

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



**“ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SKI EN
NUCLÉOLOS Y REGIONES NOR EN CÉLULAS HUMANAS”**

DAVID ANDRÉS CARRERO ZAPATA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN GENÉTICA

Director de Tesis: Prof. Dra. Katherine Marcelain Cubillos

2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

DAVID ANDRÉS CARRERO ZAPATA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Genética en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 15 de Diciembre de 2015.

**Prof. Dra. Katherine Marcelain Cubillos
Director(a) de Tesis
ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Laura Walker

Prof. Dr. Patricio Olguín

Prof. Dr. Sergio Flores

**Prof. Dra. Soledad Berríos
Presidente Comisión**

AGRADECIMIENTOS

Después de un largo y arduo trabajo, existen personas que nos marcan enseñándonos a crecer personal y académicamente. Quiero agradecer a todas las personas que han formado parte de esta etapa contribuyendo al desarrollo de la tesis.

En primera instancia quisiera agradecer a toda mi familia, mis padres, hermano, abuelos y tíos. A mis padres por su apoyo incondicional y fundamental, sus consejos han sido importantes en mi formación para ser una persona perseverante y resiliente. También quisiera agradecer a mis amigos que siempre han estado apoyándome, en buenos y malos momentos, un gran abrazo para todos ellos en la ciudad de La Serena.

En particular quisiera agradecer al equipo de trabajo que me acompañó directamente durante el desarrollo de la tesis, aportando tanto conocimiento teórico como experimental:

Dra. Katherine Marcelain

Bq. Víctor Pola

Bq. Claudio Cappelli

Tm. Marisel González

Debo agradecer de manera especial y sincera a mi tutora Dra. Katherine Marcelain por aceptarme para realizar esta tesis de magister bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. A la comisión de tesis: Dra. Laura Walker, Dra. Soledad Berríos, Dr. Sergio Flores y Dr. Patricio Olguín, por sus observaciones y aportes para mejorar la integridad de la presente investigación. Muchas Gracias.

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular y Genómica del Cáncer del Programa de Genética Humana del Instituto de Ciencias Biomédicas. Las fuentes de financiamiento fueron el proyecto FONDECYT regular #1151435.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	5
3.1. Proteína Ski	5
3.1.1. Ski durante mitosis	7
3.2. Nucléolos y Regiones NOR	12
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
5.1. Objetivo General	19
5.2. Objetivos Específicos	19
6. Materiales y Métodos	20
6.1. Cultivos celulares	20
6.2. Inmunofluorescencia indirecta	21
6.3. Inmunofluorescencia indirecta sobre placas metafásicas	21
6.4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP - PCR)	22
6.5. Partidores	24
6.6. Microscopia	25
6.7. Análisis Estadístico	25
7. Resultados	26
7.1. Distribución de Ski en distintos tipos celulares humanos	26
7.2. Distribución cromosómica de Ski en distintos tipos celulares humanos	31
7.3. Colocalización de Ski con UBF en cromosomas mitóticos	34
7.4. Ubicación de Ski en los promotores de los genes ribosomales	41
8. Discusión	44
8.1. Distribución de la proteína Ski durante interfase en distintos tipos celulares	44
8.2. Distribución de la proteína Ski durante mitosis en línea celular MCF7	47

9. Conclusión	53
10. Bibliografía	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

- Figura 1.** *Ski recluta y deposita un complejo de represión en las secuencias reguladoras de un gen de respuesta a Smads.*_____ **6**
- Figura 2.** *Anomalías en la segregación cromosómica en MEF Ski-/-.* _____ **8**
- Figura 3.** *Ski se ubica en regiones pericentroméricas en algunos cromosomas de MEF.*_____ **8**
- Figura 4.** *Ski se ubica en centrosomas y huso mitótico en células humanas transformadas.*_____ **9**
- Figura 5.** *Ski se ubica en centrosomas y huso mitótico en células humanas no transformadas.*_____ **10**
- Figura 6.** *Ski se ubica en cromosomas acrocéntricos en línea celular MRC5.* **11**
- Figura 7.** *Regiones NOR en cromosomas nucleolares.*_____ **12**
- Figura 8.** *Subregiones del nucléolo.*_____ **13**
- Figura 9.** *Estructura del gen ribosomal humano.*_____ **14**
- Figura 10.** *Factores de transcripción de la ARN Polimerasa I.*_____ **16**
- Figura 11.** *UBF se asocia a regiones NOR cuyos genes ribosomales estaban transcripcionalmente activos en la interfase previa.*_____ **17**

Materiales y Métodos

- Figura 12.** *Amplificación del promotor del gen ribosomal.*_____ **24**

Resultados

- Figura 13.** *Distribución de Ski en núcleos de células MRC5.*_____ **27**
- Figura 14.** *Distribución de Ski en núcleos en cultivo primario de fibroblastos humanos.*_____ **28**
- Figura 15.** *Distribución de Ski en núcleos de la línea celular MCF7.*_____ **29**
- Figura 16.** *Cuantificación de patrones de distribución de Ski en tipos celulares humanos.*_____ **30**

Figura 17. <i>Comparación de la distribución de Ski en los tres modelos celulares estudiados.</i>	31
Figura 18. <i>Ski se asocia a cromosomas en tres tipos celulares humanos.</i>	32
Figura 19. <i>Ski se asocia a cromosomas acrocéntricos en tres tipos celulares humanos.</i>	33
Figura 20. <i>Ski colocaliza y no con UBF en cromosomas acrocéntricos en línea celular MCF7.</i>	34
Figura 21. <i>Cromosomas acrocéntricos colocalizados y no-colocalizados con Ski y UBF en línea celular MCF7.</i>	35
Figura 22. <i>Cuantificación de cromosomas que contienen Ski y UBF en placas metafásicas en la línea celular MCF7.</i>	36
Figura 23. <i>Cuantificación de cromosomas que presentan colocalización Ski-UBF (señal) en placas metafásicas en la línea celular MCF7.</i>	37
Figura 24. <i>Cuantificación total de cromosomas que presentan Ski, UBF y colocalización en placas metafásicas células MCF7.</i>	38
Figura 25. <i>Distribución de Ski en cromosomas en la línea celular MCF7.</i>	38
Figura 26. <i>Distribución de Ski en placas metafásicas en la línea celular MCF7</i>	40
Figura 27. <i>Ski no se ubica en promotores de genes ribosomales en células MCF7 asincrónicas.</i>	42
Figura 28. <i>Ski se ubica en promotores del gen ribosomal en células mitóticas en la línea celular MCF7.</i>	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. *Partidores del promotor del gen ribosomal.*_____ **24**

Tabla 2. *Cantidad de cromosomas con presencia/ausencia de Ski (observados y esperados)*_____ **40**

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNr	Gen Ribosomal.
ARN Pol I	ARN Polimerasa I.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNr	ARN Ribosomal.
CDK	Quinasa dependiente de ciclina.
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina.
CP	Núcleo del promotor.
DFC	Centros Fibrilares Densos.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medio de cultivo).
DNMT	ADN Metiltransferasa.
ETS	Espaciador Transcrito Externo.
FBS	Suero bovino fetal.
FC	Centros Fibrilares.
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente.
GC	Componente Granular.
HDACs	Histona desacetilasa.
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta.
IgG	Inmunoglobulina G.
IP	Inmunoprecipitación.
ITS	Espaciador Transcrito Interno.
KCM	Medio potásico para cromosomas.
MeCP	Proteína de unión a metil-citosinas.
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón.
MEM	Minimun Modified Eagle Medium (Medio de cultivo).
N-COR	Co-represor de receptor nuclear.
NOR	Región organizadora de nucléolo.
NoRC	Complejo de remodelamiento nucleolar.
NTC	No template control (control negativo qPCR).

P53	Proteína P53.
PBS	Tapón de fosfato salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Tiempo real).
Rb	Proteína Retinoblastoma.
RNPs	Ribonucleoproteínas.
SBE	Elementos de unión a SMAD.
Ski	Sloan Kettering Institute (Proteína).
SL1	Selectivity Factor 1 (Proteína).
snoRNPs	Ribonucleoproteínas nucleolares.
snRNPs	Ribonucleoproteínas nucleares.
TA	Temperatura ambiente.
TAFs	Factores asociados a TBP (Proteína).
TBP	Proteína de unión a caja TATA (Proteína).
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante Beta.
TIF	Factor inicio de la transcripción.
TTF-I	Factor de terminación de la transcripción (Proteína).
UBF	Upstream Binding Factor (Proteína).
UCE	Elemento control río arriba.

1. RESUMEN

Ski es una proteína que actúa principalmente como co-represor transcripcional, regulando negativamente la expresión de genes de respuesta en numerosas vías de señalización, incluyendo la vía de TGF- β . En los promotores de los genes blancos, Ski actúa como una proteína de andamio que permite el reclutamiento de enzimas modificadoras de la cromatina, como las desacetilasas de histonas (HDACs) y metiltransferasas de ADN. Los niveles de la proteína Ski varían en el ciclo celular, encontrándose más altos durante mitosis, sin embargo poco se conoce acerca del funcionamiento de la proteína durante esta etapa. No obstante, los antecedentes disponibles indican que Ski sería necesaria para la correcta segregación cromosómica. Es así como, Fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) nulos para el gen Ski, presentan defectos en la segregación de los cromosomas durante mitosis. Al realizar un análisis detallado de la ubicación de Ski, se encontró que esta proteína se encuentra ubicada en regiones pericentroméricas en un número limitado de cromosomas, por lo que se planteó que existiría una relación funcional entre la localización de Ski en estas regiones y la segregación cromosómica. Debido a la semejanza funcional de las regiones pericentroméricas entre ratón y humano, se decidió observar si en células humanas Ski ocupa la misma localización. Se utilizó una línea de fibroblastos no transformados MRC5, en la cual se encontró la proteína Ski en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. En humanos, en estos cromosomas se ubican las regiones organizadoras del nucléolo (regiones NOR), las cuales corresponden a genes ribosomales y parte de su maquinaria transcripcional.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la ubicación y posible asociación de Ski con la maquinaria transcripcional de los genes ribosomales en distintos tipos celulares humanos. Se evaluaron dos cultivos celulares de fibroblastos no transformados (línea celular MRC5 y un cultivo primario) y una línea celular epitelial transformada (MCF7). Para establecer la distribución de la proteína Ski con respecto al nucléolo, se realizó inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar Ski en conjunto con el factor transcripcional UBF en núcleos interfásicos. Adicionalmente, se realizó

IFI sobre placas metafásicas y se determinó si Ski se localiza en los cromosomas acrocéntricos. Debido a la dificultad técnica de obtener placas metafásicas en los fibroblastos no transformados, la relación y cuantificación entre Ski y UBF en cromosomas acrocéntricos, se determinó sólo en la línea celular MCF7. Finalmente, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), se evaluó si Ski ocupa los promotores de los genes ribosomales en células asincrónicas y mitóticas en la línea celular MCF7.

Encontramos que durante interfase, Ski se distribuye en dos patrones en el núcleo celular, colocalizando con nucléolos (con uno o más nucléolos) o no colocalizando con los nucléolos (ausente de todos los nucléolos). En los cultivos de fibroblastos, un 44,5% de los núcleos mostró Ski localizado con los nucléolos, mientras que en un 55,5% no se encontró en los nucléolos. Por otro lado, en el 100% de las células MCF7, Ski no colocalizó con ningún nucléolo. En mitosis, Ski se encontró localizado tanto en cromosomas acrocéntricos como en cromosomas no acrocéntricos, siendo la localización en los primeros independiente de la presencia de UBF. Finalmente, los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina indicaron que Ski se encontraría ocupando los promotores de los genes ribosomales sólo durante mitosis. Estos resultados sugieren un posible rol de Ski en la regulación de los genes ribosomales en las regiones NOR durante mitosis. Dadas las funciones descritas para esta proteína, es posible proponer que Ski sería necesaria para regular transcripcionalmente estas regiones, controlando la expresión de los genes ribosomales posterior a la mitosis. Futuros análisis se necesitan para evaluar esta hipótesis.

2. ABSTRACT

Ski protein acts mainly as a transcriptional co-repressor, repressing gene expression in numerous signaling pathways, including TGF- β . Ski acts as a scaffold protein that allows the recruitment of chromatin-remodeling enzymes, such as histone deacetylases (HDACs) and DNA methyltransferases, to the promoters of target genes. Ski expression varies through cell cycle reaching the highest levels during mitosis, however little is known about the functioning of the protein during this stage. Nevertheless, the available data indicate that Ski would be required for proper chromosome segregation. Ski-null mouse embryonic fibroblasts (MEF), display defective chromosomes segregation during mitosis. Ski is located at the pericentromeric regions of a limited number of chromosomes, suggesting a functional relationship between the location of Ski in these regions and chromosome segregation. Because of the functional similarity of the pericentromeric regions between mouse and human, it was decided to assess if Ski occupies the same location in human cells. Thus, we evaluated localization of Ski in a non-transformed human fibroblast cell line (MRC5). In this cells, the protein was found at the pericentromeric regions of acrocentric chromosomes. In humans, these type of chromosomes, contain nucleolus organizer regions (NOR regions), corresponding to ribosomal genes and the associated transcriptional machinery.

In this study, we evaluated the localization of Ski and its possible association with the transcriptional machinery of ribosomal genes in different human cell types. We assessed two non-transformed fibroblasts (MRC5 cell line and a primary culture) and a transformed epithelial cell line (MCF7). To establish Ski distribution regarding to nucleolus, we performed indirect immunofluorescence (IFI) for detection of Ski and transcriptional factor UBF in interphase nuclei. Additionally, when IFI were performed on metaphase spreads, localization of Ski at acrocentric chromosomes was evidenced. Colocalization of Ski and UBF at acrocentric chromosomes was determined in MCF7 cells. Finally, by chromatin immunoprecipitation assays (ChIP), we assessed whether Ski occupied ribosomal genes promoters in asynchronous and mitotic MCF7 cells.

We found that during interphase, Ski shows two distinct patterns: Ski colocalization with one or more nucleoli or Ski absent in all nucleoli. In fibroblast lineage, 44.5% of nuclei had Ski localized in nucleoli, while in 55.5%, the protein was not found in the nucleoli. On the other hand, in 100% of MCF7 cells, Ski was not colocalized in the nucleoli. During mitosis, Ski was found in acrocentric and non-acrocentric chromosomes in MCF7 cells. In acrocentric chromosomes, Ski localization was independent of the presence of UBF. Finally, chromatin immunoprecipitation assays showed that Ski is occupying the promoters of the ribosomal genes only during mitosis. Given the functions described for Ski, it is possible to propose that this protein would be needed to maintain epigenetic information in these regions, controlling expression of ribosomal genes in the following interphase. Further analyses are needed to evaluate this hypothesis.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Proteína Ski.

La proteína Ski fue identificada por primera vez en el Sloan-Kettering Institute (New York, USA) a partir de una serie de retrovirus capaces de inducir la transformación de fibroblastos embrionarios de pollo [1]. En seres humanos, el gen *SKI* codifica para una proteína de 728 aminoácidos que participa de procesos fundamentales como: la diferenciación celular de los linajes neuronales *in vitro* [2], hematopoyético *in vitro* [3] y musculares *in vivo* [4].

Durante el desarrollo embrionario Ski tiene funciones críticas, principalmente vinculadas en el desarrollo del sistema nervioso y muscular [5]. Alteraciones de Ski en mamíferos producen disminución de la masa del músculo esquelético [6] y pérdida de mielina en las neuronas debido a alteraciones en las células de Schwann [7]. En adultos, la expresión de Ski se altera durante procesos fisiopatológicos, como la regeneración del hígado [8] y el cierre de heridas [9].

La proteína Ski presenta una señal de localización nuclear [10], por lo que presenta una distribución nuclear donde actúa como un co-represor transcripcional. Ski posee muchos dominios estructurales que median la unión proteína-proteína [11,12], sin embargo, carece de dominios de unión al ADN y de actividad enzimática propia [5]. La presencia de estos múltiples dominios de interacción con proteínas define la función de Ski como proteína de andamiaje, favoreciendo la interacción con factores de transcripción y de maquinaria represora asociados a ciertos promotores [5]. Ski interactúa con un gran número de proteínas, como los factores de transcripción de la familia Smad [13], factores de remodelamiento de cromatina como la histona desacetilasa 1 (HDAC1) [14] y reguladores del ciclo celular como el supresor tumoral p53 [15] y la proteína retinoblastoma (Rb) [16].

El modelo más estudiado donde participa Ski es en la vía de señalización “Factor de crecimiento transformante beta” (TGF- β), actuando como un regulador negativo de la expresión génica. En esta vía, Ski se une a complejos heteroméricos activos de Smad 2/3/4 reprimiendo su habilidad para activar genes blancos de TGF- β [17]. La **Figura. 1** muestra un esquema que ilustra la interacción de Ski con el complejo Smad, el cual se asocia a los promotores de distintos genes de respuesta a TGF- β que poseen la secuencia “*Smad Binding Element*” (SBE). La presencia de Ski en este complejo es necesaria para el reclutamiento de SIN3A y N-CoR [13], favoreciendo el silenciamiento génico de los genes blancos. De esta forma, mediante la regulación de la vía TGF- β , Ski participa en distintos procesos, como: regulación del ciclo celular, diferenciación, transformación y progresión tumoral [18].

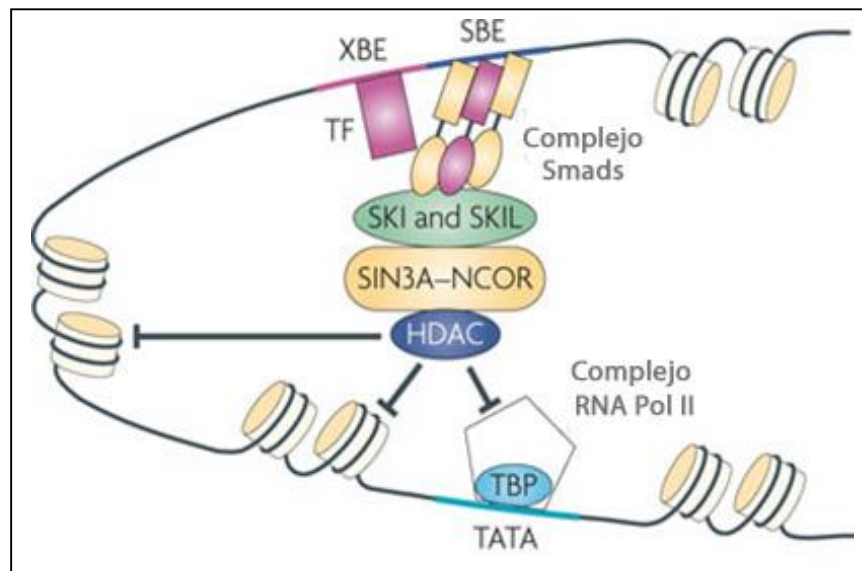


Figura 1. Ski recluta y deposita un complejo de represión en las secuencias reguladoras de un gen de respuesta a Smads. Imagen ilustrativa del mecanismo de acción mejor estudiado de la proteína Ski (Vía de señalización TGF- β). **Abreviaciones:** HDAC: “*Histone Desacetylase*”; NCOR: “*Nuclear-receptor-co-repressor*”; SIN3A: “*Paired amphipathic helix protein Sin3a*”; Ski: “*Sloan Kettering Institute*”; SKIL: “*Ski like protein*”; TBP: “*TATA binding protein*”; SBE: “*Smad Binding Element*”; XBE: “*Rex-Binding Element*”. Adaptada de [67].

