



Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biomedicina

Disfunción de la biogénesis de pre-mRNAs y pre-rRNAs
en motoneuronas en el modelo murino SMN Δ 7 de
atrofia muscular espinal

Directores:

Dra. Olga Tapia Martínez

Dr. Jordi Calderó Pardo

Tesis Doctoral presentada por Josep Oriol Narcís Majós
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria

Santander, enero 2019

Dña. OLGA TAPIA MARTÍNEZ, Investigadora postdoctoral de CIBERNED adscrita al Departamento de Anatomía y Biología Celular de la UC, y D. JORDI CALDERÓ PARDO, Catedrático del Area de Biología Celular del Departamento de Medicina Experimental de la Universidad de Lleida.

CERTIFICAN:

Que D. Josep Oriol Narcís Majós, graduado en Biotecnología, ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: "Disfunción de la biogénesis de pre-mRNAs y pre-rRNAs en motoneuronas en el modelo murino SMN Δ 7 de Atrofia Muscular Espinal".

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

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Santander, a 23 de Enero de 2019.

Fdo. Olga Tapia Martínez

Fdo. Jordi Calderó Pardo

Esta Tesis ha sido financiada con las siguientes ayudas:

- Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto de investigación BFU2014-54754-P.
- Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas. Red CIBERNED CB06/05/0037.
- Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla. Proyecto de investigación NVAL17/22.

Agradezco, en primer lugar, a mis directores de Tesis, la Dra. Olga Tapia por todo el apoyo científico, moral y el gran compañerismo que ha hecho que mi tesis doctoral haya sido una experiencia única a nivel científico y personal. Al profesor Jordi Calderó, gracias por abrirme camino en el mundo de la Neurociencia y por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

A a mi tutor el profesor Juan Hurlé por sus consejos y apoyo en el desarrollo del proyecto de Tesis Doctoral.

La realización de esta Tesis no habría podido ser posible sin el enorme apoyo recibido por la profesora Maite Berciano, una persona brillante a quien agradezco profundamente su implicación, paciencia y sobretodo haberme transmitido su pasión por la Ciencia y la Biología Celular. Es admirable que, pese a todas las circunstancias, siga trabajando con la misma pasión de siempre para avanzar en el conocimiento de la enfermedad de la atrofia muscular espinal.

A su vez, al profesor Miguel Lafarga por su gran dedicación hacia mi aprendizaje y progresión como científico, un profesor excepcional quien me ha instruido, con total fascinación, en el complejo mundo de la Biología Celular.

Al Dpto. de Anatomía y Biología Celular donde he realizado mi trabajo investigador. De modo especial a Juan Antonio Montero, a Raquel García Ceballos por su calidad humana y su imprescindible ayuda en las técnicas de microscopía electrónica. Gracias, también a Sonia, Susana, Montse, Julia, Icardo y al resto del Departamento por el acogimiento recibido.

Al laboratorio de las profesoras Carmen Martínez-Cué y Noemí Rueda por haberme acogido con los brazos abiertos durante mi última etapa doctoral. A Eva por todos sus sabios consejos profesionales y, en especial, personales.

También quiero agradecer su ayuda, consejos y recursos al alcance del laboratorio de la profesora Maruja Hurlé de la Facultad de Medicina y a las profesoras Elena Castro y Fuencisla Pilar del IBBTEC. Incluyo en este agradecimiento, por supuesto, a todo su equipo que en algún momento me han prestado su ayuda con una sonrisa: Raquel García López, gracias por los consejos sobre el futuro, Mónica, Nieves y Ana.

Al equipo del IRBLleida, Olga, Lidia y Sara por su gran colaboración y su increíble labor como investigadoras en el extenso mundo de las enfermedades de la motoneurona.

A todos mis compañeros y amigos que he conocido durante esta etapa de mi vida en Santander, por los buenos momentos tanto dentro como fuera del laboratorio. A Jorge, que me allanó el terreno en el laboratorio y que es una de las

personas que más me han hecho reír, a Cris con la que he pasado tantas horas charlando hasta las mil en la biblioteca del departamento.

A Rachel con la que he compartido tantas cosas como saber apreciar una buena hamburguesa y he pasado tan buenos momentos. Hemos estado a la par en la última y más difícil etapa de la Tesis. A mi confidente María por hacerme reír tanto. A mi amiga AnaB, una amiga con personalidad propia y con la que he conectado tanto, no cambies!.

A Nacho por los planes que siempre compartimos, a Vero una super-compañera de laboratorio y colega, siempre dispuesta a ayudar, con la que he pasado innumerables horas discutiendo sobre la vida. A "Su", por su buen rollo y hacerme sentir que puedo con todo!.

A mi super-pinche Alba que me ha seguido allá donde fuera y nos hemos puesto en forma con todos los km recorridos por la facultad, a Marisol por ser mi compañera de grupo e iluminar el laboratorio con su felicidad y alegría.

A "Ful" y Dani mis compañeros "Frizantes" con los que he compartido uno de los mejores congresos a los que he ido, al club de surfistas Agus, Nuria y Helen. A Emilio por su carácter y buen rollo, a Alexia y "Ale" dos compañeras de laboratorio geniales que siempre me han ayudado cuando me hacía falta. Y, en especial a Eva, la primera persona que conocí en Santander, la mejor surfista que conozco y una de las mejores personas que he conocido "moltes gràcies per ser com ets".

"Als amics de sempre de Lleida, gràcies per lo molt que m'aprecien i que em fan veure lo lluny que es pot arribar amb l'esforç necessari. Als meus pares i germà, que, malgrat estar lluny de casa sempre em recorden lo molt que m'estimen i tot el suport que em donen des de Lleida, us estimo."

A toda mi familia y amigos,

Gracias

"What's past is prologue".

William Shakespeare.

The Tempest.

Índice

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Anatomía y biología celular del sistema motor.....	7
1.1.1 Control del movimiento motor voluntario.....	7
1.1.2 Las motoneuronas espinales alfa (MN α).....	10
1.2 Biología del núcleo y citoplasma celular.....	12
1.2.1 El núcleo celular.....	13
1.2.1.1 Dominio cromatínico.....	14
1.2.1.2 Dominio intercromatínico.....	19
<i>El cuerpo nuclear de Cajal (CB)</i>	20
<i>El nucleolo</i>	24
<i>Granulaciones intercromatínicas o "speckles" nucleares</i>	28
1.2.2 El citoplasma de la MN α	29
1.3 La proteína de supervivencia de las motoneuronas (SMN).....	30
1.3.1 El complejo SMN.....	32
1.3.2 Papel funcional del complejo SMN en la biogénesis de snRNPs.....	34
1.4 La atrofia muscular espinal (SMA).....	37
1.4.1 Epidemiología y características clínicas y fenotípicas de la SMA.....	40
1.4.2 Bases genéticas de la SMA.....	41
1.5 Planteamiento del trabajo.....	44
2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1 Animales de experimentación.....	53
3.1.1 Genotipado de los animales.....	53
3.1.2 Obtención y procesamiento del tejido biológico.....	54
3.1.2.1 Extracción de médula espinal.....	55
3.1.2.2 Técnica de perfusión.....	55
3.1.2.3 Obtención de disociados neuronales.....	56
3.2 Técnicas de Biología Celular.....	56
3.2.1 Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	56

3.2.2 Hibridación <i>in situ</i> de la cola de poli(A) de los mRNAs.....	58
3.3 Técnicas de microscopía electrónica.....	59
3.3.1 Inclusión en Araldita.....	59
3.3.2 Inclusión en Lowicryl.....	60
3.3.3 Inmunocitoquímica ultraestructural.....	61
3.3.4 Ensayo de transcripción <i>in situ</i> a nivel ultraestructural.....	62
3.4 Técnicas de Biología Molecular.....	59
3.4.1 Análisis de expresión génica con PCR cuantitativa a tiempo real.....	63
3.4.1.1 Extracción del RNA total.....	63
3.4.1.2 Retrotranscripción.....	64
3.4.1.3 Diseño de oligonucleótidos cebadores para PCR cuantitativa.....	64
3.4.1.4 PCR cuantitativa a tiempo real.....	66
3.4.1.5 Cuantificación y análisis de la expresión génica relativa.....	67
3.4.2 Análisis de proteínas por western blot (WB).....	67
3.4.2.1 Extracción y valoración de proteínas.....	68
3.4.2.2 Electroforesis e “immunoblotting”.....	68
3.5 Análisis cuantitativo y estadístico.....	69
4. RESULTADOS.....	73
4.1 Bases celulares de la disfunción en el metabolismo del RNA en MN α del ratón SMN Δ 7: alteraciones de los CBs y del nucleolo.....	75
4.1.1 Disrupción de CBs y relocalización nucleolar de la coilina en las MN α	76
4.2.2 Las MN α del ratón SMN Δ 7 presentan graves alteraciones en el “splicing” de los pre-mRNAs.....	81
4.1.3 Reorganización estructural, molecular y funcional del nucleolo en las MN α -SMN Δ 7.....	82
4.2 Acumulación de RNAs poli(A) en gránulos nucleares en las MN α del ratón SMN Δ 7	92
4.2.1 En las MN α -SMN Δ 7, los mRNAs poliadenilados se relocalizan en gránulos nucleares de poli(A) RNAs.....	93
4.2.2 Los PARGs son un compartimento nuclear con identidad propia.....	96
4.2.3 Los PARGs concentran la proteína de unión al RNA Sam68.....	97

4.2.4 Los PARGs enriquecidos en Sam68, no concentran otras proteínas implicadas en el procesamiento y exportación de los mRNAs.....	99
4.1.5 El déficit de SMN induce alteraciones citoplasmáticas en la maquinaria de síntesis proteica en MN α -SMN Δ 7.....	102
5. DISCUSIÓN.....	105
5.1 Disfunción de los CBs y del nucleolo en las MN α del ratón SMN Δ 7.....	107
5.1.1 Pérdida de CBs canónicos en las MN α	107
5.1.2 Disrupción de la interacción CB-Nucleolo.....	108
5.1.3 Relocalización de la coilina en casquetes perinucleolares y en el nucleolo.....	110
5.1.4 El déficit de SMN induce alteraciones del "splicing" mayor y menor en la médula espinal del ratón SMN Δ 7.....	111
5.1.5 Alteraciones nucleolares.....	112
5.2 Disfunción del procesamiento de mRNAs poliadenilados en las MN α del ratón SMN Δ 7.....	115
5.2.1 Caracterización estructural y molecular de los PARGs.....	116
5.2.2 Los PARGs concentran el factor regulador del "splicing" Sam68.....	117
5.2.3 Alteraciones de la maquinaria de síntesis de proteína.....	119
6. CONCLUSIONES.....	123
7. BIBLIOGRAFÍA.....	127
8. ARTÍCULOS.....	149

Abreviaturas



5´-FU: 5´-Fluoruridina
53BP1: *Tumor suppressor p53-binding protein 1*
ACh: Acetilcolina
ASOs: *Antisense oligonucleotides*
CB: *Cajal bodies*
CF: Centro fibrilar del nucleolo
CFD: Componente fibrilar denso del nucleolo
CG: Componente granular del nucleolo
Chat: Acetilcolina transferasa
CTCF: *11-zinc finger protein* o *CCCTC-binding factor*
DNA: Ácido desoxirribonucleico
ELA: Esclerosis lateral amiotrófica
gDNA: DNA genómico
GT: Ganglio del trigémino
H1: Histona 1
Hi-C: *High-throughput chromosome conformation capture*
hnRNPs: Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
HP1: Proteína de la heterocromatina 1
IGCs: Granulaciones intercromatínicas
INoBs: Cuerpos intranucleolares
IP: Ioduro de propidio
MN α : Motoneurona/s alfa
MN γ : Motoneurona/s gamma
mRNA: RNA mensajero
ncRNA: *Non-coding RNA*
Nolo: Nucleolo
NOR: Región organizadora nuclear
OPMD: *Oculopharyngeal muscular dystrophy*
PABPN1: *Poly(A) binding protein nuclear 1*
PARG: *Poly(A) RNA granules*
PML: *Promyelocytic leukemia protein*

Pol I: RNA polimerasa I
R-Ach: Receptor de la acetilcolina
rDNA: DNA ribosomal
RER: Retículo endoplasmático rugoso
RNA: Ácido ribonucleico
rRNA: RNA ribosomal
RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa y a tiempo real
scaRNAs: *small Cajal body RNAs*
siRNA: *small interference RNA*
SMA: Atrofia muscular espinal
SMN: *Survival motor neuron protein*
SNC: Sistema nervioso central
SNP: Sistema nervioso periférico
snoRNPs: Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas
snRNPs: Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
SRP: Ribonucleoproteína de reconocimiento de señal
SUMO1: *Small Ubiquitin-like modifier-1*
TAD: Dominios de asociación topológica
TBP: *TATA binding protein*
TDP43: *TAR DNA-binding protein 43*
UBF: *Upstream binding factor*
Unrip: *UNR-interacting protein*
UPS: Sistema ubiquitina proteasoma
UsnRNAs: RNAs pequeños enriquecidos en Uridinas
WB: *Western blot*

1. Introducción

1.1 ANATOMIA Y BIOLOGIA CELULAR DEL SISTEMA MOTOR

1.1.1 Control del movimiento motor voluntario

El movimiento muscular voluntario y consciente, fundamental para la vida de relación del ser humano con el medio que lo rodea, está rigurosamente regulado por redes de neuronas motoras situadas en

el sistema nervioso central (SNC) motor. Este sistema se organiza en tres niveles neuroanatómicos: i) el nivel inferior, incluye las motoneuronas del asta anterior de la médula espinal y de los núcleos motores troncoencefálicos; ii) el nivel intermedio contiene los núcleos del tronco del encéfalo, los ganglios basales y el cerebelo; y, finalmente en el superior, el nivel más alto de la jerarquía motora, la corteza cerebral, se ubican las motoneuronas corticales o superiores (Fig. 1).

Asimismo, el movimiento motor voluntario requiere de la cooperación del sistema nervioso periférico sensorial que garantiza el control involuntario, postural, del equilibrio y de la respuesta refleja (Ojeda-Sahagún & Icardo de la Escalera, 2005; García-Porrero & Hurlé, 2015) (Fig. 1 y 2).

Desde un punto de vista funcional, el movimiento motor se clasifica en tres categorías: reflejo, rítmico y voluntario. El primero es automático, de contracción y relajación muscular rápida e involuntaria. Se produce en respuesta a estímulos periféricos (por ejemplo, retirar la mano de algo que quema). El movimiento rítmico o estereotipado consiste en secuencias de contracciones y relajaciones musculares repetidas. Requiere el control voluntario tanto en el inicio como en la terminación (un ejemplo, la masticación). Finalmente, el movimiento voluntario se realiza de modo consciente con el fin de conseguir un

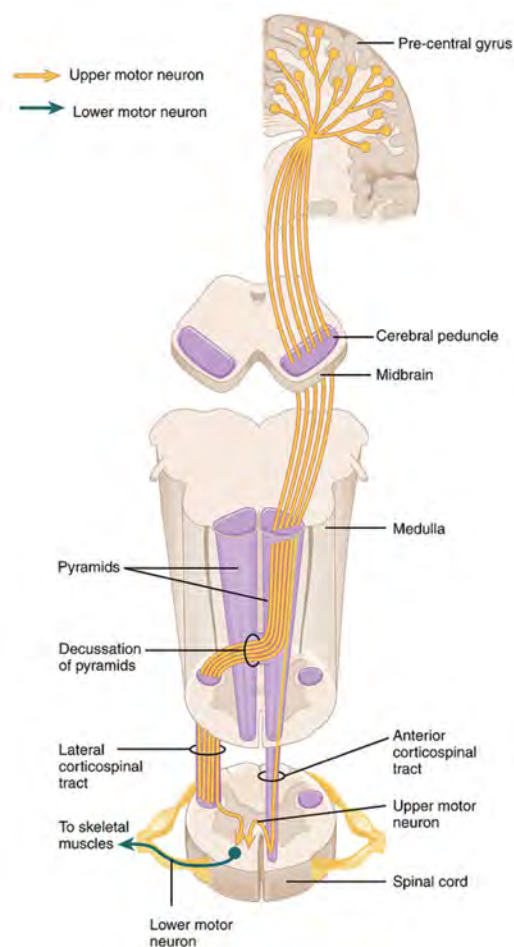


Figura 1. Red neuronal del circuito motor organizado en tres niveles anatómicos, el nivel inferior, el medio y el superior. La imagen ha sido tomada de Anatomy & Physiology, Connexions Web site. <http://cnx.org/content>.

El primero es automático, de contracción y relajación muscular rápida e involuntaria. Se produce en respuesta a estímulos periféricos (por ejemplo, retirar la mano de algo que quema). El movimiento rítmico o estereotipado consiste en secuencias de contracciones y relajaciones musculares repetidas. Requiere el control voluntario tanto en el inicio como en la terminación (un ejemplo, la masticación). Finalmente, el movimiento voluntario se realiza de modo consciente con el fin de conseguir un

objetivo concreto (por ejemplo, tocar un instrumento musical). Requiere aprendizaje, planificación elaborada y control preciso. En su correcto desarrollo participan los centros supraespinales del tronco del encéfalo y las áreas motoras superior e inferior. Las motoneuronas superiores o corticales integran la información muscular que, una vez elaborada, se transmite a las motoneuronas inferiores (espinales) situadas en la asta anterior de la médula espinal contralateral. Estas son las responsables finales del control motor y configuran el sistema de proyección que fluye centrífugamente desde la médula espinal del SNC hasta los músculos esqueléticos a través de los nervios periféricos (SNP) (Ojeda-Sahagún & Icardo de la Escalera, 2005) (Fig.2).

Anatómicamente, la médula espinal es un cordón de tejido nervioso, con morfología cilíndrica, largo y localizado en el canal vertebral. De ella emergen 31 pares de nervios raquídeos que inervan la mayoría de los músculos esqueléticos, los músculos lisos y las glándulas. La médula espinal presenta en su recorrido dos engrosamientos, uno a nivel cervical y otro en la región lumbo-sacra. El primero transmite la sensibilidad y acción motora hacia los miembros superiores (brazo, antebrazo y mano). Por su parte, el engrosamiento lumbo-sacro es responsable de la sensibilidad y acción motora hacia los miembros inferiores (muslo, pierna y pie).

En todo su recorrido la médula espinal presenta en las secciones anatómicas transversales una organización muy similar: la sustancia gris, situada en la región central adoptando una forma de mariposa, y la sustancia blanca, formando una banda periférica a su alrededor. Las proyecciones dorsales de la sustancia gris se denominan astas posteriores, y las prolongaciones ventrales, donde se localizan las motoneuronas, más anchas y redondeadas, forman las astas anteriores. A su vez, en el asta anterior las motoneuronas incluyen dos categorías, las extrafusales alfa ($MN\alpha$) y las intrafusales gamma ($MN\gamma$) (Fig. 2).

Las $MN\alpha$ inervan las fibras musculares estriadas esqueléticas (miofibras) controlando su contracción/relajación. Sus somas son de gran tamaño (>90 micras de diámetro) y, junto con su árbol dendrítico, se sitúan en el asta anterior de la médula espinal. Sus axones, abandonan el SNC por la raíz anterior y discurren por los nervios periféricos hasta alcanzar sus dianas postsinápticas, el sarcolema (membrana celular) de las miofibras esqueléticas. El axón está muy mielinizado y forma una fibra nerviosa de gran calibre. Al llegar a la superficie de las miofibras, se

resuelve en varias ramas terminales, cada una de las cuales establece un contacto sináptico sobre el sarcolema de una miofibra formando una unión neuromuscular o placa motora (Fig. 2). El conjunto de la $MN\alpha$ junto con todas las miofibras esqueléticas que inerva su axón se denomina unidad motora (Stifani, 2014) (Fig. 2). Las $MN\gamma$ se entremezclan espacialmente con las $MN\alpha$. Difieren de éstas por su menor tamaño (<30 micras de diámetro somático) y porque sus axones son delgados y poco mielinizados. Como en el caso fibras nerviosas de las $MN\alpha$, sus fibras nerviosas se incorporan a las raíces anteriores de los nervios espinales hasta alcanzar e inervar las miofibras que configuran los husos neuromusculares situados en el vientre muscular. Funcionalmente, las miofibras intrafusales actúan de receptores sensoriales detectando cambios en la longitud muscular (tono muscular). Su información se transmite centripétamente, por las neuritas de las neuronas sensitivas posteriores hasta alcanzar el ganglio dorsal del SNC motor (Fig. 2).

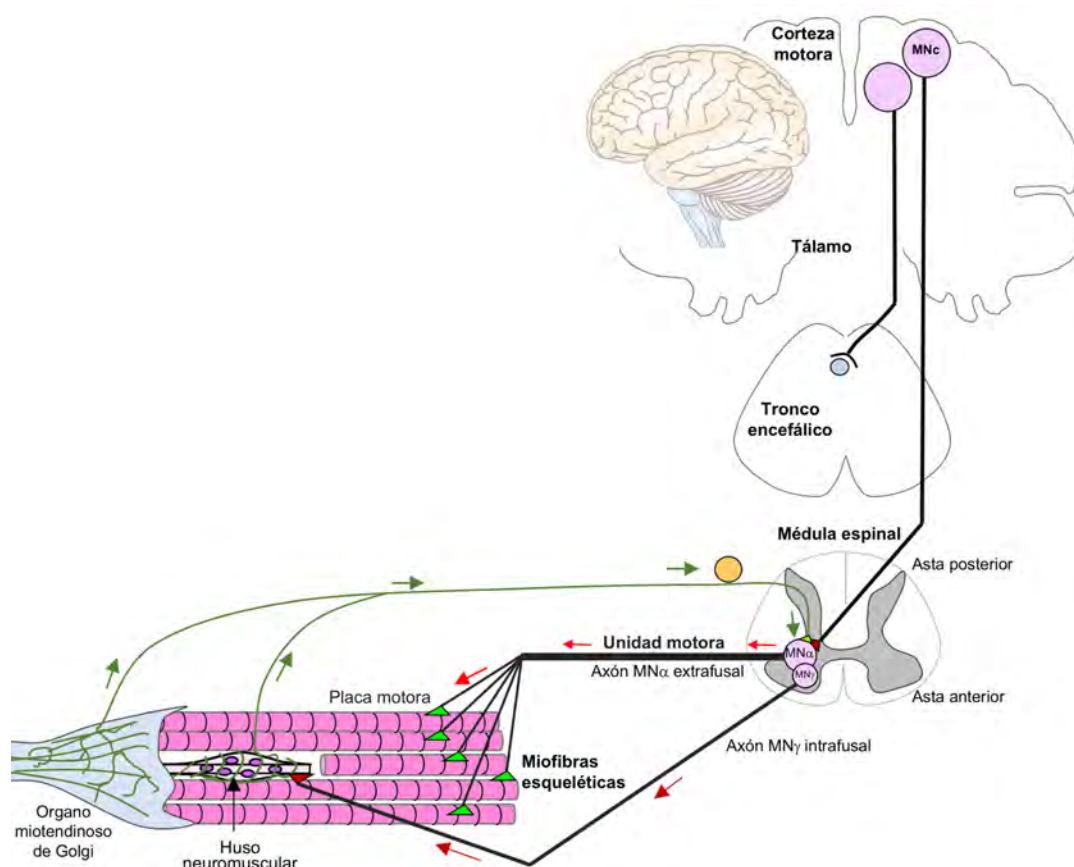


Figura 2. Circuito motor. La motoneurona cortical del tracto córtico-espinal, de curso descendente, establece contacto sináptico con la motoneurona espinal alfa extrafusilar ($MN\alpha$). Su axón se ramifica emitiendo varias placas motoras, cada una de las cuales establecen un contacto sináptico con el sarcolema de una miofibra. Las $MN\gamma$ intrafusales inervan el huso neuromuscular cuya información es transmitida por la neurona sensitiva hasta la $MN\alpha$ regulado el tono muscular. Esquema cedido por la profesora Berciano.

1.1.2 Las motoneuronas espinales alfa ($MN\alpha$)

Las $MN\alpha$ tienen una entidad diferente de las corticales, no solo por la ubicación del soma neuronal, sino también porque su diana postsináptica, las miofibras esqueléticas, están fuera del SNC. Además, utilizan diferente neurotransmisor y, en respuesta a una lesión, generan diferentes síntomas clínicos (ver Stifani, 2014). En secciones histológicas del asta anterior de la médula espinal, las $MN\alpha$ y $MN\gamma$ forman agrupaciones de 15-20 células. Son fácilmente identificables ya que sus somas son de mayor tamaño que el resto de las células del neuropilo (Fig. 3A). Ambos tipos de motoneuronas muestran núcleos grandes, eucromatínicos y sus nucleolos son muy prominentes debido a su elevada actividad transcripcional. No obstante, las $MN\alpha$ (extrafusales) pueden diferenciarse de las $MN\gamma$ (intrafusales) por su mayor tamaño (>de 90 micras de diámetro) y por ser muy positivas al marcaje de la proteína nuclear NeuN si se compara con las $MN\gamma$. Estas no superan las 30 micras de diámetro y son sutilmente positivas a NeuN (Friese et al., 2009) (Fig. 3A-B). Nosotros, en el presente proyecto de Tesis Doctoral, vamos a centrar nuestro interés en las $MN\alpha$ situadas en la dilatación lumbar de la médula espinal.

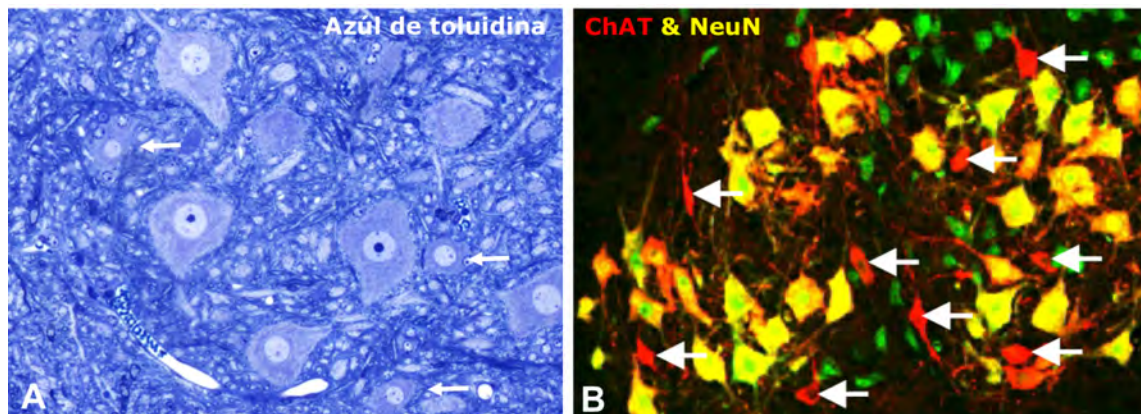


Figura 3. Motoneuronas alfa y gamma en la médula espinal. A, La sección semifina ilustra un agregado de motoneuronas muy grandes pero con diferencias en el tamaño somático. Las más grandes son $MN\alpha$ y las señaladas con flechas blancas pueden corresponder a $MN\gamma$. B, Todas las motoneuronas expresan Acetilcolina transferasa (ChAT, rojo) pero, mientras que las $MN\alpha$ son muy inmunopositivas al marcado NeuN (amarillas) las $MN\gamma$ son prácticamente negativas (flechas blancas). La imagen B ha sido tomada de Friese et al., 2009; doi: 10.1073 pnas.0906809106.

Es preciso comentar que, a su vez, entre las $MN\alpha$ hay diferencias en su capacidad bioeléctrica. Esta variabilidad está directamente relacionada con el tamaño de las unidades motoras que configuran o lo que es lo mismo, con el número de placas motoras que emite el axón. En este contexto, podemos diferenciar entre unidades motoras grandes y pequeñas. En estas últimas los somas

de las MN α no superan las 50 micras de diámetro, disponen de axones poco mielinizados y forman pocas placas motoras. La velocidad de conducción del impulso nervioso es baja y su diana postsináptica son miofibras pequeñas de tipo 1 (rojas), aeróbicas de contracción lenta y resistentes a la fatiga (Fig. 4A). Son responsables del mantenimiento de la postura corporal. Por su parte, las unidades motoras denominadas grandes, las configuran MN α con un soma muy voluminoso (hasta de 90 micras), con un árbol dendrítico muy desarrollado. Sus axones, de gran calibre, muy mielinizados y con una velocidad de conducción muy alta, dan lugar a un elevado número de placas motoras que inervan miofibras gruesas de tipo 2. Estas miofibras son blancas y tienen un metabolismo eminentemente anaeróbico. Son necesarias en los músculos que requieren contracción forzada y rápida (por ejemplo, los músculos necesarios para correr) (Tripodi & Arber, 2012) (Fig. 4B).

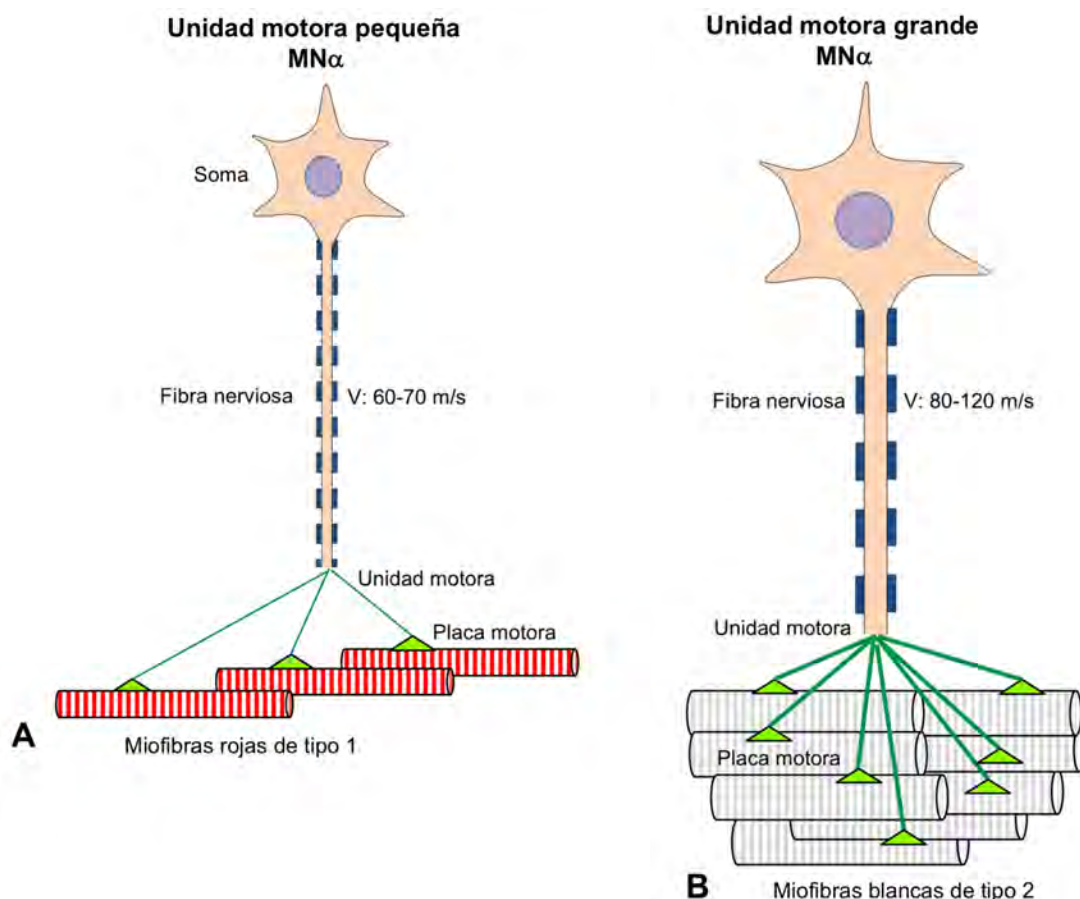


Figura 4. Unidades motoras. A, MN α pequeña que da una unidad motora que inerva pocas miofibras. Su axón es de conducción lenta y las miofibras postsinápticas son rojas. B, MN α de gran tamaño y de conducción rápida que configura una unidad motora que emite muchas placas motoras. Las miofibras inervadas son blancas. Esquemas cedidos por la profesora Berciano.

En la unión neuromuscular, las placas motoras se imprimen sobre surcos establecidos en el sarcolema de las miofibras (Fig. 5). Estas interdigitaciones son un sistema de amplificación de la superficie sináptica y, consecuentemente, favorecen la transmisión del impulso nervioso. La sinápsis neuromuscular la forman los tres elementos sinápticos convencionales, el presináptico, el post-sináptico y, entre ambos, la hendidura sináptica. El elemento presináptico de la placa motriz alberga numerosas vesículas sinápticas que almacenan el neurotransmisor acetilcolina (ACh), específico de las MN α . Se estima que cada vesícula almacena de 5.000 a 10.000 moléculas de ACh y, a su vez, el contenido de una vesícula se conoce como "quantum". Por su parte, la superficie post-sináptica, el sarcolema de la miofibra, recluta numerosos receptores para la Ach (R-ACh). Está revestida por la lámina basal continua que recubre la superficie de la miofibra. Finalmente, la hendidura sináptica, delimitada por ambas membranas, la presináptica (axonal) y la postsináptica (sarcolema), es un espacio virtual de aproximadamente 50nm, que incluye la lámina basal de la miofibra, través de la cual difunde la ACh (Hughes et al., 2006; Hirsch, 2007) (Fig. 5).

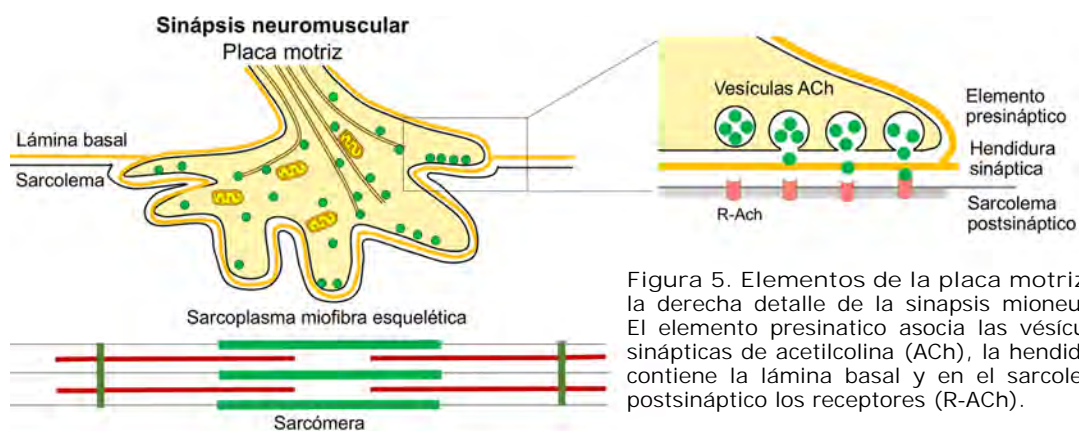


Figura 5. Elementos de la placa motriz. A la derecha detalle de la sinápsis mioneural. El elemento presinático asocia las vesículas sinápticas de acetilcolina (ACh), la hendidura contiene la lámina basal y en el sarcolema postsináptico los receptores (R-ACh).

