



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Dpto. de Anatomía y Biología Celular

**Respuesta de las neuronas sensitivas al estrés
genotóxico inducido por radiaciones ionizantes
y por la inhibición del proteasoma**

**Tesis doctoral presentada por Ana Palanca Cuñado
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria
Santander, Abril 2014**

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

CERTIFICAN: Que D. **Ana Palanca Cuñado** ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: "Respuesta de las neuronas sensitivas al estrés genotóxico inducido por radiaciones ionizantes y por la inhibición del proteasoma".

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

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Santander, a 4 de Abril de 2014.

Fdo. Miguel Lafarga Coscojuela

Fdo. M^a Teresa Berciano Blanco

Esta Tesis ha sido financiada con las siguientes ayudas:

- Ayuda predoctoral de formación de personal investigador (FPI; BES-2009-013358) asociada al proyecto de investigación (BFU2008-00175). Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas CIBERNED CB06/05/0037.

Agradezco, en primer lugar, a los profesores Maite Berciano y Miguel Lafarga, por todos sus consejos y su apoyo durante estos años y para la realización de esta Tesis Doctoral. Especialmente a Maite, por su generosidad científica y por transmitirme esa inagotable energía y entusiasmo por la investigación.

A mis compañeros de laboratorio: Rocío, Íñigo, Saray, Olga, María, Jorge y Javi. Gracias por todos estos años aprendiendo con vosotros y por la confianza con la que me habéis tratado y por vuestra amistad. A Vanesa, su apoyo y su implicación científica en el laboratorio ha sido fundamental en el desarrollo de mi formación investigadora.

A los miembros del Departamento de Anatomía y Biología Celular por su acogida y su apoyo durante todos estos años. Especialmente a los "ex-vecinos" del laboratorio del profesor Hurlé, con los que he compartido muchos momentos profesionales y personales. A Raquel, por su ayuda en la microscopía electrónica. A África, por no dejar que me ahogue en esta montaña de papeles.

Agradecer también a los Departamentos de la Facultad de Medicina, a sus profesores por permitirme trabajar en sus laboratorios siempre que lo he necesitado y a los compañeros de estos laboratorios, con los que he aprendido y compartido ciencia. Gracias también por esos ratos fuera del laboratorio y especialmente ahora, por continuar así pese a la distancia. A mis compañeras de piso, por conocerme "pretésica" y aguantarme.

Al SEEA, especialmente a su director, Miguel García por su asesoramiento y su ayuda para desarrollar los experimentos; y a Mar, porque siempre puedo contar con ella y por cuidar de "mis pequeñas". A Pepe, en el Departamento de Física Médica, por su ayuda en la utilización del equipo de radiación. A Virginia Martínez de la Farmacia Hospitalaria de Valdecilla por su amabilidad y disponibilidad siempre que necesité el fármaco bortezomib.

Al grupo de "*Respuesta Celular al Estrés Oxidativo*" de la Universidad de Oviedo, especialmente a las profesoras Ana Coto Montes y Pepa Rodríguez Colunga por permitirme la integración en su grupo de trabajo y por ser, junto con los compañeros del grupo, las que me hicieron pensar en continuar con la investigación. A Covi Huidobro, por introducirme "en el mundillo" y porque desde que la conocí me ha ofrecido su amistad y apoyo.

Agradecer de forma especial al profesor Federico Mayor y a su grupo "*Mecanismos de señalización y regulación de receptores acoplados a proteínas G*", con los que realicé dos estancias que me permitieron aprender técnicas bioquímicas que han enriquecido mi formación. Muchas gracias por vuestra paciencia y por tratarme como una más dentro y fuera del laboratorio.

Personalmente darles las gracias a mis padres, a Cristina, a Berto, a mis amigos "de toda la vida" y a la comida de mi madre (que merecería un apartado). En definitiva, a toda esa gente especial sin cuyo cariño esta Tesis y yo misma, no habiéramos sido lo mismo. Gracias por haber confiado en mí, aunque a veces ni yo misma lo hiciera.

En aquella época me preguntaba:
"¿Qué hay detrás de esta montaña, qué esconde su vista?".
Y sentía curiosidad por ir a ver.
Hasta que subí y vi que detrás de ese macizo había otros.
Michel Sébastien "*Cimas Pirenaicas*"

Índice

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 ANATOMÍA GENERAL DEL GANGLIO TRIGÉMINO DE LA RATA	9
1.1.1 Clasificación de las neuronas del GT.....	10
1.2 BIOLOGÍA CELULAR DEL NÚCLEO Y EL CITOPLASMA	12
1.2.1 Núcleo celular interfásico.....	12
1.2.1.1 Territorio cromosómico.....	13
1.2.1.2 Dominio intercromatínico.....	17
El nucleolo.....	17
El cuerpo nuclear de Cajal.....	20
Las granulaciones intercromatínicas o “speckles” nucleares.....	26
La envoltura nuclear y el microambiente perinuclear.....	27
1.2.2 El citoplasma.....	31
1.3 MECANISMOS DE RESPUESTA Y REPARACIÓN DEL DNA	32
1.3.1 Respuesta al daño del DNA de doble cadena.....	33
1.3.2 Reparación del DNA dañado por rotura de doble cadena.....	35
1.4 LA VÍA UBIQUITINA-PROTEASOMA	38
2. OBJETIVOS	45
3. MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1 MODELOS EXPERIMENTALES DE RADIACIÓN IONIZANTE Y DE ADMINISTRACIÓN DE DROGAS	51
3.2 PROCESAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO	52
3.2.1 Técnica de fijación por perfusión.....	52
3.2.2 Obtención de disociados neuronales.....	52
3.3 MICROSCOPÍA CONFOCAL	53
3.3.1 Inmunofluorescencia.....	53
3.3.2 Hibridación <i>in situ</i> para RNAs poliadenilados.....	54
3.3.3 Ensayo de transcripción “run-on” mediante la incorporación de 5'-fluorouridina <i>in vivo</i>	55
3.3.4 Inmunodetección de muerte celular mediante TUNEL.....	55
3.3.5 Ensayo de cometa neutro.....	55
3.4 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA	56
3.4.1 Microscopía electrónica de transmisión convencional.....	56
3.4.2 Inmunocitoquímica ultraestructural.....	57
3.4.3. Microscopía inmunoelectrónica de los sitios de incorporación de 5'-FU.....	58
3.5 ANÁLISIS CUANTITATIVO Y ESTADÍSTICO	58
3.6 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	59
3.7 ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN DE RNA POR PCR CUANTITATIVA	61

3.7.1 Extracción de RNA.....	61
3.7.2 Obtención de cDNA.....	62
3.7.3 Diseño de oligonucleótidos cebadores para PCR cuantitativa.....	62
3.7.4 Detección de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real.....	63
3.7.5. Cuantificación y análisis de la expresión génica relativa.....	64
4.RESULTADOS.....	65
4.1 RESPUESTA AL DAÑO DEL DNA INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE DE LAS NEURONAS SENSITIVAS TIPO A.....	67
4.1.1 Planteamiento del trabajo.....	67
4.1.2 Organización espaciotemporal y dinámica funcional de los focos de DNA dañado por RI.....	69
4.1.3 Las roturas de doble cadena inducidas por radiación ionizante activan la vía p53/p21 en las neuronas del ganglio del trigémino.....	74
4.1.4 El daño en el DNA inducido por RI bloquea transitoriamente la transcripción neuronal.....	76
4.1.5 La RI induce cambios estructurales y epigenéticos en la cromatina.....	77
4.1.6 Los IRIFs de DNA dañado reclutan componentes de la vía ubiquitina-proteasoma.....	80
4.2 RESPUESTA DE LAS NEURONAS SENSITIVAS AL ESTRÉS INDUCIDO POR LA INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA.....	81
4.2.1 Planteamiento del trabajo.....	81
4.2.2 La inhibición del proteasoma induce cambios en la posición, forma y polaridad nuclear y afecta a los grumos de Nissl citoplasmáticos.....	82
4.2.3 El tratamiento con Btz induce rotura de la doble cadena en el DNA sin comprometer la supervivencia neuronal.....	88
4.2.4 Respuesta neuroprotectora a la inhibición del proteasoma.....	90
4.3 PAPEL NEUROPROTECTOR DEL NUCLEOLO Y DE LOS CUERPOS NUCLEARES DE CAJAL EN RESPUESTA A LA INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA.....	97
4.3.1 Planteamiento del trabajo.....	97
4.3.2 La inhibición del proteasoma incrementa el tamaño y número de nucleolos en las neuronas de tipo A.....	98
4.3.3 El tratamiento con Btz no altera la citoarquitectura nucleolar.....	99
4.3.4 El tratamiento con Btz no interfiere la transcripción nucleolar.....	101
4.3.4 El tratamiento con Btz incrementa el número de CBs.....	106
5. DISCUSIÓN.....	109
5.1 RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE EN LAS NEURONAS SENSITIVAS DE TIPO A.....	111
5.2 RESPUESTA DE LAS NEURONAS SENSITIVAS AL ESTRÉS INDUCIDO POR	

LA INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA	120
Papel neuroprotector del nucleolo y del CB en la respuesta neuronal al estrés proteotóxico	128
6. CONCLUSIONES	135
7. BIBLIOGRAFÍA	139
8. ARTÍCULOS	159

Abreviaturas

53BP1: p53-binding protein 1
5'-FU: 5'-Fluorouridina
19S: Unidad reguladora del proteasoma 26S
20S: Unidad catalítica del proteasoma 26S
APE1: AP endonuclease 1
ATM: "Ataxia Telangiectasia Mutated protein"
B23: Nucleofosmina
BAF: "Barrier-to-autointegration factor"
BDNF: "Brain derived neurotrophic factor"
BER: Reparación por escisión de bases
BIPN: Neuropatía periférica inducida por bortezomib
B-NHEJ: NHEJ alternativa o plan B
BRCA1: Breast cancer associated
Btz: Bortezomib
Btz-DA: Dosis alta de bortezomib
Btz-DB: Dosis baja de bortezomib
Btz-IF: Foco de daño inducido por bortezomib
CAP: Caperuza de 7-metil guanosina
CB: Cuerpo nuclear de Cajal, "Cajal body"
CF: Centro fibrilar
CFD: Componente fibrilar denso
CG: Componente granular
CNP: Complejos nucleares del poro
Cy5: Cyanine (blue fluorescent dye)
DBUs: Enzimas con actividad desubiquitilasa
DDR: Respuesta al daño en el DNA
DNA pol I: DNA polimerasa I
DNA topo I: DNA topoisomerasa I
D-NHEJ: NHEJ canónica
DSB: Rotura de doble hebra en el DNA
EN: Envoltura nuclear
FITC: Fluorescein isothiocyanate (green fluorescent dye)
GC_{NO}: "NO-sensitive guanylyl cyclase"
GFP: "Green fluorescent protein"
GT: Ganglio trigémino
GTa: Ganglio trigémino accesorio
GTp: Ganglio trigémino principal
H2AX: Variante de la H2A
γH2AX: H2AX fosforilada
H2A-Ub: H2A ubiquitilada

H2AX-Ub: H2A ubiquitilada
H2B-Ub: H2B ubiquitilada
H3K9me3: Histona 3 trimetilada en la lisina 9
H3K27me3: Histona 3 trimetilada en la lisina 27
H4Ac: Histona 4 acetilada
H4K20me3: Histona 4 trimetilada en la lisina 20
hnRNA: RNA heterogéneo
Hp: Hipófisis
HP1: Proteína de la heterocromatina 1
HR: Recombinación homóloga
HRR: Reparación por HR
hTERT: Telomerasa transcriptasa inversa humana
IkB: Inhibidor de NF-κB
IRIF: Focos de daño inducidos por radiación ionizante
LBR: Receptor de lámina B
MAN1: LEMD3 o "LEM domain-containing protein 3"
MDC1: "Mediator of DNA damage checkpoint 1"
MNI: Membrana nuclear interna
MNE: Membrana nuclear externa
Mre11: Meiotic recombination 11 homolog A (*S. cerevisiae*)
MRN: Complejo formado por las proteínas Mre11, Rad50 y Nbs1
mRNA: RNA mensajero
NBS1: NBN, nibrina
NEMO: Modulador esencial de NFκB
NF-κB: "Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"
NHEJ: "Non-homologous end joining", unión de extremos no homólogos
NHEJR: Reparación por NHEJ
NLS: Señal de localización nuclear
NOs: Nervios ópticos
NORs: Regiones organizadoras del nucleolo
NPM: Nucleofosmina, B23
Nup: Nucleoporina
Nups FG: Nucleoporina ricas en fenilalanina y glicina
PABPN1: "Poly(A) binding protein nuclear 1"
PABPC1: "Poly(A) binding protein cytoplasmic"
PARP1: "Poly (ADP-ribose) polymerase"
PI: Ioduro de propidio
PML: "Promyelocytic leukemia protein"
PNKP: "Polynucleotide kinase/phosphatase"
Poli(A): Poliadenosinas

Poli(A) RNA: RNA poliadenilado

Poli(U): Poliuridinas

RER: Retículo endoplasmático rugoso

RI: Radiación ionizante

RNA pol I: RNA polimerasa I

rRNA: RNA ribosomal

rDNA: DNA ribosoma

RNP: Ribonucleoproteína

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SMN: Factor de supervivencia de las motoneuronas

SNC: Sistema nervioso central

scaRNAs: "Small Cajal body-specific RNAs"

snRNA: RNA pequeño nuclear

snoRNA: RNA pequeño nucleolar

snoRNPs: Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas

SNP: Sistema Nervioso Periférico

snRNPs: Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas

SON: Núcleo del supraóptico

SSB: rotura de hebra simple en el DNA

SUMO1: "Small Ubiquitin-related Modifier 1"

SUN: Dominios C-terminal conservados de las proteínas Sad1p y UNC-84

TBP: Proteína de unión a TATA

TCAB1: "Telomere Cajal Body protein 1"

TDP1: Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1

TERC: Componente ribonucleotídico (RNA) de la telomerasa

tRNA: RNA de transferencia

TUNEL: "Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling"

Ub: Ubiquitina

U2B: U2 small nuclear ribonucleoprotein B"

Ubc9: Conjugasa específica de sumoilación (E2)

UBF: Upstream binding factor

U snRNA: RNAs pequeños nucleares ricos en uridina

U snoRNA: RNAs pequeños nucleolares ricos en uridina

USPL: "Ubiquitin-specific peptidase-like protein 1"

VUP: Vía ubiquitina proteasoma

WB: Western blot

WRN: Proteína del síndrome de Werner

XLF: XRCC4-like factor

XRCC4: X-ray repair crosscomplementing protein 4

1. Introducción



1.1 ANATOMÍA GENERAL DEL GANGLIO TRIGÉMINO DE LA RATA

El ganglio del trigémino (GT), semilunar o ganglio de Gasser de la rata, al igual que en los mamíferos superiores, es un ganglio nervioso intracraneal que alberga diferentes poblaciones neuronales que proporcionan las fibras nerviosas somatosensitivas del nervio trigémino. El GT es grande, de aproximadamente 10mm de largo y 3mm de ancho. Está superficialmente cubierto por una cápsula conectiva densa y se ubica en una depresión del hueso petroso. Observado con lupa, muestra la organización estructural anatómica característica en la que las células ganglionares están segregadas en dos zonas bien definidas e independientes entre sí, el ganglio principal (GTp) de gran tamaño y el ganglio accesorio (GTa) mucho más pequeño y organizado en el borde posterolateral externo del ganglio (Fig. 1A). En ambas localizaciones las neuronas emiten una prolongación periférica y otra central que discurren centrípetamente por el nervio trigémino. Las fibras periféricas pertenecientes a las neuronas del GTp se incorporan a las ramas oftálmico-maxilar e inervan la cara superior, el ojo y las cavidades bucal y nasal. Por su parte, las neuritas de las neuronas del GTa discurren por la rama mandibular e inervan la cara inferior y las correspondientes zonas de la cara, de la boca y de la lengua. Esta rama mandibular es sensitiva y motora (Pannese, 1994) (Fig. 1B).

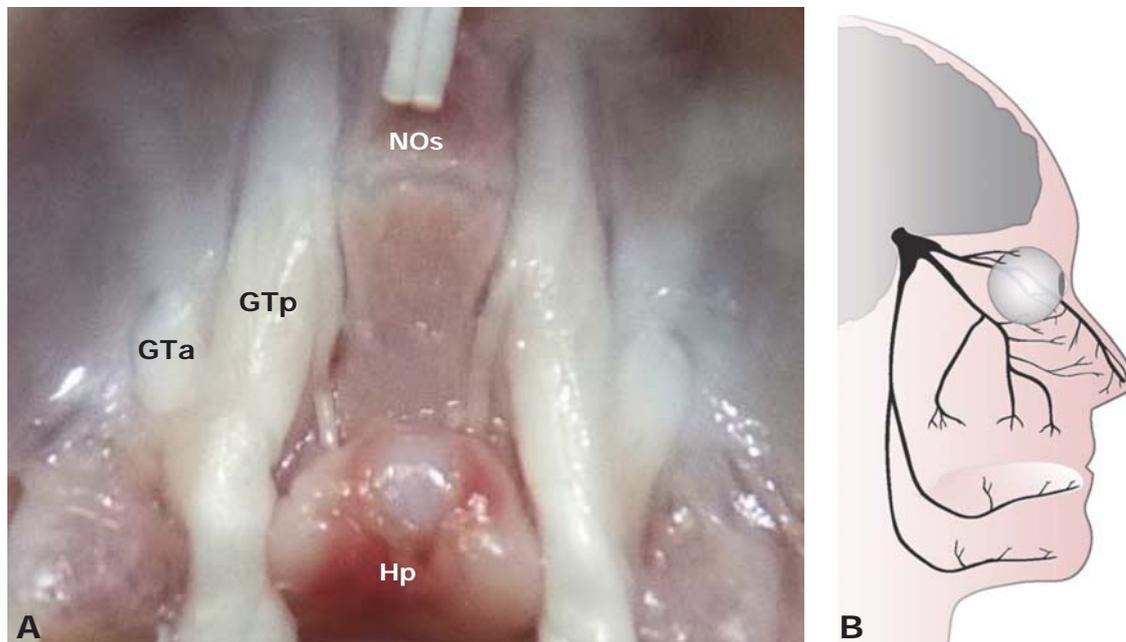


Figura 1. A. Imagen de la base del cráneo de la rata que muestra los GTs acoplados a la silla turca. Se señalan los ganglios principal (GTp) u oftálmico-maxilar y ganglio accesorio (GTa) o mandibular. **B.** Esquema ilustrativo de la distribución de las ramas del nervio trigémino oftálmica y maxilar, originadas a partir del GTp. Éstas inervan la cara, el ojo y las cavidades nasal y bucal. Por su parte, la rama mandibular, originada a partir del GTa, inerva la parte inferior de la cara y de la mucosa bucal (tomado de Viana, 2011). **NOs:** nervios ópticos; **Hp:** hipófisis.

1.1.1 Clasificación de las neuronas del GT

Independientemente de su localización, las neuronas sensitivas son morfológicamente idénticas y exhiben un soma oval del que emerge una prolongación única (neurita) muy tortuosa (glomérulo de Cajal) cuyo calibre está directamente relacionado con el volumen celular. Esta neurita se divide en la proximidad del soma neuronal en dos prolongaciones, las neuritas, o axones, aferente y la eferente (Fig. 2). Sin embargo, de acuerdo con el tamaño somático, con la cantidad de maquinaria para la síntesis de proteínas (grupos de Nissl/dictiosomas de Golgi) y con el número y tamaño de los nucleolos, las neuronas del GT se clasifican en tres categorías: neuronas de tipo A, de tipo B, y de tipo C (Pena y cols., 2001). De esta forma, se consideran neuronas de tipo A a las de mayor tamaño somático (diámetro >40µm), medianas o de tipo B a aquellas cuyo diámetro somático oscila entre 40-20µm y pequeñas o de tipo C a las neuronas con un diámetro inferior a 20µm. A su vez, las neuronas de tipo A tienden a ser mononucleoladas y sus citoplasmas albergan gran abundancia de grupos de Nissl y de dictiosomas de Golgi distribuidos por todo el citoplasma. Por su parte, las neuronas de tipo B exhiben más nucleolos y la distribución de los grupos de Nissl queda más confinada a zonas concéntricas del citoplasma marginal. En el caso de las neuronas de tipo C, muestran mayor número de nucleolos y, la proporción de grupos de Nissl y de dictiosomas de Golgi es menor (Rambourg y cols., 1983; Pena y cols., 2001).

Por otra parte, en función del tamaño axonal (neurítico) y del grosor de la mielina que lo envaina, se clasifican tres principales grupos de fibras nerviosas sensitivas. Las fibras primarias aferentes de los subtipos A α y A β , que corresponden a las neuronas de tipo A caracterizadas por tener gran diámetro axonal (5-10µm) muy mielinizado. Esta categoría de fibras nerviosas tiene propiedades bioeléctricas o de transmisión del impulso nervioso saltatorio muy rápido y sus terminaciones nerviosas están principalmente especializadas en la propiocepción y en el tacto suave o ligero de la piel, pero no responden a estímulos dolorosos. El segundo tipo de fibras nerviosas sensitivas son las fibras A δ , que se corresponden con las neuronas de tipo B. Éstas tienen un diámetro axonal medio ligeramente mielinizado (1-5µm) y están especializadas en la percepción térmica (~43-53°C) y en la nocicepción rápida. Su capacidad de transmisión es saltatoria pero lenta. Finalmente, las fibras C, correspondientes al tipo neuronal C, son amielínicas y de un diámetro inferior a 1µm. Su función sensorial es eminentemente nociceptiva lenta pero también intervienen en la sensibilidad térmica inocua (<43°C). En estas fibras la capacidad de conductancia es continua y muy lenta (Julius y Basbaum, 2001).

Tanto el soma como el segmento inicial de la neurita están revestidos por una cápsula continua de elementos celulares de la glía, las células de la glía satélite. Antes de que la neurita se dicotomiche, las células satélites son sustituidas por las de Schwann. Éstas

acompañan a las neuritas hasta la emisión de los receptores sensitivos. Las neuritas que superan $1\mu\text{m}$ de diámetro son mielinizadas por las células de Schwann, mientras que las de menor tamaño forman fascículos y están envainadas conjuntamente por una célula de Schwann formando las fibras amielínicas. El calibre de la envoltura mielínica formado por las células de Schwann está directamente relacionado con el calibre axonal y, consecuentemente, con la velocidad de conducción del estímulo sensitivo. La superficie externa de las células satélite y de las células de Schwann está tapizada por una lámina basal bien definida que establece la interfase entre la glía y el compartimento conectivo endoneural (Peters y cols., 1991; Pannese, 1994) (Fig. 2).

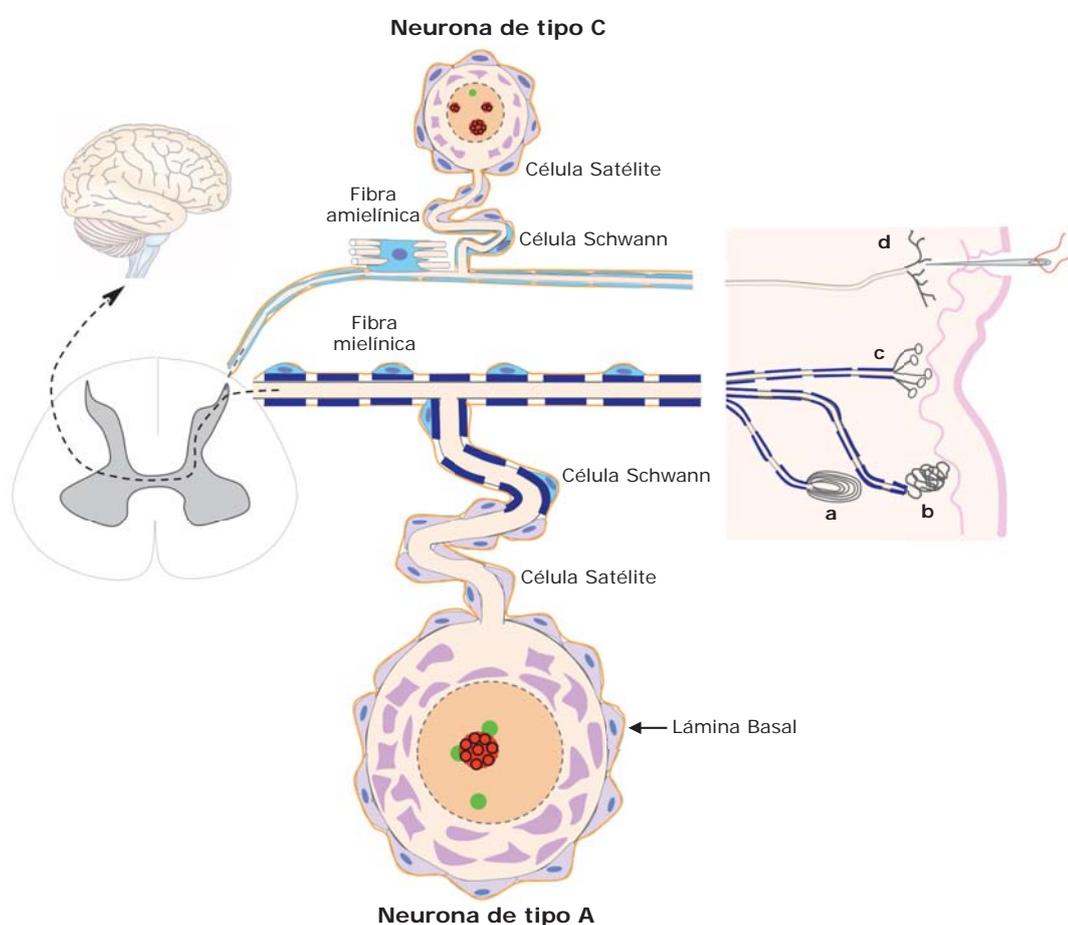


Figura 2. El esquema ilustra una neurona de tipo A (grande) y otra de tipo C (pequeña). Ambas neuronas muestran un soma oval del que emerge una neurita tortuosa que se dicotomiza en las prolongaciones aferente y eferente. La aferente se ramifica e inerva la piel y la eferente alcanza el asta posterior de la médula espinal y el cerebro contralateral. Los dos tipos neuronales muestran grupos de Nissl somáticos (violeta) pero la proporción es mayor en la neurona grande. En el núcleo se ilustran el nucleolo/s (rojo) y cuerpos nucleares de Cajal (verde). Obsérvese, cómo el soma y la porción inicial del axón están cubiertos por la glía satélite, y la porción distal por las células de Schwann. Estas células mielinizan el axón en la neurona A pero en la neurona tipo C permanece amielínico. Las células satélite y de Schwann están rodeadas por la lámina basal (línea amarilla, flecha). Se representan varios tipos de receptores sensitivos cutáneos, los corpúsculos de Pacini (a) y Meissner (b) y los discos de Merkel (c) que proceden de las terminaciones nerviosas de las neuronas de tipo A y terminaciones nerviosas libres originadas de las neuronas tipo C responsables de la nocicepción (d).

1.2 BIOLOGÍA CELULAR DEL NÚCLEO Y CITOPLASMA

Dado que el presente proyecto de Tesis Doctoral se ha realizado utilizando como modelo biológico las neuronas ganglionares de tipo A, la descripción citológica del núcleo y del citoplasma que vamos a desarrollar a continuación se basa en un modelo teórico de una célula post-mitótica cuyas características fenotípicas son, por lo general, la contrapartida de un modelo celular metabólicamente muy activo en la transcripción y traducción de proteínas comparable al de las neuronas sensitivas grandes del GT.

1.2.1 Núcleo celular interfásico

Los estudios modernos de Biología Celular y Molecular *in situ* demuestran que el núcleo de las células no proliferantes está compartimentalizado estructural y funcionalmente en dos dominios fundamentales: el territorio cromosómico, en el que cada cromosoma interfásico ocupa un subvolumen nuclear determinado, y el dominio intercromosómico o intercromatínico (Cremer y Cremer, 2006; Cremer y cols., 2006). Este dominio incluye el nucleolo y un grupo

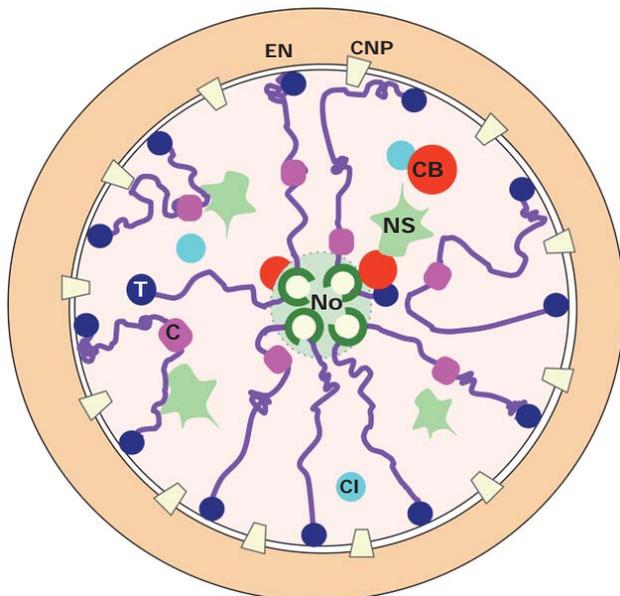


Figura 3. Compartimentos nucleares. En el dominio cromosómico, la cromatina facultativa se representa en violeta y los telómeros (T, azul oscuro) y los centrómeros (C, fucsia) El rDNA se introduce parcialmente en el interior nucleolo (No). En el dominio intercromatínico aparecen además, los "speckles" nucleares (NS en verde), los CBs (rojo) y los clastosomas (azul turquesa). La envoltura nuclear (EN) muestra doble membrana y los complejos nucleares del poro (CNP).

importante y heterogéneo de cuerpos nucleares implicados funcionalmente en el procesamiento de los mRNAs, los "speckles" nucleares, el cuerpo nuclear de Cajal (CB), los cuerpos PML y los clastosomas (Berciano y cols., 2002; Lafarga y cols., 2009; Moore y Proudfoot, 2009; Misteli y Spector, 2011) (Fig. 3). Para preservar el genoma, el núcleo se rodea de una doble membrana, la envoltura nuclear (EN), que alberga los complejos nucleares del poro (CNP) (Fig. 3). En la actualidad se considera que esta envoltura nuclear, junto con el microambiente nuclear y citoplasmático que la rodea, constituyen una plataforma funcionalmente integrada que garantiza la expresión fenotípica celular (Dauer y Worman, 2009; Mekhail y Moazed,

2010). En las neuronas sensitivas la correcta organización del compartimento nuclear junto con el microambiente perinuclear que le rodea es fundamental ya que debe garantizar una tasa transcripcional y traduccional muy alta correspondiente a su enorme actividad bioeléctrica.

1.2.1.1 Territorio cromosómico

En las neuronas sensitivas de tipo A el dominio cromosómico representa un subvolumen nuclear muy grande debido a su enorme actividad transcripcional. Poseen un patrón de cromatina eminentemente eucromatínico, es decir, que la cromatina muestra mayoritariamente el nivel más elemental de condensación del DNA, las cadenas lineales polinucleosomales. Estas cadenas tienen $\sim 10\text{nm}$ de diámetro y están formadas por la doble hélice de DNA enrollada alrededor de un octámero de histonas, el nucleosoma (Fig. 4B). Es bien conocido que cada nucleosoma (unidad fundamental de la cromatina) está constituido por 146pb de DNA enrollado 1,7 veces alrededor del núcleo central en el que se organizan ocho histonas (en cada octámero se integran dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4) (Fig. 4A). Las histonas son proteínas globulares con gran afinidad para interactuar intranucleosomalmente entre sí y con el DNA enroscado a ellas. El extremo N-terminal es largo y se extiende fuera del nucleosoma; el C-terminal es más corto y queda confinado en el interior del nucleosoma. A su vez, los nucleosomas están separados por un DNA espaciador de 10-16pb. La cadena polinucleosomal constituye el grado máximo de descondensación o relajación de la cromatina donde puede producirse la transcripción activa. Este grado de descondensación representa la eucromatina, cromatina abierta o inducible. En el siguiente nivel de compactación, las cadenas polinucleosomales unen la histona H1, que comprime los nucleosomas lineales en fibras cromatínicas silentes de 30nm de diámetro (Fig. 4C) (ver Fernandez-Capetillo y cols., 2004; genome.nhgri.nih.gov/histones/complete.shtml).

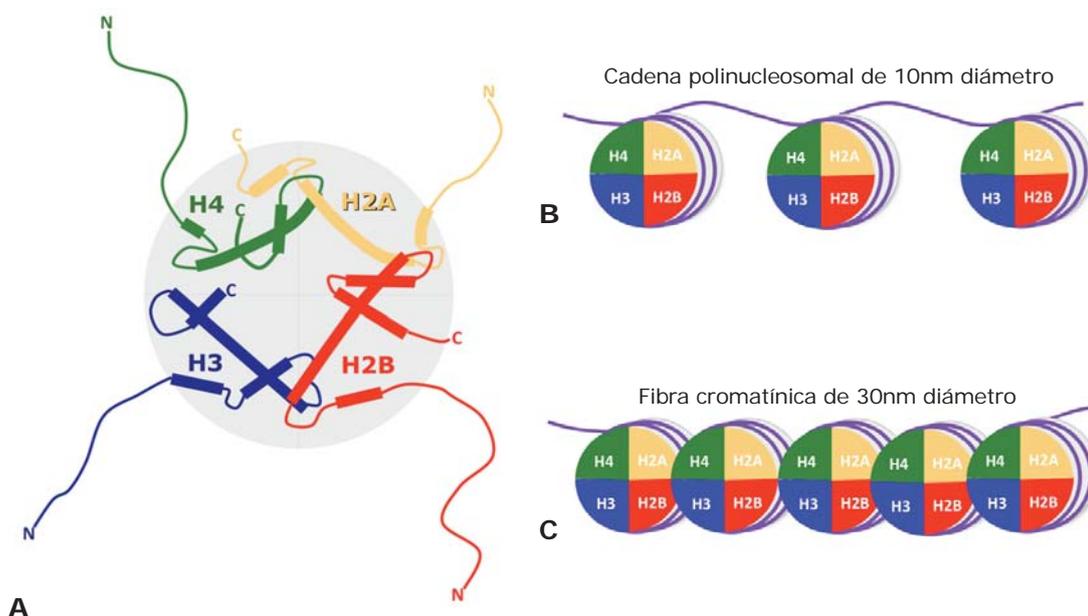


Figura 4. Estructura de la cromatina. **A.** Organización e interacción de las cuatro histonas más habituales formando uno de los dos complejos del octámero nucleosomal, H2A (amarillo), H2B (rojo) y H3 (azul) y H4 (verde). **B.** Nucleosomas lineales organizados en la cadena polinucleosomal de 10nm (eucromatina). **C.** Compactación nucleosomal formando fibras cromatínicas de 30nm (heterocromatina).

En la heterocromatina se organizan secuencias repetidas no codificantes del DNA, formando la heterocromatina constitutiva, y regiones cromosómicas que incluyen genes codificantes que se expresan de forma facultativa (silenciados). En el caso de las neuronas sensitivas de tipo A, la heterocromatina está representada por pequeños agregados, principalmente asociados a la envoltura nuclear y al nucleolo (Pena y cols., 2001). Aunque en las neuronas sensitivas normales la cromatina muestra un patrón muy específico, en situaciones de estrés experimentan un remodelamiento muy rápido por heterocromatinización masiva reversible (Navascues y cols. 2004). La plasticidad estructural y funcional de la cromatina se debe a que las células somáticas disponen de estrategias de regulación génica muy importantes entre las que destacan las modificaciones post-traduccionales de las histonas nucleosomales (Fernandez-Capetillo, 2004).

En las células post-mitóticas las modificaciones post-traduccionales de las histonas nucleosomales en regiones génicas son imprescindibles para regular procesos tan importantes como la transcripción, el silenciamiento génico, la heterocromatinización o a reparación del DNA (Munshi y cols., 2009). Estas modificaciones de las histonas se producen fundamentalmente en los extremos NH₂ y COOH terminales (Fig. 5A-B). El extremo N-terminal es largo y cargado positivamente al estar enriquecido en residuos de lisina (K) y arginina (R) que afianzan su afinidad con el DNA. Dichos residuos pueden modificarse específicamente por acetilación y metilación modificando su afinidad por el DNA. Además, presenta aminoácidos fosforilables de serina (S) y treonina (T). Por su parte, el extremo C-terminal es más corto y, preferentemente, se modifica por ubiquitilación (Schneider y Grosschedl, 2007; Patel y Wang, 2013). Se ha propuesto que algunas marcas epigenéticas son estables y etiquetan histonas nucleosomales sintetizadas de *novo*, como son la monometilación de la H3 en la K27 (H3K7me1) y de la H4 en la K20 (H4K20me1) (Balakrishnan y Milavetz, 2010) (Fig. 5A-B). Pero realmente, lo que regula la transcripción son las modificaciones alternativas y, por lo general, reversibles de las histonas nucleosomales. Estas marcas confieren a las histonas gran diversidad proteómica, permiten su propia autorregulación y modulan su interacción molecular con otras proteínas, con las RNPs y con el DNA (Munshi y cols., 2009). Por ejemplo, el ciclo de acetilación/deacetilación coordina la expresión génica; así, la acetilación de la histona H4 (en K5, K8 o K12) es una marca que induce la eucromatinización y activa la transcripción, mientras que su deacetilación la reprime (Peterson y Laniel, 2004; Blasco, 2007; Munshi y cols., 2009) (Fig. 5A). Además, las propias enzimas acetiltransferasas responsables de la acetilación de H4 actúan como co-activadores transcripcionales. Al contrario de la acetilación, la metilación de determinadas histonas estabiliza la cromatina en estado silente (Fig. 5B). En el núcleo interfásico, los nucleosomas silentes de la eucromatina y de la heterocromatina constitutiva y facultativa están específicamente hipoacetilados e hipermetilados. En particular, en los nucleosomas silentes de la eucromatina y de la heterocromatina constitutiva, las histonas H3 y H4 están etiquetadas por trimetilación, la H3 se metila en K9 (H3K9me3) y la H4

lo hace en la K20 (H4K20me3) (Fig. 5B). Por su parte, en la cromatina facultativa, la metilación de histonas también es muy importante, pero en este caso la represión transcripcional depende ,además, de la metilación de la H4 y de la hipermetilación selectiva de la H3 en la K27 (H3K27me3) (Kourmouli y cols., 2004; Fedorova y Zink, 2008; Munshi y cols., 2009). Estas modificaciones post-traduccionales favorecen la interacción de la cromatina con las proteínas HP1 (“Heterochromatin Protein 1”) y BAF (“Barrier to autointegration factor”), que a su vez estabilizan la asociación de la cromatina con la lámina nuclear y organizan espacialmente cada cromosoma en un territorio específico de tipo celular (Misteli, 2007; Schneider y Grosschedl, 2007; Munshi y cols. 2009; Meldi y Brickner, 2011). No obstante, la metilación no siempre es una señal de silenciamiento génico. De hecho, la H3K36me3 se asocia específicamente a la fase de elongación de la transcripción y, co-transcripcionalmente, al “splicing” y a la poliadenilación de los pre-mRNAs (Moore y Proudfoot, 2009). Otras modificaciones post-traduccionales importantes de las histonas nucleosomales son la fosforilación y la ubiquitilación. La fosforilación del extremo N-terminal de las histonas H3 y H2B activa la transcripción, mientras que la fosforilación de la H2A la reprime (Peterson y Laniel, 2004). Recientemente se ha demostrado en células eucariotas superiores que las H2A y H2B pueden monoubiquitilarse en K119 (H2A-Ub) y K120 (H2B-Ub). A nivel transcripcional, la ubiquitilación regula el remodelamiento de la cromatina, H2A-Ub participa en el silenciamiento génico y H2B-Ub favorece la elongación de la transcripción (Ma y cols., 2011). Ambas histonas ubiquitiladas están implicadas en la respuesta al daño del DNA (Batta y cols., 2011).

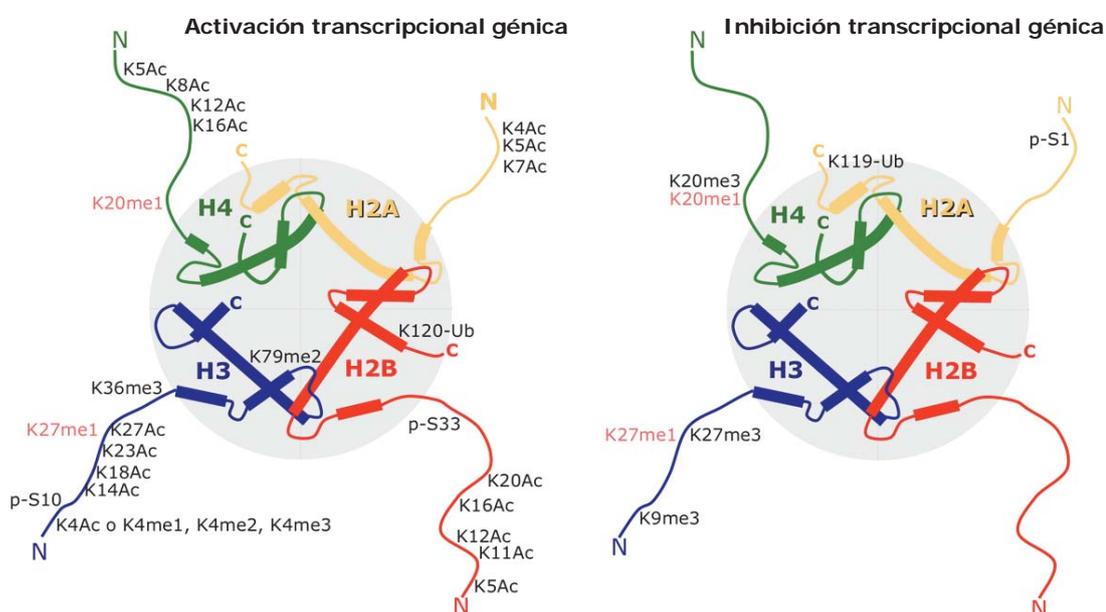


Figura 5. Modificaciones post-traduccionales de las histonas nucleosomales. La multiacetilación de residuos de K de las cuatro histonas nucleosomales potencia la transcripción, mientras que la modificación de lisinas por trimetilación de las H3 en K9 y K27 y H4K20 tiene un efecto represor. No obstante, cuando la metilación se produce en las lisinas K4, K36 y K79 de la H3, se favorece la transcripción. Con la excepción de la ubiquitilación (Ub) que es del extremo C-terminal de la H2A y de la H2B, la mayor parte de las modificaciones se producen en el extremo N-terminal. En color salmón se representan las histonas etiquetadas de forma estable.

En las histonas nucleosomales existen ciertas variantes, como son las de la histona H2A, que incluyen la H2AX, H2AZ, macroH2A y H2AB (Kamakaka y Biggins, 2005). De este "pool", la H2AX se distribuye regularmente en el genoma y, en los mamíferos, constituye entre un 2-25% del total de la H2A (Fernandez-Capetillo, 2004). Como se comentará más adelante, la histona H2AX juega un papel muy importante en la señalización molecular del DNA dañado (Rogakou y cols., 1998). Asimismo, la H3 también presenta las variantes centromérica (cenH39) y la H3.3 (Kamakaka y Biggins, 2005).

Otro aspecto importante relacionado en la regulación génica es la localización espacial de los cromosomas y la formación de unidades de cromatina formando bucles o lazos de fibras cromatínicas o de cadenas polinucleosomales. Estos bucles cromosómicos han cobrado mucha entidad funcional en la organización del genoma, ya que pueden incluir secuencias génicas silentes, aproximar espacialmente secuencias del genoma alejadas y formar bucles de genes activos transcripcionalmente (Fig. 6). Con frecuencia, los bucles de DNA activado transcripcionalmente se asocian a los complejos del poro nuclear, creando factorías que favorecen rápidamente el ensamblaje de la maquinaria de transcripción necesaria para la síntesis y maduración de RNAs y la exportación directa de los transcritos al citoplasma. Actualmente se propone que estos bucles tienen memoria transcripcional, lo que favorece que en activaciones sucesivas la respuesta sea más rápida y eficiente (Misteli, 2007; Schneider y Grosschedl, 2007; Moore y Proudfoot, 2009; Meldi y Brickner, 2011). De hecho, las neuronas sensitivas de tipo A, cuya tasa transcripcional es muy alta, muestran un patrón de fibrillas pericromatínicas muy prominente y particularmente localizado en el microambiente perinuclear del poro (Casafont y cols., 2006).

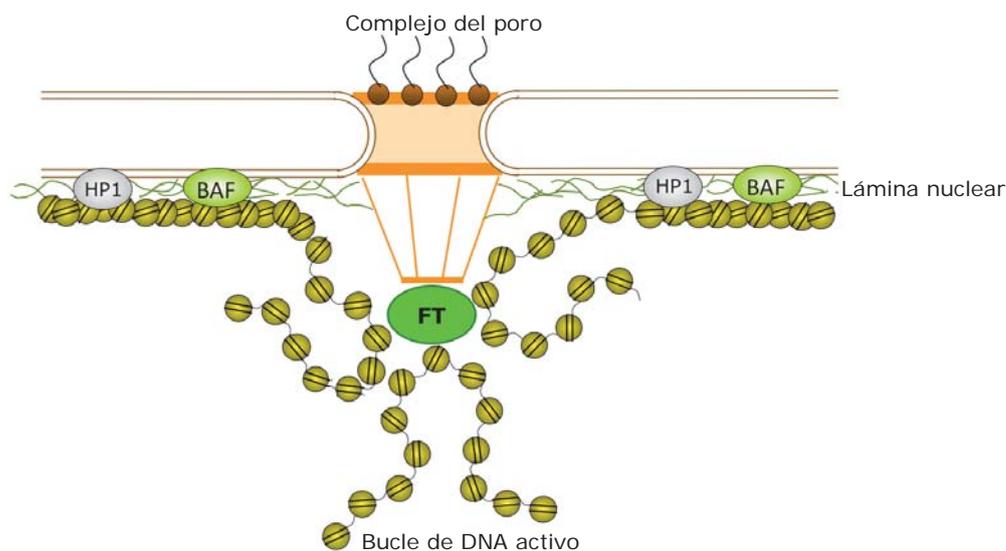


Figura 6. Organización espacial de la cromatina con la envoltura nuclear. Mientras que el anclaje de las fibras cromatínicas (heterocromatina) a la lámina nuclear está mediado por las proteínas de heterocromatinización HP1 y BAF, los bucles de eucromatina transcripcionalmente activa se aproximan al complejo del poro nuclear (CNP). Estos bucles favorecen que la maquinaria transcripcional pueda ser compartida dando lugar a una factoría transcripcional (FT).

Merece la pena destacar, aunque sea brevemente, la organización de la cromatina nucleolar, ya que tiene algunas peculiaridades específicas. Como se comentará en el siguiente apartado, el nucleolo es el compartimento nuclear donde se localizan los genes ribosomales (rDNA), siendo el rDNA nucleolar la base estructural y funcional del nucleolo. En este sentido, el nucleolo podría considerarse un subcompartimento del dominio cromosómico. El rDNA del nucleolo está esencialmente representado por genes ribosomales repetidos y ordenados en tándem en las regiones organizadoras del nucleolo (NORs) de determinados cromosomas (Sogo y cols., 1984; Hadjiolov, 1985). El número de cromosomas portadores de NORs es variable entre especies animales, en la rata sólo tres pares de cromosomas tienen rDNA por lo que las neuronas sensitivas, por ser diploides, podrían tener un número máximo de seis nucleolos (Kano y cols., 1976). No obstante, las neuronas sensitivas nunca poseen tantos nucleolos (Pena y cols., 2001), lo que apoya que en la nucleologénesis no participan necesariamente todas las NORs. Sin embargo, es interesante matizar que el número de nucleolos no es un buen indicador de actividad transcripcional ya que las neuronas de tipo A, más activas transcripcionalmente que las de tipo B o C, organizan preferentemente los NORs activos en un único nucleolo. Probablemente, la formación de un único nucleolo de gran tamaño puede favorecer el reclutamiento de los genes ribosomales activos y de la maquinaria molecular para la transcripción y procesamiento del rRNA en un único dominio nuclear. Este proceso podría incrementar la eficiencia de biogénesis nucleolar de los pre-ribosomas (Pena y cols., 2001).

1.2.1.2 Dominio intercromatínico

Entre los territorios cromosómicos se encuentra el espacio intercromosómico o intercromatínico, donde se organizan numerosas estructuras nucleares. Estos cuerpos nucleares son principalmente de naturaleza protéica y, aunque carecen de membrana limitante, se consideran sub-organelas con entidad propia, ya que poseen una clara identidad morfológica, concentran componentes específicos y están implicados en distintas funciones (Lamond y Spector, 2003; Misteli 2005). Las estructuras más relevantes del dominio intercromatínico de las neuronas sensitivas de la rata son el **nucleolo**, los cuerpos nucleares de Cajal (**CBs**), las áreas de factores de "splicing" o "**speckles**" nucleares y la **envoltura nuclear** o **microambiente perinuclear**.

El nucleolo

El nucleolo es una organela multifuncional altamente especializada en la organización de los genes en "tándem" que constituyen el rDNA y en la biogénesis de los ribosomas. Esta biogénesis es un proceso complejo que requiere una serie de etapas consecutivas que incluyen: i) la activación y transcripción inicial de los genes ribosomales (tránscritos primarios de pre-rRNA 45S) ii) el corte de los pre-rRNA 45S en las tres categorías de rRNAs

nucleolares, 28S, 18S y 5,8S; iii) la modificación post-transcripcional de los transcritos y iv) el ensamblaje de los rRNAs 28S, 18S, 5,8S y 5S, este último de origen extranucleolar. A partir de los cuales se forman las subunidades grande (60S) y pequeña (40S) del ribosoma (Raska y cols., 2006; Boisvert y cols., 2007). Dichos procesos ocurren en subcompartimentos nucleolares bien definidos que incluyen los centros fibrilares (CFs), el componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y los intersticios (Fig. 7A-B). La organización estructural y la proporción de estos componentes está directamente relacionada con la actividad metabólica celular, razón por la que las neuronas sensitivas son un excelente modelo para correlacionar la estructura y la función del nucleolo. De hecho, las neuronas de tipo A muestran generalmente un único nucleolo muy grande y visible con la microscopía de luz por su elevado índice de refracción debido a la alta concentración de rRNAs y proteínas que posee. Sus componentes muestran un alto nivel de organización, con numerosos CFs pequeños distribuidos por todo el nucleolo y un CF de gran tamaño (centro fibrilar gigante, CFG) cuyo significado funcional no es bien conocido (Casafont y cols., 2007). Los CFs están rodeados parcial o totalmente por el CFD y, entre ambos subcompartimentos, se organiza el componente granular (CG) y los intersticios nucleolares (Pena y cols., 2001) (Fig. 7A-B).

Cada CF junto con la cápsula del CFD constituyen las unidades estructurales y funcionales del nucleolo donde se produce la biogénesis y procesamiento inicial de los rRNAs (Fig. 7A-B). En los CFs se organizan numerosas copias de genes ribosomales activados o inhibidos transcripcionalmente (Hadjiolov, 1985). Los genes de rDNA silentes se sitúan, preferentemente en la zona más central del CF, mientras que el rDNA activo se dispone en la periferia y se extiende en el CFD, donde se produce la transcripción (Raska y cols., 2006; Boisvert y cols., 2007). En el CF se almacenan moléculas implicadas en la transcripción como son el factor de transcripción UBF ("Upstream binding factor"), la RNA polimerasa I, la TBP ("TATA binding protein"), la DNA topoisomerasa I y algunos transcritos de los propios pre-rRNAs (Carmo-Fonseca y cols., 2000; Sirri y cols., 2008; Tremblay y cols., 2009; McKeown y Shaw, 2009) (Fig. 7A-C). Desde un punto de vista funcional podemos decir que los CFs son los organizadores estructurales del rDNA y sitios de almacenamiento transitorio de componentes de la maquinaria de transcripción, procesamiento y maduración de los rRNAs (McKeown y Shaw, 2009). Por su parte, el CFD está constituido por fibrillas densamente empaquetadas en las que se disponen buena parte de los genes ribosomales activos. Está enriquecido en componentes de la maquinaria de transcripción (RNA-polimerasa I y a la nucleolina), ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs), "procesomas" y productos génicos, los transcritos primarios (Dragon y cols., 2002; Mongelard y Bouvet, 2007; Sirri y cols., 2008). Entre las proteínas constituyentes de las snoRNPs, tienen particular importancia la chaperona Nopp140, la pseudouridina sintasa disquerina/NAP57 y la rRNA metiltransferasa fibrilarina (Fig. 7C). Estas enzimas son responsables de la pseudouridinación y metilación de

los pre-rRNAs, dos modificaciones post-transcripcionales fundamentales para la posterior escisión del pre-rRNA 45S en las tres modalidades de rRNAs 18S, 28S y 5,8S (Sweet y cols., 2008; Montanaro y cols., 2008) (Fig. 10).

El CG se denomina así porque a nivel ultraestructural lo forman gránulos de unos 15-20nm de diámetro correspondientes a las subunidades pequeñas y grandes pre-ribosomales (Fig. 7A-B). En este subcompartimento nucleolar finaliza el ensamblaje de las subunidades de los ribosomas y es un sitio de depósito de estas subunidades hasta su exportación al citoplasma (Raska y cols., 2006). En las neuronas de tipo A este componente nucleolar es muy evidente y ocupa prácticamente todos los intersticios que quedan entre los CF/CFD (Pena y cols., 2001). Una proteína característica y muy importante funcionalmente del CG es la fosfoproteína B23, también conocida como nucleofosmina (NPM), NO38 o numatrina (Fig. 7C). Es una de las proteínas con mayor "pluriempleo" celular ya que, además de tener un papel crítico en el ensamblaje final y exportación de las partículas pre-ribosomales, actúa como endonucleasa, ribonucleasa y chaperona (Boisvert y cols., 2007).

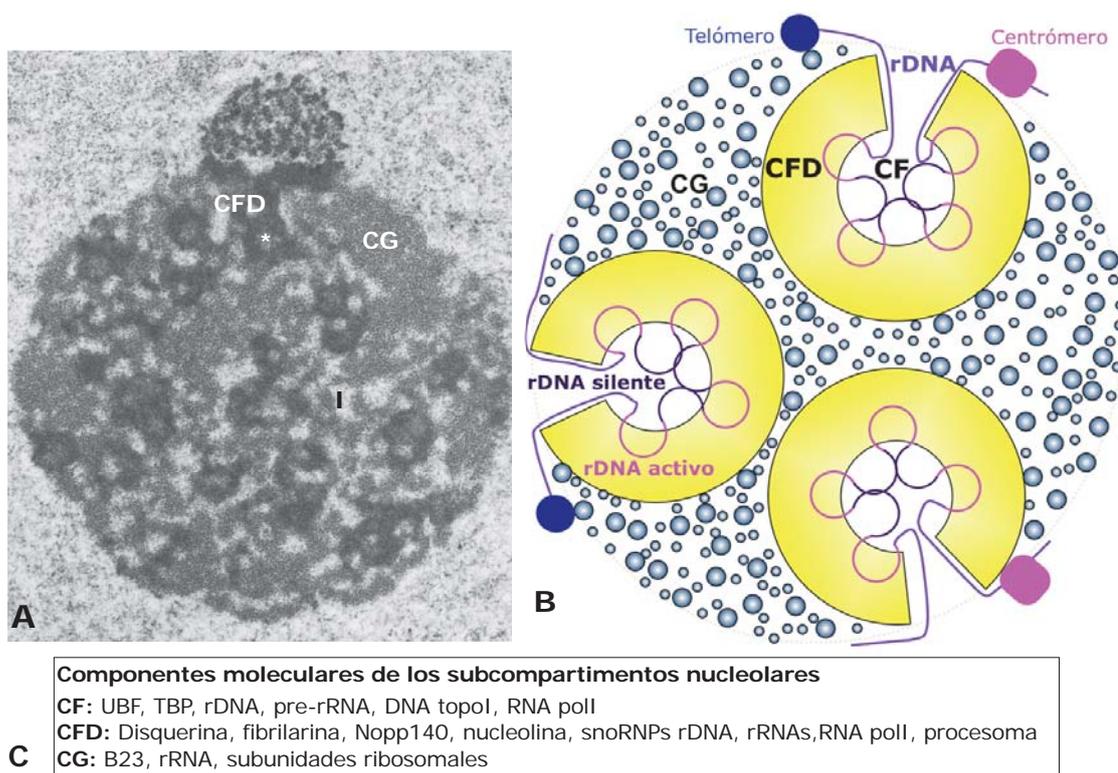


Figura 7. Compartimentos del nucleolo. **A.** Imagen ultraestructural de un nucleolo perteneciente a una neurona sensitiva de tipo A. Se identifican los tres subcompartimentos canónicos del nucleolo, centros fibrilares pequeños y numerosos (asterisco), componente fibrilar denso (CFD), componente granular (CG) y los intersticios (I). **B.** Esquema de un nucleolo que representa los tres subcompartimentos característicos del nucleolo. La línea violeta corresponde al rDNA que se introduce en el CF (rDNA silente, en oscuro) y parcialmente organizado en el borde interno del CFD (rDNA activo transcripcionalmente, fucsia). En el CG los gránulos grises representan las partículas ribosomales grandes y pequeñas. **C.** En los recuadros se resumen algunas moléculas que se localizan específicamente en cada compartimento.

La versión moderna que tenemos del nucleolo añade a su función primaria, la biogénesis de ribosomas, otras funciones tales como la regulación de la mitosis, la progresión del ciclo celular y proliferación, la respuesta al estrés y a la infección vírica, el proceso de carcinogénesis y la biogénesis de múltiples ribonucleoproteínas (RNPs) de pequeño tamaño (Boisvert y cols., 2007). Además, los avances en el campo de la microscopía confocal con la expresión ectópica y seguimiento *in vivo* de proteínas fluorescentes, y los estudios de proteómica han contribuido significativamente a conocer la multifuncionalidad del nucleolo. El grupo de Lamond (Dundee, UK), pionero en el campo de la proteómica nucleolar, ha demostrado que los nucleolos aislados continúan transcribiendo el rRNA, indicando que funcional y estructuralmente son organelas autónomas y muy estables (Boisvert y cols., 2007). Además, estudios de seguimiento *in vivo* de proteínas nucleolares fluorescentes han demostrado que los compartimentos nucleolares son muy dinámicos y que sus componentes están sometidos a un intercambio continuo con el nucleoplasma (Andersen y cols., 2005; Hernandez-Verdun, 2006). Por otra parte, la combinación de proteómica nucleolar con el análisis de proteínas por espectrometría de masas demuestra que, aproximadamente, el 30% de las casi 5000 proteínas identificadas en el nucleolo están funcionalmente relacionadas con la producción de las subunidades del ribosoma. El resto de proteínas, de entidad y función muy diversa, justifican la idea de que el nucleolo tiene funciones adicionales a la biogénesis de ribosomas. Entre las proteínas no ribosomales destacan factores implicados en el procesamiento de mRNAs, el control del ciclo celular y la reparación del DNA (Boisvert y cols., 2007; Ahmad y cols., 2009).

El cuerpo nuclear de Cajal (CB)

El CB es una organela nuclear del dominio intercromosómico descubierta por Santiago Ramón y Cajal en 1903 en diversos tipos neuronales y en varias especies de mamíferos. Cajal la describe como una estructura nuclear argirófila, de forma esférica y bordes nítidos, de aproximadamente 0,5 a 1µm de diámetro, con una textura homogénea y localizada libre en el nucleoplasma o asociado al nucleolo (Fig. 8). Cajal consideró que esta organela estaba relacionada con el nucleolo, razón por la que la bautizó con el nombre de "cuerpo accesorio" del nucleolo (Cajal, 1903; Lafarga y cols., 1983). Posteriormente, demostró que el cuerpo accesorio es una estructura constante en la mayoría de tipos neuronales y que presenta variaciones en el número y tamaño dependiendo de la población neuronal (Cajal, 1910). El cuerpo accesorio despertó escaso interés entre los científicos de la época hasta que, en la década de 1950, el equipo de Barr (University Western Ontario), estimulado por la demostración de la cromatina sexual en el núcleo neuronal de las hembras (en la actualidad el cromosoma X inactivo), dedicó un gran esfuerzo al estudio del núcleo neuronal y publicó tres artículos sobre la organización del cuerpo accesorio en neuronas de varios centros

nerviosos del gato (para revisión ver Lafarga y cols., 2009). En estos estudios se confirmaban las observaciones de Cajal, se demostraba la ausencia de DNA en el cuerpo accesorio (Feulgen negativo) y se aportaban las primeras evidencias de su comportamiento dinámico en respuesta a los cambios de la expresión génica asociados con la axotomía (Lafarga y cols., 2009).

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

Sin ninguna duda, un avance fundamental para conocer la importancia funcional de esta organela ha sido su caracterización molecular. Durante la década de los 90 se alcanzó un gran progreso en el conocimiento de la composición molecular del CB que dio importantes pistas acerca de la funcionalidad de esta organela. Así, la identificación del marcador molecular específico, la coilina (Andrade y cols., 1991) y el desarrollo de nuevos anticuerpos y sondas de hibridación, permitieron localizar en el CB factores implicados en el "splicing" de los pre-mRNAs, incluyendo los U snRNAs espliceosomales, proteínas del "splicing" (complejo Sm) y las propias ribonucleoproteínas espliceosomales (snRNPs). Asimismo, con sueros autoinmunes y anticuerpos específicos, se demostró que el CB estaba enriquecido en el complejo multiprotéico Sm y U2B", que forma parte del núcleo central del espliceosoma (Carmo-Fonseca y cols., 1992; Lamond y Carmo-Fonseca, 1993; Gall, 2000). Otro componente del CB es el factor de supervivencia de las motoneuronas ("survival motor neuron protein", SMN) que está relacionado con la biogénesis de los snRNPs en el citoplasma y con su destino nuclear al CB. Inicialmente la proteína SMN fue identificada por Liu y

Dreifuss (1996) en el citoplasma y formando cuerpos nucleares que denominó gemelos o “gems” del CB, porque se encontraron asociados a esta organela (Liu y Dreifuss, 1996; Liu y cols., 2009). Estudios posteriores (Matera y Frey, 1998; Carvalho y cols., 1999; Young y cols., 2000; Pena y cols., 2001; Berciano y cols., 2007) en diferentes líneas celulares y tejidos animales, han revelado que el factor SMN y sus proteínas asociadas normalmente colocalizan con la coilina y snRNPs en el CB. También son dianas del CB una amplia familia de ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs) y de RNAs pequeños asociados al CB (scaRNAs) (Cioce y Lamond, 2005, Nizami y cols., 2010; Hebert, 2013). Además, la lista creciente de nuevas moléculas identificadas en el CB abre nuevas expectativas funcionales para esta estructura. Por ejemplo, la presencia del RNA de la telomerasa, de la transcriptasa inversa humana (hTERT) y de las subunidades catalíticas de la telomerasa (TERC, diskarina y TCAB1) (para revisión, ver Cioce y Lamond, 2005). El CB también asocia determinados loci génicos, particularmente de las histonas, y concentra moléculas requeridas para el procesamiento de los pre-mensajeros de las histonas (Ciclina E/CDK2, P220 y U7 snRNA) (Hoffmann y Birnstiel, 1990; Fernandez y cols., 2002). Más recientemente, nuestro grupo ha demostrado que algunos CBs están enriquecidos en el modificador post-traducciona SUMO1 (“Small Ubiquitin-like modifier-1”) (Navascues y cols., 2008) y que la sumoilación de la proteína SMN es crucial para la organización del CB (Tapia y cols., 2014, en prensa). A la vez el grupo de Melchior ha añadido al listado molecular de los componentes del CB la presencia de la enzima específica de desumoilación USPL1 (Schulz y cols., 2012) (Fig. 8).

A pesar de que el CB concentra gran variedad de componentes para la biogénesis de mRNAs y rRNAs, no es un sitio de transcripción ni de “splicing” como demuestra la ausencia de sustratos hnRNPs o poli(A) RNAs y de otros factores de “splicing” esenciales como las proteínas SC35 y U2AF (Lamond y Carmo-Fonseca, 1993; Gama-Carvalho y cols., 1997). Además, el CB carece de DNA, de histonas y no incorpora uridina tritiada (Lamond y Carmo-Fonseca, 1993; Gall, 2000). Sin embargo, dada la gran cantidad de componentes implicados en la expresión génica y que su número y tamaño está directamente relacionado con la actividad transcripcional celular, se mantuvo el interés por demostrar que no era una organela de mero depósito molecular sino una estructura dinámica con actividad funcional (Carmo-Fonseca y cols., 1993; Lafarga y cols., 1998; Pena y cols., 2001; Berciano y cols., 2007; Hebert, 2013). De hecho, el seguimiento en células vivas de proteínas del CB fusionadas con proteínas fluorescentes ha permitido conocer que esta organela tiene un importante dinamismo molecular y sus componentes moleculares están en flujo constante con el nucleoplasma (Misteli, 2008). Además, el CB se mueve libremente en el nucleoplasma y se relaciona espacialmente con otros compartimentos nucleares, particularmente con el nucleolo, determinados dominios de la cromatina y los cuerpos PML (Platani y cols., 2002; Cioce y Lamond, 2005; Mistelli, 2007; 2008; Berciano y cols., 2007). Así, la relación espacial

física de los CBs con otros cuerpos nucleares como son los “speckles” nucleares, el nucleolo, los telómeros y los cuerpos nucleares PMLs ha permitido proponer la existencia de un tráfico molecular activo entre el CB y dichos dominios nucleares (ver Frey y Matera, 1995; Cioce y Lamond, 2005). Sobre la base de las relaciones espaciales del CB y de su composición molecular, se ha propuesto que el CB está implicado en funciones tan importantes como la biogénesis de los snRNAs espliceosomales (Fig. 8A) y de los snoRNAs nucleolares (Fig. 8B); el procesamiento de pre-mRNAs de determinadas histonas (Fig. 8C); en la sumoilación/ desumoilación de sustratos (Fig. 8D), y la maduración de la telomerasa (Fig. 8E).

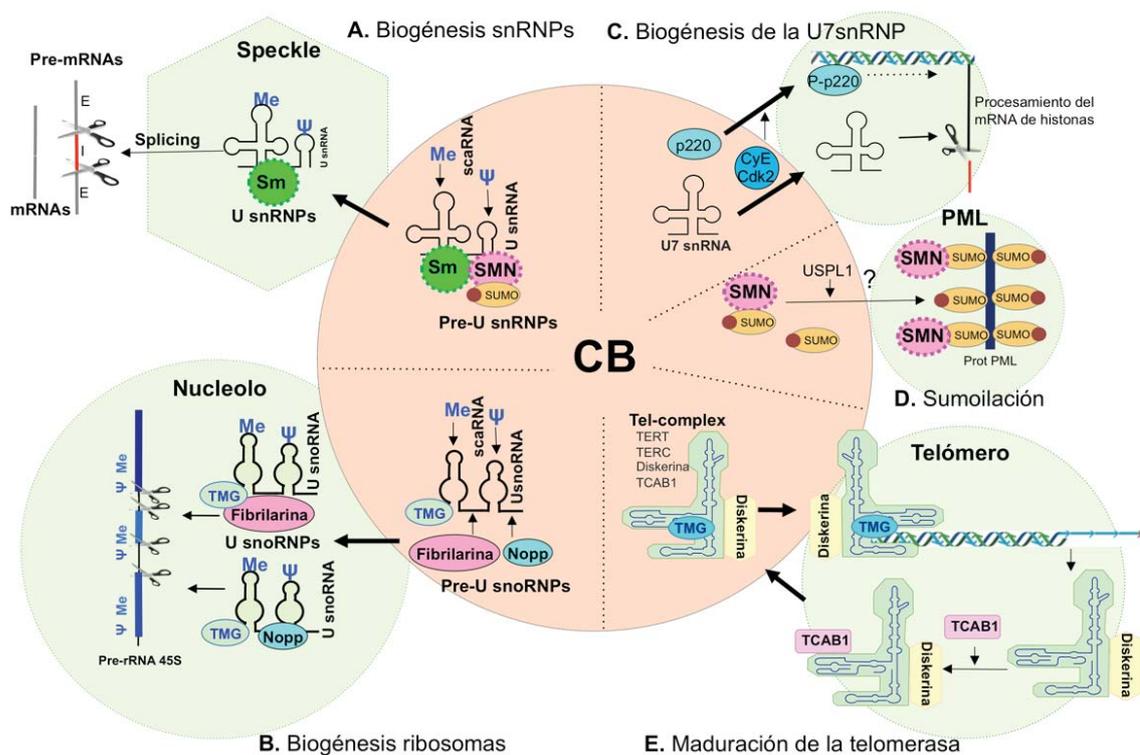


Figura 8. Se esquematizan cinco funciones del CB. En el CB culmina la maduración de las ribonucleoproteínas espliceosomales (snRNPs) (A) y de las ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs) (B). En la fase S del ciclo celular, el CB está relacionado con la transcripción y procesamiento de histonas nucleosomales (C). El CB almacena el complejo de la telomerasa y contribuye a la maduración de la DNA-telomerasa (D). En (E) se ilustra su asociación y posible relación funcional con la sumoilación y el tráfico bidireccional de proteínas.