Tanto la sobreexpresión como la disminución de Ski han sido asociadas al desarrollo de diversos tipos de tumores, incluyendo cáncer de mama [19], esófago [20], páncreas [21] y melanoma [22]. En células de ratón, alteraciones en la expresión normal de Ski da lugar a aneuploidía [23], que es una de las manifestaciones más frecuentes de la inestabilidad cromosómica en los tumores y está estrechamente asociado con la progresión del cáncer y el mal pronóstico del mismo [24].

3.1.1. Ski durante mitosis.

Los niveles de la proteína Ski varían a través del ciclo celular, manteniéndose en niveles bajos durante G1/S y aumentando progresivamente su expresión hacia G2, para alcanzar los niveles más altos en mitosis [25]. La regulación de la proteína Ski se realiza por medio de degradación proteosomal dependiente de ubiquitinación [26], sin embargo durante mitosis se ha observado un aumento de la fosforilación de Ski mediado por el complejo CDK1-Ciclina B, contribuyendo a la estabilización de la proteína para protegerla de la degradación [27].

La acumulación y fosforilación de Ski durante mitosis sugieren que esta proteína participaría activamente en el proceso mitótico. Es por esto que en resultados previos de laboratorio se investigó la ausencia de Ski en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) nulos para el gen Ski (Ski -/-). Las células presentan altos niveles de inestabilidad cromosómica debido a fallas en la segregación de los cromosomas, esto es manifestado por la presencia de puentes intercromosómicos y micronúcleos [23] (**Figura. 2**).

Debido a la inestabilidad cromosómica que produce la falta de Ski en MEF, se decidió realizar un análisis detallado de la ubicación de la proteína durante mitosis. Mediante inmunofluorescencia en placas metafásicas se observó que la proteína se ubica en forma punteada y simétrica en ambas cromátidas hermanas del cromosoma mitótico (datos de laboratorio no publicados) (**Figura. 3**).

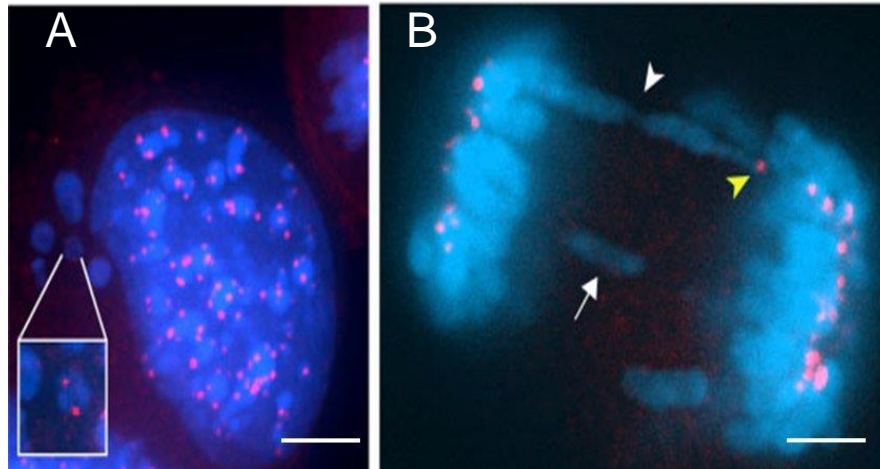


Figura 2. Anomalías en la segregación cromosómica en MEF $Ski^{-/-}$. Inmunofluorescencia indirecta en células MEFs $Ski^{-/-}$, se marcaron los centrómeros con un anticuerpo Anti-CREST (rojo) que indica centrómero y el ADN con el reactivo Hoechst (azul). **(A)** Ampliación de un micronúcleo con una doble marca de CREST **(B)** Anafase con anomalías en la segregación. La cabeza de flecha blanca indica un puente intercromosómico, la cabeza de flecha amarilla un centrómero del cromosoma involucrado en el puente y la flecha blanca un cromosoma rezagado. Escala $2\mu m$. Tomada de [23].

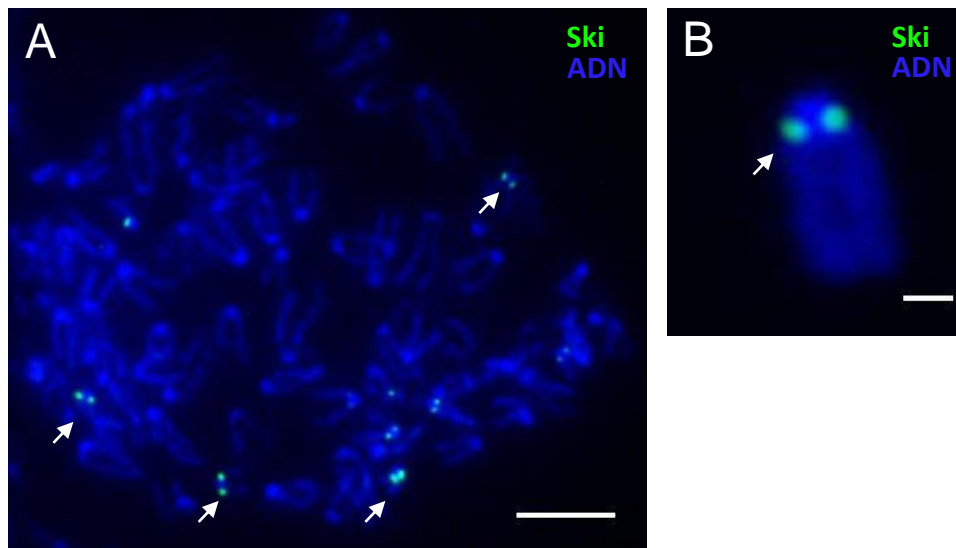


Figura 3. Ski se ubica en regiones pericentroméricas en algunos cromosomas de MEF. Inmunofluorescencia indirecta sobre placas metafásicas en células MEFs Ski^{+} , se detectó la proteína Ski (verde) y DAPI para teñir el ADN. **(A)** Placa metafásica en donde se observa Ski en cromosomas mitóticos. Escala $5\mu m$ **(B)** Ampliación de un cromosoma en donde se ubica Ski. Escala $0,5\mu m$ Las flechas blancas indican la presencia de Ski en las regiones pericentroméricas. (Datos no publicados)

Aunque las secuencias de las regiones pericentroméricas de ratón difieren de las que se registran en humanos [28,29], funcionalmente son muy similares entre sí. En ambas especies las regiones pericentroméricas conforman estructuras tridimensionales esenciales para la correcta compactación de los cromosomas y actúan como sitio de unión de cohesinas permitiendo la cohesión de las cromátidas hermanas [30]. Fallas en la compactación y estructuración de estas regiones, ha sido relacionada con aberraciones en la segregación de los cromosomas [31]. Debido a la similitud funcional entre ambos modelos celulares (ratón y humano), se estima que Ski está presente en la misma ubicación en células humanas.

Con respecto a la localización mitótica de Ski en células humanas, se ha observado que en líneas celulares humanas derivadas de tumores (líneas celulares U2OS y HeLa), la proteína se localiza en centrosomas y en el huso mitótico (Figura 4). En este aspecto, Ski podría jugar un rol importante en la coordinación de procesos celulares en estos lugares [27].

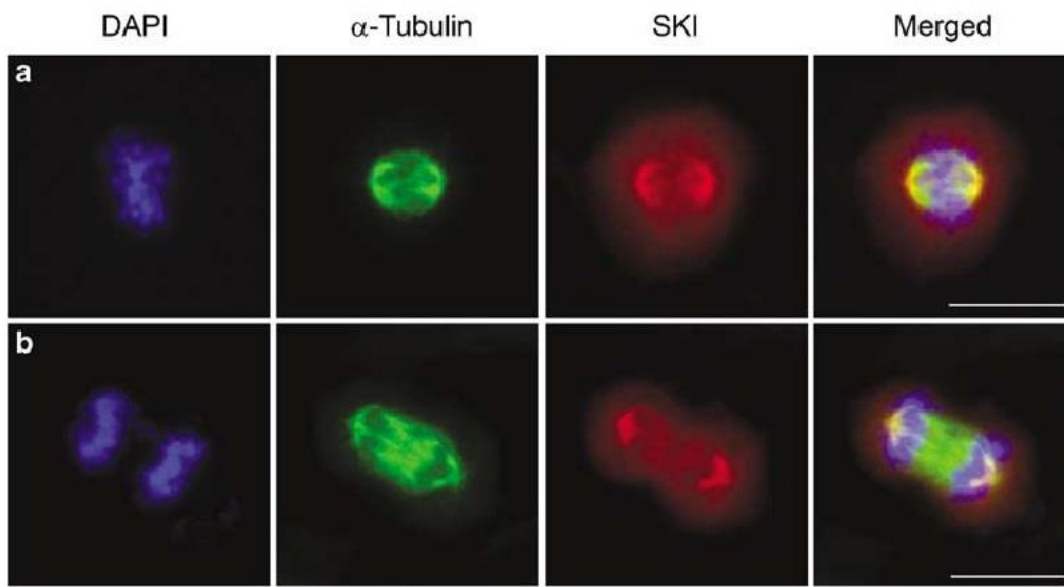


Figura 4. Ski se ubica en centrosomas y huso mitótico en células humanas transformadas. Inmunofluorescencia indirecta en células U2OS, se detectó la proteína Ski (rojo), tubulina (verde) y DAPI para teñir el ADN. **(A)** Células en metafase y **(B)** células en anafase. Escala 10 μ m. Tomada y modificada de [27].

Para identificar a los cromosomas que llevan Ski, se decidió ocupar la línea celular no transformada de fibroblastos (MRC5), debido a que es un linaje análogo a los fibroblastos embrionarios de ratón y además por presentar un genoma diploide en donde los cromosomas pueden ser identificados según su morfología, a diferencia de los cromosomas de ratón que todos presentan morfología telocéntrica/acrocéntrica [32]. Al evaluar la ubicación de Ski por inmunofluorescencia indirecta en MRC5, la proteína se distribuye de la misma forma que en las líneas celulares humanas derivadas de tumores, enriqueciéndose en los centrosomas y en el huso mitótico (Figura. 5).

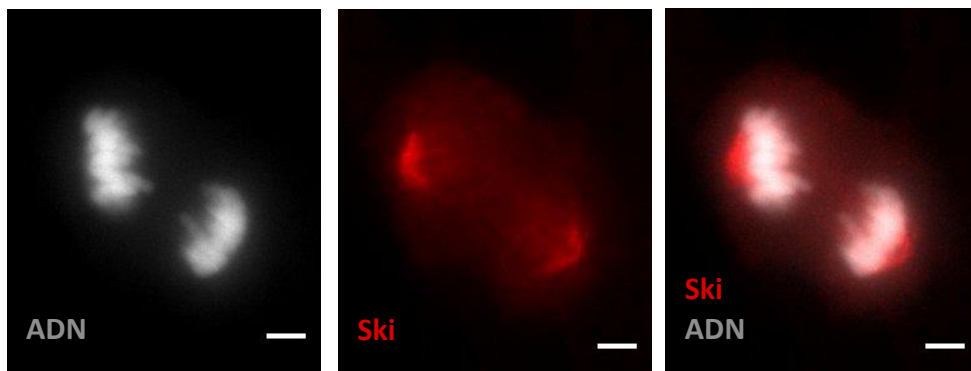


Figura 5. Ski se ubica en centrosomas y huso mitótico en células humanas no transformadas. Inmunofluorescencia indirecta en células MRC5, se detectó la proteína Ski (rojo), y DAPI para teñir el ADN. Escala 2 μ m. (Datos no publicados)

Al tratar las células MRC5 con drogas que inhiben la formación del huso mitótico, como nocodazol o colcemid, se pudo evidenciar que la proteína Ski se ubica en los brazos cortos de un número limitado de cromosomas. Al impedir la polimerización de tubulina, permite que la señal de Ski proveniente del huso mitótico no enmascare la señal proveniente de los cromosomas. Los cromosomas identificados corresponden sólo a cromosomas acrocéntricos o subtlocéntricos [33] (Figura. 6). En seres humanos, estos cromosomas comparten la característica que en dichas regiones se albergan regiones organizadoras del nucléolo (regiones NOR), las cuales corresponden a secuencias repetitivas de genes ribosomales [34].

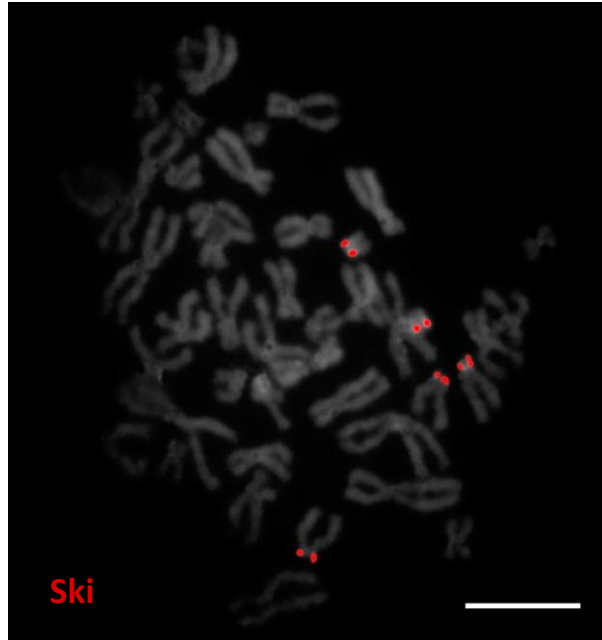


Figura 6. Ski se ubica en cromosomas acrocéntricos en línea celular MRC5. Inmunofluorescencia indirecta sobre placas metafásicas en células MRC5, se detectó la proteína Ski (rojo) y DAPI para teñir el ADN. Escala 5µm. Tesis de MSc. David Carrero (No publicado).

Las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia indirecta en placas metafásicas indican que posiblemente la proteína Ski se encuentre asociada a regiones NOR en células humanas. En estas regiones, existe un conjunto de proteínas que permanecen asociadas a las regiones NOR durante mitosis, las cuales corresponden a maquinaria transcripcional de los genes ribosomales.

Estas proteínas se pueden visualizar mediante el uso de técnicas citogenéticas como la tinción AgNOR, en donde al tratar las placas metafásicas con una solución de plata, se pueden observar las proteínas en algunos cromosomas nucleolares debido a las propiedades argentofílicas de las mismas [35]. Por lo cual, si la proteína Ski ocupa las regiones NOR en células humanas, es posible que este asociada a estas proteínas interviniendo en la represión transcripcional de los genes ribosomales.

3.2. Regiones NOR y Nucléolos.

Las zonas organizadoras de nucléolo (Regiones NOR), son genes ribosomales repetidos en tándem, los cuales durante mitosis se pueden observar en zonas restringidas en ciertos cromosomas debido a la compactación de la cromatina [36]. Tales agrupaciones de genes ribosomales se pueden identificar y en la especie humana se encuentran ubicados en cinco pares de cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22 [34], los cuales se denominan cromosomas nucleolares (**Figura. 7**).

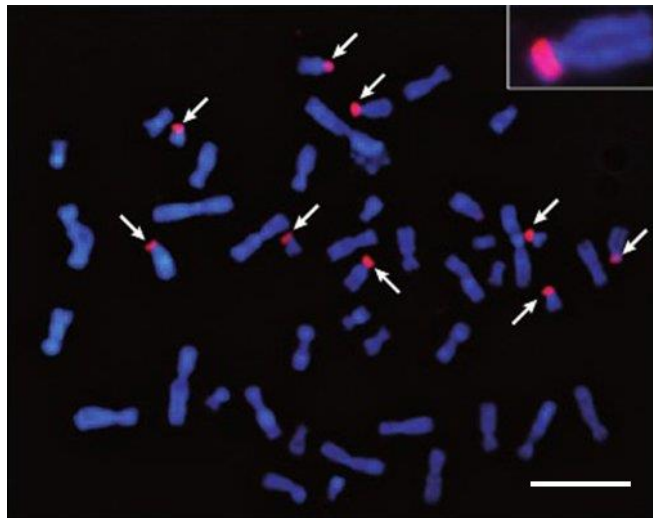


Figura 7. Regiones NOR en cromosomas nucleolares. FISH sobre linfocitos humanos (varón). Cromosomas fueron teñidos con DAPI y se utilizó una sonda dirigida contra las repeticiones intergénicas del gen ribosomal, para identificar las regiones NOR en los cromosomas nucleolares (indicado por las flechas blancas). Escala 5µm. Tomada y modificada de [34].

Al comienzo de interfase, los genes ribosomales comienzan a ser transcritos formando los nucléolos [37]. Durante este proceso ocurre la transcripción de ARN ribosomal y toma lugar la biogénesis de los ribosomas [38]. Mientras el nucléolo se encuentra activo, ocurren los diferentes pasos que terminarán en la formación de las dos subunidades del ribosoma, estos pasos se agrupan en: transcripción de los genes ribosomales (ADNr), procesamiento del ARN ribosomal (ARNr) y el ensamblaje de estos últimos con proteínas ribosomales para así conformar las subunidad menor y mayor del ribosoma [38].

Actualmente el nucléolo es considerado como un dominio multifuncional, ya que existen funciones extra-ribosomales como: el control de la proliferación celular, detección del estrés y vías de supervivencia tumorales, apoptosis, formación de telómeros y ciclo de vida viral, etc. [39]

La observación del nucléolo a través de microscopía electrónica ha mostrado que este se subdivide en regiones, las que se relacionan con los procesos presentes en la biogénesis ribosomal [40]. El nucléolo se divide en tres regiones observables y corresponden a los centros fibrilares (FCs) [41], componentes fibrilares densos (DFCs) [42] y el componente granular (GC) [43] (Figura. 8). La transcripción de los genes ribosomales ocurre ampliamente en el límite entre el centro fibrilar y los componentes fibrilares densos [34]. El procesamiento y modificación de los transcritos de pre-ARNr ocurre en los DFC, donde las ribonucleoproteínas (RNPs) se acumulan, mientras que finalmente, una mayor cantidad de proteínas se concentra en la región GC, donde las unidades ribosomales son ensambladas [44].

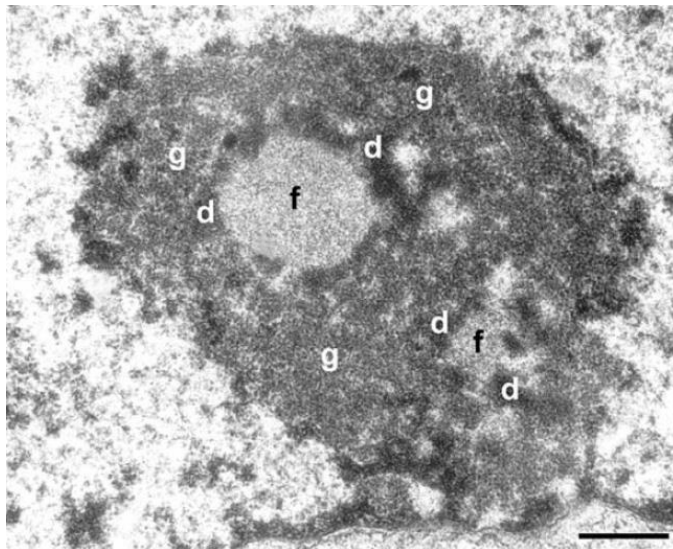


Figura 8. Subregiones del nucléolo. Fotografía electrónica de un nucléolo de mamífero (ratón). (f), (d) y (g) corresponden a componente fibrilar (FC), componente fibrilar denso (DFC) y componente granular (GC), respectivamente. Escala 0,5 μ m. Tomada y modificada de [36].

Las células somáticas en eucariontes contienen cientos de genes ribosomales dependiendo de la especie estudiada [45], por ejemplo, las células humanas diploides contienen aproximadamente 400 genes ribosomales organizados en tándem en los cromosomas nucleolares [36]. Cada gen ribosomal consiste en una secuencia que se transcribe y un espaciador intergénico que no se transcribe [34], la estructura del gen ribosomal está señalado en la **Figura. 9**.