1.2 BIOLOGIA DEL NUCLEO Y DEL CITOPLASMA CELULAR

Es bien conocido que en las células postmitóticas la actividad metabólica está directamente relacionada con el tamaño celular (Schneider & Grosschedl, 2007). En este sentido, el enorme tamaño de las MN α (sus axones pueden tener hasta un metro de longitud) justifica su gran volumen nuclear y citoplasmático y, consecuentemente, su actividad transcripcional tanto para producir mRNAs como rRNAs. Esta actividad es esencial para mantener la correcta proteostasis y supervivencia neuronal. Por lo tanto, no es sorprendente que la desregulación de la transcripción y procesamiento de

RNAs sea muy importante en cuadros neurodegenerativos, como la atrofia muscular espinal (SMA, del inglés *spinal muscular atrophy*) que afecta a las MN α (Tislade & Pellizzoni, 2015).

1.2.1 El núcleo celular

Los estudios modernos de Biología Celular y Molecular *in situ* demuestran que la arquitectura del núcleo durante la interfase incluye dos dominios estructurales y funcionales diferentes. Estos se denominan territorio cromosómico o cromatínico y territorio intercromosómico o intercromatínico. La proporción que cada uno ocupan en el volumen nuclear esta relacionada con los requerimientos de transcripción y traducción de las células (Cremer & Cremer, 2006; Cremer et al., 2006). En el dominio cromatínico, cada cromosoma ocupa un determinado subvolumen en el espacio nuclear. Su tamaño depende de la cantidad de DNA que contenga y de su estado de compactación o relajación. En el caso de las MN α , con una expresión génica muy elevada, la cromatina potencialmente activa (eucromatina) constituye la fracción más importante del volumen nuclear. En el territorio intercromosómico se localizan varios cuerpos nucleares, desprovistos de membrana limitante, principalmente implicados en la regulación de la expresión génica y en el procesamiento de los transcritos primarios de los RNAs. Éstas incluyen el nucleolo, los cuerpos nucleares de Cajal (CBs), los cuerpos de los *locus* de histonas, los "speckles" y "paraspeckles" y los cuerpos PML (*promyelocytic leukemia bodies*) (Lafarga et al., 2002; Boisvert et al., 2007; Mao et al., 2011) (Fig.6).

El genoma se mantiene aislado del citoplasma por la envoltura nuclear constituida por una membrana doble, la interna (nuclear) y la externa (citoplasmática). La hoja externa se continúa con el retículo endoplásmico rugoso (RER) del citoplasma con el que comparte una organización proteica muy similar. La membrana interna posee proteínas asociadas, altamente específicas, necesarias para establecer interacciones moleculares con los cromosomas y con el citoesqueleto de filamentos intermedios tipo V que configuran la lámina densa nuclear. La composición molecular de la membrana interna es un factor determinante en la citoarquitectura de los cromosomas en la interfase (Cremer & Cremer, 2001). Ambas membranas se fusionan en numerosos sitios generando poros nucleares. Los poros nucleares son macrocanales acuosos constituidos por complejos proteicos de nucleoporinas. Son estructuras muy dinámicas implicadas en

diversos procesos celulares, tales como la organización del citoesqueleto de la lámina nuclear, el control de la expresión génica y la regulación del tráfico bidireccional selectivo entre el núcleo y el citoplasma (para revisión ver Gerace & Tapia, 2018).

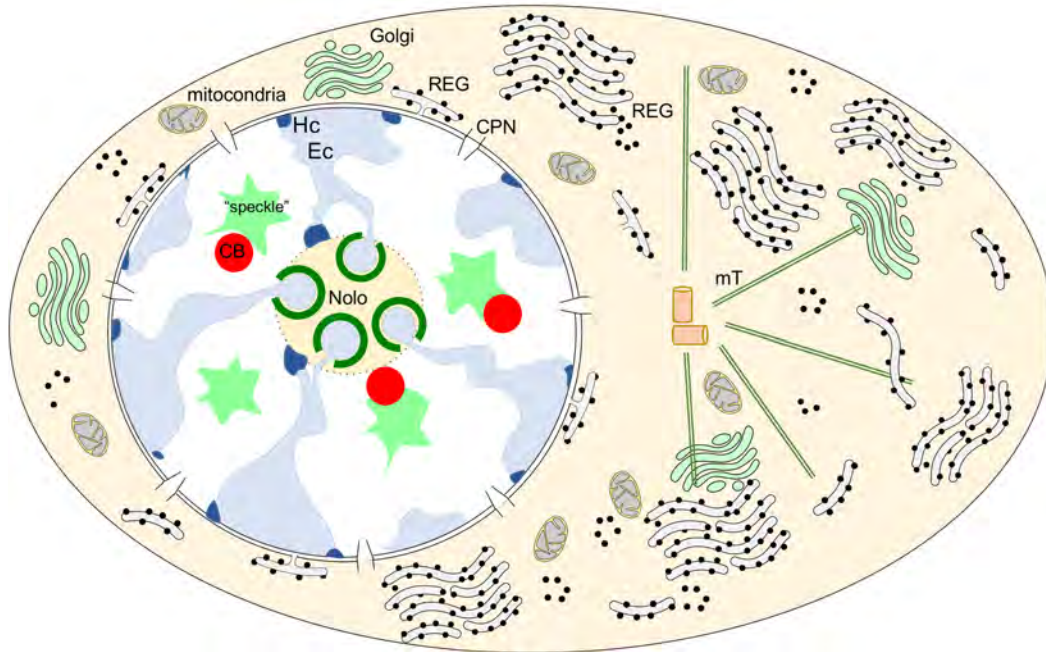


Figura 6. Prototipo teórico de una MNa sobre la que se han representado los compartimentos del núcleo y del citoplasma. En el núcleo se ilustra el dominio cromosómico, la euromatina (Ec, gris pálido) ocupa la gran parte si se compara con la heterocromatina (Hc, azul oscuro). En el dominio intercromatínico se dibujan, el nucleolo (Nolo), "Cajal bodies" (CBs) y los "speckles" nucleares. En la envoltura nuclear los complejos de los poros nucleares (CPN).

1.2.1.1 Dominio cromatínico

Ha pasado más de un siglo desde que Rabl y Boveri propusieron que en los núcleos interfásicos de las células eucariotas cada cromosoma ocupaba un territorio predeterminado (Rabl, 1885; Boveri, 1909). Posteriormente, el concepto de territorio cromosómico fue sustituido por otro modelo alternativo en el que, los cromosomas se entremezclaban al azar sin un orden establecido (Wischnitzer, 1973). En la actualidad, los avances tecnológicos han restablecido y consolidado definitivamente el modelo que determina que cada cromosoma tiene un territorio propio e independiente (Cremer & Cremer, 2010). Un aspecto esencial en el estudio de la cromatina es conocer los distintos niveles de plegamiento del DNA y su asociación con histonas y proteínas no histonas. Las reconstrucciones tridimensionales por cristalografía del DNA han demostrado que el DNA no está desnudo sino que, se organiza alrededor de una partícula central de histonas que

configuran el nucleosoma, la unidad estructural básica de la cromatina. El nucleosoma contiene un octámero de histonas, dos dímeros de H3-H4 y dos de H2A-H2B (McGinty & Tan, 2015) (Fig. 7A). Las histona nucleosomales se organizan en dos dominios, una región globular central muy plegada, de interacción con el DNA y un dominio N-terminal libre de entre 15-130 residuos (colas). Las colas de las histonas salen del nucleosoma y están desplegadas. Son muy flexibles y experimentan modificaciones postraduccionales que, de forma reversible, modifican la estructura y la función de la cromatina. En su conjunto, los nucleosomas son unidades estructuralmente muy estables, pero funcionalmente muy dinámicos. Contribuye en esta plasticidad inherente la histona H1, una proteína extranucleosomal que conecta los extremos libres del DNA nucleosomal. Al conjunto de la histona H1 y el nucleosoma se le denomina cromatosoma. Estudios recientes de criomicroscopía electrónica han demostrado que cuando los extremos del DNA nucleosomal interactúan con la proteína H1 el nucleosoma adopta una conformación compacta, rígida y silente, mientras que la disociación de la histona H1 del DNA causa un cambio conformacional que lo hace más abierto y flexible favoreciendo la transcripción de RNAs (Bednar et al., 2017) (Fig. 7B).

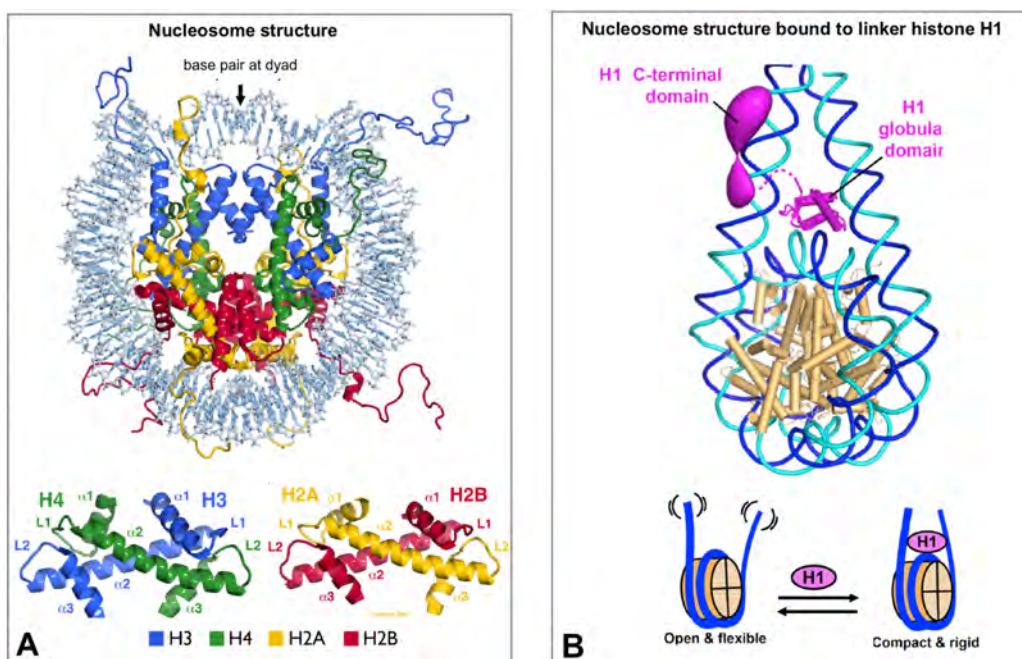


Figura 7. El nucleosoma y el cromatosoma. A, Se representan las cuatro histonas con una zona central globular y los extremos N-terminales desplegados. (esquema tomado de McGinty & Tan, 2014; doi: 10.1021/cr500373h). B, Cromatosoma en el que se ilustra como la histona 1 (H1) se une al DNA nucleosomal. En la parte inferior se muestra como el desensamblaje de la H1 abre el nucleosoma y su unión lo cierra. (Tomado de Bednar et al., 2017; doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.012).

Clásicamente se ha considerado que la cromatina, el complejo formado por el DNA junto con las histonas nucleosomales y otras proteínas asociadas, adopta tres niveles de empaquetamiento jerárquico. En el primer nivel, están las fibras nucleosomales de unos 11 nm de diámetro. Están constituidas por los nucleosomas y el DNA de conexión o espaciador (10-80 pares de bases). Las fibras nucleosomales de 11 nm se ordenan linealmente en zig-zag, de modo semejante a un collar de perlas. A esta cromatina enriquecida en fibras nucleosomales desplegadas se la denomina eucromatina y su organización estructural es óptima para facilitar la expresión tanto de genes activos como de algunos genes inactivos que están preparados para ser expresados rápidamente. Por esta razón, dada la elevada actividad transcripcional de las MN α , dicha configuración, representa una proporción muy elevada de la cromatina (Hansen et al., 2017; Fyodorov et al., 2018). En el segundo nivel de organización están las fibras cromatínicas (selenoides), de aproximadamente 30 nm, que al plegarse se compactan para formar dominios de heterocromatina. Ésta incluye secuencias no codificantes, centrómericas y teloméricas (heterocromatina constitutiva) y genes que codifican proteínas pero no expresados en un determinado tipo celular (heterocromatina facultativa). Las fibras cromatínicas pueden formar bucles de mayor entidad que representa el mayor grado de compactación, las fibras de 200 nm o más de los cromosomas mitóticos (Cremer & Cremer, 2010). Según el modelo clásico el empaquetamiento de la heterocromatina sigue un orden jerárquico, las fibras de 30 nm o más se forman por el enrollamiento sobre si mismas de las fibras nucleosomales de 11 nm. Sin embargo, en la actualidad este patrón organizativo de la heterocromatina está muy cuestionada (Dixon et al., 2016).

Estudios recientes realizados con criomicroscopía electrónica y dispersión de rayos X de ángulo pequeño han corroborado que el DNA se organiza en fibras nucleosomales de 11 nm. Sin embargo, la existencia fibras de cromatina de 30 nm, no se ha confirmado definitivamente (Razin & Gavrilo, 2017; Hansen et al., 2018). Se propone que las fibras cromatínicas de 30nm, en lugar de formarse por el simple enrollamiento de las fibras nucleosomales, se producen por interacciones biofísicas y moleculares tanto intracromosómicas como intercromosómicas de los nucleosomas. Se considera que estas interacciones son la base molecular de los agregados de la heterocromatina denominados polímeros fundidos (Hansen et al., 2018) (Fig. 8). Además, mediante Hi-C (*High-throughput chromosome conformation capture*) se sabe que los polímeros fundidos, aparentemente organizados al azar, disponen de dominios específicos de longitud variable y de alta frecuencia de interacciones

génicas, que pueden ser transcripcionalmente activos o inactivos. Estos dominios se denominan dominios de asociación topológica (TADs, *Topologically associating domains*) (Razin & Gavrillov, 2017). Se definen como bucles de cromatina muy estable e invariables entre diferentes tipos celulares y persistentes en sucesivos ciclos de división mitótica. Los TADs son los responsables de la organización específica de cada cromosoma y pueden ser activos o inactivos (Dekker & Heard, 2015; Sexton & Cavalli, 2015) (Fig. 8, ínet). Por lo general, los TADs reprimidos se asocian a la lámina de la envoltura nuclear y al nucleolo y los activos tienden a situarse por el resto del núcleo (Dixon et al., 2016; Mata et al., 2017) (inset, Fig. 8). La organización estructural y funcional de los TADs favorece el dinamismo de la expresión génica ya que, a diferencia del modelo clásico de formación de las fibras cromatínicas por torsión de cadenas nucleosomales de 11 nm, los TADs pueden moverse y reorganizarse constantemente formando bucles confluentes que pueden compartir factorías moleculares activadoras o represoras que mejoran la eficiencia de la transcripción (Dixon et al., 2016; Razin & Gavrillov, 2017; Hansen et al., 2018).

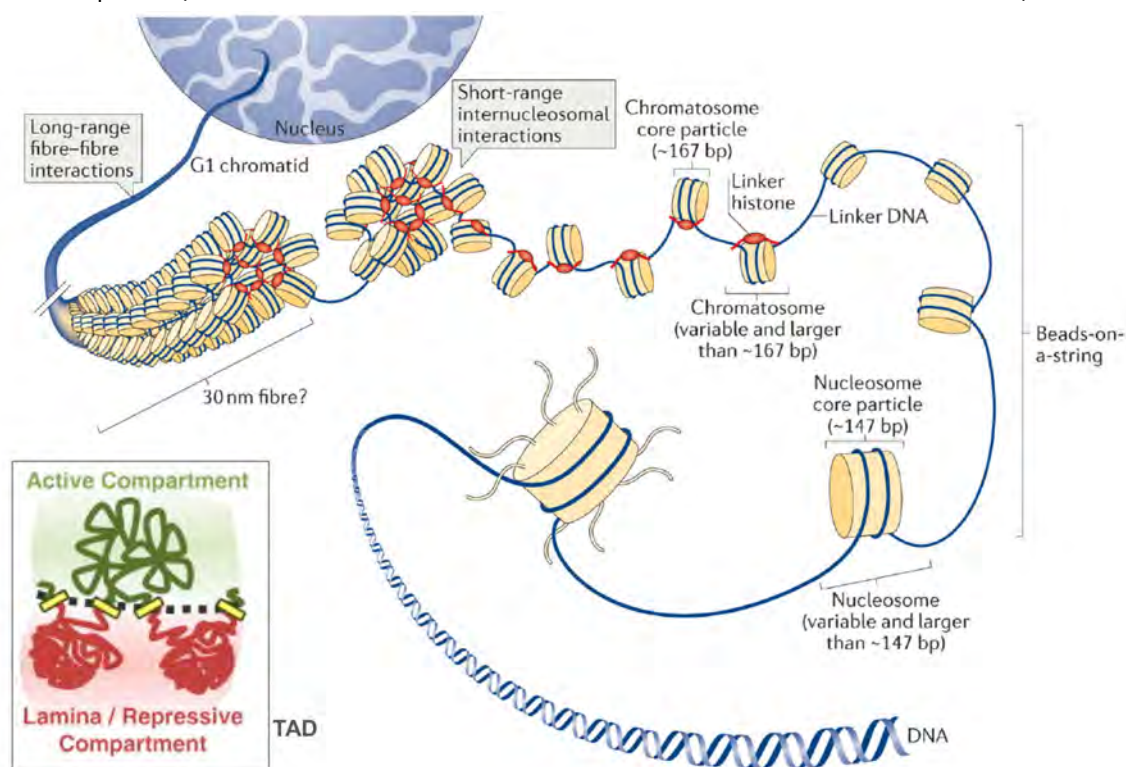


Figura 8. Organización estructural de la cromatina. La eucromatina está representada por las fibras nucleosomales de 11 nm y el DNA espaciador. Se organiza linealmente en zig-zag, formando un collar de perlas. A los nucleosomas se asocia la histona 1 (rojo) conformando cromatosomas. Las fibras nucleosomales interactúan entre sí para formar las fibras de cromatina de 30 nm (heterocromatina). En el inset, se representa un TAD con un dominio transcripcionalmente activo (verde) y dos reprimidos asociados a la lámina de la envoltura nuclear (rojo). (Tomado de Hansen et al.; 2018. doi: 10.1038/nrm.2017.94).

No obstante, teniendo en cuenta que las células diploides humanas disponen de unos dos metros de DNA en sus núcleos, es fácil comprender que en la citoarquitectura de la cromatina, además de las interacciones moleculares entre los

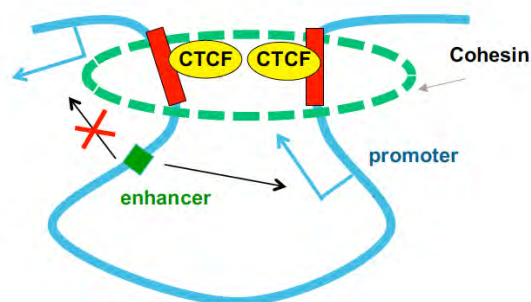


Figura 9. Esquema de un TAD en el que las proteínas CTCF y el complejo de las cohesinas regulan la estructura de un bucle génico. (Figura adaptada de Dixon et al. 2014. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.018).

nucleosomas, participen otros factores. De hecho, a pesar de que el DNA tiene una tendencia natural al desorden, la cromatina está altamente organizada y su patrón de distribución es específica del tipo celular. Por ejemplo, en la formación de los TADs son fundamentales el factor aislante y

repressor de la transcripción CTCF (*11-zinc finger protein* o *CCCTC-binding factor*) y las cohesinas, un complejo de proteínas involucradas en el mantenimiento y en la plasticidad estructural y funcional de los cromosomas (Lawrence et al., 2015; Dixon et al., 2016) (Fig. 9).

Junto a las proteínas anteriormente comentadas, en la configuración de la cromatina, tienen particular relevancia las modificaciones epigenéticas que puede experimentar tanto el DNA como las histonas nucleosomales. En el caso particular de las modificaciones de las histonas nucleosomales, son fundamentales las modificaciones postraduccionales reversibles que experimentan determinados residuos tanto del extremos N-terminal libre como en el dominio globular central de interacción con el DNA (Lawrence et al., 2016). Se producen por adición covalente de radicales funcionales que incluyen la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinilación, sumoilación, ribosilación de ADP y desaminación. Más recientemente, se han descrito otras modificaciones, como la propionilación y la butirilación (Kebede et al., 2015). Estas marcas, conocidas como “codigo de histonas” pueden cambiar directa o indirectamente la configuración del nucleosoma haciéndolo más abierto o más compacto, facilitando el acceso de maquinarias moleculares específicas para la activación, represión o reparación del DNA (Kouzarides, 2007).

Las modificaciones postraslacionales mejor conocidas son las marcas en las “colas” libres de las histonas nucleosomales, principalmente en residuos de lisinas (K), serina (S) y arginina (R) (Fig. 10). Algunas de estas marcas tienen un efecto directo en la arquitectura de la cromatina y en las interacciones entre los nucleosomas. Por ejemplo, la adición de restos acetilo en la lisina 16 de la histona H4 (H4K16ac) promueve la actividad transcripcional, tanto *in vitro* como *in vivo* (Akhtar & Becker,

2001; Shogren-Knaak et al., 2006) (Fig. 10). Por lo contrario, otras modificaciones pueden tener un efecto inverso incrementando la compactación del DNA. Por ejemplo, la di- y tri-metilación en la lisina de la H4 (H4K20me) causa mayor condensación de la cromatina y, consecuentemente, inactiva la transcripción (Lu et al., 2008) (Fig. 10). Además de estos efectos directos, otras modificaciones pueden actuar indirectamente reclutando proteínas efectoras, bloqueando el acceso de los complejos de remodelación o influyendo en el reclutamiento de modificadores de la cromatina y factores de transcripción (Lu et al., 2018).

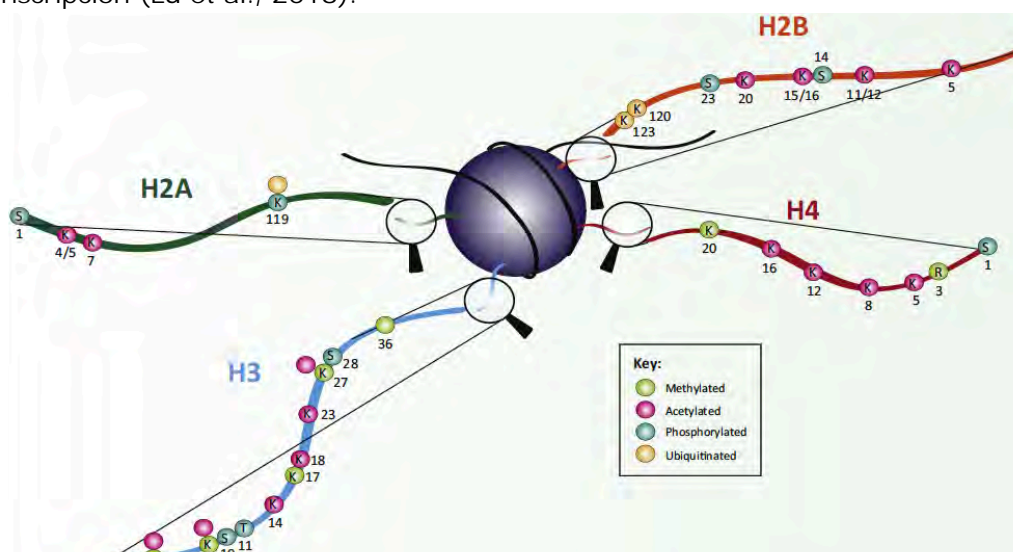


Figura 10. Modificaciones postraduccionales de las colas de las histonas nucleosomales. Los aminoácidos modificados son: K = lisina, R = arginina, S = serina, T = treonina). El color de cada residuo indica su modificación (verde = metilación, rosa = acetilación, azul turquesa = fosforilación, beige = ubiquitinación). (Esquema tomado de Lawrence et al., 2016; doi: 10.1016/j.tig.2015.10.007).

De modo similar pueden modificarse los dominios globulares de las histonas del octámero central. Las marcas se producen, principalmente, en la superficie externa que está en contacto con el DNA, aunque existe en la actualidad gran controversia sobre su resultado funcional. Una de las modificaciones mejor conocida es la metilación de la histona H3 en K79. Así, la trimetilación de H3 (H3K79me³) activa el inicio de la transcripción. La monometilación de la H3 en las K79, K4 y K27, confiere un estado de equilibrio transcripcional regulando la expresión de genes activos y de aquellos que están preparados para su activación. Por su parte, la dimetilación de la H3 (H3K79me²) se detecta en la eucromatina activa (ver Lawrence et al., 2016).

1.2.1.2 Dominio intercromatínico o intercromosómico

Como ya hemos comentado, en el espacio intercromosómico se sitúan numerosas organelas o cuerpos nucleares carentes de membrana plasmática (Fig. 6) incluyendo el

nucleolo, el CB, los *locus* de las histonas, los “speckles”, “paraspeckles”, clastosomas y cuerpos PML (Mao et al., 2011). Una cuestión intrigante de las organelas nucleares, que permanece sin resolver, es como pueden mantener su identidad estructural y molecular propia careciendo de membrana limitante. Con la excepción del nucleolo, que está enriquecido en secuencias génicas codificantes de los RNAs ribosomales (rDNA), el resto de cuerpos nucleares son de naturaleza proteica. Asimismo, salvo los cuerpos PML y los clastosomas, son organelas nucleares ricas en RNAs (Lamond & Spector, 2003; Misteli 2005).

El cuerpo nuclear de Cajal

El cuerpo nuclear de Cajal (CB, del inglés *Cajal bodies*) es una organela del dominio intercromatínico descubierta por Cajal en varios tipos neuronales de diferentes vertebrados que denominó “cuerpo accesorio” (1903). Cajal describe al CB como una estructura nuclear argirófila de textura homogénea, de forma esférica y bordes nítidos de aproximadamente 0,5 a 1 μm de diámetro. La localiza libre en el nucleoplasma y, con mucha frecuencia asociada al nucleolo (ver Lafarga et al., 1983) (Fig. 11A-B). Posteriormente, Cajal demostró que el cuerpo accesorio presenta variaciones en el número y tamaño entre las diferentes poblaciones neuronales (Cajal, 1910). El CB despertó escaso interés entre los científicos de la época hasta que, en la década de 1950, el equipo de Barr (University Western Ontario), dedicó un gran esfuerzo al estudio del núcleo neuronal y publicó tres artículos sobre la organización del cuerpo accesorio en neuronas de varios centros nerviosos del gato. En estos estudios se confirmaban las observaciones de Cajal y se demostraba que el cuerpo accesorio carecía de DNA (Feulgen negativo). Asimismo, se aportaban las primeras evidencias de que tenía un comportamiento dinámico en respuesta a los cambios de la expresión génica inducidos por la axotomía (para revisión ver Lafarga et al., 2009; 2017).

Con la incorporación de las técnicas de microscopía electrónica al estudio del núcleo celular, Monneron & Bernhard (1969) describen en hepatocitos un cuerpo nuclear formado por hebras densas arrolladas de material fibrilar denso, que denominaron “coiled body” (cuerpo arrollado). En su estudio no hacen referencia a los artículos de Cajal (1910), probablemente no los conocían y presentan el “coiled body” como una estructura nuclear nueva. En 1983, Lafarga y sus colaboradores adaptaron el método del nitrato de plata reducido para su aplicación a la microscopía electrónica demostrando en varios tipos neuronales que el cuerpo accesorio de Cajal y el “coiled body” de Monneron y Bernhard (1969) eran la misma

estructura (Fig. 11C-D). Sin embargo, fue necesario esperar hasta 1999 para que la comunidad científica internacional reconociese el descubrimiento a Cajal. Joe Gall, apoyándose en las observaciones de nuestro laboratorio y en las de otros investigadores, propuso la adopción del nombre de “Cajal body” (CB) en sustitución de “coiled body” (Carvalho et al., 1999; Gall, 2000; Lafarga et al., 2009).

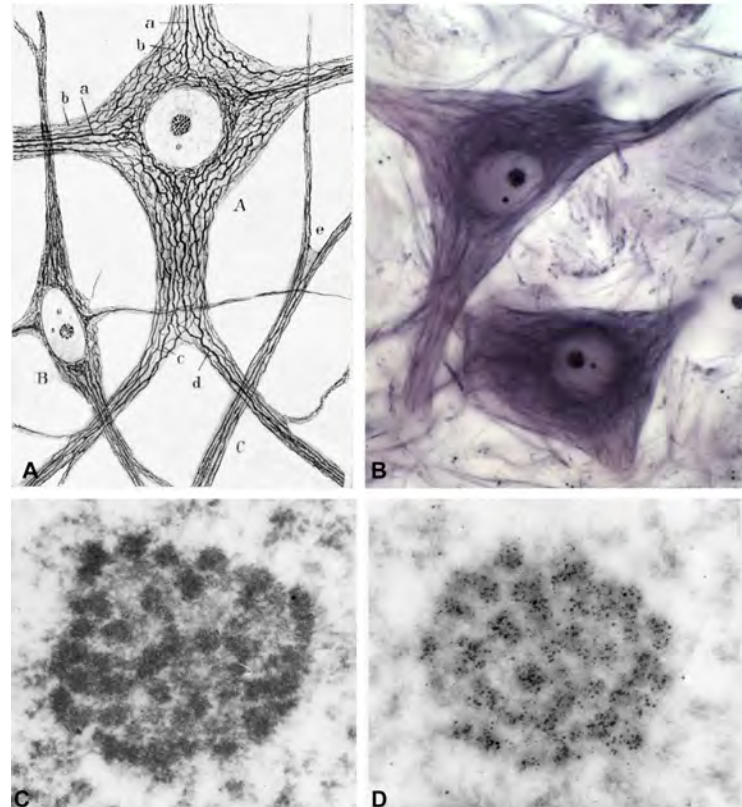


Figura 11. El cuerpo nuclear de Cajal (CB). A, Dibujo original de Cajal de neuronas que exhiben nucleolos grandes y CBs argirófilos. El citoplasma muestra la red de neurofilamentos (Ramón y Cajal 1903). B, Contrapartida fotográfica con un método reducido que confirma la fidelidad de los dibujos de Cajal. C, Imagen ultraestructural de un CB que muestra las hebras electrodensas inmersas en una matriz más electrolúcida. D, CB marcado con una técnica argéntica que demostró que el “coiled body” y el cuerpo accesorio son la misma organela (Microfotografías tomadas de Lafarga et al., 1984, 1995).

Sin ninguna duda, un avance fundamental para conocer la importancia funcional de esta organela se produjo en la década de los 90 al conocerse su composición molecular. En primer lugar se identificó la coilina, una proteína estructural fundamental y específica de los CBs canónicos (Andrade et al., 1991). Casi al mismo tiempo se generaron anticuerpos y sondas de hibridación con las que se ha demostrado que el CB concentra una variedad de RNAs no codificantes y proteínas específicas. Tienen particular relevancia la familia de scaRNAs (*small Cajal body RNAs*), snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) espliceosomales y snoRNPs

(*small nucleolar ribonucleoproteins*) nucleolares (Meier, 2017) (Fig. 12). Asimismo, se demostró que el CB está enriquecido en el complejo Sm, formado por un anillo de siete proteínas, y la proteína U2B^{''}, de asociación al U2snRNA, que forman parte del núcleo central de las snRNPs (Carmo-Fonseca et al., 1992; Lamond & Carmo-Fonseca, 1993; Gall, 2000). Otro componente del CB es el factor de supervivencia de las motoneuronas (SMN, *survival motor neuron protein*) que, como comentaremos más adelante, está implicado en la biogénesis de las snRNPs y snoRNPs. La lista creciente de nuevas moléculas identificadas en el CB abre nuevas expectativas funcionales para esta organela. Por ejemplo, la presencia del RNA de la telomerasa, de la transcriptasa inversa humana (hTERT) y de subunidades catalíticas de la telomerasa (TERC, diskarina y TCAB1) (Cioce & Lamond, 2005) que reflejan el papel del CB en el ensamblaje de la telomerasa en el periodo S del ciclo celular (Fig. 12). Asimismo, el CB se asocia a determinados *loci* génicos, particularmente a los de las histonas, y concentra moléculas requeridas para el procesamiento de los pre-mRNAs de las histonas (Ciclina E/CDK2, P220 y U7 snRNA) (Hoffmann & Birnstiel, 1990; Fernandez et al., 2002). Más recientemente, nuestro grupo ha demostrado que algunos CBs están enriquecidos en el modificador post-traducciona SUMO1 (*small ubiquitin-like modifier-1*) (Navascues et al., 2008) y que la sumoilación de la proteína SMN es crucial para la organización del CB (Tapia et al., 2014; Lafarga et al., 2017) (Fig. 12).

A pesar de que el CB concentra gran variedad de componentes para la biogénesis de mRNAs y rRNAs, no es un sitio de transcripción ni de "splicing" como demuestra la ausencia de RNAs poliadenilados y de otros factores de "splicing" esenciales como las proteínas SC35 y U2AF (Lamond & Carmo-Fonseca, 1993; Gama-Carvalho et al., 1997). Además, carece de DNA, de histonas y no incorpora uridina tritiada, un precursor para la síntesis de RNAs (Lamond & Carmo-Fonseca, 1993; Gall, 2000; Lafarga et al., 2017). Sin embargo, dada la gran heterogeneidad de sus componentes y la demostración de que su número y tamaño está directamente relacionado con la actividad transcripcional, se mantuvo el interés por demostrar que no era una organela de mero depósito molecular sino una estructura dinámica con actividad funcional (Carmo-Fonseca et al., 1993; Lafarga et al., 1998; Pena et al., 2001; Berciano et al., 2007; Hebert, 2013). De hecho, el seguimiento en células vivas de proteínas del CB fusionadas con proteínas fluorescentes ha permitido conocer que esta organela tiene un importante dinamismo molecular y sus componentes

moleculares están en flujo constante e intercambio con el nucleoplasma (Platani et al., 2002; Cioce & Lamond, 2005; Berciano et al., 2007; Misteli, 2008). Así, la relación espacial física de los CBs con el nucleolo, los “speckles”, los telómeros y los cuerpos nucleares PMLs ha permitido proponer la existencia de un tráfico molecular activo entre el CB y dichos compartimentos nucleares (para revisión, ver Frey and Matera, 1995; Cioce & Lamond, 2005). Sobre la base de lo anteriormente comentado proponemos en la figura 12 algunas de las funciones del CB mejor conocidas en la actualidad, como son la biogénesis de las snRNPs y snoRNPs, el procesamiento de pre-mRNAs de determinadas histonas, la sumoilación/desumoilación de determinados sustratos y la maduración del complejo de la telomerasa (Fig. 12).