Las cinco funciones del CB presentadas en la figura 8 tienen enorme trascendencia funcional, pero en el contexto del presente proyecto de Tesis Doctoral tienen particular relevancia la participación del CB en la biogénesis de las snRNPs espliceosomales implicadas en el “splicing” de los mRNAs y en la biogénesis de las snoRNPs nucleolares. Por esta razón, aunque sea brevemente, vamos a describir con más detalle la implicación del CB en la maduración de ambas ribonucleoproteínas.

En el caso de la participación del CB en la biogénesis de las snRNPs espliceosomales la secuencia de acontecimientos sería la siguiente: en primer lugar, tras la transcripción, los

UsnRNAs espliceosomales son exportados al citoplasma donde se modifican post-transcripcionalmente por hipermetilación del extremo 5' (caperuza de trimetil-guanosina, TMG). En el citoplasma, estos U snRNAs se ensamblan con el complejo proteico espliceosomal Sm (SmB/B', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF y SmG) formando la pre-snRNP espliceosomal. Para que este ensamblaje se produzca se requiere la participación del complejo SMN, compuesto por la proteína SMN y, al menos, 7 proteínas denominadas "geminis" (Carissimi y cols., 2006). Una vez ensamblado el complejo pre-snRNP (snRNA/Sm/SMN), la snurimportina/importina β dirige su importación y destino al CB (Stanek y cols., 2008). Esta fase está mediada por la interacción de la SMN y de la Sm de las pre-snRNPs con la coilina del CB (Fig. 9). En el CB se produce la maduración funcional de las pre-snRNPs a las snRNPs mediante dos modificaciones en los snRNAs, la 2'-O-metilación de residuos de ribosa y la conversión de uridinas en pseudouridinas. En ambos procesos son clave los scaRNAs o RNAs-guías específicos del CB (Darzacq y cols., 2002; Jady y cols., 2003). Una vez que los snRNAs de las snRNPs son metilados y pseudouridinados, el complejo SMN se debe disociar, un requisito previo para que las snRNPs sean transferidas a los "speckles" y a los sitios de transcripción activa donde se ensamblan en el espliceosoma responsable del "splicing" de los pre-mRNAs (Lamond y Spector, 2003; Lafarga y cols., 2009) (Figs. 8A y 9).

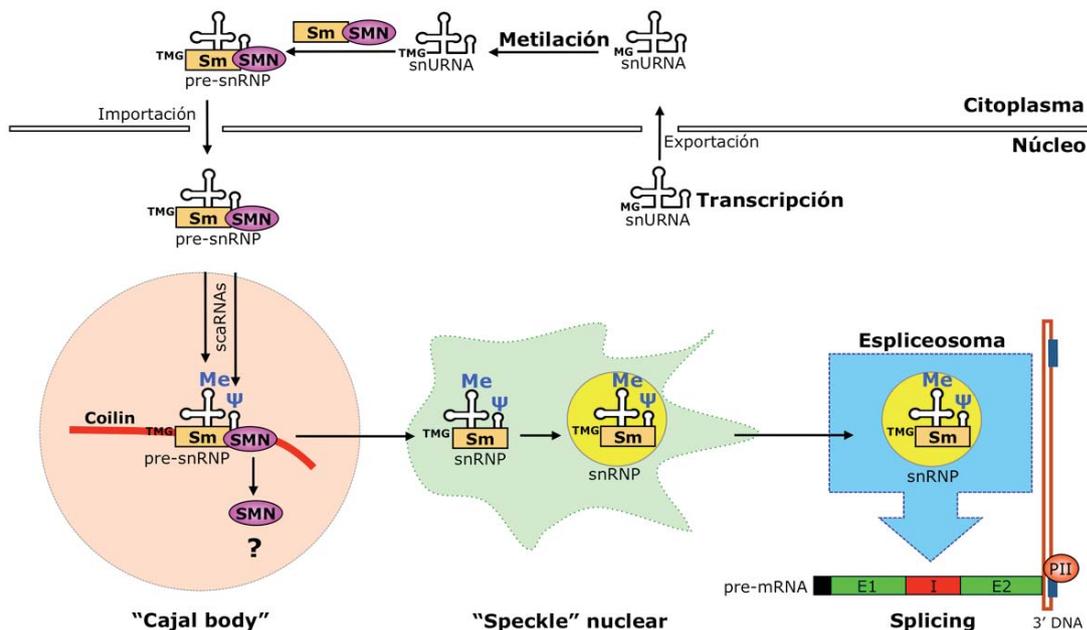


Figura 9. Etapas de la biogénesis de snRNPs espliceosomales. Tras la transcripción, los snRNAs espliceosomales se exportan al citoplasma donde se ensamblan con los complejos SMN y Sm para formar las pre-snRNPs que son reimportadas al núcleo por la importina β (no representada) y al CB. En el CB, tras interacción con la coilina (rojo), culminan su maduración por metilación (Me) y pseudouridinación (ψ) de los snRNAs. Los scaRNAs dirigen este proceso. Las snRNPs maduras se almacenan transitoriamente en los "speckles" nucleares. Las snRNPs se integran en el espliceosoma para participar en el "splicing" de los pre-mRNAs.

Con respecto a la participación del CB en la biogénesis de las snRNPs nucleolares también tiene gran entidad funcional para la génesis de los rRNAs. Existen múltiples tipos de

snoRNPs que se agrupan en dos familias según el RNA pequeño (snoRNA) que contengan: las snoRNPs tipo C/D con actividad metiltransferasa y los snoRNPs del tipo H/ACA que actúan como pseudouridina sintasa. La participación del CB en la maduración de snoRNPs comienza con la 2'-O-ribosa-metilación y pseudouridinación de los snoRNAs, un proceso dirigido por los scaRNAs del CB (Matera y cols., 2007). Una vez modificados los snoRNAs se ensamblan molecularmente con la chaperona Nopp140. A continuación, las pre-snoRNPs que van a formar la familia C/D unen a la metiltransferasa fibrilarina, mientras que las snoRNPs H/ACA interaccionan con la pseudouridina sintasa disquerina/NAP57 (Fig. 10). Completada su maduración, las snoRNPs activas son transferidas desde el CB al nucleolo, donde cumplirán su función en el procesamiento de los pre-rRNAs. La fibrilarina metila el pre-rRNA 45S naciente y la disquerina/NAP57 cataliza la conversión de uridinas en pseudouridinas. Estas modificaciones son esenciales para el corte del pre-rRNA 45S que dará lugar a los rRNAs 18S, 28S y 5,8S previo el ensamblaje con los procesomas. El rRNA 18S unido al procesoma forma la subunidad pequeña del ribosoma y los rRNAs 28S y 5,8S, junto con el rRNA 5S, se unen al procesoma par formar la subunidad grande del ribosoma (Carmo-Fonseca y cols., 2000; Verheggen y cols., 2001; Boisvert y cols., 2007; Sirri y cols., 2008; Machyna y cols., 2013) (Fig. 10).

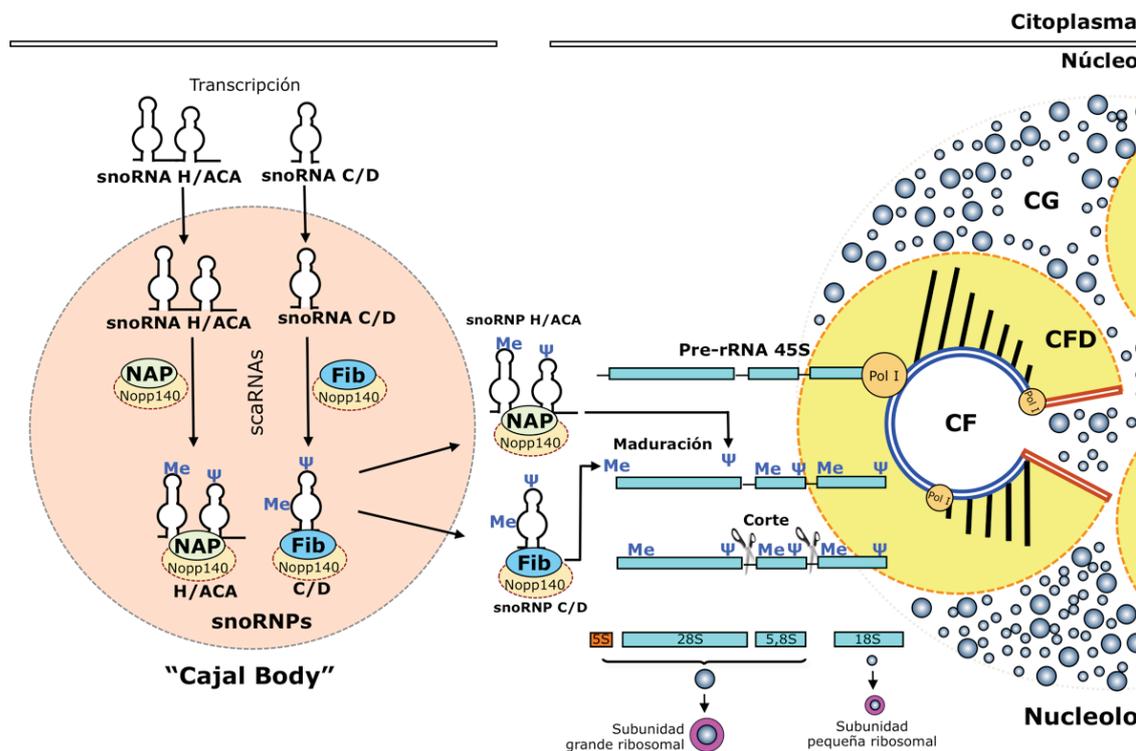


Figura 10. Etapas de la biogénesis de snoRNPs nucleolares. Tras su transcripción los snoRNAs se incorporan al CB donde se modifican por metilación y pseudouridinación y se ensamblan con los complejos Nopp140-fibrilarina y Nopp140-NAP57. Las snoRNPs activas se exportan al CFD del nucleolo donde dirigen la maduración del pre-rRNA 45S por metilación y pseudouridinación. El pre-rRNA 45S maduro es cortado en los RNAs 28S, 5,8S y 18S. Estos transcritos se unen al procesoma para formar la subunidad ribosomal grande y el 18S que junto con el procesoma pequeño formarán la subunidad ribosomal pequeña.

Las granulaciones intercromatínicas o “speckles” nucleares

Las granulaciones intercromatínicas fueron descritas inicialmente por Swift (1962) y han recibido esta denominación ya que a nivel ultraestructural están constituidas por gránulos muy electrodensos. Su patrón de expresión puede ser difuso por el nucleoplasma excluyendo el nucleolo, o formando agregados de granulaciones intercromatínicas (IGCs). Dado que las IGCs están enriquecidas en factores de “splicing” y en RNAs poliadenilados, en la actualidad a dichas áreas de IGCs se denominan áreas de factores para el “splicing” o sencillamente “speckles” nucleares. No incorporan uridina tritiada y carecen de DNA, lo que indica

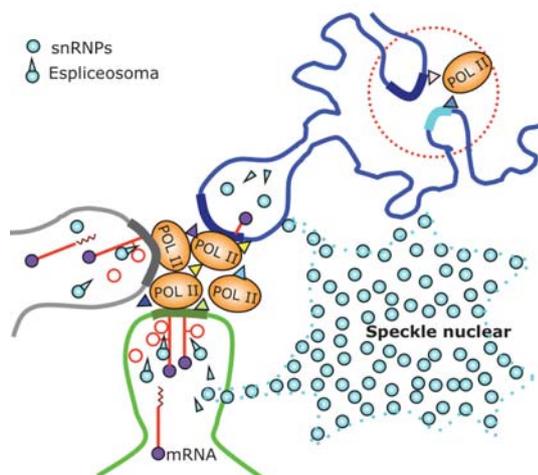


Figura 11. Los “speckles” en el proceso del “splicing” de mRNAs. Se representa un complejo transcripcional de varios genes que comparten la maquinaria de la Polimerasa II asociados a un “speckle” que aporta las snRNPs que formaran parte del espliceosoma. Los pre-mRNAs (rojo) asociados a al DNA muestran bucles de intrones que son eliminados por los espliceosomas para madurar a mRNA traduccionalmente correctos (rojo).

claramente que no son sitios de transcripción activa (Spector, 1993; Mintz y cols., 1999). Sin embargo, el hecho de que asocien en la periferia muchos focos activos de transcripción ha servido para proponerlos como depósitos moleculares dinámicos que suministran factores de “splicing” a los genes asociados activos transcripcionalmente (Misteli y Spector, 1997; Pena y cols., 2001; Casafont y cols., 2006). El tamaño de los “speckles” está inversamente relacionado con la actividad transcripcional. Este hecho fue confirmado en nuestro laboratorio, utilizando como modelo experimental los tres tipos neuronales sensitivos del GT, grandes, medianas y pequeñas, con decreciente actividad metabólica. Así, inmunodetectando el complejo Sm espliceosomal, se comprobó que las

neuronas pequeñas, con poca actividad transcripcional, reclutan los factores de splicing preferentemente en “speckles” grandes y abundantes. Inversamente, en las neuronas de tipo A las granulaciones intercromatínicas adoptan un patrón difuso y sus “speckles” son pequeños y poco numerosos (Pena y cols., 2001). Esta dinámica de los “speckles” también ha sido demostrada en mioblastos humanos controles y de pacientes afectados por la OPMD (“Oculopharyngeal Muscular Dystrophy”); en este caso, inmunodetectando la proteína PABPN1 (“Poly(A)-Binding Nuclear Protein 1”) silvestre y expandida ubicua en los “speckles”. Este estudio corroboró que en los mioblastos de la OPMD, con déficit transcripcional, la PABPN1 formaba “speckles” de gran tamaño (Bengoechea y cols., 2012). Con frecuencia los “speckles” aparecen asociados físicamente a los CBs, por lo que se ha propuesto que esta relación íntima puede facilitar el intercambio molecular entre ambas organelas (Lafarga y cols., 1998).

La envoltura nuclear y el microambiente perinuclear

El núcleo celular es una organela muy compleja con funciones tan esenciales como la estabilidad genómica, la replicación del DNA y la expresión génica. Para cumplir estas funciones biológicas las células eucarióticas separan las actividades nucleares y citoplasmáticas organizando la envoltura nuclear (EN). La microscopía electrónica reveló que la EN comprende tres estructuras fundamentales: (i) dos endomembranas concéntricas, la externa (MNE) y la interna (MNI), relacionadas con el citoplasma y el nucleoplasma respectivamente, y separadas por el espacio intermembranoso o perinuclear; (ii) los complejos del poro (CNP) o poros nucleares insertados en la doble membrana, los cuales median en el intercambio de componentes; y (iii) el nucleoesqueleto de la lámina nuclear que está íntimamente asociado con la MNI y proporciona estabilidad mecánica al núcleo. La MNE asocia ribosomas y está directamente vinculada citológica y funcionalmente con el RE granular (RER) (Fig. 12).

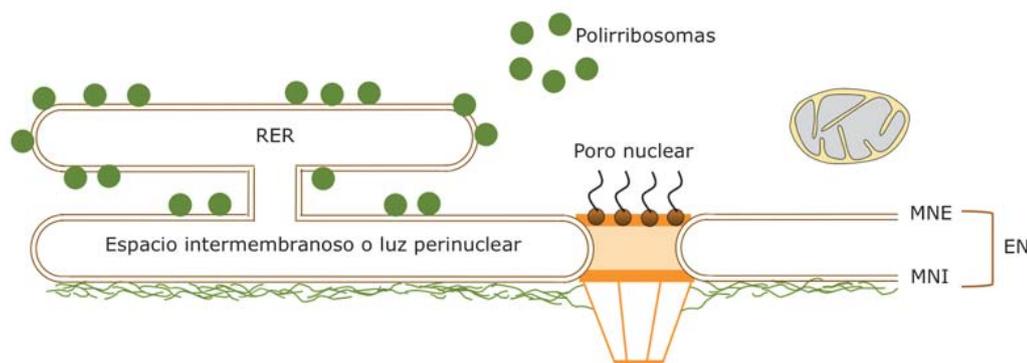


Figura 12. Organización de los componentes esenciales de la envoltura y de la lámina nuclear. La membrana nuclear externa (MNE) se continúa con el RE que asocia ribosomas (RER). La membrana nuclear interna (MNI) asocia la lámina nuclear que se interrumpe a nivel de los poros nucleares, si bien interactúa en la superficie del poro. Ambas membranas, MNE y MNI, se fusionan a nivel del complejo del poro y dejan entre ellas espacio intermembranoso o luz perinuclear.

Históricamente se consideró que la envoltura nuclear era poco más que una barrera física destinada a aislar a los cromosomas interfásicos del citoplasma. Posteriormente, la identificación ultraestructural de los poros nucleares permitió saber que existía una comunicación nucleocitoplasmática (Callan y Tomlin, 1950). Ahora, con una visión más moderna basada en datos combinados obtenidos con métodos de biología celular, genéticos, bioquímicos y de proteómica, sabemos que los poros nucleares son estructuras con un flujo molecular muy dinámico y que tanto la MNE como la MNI expresan proteínas transmembrana con identidad y función propia. Por ejemplo, la MNE expresa proteínas no compartidas con el RE asociado y la MNI (aunque unida a nivel de los poros a la MNE) tiene su propia composición, integrando un grupo de proteínas que la polarizan eficientemente hacia la cara nuclear (Chow y cols., 2012).

Recientemente se ha demostrado que la interacción de determinadas proteínas transmembrana de la EN con su respectivo entorno, es clave para determinar la expresión fenotípica celular. Así, el dominio citosólico de las proteínas transmembrana Nesprinas se ensambla el citoesqueleto perinuclear de filamentos finos de actina e intermedios a la MNE (Fig. 13). Los microtúbulos centrosomáticos también se asocian a la MNE pero no se conoce la identidad de la proteína de anclaje en las células eucariotas superiores (de las Heras y cols., 2013). Por su parte, en la MNI el dominio nuclear de la proteína transmembrana SUN interacciona con el nucleoesqueleto y ambas (Nesprina-SUN) establecen un nexo transluminal que enlaza a los compartimentos perinucleares, citoplasmático y nuclear (Fig. 13). Por otra parte, la lámina nuclear subyacente a la MNI tiene gran relevancia en la organización nuclear. Está constituida por una red de filamentos intermedios denominados láminas, incluyendo los tipos, A, C, B1 y B2. Las láminas forman parte del nucleoesqueleto pero a nivel de la EN se organizan en una densa red, la lámina nuclear, acoplada a la MNI mediante su interacción molecular con los dominios nucleoplasmáticos de las proteínas MAN1, LBR, Emerina, Nesprina y SUN (Fig. 13). Dichas proteínas transmembrana de la MNI además de unir la lámina nuclear a la EN, sirven para el anclaje directo e indirecto de la cromatina periférica. Así, SUN y Nesprina exhiben dominios de interacción directa con el DNA, mientras que MAN1, LBR, Emerina requieren su interacción con las proteínas responsables de la heterocromatinización BAF y HP1 para asociar la heterocromatina a la EN (Fig. 13). Funcionalmente, la lámina nuclear es tan importante que mutaciones puntales en algún componente (laminopatías) conllevan devastadoras consecuencias clínicas con enfermedades muy severas incluyendo, cardiomiopatías, lipodistrofias o progeria (Dauer y Worman, 2009; Chow y cols., 2012; de las Heras y cols., 2013) (Fig. 13).

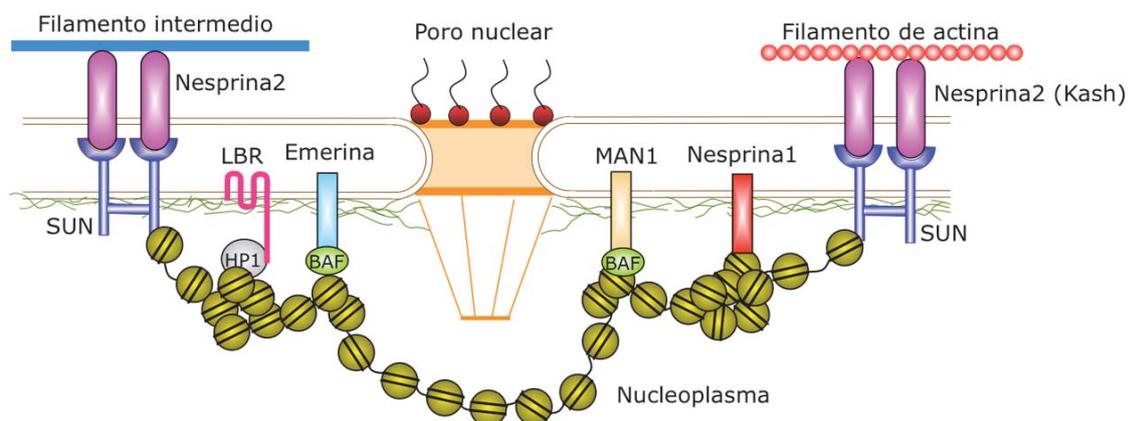


Figura 13. Relación de la EN con el entorno citoplasmático y nuclear. En la MNE la proteína Nesprina ancla a los filamentos finos e intermedios mientras que la proteína SUN (MNI) fija el nucleoesqueleto de la lámina nuclear. Las MNE y la MNI quedan acopladas intraluminalmente por la interacción de ambas proteínas. La lámina nuclear (filamentos verdes) permanece asociada a la MNI por interacción con SUN, LBR, Emerina, Nesprina y MAN1. La interacción de porción nucleoplasmática de estas proteínas con BAF y HP1 sirve de andamiaje para el anclaje la heterocromatina periférica.

Los poros nucleares o complejos del poro (CNP) son canales acuosos que atraviesan la EN y conectan el núcleo con el citoplasma. Pueden considerarse como puertas para un transporte bidireccional altamente selectivo de un elevado número de moléculas (Wente y Rout, 2010). A nivel de los CNP, las membranas de la EN se continúan dejando un ojal para su implantación. Con el microscopio electrónico se observan como estructuras cilíndricas huecas, de un tamaño de 100-150nm en el eje mayor y 50-70nm en el eje menor. Muestran una simetría octagonal muy rigurosa en la que se diferencian un núcleo central (anillo central del poro) flanqueado por ocho filamentos polarizados hacia el citoplasma y hacia el nucleoplasma. Los CNP están constituidos molecularmente por al menos 30 proteínas diferentes denominadas nucleoporinas (Nups). Las proteínas Nups están evolutivamente muy conservadas y, mayoritariamente, forman subcomplejos estructurales específicos de cada parte del poro. De hecho, en la estructura molecular del poro nuclear participan más de 400 polipéptidos de Nups. En el anillo central, los subcomplejos de Nups forman ocho columnas dispuestas perpendicularmente al eje de la EN. Cada una asocia un componente adluminal de anclaje a la EN y otro que se proyecta a la luz reduciendo el espacio útil de transporte a unos 50nm. Este núcleo central está flanqueado por dos anillos, uno externo y otro interno, de los que emergen los componentes filamentosos del CNP. Los ocho filamentos citoplasmáticos del CNP discurren paralelos y perpendiculares a la EN y los nucleoplasmáticos adoptan la típica morfología en cesto, convergiendo en un anillo nuclear (Fig. 14).

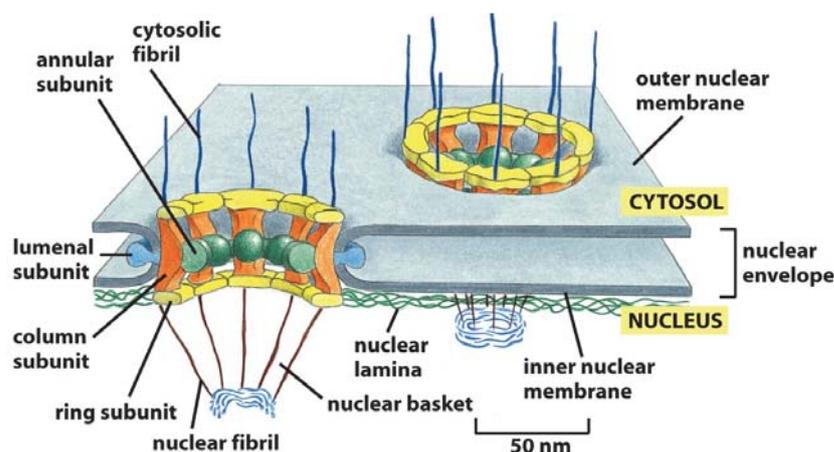


Figura 14. Complejo nuclear del poro (CNP) tomado de Alberts y cols., 2008.

Una peculiaridad común es que todas las Nups tienen múltiples sitios de interacción molecular destinados, en unos casos, a favorecer la propia organización estructural y en otros, a seleccionar el tráfico bidireccional núcleo-citoplasmático. En este sentido tienen particular relevancia las Nups enriquecidas en fenilalanina y glicina (FG). Una parte de estas nucleoporinas se organizan alrededor del corazón del poro creando un canal hidrofóbico y,

otras Nups FG se asocian a los filamentos nucleocitoplásmaticos del CNP (Fig. 15). Las Nups FG se consideran una barrera selectiva para el paso de macrocomplejos, pero a su vez

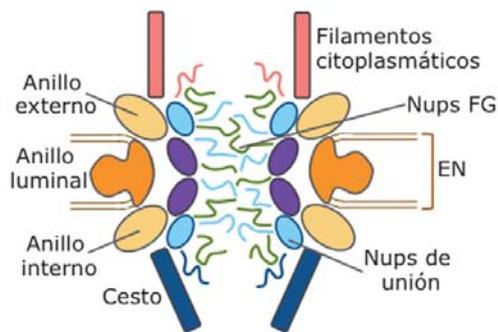


Figura 15. Complejo nuclear del poro (CNP). En el esquema se representa la organización estructural de las Nups en el CNP. Nótese cómo las Nups FG se asocian al tubo central y se proyectan al citoplasma y al nucleoplasma donde se asocian a los filamentos del CNP.

favorecen el paso de pequeñas moléculas (agua y nucleótidos) y péptidos hidrofóbicos (Lim y cols., 2006). A los complejos de Nups se asocian numerosas proteínas de interacción que contribuyen a seleccionar el tráfico. Aunque teóricamente el CNP no ofrece resistencia al paso de moléculas solubles menores de 40nm de diámetro, la importación de péptidos, aunque sean pequeños, requiere secuencias de señalización nuclear (NLS). En otros casos, independientemente del tamaño, la carga se une a transportadores solubles denominados

carioferinas (importinas, exportinas o transportinas). En este caso, el tráfico puede ser por reconocimiento directo por Nups específicas o mediante moduladores, por ejemplo, las RanGDP y RanGTP asociadas respectivamente a los filamentos citoplasmáticos o nucleares. Por estos sistemas se produce el paso de macrocomplejos como son familias de RNPs incluyendo snRNPs, mRNPs, tRNAs o las partículas ribosomales (para más información ver Alber y cols., 2007a y b; Wentz y Rout, 2010; Raices y D'Angelo, 2012).

Aunque la función principal del complejo del poro es controlar el intercambio molecular nucleocitoplasmático, estas estructuras y sus componentes tienen otras funciones implicadas en el mantenimiento de la integridad genómica independientes del transporte molecular (Raices y D'Angelo., 2012). En las células proliferantes los poros son fundamentales en la replicación del DNA, el mantenimiento telomérico, la segregación de los cromosomas y la respuesta al daño por recombinación homóloga (HR) (Bukata y cols., 2013). Pero en las células interfásicas los CPNs también tienen un importante papel en la organización interna del microambiente perinuclear (Fig. 16). Así, los anclajes de las Nups del anillo central a la lámina nuclear estabilizan la EN. Además, como ya hemos comentado al describir el dominio cromosómico, determinados genes inducibles, portadores de secuencias específicas de asociación a las Nups del cesto, pueden activarse transcripcionalmente cuando se produce su interacción con el CNP. Puesto que cuando cesa la transcripción, estos genes mantienen durante un tiempo "memoria transcripcional", quedan "preparados" para su rápida reactivación si han sido recientemente expresados (Ahmed y cols., 2010; Raices y D'Angelo, 2012). La unión de estos genes inducibles con el poro retiene factores implicados en la transcripción (factorías transcripcionales), en la modificación co-transcripcional y en la exportación (revisado de Wentz y Rout, 2010) (Fig. 16).

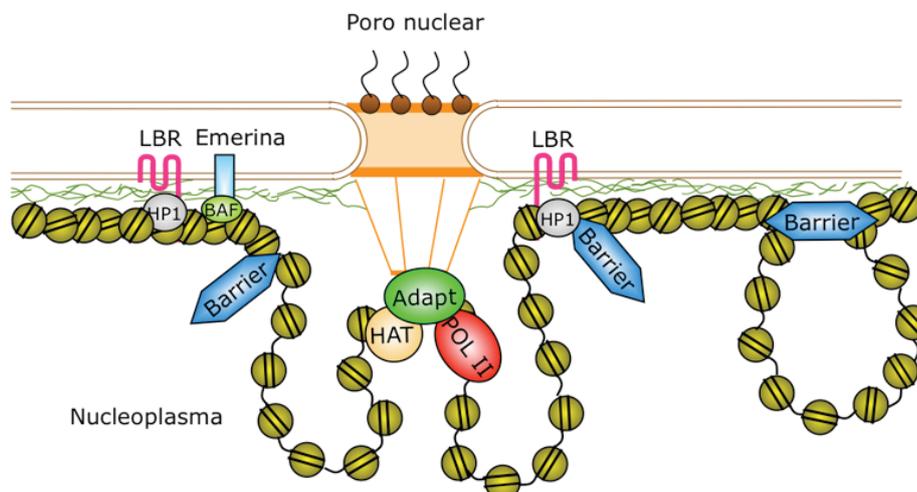


Figura 16. El poro nuclear como regulador de la transcripción de la eucromatina periférica. Las Nups del anillo nuclear del CNP sirven como base estructural para anclar bucles de genes transcripcionalmente activos junto con la maquinaria de transcripción (RNA Polimerasa II (Pol II), Adaptador y histona acetiltransferasa HAT). Por otra parte la heterocromatina se asocia a la lámina nuclear.

El número de CNPs es muy variable y dependiente del tipo celular. Estudios de nuestro laboratorio demostraron que en las neuronas su número por unidad de superficie está directamente relacionada con la actividad transcripcional. Por ejemplo, las neuronas de Purkinje del cerebelo con gran actividad transcripcional tienen 22 poros/ μm^2 mientras que, en el mismo centro nervioso, las estrelladas o las "basquets" no superan 6 poros/ μm^2 (García-Segura y cols., 1989). Aunque no hay datos cuantitativos acerca de la densidad de CNPs en las neuronas sensitivas de tipo A, a partir de nuestras propias observaciones (Pena y cols., 2001), estas neuronas exhiben una tasa transcripcional alta y gran eucromatinización periférica, lo que indicaría que la densidad de poros debe de ser muy elevada.

En su conjunto, debemos asumir que la correcta integración de la EN con su entorno es fundamental para garantizar la morfología nuclear, su polaridad y para regular la expresión génica específica de cada tipo celular. Razón por la que acuñamos el término de microambiente perinuclear, que integra a la EN y el entorno que la rodea (revisado de Schirmer y Foisner, 2007; Wentz y Rout 2010). De hecho la lista de cuadros patológicos relacionados con mutaciones o deleciones en cualquiera de las proteínas implicadas en el mantenimiento del microambiente perinuclear está en permanente crecimiento en la actualidad (ver de las Heras y cols., 2013).

1.2.2 El citoplasma

El citoplasma que circunda al núcleo de las células eucariotas consiste en el citosol y las organelas citoplasmáticas suspendidas en él. La composición del citoplasma depende del fenotipo celular para el cual ha sido seleccionado genéticamente. En el caso de las células

destinadas a producir proteínas para la exportación, con predominancia de endomembranas y de proteínas de uso intracelular, las organelas predominantes son el RER y polisomas (polirribosomas), dictiosomas de Golgi y mitocondrias. En el caso particular de las neuronas de proyección y sensitivas, la maquinaria de síntesis de proteínas se organiza estructuralmente formando ordenaciones paralelas denominadas grumos de Nissl.

Como se ha comentado anteriormente, las neuronas de tipo A del GT requieren, para garantizar su morfología y actividad bioeléctrica propioceptiva, una importante tasa de síntesis de proteínas específicas. Razón por la exhiben numerosos grumos de Nissl distribuidos por todo el citoplasma. Dado que la mayor parte de las proteínas son proteínas modificadas destinadas a la exportación o a integrarse en el sistema intracelular de endomembranas, los grumos de Nissl son muy prominentes y asocian dictiosomas de Golgi. Los dictiosomas están constituidos por numerosas unidades bien ordenadas que en su mayor parte exhiben la cara *cis* (formadora), orientada hacia el RER, y la cara *trans* (madurativa) hacia el núcleo neuronal, de la que emanan numerosas vesículas. La presencia de numerosas mitocondrias organizadas entre los grumos de Nissl está justificada ya que los procesos de traducción y modificación post-traslacional son energéticamente dependientes (Pena y cols., 2001). Otra organela citoplasmática importante en las neuronas sensitivas son los lisosomas, imprescindibles para regular la homeostasis de proteínas grandes y de las endomembranas que están en permanente renovación celular. Como complemento en la homeostasis de proteínas las neuronas de tipo A expresan ubicuamente y de modo importante componentes de la vía ubiquitina-proteasoma (VUP) (Pena y cols., 2001; Casafont y cols., 2006).

Un componente esencial de las neuronas sensitivas es el citoesqueleto, representado por los microtúbulos, organizados en el área centrosomática perinuclear y responsables del tráfico molecular rápido en las neuritas y por filamentos intermedios (neurofilamentos) que entre otras funciones, garantizan la morfología y polarización somática y nuclear.

1.3 MECANISMOS DE RESPUESTA Y REPARACIÓN DEL DNA

En las células somáticas se produce permanentemente daño en el DNA debido a la producción celular endógena de agentes genotóxicos, como son las especies reactivas de oxígeno ("Reactive Oxygen Species", ROS) propias del metabolismo fisiológico interno. En otras ocasiones el DNA se daña exógenamente por exposición a diversos de agentes como la radiación ionizante (RI) o a sustancias químicas intercalantes en el DNA (inhibidores de la topoisomerasa II o agentes radiomiméticos) (Mladenov e Iliakis, 2011; Kavanagh y cols., 2013). Pero el DNA dañado desencadena de modo automático una respuesta señalizadora y reparadora altamente específica, rápida y, por lo general, muy eficiente. Por ejemplo, la RI por rayos X emite una radiación electromagnética (formada por fotones) que genera una energía capaz de ionizar el DNA lo que conlleva rupturas que pueden alcanzar una hebra

(Single-Strand Breaks", SSBs) o fragmentar la doble cadena del DNA ("Double-Strand Breaks", DSBs). La RI también puede modificar las bases nitrogenadas por oxidación, alquilación, desaminación o pérdida de bases que producen sitios apurínicos o apirimidínicos, que a su vez dan lugar a lesiones de SSBs y DSBs. Como además, la radiación ionizante genera especies reactivas de oxígeno (ROS) produce, de forma indirecta, lesiones del DNA principalmente por la ionización del agua asociada al DNA. De hecho, más del 70% del DNA dañado se produce por la liberación de radicales libres (HO^\cdot) del H_2O ionizada (Mladenov e Iliakis, 2011; Kavanagh y cols., 2013). Controlar la inestabilidad genómica causada por la RI, o por otras entidades etiológicas, es imprescindible para no comprometer la supervivencia celular. Pero, mientras que la reparación de SSBs del DNA es fácil, ya que mantienen una hebra preservada para copiar y reparar las secuencias perdidas, la reparación de las DSB es más compleja. Se requiere una respuesta temprana al daño y una reparación específica, que pueda reponer las secuencias génicas lesionadas por recombinación homóloga ("Homologous recombination", HR). Si no hay una plantilla de DNA que permita la HR, la reparación se produce por la simple unión de extremos de DNA no homólogos ("Non Homologous End Joining", NHEJ o D-NHEJ), sin reposición de las secuencias génicas perdidas (Mladenov e Iliakis, 2011).

1.3.1 Respuesta al daño del DNA de doble cadena

De modo universal el DNA dañado en la doble cadena del DNA provoca una respuesta coordinada ("DNA damage response", DDR) y una reparación que garantiza la estabilidad genómica. De esta forma, la DDR puede considerarse como un mecanismo de defensa celular al impedir que la célula acumule daños genéticos progresivos que pueden desencadenar la desregulación del ciclo celular o la transcripción. Ambas son la causa de numerosas enfermedades como es el caso del cáncer o las enfermedades neurodegenerativas. En este contexto, tienen particular relevancia las lesiones DSBs ya que, en este caso, los focos de daño fragmentan los cromosomas y generan un desequilibrio génico que puede afectar tanto al proceso de la replicación (estrés replicativo) como al de la transcripción en el periodo Go/G1 (estrés transcripcional). Además, las DSBs, al no disponer de una hebra homóloga sana para su reparación, dependen exclusivamente de la probabilidad de encontrar una cromátida homóloga post-replicativa que permitiría la HR o de fusionar los extremos rotos mediante NHEJ. Aunque las DSBs inducen de forma muy eficiente la activación de la DDR, no es menos cierto que si no se produce correctamente la reparación, en términos de letalidad y probabilidad mutagénica, se pueden alterar irreversiblemente las secuencias génicas (Bekker-Jensen y Mailand, 2010; Kavanagh y cols., 2013).

Aunque la mayoría de los componentes implicados en la DDR se expresan ubicuamente en todas las células somáticas, su puesta en marcha no es automática, requiere que algunos de sus componentes se activen y se localicen en los focos del DNA dañado (Lisby y

Rothstein, 2009). La DDR activa una cascada molecular que incluye: (i) la señalización del DNA dañado; (ii) la transducción y amplificación de la señal del DNA dañado; y (iii) el reclutamiento de moléculas efectoras específicas que van a determinar que la reparación sea por HR o por NHEJ. El desarrollo de las distintas fases de la DDR es muy rápido (minutos) y, aunque nosotros las vamos a describir secuencialmente, muchas de ellas se solapan e incluso comparten enzimas activadores (Bekker-Jensen y Mailand, 2010) (Fig. 17).

Independientemente de la etiología que provoque DSBs en el DNA, la primera proteína que detecta el daño y activa la DDR es la quinasa nuclear ATM (“ataxia-telangiectasia mutated protein”) (Fig. 17-1). Esta quinasa se expresa endógenamente en forma dimérica inactiva pero, en presencia de DSBs, se autofosforila en la Ser1981 (pATM) lo que provoca su monomerización y activación. Un sustrato importante de la pATM es la histona H2AX, que como ya hemos comentado anteriormente, es una variante que representa del 2-25% de la histona H2A nucleosomal (Fig. 17-2). La fosforilación de la H2AX en la serina 139 del extremo C-terminal (γ H2AX) no sólo se restringe a los nucleosomas que demarcan los focos de daño en el DNA, sino que puede expandirse hasta 1Mb en ambos flancos del sitio de lesión. Esta fosforilación expansiva de la γ H2AX es muy importante porque amplifica el número de sitios de interacción de esta histona con moléculas señalizadoras que servirán para el anclaje de los factores transductores de la señal de daño en el DNA (Rokagou y cols., 1998; Fernandez-Capetillo y cols., 2004; Lowndes y Toh, 2005; Scully y Xie, 2013). Por tanto, la γ H2AX es un sitio de unión amplificado con alta afinidad para el reclutamiento de otras moléculas implicadas en la DDR, particularmente la proteína MDC1 (“Mediator of DNA Damage Checkpoint 1”) (Fig. 17-2). La MDC1 es una proteína multifuncional que estabiliza la estructura de los extremos del DNA dañado y ensambla rápidamente el complejo transductor MRN formado por las proteínas Mre11, Rad50 y Nbs1. Cada una de las proteínas del complejo MRN tiene una función propia, Mre11 posee actividad endonucleasa, Rad50 es estabilizadora y Nbs1 reclutadora. A su vez, el complejo MRN ensambla la pATM favoreciendo su disponibilidad en el foco de la lesión y, consecuentemente, la fosforilación de sus sustratos (McGowan y Russel, 2004; Lee y Paull, 2007) (Fig. 17-2). Por otra parte, la proteína MDC1 recluta la ubiquitin-ligasa RNF8 específica para la ubiquitilación de las histonas H2A y H2AX (Fig. 17-3). La ubiquitilación de la H2A (H2A-Ub) es indispensable para el reclutamiento alternativo de las proteínas efectoras, en unos casos H2A-Ub interacciona con 53BP1 (“p53 binding protein 1”), en otros recluta BRCA1 (Breast cancer 1 protein) (Fradet-Turcotte y cols., 2013). Esta capacidad alternativa de la H2A-Ub para reclutar una u otra proteína efectora de la DDR es clave para determinar el tipo de reparación de la DSB. En el caso de la unión con el complejo BRCA1, el daño se repara por HR, pero si la H2A-Ub se une a la 53BP1, la reparación se realiza mediante la fusión de los extremos no homólogos del DNA (Aly y Ganesan, 2011).

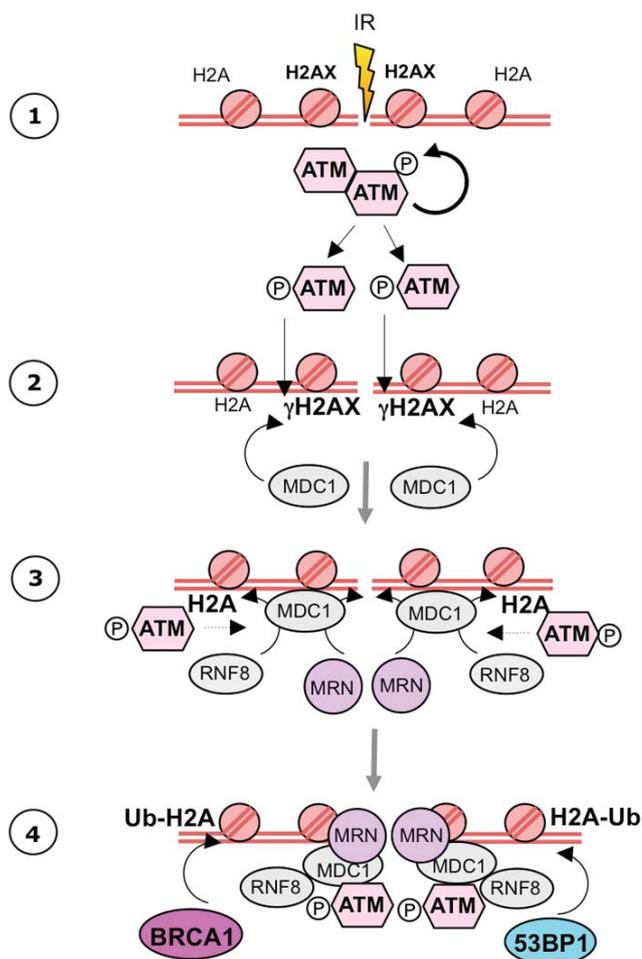


Figura 17. Respuesta al daño en el DNA (DDR). El daño por RI (1) da lugar a una DSB que dispara la activación de la ATM (2). ATM fosforila la histona H2AX, creando un sitio de unión para MDC1 (2). El complejo ATM-MRN (3) se asocia con MDC1, lo que favorece la propagación de γ H2AX a lo largo de la cromatina. MDC1 recluta la ubiquitin-ligasa RNF8 (4). La ubiquitinilación de la histona H2A induce el reclutamiento del complejo BRCA1 y proteínas reparadoras como 53BP1 (4).

1.3.2 Reparación del DNA dañado por rotura de doble cadena

Aunque el proceso de DDR es independiente del agente genotóxico que induce el daño en el DNA y de la fase del ciclo celular, el proceso reparativo de las DSBs puede producirse en la fase post-replicativa del DNA por HR o, en el periodo G1 del ciclo celular, por NHEJ (Aly y Ganesan, 2011). Por tanto, las células con capacidad proliferativa pueden reparar las DSBs por ambos mecanismos mientras que las postmitóticas sólo lo harán por NHEJ. Ambas vías de reparación comparten la señalización, transducción y reclutamiento de moléculas efectoras comentadas en la figura 17. En el caso de la reparación por HR (HRR) se produce en las fases S y G2, ya que exige la previa duplicación del DNA para que el apareamiento y sinaptogénesis de las secuencias dañadas se produzca fielmente con la cromátida homóloga indemne. Por su parte, la reparación de los fragmentos cromosómicos por NHEJ (NHEJR) es

independiente del ciclo celular y se produce en el periodo G1. Lógicamente, en las células post-mitóticas, como es el caso de las neuronas sensitivas, la reparación se realiza obligatoriamente por la vía NHEJR (Bekker-Jensen y Mailand, 2010; Kass y Jasin, 2010; Price y D'Andrea, 2013).

En el supuesto de que la reparación sea por HR, tienen que darse dos condiciones fundamentales: la síntesis de la cromátida homóloga sana y su apareamiento con la cromátida dañada, y que en la fase de DDR la H2A-Ub reclute el complejo efector BRCA1. Esta selección es necesaria porque en presencia de BRCA1 la proteína efectora 53BP1 no puede unirse a la H2A-Ub. Funcionalmente BRCA1 induce el reclutamiento de nucleasas, incluyendo la endonucleasa Mre11 (del complejo MRN) que escinde unos pocos nucleótidos de los extremos 5' del DNA dañado (Fig. 18A, puntos 1-2). Por su parte, los extremos libres 3' no escindidos reclutan la proteína RPA ("Replication Protein A") que, además de estabilizar estos extremos, reúne otras proteínas como Rad51. Esta familia de proteínas es clave para dirigir la invasión, apareamiento y sinaptogénesis del extremo 3' con la hebra homóloga replicada no dañada (Fig. 18A puntos 3-4). Esta conformación espacial permite que la DNA polimerasa acceda y replique la hebra del DNA (Fig. 18A puntos 5 y 6). Finalmente, las DNA ligasas sellan las cadenas de DNA en el sitio de la lesión (Fig. 18A puntos 7-8). En términos de restauración del genoma, la HRR es muy precisa, eficiente y, teóricamente, libre de errores. Sin embargo, por este mecanismo sólo se repara una parte de las lesiones en el DNA, lo que requiere la participación de la vía NHJRR para reparar el resto del DNA dañado (Bekker-Jensen y Mailand, 2010; Kass y Jasin, 2010; Price y D'Andrea, 2013; Panier y Boulton, 2013).

La NHEJR actúa en en la fase G1 del ciclo celular tanto en las células proliferantes como en las post-mitóticas (Fig. 18B). En este caso, H2A-Ub recluta el efector 53BP1. Esta proteína tiene dos funciones, inhibe la nucleasa Mre11 del complejo MRN, interceptando la escisión de los extremos 5', y favorece el reclutamiento del heterodímero Ku70/80. Este complejo protege de la escisión temprana de los extremos 5' del DNA por las nucleasas, a la vez que induce el reclutamiento de la DNA-PKcs en el foco de la lesión (Fig. 18B-1). La quinasa DNA-PKcs tiene, a su vez, dos funciones claves, mantener los extremos rotos del DNA próximos y reclutar las nucleasas específicas tardías, tales como Artemis, PNKP, APE1 y TDP1, que escinden los extremos 5' y 3' del DNA dañado (Fig.18B punto 2). Esta escisión es un prerrequisito para la incorporación del complejo de ligación ligasa IV/XRCC4/XLF que sella los extremos de DNA dañado por fusión. (Kass y Jasin, 2010; Mladenov y Iliakis, 2011; Panier y Boulton, 2013) (Fig. 18B, puntos 3-4). La NHEJR es muy eficiente, rápidamente restablece la inestabilidad del genoma causada por los fragmentos cromosómicos libres, pero conlleva ligeras o extensas adiciones o deleciones de nucleótidos que, irreversiblemente, alteran la fidelidad de las secuencias génicas en el DNA reparado.

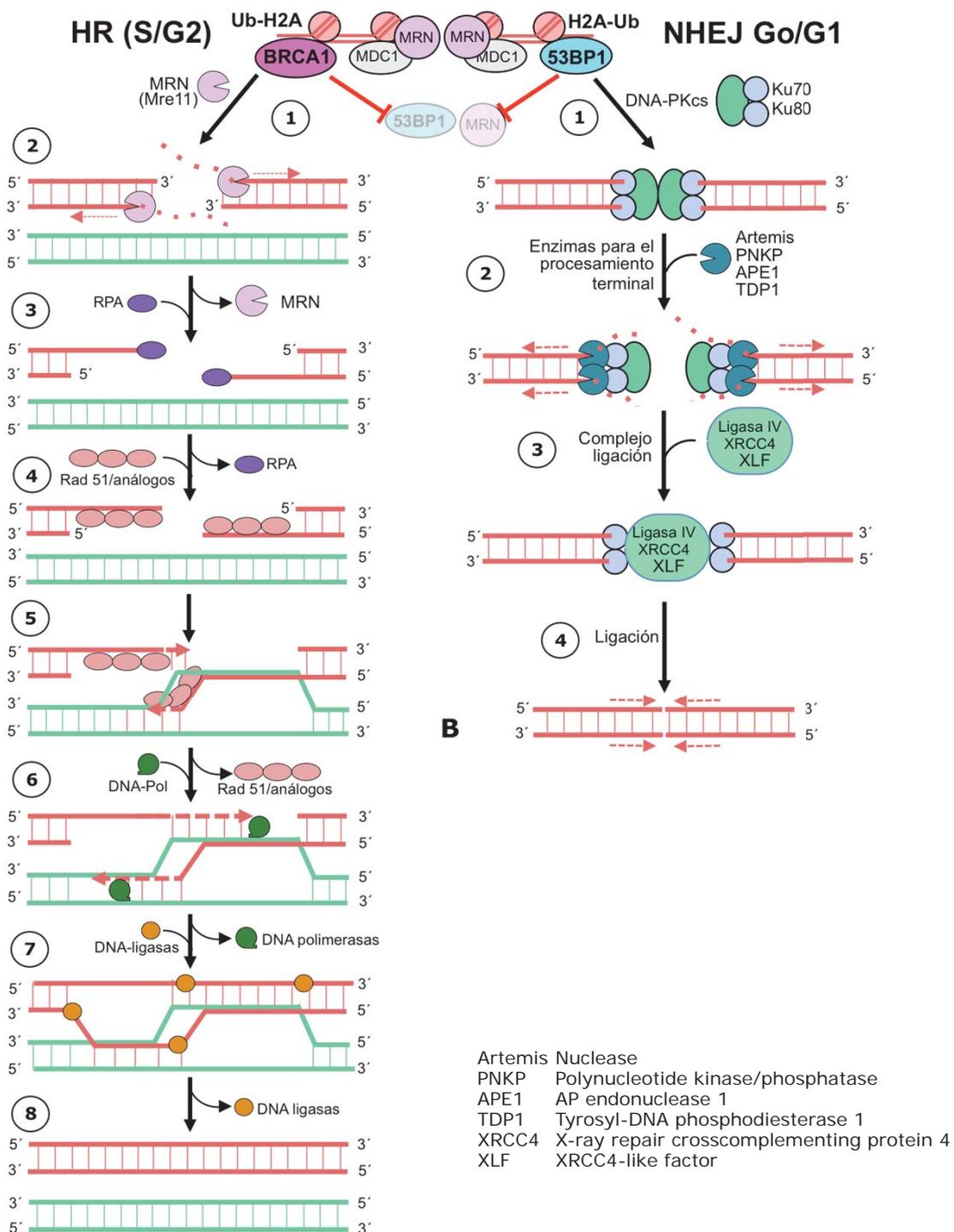


Figura 18. Mecanismos de reparación de DSBs en el DNA por HR y NHEJ. A. La reparación por HR (HRR) requiere la unión de BRCA1 a la H2A-Ub (1). Esto induce que la Mre11 escinda un determinado número de nucleótidos en los extremos 5' dejando libres los extremos 3' de la otra hebra (2). Estos son estabilizados por RPA (3). Seguidamente Rad51 dirige el entrecruzamiento y sinapsis del extremo 3' con la hebra de la cromátida homóloga sana (4 y 5). La DNA-polimerasa replica de *ново* los fragmentos del DNA dañado y escindido de ambos extremos 3' y los complejos de ligamiento los sellan (6-7). **B.** La reparación por NHEJ (NHEJR) requiere la unión de la 53BP1 a la H2A-Ub (1). Esto permite la unión de Ku70/80-DNA-PKcs a los extremos rotos del DNA (2). El reclutamiento de las enzimas Artemis, PNKP, APE1 y TDP1 escinden secuencias de nucleótidos previa a la ligación de los extremos del DNA dañado (3 y 4).

Cuando ambos tipos de reparación pueden operar cooperativamente, las células pueden alcanzar un nivel de reparación útil para garantizar la expresión fenotípica y supervivencia celular. Sin embargo, en el caso de las células post-mitóticas, particularmente las neuronas, el hecho de que la reparación sea exclusivamente por la vía NHEJ puede ser un handicap importante ya que, al ser diploides, solo tienen una probabilidad de expresión génica alternativa en el supuesto de que esa copia no esté dañada (van Gent y cols., 2001). Por esta razón las neuronas son muy vulnerables al daño del DNA acumulativo que en muchas ocasiones causan la neurodegeneración (Baltanas y cols., 2011a y b).

1.4 LA VÍA UBIQUITINA-PROTEASOMA

Una de las condiciones básicas para la supervivencia celular es el control permanente de la homeostasis de las proteínas intracelulares. Así, en condiciones fisiológicas las proteínas innecesarias, redundantes y/o malformadas son eliminadas continuamente en el núcleo y en el citoplasma celular. La homeostasis protéica, o proteostasis, se regula mediante una red funcional en la que participan los ribosomas/nucleolo, las chaperonas y dos sistemas principales proteolíticos: el lisosomal y la vía ubiquitina-proteasoma (VUP). En las células eucariotas superiores dicha red es capaz de mantener la proteostasis incluso en situaciones de estrés metabólico, incluyendo el estrés oxidativo y el estrés xenobiótico, durante la diferenciación celular, y en respuesta a variaciones en el aporte de nutrientes o a cambios térmicos. De hecho, los componentes del sistema regulador de la proteostasis están coordinados funcionalmente entre sí, por lo que si alguno fracasa el resto compensa esa disfunción evitando el colapso proteico (Schmidt y Finley, 2013). En referencia a la proteólisis proteasomal se considera a la VUP como un complejo proteolítico porque la máxima eficiencia de proteólisis se consigue cuando los sustratos están modificados específicamente por cadenas de ubiquitinas (poliubiquitilación). La VUP es el principal sistema proteolítico extralisosomal que actúa en el citoplasma y el núcleo de las células somáticas. Su función es muy importante ya que degrada entorno al 80-90% de las proteínas intracelulares. Son sustratos preferentes de esta vía las proteínas solubles de vida media corta, tanto normales como dañadas.

Con respecto a la ubiquitilación, debemos de señalar que es una modificación post-traducciona que consiste en la unión covalente de un residuo de lisina (K) del sustrato con la glicina 76 del extremo C-terminal de la ubiquitina (GG₇₆-C-terminal). La ubiquitina es una proteína ubicua en el núcleo y el citoplasma de todas las células somáticas, muy conservada evolutivamente y de pequeño tamaño (76 aminoácidos, ~8,5KDa). Adopta una organización estructural terciaria que le permite exponer las 7 lisinas implicadas en su propia ubiquitilación (homooligomerización). La ubiquitilación de las proteínas es una modificación muy importante, no sólo para dirigir el sustrato al proteasoma para su degradación, sino también porque cambia sus funciones biológicas contribuyendo a la diversidad funcional del

proteoma (Komander, 2009; Hou y Yang, 2012). En referencia a la ubiquitilación del sustrato, debemos señalar que es muy específica ya que está estrictamente regulada por la cascada enzimática de ubiquitilación, aunque teóricamente, la Ub podría unirse a cualquier K del sustrato. En esta cascada participan consecutivamente tres enzimas, la E1 (activadora), la E2 (conjugadora) y la E3 (ligadora específica del sustrato). En condiciones basales la Ub se expresa constitutivamente en una forma inactiva. Pero se activa de manera energético-dependiente por su unión a la enzima activadora E1. Esta unión dispara la transferencia de la Ub a la conjugasa E2 que, a su vez, recluta la ligasa E3 para formar un enlace covalente entre la GG₇₆-C-terminal de la Ub y una K de la proteína diana (Fig. 19). El proceso de ubiquitilación es reversible y altamente selectivo porque, aunque el número de enzimas E1 es muy reducido (2), las conjugasas conocidas superan las 30 y se conocen cientos de ligasas específicas de ubiquitilación (<600) (Hershko y Ciechanover, 1998; Kravtsova-Ivantsiv y cols., 2013).

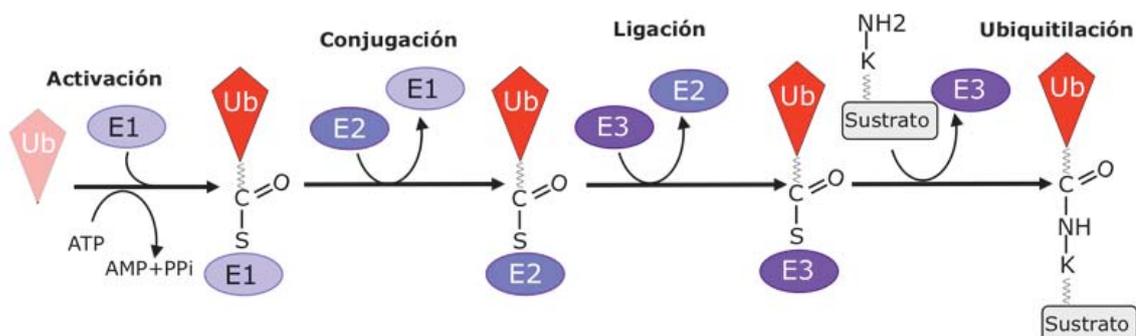


Figura 19. Cascada enzimática de la ubiquitilación (Ub). La participación consecutiva de la activación de la Ub por E1 y su unión con la conjugasa (E2) y la ligasa (E3) permiten que se establezca el enlace covalente entre la G₇₆ de la Ub y la K del sustrato.

Otro aspecto importante de la ubiquitilación es el número de Ub unidas al sustrato, monoubiquitilación, multiubiquitilación o poliubiquitilación, ya que afecta al destino y a la función biológica de las proteínas (Komander, 2009; Hou y Yang, 2013). Como ya hemos comentado, la monoubiquitilación de determinadas histonas como la H2A es fundamental en el proceso de la DDR y, consecuentemente, en la reparación del daño del DNA por las vías de HR y NHEJ. Por su parte, la monoubiquitilación múltiple (multiubiquitilación) es muy importante en la endocitosis y la poliubiquitilación es enormemente multifuncional. En este último caso, las Ub forman cadenas de homo-oligómeros de Ub unidas entre sí por enlaces covalentes. La unión se establece entre una de las siete K de la Ub y la GG₇₆-C-terminal de la siguiente ubiquitina. Sirva como ejemplo la poliubiquitilación para la proteólisis proteasomal de un sustrato, en la que se utiliza la K48 como enlace para formar la cadena de poliubiquitinas (Dammer y cols., 2011).

Respecto al proteasoma, como la ubiquitina, se localiza en el citoplasma y en el núcleo. Existen diversas formas de proteasoma denominadas según la velocidad de sedimentación pero, en relación con la proteólisis, el más común es el proteasoma 26S. Se

trata de un complejo multiprotéico de gran tamaño organizado en una unidad central catalítica, el proteasoma 20S, y una o dos unidades periféricas reguladoras 19S. El proteasoma 20S tiene forma de barril hueco constituido por 4 anillos, dos anillos periféricos α y dos anillos centrales β , cada uno de los cuales está formado por siete subunidades protéicas. Los anillos β forman la verdadera cámara proteolítica y sus subunidades β_1 , β_2 y β_5 tienen actividad proteolítica específica. Así, la subunidad β_1 , con actividad caspasa-like, cataliza aminoácidos ácidos, la subunidad β_2 tiene actividad de tripsina (hidroliza aminoácidos básicos) y la subunidad β_5 es quimiotripsina-like, con particular preferencia por la hidrólisis de aminoácidos hidrofóbicos. Los anillos α carecen de actividad proteolítica y están constituidos por siete subunidades que flanquean a la cámara catalítica. Estos anillos α son muy importantes en la organización del 20S y en la regulación de la entrada de los sustratos. De hecho, la entrada a la cámara catalítica 20S permanece cerrada ya que los extremos N-terminales de las siete subunidades α se proyectan hacia la cavidad central del 20S obturándola. Por su parte, las subunidades reguladoras 19S son caperuzas flexibles unidas a uno o a ambos extremos del proteasoma 20S. Cada unidad está compuesta por 20 subunidades que forman un complejo multifuncional estructuralmente constituido por una base y una tapadera. Funcionalmente, la tapadera es muy importante, reconoce sustratos poliubiquitilados, potencia su desubiquitilación y linealiza las proteínas diana, todos ellos prerrequisitos necesarios para su entrada y proteólisis en el proteasoma 20S. Por su parte, en la base se organizan proteínas con actividad ATPasa que generan la energía necesaria para catalizar funciones energético-dependientes, tales como la linealización del sustrato desubiquitilado, la apertura de los anillos α y el paso del sustrato a la cámara proteolítica (Hershko y Ciechanover, 1998; Kravtsova-Ivantsiv y cols., 2013) (Fig. 20).

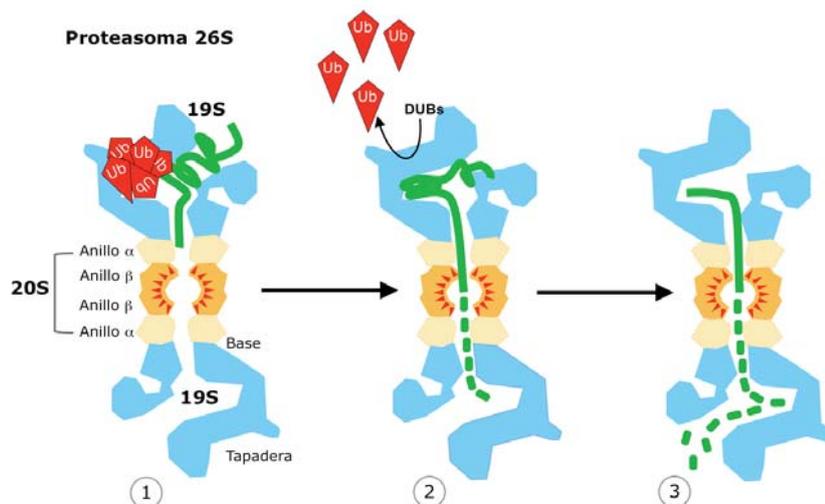


Figura 20. Proteólisis por el proteasoma 26S. (1) El proteasoma 26S está constituido por la unidad central catalítica 20S y las subunidades reguladoras 19S. En la unidad reguladora 19S se distinguen la base y la tapadera. En esta subunidad se reconoce el sustrato poliubiquitilado. El proteasoma 20S está formado por dos anillos β catalíticos flanqueados por dos anillos alfa que interaccionan con la base de la subunidad reguladora. (2) Se representa la desubiquitilación y el desplegamiento del sustrato así como su la entrada a la cámara catalítica. (3) Ilustra una fase más avanzada del proceso proteolítico.

Aunque la ubiquitilación de los sustratos juega un papel crucial en el “turnover” de las proteínas para controlar con exactitud su degradación, en la actualidad se sabe que hay dianas del proteasoma que pueden ser degradadas por el proteasoma sin ser ubiquitilados previamente, entre las que se incluye la ornitina decarboxilasa, p21, I κ B- β , la proteína del retinoblastoma (pRb) y el factor inducible por hipoxia (Hoyt y cols., 2004).

La actividad proteolítica del proteasoma es autorregulable y se adapta en cada momento a las necesidades de la proteostasis celular. Este hecho fue validado en nuestro laboratorio al descubrir que cuando las células exigen mayor demanda del proteasoma 26S, éste es capaz de formar macrofactorías proteolíticas nucleares denominadas clastosomas (Lafarga y cols., 2002). Los clastosomas son cuerpos nucleares que reclutan miles de unidades de proteasomas. Aunque son escasos en los núcleos de las células normales, su formación se induce cuando se estimula la actividad del proteasoma y desaparecen cuando las células son tratadas con inhibidores del proteasoma, indicando que el reclutamiento de proteasomas en los clastosomas es muy dinámico. Entre los sustratos que se degradan en los clastosomas destacan factores de transcripción de vida media muy corta como c-Fos y c-Jun, la proteína adenoviral E1A, la proteína PML y la subunidad β 1 de la GC_{NO} (Lafarga y cols., 2002; Baltrons y cols., 2008; Misteli y Spector, 2011).

Aunque la VUP tiene un papel esencial en la proteostasis y en el funcionamiento normal de la célula, también juega un papel importante en la enfermedad participando en la degradación de proteínas mutadas y mal plegadas. Igualmente, interviene en otros procesos celulares como la diferenciación y la proliferación celular, la transducción de señales y la apoptosis. De hecho, la eficiencia del proteasoma es clave en la evolución de muchas enfermedades neuromusculares humanas causadas por depósito de proteínas mutadas en determinados tipos neuronales o en las fibras musculares estriadas esqueléticas. Por lo tanto, el déficit funcional del proteasoma puede considerarse como un mecanismo etiopatogénico de la agregación tóxica de proteínas y, en algunos casos, de la degeneración celular (Rubinsztein, 2006; Casafont y cols., 2006; Tavanez y cols, 2009; Bengoechea y cols., 2012). Otro aspecto importante del proteasoma es su contribución funcional en el cáncer, dado que puede contribuir muy eficientemente en la evolución de la enfermedad estabilizando o degradando las proteínas oncogénicas (Ciechanover y cols., 1998). Se da la circunstancia de que muchas proteínas diana del proteasoma están implicadas en la tumorigénesis, incluyendo los factores supresores tumorales p53 y pRB, la proteína proapoptótica Bax, p27 y el inhibidor de NF- κ B (I κ B- α) (Jia y Liu., 2013). Estos hallazgos han proporcionado los primeros indicios de la posible implicación del proteasoma en el desarrollo de tumores. De hecho, numerosos estudios experimentales han demostrado que la actividad del proteasoma está incrementada en tumores malignos, incluyendo los de colon, próstata y

en la leucemia (Chen y cols., 2011). La hiperactividad del proteasoma conlleva en unos casos el incremento de factores tumorigénicos, como es NF- κ B, y en otros la disminución de factores pro-apoptóticos como NOXA o Bax (McConkey y Zhu, 2008; Jia y Liu, 2013). Estos hallazgos dieron pistas muy interesantes acerca del uso de inhibidores del proteasoma como potenciales agentes en la terapia del cancer. En este contexto, numerosos estudios se han dirigido a descubrir nuevas drogas anticancerosas que actúan inhibiendo al proteasoma (Adams, 2004; Landis-Piowar y cols., 2006).

Para utilizar inhibidores del proteasoma con propósitos clínicos es necesario que la inhibición sea potente, específica y reversible, de tal forma que la función del proteasoma se restablezca cuando termine el tratamiento. Considerando estas premisas, y que las células tumorales son significativamente más sensibles a la inhibición del proteasoma que las normales (Landis-Piowar y cols., 2006; McConkey y Zhu, 2008), las drogas con mayor potencial clínico son los ácidos borónicos dipeptidilos. Estos compuestos inhiben reversiblemente el proteasoma, de manera similar a los de los péptidos aldehídos, pero son cien veces mas potentes y sumamente selectivos para el proteasoma. Además, su unión y

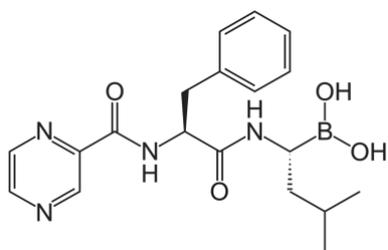


Figura 21. Estructura química del bortezomib.

disociación lentas con el proteasoma les confieren una inhibición estable y eficiente (Richardson y cols., 2006; Jia y Liu, 2013). De particular interés es el Bortezomib (Btz) (previamente conocido como PS-341), un ácido borónico dipeptidilo de bajo peso molecular y soluble en agua, extremadamente potente y selectivo, que se une al proteasoma 26S y lo inhibe de manera estable pero reversible. Además

no tiene actividad conocida contra otras proteasas intracelulares (Richardson y cols., 2006). Esta droga fue el primer inhibidor del proteasoma aprobado por la FDA ("Food and Drug Administration"). El Btz puede unirse y formar complejos con el grupo hidroxilo de la treonina de la subunidad proteolítica β 5 del proteasoma 20S, lo que bloquea su actividad como quimotripsina-like e induce la muerte celular (Chen y cols., 2011). Uno de los mecanismos mas importantes del Btz relacionado con su actividad anti-cancerígena es la regulación al alza de NOXA, un factor pro-apoptótico que interacciona con la familia de las proteínas Bcl-2. Otra importante acción del Btz es la supresión de la vía de señalización del factor de transcripción NF- κ B, lo que conduce a la inhibición transcripcional de sus genes diana anti-apoptóticos (Adams, 2004; Chen y cols., 2011). Esta capacidad funcional del Btz hace sea muy eficiente en el tratamiento del mieloma múltiple y del linfoma de las células del manto, pero también conlleva otros efectos metabólicos menos deseados que incluyen el estrés oxidativo mediante la génesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) o el incremento celular de Bax (Jia y Liu, 2013).