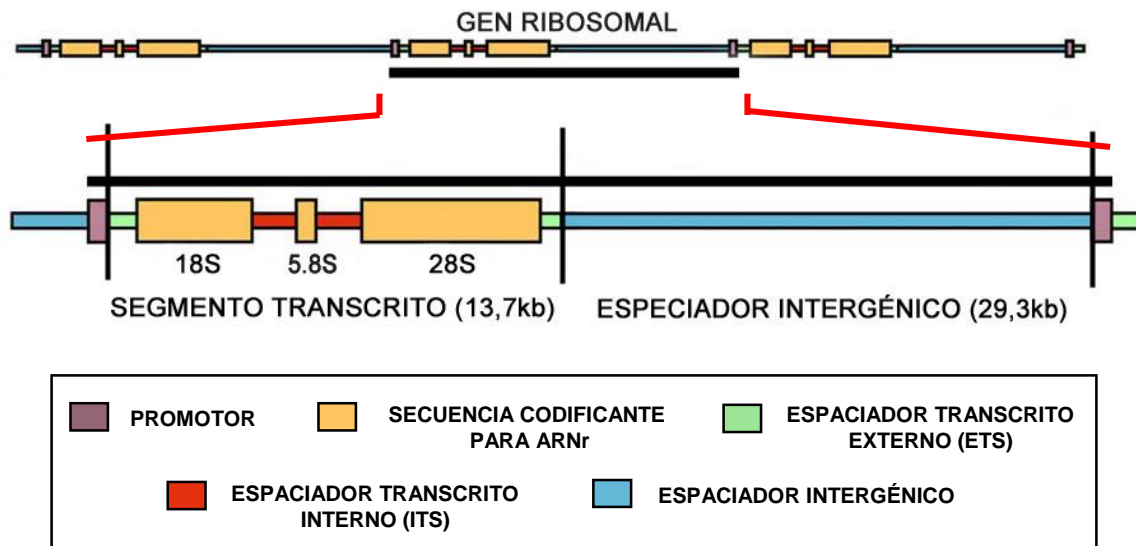


Figura 9. Estructura del gen ribosomal humano. Esquema ilustrativo del gen ribosomal humano. Tomada y modificada de [36].

Los segmentos codificantes son transcritos en conjunto con los espaciadores internos y externos (ITS y ETS), este transcrito (pre-ARNr) es extensamente modificado por ribonucleoproteínas nucleolares y nucleares pequeñas (snoRNPs & snRNPs) [38], las cuales modifican químicamente el transcrito, principalmente mediante metilaciones en el oxígeno 2' y pseudouridinas [46], las cuales son necesarias para el ensamblaje de las subunidades. Finalmente el transcrito modificado es cortado mediante actividad endo y exonucleasa para liberar los ARNr 18S, 5.8S y 28S [47]. Estos ARNr, en conjunto con proteínas ribosomales y el transcrito de ARNr 5S, el cual tiene origen extranucleolar [48], formarán parte de las subunidades mayor y menor de los ribosomas, siendo transportados al citoplasma para que puedan realizar la síntesis de polipéptidos a partir del ARN mensajero [34].

A diferencia de los genes que codifican para proteínas, la transcripción de los genes ribosomales se realiza por medio de la enzima ARN Polimerasa I (ARN Pol I) [49]. La transcripción del gen ribosomal es controlado por secuencias específicas del ADN y factores de transcripción los cuales pueden interactuar específicamente con estas secuencias de ADN, estas secuencias corresponden a tres regiones importantes: promotores, potenciadores y terminadores [46].

El promotor del gen ribosomal se caracteriza por tener dos regiones, el núcleo del promotor “*Core Promoter/Core Region*” (CP), el cual reside aproximadamente entre + 10 and -40 con respecto al inicio de la transcripción [50] y el Elemento Control “*Upstream Control Element*” (UCE), ambos interactúan con factores de transcripción para el inicio de la transcripción, principalmente con el factor transcripcional UBF “*Upstream Binding Factor*” [51]. Las secuencias potenciadoras se han descrito preferentemente en *Xenopus* [52] y roedores [53], en seres humanos es escasa la información, sin embargo se han encontrado secuencias en el espaciador intergénico del gen ribosomal [54]. Estos elementos pueden estimular la transcripción y generalmente funcionan interactuando con factores transcripcionales a distancia del promotor [50]. Por último, las secuencias terminadoras consisten en secuencias de 18 pares de bases las cuales son llamadas “*Sal Boxes*” en roedores y humanos [50], y son reconocidas por el Factor de Terminación de la Transcripción para Pol I (TTF-I) permitiendo el término de la transcripción ribosomal [55].

Los factores de transcripción de la ARN polimerasa I se observan en la **Figura 10**, siendo el más estudiado el factor transcripcional UBF. La maquinaria de transcripción mínima necesaria para la transcripción de los genes ribosomales está formada por el complejo ARN polimerasa I y factores de transcripción específicos como UBF y SL1 (Selectivity factor 1), esta última constituida por TBP (TATA Binding Protein) y tres proteínas asociadas a TBP (Complejo TAFs) [50].

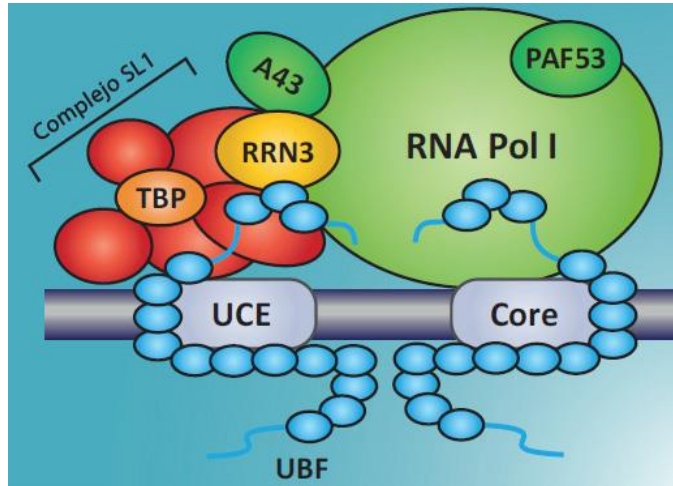


Figura 10. Factores de transcripción de la ARN Polimerasa I. Esquema ilustrativo de los factores de transcripción que intervienen en el reclutamiento de ARN Polimerasa I. **Abreviaciones:** UBF: “Upstream Binding Factor”; SL1: “Selective Factor 1” TBP: “TATA Binding Protein”; RRN3: “RNA polymerase I-specific transcription initiation factor”; A43: “A43 RNA Pol I Subunit”; PAF53: “Pol I-associated Factor” ; UCE: “Upstream Control Element”; Core: “Core Region Promoter”. Tomada y adaptada [64].

La proteína UBF posee 764 aminoácidos y es considerado un factor transcripcional esencial para la transcripción de los genes ribosomales. UBF es el primer factor transcripcional que se une al promotor de los genes ribosomales y activa la transcripción mediada por la ARN polimerasa I a través de interacciones cooperativas con el factor de transcripción SL1/TIF-IB [56], lo cual es esencial para el acoplamiento de la ARN polimerasa I. UBF contiene múltiples sitios de fosforilación que están dispersos a lo largo de la proteína, con varios de estos sitios agrupados en el extremo C-terminal [57].

En estudios recientes se ha mostrado que la activación de la transcripción de ADNr es mediada por la fosforilación secuencial de UBF [58] [59]. El evento inicial es la fosforilación de UBF, la cual ocurre en la serina-484 y está mediada por los complejos kinasa dependiente de ciclina específicos para G1 [58]. Después de la progresión por G1, UBF es fosforilado en el residuo serina-388 por el compuesto cdk2/ciclina E y A, tanto en ensayos de transfección transitoria y en sistemas

reconstituidos de transcripción *in vitro*. Ambas fosforilaciones son indispensables para la función de transactivación de UBF [59].

La mayor transcripción de los genes ribosomales ocurre entre las fases S y G2 del ciclo celular; luego disminuye al entrar en mitosis y se produce su reactivación al salir de ésta [60]. Al inicio de mitosis, la transcripción de los genes ribosomales cesa, sin embargo en aquellos genes ribosomales que estuvieron transcripcionalmente activos durante interfase, algunas de las proteínas de la maquinaria transcripcional quedan asociadas a estos genes y se pueden identificar en mitosis [61]. En contraste, las regiones NOR cuyos genes ribosomales no presentaron actividad transcripcional en la interfase previa, la maquinaria transcripcional no queda asociada a estos genes por lo cual no participarían en la formación del nuevo nucléolo [39]. En células humanas (HeLa) mitóticas, se ha descrito que UBF es una de las proteínas de la maquinaria transcripcional que permanece en estas regiones NOR previamente activas [62] (Figura. 11).

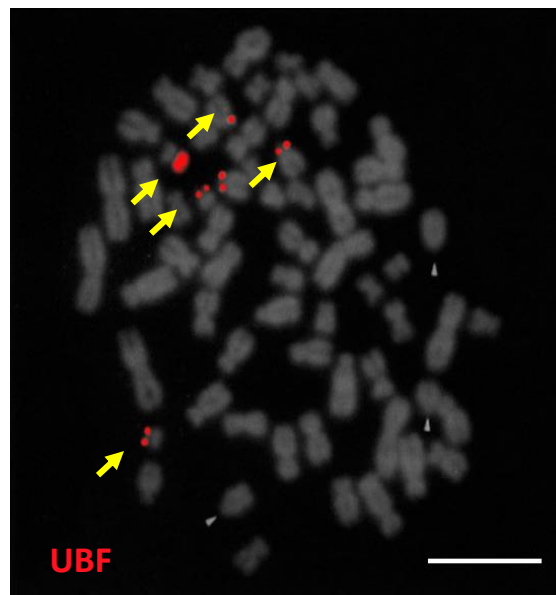


Figura 11. UBF se asocia a regiones NOR cuyos genes ribosomales estaban transcripcionalmente activos en la interfase previa. Inmunofluorescencia indirecta sobre placas metafásicas en células HeLa, se detectó la proteína UBF (rojo) y DAPI para teñir el ADN. Las flechas amarillas indican a UBF. Escala 5µm. Tomada y modificada de [61].

Como se señaló anteriormente, nuestros resultados de laboratorio sugieren que Ski podría localizarse en las regiones NOR en cromosomas acrocéntricos/nucleolares. Esto lleva a proponer la hipótesis que Ski podría estar asociándose a la maquinaria transcripcional de los genes ribosomales que permanece asociada durante mitosis.

Ski al carecer de dominios de unión directa al ADN y al unirse a otras proteínas como factores de transcripción [5], podría establecer una asociación con las proteínas de la maquinaria transcripcional del gen ribosomal. Si bien, existen más proteínas que se ubican en estas zonas, como algunas subunidades de la ARN Pol I [63] y SL1 [61], estimamos que Ski podría estar participando de alguna forma en estos complejos, en donde también participe el factor transcripcional UBF, debido a que es el factor transcripcional esencial que asegura que todo el complejo transcripcional se una a un promotor, uniéndose en primera instancia a la secuencia promotora y reclutando factores transcripcionales adicionales para estabilizar finalmente la unión de la ARN Pol I al promotor [36,64].

4. HIPÓTESIS

Ski se ubica en regiones NOR en cromosomas acrocéntricos en distintos tipos celulares humanos, asociándose al complejo transcripcional de los genes ribosomales en los cromosomas mitóticos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la ubicación de Ski y estudiar su posible asociación con complejos transcripcionales de genes ribosomales en tres tipos celulares humanos durante interfase y mitosis.

5.2 Objetivos Específicos

- 1.- Determinar la presencia o ausencia de Ski en nucléolos durante la interfase y en cromosomas acrocéntricos en mitosis en tres tipos celulares.
- 2.- Evaluar la asociación de la proteína Ski con el factor transcripcional UBF en placas metafásicas en línea celular MCF7.
- 3.- Determinar la presencia de la proteína Ski en promotores de los genes ribosomales durante interfase y mitosis en línea celular MCF7.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Líneas y cultivos celulares

Este estudio se llevó a cabo en la línea celular MRC5 (fibroblastos humanos no transformados), MCF7 (células epiteliales transformadas), y en un cultivo primario de fibroblastos humanos. Estos fueron subcultivados y mantenidos en placas de 60mm, 100mm de diámetro, y en botellas con filtro t-75 a 37°C con 5% CO₂, con sus respectivos medios de cultivo.

La línea celular MRC5 fue mantenida en medio de cultivo MEM (Minimum Modified Eagle Medium), con 10% de suero bovino fetal (FBS), 2mM L-glutamina, 100U/ml de penicilina G, 100 mg/ml de estreptomicina y 1% de aminoácidos no esenciales para MEM. La línea celular MCF7 y el cultivo primario fueron mantenidos en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 100U/ml de penicilina G, 100 mg/ml de estreptomicina.

El cultivo primario se obtuvo de un paciente sano a partir de una muestra de tejido adiposo (luego de la firma del correspondiente consentimiento informado) y fue realizado en el laboratorio de citogenética de la Clínica Las Condes. La muestra fue centrifugada a 1200g durante tres minutos para eliminar eritrocitos y plasma sanguíneo, posteriormente se realizó la incubación con la enzima colagenasa C0130-100MG (Sigma Aldrich) a 37°C durante 30 minutos para separar los fibroblastos de la matriz extracelular. Una vez terminada la incubación se centrifugo durante 10 min a 1,8g para eliminar la fracción lipídica y quedar solamente con la fracción estromal y sanguínea. Luego se adicionó medio de cultivo en estas fracciones y se resuspendió, para posteriormente subcultivarlas en diferentes superficies. Al día siguiente se realizó el cambio de medio de cultivo y se esperó una confluencia de 60% para la amplificación del cultivo primario.

6.2. Inmunofluorescencia indirecta

Las células MRC5, de cultivo primario y MCF7 se subcultivaron sobre cubreobjetos de 12mm para obtener una confluencia final de un 60%. Una vez que las células se adherieron al cubreobjeto (aproximadamente 24 horas), se lavaron dos veces con PBS1x durante 5 minutos, para posteriormente fijarlas con paraformaldehído al 3,7% durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Luego se lavaron tres veces con PBS1x durante 5 minutos. En seguida se realizó la permeabilización con 0,25% tritón x-100 en PBS1x incubándolas por 10 minutos a TA y después se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos con albúmina de suero bovino (BSA) al 2% en PBS1x durante 45 minutos a TA. Se realizó la incubación de los anticuerpos primarios Anti-Ski isotipo conejo H-329 (Santa Cruz) y Anti-UBF isotipo ratón F-9 (Santa Cruz) overnight (18 horas) en una cámara húmeda a 4°C. Los anticuerpos fueron diluidos en BSA 2% y 0,1% tritón x-100 en PBS1x, para Anti-Ski isotipo conejo 1:400 y para UBF isotipo ratón 1:50.

Al día siguiente, se realizaron 6 lavados con PBS1x por 9 minutos y se incubaron con los anticuerpos secundarios: anti-ratón Alexa Fluor 546 isotipo cabra A11003 (Invitrogen) y anti-conejo Alexa Fluor 488 isotipo cabra A11034 (Invitrogen) durante 45 minutos a TA protegidos de la luz, los anticuerpos fueron diluidos en BSA 2% y 0,1% tritón x-100 en PBS1x, ambos a una dilución 1:500. Luego para quitar el excedente del anticuerpo se realizaron 6 lavados con PBS1x por 5 minutos protegidos de la luz. Posteriormente se incubó con DAPI 0,3µg/ml durante 5 minutos, para finalizar agregando el medio de montaje Prolong Gold Antifade Reagent.

6.3. Inmunofluorescencia indirecta sobre placas metafásicas

Las células MRC-5 se subcultivaron en placas de 60mm o 100mm de diámetro para obtener una confluencia final de 70%. Para sincronizar en mitosis se adicionaron 0,1µg/ml de colcemid durante 6 horas. Se realizó "mitotic shake off" en las superficies y el medio de cultivo fue recolectado en un tubo de 15ml el cual se mantuvo en hielo. Posteriormente, las células se centrifugarán a 800rpm a TA y se eliminó el sobrenadante, dejando un volumen residual de aproximadamente 500ul, en donde se

resuspendieron las células. Luego se agregaron 2ml de la solución que produce hipotonía, lentamente por la pared del tubo, la cual se compone de KCl 75mM y 0,1% de tween-20 en agua libre de nucleasas. Finalmente el tubo con células se incubó a 37°C durante 12 minutos.

Transcurrido ese tiempo se resuspenden las células y se agregan 200ul a cada cámara de citocentrifugación. Para la obtención de placas metafásicas se citocentrifugo a 700rpm por 12 minutos para línea celular MCF7 y a 1300rpm por 12 minutos para la línea celular MRC5 y el cultivo primario. Para quitar el excedente de medio hipotónico se lavó por 5 minutos con medio potásico para cromosomas (KCM) sobre los portaobjetos y se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos con BSA 2% y 0,1% tritón en PBS1x por 30 minutos a TA. Posteriormente las placas metafásicas serán incubadas con los anticuerpos primarios Anti-Ski isotipo conejo H-329 (Santa Cruz), Anti-UBF isotipo ratón F-9 (Santa Cruz), durante overnight (18 horas) en una cámara húmeda a 4°C. Los anticuerpos fueron diluidos en BSA 1% y 0,05% tritón x-100 en PBS1x, para ambos anticuerpos se hicieron diluciones de 1:50, 1:100 y 1:200 en diferentes portaobjetos.

Al día siguiente, los portaobjetos fueron lavados con KCM 3 veces por 5 minutos, seguido de la incubación de los anticuerpos secundarios anti-ratón Alexa Fluor 546 isotipo cabra A11003 (Invitrogen) y anti-conejo Alexa Fluor 488 isotipo cabra A11034 (Invitrogen) por 45 minutos a TA protegidos de la luz. Para remover el exceso de anticuerpo, las placas fueron lavadas nuevamente con KCM 3 veces por 5 minutos protegido de la luz, luego se fijaron con formaldehído al 4% en KCM por 15 minutos. Posteriormente se incubó con DAPI 0,3µg/ml durante 5 minutos, y para finalizar se agregó el medio de montaje Prolong Gold Antifade Reagent.

6.4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-PCR)

Para la obtención de células no sincronizadas, las células MCF7 fueron cosechadas en presencia de inhibidores de proteasas. Para obtener cromatina de células mitóticas, éstas fueron sincronizadas en mitosis usando colcemid (0,1µg/ml)

durante 6 horas; posteriormente, las células del sobrenadante se incubaron en medio con inhibidores de proteasas.

Tanto las células no sincronizadas como las mitóticas fueron fijadas en formaldehído 1% en PBS1x 10 minutos a temperatura ambiente (entrecruzamiento / crosslinking), para unir temporalmente las proteínas a la cromatina. El pellet fijado se lavó en PBS1x y se lisó en buffer de lisis durante 10 min a 4°C, luego se sometieron a pulsos de sonicación para obtener fragmentos de cromatina de 200-400pb. La cromatina sonicada se usó para su inmunoprecipitación con el anticuerpo Anti-Ski isotipo conejo H-329 (Santa Cruz), Anti-UBF isotipo ratón F-9 (Santa Cruz) y también se empleó la histona H3 isotipo conejo 8898 (Abcam) como control positivo. Como control negativo se inmunoprecipitó usando un anticuerpo del mismo isotipo que el experimental pero inespecífico, los cuales fueron normal IgG isotipo conejo (Millipore) y normal IgG isotipo ratón (Millipore). Los complejos inmunes asociados a la cromatina se precipitaron usando beads de agarosa conjugadas a proteínas A (para isotipo conejo) y proteínas G (para isotipo ratón). La cromatina precipitada se sometió a la separación del ADN de las proteínas (descrosslinking), usando RNasa A 2 µg (Sigma Aldrich, MO) a 65° incubación overnight (18 horas) y posteriormente la adición 2,5 µg de proteinasa K (Sigma Aldrich, MO) durante 2 horas a 50 °C en un volumen final de 100 µl. Finalmente, el ADN se purificó mediante extracción fenol-cloroformo.