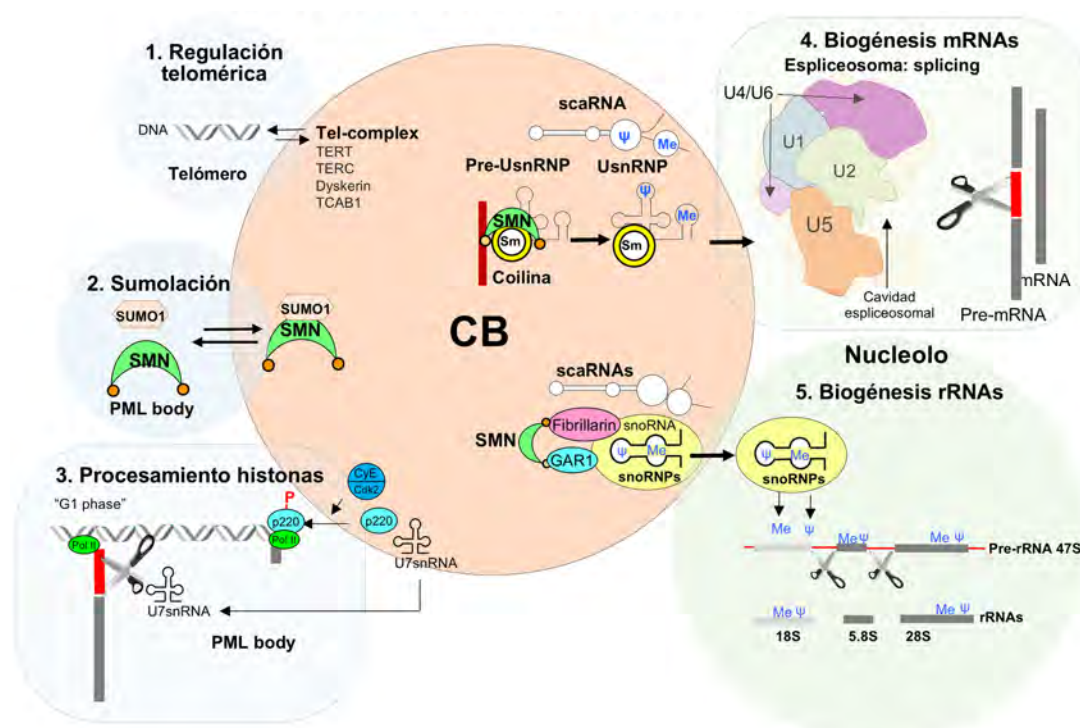


Figura 12. Esquema ilustrativo de las funciones del CB. Estas incluyen: la regulación telomérica (1); sumoilación de proteínas (2); procesamiento de histonas (3); biogénesis de snRNPs implicadas en el “splicing” de mRNAs (4); y biogénesis de las snoRNPs (5).

Aunque las cinco funciones asignadas al CB (Fig. 12) tienen gran relevancia, en el contexto del presente proyecto de Tesis Doctoral adquiere particular importancia la participación del CB en la biogénesis de las snRNPs espliceosomales, implicadas en el “splicing” de los mRNAs y de las snoRNPs responsables del procesamiento de los pre-rRNAs en el nucleolo, donde se sintetizan los rRNAs maduros que formarán las partículas ribosomales.

El nucleolo

El nucleolo es la estructura más prominente en el núcleo de las células eucariotas. Se visualiza como una organela grande, carente de membrana limitante y con propiedades bioquímicas propias que le permiten catalizar procesos biológicos muy importantes para la supervivencia celular, si bien su función primaria es la biogénesis de los rRNAs ribosomales (rRNAs) (Tiku & Antebi, 2018). De hecho, se estima que en el cómputo global de la transcripción más del 60% de los RNAs nucleares se sintetizan en el nucleolo, razón por la que se le cataloga como un centro de máxima actividad transcripcional (ver Schofer & Weipoltshammer, 2018). No obstante, es una estructura multifuncional y muy polivalente en tareas de mantenimiento (*housekeeping*) que incluyen, la respuesta al estrés celular, el mantenimiento de la arquitectura y la estabilidad del genoma, el ensamblaje de las RNPs de reconocimiento de la partícula señal, la maduración de pre-tRNAs, la edición de diversos RNAs, el ensamblaje de la telomerasa, la maduración de los espliceosomas, la regulación del envejecimiento y la respuesta al daño en el DNA (para revisión, ver Ogawa & Baserga, 2017; Tiku & Antebi, 2018). De hecho, estudios de proteómica han demostrado que el 70% de las proteínas nucleolares no están implicadas en la síntesis de ribosomas (Ahmad et al., 2009).

Centrándonos en la función primaria, la biogénesis de las partículas pre-ribosomales, el nucleolo organiza en su interior gran parte de las secuencias génicas (rDNA) codificantes del rRNA. Los dominios de rDNA se denominan regiones organizadores del nucleolo (NORs, *nucleolar organizer regions*) y, en función de la especie animal, el número de cromosomas portadores de NOR es variable. Las células diploides humanas poseen diez NORs situados en los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 y, las células del ratón tienen NORs los cromosomas 1, 2, 15 y 19 (Henderson et al., 1972). Solo una parte de la cromatina ribosomal se introduce en el nucleolo, el resto puede estar adyacente o libre en el nucleoplasma. No obstante, la cantidad de rDNA intranucleolar es un indicativo directo de actividad transcripcional ya que, la fracción activa se organiza en el interior del nucleolo y la silente es, preferentemente, perinucleolar (Farley-Barnes et al., 2017). Se estima que, el genoma humano diploide dispone unas 400 copias de genes rRNA repartidos entre todos las NORs. Estos genes se ordenan en "tandem" en cada NOR. Como veremos más adelante, cada gen ribosomal codifica el pre-rRNA 47S, precursor de los tres tipos de rRNAs ribosomales maduros, 18S, 5,7S y 28S, separados por

secuencias espaciadoras. Hay dos secuencias espaciadoras internas, que flanquean el 5,8S, y dos secuencias espaciadoras externas, intergénicas, relacionadas con los extremos 5' y 3' (Gibbons et al., 2014) (Fig. 13).

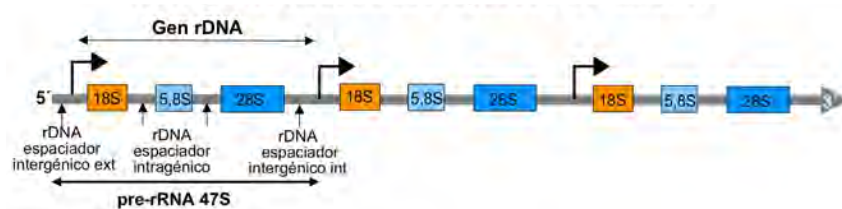


Figura 13. Esquema de un NOR con los genes ribosomales repetidos en "tandem". Cada NOR incluye varios genes rDNA ordenados en "tandem". A su vez, cada gen, codifica el precursor rRNA 47S, que se escindirá en los rRNA 18S, 5,8S y 28S maduros.

El nucleolo observado a microscopía electrónica muestra una arquitectura peculiar tripartita bien definida configurada por los centros fibrilares (CF), el componente fibrilar denso (CFD) organizado alrededor de cada CF y el componente granular (CG), si bien entre estos componentes puede quedar intersticios intranucleolares (Fig. 14). La organización estructural de estos componentes está relacionada con actividad de biogénesis de ribosomas y de síntesis de proteínas. Por ejemplo, las neuronas de proyección como son las MN α , con un metabolismo muy elevado, muestran un nucleolo generalmente único, muy grande y con un patrón estructural característico. Así, poseen un nucleolo reticular con numerosos CFs de pequeño tamaño rodeados por el CFD, mientras que masas irregulares de CG se disponen entre el CFD, preferentemente en la superficie del nucleolo (Riancho et al., 2014; Tapia et al., 2017).

En los CF se sitúan los genes ribosomales silentes y moléculas implicadas en la transcripción nucleolar. Éstas incluyen el complejo de la RNA polimerasa I en la forma inactiva (defosforilada), los factores UBF (*upstream-binding factor*), SL1 (*selective factor 1*), TBP (*TATA binding protein*) y la DNA topoisomerasa I (Olson & Dundr, 2005; Hernandez-Verdun, 2006; Boisvet et al., 2007) (Fig. 14A-B). En el borde interno del CFD, en su interfase con el CF, se organizan los genes ribosomales transcripcionalmente activos. En condiciones fisiológicas, el número de genes activos permanece bastante constante pero, su organización espacial es muy favorable para que, en función de la demanda de biogénesis de ribosomas, puedan moverse desde el CF y relocalizarse en el CFD o viceversa (Xie et al., 2012). Esta plasticidad espacial hace que el CF junto con el CFD que lo rodea formen diadas consideradas unidades funcionales de transcripción nucleolar (*CF/CFD transcription units*) (Dundr et al., 2002; Smirnov et al., 2016). El CFD dispone de la maquinaria necesaria para la transcripción, pero aquí la

RNA-Pol I está activada (fosforilada). Dispone de la fosfoproteína nucleolina, implicada en la síntesis y maduración de los ribosomas y de una familia de snoRNPs que, como ya hemos comentado anteriormente, proceden del CB (Fig. 14A-B). El CG se denomina así por su aspecto granular a nivel ultraestructural. Lo forman gránulos de unos 15-20 nm de diámetro correspondientes a las subunidades pequeñas y grandes pre-ribosomales. En el CG finaliza el ensamblaje de los RNAs en las subunidades de los ribosomas y se almacenan hasta su exportación al citoplasma. Concentra la proteína fosfoproteína B23, también conocida como nucleofosmina, NO38 o numatrina. Es una de las proteínas con mayor “pluriempleo” celular ya que, además de tener un papel esencial en el ensamblaje final y exportación de las partículas ribosomales, actúa como endonucleasa, ribonucleasa y chaperona (Raska et al., 2006; Boisvert et al., 2007) (Fig. 14A-B).

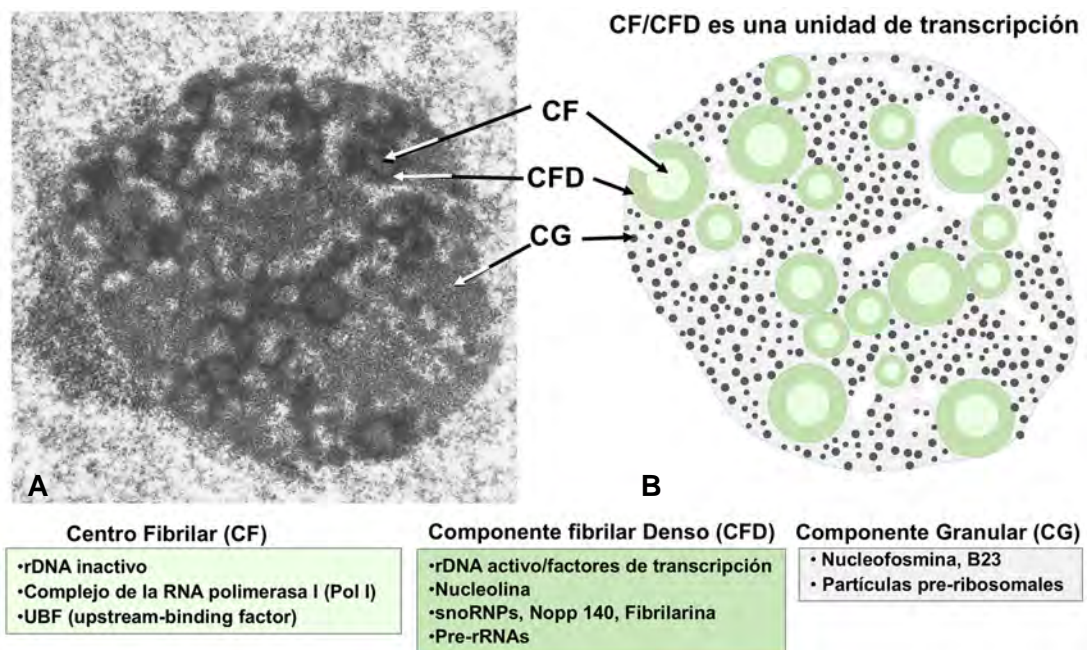


Figura 14. Compartimentos del nucleolo. A, Ultraestructura de un nucleolo de una MN α que muestra un elevado número de centros fibrilares (CF) rodeados del componente fibrilar denso y entre ellos el componente granular (CG) y los intersticios nucleolares. B, Replica de los compartimentos nucleolares, CF (verde claro), CFD (verde) y el CG con bolas negras grandes y pequeñas. Al pie de la imagen se encuadran las moléculas específicas de cada compartimento nucleolar.

Inicialmente la transcripción de cada gen ribosomal da lugar a un pre-rRNA naciente, el 47S que incluye los transcritos rRNAs 18S, 5,8S y 28S y las secuencias espaciadoras. El pre-rRNA 47S tiene una vida media muy corta ya que, una vez transcrito, se escinde inmediatamente en los tres sub-tipos de rRNAs pre-ribosomales. El proceso de escisión de los rRNAs 18S, 5,8S y 28S es muy complejo y requiere su modificación co-transcripcional en etapas sucesivas que incluyen, la

chaperonización, pseudouridinización, mediada por NAP57/Nopp140 y disquerina/NAP57, y la metilación, catalizada por la metiltransferasa fibrilarina. Estas modificaciones están guiadas por snoRNPs específicas que proceden del CB. Se interpreta que la asociación de los CBs al CFD del nucleolo justifica el intercambio molecular entre ambas organelas (CB→CFD) (Kiss et al., 2006; Lafarga et al., 2017; Trinkle-Mulcahy & Sleeman, 2017) (Fig. 15). Las snoRNPs se agrupan en dos familias, catalogadas por el tipo de RNA pequeño (snoRNA) que contienen, el tipo C/D con actividad metiltransferasa y el tipo H/ACA con actividad pseudouridina sintasa. El proceso de maduración de snoRNPs comienza con la 2'-O-ribosa-metilación y pseudouridinación de los snoRNAs, un proceso dirigido por los scaRNAs específicos del CB (Matera et al., 2007). Una vez modificados los snoRNAs el tipo C/D ensamblan la metiltransferasa fibrilarina, mientras que las snoRNPs H/ACA interaccionan con la pseudouridina sintasa disquerina/NAP57. Este proceso está mediado por la chaperona Nopp140 (Kiss et al., 2006; Singh et al., 2017 (Fig.15).

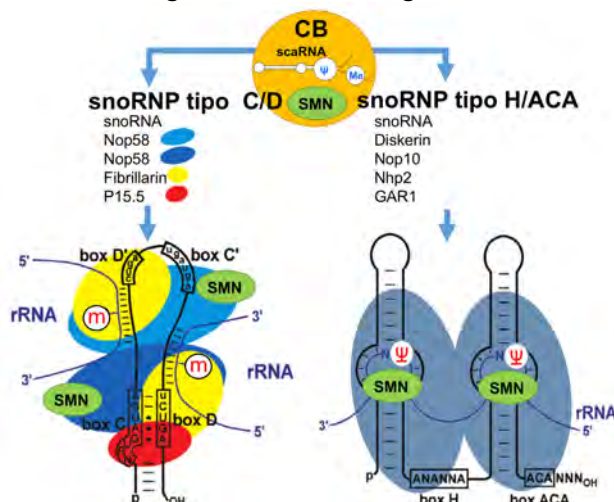


Figura 15. Ensamblaje molecular de las snoRNPs en el CB. Las snoRNPs del grupo C/D asocian la fibrilarina que actuará como metiltransferasa del residuo (m). Las snoRNPs H/ACA serán responsables de la pseudouridinación (ψ) de los rRNAs. La proteína SMN es clave en su biogénesis. (Modificado de Kiss et al., 2006; doi: 10.1101/sqb.2006.71.025).

Las etapas madurativas de las snoRNPs llevadas a cabo en el CB requieren de la proteína SMN que a modo de chaperona interacciona con las proteínas fibrilarina o GAR1 promoviendo la fase final de su maduración en las snoRNP de la clase C/D snoRNPs o de la clase H/ACA (Jones et al., 2001; Pellizzoni et al., 2001). Completada su maduración, las snoRNPs activas son transferidas desde el CB a las unidades transcripcionales CF/CFD del nucleolo donde cumplirán su función en el procesamiento de los pre-rRNAs. La fibrilarina de las snoRNPs metila el pre-rRNA 47S naciente y la disquerina/NAP57 de las snoRNPs cataliza la conversión de uridinas en pseudouridinas. Estas modificaciones son

esenciales para el corte del pre-rRNA 47S que dará lugar a los rRNAs 18S, 28S y 5,8S maduros previo el ensamblaje con los procesomas. En el CG, El rRNA 18S unido al procesoma forma la subunidad pequeña del ribosoma y los rRNAs 28S y 5,8S, junto con el rRNA 5S, se unen al procesoma para formar la subunidad grande del ribosoma (para revisión, ver Kiss et al. 2006; Schöfer & Weipoltshammer, 2018) (Fig. 16).

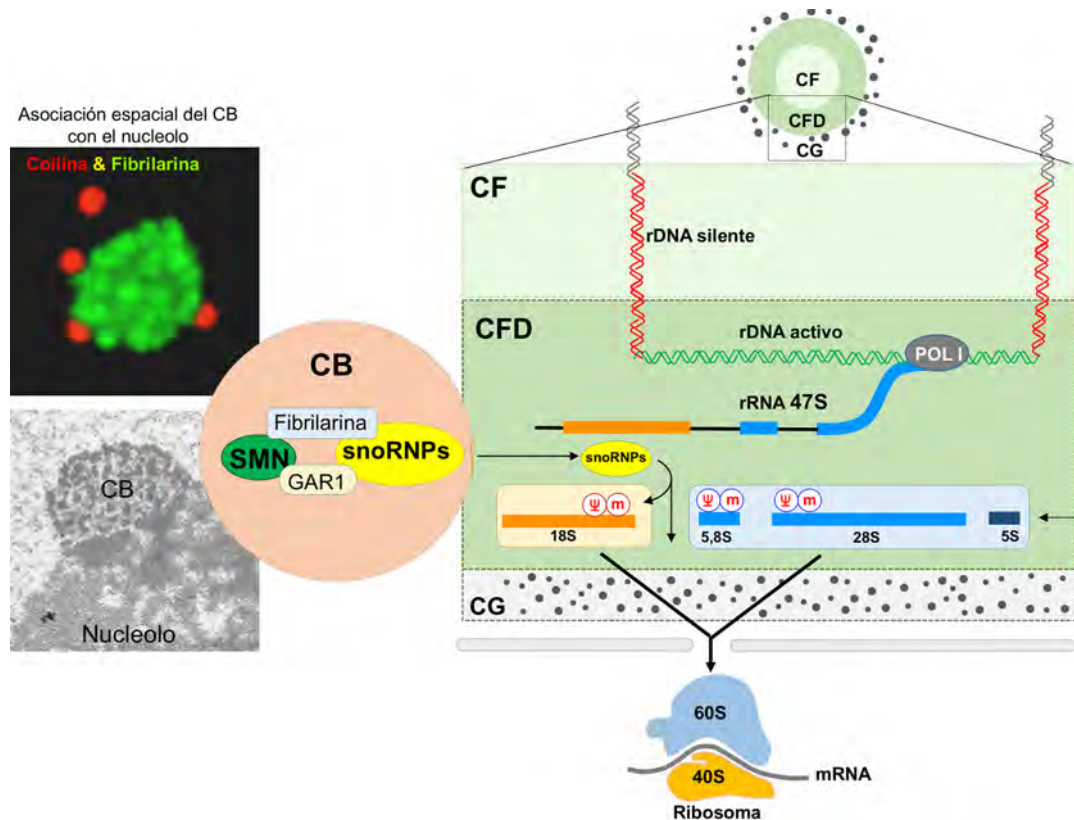


Figura 16. Secuencia madurativa de la biogénesis de las partículas ribosomales. En el CFD se transcriben los genes ribosomales que codifican el rRNA 47S. Su metilación y pseudourinización promueven la escisión de los rRNAs 18S, 5,8S y 28S maduros. El primero formará la partícula ribosomal pequeña y los otros dos junto con el rRNA 5S transcrito extranucleolarmente la partícula grande. Las imágenes ilustran la asociación del CB con el CFD del nucleolo.

Granulaciones intercromatínicas o "speckles" nucleares

Los "speckles" nucleares fueron descubiertos por Cajal como áreas irregulares de textura homogénea e impregnadas con la plata que él denominó "grumos hialinos" (para revisión, ver Lafarga et al., 2009). Posteriormente, fueron descritas por Swift (1962) y denominadas agregados de granulaciones intercromatínicas (IGCs, *interchromatin granule clusters*), ya que están constituidas por la acumulación de granulaciones muy electrodensas a nivel ultraestructural. El patrón de distribución de las granulaciones intercromatínicas puede ser difuso por el nucleoplasma, excluyendo el nucleolo, o formando varios agregados de IGCs. Sobre la base de que las IGCs están

enriquecidas en factores de "splicing" y en RNAs poliadenilados, en la actualidad a dichas áreas de IGCs se denominan "áreas de factores de splicing" o, sencillamente, "speckles" nucleares debido a que con marcadores fluorescentes de factores de "splicing" muestran un patrón moteado en la microscopía confocal (Lamond & Spector, 2003). No incorporan uridina tritiada y carecen de DNA, indicado claramente que no son sitios de transcripción activa (Spector, 1993; Mintz et al., 1999). Sin embargo, frecuentemente aparecen asociados con genes activos, lo que puede favorecer la transferencia de factores de "splicing" a los sitios de transcripción para el procesamiento cotranscripcional (Lamond & Spector, 2003; Galganski et al., 2017).

El tamaño de los "speckles" está inversamente relacionado con la actividad transcripcional (Lamond & Spector, 2003). Este hecho fue confirmado en nuestro laboratorio en los tres tipos de neuronas de los ganglios sensitivos, grandes, medianas y pequeñas, con decreciente actividad transcripcional. Inmunodetectando snRNPs espliceosomales, se comprobó que las neuronas pequeñas, con poca actividad transcripcional, preferentemente reclutan los factores de splicing en "speckles" grandes. Por el contrario, en las neuronas de tipo A, las más grandes, las granulaciones intercromatínicas adoptan un patrón difuso y sus "speckles" son pequeños y poco numerosos (Pena et al., 2001). Esta dinámica de los "speckles" también ha sido demostrada en mioblastos humanos controles y de pacientes afectados por la OPMD (*oculopharyngeal muscular dystrophy*). Este estudio corroboró que en los mioblastos de la OPMD, con déficit de la proteína PABPN1 (*poly(A)-binding nuclear protein 1*) se acumulaba en los "speckles" de gran tamaño (Bengoechea et al., 2012). Los "speckles" nucleares son sitios de almacenamiento dinámico de factores de "splicing" y preensamblaje de componentes del espliceosoma para ser transferidos a los sitios de transcripción, donde se produce el procesamiento cotranscripcional de los pre-mRNAs (Galganski et al., 2017). Con frecuencia los "speckles" aparecen asociados físicamente a los CBs, por lo que se ha propuesto que esta relación íntima puede facilitar el intercambio molecular entre ambas organelas (Lafarga et al., 2017).

1.2.2 El citoplasma de la MN α

Para garantizar y mantener su elevada tasa de actividad transcripciones y metabólica, las MN α muestran en su citoplasma una gran abundancia de mitocondrias y un gran desarrollo de la maquinaria para la síntesis de proteínas, tanto de proteínas comunes de mantenimiento como proteínas específicas para las funciones neuronales. Esta maquinaria se organiza formando numerosos grumos de Nissl constituidos, a nivel

ultraestructural, por cisternas paralelas de retículo endoplasmático rugoso (RER) y, entre ellas, abundantes polirribosomas libres. Dado que muchas de las proteínas sintetizadas en el RER exigen su modificación postraduccional, los grumos de Nissl exhiben numerosas vesículas de transición libres y asociadas a la cara cis del complejo de Golgi. Asimismo, la cara trans-Golgi forma numerosas vesículas de secreción constitutiva, vesículas sinápticas de neuropéptidos y vesículas pre-lisomales. Asimismo, como el proceso de síntesis de proteínas y de otras moléculas es energético dependiente, el citoplasma exhibe abundantes mitocondrias. La elevada tasa en la síntesis de proteínas en las MN α conlleva un concomitante catabolismo molecular en el soma neuronal que queda reflejado en la presencia de abundantes lisosomas, primarios y secundarios, y de proteasomas. El citoesqueleto de las MN α presenta la típica organización neuronal de neurofilamentos y neurotúbulos, además de los filamentos finos de actina (Riancho et al., 2014) (Fig. 17).

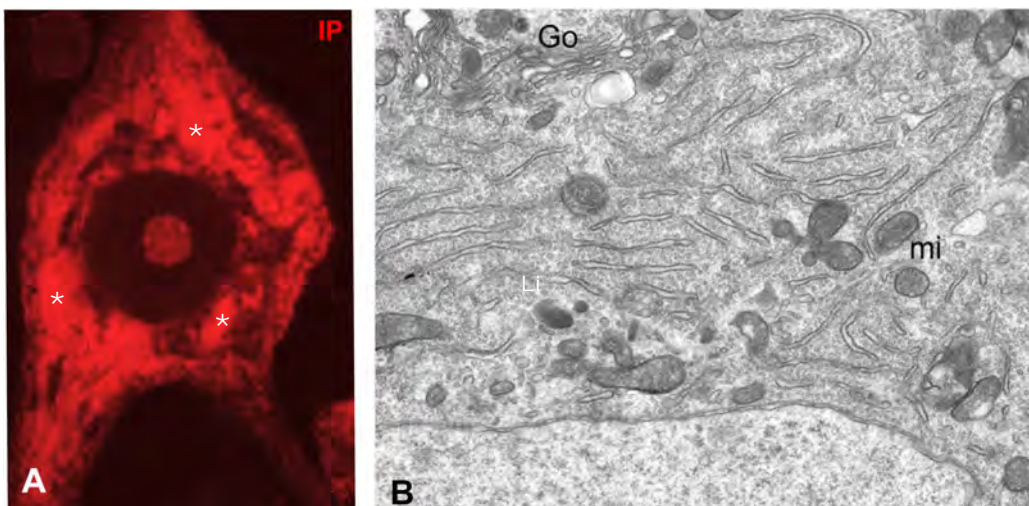


Figura 17. Organización estructural de la maquinaria de síntesis de proteínas. A, Imagen de una MN α marcada con Ioduro de propidio (IP) que se une a los ácidos nucleicos. Tanto el nucleolo como de los grumos de Nissl son de gran tamaño en las MN α (asteriscos). B, detalle ultraestructural del RER y los polirribosomas libres formando un grupo de Nissl. A su alrededor, se observan mitocondrias (mi), dictiosomas de Golgi (Go) y lisosomas (Li).

1.3 LA PROTEINA DE SUPERVIVENCIA DE LAS MORONEURONAS (SMN)

La proteína SMN humana está altamente expresada en todas las células somáticas tanto durante el desarrollo embriológico como en las células diferenciadas y es imprescindible para la supervivencia de todas las células somáticas. Es ubicua en el citoplasma y en el núcleo celular, concentrándose principalmente en los CBs (La Bella et al., 1998; Tapia, et al., 2017) (Fig. 18A). Además, se ha detectado en otros compartimentos subcelulares, incluyendo los axones y conos de crecimiento

neuronales (Pagliardini et al., 2003), en los discos Z sarcoméricos de las miofibras (Walker et al., 2008), las cisternas de Golgi (Ting et al. 2012), los microtúbulos (Torres-Benito et al., 2011), los gránulos de estrés (Zou et al., 2011), así como unida a microsomas y al complejo del poro nuclear (Bowerman et al., 2017). La proteína SMN cobró gran relevancia clínica cuando se demostró que la delección y/o mutación bi-alélica del gen *SMN1*, que codifica la proteína, causaba una devastadora enfermedad neuromuscular de la infancia, la atrofia muscular espinal (SMA).

Es una proteína de 294 aminoácidos muy conservada en la evolución, indicando su importancia funcional en la evolución filogenética de las especies animales. Está codificada por los primeros ocho exones de los genes *SMN1* y *SMN2*. Su extremo N-terminal es muy básico (enriquecido en lisinas), su porción central contiene un dominio Tudor hidrofóbico y su extremo C-terminal, rico en prolina, contiene un dominio box-YG. Cada exón codifica un dominio de interacción de la SMN con diversas moléculas, si bien algunos se solapan en el espacio. Así, el exón 2 codifica el dominio de interacción de SMN con p53 y ácidos nucleicos (RNAs y DNA), parcialmente superpuesto con el codificado por el exón 2B. El exón 3 codifica el dominio Tudor, involucrado en múltiples interacciones con la fibrilarina, hnRNP Q, hnRNP R, hnRNP U, proteína del Sarcoma de Ewing (EWS), FUS, proteínas del complejo Sm y la RNA polimerasa II. Por su parte, los exones 4, 5, 6 y 7 determinan dominios de interacción con la profilina 2a y engloban una Caja YG especializada en la homo-oligomerización, la estabilidad y localización celular de la SMN (Shing et al., 2017; Chaytow et al., 2018) (Fig. 18B). Sobre la base de su ubicuidad intracelular y por sus múltiples dominios de interacción molecular, se considera a la SMN como una proteína “housekeeping” multifuncional.

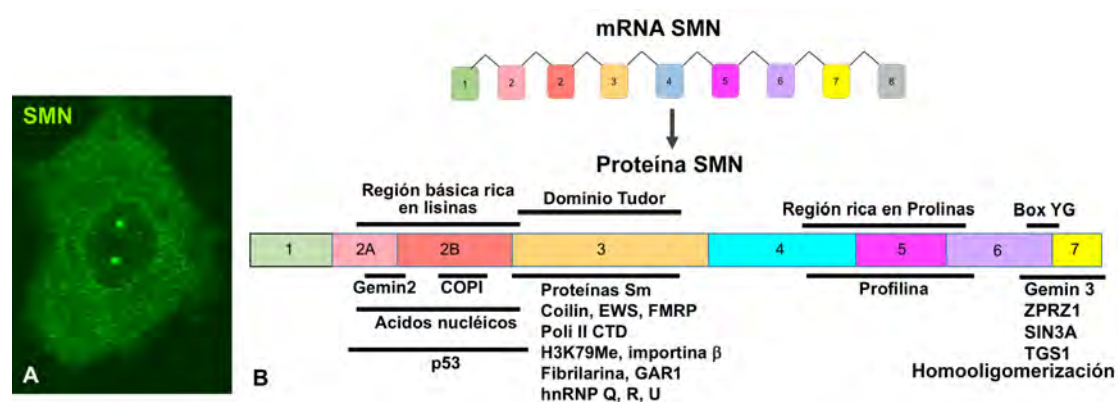


Figura 18. A, Distribución de la proteína SMN en el citoplasma y en el núcleo neuronal. Obsérvese como SMN se concentra en los CBs. B, Diagrama de los dominios de interacción molecular de SMN con moléculas dianas (Basado en Singh et al.; 20017; doi: 10.1016/j.bbgrm.2016.12.008).

1.3.1 El complejo SMN

La proteína SMN tiene una elevada tendencia natural a homo-oligomerizar *in vitro*. De hecho, por el momento no se conoce la estructura de la proteína SMN en estado monomérico ya que, es indetectable y carente de funcionalidad en las células somáticas (Weiss et al., 2016). Para su activación funcional precisa de su propia auto-oligomerización mediante interacción recíproca. En particular, en el proceso de biogénesis de las snRNPs, el homopolímero de SMN se une a otras proteínas denominadas Gemins (Gemin2-Gemin8) y a la proteína Unrip (*UNR-interacting protein*), dando lugar al macrocomplejo, de variable estequiometría, denominado complejo SMN (Kolb et al., 2007; Pellizzoni et al., 2007; Chaytow et al., 2018) (Fig. 19). La polimerización de la SMN amplifica su capacidad de unión con proteínas específicas y complejos de alto peso molecular como son diversas familias de RNPs (Li et al., 2014) (Fig. 19).

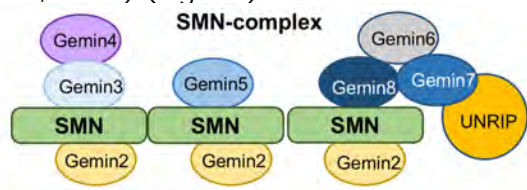


Figura 19. El complejo SMN. La SMN homo-oligomeriza de manera natural. Este polímero une otras proteínas denominadas "Gems" y la proteína UNRIP para formar el complejo SMN.

El mecanismo de ensamblaje molecular de los componentes del complejo SMN no es bien conocido. Se propone un engranaje escalonado sobre el homopolímero de SMN. Con la evolución filogenética de las especies el complejo SMN ha adquirido mayor complejidad. Su estructura más primitiva consiste en el polímero de SMN y Gemin2 pero, secuencialmente, se han ido adicionando al complejo SMN las proteínas Gemin3/4, Gemin6/7, Gemin5 y UNRIP, consiguiéndose así una progresiva capacidad funcional más específica y diversa (Tisdale et al., 2014). Merece la pena señalar que, en el proceso evolutivo, ha sido fundamental la adquisición en la proteína del dominio YG-box. Éste le confiere la capacidad inherente de auto-oligomerización (exones 6-7 del C-terminal) y de la secuencia de argininas simétricamente dimetiladas situadas en el el dominio Tudor. Ambos dominios pueden servir de andamiaje estructural para iniciar su propio autoensamblaje y promover la asociación con las proteínas Gemins. Otro aspecto funcional del complejo SMN es la capacidad de formar partículas de orden superior, que pueden alcanzar un tamaño que va desde 20S a 80S, y así, incrementar la actividad funcional de la proteína SMN (Li et al., 2014; Tisdale et al., 2014; Curmi & Cauchi, 2018).

En el complejo SMN, la proteína SMN actúa como chaperona molecular controlando el ensamblaje de moléculas reguladoras implicadas en numerosas vías metabólicas y en la biogénesis de los CBs. Así, es fundamental en la biogénesis de de UsnRNPs, incluyendo las que configuran estructuralmente los espliceosomas, las implicadas en el procesamiento de las histonas y en el transporte axonal anterógrado, particularmente del mRNA β -actina (Shing et al., 2017; Chaytow et al., 2018). De hecho, la deficiencia de SMN interfiere estos procesos y, consecuentemente, el procesamiento de mRNAs, principalmente el “splicing”. En este contexto, la disfunción del “splicing” se considera un mecanismo patogénico primario de la muerte de las MN α en la SMA (Fig. 20). En la actualidad, la SMA es considerada una enfermedad incluida en el grupo de las patologías de los RNAs (“RNAopathies”), un grupo de enfermedades neurodegenerativas muy heterogéneas del SNC y del SNP que incluyen la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la demencia frontotemporal (Belzil et al., 2013; Tapia et al., 2017; Narcis et al., 2018).

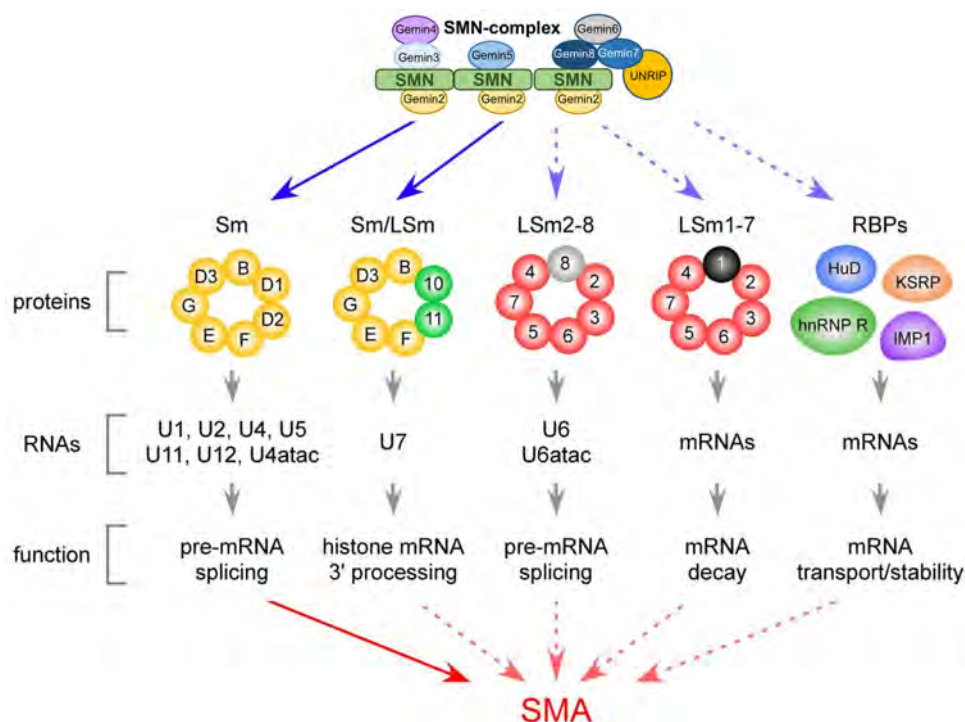


Figura 20. Papel del complejo SMN en la disfunción del “splicing” en la SMA. Vías y funciones del complejo SMN: el “splicing”, el procesamiento de histonas, en la degradación de mensajeros, el transporte y estabilidad. Las flechas azules indican las funciones del complejo SMN en la salud y su fracaso en la SMA (flechas rojas) (Modificado de Li et al., 2014; doi: 10.1016/j.semcd.2014.04.026).