Aunque el Btz tiene un incuestionable beneficio clínico como droga antitumoral ya que detiene el ciclo celular en G2/M e inhibe la proliferación de las células tumorales, también puede afectar a tejidos normales proliferantes, particularmente al epitelio de la mucosa intestinal, causando en los pacientes tratados una toxicidad intestinal que cursa con diarreas persistentes que pueden limitar su utilización terapéutica. Además, el Btz también afecta a las células postmitóticas, particularmente a las neuronas del SNP pues, al carecer de barrera hematoencefálica (BHE), la droga accede fácilmente a las neuronas. Así, un efecto secundario muy devastador para los enfermos tratados con Btz es el desarrollo de una neuropatía periférica (Argyriou y cols., 2012). De hecho, estudios de nuestro laboratorio han sido pioneros en demostrar la gran vulnerabilidad de las neuronas sensitivas al Btz, lo que puede contribuir a la fisiopatología de la enfermedad neurológica (Casafont y cols., 2006).

2. Objetivos



2.1 OBJETIVOS

Los objetivos que se pretenden desarrollar en el presente proyecto de Tesis Doctoral están destinados a conocer la capacidad de respuesta de las neuronas sensitivas de tipo A de la rata al estrés genotóxico y proteotóxico inducido por radiaciones ionizantes y por la inhibición del proteasoma, respectivamente. Los objetivos concretos son los siguientes:

2.1.1 Respuesta de las neuronas sensitivas al daño en el DNA inducido por radiaciones ionizantes

1. Definir la organización espaciotemporal y dinámica funcional de los focos de daño del DNA.
2. Investigar si en la reparación del DNA está implicada la vía p53/p21.
3. Correlacionar la evolución temporal de los focos de daño en el DNA con la actividad transcripcional extranucleolar.
4. Abordar los cambios estructurales y epigenéticos en la cromatina inducidos por el DNA dañado.

2.1.2 Respuesta de las neuronas sensitivas al estrés inducido por la inhibición del proteasoma con el fármaco antitumoral bortezomib

1. Estudiar el efecto de la inhibición del proteasoma sobre la organización nuclear (posición, forma y polaridad del núcleo celular) y sobre la maquinaria de síntesis de proteínas (la sustancia de Nissl).
2. Conocer si el bortezomib induce lesiones en el DNA.
3. Investigar la puesta en marcha de posibles mecanismos de neuroprotección en respuesta al estrés proteotóxico inducido por la inhibición del proteasoma y establecer el posible papel neuroprotector del microambiente perinuclear.

2.1.3 Papel funcional del nucleolo y del cuerpo nuclear de Cajal en respuesta a la proteotoxicidad inducida por el bortezomib

1. Estudiar si el bortezomib induce cambios en el tamaño y en el número de nucleolos.
2. Analizar el patrón estructural y la composición molecular del nucleolo en respuesta a la inhibición del proteasoma.
3. Estudiar los efectos de la inhibición del proteasoma sobre la actividad transcripcional del nucleolo y su regulación.
4. Analizar el comportamiento de los CBs y su relación con el nucleolo en respuesta al tratamiento con Btz.

3. Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo experimental del presente trabajo de Tesis Doctoral se ha utilizado material biológico procedente de animales de experimentación. La experimentación animal se realizó en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley. Los animales se mantuvieron en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal (SEEA) de la Universidad de Cantabria. El cuidado y manipulación de los animales se llevó a cabo siguiendo las normas de experimentación con animales dictadas por la directiva de la Comunidad Europea (86/609/CEE) y de acuerdo con la legislación española vigente (Real Decreto 1201; 2005). Se han utilizado aproximadamente 70 animales distribuidos como sigue: i) animales adultos de aproximadamente 23 días de edad utilizados para investigar el daño en el DNA por radiación ionizante, para ello se analizaron 6 condiciones: control, 0,5 horas, 3 horas, 1 día, 3 días y 15 días post-RI, ii) animales de unos 125g (~29 días) para investigar el estrés proteotóxico inducido por la inhibición del proteasoma con el bortezomib; fueron analizadas 3 condiciones: control y experimentales tratados con dos dosis bajas o dos dosis altas del fármaco durante una semana.

3.1 MODELOS EXPERIMENTALES DE RADIACIÓN IONIZANTE Y ADMINISTRACIÓN DE DROGAS

El modelo de radiación ionizante genera un daño exógeno en el DNA mediante un sistema generador de rayos-X (Maxishot-d, Yxlon, Int. USA) equipado con un tubo de rayos-X a 200mKV y 4,5mA. Los animales, profundamente anestesiados con una mezcla de ketamina (100mg/kg) y xilacina (10mg/kg) administrada vía intraperitoneal, se colocaron en una plataforma a 25cm del tubo que genera los rayos X con una tasa de absorbanza de 0,9Gy/min. La cabeza del animal se colocó centrada en el punto donde incidirían los rayos X y el resto del cuerpo se protegió con una cámara de plomo para evitar efectos secundarios por exposición a una radiación global en médula ósea y otros tejidos. Los animales se radiaron durante 4 minutos y 20 segundos para administrar una dosis subletal de 4Gy, dosis usada como referencia en experimentos de daño/reparación del DNA (Yang y cols., 2009). Para este trabajo se utilizaron animales control e irradiados de 0,5h, 3h, 1d, 3d y 15d post-RI (n=7 para cada grupo). Después de ese tiempo, los animales se sacrificaron y se procesaron los ganglios sensitivos del trigémino según la técnica que se fuera a realizar.

Para la inhibición del proteasoma catalítico se ha utilizado el agente quimioterápico Bortezomib (Velcade, Millennium Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA) suministrado por el HUMV ya alicuotado en 1mg/ml. Bortezomib inhibe específicamente la subunidad catalítica $\beta 5$ del proteasoma, de actividad quimotripsínica, y en menor medida la subunidad $\beta 1$, que actúa como caspasa. Los animales recibieron dos dosis del fármaco de 0,2mg/kg (Btz-DB) o

0,5mg/kg (Btz-DA) disuelto en suero salino y administrado vía intravenosa por la vena de la cola. A los animales control se les administró suero salino. Las dosis fueron inyectadas los días 1 y 3 y el sacrificio se produjo el día 4. La administración de la dosis alta (Btz-DA) fue tolerada por las ratas y ningún animal murió durante la administración de la droga. Los criterios de dosis y administración de la droga se hicieron siguiendo los protocolos del grupo de Cavaletti (Cavaletti y cols., 2007).

3.2 PROCESAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1 Técnica de fijación por perfusión

En primer lugar, los animales fueron profundamente anestesiados utilizando 2,2,2-Tribromoetanol (Aldrich) administrado por vía intraperitoneal, a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal. Una vez comprobada la total ausencia de movimientos reflejos, los tejidos se fijaron mediante perfusión transcardíaca según el procedimiento de Palay y Chan-Palay (1974). Se realizó una incisión en Y, con un tramo central abdominal y dos tramos laterales siguiendo el reborde costal. Posteriormente se abrió la cavidad torácica, seccionando el diafragma en su inserción anterior, y se levantó el peto costal pinzando la parte inferior del esternón, dejando así al descubierto el corazón. A continuación, se introdujo un catéter de teflón Abbocath-T® a través del vértice del ventrículo izquierdo hasta el origen del cayado aórtico para canalizar la entrada de la solución fijadora y, seguidamente, se practicó una incisión en la aurícula derecha para crear una circulación abierta y permitir así la salida de dicha solución. Para impulsar el líquido fijador se utilizó una bomba de perfusión Masterflex® a un flujo aproximado de 25 ml/min y se bombeó aproximadamente el mismo volumen (en mililitros) de fijador que gramos pesó el animal. Finalizada la fijación, el animal se decapitó y con una tijera se liberó la piel y la musculatura pericraneal. A continuación, con una gubia fina se desprendieron los huesos de la base del cráneo y se descartó el encéfalo (lámina basilar, peñascos temporales y concha occipital). Seguidamente, seccionamos el nervio trigémino en su raíz anterior y posterior. De esta forma los ganglios del trigémino (GTs) quedan liberados y se pudieron extraer con la ayuda de una tijera y una gubia fina. Finalmente, los fragmentos de tejido se procesaron con diferentes técnicas histológicas.

3.2.2 Obtención de disociados neuronales

Los disociados de neuronas del GT se han utilizado para el estudio de inmunofluorescencia e hibridación *in situ* con microscopía confocal láser según el protocolo descrito previamente en nuestro grupo (Lafarga y cols., 1991; Pena y cols., 2001). Para llevar a cabo esta técnica, se utiliza el tejido fijado por perfusión con paraformaldehído (Merk) al 3,7% en PBS (PBS1x: 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 1,75mM KH₂PO₄; pH7,4). El material así fijado se almacena en PBS a 4°C hasta su posterior procesamiento. La técnica de "squash" o de

disociado neuronal consiste en depositar sobre un portaobjetos (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Alemania) un pequeño fragmento de tejido obtenido por microdissección de la región periférica del ganglio enriquecida en cuerpos neuronales. La muestra se cubre con un volumen de 10µl de PBS y sobre ella se sitúa un cubreobjetos de 18x18mm. A continuación, con una aguja histológica, se van disociando las neuronas por percusión. El grado de disociación y la preservación citológica de las neuronas se controla bajo observación microscópica en contraste de fase. Para que al retirar el cubreobjetos los somas neuronales queden adheridos al portaobjetos, las muestras se congelan en nieve carbónica durante aproximadamente 5 minutos y el cubreobjetos congelado se retira fácilmente con una cuchilla. Posteriormente, las muestras se estabilizan sumergiendo los portas en etanol al 96% a 4°C durante 5 minutos. Seguidamente, se almacenan en PBS a 4°C hasta el momento de uso.

Los disociados neuronales obtenidos mediante esta metodología, que permite disponer de centenares de cuerpos neuronales enteros y perfectamente preservados, en combinación con la ayuda de un microscopio confocal (Zeiss, LSM 510), han sido fundamentales para el desarrollo del presente trabajo. De esta forma, en dichas preparaciones se han elegido las neuronas de tipo A en las que, por las características del microscopio, se pueden realizar secciones ópticas de la totalidad del soma neuronal; esto permite determinar con alta resolución la distribución de las moléculas objeto de estudio en los compartimentos nucleares y establecer, además, la posible colocalización de moléculas en dichos compartimentos. Además, el "squash" también es muy útil para realizar análisis cuantitativos con alta fiabilidad, ya que en la proyección digitalizada de todas las secciones que componen los núcleos de las neuronas sensitivas tipo A se pueden cuantificar todas las estructuras nucleares consideradas de interés para el estudio como son los focos de daño en el DNA, el nucleolo y el cuerpo nuclear de Cajal.

3.3 MICROSCOPIA CONFOCAL

3.3.1 Inmunofluorescencia

Para la inmunofluorescencia convencional, los disociados de las neuronas del GT obtenidos mediante la técnica del "squash" se incuban 20 minutos con glicina 0,1M para eliminar los grupos aldehído residuales tras la fijación. Tras ello, las muestras se permeabilizan con PBS-Triton X-100 0,5% durante 45 minutos a temperatura ambiente en agitación ligera, se lavan en PBS-Tween-20 al 0,05% (PBS-T 0,05%) y se procede al marcaje por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario diluido en PBS-BSA 1%. Con este propósito, se delimita la zona del disociado en el portaobjetos mediante un lápiz con punta de diamante, se añaden 7µl del anticuerpo primario por preparación y se incuba durante 60 minutos en cámara húmeda, en oscuridad y a temperatura ambiente (TA). Tras varios lavados en PBS-T

0,05%, las preparaciones se incuban con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo, fluoresceína (FITC), Cy3 o Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, E.U.A.) durante 45 minutos, en cámara oscura y húmeda a TA. En el caso de que se requiera la inmunodetección de varias proteínas, dobles o triples inmunomarcajes, los anticuerpos primarios se incubaron de modo independiente y se revelaron con una mezcla de anticuerpos secundarios específicos para cada anticuerpo primario y con diferentes fluorocromos. Algunos inmunomarcajes fueron contrastados con una solución de yoduro de propidio (PI) (dilución 1:2000 a partir de un stock de 1mg/ml), que tiñe específicamente los ácidos nucleicos y, en las neuronas, contrasta muy bien el nucleolo y los grumos de Nissl.

Las muestras se montaron con el medio VectaShield (Vector Laboratories, Peterborough), se sellaron con laca de uñas y a continuación se examinaron con un microscopio confocal láser Zeiss LSM 510 provisto de tres líneas de láser, argón (488nm), HeNe (543nm) y HeNe (633nm), para excitar FITC, TxRd, y Cy5 respectivamente. Los anticuerpos específicos utilizados en este estudio aparecen enumerados en la tabla 1.

3.3.2 Hibridación *in situ* para RNAs poliadenilados

A partir de neuronas disociadas fijadas con paraformaldehído 3,7%, se detectaron los RNAs poliadenilados con una sonda de oligonucleótidos poli(U) conjugada con biotina. En todos los casos se siguió el siguiente procedimiento: las muestras se permeabilizan con una solución de TBS-SDS 0,05%-EDTA 1mM (TBS: Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM; pH 7,4); durante 5 minutos a TA. Tras varios lavados en 6x-SSPE (ClNa 900 mM, NaH₂PO₄ x H₂O 60 mM, EDTA 6 mM; pH 7.4) con 0.1% Tween-20 a TA, las muestras se prehibridaron con t-RNA (0.5 mg/ml) diluido en 6x-SSPE/50x-Denhardt (50x-Denhardt: 1% ficoll-400; 1% polivinilpirrolidona; 1% BSA) durante 30 minutos en cámara húmeda a TA. A continuación se lleva a cabo la hibridación con 2 pmol/μl de la sonda correspondiente diluida en 6x-SSPE/5x-Denhardt durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras varios lavados a 37°C en 6x-SSPE y 4x-SSC (NaCl 600 mM, citrato sódico 60 mM; pH 7,4) con 0,1% Tween-20, se procede a revelar y amplificar la señal de hibridación. Para ello, las preparaciones se incuban con avidina conjugada con fluoresceína (FITC) 5μg/ml diluida en una solución de 4x-SSC-Tween-20 0,1% y BSA 1% durante 30 minutos a 37°C. Después de varios lavados con 4x-SSC-Tween-20 0,1%, las muestras se reincuban con anti-avidina conjugada con biotina 5 μg/ml diluida en 4x-SSC-Tween-20 0,1% y BSA 1%, durante 30 minutos a 37°C. Tras lavar con 4x-SSC-Tween-20, las preparaciones se incuban de nuevo con avidina conjugada con fluoresceína durante 30 minutos a 37°C. Por último, las muestras se lavan varias veces en 4x-SSC-Tween-20. A continuación, puede continuarse con un doble marcaje con inmunofluorescencia, y posterior montaje del mismo modo explicado en el apartado anterior.

3.3.3 Ensayo de transcripción “run-on” mediante incorporación de 5'-fluorouridina (5'-FU) *in vivo*

La actividad transcripcional fue medida por la incorporación *in vivo* de 5'-fluorouridina (5'-FU; Sigma-Aldrich) en el RNA recién sintetizado. La vía de administración usada fue una dosis única intravenosa de 20ml/Kg de peso corporal. Pasada 1 hora de incorporación del nucleótido halogenado, se sacrifica al animal. En todos los casos, los ganglios fueron fijados con 3.7% paraformaldehído en buffer HEPES (Pipes básico 65mM; Hepes 30mM; MgCl₂ hexahidratado 2mM; EGTA 10mM; pH 7,4) que contiene 0,5% de Tritón X durante 20 minutos. Posteriormente, se realizó la extracción de los GTs y los disociados neuronales como se ha descrito anteriormente. El nucleótido halogenado se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU (clone BU-33; Sigma-Aldrich) seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC o TexasRed (Jackson Laboratorios, USA). Las preparaciones se montaron con Vectashield.

3.3.4 Inmunodetección de muerte celular mediante TUNEL (Terminal transferase-mediated dUTP Nick End Labeling)

Se realizó una detección de muerte celular *in situ* mediante un kit (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania) para detectar las células apoptóticas. El protocolo de fijación y permeabilización del disociado que empleamos fue el mismo que el utilizado para realizar la inmunofluorescencia convencional. Los disociados neuronales almacenados en PBS se trataron con borohidruro sódico (5mg/ml) durante 20 minutos a temperatura ambiente para reducir el marcaje de fondo y se permeabilizaron con una solución compuesta de 0,2% Triton X-100 y 0,1% citrato sódico preparada en el momento. El siguiente paso fue la incubación en el tampón TUNEL (30mM Tris pH 7,2; 140mM cacodilato de sodio; 1mM de cloruro de cobalto; 0,3% de Tritón X-100). A continuación se incubó la preparación con una mezcla de que contenía enzima transferasa terminal (2 µl/ml) y dUTP-biotinado (2 µl/ml) en tampón TUNEL durante 2 horas a 37°C. La reacción se paró con el tampón SSC (2 lavados de 10 minutos). Por último se lavó con PBS y montó como ya se ha descrito anteriormente. Como control positivo se usó un “squash” de timo de rata que, en condiciones fisiológicas, contiene numerosas células apoptóticas. Cuando se acopló la técnica de TUNEL con la técnica de inmunofluorescencia, en primer lugar se llevó a cabo el protocolo para la inmunofluorescencia y a continuación el protocolo para la detección del TUNEL.

3.3.5 Ensayo de COMETA neutro

El ensayo COMETA o electroforesis en gel de células individuales, es un método sensible y rápido para cuantificar el daño en el DNA en neuronas del GT. El fundamento de este ensayo radica en que las rupturas que se han producido en el material genético después de una

electroforesis generan fragmentos que aparentan ser la cola de un cometa, donde la cabeza sería el núcleo y la cola el DNA fragmentado. La longitud y la intensidad de la cola dependen del número de rupturas que se hayan producido. Esta técnica se puede realizar en condiciones neutras, detectando rupturas de doble cadena del DNA (DSBs), o bajo condiciones alcalinas, detectando rupturas de cadena simple y doble (SSBs y DSBs) y sitios lábiles del DNA (Olive y Banath, 2008).

Para este ensayo, las neuronas del GT de ratas control y experimentales se disociaron por digestión enzimática con colagenasa 0,1% (Sigma-Aldrich) durante 30min a 37°C como ya fue descrito por Pena y cols (2001). Las neuronas, a una concentración de 3×10^4 células/ml, se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión al 0,7% en PBS a 37°C. La suspensión fue pipeteada sobre los vidrios portaobjetos pre-tratados con agarosa 1% de punto de fusión normal y después de su solidificación a 4°C se añadió otra capa de agarosa de bajo punto de fusión y se cubrió con un portaobjetos. La agarosa se dejó enfriar y solidificar a 4°C, se eliminaron los cubreobjetos y los vidrios fueron sumergidos en solución de lisis fría a pH 10 (NaCl 2,5M; Na₂EDTA 100mM; Tris 10mM pH10; TritónX-100 1%; DMSO 10%) y mantenidos a 4°C durante una hora. Se secaron los vidrios y se colocaron en horizontal en una cubeta de electroforesis con el tampón de electroforesis neutro (pH 8,4; Na₂EDTA 1mM/NaOH 300mM), con el fin de permitir la desnaturalización del DNA. Todo el proceso se realizó en oscuridad y a 4°C para impedir el daño adicional del DNA. La electroforesis se llevó a cabo con un tampón fresco a 4°C durante 20min a 1,6V/cm y 300 mA. Una vez pasado ese tiempo, las muestras se neutralizaron en TrisHCl 0,4 M pH 7,5 durante 5 min, se tiñeron con ioduro de propidio (2 µg/ml), se cubrieron con cubreobjetos y se incubaron durante 10 minutos en oscuridad. Los cometas fueron visualizados con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop 2 plus con cámara AxioCam HRc Zeiss acoplada y cuantificados desde el punto medio del núcleo hasta el final de la estela con el software ImageJ (NHI, USA).

3.4 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3.4.1 Microscopía electrónica de transmisión convencional

Para el estudio de microscopía electrónica de transmisión hemos utilizado la técnica descrita por Palay y Chan-Palay (1974). Tras la perfusión de los animales con glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,12M (pH 7,4) los GT se extrajeron y post-fijaron en la misma solución, durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados de 15 minutos en tampón fosfato 0,12M, los GT microdisecionados se post-fijaron en tetróxido de osmio al 2% en solución tamponada durante 2 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Antes de proceder con la deshidratación, el material se lavó varias veces en

agitación con una solución salina (NaCl 2,4%). Para el proceso de deshidratación se siguieron los siguientes pasos:

- Acetona 30%, 15 minutos
- Acetona 50%, 15 minutos
- Acetona 70% + acetato de uranilo 1% 30 minutos
- Acetona 80%, 30 minutos
- Acetona 90%, 30 minutos
- Acetona anhidra, 30 minutos (dos pasos)
- Propilenóxido, 30 minutos (dos pasos)

Los bloques de tejido se incluyeron en araldita (Durcapan) siguiendo las indicaciones especificadas por el fabricante (ACM, Fluka AG, Suiza) y se introdujeron en una estufa a 65° C durante 48 horas para su polimerización. Finalmente, los bloques se cortaron con un ultramicrotomo (Leica, Ultracut UCT). Se realizaron cortes semifinos de 1 µm de espesor que se tiñeron con azul de toluidina al 1% para valorar la correcta preservación del material y para seleccionar la zona del GT que se desea utilizar para ultramicrotomía. Los cortes ultrafinos de 50nm se montan en rejillas de cobre recubiertas con una película de Formvar (Sigma-Aldrich) y a continuación se tiñen con acetato de uranilo y citrato de plomo según Reynolds (1963) para su observación con un microscopio electrónico (Philips EM 208).

3.4.2 Inmunocitoquímica ultraestructural

Parte del material fijado por perfusión con paraformaldehído 3.7% para el estudio de inmunofluorescencia confocal láser se reservó para el análisis inmucitoquímico a nivel ultraestructural. Los fragmentos de ganglio del trigémino se incluyeron en resina Lowicryl K4M del siguiente modo:

- Metanol 30%, 10 minutos a 4°C
- Metanol 50%, 10 minutos a 4°C
- Metanol 70%, 10 minutos a 4°C
- Metanol 90%, 30 minutos a -20°C
- Metanol 90%: Lowicryl (1:1), 60 minutos a -20°C
- Metanol 90%: Lowicryl (1:2), 60 minutos a -20°C
- Lowicryl, 60 minutos a -20°C
- Lowicryl, toda la noche a -20°C

Posteriormente, los bloques se embebieron en lowicryl, evitando el contacto con el aire, en cápsulas de gelatina transparente (Gelatin capsule, size 2; Electron Microscopy Sciences) . La polimerización se llevó a cabo por exposición a luz ultravioleta (366nm, Philips T16/05) durante 5 días a -20°C seguida de 3 días a temperatura ambiente. Finalmente, los bloques se cortaron con un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT). Las secciones ultrafinas se

recogen en rejillas de níquel cubiertas de Formvar. A continuación, estas secciones se incuban secuencialmente en gotas de PBS-glicina 0,1M durante 15 minutos como paso previo a su incubación con un anticuerpo primario (diluido en PBS con 1% de BSA) durante 60 minutos, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Después de varios lavados sobre gotas de PBS se procede a su incubación con un anticuerpo secundario específico. Los anticuerpos secundarios, conjugados con partículas de oro coloidal de 10 o 15nm de diámetro (BioCell, UK), se usaron a una concentración de 1:25 a 1:50 en PBS con 1% de BSA. Después, las rejillas se lavan enérgicamente con agua bidestilada en un vaso de precipitados, se dejan secar al aire y se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo según Reynolds (1963) para su observación al microscopio electrónico (Philips-EM 208). La relación de anticuerpos primarios usados en este apartado aparecen reflejados en la tabla 1, la concentración utilizada es aproximadamente 2 veces mayor que para la inmunofluorescencia.

3.4.3 Microscopía inmunoelectrónica de los sitios de incorporación de 5'-FU

Para el estudio de la incorporación *in vivo* de la 5'-FU, se siguió el mismo protocolo citado anteriormente en el apartado de microscopía óptica. Sin embargo, para su detección *in situ* en los RNAs nacientes mediante microscopía electrónica, los animales se perfundieron con paraformaldehído al 3.7% en 0,1M de tampón cacodilato. Un vez extraídos los GT, se lavaron en tampón cacodilato 0,1M y se deshidrataron con concentraciones crecientes de metanol como se ha explicado en el apartado anterior, hasta que se embebió en lowicryl K4M a -20°C y se polimerizó con radiación ultravioleta. Los cortes ultrafinos se montaron en rejilla de níquel cubiertas de Formvar. A continuación, las secciones se incubaron siguiendo el procesamiento anteriormente citado, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Sigma, Aldrich, UK), diluido 1:10 en Tris-HCl 50mM pH7,6 con BSA al 1% y glicina 0,1M). Se incubó durante una hora a 37°C y, tras un lavado en PBS, se incubó con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con partículas de oro coloidal de 15 nm (dilución 1:50 en PBS con BSA 1%; BioCell). Una vez que terminó el periodo de incubación, las preparaciones se lavaron y se contrastaron como se indicó anteriormente. Finalmente, se observó al microscopio electrónico (Philips EM 208).

3.5 ANÁLISIS CUANTITATIVO Y ESTADÍSTICO

Como se ha comentado anteriormente, la técnica del "squash" permite analizar el soma completo de las neuronas sensitivas tipo A del GT. Gracias a esta técnica hemos cuantificado, i) en el modelo de daño en el DNA por RI: el número de focos de daño en el DNA (IRIFs) en cada neurona; el área de estos IRIFs; el número de neuronas que presentaban IRIFs; la intensidad en la fluorescencia de la anti-BrdU; y la longitud de los "cometas" generados por las DSBs en el DNA; ii) en el modelo de la inhibición del proteasoma por bortezomib: el

número de neuronas excéntricas; la proporción de neuronas con Btz-IFs; el número de estos focos por neurona, el diámetro nucleolar; el número de nucleolos y el número de CBs. Para el estudio del factor de forma, se utilizaron imágenes de microscopía electrónica convencional que permitieron trazar un perímetro muy preciso usando el programa ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>). Una vez medido, se utilizó la fórmula $4\pi A/P^2$, donde A es el área de la figura y P el perímetro. El círculo perfecto tendría como valor la unidad y un segmento el cero. Los datos se analizaron con el programa GraphPad para Windows mediante un ANOVA unifactorial y Bonferroni como test post-hoc.

3.6 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Para la obtención de lisados totales a partir de neuronas del GT se extraen los GT en fresco sacrificando al animal mediante la guillotina y se congelan rápidamente en un criotubo mediante nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de uso. En general, para lisar el tejido se usó un tampón comercial ($1\ \mu\text{l}/\mu\text{g}$, Phosphosafe Extraction Reagent, Novagen) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas (1:100, Roche). Sin embargo, para la inmunodetección por Western blotting (WB) de histonas se utilizó un tampón específico, NETN, a partir del stock (200mM Tris-HCl pH 8; 150mM NaCl; 1mM EDTA), 500mM finales de NaCl, benzonasa ($1\ \mu\text{l}/\text{ml}$, Novagen) e inhibidores de proteasas (1:100, Roche).

El sobrenadante obtenido se procesó lisándolo físicamente mediante un politrón (Kinematica PT 2500E) en frío. Una vez tenemos un extracto homogéneo a 4°C , y han pasado 30 minutos desde que se empezó a procesar la muestra congelada, se centrifuga a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se realizó la cuantificación de la proteína mediante el sistema de fluorometría Qubit 2.0 (Life Technologies). Las muestras ($30\ \mu\text{g}$ de proteína) se calentaron a 95°C durante 5 minutos en un tampón de carga (tampón 5x: 60mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,02% azul de bromofenol. Añadir 5% β -mercaptoetanol antes de uso) y se fraccionaron por electroforesis vertical en geles de poli(acrilamida)-SDS de un porcentaje adecuado para el tamaño de las proteínas a analizar. La electroforesis se realizó en un Mini-ProteanII (BioRad) en tampón de electroforesis (a partir de un stock 10x 0,25M Tris-base; 2M glicina y 1% SDS). Seguidamente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa PROTAN® (SCHLEICHER&SCHUELL), durante 2 horas a $300\text{mA}/\text{cm}^2$ en un Mini-ProteanII (BioRad) en tampón de transferencia (25mM Tris-base y 192mM glicina). Finalizada la transferencia, la membrana se tiñe con Ponceau (0,2% Ponceau-S en 3% TCA). Una vez detectadas la bandas de proteínas, la membrana se lava con PBS1x hasta que desapareció el

tinte. Después, incubamos la membrana una hora con TBS-5% BSA para bloquear los sitios inespecíficos. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en TBS-T y 2% de BSA, durante toda la noche a 4°C y en agitación. Los anticuerpos primarios utilizados en este apartado aparecen enumerados en la tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en microscopía y en bioquímica.

Anticuerpo	Especie	Dilución (IF*)	Referencia
P53	Ratón	1:100	Santa Cruz Biotech.
p-P53 (Ser15)	Conejo	1:100	Cell Signaling Tech.
α -Tubulina	Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich
Histona H4 acetilada	Conejo	1:100	Millipore-Upstate
Histona H4 Trimetilada (Lys 20)	Conejo	1:100	Millipore-Upstate
γ H2AX (Ser 139)	Ratón	1:200	Millipore-Upstate
p-ATM (Ser 1981)	Conejo	1:100	Cell Signaling Tech.
Ubiquitina-proteína	Conejo	1:100	Affiniti Research Prod.
53BP1	Conejo	1:300	Bethyl Lab., Inc
P21	Conejo	1:100	Santa Cruz Biotech.
Ciclina D1	Conejo	1:100	Cell Signaling Tech.
Ciclina A	Ratón	1:100	BD Pharmingen™
MCP proteasoma 20S	Conejo	1:100	Mengual y cols., 1996
GAPDH	Ratón	1:200	Abcam
Proteasoma 20S sub. β 5	Ratón	1:100	Abcam
Proteasoma 20S sub. α 5	Conejo	1:100	Abcam
panHistona	Ratón	1:200	Roche
Nucleoporina	Ratón	1:200	Abcam
Lámina B1	Conejo	1:300	Abcam
PABPN1	Conejo	1:200	Epitomics
γ -Tubulina	Ratón	1:2000	Sigma
BDNF	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotech.
Actina	Cabra	1:200	Santa Cruz Biotech.

*Dilución utilizada para inmunofluorescencia (IF). Para inmunoblot (western blot, WB) la dilución usada es 10xIF y para microscopía electrónica (ME) 1/2xIF

Finalizada la incubación, se retiró el anticuerpo primario y la membrana se lavó 2 veces con TBS-T (0,05% Tween-20 en TBS) durante 15 minutos/lavado; se incubó con el

anticuerpo secundario correspondiente (1:10000 en TBS-T y 2% de BSA) durante 1 hora a TA, seguido de varios lavados con TBS-T. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios, diluidos en solución de bloqueo: IRDye™ 680/800 anti-IgG de ratón (1:10000, Rockland) y IRDye™ 680/800 anti-IgG de conejo (1:10000, Rockland) que se detectaron utilizando el sistema Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor). Para calcular la cantidad de la proteína de los experimentales con respecto a los controles y saber si había cambios tras el tratamiento, se tomó la imagen escaneada de la membrana y se cuantificó mediante ImageJ el valor de cada banda teniendo en cuenta la proteína normalizadora (GAPDH, tubulina o actina).

3.7 ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN DE RNA POR PCR CUANTITATIVA

La técnica de PCR cuantitativa se usa para cuantificar cambios en la expresión de genes en las muestras experimentales con respecto a sus muestras control. El tipo de PCR cuantitativa escogida en este estudio fue SYBRGreen. SYBRGreen es capaz de emitir fluorescencia ($\lambda_{em}=520nm$) cuando se encuentra unido a un surco mayor del DNA de doble cadena y es excitado por una luz polarizada ($\lambda_{ex}=497nm$). Además, para comprobar la especificidad del experimento, se puede realizar una curva de disociación, ya que los productos de PCR de diferente longitud y diferentes secuencias se desnaturalizan a distintas temperaturas. La curva de disociación demuestra es una reacción específica en la que sólo se origina un producto único que queda bien caracterizado al mostrar un único pico al representar la derivada de la medida con respecto al aumento de la temperatura.

3.7.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA a partir de neuronas del GT se realizó en fresco, sacrificando al animal mediante la guillotina, y se seleccionó el ganglio accesorio y la zona del ganglio principal para conseguir concentrar el volumen de neuronas del GT recogido. El tejido se congeló rápidamente por nitrógeno líquido y se almacenó a $-80^{\circ}C$. Una vez tenemos el tejido congelado, se siguieron las instrucciones del agente para la extracción de RNA (ver fig. 1), en este caso trizol (TR-118, Molecular Research Center, inc.). En la primera fase se procedió a la homogenización del tejido embebido en Trizol (1ml/mg tejido) con un politrón (Kinematica PT 2500E) y se incubó durante 5 minutos a TA. A continuación se realizó una separación de fases añadiendo 0,2ml de cloroformo/ml lisado. Se agitó 15 segundos y se dejó unos 2-3 minutos, TA. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a $4^{\circ}C$ (Centrifuge

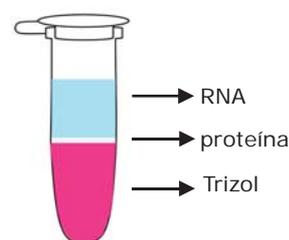


Fig. 1. Esquema de la separación de fases en el protocolo de extracción de RNA.

5810R, Eppendorf). Se recogió la fase acuosa y se precipita el RNA añadiendo 0,5ml de isopropanol/ml trizol utilizado. Se incubó 10 minutos, TA y se centrifugó durante 10 minutos a 4°C a 12000rpm. Una vez precipitado, se procedió al lavado: con cuidado, se tiró el sobrenadante y se añadió 1ml de etanol 70% en H₂O depc (dietil pirocarbonato 0,1% en agua destilada) por cada ml de trizol utilizado, se mezcló con un vórtex, ligeramente para evitar fragmentación, y se centrifugó durante 5 minutos a 12000rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar bien antes de añadirle hasta 50µl de H₂O depc (según el pellet que hayamos observado en cada muestra). La cuantificación de las muestras se realizó mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000 V 3.6). Finalmente, la pureza se midió mediante el cociente entre absorbancia a 260 nm y a 280 nm, el cual hace referencia a la cantidad de proteínas presentes en la muestra. Un resultado de 2,0 indica un RNA puro, sin contaminantes. En todos los experimentos, este cociente fue siempre superior a 1,8.

3.7.2 Obtención de cDNA

A partir de los RNAs purificados según el apartado anterior, se obtiene el cDNA correspondiente por retrotranscripción mediante el kit de síntesis de cDNA de Thermo (Thermo Scientific Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit). La retrotranscripción se llevó a cabo usando 1µg de RNA total en presencia de deoxinucleótidos y transcriptasa inversa M-MuIV, utilizando hexámeros de oligonucleótidos ("random hexamers") como cebadores. La reacción se realizó en un termociclador (BioRad) cuyo programa consiste en una primera incubación de 10 minutos a 25°C, otra de una hora a 42°C y la última de 10 minutos a 70°C. Una vez obtenido el cDNA, se midió su concentración en un espectrofotómetro (Nanodrop Technologies ND-1000). Una vez medida la concentración de cDNA se ajustó a 0,5 µg/µl diluyendo las muestras en agua estéril Milli-Q.

3.7.3 Diseño de oligonucleótidos cebadores para PCR cuantitativa

En el diseño de los oligonucleótidos cebadores se utilizó el programa informático "Sequence Analysis v.1.7.2" (<http://informagen.com/SA/>) así como la página web "The Sequence Manipulation Suite". Se consideraron adecuadas las parejas de oligonucleótidos cuya longitud estuviera en torno a 20 bases, su porcentaje de G+C fuera de aproximadamente el 50%, su T_m fuera ~60 °C y su composición no favoreciese la aparición de estructuras secundarias. Además, se comprobó mediante un análisis nBLAST (nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) que el amplicón producto de los oligonucleótidos seleccionados se correspondiesen únicamente al gen de interés y no amplificaba otras secuencias en nuestro animal de experimentación. Los cebadores o primers que se han usado en este trabajo para analizar los niveles de expresión génica por qPCR para SYBRGreen se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en los estudios de expresión génica.

Nombre	Referencia	Primer Forward/reverse (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>Proteasome 20S subunit β5</i>	NM_001105727.2	Fw: agtggaggaggcctatgacc Rv.: cacatggtagagggtgactgc	94
<i>Proteasome 20S subunit α5</i>	NM_017282.1	Fw: gctgaacgcaactaacatcg Rv.: tcacctctccagttcttcc	86
<i>45S pre-rRNA</i>	Kalita y cols., 2010	Fw.: tggggcagctttatgacaac Rv.: tagcaccaaacgggaaaacc	-
<i>18S rRNA</i>	Kalita y cols., 2010	Fw.: gttggttttcggaactgaggc Rv.: gtcggcatcgttatggtcg	-
<i>Nucleophosmin</i>	NM_012992.4	Fw.: catcttctgactctgcatcttcc Rv.: ggtcttgagggtgaagtgtgg	89
<i>Ubtf</i>	NM_001105723.2	Fw.: gaagagaaggcagcttcagg Rv.: cttctcggacaagtcgttcc	94
<i>Fbl</i>	NM_001025643.1	Fw.: attgactccacagcctcagc Rv.: gcgtggtctcgttcataagg	116
<i>Nucleolin</i>	NM_012749.2	Fw.: tgctggagttgtgtagcc Rv.: tgacagcagtggaagagg	70
<i>Coilin</i>	NM_017360.1	Fw.: ccagcatgttcttgacacc Rv.: agcctagcttcacctcagc	114
<i>Tp53</i>	NM_030989.3	Fw.: accagcacaagctcctctcc Rv.: ctctcggaaacatctcgaagc	102
<i>c-myc</i>	NM_012603.2	Fw.: aagtggaacccgacag Rv.: cagcagctcgaatttcttcc	195
<i>Rps14</i>	NM_022672.1	Fw.: tcaactgccctgcatatcaaac Rv.: tccttcgagtgctgtcagag	159

3.7.4 Detección de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La reacción de PCR a tiempo real cuantitativa (qPCR) consiste en monitorizar el progreso de la reacción a medida que va ocurriendo, desde el comienzo hasta el final. La detección se realiza al mismo tiempo que la amplificación, por lo que esta tecnología sustituye a la amplificación tradicional y la electroforesis. En esta técnica se marca un umbral de fluorescencia (*threshold*), en el punto en que la reacción de amplificación se encuentra en fase exponencial. El ciclo en el cual la reacción de amplificación atraviesa este umbral de fluorescencia se denomina C_T (*threshold cycle*) y depende de la cantidad de cDNA presente en cada muestra.

La técnica se realizó en un sistema accesorio de automatización Mx3005P (Stratagene) y software de análisis MxPro (Stratagene). Para realizar la qPCR se añaden para cada muestra 1µl de cDNA (0,5µg/µl); 9µl de stock (formado por 8,2µl de agua Milli-Q y 0,4µl 10µM de cada cebador sense y antisense, correspondientes al gen de interés) y 10µl de SYBRgreen Mix (Takara). Estos 20µl totales se dividen en 2 tubos, obteniéndose para cada muestra 10µl de reacción por duplicado. Las condiciones de la qPCR que hemos usado son: (i) un primer segmento de desnaturalización (1 ciclo de 95° de 30 segundos); seguido de un (ii) segmento de anillamiento a 60°C durante 30 segundos y elongación a 72°C (30 segundos). A continuación se añadió un segmento final para verificar la especificidad de

la reacción, (iii) la curva de disociación, de un ciclo a 95°C un minuto, 55°C 30 segundos y 95°C 30 segundos. Se toman medidas de fluorescencia al final de cada paso de anillamiento del segundo segmento y en el segmento final, para realizar la curva de disociación, durante toda la subida de temperatura desde 55°C hasta 95°C. Cuando se representa la derivada de la fluorescencia frente a la temperatura, aparece un pico correspondiente a la temperatura de fusión del producto (T_m). El área del pico es proporcional a la cantidad de producto de amplificación obtenido. En las condiciones en las que se amplifica más de un producto, se detectan varios picos, cada uno con una T_m característica.

3.7.5 Cuantificación y análisis de la expresión génica relativa

Los resultados fueron analizados con dos programas específicos de análisis, Stratagene MXPro software versión 3.0 (Stratagene) y el software Prism 6 de Graphpad, donde se usó como control interno el gen *Rps14* (subunidad 14S del RNA ribosomal en rata). Se utilizó un método de comparación de los valores de C_T (ΔC_T) en el que el umbral de cada ciclo (C_t) de qPCR se define como el número de ciclos fraccionarios en los que la fluorescencia alcanza una línea de umbral fija. El nivel de expresión relativo se calcula usando la ecuación $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ (Livak and Schmittgen, 2001), que se resume en el siguiente esquema:

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen interés} - C_T \text{ gen de referencia}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ condición problema} - \Delta C_T \text{ condición control}$$

$$\text{Cambio relativo de la expresión} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Cada valor representa la media de, al menos, tres muestras independientes obtenidas en las mismas condiciones. Los resultados se han testado estadísticamente mediante los análisis estadísticos t-Student y ANOVA; el test post-hoc empleado fue el de Bonferroni, considerándose el resultado como estadísticamente significativo cuando $p < 0,05$.

4. Resultados



4.1 RESPUESTA AL DAÑO DEL DNA INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE DE LAS NEURONAS SENSITIVAS TIPO A

4.1.1 Planteamiento del trabajo

En la actualidad los tratamientos oncológicos administrados en la clínica humana han experimentado un avance espectacular en su eficiencia antitumoral y en el diseño de protocolos terapéuticos dirigidos que han mejorado mucho la tasa de supervivencia de los pacientes tratados. Sin embargo, las intervenciones médicas generan diversos efectos adversos, en unos casos agudos, que pueden comprometer al tracto gastrointestinal o a la médula ósea roja, y en otros neurotóxicos, más tardíos y que evolucionan en el tiempo. De hecho, la neuropatía periférica inducida por el tratamiento médico del cáncer es la complicación más frecuente y probablemente la neuropatía tóxica más común en nuestro medio (Kannarkat y cols., 2007). Sin embargo, gracias al reconocimiento de los efectos adversos en la calidad de vida de los pacientes con tratamientos oncológicos, la neuropatía periférica ha dejado de ser infravalorada clínicamente. De hecho, la investigación básica y clínica ha empezado a evaluar conjuntamente el papel de múltiples terapias dirigidas a prevenir y tratar el daño neurológico (Dropcho, 2010a y b).

La radioterapia posee una citotoxicidad no específica que afecta a las células tumorales y a las células sanas de cualquier parte del sistema nervioso central (SNC) o periférico (SNP). Pese al desarrollo de nuevos protocolos de tratamiento, las complicaciones neurológicas continúan siendo un problema importante, sobre todo en aquellos pacientes con mayor esperanza de vida. En la génesis de las complicaciones neurológicas secundarias a la radioterapia, se han implicado tanto factores relacionados con el propio tratamiento (dosis total, fraccionamiento, volumen de radiación), como factores dependientes del paciente, particularmente la edad o tratamientos concomitantes con la radioterapia (fundamentalmente quimioterapia simultánea). Los síntomas clínicos de la neuropatía sensitiva periférica inducida por radioterapia son comunes con los ocasionados por otros tratamientos oncológicos siendo las manifestaciones más frecuentes las disestesias, sensación de quemazón y alteraciones en la sensibilidad vibratoria, propioceptiva y dolorosa. Estos síntomas comprometen la calidad de vida de los pacientes y pueden requerir modificaciones en el protocolo de tratamiento, reducción de la dosis e incluso suspensión del tratamiento; lo que condiciona el potencial curativo y pronóstico del paciente (Chi y cols., 2008; Velasco y Bruna, 2010). Estas razones han generado un creciente interés de la Biomedicina por las neuropatías periféricas, siendo reflejo de ello las múltiples revisiones que han aparecido en la literatura reciente (Cavaletti y cols., 2007; Cavaletti y Marmioli, 2010; Bruna y cols., 2010; Fallon, 2013).

La repercusión neurológica periférica de la radioterapia es mixta ya que depende no sólo del efecto neurotóxico sobre los ganglios y nervios sensitivos (neuropatía

desmielinizante) sino también del daño ocasionado en el perineuro y endoneuro, principalmente en el lecho vascular endoneural (necrosis tisular).

Independientemente del tejido afectado, el mecanismo de acción se basa en la propiedad de las radiaciones ionizantes de emitir fotones que, al colisionar directamente con moléculas biológicas intracelulares (DNA) o ser absorbidos de forma disipada (H_2O), ceden

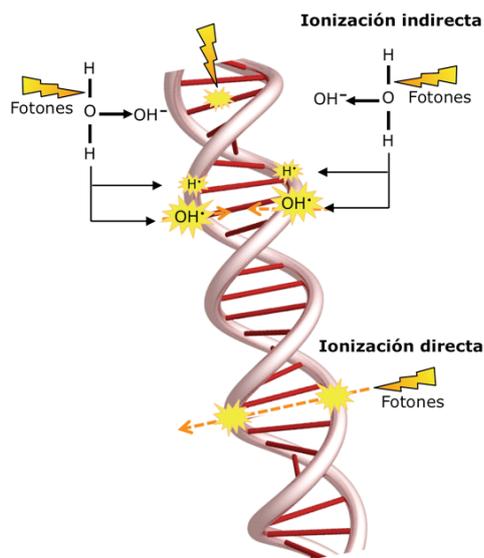


Figura 1. Esquema que ilustra el daño por DSB en el DNA inducido por la ionización directa o indirecta por los radicales libres generados principalmente por la ionización del agua del asociada al DNA.

su energía ionizando la materia. En el sistema nervioso esta ionización puede afectar al núcleo y al citoplasma de las neuronas y a los elementos gliales asociados. A nivel nuclear, la diana más importante es el DNA sobre el que la RI administrada a la dosis de 4Gy provoca roturas en el DNA que, mayoritariamente, son DSBs (Sutherland y cols., 2003). La ionización del DNA puede ser directa ("efecto de bala") o a través de radicales libres ($H\cdot$ y $OH\cdot$) que se producen cuando la energía fotónica es absorbida principalmente por el H_2O (Fig. 1). A nivel nuclear, la colisión de los fotones X sobre el DNA genera pequeños focos aleatorios de DNA dañado (IRIFs) en la cromatina, siendo más vulnerable la cromatina descondensada (eucromatina) que las masas compactas de heterocromatina o el

nucleolo (Mladenov e Iliakis, 2011). Las lesiones que la RI produce en el DNA son muy complejas ("complex DNA damage"), numerosas e incluyen DSBs y modificaciones en las bases y azúcares del DNA. La vulnerabilidad de las neuronas sensitivas de tipo A a generar roturas de la doble cadena en el DNA puede deberse, al menos en parte, a la configuración eucromática y relajada de su cromatina que favorece el acceso de drogas intercalantes en el DNA y el efecto de las RI. Otro handicap considerable es que, al ser células post-mitóticas, la reparación de las DSBs no puede hacerse por recombinación homóloga (HR), y la reparación se produce por fusión no homóloga de los dos extremos dañados de la misma hebra (NHEJR). Dicha reparación, puede conllevar deleciones de las secuencias génicas dañadas y, consecuentemente, puede alterar la fidelidad del producto génico traducido (Fig. 2).

Sobre la base de lo anteriormente expuesto, tiene gran interés biomédico investigar la repercusión fisiopatológica de la reparación del DNA por NHEJ en las neuronas sensitivas, considerando que en la clínica humana dosis terapéuticas de RI conllevan importantes secuelas neurológicas (Yang y cols., 2009). De acuerdo con este planteamiento, nos pareció interesante desarrollar los siguientes objetivos: (i) definir la organización espaciotemporal y

dinámica funcional de los focos de daño del DNA, (ii) investigar la implicación de la vía p53/p21, (iii) conocer si el daño del DNA compromete la transcripción neuronal y (iv) abordar los cambios estructurales y epigenéticos en la cromatina. Para desarrollar estos objetivos hemos seleccionado el subtipo de neuronas sensitivas del GT tipo A debido a su mayor vulnerabilidad para experimentar DSBs en el DNA (Pena y cols., 2001).

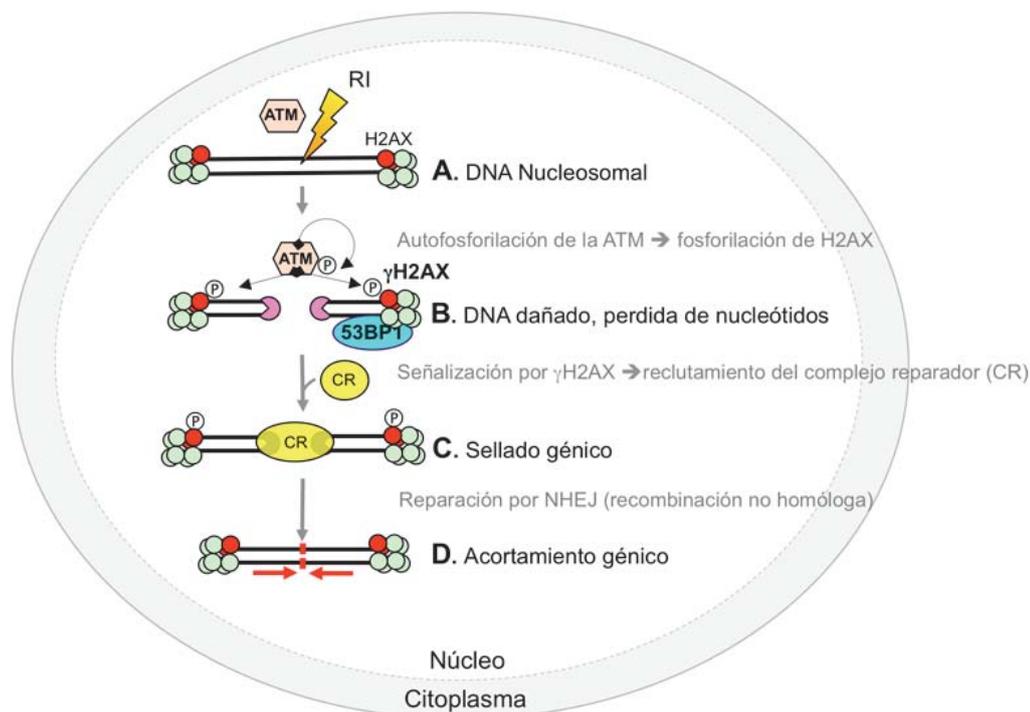


Figura 2. Esquema que ilustra la reparación del DNA por la vía de NHEJ. El daño en el DNA inducido por RI (A) activa la autofosforilación de la ATM. Un pre-requisito para su activación como quinasa. La pATM activada fosforila a la H2AX (γ H2AX) (B). La fosforilación de la H2AX es fundamental para el reclutamiento de la proteína transductora 53BP1 específica de la reparación por NHEJ, actúa como "scaffolding" para ensamblar el complejo reparador (CR). El complejo CR es responsable del sellado del DNA dañado por fusión de los extremos cromosómicos rotos (C). Las flechas rojas indican que la reparación del DNA por NHEJ conlleva acortamiento génico de los cromosomas fragmentados por la RI (D).

4.1.2 Organización espaciotemporal y dinámica funcional de los focos de DNA dañado por RI

De acuerdo con los objetivos propuestos, investigamos en primer lugar la organización espacial y temporal de los IRIFs administrando a los animales de experimentación una dosis de RI de 4Gy. Los IRIFs fueron identificados en disociados neuronales siguiendo el protocolo descrito por Pena y cols, 2001. Esta técnica permite, de forma muy eficiente, estimar con alta resolución y exactitud el número y tamaño, la localización nuclear y las asociaciones espaciales con otros compartimentos nucleares de los IRIFs en la totalidad del núcleo neuronal. Con este fin, hemos detectado dos proteínas clave en la DDR, como proteína

sensora del daño en el DNA hemos utilizado la histona H2AX fosforilada en la Ser133 (γ H2AX) (Fernandez-Capetillo y cols., 2004) y, como proteína implicada en la reparación, la proteína 53BP1. Esta proteína actúa como un “andamiaje molecular” selectivo para reclutar en el foco de la lesión el complejo reparador de la vía NHEJ (Noon y cols., 2010; Callen y cols., 2013). Antes de nada, verificamos con microscopía confocal que en las neuronas control el inmunomarcaje de la γ H2AX era prácticamente indetectable, si bien la 53BP1 se expresaba constitutivamente de manera difusa en el nucleoplasma excluyendo el nucleolo (Fig. 3A-C). Sólo en algunas neuronas no radiadas, observamos la presencia de algún foco nuclear enriquecido en las proteínas γ H2AX y 53BP1. Tales focos pueden corresponder a sitios de daño del DNA generados espontáneamente y de forma fisiológica como consecuencia de la gran intensidad del metabolismo oxidativo neuronal normal. Seguidamente, investigamos el comportamiento de la γ H2AX y de la 53BP1 en distintos periodos de tiempo post-RI: 0,5h, 3h, 1d, 3d y 15d. En contraste con las neuronas control, 30 minutos post-RI fueron suficientes para inducir en todas las neuronas numerosos IRIFs de DNA dañado enriquecidos en γ H2AX y 53BP1. En las neuronas de tipo A, los IRIFs nucleares eran muy numerosos y de pequeño tamaño, estaban bien definidos y se distribuían por todo el nucleoplasma, excluyendo el nucleolo (Fig. 3D-F). La inducción de fragmentación del DNA a los 30 minutos fue validada por el ensayo COMETA neutro (Olive y Banath, 2006), que demostró cometas de gran longitud en las neuronas radiadas ($>39\pm 2,7\mu\text{m}$) en comparación con las controles cuyas colas eran indetectables (Fig. 3S-T). Tras 3h post-RI, el número de IRIFs de DNA dañado claramente disminuía a la vez que incrementaban su tamaño (Fig. 3G-I). Esta tendencia a la progresiva reducción del número e incremento de tamaño de los IRIFs se mantuvo después de 1, 3 y 15d post-RI. Estos resultados indican que los IRIFs de DNA dañado eran mayoritariamente transitorios (IRIFs transitorios). No obstante, fue muy interesante comprobar que después de 15d post-RI algunas neuronas mostraban unos pocos, normalmente de 1 a 3, IRIFs permanentes que consideramos como una fracción acumulada del DNA dañado no reparado (Fig. 3J-R). Estos IRIFs permanentes eran de gran tamaño y, preferentemente, se asociaban a la envoltura nuclear y al nucleolo (Fig. 3P-R). La expresión de la γ H2AX fue confirmada por western blotting que demostró que el nivel de la H2AX fosforilada era prácticamente indetectable en los lisados de los GTs no radiados, mientras que a las 0,5h post-RI se observó una elevada inducción que se mantuvo, aunque algo menos elevada, en los siguientes puntos post-RI estudiados (Fig. 3U). El hecho de que la γ H2AX no recuperase los niveles basales del control podría estar justificado por la persistencia de DNA dañado en los IRIFs persistentes.

Seguidamente realizamos un análisis morfométrico y cuantitativo de los IRIFs en el curso temporal post-RI. Este estudio confirmó que el número de IRIFs transitorios por célula disminuye desde $49,1\pm 4,8$, a las 0,5h, hasta $1,96\pm 0,5$, a los 15d post-RI (Fig. 3V). Por su

parte, el tamaño de los focos se incrementó desde $0,7 \pm 0,11 \mu\text{m}^2$, a las 0,5h, hasta alcanzar $6,5 \pm 0,52 \mu\text{m}^2$ en los IRIFs permanentes (Fig. 3T-W). El estudio cuantitativo validó nuestras observaciones al demostrar que la proporción de neuronas con IRIFs oscilaba desde un 100% a los 0,5h post-RI, hasta aproximadamente un 33% a los 15 días post-RI (Fig.3X).

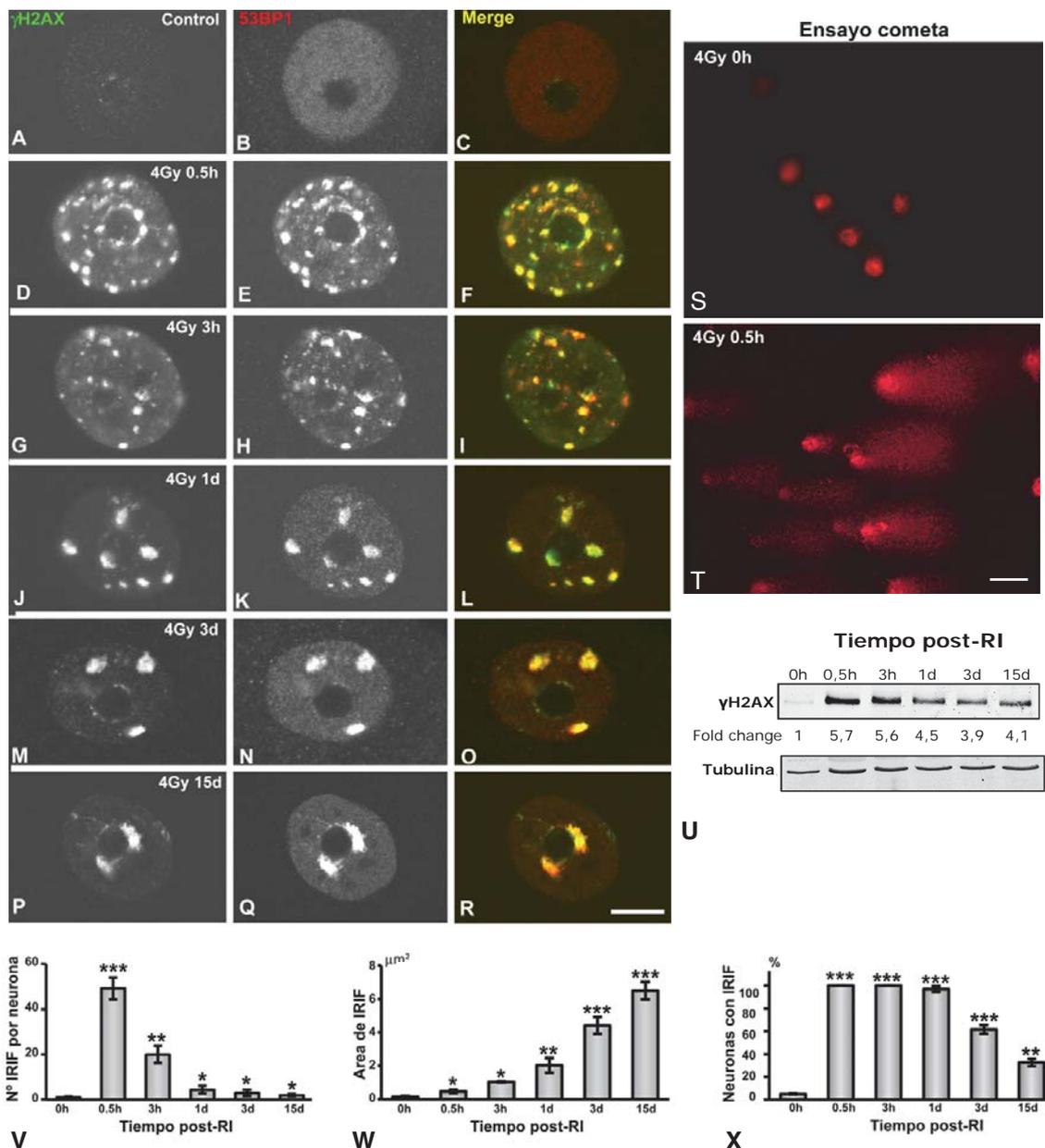


Figura 3. Distribución espacial de los IRIFs post-RI inmunodetectando γH2AX y 53BP1. A-C. La neurona control carece de γH2AX y muestra un patrón nuclear difuso de la 53BP1. D-R. Tras la RI, la γH2AX y la 53BP1 colocalizan en los IRIFs de DNA dañado. En la secuencia temporal post-RI los IRIFs muestran progresivamente disminución numérica y el incremento de su tamaño. S-T. El ensayo del COMETA neutro demuestra colas de gran longitud de DNA fragmentado post-RI (0,5h) si se compara con las neuronas control (S) ($39 \pm 2,7 \mu\text{m}$, media \pm SD). U. El western blotting confirma la inducción de γH2AX a las 0,5h post-RI y su decreciente expresión temporal. V-X. Estudio cuantitativo del número medio de IRIFs por célula (V), de su tamaño medio (W) y de la proporción de neuronas con IRIFs (X). Los datos se expresan como media \pm SD; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs control (0h). Barra de medida A-R 5 μm ; T-U 15 μm .

Estos resultados confirman que las neuronas sensitivas son muy vulnerables a la RI dado que, a los 30 minutos, ya exhiben numerosos IRIFs transitorios. Pero también demuestran la gran eficiencia reparadora del DNA de estas neuronas en las primeras 24h post-IR, cuando la mayoría de las neuronas logran reparar totalmente el DNA. No obstante, merece la pena enfatizar la existencia de una población de neuronas que tienen IRIFs permanentes de DNA dañado, bien por un retraso de su reparación o bien debido al fracaso en el ligamiento de los extremos por NHEJR. Además, otro aspecto importante observado en nuestros resultados es que los IRIFs persistentes son relativamente frecuentes en las neuronas de gran tamaño, pero son raros en las neuronas pequeñas, de tipo C, y en las células gliales. Esta observación deja una cuestión muy interesante para futuras investigaciones.

Dado que la quinasa ATM es primariamente requerida en la DDR de las DSBs del DNA inducidas por RI o por drogas radiomiméticas y, además, es imprescindible para la fosforilación de la H2AX, nos pareció importante investigar su expresión y localización nuclear de la forma activada, la ATM autofosforilada (pATM). La co-inmunodetección de pATM y γ H2AX demostró que la expresión de pATM era tenue en las neuronas control. Sin embargo, tras la RI, la señal de la pATM se incrementó notablemente en el nucleoplasma y en los IRIFs γ H2AX-positivos transitorios y persistentes (Fig. 4D-R). El incremento transitorio en el nivel de expresión de pATM fue confirmado por western blotting (Fig. 4S).

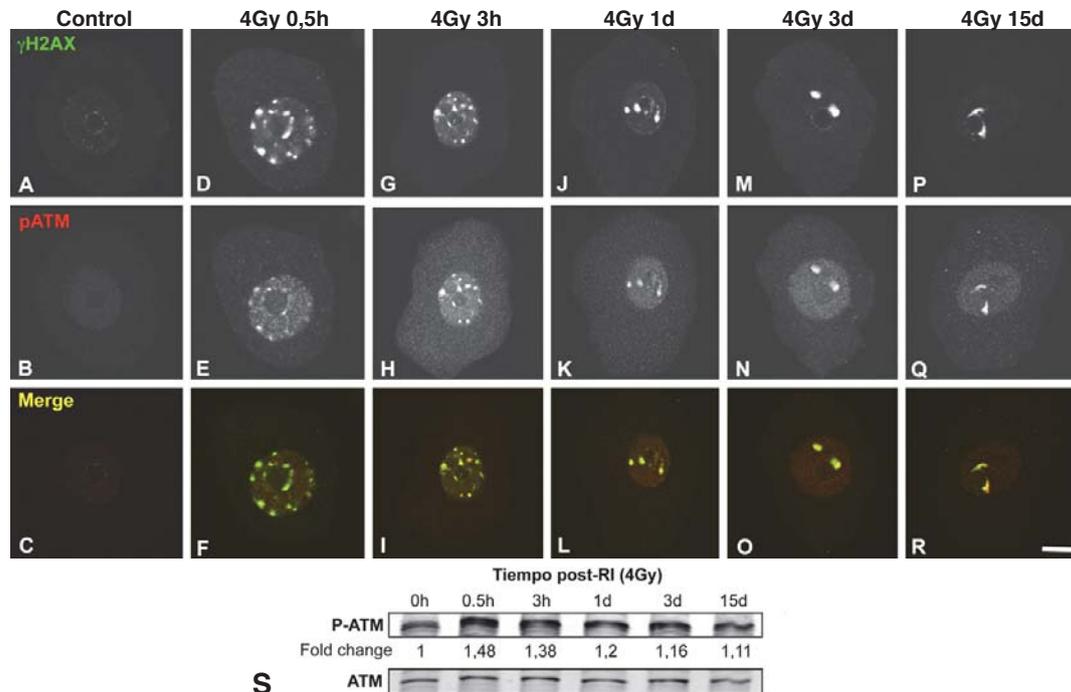


Figura 4. Dinámica de la expresión de pATM en los IRIFs γ H2AX-positivos. A-C. La señal de pATM nucleoplasmática en las neuronas control es muy débil. D-R. En las neuronas irradiadas, se induce una expresión nuclear de la pATM que se acumula tanto en IRIFs γ H2AX-positivos transitorios como persistentes. Obsérvese cómo aunque la pATM se concentra en los IRIFs permanentes, la dosis nuclear progresivamente decrece aunque no recupera el patrón de expresión de la neurona control. S. El análisis por western blotting

Nuestros resultados demuestran que las neuronas sensitivas activan la cascada reparadora del DNA dañado, sin embargo un importante contingente (33%) no es capaz de reparar totalmente el DNA dañado. Por esta razón, centramos nuestro interés en investigar si la presencia de IRIFs permanentes inducía neurodegeneración por apoptosis. Con este fin valoramos parámetros celulares que se asocian a disfunción neuronal, incluyendo (i) la heterocromatinización, (ii) alteraciones en la morfología nucleolar y (iii) la disolución de los grumos de Nissl. Como muestra la figura 5A-B, en secciones semifinas teñidas con violeta de cresilo, no se observaron signos de degeneración neuronal. Así, al igual que en las neuronas control (Fig. 5A), a los 15d post-RI, los núcleos neuronales eran pálidos y eucromáticos con nucleolos prominentes y, en el citoplasma, la distribución de la maquinaria de síntesis de proteínas se organizaba en los típicos grumos de Nissl (Fig. 5B). Además, la técnica del TUNEL demostró la total ausencia de neuronas apoptóticas, indicando que la dosis de RI utilizada (4Gy) no induce en el GT neurodegeneración por apoptosis (Fig. 5C-H). Para descartar que la negatividad del TUNEL fuera un falso negativo, realizamos esta técnica en la corteza tímica, que de modo natural presenta linfoblastos apoptóticos TUNEL positivos en proceso de selección clonal negativa (Fig. 5I).

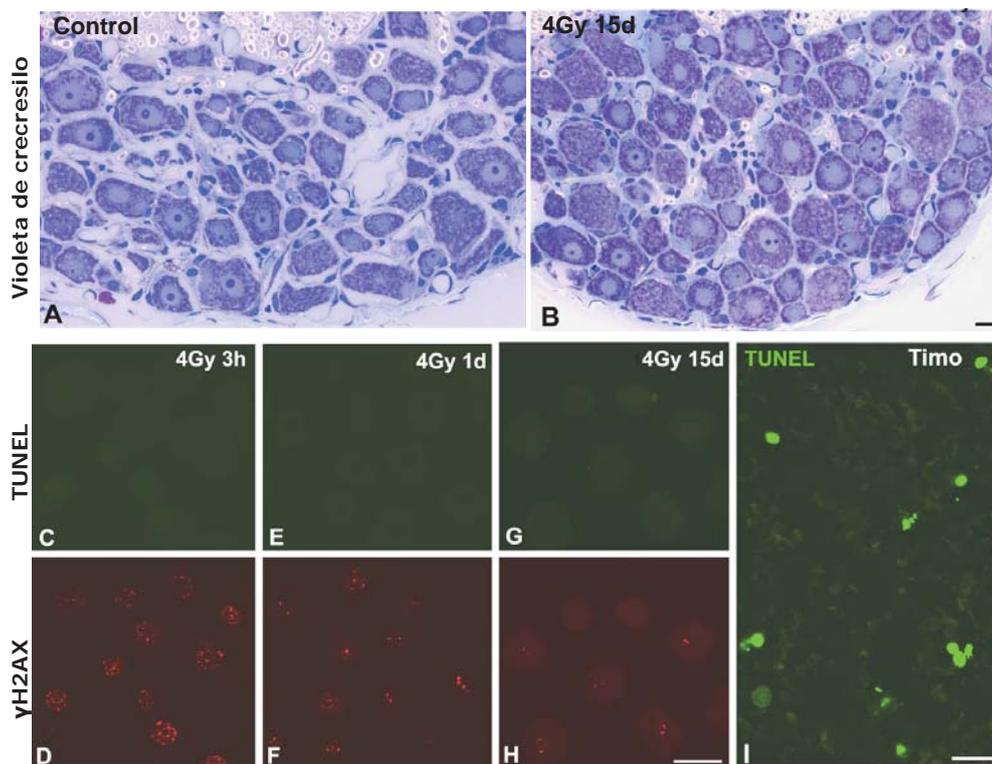


Figura 5. La radiación ionizante no induce degeneración neuronal. A-B. Secciones semifinas de 1 μ m de espesor teñidas con violeta de cresilo de un fragmento de GT control (A) y de 15d post-RI (B). Obsérvese cómo la RI no produce cambios en el patrón de cromatina, en el nucleolo o en los grumos de Nissl. C-H. La técnica del TUNEL combinada con la inmunodetección de γ H2AX demuestra que las neuronas post-RI a las 3h, un 1d o 15d con IRIFs γ H2AX-positivos son negativas a la técnica del TUNEL. En I se muestra varias apoptosis TUNEL positivas pertenecientes a la corteza tímica. Barra de medida A-B 15 μ m y C-I 25 μ m.