El ADN de la inmunoprecipitación (IP) fue cuantificado mediante qPCR usando partidores específicos contra la secuencia promotora de los genes ribosomales. Para complementar la información obtenida en los qPCR se realizó un PCR convencional semicuantitativo, los productos de amplificación obtenidos fueron resueltos en una electroforesis en gel de agarosa (1,5%). El patrón de bandas conseguido fue cuantificado según su fluorescencia utilizando el software Image J v1.48.

6.5. Partidores.

Los partidores utilizados se observan en la **Tabla. 1**.

Partidor		Secuencia 5' - 3'	Largo Amplicón (pbs)
Primer A (promotor)	Fw	AGGTGTCCGTGTCCGTGT	136
	Rv	GGACAGCGTGTCAGCAATAA	

Tabla 1. Partidores del promotor del gen ribosomal. Extraídos de [74].

La región amplificada corresponde a los promotores de los genes ribosomales, la cual se muestra en un esquema en la **Figura. 12**.

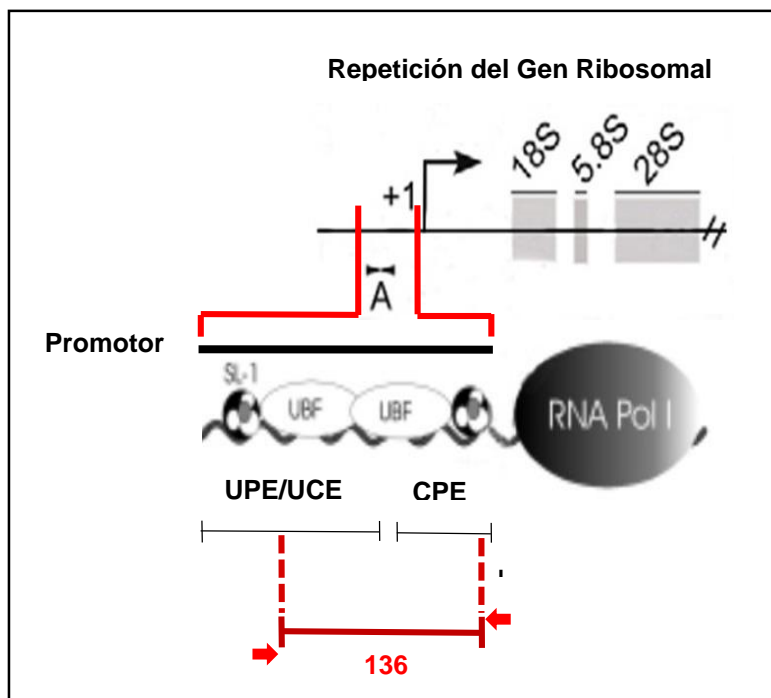


Figura 12. Amplicón del promotor del gen ribosomal. Región amplificada cubre 136 bp.

6.6. Microscopía.

Para selección de imágenes durante interfase y mitosis se empleó el microscopio de epifluorescencia Nikon Optihot-2 con el software NIS-Elements F-2.30. Una vez determinados los campos a fotografiar, la obtención se realizó en el microscopio Spinning Disk Olympus IX 81 mediante el software xcellence rt, la cuantificación de patrones de distribución durante interfase y placas metafásicas en mitosis también fueron obtenidos mediante este microscopio. El procesamiento de imágenes se realizó con los software Image J v1.48 y Adobe Photoshop Elements v6.0.

6.7. Análisis Estadístico

La significancia estadística se estableció con un valor de $p < 0,05$ mediante la prueba t de Student no pareada de dos colas para los resultados obtenidos en las **Figuras. 17A y 25**, prueba de ANOVA de una vía para el resultado de la **Figura.17B**. Para los resultados de la **Figura. 26** se empleó prueba de chi-cuadrado con significancia estadística de $p < 0,0001$ ($X^2 = 242,1$).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism GraphPad v6.0.

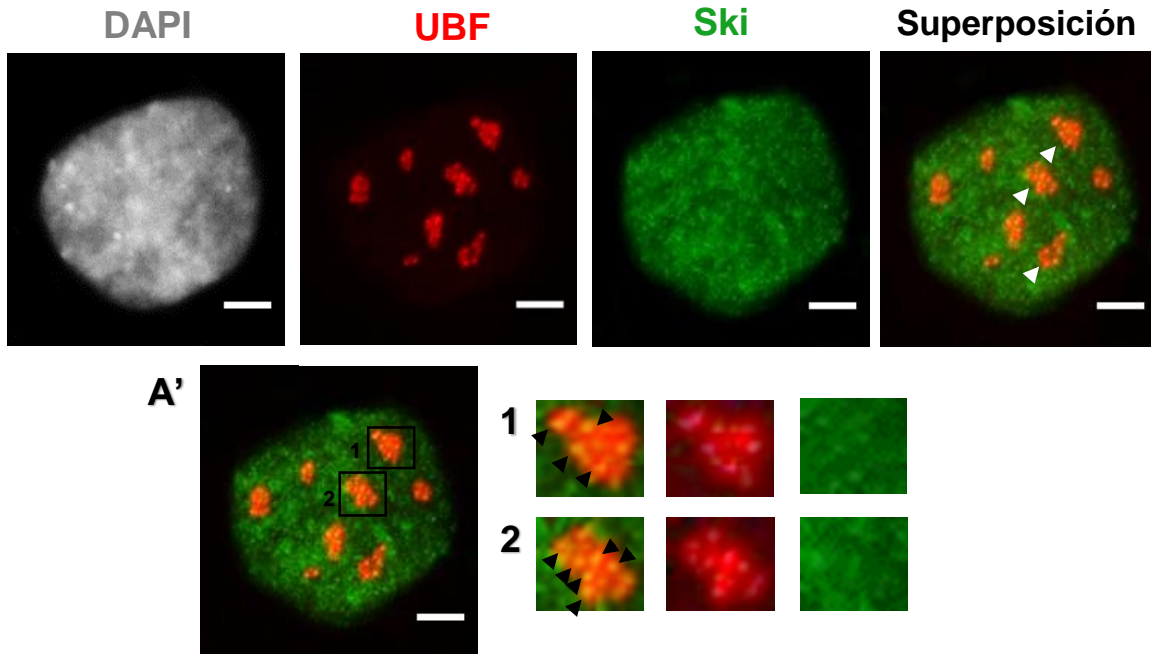
7. RESULTADOS

7.1. Distribución nuclear de Ski en distintos tipos celulares humanos.

Para determinar si Ski se ubica en los nucléolos de células humanas, la proteína fue detectada mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), simultáneamente con el factor transcripcional UBF, utilizado como marcador nucleolar en fibroblastos inmortalizados no transformados (línea celular MRC5) (**Figura. 13**), cultivo primario de fibroblastos humanos (**Figura. 14**) y en células epiteliales de adenocarcinoma mamario (línea celular MCF7) (**Figura. 15**). Mediante microscopía confocal (*Spinning Disk Microscope*), se observó dos patrones de distribución tanto en la línea MRC5 como en el cultivo primario de fibroblastos. En el primer patrón, Ski se distribuye en todo el núcleo interfásico abarcando todos o algunos nucléolos (Ski colocaliza con el nucléolo), mientras que en el segundo, la señal de Ski se distribuye en el núcleo, sin embargo se excluye del territorio nucleolar (Ski no colocaliza con el nucléolo) (**Figuras 1-3**). Para evaluar la colocalización de Ski y UBF, se captaron imágenes en distintos planos Z del núcleo. En las células en que Ski presenta colocalización con los nucléolos, se puede observar pequeñas áreas de colocalización de Ski y UBF en la zona central y periférica de los nucléolos (**Puntas de flechas negras en ampliaciones figuras 13A' y 214A'**). Cuando Ski presenta una distribución en donde no colocaliza con los nucléolos, se observa que la proteína no se distribuye en el territorio nucleolar (**Figuras 13B y 14B**); no obstante, también es posible observar en menor medida estas áreas de colocalización Ski-UBF dentro del territorio nucleolar (**Puntas de flechas negras figuras 13B y 14B**).

A diferencia de lo encontrado en los fibroblastos, en la línea celular MCF7 sólo se encontró un patrón de distribución de Ski no nucleolar (**Figura. 15**), sin encontrarse áreas de colocalización entre Ski y UBF dentro del nucléolo.

A Ski colocaliza con nucléolos



B Ski no colocaliza con nucléolos

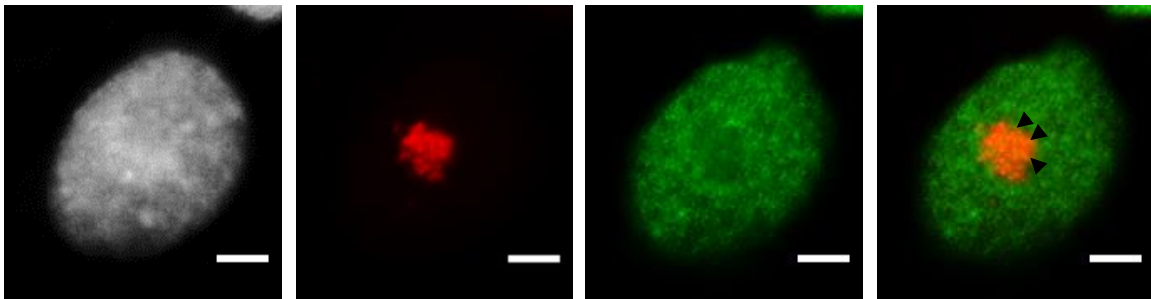
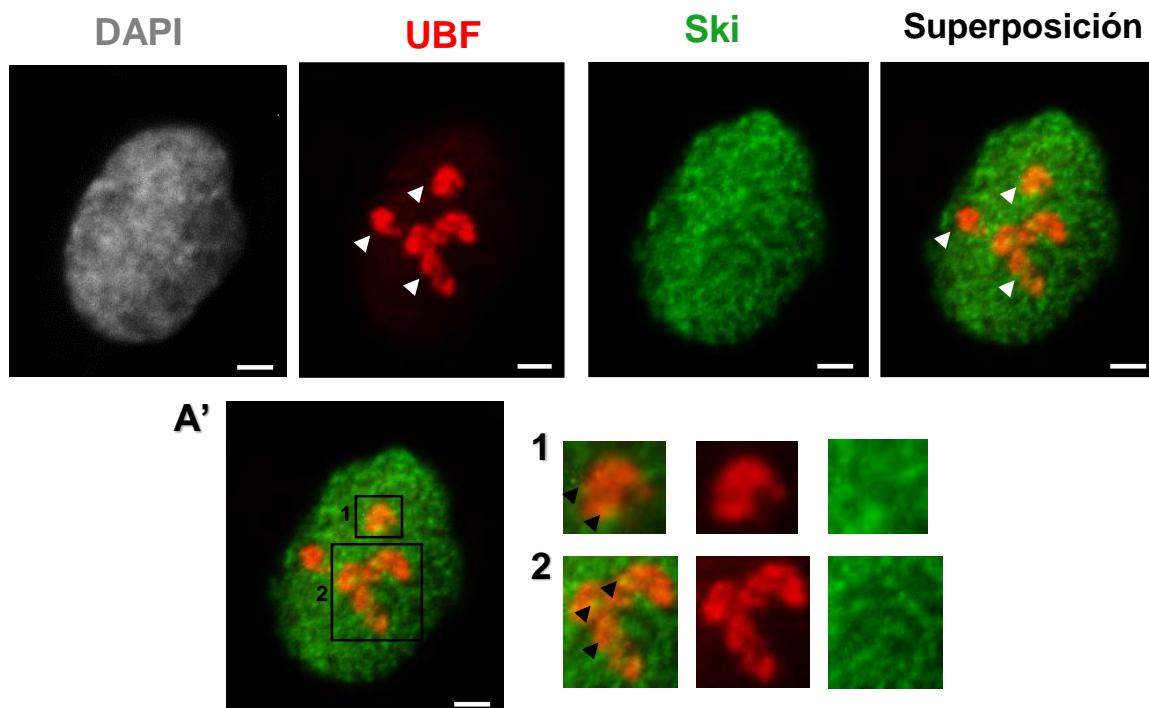


Figura 13. Distribución de Ski en núcleos de células MRC5. La proteína Ski fue detectada mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células asincrónicas, utilizando un anticuerpo policlonal anti-Ski. Los nucléolos fueron detectados usando un anticuerpo anti-UBF. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **(A)** Ejemplo de Ski colocalizando con los nucléolos y **(B)** Ejemplo de Ski con un patrón de distribución en donde no colocaliza con los nucléolos. Puntas de flechas blancas indican los nucléolos. **(A)** 1 y 2 corresponden a ampliaciones fotográficas de los nucléolos en la distribución de Ski colocalizada con el nucléolo, las puntas de flechas negras indican colocalización Ski-UBF. Imágenes representativas seleccionadas de un set de 100 de campos en triplicados biológicos. ADN: gris, Ski: verde, UBF: rojo. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía confocal. Se muestran cortes de 0,5 μm . Escala 2 μm .

A Ski colocaliza con nucléolos



B Ski no colocaliza con nucléolos

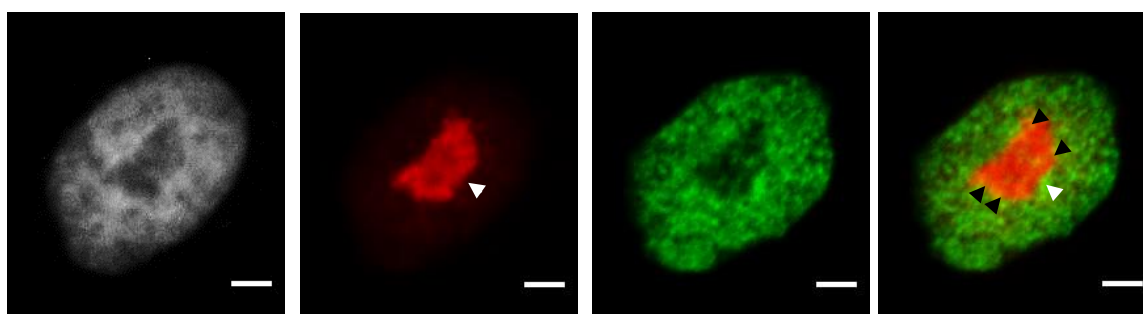


Figura 14. Distribución de Ski en núcleos en cultivo primario de fibroblastos humanos. Las proteínas Ski y UBF fueron detectadas como se señala en la Figura 13. **(A)** Ejemplo de Ski colocalizando con los nucléolos y **(B)** Ejemplo de Ski con un patrón de distribución en donde no colocaliza con los nucléolos. **(A')** 1 y 2 corresponden a ampliaciones fotográficas de los nucléolos en la distribución de Ski colocalizada con los nucléolos, en donde las puntas de flechas negras indican colocalización Ski-UBF. Imágenes representativas seleccionadas de un set de 100 de campos en triplicados biológicos. ADN: gris, Ski: verde, UBF: rojo. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía confocal. Se muestran cortes de 0,5 μm . Escala 2 μm .

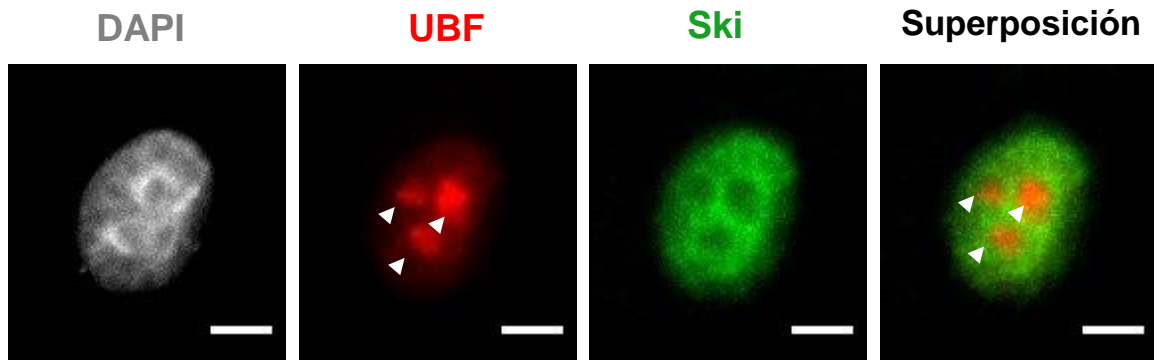


Figura 15. Distribución de Ski en núcleos de la línea celular MCF7. Las proteínas Ski y UBF fueron detectadas como se señala en la Figura 13. En estas células sólo se encontró un patrón de distribución, en donde Ski no colocaliza con los nucléolos. Puntas de flechas blancas indican los nucléolos. Imagen representativa seleccionada de un set de 100 de campos en triplicados biológicos. ADN: gris, Ski: verde, UBF: rojo. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía confocal. Se muestran cortes de 0,5 μm . Escala 2 μm .

La **Figura. 16** muestra el porcentaje de células que presentan los patrones de distribución de Ski en los distintos tipos celulares analizados, en el 41,7% de las células MRC5 Ski colocaliza con el nucléolo, mientras que en un 58,3% de las células, no colocaliza (**16A**). Esta distribución fue similar en el cultivo primario de fibroblastos, los que presentan un 52,8% de Ski colocalizando con los nucléolos y un 47,2% de núcleos en que Ski no colocaliza con los nucléolos (**16B**). Finalmente, en el 100% de las células MCF7 Ski no colocaliza con el nucléolo (**16C**).

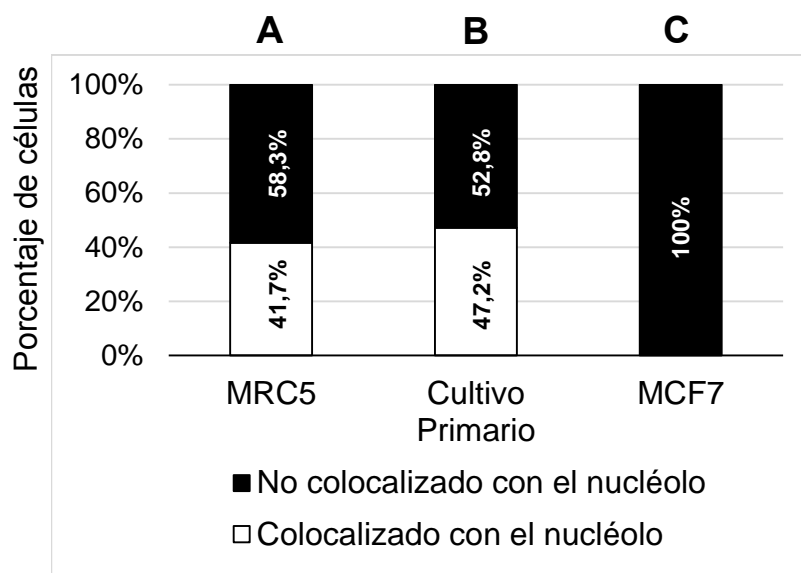


Figura 16. Cuantificación de patrones de distribución de Ski en tipos celulares humanos. Ambos patrones de distribución de Ski (Ski colocalizando o no con nucléolos) fueron cuantificados en 180 células no sincronizadas (100%) por tipo celular en triplicado biológico, en **A** para línea celular MRC5, en **B** cultivo primario de fibroblastos humanos y en **C** para línea celular MCF7. Ski y UBF fueron detectados mediante inmunofluorescencia indirecta, como se indica en **Figuras 13**.