Por otra parte, la SMN tiene funciones “housekeeping” que implican su participación en el ensamblaje de otros complejos de RNPs, incluyendo la biogénesis de U1snRNP, la más abundante del núcleo, asociada con la supresión de lugares

crípticos de poliadenilación y regulación de promotores (Tisdale et al., 2014), así como la biogénesis de U3snoRNP, necesaria para la maduración del rRNA 18S, y de otras snoRNPs, en las que el snoRNA guía la modificación de RNAs pequeños no codificantes, por ejemplo tRNA (Burghes & Beattie, 2009; Bernabó et al., 2017). Otras funciones recientemente descubiertas, pero no por ello menos importantes, sitúan a SMN como una proteína que opera en i) la regulación de la apoptosis, bloqueando la activación de las caspasas y regulando factores de supervivencia celular, como el supresor tumoral PTEN y la vía RhoA/ROCK, ii) la biogénesis de la partícula de reconocimiento de señal (SRP, *signal recognition particle*), iii) la traducción de proteínas (selenoproteínas) y iv) la formación de gránulos de estrés (Shing et al., 2017; Bernabó et al., 2017; Chaytow et al., 2018). Así, el déficit de SMN puede también alterar estas funciones contribuyendo a la fisiopatología de la SMA. Sin embargo, no ha sido posible demostrar que la disfunción de alguno de estos procesos cause, por sí solo, el fenotipo de SMA (Singh et al., 2017). Es importante comentar que, aunque las MN α son muy vulnerables al defecto de SMN todas células somáticas pueden ser dianas patogénicas de la carencia de la proteína. De hecho, se ha demostrado en modelos murinos de SMA la severa afectación fuera del sistema nervioso, incluyendo el corazón, órganos linfoides páncreas e hígado, así como en el propio músculo esquelético, especialmente en la unión neuromuscular (Dachs et al., 2011; Bowerman et al., 2012; Tiziano et al., 2013; Tisdale & Pellizzoni, 2015).

1.3.2 Papel funcional del complejo SMN en la biogénesis de U snRNPs

Antes de abordar el papel funcional del complejo SMN en el metabolismo de los mRNAs merece la pena describir, aunque sea brevemente, el proceso de la modificación co-transcripcional del "splicing". Es sobradamente conocido que, en las células eucariotas, los genes codificantes de proteínas se transcriben en mRNAs inmaduros o pre-mRNAs de mayor longitud que los mRNAs maduros que se traducen en el citoplasma. Las modificaciones co-transcripcionales de los pre-RNAs son cruciales para la estabilidad y exportación de los transcritos y para eliminar las secuencias no codificantes. El procesamiento co-transcripcional se inicia tan pronto como la RNA polimerasa II ha producido alrededor de 25-30 nucleótidos añadiendo una caperuza de metilguanosa (m7G) en el extremo 5'. Seguidamente, se continúa con la escisión progresiva de intrones y empalme de exones a través del proceso de "splicing" y culmina cuando la RNA polimerasa II transcribe la señal de poliadenilación

(AAUAA), que marca el sitio de adición de cola de poli(A). Además, de forma directa o indirecta, SMN participa en las tres etapas de la transcripción (iniciación, elongación y terminación) gracias a su amplio interactoma. Así, opera en la iniciación gracias a su interacción con la RNA polimerasa II, p53 y el factor transcripcional E2; de manera indirecta, en la elongación, al controlar la biogénesis de U1snRNP, y, finalmente, en la terminación, al interactuar con la helicasa DNA/RNA senataxina y con la propia RNA polimerasa II (Sing et al., 2017).

Centrando nuestro interés en el “splicing”, es preciso comentar que cada snRNP espliceosomal está compuesta por un UsnRNA específico (U1, U2, U4/6, U5, U11, U12 y U4/6atac) (Fig. 21) y el complejo de proteínas espliceosomales Sm (Fig. 21). En el espliceosoma mayor, que opera en el “splicing” de la mayoría de los mRNAs (99%), se integran las snRNPs cuyos snRNAs son U1, U2, U4/U6 y U5. Éstas reconocen intrones flanqueados por la secuencia consenso GT/AC. El espliceosoma menor está formado por las snRNPs cuyos snRNAs son U11, U12, U4atac/U6atac y U5, esta última común a los dos tipos de espliceosomas. El esplicesoma menor, dependiente de U12, reconoce secuencias intrónicas AT/AC (Cauchi, 2010; Matera & Wang, 2014) (Fig. 21). Se estima que los núcleos de las células humana contienen ~100.000 espliceosomas, los cuales son responsables de eliminar unos 200.000 intrones diferentes.

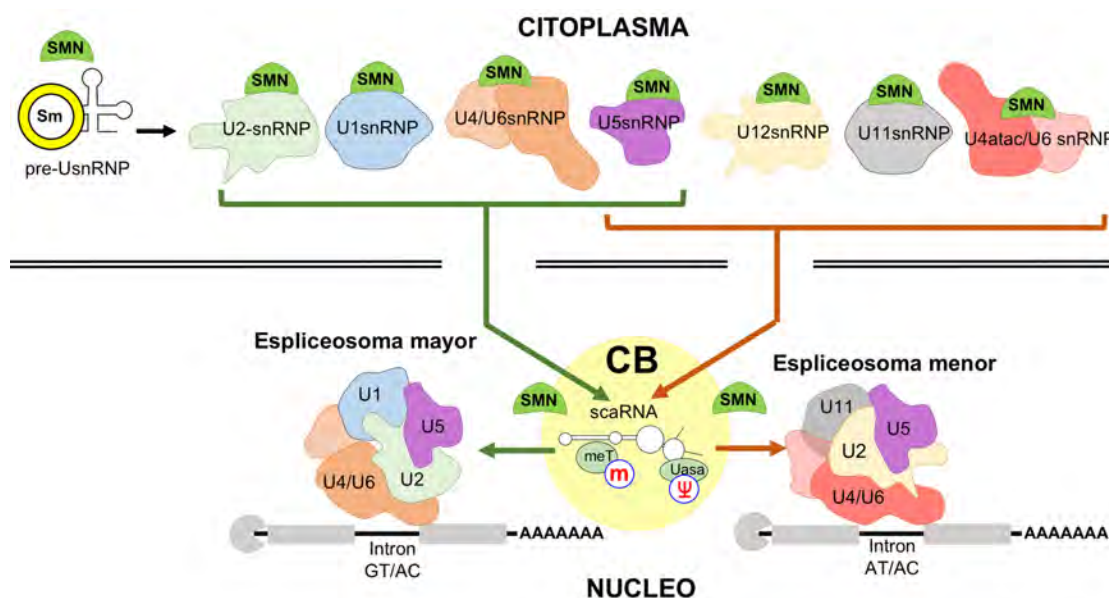


Figura 21. Las snRNPs forman los espliceosomas mayor y menor. Se caracterizan porque los U snRNAs son diferentes y reconocen diferentes secuencias intrónicas. En el espliceosoma mayor se integran las snRNPs U1, U2, U4/U6 y U5 y en el menor las snRNPs U11, U12, U4atac/U6atac y U5. En su biogénesis es fundamental el complejo SMN tanto en el citoplasma como en el CB nuclear.

En la biogénesis de las UsnRNPs espliceosomales es imprescindible el complejo SMN (Tisdale et al., 2014; Matera & Wang, 2014). Actúa como chaperona molecular facilitando el plegamiento, ensamblaje y transporte celular de U snRNPs (Cauchi, 2010).

En una primera fase nuclear, la RNA polimerasa II transcribe el pre-U snRNA espliceosomal que es exportado al citoplasma (Fig. 22a). En una segunda etapa citoplasmática, el UsnRNA recién exportado se une a la proteína SMN del complejo SMN que previamente se había unido a las proteínas espliceosomales del complejo Sm (Fig. 22b). Este complejo Sm está constituido por 7 proteínas que forman subcomplejos de heterodímeros (SmD1-D2, SmB-D3) o heterotrímeros (SmE-F-G) (Fig. 22, inset). Los subcomplejos se unen mediante la intervención de la metiltransferasa PMRT5 y la chaperona pICln. La chaperona pICln recluta las proteínas Sm y facilita la dimetilación de las proteínas Sm D1, D3 y B en los residuos de arginina, una modificación que incrementa su afinidad por SMN (Cauchi, 2010; Matera & Wang, 2014). La unión de SMN del complejo SMN es fundamental para la expresión génica, ya que asegura la correcta interacción del anillo heteroheptamérico Sm con su UsnRNA diana, dando estabilidad y protegiendo al snRNA de nucleasas, y permitiendo así el desarrollo de las siguientes etapas en la biogénesis de las snRNPs espliceosomales (Tisdale et al., 2014; Matera & Wang, 2014). SMN se une al UsnRNA recién exportado mediante Gemin5 y a las proteínas Sm a través de Gemin2 del complejo SMN (Fig. 22b).

La SMN recluta a la trimetilguanosina sintasa 1 (TGS1), que hipermetila el extremo 5' del pre-UsnRNA (TMG cap) (Fig. 22c), generando así una señal de localización nuclear sinérgica con el propio núcleo del complejo SMN. Estas dos señales, la del propio complejo SMN y del UsnRNA metilado, son reconocidas respectivamente por el receptor importina β y por la snurportin-1 que actúa como adaptador al unirse al TMG cap del UsnRNA (Cauchi, 2010; Matera & Wang, 2014) (Fig. 22d).

El complejo pre-SMN-UsnRNP recién sintetizado puede ser reimportado al núcleo, concentrándose en los CBs. El reclutamiento de las snRNPs en esta organela requiere de la interacción molecular de SMN con la proteína estructural CB coilina. (Fig. 22e). Esta interacción induce que el complejo SMN se libere de la pre-UsnRNP y que ésta prosiga su maduración, mediante la metilación y pseudouridinación dependiente de scaRNAs ubicuos en el CB (Cauchi, 2010) (Fig. 22f). Las snRNPs espliceosomales maduras se asocian a proteínas específicas de cada tipo de UsnRNPs

y se ensamblan en los espliceosomas, bien directamente o bien haciendo una escala previa en los nuclear speckles (Cauchi, 2010; Li et al., 2014; Matera & Wang, 2014) (Fig. 22g-h).

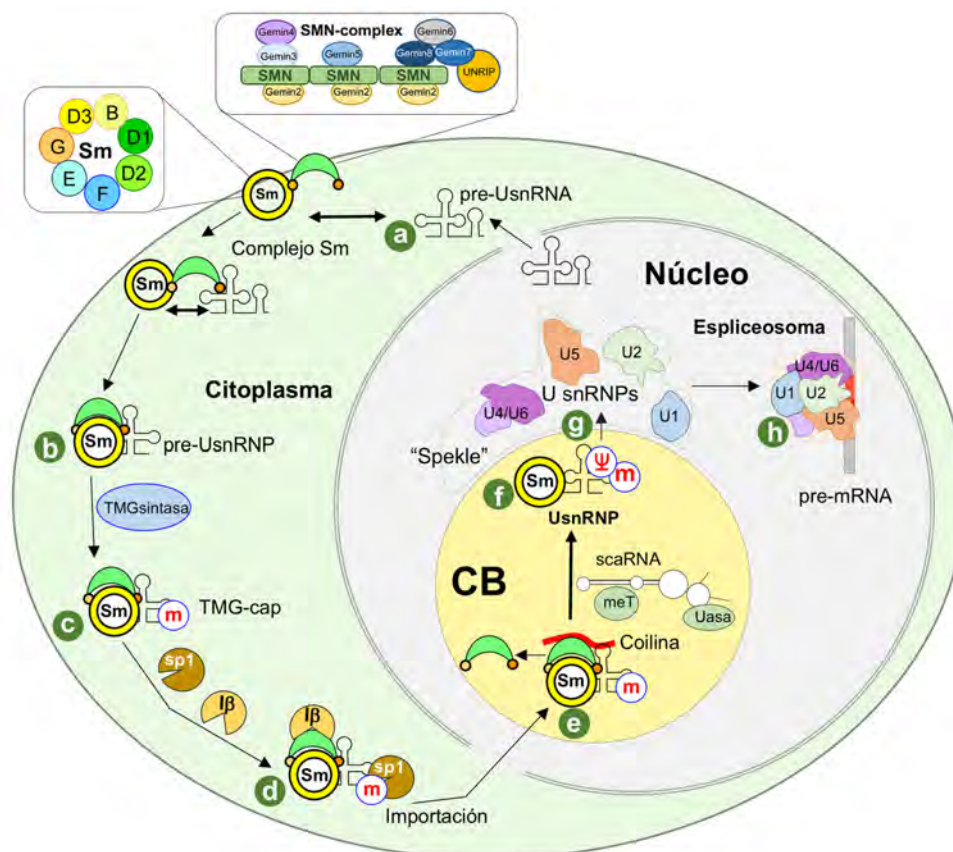


Figura 22. Biogénesis mediada por el complejo SMN. a, exportación del UsnRNA; b, interacción del complejo SMN con las proteínas Sm y con el snRNA para formar la pre-UsnRNP (el complejo Sm y SMN se muestran en los insets); c, la unión del complejo SMN estabiliza la UsnRNP por metilación del snRNA; d, se produce la importación al CB por unión de la importina beta a SMN y la snurportina1 al UsnRNA; e-f, interacción del complejo SMN con la coilina, se libera el complejo SMN y culmina la maduración de las pre-UsnRNPs por metilación y pseudouridinación mediada por scaRNAs del CB (e); g-h, las UsnRNPs salen del CB al nucleoplasma ("speckles") y se ensamblan en espliceosomas en los sitios de transcripción.

1.4 LA ATROFIA MUSCULAR ESPINAL (SMA)

La SMA es una devastadora enfermedad neuromuscular de la infancia ocasionada por el déficit de la proteína SMN. Los primeros casos clínicos de niños que padecían la enfermedad fueron descritos por dos neurólogos, el austriaco Guido Werning (1890) y alemán Johan Hoffmann (1900). Estos autores ya advirtieron que los niños con SMA mostraban diferente grado de afectación muscular, catalogando a la SMA como severa (tipo I) e intermedia (tipo II). Posteriormente, en reconocimiento a dichos autores, a la forma mas severa de SMA de Tipo I se la denominó enfermedad

de Werning y Hoffmann. A mediados del siglo XX, varios autores, y muy especialmente Kugelberg y Welander, describieron la SMA de tipo III. Para todos los estudiosos de la SMA, los diferentes fenotipos de la enfermedad tenían rasgos en común, la degeneración de las MN α de la asta anterior de la médula espinal, diferente grado de hipotonía y debilidad muscular simétrica, predominantemente proximal y de predominio en las extremidades inferiores y en los músculos intercostales. Además, en la forma más severa (tipo I), mostraban parálisis flácida completa y muerte temprana por grave insuficiencia respiratoria. A mediados del siglo XX varios autores y, en más detalle, Kugelberg & Welander, describieron la SMA de tipo III y, en base a la severidad clínica, se estableció la primera clasificación (ver Kolb & Kissel, 2015).

Sin embargo, la conquista más importante en el conocimiento de la patógena de la SMA se produjo a finales del siglo XX, cuando en el laboratorio de la neuropediatra Judith Melki se descubrió que más del 95% de los niños que padecían SMA presentaban una dramática reducción de los niveles de la proteína SMN en la médula espinal debida a la delección y/o mutación específica del gen *SMN*. Esto permitió caracterizar a la SMA como una enfermedad homocigota y monogénica. Otro importante hallazgo del grupo de Melki fue que, a diferencia de la mayoría de las especies animales, que disponen de una sola copia del gen *SMN*, el salto evolutivo a la especie humana produjo su duplicación invertida, dando lugar al gen *SMN1*, telomérico, y a su parálogo, el gen *SMN2*, orientado centroméricamente, del que, además, pueden existir dos o más copias (Lefevbre et al., 1997; Monani, 2005; Burghes & Beattie, 2009). Además, demostraron que la SMA se debía exclusivamente a la delección y/o mutación del gen *SMN1*, ya que la ausencia de *SMN2* no daba fenotipo de SMA. No obstante, aunque el gen *SMN2* no participaba directamente en la patología de la enfermedad, se propuso que el número de sus copias era determinante en la severidad y diagnóstico, catalogándolo como el principal modificador clínico de la SMA (Lefevbre et al., 1997; Coover et al., 1997). Al mismo tiempo, en el laboratorio de McPherson se demostró que la eficiencia funcional del producto génico traducido de *SMN* era diferente entre ambos genes. Mientras que la eficiencia del gen *SMN1* es del 100%, la del *SMN2* es meramente residual pues sólo genera aproximadamente un 15% de *SMN* funcional (Monani et al., 1999).

Aprovechando la ventaja de que la SMA es monogénica, a principios del siglo XXI se desarrollaron los primeros modelos experimentales en ratones transgénicos que parcialmente reproducen diferentes variantes de la SMA humana. Estos modelos experimentales mimetizan con bastante fidelidad la evolución clínica de la enfermedad y la histopatología caracterizada por la degeneración de las MN α (Hsieh-Li et al., 2000; Monani et al., 2000). Aspectos fundamentales que no pueden analizarse en la SMA humana, porque el material de autopsia representa la fase final de la neurodegeneración, cuando los cambios involutivos ya no son específicos de la enfermedad. Además, la disponibilidad de animales transgénicos, han servido para diseñar novedosas aproximaciones terapéuticas que han dado esperanzas de vida a los niños que padecen la enfermedad. De hecho, aunque durante más de 100 años, el tratamiento de los pacientes ha sido paliativo y de soporte, en la última década se ha creado una guía clínica, orientada a resolver las necesidades respiratorias, nutricionales, ortopédicas, emocionales, rehabilitadoras y sociales y se ha diseñado las primeras terapias clínicas destinadas a incrementar los niveles de la proteína SMN (Wang et al., 2007) (Fig. 23).

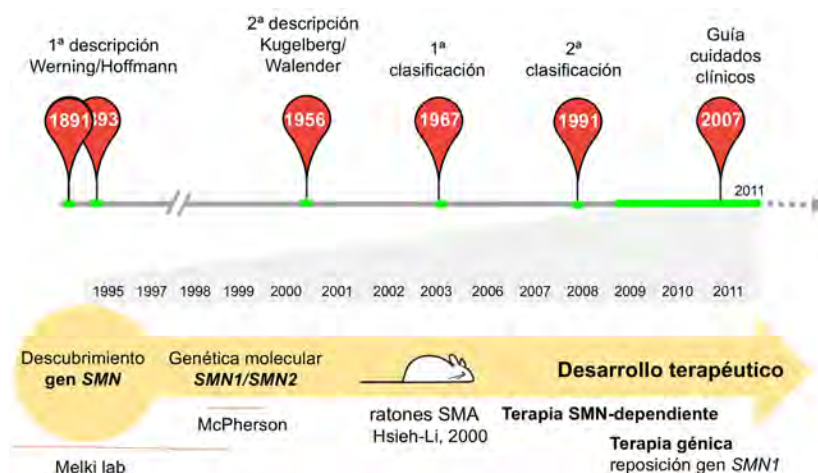


Figura 23. Cronograma temporal de la SMA. En el 1891 Werning y otros investigadores establecen la primera clasificación. Tras el descubrimiento del gen *SMN* han desarrollado animales transgénicos y dianas terapéuticas (basado en Kolb y Kissel, 2011; doi: 10.1001/archneur.2011.74).

En la actualidad, la SMA es la primera enfermedad neurológica con una aproximación terapéutica potencialmente eficaz autorizada tanto por la FDA ("Food and Drug Administration") como por la EMA ("European Medicines Agency"). Son destacables las denominadas terapias "SMN-dependientes", orientadas a incrementar los niveles intracelulares de SMN, actuando a diferentes niveles,

principalmente con inhibidores de las histona deacetilasas (HDAC) que activan el promotor del gen *SMN2* e incrementan la transcripción y con oligonucleótidos antisentido (ASOs, *antisense oligonucleotide*). Es muy prometedor el fármaco Nusinersen/Spinraza®, un ASO que favorece la inclusión del exón 7 en el “splicing” alternativo de *SMN2*. Más recientemente, la terapia génica con AAV9-*SMN1*, un vector viral adeno-asociado no replicante que vehiculiza una copia del gen humano funcional *SMN1* a las células somáticas (Bowerman et al., 2017).

Finalmente, merece la pena señalar que en la actualidad además del número de copias del gen *SMN2*, otros factores pueden modificar el pronóstico de la SMA como son la *plastina3*, *NAIP* (*neuronal apoptosis inhibitory protein*), *H4N4* (*Hemagglutinin N4 protein*), *IGF1* (*insulin-like growth factor 1*), *ZPR1* (*Zinc finger protein*) y *UBA1* (*Ubiquitin-like modifier activating enzyme 1*), pero ninguno es capaz de compensar completamente la pérdida de la proteína SMN (Singh et al., 2017).

1.4.1 Epidemiología y características clínicas y fenotípicas de la SMA

La SMA es una enfermedad considerada la primera causa de mortalidad infantil de origen genético en el mundo. Tiene una incidencia anual de 1 caso por cada 6.000 a 10.000 niños nacidos vivos, y una frecuencia de portadores de 1:35 a 1:50, según etnias (Bäumer et al., 2009; Govoni et al., 2017). Clásicamente, se ha incluido a la SMA en el conjunto de síndromes de “enfermedades de la motoneurona”, un grupo de patologías neuromusculares muy severas y heterogéneas que afecta exclusiva- o predominantemente a las motoneuronas de la corteza cerebral y/o núcleos motores del tronco del encéfalo y/o de las astas anteriores de la médula espinal. En la SMA el déficit de SMN causa la muerte progresiva de las MN α del asta anterior de la médula espinal y, como consecuencia, la pérdida de la conectividad sináptica en la unión neuromuscular. Aunque, por el momento, la SMA es una representante clásica de dichas enfermedades de la neurona motora, muy probablemente, en poco tiempo, podría ser catalogada como un síndrome multisistémico, ya que el déficit de SMN también afecta a otros tipos celulares no neuronales (Verhaart et al., 2017).

Aunque los pacientes con SMA muestran una remarcable variabilidad fenotípica, tradicionalmente se clasifica la enfermedad en función de la edad, comienzo de los síntomas clínicos, evolución y número de copias del gen *SMN2* en: i) SMA tipo 0, la forma más severa, se inicia en el útero y suele ser letal prenatalmente

o en los primeros meses de vida postnatal; ii) SMA tipo I o síndrome de Werdnig-Hoffmann, muy severa, de aparición después del nacimiento, los niños no suelen superar los dos años de vida; iii) SMA tipo II, los pacientes son capaces de sentarse erguidos que no caminan y suelen sobrevivir hasta la adolescencia; iv) SMA tipo III (enfermedad de Kugelberg-Welander juvenil), los pacientes son capaces caminar de forma independiente con una esperanza de vida normal o casi normal, y v) SMA tipo IV o pseudomiopática, de inicio en adultos (para revisión, ver Verhaart et al., 2017). Con mayor o menor proporción, en todos los casos se produce degeneración de las MN α que conduce al desarrollo de una debilidad muscular progresiva con atrofia muscular neurogénica. En la variante más severa de tipo I, los bebés muestran al nacer hipotonía generalizada dando el aspecto clínico de



Figura 24. La imagen ilustra la hipotonía característica de un niño con SMA tipo I. Estos niños al nacer parecen muñecos de trapo. www.medigraphic.org.mx.

“niño de trapo” (Fig. 24). En esta variante la pérdida de MN α es muy precoz y abrupta lo que

conlleva el desarrollo progresivo de debilidad y parálisis muscular. La parálisis muscular es, característicamente, simétrica y proximal. Tiene predominio axial en extremidades inferiores que se extiende a los músculos intercostales, conduciendo ineludiblemente a la muerte por fracaso respiratorio en los dos primeros años de vida postnatal (Bäumer et al., 2009; Tisdale & Pellizzoni, 2015).

1.4.2 Bases genéticas de la SMA

La SMA es una enfermedad autosómica recesiva monocigota, causada en el 95% de los casos por delección, mutación o conversión homocigota (bi-alélica) del gen *SMN1*. El resto representan pequeñas mutaciones en dicho gen, bien delecciones, mutaciones antisentido o mutaciones de empalme (*splice mutations*). En éste grupo de mutaciones se ha basado una clasificación denominada como “mutaciones leves”, responsables de los tipos II y III de SMA. Aunque estas mutaciones no comprometen la capacidad funcional, impiden la interacción molecular con otras proteínas (Selenko et al., 2001; Burghes & Beattie, 2009; Lafarga et al., 2018).

La mayoría de las especies animales disponen de una sola copia del gen *SMN* que codifica para la proteína *SMN*, pero el salto evolutivo a la especie humana

provocó su duplicación invertida, dando lugar a los genes *SMN1* telomérico y *SMN2* centromérico, separados por 900 kb, si bien, *SMN2* puede estar duplicado e incluso tener varias copias repetidas. Ambos genes están situados en el cromosoma 5 (q11.2-q13.35q3), una región de alta inestabilidad genómica que provoca, en el 2% de los pacientes, mutaciones *de novo* en el gen *SMN1* (Wirth, 2000; Markowitz et al., 2012). La transcripción de *SMN1* y *SMN2* está estrictamente regulada por factores genéticos y epigenéticos. Así, el exón 1 dispone de tres lugares de inicio de la transcripción "upstream" y varios factores reguladores, incluyendo $INF\gamma$, $INF\beta$ y CREB1. Asimismo, son fundamentales mecanismos epigenéticos, fundamentalmente de las histonas. De hecho, la administración de inhibidores de HDAC potencia la transcripción de múltiples genes, incluyendo el gen *SMN2*, por lo se ha utilizado como terapia para incrementar los niveles de proteína SMN (Tiziano et al., 2013).

La secuencia de nucleótidos de los genes *SMN1* y *SMN2* es virtualmente idéntica, muestran nueve exones que, difieren solo en cinco nucleótidos en sus secuencias de DNA. Uno de las cuales, consiste en la transición de la sexta citosina (C) del el exón 7 de *SMN1* por una timidina (T) en el *SMN2* (Monani et al., 1999) (C→T). Esta mutación en *SMN2* ocasiona un profundo impacto funcional ya que, la T potencia un salto en la lectura del exón 7, resultando en un "splicing" alternativo con producción mayoritaria (85%-90%) de transcritos denominados *SMN Δ 7*, que carecen del exón 7 y codifican una forma truncada e inactiva de la proteína SMN (Lorson et al., 1999). El resto (10%-15%) tiene una longitud completa, es estable y funcional (Burghes & Beattie, 2009; Tisdale & Pellizzoni, 2015). Por lo tanto, en condiciones fisiológicas el gen *SMN1* es la única fuente de la proteína SMN, mientras que el producto del gen *SMN2* es una aportación meramente residual.

No obstante, cuando *SMN1* está deletado o la mutación inactiva funcionalmente al gen, los niveles de la proteína dependen del número de copias disponibles de *SMN2*, de esta forma el gen *SMN2*, funcionalmente "anónimo" en condiciones fisiológicas, se convierte en guardián de la SMA. Así, *SMN2* constituye el factor más determinante en el diagnóstico y pronóstico clínico de la enfermedad. No obstante, por lo general, la pequeña cantidad de la proteína SMN funcional que produce *SMN2* no es suficiente para compensar completamente el déficit, ni evita el desarrollo de la enfermedad. Así, la disponibilidad de una copia única de *SMN2* no garantiza la supervivencia y es letal en la SMA tipo 0 o tipo I. Sin embargo, la existencia de más de dos copias reduce la neurodegeneración y mejora el pronóstico

clínico (McAndrew, 1997; Burghes, 1997; Lafebvre et al., 1997; Harada et al. 2002). En este contexto, la delección homocigota de *SMN1* y *SMN2*, provoca la muerte fetal en la fase de pre implantación embrionaria, la forma más letal de SMA o de tipo 0 (Boyer et al., 2013) (Fig. 23).

El salto en la lectura del exón 7 en el gen *SMN2* se produce porque con el cambio C→T pierde su capacidad para interactuar con el factor regulador del “splicing” ISS1 (*intrón splicing silencer*), lo que conlleva al “splicing” alternativo con exclusión del exón 7 en la mayoría de los transcritos de los mRNAs SMN con gran repercusión funcional en los transcritos *SMNΔ7*. Primero, carecen de una secuencia de nucleótidos necesaria para la estabilidad y función de la proteína SMN (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Govoni et al., 2017). Segundo, la ausencia del exón 7 impide su auto-oligomerización, un requisito fundamental para su actividad biológica. Tercero, la pérdida del exón 7 excluye el motivo QNQKE, una secuencia de exportación nuclear (Singh et al., 2017). Finalmente, la exclusión del exón 7 añade a la proteína SMN un motivo de 4 aminoácidos (EMLA) codificado por el exón 8, que actúa como potente señal de degradación de la proteína *SMNΔ7* (degron, *SMNΔ7-DEG*) (Cho & Dreyfuss, 2010; Singh et al., 2017). Como consecuencia, más del 80% de la proteína *SMNΔ7* es muy inestable y se degrada rápidamente por el sistema proteolítico ubiquitina-proteasoma (Burnett et al., 2009). Aunque en presencia del gen *SMN1*, la aportación del gen *SMN2* en la proteostasis celular es meramente residual, cobra un protagonismo de inestimable valor en el pronóstico clínico la SMA (Fig. 25).

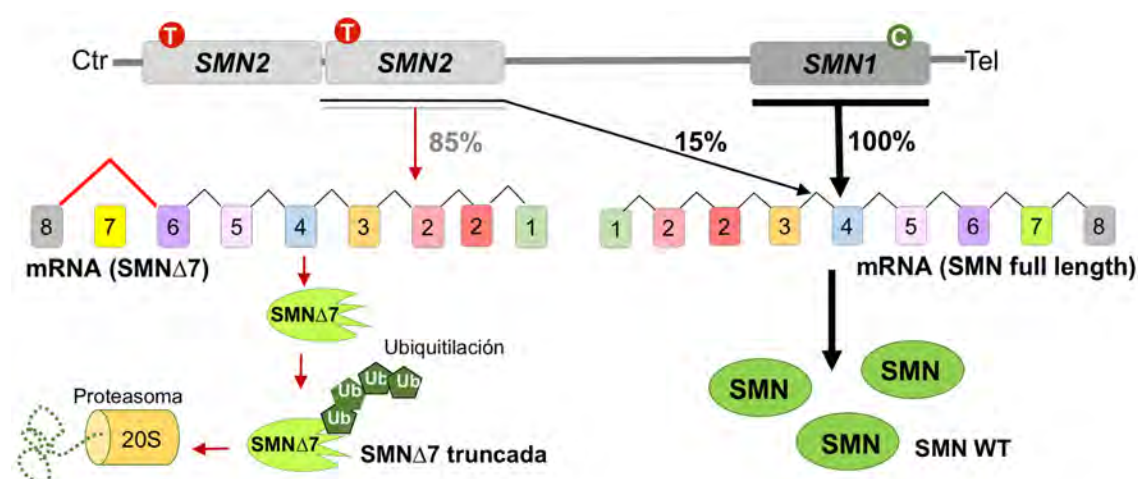


Figura 25. Genes *SMN1* y *SMN2*. La proteína SMN humana está codificada por los genes *SMN1* y *SMN2*. Mientras que los transcritos primarios de *SMN1* codifican una proteína funcional al 100% los derivados del *SMN2*, en un 85% de los casos experimentan “splicing” alternativo del exón 7, codificando una proteína inestable que es ubiquitinada y degradada por el proteasoma.

1.5 PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Como se ha comentado en los apartados anteriores, en la SMA, los niveles reducidos de SMN en las MN α impiden una correcta biogénesis de snRNPs espliceosomales y producen una alteración del “splicing” de los pre-mRNAs. Aunque en la SMA también participan otras alteraciones celulares, como defectos en el flujo axónico de determinados mRNA (actina) y en la formación y mantenimiento de la sinapsis (Rossoll et al., 2003), la patología de “splicing” es la disfunción mejor conocida y debe contribuir de manera esencial a la fisiopatología de la SMA (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Tapia et al., 2017; Narcis et al., 2018). Existen diversos estudios de biología molecular que han analizado en profundidad las alteraciones en el splicing en células derivadas de pacientes y de modelos murinos de SMA (Zhang et al., 2008; Lotti et al., 2012; Jing et al., 2017; Doktor et al., 2017). No obstante, existe muy poca información sobre las alteraciones, a nivel celular, de los compartimentos nucleares implicados en el procesamiento nuclear de mRNAs, así como sobre la reorganización nuclear y citoplasmática de los mRNAs en las MN α SMA. De especial relevancia es la potencial contribución de los CBs a la patogenia de esta enfermedad, dada su función fundamental en la biogénesis de las snRNPs espliceosomales necesarias para ensamblar la maquinaria del “splicing”, el espliceosoma (Machyna et al., 2013; Matera & Wang, 2014; Lafarga et al., 2017). Además, el CB es el sitio de maduración de snoRNPs nucleolares que deben ser transferidas al nucleolo donde operan en el procesamiento de los pre-rRNAs.

En este contexto, nos planteamos analizar cómo el déficit de SMN en las MN α del modelo murino SMN Δ 7 de SMA afecta a la organización y comportamiento del CB, considerado como una central nuclear en el procesamiento SMN-dependiente de diversas categorías de snRNPs (Machyna et al., 2015). Hemos dedicado especial atención a investigar si la disfunción de los CBs, además de afectar al procesamiento de mRNAs, impide el normal acoplamiento estructural y funcional entre CBs y nucleolo, que es especialmente relevante en neuronas (Lafarga et al., 2017; Trinkle-Mulcahy & Sleeman, 2017). Si es así, el déficit en la transferencia al nucleolo de las snoRNPs maduras en el CB debería comprometer la estructura y función del nucleolo, especialmente en el procesamiento de los pre-rRNAs. Consideramos que la posible disfunción SMN-dependiente del nucleolo podría interferir con la biogénesis de ribosomas y contribuir a la disrupción de la

maquinaria de síntesis de proteínas y a los defectos en la traducción de mRNAs reportados en la SMA (Tapia et al., 2012; Bernabó et al., 2017).

Es bien conocido que defectos en el splicing de pre-mRNAs frecuentemente impiden el reclutamiento de factores de exportación nuclear de mRNAs maduros, dando como resultado la retención nuclear de formas inmaduras, incorrectamente procesadas, de mRNAs (Schmid & Jensen, 2010). De hecho, en varios procesos neurodegenerativos se ha demostrado la formación de inclusiones nucleares que contienen formas anormales, incorrectamente procesadas, de mRNAs (Smith et al., 2007; Qurashi et al., 2011; Bengoechea et al., 2012; Klein et al., 2016). En este contexto, también nos planteamos investigar si el defecto SMN-dependiente del splicing en las MN α de la SMA afecta a la exportación nuclear y distribución celular de los mRNAs poliadenilados (todos menos los de las histonas), dando como resultado su retención nuclear en agregados o gránulos de RNA y a la consiguiente reducción de su disponibilidad citoplasmática para la traducción. Además, nos planteamos analizar la posible reorganización nuclear de varias proteínas de unión a los mRNAs que secuencialmente operan en el procesamiento y exportación nuclear. Finalmente, deseamos demostrar la existencia de mRNAs inmaduros, que retienen secuencias intrónicas, como potenciales candidatos a su retención nuclear en las MN α de la SMA.