En su conjunto estos resultados reflejan que las neuronas tipo A del GT son capaces de reclutar espacial y temporalmente moléculas clave implicadas en la señalización y reparación de las DSBs. Sin embargo, es importante considerar dos hechos que pueden tener particular relevancia biomédica para comprender la fisiopatología de la neuropatía inducida por radiaciones ionizantes. En primer lugar, la reparación de los IRIFs por la vía de NHEJ es propensa a introducir errores en la secuencia del DNA. De hecho, se pueden producir numerosas mini-deleciones y/o alteraciones irreversibles que afectan a secuencias génicas codificantes de proteínas, con un importante impacto en la expresión de proteínas específicas neuronales. En segundo lugar, la persistencia de focos con DNA dañado no reparado puede comprometer la fisiología neuronal. A nuestro entender, los IRIFs persistentes pueden representar secuencias génicas en las que la reparación del DNA por NHEJ ha sido ineficaz. Desde un punto de vista funcional, los dos factores comentados contribuirían a generar una inestabilidad en el genoma neuronal que puede provocar la expresión de proteínas anormales implicadas en el estrés genotóxico, tales como las proteínas p53 y p21 (Lavin, 2008).

4.1.3 Las roturas de doble cadena inducidas por RI activan la vía p53/p21 en las neuronas del ganglio del trigémino

La proteína p53 es un supresor tumoral y activador transcripcional del gen que codifica la proteína p21. La proteína p53 tiene una vida media muy corta y es difícilmente detectable en condiciones fisiológicas (Boisvert y Lamond, 2010). Sin embargo, el estrés genotóxico induce en las células proliferantes la expresión y activación, por fosforilación dependiente de pATM, de p53 (p-p53) que, a su vez, incrementa los niveles de p21 (Lavin, 2008). En respuesta al daño en el DNA, la proteína p21 actúa como un potente inhibidor del ciclo celular, lo que permite la reparación homóloga (HR) del DNA o, de no ser así, p-p53 dispara el programa de muerte celular por apoptosis (Lukas y cols., 2003; Helton y Chen, 2007). Aunque las neuronas son células post-mitóticas que reparan el DNA por la vía NHEJ, aparentemente en el periodo G₀, nos pareció importante valorar la participación de la vía p53/p21 en la respuesta neuronal al estrés genotóxico inducido con RI y con independencia del ciclo celular. Siguiendo la cascada molecular planteada en el esquema de la Figura 6, previamente analizamos con inmunofluorescencia los patrones de expresión de la p53 fosforilada en la Ser15 (p-p53). Nuestros resultados confirmaron que las neuronas control no expresaban niveles detectables de esta proteína (Fig. 6B). Sin embargo, cuando analizamos su expresión a diferentes tiempos post-RI, observamos una débil señal de inmunorreactividad para p-p53 en los núcleos neuronales a las 0,5h post-RI, que se incrementaba claramente a las 3h post-RI y tendía a desaparecer progresivamente a partir de 1d post-RI (Fig. 6C-F). Nuestras observaciones con inmunofluorescencia fueron validadas por el análisis por western blotting (Fig. 5L). Una vez demostrado que las RI inducen la fosforilación de p53 en las neuronas sensitivas, nos pareció obligado conocer el comportamiento de su diana, la proteína p21 (esquema Fig. 6A, puntos 1 y

2). Nuestros resultados por inmunofluorescencia y por western blotting demostraron que las RIs inducen la co-expresión transitoria de p-p53 y p21, alcanzando esta última un pico máximo de expresión 1d post-RI (Fig. 6L). Dado que en nuestro modelo experimental no se observaron apoptosis, podemos inferir que la inducción de p-p53 es independiente de la la activación de programas de muerte celular y, por tanto, cabe hipotetizar que su importancia funcional esté dirigida a la inducción de genes de reparación del DNA (Helton y Chen, 2007).

Dado que en algunos modelos experimentales de neurodegeneración que cursan con acumulación de daño en el DNA se ha demostrado la reactivación del ciclo celular en neuronas (Kruman y Schwartz, 2008; Klein y Assoian, 2008), nos planteamos investigar si las RI inducen en las neuronas sensitivas la progresión de la fase G₀ a G₁, lo que implicaría la reentrada en el ciclo celular (esquema Fig. 6A, punto 2). Con este fin, valoramos los patrones de expresión de la ciclina D1, un marcador del periodo G₁, por inmunofluorescencia y western blotting. En las neuronas control (Fig. 6G) la expresión de esta ciclina era muy débil, pero se incrementó progresivamente a las 3h post-RI y fue muy elevada a la 24h post-RI (Fig. 6H-K y L). Así, independientemente de los niveles elevados de p21, se inducía la transición G₀-G₁ (esquema Fig. 6A, punto 3). Para conocer si las neuronas eran capaces de progresar a la fase S y G₂ investigamos el comportamiento de la ciclina A, un marcador del periodo S. Como muestra la Figura 5L, el tratamiento con RI no indujo la expresión de esta ciclina, indicando que la reentrada en ciclo se para en G₁ y no puede progresar a la fase S (Fig. 6A, punto 4)

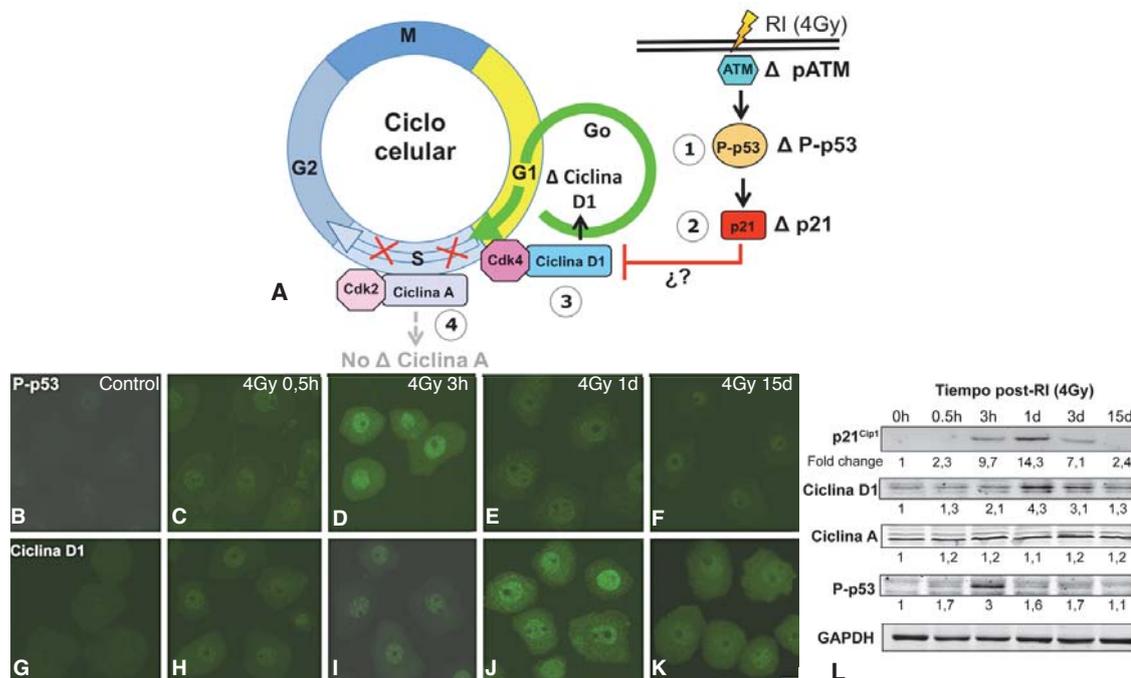


Figura 6. El daño al DNA inducido por RI activa la progresión G₀-G₁ del ciclo celular. A. Esquema del ciclo celular que ilustra la implicación funcional de P-p53, p21 y las ciclinas D1 y A y su implicación funcional tras la RI. B-F. Marcaje de P-p53 en neuronas control RI, la expresión nuclear se detecta claramente a 3h post-RI (D) y permanece, pero con menor intensidad, tras 1 y 15d post-RI (E-F). G-K. La inmunofluorescencia de ciclina D1 muestra un incremento progresivo de la señal nuclear desde 0,5h hasta 1d post-RI (J). L. El western blotting muestra la inducción de P-p53, p21 y de la ciclina D1. Barra de medida 10µm.

En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que el daño del DNA inducido por RI desencadena la activación del ciclo celular en las neuronas del GT, pero sólo progresa hasta la fase G1, presumiblemente para contemporizar la reparación del DNA y garantizar la supervivencia.

4.1.4 El daño en el DNA inducido por RI bloquea transitoriamente la transcripción neuronal

En la actualidad se considera que la maquinaria de transcripción es un importante sensor del daño del DNA. Se postula que el DNA dañado para el complejo de la RNA polimerasa II (Pol II) en la horquilla de transcripción dando lugar a la inhibición de la transcripción. Así, esta inhibición transitoria sería necesaria para favorecer la correcta eliminación de los complejos de Pol II asociados a las lesiones del DNA. Si la reparación es eficiente se recupera la transcripción y traducción de proteínas, pero la reparación deficiente puede activar la vía de apoptosis (Ljungman y Lane, 2004). Por esta razón, nos pareció interesante correlacionar las variaciones de la actividad transcripcional con la progresión de la reparación en las neuronas tratadas con RI. Para este fin llevamos a cabo un ensayo de transcripción "run-on" *in vivo* mediante la incorporación del nucleótido halogenado 5'-fluorouridina (5'-FU) en los RNAs nacientes (Casafont y cols., 2006). El nucleótido se administró intravenosamente y su incorporación en los RNAs nacientes se analizó tras un pulso de exposición de 1h.

El análisis con microscopía confocal reveló que en las neuronas control contrastadas con PI los RNAs nacientes se concentraban en el nucleolo, además de formar numerosos focos o factorías de transcripción activa distribuidos por todo el nucleoplasma (Fig. 7A-C). En la actualidad, se interpreta que estos focos representan "clusters" de genes transcripcionalmente activos que comparten la factoría de transcripción de la RNA Pol II (Chakalova y Fraser, 2010; Iborra y cols., 1996). Este patrón de distribución de la 5'-FU encaja perfectamente con la elevada tasa de transcripción que requieren las neuronas sensitivas de tipo A para mantener su volumen celular y actividad bioeléctrica (Pena y cols., 2001).

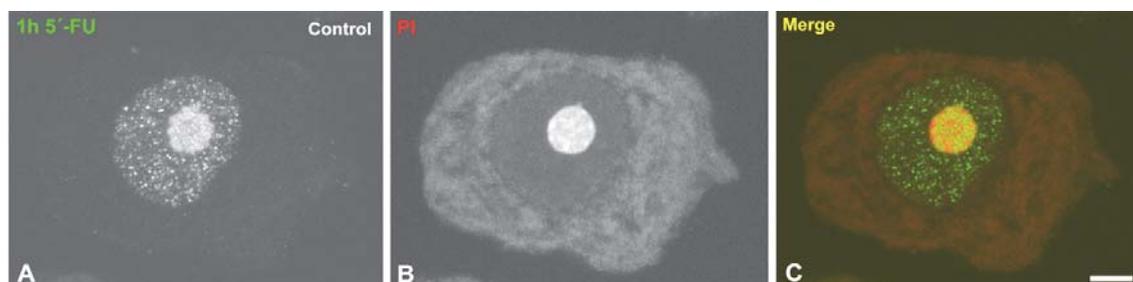


Figura 7. Ensayo de transcripción *in vivo* en combinación con el PI en neurona control. A. Inmunofluorescencia de la 5'-FU que muestra la concentración de rRNAs en el nucleolo y formando numerosos microfocos en el nucleoplasma (mRNAs). Estos focos representan indirectamente los correspondientes genes transcripcionalmente activos. **B.** El PI unido a los ácidos nucleicos marca intensamente el nucleolo y, en el citoplasma, la maquinaria para la síntesis de proteínas organizada en las neuronas sensitivas formando numerosos grumos de Nissl. **C.** Imagen combinada de ambos marcadores. Barra de medida 5µm.

Seguidamente, aplicando esta técnica a nuestro modelo experimental, comprobamos que la RI induce a las 0,5h post-RI una caída dramática de la tasa de transcripción, siendo más importante en el nucleoplasma que en el nucleolo (Fig. 8A-B). Sin embargo, la actividad transcripcional global, nucleolar y extranucleolar, se recuperó de forma progresiva a partir de las 3h hasta 1d post-RI, momento en el que la incorporación del nucleótido halogenado tendía a normalizarse respecto a las neuronas control (Fig. 8C-E). Estas observaciones fueron validadas mediante el análisis cuantitativo, por densitometría, de la intensidad de la señal fluorescente de incorporación de 5'-FU en el RNA naciente. Para este fin, las imágenes de microscopía confocal fueron procesadas con el programa ImageJ, que confirmó la caída y la recuperación transcripcional observada con microscopía confocal (Fig. 8F).

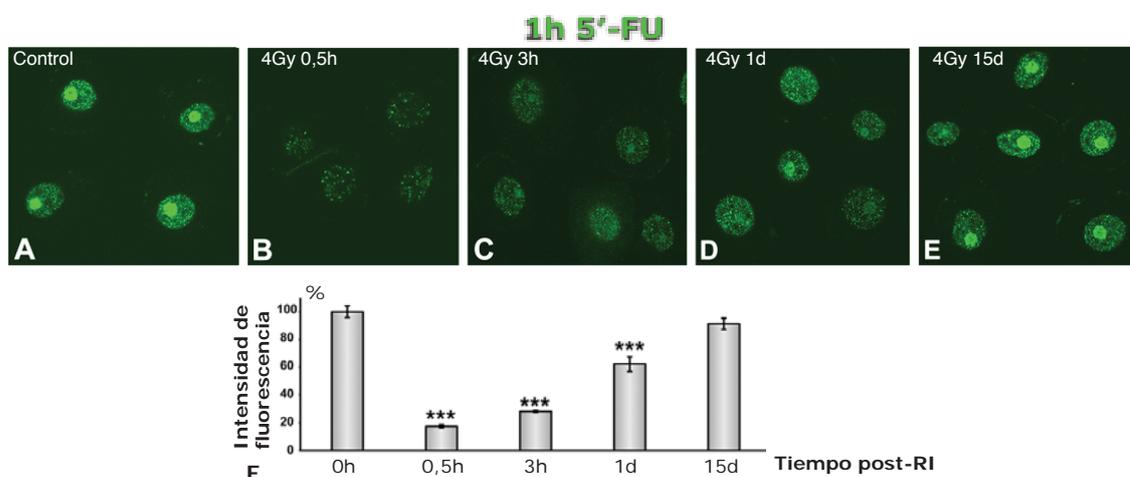


Figura 8. Ensayo de transcripción *in vivo* analizado por incorporación de 5'-FU en los RNAs nacientes. En A-E se muestran ejemplos representativos de los patrones de expresión de 5'-FU en animales control (A) y radiados (B-E). Nótese como a las 0,5h y 3h post-RI la tasa de incorporación del nucleótido es muy baja si se compara con el control o con tiempos largos de RI. F. Gráfica que ilustra la intensidad de la fluorescencia emitida por la 5'-FU en cada estado analizado con el programa ImageJ, (media±SD) ***p<0,001 comparando con el control (0h).

En conclusión, podemos resumir que la fase temprana de daño masivo del DNA (0,5 y 3h post-RI) induce una severa inhibición transitoria de la actividad transcripcional global. Probablemente, esta inhibición de la síntesis de RNAs puede ser requerida para retrasar la reparación del daño del DNA hasta la renovación de los complejos de RNA Pol II en los sitios de transcripción. Estos resultados también indican que las neuronas sensitivas tienen gran plasticidad para adaptar el déficit transcripcional a los requerimientos metabólicos necesarios para la supervivencia.

4.1.5 La RI induce cambios estructurales y epigenéticos en la cromatina

Una vez establecido que el daño en el DNA inducido por RI causa una inhibición reversible en la actividad transcripcional global de las neuronas del GT, quisimos investigar si concomitantemente se producían cambios estructurales y epigenéticos en la configuración de

la cromatina durante las diferentes fases de reparación de las DSBs. Para ello analizamos los patrones de expresión de dos marcas epigenéticas, la trimetilación de la lisina 20 en la histona H4 (H4K20me3), involucrada en la represión transcripcional tanto en dominios de eucromatina silente como en la heterocromatina (Schotta y cols, 2004), y la acetilación de la histona H4 (H4Ac), un marcador del remodelamiento de la cromatina en sitios de transcripción activa (Berger, 2007).

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que las neuronas de tipo A del GT tienen una configuración eminentemente eucromática (Pena y cols., 2001), tan sólo disponen de unos pocos agregados de heterocromatina asociada al nucleolo y la envoltura nuclear. Bajo esta premisa, analizamos si la inhibición transcripcional inducida por la RI modificaba la estructura de la cromatina a una configuración más heterocromática. Para ello inmunodetectamos las histonas H4K20me3 y γ H2AX. De acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio (Pena y cols., 2001), la heterocromatina H4K20me3-positiva de las neuronas control se restringe a unos pocos agregados pequeños que se asocian al nucleolo y a la envoltura nuclear (Fig. 9A-C). En cambio, tras 0,5h post-RI, junto con la formación de numerosos IRIFs γ H2AX-positivos, se observó un incremento del marcaje difuso, presumiblemente debido al silenciamiento génico de la eucromatina, y la presencia de pequeños focos de heterocromatina nucleoplasmáticos (Fig. 9D-F). Tales focos desaparecieron a partir de las 24h post-RI. Sin embargo, las marcas epigenéticas represoras de la eucromatina, fueron más persistentes en el tiempo (Fig. 9G-R).

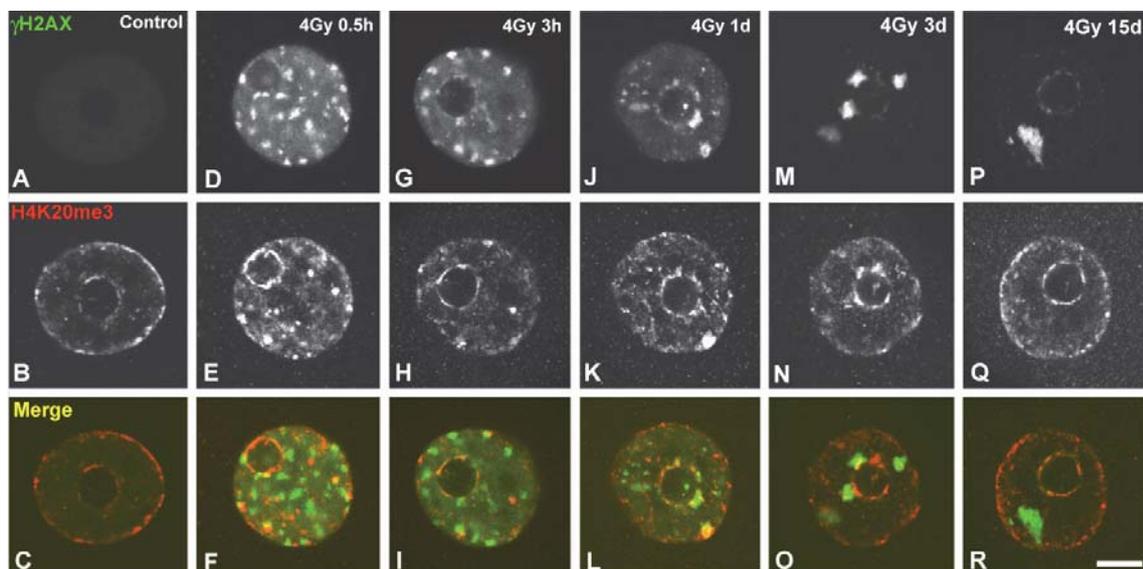


Figura 9. El daño al DNA post-RI produce cambios epigenéticos en la cromatina. En A-C. la neurona control exhibe un ligero marcaje de la H4K20me3 en la periferia nuclear y unos pequeños agregados perinucleolares de heterocromatina. La expresión de la γ H2AX es negativa. D-F. Tras 0,5h post-RI, la inmunofluorescencia muestra reordenación de la cromatina, formando muchos focos de heterocromatina en el nucleoplasma y alrededor del nucleolo. La mayoría de los focos γ H2AX-positivos se localizan en áreas H4K20me3-negativas. G-R. El patrón de distribución de la cromatina se va normalizando progresivamente. Barra de medida 5 μ m.

Respecto a la relación espacial de la heterocromatina con los IRIFs de DNA dañado observamos que si bien algunos focos colocalizaban parcialmente, el patrón predominante era la ausencia de asociación entre los agregados de heterocromatina (H4K20me3-positivos) y los IRIFs del DNA dañado inmunomarcados para la γ H2AX (Fig. 9D-F). En resumen, estos resultados demuestran que la RI incrementa de forma transitoria la expresión de la marca epigenética represiva H4K20Me3, en paralelo con la dramática inhibición temprana de la transcripción. Sin embargo, la mayoría de los IRIFs de DNA dañado carecían de signos de heterocromatinización y no fueron inmunomarcados con el anticuerpo que reconoce la H4K20me3.

El daño al DNA también indujo cambios transitorios en la expresión de la histona H4Ac, un marcador epigenético de dominios de cromatina activa. Como muestra la figura 10A, en las neuronas control se detectó un fuerte inmunomarcaje para la H4Ac en todo el núcleo, excluyendo el nucleolo y unos pequeños dominios irregulares correspondientes a las áreas enriquecidas en factores de "splicing" o "speckles" nucleares (Lafarga y cols., 2009). En condiciones normales, esta histona acetilada forma numerosos microfocos correspondientes a dominios de cromatina activa que agrupan genes transcripcionalmente activos que comparten factorías de transcripción (Fig.10A). Sin embargo, después de 0,5h post-RI, la señal H4Ac disminuye dramáticamente, no forma focos y en su lugar se distribuye difusamente por el nucleoplasma (Fig. 10B). A partir de 1d post-RI la expresión de la H4Ac recupera su patrón característico y de nuevo las neuronas exhiben un patrón de cromatina transcripcionalmente activa idéntico al de las neuronas que no habían recibido RI (Fig. 10D-F). Un observación interesante fue que aunque los IRIFs γ H2AX-positivos quedaban excluidos de la cromatina acetilada, con frecuencia asociaban algunos focos de transcripción activa (Fig. 10G-I).

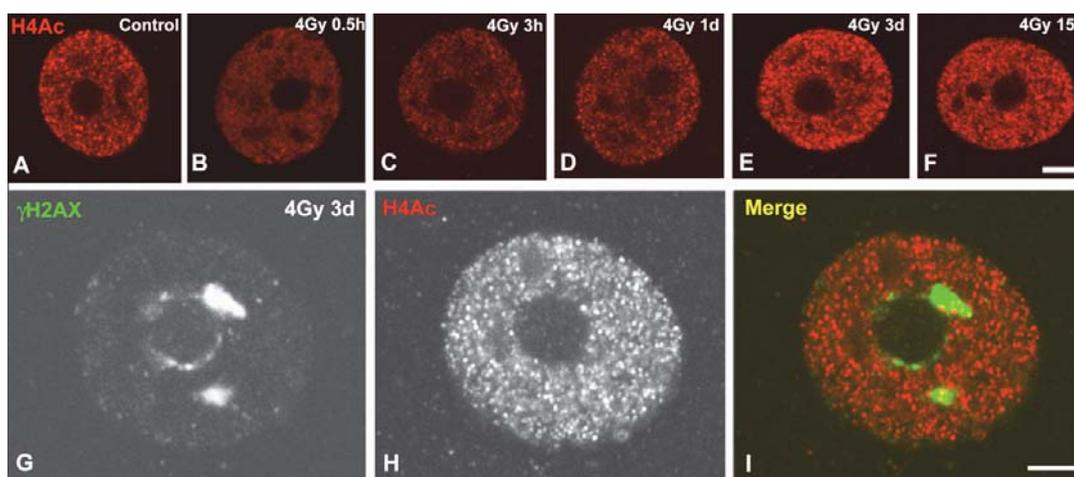


Figura 10. El daño del DNA post-RI produce cambios epigenéticos en la configuración eucromatinica. A-F. Ejemplos representativos de la distribución nuclear de la H4Ac en una célula control y en varios tiempos post-RI. **A.** En el control se observa un patrón punteado que representa grupos de genes activados transcripcionalmente. **B-C.** La intensidad de la señal disminuye de forma dramática tras 0,5h y 3h post-RI. **C-F.** El patrón granuloso típico se va recuperando progresivamente. **G-I.** Co-inmunofluorescencia de la γ H2AX y la H4Ac que revela la asociación de los microfocos H4Ac-positivos con los IRIFs generados a los 3d post-RI. Barras de medida A-C 5 μ m; G-C 3 μ m.

4.1.6 Los IRIFs de DNA dañado reclutan componentes de la vía ubiquitina-proteasoma

La participación de la vía ubiquitina-proteasoma (VUP) en la reparación homóloga del daño del DNA ha sido ampliamente estudiada (ver Finley, 2012), pero su implicación funcional a nivel de la NHEJ en células post-mitóticas es menos conocida. Por esta razón, nos pareció importante investigar en las neuronas sensitivas el comportamiento de la VUP en relación con los IRIFs transitorios (3h) y permanentes (15d). Nuestros resultados demuestran que ambos tipos de IRIFs están enriquecidos en el proteasoma catalítico 20S (Fig. 11 A-F) y en proteínas ubiquitiladas (Fig. 11 G-L), sugiriendo que la VUP está íntimamente relacionada en la reparación del DNA post-RI. Este resultado abre una vía de experimentación muy importante, particularmente orientada a conocer la dinámica de la reparación en las neuronas sensitivas en situación de déficit del proteasoma catalítico. Como ya hemos comentado anteriormente, en condiciones fisiológicas las neuronas sensitivas exhiben DSBs espontáneas como consecuencia de su propio metabolismo oxidativo. Tomando como modelo biológico dicho proceso, nos propusimos como segundo objetivo del presente proyecto de Tesis Doctoral estudiar la repercusión que la inhibición del proteasoma catalítico tiene en la proteostasis global de las neuronas sensitivas y, en particular, en la reparación del DNA dañado espontáneamente por agentes endógenos.

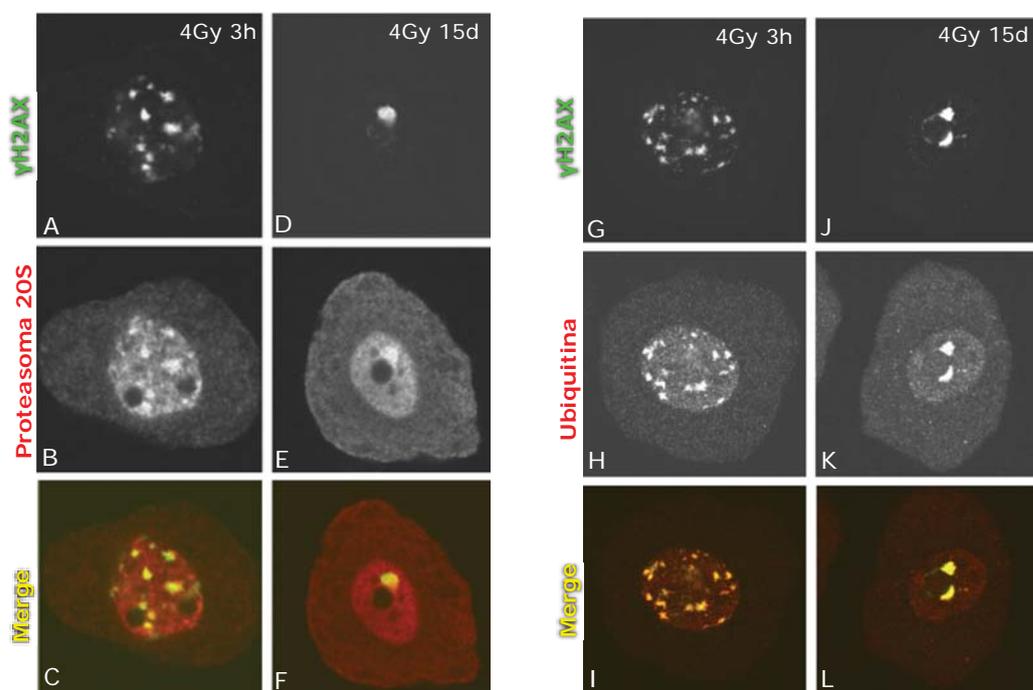


Figura 11. El daño del DNA recluta proteasoma 20S y ubiquitina. Co-inmunofluorescencia de la γ H2AX combinada con proteasoma 20S y ubiquitina en neuronas tras 3h post-RI (**A-C, G-I**) en la que se observa que los IRIF tempranos γ H2AX-positivos colocalizan con el proteasoma 20S (**A-C**) y con ubiquitina (**G-I**). El mismo co-inmunomarcage para neuronas de 15d post-RI muestra que los IRIFs permanentes siguen reclutando proteasoma 20S (**D-F**) y ubiquitina (**J-L**). Barra de medida 5 μ m.

4.2 RESPUESTA DE LAS NEURONAS SENSITIVAS DE TIPO A AL ESTRÉS INDUCIDO POR LA INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA

4.2.1 Planteamiento del trabajo

La proteólisis nuclear mediada por la VUP es fundamental para controlar la calidad y el “turnover” de las proteínas de vida media corta, principalmente de factores reguladores de la transcripción y del “splicing” (Lafarga y cols., 2002; von Mikecz, 2006). De hecho, estudios realizados en el sistema nervioso han demostrado que la disfunción en la actividad del proteasoma 20S se asocia con el envejecimiento neuronal precoz y la neurodegeneración (Rubinztstein, 2006). Por tanto, estudiar la repercusión de la inhibición del proteasoma 20S en las neuronas sensitivas de tipo A de la rata, con una tasa transcripcional y traduccional muy alta, nos permitirá conocer la respuesta celular al estrés generado por la disfunción de la proteostasis. Como inhibidor del proteasoma hemos elegido el bortezomib (Btz), por ser un fármaco utilizado en la clínica humana y porque actúa específicamente inhibiendo la proteasa $\beta 5$ con capacidad quimiotripsina y, en menor medida, la subunidad $\beta 1$, que actúa a modo de caspasa (Fig. 12). Como ya hemos comentado en la introducción, este fármaco es utilizado en la clínica humana como quimioterápico principalmente en el tratamiento del mieloma múltiple refractario y en el linfoma del manto (Adams, 2004; Richardson y cols., 2006; Argyriou y cols., 2012). El sistema nervioso periférico (SNP) es particularmente vulnerable al efecto tóxico del Btz ya que al carecer de barrera hematoencefálica es muy accesible a las neuronas que pueden ser fácilmente dañadas (Cavaletti y cols., 2007; Carozzi y cols., 2010). En consecuencia, desarrollar este estudio tiene también interés biomédico para avanzar en el conocimiento fisiopatológico de la neuropatía periférica que padecen los pacientes tratados con este quimioterápico (Argyriou y cols., 2012; Jia y Liu., 2013).

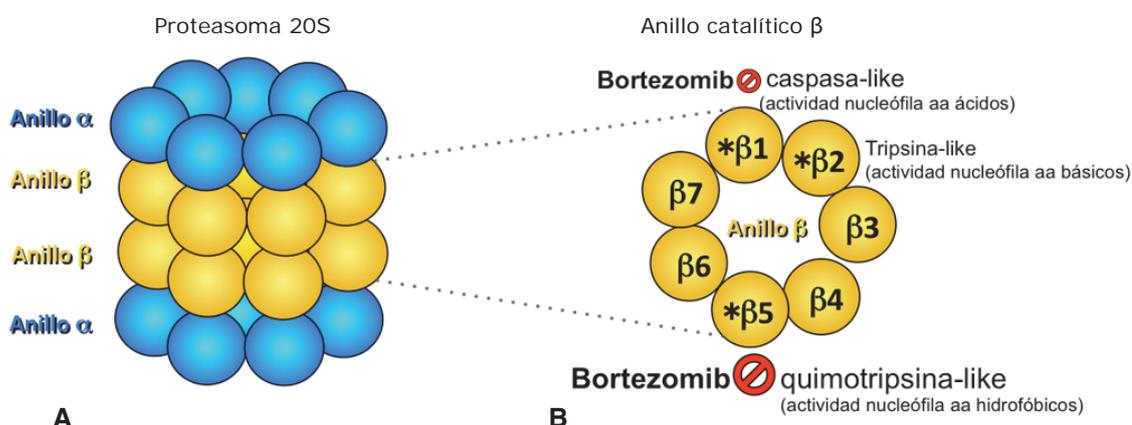


Figura 12. Esquema ilustrativo del proteasoma catalítico 20S. **A.** Unidad catalítica 20S constituida por 4 anillos, dos anillos α (azul) y dos β (amarillo); a su vez, cada anillo lo conforman 7 subunidades. Los dos anillos centrales β forman la cámara proteolítica y los periféricos son reguladores de la entrada de los sustratos al interior. **B.** Ilustra la disposición de las 3 subunidades catalíticas en uno de los dos anillos β (asteriscos). Se señalan las proteasas específicamente inhibidas por el bortezomib.

Tal y como hemos planteado en el apartado de los objetivos, nos parece de gran interés estudiar los efectos del Btz sobre la organización nuclear. Particularmente, si induce cambios en la posición, forma y polaridad del núcleo y en la maquinaria de síntesis de proteínas, y si provoca lesiones en el DNA. Asimismo, investigaremos posibles mecanismos de neuroprotección frente al estrés proteotóxico inducido por la inhibición del proteasoma.

4.2.2 La inhibición del proteasoma induce cambios en la posición, forma y polaridad nuclear y afecta a los grumos de Nissl citoplasmáticos

Como se describe en detalle en el capítulo de los métodos, hemos utilizado como modelo experimental ratas Sprague-Dawley tratadas con dos dosis de Btz de 0,2mg/kg (dosis baja, Btz-DB) o con dos dosis de 0,5mg/kg (dosis alta, Btz-DA). En primer lugar comprobamos que el inhibidor del proteasoma se toleraba bien y no producía la muerte de los animales de experimentación. Seguidamente procedimos a estudiar si el fármaco provocaba cambios en la organización nuclear de las neuronas de tipo A y, de ser así, si éstos eran dependientes de la dosis administrada. Con este fin utilizamos como marcadores nucleares el PI, que se une a los ácidos nucleicos, y la lámina B1 como componente esencial de la lámina nuclear de la envoltura nuclear. La simple observación microscópica reveló que el núcleo central de las neuronas control se desplazaba hacia una posición excéntrica en muchas neuronas tratadas con Btz (Fig. 13A-C). Dicha observación fue validada por un estudio cuantitativo que demostró que la excentricidad nuclear era dependiente de la dosis administrada, alcanzando en las neuronas expuestas a Btz-DA un 38%; si bien en las tratadas con Btz-DB no superó el 25% y en los controles la excentricidad nuclear fue excepcional (Fig. 13H). Asimismo, el doble marcaje con IP e inmunofluorescencia para lámina B1, como marcador de la lámina nuclear, reveló el característico perfil redondeado y liso de los núcleos de las neuronas control, mientras que el Btz provocaba la formación de numerosos pliegues en la envoltura nuclear. Este hallazgo fue más evidente cuando las neuronas recibían Btz-DA y se acompañaba, además, de excentricidad nuclear y disolución de los grumos de Nissl en el citoplasma, cromatolisis (Fig. 13C, F). Sorprendentemente, incluso en las neuronas más afectadas, los nucleolos aparecían bien preservados sugiriendo que esta organela era menos vulnerable al efecto del Btz. La ganancia de envoltura nuclear y su relación con la dosis de Btz administrada fue confirmada analizando la expresión de la lámina B1 por western blotting (Fig. 13G).

Con el fin de conocer si el incremento de la membrana nuclear modificaba la expresión de las nucleoporinas (Nups) del complejo del poro nuclear (CNP), realizamos un estudio de microscopía confocal que demostró que las zonas plegadas de la membrana nuclear presentaban una elevada concentración de dichas proteínas (Fig. 13F), sugiriendo que a este nivel se organizaban numerosos poros nucleares. Este hallazgo sugiere que si bien la inhibición del proteasoma altera la morfología nuclear, no parece comprometer el tráfico bidireccional entre el núcleo y el citoplasma. Otro aspecto que puede deducirse de

estos resultados es que el plegamiento de la envoltura no era aleatorio y estaba polarizado: el polo nuclear liso se orientaba hacia la periferia de la célula y el polo plegado, con invaginaciones de la envoltura nuclear, lo hacía hacia la parte central del citoplasma (Fig. 13C, F y Fig. 14C).

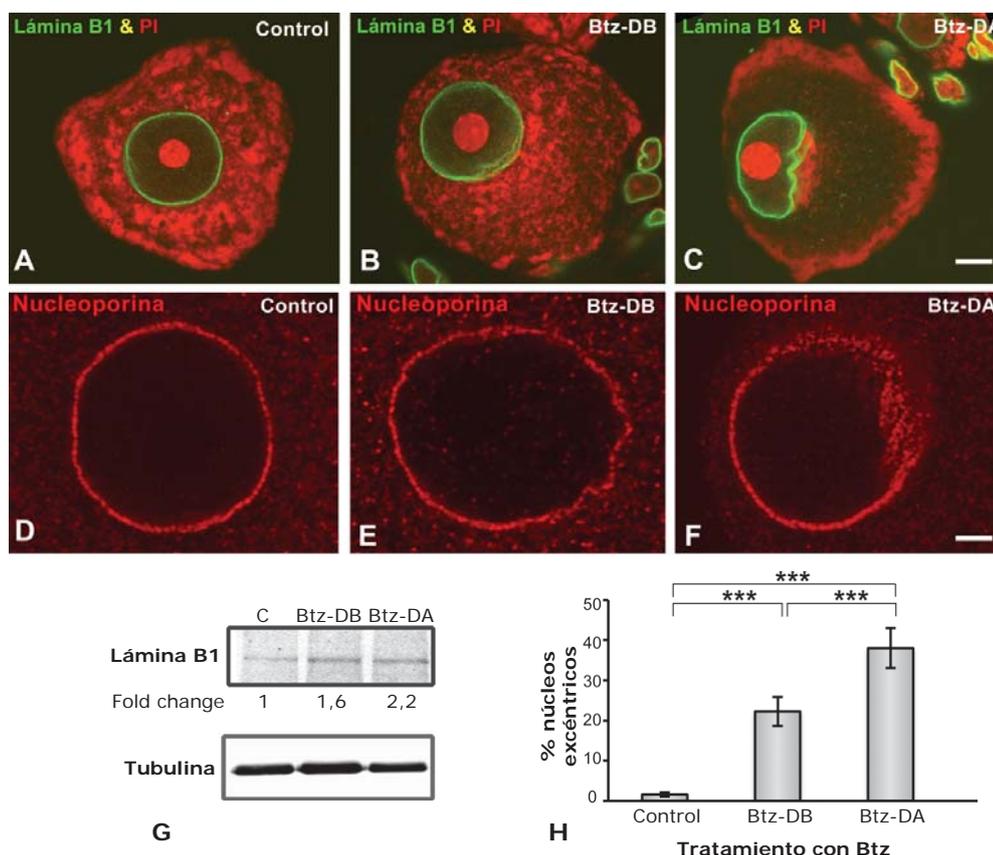


Figura 13. Cambios citoarquitectónicos del núcleo neuronal inducidos por el Btz. **A.** La inmunodetección de la lámina B1 perfila en el control un núcleo redondeado y liso. El PI marca un nucleolo prominente y la distribución típica de los grumos de Nissl citoplasmáticos. **B-C.** El Btz induce plegamiento polarizado de la envoltura hacia la parte central del citoplasma y el PI demuestra cromatolisis central. Nótese cómo el nucleolo no parece estar afectado por el fármaco. **D-F.** Inmunomarcado de las nucleoporinas distribuidas homogéneamente por el contorno nuclear control (**C**). **E-F.** El Btz no disminuye la expresión de las nucleoporinas e incluso en la neurona tratada con Btz-DA (**F**) se observa un incremento en el polo plegado. **G.** El western blotting confirma incremento de lámina B1 en las neuronas tratadas con Btz de forma dosis-dependiente. **H.** El histograma ilustra cómo Btz conlleva excentricidad nuclear dosis-dependiente. Obteniéndose, en ambos casos, diferencias estadísticamente significativas si se compara con el control. Los datos se expresan como media \pm SD *** p <0,001. Barra de medida A-C 5 μ m; D-F 3 μ m.

Los cambios en la morfología nuclear inducidos por el Btz fueron confirmados mediante un estudio con microscopía electrónica de transmisión que demostró que las neuronas tratadas con Btz exhibían irregularidades de la envoltura nuclear en un polo nuclear (Fig. 14B-C), siendo éstas mucho más pronunciadas en los núcleos de las neuronas tratadas con dosis altas del fármaco (Fig. 14C). Para cuantificar las alteraciones en la forma del núcleo inducidas por la inhibición del proteasoma, analizamos el factor de forma nuclear

(factor de circularidad) utilizando imágenes de microscopía electrónica. Dado que las neuronas de tipo A suelen tener un nucleolo situado en el centro del núcleo (Pena y cols., 2001) utilizamos este parámetro para seleccionar las imágenes en las que se determinó el factor de forma. Para estimar este factor se considera que un círculo perfecto es uno. Teóricamente, a este valor deberían de aproximarse los núcleos control ya que habitualmente son redondeados y lisos. Sin embargo, cuando el valor del factor de forma se aleja de la unidad indica que las formas nucleares son cada vez más irregulares, lo que supuestamente se correspondería con los núcleos tratados con Btz. En efecto, el factor de forma medio obtenido en las neuronas tratadas era significativamente menor que en las neuronas controles y esta reducción fue dosis dependiente (Fig. 14D). Estos resultados apoyan la participación del proteasoma en el control de la morfología y posición del núcleo celular.

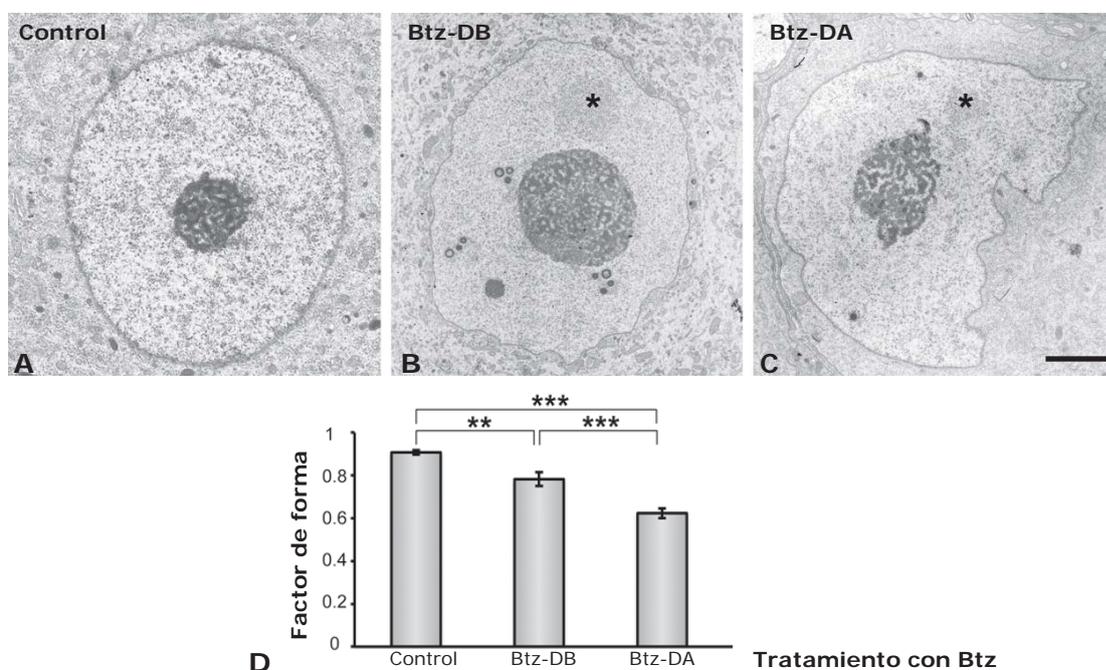


Figura 14. Ultraestructura de la forma nuclear. La neurona control muestra un núcleo redondeado y una configuración bastante eucromática. **B-C.** El tratamiento con Btz induce irregularidades del contorno nuclear, desplazamiento a la periferia y mayor eucromatinización que la neurona control. Los asteriscos en **B** y **C** señalan agregados de granulaciones intercromatínicas (conocidos a microscopía óptica como "speckles nucleares"). **D.** Gráfica que documenta los cambios en la forma nuclear de los núcleos tratados con Btz. Para este estudio morfométrico se analizó el factor de forma nuclear (media \pm SD; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Barra de medida $3\mu\text{m}$.

Otro aspecto interesante revelado por la microscopía electrónica fue que la inhibición del proteasoma induce la formación de cuerpos nucleares con forma anulada y de tamaño variable (Fig. 15A-C). Dichos cuerpos podían aparecer solos o, más frecuentemente, formando agrupaciones nucleares. Están formados por un anillo muy electrodensos que engloba una región central ocupada por un material amorfo de baja densidad electrónica (Fig. 15C). Estos anillos han sido previamente identificados en nuestro laboratorio como

cuerpos de poli(A) debido a su enriquecimiento en RNAs poliadenilados (Casafont y cols., 2010). Aunque su naturaleza molecular no es totalmente conocida, probablemente reflejan la retención nuclear de mRNAs en un compartimento nuclear específico. Normalmente, los cuerpos de poli(A) inducidos con el Btz aparecen rodeados de numerosas granulaciones pericromatínicas (Fig. 15B-C). Estas granulaciones son visibles en condiciones fisiológicas pero su número se incrementa en procesos patológicos en los que se altera el procesamiento y la exportación nuclear de los pre-mRNAs, lo que conduce a su retención en granulaciones pericromatínicas (Casafont y cols., 2006).

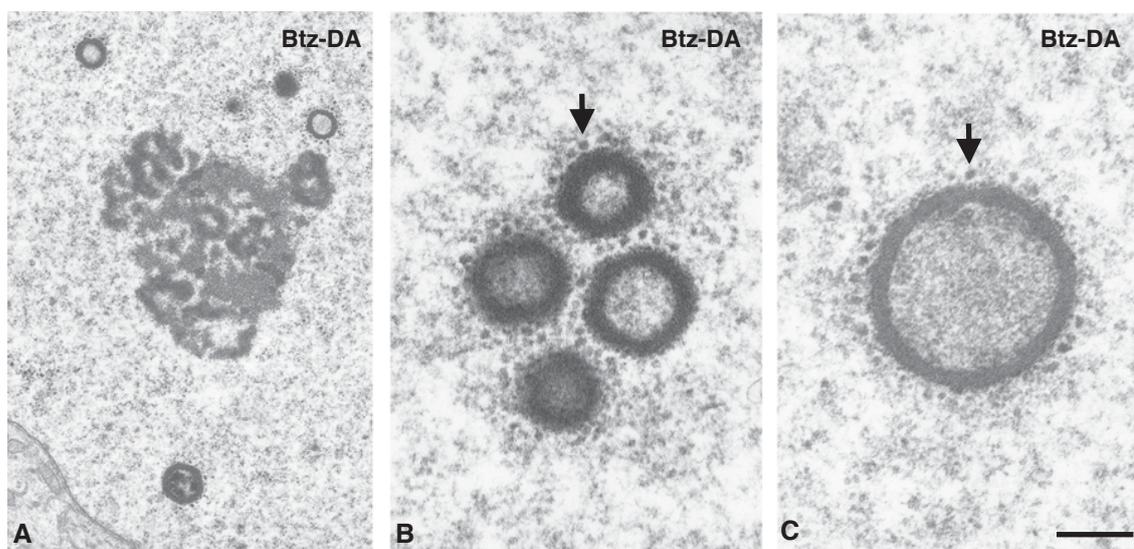


Figura 15. Microscopía electrónica de cuerpos nucleares anulados inducidos por el Btz. **A.** Imagen panorámica de un núcleo que muestra varios cuerpos nucleares anulados distribuidos por el nucleoplasma en una neurona tratada con Btz. Estos cuerpos muestran una morfología en anillo. **B.** Ilustra un agregado de cuerpos anulados. **C.** Detalle de la estructura de un anillo a alta resolución. Como muestra la imagen, dispone de una cubierta externa de un material muy electrodensó y una región central más pálida formada por un material más amorfo. Característicamente, los cuerpos en anillo asocian numerosas granulaciones pericromatínicas (**B-C**), algunas de las cuales se señalan con flechas. Barras de medida A 1,2 μ m; B 300nm; C 250nm.

Dado que, en los animales tratados con Btz, el marcaje con PI muestra la desaparición de los grumos de Nissl en la porción central del soma neuronal, un proceso conocido como cromatolisis central (Fig. 13A-C), nos pareció importante confirmarlo con microscopía electrónica de transmisión. La cromatolisis central es un signo patognomónico de disfunción neuronal severa, se produce por la disolución de los grumos de Nissl en los que se organiza el retículo endoplásmico rugoso (RER) y los polirribosomas libres. En nuestro modelo experimental la microscopía electrónica reveló que, efectivamente, el Btz induce, en mayor y menor grado, la desestructuración de la maquinaria de síntesis de proteínas. Así, a diferencia de las neuronas control que mostraban los característicos grumos de Nissl formados por agrupaciones de RER (Fig. 16A-B), en muchas neuronas tratadas con Btz, particularmente en aquellas que mostraban excentricidad nuclear y pliegues nucleares, se observó una pérdida severa de cisternas de RER y polirribosomas libres, mostrando el

citoplasma un aspecto pálido en el que destacaban la abundancia de neurofilamentos y las mitocondrias (Fig. 16C-D). Este resultado claramente indica que la inhibición del proteasoma afecta a la maquinaria de traducción de los mRNAs.

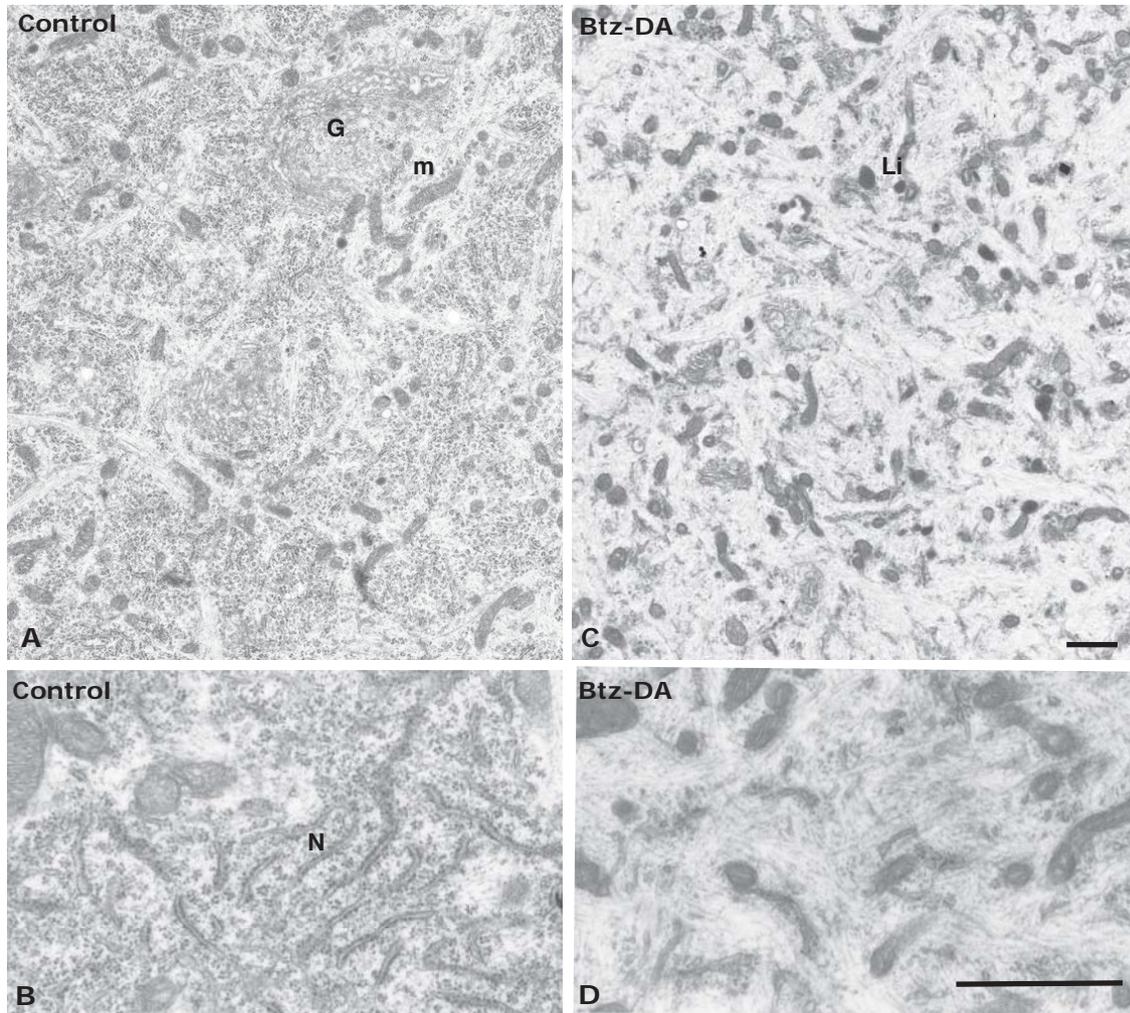


Figura 16. Microscopía electrónica que ilustra la disfunción de los grumos de Nissl inducidos por el Btz. **A.** Fragmento citoplasmático de una neurona control que presenta la organización característica de los grumos de Nissl (N). Entre los grumos de Nissl se organizan los complejos de Golgi (G) y numerosas mitocondrias (m). **B.** Detalle de un grumo de Nissl constituido por cisternas de RER y polirribosomas libres. **C.** En la neurona tratada, los grumos de Nissl desaparecen (cromatolisis) pero las mitocondrias, los complejos de Golgi y los lisosomas (Li) se encuentran conservados. **D.** Detalle que ilustra cómo el Btz provoca la desaparición del RER pero los elementos del citoesqueleto aparecen preservados. Barra de medida 1 μ m.

Para profundizar en el efecto de la desestructuración del RER (cromatolisis) sobre la síntesis de proteínas, analizamos por western blotting la expresión de factor neurotrófico BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor). Como se muestra en la Figura 17, el tratamiento con Btz reduce significativamente los niveles de esta proteína. El BDNF es un factor que se acumula en el RER de las neuronas sensitivas (Binder y Scharfman, 2004), por tanto su reducción puede utilizarse como un indicador de que el Btz produce disfunción en la síntesis

global de proteínas. Además, dado que BDNF es una neurotrofina que favorece la supervivencia y actividad funcional en esta población neuronal (Binder y Scharfman, 2004), la caída de su expresión podría ser un componente importante en la etiopatogenia de la neuropatía periférica inducida con el Btz.



Figura 17. Western blotting que demuestra que la inhibición del proteasoma reduce los niveles de expresión de la proteína BDNF.

Sobre la base de que durante la neurogénesis la polaridad nuclear requerida para la migración de los neuroblastos está determinada por la localización del centrosoma (Holcomb y cols., 2013), decidimos investigar si la excentricidad nuclear inducida por Btz se debía a un cambio posicional del centrosoma. Para comprobar esta hipótesis co-inmunodetectamos la proteína centrosomal γ -tubulina y, como marcador posicional del núcleo celular, la lámina B1. Mediante la observación directa con microscopía de fluorescencia verificamos que todas las neuronas controles y tratadas con el inhibidor del proteasoma presentaban el centrosoma muy próximo al polo nuclear plegado (Fig. 18A-B). De hecho, la distancia mínima entre el centrosoma y la envoltura nuclear nunca superó $4\mu\text{m}$ ni en las neuronas control ni en las tratadas con Btz. Esto indica que el desplazamiento nuclear y del centrosoma se producían en paralelo.

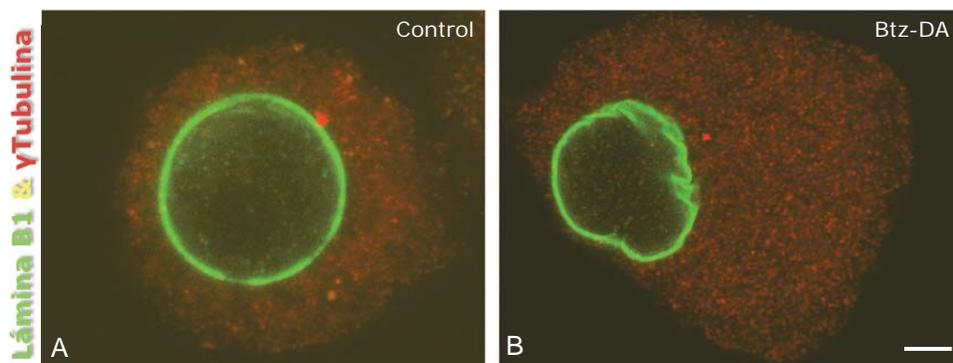


Figura 18. La excentricidad nuclear inducida por el Btz no depende de la localización del centrosoma. La co-inmunodetección de la lámina B1 y de la γ -tubulina muestra que, tanto en la neurona control (A) como en la tratada (B), la disposición del centrosoma es adyacente o muy cercana al núcleo neuronal. Barra de medida $5\mu\text{m}$.

En su conjunto estos resultados indican que el tratamiento con Btz ejerce en las neuronas sensitivas un efecto dual. Por un lado induce signos de disfunción neuronal, tales como excentricidad nuclear, disgregación de la maquinaria de la síntesis de proteínas (cromatolisis central) y reducción en la expresión de la proteína BDNF; pero a su vez, también produce signos de neuroprotección, particularmente la formación de pliegues de la envoltura nuclear que incrementan la cantidad de poros nucleares para favorecer el tráfico molecular bidireccional entre el núcleo y el citoplasma.

4.2.3 El tratamiento con Btz induce rotura de la doble cadena en el DNA sin comprometer la supervivencia neuronal

Es bien conocido que la actividad catalítica del proteasoma es requerida en la respuesta al daño del DNA inducido endógena- o exógenamente (Jacquemont y Taniguchi, 2007; Sakasai y cols., 2010). De hecho, la inhibición del proteasoma 20S produce defectos en la autofosforilación de la quinasa ATM implicada en la DDR lo que, consecuentemente, retarda la aparición de los focos de daño generados por RI (Sakasai y cols., 2010). En este contexto, nos pareció muy importante investigar si la inhibición del proteasoma induce en las neuronas sensitivas lesiones en el DNA. Para demostrarlo inmunodetectamos la histona nucleosomal γ H2AX en disociados neuronales. En nuestras observaciones con microscopía confocal, los focos nucleares γ H2AX-positivos fueron muy raramente encontrados en neuronas control (Fig. 19A). Sin embargo, muchas de las neuronas tratadas con Btz mostraban focos de daño en el DNA (Bortezomib-Induced Foci, Btz-IF) distribuidos por todo el nucleoplasma excluyendo el nucleolo (Fig. 19B-C). Por lo general, los Btz-IFs eran muy numerosos y de pequeño tamaño, aunque, en algunos casos, observamos Btz-IF grandes frecuentemente asociados al nucleolo o a la envoltura nuclear (Fig. 21A). Estos focos grandes recordaban por su tamaño y distribución a los IRIFs persistentes, que presentaban las neuronas sensitivas después de 15d post-RI, descritos en el apartado anterior. Mayoritariamente, los núcleos con Btz-IFs correspondían a neuronas que mostraban excentricidad nuclear y/o cromatolisis central y habían sido tratadas con Btz-DA. La inducción de la expresión de γ H2AX detectada con inmunofluorescencia fue confirmada por western blotting (Fig. 19D), indicando que la inhibición del proteasoma con Btz provoca daño en el DNA de las neuronas sensoriales.

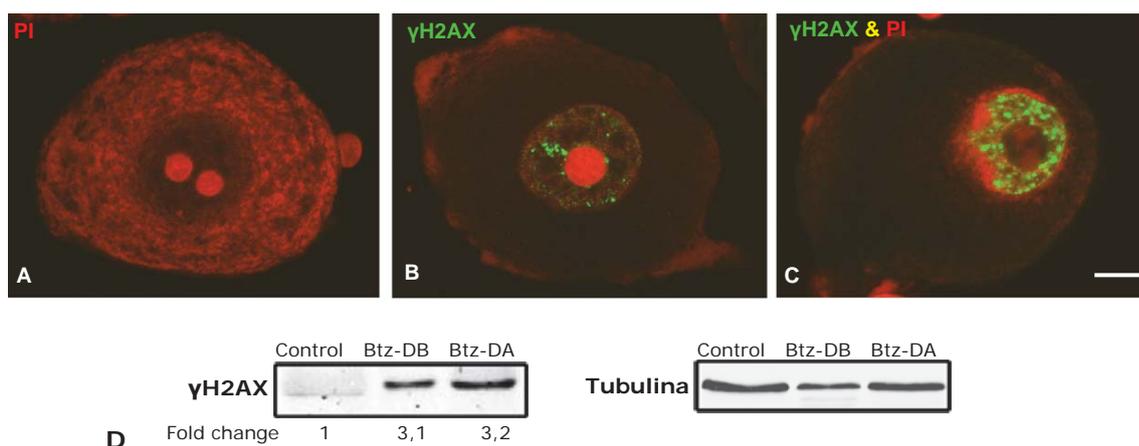


Figura 19. Btz induce daño en el DNA de las neuronas del GT. El marcaje con PI y con γ H2AX ilustra la distribución de los grumos de Nissl y ausencia de daño en el DNA de una neurona control (A). B-C. Se muestran dos neuronas tratadas con Btz en las que la desestructuración de los grumos Nissl se acompaña de daño en el DNA tanto a dosis bajas como a dosis altas. Nótese cómo los RNAs teñidos con PI se acumulan en la cara citoplasmática enriquecida en pliegues de la envoltura nuclear (C). D. El western blotting demuestra la sobreexpresión de la γ H2AX en neuronas tratadas con Btz. Barra de medida 5 μ m.

Por otra parte, el estudio cuantitativo reveló que la vulnerabilidad neuronal al daño en el DNA era dosis dependiente. Así, tanto el porcentaje de neuronas con focos γ H2AX-positivos (Fig. 20A) como el número medio de focos por núcleo (Fig. 20B) fue significativamente mayor en las neuronas expuestas a Btz-DA, en comparación con las neuronas no tratadas o expuestas a Btz-DB.

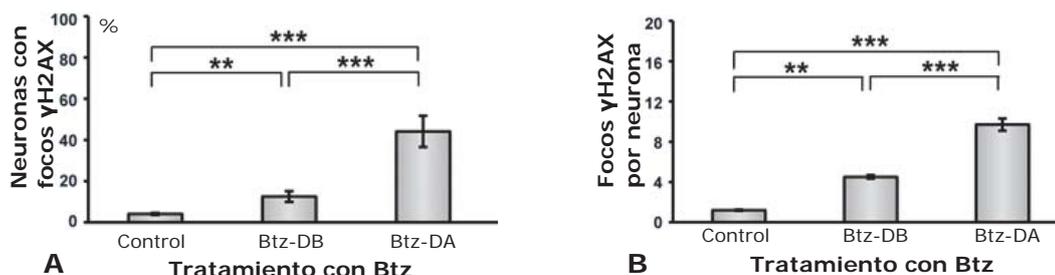


Figura 20. Análisis cuantitativo de los Btz-IFs. **A.** Proporción de neuronas que contienen focos γ H2AX positivos. El Btz induce focos de daño de forma dosis-dependiente. **B.** Ilustra el número de focos por núcleo en neuronas control y tratadas. De forma directamente proporcional a la dosis el tratamiento con Btz incrementa el número de Btz-IF. Los asteriscos indican el p-valor, siendo ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Nuestra siguiente cuestión fue analizar si los focos γ H2AX-positivos estaban implicados en la reparación del DNA. Para ello, co-inmunodetectamos γ H2AX y la proteína reparadora 53BP1 (Fig. 21A-C). Como muestra esta figura, la inhibición del proteasoma no interfería el reclutamiento y la concentración de 53BP1 en los Btz-IFs grandes (Fig. 21A-C). Sin embargo, fue muy interesante comprobar que la mayoría de los micro-Btz-IFs no reclutaban la proteína reparadora (Fig. 21C). Desde un punto de vista funcional este resultado puede indicar que la inhibición del proteasoma no impide la activación del sensor de lesión del DNA (γ H2AX) pero podría producir un efecto “downstream” que podría afectar al reclutamiento de la maquinaria reparadora lo que, presumiblemente, justificaría la acumulación de lesiones no reparadas del DNA.

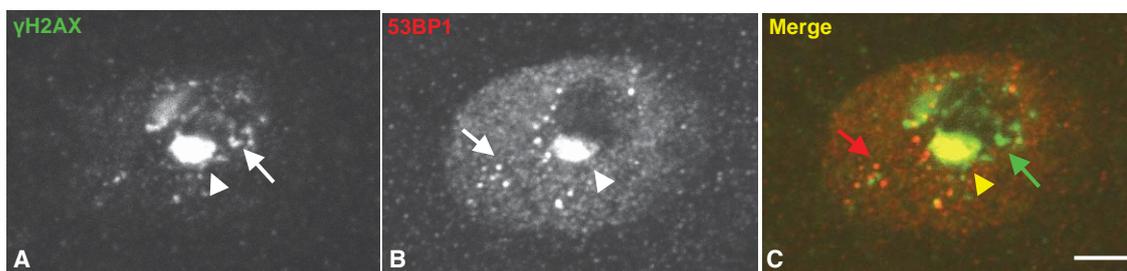


Figura 21. El Btz desregula el reclutamiento de 53BP1 en los focos γ H2AX-positivos de daño en el DNA. **A.** La inmunodetección de γ H2AX demuestra que el Btz induce la génesis de pequeños focos de DNA dañado (Btz-IFs) distribuidos por el nucleoplasma (flecha) y formando un Btz-IF grande asociado al nucleolo (cabeza de flecha). **B.** Ilustra cómo la proteína efectora de la respuesta al daño en el DNA (DDR), la proteína 53BP1 aparece difusamente distribuida por el nucleoplasma, formando pequeños agregados (flecha) y concentrada en el Btz-IF grande (cabeza de flecha). **C.** La mezcla de canales ilustra la co-localización de γ H2AX y de la 53BP1 en el Btz-IF (cabeza de flecha) pero en la mayoría de los los Btz-IFs- γ H2AX-positivos pequeños (flecha verde) y de los 53BP1-positivos (flecha roja) permanecen independientes. Barra de medida 5 μ m.

Para investigar si el daño del DNA inducido por Btz desencadenaba la muerte celular por apoptosis, realizamos el ensayo del TUNEL en disociados de neuronas control y tratadas con Btz. En ningún caso se observaron neuronas TUNEL-positivas, indicando que las dosis de Btz administradas en nuestro modelo experimental no inducen muerte neuronal por apoptosis (Fig. 22A). Como control positivo de la eficiencia de la técnica utilizamos disociados celulares de timo de rata en los que normalmente se observan apoptosis de los linfoblastos que han experimentado la selección clonal negativa (Fig. 22B).

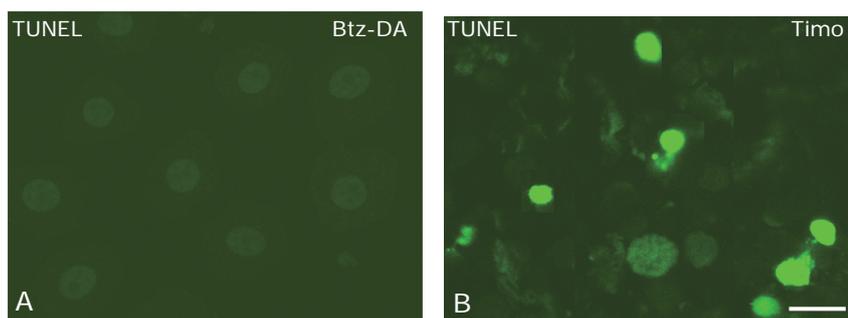


Figura 22. Btz no induce degeneración neuronal. **A.** Imagen que ilustra con la técnica del TUNEL que el Btz no induce degeneración neuronal por apoptosis. **B.** Corteza tímica utilizada como control positivo para la técnica del TUNEL que presenta varios linfoblastos apoptóticos. Barra de medida 25 μ m.