Al realizar la comparación de ambos patrones de distribución entre los distintos tipos celulares, se observa que en los fibroblastos no transformados (línea celular MRC5 y cultivo primario) no existe diferencia significativa en la distribución de Ski colocalizada con el nucléolo (**Figura. 17A**).

Sin embargo, al realizar la comparación en la distribución de Ski en donde no colocaliza con el nucléolo, se muestra diferencia significativa sólo al comparar los tipos celulares de fibroblastos con la línea celular MCF7 (**Figura. 17B**), ya que en esta última solo se encontró solo este último patrón de distribución (100%), a diferencia de los otros tipos celulares (MRC5: 58,3% y cultivo primario: 52,8%).

Patrones de distribución de Ski

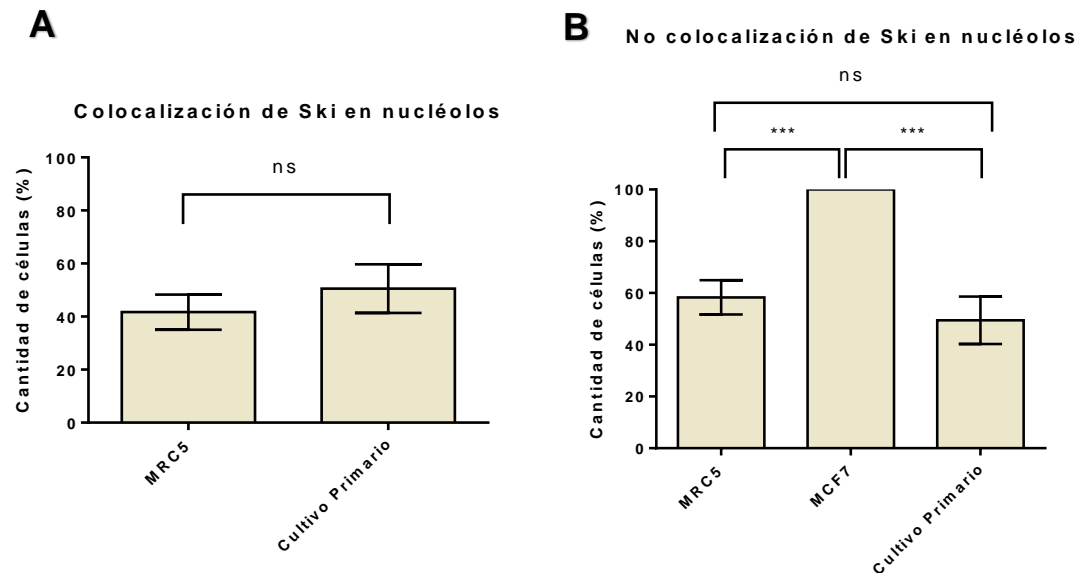


Figura 17. Comparación de la distribución Ski en los tres tipos celulares estudiados. Análisis estadístico de los patrones de distribución de Ski (Ski colocaliza con nucléolos y no) en 180 células no sincronizadas (100%) por modelo celular en triplicado biológico, en **(A)** distribución donde Ski colocaliza con el nucléolo y en **(B)** en donde no colocaliza. **A:** t-test ns $p = 0,2450$ **B:** One way ANOVA *** $p = 0,0002$.

7.2. Distribución cromosómica de Ski en distintos tipos celulares humanos.

Para evidenciar la localización de Ski en cromosomas humanos, la proteína fue detectada mediante inmunofluorescencia indirecta realizada sobre placas metafásicas en células MRC5 (**Figura. 18A**), fibroblastos primarios (**Figura. 18B**) y de la línea celular MCF7 (**Figura. 18C**). Tal como se había detectado en los estudios preliminares, en estos ensayos se confirmó la localización de Ski en algunos cromosomas, mostrando una distribución punteada en los brazos cortos de cromosomas acrocéntricos.

En la **Figuras 18A y 18B**, se puede evidenciar que en fibroblastos, los cromosomas que presentan Ski corresponden a cromosomas acrocéntricos, los cuales en humanos se caracterizan por tener regiones NOR en dichas zonas. Mientras que en la línea celular MCF7, Ski se evidencia no sólo en cromosomas acrocéntricos, sino también en algunos cromosomas de diferente morfología (**18C**).

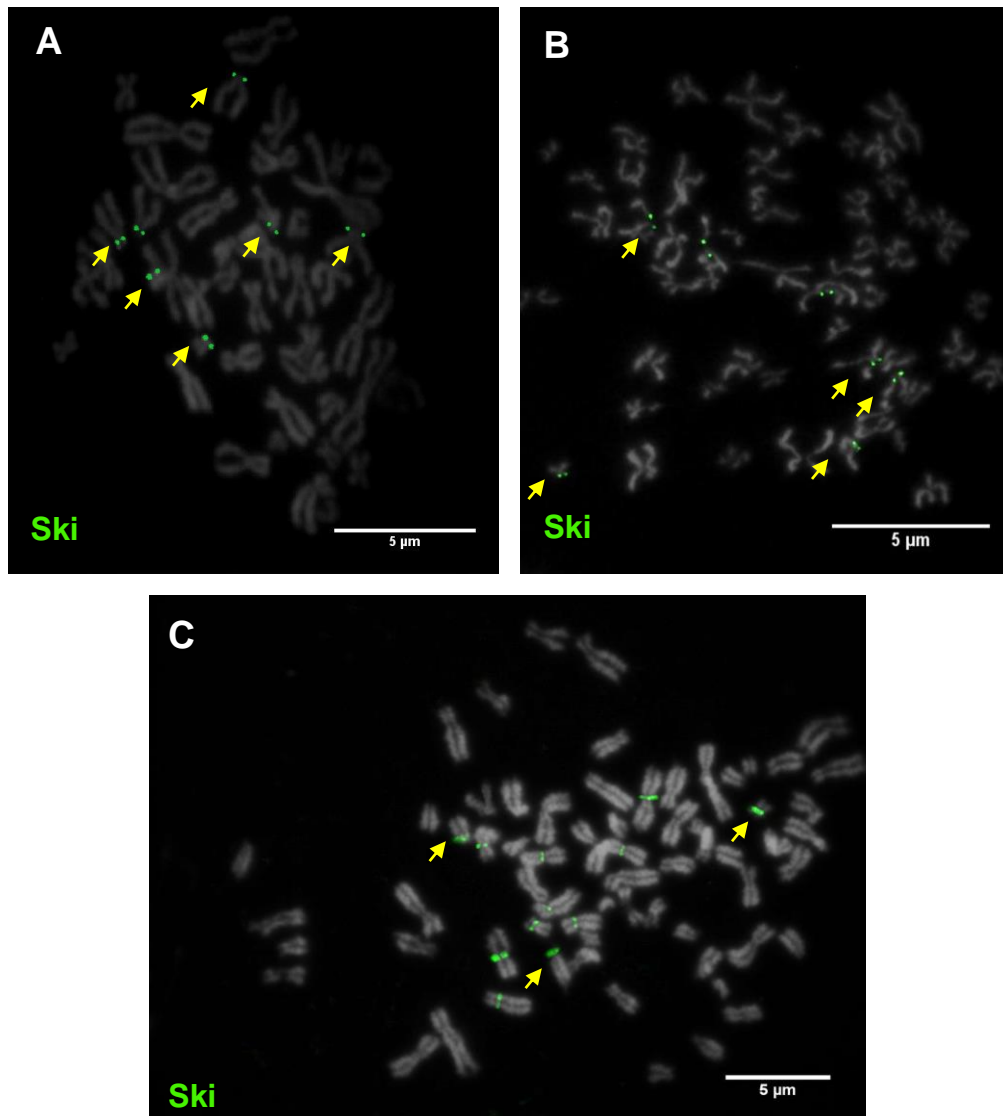


Figura 18. Ski se asocia a cromosomas en tres tipos celulares humanos. Las células fueron sincronizadas en mitosis utilizando colcemid y las placas metafásicas fueron obtenidas por citocentrifugación en condiciones de hipotonía. Ski fue detectado mediante IFI y los cromosomas fueron teñidos con DAPI. Las flechas amarillas indican la presencia de Ski en cromosomas acrocéntricos en la línea celular MRC5 **(A)**, cultivo primario de fibroblastos humanos **(B)** y línea celular MCF7, donde además se detecta en cromosomas no acrocéntricos (no marcados con flechas). **(C)**. Placas metafásicas representativas seleccionadas de un set de campos, para MRC5 N=1, para cultivo primario de fibroblastos primarios N=1 y para MCF7 en triplicados biológicos. ADN: gris, Ski: verde.

Para identificar los cromosomas que presentan Ski, se realizaron cariotipos de las líneas celulares MRC5 (**Figura. 19A**) y MCF7 (**Figura. 19B**). No se pudo obtener un cariotipo del cultivo primario de fibroblastos debido a la dificultad de preservar la estructura cromosómica luego de la citocentrifugación. Para el cariotipo de la **Figura 19A**, el cromosoma 12 no pudo ser identificado. En MRC5, Ski se localiza principalmente en cromosomas acrocéntricos (13, 14 y/o 15 y 22) y no siempre se localiza en ambos pares de homólogos. En estas células, el aumento en el tiempo de exposición de la señal fluorescente deja en evidencia la presencia de Ski en otros cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, pero la señal es significativamente menos intensa que la visualizada en los cromosomas acrocéntricos. Por su parte, en células MCF7 (**19B**), Ski se encontró en cromosomas acrocéntricos, pero también fue evidente la señal en otros cromosomas del grupo A-C y E. El número de cromosomas acrocéntricos que llevan Ski fue variable entre placas metafásicas.

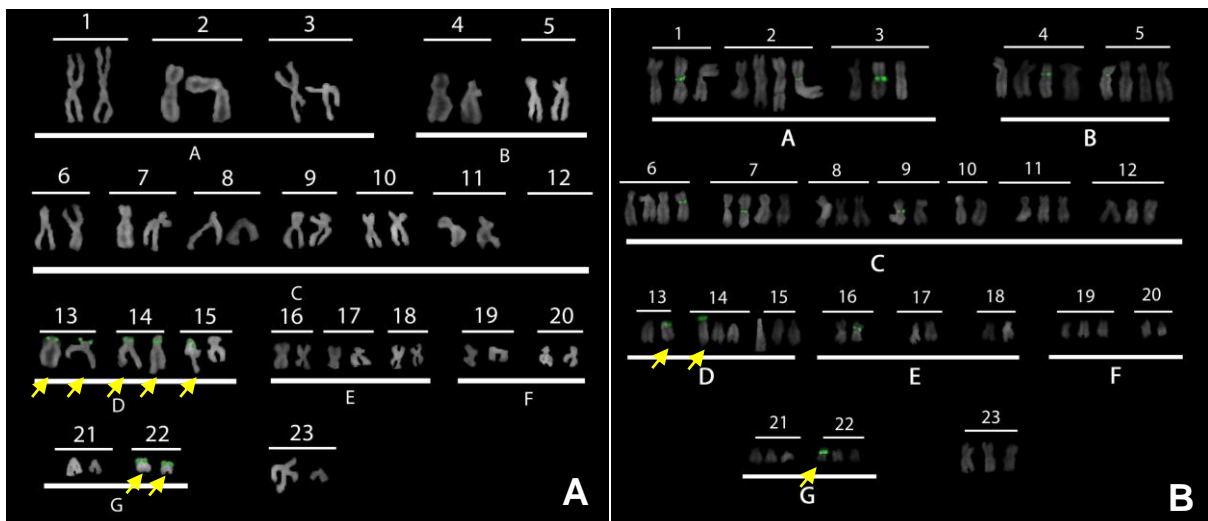


Figura 19. Ski se asocia a cromosomas acrocéntricos en tres tipos celulares humanos. Cariotipos realizados a partir de inmunofluorescencia indirecta realizada sobre placas metafásicas (**Figura 18**). Las flechas amarillas indican los posibles cromosomas acrocéntricos en donde se ubica la señal correspondiente a Ski (verde). En el modelo celular MRC5 se estimó que los cromosomas que contienen Ski corresponden al par 13, 14, 22 y a un cromosoma del par 15 (**A**), para la línea celular MCF7 los cromosomas nucleolares que contienen Ski corresponden al 13, 14 y 22. En esta línea celular también se detecta en los centrómeros de algunos cromosomas no acrocéntricos (**B**). Cariotipos representativos seleccionados, para línea celular MRC5 de un cariotipo y para MCF7 de tres cariotipos. ADN: gris, Ski: verde.

7.3. Colocalización de Ski con UBF en cromosomas mitóticos.

Para determinar si Ski se encuentra asociada a maquinaria transcripcional de los genes ribosomales, como aproximación se decidió ver si la proteína Ski colocaliza en cromosomas acrocéntricos junto con UBF. El factor transcripcional UBF permanece asociado a los cromosomas nucleolares sólo en aquellos NORs que formaron nucléolos activos en la interfase previa, mientras que los resultados previos mostraron que Ski se ubica en ciertos cromosomas acrocéntricos, por lo cual estimamos que ambas proteínas podrían estar colocalizadas en estos cromosomas. Debido a dificultades técnicas relacionadas con la obtención de fibroblastos mitóticos (cultivo primario y MRC5), los experimentos de colocalización de Ski-UBF en mitosis e inmunoprecipitación de cromatina fueron realizados sólo en la línea MCF7, debido a su alta tasa de proliferación y alto índice mitótico. En la **Figura. 20** se puede observar una placa metafásica en donde se evidencian cromosomas acrocéntricos en que existe colocalización de Ski y UBF.

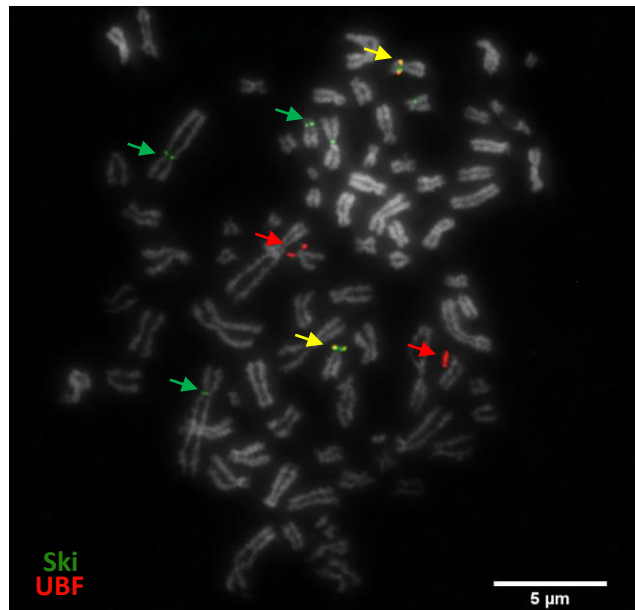


Figura 20. Ski colocaliza y no con UBF en cromosomas acrocéntricos en línea celular MCF7. Los cromosomas mitóticos fueron obtenidos como se indicó en la Figura 18. Ski y UBF fueron detectados mediante IFI y los cromosomas teñidos con DAPI. Las flechas verdes indican la presencia de Ski, flechas rojas de UBF y las flechas amarillas colocalización entre ambas proteínas. Imagen representativa seleccionada de un set de 100 placas metafásicas en cuadruplicados biológicos. ADN: gris, Ski: verde y UBF: rojo.

La **Figura. 21**, muestra un detalle representativo de los distintos patrones de localización de Ski y UBF encontrados en los cromosomas de las células MCF7.

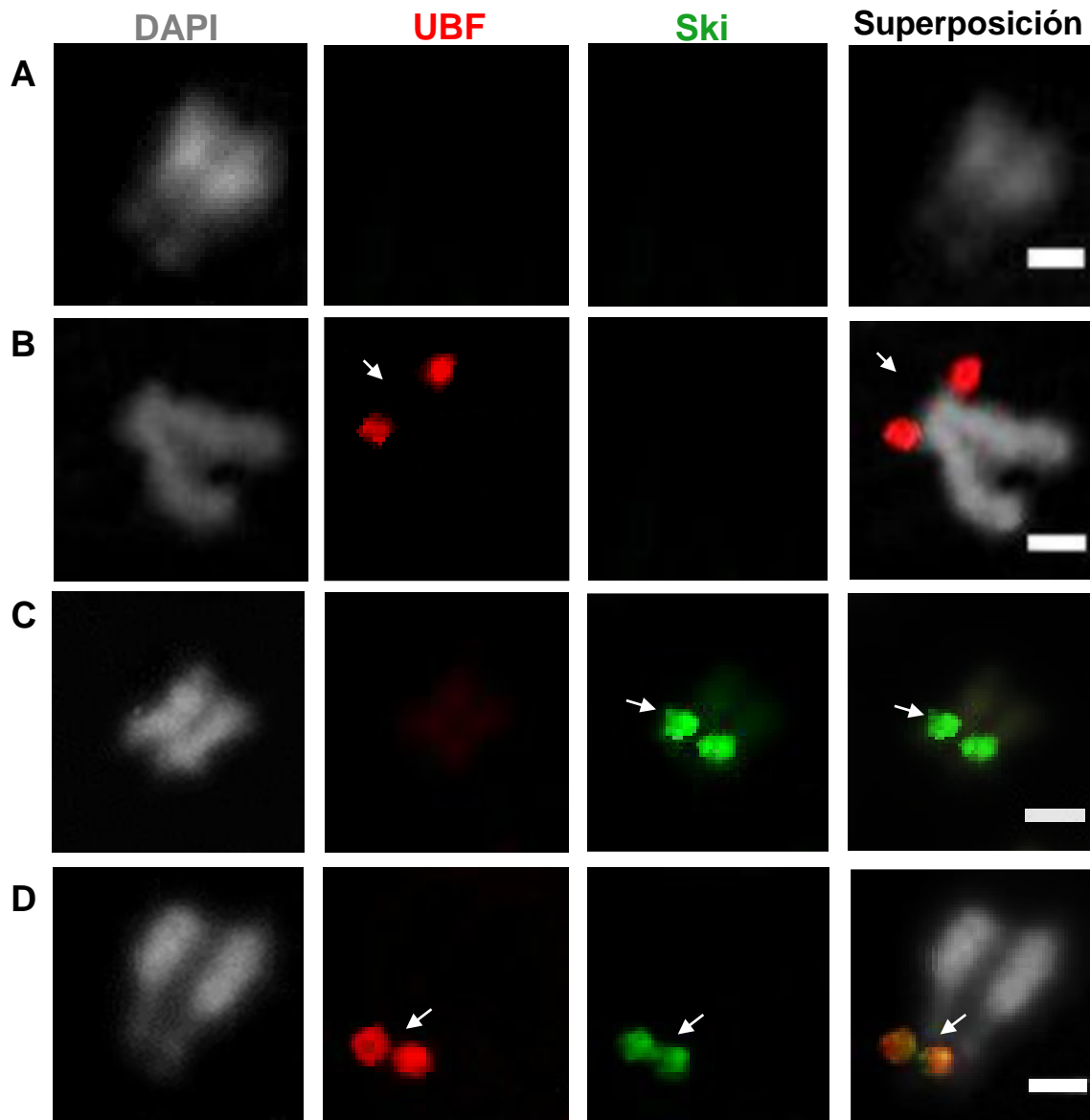


Figura 21. Cromosomas acrocéntricos colocados y no-colocalizados con Ski y UBF en línea celular MCF7. Los cromosomas acrocéntricos mitóticos fueron obtenidos como se indicó en la Figura 18 Ski y UBF fueron detectados mediante IFI y los cromosomas teñidos con DAPI. En **(A)** se encuentra un cromosoma acrocéntrico sin la colocación de ninguna de las dos proteínas, en **(B)** asociados solo a UBF, en **(C)** sólo a Ski y en **(D)** colocalizado con ambas proteínas. Las flechas blancas indican la presencia de Ski, UBF y su colocación. ADN: gris, Ski: verde y UBF: rojo (Escala 0,5 μm).