2. Objetivos



2. OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto de Tesis Doctoral es estudiar si el déficit de SMN afecta a la organización nuclear en las MN α del modelo murino SMN Δ 7 de SMA. En particular, deseamos profundizar en el conocimiento de las bases celulares y moleculares de la disfunción, SMN-dependiente, del procesamiento de mRNAs y rRNAs en esta población neuronal.

Objetivos específicos:

2.1 Respuesta del CB y del nucleolo al déficit de SMN en las MN α -SMN Δ 7

1. Analizar si el déficit de SMN afecta a la biogénesis de CBs.
2. Analizar si el déficit de SMN afecta al "splicing" y promueve la retención de intrones en mRNAs importantes para el metabolismo neuronal.
3. Determinar si la potencial disfunción de los CBs afecta a la estructura y función del nucleolo.

2.2 Reorganización nuclear y citoplasmática de los mRNAs poliadenilados en las MN α -SMN Δ 7

4. Analizar si el déficit de SMN afecta a la distribución y procesamiento de pre-mRNAs y conduce a su retención nuclear en gránulos o inclusiones de RNA
5. Estudiar la reorganización nuclear de proteínas de unión a RNA implicadas en el procesamiento y exportación de mRNAs.
6. Investigar el impacto que tiene el déficit de SMN en la maquinaria de síntesis de proteínas.

3. Material y Métodos

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El modelo animal utilizado en el presente trabajo de Tesis Doctoral fue el ratón transgénico SMN Δ 7, un modelo murino de atrofia muscular espinal (SMA) tipo I. Estos animales presentan delección homocigota del gen *Smn* murino y la inclusión de dos copias del transgen humano SMN2 y del cDNA codificante de la proteína SMN Δ 7 (Le et al., 2005). El cruce de animales heterocigotos ($Smn^{+/-}; SMN2^{+/-}; SMN\Delta7^{+/+}$), procedentes de los Laboratorios Jackson (número de stock 005025, Bar Harbor USA), permitió la obtención de ratones wild-type (WT, $Smn^{+/+}; SMN2^{+/+}; SMN\Delta7^{+/+}$) y SMN Δ 7 ($Smn^{-/-}; SMN2^{+/+}; SMN\Delta7^{+/+}$). Los ratones SMN Δ 7 reproducen las manifestaciones clínicas e histopatológicas de la SMA tipo I humana, presentando un severo fenotipo posnatal con una esperanza de vida media de dos semanas (Le et al., 2005).

Los animales se criaron y mantuvieron en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal (SEEA) de la Universidad de Lleida a temperatura y humedad relativa constantes, fotoperiodo artificial de 12 horas y alimentados *ad libitum* con pienso compuesto para roedores (T2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Diet, Oxon, Reino Unido).

El protocolo de mantenimiento, manejo y sacrificio de los animales cumplió con la actual normativa europea (2010/63/UE), legislación española (RD 53/2013) y de la Generalitat de Cataluña (DOGC 2073, 1995). Además, los procedimientos empleados fueron previamente aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal de la Universidad de Lleida.

3.1.1 Genotipado de los animales

Para la identificación del genotipo de los animales de experimentación se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés "Polymerase Chain Reaction").

Para la extracción del DNA genómico (gDNA) de fragmentos de cola de ratón se utilizó el kit "Phire Tissue direct PCR mastermix" (Thermo). El gDNA se extrae mediante una incubación de la muestra con el buffer de lisis a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras la neutralización, la presencia del gen *Smn*, en sus variantes wild-type (Smn^{+}) o con el marco de lectura interrumpido por la

inserción de *LacZ* (*Smn*⁻), se amplifica por PCR utilizando los reactivos del propio kit y los siguientes primers cebadores (Thermo): *Smn* sentido 5´-CTCCGGG ATATTGGGATTG-3´; *Smn*⁺ reverse 5´-TTTCTTCTGGCTGTGCCTTT-3´ y *Smn*⁻ reverse 5´-GGTAACGCCAGGGTTTTCC-3´. La PCR se realizó en un termociclador (Corbett Research) con las siguientes etapas:

Temperatura	Duración	Repeticiones
98°C	5 minutos	1X
98°C	5 segundos	30X
62°C	5 segundos	
72°C	20 segundos	
72°C	1 minutos	1X
4°C	-	-

Los productos de PCR amplificados se analizan en geles de agarosa del 1% en tampón Tris-borato-EDTA 0.5X (TBE: Tris-base 50 mM, ácido bórico 50 mM, EDTA 1mM; pH 8). Al gel se añaden 0.4 µg/ml de RedSafe (IntRON Biotechnology) para la visualización de las distintas bandas del DNA amplificado bajo una lámpara de luz ultravioleta (Gel Doc XR, BioRad Laboratories, Barcelona, España). El marcador de peso molecular empleado fue el Mass Ruler™ DNA ladder mix (Fermentas). Los carriles donde aparecen dos bandas de diferente tamaño (300pb y 400pb) corresponden a animales heterocigotos, mientras que en los que aparece una sola banda corresponden a animales de los genotipos WT (300bp) o SMNΔ7 (400bp), respectivamente. Una vez determinado el genotipo, los animales fueron identificados a través de un marcaje con tinta verde de tatuaje en las extremidades (Ketchum 24201-01, Fine Science Tools).

3.1.2 Obtención y procesamiento del tejido biológico

En el presente Trabajo de Tesis Doctoral se emplearon muestras de la región lumbar de la médula espinal de ratones WT y SMNΔ7. Para la extracción de muestras de médula espinal en los días postnatales P5 (etapa pre-sintomática) o P14 (etapa sintomática), los animales fueron sacrificados mediante decapitación para las técnicas de Biología Molecular o fijados por la técnica de perfusión para los experimentos de Biología Celular, previa anestesia con pentobarbital (50 mg/Kg).

3.1.2.1 Extracción de médula espinal

La obtención de muestras de médula espinal para las técnicas de Biología Molecular se llevó a cabo por hidroextrusión. Los animales fueron anestesiados por inhalación de éter etílico y sacrificados por decapitación. Inmediatamente después de la decapitación, se seccionó la columna vertebral a la altura de la cresta iliaca. Una aguja conectada a una jeringa de 15ml conteniendo suero salino (NaCl 0.9%) se insertó por el orificio distal del canal vertebral y ejerciendo presión, la médula espinal se expulsa por el orificio proximal. Rápidamente, la médula espinal se disecciona por la línea media para separar los dos hemi cordones espinales y se extrae la región lumbar. Las muestras de tejido fueron guardadas en criotubos, congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta su uso.

3.1.2.2 Técnica de perfusión

Los animales fueron profundamente anestesiados utilizando pentobarbital administrado por vía intraperitoneal, a una dosis de 50mg/kg de peso corporal. A continuación, y una vez comprobada la total ausencia de movimientos reflejos, los tejidos se fijaron mediante perfusión transcardíaca según el procedimiento de Palay y Chan-Palay (1974). Se realizó una incisión en Y, con un tramo central abdominal y dos tramos laterales siguiendo el reborde costal. Posteriormente se abrió la cavidad torácica, seccionando el diafragma en su inserción anterior, y se levantó el peto costal pinzando la parte inferior del esternón, dejando así al descubierto el corazón. A continuación, se introdujo un catéter de teflón Abbocath-T® a través del vértice del ventrículo izquierdo hasta el origen del cayado aórtico para canalizar la entrada de la solución fijadora y, seguidamente, se practicó una incisión en la aurícula derecha para crear una circulación abierta y permitir así la salida de dicha solución. Para impulsar el líquido fijador se utilizó una bomba de perfusión Masterflex® a un flujo aproximado de 8 ml/min y se bombeó aproximadamente el doble de volumen (en mililitros) que el peso (en gramos) del animal. Finalizada la fijación, el animal se decapitó y con una tijera se liberaron la piel y la musculatura dorsal. A continuación, se fueron abriendo las diferentes vértebras a través de ambos pedículos vertebrales, quedando expuesto de esa manera el cordón medular. Posteriormente, se extrajo el cordón medular completo con la ayuda de una pinza lisa. Una vez diseccionada la médula, se identificaron los engrosamientos torácico y

lumbar procediéndose a seleccionar este último para llevar a cabo las diferentes técnicas de Biología Celular.

3.1.2.3 Obtención de disociados neuronales

La técnica de "squash" o disociación neuronal (Lafarga et al., 1991) permite disponer de numerosos somas neuronales enteros y perfectamente preservados, lo cual resulta de especial interés para el estudio de la distribución y cuantificación de distintas estructuras en los distintos compartimentos nucleares o citoplasmáticos, así como para realizar estudios de colocalización de moléculas (Pena et al., 2001). Para llevar a cabo esta técnica, se han utilizado médulas espinales fijadas por perfusión con paraformaldehído (Merk) al 3,7% en PBS (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 1,75mM KH₂PO₄; pH7,4). La región lumbar de la médula espinal así fijada se almacena en PBS a 4°C hasta su posterior procesamiento.

Para desarrollar la técnica de "squash" o de disociado neuronal, se realizaron secciones transversales de médula de 160µm de grosor con un vibratomo de deslizamiento (Leica VT1000S, Leica Instruments GmbH). Los cortes se recogieron en PBS, y se procedió a diseccionar el asta anterior bajo una lupa estereoscópica. Brevemente, se deposita un pequeño fragmento del asta anterior de la médula espinal sobre un portaobjetos (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Alemania). Para ello la muestra se cubre con un volumen de 10 µl de PBS y sobre ella se sitúa un cubreobjetos de 18x18 mm. A continuación, con una aguja histológica, se van disociando las neuronas por percusión. El grado de disociación y la preservación citológica de las neuronas se controla bajo observación microscópica en contraste de fase. Para que al retirar el cubreobjetos los somas neuronales queden adheridos al portaobjetos, las muestras se congelan en nieve carbónica durante aproximadamente 5 minutos y el cubreobjetos congelado se retira fácilmente con una cuchilla. Posteriormente, las muestras se estabilizan sumergiendo los portas en etanol al 96% a 4°C durante 5 minutos y se almacenan en PBS a 4°C hasta el momento de uso.

3.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

3.2.1 Inmunofluorescencia y microscopía confocal

La detección específica de los distintos antígenos mediante inmunofluorescencia en disociados neuronales de asta anterior de médula espinal obtenidos mediante la

técnica del “squash” se realizó con el siguiente proceder: Una vez obtenidas las preparaciones de squash, éstas se incuban 20 minutos con glicina 0,1M para eliminar los grupos aldehído residuales de la fijación. Tras ello, las muestras se permeabilizan con PBS-Triton X-100 0,5% durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, se lavan varias veces en PBS-Tween-20 0,05% y se procede al marcaje por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario diluido en PBS conteniendo 1% BSA. Con este propósito, se delimita la zona del disociado neuronal en el portaobjetos mediante con un lápiz de diamante o hidrofóbico y, seguidamente, se añaden 7µl del anticuerpo primario que se incubaba durante 3 horas en cámara oscura y húmeda, a temperatura ambiente (TA), o bien toda la noche (o/n) a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados aparecen enumerados en la tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Especie	Referencia	Dilución
SMN	Ratón	BD Transduction Lab.	1:50
Coilin	Conejo	Bohmann et al., 1995	1:300
Fibrilarin	Ratón	Abcam	1:25
TMG-cap	Ratón	Oncogene	1:100
Sm	Conejo	Gama-Carvalho et al., 1997	1:100
Y12	Ratón	Abcam	1:50
UBF	Ratón	Santa Cruz	1:100
SUMO1	Conejo	Santa Cruz	1:100
Nucleolin	Conejo	Abcam	1:200
PABPN1	Conejo	Santa Cruz	1:100
Prot. 20S	Conejo	Abcam	1:50
Sam68	Conejo	Santa Cruz	1:100
Chat	Cabra	Millipore	1:100
TDP43	Conejo	Proteintech Inc.	1:50
hnRNPA2/B1	Conejo	Santa Cruz	1:100
hnRNPM3/M4	Ratón	Abcam	1:100
REF	Ratón	Abcam	1:100
Y14	Ratón	Abcam	1:100

Tras varios lavados en PBS-Tween-20, las preparaciones se incuban con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo: fluoresceína (FITC), Texas Red (TxRd), Cy3 o Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, E.U.A.), durante 45 minutos, en cámara oscura y húmeda a TA. En el caso de que se requiera la inmunodetección de varias proteínas, se realizaron dobles o triples inmunomarcajes donde los anticuerpos primarios se incubaron de modo secuencial y se revelaron con una mezcla de anticuerpos secundarios específicos para cada anticuerpo primario conjugados con diferentes fluorocromos. Algunos inmunomarcajes fueron contrastados con una solución de yoduro de propidio (PI) (dilución 1:2000 a partir de un stock de 1mg/ml), que tiñe específicamente los ácidos nucleicos y, en las neuronas, contrasta preferentemente el nucleolo y los grumos de Nissl.

Las muestras se montaron con el medio de montaje VectaShield® (Vector Laboratories) o con ProLong® (Invitrogen), se sellaron con laca de uñas y a continuación se examinaron con un microscopio confocal láser Zeiss LSM 510 provisto de tres líneas de láser, argón (488nm), HeNe (543nm) y HeNe (633nm), para excitar FITC, TxRd, y Cy5 respectivamente.

3.2.2 Hibridación *in situ* de la cadena de poli(A) de los mRNAs

La técnica de la hibridación *in situ* de la cadena de poli(A) se realizó sobre disociados de MN α para detectar la distribución del RNA poliadenilado con una sonda de oligonucleótidos poly(dT) conjugada con biotina.

Para desarrollar esta técnica los disociados neuronales se lavaron varias veces con TBS a TA (TBS: Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM; pH 7,4), para después permeabilizar con una solución de TBS-E-SDS (EDTA 1mM, SDS 0,05%) durante 5 minutos a TA. Tras varios lavados en 6x-SSPE (CINa 900 mM, NaH₂PO₄ x H₂O 60 mM, EDTA 6 mM; pH 7.4) con 0.1% Tween-20 a TA, las muestras se prehibridaron con t-RNA (0.5 mg/ml) diluido en 6x-SSPE/50x-Denhardt (50x-Denhardt: 1% ficoll-400; 1% polivinilpirolidona; 1% BSA) durante 45 minutos en cámara húmeda a TA como bloqueo. A continuación se llevó a cabo la hibridación con 2 pmol/ μ l de la sonda poli(dT) diluida en 6x-SSPE/50x-Denhardt durante toda la noche (o/n) en

cámara húmeda a 4°C. Tras varios lavados a 37°C en 6x-SSPE y 4x-SSC (NaCl 600 mM, citrato sódico 60 mM; pH 7,4) con 0,1% Tween-20, se procede a revelar y amplificar la señal de hibridación. Para ello, las preparaciones se incubaron con avidina conjugada con fluoresceína (FITC), 5 µg/ml diluida en una solución de 4x-SSC-Tween-20 0,1% y BSA 1% durante 30 minutos a 37°C. Después de varios lavados con 4x-SSC-0,1% Tween-20, las muestras se reincubaron con anti-avidina conjugada con biotina (5 µg/ml diluida en 4x-SSC-Tween-20 0,1% y BSA 1%), durante 30 minutos a 37°C. Tras lavar con 4x-SSC-0,1% Tween 20, las preparaciones se incubaron de nuevo con avidina conjugada con fluoresceína durante 30 minutos a 37°C. Por último, las muestras se lavaron varias veces en 4x-SSC-0,1% Tween-20 y se continúa con el marcaje por inmunofluorescencia de epítomos específicos o de RNA con PI, como se ha explicado en el apartado 3.2.3.

3.3 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3.3.1 Inclusión en Araldita

Para el estudio de microscopía electrónica de transmisión se utilizó la técnica descrita por Palay y Chan-Palay (1974). La perfusión de los animales de experimentación se realizó con glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,12M (TF: NaH₂PO₄·H₂O 50mM; K₂HPO₄ 70mM; pH 7,4).

Trás la fijación por perfusión se extrajo la médula espinal que debe post-fijarse en la misma solución, durante aproximadamente 1 hora a TA. Tras varios lavados de 15 minutos en TF, se realizaron secciones transversales de 300µm de grosor de la región lumbar de la médula y se microdisecionaron las dos astas anteriores. A continuación se procedió a la post-fijación del tejido en tetróxido de osmio al 2% en solución tampón (glucosa 14%, CaCl₂ 0,025% en TF 0,28M) durante 2 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz. El material se lavó dos veces durante 15 minutos a 4°C con solución de lavado (ácido maleico 80mM, NaOH 7,5mM; pH 4,5). Se contrastaron las piezas con una solución de acetato de uranilo al 2% en solución de contraste (ácido maleico 80mM, NaOH 7,5mM; pH 4,5) durante 90 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, tras dos lavados de 15 minutos, se procedió a su deshidratación siguiendo los siguientes pasos de lavados:

Solución	Duración	Repeticiones
Acetona 30%	10 minutos	1X
Acetona 50%	10 minutos	
Acetona 70%	10 minutos	
Acetona 80%	15 minutos	
Acetona 90%	15 minutos	4X
Acetona anhidra	30 minutos	4X

Los bloques de tejido se incluyeron en Araldita (Durcapan) siguiendo las indicaciones especificadas por el fabricante (ACM, Fluka AG, Suiza) y se polimerizaron en una estufa a 65°C durante 48 horas. Finalmente, los bloques se cortaron con un ultramicrotomo (Leica, Ultracut UCT) y se realizaron cortes semifinos, de 1 µm de espesor, que se tiñeron con azul de toluidina al 1% para los estudios de microscopía óptica y valorar la correcta preservación del material, además de poder seleccionar la zona de la médula que se deseaba utilizar para ultramicrotomía. Los cortes ultrafinos, de 50 nm de espesor, se montaron en rejillas de cobre recubiertas con una película de Formvar (Sigma-Aldrich) y a continuación se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo según Reynolds (1963) para su observación con un microscopio electrónico de transmisión convencional (Jeol 201) y registro de imágenes con una cámara digital Gatan (USA).

3.3.2 Inclusión en Lowicryl

Para poder detectar proteínas específicas con el microscopio electrónico la inclusión del tejido se llevó a cabo en Lowicryl. Para ello se perfundieron los ratones con PFA 4% en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4 durante 20 min. A continuación, se realizaron cortes de 300 µm de espesor en el vibratomo y se dejaron en agitación en el mismo fijador durante 60 min a TA. Los cortes se lavaron posteriormente en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4 (3x 15 min). Seguidamente, las secciones se lavaron (2 x 25 min) en una solución de tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4 que contenía 50 mM de cloruro de amonio a 4 °C. De nuevo, los bloques de tejido se lavaron con tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4 (3 x 10 min) a 4 °C. Posteriormente,

los bloques de tejido se deshidrataron en concentraciones crecientes de metanol a las temperaturas que se indican a continuación:

Solución	Duración	Temperatura
Metanol 30%	10 minutos	4°C
Metanol 50%	10 minutos	
Metanol 70%	10 minutos	
Metanol 90%	30 minutos	-20°C
Metanol 90%:Lowicryl 1:1	60 minutos	
Metanol 90%:Lowicryl 1:2	60 minutos	
Lowicryl puro	60 minutos	
	16 horas (o/n)	

En una siguiente etapa, los bloques se embebieron en Lowicryl, evitando el contacto con el aire, en cápsulas de gelatina transparente (Gelatin capsule, size 2; Electron Microscopy Sciences). La polimerización se llevó a cabo por exposición a luz ultravioleta (366nm, Philips T16/05) durante 5 días a -20°C seguida de 3 días a temperatura ambiente.

3.3.3 Inmunocitoquímica ultraestructural

Para la detección de antígenos a nivel ultraestructural se utilizaron técnicas de inmunocitoquímica aplicadas en cortes ultrafinos para su observación en el microscopio electrónico.

Para ello, los bloques de tejido incluidos en Lowicryl se cortaron con un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT). Las secciones ultrafinas se recogieron en rejillas de níquel cubiertas de Formvar. A continuación, estas secciones se incubaron secuencialmente en gotas de PBS-glicina 0,1 M durante 15 minutos como paso previo a su incubación con un anticuerpo primario (diluido en PBS con 1% de BSA) durante 60 minutos, a TA y en cámara húmeda. Después de varios lavados sobre gotas de PBS se procedió a su incubación con un anticuerpo secundario específico. Los anticuerpos secundarios, conjugados con partículas de oro coloidal de 10 o 15 nm de diámetro (BioCell, UK), se usaron a una concentración de 1:25 a 1:50 en PBS con 1% de BSA. Seguidamente, las rejillas se lavaron energicamente con agua

destilada en un vaso de precipitados, se dejaron secar al aire y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo según Reynolds (1963) para su observación al microscopio electrónico (Jeol 201). Como control negativo, las rejillas con las secciones de tejido fueron procesadas en ausencia del anticuerpo primario. La relación de anticuerpos primarios usados en este apartado aparecen reflejados en la tabla 1, aunque la dilución utilizada es 10 veces menor que para la técnica de inmunofluorescencia.

3.3.4 Ensayo de transcripción *in situ* a nivel ultraestructural

La actividad transcripcional global de las MN α fue valorada con un ensayo de transcripción basado en la incorporación de 5'-fluorouridina (5'-FU; Sigma-Aldrich) en el RNA naciente (Casafont et al., 2006). La pauta de administración usada fue una dosis única intraperitoneal de 10 ml/Kg de una solución stock de 5'-FU 0,4 M disuelta en suero salino. Tras un pulso de 45 min de exposición al nucleótido halogenado, se sacrificó el animal, previamente anestesiado, mediante perfusión con paraformaldehído al 3,7% en PBS. Una vez extraída la médula espinal, se hicieron secciones transversales de 300 μ m de espesor con el vibratomo de deslizamiento. Fragmentos de la sustancia gris del asta anterior fueron microdisecados bajo control de una lupa estereoscópica y procesados para su inclusión en Lowicryl, tal y como se ha descrito en el apartado 3.3.2.

Los cortes ultrafinos montados en rejillas de níquel cubiertas de Formvar se incubaron con 0,1 M glicina en PBS conteniendo 1% de BSA durante 15 min y con 0,01% Tween-20 en PBS durante 5 min. La incorporación de 5'-FU en el RNA naciente fue detectada con un anticuerpo monoclonal anti-bromodeoxiuridina (anti-BrdU) (Clon BU-33; Sigma Aldrich), diluido 1:50 en Tris-HCl 50 mM pH7,6 conteniendo BSA al 1% y glicina 0,1 M, durante 1 h a 37°C. Tras un lavado en PBS, se incubó con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con partículas de oro coloidal de 15 nm (dilución 1:50 en PBS con BSA 1%; BioCell). Una vez finalizada la incubación, las preparaciones se lavaron y se contrastaron como se describe en el apartado 3.3.3. Finalmente, el estudio ultraestructural de las preparaciones se realizó con el microscopio electrónico (Jeol 201).

3.4 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.4.1 Análisis de expresión génica con PCR cuantitativa a tiempo real

Hemos analizado mediante PCR cuantitativa a tiempo real los niveles de transcritos producidos por los genes objeto de estudio. En todos los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral se comprobó la especificidad de cada RT-qPCR mediante el análisis de la curva de disociación. Se representa la derivada de la medida de fluorescencia con respecto al aumento de la temperatura que en caso de amplificar un producto único debe mostrar un sólo pico. En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos comparado la expresión de diversos genes analizando los niveles de transcritos presentes en el RNA extraído de la región lumbar de la médula espinal de ratones SMN Δ 7 (n=5) con respecto a ratones WT (n=3).

3.4.1.1 Extracción del RNA total

Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se extrajo rápidamente la médula espinal en una zona estéril para evitar contaminaciones según el proceder descrito en el apartado 3.1.2.1. Seguidamente, se homogeneizó el tejido con un Poly-tron (OMNI International TH) en 1 ml de TRIzol (Ambion) y se dejó reposar durante 10 min a TA. Posteriormente, se añadieron 200 μ l de cloroformo, se mezcló vigorosamente y pasados 10 min se centrifugó durante 15 min a 12.000 g a 4°C. A continuación, se recogió la fase acuosa y se transfirió a un eppendorf estéril, donde se añadieron 500 μ l de isopropanol. Se dejó precipitar el RNA durante 24h a -20°C y posteriormente se centrifugó a 4 °C durante 20 min, a una velocidad de 11.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol frío (-20 °C) al 75% (v/v). De nuevo, se centrifugó (5 min) a 4 °C y a una velocidad de 8.500 rpm. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el pellet de RNA al aire y se resuspendió en un volumen de 30 μ l de H₂O libre de RNAasas. El RNA fue purificado mediante columnas QIAGEN (RNeasy mini-kit, Cat. N° 74104, Qiagen Iberia, Madrid). Por último, la cuantificación de las muestras de RNA se realizó mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000 V 3.6, Thermo). De la misma manera, la pureza se midió mediante el cociente entre absorbancia a 260 nm y a 280 nm, el cual hace referencia a la cantidad de proteínas presentes en la muestra. Un resultado de 2,0 indica un RNA

sin contaminantes. En todos los experimentos, este cociente fue siempre superior a 1,8. Las muestras de RNA se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su utilización. Durante todo este proceso se utilizó material esterilizado previamente en el autoclave.

3.4.1.2 Retrotranscripción

A partir de los RNAs totales purificados según el apartado anterior, procedimos a sintetizar el DNA copia (cDNA) correspondiente mediante el proceso de la retrotranscripción. Este proceso se llevó a cabo utilizando el kit de síntesis de cDNA Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo). En todos los casos utilizamos 1 µg de RNA total de cada muestra y la enzima transcriptasa inversa M-MuIV, utilizando hexámeros de nucleótidos (*random hexamers*) como cebadores. La reacción se realizó en un termociclador (Corbett Research) cuyo programa consiste en una primera incubación de 5 minutos a 25°C (anillamiento de los cebadores al RNA), otra de 45 minutos a 42°C (extensión de las cadenas) y la última de 10 minutos a 95°C (inactivación del cDNA).

3.4.1.3 Diseño de oligonucleótidos cebadores para PCR cuantitativa

En el diseño de los oligonucleótidos cebadores se utilizó el programa informático Primer 3-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se consideraron adecuadas las parejas de oligonucleótidos cuya longitud estuviera en torno a 20 nucleótidos, su porcentaje de G+C fuera de aproximadamente el 50%, su temperatura de anillamiento de ~60°C, su composición no favoreciera la aparición de estructuras secundarias y la longitud del amplicón de unas 100pb. Además, se comprobó mediante un análisis nBLAST (nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) que el amplicón producto de los oligonucleótidos seleccionados se correspondiese únicamente al gen de interés y no amplificaba otras secuencias en nuestro animal de experimentación.

Para el análisis de la expresión de los genes SMN murino (*Smn*) y SMN2 humano, así como de los genes codificantes de las proteínas nucleolares UBF (*Ubtf*), nucleofosmina/B23 (*Npm1*), nucleolina (*Ncl*) y fibrilarina (*Fbn1*), se utilizaron oligonucleótidos TaqMan pre-diseñados (Life Technologies) y como gen de referencia para el control de carga, el gen *Pgk1*.

Para el análisis de la expresión génica por RT-qPCR para SYBRGreen, los oligonucleótidos cebadores o “primers” que se usaron en este trabajo se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de “primers” utilizados en RT-qPCR con SYBRGreen.

Nombre	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
45S rRNA	TGGGGCAGCTTTATGACAAC	TAGCACCAAACGGGAAAACC
18S pre-rRNA	TGGGGCAGCTTTATGACAAC	TAGCACCAAACGGGAAAACC
18S rRNA	GTTGGTTTTCGAACTGAGGC	GTCGGCATCGTTTATGGTCG
5.8S pre-rRNA	TACGACTCTTAGCGGTGGATCA	AGCTAGCTGCGAGAATTAATGTGA
5.8S rRNA	ACTCGGCTCGTGCGTC	CCTGTCTGAGCGTCGG
28S pre-rRNA	CCTCCTCGCTCTTCTTCC	CCTGTTCACTCGCCGTTACT
28S	ACTCGGCTCGTGCGTC	ACCTACTATCCAGCGAAACCACA
<i>Sam68</i>	CTCCAGCTAGGCCAGTGAA	TTGTGGGTAAAGCAACAGGA
<i>Pabpn1</i>	TATGGTGCACAGCAGAAGA	TATGCAAACCTTTGGGATG
<i>Actb unspliced</i>	GACTCCCAGCACACTGAACT	CTCAGGGCAGGTGAACTGT
<i>Actb spliced</i>	CAGCCTTCCTTCTGGGATG	GGCATAGAGGTCTTTACGGATG
<i>Chat unspliced</i>	CTTGGGGCCAGTCTGATAGC	GGACACATGGCTAGAAGGGG
<i>Chat spliced</i>	CTGGCTTACTACAGGCTTACC	GTGGCCGATCTGATGTTGT
<i>Chodl unspliced</i>	GCTGTTGTCTCCCGCATCTT	AAGTGAAGCGTTTGGGATT
<i>Chodl spliced</i>	GAAGCAGGCATAATTCCCAATC	TTCCCAAAGCAACCAGTATCA
<i>Myh9 unspliced</i>	CACTTGTGTGGCATTGGGAC	AAGAAGGACCTCTCTCCGA
<i>Myh9 spliced</i>	TGGTGCCAACATTGAGACTTAT	CCAGACAGCAGGTAGTAGAAGA
<i>Myh14 unspliced</i>	TCACCCTGAAAAGATGCCCC	TCGAAGGTCCAGACAGGCAT
<i>Myh14 spliced</i>	GGAGCAAACATCGAGACCTATC	GGTAGAAGATATGGAAGCTGCATT
<i>Bcl-x long form</i>	GAGTTACCGGCGACCCA	CGACAGCAAGCAGGTACAA
<i>Bcl-x short form</i>	GCTGCCTACCAGAACCTTATC	GGCTCAACCAGTCCATTGT
<i>Nrxnl 4(+)</i>	TAGTTGATGAATGGCTACTCGACAAA	GACTCAGTTGTCATAGAGGAAGGCAC
<i>Nrxnl 4(-)</i>	GCTACCCTGCAGGGCGT	GAGGTGGACATCTCAGACTGCAT

3.4.1.4 PCR cuantitativa a tiempo real

Una vez aislado el cDNA de cada una de las muestras, se midió el grado de expresión de los transcritos de los genes de interés de cada muestra mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Este método se basa en la detección de los productos de amplificación de la RT-qPCR a través del fluorocromo SYBR Green I. Esta molécula se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del DNA y se acopla energéticamente a los nucleótidos que lo forman, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. El complejo resultante DNA-SYBR Green presenta el pico de absorción en $\lambda = 498$ nm y el pico de emisión en $\lambda = 522$ nm. La unión DNA-SYBR Green es estequiométrica, a mayor cantidad de DNA mayor intensidad de emisión fluorescente. El termociclador está provisto de un sistema que le permite excitar el fluorocromo y recoger la señal emitida por éste al final de cada ciclo con lo que podemos medir la cantidad de DNA. La detección se realiza al mismo tiempo que la amplificación, por lo que esta tecnología sustituye a la amplificación tradicional y la electroforesis. En esta técnica se marca un umbral de fluorescencia (*threshold*), en el punto en que la reacción de amplificación se encuentra en fase exponencial. El ciclo en el cual la reacción de amplificación atraviesa este umbral de fluorescencia se denomina C_T (*threshold cycle*) y depende de la cantidad de cDNA presente en cada muestra.

La técnica se realizó en un sistema accesorio de automatización Mx3005P (Stratagene) y software de análisis MxPro (Stratagene). Para realizar la RT-qPCR a cada reacción se añadió 1 μ l de cDNA (0,5 μ g/ μ l); 9 μ l de stock (formado por 8,2 μ l de agua Milli-Q y 0,4 μ l del stock 10 μ M de cada oligonucleótido cebador sentido y antisentido, correspondientes al gen de interés) y 10 μ l de SYBRgreen Mix (Thermo). Las condiciones de la RT-qPCR que se utilizaron son:

Etapa	Temperatura	Duración	Repeticiones
Desnaturalización	95°C	10 minutos	1X
Anillamiento	95°C	30 segundos	40X
	60°C	1 minuto	
	72°C	30 segundos	
Curva de disociación	95°C	1 minuto	1X
	55°C	30 segundos	
	95°C	30 segundos	

3.4.1.5 Cuantificación y análisis de la expresión génica relativa

El sistema de cuantificación en la RT-qPCR se basa en el número de ciclos necesarios para que una muestra alcance el ciclo umbral o C_T . Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de cDNA de la muestra; es decir, a mayor cantidad de cDNA menor es el número de ciclos necesarios para alcanzar el C_T .

Para nuestros estudios se emplearon muestras de tres ratones WT (n=3) y de cinco ratones SMN Δ 7 (n=5) por triplicado. Como gen de referencia del control de carga utilizamos "primers" que amplificaban el transcrito resultante de la transcripción del gen de la *Gapdh* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y, cuando se indica, el rRNA 45S. Los resultados fueron analizados con el programa específico de análisis Stratagene MXPro software versión 3.0 (Stratagene). Se utilizó un método de comparación de los valores de C_T (ΔC_T) en el que el umbral de cada ciclo (C_T) de RT-qPCR se define como el número de ciclos fraccionarios en los que la fluorescencia alcanza una línea de umbral fija. El nivel de expresión relativo se calcula usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001), que se resume en el siguiente esquema:

$$\begin{aligned} \Delta C_T &= C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen de referencia} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_T \text{ condición problema} - \Delta C_T \text{ condición control} \\ 2^{-\Delta\Delta C_T} &= \text{Cambio relativo de la expresión} \end{aligned}$$

Esta metodología nos permitió calcular los niveles de expresión de cada muestra y compararlas entre sí. Para estudiar si existían diferencias significativas entre los niveles de expresión de un transcrito a lo largo de la edad, o bien entre los dos transcritos a una misma edad se empleó el análisis estadístico de la *t* de Student. El nivel de significación se estableció en $*p < 0.05$.

3.4.2 Análisis de proteínas por western blot (WB)

Utilizamos la técnica de WB para la detección de los niveles globales de proteínas específicas en muestras de la región lumbar de la médula espinal de ratones WT como ratones SMN Δ 7. El proceso completo se realizó como describimos a continuación.

3.4.2.1 Extracción y valoración de proteínas.

Animales WT y SMN Δ 7 de 13-14 días de edad postnatal (P14) se sacrificaron mediante dislocación cervical según el proceder descrito en el apartado 3.1.2.1. Rápidamente se aisló la médula espinal y la región lumbar fue congelada por inmersión en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

Las muestras de tejido fueron homogeneizadas, mediante sonicación durante 5 ciclos de 30 segundos ON/OFF, en un baño frío de ultrasonidos (Bioruptor Plus, Diadode) en 200 μ l de buffer de lisis (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 2%, SDS 0,1%; pH 8) suplementado con DTT 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) y fosfatasas (PhosSTOP, Roche). Se dejó reposar el homogeneizado durante 5 min a 4°C y se centrifugó posteriormente durante 10 min a 12.000 rpm. Se recogió el sobrenadante sobre un eppendorf frío y el extracto de proteínas se almacenó a -80 °C hasta su uso.

