doi:10.1016/j.neuron.2014.06.034
61. Maiuri T et al. DNA Repair Signaling of Huntingtin: The Next Link Between Late-Onset Neurodegenerative Disease and Oxidative DNA Damage. *DNA and cell biol*. 2019; 3:1-6. doi: 10.1089/dna.2018.4476
62. Martou G, Boni U. Nuclear topology of murine, cerebellar Purkinje neurons: changes as a function of development. *Exp Cell Res*. 2000; 256:131-9. doi: 10.1006/excr.1999.4793

63. Mata-Garrido. Organización y dinámica de los focos nucleares permanentes de reparación del daño del DNA en neuronas. Tesis doctoral. 2016; pags 11-49.

64. Mata-Garrido J et al. Neuronal accumulation of unrepaired DNA in a novel specific chromatin domain: structural, molecular and transcriptional characterization. *Acta Neuropathol Commun.* 2016; 4:41. doi:10.1186/s40478-016-0312-9

65. Mata-Garrido J et al. Persistent accumulation of unrepaired DNA damage in rat cortical neurons: nuclear organization and ChIP-seq analysis of damaged DNA. *Acta Neuropathol Commun.* 2018; 6:68. doi:10.1186/s40478-018-0573-6

66. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome [published correction appears in *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Apr;15(4):294]. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15:108–121. doi:10.1038/nrm3742

67. McKinnon PJ. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep.* 2004; 5:772–776. doi:10.1038/sj.embor.7400210

68. McStay B, Grummt I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008; 24:131-57. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175259

69. Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7:540-6. doi: 10.1038/nrm1938

70. Misteli T. Concepts in nuclear architecture. *Bioessays.* 2005; 27:477-87. doi: 10.1002/bies.20226

71. Misteli T et al. Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trends Cell Biol.* 1997; 7:135-8. doi: 10.1016/S0962-8924(96)20043-1

72. Misteli T, Soutoglou E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:243–254. doi:10.1038/nrm2651

73. Montanaro L et al. Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am J Pathol.* 2008;173:301–310. doi:10.2353/ajpath.2008.070752

74. Moore MJ, Proudfoot NJ. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. 2009; 136:688-700. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.001.

75. Namboodiri et al. The Crystal Structure of Drosophila NLP-Core provides Insight into pentamer Formation and Histone Binding. *Structure*. 2003; 11: 175–186. doi: 10.1016/S0969-2126(03)00007-8
76. Nizami Z et al. The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2:a000653. doi:10.1101/cshperspect.a000653
77. Moss, T. At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Curr Opin Genet Dev*. 2004; 14: 210–217.
78. Nomura, M et al. Transcription of rDNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Nucleolus*. 2004; pp. 128–153
79. Ong W.Y, Garey L.J. Distribution of GABA and neuropeptides in the human cerebral cortex. A light and electron microscopy study. *Anat. Embryol*. 183:397-413.
80. Oomen ME et al. CTCF sites display cell cycle-dependent dynamics in factor binding and nucleosome positioning. *Genome Res*. 2019; 29:236-249. doi: 10.1101/gr.241547.118
81. Padeken J et al. The nucleoplasmin homolog NLP mediates centromere clustering and anchoring to the nucleolus. *Mol cell*. 2013; 50(2): 236-49. doi: 10.1016/j.molcel.2013.03.002
82. Pan L et al. Chromatin regulation of DNA damage repair and genome integrity in the central nervous system. *J Mol Biol*. 2014; 426:3376–3388. doi: 10.1016/j.jmb.2014.08.001
83. Parada LA, McQueen PG, Misteli T. Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol*. 2004; 5:44. doi:10.1186/gb-2004-5-7-r44
84. Patel AA, Steitz JA. Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4:960-70. DOI: 10.1038/nrm1259
85. Peric-Hupkes D et al. Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Mol Cell*. 2010; 38:603–613. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.016ddd
86. Pinto M et al. Lack of Parkin Anticipates the Phenotype and Affects Mitochondrial Morphology and mtDNA Levels in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience*. 2018; 38: 1042-1053. doi:10.1523/JNEUROSCI.1384-17.2017

