



“Estudio del rol del factor UBF en la expresión de poblaciones de rDNA variantes durante la adaptación estacional de *Cyprinus carpio*.”

**Tesis para optar al grado de Doctor en
Biociencias Moleculares**

Robinson Jorge Fumeron Pinilla

Director de Tesis: Dr. Marco Antonio Alvarez Santana.

Santiago-2013

Resumen

La biogénesis ribosomal es uno de los procesos cruciales a nivel celular. En la regulación de este proceso participan dos mecanismos principales: uno que involucra los factores de transcripción clásicos de la RNA polimerasa I (RNA PolI), y un segundo que consiste en el despliegue de mecanismos epigenéticos. Actualmente, existe conocimiento de que ambas vías se encontrarían íntimamente relacionadas.

En este contexto el pez *Cyprinus carpio* (carpa), presenta características especiales en cuanto a la regulación de la biogénesis ribosomal. Previamente, se ha reportado que durante el ciclo estacional este organismo debe implementar un proceso de adaptación a nivel molecular para adecuar el proceso fundamental de síntesis de ribosomas. La carpa durante la estación invernal sufre una segregación de sus componentes nucleolares, acompañada de un reordenamiento de la cromatina nucleolar, lo cual finalmente se traduce en una disminución de la expresión de los genes ribosomales. Este fenotipo celular es revertido al llegar la estación veraniega, continuando un proceso cíclico genéticamente programado denominado ***aclimatización estacional***. Estos antecedentes han permitido postular que este organismo es capaz de generar mecanismos moleculares de adaptación compensatorios frente a los cambios en su entorno. Hasta nuestro conocimiento, la carpa constituye el único organismo en donde se ha descrito y estudiado que el efecto de estímulos medioambientales es capaz de controlar la transcripción de los genes ribosomales a lo largo del ciclo estacional. Por esta razón, *C. carpio* es un extraordinario modelo de estudio tanto para el control de la biogénesis ribosomal, como para profundizar el conocimiento sobre el efecto los estímulos medioambientales en la reprogramación génica de un organismo.

En este trabajo de tesis hemos centrado nuestro estudio en la proteína UBF (*Upstream Binding Factor*). Esta proteína ha sido caracterizada como un factor de transcripción de la RNA PolI, que interviene en la formación del complejo de pre-iniciación sobre el promotor de los genes ribosomales. Sin embargo, recientemente se ha descrito que este factor también interviene ayudando a mantener la transcripción ribosomal activa. Así, otros estudios han demostrado que la proteína UBF no sólo se une al promotor del cistron ribosomal, sino que también interactúa con gran parte de la secuencia del cistron ribosomal. En este caso, UBF desempeñaría un rol fundamental en la expresión de las diferentes poblaciones de estos genes,

manteniéndolos estructuralmente en un estado activo. El conjunto de estas evidencias parece señalar a UBF como un factor central en la regulación de la transcripción de los genes ribosomales.

La hipótesis de nuestro trabajo sostiene que UBF controla la expresión diferencial del rDNA durante el proceso de aclimatación estacional del pez *Cyprinus carpio*, mediante el control de la actividad de las poblaciones variantes (V-rDNAs).

El presente trabajo se avocó en identificar cambios en la expresión de V-rDNAs durante la aclimatación de la carpa y caracterizar el efecto del factor UBF sobre el control expresión de estas poblaciones de V-rDNAs. En este trabajo logramos amplificar la secuencia de cDNA que codifica para UBF de carpa, pudiendo analizar las principales características de esta proteína. Posteriormente, mediante estudios de expresión, logramos determinar que la transcripción de UBF es regulada estacionalmente. En este contexto, pudimos establecer que existe un mayor contenido de esta proteína durante la estación de verano en comparación a la estación de invierno. Por otro lado, utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo*, determinamos que la concentración de la proteína UBF se relaciona positivamente con la actividad transcripcional de los genes ribosomales en la carpa durante su ciclo estacional. Así, logramos establecer que UBF es el responsable de mantener el estado activo del rDNA. Nuestros resultados demostraron que durante la estación invernal baja el contenido nuclear de UBF, así como su asociación al rDNA. En ese estado, la transcripción decrece a causa de una disminución de los genes ribosomales activos. En paralelo, ensayos *in vitro* demostraron que una sobreexpresión de UBF durante la estación invernal permite mantener constante la cantidad de genes ribosomales activos, aumentando así la tasa transcripcional de los mismos. Consecuentemente, estos datos sugieren que los niveles de UBF son capaces de controlar la biogénesis ribosomal en la carpa, de manera cíclica y en respuesta a los estímulos medioambientales.