La valoración de la cantidad de proteínas totales obtenidas se llevó a cabo mediante el sistema de fluorimetría Qubit 2.0 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.2.2 Electroforesis e inmunoblotting

Las muestras (30 μ g de proteína) se calentaron a 100°C durante 5 minutos en tampón de carga (tampón 5x: Tris-HCl 60mM, SDS 2%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,02%; pH 6,8) al que se añade β -mercaptoetanol al 5% antes de uso. Las proteínas se separaron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida–SDS de un porcentaje adecuado para el tamaño de las proteínas a analizar. La electroforesis se realizó en un Mini-ProteanII (BioRad) en tampón de electroforesis (a partir de un stock 10x: Tris-base 0,25 M; glicina 2 M y SDS 1%). Seguidamente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman-Protan®), durante 2,15 horas a 300 mA/cm² en un Mini-ProteanII (BioRad) en tampón de transferencia (Tris-base 25 mM y glicina 192 mM). Finalizada la transferencia, la para la visualización de las proteínas transferidas a la membrana, ésta se tiñe con rojo Ponceau-S (Sigma) al 0,2% diluído en ácido acético al 5%.

Antes de realizar el "inmunoblotting", la membrana se preincubó con un medio de bloqueo compuesto por leche desnatada en polvo al 5% en PBS-Tween 0.5% (PBS-T) a TA durante 1 hora. Posteriormente, la membrana se incubó con el

anticuerpo primario diluido en PBS y 2% de BSA, durante toda la noche a 4°C y en agitación. En este apartado se utilizaron los anticuerpos primarios contra las proteínas SMN, Sam68, PABPN1, histona H3 y β -Tubulina (isofoma III) (Tabla 1), aunque la dilución utilizada fue 10 veces mayor que para la técnica de inmunofluorescencia.

Finalizada la incubación, se retiró el anticuerpo primario y la membrana se lavó 2 veces con PBS-T durante 15 minutos. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (1:10000 en PBS y 2% de BSA) durante 1 hora a TA, seguido de varios lavados con PBS-T. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: IRDye™ 680/800 anti-IgG de ratón (Rockland) y IRDye™ 680/800 anti-IgG de conejo (Rockland) que se detectaron utilizando el sistema Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor). Para calcular la cantidad de la proteína de los experimentales con respecto a los controles y saber si había cambios tras el tratamiento se cuantificó el valor de cada banda y se normalizó frente al valor de la banda correspondiente a la proteína de referencia H3 o β -Tubulina III. Para la cuantificación de la intensidad de bandas se utilizó el software ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>).

3.5 Análisis cuantitativo y estadístico

Como se ha comentado anteriormente, la obtención de disociados neuronales es una técnica muy útil para realizar análisis cuantitativos con alta fiabilidad. La proyección de todas las secciones que componen el soma de las motoneuronas, digitalizadas por microscopía confocal, se puede utilizar para cuantificar las estructuras nucleares consideradas de interés en los distintos estudios del presente trabajo.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos realizado los siguientes análisis cuantitativos y morfométricos comparativos entre ratones WT y SMN Δ 7: i) estimación del porcentaje de MN α que exhibían CBs (coilina-positivos), o rosetas perinucleolares y nucléolos inmunoreactivos para la coilina; ii) determinación del diámetro nucleolar medio en las MN α ; iii) cuantificación del número de unidades funcionales de transcripción nucleolar (CF/CFD) inmunomarcadas para el factor de

transcripción nucleolar UBF; iv) estimación del porcentaje de MN α que contenían gránulos nucleares de poli(A) RNA (PARGs) con hibridación *in situ* con la sonda de polidT y v) análisis densitométrico de la intensidad de fluorescencia de la señal de poli(A) RNA en el citoplasma para estimar la concentración relativa de mRNAs poliadenilados.

En todos los análisis cuantitativos realizados, se empleó el análisis estadístico de la *t* de Student para conocer si existían diferencias significativas entre los grupos experimentales. El nivel de significación se estableció en $*p < 0,05$. Para los cálculos y representaciones estadísticas se utilizó el programa Prism 7 (Graph Pad).

i) Para el estudio del porcentaje de MN α que exhibían formación de CBs, rosetas de coilina perinucleolar, o una distribución intranucleolar de la coilina (Tabla 3), se emplearon 5 ratones de cada grupo experimental, WT (n=5) y SMN Δ 7 (n=5) de edad postnatal P14. Se capturaron imágenes panorámicas por microscopía confocal de disociados neuronales del asta anterior de la médula espinal donde se inmunomarcó la proteína coilina. Se contabilizaron 3 categorías de MN α : a) con CBs canónicos, donde la coilina y la SMN colocalizaban; b) con “caps” perinucleolares coilina-positivas y c) con coilina intranucleolar. Terminado el recuento, cada categoría de MN α se relativizó al número total de motoneuronas analizadas (100%). Para este estudio se analizaron al menos 25 MN α de cada animal experimental.

ii) Para el estudio morfométrico del diámetro nucleolar (Fig. 34D), se utilizaron disociados neuronales de ratones WT a P15 (n=5) o SMN Δ 7 a P13 o P15 (n=5) en los que se habían marcado los ácidos nucleicos con PI. Este marcador es excelente para la visualización de los grumos de Nissl y el nucleolo (Palanca et al 2014). Sobre imágenes de microscopía confocal se midió el diámetro nucleolar en neuronas mononucleoladas en al menos 25 MN α por animal y utilizando el software ImageJ. Cada dato se representó en una gráfica de dispersión de puntos donde la media aritmética se expresó con una línea negra horizontal.

iii) Para el estudio del número de CFs nucleolares (considerados como unidades de transcripción a los efectos del análisis cuantitativo) (Fig. 35E), se utilizaron disociados neuronales donde las unidades de transcripción fueron detectadas con el inmunomarcaje del factor de transcripción nucleolar UBF. Se contabilizó el número total de cuerpos UBF-positivos (CFs) en los nucleolos de al

menos 25 MN α de animales WT (n=5) o SMN Δ 7 (n=5). Además, se tomaron medidas del área nucleolar y se relativizó el número total de unidades de transcripción de cada nucleolo con respecto al área (Fig. 35F). Los datos se representaron en dos gráficas de dispersión de puntos donde la media aritmética se expresó con una línea negra horizontal.

iv) Para la cuantificación del porcentaje de MN α que exhibían formación de PARGs (Fig. 44G), se utilizaron disociados neuronales sobre los que se había realizado la técnica de hibridación *in situ* con una sonda poli(dT) o poli(dU) conjugada con biotina, tal y como se describe en el apartado 3.2.2. Se capturaron imágenes panorámicas con el microscopio confocal manteniendo, en todos los casos, los mismos parámetros de potencia de láser. Se cuantificaron el número total de MN α presentes en cada imagen y el número de MN α que exhibían PARGs nucleares. En este estudio se analizaron al menos 30 MN α de cada animal WT (n=3) o SMN Δ 7 (n=3) en los días postnatales P5 y P14. Las barras representan la media aritmética y la desviación estándar de cada grupo experimental.

vi) Para el análisis densitométrico de la intensidad de fluorescencia de los mRNAs poliadenilados en el citoplasma de las MN α (Fig.44H), se utilizaron las mismas imágenes realizadas para el estudio descrito en el apartado iv. Utilizando el software ImageJ se seleccionaron tres áreas de la región correspondiente a los grupos de Nissl en cada MN α . El software realizó la suma integrada de los valores asignados, en escala de grises, a cada pixel contenido en el área escogida. Cada punto en la gráfica, representa la media aritmética de las tres medidas en una MN α . Los datos se distribuyeron en tres grupos dependiendo del animal de experimentación al que corresponden las MN α , WT (n=93) o SMN Δ 7. En el caso de las MN α -SMN Δ 7, se analizaron por separado las que carecían (n=112) o exhibían PARGs nucleares (n=90). Cada dato se representó en una gráfica de dispersión de puntos donde la media aritmética se expresó con una línea negra horizontal.

4. Resultados



4.1 BASES CELULARES DE LA DISFUNCIÓN EN EL METABOLISMO DEL RNA EN MN α DEL RATÓN SMN Δ 7: ALTERACIONES DE LOS CBs Y DEL NUCLEOLO

Para desarrollar el presente proyecto de Tesis Doctoral hemos utilizado ratones WT y SMN Δ 7 de P13-P14 días. En esta edad los animales presentan un fenotipo que mimetiza con bastante fidelidad la evolución clínica e histopatológica de la fase sintomática de la variante más severa de SMA humana, tipo I o enfermedad de Werdnig-Hoffmann (Fig. 26A). Como se ha comentado antes, la manipulación genética del ratón SMN Δ 7 consiste en la inactivación del gen endógeno *Smn* y la inserción del cDNA SMN Δ 7 y del transgén SMN2 humano. La delección del gen *Smn* fue confirmada por RT-qPCR (Fig. 26B). Además, el análisis por WB confirmó que, como ocurre en la SMA humana tipo I, la expresión del gen SMN2 no es capaz de compensar los niveles de SMN funcional (Fig. 26B). Clínicamente, los ratones SMN Δ 7 deficitarios de SMN desarrollan la SMA murina, son más pequeños que los WT y presentan debilidad muscular severa (Fig. 26C). El estudio histológico del asta anterior de la médula reveló la pérdida masiva de MN α en comparación con los animales WT (Fig. 26D-G).

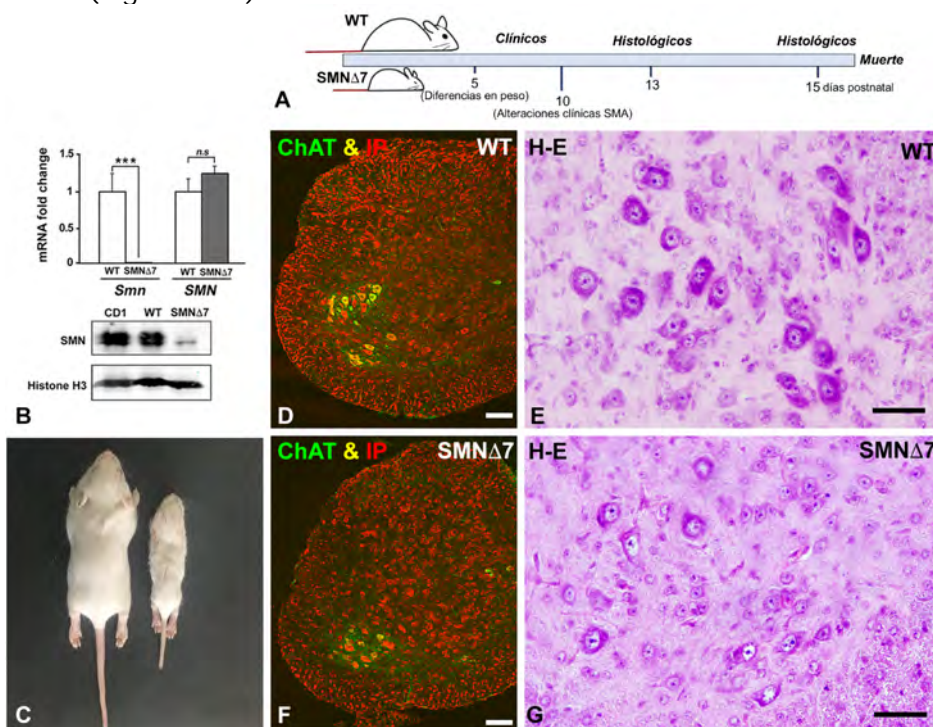


Figura 26. A, Cronograma de la evolución clínica de los ratones SMN Δ 7. B, RT-qPCR y WB que muestran ausencia de expresión del gen *Smn* y de la proteína en los ratones SMN Δ 7. D-E, Hemi-médula marcada con anticuerpos anti-ChAT y contrastada con IP y detalle teñido con hematoxilina-eosina de un ratón WT. F-G, Imágenes de un ratón SMN Δ 7 que muestran pérdida de MN α con ambos marcajes. C, Fotografía de un ratón WT (izquierda) y SMN Δ 7 (derecha) en P14. Escala: D, F: 50 μ m. C, E 40 μ m.

4.1.1 Disrupción de CBs y relocalización nucleolar de coilina en MN α

Siguiendo el criterio de Lafarga et al. (2017), hemos utilizado el tamaño y número de CBs como un indicador de la actividad transcripcional. Dado que la proteína SMN es un componente esencial de los CBs (Carvalho et al., 1999), quisimos conocer si su déficit conlleva cambios en su estructura y función. Con este fin, inmunodetectamos la coilina, un marcador de los CBs, y contrastamos las muestras con yoduro de propidio (IP), un marcador citoquímico de ácidos nucleicos en el núcleo y en el citoplasma. En las MN α -WT, el IP mostró la típica distribución citoplasmática de la maquinaria de síntesis de proteínas formando abundantes grumos Nissl. Los núcleos eran de gran tamaño, eucromáticos, y exhibían nucleolos muy prominentes debido a la elevada concentración de rRNAs que poseen. Por su parte, los CBs aparecían como cuerpos nucleares redondeados, bien definidos, libres en el nucleoplasma o, más frecuentemente, asociados al nucleolo (Fig. 27A). Al estudiar las MN α -SMN Δ 7 de P14, deficientes de SMN, observamos que la mayoría de las neuronas no mostraban cambios evidentes ni en el marcaje de los grumos de Nissl ni de los nucleolos con el IP (Fig. 27B), si bien algunas MN α presentaban marginación de la maquinaria de síntesis de proteínas y cromatolisis central (Fig. 27C). Sin embargo, al analizar el patrón de distribución de la coilina comprobamos que, de manera muy destacada, el déficit de SMN causaba disrupción de los CBs y redistribución de la colina formando casquetes ("rosetas") alrededor del nucleolo (Fig. 27B) o incluso localizándose en su interior como colina intranucleolar (Fig. 27C, inset). Estos resultados indican que la patología de los CBs precede a la severa disfunción de la traducción y, como en la SMA I humana (Tapia et al., 2012), puede considerarse un sello de identidad nuclear en las MN α de la SMA murina.

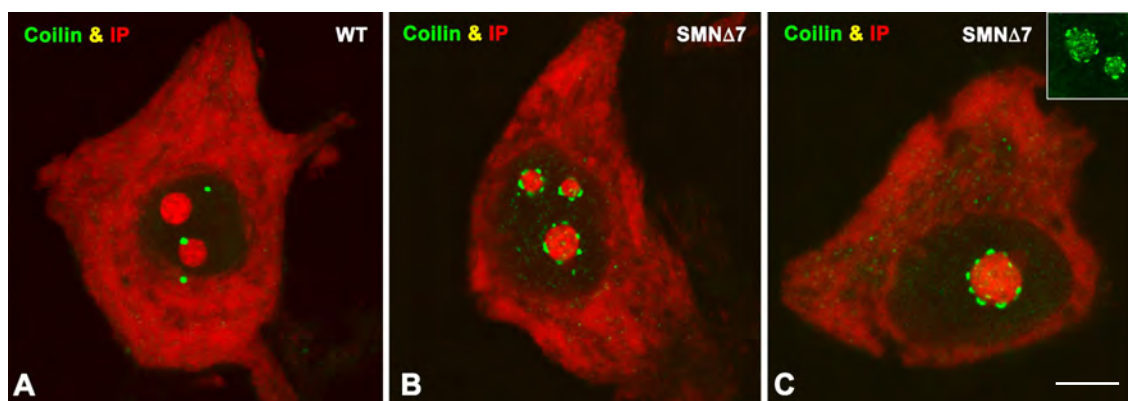


Figura 27. A, MN α -WT inmunomarcada con coilina y contrastadas con IP. Nótese dos CBs libres en el nucleoplasma y uno unido al nucleolo. B-C, la MN α -SMN Δ 7 redistribución de la colina en numerosas rosetas perinucleolares. En el detalle se observan dos nucleolos con coilina intranucleolar. Escala: 5 μ m.

Con la fin de demostrar la proporción de MN α que poseían CBs, rosetas perinucleolares y coilina intranucleolar, realizamos un estudio cuantitativo en disociados neuronales inmunomarcados para la coilina. Este es un excelente sistema ya que, al preservarse los núcleos enteros, se puede cuantificar con exactitud el número total de las estructuras objeto de análisis en cada neurona. Nuestros resultados mostraron que en las MN α -WT la colina formaba típicos CBs en el 100% de las células. Sin embargo, en las MN α -SMN Δ 7, solo un 2,8% mostraban típicos CBs (canónicos), el 87% reclutaban la coilina en rosetas perinucleolares y el 10% concentraban la colina dentro del nucleolo (Tabla 3).

Coilina	WT (%)	SMN Δ 7 (%)
CB	100	2,80 \pm 0,65
Rosetas	-	87,08 \pm 2,54
Intranucleolar	-	10,12 \pm 2,15

Tabla 3. Análisis cuantitativo de MN α con CBs canónicos, rosetas y coilina intranucleolar.

Dado que la SMN es fundamental para el ensamblaje de los CBs canónicos (Carvalho et al., 1999; Machyna et al., 2013), quisimos comprobar si la reducción de SMN estaba asociada con la formación de rosetas perinucleolares. El doble inmunomarcaje de SMN y coilina en las MN α -WT mostró la típica expresión difusa de SMN en el citoplasma y su estricta co-localización con la colina en los CBs (Fig. 28A-C). Sin embargo, en las MN α del ratón SMN Δ 7 la expresión citoplasmática de SMN era indetectable y las rosetas perinucleolares eran SMN negativas (Fig. 28D-F). Estos resultados indican que en el ratón SMN Δ 7 la expresión del gen SMN2 es insuficiente para mantener los niveles citoplasmáticos de SMN y confirman que su disminución impide que la coilina se ensamble en CBs funcionales, agregándose alrededor y en el interior del nucleolo.

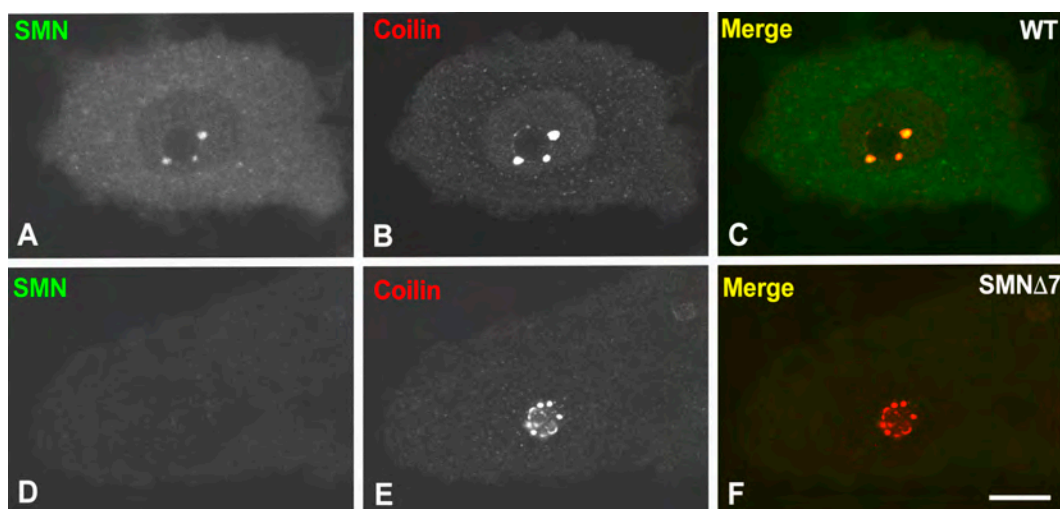


Figura 28. A-C, MN α -WT que muestra la colocalización de coilina y SMN en los CBs. D-F, MN α -SMN Δ 7 que muestra la coilina alrededor y en el interior del nucleolo y ausencia de marcaje de SMN. Escala: 7 μ m.

Seguidamente quisimos conocer si el déficit de SMN afecta al destino de otras moléculas esenciales para la función de los CBs, incluyendo la fibrilarina, un componente de las snoRNPs que es fundamental para la biogénesis de rRNAs, y dos componentes de las snRNPs, la TMG-cap, que forma la caperuza de trimetil guanosina del extremo 5' de los snRNAs espliceosomales, y el complejo Sm constituido por siete proteínas que se ensamblan con los snRNAs para formar pre-snRNPs (para revisión, ver Wang & Matera, 2014). Todos estos componentes de las snoRNPs nucleolares y snRNPs espliceosomales requieren la interacción con la SMN del complejo SMN para su importación y ensamblaje funcional en el CB (Machyna et al., 2013; Hebert & Poole, 2017). El doble inmunomarcaje de la colina con fibrilarina, TMG-cap o el complejo Sm confirmó su colocación en todos los CBs, libres y asociados al nucleolo, de las MN α -WT (Fig. 29A). Sin embargo, las rosetas perinucleolares, inmunorreactivas para la colina, mostraban una señal prácticamente indetectable para la fibrilarina, TMG-cap y Sm (Fig. 29B). Estos resultados apoyan el criterio de que la proteína SMN es fundamental para el reclutamiento y maduración de las pre-snRNPs espliceosomales y pre-snoRNPs nucleolares en el CB. Consecuentemente, el déficit de SMN afecta al ensamblaje de CB canónicos, impacta en la biogénesis de estas dos categorías de RNPs, esenciales para el procesamiento de pre-mRNAs y pre-rRNAs, y debe producir un déficit en la síntesis de proteínas.

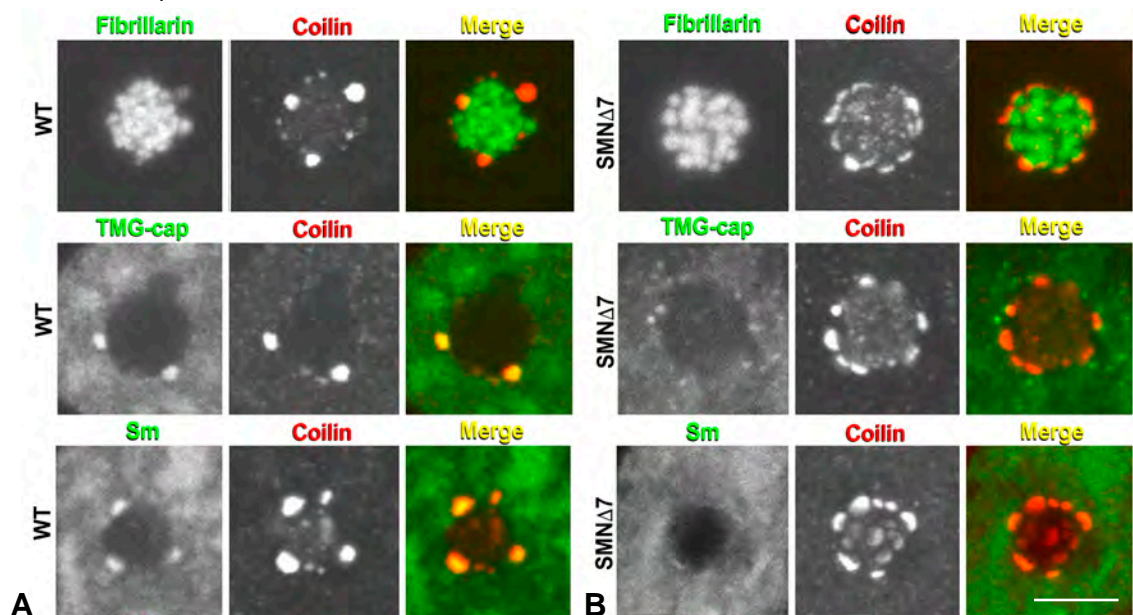


Figura 29. A, En el animal WT los CBs, en este ejemplo perinucleolares, están enriquecidos en coilina y reclutan fibrilarina, TMG-cap y el complejo espliceosomal Sm. B, Por lo contrario, las rosetas perinucleolares positivas a coilina exhiben una señal casi indetectable de fibrilarina, TMG-cap y Sm. Escala: 5 μ m.

Es bien conocido que el estado de metilación de la coilina regula su destino celular. Así, la dimetilación simétrica de la coilina incrementa su afinidad por la SMN y otras dianas moleculares, incluyendo el complejo Sm y la fibrilarina cuya interacción con la coilina es imprescindible para su reclutamiento en el CB (Hebert & Matera, 2000; Boisvert et al., 2002; Tapia et al., 2010; Hebert & Poole, 2017). En este contexto, nos pareció interesante investigar si los niveles de expresión de la SMN afectan al estado de metilación de la coilina, utilizando el anticuerpo monoclonal denominado Y12 que reconoce la coilina dimetilada (Clelland et al., 2009). Como cabía esperar, todos los CBs de las MN α -WT mostraban una fuerte inmunoreactividad para la coilina e Y12 (Fig. 30A). Sin embargo, las rosetas perinucleolares y los nucleolos enriquecidos en coilina de las MN α -SMN Δ 7 exhibían una señal de Y12 muy débil o indetectable (Fig. 30B y C). Los perfiles lineales de la intensidad de la fluorescencia de Y12 y coilina confirmaron la fuerte colocalización de ambas señales en los CBs-WT (Fig. 30D), la reducida concentración de Y12 en las rosetas perinucleolares (Fig. 30E) y su práctica ausencia en el nucleolo (Fig. 28F). Estos resultados indican que el déficit de SMN, directa o indirectamente, impide la correcta metilación de la coilina, de tal suerte que la coilina hipometilada, además de interferir con la biogénesis de CBs canónicos, se relocaliza en la superficie (rosetas) o en el interior del nucleolo (coilina intranucleolar).

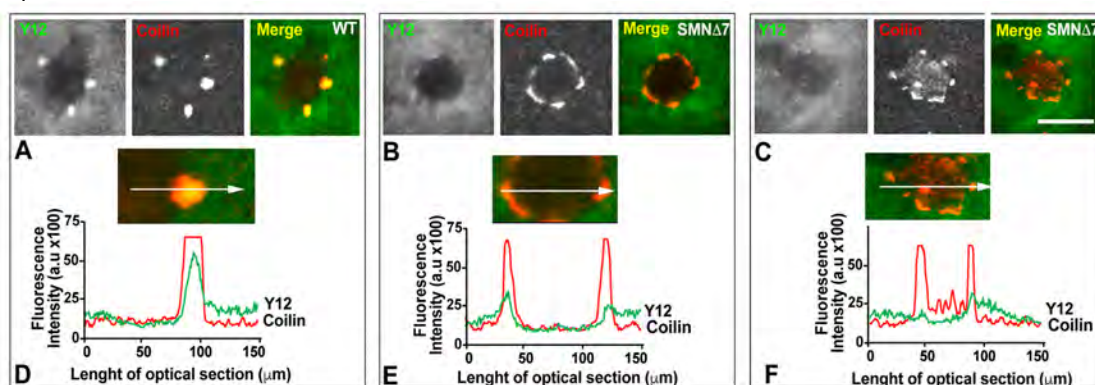


Figura 30. A-C, Imágenes que ilustran que los CBs-WT concentran coilina metilada (A) mientras que la coilina de las rosetas perinucleolares (B) y del nucleolo (C) está hipometilada. D-F, Los perfiles ilustran la colocalización de Y12 y coilin en los CBs canónicos y la débil señal de Y12 en las rosetas perinucleolares e intranucleolar en las MN α -SMN Δ 7. Escala: 5 μ m.

Seguidamente quisimos conocer el patrón de reorganización estructural de los CBs y de las rosetas perinucleolares a nivel ultraestructural en respuesta al déficit de SMN. La microscopía electrónica convencional confirmó que los CBs de las MN α -WT aparecían libres en el nucleoplasma o asociados al nucleolo y exhibían la

típica morfología de hebras electrodensas arrolladas o “dense coiled threads” inmersas en una matriz amorfa bastante electrolúcida (Fig. 31A). La inmunoelectrónica reveló que las partículas de oro coloidal que inmunodetectaban la coilina específicamente decoraban las hebras densas arrolladas, mientras que la matriz amorfa intercalada carecía de marcaje (Fig. 31B).

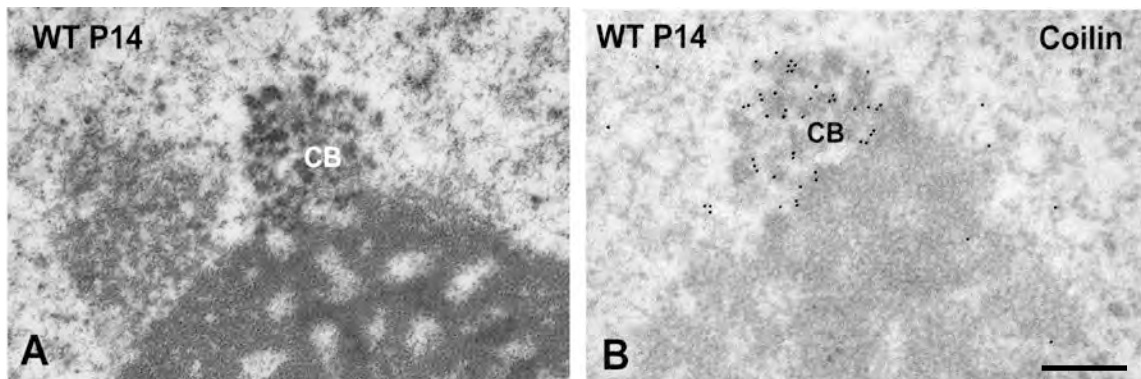


Figura 31. A, Imagen de microscopía electrónica convencional de un CB perteneciente a una MN α -WT, en este caso, asociado al nucleolo. B, La inmunodetección de la coilina de un CB-WT muestra como las partículas de oro coloidal decoran las hebras densas o “coiled threads” pero no la matriz amorfa del CB. Escala: 200 nm.

En el caso de las MN α de los ratones SMN Δ 7 del periodo P14, la microscopía electrónica mostró alteraciones de gran interés. Junto a la carencia de CBs canónicos, observamos la presencia de CBs intranucleolares (Fig. 32A). Éstos mostraban la típica configuración de hebras electrodensas arrolladas dispuestas en una matriz amorfa. Sin embargo, a diferencia de los CBs convencionales con una forma redondeada, los CBs intranucleolares tenían una forma muy irregular y eran de pequeño tamaño, razón por la que consideramos que se trataba de CBs residuales (Fig. 32A). Para determinar si los CBs residuales observados con microscopía electrónica correspondían a los agregados de coilina intranucleolar visualizados con la microscopía confocal (Fig. 27C), realizamos un estudio con inmunoelectrónica que reveló que la coilina era la proteína estructural de los agregados y CBs intranucleolares (Fig. 32B). Asimismo, el inmunomarcaje de la coilina confirmó la presencia las rosetas perinucleolares (Fig. 32C). Curiosamente, con frecuencia, detectamos la presencia de cuerpos intranucleolares (INoBs) de un material amorfo y poco electrodenso. Tales cuerpos se localizaban dentro de cavidades del nucleolo cuya pared frecuentemente exhibía inmunorreactividad para la colina (Fig. 32D).

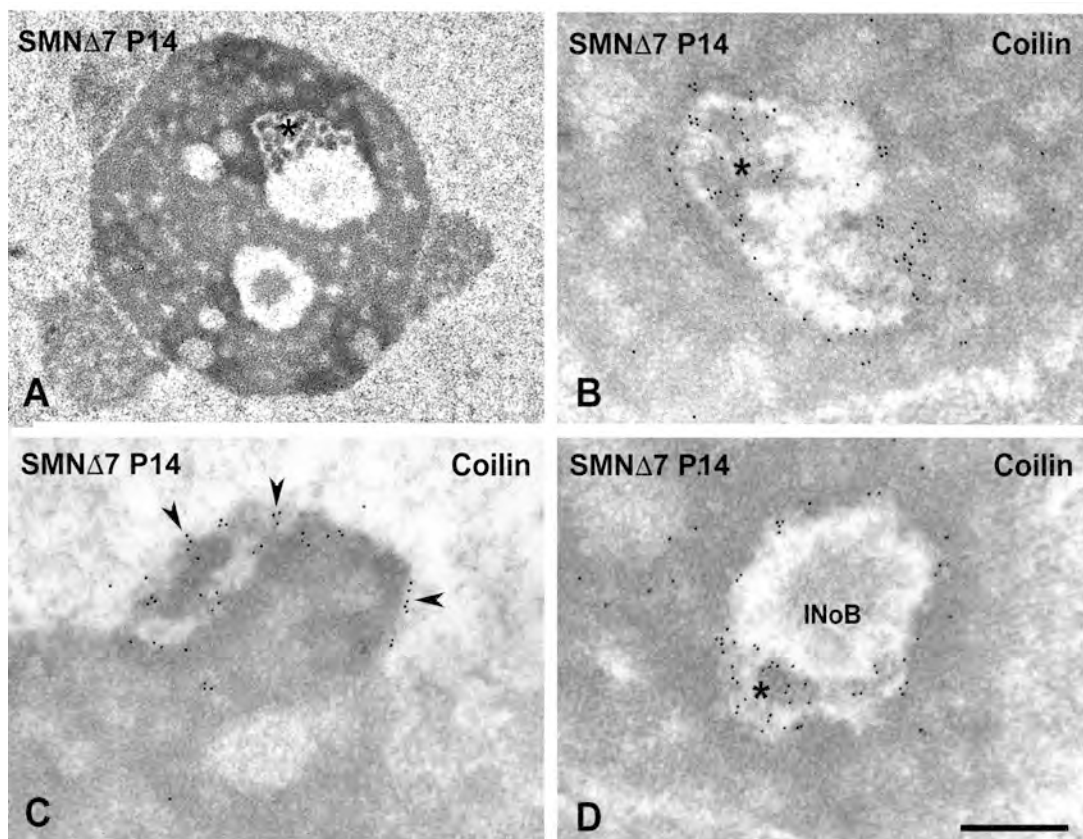


Figura 32. A, Imagen de microscopía electrónica convencional de CBs intranucleolar (asterisco). B, CB intranucleolar positivo a la coilina. C, Roseta perinucleolar de coilina asociada al CFD de un nucleolo (flechas). D, Ilustra la presencia de agregados positivos a coilina en cavidades nucleolares (asterisco). Escala: A: 1 μ m; B-D: 250 nm.

4.1.2 Las MN α del ratón SMN Δ 7 presentan alteraciones en el “splicing” de los pre-mRNAs.

Estudios previos han demostrado que en la SMA el déficit de SMN disminuye la biogénesis de las snRNPs espliceosomales que configuran tanto el espliceosoma mayor (U1, U2, U4/6 y U5-snRNPs) como el espliceosoma menor (U11, U12, U4atac/U6atac y U5-snRNPs) (Fischer et al., 2011). Este hecho tiene graves consecuencias para el correcto “splicing” co-transcripcional de pre-mRNAs en las MN α -SMN Δ 7 (Zhang et al., 2008; Lotti et al., 2012; Doktor et al., 2017). Sobre esta base, quisimos investigar si la pérdida de CBs, estructuras esenciales para la biogénesis de snRNPs, se asociaba con defectos en el “splicing”. Para ello, analizamos la expresión de 4 genes importantes de las MN α , *Chat*, *Chodl*, *Myh9* y *Myh14*. Estos genes son cruciales en la diferenciación, desarrollo y correcta sinaptogénesis de las MN α (Bäumer et al., 2009; Newell-Litwa et al., 2015). Los dos primeros codifican las proteínas, colina acetiltransferasa (*Chat*) y la

condrolectina (*Chodl*) cuyos transcritos son procesados por el espliceosoma mayor. Los segundos, codifican las isoformas de miosina no muscular IIA (*Myh9*) y IIC (*Myh14*), procesadas por el espliceosoma menor. Para estimar si el déficit de SMN compromete la eficiencia del “splicing” analizamos por RT-qPCR la relación entre la cantidad de pre-mRNAs con secuencias intrónicas (“unspliced”) frente al total de mRNAs correctamente procesados (“spliced”). Utilizamos extractos de RNA de médulas espinales WT y SMN Δ 7 en el día 5 y 14 postnatal que, respectivamente corresponden a la fase pre-sintomática y sintomática. En el día P5, el análisis comparativo demostró un incremento significativo de los transcritos “unspliced” de *Chodl* y *Myh9* (Fig. 33A). Sin embargo, en la etapa sintomática tardía (P14) los cuatro pre-mRNAs examinados acumulaban significativamente secuencias intrónicas (“unspliced”) (Fig. 33B), indicando que el déficit de SMN causa disfunción en el “splicing” de mRNAs fundamentales para la homeostasis y sinaptogénesis de las MN α . No obstante, no detectamos cambios significativos en el “splicing” del gen de mantenimiento *Actb*, que codifica la β -actina, en los periodos P5 y P14 cuando se compararon las muestras WT y SMN Δ 7.