En su conjunto estos resultados tienen gran interés biomédico puesto que el Btz genera un estrés proteotóxico que nos lleva a una disyuntiva fisiopatológica: por una parte la inhibición del proteasoma provoca en las neuronas sensitivas la acumulación de lesiones en el DNA y cromatolisis central; pero, por otra, el estrés proteotóxico no conduce a la degeneración y muerte neuronal. Por tanto, es evidente que las neuronas sensitivas deben de desarrollar mecanismos neuroprotectores que garanticen su supervivencia. De hecho, los enfermos tratados con Btz soportan durante años el tratamiento con este fármaco.

4.2.4 Respuesta neuroprotectora a la inhibición del proteasoma

Una vez establecido que el tratamiento con Btz, a las dosis utilizadas, no afectaba a la supervivencia de las neuronas ganglionares sensitivas, decidimos investigar potenciales mecanismos neuroprotectores desarrollados a nivel nuclear y citoplasmático que pudieran justificar la plasticidad neuronal necesaria para responder al estrés proteotóxico.

Un posible mecanismo neuroprotector podría ser el mantenimiento de la actividad transcripcional basal. Para investigar esta hipótesis, utilizamos el ensayo de transcripción *in vivo* basado en la incorporación de 5'-FU en los RNAs nacientes tras un pulso de exposición al precursor de 1h (Casafont y cols., 2006). Nuestros resultados muestran que tanto en las neuronas control como en las tratadas con el Btz presentaban un patrón similar de incorporación de 5'-FU, la señal de incorporación se concentraba en el nucleolo y en numerosos focos de transcripción extranucleolares distribuidos por todo el núcleo (Fig. 23A-B). No obstante, la densidad de focos de transcripción fue aparentemente menor en las

neuronas tratadas que en las controles. Esta observación fue validada mediante inmunoelectrónica, utilizando partículas de oro coloidal conjugadas con el anticuerpo secundario para visualizar los sitios de incorporación de la 5'-FU (Casafont y cols., 2006). Como era de esperar, las partículas de oro coloidal decoraban dominios de eucromatina transcripcionalmente activa. Sin embargo, la densidad de partículas era claramente mayor en la eucromatina de las neuronas control (Fig. 23C) que en las expuestas al inhibidor del proteasoma (Fig. 23D). No obstante, incluso las neuronas con una severa disfunción (cromatolisis) preservaban un nivel considerable de transcripción. En conclusión, tras el tratamiento con Btz, las neuronas reducen la actividad transcripcional global, pero manteniendo una tasa de transcripción suficiente para garantizar el metabolismo y la supervivencia neuronal.

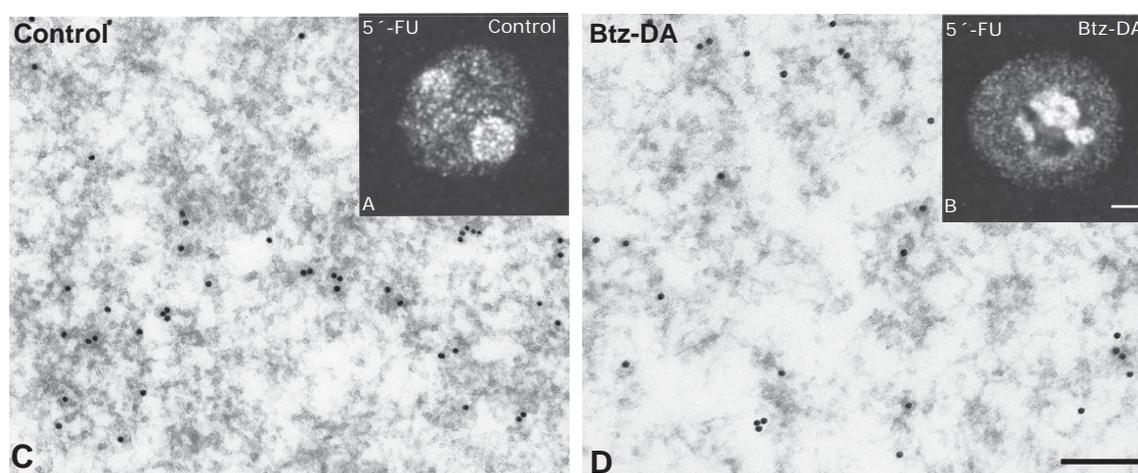


Figura 23. Ensayo de transcripción *in vivo* del nucleótido 5'-FU a nivel de microscopía óptica y electrónica. **A, C.** Neurona control que muestra alta tasa de incorporación del nucleótido a nivel nucleolar (**A**) y nucleoplasmático (**C**). Los RNAs nacientes aparecen formando microfocos asociados a los genes transcripcionalmente activos. **B, D.** Neurona tratada con Btz. Obsérvese cómo a pesar de mostrar un patrón similar de marcaje nucleolar (**B**), la densidad de microfocos nucleoplasmáticos enriquecidos en RNAs nacientes es menor (**D**). Barra de medida A-B 4 μ m; C-D 150nm.

El segundo mecanismo nuclear que podría estar implicado en la supervivencia de las neuronas sensitivas tratadas con Btz es que la inhibición del proteasoma retroalimente positivamente la expresión de múltiples genes implicados en la respuesta al estrés proteotóxico, incluyendo los genes que codifican las subunidades del proteasoma. En este sentido, estudios experimentales en modelos celulares han demostrado que la formación de proteasomas se autorregula transcripcionalmente (Meiners y cols., 2003). Así, la inhibición del proteasoma induce la sobreexpresión compensatoria de genes que codifican las subunidades del proteasoma 20S (Steffen y cols., 2010). Sobre la base de estos datos, decidimos analizar con qPCR la expresión génica de dos subunidades del proteasoma 20S, la proteolítica *PSMB5/ β 5*, específicamente inhibida por el Btz, y la estructural *PSMB5/ α 5* en lisados del ganglio del trigémino. Como se muestra en la tabla de la figura 24A, el Btz incrementa significativamente y dosis-dependiente la expresión de ambos genes. Además, mediante western blotting

comprobamos que el aumento de la expresión de *PSMB5/β5* se traducía en un incremento de los niveles de proteína de la subunidad β5 en los ganglios tratados con Btz respecto a los controles, si bien no hubo variaciones de la proteína α5 (Fig. 24A-B). En consecuencia, podemos concluir que el incremento compensatorio de la subunidad catalítica β5 podría contribuir a mantener una actividad proteolítica suficiente para garantizar la supervivencia neuronal.

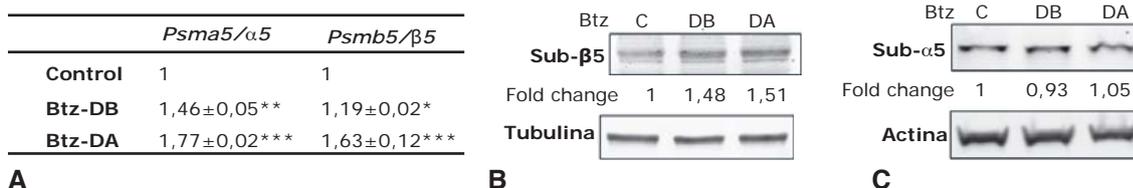


Figura 24. A. La tabla muestra el patrón de expresión génica de las subunidades del proteasoma 20S β5 y α5 en GTs control y tratados con Btz. El Btz produce un incremento significativo en la expresión de ambos genes. **B-C.** Western blotting que demuestra que el Btz induce sobreexpresión de la subunidad β5 (**B**) pero no de la subunidad reguladora α5. (**C**). Valores expresados como media±SD; siendo *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 comparado con el control.

Un dominio celular potencialmente implicado en procesos de neuroprotección y con capacidad de participar en la regulación de la proteostasis es el compartimento perinuclear. Como ya hemos comentado en la introducción, en la actualidad se considera que la envoltura nuclear junto con el microambiente que la rodea constituyen una plataforma multifuncional implicada en múltiples procesos, incluyendo (i) la transferencia de señales desde el citoesqueleto al núcleo, (ii) el intercambio molecular bidireccional entre el núcleo y el citoplasma, (iii) la organización de secuencias génicas específicas asociadas a la lámina nuclear o a los poros nucleares y su regulación transcripcional, (iv) la rápida traducción de algunas proteínas y (v) la estabilidad del genoma (Mekhail y Moazed, 2010; Dauer y Worman, 2009). De hecho, la disrupción del compartimento perinuclear se asocia a diversas enfermedades neuromusculares como la lipodistrofia, la distonía o el envejecimiento precoz (progeria) (Wente y Rout, 2010). Sobre esta base, nos propusimos investigar la organización estructural del dominio perinuclear en las neuronas sensitivas control y en las neuronas con cromatolisis central inducida por la inhibición del proteasoma. Nuestros resultados con microscopía confocal ya indicaban que el microambiente perinuclear era menos vulnerable al efecto proteotóxico del Btz que la zona central del citoplasma. Por ejemplo, en el polo nuclear con invaginaciones de la envoltura nuclear se incrementaba la cantidad de membrana enriquecida en poros nucleares (Fig.13C y F) y la tinción citoquímica con PI mostraba la acumulación focal de RNAs en la cara citoplasmática (Fig. 13C). Sin embargo, para poder conocer la exacta organización del microambiente perinuclear es necesario el análisis ultraestructural. En primer lugar examinamos el patrón de distribución de la cromatina del microambiente perinuclear. Como previamente había sido descrito en nuestro laboratorio (Pena y cols., 2001), las neuronas sensitivas de tipo A del GT control mostraban una configuración preferentemente eucromática con pequeños agregados de heterocromatina

asociados a la envoltura nuclear (Fig. 25A). Curiosamente, la inhibición del proteasoma produjo la decondensación de la heterocromatina periférica que se transformó en dominios de eucromatina (Fig. 25B). Por su parte, la cara citoplasmática de la envoltura nuclear portadora de pliegues mostró una importante reorganización en respuesta a la inhibición del proteasoma, particularmente de la maquinaria de síntesis de proteínas. Así, mientras el citoplasma perinuclear de las neuronas control presentaba cisternas aisladas de RER, dictiosomas de Golgi, lisosomas y mitocondrias, en los pliegues nucleares de las neuronas tratadas se acumulaban gran cantidad de ribosomas pero la pérdida de RER y de dictiosomas de Golgi era muy evidente (Fig. 25B). Además, comprobamos con alta resolución que los ribosomas íntimamente asociados a los poros nucleares no estaban en la forma monomérica sino que formaban las típicas rosetas de polirribosomas o polisomas (Fig. 25D). Aunque la configuración del polirribosoma, por sí misma, representa la asociación de múltiples ribosomas con una molécula de mRNA en proceso de traducción, nos pareció importante validar si los polirribosomas del microambiente perinuclear inducido por el Btz reclutaban mRNAs poliadenilados y si éstos eran RNAs maduros y potencialmente activos en la traducción.

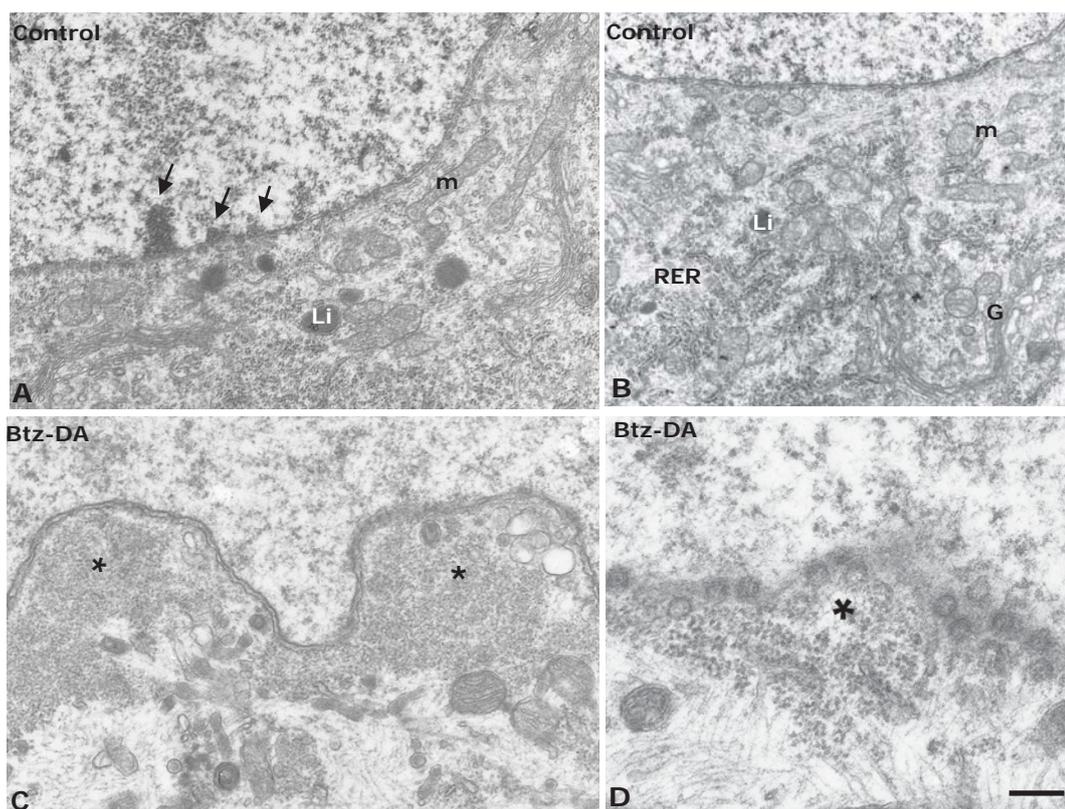


Figura 25. Ultraestructura del microambiente perinuclear. **A.** Región perinuclear control con pequeños agregados periféricos de heterocromatina (flechas). **B.** El citoplasma perinuclear exhibe polirribosomas, cisternas de RER, dictiosomas de Golgi (G), lisosomas (Li) y mitocondrias (m). **C.** Zona perinuclear plegada de una neurona tratada con el Btz. La cromatina perinuclear aparece decondensada y, en los pliegues citoplasmáticos, se acumulan numerosos polirribosomas (asteriscos). **D.** Sección tangencial de la envoltura nuclear que ilustra la gran densidad de poros y la íntima asociación con los polirribosomas. Nótese la ausencia de RER y de dictiosomas de Golgi. Barra de medida A-C 500nm; D 300nm.

La acumulación de mRNAs poliadenilados en el área perinuclear se demostró con hibridación *in situ*, utilizando una sonda de poli(dT) que reconoce la cola de poli(A) RNA de los mRNAs. En las neuronas control, los mRNAs poliadenilados se localizaban difusamente en el nucleoplasma, excluyendo el nucleolo, y aparecían altamente concentrados en los “speckles” nucleares. En el citoplasma, los mRNAs poliadenilados se concentraban en los grumos de Nissl y su densidad decrecía centrípetamente hacia el microambiente perinuclear (Fig. 26A). Este patrón de organización de los mRNAs justifica que la periferia del soma neuronal es una región preferente para la producción de proteínas destinadas a la exportación, a las membranas celulares o sistemas de endomembranas como son los lisosomas (Alberts y cols., 2008). Sin embargo, la zona perinuclear, con menor cantidad de polirribosomas asociados al RE, parece estar más especializada en la síntesis de proteínas para uso intracelular.

La inhibición del proteasoma en las neuronas ganglionares provocó, a nivel nuclear, una reducción global de la señal de hibridación para mRNAs poliadenilados. De hecho, los “speckles” nucleares poli(A) RNA-positivos desaparecieron y los RNAs poliadenilados se reclutaban en los cuerpos poli(A) (Fig. 15; Fig. 26B-C). El Btz también indujo cambios en la distribución de los mRNAs citoplasmáticos. Así, mientras que la extensa zona de cromatolisis central aparecía exenta de señal de hibridación, se observaron importantes acúmulos de RNAs poliadenilados en la zona perinuclear plegada (Fig. 26B y C). Este hallazgo, junto con la abundancia de polirribosomas perinucleares observada a nivel ultraestructural, demuestra que la inhibición del proteasoma induce la formación *de novo* de un dominio perinuclear de síntesis de proteínas. Bajo condiciones de estrés proteotóxico, esta maquinaria perinuclear podría ser esencial para mantener una actividad basal de síntesis de proteínas requerida para la supervivencia neuronal.

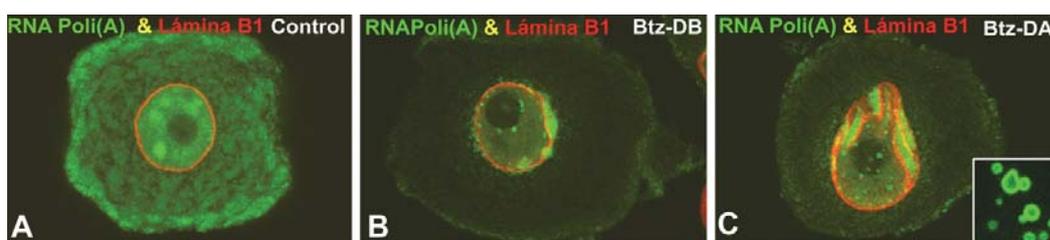


Figura 26. Hibridación *in situ* de RNAs poli(A) e inmunodetección de la lámina B1. A. En el control los RNAs poli(A) se concentran en speckles nucleares y en grumos de Nissl. B-C. Tras el tratamiento, los RNAs poli(A) se acumulan en gránulos de RNA poli(A) (C, recuadro) y en la cara citoplasmática de los pliegues, inmunodetectados con α -lámina B1. Obsérvese en el citoplasma la desaparición de los grumos de Nissl con el tratamiento de Btz. Barra de medida A-C 5 μ m.

Para investigar si los RNAs acumulados en la región perinuclear estaban correctamente poliadenilados estudiamos la expresión de la proteína PABPN1 (Poly(A)-Binding Nuclear Protein 1). Esta proteína está implicada en la poliadenilación y se une a la cola de poli(A) de los mRNAs. La unión de PABPN1 a los mRNAs es necesaria para su estabilidad, su exportación y el inicio de la traducción de las proteínas en el citoplasma (Kuhn y Whale, 2004). Los experimentos de doble inmunofluorescencia para la PABPN1 y la pan-histona, esta última como marcador de la cromatina, revelaron el patrón nuclear típico de la PABPN1,

básicamente idéntico al de los mRNAs poliadenilados, concentrado en los “speckles nucleares” y difuso en el nucleoplasma, excluyendo el nucleolo (Fig. 27A-C). Por su parte, en los animales tratados con Btz, la PABPN1 nuclear aparecía difusa por el nucleoplasma y no se concentraba en los “speckles”. En el citoplasma, la PABPN1 fue indetectable en las neuronas control, pero en las tratadas con Btz se concentraba en la región perinuclear portadora de pliegues nucleares. Este patrón citoplasmático sugiere que los mRNAs acumulados en la región perinuclear están correctamente poliadenilados, siendo aptos para su traducción y alternativamente podrían reflejar un “atasco” o retención de RNAs no válidos para la síntesis de proteínas (Fig. 27D-F).

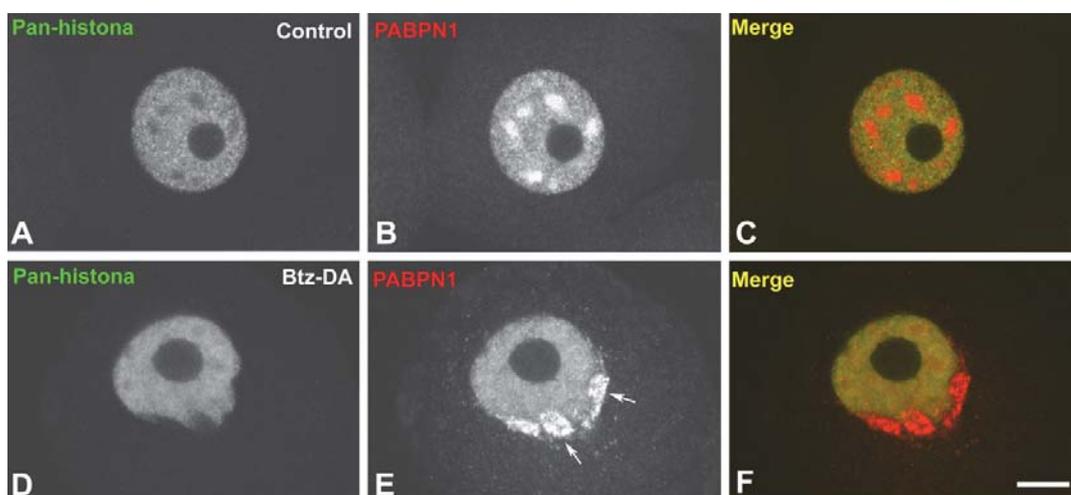


Figura 27. Co-inmunomarcado de PABPN1 y pan-histona en neurona control (A-C) y tratada con Btz (D-F). En ambas se observa un patrón nuclear difuso de la distribución de la pan-histona que excluye el nucleolo. PABPN1 se concentra en los “speckles” nucleares en neuronas control (B-C) pero desaparece de los “speckles” y se concentra en el lado citoplasmático del polo nuclear plegado en las neuronas tratadas (E-F). Barra de medida 4µm.

Con el fin de discriminar si los RNAs detectados en la región perinuclear contenían mRNAs recién sintetizados, y presumiblemente funcionales en la traducción de proteínas, realizamos un ensayo de transcripción *in vivo* mediante la incorporación de la 5'-FU tras un pulso de 1 hora de exposición al precursor halogenado. La combinación del ensayo de transcripción con la hibridación *in situ* para detectar los mRNAs poliadenilados demostró la colocalización de RNA nacientes con la señal de hibridación para poli(A) RNAs en la región perinuclear (Fig. 28).

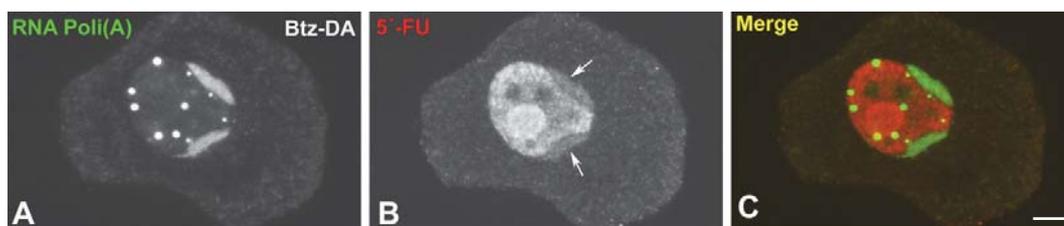


Figura 28. Hibridación de RNAs poliadenilados y de RNAs nacientes. A-C. La incorporación de 5'-FU colocaliza en el microambiente perinuclear (flechas) con los RNAs poliadenilados indicando que es una zona de traducción activa de proteínas. Barra de medida 5µm.

La presencia de RNA nacientes en el dominio perinuclear fue confirmada con inmunoelectrónica que reveló la presencia de partículas de oro coloidal sobre los polirribosomas (Fig. 29). Estos resultados sugieren una exportación dinámica de mRNAs nucleares al dominio perinuclear enriquecido en polirribosomas para su traducción.

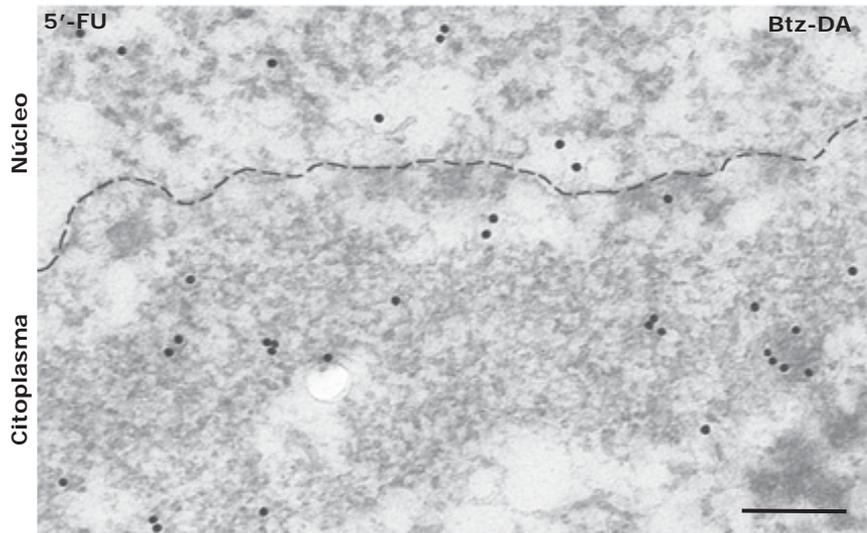


Figura 29. Micrografía de un ensayo de transcripción *in situ*. La inmunoelectrónica revela cómo las partículas de oro coloidal decoran los ribosomas acumulados en la región perinuclear. Barra de medida 500nm.

En su conjunto, estos hallazgos confieren al microambiente perinuclear una importancia funcional vital para garantizar la supervivencia neuronal en respuesta a la inhibición del proteasoma inducida por el Btz. Presumiblemente, las neuronas sensitivas de tipo A tienen la capacidad de responder a la neurotoxicidad del Btz generando un microambiente nuclear que facilite la expresión de determinados genes en la periferia nuclear y la traducción de los mRNAs en la región perinuclear portadora de pliegues nucleares. La reorganización del microambiente nuclear inducida con el tratamiento con Btz parece ser un componente esencial de la respuesta de neuroprotección frente al estrés proteotóxico.

4.3 PAPEL NEUROPROTECTOR DEL NUCLEOLO Y DE LOS CUERPOS NUCLEARES DE CAJAL EN RESPUESTA A LA INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA

4.3.1 Planteamiento del trabajo

El nucleolo es la factoría nuclear para la síntesis de los rRNAs, para el procesamiento de los transcritos de rRNAs y, para el ensamblaje de las subunidades pre-ribosomales (Fig. 29). Estos procesos están intrínsecamente regulados por los propios requerimientos de biogénesis de ribosomas que requiere la actividad celular y el mantenimiento de la proteostasis. El nivel de activación del nucleolo se refleja en la propia organización estructural de sus componentes fundamentales: los centros fibrilares (CFs), el componente fibrilar denso (CFD) y el componente granular (CG) (Fig. 7). En el correcto funcionamiento del nucleolo está implicado el cuerpo nuclear de Cajal (CB), una pequeña organela nuclear con múltiples funciones entre las que merece la pena destacar su participación en el procesamiento de los pre-rRNAs. De hecho en el CB se produce el ensamblaje y maduración de las ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs) (Kaiser y cols., 2008) implicadas en la pseudouridinación y metilación de los pre-rRNAs, una modificación esencial en la maduración de los rRNAs. (Fig. 30).

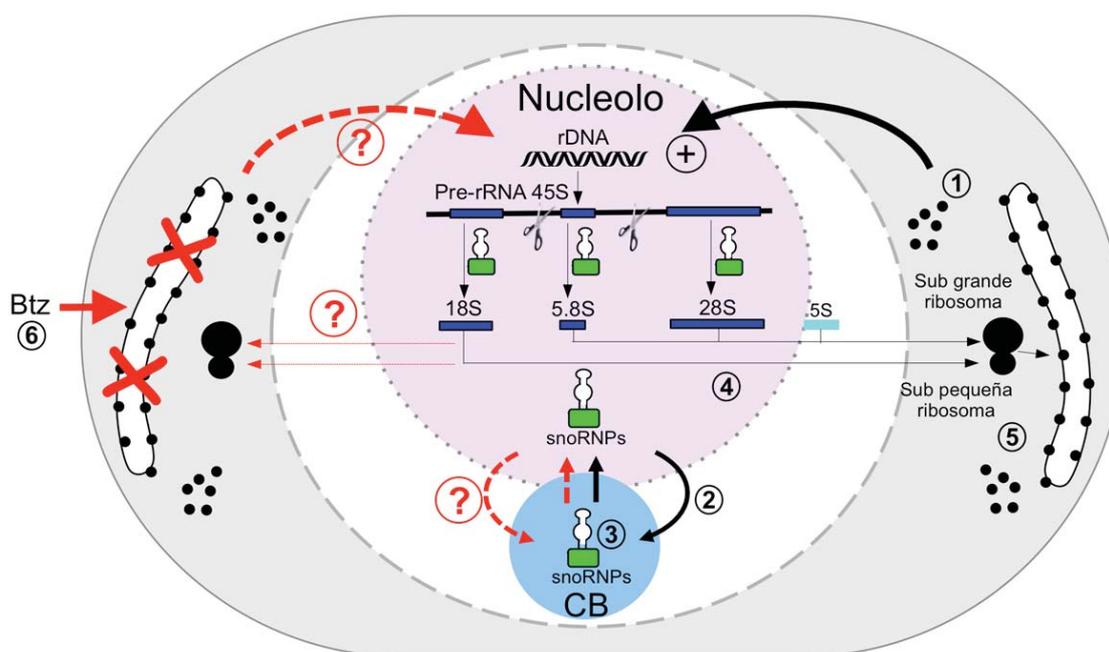


Figura 30. Etapas de la biogénesis nucleolar de los rRNAs. La actividad transcripcional del nucleolo está regulada por los propios requerimientos ribosomales (1). A su vez el nucleolo regula la actividad del CB (2). El CB activado por el nucleolo genera snoRNPs (3) que dirigen la maduración del pre-rRNA 45S permitiendo el corte en los rRNAs maduros, 18S, 5.8S y 28S que forman la subunidad grande (5.8S, 18S y 5S) y la pequeña (18S) del ribosoma (4). Finalmente estas subunidades se exportan y conforman en el citoplasma los ribosomas libres y asociados al RE (5). A la izquierda se representa (rojo) como el bortezomib (Btz) intercepta la organización del RER (6). La disfunción del RER plantea putativos cambios funcionales a nivel nucleolar y del CB (interrogantes).

Por otra parte, varios estudios apoyan la función del nucleolo como sensor celular que detecta y coordina la respuesta al estrés celular (Olson, 2004; Boulon y cols., 2010). Estudios recientes indican que la proteostasis, esencialmente la concentración y el control de calidad de las proteínas, está regulada por múltiples sistemas entre los que destacan la maquinaria de síntesis de proteínas (nucleolo/ribosomas), las chaperonas y dos sistemas principales proteolíticos, el lisosomal y la VUP (Schmidt y Finley, 2013). De hecho, recientemente se ha demostrado que el nucleolo y la VUP cooperan de forma integrada en la proteostasis celular (Moore y cols., 2013; Schmidt y Finley, 2013). En el capítulo anterior, hemos abordado cómo la inhibición del proteasoma inducida por el Btz puede producir la disfunción neuronal (cromatolisis central), un componente importante de la neurotoxicidad del Btz. Asimismo, hemos analizado posibles mecanismos de neuroprotección que contrarrestan el efecto neurotóxico de este inhibidor del proteasoma. En este contexto, nos pareció importante analizar la participación del nucleolo y el CB, dos organelas relacionadas con la respuesta celular al estrés y con la síntesis y procesamiento de pre-rRNAs (Boisvert y cols., 2007; Cioce y Lamond, 2005; Lafarga y cols., 2009), en la respuesta al estrés proteotóxico inducido con Btz en las neuronas ganglionares. En particular, nos planteamos desarrollar los siguientes objetivos sobre el comportamiento de ambas estructuras nucleares en respuesta al tratamiento con Btz: (i) analizar cambios en el tamaño y el número de nucleolos, (ii) estudiar el patrón estructural y la composición molecular del nucleolo, (iii) analizar la actividad transcripcional del nucleolo (iv) determinar cambios en el número y organización de los CBs..

4.3.2 La inhibición del proteasoma incrementa el tamaño y el número de nucleolos en las neuronas de tipo A

Los resultados presentados anteriormente en neuronas tratadas con Btz y teñidas con PI ya sugerían que la excentricidad nuclear y la cromatolisis central no se acompañaban de cambios morfológicos evidentes indicativos de una disfunción nucleolar; es más, los nucleolos parecían preservar su estructura normal, pero aparentemente eran de mayor tamaño (Fig. 13A-C; Fig. 14A-C). Para validar dichas observaciones realizamos un estudio morfométrico y cuantitativo del nucleolo en disociados neuronales. Esta técnica aplicada a los estudios cuantitativos y morfométricos tiene gran interés ya que nos permite contar el número de nucleolos por neurona y medir su diámetro con gran exactitud. Para este objetivo inmunodetectamos la proteína B23 del componente granular como marcador nucleolar. Dado que el nucleolo de las neuronas sensitivas control de tipo A es preferentemente esférico (Pena y cols., 2001), seleccionamos el diámetro del nucleolo como parámetro para estimar el tamaño nucleolar en imágenes de microscopía confocal inmunoteñidas para B23 y procesadas con el programa ImageJ (NIH, USA). Asimismo, para facilitar el análisis morfométrico seleccionamos sólo a las neuronas mononucleoladas, que son la mayoría en la población neuronal tipo A (Pena y cols.,

2001). Nuestros resultados muestran un incremento significativo y dosis dependiente del tamaño nucleolar en los animales tratados con Btz en comparación con los controles no tratados (Fig. 31A). En esta gráfica se muestra cómo el diámetro del nucleolo casi se duplica en las neuronas tratadas con Btz-DA en relación con las neuronas control. Por su parte, el estudio cuantitativo demostró que la inhibición del proteasoma induce un incremento del número medio de nucleolos por célula. Así, mientras que el 66,05% de las neuronas control exhibían un único nucleolo, el tratamiento Btz redujo la mononucleación aproximadamente al 25%, mostrando la mayoría de las neuronas de 2 a 4 nucleolos (Fig. 31B). Otro aspecto interesante es que los nucleolos de las neuronas multinucleoladas presentaban gran heterogeneidad en su diámetro; aunque, por lo general, mostraban un nucleolo dominante de mayor tamaño y el resto más pequeños y de tamaño variable (Fig. 31B). Estos resultados indican que la inhibición del proteasoma induce en las neuronas sensibles hipertrofia nucleolar y nucleologénesis, lo que sugiere un mayor reclutamiento nucleolar de secuencias organizadoras de nucleolo (NORs) activas implicadas en la biogénesis de ribosomas.

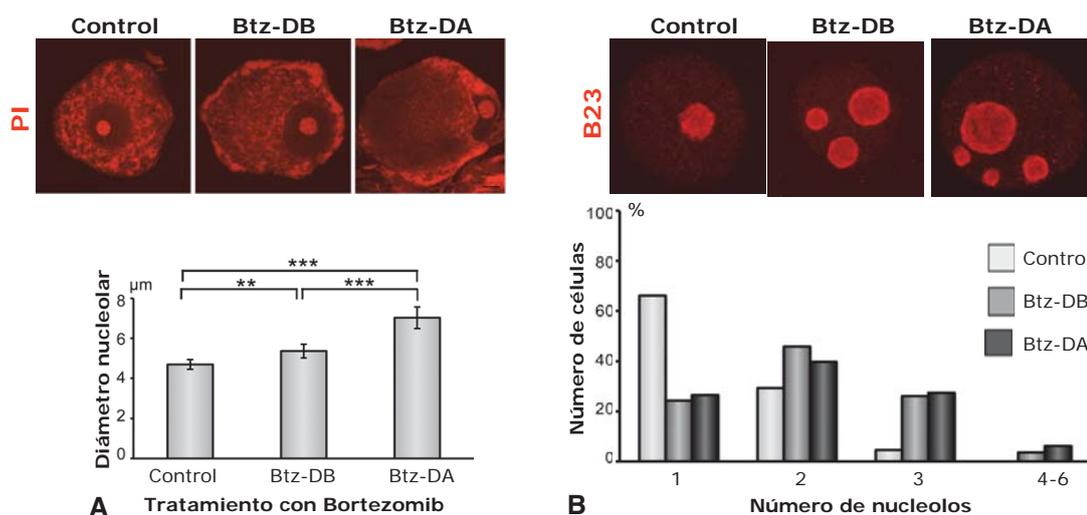


Figura 31. Cambios morfométricos y cuantitativos de los nucleolos inducidos por el Btz. **A.** El estudio del diámetro nucleolar en neuronas grandes mononucleadas muestra que la inhibición del proteasoma induce hipertrofia nucleolar. En la parte superior se muestran dos neuronas con cromatolisis central que poseen un nucleolo perfectamente estructurado y de gran tamaño si se compara con el de la neurona control. **B.** Análisis cuantitativo del porcentaje de neuronas con uno, dos, tres, cuatro-seis nucleolos que demuestra que el Btz induce nucleologénesis. Este resultado queda ilustrado en la imagen superior en la que se observa como las neuronas tratadas exhiben varios nucleolos inmunodetectados con el anticuerpo-B23. Datos representados como media±SD; **p<0,01; ***p<0,001.

4.3.3 El tratamiento con el Btz no altera la citoarquitectura nucleolar

Una vez conocido que la inhibición del proteasoma incrementaba el tamaño y el número de nucleolos, el siguiente paso fue analizar con microscopía electrónica el grado de preservación de la organización estructural de sus tres componentes fundamentales (CFs, CFD y CG), un parámetro íntimamente relacionado con la actividad funcional del nucleolo (Raska y cols., 2006; Hernandez-Verdun y cols., 2010). Este estudio corroboró que los nucleolos control

exhibían el patrón reticulado característico de esta población neuronal (Pena y cols., 2001). Así, presentaban numerosos CFs pequeños rodeados por la capa electrodensa del CFD. Entre ambos componentes, se organizaba el CG y los intersticios nucleolares (Fig. 32A). Tras el tratamiento con Btz, tanto a dosis bajas como altas, la mayoría de los nucleolos, aproximadamente el 80%, conservaban la configuración reticular y la organización de los componentes nucleolares característica de los nucleolos control (Fig. 32B). Este comportamiento de la mayor parte de los nucleolos sugiere que el estrés proteotóxico inducido por la inhibición del proteasoma no interfiere con la principal función del nucleolo, la biogénesis de ribosomas.

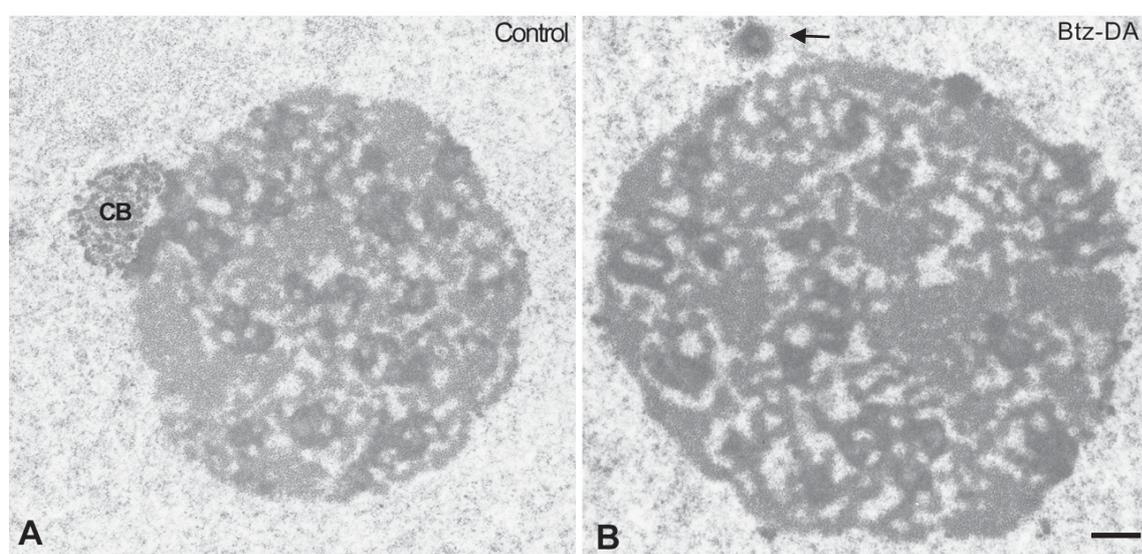


Figura 32. El Btz no induce cambios en la organización ultraestructural del nucleolo. **A.** El nucleolo de la neurona control muestra la configuración reticulada típica con pequeños y numerosos CFs rodeados por el CFD y entre ambos componentes, se observan áreas de GC. Los espacios ópticamente vacíos representan los intersticios nucleolares. Nótese la presencia de un CB asociado a un área de CFD de la superficie del nucleolo. **B.** Nucleolo de una neurona tratada con Btz. Este fármaco no modifica la configuración estructural nucleolar reticulada característica de las neuronas sensitivas de tipo A. Sin embargo, su tamaño es superior al del nucleolo control. El cuerpo nuclear en forma de anillo señalado con la flecha corrobora que el nucleolo hipertrófico de la imagen pertenece a una neurona afectada por el Btz. Barra de medida 1µm.

Además, debemos señalar que algunos nucleolos tratados y con una configuración reticular normal mostraban masas de gran tamaño del GC tanto en el interior como en la periferia del nucleolo (Fig. 33C). En unos pocos casos observamos signos de moderada disfunción nucleolar como la presencia de microesférulas de CFD que quedaban atrapadas en los intersticios nucleolares o se disponían en la superficie del nucleolo (Fig. 33D). Sin embargo, a diferencia de otros modelos experimentales en los que se produce una severa inhibición de la RNA Pol I, como el tratamiento con actinomicina D, el Btz no indujo macrosegregación de los componentes nucleolares, una alteración estructural característica de una severa disfunción nucleolar (Casafont y cols., 2007; Murayama y cols., 2008).

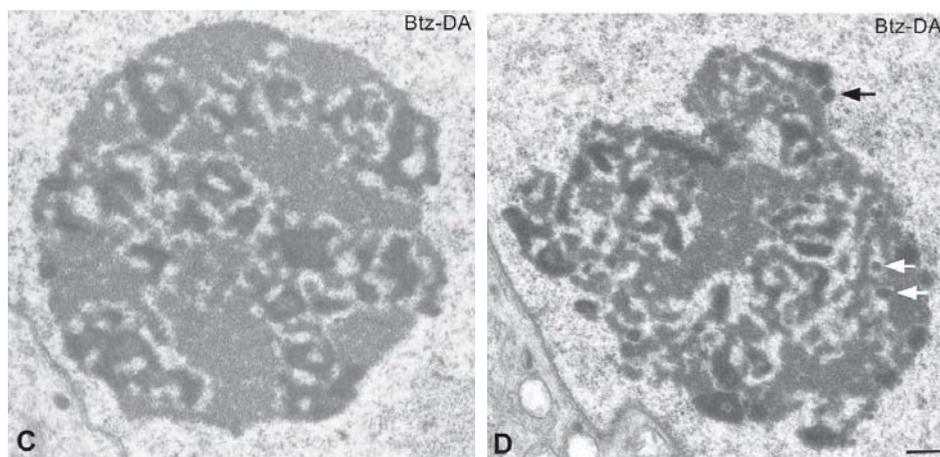


Figura 33. Cambios ultraestructurales nucleolares inducidos por el Btz. **A.** Ejemplo de un nucleolo levemente afectado por el Btz que muestra grandes masas de GC. **B.** Nucleolo más afectado por el fármaco que muestra grandes masas de GC, está parcialmente desestructurado y presenta microesférulas electrodensas de CFD (flechas). Barra de medida 0,5 μ m.

4.3.4 El tratamiento con Btz no interfiere la transcripción nucleolar

Con el fin de establecer si la hipertrofia nucleolar inducida por el Btz conllevaba incremento en su actividad funcional, decidimos investigar el patrón de expresión del factor de transcripción nucleolar UBF (“Upstream binding factor, UBF”) y la actividad transcripcional con el ensayo de incorporación de 5'-FU en el rRNA naciente. En primer lugar estudiamos la distribución de la maquinaria de transcripción inmunodetectando el factor UBF del complejo de la RNA Polimerasa I (Berciano y cols., 2007; Casafont y cols., 2007; Hernandez-Verdun y cols., 2010). Dado que este factor se concentra en los CFs, su inmunomarcaje nos permite definir el número de CFs, un parámetro positivamente relacionado con la tasa de transcripción del rDNA nucleolar (Raska y cols., 2006; Berciano y cols., 2007; Hernandez-Verdun y cols., 2010). Nuestros resultados muestran que los nucleolos hipertróficos de las neuronas tratadas con Btz poseen el típico patrón de múltiples microfocos UBF-positivos de las neuronas control, pero, debido a su mayor tamaño, contienen un mayor número de estas estructuras (Fig. 34A-C). Este hallazgo claramente apoya la idea de que la hipertrofia nucleolar refleja un incremento de la actividad transcripcional de los genes ribosomales.

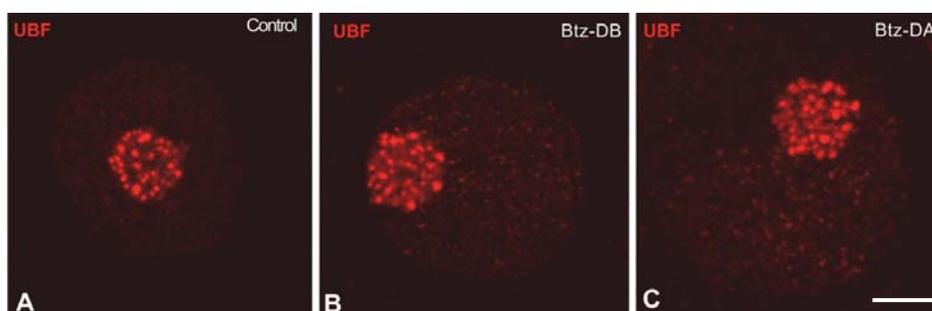


Figura 34. El Btz no modifica la organización de los CFs inmunodetectados con el anticuerpo α -UBF. **A.** Neurona control que exhibe numerosos spots UBF-positivos representativos de CFs. **B-C.** Nucleolos tratados con Btz. Nótese cómo el fármaco induce la génesis de CFs. Barra de medida 5 μ m.

Una vez demostrado que los nucleolos hipertróficos-Btz disponían de una maquinaria de transcripción muy desarrollada, decidimos investigar la actividad de transcripción nucleolar.

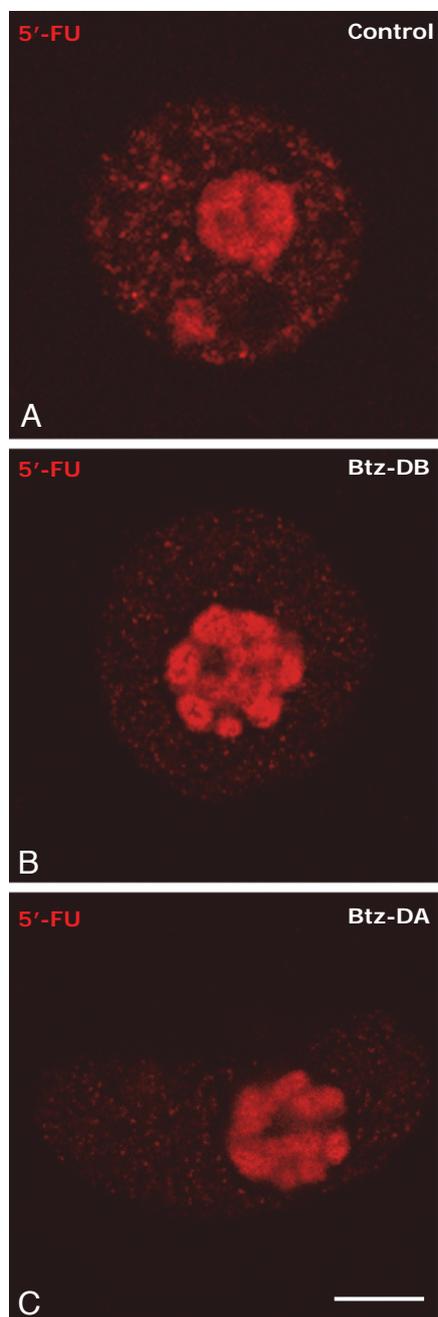


Figura 35. Imágenes de microscopía confocal de la incorporación de 5'-FU. **A.** El control muestra marcaje intenso del nucleolo y numerosos cuerpos de transcripción nuclear. **B-C.** En las neuronas tratadas, los nucleolos exhiben mayor incorporación de 5'-FU en el CFD aunque marcaje extranucleolar es mas bajo que en la neurona control. Barra de medida 5µm.

Con este objetivo analizamos la tasa de incorporación de 5'-FU en los pre-rRNAs y rRNAs nacientes del nucleolo. Como ya hemos comentado anteriormente, el CFD forma anillos incompletos alrededor de los CFs y es la región nucleolar en la que se disponen las secuencias génicas del rDNA transcripcionalmente activo (Raska y cols. 2006; Casafont y cols., 2006) (Fig. 7). Tras un pulso de 1h de exposición a la 5'-FU, la mayor incorporación de este precursor se detectó en el CFD que rodea a los CFs, tanto en los nucleolos de las neuronas control como en las tratadas con Btz (Fig. 35A-C). Sin embargo, era muy llamativo que, en respuesta a la inhibición del proteasoma, los nucleolos hipertróficos tenían una mayor intensidad de la señal fluorescente de incorporación de 5'-FU en el rRNA naciente y disponían, además, de un mayor número de anillos de incorporación de 5'-FU en el CFD que rodeaba a los CFs (Fig. 35B). Esta observación fue muy evidente incluso cuando los nucleolos hipertróficos pertenecían a núcleos con baja tasa de transcripción extranucleolar (Fig. 35B-C).

La gran capacidad de síntesis de pre-rRNAs en las neuronas tratadas con Btz fue validada, a nivel ultraestructural, inmunodetectando los sitios de incorporación de 5'-FU con partículas de oro coloidal (Fig. 36A-D). Este ensayo confirmó que los anillos de CFD estaban decorados por numerosas partículas de oro coloidal (Fig. 36B-C). Aunque no se realizó un estudio cuantitativo de la densidad de partículas de oro, éstas fueron más abundantes en los nucleolos de las neuronas tratadas que en las no tratadas (Fig. 36A y B). Además, tras un pulso de 1h de incorporación de 5'-FU, algunas partículas ya decoraban el CG, indicando que la inhibición del proteasoma no

interfiere con el tráfico de los rRNAs desde el CFD al CG. En conclusión, la inhibición del proteasoma activa la transcripción nucleolar en las neuronas sensitivas ganglionares tipo A.

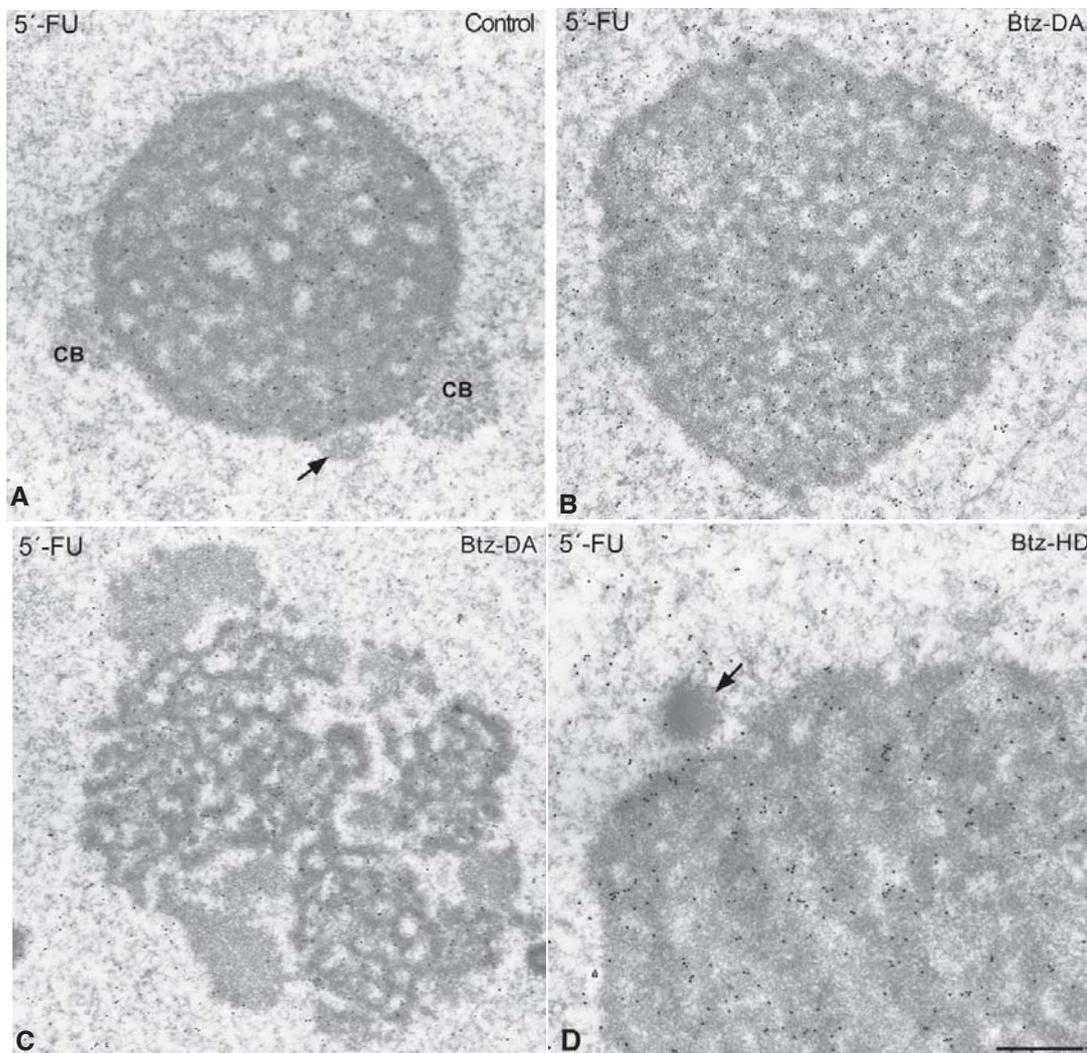


Figura 36. El Btz incrementa la actividad transcripcional nucleolar. Imágenes de microscopía electrónica de la incorporación de la 5'-FU que muestran la localización de los RNAs nacientes en un núcleo control (A) y tratados con Btz (B-D). Nótese en A la ausencia de marcaje en los CBs y la masa heterocromática asociada al nucleolo (flecha). En todos los casos la mayoría de las partículas de oro coloidal decoran de forma predominante el CFD. Obsérvese en D la ausencia de 5'-FU en el pequeño cuerpo electrodenso (cuerpo poli(A) situado en la periferia del nucleolo (flecha). La presencia de este cuerpo corrobora que el nucleolo asociado, muy activado en la transcripción, corresponde a una neurona tratada con el Btz. Barra de medida A-C 1 μ m; D 0,4 μ m.

Habiendo establecido que los nucleolos-Btz hipertróficos son factorías activas en la transcripción del rDNAs, nos planteamos analizar la posible reorganización del CG, compartimento en el que tiene lugar el último eslabón de la maduración de los rRNAs y su ensamblaje en las subunidades prerribosomales. Con este fin inmunodetectamos la chaperona B23, un marcador molecular del CG implicado en el ensamblaje final y la exportación de las partículas prerribosomales al citoplasma (Boisvert y cols., 2007). En las

neuronas de los mamíferos la expresión de esta fosfoproteína es dependiente de la transcripción nucleolar (Kalita y cols., 2008; Hetman y cols., 2012). El inmunomarcaje de la proteína B23 corroboró que su expresión era predominantemente nucleolar y reflejaba la distribución característica del CG en los nucleolos de las neuronas sensitivas, formando agregados intercalados entre los CFs y el CFD y en la periferia nucleolar (Fig. 37A). El tratamiento con Btz no modificó ni el patrón nucleolar ni el nucleoplasmático de expresión de B23, pero los nucleolos hipertróficos se marcaban más intensamente con el anticuerpo anti-B23 (Fig. 37B-C), sugiriendo que los nucleolos eran activos en el ensamblaje de partículas prerribosomales. De hecho, la translocación de B23 del nucleolo al nucleoplasma, un signo característico de disfunción nucleolar asociado a la inhibición de la transcripción de los genes ribosomales (Kalita y cols., 2008; Baltanas y cols., 2011b; Moore y cols., 2013), no fue nunca observado en nuestro modelo experimental de inhibición del proteasoma.

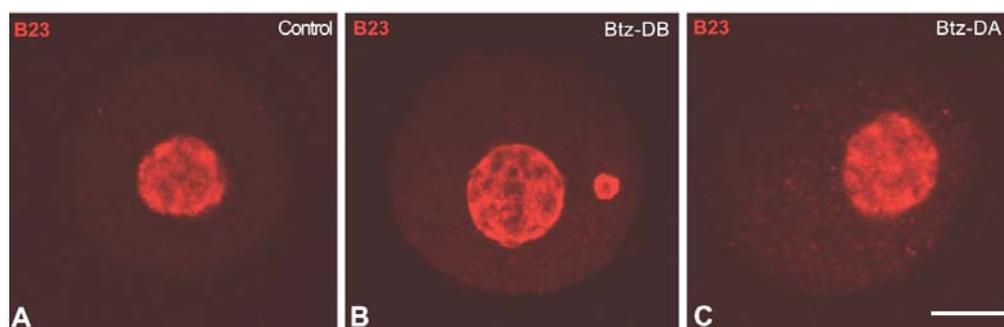


Figura 37. Inmunodetección de B23 que muestra que el Btz no interfiere el CG. **A.** En la neurona control B23 se concentra principalmente en el nucleolo y a nivel de nucleoplasma sólo se observa un marcaje difuso muy débil. **B-C.** Nucleolos hipertróficos generados por el tratamiento con Btz que conservan la organización característica del CG. Obsérvese en **B** un micro-nucleolo muy enriquecido en la proteína B23. Barra de medida A-C 5 μ m.

Para validar el incremento de la actividad transcripcional nucleolar inducido con el tratamiento con Btz analizamos mediante PCR cuantitativa los niveles de expresión de rRNAs y de mRNAs que codifican proteínas implicadas en el procesamiento de los rRNAs. En primer lugar determinamos los niveles de expresión del pre-rRNA 45s y del rRNA maduro 18S, ambos muy importantes para evaluar la capacidad transcripcional del nucleolo. El precursor 45S, tiene una vida media muy corta y se considera un indicador de la actividad de la RNA polimerasa I (Mayer y cols., 2005); el 18S nos permite valorar la tasa de maduración de los rRNAs. El análisis por qPCR demostró que el tratamiento con Btz incrementa de forma significativa los niveles de pre-rRNA 45S y rRNA 18S, si se compara con los valores de las neuronas control (Fig. 38A). Este resultado corrobora que la inhibición del proteasoma activa la transcripción de los genes ribosomales, presumiblemente en respuesta al propio estrés proteotóxico (cromatolisis central) generado por el Btz. De acuerdo con esto, se detectó un incremento, dosis-dependiente, de la expresión de los mRNAs que codifican las proteínas UBF, fibrilarina y B23 (Fig. 38A), que secuencialmente participan en la transcripción (UBF),

en el procesamiento del pre-rRNA (fibrilarina) y en el ensamblaje de las partículas prerribosomales (B23) (Raska y cols., 2006; Boisvert y cols., 2007; Hernandez-Verdun y cols., 2010). Sin embargo, el Btz no indujo cambios en la expresión de los niveles del mRNA que codifica la nucleolina, un cofactor regulador de la RNA polimerasa I (Fig. 38A).

Para profundizar en el conocimiento de los posibles mecanismos reguladores de la actividad transcripcional del nucleolo en las neuronas tratadas con Btz, seguidamente analizamos los niveles de expresión de dos reguladores importantes, la oncoproteína c-Myc y el supresor tumoral p53. La proteína c-Myc tiene gran interés en nuestro modelo experimental ya que es un regulador del crecimiento celular que estimula la biogénesis ribosomal (Grandori y cols., 2005; van Riggelen y cols., 2010). El análisis por qPCR y western blotting mostró que el Btz induce un incremento significativo, dosis-dependiente, en los niveles de mRNA y de la proteína c-Myc (Fig. 38A-B). Por el contrario, el factor de transcripción p53, un factor inhibidor de la transcripción de la RNA polimerasa I (Zhai y Comai, 2000), mostró una caída, dosis-dependiente, del mRNA en comparación con el control, así como la ausencia de activación por fosforilación de p53 (Fig. 38A, C). En resumen, estos resultados apoyan de forma complementaria que el tratamiento con Btz provoca la activación de la transcripción nucleolar.

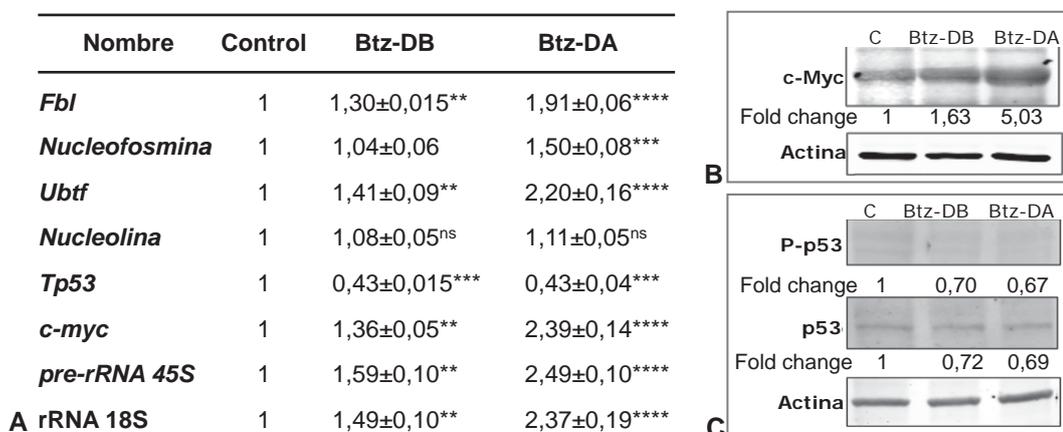


Figura 38. A. Tabla que muestra el patrón de regulación génica de los marcadores fibrilarina, B23, UBF, nucleolina, p53, c-myc, pre-rRNA 45S y rRNA 18S y coilina usando el gen *Rsp14* como normalizador. **B.** Western blotting de p-p53 y p53 en la que se observa una disminución tras la inhibición del proteasoma. **C.** Western blotting de c-Myc que muestra su incremento tras el tratamiento con Btz. Los valores se expresan como media±SD; ns no significativo; **p<0,01; ***p<0,001 comparado con el control.

Desde un punto de vista fisiopatológico los resultados de este apartado parecen reflejar una activación compensatoria de la biogénesis de ribosomas para intentar restablecer la proteostasis neuronal cuando hay una severa disrupción de la maquinaria de síntesis de proteínas (cromatolisis). Por tanto, el nucleolo se convierte en una organela crucial en la respuesta de neuroprotección de las neuronas ganglionares a la inhibición del proteasoma.

4.3.5 El tratamiento con Btz incrementa el número de CBs

El CB es una organela multifuncional cuyo tamaño y número está directamente relacionado con la actividad transcripcional celular de mRNAs (Lafarga y cols., 1998; Carmo-Fonseca y cols., 1993; Santama y cols., 1996; Pena y cols., 2001; Berciano y cols., 2007). Dado que el nucleolo y el CB están físicamente y funcionalmente relacionados, nos pareció importante investigar el comportamiento del CB en respuesta al incremento de la actividad transcripcional del nucleolo inducido con Btz. Como se ha comentado en la introducción (Fig. 8), el CB cumple numerosas funciones nucleares entre las que merece la pena señalar su implicación en la biógenesis de las snoRNPs requeridas para el procesamiento de los pre-rRNAs en el CFD del nucleolo (Fig. 10) (Verheggen y cols., 2001; Machyna y cols., 2013).

En primer lugar realizamos estudios de inmunofluorescencia para conocer si los CBs de las neuronas sensitivas tratadas con Btz eran canónicos, es decir si reclutaban las moléculas esenciales requeridas para la maduración en el CB de las snRNPs y snoRNPs. Utilizamos como marcador estructural del CB canónico la colina (Andrade y cols., 1991) que co-inmunodetectamos bien con la proteína SMN, un componente de las snRNPs espliceosomales (Fig. 39A-C), o bien con la fibrilarina, proteína que se asocia a las snoRNPs (Fig. 39D-F). Los dos dobles marcajes demostraron que las neuronas afectadas por la inhibición del proteasoma exhibían numerosos CBs canónicos, libres por el nucleoplasma y/o asociados a nucleolo, en comparación con las neuronas control (Fig. 39A-F). Además, en el caso particular de la SMN, pudimos comprobar que esta proteína, requerida para la supervivencia neuronal, mostraba un patrón de expresión nuclear y citoplasmático similar al de las neuronas control (Fig. 39A-C).

La inmunodetección de la fibrilarina, además de determinar la categoría molecular de los CBs, tiene particular interés por su relación con la función nucleolar. La observación con el microscopio confocal mostró que tanto los CBs como el CFD del nucleolo estaban muy enriquecidos en fibrilarina. Además, era muy evidente que las neuronas muy afectadas por el tratamiento con Btz (excentricidad nuclear, cromatolisis central y nucleolos hipertróficos) contenían muchos CBs de los cuales la mayor parte estaban asociados al nucleolo (Fig. 39C). Seguidamente, realizamos un estudio de inmunoelectrónica con partículas de oro coloidal para analizar al patrón ultraestructural de distribución de la fibrilarina. En las neuronas expuestas al Btz, las partículas de oro decoraban CBs de gran tamaño que exhibían la morfología típica de hebras enrolladas de material fibrilar denso intensamente inmunomarcadas. Esta caracterización ultraestructural, conjuntamente con la frecuente asociación entre CBs y el nucleolo, apoyan la idea de una activa participación del CB en la maduración y transferencia al nucleolo de las snoRNPs. Tan solo de forma muy excepcional observamos CBs con una masa fibrilar densa segregada y muy enriquecida en fibrilarina (Fig. 39H). Este tipo mixto de CB también se observó en condiciones normales y en modelos

experimentales pero su caracterización funcional permanece desconocida en la actualidad (Pena y cols., 2001).

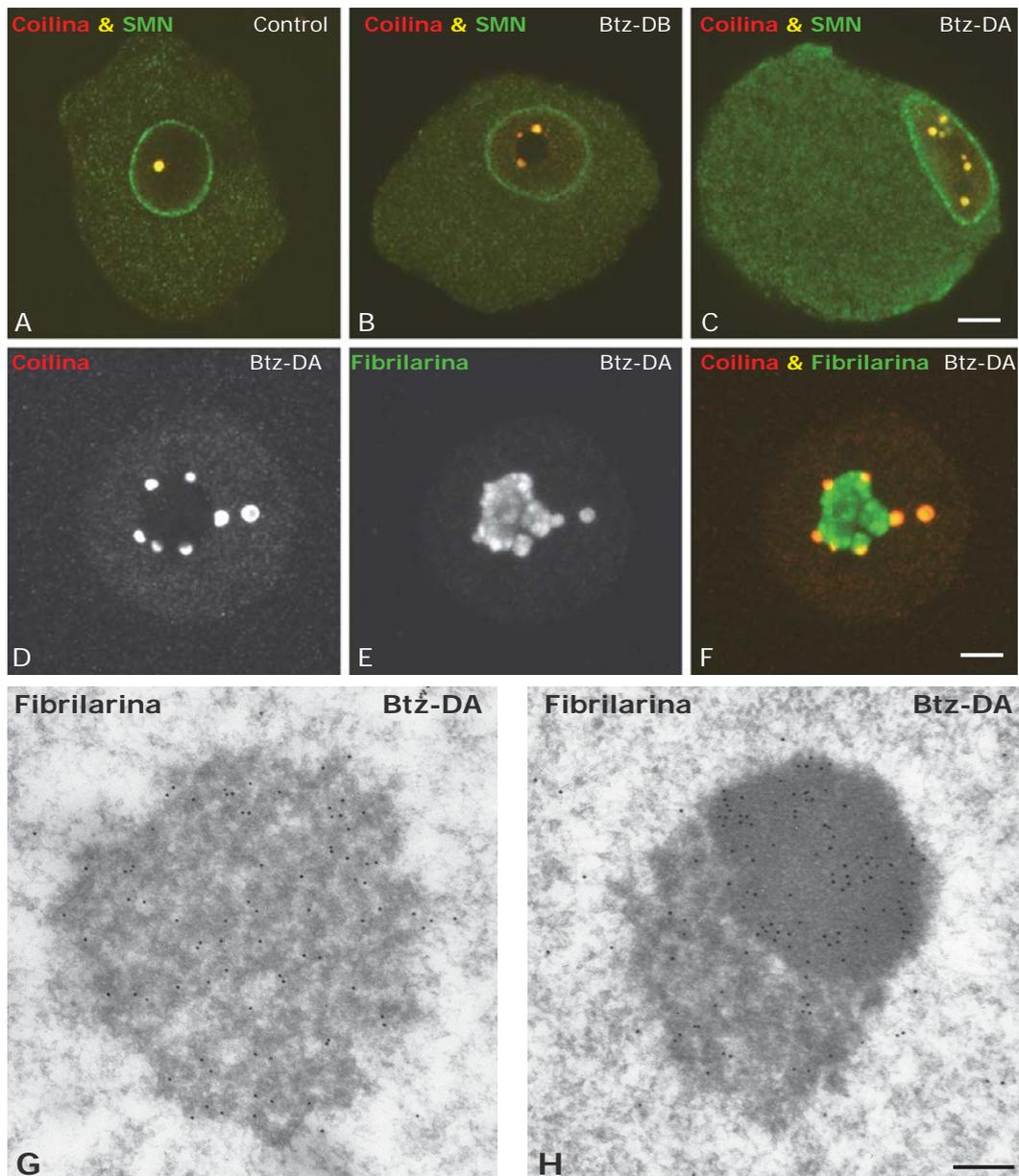


Figura 39. Estudio con microscopía confocal e inmunoelectrónica de los CBs en neuronas tratadas con Btz. A-C. Co-inmunomarcaje de coilina y SMN que muestra la colocalización en todos los CBs. La SMN citoplasmática es muy abundante en la neurona tratada Btz-DA (C). **D-F.** Inmunodetección de la coilina y la fibrilarina en una neurona tratada con Btz que muestra que la mayoría de los CBs están asociados al nucleolo. **G.** Imagen de inmunoelectrónica que muestra como el CB está muy enriquecido en fibrilarina a nivel de las hebras enrolladas. **H.** CB mixto. Tanto el componente denso como las hebras del CB están decoradas por numerosas partículas de oro coloidal. Barras de medida A-C 5 μ m; D-F 2 μ m; G-H 0,15 μ m.