Para determinar con qué frecuencia Ski y UBF se asocian a los cromosomas nucleolares, se realizó la cuantificación de los cromosomas que contienen ambas proteínas colocalizadas y sin colocalizar. Cabe mencionar que ambas proteínas se localizan como un par de puntos en los brazos de los cromosomas, esto fue considerado como un cromosoma con Ski, con UBF o con colocalización. En la **Figura. 22** se observan las frecuencias de cromosomas con Ski y UBF.

Al analizar el número de cromosomas que presentan señal positiva para Ski, se encontró que en promedio 5,8 cromosomas por placa metafásica analizada, fueron positivos para Ski; mientras que 3,3 cromosomas por placa metafásica fueron positivos para la señal de UBF. La frecuencia de distribución de los cromosomas positivos para Ski varió entre 1-12, con una moda de 5 cromosomas por placa, en 13 placas metafásicas (**22A**). Por su parte, para UBF se encontró un rango de 1-7, con una moda de 2 cromosomas por placa, en 18 placas metafásicas (**22B**).

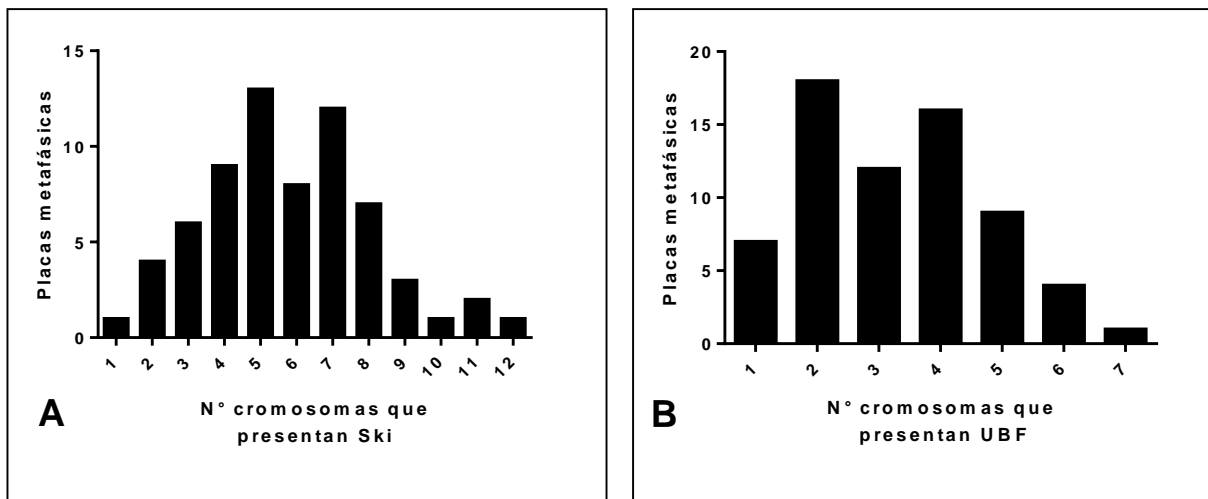


Figura 22. Cuantificación de cromosomas que contienen Ski y UBF en placas metafásicas de la línea celular MCF7. Se cuantificaron un total de 67 placas metafásicas en cuatro ensayos independientes, encontrándose en total 387 cromosomas con Ski y 219 con UBF. En **(A)** se observa la cantidad de placas metafásicas con cromosomas que contienen Ski y en **(B)** que contienen UBF.

Con respecto a los cromosomas que presentaron colocalización de Ski-UBF, estos se encontraron con una frecuencia de distribución de 0 (ausencia de colocalización) a 5 cromosomas por placa metafásica, con una moda de 1 cromosoma en 17 placas metafásicas (**Figura. 23**). El promedio de cromosomas que presentaron colocalización fue de 2,0 cromosomas por placa metafásica (analizadas sobre un total de 137 cromosomas que presentaron la colocalización Ski-UBF).

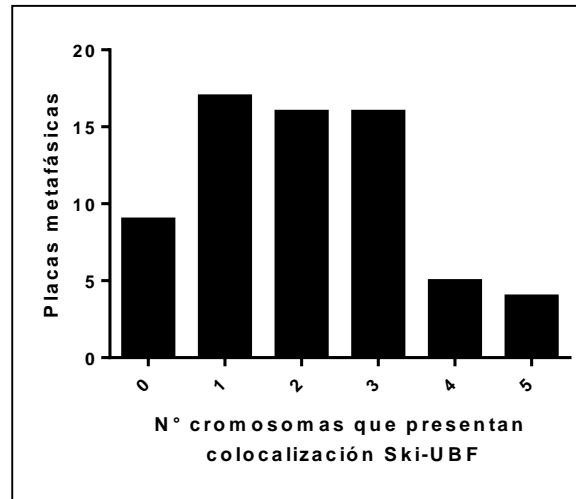


Figura 23. Cuantificación de cromosomas que presentan colocalización Ski-UBF (señal) en placas metafásicas en la línea celular MCF7. Se cuantificaron un total 67 placas metafásicas de cuatro ensayos, encontrándose en total 137 cromosomas con colocalización.

Mediante un diagrama de Venn se realizó un análisis total de los cromosomas que son positivos para la señal Ski, UBF y la colocalización de ambas proteínas (**Figura. 24**). El 64,6% de los cromosomas que presentan Ski se encontraron en el brazo corto de cromosomas que no son acrocéntricos o bien son cromosomas acrocéntricos que no presentaron colocalización con UBF. Sólo el 35,4% de cromosomas con Ski se encontró colocalizado con UBF. Sin embargo, al analizarlos desde la perspectiva de UBF, el 62,6% de cromosomas con UBF se encontró en cromosomas acrocéntricos en donde también se encuentra la proteína Ski.

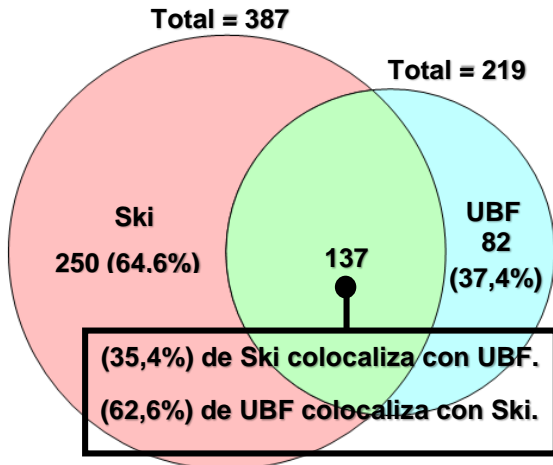


Figura 24. Cuantificación total de cromosomas que presentan Ski, UBF y colocalización en placas metafásicas células MCF7. Se cuantificó las señales en cromosomas de Ski, UBF y colocalización en un total de 67 placas metafásicas en cuatro ensayos independientes.

Para determinar en qué cromosomas se ubica Ski en placas metafásicas, se realizó un análisis, en donde sólo se consideraron los cromosomas que colocaron con Ski, los cuales corresponden a un total 387 (100%). De este total, 202 (51,6%) corresponden a cromosomas acrocéntricos, mientras que el 48,4% restante corresponde a cromosomas no acrocéntricos (**25A**). De los cromosomas acrocéntricos positivos para Ski, 137 (69,1%) cromosomas fueron también positivos para UBF, encontrándose co-localización entre ambas proteínas (**25B**).

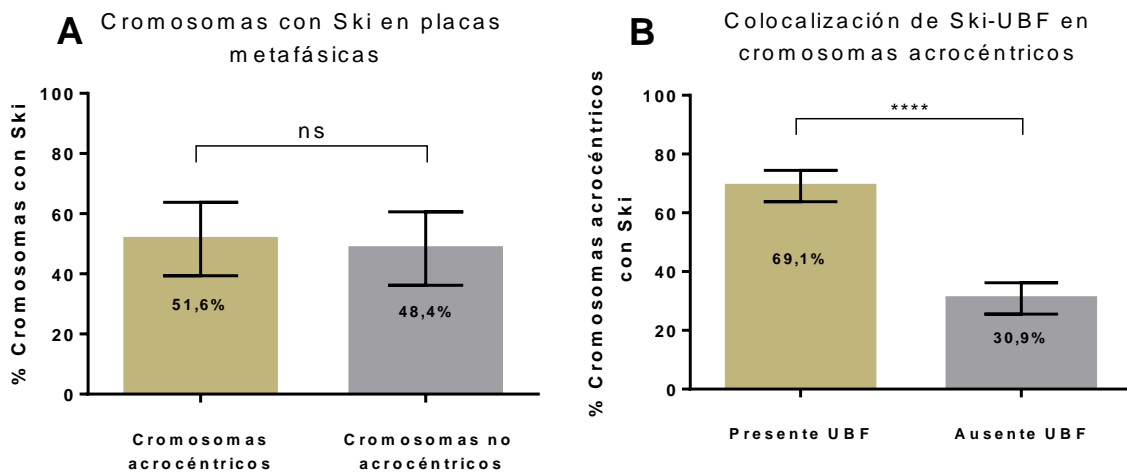


Figura 25. Distribución de Ski en cromosomas en la línea celular MCF7. Se cuantificaron un total 67 placas metafásicas en cuatro ensayos independientes. **(A)** Distribución de colocalización de Ski en los cromosomas (%). **(B)** Colocalización de Ski en cromosomas acrocéntricos dependiendo su colocalización con UBF (%). **A:** t-test ns $p = 0,7272$ **B:** t-test **** $p < 0,0001$.

Para determinar si la proteína Ski se distribuye preferentemente en cromosomas acrocéntricos, se trabajó bajo el supuesto que la línea celular MCF7 es una línea de constitución genómica diploide ($2n=46$). Así, en una célula humana diploide proveniente de tejido femenino, el máximo de veces que se puede ubicar Ski en cromosomas acrocéntricos es de 10 veces (5 pares de cromosomas homólogos), mientras que para cromosomas no acrocéntricos es de 36 veces (18 pares de cromosomas homólogos). Al considerar un total de 67 placas metafásicas cuantificadas, existe un universo de 670 cromosomas acrocéntricos y 2412 cromosomas no acrocéntricos.

Al extrapolar los datos obtenidos de la ubicación de Ski en cromosomas de las células MCF7 y considerando la diploidía celular, se obtuvo la cantidad de cromosomas acrocéntricos y no acrocéntricos con y sin Ski (**Figura. 26**). Al analizar los datos mediante prueba chi-cuadrado, se desprende que la proteína Ski se distribuye más en cromosomas acrocéntricos que en cromosomas no acrocéntricos, debido a que los valores observados de Ski en estos cromosomas acrocéntricos son muchos más altos en comparación con los valores esperados, caso contrario ocurre en cromosomas no acrocéntricos, en donde los cromosomas con Ski son mucho menor a lo esperado (**Tabla. 2**).

Distribución de Ski en Placas Metafásicas (MCF7)

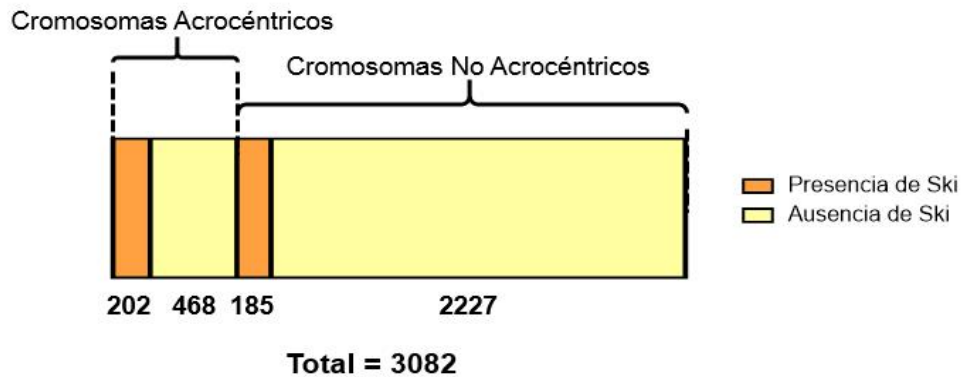


Figura 26. Distribución de Ski en placas metafásicas en la línea celular MCF7. Se cuantificaron un total 67 placas metafásicas en cuatro ensayos independientes, considerando que cada placa presenta 46 cromosomas (diploidía). Distribución de Ski en un total de 3087 cromosomas, en donde 670 corresponden a cromosomas acrocéntricos y 2412 a cromosomas no acrocéntricos. Chi-cuadrado **** p = 0,0001.

	Cromosomas Acrocéntricos		Cromosomas no Acrocéntricos	
	Observado	Esperado	Observado	Esperado
Presencia de Ski	202	84	185	303
Ausencia de Ski	468	586	2227	2109
TOTAL	670	670	2412	2412

3082

Tabla 2. Cantidad de cromosomas con presencia/ausencia de Ski observados y esperados. Distribución de Ski en un total de 3087 cromosomas, en donde 670 corresponden a cromosomas acrocéntricos y 2412 a cromosomas no acrocéntricos. Chi-cuadrado **** p = 0,0001 $X^2 = 242,1$

7.4. Ubicación de Ski en los promotores de los genes ribosomales.

La función principal de Ski dice relación con su actividad co-represora de la transcripción de diversos genes blancos. Para determinar si Ski está ocupando los promotores de genes ribosomales en nucléolos y cromosomas con NOR, se realizó una inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) contra Ski en células MCF7 asincrónicas y mitóticas.

El ADN de la inmunoprecipitación (IP) fue cuantificado mediante qPCR usando partidores específicos contra la secuencia promotora de los genes ribosomales. La ChIP contra H3 y UBF fueron utilizados como controles positivos de inmunoprecipitación y del promotor de los genes ribosomales, respectivamente. Como controles negativos, se utilizaron inmunoglobulinas (IgG) normal.

Las **figuras 27 y 28** muestran los resultados obtenidos en los experimentos de ChIP para células no sincronizadas y sincronizadas en mitosis, respectivamente. En la figura **27A** y **28A** se muestran los valores de porcentaje de *input* obtenidos al inmunoprecipitar Ski, UBF y ambas IgGs. Para complementar la información obtenida en los qPCR se realizó un PCR convencional y los productos de amplificación obtenidos fueron resueltos en una electroforesis en gel de agarosa. Las fotografías de los geles se ilustran en **27B** y **28B**. A partir de estas fotografías se realizó una semicuantificación de las bandas, la que se muestra en la figura **27B'** y **28B'**.

Los resultados muestran que el anticuerpo anti-Ski inmunoprecipita los promotores de genes ribosomales sólo en células mitóticas, no así en células no sincronizadas (aprox. 95% interfase) en la línea celular MCF7.

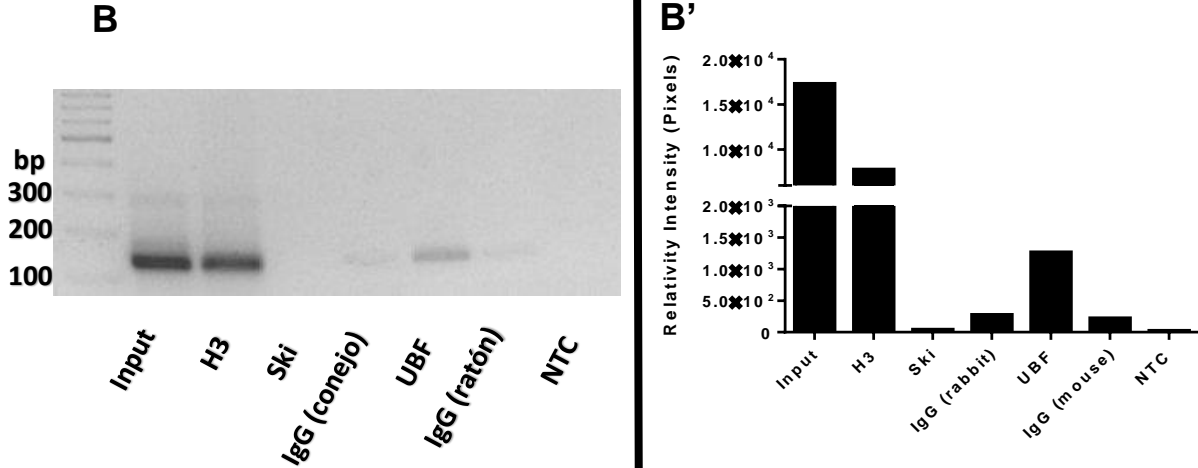
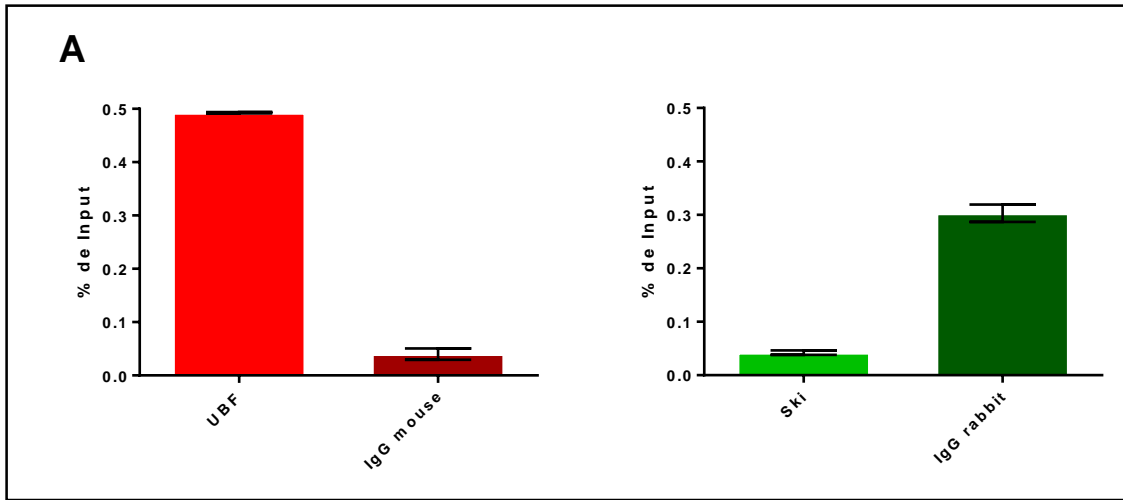


Figura 27. Ski no se ubica en promotores de genes ribosomales en células MCF7 asincrónicas. Células asincrónicas fueron fijadas y sonicadas. La cromatina se inmunoprecipitó (IP) con anticuerpos anti-Ski y anti-UBF. Anti-H3 e IgG normal fueron utilizados como control positivo y negativo de la IP, respectivamente. NTC: No Template Control; Sybr Green/MasterMix más partidores y agua, se empleó como control negativo del qPCR. En (A) se muestran los resultados de qPCR para Ski y UBF, en (B) los productos de PCR correspondientes a la amplificación de un segmento del promotor de ADN_r; y en (B') una semicuantificación de las bandas. El grafico muestra la conducta representativa que se repite en triplicados biológicos.