Adicionalmente, hemos caracterizado y estudiado las semejanzas en el proceso de biogénesis ribosomal que ocurre en el pez *C. carpio* y la línea celular EPC (derivada de este mismo organismo). Mediante la caracterización de la dinámica nucleolar de EPC, así como de los principales factores que intervienen en la regulación de la biogénesis ribosomal, pudimos demostrar que las células EPC surge como un modelo que permite el estudio de la biogénesis ribosomal en *C. carpio* en un sistema *in vitro* desprovisto de las dificultades del modelo del animal completo.

Summary

Ribosomal biogenesis is a critical process at a cellular level. Two main mechanisms participate in the regulation of this process: one involving typical transcription factors of RNA polymerase I (RNA Pol I) and a second consisting of a display of epigenetic mechanisms. Nowadays, studies have proved that both pathways are closely related.

Cyprinus carpio (carp) has special features concerning ribosomal biogenesis regulation. It has been previously reported that during each seasonal cycle, this organism must go through an adaptation process at a molecular level in order to adjust the fundamental process of ribosomal synthesis. During winter time, the carp undergoes a segregation process of the nucleolar components along with a rearrangement of the nucleolar chromatin, which results in a decreased expression of ribosomal genes. This cellular phenotype is reverted in the summer season, thus creating a genetically programmed cyclical process known as ***seasonal acclimatization***. This suggests that this organism could generate compensatory molecular adaptation mechanisms when its environment changes. To our knowledge, modulation of ribosomal genes at a transcriptional level in response to environmental changes has been described only in carp. For these reasons, *C. carpio* represents an excellent model to study the mechanisms controlling ribosomal biogenesis, allowing us at the same time to deepen our knowledge about the effects of environmental stimuli over this and other processes.

This thesis is focused on the protein UBF (Upstream Binding Factor), one of the several factors involved in ribosomal regulation. This protein has been characterized as a transcription factor for RNA Pol I, directly intervening in the formation of the pre-initiation complex in the ribosomal gene. However, it has been recently reported that this factor also acts as a maintainer of ribosomal transcription. Other studies have shown that UBF not only binds to the promoter of the ribosomal cistron but also interacts with a large part of the ribosomal gene sequence. If that is the case, UBF might have a significant role in the expression of ribosomal genes, keeping them in a structurally active state. Overall, these allow us to suggest UBF as a central factor in the regulation of ribosomal gene transcription, and our hypothesis is that UBF differentially controls the expression of rRNA during seasonal acclimation on *C. Carpio* by controlling the activity of a variant forms of rDNA (v-rDNA).

The present work focused on the identification of changes in the expression of V-rDNAs during carp acclimation and the characterization of UBF role during this process. During this study, we achieved the amplification of the cDNA coding for UBF in carp, which allowed us to analyze the main characteristics of such protein. Subsequently and through expression studies, we determined that UBF transcription is regulated in a seasonal manner. In this scenario, we established that there is a higher content of this protein during the summer compared to the winter. Furthermore, we determined that UBF is essential to maintain the transcriptional activity of ribosomal genes in carp *in vitro* and *in vivo* during its seasonal cycle. Our results proved that the nuclear content of UBF drops in wintertime as well as its association with the ribosomal cistron. As a consequence, ribosomal transcription decreases due to a reduction of active ribosomal genes. At the same time, *in vitro* experiments showed that overexpression of UBF in winter allows to maintain a constant amount of active ribosomal genes, thus increasing their own transcriptional rate. Consequently, these data suggest that UBF levels are capable of controlling ribosomal biogenesis in carp in a cyclic manner and in response to environmental stimuli.

Additionally, we studied and characterized the similarities in ribosomal biogenesis process that occurs in *C. carpio* and in the EPC cell line (derived from the same organism). By characterizing the nucleolar dynamics as well as the behavior of the main factors involved in the regulation of ribosomal biogenesis on EPC, we proved that EPC cells are a valid model to study ribosome biogenesis in *C. carpio* without the difficulties of the whole animal model.