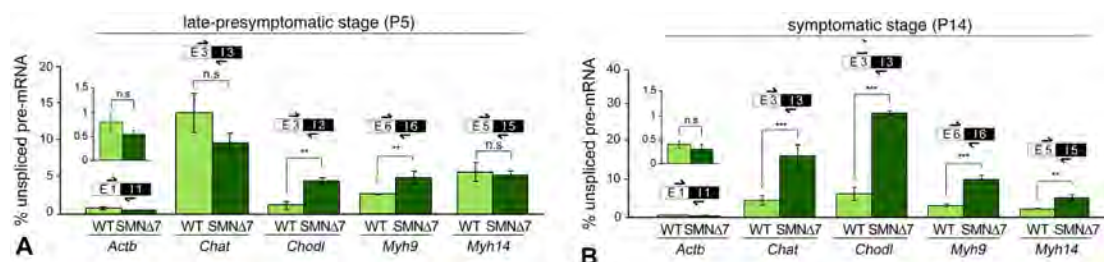


Figura 33. A-B, Análisis por RT-qPCR de pre-mRNAs con secuencias exón-exón (spliced) y secuencias intrónicas (unspliced) de *Actb*, *Chat*, *Chodl*, *Myh9* y *Myh14* en extractos de médula espinal WT y SMN Δ 7 en P5 y P14. Las gráficas representan la media de la fracción relativa de los pre-mRNAs no procesados (con secuencias intrónicas) frente a la transcripción de RNA total. En el P14 las MN α -SMN Δ 7 muestran un incremento significativo de los pre-mRNAs *Chat*, *Chodl*, *Myh9* y *Myh14* con secuencias intrónicas. ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

4.1.3 Reorganización estructural, molecular y funcional del nucleolo en las MN α -SMN Δ 7

Como se ha comentado anteriormente, el nucleolo desempeña en todas las células eucariotas funciones vitales para la supervivencia celular, si bien su papel primario es la biogénesis de los ribosomas. Dado que el déficit de SMN produce pérdida de CBs, una organela funcionalmente relacionada con la maduración de snoRNPs y con la biogénesis de rRNAs (Machyna et al., 2013; Lafarga et al., 2017), nos pareció importante analizar la repercusión del déficit de SMN en la organización estructural y funcional del nucleolo y, por lo tanto, la potencial contribución de esta organela a

la fisiopatología molecular de la SMA murina. Un parámetro directamente relacionado con la tasa de síntesis y procesamiento de rRNAs es el tamaño nucleolar (Lafarga et al., 1991; Raska et al., 2006; Berciano et al., 2007). Por esta razón, se realizó un análisis morfométrico del diámetro nucleolar en disociados de MN α teñidas con IP en animales WT y SMN Δ 7 de P13 y P15. El diámetro nucleolar estaba aumentado en las MN α -SMN Δ 7 (Fig. 34B-D), si bien solo fue significativo en las MN α -SMN Δ 7 de P15 (Fig. 34A-D). Curiosamente, en algunos casos, la hipertrofia nucleolar se acompañó de cromatolisis central (Fig. 34C).

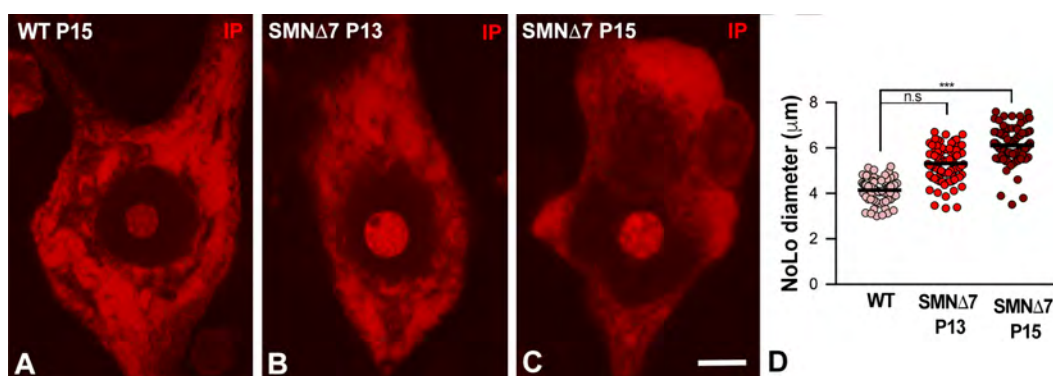


Figura 34. A, MN α -WT teñida con IP. Nótese el marcaje de los grupos de Nissl en el citoplasma y el nucleolo. B-C, Dos MN α -SMN Δ 7 que ilustran el incremento del volumen nucleolar. D, Análisis morfométrico del diámetro nucleolar que demuestra incremento significativo en los animales de 15 días de edad en los ratones SMN Δ 7. Escala: 5 μ m. *** p <0.0005.

A continuación, investigamos si la hipertrofia nucleolar observada en MN α -SMN Δ 7 se acompañaba de cambios en la organización de las unidades de transcripción nucleolar CF/CFD y del componente granular (Smirnov et al., 2016). Para analizar la distribución global de los subcompartimentos nucleolares y, en particular, de los CFs realizamos un estudio con microscopía electrónica convencional y con inmunofluorescencia para detectar UBF, un factor de transcripción específico de genes ribosomales que se concentra en los CFs de las neuronas de los mamíferos (Berciano et al., 2007; Palanca et al., 2014). A nivel ultraestructural, los CFs de las MN α -WT aparecían como numerosas áreas circulares, electrolúcidas y de pequeño tamaño, rodeadas por una cápsula de CFD (Fig. 35A). El marcaje inmunofluorescente del factor UBF corroboró el patrón de distribución de los CFs que aparecían como numerosos “focos” distribuidos por todo el nucleolo (Fig. 35A, inset). Sin embargo, los nucleolos de las MN α -SMN Δ 7 mostraban una profunda reorganización de las unidades de transcripción CF/CFD y del componente granular. Estos cambios incluían la segregación de los tres

componentes (Fig. 35B-D) y, en algunos nucleolos, la formación de unidades funcionales CF/CFD de gran tamaño (Fig. 35C). La microscopía confocal confirmó la reorganización de los CFs marcados para el factor UBF (Fig. 35 insets en B-D). El análisis cuantitativo de los CF positivos a UBF reveló que el déficit de SMN causaba una reducción significativa tanto del número medio de CFs por nucleolo como de su densidad de empaquetamiento (número/ μm^2) (Fig. 35C, inset; E-F). Estos cambios fueron acompañados por otras alteraciones nucleolares, como la segregación de grandes masas de GC y la formación de cavidades nucleolares que, con frecuencia, contenían INoBs muy electrodensos (Fig. 35B-D).

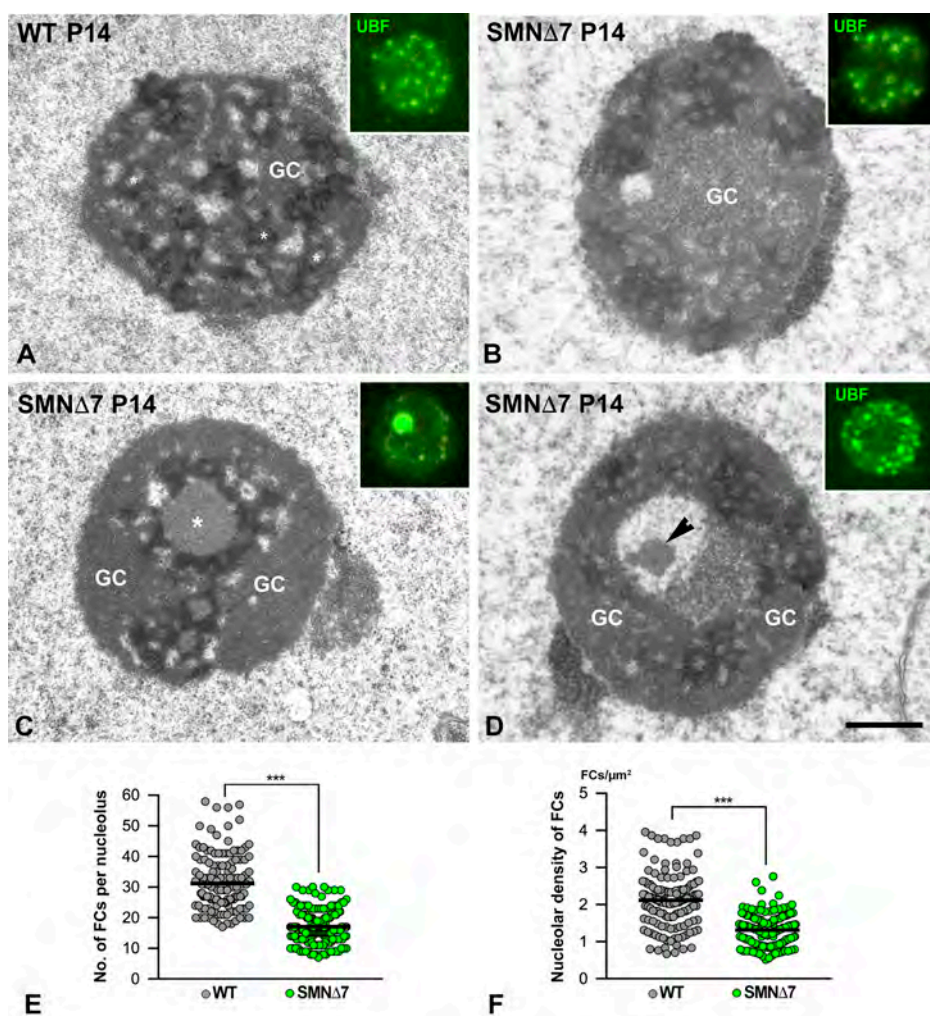


Figura 35. A, Nucleolo de una MN α -WT que muestra numerosos CFs (asteriscos). El inset ilustra la distribución de los CFs positivos a UBF en un nucleolo en microscopía confocal. B-D, Tres ejemplos de las alteraciones nucleolares más frecuentes en las MN α -SMND7: la segregación de los compartimentos (C) y la formación de grandes CFs (C, asterisco) y cavidades nucleolares que, en el panel D contiene un cuerpo muy electrodenso (flecha). En los insets se muestra la contrapartida de los nucleolos inmunodetectando la UBF. E-F, Análisis cuantitativo de la media del número de CFs por nucleolo (E) y el número de CFs por área nucleolar (F) en MN α -WT y SMN Δ 7. Escala: 1,5 μm . *** p <0.0005.

Estudios previos en líneas celulares han demostrado que el estrés nucleolar induce el reclutamiento en el nucleolo de proteínas nucleares conjugadas con SUMO (Abella et al., 2010; Brun et al., 2017). Sobre esta premisa decidimos analizar si los INoBs observados en las MN α -SMN Δ 7 con microscopía electrónica convencional concentraban SUMO y, de ser así, si podían corresponder a CFs SUMO1-positivos. En las MN α -WT, el doble inmunomarcaje para SUMO1 y UBF reveló la presencia de numerosos CFs UBF-positivos y SUMO1-negativos, si bien SUMO1 mostraba una distribución difusa en el nucleoplasma y se concentraba en la envoltura nuclear (Fig. 36A). Por lo contrario, en algunas MN α -SMN Δ 7 los nucleolos exhibían varios INoBs SUMO1-positivos que, en ningún caso, colocalizaban con los CFs inmunomarcados para UBF (Fig. 36B-C).

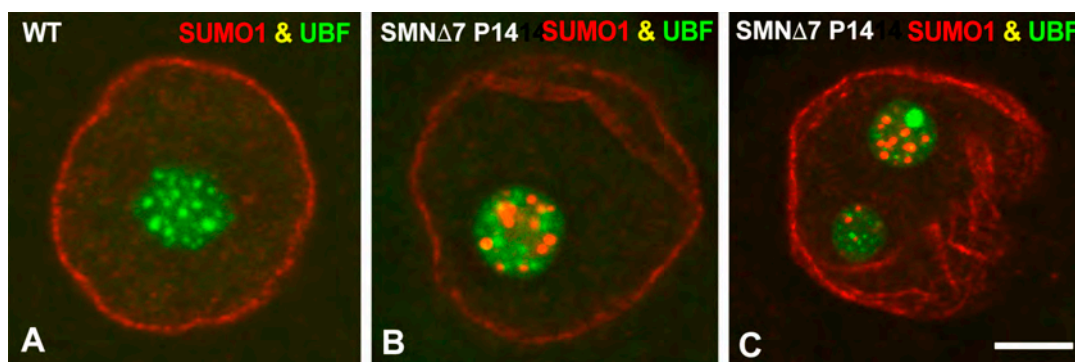


Figura 36. A, Nucleolo de una MN α -WT que muestra numerosos CFs desprovistos de SUMO. En el nucleoplasma se observa un patrón difuso y asociado a la envoltura nuclear. B-C, Ejemplos nucleolos pertenecientes a MN α -SMN Δ 7. Nótese la inclusión de cuerpos SUMO positivos pequeños ubicados entre los CFs, si bien en la imagen C se muestra uno de gran tamaño. Obsérvese como la envoltura nuclear marcada por el SUMO es muy irregular si se compara con el control. Escala: 5 μ m.

La presencia de INoBs SUMO1-positivos fue confirmada con inmunoelectrónica usando partículas de oro coloidal. De acuerdo con las observaciones de microscopía confocal, con bastante frecuencia detectamos nucleolos que contenían INoBs SUMO1-positivos. Tales cuerpos mostraban una textura muy electrodensa y estaban ubicados en cavidades del nucleolo, quedando un halo, presumiblemente de nucleoplasma, entre el INoB y la pared de la cavidad (Fig. 37A-B). Seguidamente, quisimos conocer si los INoBs SUMO1-positivos reclutaban fibrilarina y nucleolina, dos constituyentes esenciales del CFD. El inmunomarcaje con oro coloidal reveló que ambas proteínas quedaban excluidas tanto del INoB como del nucleoplasma circundante, si bien las dos moléculas decoraban la pared de la cavidad nucleolar formando una cápsula a modo de "CFD-like" (Fig. 37C-D). Aunque queda un campo abierto para investigar las dianas moleculares de

conjugación con SUMO1 en los INoBs, los presentes resultados sugieren que el déficit de SMN causa estrés nucleolar en las MN α y que su presencia puede considerarse un sello patogénico en la SMA murina.

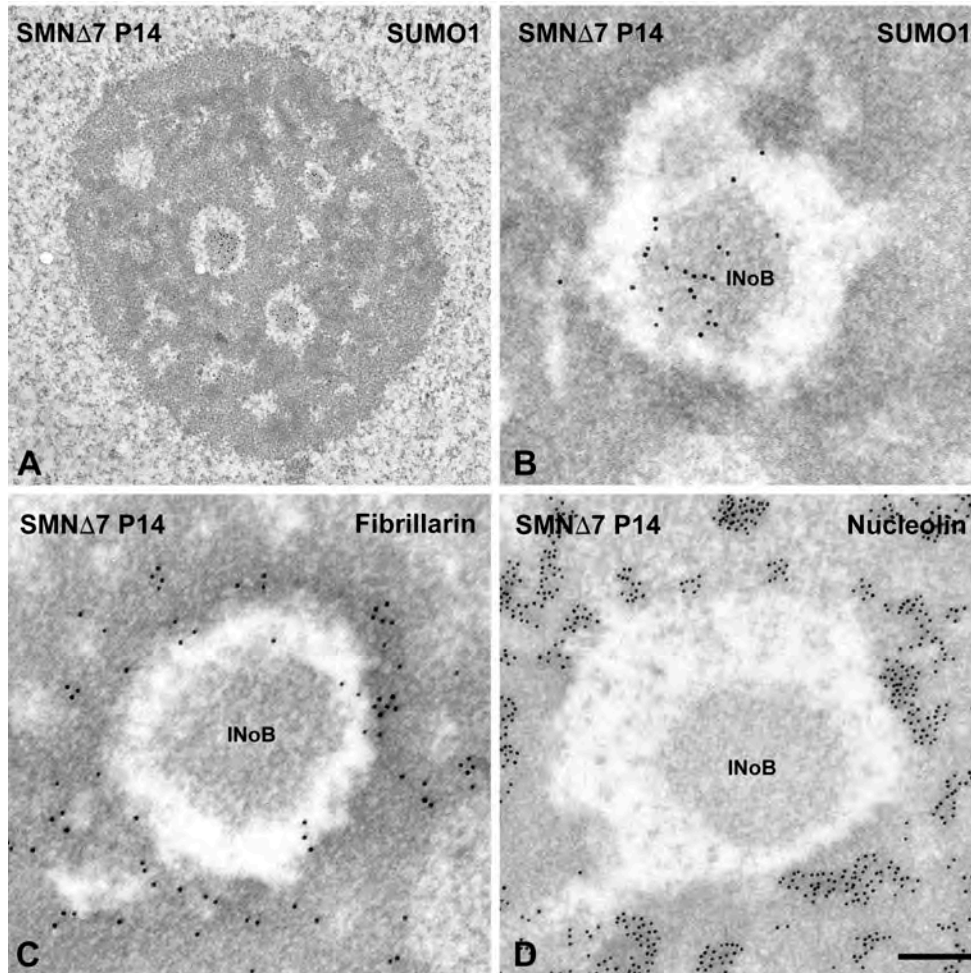


Figura 37. A, Panorámica de un nucleolo que muestra varios cuerpos SUMO intranucleolares (INoBs). B, Detalle de un INoB-SUMO positivo inmerso en una cavidad electrolúcida. C-D, El inmunomarcaje de la fibrilarina (C) y de la nucleolina (D) no se concentra en los INoBs, pero forma una cápsula de CFD-like que rodea a las cavidades intranucleolares. Escala: A: 1 μ m, B-C: 500 nm.

Para profundizar en el estudio de la segregación nucleolar (Fig. 35B-D), nos planteamos estudiar el patrón de distribución de la nucleolina, una fosfoproteína nucleolar multifuncional que se localiza principalmente en el CFD nucleolo y cuya reorganización se correlaciona con alteraciones de la actividad nucleolar en la biogénesis de ribosomas (Abdelmohsen & Gorospe, 2012). La nucleolina interactúa directamente con el rDNA y con los pre-rRNA facilitando la transcripción de los genes ribosomales y el procesamiento de los pre-rRNAs, respectivamente (para revisión, ver Ogawa & Baserga, 2017). Al estudiar por inmunoelectrónica con oro coloidal la distribución de esta proteína observamos que,

en las MN α -WT, las partículas de oro coloidal decoraban principalmente el CFD que rodeaba a los CFs, dando el característico patrón reticulado del nucleolo (Fig. 38A). En las MN α -SMN Δ 7, la distribución de las partículas de oro coloidal confirmó la segregación de los componentes nucleolares detectada con microscopía electrónica convencional. Sin embargo, fue muy sorprendente que, en ningún caso, la nucleolina se relocalizó fuera del CFD (Fig. 38B-D). Este hallazgo difiere de lo que ocurre en otras situaciones de estrés nucleolar en las que la nucleolina se relocaliza en el nucleoplasma e incluso en el citoplasma celular (Daniely et al., 2002). De hecho, en nuestro modelo de SMA murina, ni la eucromatina ni la heterocromatina reclutaban la proteína. También es destacable que los INoBs SUMO1-positivos carecían totalmente de nucleolina (Fig. 38B).

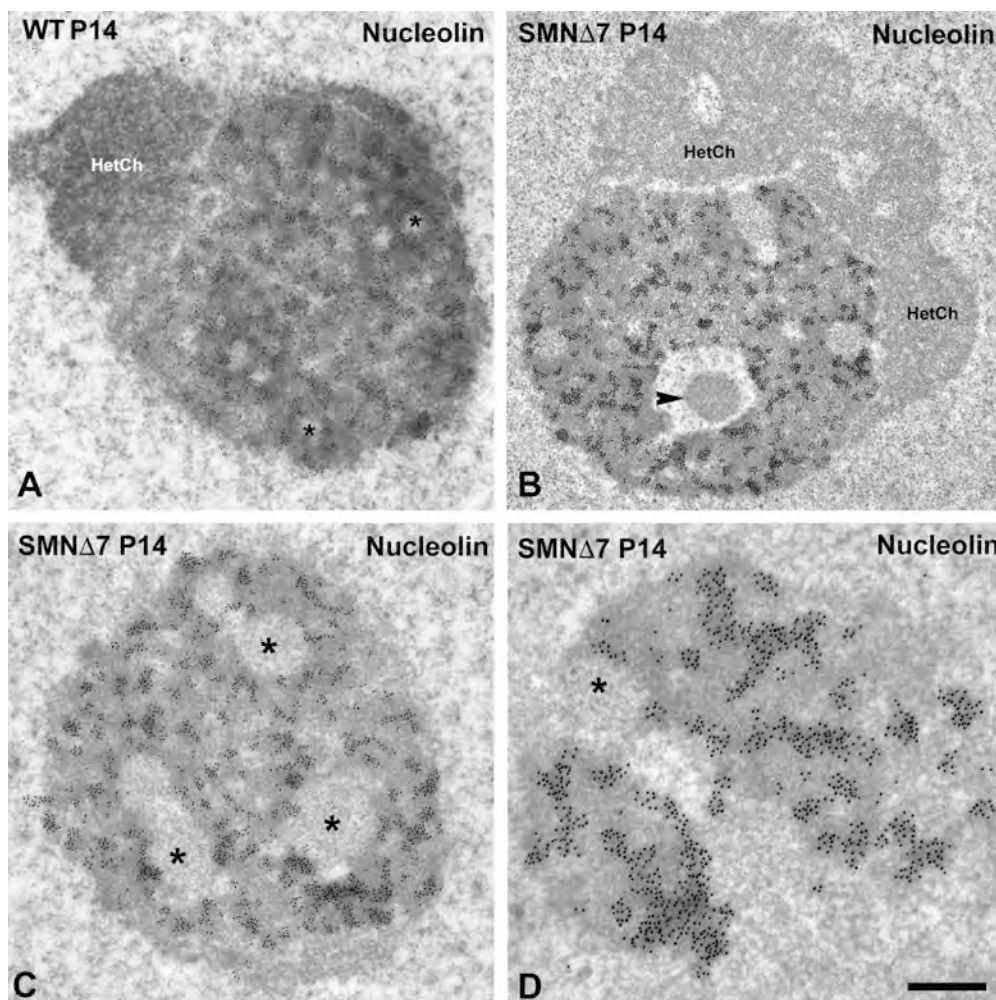


Figura 38. A, Nucleolo-WT que muestra la distribución de las partículas de oro coloidal sobre el CFD dando un patrón reticulado. B, Nucleolo-SMN Δ 7 que preserva su organización estructural, si bien muestra cuerpos intranucleares (flecha) y grandes masas de heterocromatina asociadas (HetCh) desprovistas del marcaje de la nucleolina. C-D, Dos ejemplos de segregación nucleolar en los que se muestra la nucleolina confinada en el CFD. Los asteriscos CFs de gran tamaño. Escala: A-D: 700 nm.

Dado que la reducción de los niveles de SMN causaba desestructuración de los compartimentos nucleolares en las MN α nos pareció importante investigar si el déficit de SMN modificaba los niveles de expresión de genes que codifican proteínas nucleolares esenciales para el procesamiento de los pre-rRNAs y ensamblaje en las partículas ribosomales. En particular, analizamos la expresión de los genes que codifican nucleolina, UBF, fibrilarina y nucleofosmina/B23 (Raska et al., 2006; Boisvert et al., 2007). Curiosamente, los cuatro genes estaban regulados al alza en las muestras procedentes de médula espinal de los animales SMN Δ 7 (Fig. 39). Esto sugiere una respuesta nucleolar reactiva, posiblemente neuroprotectora, a la disfunción de la maquinaria de síntesis de proteínas descrita en este modelo experimental (Bernabó et al., 2017). Sin embargo, es preciso considerar que los datos de las PCR cuantitativas en tiempo real se obtienen en extractos de RNA de toda la médula espinal y, por lo tanto, no se puede excluir la participación de otras poblaciones celulares en la respuesta nucleolar en el ratón SMN Δ 7.

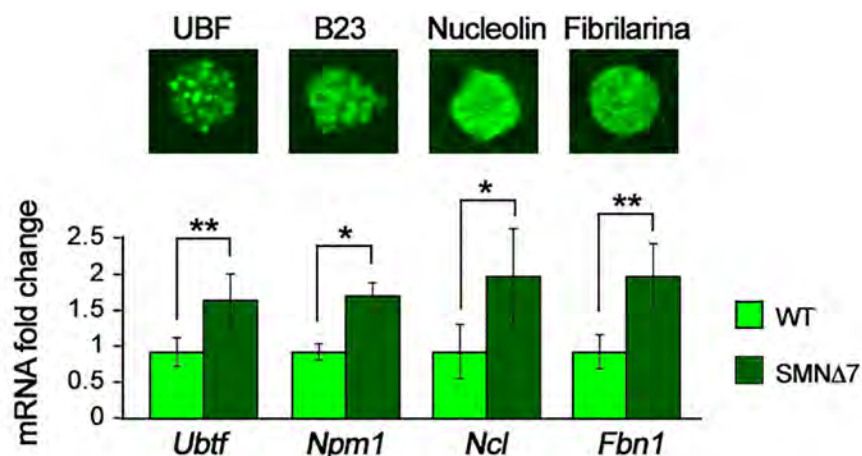


Figura 39. RT-qPCR de los componentes nucleolares UBF (*Ubtf*), Fibrilarina (*Fbn1*), Nucleolina (*Ncl*) y B23 (*Npm1*) en extractos de médula espinal de animales WT y SMN Δ 7. Nótese un aumento significativo en la expresión de los componentes nucleolares en los ratones SMN Δ 7. Los insets ilustran los distintos marcadores a nivel de microscopía confocal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Un método excelente para valorar si el déficit de SMN modifica o no la actividad transcripcional del nucleolo es el ensayo de transcripción *in situ*. Brevemente, este procedimiento se basa en la incorporación del nucleótido 5'-FU inyectado intraperitonealmente en los RNA nacientes tanto a nivel nucleolar (rRNAs) como extranucleolar (mRNAs). Con la finalidad de obtener la máxima resolución, adaptamos el ensayo de transcripción al análisis ultraestructural utilizando partículas de oro coloidal que reconocen los sitios de incorporación de 5'-FU (Casafont et al., 2006). A los 45 minutos de exposición al nucleótido

halogenado, los nucleolos de las MN α -WT mostraban que las partículas de oro decoraban los sitios de incorporación de la 5'-FU, principalmente en el CFD, donde se produce la transcripción de los genes ribosomales (Cmarko et al., 2000; Casafont et al., 2006; Raska et al., 2006). Sin embargo, los CF y el CG estaban libres de inmunomarcaje (Fig. 40A-B). A nivel extranucleolar, las partículas de oro coloidal decoraban la eucromatina, donde se transcriben los genes codificantes de proteínas (Fig. 40B). Confirma la validez del ensayo de transcripción la ausencia de inmunomarcaje en la heterocromatina, transcripcionalmente silente, y en los CBs que carecen de DNA y de RNAs nacientes (Fig. 40A-B).

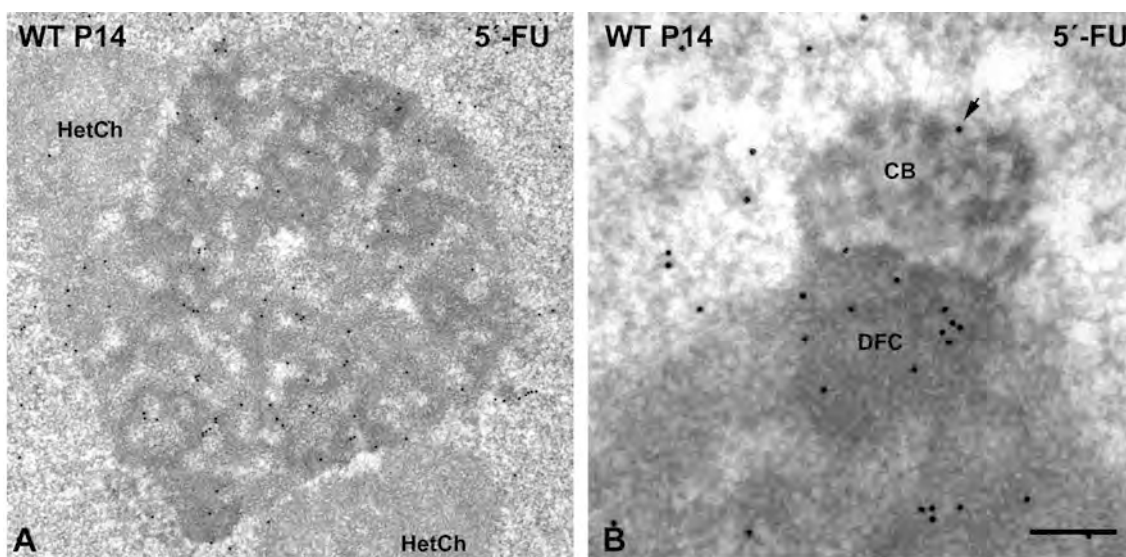


Figura 40. A-B, Las imágenes documentan el ensayo de transcripción *in situ* a nivel ultraestructural en MN α -WT. Las partículas de oro coloidal decoran los sitios de incorporación de la 5'-FU que corresponde al CFD (DFC) (A) y en la eucromatina (B). Nótese como la heterocromatina (HetCh) y los CB carecen de señal. Escala: A: 1 μ m, B: 400 nm.

Seguidamente, analizamos la incorporación de la 5'-FU en las MN α -SMN Δ 7. El ensayo de transcripción reveló que, a pesar de las severas alteraciones estructurales del nucleolo, la reducción de SMN no impedía la transcripción nucleolar en el CFD. Así, las partículas de oro coloidal marcaban específicamente el CFD, excluyendo los CFs, donde se localizan los genes ribosomales silentes. También carecía de señal el CG (Fig. 41A-C). Incluso aquellos nucleolos con una segregación severa de sus componentes mostraban las partículas de oro coloidal en el CFD segregado (Fig. 41C). Además, el doble inmunomarcaje para 5'-FU y SUMO1 demostró que los INoBs SUMO1-positivos no eran sitios de transcripción nucleolar (Fig. 41D).

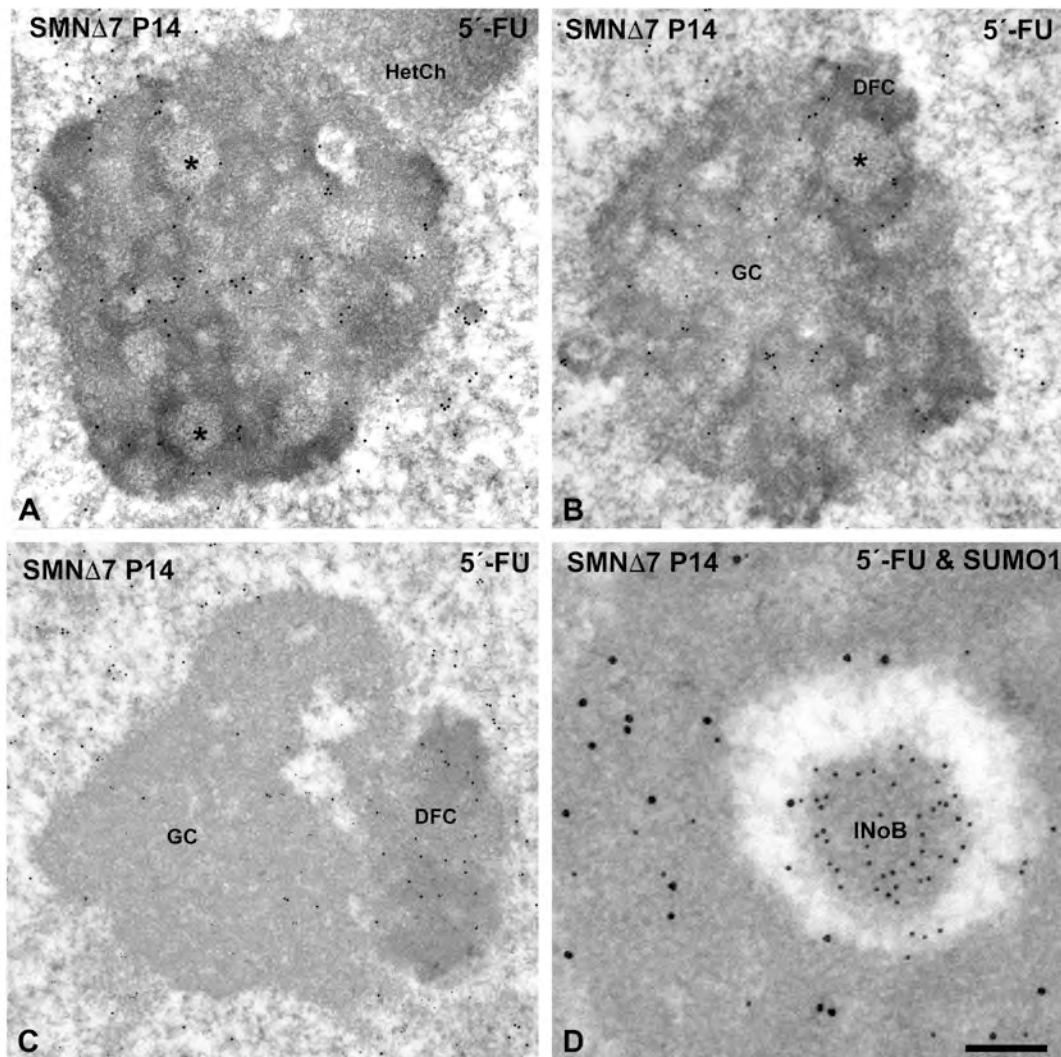


Figura 41. A-D, Incorporación del nucleótido 5'-FU en el CFD que rodea los CF en nucleolos pertenecientes a MN α -SMN Δ 7. Algunos CFs (asteriscos) son de gran tamaño y están rodeados por el CFD específicamente marcado con el nucleótido halogenado (A-B). En C se ilustra un nucleolo con severa segregación del componente granular, pero que preserva el marcaje en el CFD. En D, el doble inmunomarcaje de SUMO1 (partículas pequeñas) y 5'-FU (partículas grandes) se documenta la ausencia de RNAs naciendo en el INoBs y su reclutamiento en el CFD. Escala: A-C: 1 μ m, D: 150 nm.