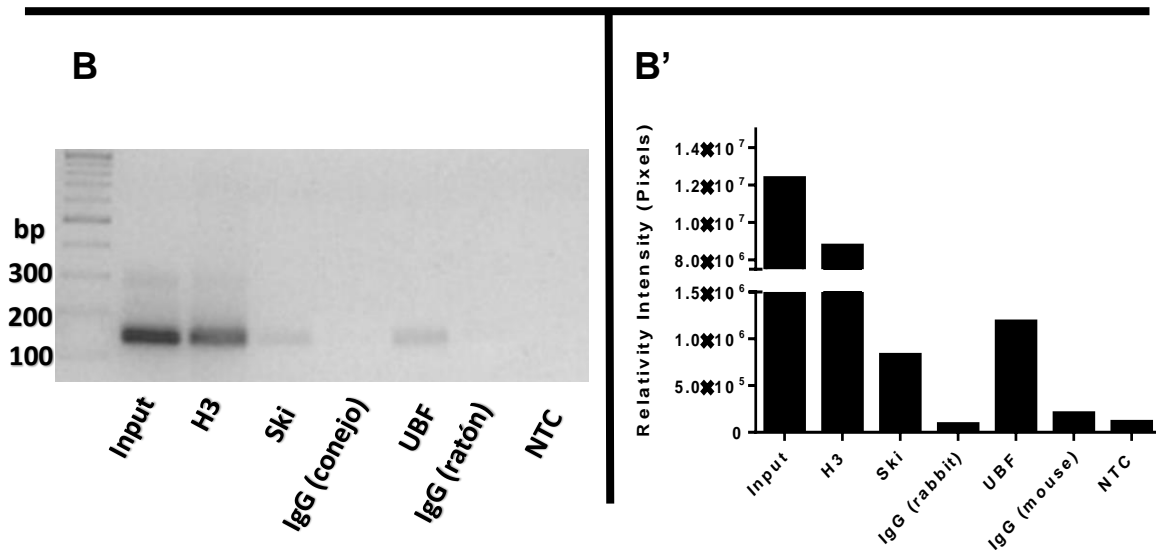
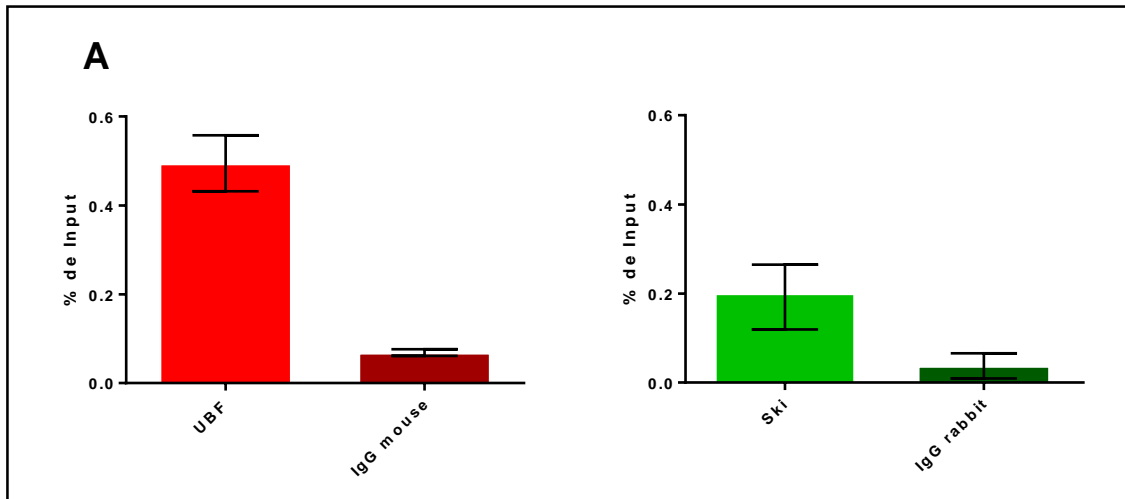


Figura 28. Ski se ubica en promotores del gen ribosomal en células mitóticas en la línea celular MCF7. Células MCF7 fueron crecidas hasta un 70% de confluencia y luego fueron sincronizadas en mitosis usando Colcemid. Las células mitóticas fueron fijadas y sonicadas. La cromatina obtenida se inmunoprecipitó (IP) con anticuerpos anti-Ski y anti-UBF. Anti-H3 e IgG normal fueron utilizados como control positivo y negativo de la IP, respectivamente. NTC: No Template Control; Sybr Green/MasterMix más partidores y agua, se empleó como control negativo del qPCR. En (A) se muestran los resultados de qPCR para Ski y UBF, en (B) los productos de PCR correspondientes a la amplificación de un segmento del promotor de ADNr; y en (B') una semicuantificación de las bandas. El grafico muestra la conducta representativa que se repite en triplicados biológicos.

8. DISCUSIÓN

8.1 Distribución de la proteína Ski durante interfase en distintos tipos celulares.

Ski es una proteína co-represora que se localiza principalmente en todo el núcleo interfásico ejerciendo su función biológica, la cual consiste en reclutar represores transcripcionales para silenciar genes blancos en las vías de señalización donde participa (como TGF- β) [10]. No obstante, en los distintos tipos celulares estudiados encontramos diferencias en su distribución nuclear con respecto al territorio nucleolar. Las diferencias se observan entre los fibroblastos no transformados y el tipo celular de carcinoma mamario MCF7, en donde para los primeros se encontraron dos tipos de distribuciones de Ski, colocalizando y no colocalizando con el nucléolo, mientras que en la línea celular MCF7, la proteína Ski sólo se encontró no colocalizando con el nucléolo.

Las diferencias observadas entre los fibroblastos y la línea celular MCF7 pueden obedecer a las diferencias propias de los linajes (origen mesenquimal y epitelial), o bien, al estado de transformación oncogénica, que difiere entre ambos tipos celulares. Debido a la transformación oncogénica de las células MCF7 [65], además de existir una mantención basal de las estructuras celulares, estas células requieren un aumento de la generación y recambio proteico para mantener una alta proliferación [34], en comparación con células no transformadas o quiescentes donde la producción ribosomal es menor [66], como es el caso de los fibroblastos estudiados. Por lo tanto, es esperable que las células MCF7 tengan un mayor número de genes ribosomales transcripcionalmente activos, y esto pueda repercutir en la diferencia de distribución nuclear de la proteína Ski.

En células MCF7, Ski se encuentra excluido de los territorios nucleolares, lo cual es esperado debido a que los nucléolos en estas células se encuentran más activos transcripcionalmente [67]. Por lo cual, la diferencia de la distribución de Ski en esta línea celular en comparación con los fibroblastos no transformados puede ser debido por el estado de transformación y exigencia metabólica que poseen estas células. Sin

embargo, se desconoce si los cambios de la distribución de Ski son una consecuencia de la transformación oncogénica o una causa de la transformación, por ello se hace necesario seguir el estudio de la distribución de Ski en los nucléolos en otros tipos celulares transformados.

Los modelos de fibroblastos no transformados fueron obtenidos de distintas fuentes tisulares. La línea celular MRC5 fue establecida a partir de tejido pulmonar fetal [68], mientras que el cultivo primario fue extraído y separado de tejido adiposo de humanos adultos. A pesar de las diferencias en la expresión génica que tienen ambos tipos celulares de fibroblastos, no se encontraron diferencias en la distribución de Ski con respecto al nucléolo.

El posible rol de Ski en nucléolos de fibroblastos no transformados (un 41,7% para MRC5 y un 47,2% para el cultivo primario), puede tener relación con la regulación negativa de la expresión de los genes ribosomales, principalmente afectando el estado de compactación de la cromatina. Cabe mencionar que aunque el nucléolo sea una zona de alta tasa transcripcional, también existen co-represores que silencian la expresión de estos genes, resultando en genes ribosomales silentes durante interfase [69]. La transcripción de genes ribosomales es regulada a través de la presencia de UBF, el cual a su vez es capaz de reclutar a la ARN Pol I e iniciar la transcripción de estos genes [36], sin embargo, este proceso es dependiente del estado de compactación de cromatina en cada promotor del gen ribosomal [70]. En este último caso, el complejo remodelador más estudiado es el complejo de remodelamiento nucleolar (NoRC), complejo proteico que en conjunto con la maquinaria de desacetilación [71] promueven el silenciamiento de genes ribosomales durante interfase [72].

En este aspecto, las modificaciones de histonas gobiernan el estado de activación de los genes ribosomales [73]. Debido a los conocidos roles de Ski como co-represor que media la desacetilación de histonas, es que esperaríamos encontrar a Ski en estos promotores que necesiten permanecer silenciados [5].

La presencia de Ski en los promotores de genes ribosomales en fibroblastos no transformados durante interfase, sugiere que el silenciamiento de estos genes en células con un metabolismo controlado y fisiológico podría ser mediado por la ocupación de Ski ejerciendo un rol similar al de NoRC. Un mecanismo análogo ya ha sido descrito para el factor de transcripción Runx2 [74], el cual en tejido óseo es capaz de reprimir la expresión de genes ribosomales reclutando a HDAC1 durante interfase, al igual que el complejo macromolecular NoRC. Concordante con estos hallazgos en este trabajo se muestra que en fibroblastos, Ski se localiza en los bordes de los nucléolos, al igual que Runx2. Curiosamente, en estas zonas se procesa el ARN ribosomal para dar lugar a las estructuras ribosomales maduras y que no guardan relación con la regulación transcripcional de los genes ribosomales en sí [36].

A través de microscopia electrónica, se ha descrito que los nucléolos se dividen en tres subterritorios (**Figura. 8**), en donde el territorio periférico del nucléolo podría corresponder a los centros fibrilares densos (DFC) [42] y/o componentes granulares (GC) [43]. En los DFC se encuentran una gran cantidad de proteínas que se encargan del procesamiento del transcrito pre-ARN ribosomal [39], mientras que en el componente granular se encuentran proteínas tanto ribosomales como no ribosomales [75], encargadas del ensamblaje de ambas subunidades del ribosoma, antes que sea exportado al citoplasma [76]. La localización de Ski en la periferia de los nucléolos sugiere que Ski podría estar actuando como una proteína de andamiaje, en el cual las proteínas encargadas de la maduración de los ARN ribosomales se podrían anclar a Ski en las regiones periféricas del nucléolo.

En este sentido, Ski podría estar actuando en un proceso ulterior a la transcripción de los genes ribosomales, aunque, es común que Ski actúe regulando negativamente la transcripción a través de diversos mecanismos [5]. Se ha demostrado que esta proteína puede actuar en procesos no relacionados con la transcripción directamente, por ejemplo aumentando la vida media de HDAC3, inhibiendo su degradación proteosomal [77] y mediando la interacción de SIRT1 con

p53 para facilitar la desacetilación e inhibición de este último [15]. Sin embargo, no existe literatura que relacione Ski a evento de la maduración de ningún tipo de RNA.

8.2 Distribución de la proteína Ski durante mitosis en línea celular MCF7.

Los resultados mostrados para la línea celular MCF7, indican que la distribución de Ski en estas células tiene aparente relación con el ciclo celular. Durante interfase Ski no se localiza en los nucléolos y al ingresar a mitosis Ski se redistribuye como un par de puntos en los brazos cortos de un número limitado de cromosomas. Para los tipos celulares de fibroblastos no se logró determinar si Ski se redistribuye en el material genético dependiendo de la fase del ciclo celular, ya que no fue posible evaluar las placas metafásicas de estas células, sin embargo, al igual que en la línea MFC7, las imágenes que se lograron obtener de estos cultivos indicarían que Ski también se distribuye en los brazos cortos de algunos cromosomas.

Aún no se ha podido identificar los cromosomas en los cuales se localiza Ski, sin embargo, la observación en fibroblastos no transformados nos permitió determinar que Ski se distribuye en cromosomas acrocéntricos. En la línea celular MCF7, además de estar distribuida en cromosomas acrocéntricos se observa que la proteína también se encuentra ubicada en regiones (centrómero) de otros cromosomas, tanto metacéntricos como submetacéntricos. La cuantificación de cromosomas con Ski en placas metafásicas muestra que la proteína se distribuye un 51,6% en cromosomas acrocéntricos y un 48,4% en cromosomas con otra morfología, diferente a la acrocéntrica. Al evaluar los cromosomas que presentan Ski y considerando la línea celular MCF7 como de constitución genómica diploide, se observa que la distribución de la proteína depende de la morfología cromosómica, en donde Ski se encuentra más en cromosomas acrocéntricos que no acrocéntricos. Esto indica que la asociación de la proteína Ski a este grupo de cromosomas en específico, debe ser por características particulares que presentan los mismos, principalmente en la región específica donde se observa Ski (brazos cortos del cromosoma), como los genes ribosomales o ADN satelital repetitivo.

El material genético de cada célula en la línea celular MCF7 es altamente inestable, ya que ellas pueden tener un genoma hipertriploide e hipotetraploide. Considerando esto, estas células deberían tener entre 15 y 20 cromosomas acrocéntricos respectivamente, sin embargo, este rango tampoco es completamente certero, ya que los cromosomas acrocéntricos pueden reordenarse entre sí [78] formando cromosomas con diferente morfologías tanto metacéntricos como submetacéntricos. En el cariotipo que aparece en la **Figura. 19B** se pudo identificar sólo 14 cromosomas acrocéntricos con regiones NOR, por que el resto de los cromosomas acrocéntricos podrían haber experimentado reordenamientos que alteraron sus morfologías. No obstante, aún sin considerar estos posibles reordenamientos, Ski se distribuyó preferentemente en cromosomas acrocéntricos.

Respecto a las diferencias observadas para la distribución de Ski durante mitosis entre los cultivos de fibroblastos y la línea celular MCF7 podemos postular que: (1) la presencia de Ski en la línea celular MCF7 en regiones diferentes a los NOR de cromosomas acrocéntricos indicaría que Ski se encuentra en estos casos realizando una función que no tiene relación con los genes ribosomales, (2) la línea MCF7 presenta una distribución alterada de Ski debido a la transformación oncogénica experimentada, así la presencia de Ski en otros cromosomas no acrocéntricos podría deberse a los reordenamientos cromosómicos producidos en esta línea celular; y/o (3) los cambios de distribución de Ski se explicarían porque los tipos celulares estudiados pertenecen a diferentes linajes celulares, lo que se traduciría en que las distribuciones de Ski son diferentes en fibroblastos que en células de linaje epitelial.

La ubicación de Ski en cromosomas acrocéntricos es coincidente con las regiones NOR donde la asociación de UBF a estas regiones depende de la actividad transcripcional previa que tuvieron dichos genes ribosomales en la interfase anterior [61]. Independiente de esta asociación al factor transcripcional UBF, durante mitosis los genes ribosomales siempre se encuentran silentes [79]. Nuestros resultados indican que la distribución de Ski en cromosomas acrocéntricos no depende de la

presencia de UBF, aunque se distribuye con más frecuencias en cromosomas NOR que contienen UBF (69,1%) que cuando no está (30,9%).

En cromosomas acrocéntricos en donde se encuentra Ski en ausencia de UBF, la proteína Ski debería asociarse a maquinaria co-represora al igual que durante interfase, por ejemplo se ha descrito que durante interfase la metilación en los promotores de los genes ribosomales impiden la unión de UBF [36], un comportamiento análogo se podría esperar durante mitosis, en donde Ski reclute ADN metiltransferasas asociadas a genes ribosomales como Dnmt1 y Dnmt3b [70], un antecedente que refuerza estas especulaciones es que Ski es capaz de unirse a MeCP2 y facilitar el reconocimiento de ADN metilado [80], esta extensa metilación y ocupación de los promotores por Ski sería necesaria para mantener el silenciamiento transcripcional de los genes durante mitosis y/o evitar su transcripción inmediata en la interfase siguiente. Estos genes ribosomales no estuvieron transcripcionalmente activos durante la interfase previa a la mitosis, por lo cual es probable que las regiones promotoras del gen ribosomal puedan quedar expuestas a UBF, debido a que la unión al promotor es independiente de la fosforilación de UBF [51]. Esta potencial unión puede iniciar el reclutamiento de factores transcripcionales secundarios los cuales se reclutan por la acción de UBF que aún no haya sido desfosforilado, iniciando una posible transcripción anómala durante mitosis.

En los cromosomas acrocéntricos donde se encuentran ambas proteínas colocalizadas, la ubicación de la proteína Ski puede tener relación con la represión de la actividad transcripcional que se comienza a realizar en la entrada de mitosis [36]. Sin embargo, la inactivación transcripcional es independiente del estado de compactación de la cromatina, ya que la cromatina ubicada en las proximidades de la región promotora de los genes ribosomales no se silencia epigenéticamente para que factores de transcripción secundarios reclutados por UBF no puedan ingresar al promotor [81]. La inactivación transcripcional de los genes ribosomales en mitosis se realiza de dos formas: por medio de fosforilaciones dirigidas al complejo TIF-IB/SL1 mediado por cdk1/ciclina B impidiendo su unión a UBF [82], y por la pérdida de

fosforilación de UBF, lo cual enmascara distintos sitios de interacción proteína-proteína, imposibilitando el reclutamiento de factores de transcripción adicionales que permitan la interacción de la ARN polimerasa I con el promotor [83]. Existen estudios en donde se demuestra que la inhibición en vivo del complejo cdk1/ciclina B, permite la restauración de la síntesis de ARN ribosomal en células mitóticas [79].

Con respecto a la cuantificación de placas metafásicas encontramos más cromosomas que contienen Ski, que cromosomas que contienen el factor transcripcional UBF. Esto es debido a que la presencia de UBF durante mitosis está limitada por la cantidad de cromosomas acrocéntricos que tenga la célula, en seres humanos corresponden a cinco pares de cromosomas (cromosoma 13, 14, 15, 21 y 22) [84], además se debe considerar que UBF solo localiza en NOR que estuvieron activas en la interfase anterior [79]. Por lo cual en células diploides (como los fibroblastos utilizados en este estudio), el valor máximo que puede alcanzar la frecuencia de cromosomas con UBF corresponde a 10, bajo la premisa que todos los genes ribosomales estuvieron transcribiendo en la interfase previa. En MCF7 se esperaría que más cromosomas se encontraran asociados con UBF que una línea celular no transformada, sin embargo los resultados arrojaron una baja frecuencia de cromosomas con UBF y de colocalización entre ambas proteínas. Esto se refleja en el análisis total de cromosomas con Ski y UBF, los cuales indican el bajo porcentaje de Ski colocalizando con UBF en cromosomas acrocéntricos (35,4%). Sin embargo, al analizar los datos considerando sólo los cromosomas acrocéntricos que contienen Ski, encontramos una colocalización de 62,6% con UBF.

Se decidió realizar una inmunoprecipitación de cromatina para determinar si la proteína Ski se encuentra en esta región promotora de los genes ribosomales en conjunto con el factor transcripcional UBF, debido a que el rol conocido de la proteína Ski (reclutamiento de co-represores transcripcionales) se relaciona con los promotores de genes blancos en la vía TGF- β [5]. Los resultados revelaron que Ski se encuentra ausente en las regiones promotoras de los genes ribosomales durante interfase, pero presente durante mitosis, lo cual indica, que en algún momento de la interfase celular

o inicio de mitosis la proteína se redistribuyó ubicándose en regiones NOR de cromosomas nucleolares. La presencia de Ski durante mitosis en estas regiones sólo se asegura para el promotor en posición 5' del gen ribosomal, desconociéndose otras ubicándose río arriba o río debajo del gen o del promotor.