87. Politz JC et al. Something silent this way forms: the functional organization of the repressive nuclear compartment. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013; 29:241–270. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122317
88. Proudfoot NJ et al. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell.* 2002 22;108(4):501-12.
89. Rabut G et al. Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. 2004; 6(11):1114-21. DOI: 10.1038/ncb1184
90. Rapin I et al. Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Neurology.* 2000; 55:1442–1449.
91. Raska I et al. New Insights into Nucleolar Architecture and Activity. *International Review of Cytology.* 2006; 255:177-235. doi: 10.1016/S0074-7696(06)55004-1
92. Raurell-Vila H et al. An HP1 isoform-specific feedback mechanism regulates Suv39h1 activity under stress conditions. *Epigenetics.* 2017; 12:166–175. doi:10.1080/15592294.2016.1278096
93. Rodriguez-Navarro S et al. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell.* 2004 9;116:75-86
94. Rogakou E.P et al. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry.* 1998; 273:5858-5868. doi: 10.1074/jbc.273.10.5858
95. Rougemaille M et al. mRNA journey to the cytoplasm: attire required. *Biol cell.* 2008; 100: 327–342. doi:10.1042/BC20070143
96. Sarkander HI, Uthoff CG. Comparison of the number of RNA initiation sites in rat brain fractions enriched in neuronal or glial nuclei. *FEBS lett.* 1976; 72:53-6.
97. Shanbhag NM et al. ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell.* 2010; 141:970–981. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.038
98. Shopland LS et al. Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods. *J Cell Biol.* 2003; 162:981–990. doi:10.1083/jcb.200303131
99. Sirri V et al. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol.* 2007; 129:13–31. doi:10.1007/s00418-007-0359-6

100. Soria G et al. Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Mol Cell*. 2012; 46:722-34. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.002
101. Soria G et al. Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response. *Mol cell rev*. 2012; 46:722-34. doi:10.1016/j.molcel.2012.06.002.
102. Spector DL, Lamond AI. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 3:a000646. doi:10.1101/cshperspect.a000646
103. Takizawa T, Meshorer E. Chromatin and nuclear architecture in the nervous system. *Trends Neurosci*. 2008; 31:343-52. doi: 10.1016/j.tins.2008.03.005.
104. Talamas JA, Capelson M. Nuclear envelope and genome interactions in cell fate. *Front Genet*. 2015; 6:95. doi:10.3389/fgene.2015.00095
105. Vadakkan KI et al. Cell-type specific proximity of centromeric domains of one homologue each of chromosomes 2 and 11 in nuclei of cerebellar Purkinje neurons. *Chromosoma*. 2006; 115:395-402. doi: 10.1007/s00412-006-0069-1
106. Vergara Z, Gutierrez C. Emerging roles of chromatin in the maintenance of genome organization and function in plants. *Genome Biology*. 2017; 18:96. doi: 10.1186/s13059-017-1236-9
107. Wang H et al. Mutant FUS causes DNA ligation defects to inhibit oxidative damage repair in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nature Communications*. 2018; 9: 3683. DOI: 10.1038/s41467-018-06111-6
108. Wen B, Wu H, Shinkai Y, Irizarry RA, Feinberg AP. Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2009; 41:246–250. doi:10.1038/ng.297
109. White RR, Vijg J. Do DNA Double-Strand Breaks Drive Aging?. *Mol Cell*. 2016;63:729–738. doi:10.1016/j.molcel.2016.08.004
110. Wahl C et al. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell*. 2009; 136: 701–718. doi 10.1016/j.cell.2009.02.009
111. Xu H et al. The C-terminal domain of coilin interacts with Sm proteins and U snRNPs. *Chromosoma*. 2005; 114:155–166. doi:10.1007/s00412-005-0003-y

112. Xu C, Min J. Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell*. 2011; 2:202–214. doi:10.1007/s13238-011-1018-1

113. Yusuf M et al. Use of 3D imaging for providing insights into high-order structure of mitotic chromosomes. *Chromosoma*. 2018; 128:7–13. doi:10.1007/s00412-018-0678-5

114. Zarranz J.J. Neurología, 6º edición. 2018; 26: pp. 682. ISBN: 978-84-9113-071-0

115. Zhang LF et al. Perinucleolar targeting of the inactive X during S phase: evidence for a role in the maintenance of silencing. *Cell*. 2007 May 18; 129:693-706. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.036

116. Zuleger N et al. Specific nuclear envelope transmembrane proteins can promote the location of chromosomes to and from the nuclear periphery. *Genome Biology*. 2013; 14:R14. doi: 10.1186/gb-2013-14-2-r14