Otro aspecto importante referido a la posible relación del CB con el nucleolo era analizar si la activación de la transcripción nucleolar promovía el ensamblaje adicional de

CBs. El análisis cuantitativo del número medio de CBs por neurona se realizó en disociados neuronales inmunodetectando la proteína coilina. Este estudio confirmó que el tratamiento

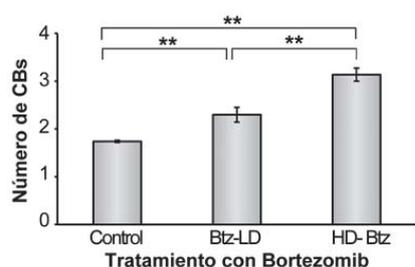


Figura 40. Análisis cuantitativo de la media de CBs por núcleo. En la gráfica se observa un incremento dosis-dependiente en el número de CBs. Datos representados como media ± SD; *p < 0,05; **p < 0,01.

con Btz induce un incremento significativo y dosis-dependiente de CBs en comparación con las neuronas control (Fig. 40). Así, mientras que las neuronas control no llegan a dos CBs por núcleo, las neuronas tratadas con Btz duplican su número. Este resultado tiene gran interés porque demuestra que el CB es una organela muy dinámica que no sólo responde a cambios en la síntesis de mRNAs sino también a variaciones de la actividad transcripcional nucleolar.

En conclusión, el incremento en la biogénesis de CBs canónicos inducido por la inhibición del proteasoma puede facilitar la maduración de snRNPs y snoRNPs requeridos para el procesamiento de pre-mRNA y pre-rRNAs bajo condiciones de estrés proteotóxico. Esta respuesta neuroprotectora parece ser esencial para intentar normalizar las alteraciones en la proteostasis neuronal inducidas por la inhibición del proteasoma. Por ello consideramos que la respuesta reactiva del nucleolo y CB son esenciales para la supervivencia neuronal en nuestro modelo experimental.

5. Discusión



Estudios previos realizados en nuestro laboratorio utilizando modelos experimentales de rata han aportado nuevos datos acerca de los mecanismos que pueden estar implicados en la neuropatía periférica inducida por drogas utilizadas en la quimioterapia del cáncer, tales como el antibiótico adriamicina, que se intercala en el DNA, y el inhibidor del proteasoma bortezomib (Btz) (Pena y cols., 2000; Casafont y cols., 2006). Ambos agentes antineoplásicos provocan una severa inhibición de la transcripción y traducción global con severa disfunción neuronal que pueden justificar el desarrollo de la neurotoxicidad en las neuronas sensitivas. Fruto de nuestro interés por avanzar en el conocimiento de las bases celulares de la neurotoxicidad en las neuropatías periféricas son los resultados originales del presente proyecto de tesis doctoral. En este contexto, vamos a discutir los posibles mecanismos implicados en la respuesta de las neuronas ganglionares sensitivas de tipo A al estrés genotóxico y proteotóxico inducido con RI y con el tratamiento con Btz, respectivamente. En la discusión enfatizaremos dos aspectos a nuestro juicio esenciales: i) los mecanismos responsables de la disfunción neuronal (neurotoxicidad) en ambos modelos experimentales que pueden conducir a la neuropatía periférica y ii) la respuesta compensatoria al estrés genotóxico y proteotóxico que permite la supervivencia neuronal. Asimismo, plantaremos nuevas hipótesis de trabajo para futuros estudios. Para facilitar el seguimiento y la comprensión de la discusión presentaremos en primer lugar la respuesta neuronal al estrés inducido por la RI y a continuación, en dos apartados, la discusión de los hallazgos neuropatológicos en respuesta a la inhibición del proteasoma inducida por el Btz.

5.1. RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA INDUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE EN LAS NEURONAS SENSITIVAS DE TIPO A

Las células post-mitóticas, particularmente las neuronas, son muy vulnerables al daño del DNA (McKinnon, 2009). Varios factores inciden en esta vulnerabilidad. Primero, la configuración eucromática del núcleo con el predominio de la cromatina relajada, "abierta" ("open chromatin"), facilita la accesibilidad de los agentes genotóxicos al DNA (Pena y cols., 2001; Soutoglou y cols, 2007). Segundo, la ausencia de barrera hematoencefálica en los ganglios nerviosos, determinada por la presencia de capilares fenestrados, favorece la entrada en las neuronas de los fármacos genotóxicos utilizados en el tratamiento del cáncer (Casafont y cols., 2010; Englander, 2013). Tercero, las neuronas ganglionares sensitivas y de proyección tienen un metabolismo oxidativo muy intenso que produce una considerable cantidad de ROS, un subproducto de la actividad de la cadena transportadora de electrones y de la generación de óxido nítrico, que puede producir constitutivamente daño oxidativo en el DNA (Martin, 2008). La producción de ROS es también dependiente de la edad y constituye el factor intrínseco más importante en la

generación de lesiones espontáneas en el DNA en condiciones fisiológicas. En las neuronas la mayor parte de estas lesiones afectan a una hebra del DNA (SSBs) que se reparan fisiológicamente y con gran eficiencia por el sistema de escisión de bases (BER), una vía de reparación esencial en todas las células de mamíferos y singularmente importante en neuronas (Englander, 2013).

Estudios realizados en la última década han aportado evidencias sólidas de la contribución de una deficiente reparación del DNA en muchos cuadros neurodegenerativos. Además, enfatizan la importancia de conocer en profundidad cómo las neuronas procesan y reparan las lesiones en el DNA en condiciones fisiológicas y cómo la disfunción de estos mecanismos puede conducir a la neurodegeneración en la patología humana y en modelos animales murinos (Rass y cols., 2007; McKinnon, 2009). Entre las enfermedades neurodegenerativas que cursan con defectos en la maquinaria reparadora destacan la *ataxia telangiectasia*, en la que se encuentra mutado el gen que codifica la ATM (McKinnon, 2009); el *síndrome de Nijmegen*, en el que la mutación afecta a genes que codifican alguna de las proteínas del complejo reparador MRN (Carney y cols., 1998; Taylor y cols., 2004), y un conjunto de enfermedades raras incluyendo los síndromes en los que está alterada la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER), tales como la *Xerodermia pigmentosa*, el *síndrome de Cockayne* y la *tricotodistrofia* (McKinnon, 2009). La acumulación progresiva de lesiones no reparadas del DNA está también implicada en la fisiopatología molecular de un creciente número de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo varios tipos de ataxia cerebelosa, corea de Huntington, Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica. Aunque múltiples mecanismos pueden potencialmente lesionar el DNA en estas patologías, el estrés oxidativo es uno de los factores mejor conocidos (Martin, 2008). En modelos murinos de neurodegeneración, como el ratón mutante *pcd* ("Purkinje cell degeneration"), un modelo experimental de ataxia cerebelosa que cursa con degeneración postnatal de las células de Purkinje, se ha podido establecer una clara relación entre la acumulación de lesiones en el DNA y el silenciamiento génico progresivo por heterocromatinización dependiente de la histona H4K20me3 que, finalmente, conduce a la degeneración neuronal y muerte celular por apoptosis (Baltanas y cols., 2011a, b). En esta ataxia cerebelosa, la mutación del gen *nna1*, que codifica una carboxipeptidasa, produce una disfunción del metabolismo mitocondrial que parece ser responsable del estrés oxidativo que produce daño irreversible en el DNA y muerte de las células de Purkinje (Baltanas cols., 2011a).

En el presente estudio, demostramos la arquitectura y organización espacio-temporal de los compartimentos de cromatina (focos nucleares) donde se procesa el daño en el DNA inducido con una sesión de rayos X (4Gy) en neuronas ganglionares sensitivas de tipo A maduras. Basándonos en la bibliografía, consideramos que 4Gy es una dosis suficiente para provocar roturas en el DNA que son mayoritariamente DSBs (Sutherland y cols., 2003),

como indica el ensayo cometa. No obstante, algunos estudios demuestran que las lesiones inducidas por RI no se limitan a DSBs y se acompañan de daño oxidativo en el DNA con formación de SSBs (Vasko y cols., 2011; Englander, 2013). Evidentemente, con una única dosis no intentamos reproducir las bases fisiopatológicas de la neuropatología humana inducida por la radioterapia. Pero consideramos que esta dosis subletal de radiación utilizada de 4Gy es muy adecuada porque no afecta a la supervivencia de los animales, no induce apoptosis y dispara una respuesta de daño en el DNA generalizada en la población neuronal con un patrón multifocal reversible claramente detectable a los 30 minutos post-RI. Además, este protocolo experimental ha sido diseñado, más que para reproducir la neuropatía periférica, para profundizar en la eficiencia de la mecánica reparadora por la vía NHEJ en las neuronas sensitivas de tipo A.

Como ya hemos comentado en la introducción, las células eucariotas poseen dos vías de reparación de las DSBs fundamentales: la HR y la NHEJ. Ambas vías operan de manera cooperativa y se complementan una con otra, alternándose en las fases S/G0 y G1 del ciclo celular que permanentemente experimentan las células proliferantes (Kass y Jasin, 2010). En el caso del sistema nervioso, la participación de las dos vías se produce durante el desarrollo del cerebro (Orii y cols., 2006). Así, la disrupción de la vía HR en la fase proliferativa temprana de los precursores neuronales, produce un estrés replicativo con acumulación de lesiones en el DNA que conducen a la apoptosis. De manera similar, la disfunción de la NHEJ en la fase post-mitótica, conduce a la apoptosis neuronal (Orii y cols., 2006). En el sistema nervioso, ambos mecanismos reparadores del DNA (HRR y NHEJR) podrían ser utilizados tanto por la glía satélite como por las células de Schwann de los ganglios sensitivos, dado que ambos tipos celulares pueden entrar en la fase "S" y duplicar su DNA bajo determinados estímulos microambientales. Sin embargo, en las neuronas maduras no se produce la HRR ya que ésta exige la previa duplicación del DNA para que el apareamiento y sinaptogénesis de las secuencias dañadas se produzca con la cromátida homóloga indemne (ver introducción Fig. 18). Consecuentemente, la reparación del DNA dañado depende de la eficiencia de la NHEJR.

Aunque en términos de restauración de la integridad del genoma la HRR tiene alta fidelidad y, al menos teóricamente, se produce libre de errores (Bekker-Jensen y Mailand, 2010; Panier y Boulton, 2013), la mayor parte de las DSBs se reparan por NHEJ. La NHEJR resuelve la reparación ligando los extremos rotos de la doble cadena del DNA sin sustituir las secuencias del DNA perdidas (Lieber, 2010). La eficiencia de la NHEJR es muy buena, ya que detiene rápidamente la inestabilidad del genoma causada por los fragmentos cromosómicos libres, pero conlleva ligeras o extensas adiciones o deleciones de nucleótidos que, irreversiblemente, alteran la secuencia de la molécula DNA reparada. El hecho de que en las células post-mitóticas la NHEJ sea la única vía de reparación de DSBs (van Gent y cols., 2001; Kass y Jasin, 2010; Mladenov y Iliakis, 2011; Panier y Boulton, 2013) puede ser un

handicap importante, particularmente en las neuronas de mamíferos donde, al ser generalmente diploides, puede comprometer la correcta expresión génica cuando las DSBs afecten a las mismas secuencias génicas en los dos cromosomas homólogos y, consecuentemente, producir un déficit de algunos mRNA que codifican proteínas esenciales para la fisiología neuronal.

La bibliografía actual acerca de la importancia de la NHEJ en la regulación de la estabilidad del genoma es muy extensa pero la mayor parte del conocimiento se ha obtenido por estudios bioquímicos realizados en levaduras y sistemas celulares proliferantes. Sin embargo, son muy escasos los resultados obtenidos por RI en modelos experimentales en células post-mitóticas de mamíferos (ver Ferrer y cols., 1997; Yang y cols., 2009; Lieber, 2010). Como se ha comentado anteriormente, las neuronas sensitivas de tipo A del GT, ofrecen importantes ventajas sobre otras células post-mitóticas: son mononucleadas, diploides, eucromáticas y presentan una organización de los compartimentos nucleares específicos muy bien conocida (Pena y cols., 2001). Además, a diferencia de otros centros nerviosos con circuitos neuronales complejos, los ganglios sensitivos tienen una organización relativamente simple; el contingente neuronal es muy homogéneo, no hay interneuronas ni se establecen contactos sinápticos *in vivo* (Peters y cols., 1991; Pannese y cols., 1994). Estas características fenotípicas nos han permitido demostrar el impacto de la RI (4Gy) en la génesis de IRIFs de DNA dañado, a la vez que estudiar la evolución espaciotemporal de los compartimentos de cromatina de lesión/reparación del DNA y los cambios asociados en la actividad transcripcional.

Nuestros resultados demuestran que las neuronas sensitivas de tipo A del GT son muy vulnerables a la RI. De hecho, a los 30 minutos post-RI los marcadores específicos de NHEJR señalizan, en todas las neuronas, numerosos focos de lesión en el DNA. Presumiblemente, la vulnerabilidad al daño de este tipo neuronal puede justificarse, como en las grandes neuronas de proyección del SNC (Womack y Khodakhah, 2002; Swensen y Bean, 2003; Davie y cols., 2008; Baltanas y cols., 2011a), por la elevada actividad metabólica requerida para mantener su gran tamaño y actividad bioeléctrica (Pena y cols., 2000, 2001). Además, las neuronas tipo A tienen una elevada actividad transcripcional con un patrón predominante de eucromatina (Casafont y cols., 2006), un tipo de cromatina "abierto" más accesible y mucho más vulnerable al efecto de las RI que las células que muestran un patrón mucho más compacto de la cromatina (Misteli y Sotoglou, 2007; Delleire y cols., 2009).

La DDR en las neuronas tipo A está regulada por la rápida activación por autofosforilación de la quinasa ATM responsable de la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX), el sensor y mediador más importante en la cascada de la reparación por NHEJ (Fernandez-Capetillo y cols., 2004). De hecho, la fosforilación de la H2AX es imprescindible

para el reclutamiento de MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint 1). Este factor dirige dos funciones muy importantes: mantener elevados los niveles de pATM y ensamblar la enzima RNF8, una ubiquitina-ligasa específica de las histonas H2AX y H2A (H2AX-Ub y H2A-Ub) en los IRIFs (Price y D'Andrea, 2013; Scully y Xie, 2013). Dado que H2A-Ub es fundamental para el reclutamiento de la proteína efectora 53BP1, responsable de la opción de reparación de las DSBs por la vía NHEJ (Escribano-Diaz y Durocher, 2013), la acumulación de 53BP1 observada en los IRIFs, ya a los 30min post-RI, refleja la elevada eficiencia de reparación del DNA por NHEJ que poseen las neuronas tipo A. No obstante, debemos reseñar una vez más que la estricta reparación del DNA por NHEJ confiere estabilidad génica a las neuronas pero sin recuperar las secuencias génicas perdidas. Esta disfunción génica generada con una dosis única puede ser banal, pudiendo afectar a pocos genes o estar compensada por su entidad diploide, sin embargo, en ciclos repetidos de RI, podría ser una de las causas fisiopatológicas de la neuropatía periférica tóxica por radioterapia.

Una intrigante cuestión en nuestros resultados es que la reparación de las DSBs da lugar a la formación de dos compartimentos nucleares diferentes de daño en el DNA: los IRIFs transitorios y los IRIFs persistentes. Mientras que los primeros son focos en los que la reparación del DNA es eficiente y desaparecen tras 1d post-RI, los IRIFs persistentes permanecen estables 15d e incluso hasta varios meses post-RI. Estos IRIFs persistentes pueden contener un DNA dañado "perezoso", de difícil reparación, que requiere más tiempo para repararse, y/o un DNA que no se repara. Esta última interpretación es consistente con estudios previos en líneas celulares en los que se demostró que la desaparición de los IRIFs se produce por defosforilación de la γ H2AX y ésta es un indicador muy sensible de la reparación del DNA (Kruhlak y cols., 2006). En este sentido, la presencia en los IRIFs persistentes de pATM y 53BP1 y γ H2AX, todos ellos factores marcadores de sitios de señalización y reparación de DSBs (Fernandez-Capetillo y cols., 2004; Mailand y cols., 2007; Noon y cols., 2010), sugiere que la reparación del DNA no se ha completado. Además, la concentración de factores de reparación en los IRIFs podrían proteger los extremos de DNA rotos de un deterioro adicional (Bekker-Jensen y Mailand, 2010). Una posible interpretación funcional de los IRIFs persistentes es que las células post-mitóticas no necesitan reparar el genoma completo sino sólo los genes que se transcriben de forma activa, se trataría de una modalidad de reparación acoplada a la transcripción (Ljungman y Lane, 2004; Nospikel, 2007). En este contexto, aunque nosotros no conocemos la identidad de las secuencias de DNA dañado en los IRIFs-persistentes, estamos tentados a sugerir que las secuencias de DNA no reparadas se reclutan y "aislan" en estos compartimentos como un mecanismo de protección para evitar la inestabilidad genómica y garantizar la supervivencia neuronal. Si esto fuera así, implicaría que los dominios de cromatina portadores de lesiones en el DNA deben desplazarse distancias

relativamente largas para ser reclutados y compartimentalizados en uno o dos IRIFs persistentes. La configuración eucromática del núcleo de las neuronas tipo A podría facilitar la movilidad de la cromatina dañada. Esta interpretación es consistente con observaciones previas que revelan la gran movilidad de las DSBs en células HeLa tratadas con RI (Aten y cols., 2004), pero difiere de otros estudios de "timelapse" en célula viva que indican una movilidad muy limitada de las DSBs (Kruhlak y cols., 2006; Soutoglou y cols., 2007). Estas discrepancias podrían reflejar diferencias en la respuesta al daño en el DNA según el tipo celular o los métodos utilizados para demostrarlo.

Otro mecanismo para explicar la presencia de IRIFs permanentes es que la reparación del DNA no se ejecute por vía canónica de NHEJ (también denominada D-NHEJ) y lo haga por el "plan B" de reparación de la NHEJ, la NHEJ alternativa (B-NHEJ). En la actualidad se considera que esta vía reparadora es muy importante como vía de apoyo a la D-NHEJ (Mladenov e Iliakis, 2011; Panier y Boulon, 2013; Paul y cols., 2013). Ambas, difieren en que el complejo de ligación que fusiona los extremos del DNA dañado es diferente. Como se ha comentado en la introducción, en la D-NHEJ las endonucleasas Artemis y APE1 escinden bilateralmente nucleótidos de los extremos 5' y 3' del DNA dañado. Esto favorece la fusión de los extremos por el complejo ligasa IV-XRCC4-XLF previa aproximación y alineamiento de la doble hélice (Fig. 41A). Sin embargo, en la vía B-NHEJ está involucrada la histona no nucleosomal H1 que promueve el reclutamiento específico de PARP1 y el complejo MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) que es además un componente de la vía HR (ver Fig. 18). En el caso de la B-NHEJ, la endonucleasa Mre11 del complejo MRN escinde exclusivamente algunos nucleótidos de los extremos 5', lo que impide el correcto alineamiento y fusión de los extremos rotos que caracteriza a la D-NHEJ, produciéndose el solapamiento de las hebras del DNA dañado (Fig. 41B) (Mladenov e Iliakis, 2011; Panier y Boulon, 2013; Paul y cols., 2013). La B-NHEJ alternativa puede operar libremente o cuando la D-NHEJ canónica fracasa. Aunque, por el momento, no podemos demostrar la participación de esta vía en la reparación del DNA de los IRIFs persistentes, podemos hipotetizar que la γ H2AX concentrada en los extremos solapados genera una señalización permanente para el reclutamiento de moléculas implicadas en la DDR en los IRIFs tardíos. Esta hipótesis deja una serie de cuestiones abiertas que deberán ser analizadas en el futuro ya que este sistema de reparación no es inocuo. Si la reparación de los IRIFs persistentes fuera por la vía alternativa, podría afectar a la estabilidad genómica de las neuronas sensitivas tipo A ya que la cinética de reparación es muy lenta y frecuentemente conlleva anormalidades cromosómicas, incluyendo deleciones, translocaciones, inversiones y reorganizaciones cromosómicas complejas superiores a las que produce la NHEJ canónica (Paul y cols., 2013). Esta disfunción de las neuronas sensitivas contribuiría potencialmente a la fisiopatología de la neuropatía tóxica por RI.

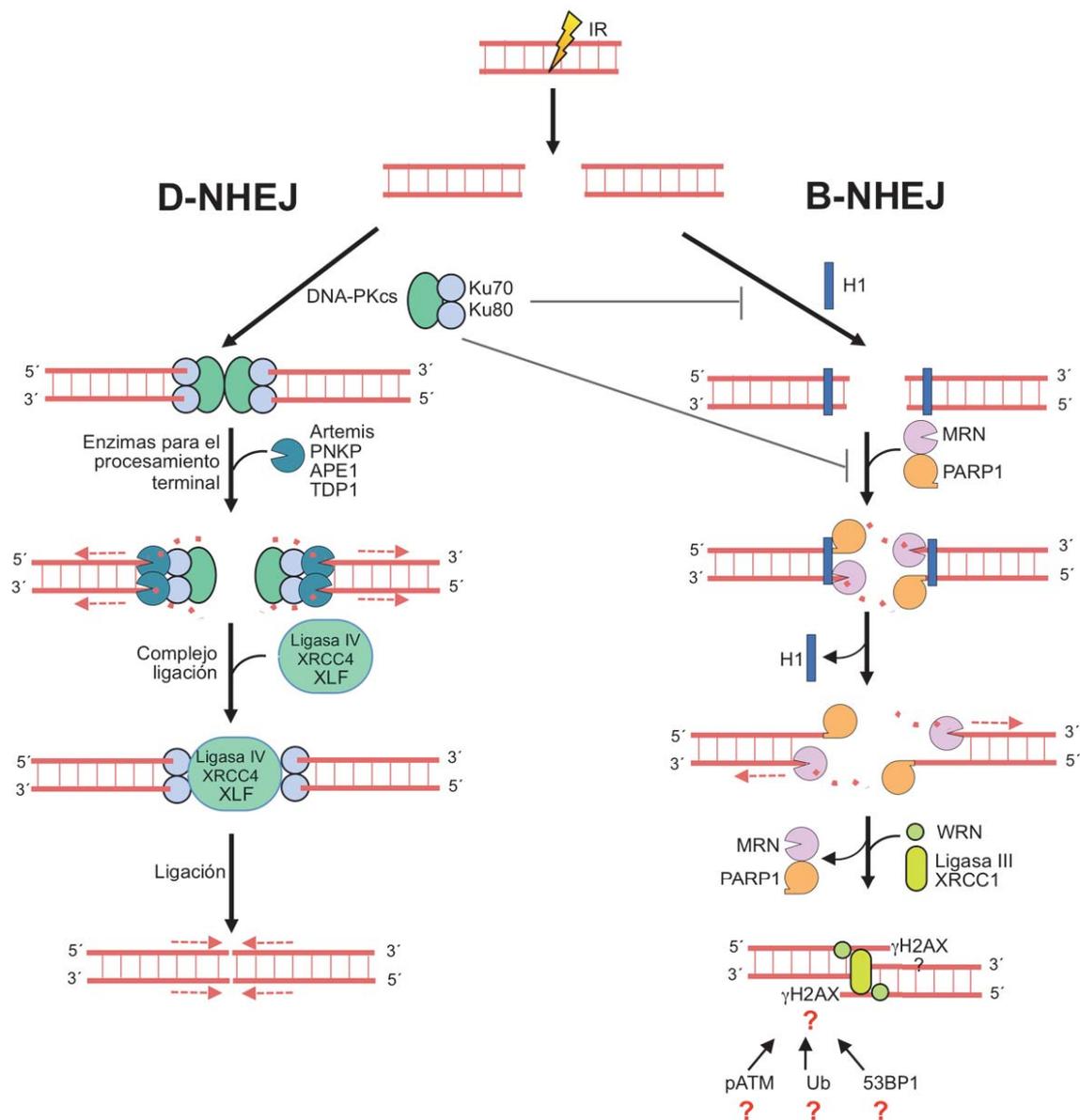


Figura 41. Esquema que muestra la reparación por las vías NHEJ. A. En la vía NHEJ canónica (D-NHEJ) actúan secuencialmente el complejo de enzimas de procesamiento terminal que, tras la escisión de unos pocos nucleótidos en los extremos 3' y 5', da como resultado la fusión alineada por aproximación de los extremos rotos. **B.** En la vía alternativa B-NHEJ están involucradas la histona no nucleosomal H1 y el complejo MRN, que también participa en la HR. La endonucleasa Mre11 de este complejo escinde algunos nucleótidos exclusivamente de los extremos 5', lo que repercute en la fusión por el complejo Ligasa III/ XRCC1 que produce solapamiento de los extremos. Estos extremos no fusionados, enriquecidos en γH2AX, podrían servir de reclamo permanente para las moléculas implicadas en la DDR (interrogantes).

Al igual que ocurre en células que permanecen en el ciclo celular, nuestro estudio en las neuronas del GT *in vivo* demuestra que las RI inducen la activación de la vía ATM-p53 (Helton y Chen, 2007). Esta activación se asocia con el incremento de los niveles de p21 y ciclina D1, una proteína de la fase G1 del ciclo celular. Esta respuesta indica que el daño del DNA generado por RI induce en las neuronas la transición de la fase G0-G1 y consecuentemente, la activación de la maquinaria del ciclo celular (Kruman y Schwartz,

2008). Sin embargo, en nuestro modelo experimental no se observan variaciones en los niveles basales de la ciclina A del periodo S tras el tratamiento con RI, lo que indica que las neuronas sensitivas no progresan a la fase S. Aunque se ha propuesto que la re-entrada en el ciclo celular, particularmente el intento de progresión al periodo S, en neuronas normales induce muerte neuronal por apoptosis (Bauer y Patterson, 2005; Kruman y Schwartz, 2008), nuestros resultados muestran que las neuronas ganglionares toleran la dosis de 4Gy de RI sin producirse signos citológicos de degeneración y apoptosis, como demuestra la ausencia de neuronas TUNEL positivas. Probablemente, en nuestro modelo experimental, la entrada en la fase G1 (dependiente de la ciclina D1) favorece la NHEJR y la supervivencia neuronal, una hipótesis que está justificada por el incremento sostenido de los niveles de esta ciclina hasta el día 15d post-RI. Otro aspecto interesante es que la RI induce en neuronas normales la sobreexpresión de la forma activa del factor de transcripción p53 (p-p53). En condiciones fisiológicas los niveles de expresión de la p53 son muy bajos, ya que es permanentemente degradada por la vía ubiquitina-proteasoma (VUP). Sin embargo, la forma fosforilada p-p53 se incrementa rápidamente en respuesta al daño en el DNA o a otros tipos de estrés celular (Boisvert y Lamond, 2010). Es bien conocido que p-p53 está implicada en la regulación de muchos genes relacionados con la respuesta al estrés celular, incluyendo genes de la DDR (Lukman y cols., 2013). En este contexto, nuestros resultados muestran que la expresión de p-p53 se induce a partir de las 3h, cuando se recupera la transcripción nuclear y progresa la reparación del DNA. Más enigmática es la explicación funcional de la sobreexpresión de la proteína p21. Probablemente, el propio estrés genotóxico activa su expresión dependiente de p-p53, y su respuesta puede estar implicada en la inhibición del avance del ciclo celular más allá de la fase G1 (Heber-Katz y cols., 2013).

Otro punto importante de nuestros resultados es la correlación entre la reparación del DNA y la actividad de transcripción global. Nuestro ensayo de transcripción *in vivo* de incorporación 5'-FU en el RNA naciente (Casafont y cols., 2006), demostró de forma precisa la alta actividad transcripcional del nucleolo y la formación de múltiples focos de transcripción extranucleolares en las neuronas sensitivas de tipo A normales. La dramática reducción de los focos de transcripción extranucleolar (dependiente de la RNA Pol II), detectada tras 0,5h post-RI, claramente indica que la transcripción global del genoma es muy sensible al daño del DNA. Las "factorías" o focos de transcripción residuales conservadas en este punto post-RI, podrían corresponder a la expresión de genes involucrados de forma directa en la respuesta neuronal al estrés por daño en el DNA.

En cuanto a los mecanismos de silenciamiento génico, se ha propuesto que los complejos de transcripción de la RNA Pol II se paran en las horquillas de transcripción lesionadas con DSBs, bloqueándose la fase de elongación de la transcripción (Ljungman y Lane, 2004; Hetman y cols., 2010). Además de los genes afectados por las DSBs, la inhibición transcripcional en neuronas del ganglio sensitivo parecen afectar a genes no

dañados y transcripcionalmente activos. En apoyo a esta idea, hemos observado que en la fase temprana de la DDR (0,5h post-RI) se induce la formación de dominios de cromatina reprimida, marcados por la expresión de la marca epigenética de la histona H4K20Me3, en sitios libres de daño en el DNA (γ H2AX negativos), que presumiblemente corresponden a focos de heterocromatinización. Asimismo, el incremento observado de la señal difusa, nucleoplasmática, de la histona H4K20me3 sugiere el silenciamiento de genes activos en dominios de eucromatina. Por otra parte, la expresión génica se reactiva a las 3h post-RI, cuando la mayoría de los IRIFs todavía no se han reparado.

La cinética de la actividad transcripcional en la DDR de las neuronas ganglionares sugiere que la recuperación de la tasa normal de transcripción requiere una reparación casi completa del daño en DNA. De hecho, la disminución de los IRIFs γ H2AX-positivos desde 3h post-RI es paralela a la recuperación de la tasa transcripcional global y del patrón de minifocos nucleares de la histona H4Ac, cuya expresión se asocia con sitios activos de transcripción en los que se produce un remodelamiento de la cromatina (Saunders y cols., 2006). No obstante, es importante destacar que si bien la expresión de la marca epigenética H4Ac y la incorporación de 5'-FU justifican la recuperación de la actividad transcripcional, la derrepresión de la eucromatina marcada epigenéticamente por la expresión de H4K20me3 es menos evidente. Este hecho sugiere que la inhibición transcripcional no es totalmente reversible, lo que podría contribuir a la disfunción neuronal y a la neurotoxicidad de las RI. De hecho, estudios recientes indican que la metilación de la H4K20me3 es una marca estable e irreversible en células eucariotas superiores (Balakrishnan y Milavetz, 2010; Black y Whetstine, 2011).

Finalmente, merece la pena señalar que los IRIFs transitorios y permanentes reclutan componentes de la VUP. La presencia de ubiquitina en los IRIFs está justificada ya que para el funcionamiento de la vía NHEJR es imprescindible la ubiquitilación de las histonas nucleosomales H2A, H2B y la H2AX fosforilada (γ H2AX) (Ma y cols., 2011). Como ya se ha indicado en la introducción, la ubiquitilación de estas histonas regula la transcripción, el silenciamiento génico y el remodelamiento de la cromatina en los sitios de daño en el DNA (Fischle y cols., 2003; Ma y cols., 2011). En el caso particular de la H2A, la ubiquitilación es crucial para el reclutamiento de la 53BP1, en la reparación por la vía NHEJ, o de BRCA1, en la vía HRR (Jackson y Durocher, 2013). De hecho, aunque no forma parte de los resultados presentados aquí, todos los IRIFs transitorios y permanentes reclutaban histonas ubiquitiladas específicamente. Otro componente esencial para la NHEJR de los IRIFs es el proteasoma catalítico 20S (ver Kouranti y Peyroche, 2012; Jackson y Durocher, 2013). Estudios recientes han demostrado, tanto *in vitro* como en células proliferantes, que la actividad de la VUP participa en la cascada reparadora del DNA. Dado que la mayor parte de los componentes de la vía de reparación por NHEJ son sustratos del proteasoma, la proteólisis podría regular la concentración de proteínas sustrato en los IRIFs, degradando

proteínas innecesarias y garantizando así el correcto ajuste molecular (Jackson y Durocher, 2013). Por lo tanto, es más que probable que el proteasoma 20S reclutado en IRIFs este implicado en dicha función biológica. En esta línea surgió nuestro interés por conocer la implicación funcional del proteasoma 20S en la reparación del DNA dañado endógenamente como resultado del propio metabolismo oxidativo neuronal que ha servido de base para desarrollar la segunda parte de nuestros resultados que se discutirán a continuación. Además, nos dejan un importante campo para futuros estudios de investigación dirigidos a conocer la implicación de VUP en la correcta respuesta post-RI en las neuronas sensitivas de tipo A.

5.2 RESPUESTA DE LAS NEURONAS SENSITIVAS AL ESTRÉS INDUCIDO POR LA INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que las neuronas de tipo A son particularmente vulnerables a la acción de drogas utilizadas en el tratamiento del cáncer, particularmente antibióticos intercalantes en el DNA, como la adriamicina, o el inhibidor del proteasoma Btz (Pena y cols., 2000; Casafont y cols., 2010). Como ya hemos comentado previamente, los ganglios nerviosos periféricos poseen capilares fenestrados, lo que determina la ausencia de una barrera hematoencefálica que restrinja el acceso de agentes quimioterápicos a las neuronas ganglionares. Esta elevada accesibilidad de las neuronas sensitivas a drogas neurotóxicas circulantes por la sangre da lugar a que muchos pacientes desarrollen una neuropatía periférica secundaria al tratamiento del cáncer. Además, las neuronas sensitivas de tipo A son particularmente vulnerables debido a su enorme actividad metabólica, con elevada actividad transcripcional y de traducción requerida para mantener su volumen celular y actividad bioeléctrica (Pena y cols., 2001). De acuerdo con estas propiedades, estas neuronas poseen un patrón preferente de cromatina abierta (eucromatina) muy accesible a los agentes que interaccionan con el DNA, y desarrollan una gran maquinaria de síntesis de proteínas (Pannese y cols., 1994). La disfunción de estas neuronas frecuentemente se asocia con inhibición de la síntesis de proteínas y disrupción del RER, un proceso clásicamente conocido como cromatolisis. De hecho, los tratamientos con agentes quimioterápicos que tienen como dianas el DNA o la inhibición de la síntesis de proteínas provocan una severa disfunción en las neuronas ganglionares y pueden producir cromatolisis (Richardson y cols., 2006; Casafont y cols., 2010; Argyrou y cols., 2012).

El Btz es un agente quimioterápico extremadamente potente y selectivo, que se une al proteasoma 26S y lo inhibe de manera estable pero reversible (Adams, 2004). Esta droga puede unirse y formar complejos con el grupo hidroxilo de la treonina de la subunidad proteolítica $\beta 5$ del proteasoma 20S, bloqueando su actividad como quimotripsina-like (Adams, 2004). El bloqueo de la proteasa $\beta 5$ por el Btz tiene un efecto multifuncional que conjuntamente da como resultado inhibir la proliferación celular e inducir la muerte por apoptosis (Fig. 42; puntos 1-3) de

las células tumorales. En primer lugar, produce agregados de proteínas poliubiquitiladas sustrato del proteasoma no degradadas y malplegadas, tanto a nivel citosólico como en RE. El efecto del Btz a nivel del RE es muy perjudicial ya que es la organela en la que se producen la mayor parte de las proteínas de secreción y de membrana (Fig. 42; punto 1a). Los agregados de proteínas tienden a oxidarse por la denominada respuesta de las proteínas malplegadas (Unfolded Protein Response, UPR) (Weniger y cols., 2011; Vaeteewoottcharn y cols., 2013), lo que favorece su solubilidad y proteólisis directa por el proteasoma 20S (Jung y Grune, 2008). Por lo general, este sistema es muy eficiente, más del 90% de las proteínas intracelulares dañadas y oxidadas son degradadas intracelularmente por el proteasoma, pero cuando este sistema es ineficiente o está específicamente inhibido, como en el caso del tratamiento con Btz, se genera un estrés oxidativo proteotóxico que afecta al RE y también produce daño en el DNA mitocondrial y nuclear, además de activar la vía intrínseca pro-apoptótica de la caspasa-9 (Fig. 42, puntos 1, 1b y 1c). En segundo lugar (Fig. 42; punto 2), el Btz es en sí mismo, un potente agente pro-apoptótico capaz de activar las vías extrínseca y extrínseca de las caspasas, proceso mediado por la inducción de las vías p53/NOXA/Bcl2/caspasa-9 y TRAIL/caspasa-8 respectivamente. Finalmente, el Btz suprime la señalización pro-supervivencia de las células tumorales inhibiendo al NF-κB (Nuclear Factor Kappa B) y AKT y activando p53/p21/p27 (Yu y cols., 2004; Feng y cols., 2007; de Wilt y cols., 2012) (Fig. 42, punto 3).

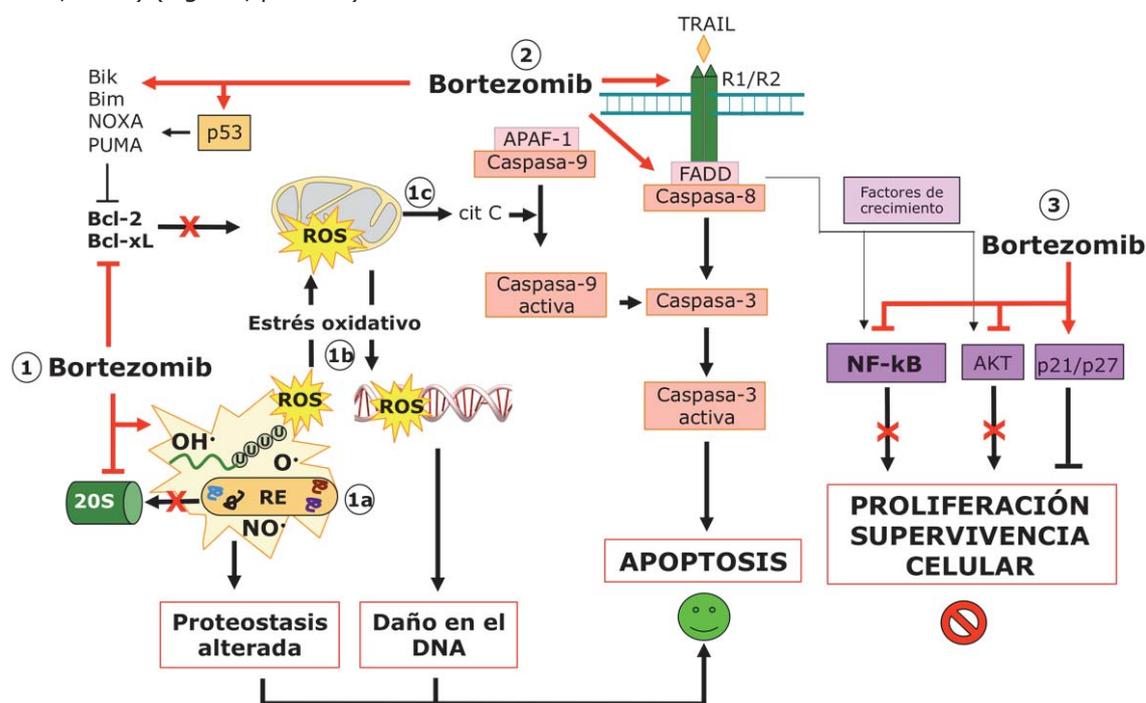


Figura 42. Mecanismos de acción de Btz en células tumorales. El Btz provoca el acúmulo de proteína (1) en citoplasma y RE (punto 1a). Esto potencia la desregulación proteostática y al estrés oxidativo (punto 1b) que a su vez activa la vía intrínseca de las caspasa-9 y daño en del DNA mitocondrial y nuclear (punto 1c). Por otra parte, el Btz es un potente factor pro-apoptótico que induce las vías p53/NOXA/Bcl2/caspasa-9 y TRAIL/caspasa-8 (punto 2) activando las vías intrínseca y extrínseca de la caspasa-3/apoptosis. El tercer mecanismo de acción (punto 3) es suprimir la señalización pro-supervivencia inhibiendo principalmente NF-κB y activando p53/p21/p27.

Merece la pena hacer mención a una de las dianas más importantes del Btz, la inhibición del factor de transcripción NF-kB. Genéricamente hablamos de NF-kB aunque existen varios subtipos, todos ellos heterodímeros, siendo el más común el complejo p50-p65 (Baldwin, 2001). Todos los dímeros NF-kB tienen secuencias homólogas con alta afinidad para unirse al DNA en sus forma transcripcionalmente activa y para interaccionar con sus inhibidores ("Inhibitor of NF-kB", Ikb). Los NF-kBs son sensores naturales que se expresan basalmente en la mayoría de los tipos celulares en condiciones fisiológicas, pero están sobreexpresados en las células tumorales y en determinadas situaciones de estrés celular (Napetsching y Wu, 2013), razón por la que Ahn y Aggarwal (2005) los denominan "smoke-detector" o "stress-sensor". En su forma inactiva el NF-kB forma complejos citoplasmáticos con su Ikb (NF-kB-Ikb). En la liberación de NF-kB es clave la quinasa IKK ("Ikb Kinase") que en respuesta a factores extra- e intracelulares fosforila a Ikb (pIkb) que, a su vez, induce su poliubiquitilación, degradación proteasomal y, consecuentemente, la liberación del dímero NF-kB. Éste se transporta al núcleo donde actúa como factor de transcripción activador de más de 400 genes diana implicados en la proliferación, supervivencia y anti-apoptosis (Ahn y Aggarwal, 2005; Chen y cols., 2011). El proceso de activación es muy rápido (minutos) y está mediada por un amplio espectro estímulos de respuesta al estrés celular incluyendo los radicales libres, la carcinogénesis, los promotores tumorales y el daño en el DNA (Baldwin, 2001; Ahn y Aggarwal, 2005).

El NF-kB activo es común en muchos tipos de tumores y su expresión se debe, en gran medida, a la hiperactividad de IKK que mantiene hiperfosforilado a Ikb lo que conlleva su degradación proteasomal permanente. Lógicamente, el nivel nuclear elevado de NF-kB induce en las células tumorales una tasa proliferativa y antiapoptótica muy grande. Por esta razón, el Btz es un quimioterápico de elección en tumores que, como en el mieloma múltiple refractario y en el linfoma de las células del manto, cursan con hiperfosforilación de Ikb (Chen y cols., 2011; Jia y Liu, 2013). En estos tumores el tratamiento con Btz tiene un incuestionable beneficio clínico. Sin embargo, también puede afectar a las células normales proliferantes y las células post-mitóticas, como las neuronas sensitivas. De hecho la neurotoxicidad del SNP es un handicap muy importante en los tratamientos con este fármaco porque conlleva como efecto secundario el desarrollo de la neuropatía periférica tóxica ("Bortezomib Induced, Peripheral Neuropathy", BIPN). Esta BIPN altera la calidad de vida de los los pacientes oncológicos ya que es muy dolorosa y afecta a la sensibilidad general propioceptiva (ver Cavaletti y Nobile-Orazio, 2007; Argyriou y cols., 2012).

Las bases moleculares de la neurotoxicidad inducida por el Btz no son bien conocidas. Estudios realizados en roedores por nuestro grupo y por otros investigadores han aportado importantes pistas acerca de la fisiopatología de la BIPN. En la actualidad

sabemos que esta neuropatía es dosis dependiente y puede ser primaria o secundaria. Así, Cavaletti y cols., (2007) han demostrado que la administración crónica de Btz (0,2mg/kg) produce alteraciones en las células de Schwann y la glía satélite, que dan lugar a axonopatías secundarias principalmente de las fibras nerviosas amielínicas. En este contexto, estudios posteriores han demostrado que la BIPN puede tener etiología primaria ya que, las neuronas sensitivas de pequeño tamaño (tipo C), cuyos axones son amielínicos, son dianas de la droga (Bruna y cols., 2010; Carozzi y cols., 2010). Las lesiones celulares más importantes incluyen vacuolización, daño mitocondrial y del retículo endoplásmico así como desregulación intracelular del Ca^{2+} (Landowski y cols., 2005; McConkey y Zhu, 2008). En nuestro laboratorio hemos corroborado que las neuronas ganglionares sensitivas son primariamente afectadas por el tratamiento con Btz (Casafont y cols., 2010 y presentes resultados) y su disfunción debe ser un componente esencial en la fisiopatología de la BIPN. Así, el Btz induce la acumulación de proteínas ubiquitiladas, reduce la actividad transcripcional extranucleolar y altera la exportación de mRNAs poliadenilados. Los mRNAs poliadenilados se agregan en cuerpos nucleares acompañados de proteínas de unión a los RNAs como la PABPN1 y la Sam 68 (Casafont y cols., 2010). Nuestros presentes resultados demuestran que las neuronas sensitivas de tipo A son enormemente sensibles al Btz. Por lo tanto, en la fisiopatología de BIPN, además de la disfunción nociceptiva causada por las alteraciones de las neuronas de tipo C, puede haber un importante componente propioceptivo.

Como discutiremos punto a punto, en el presente estudio demostramos que las neuronas de tipo A son tremendamente plásticas para adaptarse a la injuria proteotóxica del Btz sin comprometer su supervivencia. El Btz induce de forma dosis dependiente mecanismos conjuntos de neurotoxicidad y de neuroprotección. La neurotoxicidad es aguda y muy severa, afecta al núcleo y al citoplasma. En el núcleo el Btz induce la caída en la actividad transcripcional extranucleolar y daño acumulativo en el DNA y, a nivel del citoplasmático, cromatolisis central con caída en la síntesis global de proteínas. Sin embargo, en estas circunstancias, las neuronas de tipo A son capaces de sobrevivir y desarrollar mecanismos de neuroprotección que incluyen el remodelamiento del microambiente perinuclear, la activación de la transcripción nucleolar y el incrementando de CBs. En su conjunto esta paradoja biológica, neurotoxicidad versus neuroprotección, plantea un sistema interesante para evaluar la plasticidad neuronal para regular la expresión génica en la respuesta neuronal al estrés y mantener la supervivencia celular. También es importante considerar si la inhibición del NF- κ B puede tener alguna implicación funcional en las neuronas sensitivas.

Con respecto al daño en el DNA, nuestros resultados demuestran que el Btz induce la acumulación dosis dependiente de focos de daño en el DNA positivos al marcaje de la

γ H2AX, el sensor más importante de las DSBs (Fernandez-Capetillo y cols., 2004). Sin embargo, a diferencia de los focos transitorios de daño en el DNA inducidos por la RI (IRIFs) que son γ H2AX-positivos y concentran la proteína reparadora 53BP1 de la vía NHEJ, los focos de daño inducidos con el Btz (Btz-IFs) generalmente no reclutan esta última proteína. Tan solo los Btz-IFs de gran tamaño concentraban ambas moléculas. Además, mientras que la mayoría de los IRIFs desaparecen en las primeras 24h post-RI, indicando una reparación efectiva del DNA, los Btz-IFs persisten durante el tratamiento crónico con el inhibidor del proteasoma. Estos resultados parecen reflejar que en las neuronas sensitivas de tipo A la reparación de las lesiones en el DNA inducidas por el Btz es ineficiente y puede ser un componente importante en la fisiopatología de la BIPN. En este contexto, es bien conocido que la lesión en el DNA, particularmente las DSBs, representa una de las agresiones más nocivas para la célula y está implicada en la fisiopatología de múltiples procesos neurodegenerativos (Martin, 2008; McKinon, 2009). De hecho, estudios previos de nuestro grupo, utilizando el modelo murino *pcd* ("Purkinje neurodegeneration") de ataxia cerebelosa, demostraron que en la neurodegeneración de las neuronas de Purkinje se producía una reparación deficiente del DNA con acumulación de lesiones en el DNA. Tales lesiones provocan heterocromatinización y silenciamiento génico progresivo resultando una severa disfunción neuronal que conducía a la muerte celular (Baltanas y cols., 2011a). De acuerdo con estas observaciones, el ensayo de transcripción realizado en las neuronas del GT tratadas con Btz también reveló menor incorporación de 5'-FU en las RNAs nacientes.

Con respecto a los mecanismos moleculares que subyacen al daño en el DNA inducido por el Btz en las neuronas sensitivas de tipo A, nosotros consideramos que el estrés oxidativo generado por la propia proteotoxicidad citosólica y del RE induce la producción de ROS que dañan el DNA tanto a nivel mitocondrial como nuclear (Meiners y cols., 2003; Steffen y cols., 2010; Weniger y cols., 2011; Vaeteewoottcharn, 2013). En este contexto, un estudio previo realizado en células de mieloma múltiple ha mostrado que el Btz induce la generación de ROS que producen daño oxidativo en el DNA (Feng y cols., 2007; McCool y Miyamoto, 2012). Es más, la inducción de estrés oxidativo es uno de los mecanismos de acción en los que se fundamenta la quimioterapia con Btz, siendo uno de los factores que contribuye a la apoptosis de las células tumorales (de Wilt y cols., 2013) (ver Fig. 42). Una cuestión muy importante es por qué habiendo señalización de los Btz-IFs por la γ H2AX, estos focos no reclutan 53BP1, un componente esencial de la maquinaria de reparación (Escribano-Diaz y Durocher, 2013). Teóricamente podríamos proponer, como primera posibilidad, que el estrés proteotóxico sostenido en el tiempo que dura el tratamiento perpetúa el daño en el DNA generando Btz-IFs permanentes que superan la capacidad reparadora de la vía NHEJ. Sin embargo, esto no justifica la ausencia de 53BP1 en los Btz-IFs, ya que esta proteína se concentra en el nucleoplasma e incluso forma agregados nucleares. Dado que el Btz inhibe la ubiquitilación de

la H2A (Wang y cols., 2009), alternativamente podríamos proponer que la ubiquitilación deficiente de la cromatina en los Btz-IFs impide la reparación por la vía NHEJ. En este contexto, hemos comentado ya en el apartado de introducción (Figs. 17 y 18) que la ubiquitilación de la H2A (H2A-Ub) es imprescindible para el reclutamiento de la 53BP1 en los focos de lesión del DNA (Kass y Jasin, 2010; Mladenov y Iliakis, 2011; Panier y Boulton, 2013).

Otra posibilidad para explicar fracaso de la reparación del DNA dañado sería la inhibición del factor de transcripción NF- κ B inducida por el Btz (ver de Wilt y cols., 2013). En líneas tumorales, se ha demostrado que el daño en el DNA induce la activación del NF- κ B con el fin de garantizar la estabilidad del genoma durante el proceso reparador e inducir la transcripción de genes de parada del ciclo celular y antiapoptóticos (McCool y Miyamoto, 2012). Estas dos condiciones son básicas para establecer una adecuada cinética de reparación del DNA sin que las células entren en apoptosis por estrés replicativo. La activación del NF- κ B inducida por el daño en el DNA no requiere la síntesis de *nov*o sino su traslocación al núcleo celular (Janssens y Tschopp, 2006). Esta importación nuclear requiere que una fracción de la pATM activada en la DDR se una a NEMO (pATM-NEMO) y sea exportada al citoplasma donde activa a IKK, una quinasa esencial para la liberación en el citoplasma de la NF- κ B secuestrada por el inhibidor I κ B, un proceso que, como ya hemos comentado anteriormente, es dependiente de la actividad de la VUP. Finalmente, NF- κ B se transporta al núcleo donde actúa como factor de transcripción (Janssens y Tschopp, 2006; McCool y Miyamoto, 2012). Su papel funcional en respuesta al daño en el DNA neuronal no es bien conocido. El NF- κ B se expresa en todos los tipos celulares del SNC, incluyendo neuronas, astrocitos, microglía y oligodendroglia (O'Neill y Kaltschmidt, 1997) y, en su forma activa regula la expresión de un complejo grupo de genes, que son funcionalmente muy importantes en la plasticidad, supervivencia y respuesta a la injuria neuronal (ver Mattson y Camandola, 2001; Mattson y Meffert, 2006). Las neuronas sensitivas maduras muestran niveles basales de NF- κ B activo, pero éstos se elevan rápidamente en modelos experimentales de axotomía *in vivo*, sugiriendo una función de neuroprotección. Además, la inhibición sostenida de NF- κ B produce en las neuronas sensitivas la muerte neuronal por un mecanismo de estrés oxidativo equiparable al que produce el Btz en líneas celulares (Saleh y cols., 2013). En consecuencia, cabría esperar que en las neuronas de tipo A la reducción de los niveles de NF- κ B activo secundaria a la inhibición del proteasoma con Btz pudiera contribuir a la reparación deficiente del DNA.

La inducción de daño en el DNA por el tratamiento con Btz se acompaña de retención nuclear de RNAs poliadenilados, un hallazgo que había sido observado en estudios anteriores realizados en este laboratorio (Casafont y cols., 2010). Estos mRNAs poliadenilados forman una nueva categoría de cuerpos nucleares que denominamos "cuerpos poli(A) RNA".

Habitualmente, las neuronas que presentaban estos cuerpos exhibían severa disfunción de la maquinaria citoplasmática de síntesis de proteínas (cromatolisis de los grumos de Nissl), por lo que consideramos que estos cuerpos reclutan y retienen una fracción del mRNAs nucleares que no se exportan correctamente al citoplasma cuando su traducción está comprometida debido a la cromatolisis.

La cromatolisis central inducida por Btz con disolución de los grumos de Nissl y pérdida de mRNAs poliadenilados es dosis-dependiente, constituye un componente esencial de la respuesta neuronal al estrés proteotóxico y representa un típico marcador de una severa disfunción neuronal, particularmente de la síntesis de proteínas. De hecho, la cromatolisis también se induce en respuesta a la axotomía y en algunas enfermedades neurodegenerativas (de Nicola y cols., 2009; Tapia y cols., 2012). En el caso de las neuronas ganglionares de tipo A, la cromatolisis está claramente relacionada con la disminución de los niveles de la proteína de BDNF ("Brain Derived Neurotrophic Factor"). Esta proteína se sintetiza en los grumos de Nissl de las neuronas sensitivas y juega un papel muy importante en el mantenimiento de la fisiología neuronal normal y en la supervivencia de las neuronas (Binder y Scharfman, 2004). Por ello, la expresión de BDNF puede considerarse como un buen marcador de la actividad de síntesis de proteínas. En este sentido, es interesante señalar que en determinadas enfermedades neurodegenerativas, tales como el Huntington o el Alzheimer, la disfunción en la síntesis de proteínas (cromatolisis) se asocia con una reducción en los niveles de BDNF en varios centros nerviosos (Binder y Scharfman, 2004 ; Seo y cols., 2004).

En las neuronas del GT y en otros tipos neuronales (Tapia y cols., 2012), la cromatolisis comienza habitualmente cerca del núcleo y se extiende hacia la membrana plasmática. En este proceso se produce un desplazamiento del núcleo a una posición excéntrica. Los mecanismos que regulan esta migración nuclear son desconocidos. Una posibilidad es que se produzca de forma similar al que ocurre en la migración de las neuronas de la corteza cerebral durante la neurogénesis. En este proceso el movimiento del centrosoma precede a la migración nuclear, de tal manera que el núcleo podría estar separado del centrosoma entre 10-20 μ m o más (Burke y Roux, 2009; Burke y Stewart, 2013). Sin embargo, en neuronas sensitivas control y tratadas con Btz, la distancia mínima entre el centrosoma y la envoltura nuclear es mucho menor (hasta 4 μ m), lo que sugiere que la migración nuclear y el desplazamiento del centrosoma ocurren en paralelo.

Un aspecto importante es la capacidad de las neuronas ganglionares de sobrevivir al tratamiento crónico con Btz (dato no mostrado). Esta capacidad de supervivencia se relaciona muy bien con la observación en clínica humana de que la BIPN generalmente revierte tras la reducción de la dosis de Btz o la interrupción del tratamiento (Richardson y

cols., 2006), sugiriendo que la inhibición del proteasoma induce una respuesta de neuroprotección que contrarresta el estrés proteotóxico. De acuerdo con esta hipótesis, nuestros resultados muestran la ausencia de signos de apoptosis neuronal con el ensayo de TUNEL y la aparición de signos celulares de neuroprotección en las neuronas del GT tras el tratamiento con el Btz. En particular proponemos como mecanismos neuroprotectores i) la formación de pliegues nucleares, ii) la generación de un nuevo dominio perinuclear de síntesis protéica, iii) la decondensación de la heterocromatina en la periferia nuclear y iv) la regulación al alza de genes que codifican determinadas subunidades del proteasoma.

La formación de pliegues nucleares parece ser un mecanismo neuronal adaptativo para favorecer el transporte núcleo-citoplasma al incrementar la relación superficie/volumen. De hecho, estos pliegues nucleares contienen abundantes CNPs, como indican los hallazgos de inmunofluorescencia de doble marcaje para la lámina B1 y la nucleoporina y el análisis ultraestructural. Además, el incremento en los niveles de lámina B1 tras el tratamiento con Btz es consistente con la ganancia de envoltura nuclear producida por los pliegues nucleares. En este contexto, existen estudios que apoyan que los pliegues nucleares son estructuras dinámicas que transforman la geometría nuclear (Lafarga y cols., 1998) y favorecen la transcripción en la proximidad de los poros nucleares (Wittman y cols., 2009; Akhtar y Gasser; 2007). En nuestro modelo de inhibición de proteasoma por Btz, nuestra hipótesis de un tráfico preferencial núcleo-citoplasma en el polo nuclear plegado se apoya también en la acumulación local de polirribosomas, RNAs poliadenilados y PAPBN1 en los dominios citoplasmáticos ocupando los pliegues nucleares. Esta organización reduce la distancia de difusión del RNA del núcleo a la maquinaria citoplasmática de síntesis de proteínas y podría favorecer la traducción de los mRNAs. Una organización similar de la maquinaria de síntesis de proteínas ocurre de manera natural en las neuronas de Purkinje, que tienen una elevada actividad transcripcional concentrada en el polo nuclear plegado o dendrítico (Palay y Chan-Palay, 1974). En este contexto, proponemos que el polo nuclear plegado enriquecido en polirribosomas está activamente involucrado en la síntesis protéica y su formación refleja una respuesta neuroprotectora que favorece la supervivencia neuronal tras la inhibición del proteasoma. De hecho, nuestros resultados con el ensayo de transcripción y la hibridación *in situ* de los poli(A) RNAs demuestran una elevada concentración de RNAs recién sintetizados y exportados al citoplasma en el polo nuclear plegado con respecto a los niveles de RNA detectados en el resto del citoplasma.

La decondensación de la cromatina en la periferia del núcleo es otra respuesta neuronal al estrés proteotóxico. Un efecto similar se ha descrito en la progeria o síndrome Hutchinson-Gilford, caracterizado por la mutación del gen *LMA* (codifica la lámina A) que también induce cambios en la morfología nuclear y la formación de pliegues nucleares (Oberdoerffer y Sinclair, 2007). Además, estudios previos han demostrado que en el envejecimiento celular se induce la

decondensación de la cromatina y la activación de ciertos genes relacionados con el envejecimiento en la periferia nuclear (Imai y Kitano, 1998). En este contexto, la transformación de agregados de heterocromatina asociados a la envoltura nuclear en dominios de eucromatina inducida por el Btz sugiere la puesta en marcha de un mecanismo de desrepresión de genes involucrados en la respuesta neuronal al estrés proteotóxico. De acuerdo con esta idea, hemos observado un incremento en la expresión de genes que codifican la subunidad catalítica $\beta 5$ y de la subunidad estructural $\alpha 5$, ambos implicados en la respuesta antioxidante que induce el estrés proteotóxico mediado por la inhibición del proteasoma en otros sistemas celulares (Steffen y cols., 2010; Gavilan y cols., 2012).

En conclusión, la actividad del proteasoma en las neuronas ganglionares sensitivas juega un papel fundamental en la regulación de la arquitectura, la posición y la forma del núcleo neuronal, y es también esencial para la reparación eficiente del DNA. Proponemos que la disfunción de estas neuronas inducida por el Btz, mediada por el daño en el DNA y la traducción deficiente de mRNAs (cromatolisis), representa un componente importante en la fisiopatología celular y molecular de la BIPN. Además, la reorganización coordinada del microambiente de la envoltura nuclear y de la maquinaria de síntesis de proteínas parece ser un mecanismo neuroprotector importante, anteriormente desconocido, de supervivencia neuronal bajo condiciones de estrés proteotóxico. Finalmente, en términos más generales, los mecanismos celulares de disfunción y neuroprotección descritos en este estudio en las neuronas ganglionares podrían ser de aplicación a otros cuadros neurodegenerativos que cursan con déficit en la actividad del proteasoma.

Papel neuroprotector del nucleolo y del CB en la respuesta neuronal al estrés proteotóxico.

Un hallazgo muy importante presentado en nuestros resultados es la respuesta reactiva, dosis dependiente, del nucleolo y de los CBs a la inhibición del proteasoma, que cursa en paralelo con la eucromatinización en la periferia del núcleo. Esta respuesta se caracteriza por un incremento del número y tamaño de los nucleolos, la regulación al alza de la síntesis de pre-rRNAs y el aumento de CBs. Considerados en su conjunto, estos cambios parecen reflejar una respuesta compensatoria, de neuroprotección, de las neuronas ganglionares sensitivas con el fin de paliar parcialmente la disfunción de la maquinaria de síntesis de proteínas (cromatolisis) inducida por la inhibición del proteasoma.

El incremento en el número medio de nucleolos por neurona inducido por el Btz sugiere la activación de la nucleologénesis. Es bien conocido que el número teórico máximo de nucleolos en una célula está establecido por el número de cromosomas portadores de las regiones organizadoras del nucleolo (Nucleolar organizers regions, NORs). Estas regiones contienen repeticiones en tándem de genes que codifican los pre-rRNAs y, cada uno de ellos,

podría, potencialmente, organizar la formación de un nucleolo (Schwarzacher y Wachtler, 1993; Raska y Shaw, 2006; Hernandez-Verdun y cols., 2010). Las neuronas del GT de la rata son diploides y tienen seis NORs, por lo que el número máximo teórico sería de seis nucleolos por núcleo (Pena y cols., 2001). Sin embargo, en condiciones normales, la mayoría de las neuronas del GT tienen un único nucleolo por núcleo (Pena y cols., 2001). Estudios previos han mostrado que esta tendencia a la mononucleolación se produce por la asociación espacial de los NORs y la fusión de los nucleolos durante la diferenciación, así como por la existencia de algunos NORs inactivados que no contribuirían a la formación del nucleolo (Crespo y cols., 1988; Schwarzacher y cols., 1993). En este contexto, el incremento en el número de nucleolos que observamos en nuestros resultados podría reflejar la activación de NORs transcripcionalmente reprimidos dando lugar al ensamblaje de nucleolos adicionales que favorecerían la síntesis de rRNAs y la biogénesis de ribosomas. De acuerdo con estos hallazgos, un estudio posterior ha mostrado que la estimulación neuronal prolongada induce un incremento en el número de nucleolos, acompañado de una mayor tasa de síntesis de proteínas, sugiriendo la activación de la nucleologénesis (Jordan y cols., 2007).

El tamaño del nucleolo es un parámetro directamente relacionado con la transcripción nucleolar que refleja la tasa de síntesis de pre-rRNAs y su procesamiento para producir partículas pre-ribosomales (Raska y cols., 2006; Hernandez-Verdun y cols., 2010). Tanto en estudios previos en neuronas del ganglio sensitivo humano (Kinderman y Jones, 1993) como en neuronas del núcleo supraóptico estimuladas osmóticamente (Lafarga y cols., 1991) se ha demostrado que el tamaño del nucleolo se relaciona positivamente con el tamaño del soma neuronal y con la actividad transcripcional. De acuerdo con este criterio, el incremento en el tamaño nucleolar inducido por la inhibición del proteasoma en las neuronas ganglionares se correlaciona claramente con la activación de la transcripción nucleolar y representa un indicador más de la respuesta neuroprotectora al estrés proteotóxico. También es importante resaltar que tanto la morfología reticulada del nucleolo, característica de las neuronas con elevada tasa de transcripción (Pena y cols., 2001; Casafont y cols., 2006), como la incorporación activa de la 5'-FU en el rRNA naciente, se conservan en las neuronas tratadas con Btz. Esto descarta la posibilidad de que el incremento en la masa nucleolar sea el resultado de la acumulación pasiva en el nucleolo de proteínas sustrato del proteasoma que no pueden degradarse por la inhibición del proteasoma. Variaciones del tamaño nucleolar se han relacionado con el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (García-Moreno y cols., 1997; Parlato y cols., 2008; Hetman y Pietrzak, 2012). Por ejemplo, en pacientes de Alzheimer se ha descrito una disminución del volumen nucleolar en las neuronas de los centros nerviosos afectados que se relaciona con el silenciamiento de los genes ribosomales (Mann y cols., 1988; Iacono y cols., 2008; Hetman y cols., 2012). Una respuesta similar a la de las neuronas ganglionares tratadas con Btz, incluyendo excentricidad nuclear, cromatolisis severa, hipertrofia nucleolar e incremento de los niveles de rRNA, se produce en respuesta a la

axotomía de varios tipos neuronales del SNP (Kinderman y Jones, 1993; Wells y Vaidya, 1994; McIlwain y Hoke, 2005). De acuerdo con nuestra hipótesis de una función neuroprotectora del nucleolo, en el modelo experimental de axotomía se considera que la respuesta reactiva del nucleolo es un mecanismo reparador esencial para la correcta regeneración de las neuronas axotomizadas (Kinderman y Jones, 1993).

Es bien conocido que el nucleolo es una organela que actúa como sensor y coordinador de la respuesta al estrés celular (Olson, 2004; Boulon y cols., 2010). Así, en la respuesta a diversos tipos de estrés se generen alteraciones nucleolares como la segregación de los CFD y CG, formación de caperuzas perinucleolares de UBF o traslocación de B23 al nucleoplasma. Todas estas alteraciones se asocian a la inhibición de la RNA pol I y son dependientes de la activación de p53 (Boulon y cols., 2010; Hetman y cols., 2010; Kreiner y cols., 2013). Se han descrito diferentes factores que dan lugar a esta inhibición transcripcional a nivel nucleolar, incluidos tratamientos con agentes genotóxicos o con inhibidores de la transcripción nucleolar, así como la eliminación condicional del factor iniciador de la transcripción TIF-IA en ratón (Yuan y cols., 2005; Cioce y cols., 2006; Kalita y cols., 2008; Parlato y cols., 2008; Hetman y cols., 2010). Es interesante señalar que en las neuronas del GT, el estrés proteotóxico inducido por Btz preserva la organización estructural del nucleolo y favorece la síntesis del rRNA 45S. Sin embargo, esta respuesta no parece necesitar la activación de p53. Este hallazgo es consistente con la reciente demostración de que el tratamiento con Btz reduce la expresión de p53 en un modelo animal de daño por isquemia-reperfusión en la retina (Chen y cols., 2013). Por otra parte, en nuestro modelo experimental de neuronas expuestas a RI, la activación de p53 se asocia con la caída de la transcripción nucleolar, lo que sugiere una relación negativa entre la activación de p53 y la síntesis de rRNAs en las neuronas sensitivas.

Estudios recientes en cultivos celulares indican que las células pueden compensar la inhibición del proteasoma mediante la activación transcripcional de genes de defensa antioxidante que incluirían los genes de las subunidades del proteasoma 26S (Steffen y cols., 2010). Nuestros resultados muestran que la inhibición del proteasoma produce una regulación al alza de los genes que codifican UBF, fibrilarina y B23, proteínas esenciales para la síntesis y procesamiento de los pre-rRNAs (Raska y cols., 2006; Boisvert y cols., 2007; Hernandez-Verdun y cols., 2010). Además, también observamos incremento de c-Myc, un regulador transcripcional que favorece la biogénesis de ribosomas (Grandori y cols., 2005; van Riggelen y cols., 2010). Aunque el incremento de c-Myc podría deberse simplemente a que esta proteína no se proteoliza por el proteasoma, el incremento paralelo y significativo de la expresión génica de este oncogén plantea la posibilidad de que c-Myc pueda estar involucrado en la respuesta nucleolar al estrés proteotóxico. En este contexto, nuestros resultados sugieren que la respuesta reactiva del nucleolo compensa parcialmente la disfunción en la maquinaria de síntesis de proteínas causada por la inhibición del

proteasoma. No obstante, otros estudios en líneas celulares humanas cultivadas han demostrado que tratamientos cortos de inhibición del proteasoma alteran la morfología nucleolar e interfieren con el procesamiento del pre-rRNA (Stavreva y cols, 2006). Esta discrepancia con nuestros resultados podría deberse a que se han usado diferentes protocolos experimentales tanto en la dosis como en la duración de los tratamientos con inhibidores del proteasoma. Nosotros hemos administrado el Btz a los animales de experimentación durante cuatro días y su repercusión fisiopatológica ha sido analizada en las neuronas sensitivas, células post-mitóticas que pueden responder de diferente forma a la inhibición del proteasoma.