La inmunoprecipitación de cromatina corrobora las observaciones realizadas en las inmunofluorescencias indirectas realizadas en la línea celular MCF7, en donde ambos resultados demuestran que Ski no ocupa los promotores durante interfase y sólo se ubica en estas regiones durante mitosis. Imágenes de distintos planos de confocalidad indican que Ski y UBF colocalizan durante interfase y mitosis, sin embargo no se puede determinar si es una unión directa o ambas forman parte de un complejo de mayor orden. Ski al carecer de dominios de unión directa al ADN [11,12], debe ser atraído a la cromatina por proteínas que si sean capaces de unir el ADN, sin embargo, no es de excluir la posibilidad de que Ski reconozca estructuras cromatínicas como modificaciones de histonas. También cabe mencionar que UBF se encuentra presente en los promotores durante interfase y mitosis, lo cual indica que aunque la línea celular MCF7 presente una gran cantidad de reordenamientos cromosómicos, esto no afecta estructuralmente a los genes ribosomales, debido a que UBF sigue ubicándose donde normalmente debería estar, al igual como debería encontrarse en cultivos celulares no transformados.

Anormalidades en la morfología y el tamaño del nucléolo, se ha descrito hace muchos años en células transformadas [85], en donde también la proliferación celular y la actividad nucleolar están estrechamente relacionadas, tanto en células normales como cancerígenas [86]. En estas últimas al existir una proliferación descontrolada, ocurre un aumento de la tasa de crecimiento celular y biosíntesis de ribosomas [87], como ocurre en la línea celular MCF7, en donde se encontraron patrones de distribución de Ski diferentes en comparación con los cultivos de fibroblastos no transformados, tanto en interfase como en mitosis. Por lo cual, un posible rol de Ski podría estar ligado en la regulación de los genes ribosomales donde estaría

interviniendo en estos procesos, como una causa, es decir provocando la transformación celular o como una consecuencia de la misma.

Otro posible rol de Ski que no guarda relación con los genes ribosomales se desprende del hecho de que en las regiones donde se encuentra Ski, también albergan ADN satelital repetitivo (además de las regiones NOR), específicamente ADN satélite beta [88], a diferencia de las regiones centroméricas, en donde se encuentra ADN satélite alfa y tipo 2 [89].

Con estas observaciones es posible establecer que la localización de Ski en brazos cortos del cromosoma acrocéntrico podría también estar relacionada con secuencias repetitivas. En nuestro laboratorio, se encontró que Ski es capaz de asociarse a secuencias satelitales en regiones pericentroméricas de cromosomas de ratón específicamente en el satélite mayor o MaSat por su acrónimo inglés. Ski se ubica en regiones pericentroméricas compuestas por ADN satelital repetitivo (satélite mayor de ratón o satélite de ratón 4) en donde podría estar asociado a complejos co-represores disminuyendo el grado de acetilación de la H3K9, evento necesario para mantener estos residuos para su posible di o trimetilación (H3K9me2 y H3K9me3), para así favorecer la unión de HP1 y la posterior compactación de la cromatina [90]. En cromosomas acrocéntricos humanos el ADN satelital beta está formado por repeticiones de 68pb con función estructural [91], en donde Ski podría estar ubicada cumpliendo una función similar a lo observado en el modelo murino.

9. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados en conjunto nos permiten concluir que existe una asociación espacial entre los genes ribosomales de los cromosomas nucleolares con la proteína Ski en células humanas. Esta relación depende del linaje celular, donde además la transformación oncogénica podría influir en la ubicación de la proteína durante interfase y/o mitosis.

En particular para la línea tumoral MCF7 se encontró una redistribución de la proteína Ski, la cual se ausentaría de los promotores de los genes ribosomales durante interfase, probablemente debido a la alta actividad transcripcional en estas zonas en células con alta proliferación. Durante mitosis Ski se desplaza en los promotores de los genes ribosomales en algunas regiones NOR aún no identificadas independiente si estas en estas se ubica o no el factor transcripcional UBF. Nuestros hallazgos contribuyen a responder completamente la hipótesis, la cual indicaba que Ski se asocia a la maquinaria transcripcional de los genes ribosomales durante mitosis, sin embargo, aún se desconoce si existe interacción directa o indirecta entre Ski y las otras proteínas involucradas en la transcripción de genes ribosomales.

Futuras proyecciones deberán apuntar a comprobar los patrones de distribución de Ski tanto durante interfase como en mitosis, realizando experimentos de inmunofluorescencia indirecta e inmunoprecipitación de cromatina en nuevos tipos celulares que compartan las características genéticas con los linajes celulares estudiados en la presente investigación. También se debe dilucidar si el fenómeno observado es un proceso particular que guarda relación solo con la regulación transcripcional de los genes ribosomales o sí afecta a cromosomas de diferente morfología en donde no se ubican estos genes. Esto principalmente en líneas transformadas y reordenadas donde no es posible determinar certeramente en que cromosoma se encuentra Ski.

La transcripción de los genes ribosomales es un proceso estudiado ampliamente durante muchos años, en donde los cambios cualitativos y cuantitativos de la biogénesis ribosomal se relacionan directamente con cáncer. Los cambios morfológicos y funcionales del nucléolo se observan en tejidos cancerígenos debido al aumento de las necesidades metabólicas que caracterizan a las células altamente proliferantes. Por otro lado, numerosos estudios en células transformadas y no han hecho evidente que los niveles proteicos y la distribución de la proteína Ski guarda estrecha relación con su función en distintas células. Por lo cual clarificar si la proteína Ski interviene en la regulación transcripcional de los genes ribosomales, agrega una función desconocida en mitosis la cual repercutiría directamente en la conducta maligna de las células cancerosas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Li Y, Turck CM, Teumer JK, Stavnezer E. Unique sequence, ski, in Sloan-Kettering avian retroviruses with properties of a new cell-derived oncogene. *J Virol* 1986; **57**: 1065–1072.
- 2 Baranek C, Dittrich M, Parthasarathy S, Bonnon CG, Britanova O, Lanshakov D *et al.* Protooncogene Ski cooperates with the chromatin-remodeling factor Satb2 in specifying callosal neurons. *Proc Natl Acad Sci* 2012; **109**: 3546–3551.
- 3 Pearson-White S, Deacon D, Crittenden R, Brady G, Iscove N, Quesenberry PJ. The ski/sno protooncogene family in hematopoietic development. *Blood* 1995; **86**: 2146–2155.
- 4 Sutrave P, Kelly a M, Hughes SH. Ski Can Cause Selective Growth of Skeletal Muscle in Transgenic Mice. *Genes Dev* 1990; **4**: 1462–72.
- 5 Bonnon C, Atanasoski S. c-Ski in health and disease. *Cell Tissue Res* 2012; **347**: 51–64.
- 6 Berk M, Desai SY, Heyman HC, Colmenares C. Mice lacking the ski protooncogene have defects in neurulation, craniofacial, patterning, and skeletal muscle development. *Genes Dev* 1997; **11**: 2029–39.
- 7 Atanasoski S, Notterpek L, Lee H-Y, Castagner F, Young P, Ehrenguber MU *et al.* The protooncogene Ski controls Schwann cell proliferation and myelination. *Neuron* 2004; **43**: 499–511.
- 8 Macias-Silva M. Up-regulated Transcriptional Repressors SnoN and Ski Bind Smad Proteins to Antagonize Transforming Growth Factor-beta Signals during Liver Regeneration. *J Biol Chem* 2002; **277**: 28483–28490.
- 9 Liu X, Zhang E, Li P, Liu J, Zhou P, Gu D *et al.* Expression and possible mechanism of c-ski, a novel tissue repair-related gene during normal and radiation-impaired wound healing. *Wound Repair Regen* 2006; **14**: 162–171.

- 10 Nagata M, Goto K, Ehata S, Kobayashi N, Saitoh M, Miyoshi H *et al.* Nuclear and cytoplasmic c-Ski differently modulate cellular functions. *Genes to Cells* 2006; **11**: 1267–1280.
- 11 Wilson JJ, Malakhova M, Zhang R, Joachimiak A, Hegde RS. Crystal structure of the Dachshund homology domain of human SKI. *Structure* 2004; **12**: 785–792.
- 12 Wu JW, Krawitz AR, Chai J, Li W, Zhang F, Luo K *et al.* Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: Insights on Ski-mediated repression of TGF- β signaling. *Cell* 2002; **111**: 357–367.
- 13 Luo K, Stroschein SL, Wang W, Chen D, Martens E, Zhou S *et al.* The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling. *Genes Dev* 1999; **13**: 2196–2206.
- 14 Nomura T, Khan MM, Kaul SC, Dong HD, Wadhwa R, Colmenares C *et al.* Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes Dev* 1999; **13**: 412–23.
- 15 Inoue Y, Iemura S -i., Natsume T, Miyazawa K, Imamura T. Suppression of p53 Activity through the Cooperative Action of Ski and Histone Deacetylase SIRT1. *J Biol Chem* 2011; **286**: 6311–6320.
- 16 Tokitou F, Nomura T, Wadhwa R, Yasukawa T, Kohno I, Ishii S. Repression in a Dominant Negative Fashion *. 1998; : 4485–4488.
- 17 Akiyoshi S, Inoue H, Hanai JI, Kusanagi K, Nemoto N, Miyazono K *et al.* c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- β signaling through interaction with Smads. *J Biol Chem* 1999; **274**: 35269–35277.
- 18 Whitman M. Smads and early developmental signaling by the TGF β superfamily. *Genes Dev* 1998; **12**: 2445–2462.
- 19 Zhang F, Lundin M, Ristimäki A, Heikkilä P, Lundin J, Isola J *et al.* Ski-related novel protein N (SnoN), a negative controller of transforming growth factor- β signaling, is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast carcinomas. *Cancer Res* 2003; **63**: 5005–5010.

- 20 Fukuchi M, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Masuda N, Sohda M *et al.* Increased expression of c-Ski as a co-repressor in transforming growth factor- β signaling correlates with progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004; **108**: 818–824.
- 21 Heider TR, Lyman S, Schoonhoven R, Behrns KE. Ski promotes tumor growth through abrogation of transforming growth factor-beta signaling in pancreatic cancer. *Ann Surg* 2007; **246**: 61–68.
- 22 Boone B, Haspeslagh M, Brochez L. Clinical significance of the expression of c-Ski and SnoN, possible mediators in TGF- β resistance, in primary cutaneous melanoma. *J Dermatol Sci* 2009; **53**: 26–33.
- 23 Marcelain K, Armisen R, Aguirre A, Ueki N, Toro J, Colmenares C *et al.* Chromosomal instability in mouse embryonic fibroblasts null for the transcriptional co-repressor Ski. *J Cell Physiol* 2012; **227**: 278–287.
- 24 Draviam VM, Xie S, Sorger PK. Chromosome segregation and genomic stability. *Curr Opin Genet Dev* 2004; **14**: 120–125.
- 25 Macdonald M, Wan Y, Wang W, Roberts E, Cheung TH, Erickson R *et al.* Control of cell cycle-dependent degradation of c-Ski proto-oncoprotein by Cdc34. *Oncogene* 2004; **23**: 5643–5653.
- 26 Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg R a. SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 12442–12447.
- 27 Marcelain K, Hayman MJ. The Ski oncoprotein is upregulated and localized at the centrosomes and mitotic spindle during mitosis. *Oncogene* 2005; **24**: 4321–4329.
- 28 Horvath JE, Schwartz S, Eichler EE. The mosaic structure of human pericentromeric DNA: a strategy for characterizing complex regions of the human genome. *Genome Res* 2000; **10**: 839–52.

- 29 Kuznetsova I, Podgornaya O, Ferguson-Smith M a. High-resolution organization of mouse centromeric and pericentromeric DNA. *Cytogenet Genome Res* 2006; **112**: 248–255.
- 30 Mewborn SK, Lese Martin C, Ledbetter DH. The dynamic nature and evolutionary history of subtelomeric and pericentromeric regions. *Cytogenet Genome Res* 2005; **108**: 22–25.
- 31 Eckert C a., Gravidahl DJ, Megee PC. The enhancement of pericentromeric cohesin association by conserved kinetochore components promotes high-fidelity chromosome segregation and is sensitive to microtubule-based tension. *Genes Dev* 2007; **21**: 278–291.
- 32 Searle JB. Speciation , Chromosomes , and Genomes. 1998; : 1–3.
- 33 Levan a, Fredga K, Sandberg a. . Nomenclature for centromeric position at chromosomes. *Hereditas* 1964; : 201–220.
- 34 Boisvert F-M, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 574–585.
- 35 Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 1975; **53**: 37–50.
- 36 Raška I, Koberna K, Malínský J, Fidlerová H, Mašata M. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* 2004; **96**: 579–594.
- 37 Hernandez-Verdun D. Nucleolus: From structure to dynamics. *Histochem Cell Biol* 2006; **125**: 127–137.
- 38 Hadjiolov A. *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis*. 1985 doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- 39 Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DLJ. The nucleolus: Structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010; **1**: 415–431.

- 40 Thiry M, Lafontaine DLJ. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol* 2005; **15**: 194–199.
- 41 Recher L, Whitescarver J, Briggs L. The Fine Structure of a Nucleolar Constituent. 1969; **14**: 1–14.
- 42 Junéra HR, Masson C, Géraud G, Hernandez-Verdun D. The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *J Cell Sci* 1995; **108 (Pt 1)**: 3427–3441.
- 43 Scheer U, Weisenberger D. The nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 354–359.
- 44 Tschochner H, Hurt E. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 2003; **13**: 255–263.
- 45 Long EO, Dawid IB. Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 1980; **49**: 727–764.
- 46 Leary DJ, Huang S. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Lett* 2001; **509**: 145–150.
- 47 Venema J, Tollervey D. Ribosome Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev* 1999; **33**: 261–311.
- 48 Barciszewska MZ, Szymański M, Erdmann V a, Barciszewski J. Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochim Pol* 2001; **48**: 191–8.
- 49 Russell J, Zomerdijk J. The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochem Soc Symp* 2006; **73**: 203–216.
- 50 Samson J. Regulation of ribosomal gene transcription. *Biochem J* 1995; **306**: 617–626.
- 51 O’Sullivan AC, Sullivan GJ, McStay B. UBF binding in vivo is not restricted to

- regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 657–668.
- 52 Pikaard CS, McStay B, Schultz MC, Bell SP, Reeder RH. The *Xenopus* ribosomal gene enhancers bind an essential polymerase I transcription factor, xUBF. *Genes Dev* 1989; **3**: 1779–1788.
- 53 Jacob ST, Zhang J, Lalit C, Book C. Multiple functional enhancer motifs of rat ribosomal gene. 1991; : 155–162.
- 54 McStay B, Grummt I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; **24**: 131–157.
- 55 Evers R, Grummt I. Molecular coevolution of mammalian ribosomal gene terminator sequences and the transcription termination factor TTF-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 5827–31.
- 56 Kwon H, Green MR. The RNA polymerase I transcription factor, upstream binding factor, interacts directly with the TATA box-binding protein. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30140–30146.
- 57 Voit R, Schnapp a, Kuhn a, Rosenbauer H, Hirschmann P, Stunnenberg HG *et al.* The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J* 1992; **11**: 2211–2218.
- 58 Voit R, Hoffmann M, Grummt I. Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J* 1999; **18**: 1891–1899.
- 59 Voit R, Grummt I. Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 13631–13636.
- 60 Grummt I. Regulation of Mammalian Ribosomal Gene Transcription by RNA Polymerase I. *Prog Nuclea Acid Res Mol Biol* 1999; **62**: 109–154.
- 61 Roussel P, André C, Comai L, Hernandez-Verdun D. The rDNA transcription

machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* 1996; **133**: 235–246.

- 62 Roussel P, André C, Masson C, Géraud G, Hernandez-Verdun D. Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci* 1993; **104 (Pt 2)**: 327–337.
- 63 Matsui S-I, Weinfeld H, Sandberg A. Quantitative conservation of chromatin-bound RNA Polymerases I and II in mitosis. *J Cell Biol* 1979; **80**: 451–464.
- 64 Hein N, Hannan KM, George AJ, Sanij E, Hannan RD. The nucleolus: an emerging target for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2013; **19**: 643–654.
- 65 Soule HD, Vazquez J, Long a, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973; **51**: 1409–1416.
- 66 Smetana K, Freireich EJ, Busch H. Chromatin Structures in Ring-Shaped Nucleoli of Human Lymphocytes. *Exp Cell Res* 1967; **52**: 112–128.
- 67 Ikushima H, Miyazono K. TGF-beta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 415–424.
- 68 Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a Human diploid Cell Designated MRC-5. *Nature* 1970; **227**: 5–7.
- 69 Moss T, Stefanovsky VY. Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995; **50**: 25–66.
- 70 Pikaard CS, Lawrence RJ. Uniting the paths to gene silencing. *Nat Genet* 2002; **32**: 340–341.
- 71 Zhou Y, Santoro R, Grummt I. The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J* 2002; **21**: 4632–4640.

- 72 Strohner R, Nemeth A, Jansa P, Hofmann-Rohrer U, Santoro R, Längst G *et al.* NoRC - A novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *EMBO J* 2001; **20**: 4892–4900.
- 73 Grummt I, Längst G. Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 2013; **1829**: 393–404.
- 74 Ali S a., Dobson JR, Lian JB, Stein JL, van Wijnen a. J, Zaidi SK *et al.* A RUNX2-HDAC1 co-repressor complex regulates rRNA gene expression by modulating UBF acetylation. *J Cell Sci* 2012; **125**: 2732–2739.
- 75 Korobeinikova a V, Garber MB, Gongadze GM. Ribosomal proteins: structure, function, and evolution. *Biochem Biokhimiia* 2012; **77**: 562–74.
- 76 Williamson JR. After the ribosome structures: how are the subunits assembled? *RNA* 2003; **9**: 165–167.
- 77 Zhao M-L, Ueki N, Hayman M. The Ski protein negatively regulates Siah2-mediated HDAC3 degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **3**: 623–628.
- 78 Kovaleva N V, Shaffer LG. Under-ascertainment of mosaic carriers of balanced homologous acrocentric translocations and isochromosomes. *Am J Med Genet A* 2003; **121A**: 180–7.
- 79 Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* 2000; **148**: 259–270.
- 80 Kokura K, Kaul SC, Wadhwa R, Nomura T, Khan MM, Shinagawa T *et al.* The Ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem* 2001; **276**: 34115–21.
- 81 Gébrane-Younès J, Fomproix N, Hernandez-Verdun D. When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. *J Cell Sci* 1997; **110 (Pt 1)**: 2429–2440.

- 82 Heix J, Vente A, Voit R, Budde A, Michaelidis TM, Grummt I. Mitotic silencing of human rRNA synthesis: Inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J* 1998; **17**: 7373–7381.
- 83 Klein J, Grummt I. Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 6096–6101.
- 84 Henderson a S, Warburton D, Atwood KC. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; **69**: 3394–3398.
- 85 Montanaro L, Treré D, Derenzini M. Nucleolus, Ribosomes, and Cancer. *Am J Pathol* 2008; **173**: 301–310.
- 86 David-Pfeuty T. The flexible evolutionary anchorage-dependent Pardee's restriction point of mammalian cells. How its deregulation may lead to cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 2006; **1765**: 38–66.
- 87 Sulić S, Panić L, Dikić I, Volarević S. Deregulation of cell growth and malignant transformation. *Croat Med J* 2005; **46**: 622–638.
- 88 Greig GM, Willard HF. Beta satellite DNA: characterization and localization of two subfamilies from the distal and proximal short arms of the human acrocentric chromosomes. *Genomics* 1992; **12**: 573–580.
- 89 Aldrup-MacDonald ME, Sullivan B a. The past, present, and future of human centromere genomics. *Genes (Basel)* 2014; **5**: 33–50.
- 90 Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia B a, Shabanowitz J *et al.* Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 2005; **438**: 1116–1122.
- 91 Wayne JS, Willard HF. Human beta satellite DNA: genomic organization and sequence definition of a class of highly repetitive tandem DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 6250–6254.