En conclusión, la inhibición del proteasoma en neuronas del GT de tipo A induce una respuesta de activación nucleolar independiente de p53 y mediada por un incremento en los niveles de expresión de genes que codifican rRNA, c-Myc y proteínas nucleolares requeridas para la síntesis y el procesamiento de los rRNAs. Todo esto, junto con el incremento del tamaño, el mantenimiento de la organización nucleolar y la mayor tasa de transcripción verificada con el ensayo de transcripción *in situ* de la 5'-FU, apoya la función neuroprotectora del nucleolo orientada a la biogénesis de ribosomas para compensar la cromatolisis producida por la inhibición del proteasoma por el Btz y mantener la supervivencia neuronal.

Otro aspecto destacado de nuestros resultados es el incremento de CBs canónicos tras el tratamiento con Btz. Consideramos que esta respuesta refleja la coordinación del ensamblaje del CB con la transcripción y el procesamiento nucleolar de los pre-rRNAs. Así, el incremento en la expresión del gen que codifica la coilina es consistente con la activación del ensamblaje de los CBs. En este sentido, es bien conocido que la coilina es un regulador esencial del ensamblaje molecular de CBs (Raska y cols., 1990; Tucker y cols., 2001; Strzelecka y cols., 2010). Además, los CBs de las neuronas tratadas con Btz preservan la organización estructural y molecular de los CBs canónicos (Gall, 2000; Cioce y Lamond, 2005; Machyna y cols., 2013), lo que sugiere que están involucrados activamente en la biogénesis de las snRNPs y snoRNPs requeridas para el procesamiento de pre-mRNAs y pre-rRNAs. La presencia ocasional, tras el tratamiento con Btz, de CBs con una segregación parcial de su componente fibrilar denso es una variante morfológica que también puede darse en neuronas del GT normales (Pena y cols., 2001). Nuestros resultados son también consistentes con estudios previos que demuestran que los CBs son dependientes de transcripción y su formación se acomoda dinámicamente la demanda nuclear de procesamiento de pre-mRNAs y pre-rRNAs (Lafarga y cols., 1991, 1998; Gall, 2000; Cioce y Lamond, 2005; Jordan y cols., 2007). De hecho, la mayoría de las señales de estrés que causan desorganización de los CBs se asocian a inhibición de la transcripción (Cioce y cols., 2006; Boulon y cols., 2010; Gilder y cols., 2011). En este sentido, recientemente hemos demostrado, en un modelo animal de degeneración de las células de Purkinje, el ratón mutante *pcd* ("Purkinje cell degeneration"), que la inhibición de la transcripción mediada por

la acumulación de daño en el DNA desensambla los CBs y reduce dramáticamente su número medio por neurona (Baltanas y cols., 2011a).

Respecto a la relación física entre CBs y nucleolos observada en las neuronas ganglionares sensitivas tratadas con Btz, se trata de un hallazgo común en otras poblaciones neuronales (Raska y cols., 1990; Lafarga y cols., 2009; Gall, 2000; Pena y cols., 2001). Esta relación se fundamenta en que las dos estructuras nucleares comparten determinadas proteínas, como la fibrilarina, y snoRNPs (Gilder y Herbert, 2011). También es importante reseñar que la biogénesis de algunas snoRNPs se completa en los CBs antes de ser transferidas, probablemente mediante interacción física, al nucleolo donde son necesarias para el procesamiento de los pre-rRNAs (Verheggen y cols., 2001; Cioce y Lamond, 2005). Además, estudios recientes demuestran que en la respuesta nucleolar al estrés está involucrado el CB como una diana fundamental en las vías de señalización desencadenadas por diferentes tipos de estrés celular (Boulon y cols., 2010). En el caso del estrés proteotóxico inducido por la inhibición del proteasoma, la relación tan íntima (“crosstalk”) entre CBs y los nucleolos podría facilitar la biogénesis ribosomal en condiciones de disfunción neuronal severa. Es decir, la respuesta neuronal al estrés proteotóxico coordinada entre el nucleolo y el CB, sugiere una función protectora que podría ser imprescindible para la supervivencia neuronal.

En conclusión, este estudio pone de manifiesto nuevos componentes que pueden contribuir a la comprensión de la fisiopatología de la BIPN. Entre todos ellos hay dos mecanismos no excluyentes entre sí, que nos parecen particularmente relevantes. El primero es la neurotoxicidad, referida esencialmente a la proteotoxicidad inducida por la inhibición del proteasoma. El acúmulo de proteínas poliubiquitiladas e ineficientemente degradadas por el proteasoma tiene dos consecuencias fundamentales: (i) la disrupción del RE (cromatolisis) y, consecuentemente, el déficit en la síntesis y control de calidad de proteínas y (ii) la respuesta celular al estrés provocado por la oxidación de proteínas (UPR). Este último proceso conlleva un estrés oxidativo que, secundariamente, produce daño en el DNA e inhibe la transcripcional. El segundo mecanismo es eminentemente neuroprotector, consiste en reorganizar el microambiente perinuclear mediante un incremento de la envoltura nuclear, portadora de numerosos poros nucleares, la descondensación de la cromatina en la periferia del núcleo y la formación *de novo* de un dominio perinuclear de síntesis de proteínas. Pensamos que esta reorganización favorece el tráfico núcleo-citoplasma de RNAs y proteínas y la traducción de los mRNAs en el compartimento perinuclear. Además esta respuesta neuroprotectora debe incluir la activación de la transcripción nucleolar y el incremento del número de CBs, todo ello con la finalidad última de mantener la actividad de síntesis de proteínas requerida por la supervivencia neuronal bajo condiciones de estrés proteotóxico inducido por el Btz.

En conclusión, el estudio de la respuesta neuronal al tratamiento con Btz pone de manifiesto nuevos mecanismos neurotóxicos y neuroprotectores que pueden contribuir conjuntamente al conocimiento de la fisiopatología de la BIPN (ambos representados en la Fig. 43). El balance entre ambos mecanismos demuestra la plasticidad de las neuronas sensitivas de tipo A para superar la neurotoxicidad inducida por el Btz. Ésta induce acúmulo de proteínas oxidadas, seguido de un estrés proteotóxico oxidativo en el citosol, en el RE (cromatolisis central), en las mitocondrias, en DNA (DSBs) y en la transcripción (Fig. 43 puntos, 1-5). Por su parte, la neuroprotección se fundamenta en organizar un microambiente perinuclear especializado, en el intercambio núcleo-citoplasmático y en la reactivación perinuclear de la transcripción y de la síntesis basal de proteínas. Otros mecanismos neuroprotectores claves son la activación nucleolar y de los CBs. La activación transcripcional nucleolar garantiza la recuperación de partículas pre-ribosomales perdidas en el proceso de la cromatolisis. Los CBs son imprescindibles para la biogénesis de los pre-rRNAs aportando las snoRNPs. Consideramos que estas dos organelas nucleares contribuyen conjuntamente de manera muy importante en la disposición perinuclear de polirribosomas (Fig. 43, puntos 6-9). En este sentido, esperamos que nuestro estudio sirva como base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que tengan como objetivo diseñar nuevos fármacos con menor efecto neurotóxico.

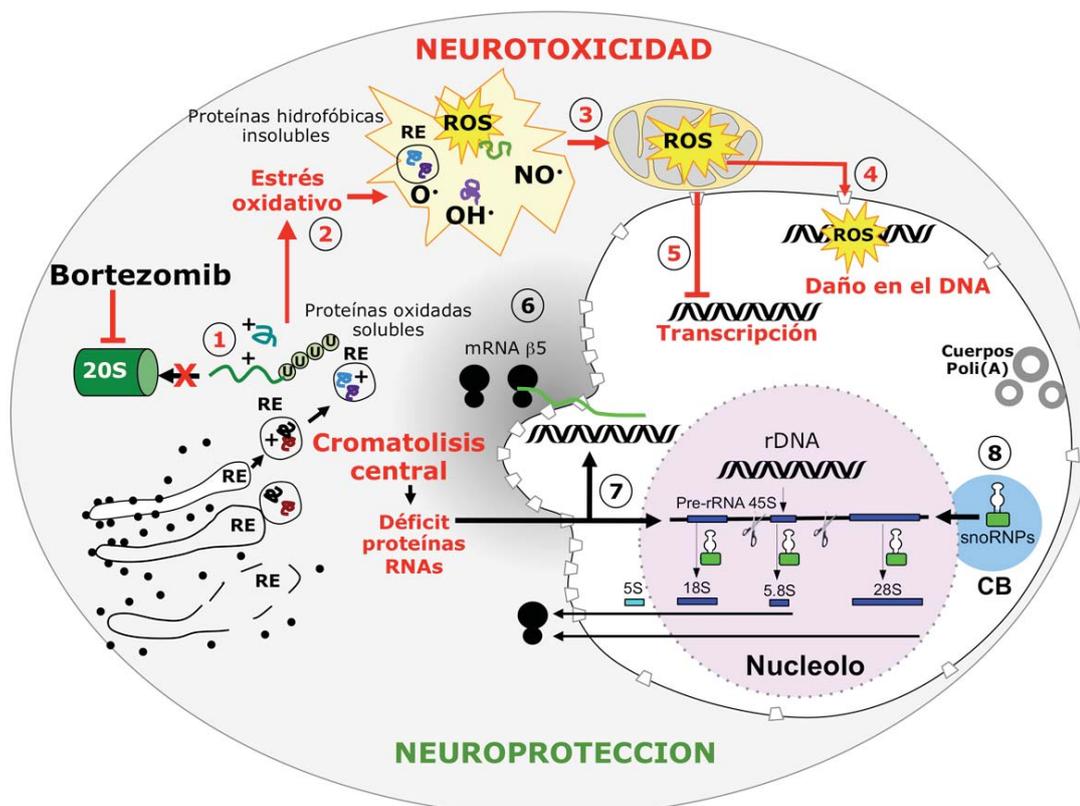


Figura 43. Ilustra los mecanismos de neurotoxicidad (flechas y líneas rojas, incluye los puntos del 1 al 5) y de neuroprotección (flechas negras, incluye los puntos del 6 al 9) secundarios al efecto del Btz.

6. Conclusiones



6.1 CONCLUSIONES

6.1.1 Respuesta de las neuronas sensitivas al daño en el DNA inducido por radiaciones ionizantes (RI)

1. Las neuronas procesan el daño en el DNA en dos compartimentos de cromatina (IRIFs): transitorios y permanentes.
2. Con independencia de la cinética de reparación, todos los compartimentos de daño reclutan los componentes básicos de las vías de señalización y reparación del DNA.
3. Para mantener la estabilidad del genoma, el DNA no reparado se aísla en compartimentos permanentes que no interfieren con la actividad transcripcional global ni con la supervivencia neuronal.
4. La señalización del daño del DNA induce la re-entrada en el ciclo celular con la transición G0-G1, un proceso mediado por la activación de p53/p21 y la expresión de la ciclina D1 del periodo G1.
5. El daño en el DNA induce la inhibición temprana de la transcripción extranucleolar que revierte a las 24 horas post-RI.

6.1.2 Respuesta de las neuronas sensitivas al estrés inducido por bortezomib

1. El bortezomib (Btz) induce un estrés proteotóxico, dosis dependiente, que conlleva la inducción de mecanismos de neurotoxicidad y de neuroprotección, estos últimos permiten la supervivencia neuronal.
2. El Btz interfiere con la reparación fisiológica del daño del DNA y conduce a la acumulación de lesiones.
3. La inhibición del proteasoma interfiere la proteostasis y conduce a una severa inhibición de la síntesis de proteínas que se refleja en la cromatolisis central.
4. La actividad del proteasoma es requerida para mantener la polaridad del soma neuronal, particularmente, la posición central del núcleo celular.
5. Para contrarrestar el estrés proteotóxico, las neuronas forman un compartimento perinuclear *de novo* para mantener la síntesis basal de proteínas asociado a pliegues de la envoltura nuclear para favorecer el tráfico núcleo-citoplasma.
6. La inhibición del proteasoma induce una respuesta reactiva del nucleolo con incremento de su número y tamaño y activación de la transcripción nucleolar.
7. Esta activación transcripcional está mediada por la sobreexpresión de genes que codifican los rRNAs y proteínas implicadas en la biogénesis de las partículas pre-ribosomales.
8. El incremento de la transcripción nucleolar inducido por el Btz se asocia a la proliferación de CBs, presumiblemente implicados en la transferencia al nucleolo de snoRNPs.

7. Bibliografía

- Adams, J. 2004. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 5(5): 417-421.
- Ahmad, Y., Boisvert, F.M., Gregor, P., Cobley, A., and Lamond, A.I. 2009. NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D181-184.
- Ahmed, S. and Brickner, J.H. 2007. Regulation and epigenetic control of transcription at the nuclear periphery. *Trends Genet* 23(8): 396-402.
- Ahmed, S. and Brickner, J.H. 2010. A role for DNA sequence in controlling the spatial organization of the genome. *Nucleus* 1(5): 402-406.
- Ahn, K.S. and Aggarwal, B.B. 2005. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci* 1056: 218-233.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., Sali, A., Rout, MP. 2007a. Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature* 450(7170): 683-694.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, LM., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, BT., Sali, A., Rout, MP. 2007b. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 450(7170): 695-701.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Science.
- Aly, A. and Ganesan, S. 2011. BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol* 3(1): 66-74.
- Akhtar, A. and Gasser, SM. 2007. The nuclear envelope and transcription control. *Nat Rev Genet* 8: 507-517.
- Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I., and Mann, M. 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433(7021): 77-83.
- Andrade, L.E., Chan, E.K., Raska, I., Peebles, C.L., Roos, G., and Tan, E.M. 1991. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J Exp Med* 173(6): 1407-1419.
- Argyriou, A.A., Bruna, J., Marmiroli, P., and Cavaletti, G. 2012. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. *Crit Rev Oncol Hematol* 82(1): 51-77.
- Aten, J.A., Stap, J., Krawczyk, P.M., van Oven, C.H., Hoebe, R.A., Essers, J., and Kanaar, R. 2004. Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 303(5654): 92-95.
- Balakrishnan, L. and Milavetz, B. 2010. Decoding the histone H4 lysine 20 methylation mark. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45(5): 440-452.
- Baldwin, A.S., Jr. 2001. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 107(1): 3-6.
- Baltanas, F.C., Casafont, I., Lafarga, V., Weruaga, E., Alonso, J.R., Berciano, M.T., and Lafarga, M. 2011a. Purkinje cell degeneration in pcd mice reveals large scale chromatin reorganization and gene silencing linked to defective DNA repair. *J Biol Chem* 286(32): 28287-28302.

- Baltanas, F.C., Casafont, I., Weruaga, E., Alonso, J.R., Berciano, M.T., and Lafarga, M. 2011b. Nucleolar disruption and cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in purkinje cells. *Brain Pathol* 21(4): 374-388.
- Baltrons, M.A., Pifarre, P., Berciano, M.T., Lafarga, M., and Garcia, A. 2008. LPS-induced down-regulation of NO-sensitive guanylyl cyclase in astrocytes occurs by proteasomal degradation in clastosomes. *Mol Cell Neurosci* 37(3): 494-506.
- Batta, K., Zhang, Z., Yen, K., Goffman, D.B., and Pugh, B.F. 2011. Genome-wide function of H2B ubiquitylation in promoter and genic regions. *Genes Dev* 25(21): 2254-2265.
- Bauer, S. and Patterson, PH. 2005. The cell cycle-apoptosis connection revisited in the adult brain. *J Cell Biol* 171(4):641-645.
- Bekker-Jensen, S. and Mailand, N. 2010. Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 9(12): 1219-1228.
- Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, J., Lafarga, M., and Berciano, M.T. 2012. Nuclear speckles are involved in nuclear aggregation of PABPN1 and in the pathophysiology of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol Dis* 46(1): 118-129.
- Berciano, M.T., Villagra, N.T., Pena, E., Navascues, J., Casafont, I., and Lafarga, M. 2002. Structural and functional compartmentalization of the cell nucleus in supraoptic neurons. *Microsc Res Tech* 56(2): 132-142.
- Berciano, M.T., Novell, M., Villagra, N.T., Casafont, I., Bengoechea, R., Val-Bernal, J.F., and Lafarga, M. 2007. Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons. *J Struct Biol* 158(3): 410-420.
- Berger, S.L. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447(7143): 407-412.
- Binder, D.K. and Scharfman, H.E. 2004. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22(3): 123-131.
- Black, JC. and Whetstine, JR. 2011. Chromatin landscape: methylation beyond transcription. *Epigenetics* 6(1): 9-15.
- Blasco, M.A. 2007. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet* 8(4): 299-309.
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J., and Lamond, A.I. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 574-585.
- Boisvert, F.M. and Lamond, A.I. 2010. p53-Dependent subcellular proteome localization following DNA damage. *Proteomics* 10(22): 4087-4097.
- Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M., and Lamond, A.I. 2010. The nucleolus under stress. *Mol Cell* 40(2): 216-227.
- Bruna, J., Udina, E., Ale, A., Vilches, J.J., Vynckier, A., Monbaliu, J., Silverman, L., and Navarro, X. 2010. Neurophysiological, histological and immunohistochemical characterization of bortezomib-induced neuropathy in mice. *Exp Neurol* 223(2): 599-608.

- Bukata, L., Parker, S.L., and D'Angelo, M.A. 2013. Nuclear pore complexes in the maintenance of genome integrity. *Curr Opin Cell Biol* 25(3): 378-386.
- Burke, B. and Roux, K.J. 2009. Nuclei take a position: managing nuclear location. *Dev Cell* 17(5): 587-597.
- Burke, B. and Stewart, CL. 2013. The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14: 13-24.
- Cajal, SR. 1903. Un sencillo método de coloración selectiva del retículo protoplasmático y sus efectos en los diversos órganos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab Invest Biol* 2:129-221.
- Cajal, SR. 1910. El núcleo de las neuronas piramidales del cerebro humano y de algunos mamíferos. *Trab Invest Biol* 8:27-62.
- Callan, H.G. and Tomlin, S.G. 1950. Experimental studies on amphibian oocyte nuclei. I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 137(888): 367-378.
- Callen, E., Di Virgilio, M., Kruhlak, M.J., Nieto-Soler, M., Wong, N., Chen, H.T., Faryabi, R.B., Polato, F., Santos, M., Starnes, L.M. et al. 2013. 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. *Cell* 153(6): 1266-1280.
- Carissimi, C., Saieva, L., Gabanella, F., Pellizoni. 2006. Gemin8 is required for the architecture and function of the survival motor neuron complex. *J Biol Chem* 281:37009-37016.
- Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Carvalho, M.T., and Lamond, A.I. 1992. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *J Cell Biol* 117(1): 1-14.
- Carmo-Fonseca, M., Ferreira, J., and Lamond, A.I. 1993. Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis--evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *J Cell Biol* 120(4): 841-852.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., and Campos, I. 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* 2(6): E107-112.
- Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R., 3rd, Hays, L., Morgan, W.F., and Petrini, J.H. 1998. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93(3): 477-486.
- Carozzi, V.A., Canta, A., Oggioni, N., Sala, B., Chiorazzi, A., Meregalli, C., Bossi, M., Marmiroli, P., and Cavaletti, G. 2010. Neurophysiological and neuropathological characterization of new murine models of chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathies. *Exp Neurol* 226(2): 301-309.
- Carvalho, T., Almeida, F., Calapez, A., Lafarga, M., Berciano, M.T., and Carmo-Fonseca, M. 1999. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J Cell Biol* 147(4): 715-728.

- Casafont, I., Navascues, J., Pena, E., Lafarga, M., and Berciano, M.T. 2006. Nuclear organization and dynamics of transcription sites in rat sensory ganglia neurons detected by incorporation of 5'-fluorouridine into nascent RNA. *Neuroscience* 140(2): 453-462.
- Casafont, I., Bengoechea, R., Navascues, J., Pena, E., Berciano, M.T., and Lafarga, M. 2007. The giant fibrillar center: a nucleolar structure enriched in upstream binding factor (UBF) that appears in transcriptionally more active sensory ganglia neurons. *J Struct Biol* 159(3): 451-461.
- Casafont, I., Berciano, M.T., and Lafarga, M. 2010. Bortezomib induces the formation of nuclear poly(A) RNA granules enriched in Sam68 and PABPN1 in sensory ganglia neurons. *Neurotox Res* 17(2): 167-178.
- Cavaletti, G. and Nobile-Orazio, E. 2007. Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: still far from a painless gain. *Haematologica* 92(10): 1308-1310.
- Cavaletti, G., Gilardini, A., Canta, A., Rigamonti, L., Rodriguez-Menendez, V., Ceresa, C., Marmiroli, P., Bossi, M., Oggioni, N., D'Incalci, M. et al. 2007. Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: a neurophysiological and pathological study in the rat. *Exp Neurol* 204(1): 317-325.
- Cavaletti, G. and Marmiroli, P. 2010. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. *Nat Rev Neurol* 6(12): 657-666.
- Chakalova, L. and Fraser, P. 2010. Organization of transcription. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(9): a000729.
- Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J., and Dou, Q.P. 2011. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 11(3): 239-253.
- Chi, D., Behin, A., Delattre, JY. 2008. Neurologic complications of radiation therapy. En: Schiff, D., Kesari, S., Wen, PY. Ed.: *Cancer neurology in clinical practice: neurologic complications of cancer and its treatment* 259-286. Totowa Humana Press.
- Chow, K.H., Factor, R.E., and Ullman, K.S. 2012. The nuclear envelope environment and its cancer connections. *Nat Rev Cancer* 12(3): 196-209.
- Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 17(24): 7151-7160.
- Cioce, M. and Lamond, A.I. 2005. Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 105-131.
- Cremer, T. and Cremer, C. 2006. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present. *Eur J Histochem* 50(4): 223-272.
- Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Muller, S., Solovei, I., and Fakan, S. 2006. Chromosome territories--a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18(3): 307-316.

- Crespo, D., Viadero, C.F., Villegas, J. and Lafarga, M. 1988. Nucleoli numbers and neuronal growth in supraoptic nucleus neurons during postnatal development in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 44(1): 151-5.
- Dammer, E.B., Na, C.H., Xu, P., Seyfried, N.T., Duong, D.M., Cheng, D., Gearing, M., Rees, H., Lah, J.J., Levey, A.I. et al. 2011. Polyubiquitin linkage profiles in three models of proteolytic stress suggest the etiology of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286(12): 10457-10465.
- Darzacq, X., Jady, B.E., Verheggen, C., Kiss, A.M., Bertrand, E., and Kiss, T. 2002. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J* 21(11): 2746-2756.
- Dauer, W.T. and Worman, H.J. 2009. The nuclear envelope as a signaling node in development and disease. *Dev Cell* 17(5): 626-638.
- Davie, J.T., Clark, B.A., and Hausser, M. 2008. The origin of the complex spike in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 28(30): 7599-7609.
- de Las Heras, J.I., Meinke, P., Batrakou, D.G., Srsen, V., Zuleger, N., Kerr, A.R., and Schirmer, E.C. 2013. Tissue specificity in the nuclear envelope supports its functional complexity. *Nucleus* 4(6): 460-477.
- De Nicola, A.F., Labombarda, F., Deniselle, M.C., Gonzalez, S.L., Garay, L., Meyer, M., Gargiulo, G., Guennoun, R., and Schumacher, M. 2009. Progesterone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration. *Front Neuroendocrinol* 30(2): 173-187.
- de Wilt, L.H., Kroon, J., Jansen, G., de Jong, S., Peters, G.J., and Kruyt, F.A. 2012. Bortezomib and TRAIL: a perfect match for apoptotic elimination of tumour cells? *Crit Rev Oncol Hematol* 85(3): 363-372.
- Dellaire, G., Kepkay, R., and Bazett-Jones, D.P. 2009. High resolution imaging of changes in the structure and spatial organization of chromatin, gamma-H2A.X and the MRN complex within etoposide-induced DNA repair foci. *Cell Cycle* 8(22): 3750-3769.
- Dragon, F., Gallagher, J.E., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y. et al. 2002. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417 (6892): 967-970.
- Dropcho, E.J. 2010a. Neurotoxicity of cancer chemotherapy. *Semin Neurol* 30(3): 273-286.
- Dropcho, E.J. 2010b. Neurotoxicity of radiation therapy. *Neurol Clin* 28(1): 217-234.
- Englander, E.W. 2013. DNA damage response in peripheral nervous system: coping with cancer therapy-induced DNA lesions. *DNA Repair (Amst)* 12(8): 685-690.
- Escribano-Díaz, C. and Durocher, D. 2013. DNA repair pathway choice--a PTIP of the hat to 53BP1. *EMBO Rep* 14(8): 665-666.
- Fedorova, E. and Zink, D. 2008. Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta* 1783(11): 2174-2184.

- Feng, R., Oton, A., Mapara, MY., Anderson, G., Belani, C. and Lentzsch, S. 2007. The histone deacetylase inhibitor, PXD101, potentiates bortezomib-induced anti-multiple myeloma effect by induction of oxidative stress and DNA damage. *Br J Haematol* 139(3): 385-397.
- Fernandez, R., Pena, E., Navascues, J., Casafont, I., Lafarga, M., and Berciano, M.T. 2002. cAMP-dependent reorganization of the Cajal bodies and splicing machinery in cultured Schwann cells. *Glia* 40(3): 378-388.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 959-967.
- Ferrer, I., Pozas, E., and Planas, A.M. 1997. Ubiquitination of apoptotic cells in the developing cerebellum of the rat following ionizing radiation or methylazoxymethanol injection. *Acta Neuropathol* 93(4): 402-407.
- Finley, D., Ulrich, HD., Sommer, T., Kaiser, P. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192(2):319-360.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD. 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15 (2) 172-183.
- Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C., Huang, H., Landry, M.C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F. et al. 2013. 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* 499(7456): 50-54.
- Frey, M.R. and Matera, A.G. 1995. Coiled bodies contain U7 small nuclear RNA and associate with specific DNA sequences in interphase human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (13): 5915-5919.
- Gall, J.G. 2000. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 273-300.
- Gama-Carvalho, M., Krauss, R.D., Chiang, L., Valcarcel, J., Green, M.R., and Carmo-Fonseca, M. 1997. Targeting of U2AF65 to sites of active splicing in the nucleus. *J Cell Biol* 137 (5): 975-987.
- Garcia-Moreno, LM., Cimadevilla, JM., Gonzalez-Pardo, H., Zahonero, MC., Arias, JL. 1997. NOR activity in hippocampal areas during the postnatal development and aging. *Mech Ageing Dev.* 97: 173-181.
- Garcia-Segura, L.M., Lafarga, M., Berciano, M.T., Hernandez, P., and Andres, M.A. 1989. Distribution of nuclear pores and chromatin organization in neurons and glial cells of the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 290(3): 440-450.
- Gilder, AS., Do, PM., Carrero, ZI., Cosman, AM., Broome, HJ., Velma, V., Martinez, LA. and Hebert, MD. 2011. Coilin participates in the suppression of RNA polymerase I in response to cisplatin-induced DNA damage. *Mol Biol Cell* 22(7):1070-9
- Gilder, AS. and Herbert, M. 2011. Relationship of the Cajal body to the nucleolus. *MOJ Olson (Ed), The nucleolus, Springer Science.*
- Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z.A., Ngouenet, C., Galloway, D.A., Eisenman, R.N., and White, R.J. 2005. c-Myc binds to human ribosomal DNA and

- stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* 7(3): 311-318.
- Hadjiolov, AA. 1985. *The nucleolus and the ribosome biogenesis*. Springer-Verlag, New York.
- Heber-Katz, E., Zhang, Y., Bedelbaeva, K., Song, F., Chen, X., Stocum, DL. 2013. Cell cycle regulation and regeneration. *Curr Top Microbiol Immunol* 367:253-276.
- Hebert, M.D. 2013. Signals controlling Cajal body assembly and function. *Int J Biochem Cell Biol* 45(7): 1314-1317.
- Helton, E.S. and Chen, X. 2007. p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* 100(4): 883-896.
- Hernandez-Verdun, D. 2006. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol* 125 (1-2): 127-137.
- Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., Thiry, M., Sirri, V., and Lafontaine, D.L. 2006. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1(3): 415-431.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
- Hetman, M., Pietrzak, M. 2012. Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends neurosci.* 35: 305-314.
- Hetman, M., Vashishta, A., Rempala, G. 2012. Neurotoxic mechanisms of DNA damage: focus on transcriptional inhibition. *J Neurochem.* 114: 1537-1549.
- Hoffmann, I. and Birnstiel, M.L. 1990. Cell cycle-dependent regulation of histone precursor mRNA processing by modulation of U7 snRNA accessibility. *Nature* 346(6285): 665-668.
- Holcomb, PS., Deerinck, T., Ellisman, MH., Spirou, GA. 2013. Construction of a polarized neuron. *J Physiol* 591: 3145-3150.
- Hou, C.C. and Yang, W.X. 2012. New insights to the ubiquitin-proteasome pathway (UPP) mechanism during spermatogenesis. *Mol Biol Rep* 40(4): 3213-3230.
- Hoyt, M.A. and Coffino, P. 2004. Ubiquitin-free routes into the proteasome. *Cell Mol Life Sci* 61(13): 1596-1600.
- Iacono, D., O'Brien, R., Resnick, SM., Zonderman, AB., Pletnikova, O., Rudow, G., An, Y., West, MJ. Neuronal hypertrophy in asymptomatic Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67: 578-589.
- Iborra, F.J., Pombo, A., Jackson, D.A., and Cook, P.R. 1996. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription "factories" in human nuclei. *J Cell Sci* 109 (Pt 6): 1427-1436.
- Imai, S., Kitano, H. 1998. Heterochromatin islands and their dynamic reorganization: a hypothesis for three distinctive features of cellular aging. *Exp Gerontol* 33: 555-570.
- Jackson, SP. and Durocher, D. 2013. Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Mol Cell.* 49(5):795-807.

- Jacquemont, C. and Taniguchi, T. 2007. Proteasome function is required for DNA damage response and fanconi anemia pathway activation. *Cancer Res* 67(15): 7395-7405.
- Jady, B.E., Darzacq, X., Tucker, K.E., Matera, A.G., Bertrand, E., and Kiss, T. 2003. Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. *EMBO J* 22(8): 1878-1888.
- Janssens, S., Tschopp, J. 2006. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death Differ* 13(5):773-784.
- Jia, L. and Liu, F.T. 2013. Why bortezomib cannot go with 'green'? *Cancer Biol Med* 10(4): 206-213.
- Jordan, BA., Fernholz, BD., Khatri, L. and Ziff, EB. 2007. Nucleoli numbers and neuronal growth in supraoptic nucleus neurons during postnatal development in the rat. *Nat Neurosci.* 10(4):427-35.
- Julius, D. and Basbaum, A.I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413(6852): 203-210.
- Jung, T., Grune, T. 2008. The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life* 60(11):743-52.
- Kaiser, TE., Intine, RV., Dundr, M. 2008. De novo formation of a subnuclear body. *Science* 322: 1713-1717.
- Kalita, K., Makonchuk, D., Gomes, C., Zheng, JJ., Hetman, M. 2008. Inhibition of nucleolar transcription as a trigger of neuronal apoptosis. *J Neurochem* 105(6):2286-2299.
- Kamakaka, R.T. and Biggins, S. 2005. Histone variants: deviants? *Genes Dev* 19(3): 295-310.
- Kannarkat, G., Lasher, E.E., and Schiff, D. 2007. Neurologic complications of chemotherapy agents. *Curr Opin Neurol* 20(6): 719-725.
- Kano, Y., Maeda, S., and Sugiyama, T. 1976. The location of ribosomal cistrons (rDNA) in chromosomes of the rat. *Chromosoma* 55(1): 37-42.
- Kass, E.M. and Jasin, M. 2010. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett* 584(17): 3703-3708.
- Kavanagh, J.N., Redmond, K.M., Schettino, G., and Prise, K.M. 2013. DNA double strand break repair: a radiation perspective. *Antioxid Redox Signal* 18(18): 2458-2472.
- Kinderman, NB., Jones, KJ. 1993. Testosterone enhancement of the nerve cell body response to injury: evidence using in situ hybridization and ribosomal DNA probes. *J Neurosci* 13: 1523-1532.
- Klein, E.A. and Assoian, R.K. 2008. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci* 121(Pt 23): 3853-3857.
- Komander, D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 5): 937-953.
- Kouranti I, Peyroche A. 2012. Protein degradation in DNA damage response. *Semin Cell Dev Biol* 23(5): 538-545.

- Kourmouli, N., Jeppesen, P., Mahadevhaiah, S., Burgoyne, P., Wu, R., Gilbert, D.M., Bongiorno, S., Prantera, G., Fanti, L., Pimpinelli, S. et al. 2004. Heterochromatin and trimethylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J Cell Sci* 117(Pt 12): 2491-2501.
- Kravtsova-Ivantsiv, Y., Sommer, T., and Ciechanover, A. 2013. The lysine48-based polyubiquitin chain proteasomal signal: not a single child anymore. *Angew Chem Int Ed Engl* 52(1): 192-198.
- Kreiner, G., Bierhoff, H., Armentano, M., Rodriguez-Parkitna, J., Sowodniok, M., Naranjo, JR., Bonfanti, Liss, LB., Schultz, G., Grummt, I. and Parlato, R. 2013. A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress. *Cell Death and Differentiation* 20: 1455–1464.
- Kruhlak, MJ., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, WG., McNally, JG., Bazett-Jones, DP., Nussenzweig, A. 2006. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 172(6): 823-834.
- Kruman, II and Schwartz, E.I. 2008. DNA damage response and neuroprotection. *Front Biosci* 13: 2504-2515.
- Kuhn, U. and Wahle, E. 2004. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1678(2-3): 67-84.
- Lafarga, M., Hervas, J.P., Santa-Cruz, M.C., Villegas, J., and Crespo, D. 1983. The "accessory body" of Cajal in the neuronal nucleus. A light and electron microscopic approach. *Anat Embryol (Berl)* 166(1): 19-30.
- Lafarga, M., Andres, M.A., Berciano, M.T., and Maquiera, E. 1991. Organization of nucleoli and nuclear bodies in osmotically stimulated supraoptic neurons of the rat. *J Comp Neurol* 308(3): 329-339.
- Lafarga, M., Berciano, M.T., Garcia-Segura, L.M., Andres, M.A., and Carmo-Fonseca, M. 1998. Acute osmotic/stress stimuli induce a transient decrease of transcriptional activity in the neurosecretory neurons of supraoptic nuclei. *J Neurocytol* 27(4): 205-217.
- Lafarga, M., Berciano, M.T., Pena, E., Mayo, I., Castano, J.G., Bohmann, D., Rodrigues, J.P., Tavanez, J.P., and Carmo-Fonseca, M. 2002. Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol Biol Cell* 13(8): 2771-2782.
- Lafarga, M., Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O., and Berciano, M.T. 2009. Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus. *Chromosoma* 118(4): 437-443.
- Lamond, A.I. and Carmo-Fonseca, M. 1993. The coiled body. *Trends Cell Biol* 3(6): 198-204.
- Lamond, A.I. and Spector, D.L. 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(8): 605-612.
- Landis-Piowar, K.R., Milacic, V., Chen, D., Yang, H., Zhao, Y., Chan, T.H., Yan, B., and Dou, Q.P. 2006. The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers. *Drug Resist Updat* 9(6): 263-273.

- Landowski, TH., Megli, CJ., Nullmeyer, KD., Lynch, RM. and Dorr, RT. 2005. Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res* 65(9):3828-36.
- Lavin, M.F. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(10): 759-769.
- Lee, J.H. and Paull, T.T. 2007. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26(56): 7741-7748.
- Lieber, M.R. 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 79: 181-211.
- Lim, R.Y., Huang, N.P., Koser, J., Deng, J., Lau, K.H., Schwarz-Herion, K., Fahrenkrog, B., and Aebi, U. 2006. Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(25): 9512-9517.
- Lisby, M. and Rothstein, R. 2009. Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 8(9): 1068-1076.
- Liu, Q. and Dreyfuss, G. 1996. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 15(14): 3555-3565.
- Liu, B., Li, Y., Wang, L., Lu, L., Li, Y. and Cai, Y. Predicting the protein SUMO modification sites based on properties sequential forward selection (PSFS). *Biochem Biophys Res Commun* 358:136-139.
- Ljungman, M. and Lane, D.P. 2004. Transcription-guarding the genome by sensing DNA damage. *Nat Rev Cancer* 4(9): 727-737.
- Lowndes, N.F. and Toh, G.W. 2005. DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr Biol* 15(3): R99-R102.
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., and Lukas, J. 2003. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* 5(3): 255-260.
- Lukman, S., Lane DP. and Verma, CS. 2013. Mapping the structural and dynamical features of multiple p53 DNA binding domains: insights into loop 1 intrinsic dynamics. *Plos One* 8(11):e80221.
- Ma, T., Keller, J.A., and Yu, X. 2011. RNF8-dependent histone ubiquitination during DNA damage response and spermatogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43(5): 339-345.
- Machyna, M., Heyn, P., and Neugebauer, K.M. 2013. Cajal bodies: where form meets function. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4(1): 17-34.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. 2007. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131(5): 887-900.
- Mann, DM., Marcyniuk, B., Yates, PO., Neary, D., Snowden, JS. The progression of the pathological changes of Alzheimer's disease in frontal and temporal neocortex examined both biopsy and autopsy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14:177-195. 198

- Martin, L.J. 2008. DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 67(5): 377-387.
- Matera, A.G. and Frey, M.R. 1998. Coiled bodies and gems: Janus or gemini? *Am J Hum Genet* 63(2): 317-321.
- Matera, A.G., Terns, R.M., and Terns, M.P. 2007. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3): 209-220.
- Mattson, MP. and Camandola, S. 2001. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest* 107(3):247-254.
- Mattson, MP. and Meffert, MK. 2006. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* 13(5): 852-860.
- Mayer, C., Bierhoff, H., and Grummt, I. 2005. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev* 19(8): 933-941.
- McCool, KW. and Miyamoto, S. 2012. DNA damage-dependent NF-κB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev.* 246(1):311-26.
- McConkey, D.J. and Zhu, K. 2008. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat* 11(4-5): 164-179.
- McGowan, C.H. and Russell, P. 2004. The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16(6): 629-633.
- McIlwain, DL. and Hoke, VB. 2005. The role of the cytoskeleton in cell body enlargement, increased nuclear eccentricity and chromatolysis in axotomized spinal motor neurons. *BCM Neurosci* 6: 19
- McKeown, P.C. and Shaw, P.J. 2009. Chromatin: linking structure and function in the nucleolus. *Chromosoma* 118(1): 11-23.
- McKinnon, P.J. 2009. DNA repair deficiency and neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 10 (2): 100-112.
- Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. 2003. Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem* 278(24): 21517-21525.
- Mekhail, K. and Moazed, D. 2010. The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(5): 317-328.
- Meldi, L. and Brickner, J.H. 2011. Compartmentalization of the nucleus. *Trends Cell Biol* 21 (12): 701-708.
- Mengual, E., Arizti, P., Rodrigo, J., Gimenez-Amaya, JM., Castaño, JG. 1996. Immunohistochemical distribution and electron microscopic subcellular localization of the proteasome in the rat CNS. *Neurosci* 16: 6331:6341.
- Mintz, P.J., Patterson, S.D., Neuwald, A.F., Spahr, C.S., and Spector, D.L. 1999. Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J* 18(15): 4308-4320.

- Misteli, T. 2005. Concepts in nuclear architecture. *Bioessays* 27(5): 477-487.
- Misteli, T. 2007. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 128(4): 787-800.
- Misteli, T. 2008. Physiological importance of RNA and protein mobility in the cell nucleus. *Histochem Cell Biol* 129(1): 5-11.
- Misteli, T. and Spector, D.L. 1997. Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trends Cell Biol* 7(4): 135-138.
- Misteli, T. and Spector, D.L. 2011. *The nucleus*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mladenov, E. and Iliakis, G. 2011. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res* 711(1-2): 61-72.
- Mongelard, F. and Bouvet, P. 2007. Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol* 17(2): 80-86.
- Monneron, A. and Bernhard, W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res* 27(3): 266-288.
- Montanaro, L., Trere, D., Derenzini, M. 2008. Nucleolus, ribosomes and cancer. *Am J Pathol* 173: 301-310.
- Moore, M.J. and Proudfoot, N.J. 2009. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136(4): 688-700.
- Moore, H.M., Bai, B., Matilainen, O., Colis, L., Peltonen, K., and Laiho, M. 2013. Proteasome activity influences UV-mediated subnuclear localization changes of NPM. *PLoS One* 8(3): e59096.
- Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N., and Jyothy, A. 2009. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* 36(2): 75-88.
- Murayama, A., Ohmori, K., Fujimura, A., Minami, H., Yasuzawa-Tanaka, K., Kuroda, T., Oie, S., Daitoku, H., Okuwaki, M., Nagata, K. et al. 2008. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* 133(4): 627-639.
- Napetschnig J, Wu H. 2013. Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys* 42: 443-468.
- Navascues, J., Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, M.T., and Lafarga, M. 2008. SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *J Struct Biol* 163(2): 137-146.
- Navascues, J., Casafont, I., Villagra, N.T., Lafarga, M., and Berciano, M.T. 2004. Reorganization of nuclear compartments of type A neurons of trigeminal ganglia in response to inflammatory injury of peripheral nerve endings. *J Neurocytol* 33(4): 393-405.
- Nizami, Z., Deryusheva, S., and Gall, J.G. 2010. The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(7): a000653.
- Noon, A.T. and Goodarzi, A.A. 2010. 53BP1-mediated DNA double strand break repair: insert bad pun here. *DNA Repair (Amst)* 10(10): 1071-1076.

- Nospikel, T. 2007. DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions. *Neuroscience* 145(4): 1213-1221.
- Oberdoerffer, P. and Sinclair, DA. 2007. The role of nuclear architecture in genome instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 692-702.
- Olive, P.L. and Banath, J.P. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1(1): 23-29.
- Olson, M.O. 2004. Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE* 2004(224): pe10.
- O'Neill, LA. and Kaltschmidt, C. 1997. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20(6): 252-258.
- Orii, K.E., Lee, Y., Kondo, N., and McKinnon, P.J. 2006. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(26): 10017-10022.
- Palay, SL. and Chan-Palay, V. 1974. *Cerebellar cortex: cytology and organization*. Springer Verlag, Berlin and Heidelberg and NewYork.
- Panier, S. and Boulton, S.J. 2013. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(1): 7-18.
- Pannese, E., Rigamonti, L., Ledda, M., and Arcidiacono, G. 1994. Perikaryal projections of spinal ganglion neurons: quantitative differences between membrane domains in contact with different microenvironments. *J Anat* 185 (Pt 3): 497-502.
- Parlato, R., Kreimer, G., Erdmann, G., Rieker, C., Stotz, S., Savenkova, E., Berger, S., Grummt, I., Schutz, G. 2008. Activation of an endogenous suicide response after perturbation of rRNA synthesis leads to neurodegeneration in mice. *J Neurosci* 28: 12759-12764.
- Patel, DJ., Wang, Z. 2013. Readout of epigenetic modifications. *Ann Rev of Biochem* 82: 81-118.
- Paul, K., Wang, M., Mladenov, E., Bencsik-Theilen, A., Bednar, T., Wu, W., Arakawa, H., Iliakis, G. 2013. DNA ligases I and III cooperate in alternative non-homologous end-joining in vertebrates. *Plos One* 8(3):e5950.
- Pena, E., Berciano, M.T., Fernandez, R., Crespo, P., and Lafarga, M. 2000. Stress-induced activation of c-Jun N-terminal kinase in sensory ganglion neurons: accumulation in nuclear domains enriched in splicing factors and distribution in perichromatin fibrils. *Exp Cell Res* 256(1): 179-191.
- Pena, E., Berciano, M.T., Fernandez, R., Ojeda, J.L., and Lafarga, M. 2001. Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J Comp Neurol* 430(2): 250-263.
- Peters, A., Palay, SL., Webster, H de F. 1991. *The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells*. Ed. Oxford University Press, New York.
- Peterson, C.L. and Laniel, M.A. 2004. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14(14): R546-551.

- Platani, M., Goldberg, I., Lamond, A.I., and Swedlow, J.R. 2002. Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat Cell Biol* 4(7): 502-508.
- Price, B.D. and D'Andrea, A.D. 2013. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* 152(6): 1344-1354.
- Raices, M. and D'Angelo, M.A. 2012. Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(11): 687-699.
- Rambourg, A., Clermont, Y., and Beaudet, A. 1983. Ultrastructural features of six types of neurons in rat dorsal root ganglia. *J Neurocytol* 12(1): 47-66.
- Raska, I., Shaw, P.J., and Cmarko, D. 2006. New insights into nucleolar architecture and activity. *Int Rev Cytol* 255: 177-235.
- Rass, U., Ahel, I., and West, S.C. 2007. Defective DNA repair and neurodegenerative disease. *Cell* 130(6): 991-1004.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212.
- Richardson, P.G., Mitsiades, C., Hideshima, T., and Anderson, K.C. 2006. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annu Rev Med* 57: 33-47.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273(10): 5858-5868.
- Rubinsztein, D.C. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443(7113): 780-786.
- Sakasai, R., Teraoka, H., and Tibbetts, R.S. 2010. Proteasome inhibition suppresses DNA-dependent protein kinase activation caused by camptothecin. *DNA Repair (Amst)* 9(1): 76-82.
- Saleh A, Schapansky J, Smith DR, Young N, Odero GL, Aulston B, Fernyhough P, Glazner GW. 2013. Normalization of NF- κ B activity in dorsal root ganglia neurons cultured from diabetic rats reverses neuropathy-linked markers of cellular pathology. *Exp Neurol* 241:169-78.
- Santama, N., Dotti, C.G., and Lamond, A.I. 1996. Neuronal differentiation in the rat hippocampus involves a stage-specific reorganization of subnuclear structure both in vivo and in vitro. *Eur J Neurosci* 8(5): 892-905.
- Saunders, A., Core, L.J. and Lis, J.T. 2006. Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(8): 557-567.
- Schirmer, E.C. and Foisner, R. 2007. Proteins that associate with lamins: many faces, many functions. *Exp Cell Res* 313(10): 2167-2179.
- Schmidt, M. and Finley, D. 2013. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1843(1): 13-25.
- Schneider, R. and Grosschedl, R. 2007. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* 21(23): 3027-3043.

- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18(11): 1251-1262.
- Schulz, S., Chachami, G., Kozaczekiewicz, L., Winter, U., Stankovic-Valentin, N., Haas, P., Hofmann, K., Urlaub, H., Ovaas, H., Wittbrodt, J. et al. 2012. Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO Rep* 13(10): 930-938.
- Schwarzacher, HG. and Wachtler, F. 1993. The nucleolus. *Anat Embryol* 188: 515-536.
- Scully, R. and Xie, A. 2013. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res* 750(1-2): 5-14.
- Seo, H., Sonntag, KC., Isacson, O. 2004. Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Ann Neurol* 56: 319-328.
- Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129(1): 13-31.
- Sogo, J.M., Ness, P.J., Widmer, R.M., Parish, R.W., and Koller, T. 1984. Psoralen-crosslinking of DNA as a probe for the structure of active nucleolar chromatin. *J Mol Biol* 178(4): 897-919.
- Soutoglou, E., Dorn, J.F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., Danuser, G., and Misteli, T. 2007. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 9(6): 675-682.
- Spector, D.L. 1993. Nuclear organization of pre-mRNA processing. *Curr Opin Cell Biol* 5(3): 442-447.
- Stanek, D., Pridalova-Hnilicova, J., Novotny, I., Huranova, M., Blazikova, M., Wen, X., Sapra, A.K., and Neugebauer, K.M. 2008. Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles repeatedly cycle through Cajal bodies. *Mol Biol Cell* 19(6): 2534-2543.
- Steffen, J., Seeger, M., Koch, A., and Kruger, E. 2010. Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop. *Mol Cell* 40(1): 147-158.
- Stoykova, A.S., Dabeva, M.D., Dimova, R.N., and Hadjiolov, A.A. 1985. Ribosome biogenesis and nucleolar ultrastructure in neuronal and oligodendroglial rat brain cells. *J Neurochem* 45(6): 1667-1676.
- Stavreva, DA., Kawasaki, M., Dunder, M., Koberna, K., Muller, WG., Tsujimura-Takahashi, T., Komatsu, W., Hayano, T., Isobe, T., Raska, I., Misteli, T., Takahashi, N., McNally, JG. 2006. Potential roles for ubiquitin and the proteasome during ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 26: 5131-5145.
- Strzelecka, M., Trowitzsch, S., Weber, G., Lührman, R., Oates, AC., Neugebauer, KM. 2010. Coilin-dependent snRNP assembly is essential for zebrafish embryogenesis. *Nat Struct Biol* 17: 403-409.

- Sutherland, BM., Bennett, PV., Gerorgakilas, AG., Sutherland, JC. 2003. Evaluation of number average length analysis in quantifying double strand breaks in genomic DNAs. *Biochem* 42: 3375-3384.
- Sweet, T., Yen, W., Khalili, K., Amini, S. 2088. Evidence for involvement of NFBP in processing of ribosomal RNA. *J Cell Physiol* 214: 381-388.
- Swensen AM, Bean BP. 2003. Ionic mechanisms of burst firing in dissociated Purkinje neurons. *J Neurosci* 23(29): 9650-9663.
- Swift, H. 1962. Nucleoprotein localization in electron micrographs: metal binding and radioautography in Harris, interpretation of ultrastructure. *Symp Int Coc Cell Biol* 2:21.
- Tapia, O., Lafarga, V., Bengoechea, R., Palanca, A., Lafarga, M., and Berciano, M.T. 2014. The SMN Tudor SIM-like domain is key to Smd1 and coilin interactions and to Cajal body biogenesis. *J Cell Sci*.
- Tavanez, J.P., Bengoechea, R., Berciano, M.T., Lafarga, M., Carmo-Fonseca, M., and Enguita, F.J. 2009. Hsp70 chaperones and type I PRMTs are sequestered at intranuclear inclusions caused by polyalanine expansions in PABPN1. *PLoS One* 4(7): e6418.
- Taylor, AM., Groom, A. and Byrd, PJ. 2004. Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)- tis clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair* 3(8-9): 1219-1225.
- Tremblay, M., Toussaint, M., D'Amours, A., and Conconi, A. 2009. Nucleotide excision repair and photolyase repair of UV photoproducts in nucleosomes: assessing the existence of nucleosome and non-nucleosome rDNA chromatin in vivo. *Biochem Cell Biol* 87(1): 337-346.
- Tucker, KE., Berciano, MT., Jacobs, EY., LePage, DF., Shpargel, KB., Rossire, JJ., Chan, EK., Lafarga, M., Colon, RA., Matera, AG. 2001. Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm, snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. *J Cell Biol* 154: 293-307.
- Vaeteewoottacharn, K., Kariya, R., Matsuda, K., Taura, M., Wongkham, C., Wongkham, S. and Okada, S. 2013. Perturbation of proteasome function by bortezomib leading to ER stress-induced apoptotic cell death in cholangiocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 139 (9): 1551-1562.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R. 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2(3): 196-206.
- van Riggelen, J., Yetil, A., and Felsner, D.W. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer* 10(4): 301-309.
- Vasko, M.R., Guo, C., Thompson, E.L., and Kelley, M.R. 2011. The repair function of the multifunctional DNA repair/redox protein APE1 is neuroprotective after ionizing radiation. *DNA Repair (Amst)* 10(9): 942-952.
- Velasco, R. and Bruna, J. 2010. [Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: an unresolved issue]. *Neurologia* 25(2): 116-131.
- Verheggen, C., Mouaikel, J., Thiry, M., Blanchard, J.M., Tollervey, D., Bordonne, R., Lafontaine, D.L., and Bertrand, E. 2001. Box C/D small nucleolar RNA trafficking

- involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain. *EMBO J* 20(19): 5480-5490.
- Viana, F. 2011. Chemosensory properties of the trigeminal system. *ACS Chem Neurosci* 2: 38-50.
- von Micecz, A. 2006. The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci* 119:1977-1984.
- Wang, Q., Mora-Jensen, H., Weniger, MA., Perez-Galan, P., Wolford, C., Hai, T., Ron, D., Chen, W., Trenkle, W., Wiestner, A. and Ye, Y. 2009. ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Wells, MR. and Vaidya, U. 1994. RNA transcription in axotomized dorsal root ganglion neurons. *Brain Res Mol* 27: 163-166.
- Weniger, MA., Rizzatti, EG., Pérez-Galán, P., Liu, D., Wang, Q., Munson, PJ., Raghavachari, N., White, T., Tweito, MM., Dunleavy, K., Ye, Y., Wilson, WH. and Wiestner, A. 2011. Treatment-induced oxidative stress and cellular antioxidant capacity determine response to bortezomib in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 17(15):5101-5112.
- Wente, S.R. and Rout, M.P. 2010. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(10): a000562.
- Wittman, M, Queisser, G., Eder, A., Wiegert, JS., Bengston, CP., Hellwig, A., Wittum, G., Bading, H. 2009. Synaptic activity induces dramatic changes in the geometry of the cell nucleus: interplay between nuclear structure H3 phosphorylation and nuclear calcium signaling. *J Neurosci* 29: 14687-14700.
- Womack, M., Khodakhah, K. 2002. Active contribution of dendrites to the tonic and trimodal patterns of activity in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 22(24) 10603-10612.
- Yang, E.S., Wang, H., Jiang, G., Nowsheen, S., Fu, A., Hallahan, D.E., and Xia, F. 2009. Lithium-mediated protection of hippocampal cells involves enhancement of DNA-PK-dependent repair in mice. *J Clin Invest* 119(5): 1124-1135.
- Young, P.J., Le, T.T., thi Man, N., Burghes, A.H., and Morris, G.E. 2000. The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp Cell Res* 256(2): 365-374.
- Yu, C., Rahmani, M., Dent, P. and Grant S. 2004. The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib. *Exp Cell Res* 295(2): 555-566.
- Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Grone, HJ., Schtz, G., Grummt, I. 2005. Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p-53 apoptosis. *Mol Cell* 19: 77-87.
- Zhai, W. and Comai, L. 2000. Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* 20(16): 5930-5938.

8. Artículos

Reactive nucleolar and Cajal body responses to proteasome inhibition in sensory ganglion neurons

Ana Palanca, Iñigo Casafont, María T. Berciano, Miguel Lafarga

Biochimica et Biophysica Acta 2014 Jun; 1842(6):848-59

[DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.11.016](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.016)

Proteasome inhibition induces DNA damage and reorganizes nuclear architecture and protein synthesis machinery in sensory ganglion neurons

Ana Palanca, Iñigo Casafont, María T. Berciano, Miguel Lafarga

Cellular and Molecular Life Sciences 2014 May; 71(10):1961-75

[DOI 10.1007/s00018-013-1474-2](https://doi.org/10.1007/s00018-013-1474-2)

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

Iñigo Casafont*, Ana Palanca*, Vanesa Lafarga, Maria T. Berciano, Miguel Lafarga

Acta Neuropathologica 2011 Oct; 122(4):481-93

[DOI 10.1007/s00401-011-0869-0](https://doi.org/10.1007/s00401-011-0869-0)



ISSN 0925-4439
Volume 1842, Issue 6, June 2014

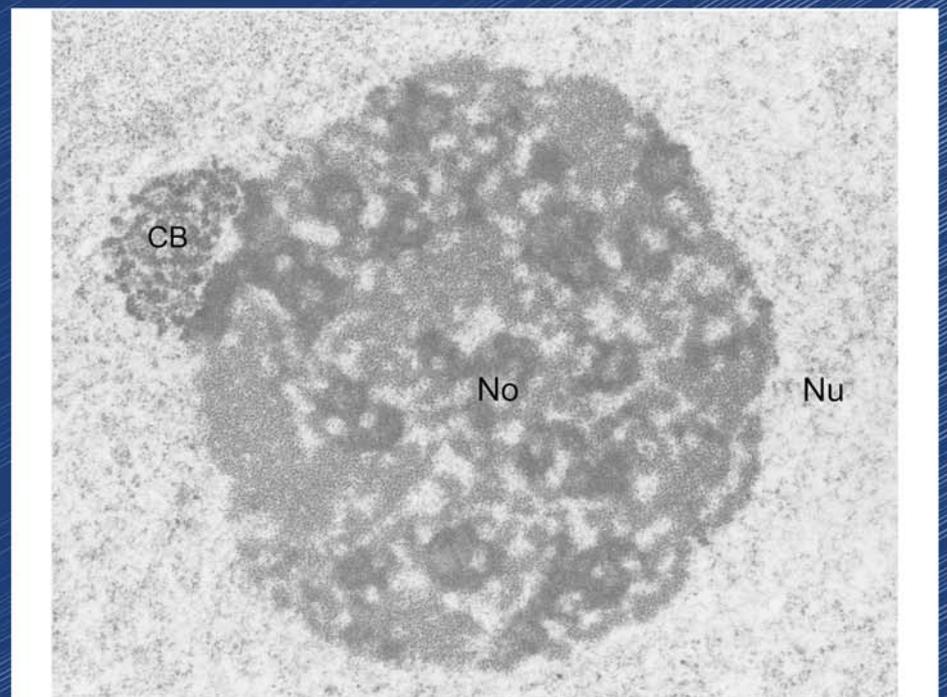
Biochimica et Biophysica Acta

BBA

Molecular Basis of Disease

Special Issue
**Role of the Nucleolus
in Human Disease**

Guest Editor
M. Hetman





Reactive nucleolar and Cajal body responses to proteasome inhibition in sensory ganglion neurons[☆]



Ana Palanca, Iñigo Casafont, María T. Berciano, Miguel Lafarga^{*}

Department of Anatomy and Cell Biology, University of Cantabria-IFIMAV, Santander, Spain
 “Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)”, Santander, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2013
 Received in revised form 12 November 2013
 Accepted 13 November 2013
 Available online 19 November 2013

Keywords:

Proteasome inhibitor
 Bortezomib
 Proteotoxic stress
 Sensory ganglia neuron
 Nucleolus
 Cajal body

ABSTRACT

The dysfunction of the ubiquitin proteasome system has been related to a broad array of neurodegenerative disorders in which the accumulation of misfolded protein aggregates causes proteotoxicity. The ability of proteasome inhibitors to induce cell cycle arrest and apoptosis has emerged as a powerful strategy for cancer therapy. Bortezomib is a proteasome inhibitor used as an antineoplastic drug, although its neurotoxicity frequently causes a severe sensory peripheral neuropathy. In this study we used a rat model of bortezomib treatment to study the nucleolar and Cajal body responses to the proteasome inhibition in sensory ganglion neurons that are major targets of bortezomib-induced neurotoxicity. Treatment with bortezomib induced dose-dependent dissociation of protein synthesis machinery (chromatolysis) and nuclear retention of poly(A) RNA granules resulting in neuronal dysfunction. However, as a compensatory response to the proteotoxic stress, both nucleoli and Cajal bodies exhibited reactive changes. These include an increase in the number and size of nucleoli, strong nucleolar incorporation of the RNA precursor 5′-fluorouridine, and increased expression of both 45S rRNA and genes encoding nucleolar proteins UBF, fibrillarin and B23. Taken together, these findings appear to reflect the activation of the nucleolar transcription in response to proteotoxic stress. Furthermore, the number of Cajal bodies, a parameter related to transcriptional activity, increases upon proteasome inhibition. We propose that nucleoli and Cajal bodies are important targets in the signaling pathways that are activated by the proteotoxic stress response to proteasome inhibition. The coordinating activity of these two organelles in the production of snRNA, snoRNA and rRNA may contribute to neuronal survival after proteasome inhibition. This article is part of a Special Issue entitled: Role of the Nucleolus in Human Disease.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The ubiquitin-dependent proteasome system (UPS) is the major pathway responsible for cellular protein degradation in eukaryotic cells. Proteasomes degrade essential proteins for cellular homeostasis including those involved in transcription, DNA repair, cell cycle progression and apoptosis [1,2]. Proteolysis is performed by the 26S proteasome, a multi-subunit complex formed by the 20S proteolytic core and one or two flanking 19S regulatory particles that recognize polyubiquitinated protein substrates [3,2]. In the cell nucleus, proteasomes are abundant in euchromatin domains, nuclear speckles of pre-mRNA splicing factors, PML (promyelocytic leukemia) nuclear bodies and clastosomes [4,5]. Proteasomal activity has been detected with fluorogenic protein substrates in nucleoplasmic foci, but not in the nucleolus [6,7]. Nuclear proteolysis seems to be involved in quality-control mechanisms and in the turnover of short-lived proteins,

particularly certain transcription regulators and splicing factors [4,5]. In the nervous system, dysfunction of proteasome is an age-related process and also occurs in several neurodegenerative diseases [8].

The ability of proteasome inhibitors such as bortezomib to induce cell death has emerged as a powerful strategy for cancer therapy [9]. Bortezomib is a reversible inhibitor that primarily targets the chymotrypsin-like activity of the proteasome β 5-subunit and to a somewhat lesser extent the caspase-like activity of the β 1 proteasome subunit [3]. Bortezomib cytotoxicity in cancer cells is mediated by several mechanisms, including inhibition of NF- κ B, up-regulation of genes involved in pro-apoptotic pathways and induction of endoplasmic reticulum stress [10]. However, peripheral neurotoxicity is the most relevant dose-limiting side effect of bortezomib treatment, and frequently leads to a severe sensory peripheral neuropathy [11,12].

The nucleolus is the nuclear factory for rRNA synthesis, processing of the maturing rRNA transcripts and preribosome subunit assembly. These processes are reflected in the structural organization of the main nucleolar components, fibrillar centers (FCs), dense fibrillar component (DFC) and granular component (GC) [13–16]. In addition, several studies support that the nucleolus is a central hub for sensing and coordinating cellular stress response [17,18]. Furthermore, recent studies indicate a functional link between the nucleolus and the UPS, suggesting

[☆] This article is part of a Special Issue entitled: Role of the Nucleolus in Human Disease.

^{*} Corresponding author at: Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Avd. Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain. Tel.: +34 942 201929; fax: +34 942 201903.

E-mail address: lafargam@unican.es (M. Lafarga).

the participation of the former in cellular proteostasis [19]. In fact, treatments with proteasome inhibitors can alter the nucleolar morphology and function [20–22].

Mammalian projection neurons exhibit prominent nucleoli with a high rate of ribosome biogenesis for the maintenance of active protein synthesis and cellular proteostasis. Neurons accommodate, at least in part, changes in the demand for protein synthesis by regulating the number and size of nucleoli, as well as the number of fibrillar centers [23–26]. In this way, a recent study has shown that the postsynaptic density protein AIDA-1 mediates a link between synaptic activity and protein synthesis by regulating neuronal nucleogenesis [27]. Moreover, nucleolar activity may influence the potential for neurorepair and nerve regeneration [25,28]. Conversely, morphological and biochemical manifestations of nucleolar dysfunction are associated with certain neurological disorders [29,28,30,31].

Cajal bodies (CBs) are nuclear structures discovered by Cajal in mammalian neurons [32]. They concentrate many molecular components, including coilin, the survival motor neuron (SMN) protein, the nucleolar protein fibrillar and small nuclear (snRNPs) and nucleolar ribonucleoproteins (snoRNPs) required for pre-mRNA and pre-rRNA processing [33–36]. In neurons, CB number positively correlates with neuronal activity [24,37]. Moreover, an activity-dependent association of CBs with nucleoli has been reported in several neuronal populations [38,27].

In rat and mouse models of bortezomib treatment, we and others have reported that sensory ganglion neurons are primary targets of the peripheral neurotoxicity when using doses equivalent to those used in clinical patients [39,40]. In particular, we demonstrated that the bortezomib-induced inhibition of proteasome activity, measured by cleavage of a fluorogenic substrate, caused a proteotoxic stress characterized by the accumulation of ubiquitylated proteins, dissolution of the rough endoplasmic reticulum (chromatolysis) and nuclear retention of polyadenylated RNAs in nuclear bodies called poly(A) granules [39]. Here we have analyzed the effects of the bortezomib-induced proteasome inhibition on the structure, organization and function of the nucleoli, as well as on the organization of CBs, in rat sensory ganglion neurons. We show that proteasome inhibition induces dose-dependent nucleolar hypertrophy and nucleogenesis, activates rRNA synthesis, and increases the number of CBs. This nucleolar response supports the participation of the nucleolus in a compensatory response to the proteotoxic stress induced proteasome inhibition, which may be important for neuronal survival.

2. Material and methods

2.1. Rats

Experiments were designed and performed to minimize the use of animals using a total of 60 young male Sprague–Dawley young rats of 125–130 g, distributed into one control and two experimental groups treated with low or high doses of bortezomib ($n = 20$ per group). Animal care and handling was in accordance with Spanish legislation (Spanish Royal Decree 53/2013 BOE) and the guidelines of the European Commission for the accommodation and care of laboratory animals (revised in Appendix A of the Council Directive 2010/63/UE). The experimental plan was preliminarily examined and approved by the Ethics Committee of the University of Cantabria. All the animals were housed in a limited access environment with a 12-h light/dark cycle, where room temperature and relative humidity were set at 22 ± 2 °C and $55 \pm 10\%$ respectively and there was free access to food and water. Animal sacrifice was performed under deep pentobarbital anesthesia (50 mg/kg).

2.2. Drug administration and sacrifice

For the study of the nuclear effects of proteasome inhibition, we used the proteasome inhibitor bortezomib (Velcade, provided by

Millennium Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA). The animals received two doses of bortezomib 0.2 mg/kg (low doses, Btz-LD) or 0.5 mg/kg (high doses, Btz-HD), dissolved in sterile saline and administered intravenously via the tail vein, on days 1 and 3 and were sacrificed 1d post-administration of the second dose. Moreover, the administration of two doses (0.5 mg/kg twice a week) was well tolerated by the Sprague Dawley rats and no animals died during the experiment. Saline-treated rats were used as controls. At the end of the treatment period the rats were sacrificed. The general condition of the animals was assessed daily.

2.3. Immunofluorescence and confocal microscopy

For immunofluorescence and in situ hybridization for poly(A) RNA the animals were perfused under deep anesthesia with pentobarbital (50 mg/kg) with 3.7% paraformaldehyde (freshly prepared) in PBS. As a model of sensory ganglion neurons we used trigeminal ganglia. After fixation, the ganglia were removed and washed in PBS. Tissue fragments from trigeminal ganglia were transferred to a drop of PBS on a siliconized slide and squash preparations of dissociated neurons were performed following the procedure previously reported [38].

For immunofluorescence, the samples were, then, sequentially treated with 0.5% Triton X-100 in PBS for 45 min, 0.1 M glycine in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) for 30 min and 0.05% Tween 20 in PBS for 5 min. The samples were incubated for 3 h with the primary antibody containing 1% BSA at room temperature, washed with 0.05% Tween 20 in PBS, incubated for 45 min in the specific secondary antibody conjugated with FITC or TexasRed (Jackson, USA), washed in PBS and mounted with the ProLong anti-fading medium (Invitrogen).

Confocal images were obtained with a LSM510 (Zeiss, Germany) laser scanning microscope and using a $63 \times$ oil (1.4 NA) objective. In order to avoid overlapping signals, images were obtained by sequential excitation at 488 nm and 543 nm, to detect FITC and TexasRed, respectively. Images were processed using Photoshop software.

The morphometric and quantitative analysis of the nucleolar size and nucleoli and CB numbers per neuron were performed in the population of large neurons (≥ 40 μm) [38]. Dissociated neurons were immunostained for B23 for nucleolar parameters, and coimmunolabeled for coilin and SMN to estimate CB number. Nucleolar diameters (only of mononucleolated neurons) and nucleoli and CB numbers were estimated on confocal images using a $63 \times$ oil objective and the LSM510 software for morphometric and quantitative analysis. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni tests for comparisons. Statistical significance was set at $p < 0.05$. All the analyses were carried out using GraphPad software for Windows.

2.4. Antibodies

The following primary antibodies were used in this study. Mouse monoclonal antibodies anti-UBF (F-9) (Santa Cruz Lab. La Jolla, CA, USA, dilution 1:100 IF), anti-SMN (BD transduction laboratories, dilution 1:50 IF), anti-fibrillarin (Abcam, dilution 1:500 IF), anti-p53 (Pab 246) (Santa Cruz Lab. La Jolla, CA, USA, dilution 1:500 WB) and anti-B23 (Abcam, dilution 1:200 IF). Rabbit polyclonal antibodies anti-coilin (210.4) (dilution 1:200 IF), anti-fibrillarin ([41], dilution 1:100, immunogold), anti-Pp53 (Ser15) (Cell Signaling, dilution 1:1000 WB) and anti-Myc (Santa Cruz Lab. La Jolla, CA, USA, dilution 1:1000 WB). Goat polyclonal antibody anti-actin (Santa Cruz Lab. La Jolla, CA, USA, dilution 1:2000 WB).

2.5. In situ hybridization for poly(A) RNAs

Sensory ganglion neurons fixed and dissociated as previously described were used for fluorescence in situ hybridization. Preparations of ganglion neurons were permeabilized with TBS-E-SDS for 15 min at 37 °C, washed three times in $6 \times$ SSPE-Tween 20 0.1% for 15 min, and incubated with the probe containing tRNA for 3 h, at 42°C in a humidified chamber. An oligo dT₍₅₀₎mer, 5'-end labeled with biotin

(MWG-Biotech, Germany) was used as a probe for in situ hybridization to poly(A) RNA. The hybridization mixture contained 80 ng oligo dT [50], 2xSSC, 1 mg/ml tRNA, 10% dextran sulfate and 25% formamide. After hybridization, sensory ganglion neurons were washed in 6xSSC for 15 min, and then washed in 4x SSC-Tween 20 0.1% for 15 min at room temperature. The hybridization signal was detected with FITC-avidin for 30 min. To amplify this signal, neuronal samples were incubated with avidin-biotin for 30 min, washed in 4x SSC-Tween 20 0.1% for 15 min and then incubated with FITC-avidin for 30 min. All samples were mounted with the ProLong anti-fading medium (Invitrogen).

2.6. Run-on transcription assays in situ and immunofluorescence

Active transcription sites were labeled by the incorporation of 5'-fluorouridine (5'-FU) into nascent RNA, as previously reported [42]. Briefly, under anesthesia both control and bortezomib-treated rats (n = 3 per group) were given an intravenous injection of 5'-FU (Sigma, UK) at doses of 5 µl/g of a stock solution of 0.4 M 5'-FU in 0.9% saline. All animals were sacrificed after 1 h post-injection of the halogenated nucleotide and fixed by perfusion with 3.7% paraformaldehyde in HPEM buffer (2x HPEM: Hepes, 60 mM; Pipes, 130 mM; EGTA, 20 mM; and MgCl₂ · 6H₂O, 4 mM) containing 0.5% Triton X-100 for 10 min. The sensory ganglia were removed, washed in HPEM buffer containing 0.5% Triton X-100 for 10 min and cut into small fragments. Mechanical sensory ganglia dissociation was performed as previously described. Then, the samples were sequentially treated with proteinase K (2.5 µg/ml in 1 M Tris buffer, pH 8) for 1 min at 25 °C, 0.1 M glycine in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) for 15 min, and 0.01% Tween 20 in PBS for 5 min. The incorporation of 5'-FU into nascent RNA was detected with a mouse monoclonal (clone BU-33) anti-BrdU antibody (Sigma, UK) diluted 1:50 in PBS (overnight at 4 °C). The samples were then washed with 0.05% Tween 20 in PBS, incubated for 45 min with an anti-mouse FITC-conjugated secondary antibody (Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA), washed in PBS, and mounted with the ProLong (Invitrogen).

2.7. Real time quantitative PCR (RTqPCR) for relative gene expression analysis

Total RNA was extracted and cleaned from the two trigeminal ganglia using Trizol (TR-118, Molecular Research Center, Inc.) following the manufacturer's instructions. Three animals per group were used. RNA samples were quantified using a spectrophotometer (Nanodrop Technologies ND-1000). First-strand cDNA was synthesized by RT-PCR using a RevertAIT H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific). The cDNA concentration was measured in a spectrophotometer (Nanodrop Technologies ND-1000) and adjusted to 0.3 mg/ml. qPCR was performed using the Mx3005P system (Stratagene) with automation attachment. In this work, we have used SYBRGreen (Takara) based qPCR. *Rps14* was chosen as the normalizer in our experiments. Expression level was evaluated relative to a calibrator according to the 2-(DDCt) equation. Mean values for fold changes were calculated for each gene. The relative levels of 45S pre-rRNA and mature 18S rRNA were calculated as previously reported [43]. Each value in this work represents the mean ± SEM of 3 independent samples obtained under the same conditions. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni tests for comparisons. Statistical significance was set at p < 0.05. All the analyses were carried out using GraphPad software for Windows. Primers used for qPCR are indicated in the Table 1.

2.8. Conventional and immunoelectron microscopy

For conventional ultrastructural examination of sensory neurons, control and bortezomib-treated rats (n = 2 per group) were perfused under deep anesthesia with 1% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. DRG were removed, rinsed in 0.1 M

Table 1
Information on the primers used for real-time quantitative PCR.

Name	GenBank	Forward primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
45S pre rRNA	NM_001100771.1	tggggcagcttatgacaac	tagcaccaaacgggaaacc
18S rRNA	–	gttggtttcggaactgaggc	gtcggcatcgtttatggtcg
<i>Nucleophosmin</i>	NM_012992.4	catctctgactctgcatctcc	ggtcttgaggtgaagtgtgg
<i>Ubf1</i>	NM_001105723.2	gaagagaaggcagcttcagg	cttctcggacaagtctgtcc
<i>Fbl</i>	NM_001025643.1	attgactccacagcctcagc	gcgtggtctcgttcataagg
<i>Nucleolin</i>	NM_012749.2	tgctggagtgtggtagcc	tgacagcagtggaagaagg
<i>Coilin</i>	NM_017360.1	ccagcatgttcttggacacc	agcctgcttcaccttcagc
<i>p53/TP53</i>	NM_030989.3	accagcacaagctctctcc	ctctcggaacatctcgaagc
<i>c-myc</i>	NM_012603.2	gaggtggaaaaccgacag	cagcagctcgaattctcc
<i>Rps14</i>	NM_022672.1	tcactgcctcatatcaaac	tcctctgagtgctcagag

phosphate buffer, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in acetone and embedded in araldite (Durcupan, Fluka, Switzerland). Ultrathin sections stained with uranyl acetate and lead citrate were examined with a JEOL 201 electron microscope.

For immunoelectron microscopy of fibrillar and 5'-FU incorporation sites into nascent RNA, control and bortezomib-treated rats were perfused with 3.7% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for 10-min at room temperature. In the case of 5'-FU incorporation, this halogenated precursor was administered as described above. Small tissue fragments of trigeminal ganglia were washed in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in increasing concentrations of methanol at –20 °C, embedded in Lowicryl K4 M at –20 °C and polymerized with ultraviolet irradiation. Ultrathin sections were mounted on nickel grids and sequentially incubated with 0.1 M glycine in PBS for 15 min, 5% BSA in PBS for 30 min and the primary rabbit anti-fibrillar or mouse monoclonal anti-BrdU antibody (diluted 1:25 in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, containing 1% BSA and 0.1 M glycine) for 1 h at 37 °C. After washing, the sections were incubated with the specific secondary antibodies coupled to 15-nm gold particles (BioCell, UK; diluted 1:50 in PBS containing 1% BSA). Following immunogold labeling, the grids were stained with lead citrate and uranyl acetate and examined with a JEOL 201 electron microscope. As controls, ultrathin sections were treated as described above but with the primary antibody being omitted.

2.9. SDS-PAGE and immunoblotting

Trigeminal ganglia from control and bortezomib-treated rats (n = 4 per group) were lysed at 4 °C in a buffer containing 20 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM EGTA, 40 mM β-glycerophosphate, 1% Nonidet P-40, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 2 mM sodium vanadate, 1 mM PMSF, 20 mg/ml aprotinin, 20 mg/ml leupeptin, and then cleared by centrifugation at 14,000 rpm for 20 min at 4 °C. Proteins were separated on SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes by standard procedures. Rabbit polyclonal anti-pP53 (Ser 15), anti-coilin and anti-Myc, mouse monoclonal anti-p53 and goat anti-actin were used. Protein bands were detected with an Odyssey™ Infrared-Imaging System (Li-Cor Biosciences) according to Odyssey™ Western-Blotting Protocol. Immunoblots were developed with anti-mouse and anti-goat IRDye800DX or anti-rabbit IRDye700DX (Rockland Immunochemicals, USA) secondary antibodies. For the quantitative analysis of the blots we used ImageJ software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>).

3. Results

3.1. Proteasome inhibition increases the size and number of nucleoli and induces chromatolysis

The intravenous administration of Btz-LD (0.2 mg/kg) or Btz-HD (0.5 mg/kg) was well tolerated by the Sprague-Dawley rats, and the animals survived these treatment protocols. Bortezomib induced dose-dependent changes in the nuclear and cytoplasmic organization of sensory ganglion neurons. The cytochemical staining for nucleic acids

with propidium iodide revealed the typical morphology of the cell body in control neurons. It was characterized by a prominent and rounded nucleolus, clearly demarcated from the pale euchromatic nucleus, and numerous Nissl bodies throughout the cytoplasm (Fig. 1A). Upon bortezomib treatment, the euchromatic configuration of the nucleus was preserved, but an apparent increase in the nucleolar size, accompanied by variable levels of dissolution of Nissl bodies (chromatolysis) and nuclear eccentricity, was observed (Fig. 1B, C). Electron microscopy analysis confirmed the dispersion of polyribosome aggregates and rough endoplasmic reticulum cisterns in chromatolytic domains of the cytoplasm (Fig. 1D, E). Moreover, there were no morphological signs of neuronal apoptosis or necrosis.

The morphometric estimation of the nucleolar size and number was performed in large neurons ($\geq 40 \mu\text{m}$) immunostained with B23, a nucleolar marker. The nucleolar diameter of mononucleolated neurons showed a significant and dose-dependent increase in bortezomib-treated neurons as compared with controls (Fig. 1F), reflecting an

augmentation of the nucleolar mass. As the whole cell nucleus could be seen in dissociated neurons, it was possible to make an accurate quantitative analysis of the number of nucleoli per cell. Whereas 66.05% of the control sensory ganglia neurons were mononucleolated, this proportion significantly dropped to 26.54% after treatment with Btz-HD (Fig. 1G), resulting in a significant increase in neurons with 2 to 4 nucleoli (Fig. 1G). These multinucleolated neurons exhibited great variations in the size of nucleoli in a given neuron (Fig. 1G).

3.2. Bortezomib treatment preserves the reticulated nucleolar configuration of sensory ganglion neurons

We next investigated by electron microscopy whether proteasome inhibition modified the nucleolar architecture in sensory ganglion neurons. Control neurons exhibited a rounded euchromatic nucleus with several areas of interchromatin granule clusters and a prominent reticulated

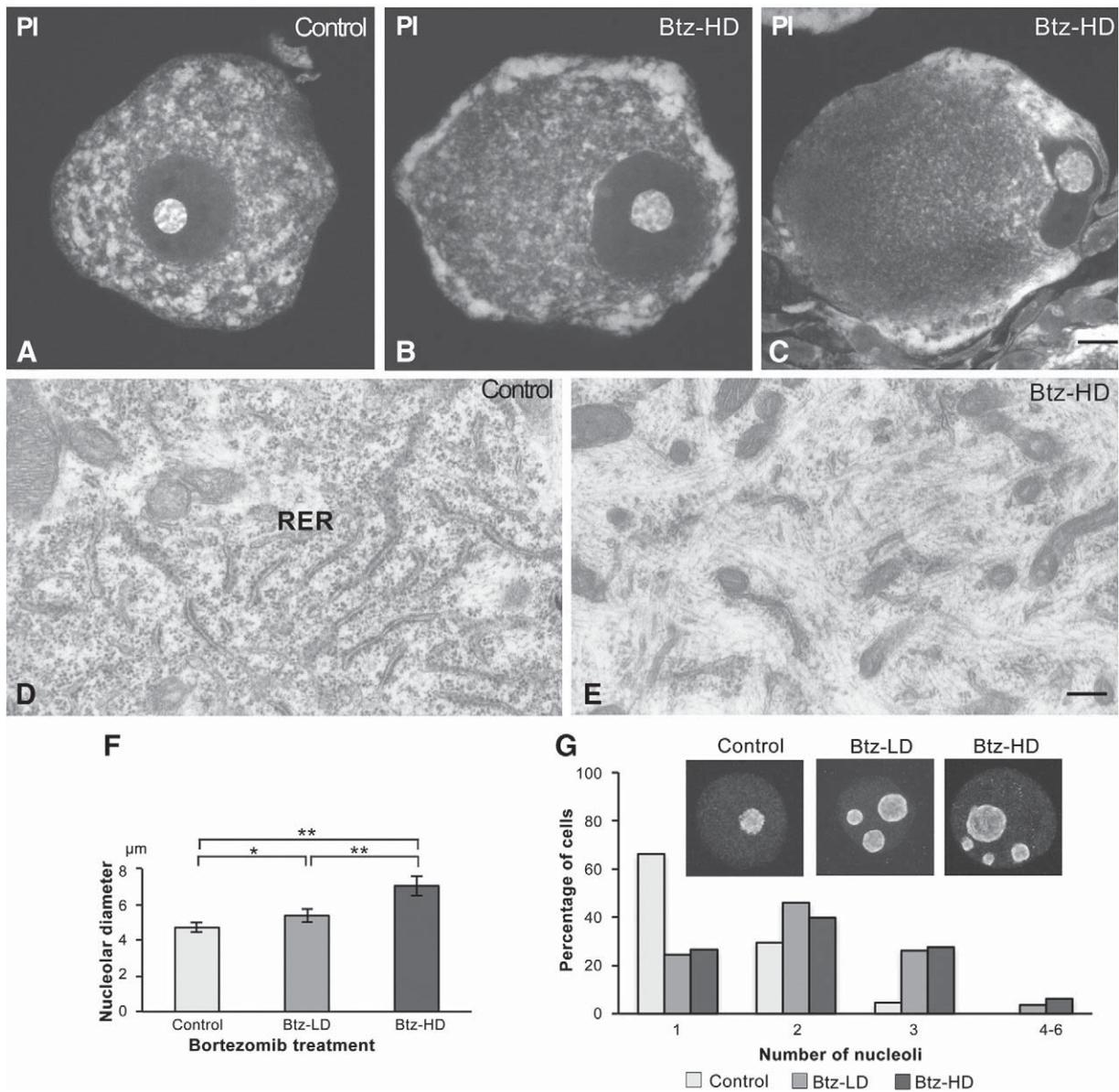


Fig. 1. A–C. Representative confocal images of control (A) and bortezomib-treated (B,C) sensory ganglion neurons stained with propidium iodide (PI). The control neuron exhibits the typical distribution of cytoplasmic Nissl bodies and a round nucleus with a prominent nucleolus. Bortezomib treatment induces nuclear eccentricity, central chromatolysis and nucleolar hypertrophy. Scale bar: 5 μm . D and E. Electron microscopy of the typical organization of the rough endoplasmic reticulum (RER) in a control neuron (D) and of its dissolution in a chromatolytic neuron (E). Scale bar: 1 μm . F. Morphometric analysis of the nucleolar diameter in mononucleolated large neurons revealed that bortezomib-treatment induces nucleolar hypertrophy. Data are mean \pm SD from three independent experiments; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$. G. Quantitative analysis of the percentage of neurons with one, two, three and four to six nucleoli showed a bortezomib-induced increase in multinucleolated neurons.

nucleolus (Fig. 2A). Following treatment with Btz-LD or Btz-HD the nuclear euchromatic configuration was preserved (Fig. 2B). Morphological nuclear hallmarks of proteasome inhibition were the increase in the nucleolar size and the formation of clusters of ring-shaped dense bodies (Fig. 2B), which we have previously reported as poly(A) RNA granules [39]. Some of these granules appeared closely associated with the nucleolar surface (Fig. 2B, inset).

In control sensory ganglia neurons, almost all nucleoli (93.4%; $n = 3$ animals; 50 nucleoli per animal) displayed the typical reticulated nucleoli of this neuronal population [38]. The ultrastructural features included i) numerous small fibrillar centers surrounded by a shell of

dense fibrillar component, ii) reticulated strands of dense fibrillar or granular components, and iii) nucleolar interstices (Fig. 2C). The granular component also formed small irregular masses intermingled with the reticulated strands. After bortezomib treatment, the reticulated nucleolar configuration was preserved in the majority (84% with Btz-LD and 81.4% with Btz-HD; $n = 3$ animals per condition; 50 nucleoli per animal) of nucleoli (Fig. 2D). The remaining nucleoli exhibited moderate nucleolar alterations. They included the accumulation of the granular component in several larger masses (Fig. 2E) or the appearance of irregular-shaped reticulated nucleoli with microspherules of dense fibrillar material [44] trapped in the nucleolar interstices or located

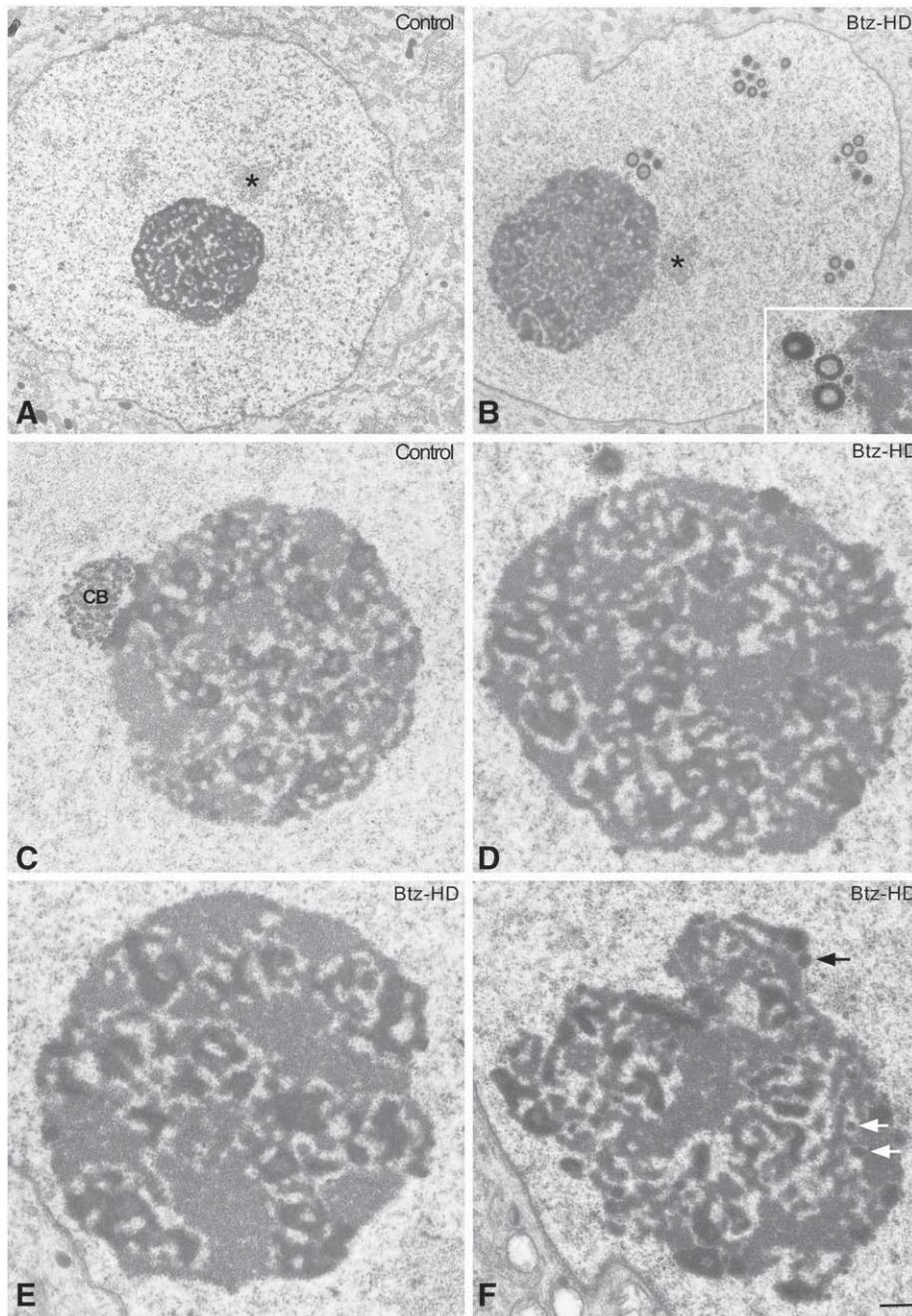


Fig. 2. A and B. Representative electron micrographs of nuclei from control (A) and bortezomib-treated (B) neurons. Both neuronal nuclei exhibit a euchromatin pattern, small interchromatin granule clusters (asterisks) and prominent nucleoli. Note the larger size of the nucleolus and the presence of clusters of ring-shaped nuclear bodies in the neuron exposed to Btz-HD (B and inset). Scale bar = 1 μm. C–F. Electron micrographs of reticulated nucleoli from control (C) and bortezomib-treated (D–F) neurons. The nucleolus of control neuron (C) shows the typical reticulated configuration with numerous small FCs, surrounded by a shell of the DFC, and small masses or strands of the GC. Note the presence of a nucleolus-attached CB. A similar reticulated configuration, but of greater nucleolar size, is preserved following bortezomib treatment (D). Upon proteasome inhibition a few neurons exhibit large masses of GC (E) or partial unraveling of the nuclear structure (F) associated with the presence of electron-dense microspherules (arrows). Scale bar = 0.5 μm.

at the nucleolar surface (Fig. 2F). However, the nucleolar macro-segregation previously reported in sensory ganglion neurons after the inhibition of RNA pol I transcription with actinomycin D [42,45] was not observed upon proteasome inhibition.

3.3. Bortezomib treatment does not interfere with nucleolar transcription

Since previous studies in neurons and non-neuronal cells have shown that the organization of FCs correlate with the transcriptional activity of the rDNA [14,26,16], we have analyzed whether proteasome inhibition impacts on the organization of FCs. These structures concentrate components of the RNA pol I transcription machinery, including the upstream binding factor (UBF), which is a reliable marker of FCs in mammalian neurons [26,45]. With immunofluorescence for the UBF, FCs appeared as numerous small-size spots, ranging from 0.15 to 0.5 μm , distributed throughout the nucleolar body in both control and bortezomib-treated neurons (Fig. 3A–C). Moreover, proteasome inhibition did not induce segregation of UBF at the nuclear periphery, as has been reported after the inhibition of rRNA synthesis with actinomycin D [45,46]. In conclusion, proteasome inhibition preserves the basic organization of FCs in sensory ganglion neurons.

We then proceeded to investigate whether proteasome inhibition interfered with nucleolar transcription using an *in situ* run-on assay based on the incorporation of the halogenated RNA precursor 5'-FU into nascent RNA. The incorporation was visualized with an anti-BrdU antibody. Following 1 h of the intraperitoneal injection of 5'-FU, the nucleolus of control neurons appeared intensely labeled (Fig. 3D). The labeling was not homogenous with nucleolar domains of higher 5'-FU incorporation. In addition, numerous extranucleolar transcription foci were observed (Fig. 3D). Interestingly, a strong nucleolar incorporation of 5'-FU was also detected in all bortezomib-treated neurons, even in the more affected neurons with elongated and eccentric nuclei (Fig. 3E, F). Moreover, nucleoli frequently exhibited small rings of higher 5'-FU incorporation that presumably corresponded to the shell of DFC around of FCs (Fig. 3E). Immunoelectron localization of 5'-FU incorporation sites confirmed the nucleolar concentration of nascent pre-rRNA in both control and bortezomib-treated neurons and revealed the predominant distribution of immunogold particles on the DFC (Fig. 4A–D). Small rings of DFC decorated with gold particles were frequently found after bortezomib treatment (Fig. 4C). Moreover, some masses of GC showed a moderate labeling indicating the migration of newly synthesized pre-rRNA from the DFC to the GC, where the late processing of this RNA occurs [14,15]. As a negative control, both Cajal bodies, lacking in DNA [33], and the transcriptional silent heterochromatin masses attached to the nucleolus appeared free of nascent RNA (Fig. 4A).

To further understand the transcriptional behavior of neuronal nucleoli upon proteasome inhibition, we performed immunostaining for the chaperone B23, a nucleolar protein with a transcription-dependent expression pattern in mammalian neurons [47,28]. In control neurons, B23 was predominantly nucleolar, with a non-homogenous staining reflecting its distribution in the granular component [15,16]. In addition, a weak diffuse nucleoplasmic staining for B23 was observed (Fig. 3G). A similar nucleolar and nucleoplasmic staining pattern was observed in bortezomib-treated neurons, which displayed hypertrophic and intensely labeled nucleoli with the anti-B23 antibody (Fig. 3H, I). Disruption of nucleolar staining or nucleoplasmic accumulation of B23, two cellular events associated with inhibition of nucleolar transcription [47,30,19], were not observed. These findings are consistent with the *in situ* transcription assay showing a high nucleolar transcription upon proteasome inhibition.

Because proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome substrates and polyadenylated RNA in cultured fibroblasts [22], we analyzed the possible association of poly(A) granules of bortezomib-treated neurons with the nucleolus. *In situ* hybridization for poly(A) RNAs revealed their concentration in nuclear speckles

and cytoplasmic Nissl bodies, as previously reported [26,39], and their absence in the nucleolus (Fig. 3J). Proteasome inhibition induced a dose-dependent formation of nuclear poly(A) granules, some of them localized at the nucleolar surface, but not within the nucleolus (Fig. 3K, L). This was accompanied by different levels of poly(A) RNA loss in nuclear speckles and Nissl bodies (Fig. 3K, L). Furthermore, immunogold electron microscopy localization of 5'-FU incorporation sites demonstrated the absence of recently synthesized RNA in the poly(A) granules associated with the nucleolus, reflecting that they are not transcription sites (Fig. 4D).

3.4. Bortezomib treatment increases the levels of both 45S rRNA and mRNAs encoding some proteins involved in rRNA synthesis and processing

To further support the possibility that bortezomib treatment increases transcription mediated by RNA pol I in sensory ganglia, we determined by quantitative RT-PCR the levels of 45S pre-rRNA and mature 18S rRNA. The 45S precursor is very short lived and is considered as an indicator of RNA-pol-I activity [48]. Bortezomib treatment significantly increased both 45S pre-rRNA and 18S rRNA levels in sensory ganglia as compared to controls (Table 2). This finding supports the notion that the inhibition of proteasome induces a compensatory response to the proteotoxic stress partially mediated by the activation of nucleolar transcription. In agreement with this view, we have detected a dose-dependent increase in the expression of mRNA transcripts encoding the UBF transcription factor of the RNA pol I (Table 2). Similarly, the genes encoding fibrillar and B23, two key proteins for pre-rRNA processing and assembly of preribosomal particles [14,15], were up-regulated (Table 2). However, no significant changes in the mRNA levels of nucleolin were detected upon proteasome inhibition.

To further understand the transcriptional response of the neuronal nucleolus to proteasome inhibition, we analyzed the expression levels of two regulators of RNA pol I transcription, the oncoprotein c-Myc and the tumor suppressor p53. c-Myc is a major cell growth regulator that stimulates ribosome biogenesis [49,50]. Interestingly, mRNA and protein levels of c-Myc showed a significant and dose-dependent increase in sensory ganglia of bortezomib-treated rats as compared with control ganglia (Table 2; Fig. 6). The transcription factor p53 is an important transducer of the cellular stress response and can function as an inhibitor of RNA pol I transcription [51]. Unlike c-Myc, the expression levels of the mRNA encoding p53 significantly decreased in sensory ganglia of bortezomib-treated rats as compared to controls. Moreover, Western blot analysis of protein levels of both the phosphorylated (Ser 15) and total forms of p53 revealed the absence of p53 activation in sensory ganglia upon bortezomib treatment (Table 2, Fig. 6).

3.5. Bortezomib treatment increased Cajal body number in sensory ganglion neurons

Since CBs are involved in the biogenesis pathway of snoRNAs required for pre-rRNA processing [52,36], we investigated whether the bortezomib-induced increase in both the nucleolar mass and rRNA biosynthesis affects the organization and assembly of CBs. Double immunolabeling for coilin and SMN revealed the presence of typical CBs immunolabeled for these two CB markers in both untreated and bortezomib-treated neurons (Fig. 5A–C). They appeared free in the nucleoplasm or attached to the nucleolus. Moreover, the diffuse cytoplasmic staining of SMN was preserved upon bortezomib treatment. The quantitative analysis of the mean number of CBs per neuron on whole dissociated neurons immunostained for coilin and SMN showed a dose-dependent significant increase in CBs upon proteasome inhibition (Fig. 5I). It is also noteworthy that coilin did not relocalize within the nucleolus following bortezomib treatment, as occurs under certain

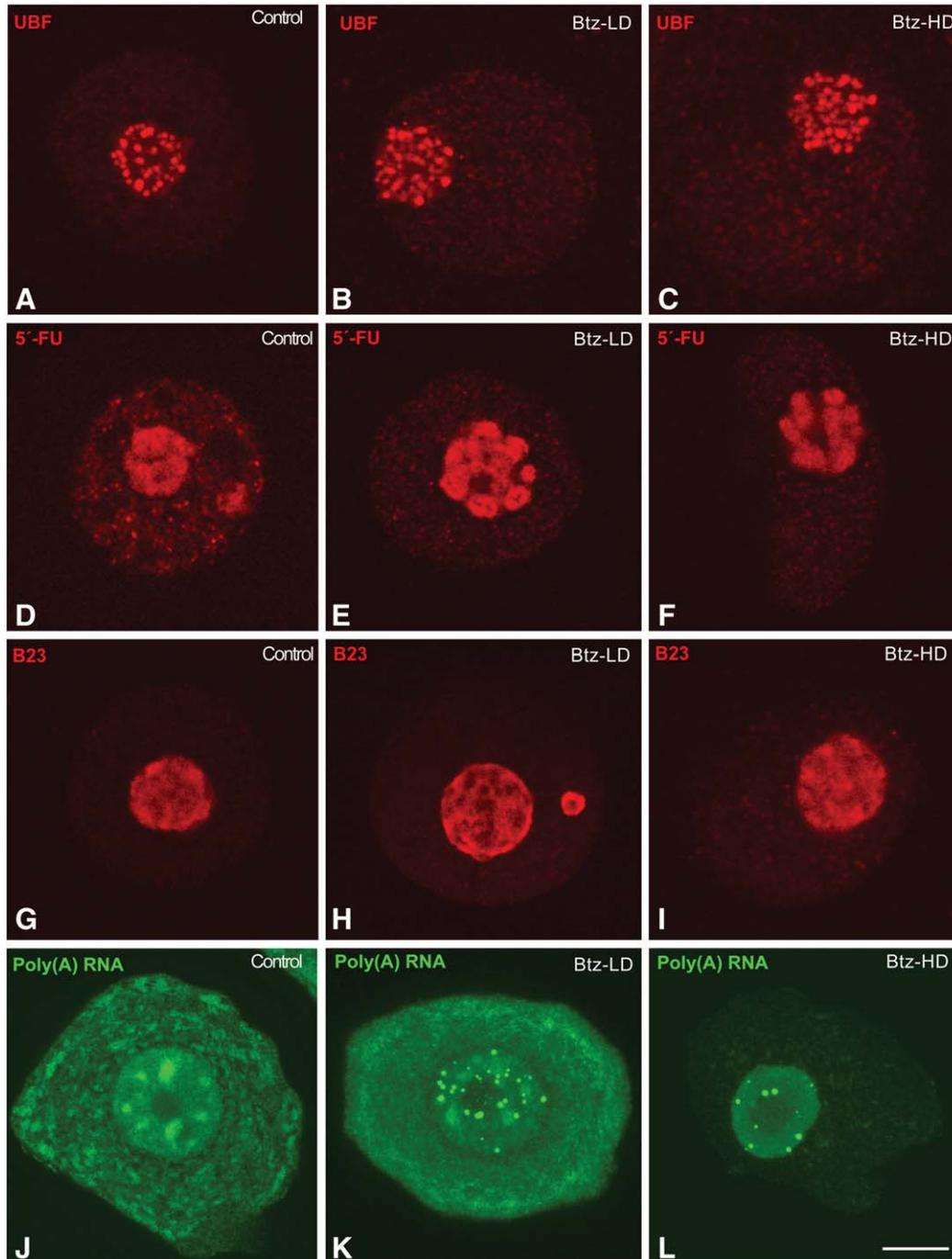


Fig. 3. A–C. Immunostaining for the UBF illustrates the organization of FCs in control (A) and bortezomib-treated (B and C) neurons. FCs in all neurons appeared as numerous UBF-positive spots of variable size distributed throughout the nucleoli body. D–F. Representative examples of in situ transcription assays with 5'-FU incorporation in control (D) and bortezomib-treated neurons (E and F) 1 h post-injection of the halogenated nucleotide. In addition to the labeled nucleolus, numerous transcription foci of 5'-FU incorporation were detected throughout the nucleus. Note the strong nucleolar incorporation of 5'-FU into nascent RNA upon proteasome inhibition (E and F) and the formation of ring-shaped nucleolar domains of highest 5'-FU incorporation (E) identified as the DFC around of FCs. G–I. B23 immunostaining of control (G) and bortezomib-treated (H and I) neurons. In all neurons, B23 appear concentrated in the nucleolus and only a weak diffuse nucleoplasmic staining is observed. Note in H the coexistence of an hypertrophic nucleolus and a micronucleoli. Scale bar, A–I = 5 μ m. J–L. In situ hybridization for poly(A) RNA in control (J) and bortezomib-treated (K and L) neurons. In the control neuron (J) poly(A) RNAs concentrate in nuclear speckles and in cytoplasmic Nissl bodies, but are absent from the nucleolus. After bortezomib treatment polyadenylated RNAs accumulate in nuclear poly(A) RNA granules, whereas the hybridization signal tends to disappear from Nissl bodies and nuclear speckles in parallel with the progression of the chromatolysis (K and L). Scale bar = 10 μ m.

experimental and pathological conditions of repression of the RNA pol I transcription [53–55].

The abundance of CBs following bortezomib treatment and their association with the nucleolus was also confirmed in co-staining experiments for fibrillarin, a snoRNP-associated nucleolar protein shared with

CBs [56,34,35], and coilin (Fig. 5D–F). Immunoelectron localization of fibrillarin revealed that almost all CBs in bortezomib-treated neurons exhibited the typical morphology of coiled threads of dense fibrillar material which appeared immunolabeled for fibrillarin (Fig. 4G), as previously reported in control sensory ganglion neurons [38]. However,

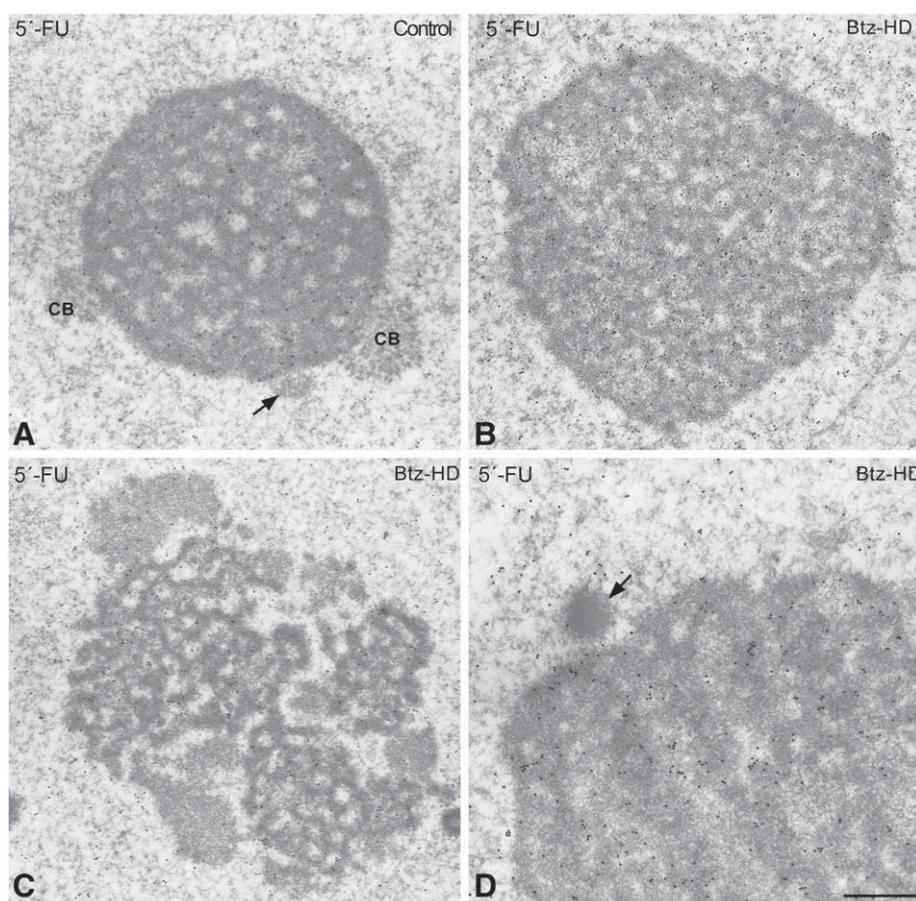


Fig. 4. A–C. Immunogold electron microscopy localization of the newly synthesized RNA in nucleoli of control (A) and bortezomib-treated (B–D) neurons. All nucleoli appear intensely decorated with gold particles of 5'-FU incorporation. Note the absence of 5'-FU labeling in CBs and in a nucleolus-attached heterochromatin mass (arrow in A). In all cases, most immunogold particles predominantly decorated the reticulated strands of DFC. Note in the panel D the absence of nascent RNA in a poly(A) granule located at the nucleolar surface (arrow). Scale bar, A–C = 1 µm, D = 0.4 µm.

a small proportion of CBs (approximately 8%; $n = 70$ CBs) appeared segregated with a mass of dense fibrillar material immunoreactive for fibrillar protein separated from the coiled threads (Fig. 5H).

Given that coilin has an essential role in the assembly and integrity of CBs [56–58], we analyzed the changes in mRNA and protein levels induced by proteasome inhibition in sensory ganglia. Whereas coilin mRNA significantly increases upon bortezomib treatment (Table 2), no significant variations were detected in protein levels as compared with control samples (Fig. 6).

Table 2

Effects of bortezomib treatment on the relative amounts of specific transcripts related to nucleolar and CB biology.

Name	Control	Btz-LD	Btz-HD
<i>Fbl</i>	1	1.30 ± 0.015**	1.91 ± 0.06****
<i>Nucleophosmin</i>	1	1.04 ± 0.06	1.50 ± 0.08***
<i>Ubf1</i>	1	1.41 ± 0.09**	2.20 ± 0.16****
<i>Nucleolin</i>	1	1.08 ± 0.05	1.11 ± 0.05
<i>Tp53</i>	1	0.43 ± 0.015***	0.43 ± 0.04***
<i>c-myc</i>	1	1.36 ± 0.05**	2.39 ± 0.14****
<i>Coilin</i>	1	1.17 ± 0.05*	1.35 ± 0.08**
45S pre-rRNA	1	1.59 ± 0.10****	2.49 ± 0.10****
18S rRNA	1	1.49 ± 0.10***	2.37 ± 0.19****

Values are expressed as fold changes versus control samples and given as mean ± SEM.

* p-value < 0.05.

** p-value < 0.01.

*** p-value < 0.001.

**** p-value < 0.0001 when compared to control.

4. Discussion

The present study demonstrates that treatments with low doses of bortezomib (0.2 mg/kg), similar to the dose used for the treatment of multiple myeloma, or higher doses (0.5 mg/kg) induce a dose-dependent reactive response in nucleoli and related CBs of sensory ganglion neurons. This response is characterized by an increase in the number and size of nucleoli, up-regulation and pre-rRNA synthesis and enhanced CB assembly.

Bortezomib has been shown to be an effective anticancer drug, but the sensory peripheral neuropathy represents the dose-limiting side effect of treatment [9,12]. Several studies in animal models have shown that sensory ganglion neurons, together with Schwann and satellite glial cells, are cellular targets of bortezomib neurotoxicity [39,40,59]. In a rat model, we have previously reported that chronic administration of Btz-LD produces chromatolysis and nuclear retention of poly(A) RNA granules, suggesting a dysfunction of protein synthesis and pre-mRNA processing [39]. More severe alterations consisting of condensation of some neuronal bodies, partial segregation of nucleolar components and degeneration of satellite glial cells have been reported in a mouse model upon treatment with high doses (0.8 mg/kg) of bortezomib [40]. Taken together, these data support that the dysfunction of sensory ganglion neurons appears to be an essential component in the pathophysiology of the bortezomib-induced peripheral neuropathy.

Commonly, the sensory peripheral neuropathy reverses after bortezomib dose reduction or discontinuation [9,12], suggesting that proteasome inhibition induces a survival response in sensory ganglion neurons to counteract proteotoxic stress and to prevent

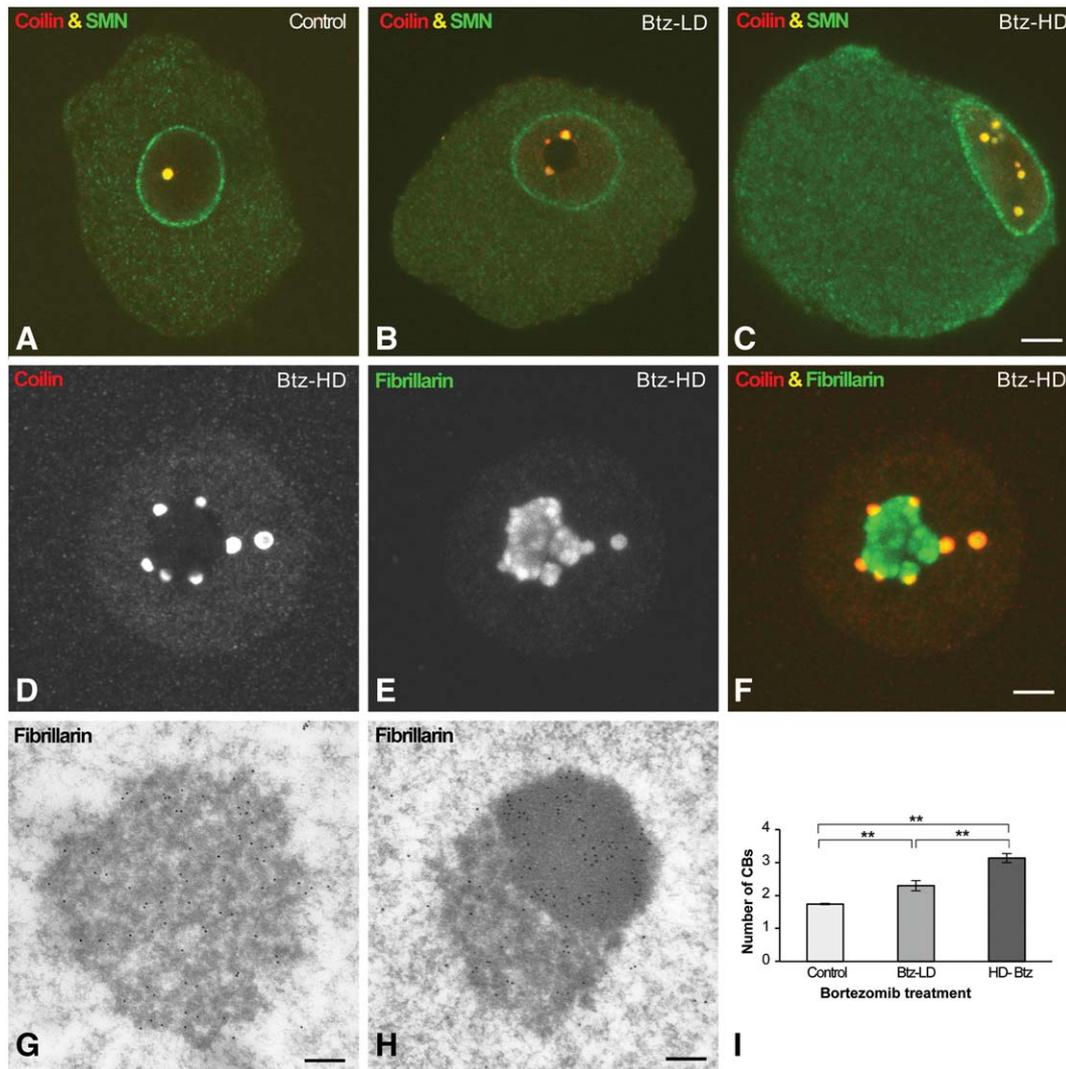


Fig. 5. A–C. Confocal microscopy images representative of control (A) and bortezomib-treated (B–Z) neurons double immunolabeled for coilin and SMN. In all neurons coilin colocalizes with SMN in CBs. Note the diffuse cytoplasmic staining of the SMN and the abundance of CBs in the bortezomib-treated neuron with an eccentric nucleus (C). Scale bar = 5 μ m. D–F. Double immunostaining for coilin and fibrillar in a bortezomib-treated neuron. Note the nucleolar concentration of fibrillar and its colocalization with coilin in numerous nucleolus-attached CBs. Scale bar = 2 μ m. G and H. Immunogold electron microscopy localization of fibrillar in two CBs of bortezomib-treated neurons. Whereas one typical CB shows the dense coiled threads decorated with immunogold particles (G) the other CB (H) appears segregated with a dense mass decorated with numerous gold particles. Scale bar = 0.15 μ m. I. Quantitative analysis of the average number of CBs per nucleus in control and bortezomib-treated large neurons. Proteasome inhibition induces a significant increase in the number of CBs. Data are mean \pm SD from three independent experiments; ***p* < 0.001.

neurodegeneration. In agreement with this view, our results show the absence of degenerating neurons and the induction of nucleolar changes that includes an increase in the number and size of nucleoli, and activation of nucleolar transcription. Nucleolar hypertrophy and activation of rRNA synthesis appear to reflect a neuronal compensatory reaction to the dysfunction of protein synthesis machinery (chromatolysis) induced by proteasome inhibition.

Bortezomib-induced increases in nucleoli number suggests the activation of a mechanism of nucleogenesis. It is well known that the theoretical maximum number of nucleoli is determined by the number of chromosomes carrying nucleolar organizers regions (NORs). These regions contain tandem repetitions of rRNA genes and each of which may potentially organize the formation of a nucleolus [60,14,16]. Rat sensory ganglia neurons are diploid cells that have six NORs, resulting in a theoretical maximum number of six nucleoli per neuron [38]. The predominance of a single nucleolus reported here and previously in large control neurons [38] may result from the spatial association of NORs and fusion of nucleoli during differentiation as well as from the existence of some inactive NORs that do not contribute to the formation

of nucleoli [23,60]. In this context, the bortezomib-induced increase in nucleoli number may reflect the activation of transcriptional repressed NORs resulting in the assembly of additional nucleoli required to enhance ribosome biogenesis. Consistent with this, a recent study has shown that prolonged neuronal stimulation induces an increase in nucleolar number and protein synthesis, suggesting the activation of nucleogenesis [27].

Nucleolar size is a parameter related to nucleolar transcription that reflects the rate of pre-rRNA synthesis and processing to produce preribosomal particles [14,16]. As such, in human sensory ganglia neurons and in a rat model of osmotic stimulation of supraoptic neurons we have previously observed a direct relationship between the nucleolar size and both neuronal body size and transcriptional activity [24,26]. In this context, we propose that the increase in nucleolar size induced by proteasome inhibition clearly correlates with the activation of nucleolar transcription and represents another indicator of the nucleolar reactive response to the proteotoxic stress. The preserved reticulated morphology of nucleoli and their active incorporation of 5'-FU in bortezomib-treated neurons reasonably rule out the possibility that

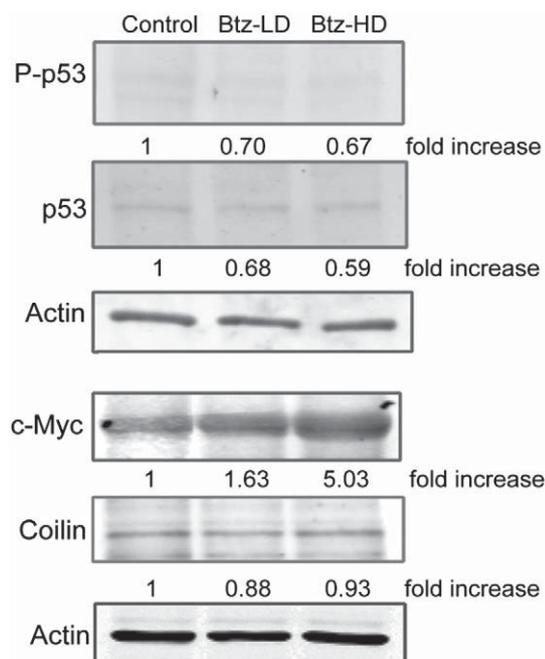


Fig. 6. Western blotting of trigeminal ganglia lysates shows the absence of p-53 activation upon proteasome inhibition. A dose-dependent increase of c-Myc protein levels was detected upon bortezomib treatment, whereas no variations in coilin levels were observed. Quantification of protein levels were normalized to actin, and the fold increase estimated. Representative blots of three independent experiments.

increased nucleolar mass results from the nucleolar accumulation of proteasome targets. Variations of the nucleolar size have been related to aging and neurodegenerative disorders [61,28,62]. For instance, whereas reduced nucleolar volume indicative of the silencing of ribosomal genes has been reported in neuronal populations affected by Alzheimer's disease, a compensatory nucleolar hypertrophy occurs in cortical and hippocampal neurons from asymptomatic patients with this disease [63,64,28]. As occurs in bortezomib-treated neurons, nuclear eccentricity, severe chromatolysis, nucleolar hypertrophy and increased rRNA levels are cellular hallmarks of the stress response to axotomy in sensory ganglion neurons and other peripheral neurons [25,65,66]. Interestingly, the nucleolar response to axotomy has been considered as a reparative mechanism, which is essential for a successful regeneration of axotomized neurons [25].

It is well established that the nucleolus senses cellular stress and coordinates the stress response [17,18]. In fact, a dramatic structural and molecular reorganization of nucleoli has been previously reported in response to different types of cellular stress. Notably, most cellular stresses that generate nucleolar alterations, such as segregation of the DFC and GC, formation of perinucleolar caps of the UBF or translocation to the nucleoplasm of B23, are p53-dependent and are accompanied by transcriptional inhibition of the RNA pol I [18,29,67]. Different factors have been reported to trigger this inhibition, including treatments with genotoxic agents or transcriptional inhibitors and the conditional ablation of the transcription initiation factor TIF-IA in mice [29,47,62,68,69]. Interestingly, the proteotoxic stress in sensory ganglion neurons preserves the normal structural organization of the neuronal nucleolus and enhances 45S rRNA synthesis. However, it does not seem to require the activation of p53. This is consistent with the recent demonstration that bortezomib treatment reduces p53 expression in an animal model of retinal ischemia-reperfusion injury [70]. Moreover, we have previously reported in sensory ganglion neurons a transient activation of p53 upon ionizing radiation treatment (4 Gy). In this experimental model, the increase in p53 expression is associated with a

drop in nucleolar transcription, suggesting a negative relationship between the activation of p53 and transcriptional activity of the nucleolus [71].

Recent studies in cultured cell lines indicate that cells can compensate for an impairment of proteasome activity by transcriptional activation of antioxidant defense genes including all 26S proteasome subunit genes [72]. Our results in sensory ganglion neurons show that proteasome inhibition upregulates genes encoding UBF, fibrillarin and B23, which are essential proteins for pre-rRNA synthesis and processing [14–16]. Furthermore, the bortezomib-induced increase in the expression of c-Myc, a positive regulator of ribosome biogenesis [49,50], may simply result from inhibition of its degradation by the proteasome. However, the parallel significant increase in the mRNA expression of c-myc raises the possibility that c-Myc could be involved in the nucleolar response to proteotoxic stress. In this context, our results suggest that the nucleolar reaction could represent a protective mechanism to compensate the dysfunction of protein synthesis machinery caused by the partial dissolution of the Nissl bodies. In human cultured cell lines, however, it has been shown that short proteasome inhibition treatments alter the nucleolar morphology and interfere with pre-rRNA processing [21]. The discrepancy with our results may result from the different experimental protocols for treatments with proteasome inhibitors; we use a prolonged treatment for 4 days on whole animals, and from a different neuronal response to proteasome inhibition.

Regarding the increase in CB number following bortezomib treatment, we propose that it reflects the coordination of CB assembly with nucleolar pre-rRNA processing. A reactive bortezomib-induced activation of CB assembly is also suggested by the increased expression levels of coilin mRNA. Indeed, coilin is an essential regulator of CB assembly [56–58]. Moreover, CBs in bortezomib-treated neurons preserve the structural and molecular organization of canonical CBs [33,34,36], suggesting that they are actively engaged in the biogenesis of snRNP and snoRNP required for pre-mRNA and pre-rRNA processing. The occasional presence in bortezomib-treated neurons of a partially segregated CB is a morphological variant, which has also been found in normal ganglion neurons [38]. Our results are also consistent with the view that CBs are transcription-dependent nuclear structures whose formation accommodates the nuclear demand of RNA processing [24,37,33,34,27]. In fact, most stress signals that cause CB disruption are associated with transcription inhibition [69,18,53]. Consistent with this, we have recently reported disruption of CBs accompanied by nucleolar segregation in a mouse model of Purkinje cell degeneration in which the accumulation of DNA damage causes transcription inhibition [30].

The physical relationship between CBs and nucleoli observed in bortezomib-treated neurons is a common finding in neuronal populations [56,32,38] and clearly reflects the functional link between these two structures [33,27,54]. In support of this view, several proteins and snoRNPs localize to both CBs and nucleoli [54] and certain snoRNPs undergo biogenesis steps in CBs before their transfer to the nucleolus where they are necessary for pre-rRNA processing [34,52]. Furthermore, recent findings demonstrate that the nucleolar stress response also involves the CB as a key target of signaling pathways triggered by a variety of cellular insults [18]. In the case of the proteotoxic stress induced by proteasome inhibition, the crosstalk between CBs and nucleoli may facilitate ribosome biogenesis under conditions of severe neuronal dysfunction.

In conclusion, the coordinated neuronal response of nucleoli and CBs to the proteotoxic stress suggests a protective role, which may be important for neuronal survival.

Disclosure

All authors declare that they have no conflict of interest, and that they have no financial interest in the information contained in the present manuscript.

Acknowledgements

The authors wish to thank Raquel García-Ceballos and María Ruiz Soto for technical assistance. The authors are also indebted to Prof. A. I. Lamond (University of Dundee), for the rabbit anti-coilin antibody, and to Prof. Maria Carmo-Fonseca (IMM, Lisbon) for the rabbit anti-fibrillarin antibody. This work was supported by the following grants: “Dirección General de Investigación” of Spain (BFU2011-23983), and “Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED; CB06/05/0037)” from Spain.

References

- [1] A.L. Schwartz, A. Ciechanover, Targeting protein for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49 (2009) 73–96.
- [2] D. Finley, Recognition and processing of ubiquitin–protein conjugates by the proteasome, *Ann. Rev. Biochem.* 78 (2009) 477–513.
- [3] J. Adams, The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs, *Cancer Cell* 5 (2004) 417–421.
- [4] A. von Mikecz, The nuclear ubiquitin–proteasome system, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 1977–1984.
- [5] M. Lafarga, M.T. Berciano, E. Pena, I. Mayo, J.G. Castano, D. Bohmann, J.P. Rodrigues, J.P. Tavanéz, M. Carmo-Fonseca, Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 2771–2782.
- [6] T.D. Rockel, D. Stuhlmann, A. von Mikecz, Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 5231–5242.
- [7] A. Scharf, T.D. Rockel, A. von Mikecz, Localization of proteasomes and proteasomal proteolysis in the mammalian interphase cell nucleus by systematic application of immunocytochemistry, *Histochem. Cell Biol.* 127 (2007) 591–601.
- [8] D.C. Rubinshtein, The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration, *Nature* 443 (2006) 780–786.
- [9] P.G. Richardson, C. Mitsiades, T. Hideshima, K.C. Anderson, Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy, *Annu. Rev. Med.* 57 (2006) 33–47.
- [10] D.J. McConkey, K. Zhu, Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer, *Drug Resist. Updat.* 11 (2008) 164–179.
- [11] G. Cavaletti, A. Gilardini, A. Canta, L. Rigamonti, V. Rodriguez-Mendez, C. Ceresa, P. Marmioli, M. Bossi, N. Oggioni, M. D’Incalci, R. De Coster, Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: a neurophysiological and pathological study in the rat, *Exp. Neurol.* 204 (2007) 317–325.
- [12] A.A. Argryriou, J. Bruna, P. Marmioli, G. Cavaletti, Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 8 (2012) 51–77.
- [13] I. Grummt, Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus, *Genes Dev.* 17 (2003) 1691–1702.
- [14] I. Raska, P. Shaw, D. Cmarko, New insights into nucleolar architecture and activity, *Int. Rev. Cytol.* 255 (2006) 177–235.
- [15] F.M. Boisvert, A.I.S. van Koningsbruggen, J. Navascues, A.I. Lamond, The multifunctional nucleolus, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 574–585.
- [16] D. Hernandez-Verdun, P. Roussel, M. Thiry, V. Sirri, D.L. Lafontaine, The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3 (2010) 415–431.
- [17] M.O. Olson, Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci. STKE* (2004) pe10.
- [18] S. Boulon, B.J. Westman, S. Hutten, F.M. Boisvert, A.I. Lamond, The nucleolus under stress, *Mol. Cell* 40 (2010) 216–227.
- [19] H.M. Moore, B. Bai, O. Matilainen, L. Colis, K. Peltonen, M. Laiho, Proteasome activity influences UV-mediated subnuclear localization changes of NPM, *PLoS One* 8 (2013) e59096, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059096>.
- [20] K. Mattsson, K. Pokrovskaja, C. Kiss, G. Klein, L. Szekeley, Proteins associated with the promyelocytic leukemia gene product (PML)-containing nuclear body move to the nucleolus upon inhibition of proteasome-dependent protein degradation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 1012–1017.
- [21] D.A. Stavreva, M. Kawasaki, M. Dunder, K. Koberna, W.G. Müller, T. Tsujimura-Takahashi, W. Komatsu, T. Hayano, T. Isobe, I. Raska, T. Misteli, N. Takahashi, J.G. McNally, Potential roles for ubiquitin and the proteasome during ribosome biogenesis, *Mol. Cell Biol.* 26 (2006) 5131–5145.
- [22] L. Latonen, H.M. Moore, B. Bai, S. Jäämaa, M. Laiho, Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability, *Oncogene* 30 (2011) 790–805.
- [23] D. Crespo, C.F. Viadero, J. Villegas, M. Lafarga, Nucleoli numbers and neuronal growth in supraoptic nucleus neurons during postnatal development in the rat, *Brain Res. Dev. Brain Res.* 56 (1988) 151–155.
- [24] M. Lafarga, M.A. Andres, M.T. Berciano, E. Maquieira, Organization of nucleoli and nuclear bodies in osmotically stimulated supraoptic neurons of the rat, *J. Comp. Neurol.* 308 (1991) 329–339.
- [25] N.B. Kinderman, K.J. Jones, Testosterone enhancement of the nerve cell body response to injury: evidence using *in situ* hybridization and ribosomal DNA probes, *J. Neurosci.* 13 (1993) 1523–1532.
- [26] M.T. Berciano, M. Novell, N.T. Villagra, I. Casafont, R. Bengoechea, J.F. Val-Bernal, M. Lafarga, Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons, *J. Struct. Biol.* 158 (2007) 410–420.
- [27] B.A. Jordan, B.D. Fernholz, L. Khatri, E.B. Ziff, Activity-dependent AIDA-1 nuclear signaling regulates nucleolar numbers and protein synthesis in neurons, *Nat. Neurosci.* 10 (2007) 427–435.
- [28] M. Hetman, M. Pietrzak, Emerging roles of the neuronal nucleolus, *Trends Neurosci.* 35 (2012) 305–314.
- [29] M. Hetman, A. Vashishta, G. Rempala, Neurotoxic mechanisms of DNA damage: focus on transcriptional inhibition, *J. Neurochem.* 114 (2010) 1537–1549.
- [30] F.C. Baltanas, I. Casafont, E. Weruaga, J.R. Alonso, M.T. Berciano, M. Lafarga, Nucleolar disruption and Cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in Purkinje cells, *Brain Pathol.* 21 (2011) 374–388.
- [31] R. Parlato, G. Kreiner, Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle? *J. Mol. Med.* 91 (2013) 541–547.
- [32] M. Lafarga, I. Casafont, R. Bengoechea, O. Tapia, M.T. Berciano, Cajal’s contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus, *Chromosoma* 18 (2009) 437–443.
- [33] J.G. Gall, Cajal bodies: the first 100 years, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (2000) 273–300.
- [34] M. Cioce, A.I. Lamond, Cajal bodies: a long history of discovery, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 (2005) 105–131.
- [35] Z. Nizami, S. Deryusheva, J.G. Gall, The Cajal body and histone locus body, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) a000653.
- [36] M. Machyna, P. Heyn, K.M. Neugebauer, Cajal bodies: where form meets function, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 4 (2013) 17–34.
- [37] M. Lafarga, M.T. Berciano, L.M. Garcia-Segura, M. Carmo-Fonseca, Acute osmotic/stress stimuli induce a transient decrease of transcriptional activity in the neurosecretory neurons of supraoptic nuclei, *J. Neurocytol.* 27 (1998) 205–217.
- [38] E. Pena, M.T. Berciano, R. Fernandez, J.L. Ojeda, M. Lafarga, Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons, *J. Comp. Neurol.* 430 (2001) 250–263.
- [39] I. Casafont, M.T. Berciano, M. Lafarga, Bortezomib induces the formation of nuclear poly(A) RNA granules enriched in Sam68 and PABPN1 in sensory ganglia neurons, *Neurotox. Res.* 17 (2010) 167–178.
- [40] V.A. Carozzi, A. Canta, N. Oggioni, B. Sala, A. Chiorazzi, C. Meregalli, M. Bossi, P. Marmioli, G. Cavaletti, Neurophysiological and neuropathological characterization of new murine models of chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathies, *Exp. Neurol.* 226 (2010) 301–309.
- [41] R.P. Jansen, E.C. Hurt, H. Kern, H. Lehtonen, M. Carmo-Fonseca, B. Lapeyre, D. Tollervey, Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast, *J. Cell Biol.* 113 (1991) 715–729.
- [42] I. Casafont, J. Navascues, E. Pena, M. Lafarga, M.T. Berciano, Nuclear organization and dynamics of transcription sites in rat sensory ganglia neurons detected by incorporation of 5′-fluorouridine into nascent RNA, *Neuroscience* 140 (2006) 453–462.
- [43] A. Murayama, K. Ohmori, A. Fujimura, H. Minami, K. Yasuzawa-Tanaka, T. Kuroda, S. Oie, H. Daitoku, M. Okuwaki, K. Nagata, A. Fukamizu, K. Kimura, T. Shimizu, J. Yanagisawa, Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status, *Cell* 133 (2008) 627–639.
- [44] Y. Ren, R.K. Busch, L. Perlaky, H. Busch, The 58-kDa microspherule protein (MSP58), a nucleolar protein, interacts with nucleolar protein p120, *Eur. J. Biochem.* 3 (1998) 734–742.
- [45] I. Casafont, R. Bengoechea, J. Navascues, E. Pena, M.T. Berciano, M. Lafarga, The giant fibrillar center: a nucleolar structure enriched in upstream binding factor (UBF) that appears in transcriptionally more active sensory ganglion neurons, *J. Struct. Biol.* 159 (2007) 451–461.
- [46] P. Jordan, M. Mannervik, L. Tora, M. Carmo-Fonseca, *In vivo* evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive, *J. Cell Biol.* 133 (1996) 225–234.
- [47] K. Kalita, D. Makonchuk, C. Gomes, J.J. Zheng, M. Hetman, Inhibition of nucleolar transcription as a trigger for neuronal apoptosis, *J. Neurochem.* 105 (2008) 2286–2299.
- [48] C. Mayer, H. Bierhoff, I. Grummt, The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and downregulates rRNA synthesis, *Genes Dev.* 19 (2005) 933–941.
- [49] C. Grandori, N. Gomez-Roman, Z.A. Felton-Edkins, C. Ngouenet, D.A. Galloway, R.N. Eisenman, R.J. White, c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 311–318.
- [50] J. van Riggelen, A. Yetil, D.W. Felsner, MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis, *Nat. Rev. Cancer* 10 (2010) 301–309.
- [51] W. Zhai, L. Comai, Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) 5930–5938.
- [52] C. Verheggen, J. Mouaikel, M. Thiry, J.M. Blanchard, D. Tollervey, R. Bordonné, D.L. Lafontaine, E. Bertrand, Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain, *EMBO J.* 19 (2001) 5480–5490.
- [53] A.S. Gilder, P.M. Do, Z.I. Carrero, A.M. Cosman, H.J. Broome, V. Velma, L.A. Martinez, M.D. Hebert, Coilin participates in suppression of RNA polymerase I in response to cisplatin-induced DNA damage, *Mol. Biol. Cell* 7 (2011) 1070–1079.
- [54] A.S. Gilder, M. Hebert, Relationship of the Cajal body to the nucleolus, in: M.O.J. Olson (Ed.), *The Nucleolus*, Springer-Science, 2011.
- [55] O. Tapia, R. Bengoechea, A. Palanca, R. Arteaga, J.F. Val-Bernal, E.F. Tizzano, M.T. Berciano, M. Lafarga, Reorganization of Cajal bodies and nucleolar targeting of coilin in motor neurons of type I spinal muscular atrophy, *Histochem. Cell Biol.* 137 (2012) 657–667.
- [56] I. Raska, R.L. Ochs, L.E.C. Andrade, E.K.L. Chan, R. Burlingame, C. Peebles, D. Gruol, E.M. Tan, Association between the nucleolus and the coiled body, *J. Struct. Biol.* 104 (1990) 120–127.

- [57] K.E. Tucker, M.T. Berciano, E.Y. Jacobs, D.F. LePage, K.B. Shpargel, J.J. Rossire, E.K. Chan, M. Lafarga, R.A. Colon, A.G. Matera, Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product, *J. Cell Biol.* 154 (2001) 293–307.
- [58] M. Strzelecka, S. Trowitzsch, G. Weber, R. Lührmann, A.C. Oates, K.M. Neugebauer, Coilin-dependent snRNP assembly is essential for zebrafish embryogenesis, *Nat. Struct. Biol.* 17 (2010) 403–409.
- [59] J. Bruna, E. Udina, A. Alé, J.J. Vilches, A. Vynckier, J. Monbaliu, L. Silverman, X. Navarro, Neurophysiological, histological and immunohistochemical characterization of bortezomib-induced neuropathy in mice, *Exp. Neurol.* 223 (2010) 599–608.
- [60] H.G. Schwarzacher, F. Wachtler, The nucleolus, *Anat. Embryol.* 188 (1993) 515–536.
- [61] L.M. Garcia Moreno, J.M. Cimadevilla, H. Gonzalez Pardo, M.C. Zahonero, J.L. Arias, NOR activity in hippocampal areas during the postnatal development and aging, *Mech. Ageing Dev.* 97 (1997) 173–181.
- [62] R. Parlato, G. Kreimer, G. Erdmann, C. Rieker, S. Stotz, E. Savenkova, S. Berger, I. Grummt, G. Schutz, Activation of an endogenous suicide response after perturbation of rRNA synthesis leads to neurodegeneration in mice, *J. Neurosci.* 28 (2008) 12759–12764.
- [63] D.M. Mann, B. Marcyniuk, P.O. Yates, D. Neary, J.S. Snowden, The progression of the pathological changes of Alzheimer's disease in frontal and temporal neocortex examined both at biopsy and autopsy, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 14 (1988) 177–195.
- [64] D. Iacono, R. O'Brien, S.M. Resnick, A.B. Zonderman, O. Pletnikova, G. Rudow, Y. An, M.J. West, Neuronal hypertrophy in asymptomatic Alzheimer disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67 (2008) 578–589.
- [65] M.R. Wells, U. Vaidya, RNA transcription in axotomized dorsal root ganglion neurons, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 27 (1994) 163–166.
- [66] D.L. McIlwain, V.B. Hoke, The role of the cytoskeleton in cell body enlargement, increased nuclear eccentricity and chromatolysis in axotomized spinal motor neurons, *BMC Neurosci.* 17 (2005) 6–19.
- [67] G. Kreiner, H. Bierhoff, M. Armentano, J. Rodriguez-Parkitna, S. Sowodniok, J.R. Naranjo, L. Bonfanti, B. Liss, G. Schütz, I. Grummt, R. Parlato, A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress, *Cell Death Differ.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.66>.
- [68] X. Yuan, Y. Zhou, E. Casanova, M. Chai, E. Kiss, H.J. Grone, G. Schtz, I. Grummt, Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis, *Mol. Cell* 19 (2005) 77–87.
- [69] M. Cioce, S. Boulon, A.G. Matera, A.I. Lamond, UV-induced fragmentation of Cajal bodies, *J. Cell Biol.* 175 (2006) 401–413.
- [70] F.-T. Chen, C.-M. Yang, C.-H. Yang, The protective effects of the proteasome inhibitor bortezomib (Velcade) on ischemia-reperfusion injury in the rat retina, *PLoS One* 8 (2013) e64262.
- [71] I. Casafont, A. Palanca, V. Lafarga, M.T. Berciano, M. Lafarga, 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.* 122 (2011) 481–493.
- [72] J. Steffen, M. Seeger, A. Koch, E. Krüger, Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop, *Mol. Cell* 40 (2010) 147–158.