A pesar de que nuestros resultados parecen indicar que el déficit de SMN no causa una severa disfunción transcripcional en el nucleolo de las MN α -SMN Δ 7, nos pareció importante corroborar estos datos mediante la determinación por RT-qPCR de los niveles de rRNAs en extractos de RNA de la médula espinal. Para ello, analizamos, en primer lugar, el nivel de expresión del pre-rRNA 45S, el precursor de los rRNAs 18S, 5,8S y 28S (Boisvert et al., 2007). El pre-rRNA 45S naciente tiene una vida media muy corta ya que, una vez transcrito, se escinde inmediatamente en los tres tipos de rRNAs ribosomales. Por ello es considerado

como un indicador de la actividad transcripcional global de la RNA polimerasa I (Mayer et al., 2005). Con este fin utilizamos oligonucleótidos cebadores específicos (Fig. 42A). Los primers del extremo 5' del pre-rRNA 45S (Primers 1) demostraron que el déficit de SMN no modificaba significativamente la expresión de pre-rRNA 45S. Seguidamente, centramos nuestro interés en la expresión de los precursores inmediatos del rRNA 18S (Primers 2) y de la forma madura del rRNA 18S (Primers 3). Curiosamente, mientras los niveles de los precursores 18S no se modificaban, la expresión del rRNA 18S maduro aparecía incrementada aproximadamente 2 veces en los ratones SMA, en comparación con las muestras de los ratones WT (Fig. 42B). Siguiendo la misma estrategia, evaluamos los niveles de los pre-rRNAs que contienen las secuencias 5' inmediatas del 5,8S ("5,8-5' junction", Primers 4) y del rRNA 5,8S maduro (Primers 5). Nuestros resultados demuestran un comportamiento paralelo al rRNA 18S, los niveles de los precursores del rRNA 5,8S no se modificaban, pero la forma madura del rRNA 5,8S estaba incrementada. (Fig. 42C). Finalmente, analizamos el rRNA 28S, utilizando los primers 7 y 8 complementarios a las regiones "28S-5' junction" y 28S respectivamente. En este caso, tanto la forma precursora del rRNA 28S como del rRNA 28S maduro estaban sobreexpresados (Fig. 42D). En su conjunto, nuestros resultados indican que el déficit de SMN no parece afectar a la actividad transcripcional de los genes ribosomales. Sin embargo, causa retención nucleolar de las formas maduras de los rRNAs 18S, 5,8S y 28S, sugiriendo su deficiente exportación al citoplasma. Además, la sobreexpresión de las formas maduras de los rRNAs puede ser un factor que justifique la hipertrofia nucleolar y el cúmulo de CG detectado en las las MN α -SMN Δ 7.

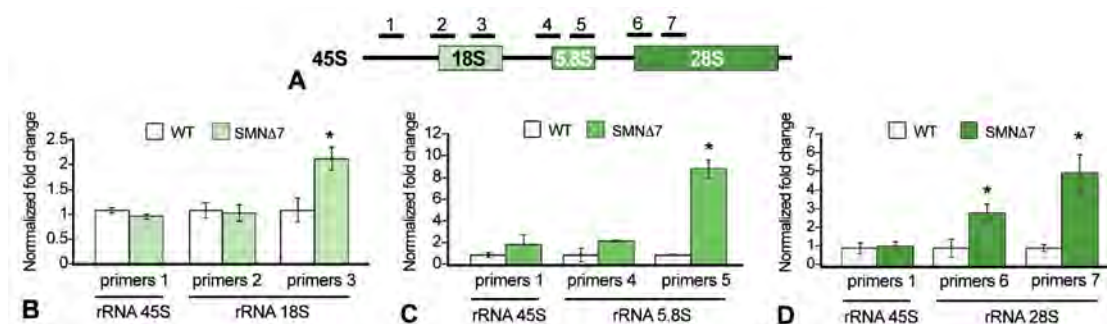


Figura 42. Esquema de los primers utilizados para la expresión de rRNAs. A-C, Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión del 45S (primer 1), de precursores inmediatos del 18S, 5,8S y 28S (primers 2, 4 y 6) y las formas maduras 18S, 5,8S y 28S (primers 3, 5 y 7). Mientras no se detectan cambios en la expresión del 45S y de los precursores del 18S y 5,8S, existe un incremento significativo de la cantidad relativa de los rRNA maduros 18S, 5,8S y 28S.

4.2 ACUMULACIÓN DE POLI (A) RNAs EN GRANULOS NUCLEARES EN MN α DEL RATÓN SMN Δ 7

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado en las neuronas del ganglio trigémino que los mRNAs poliadenilados se confinan en la eucromatina, donde se transcriben y poliadenilan, en los "speckles" nucleares, donde transitan y pueden ser modificados antes de su exportación al citoplasma, y en los grumos de Nissl del citoplasma, donde se traducen (Casafont et al., 2009 Palanca et al., 2014).

En el presente trabajo quisimos caracterizar la distribución de los mRNAs poliadenilados en las MN α -WT utilizando una sonda de un oligonucleótido de poli(dT), que se une a la cola de poli(A) de los mRNAs. El estudio en disociados de MN α mostró su típica distribución difusa en el nucleoplasma y su concentración en los "speckles" nucleares. Al igual que en las neuronas ganglionares sensitivas con elevada actividad de traducción, en el citoplasma de las MN α los mRNA poliadenilados aparecían acumulados en áreas irregulares que corresponden a los grumos de Nissl, el sitio de traducción de los mRNAs (Fig. 43A). El triple marcaje de poli(A) RNAs en combinación con el inmunomarcaje con dos anticuerpos que reconocen los "speckles" nucleares, TMG-cap (snRNAs) y PABPN1 (cola de poli(A) RNA), confirmó la localización de los poli(A) RNAs en los "speckles" nucleares. La colocalización fue también validada con el perfil lineal de la intensidad de la fluorescencia de los tres marcadores a través del núcleo (Fig. 43A-E).

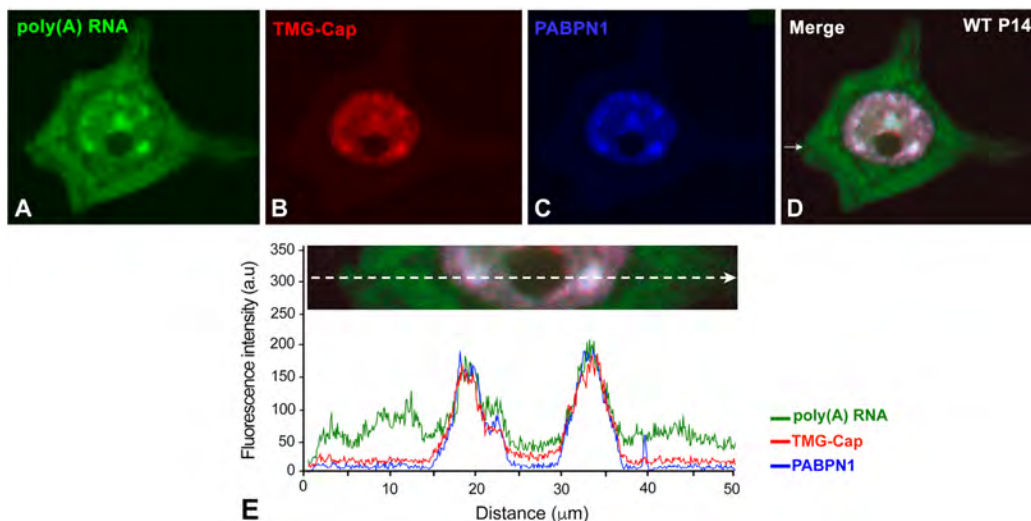


Figura 43. A-D, Triple marcaje de mRNAs poli(A) y de las proteínas TMG-Cap y PABPN1 en MN α -WT. Los mRNAs poliadenilados forman, en el citoplasma los grumos de Nissl. En el núcleo las tres moléculas colocalizan en el nucleoplasma y en los "speckles" nucleares. E, Perfil de los fluorocromos que confirma su colocalización nuclear. Escala: 5 μ m.

4.2.1 En las MN α -SMN Δ 7, los mRNAs poliadenilados se relocalizan en gránulos nucleares de poli(A) RNA

Una importante cuestión era conocer si la disfunción del metabolismo de RNAs, dependiente del déficit de SMN, inducía cambios en la distribución de los mRNA poliadenilados en las MN α -SMN Δ 7. La hibridación *in situ* de los mRNAs poliadenilados reveló que la reducción de los niveles de SMN en las MN α -SMN Δ 7 causaba una severa reorganización nuclear y citoplasmática de estos RNAs, tanto en la etapa presintomática tardía (P5) como en la sintomática (P14), si se compara con el patrón observado en las MN α de los ratones WT (Fig. 43A y 44A).

En el día 5 postnatal, cuando los ratones SMN Δ 7 no mostraban síntomas clínicos, algunas MN α exhibían severas alteraciones en la distribución nuclear de los mRNAs poliadenilados. Los rasgos más prominentes fueron el incremento de la concentración de poli(A) RNAs en los "speckles" nucleares y la formación *de novo* de gránulos nucleares de poli(A) RNA, distribuidos por todo el núcleo excluyendo el nucleolo, de forma redondeada, bien definidos y de 0,1 a 1,5 μ m de diámetro (Fig. 44B-C). Estos gránulos habían sido identificados previamente en nuestro laboratorio en neuronas del ganglio trigémino tratadas con el inhibidor del proteasoma Bortezomib, y fueron denominados como gránulos de poli(A) RNA (PARGs) (Casafont et al., 2010; Palanca et al., 2014). La presencia de PARGs en la fase presintomática, cuando la pérdida de MN α es mínima, sugiere que la formación de PARGs es una manifestación temprana de disfunción en el "splicing" y exportación al citoplasma de los mRNAs poliadenilados. Así, en el P14, cuando las MN α -SMN Δ 7 se encontraban en una fase más avanzada en su proceso neurodegenerativo y presumiblemente con una mayor disfunción del metabolismo de RNAs, detectamos una mayor incidencia de MN α -SMN Δ 7 portadoras de PARGs que, a su vez, contenían mayor número de estos gránulos. En esta edad, los PARGs frecuentemente se asociaban al nucleolo y a los "speckles" nucleares (Fig. 44D-E). Además, los PARGs mostraban dos patrones morfológicos bien definidos: redondeados y anulares. Los primeros presentaban una textura homogénea y compacta con una fuerte señal de hibridación de poli(A) RNAs. Los segundos, solo mostraban la señal de hibridación en la porción anular, mientras que la región central carecía de marcaje (Fig. 44C, F inset). De manera interesante, aquellas MN α -SMN Δ 7 que mostraban un elevado número de PARGs exhibían una señal más

débil de los RNAs poliadenilados tanto en los “speckles” nucleares como en el citoplasma neuronal (Fig. 44F). Es destacable que, a diferencia de lo que ocurre en otros modelos de neurodegeneración, los poli(A) RNAs no se concentraban en gránulos de estrés en el citoplasma de las MN α -SMN Δ 7. El análisis cuantitativo sobre disociados de MN α , hibridados con la sonda de poli-dT para detectar los poli(A) RNAs, confirmó que el déficit de SMN incrementaba significativamente el porcentaje de MN α -SMN Δ 7 que albergaban PARGs en la fase sintomática (P14) si se compara con la presintomática P5 (28% vs 17%) (Fig. 44G). Asimismo, el estudio densitométrico de la señal de los mRNAs poliadenilados mostró una reducción significativa de la concentración relativa de los mRNAs en los grupos de Nissl de las MN α -SMN Δ 7 en comparación con las MN α -WT. Esta reducción fue mucho más acusada en las MN α -SMN Δ 7 portadoras de PARGs (Fig. 44H).

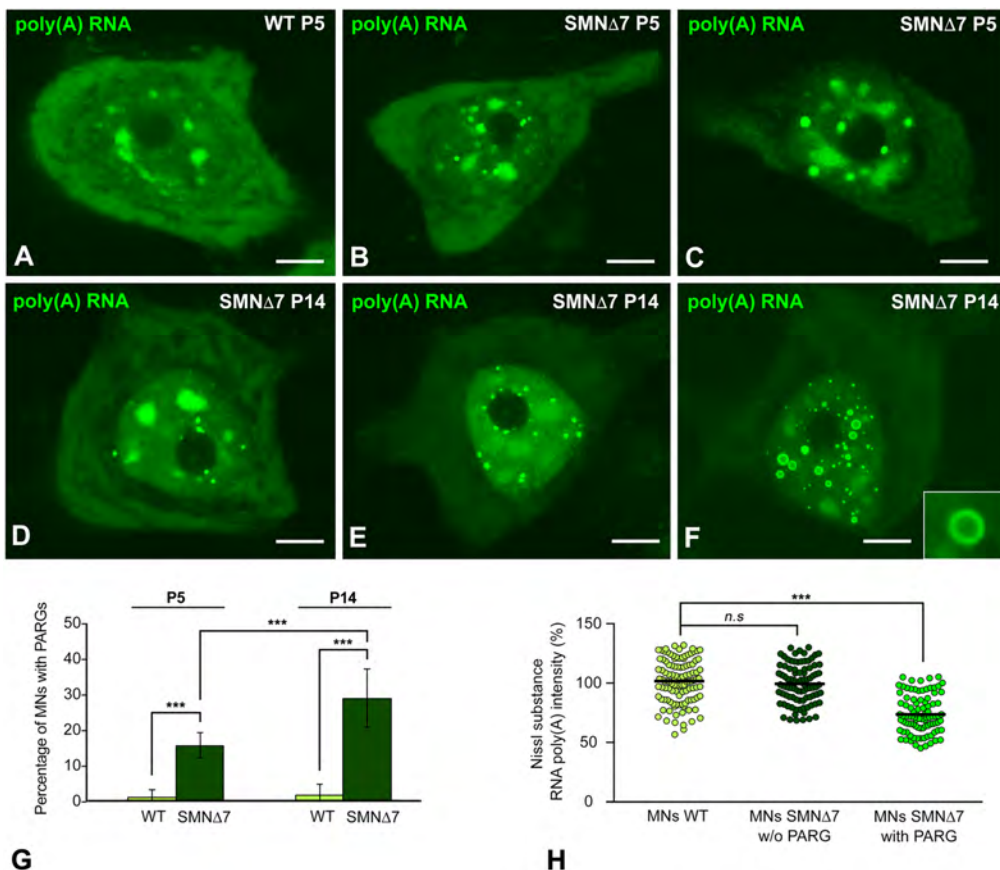


Figura 44. A-F, Hibridación *in situ* de los poli(A) RNAs. A, MN α -WT en P5 que muestra los mRNAs en los grupos de Nissl y en el núcleo. B-C, Las MN α -SMN Δ 7 en P5 muestran acúmulo de mRNAs en los speckles y en los PARGs. D-F, Las MN α -SMN Δ 7 en P14 incrementan el número y tamaño de PARGs. Nótese que algunos PARGs son pequeños y otros, de mayor tamaño, forman anillos que concentran mRNAs. G, El porcentaje de MN α -SMN Δ 7 con PARGs se incrementa en P14. H, El análisis densitométrico de los poli(A) RNAs demuestra una caída significativa de la señal en el citoplasma de las MN α -SMN Δ 7 con PARGs en P14 si se compara con las que no tienen PARGs y con las MN α -WT. Escala: 5 μ m. *** p < 0.0005.

El análisis con microscopía electrónica de las MN α -SMN Δ 7 que contenían PARGs reveló características estructurales típicas de una severa disfunción neuronal, como son la escasez de la maquinaria de síntesis de proteínas, alteraciones de la forma del núcleo, con numerosas invaginaciones de su envoltura, y segregación del componente granular del nucleolo (Fig. 45). Asimismo, se caracterizó la ultraestructura de las dos categorías de PARGs observadas con microscopía confocal. Mientras que los PARGs redondeados eran homogéneamente electrodensos, los anulares estaban compuestos por un anillo o cápsula de material electrodenso que rodeaba a la matriz central más amorfa y baja densidad electrónica (Fig. 45, inset izquierdo). Los PARGs se localizaban en dominios de eucromatina, donde se produce la transcripción y el procesamiento co-transcripcional de los mRNAs, aunque frecuentemente se asociaban espacialmente con el nucleolo y los "speckles" nucleares. A nivel ultraestructural los "speckles" se identifican claramente como densos agregados de granulaciones inter-cromatínicas (IGCs) localizados en el dominio intercromosómico (Fig. 45, inset derecho). Estos resultados permiten concluir que el déficit de SMN en las MN α -SMN Δ 7 parece interferir con el procesamiento y exportación al citoplasma de los mRNAs poliadenilados, dando como resultado su retención nuclear parcial en los PARGs y la disrupción paralela de la maquinaria de síntesis de proteínas.

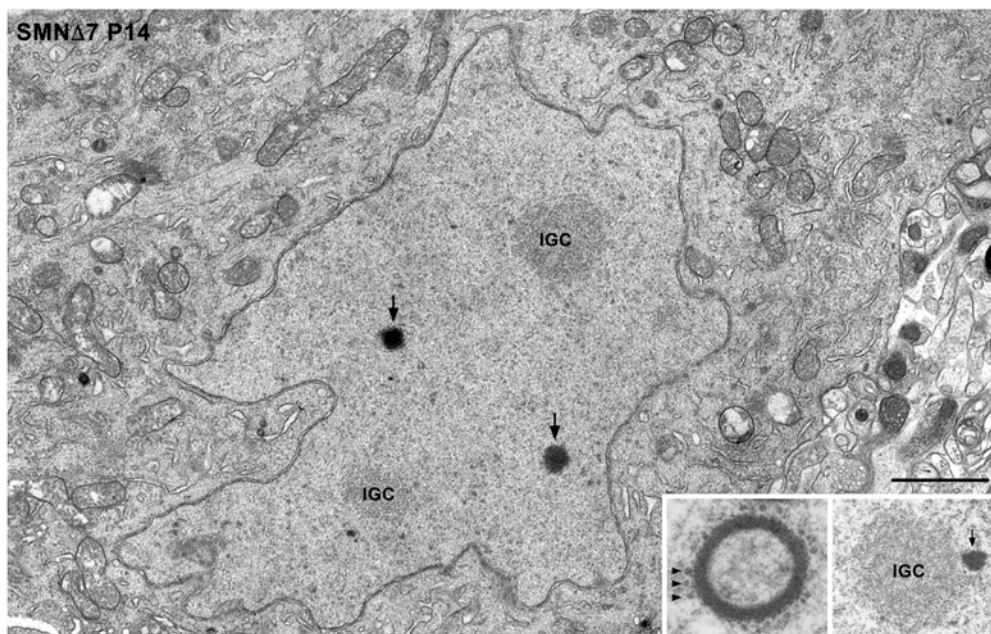


Figura 45. Microscopía electrónica de una MN α -SMN Δ 7 que muestra un núcleo irregular con numerosas invaginaciones de la envoltura nuclear. Nótese la presencia de dos PARGs compactos (flechas) y, en el ínet izquierdo un PARG en forma de anillo rodeado de gránulos pericromatinicos (cabezas de flechas). En el inset derecho un "speckle" (IGC) que asocia un PARG (flecha). Escala: 2 μ m.

4.2.2 Los PARGs son un compartimento nuclear con identidad propia

Para establecer si los PARGs encontrados en las MN α -SMN Δ 7 tienen una identidad propia, diferente de otras estructuras nucleares tales como los CBs, gems, "speckles" nucleares y clastosomas, detectamos por hibridación *in situ* los poli(A) RNAs en combinación con marcadores específicos de estos compartimentos nucleares con inmunofluorescencia. En particular, detectamos coilina (CBs), SMN (CBs y gems), TMG-cap ("nuclear speckles") y proteasoma 20S (clastosomas) (Lafarga et al., 2009). El doble marcaje de los mRNAs poliadenilados y coilina demostró que los PARGs no eran CBs puesto que no concentraban coilina (Fig. 46A). Los PARGs tampoco concentraban SMN, aunque es preciso indicar que el déficit de SMN hace muy difícil visualizar CBs y gems en MN α -SMN Δ 7 (Tapia et al., 2017) (Fig. 46B). Asimismo, los PARGs carecían de snRNPs espliceosomales marcados con el anticuerpo anti-TMG-cap que reconoce los snRNAs, descartando que los PARGs correspondan a "speckles" nucleares (Fig. 46C). Finalmente, confirmamos que los PARGs no eran clastosomas, factorías nucleares proteolíticas enriquecidas en proteasoma catalítico 20S (Lafarga et al., 2002) (Fig. 46D). Los perfiles lineales de los dobles marcajes fluorescentes validaron la falta de colocación de poli(A) RNA y los marcadores nucleares estudiados en los PARGs (Fig. 46A-D). Estos resultados claramente permiten catalogar a los PARGs como una estructura distinta en el dominio intercromatínico con identidad propia.

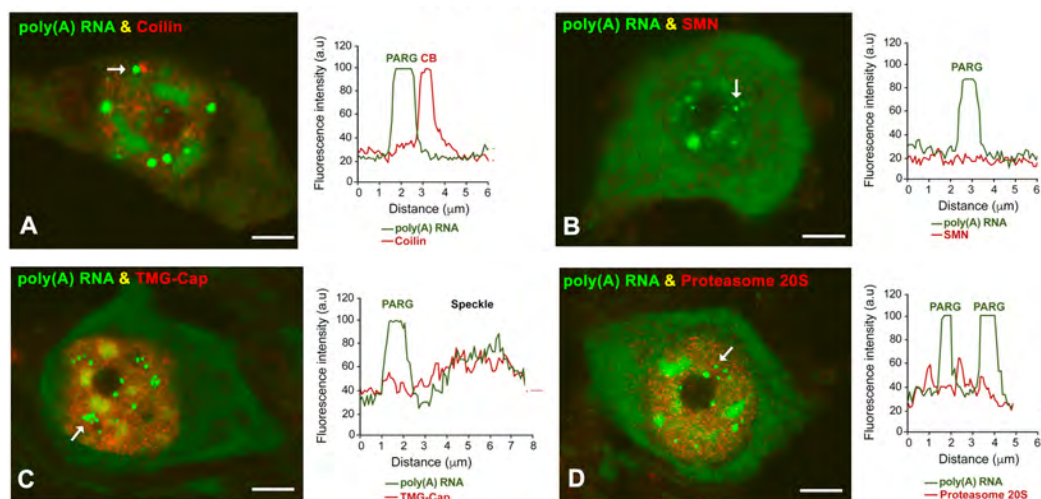


Figura 46. A-D, Marcaje de los PARGs en MN α -SMN Δ 7 P5 con la sonda poli(dT) en combinación con marcadores de otras organelas nucleares. A, Muestra que la coilina no se concentra en los PARGs. B, Los PARGs no concentran SMN. C, El marcaje de la proteína TMG-Cap, un marcador de "speckles", no se detecta en los PARGs. D, La subunidad catalítica del proteasoma 20S no es ubicada de los PARGs. La ausencia de señal en los PARGs de los diferentes marcadores en los perfiles confirma que los PARGs es una organela específica de las MN α -SMN Δ 7. Escala: 4 μ m.

4.2.3 Los PARGs concentran la proteína de unión a los mRNAs Sam68

Dado que la proteína Sam68 es un regulador del “splicing” alternativo de determinados mRNAs, incluyendo el codificado por el gen *SMN2* (Pedrotti et al., 2010), nos pareció importante investigar si la reducción de SMN induce cambios en la expresión de Sam68 y en su patrón de distribución nuclear. Mediante doble marcaje de los mRNAs poliadenilados y de la proteína Sam68 demostramos que, en las MN α -WT, Sam68 se distribuye difusamente en el dominio de la eucromatina, si bien mostraba algunos dominios con mayor nivel de expresión (Fig. 47A-C). Potencialmente, la diferente concentración de Sam68 en la cromatina podría estar relacionada con una actividad diferencial en el “splicing” alternativo de mRNAs dependientes de este factor regulador del “splicing”. Es destacable que los “speckles” nucleares, intensamente marcados con la sonda de hibridación para los poli(A) RNAs, estaban exentos de inmunomarcaje para Sam68 (Fig. 47A-C). En el caso de las MN α -SMN Δ 7, el déficit de SMN no modificaba sustancialmente el patrón nuclear de distribución de la proteína Sam68, pero los PARGs marcados con la sonda de hibridación *in situ* poli(dT) estaban enriquecidos en este factor regulador del “splicing” (Fig. 47D-F). Este resultado fue validado mediante el análisis del perfil lineal de la intensidad de la fluorescencia de poli(A) RNA y de la Sam68 que confirmó la colocalización de ambas moléculas en los PARGs. Asimismo, descartó su localización en los “speckles” nucleares y en el nucleolo (Fig. 47G).

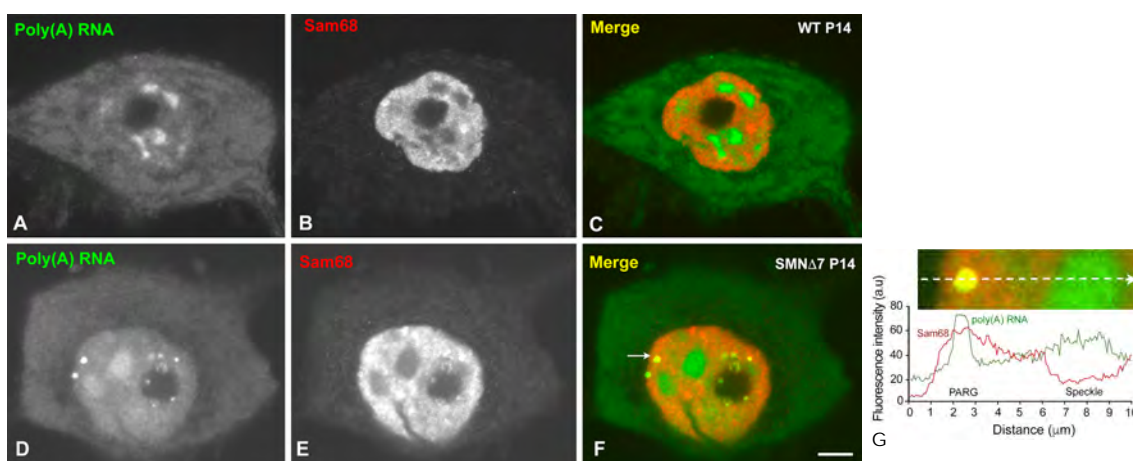


Figura 47. A-C, La MN α -WT muestra la distribución de la proteína Sam68 difusa por el nucleoplasma y concentrada en algunas áreas irregulares. Nótese que el nucleolo y los “speckles” nucleares carecen de marcaje de Sam68. D-G, La MN α -SMN Δ 7 acumula Sam68 en los PARGs marcados con la sonda poli(dT) y preserva la distribución nuclear similar a la de la MN α WT. (G) Perfil lineal de la fluorescencia de poli(A) RNAs (verde) y Sam68 (rojo) que confirma la colocalización de ambas señales en un PARG (señalado con una flecha blanca). Escala A-F: 3 μ m.

La presencia de Sam68 en los PARGs fue también validada con inmunoelectrónica utilizando partículas de oro coloidal. Como se ilustra la figura 48 A y B, las partículas de oro coloidal inmunorreactivas para Sam68 decoraban los PARGs redondeados y compactos y el anillo periférico de los PARGs anulares, dejando libre de marcaje la matriz central.

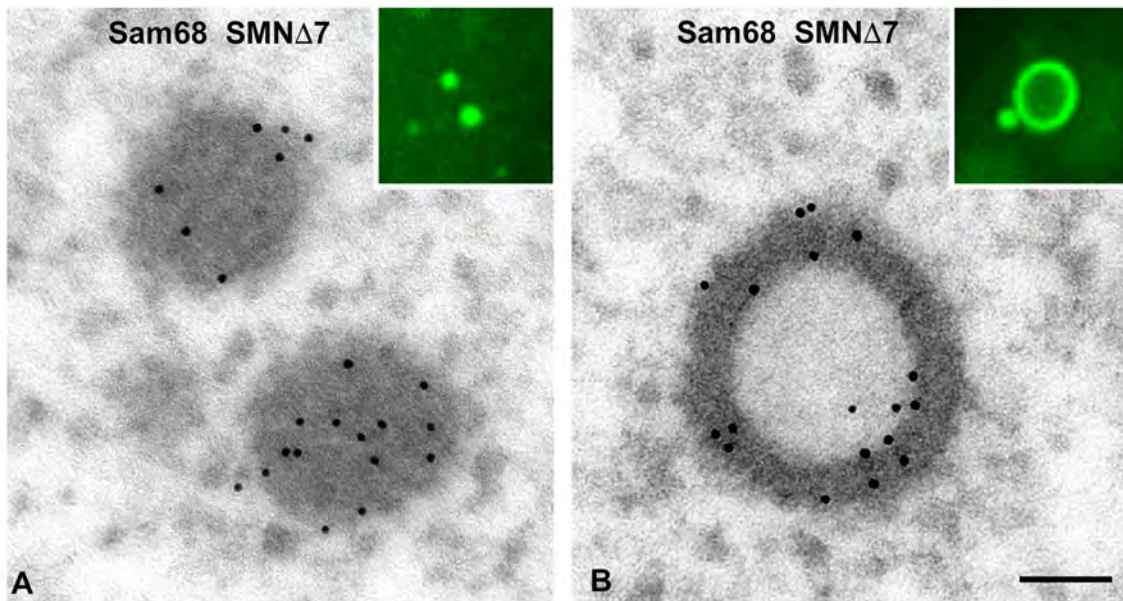


Figura 48. A-B, Inmunoelectrónica de la proteína Sam68 con partículas de oro coloidal. Obsérvese como el marcaje se localiza específicamente en los PARGs compactos (A) y en el anillo de los PARGs anulares (B). Inset muestran el marcaje de los PARGs con la sonda de poli(dT). Escala: 200 nm.

Seguidamente investigamos si el acúmulo de Sam68 en los PARGs estaba relacionado con cambios en su expresión. Para lo cual realizamos un análisis con RT-qPCR y WB. Curiosamente, el déficit de SMN no modificó los niveles de expresión ni del mRNA ni de la proteína Sam68 en las muestras de médula espinal del ratón SMN Δ 7 en comparación con los del ratón WT (Fig. 49A, B). Sin embargo, como se esperaba, los niveles de la proteína SMN estaban muy reducidos en la médula espinal del ratón MN α -SMN Δ 7 (Fig. 49B). No obstante, nos pareció importante conocer si la retención de Sam68 en los PARGs podría reducir su disponibilidad en el nucleoplasma y afectar al "splicing" alternativo de otros mRNAs diana de este factor regulador del "splicing". A tal efecto, seleccionamos los mRNAs de *Bcl-x* y *Nrxn1* cuyo "splicing" alternativo está regulado por Sam68 y que codifican dos proteínas esenciales para la función neuronal, el factor regulador de la apoptosis Bcl-x y la proteína de la membrana presináptica neurexina (Iijima et al., 2011). Con respecto al transcrito *Bcl-x*, sabemos que la concentración de Sam68

controla su “splicing” alternativo regulando el balance entre la isoforma anti-apoptótica larga *Bcl-x(L)* y la isoforma pro-apoptótica corta *Bcl-x(s)* que induce la neurodegeneración (Boise et al., 1993). Nuestro estudio por RT-qPCR de extractos de RNA de la médula espinal reveló una reducción significativa del ratio *Bcl-x(s)/Bcl-x(L)* en el ratón *SMN Δ 7* en comparación con el ratón WT (Fig. 49C). Respecto al “splicing” alternativo del mRNA de la neurexina mediado por Sam68, es conocido que genera dos isoformas, *Nrxn 1 4(+)* y *Nrxn 1 4(-)*, con presencia o ausencia del exón 20 en el segmento de “splicing” alternativo 4 (AS4) (Iijima et al., 2011). Funcionalmente, estas isoformas codifican dos proteínas con un interactoma diferente con proteínas importantes para el mantenimiento de la sinapsis (Iijima et al., 2011). El análisis cuantitativo por RT-qPCR reveló una disminución significativa del ratio *Nrxn 1 4(-)/Nrxn 1 4(+)* en la médula espinal del ratón *SMN Δ 7* en comparación con el ratón WT, indicando una mayor abundancia relativa de la isoforma 4(+) que incluye el exón 20 (Fig. 49C).

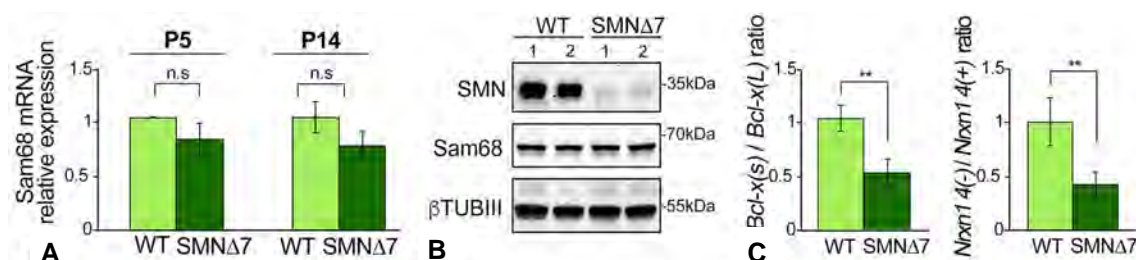


Figura 49. A, RT-qPCR de los niveles de Sam68 donde no se observan diferencias significativas entre WT vs *SMN Δ 7*. B, El WB de Sam68 tampoco muestra cambios en sus niveles proteicos (WT vs *SMN Δ 7*). C, Ratio la expresión relativa de *Bcl-X(s)/L* y *Nrxn (-)/(+)* obtenidos a partir de las muestras de médula espinal analizadas por RT-qPCR. Nótese la caída significativa de los ratios indicando una alteración del “splicing” alternativo mediado por Sam68 en los ratones *SMN Δ 7*. ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

4.2.4 Los PARGs enriquecidos en Sam68, no concentran otras proteínas implicadas en el procesamiento y exportación de mRNAs

Habiendo demostrado que los PARGs concentran Sam68, procedimos a continuación a investigar si estos cuerpos además de reclutar este factor del “splicing”, concentraban otras proteínas de unión a los mRNAs. En particular, proteínas implicadas en distintas etapas del procesamiento y exportación de mRNAs, tales como PABPN1, TDP43, hnRNPA2/B1, hnRNPM3/M4, Y14 y REF. Para desarrollar este objetivo combinamos la hibridación *in situ* de los poli(A) mRNAs, como marcador de los PARGs, con anticuerpos específicos que reconocen cada una de dichas proteínas de unión a los RNAs (Fig. 50).

En primer lugar analizamos la proteína PABPN1 ("Poly(A) Binding Protein nuclear 1"), un factor fundamental para la correcta poliadenilación co-transcripcional de los mRNAs (Kühn & Wahle, 2004; Apponi et al., 2010). Tanto en las MN α -WT como en las SMN Δ 7 la PABPN1 apareció concentrada en los "speckles" nucleares y difusa por el nucleoplasma, excluyendo el nucleolo (Fig. 50A-B). Sin embargo los PARGs enriquecidos en poli(A) RNAs carecían de señal para la PABPN1 (Fig. 50B-C). El análisis del perfil lineal de intensidades de fluorescencia de la señal de poli(A) RNAs y PABPN1 confirmó la ausencia de colocación en los PARGs de ambas moléculas (Fig. 50C). Esta observación sugiere que la PABPN1 no está unida a la cola de poli(A) de los RNAs retenidos en los PARGs.

Seguidamente analizamos la proteína TDP43 ("TAR DNA-binding protein 43") de unión a los RNAs. TDP43 que, como es bien conocido es un componente de las partículas de RNPs heterogéneas nucleares (hnRNPs) que regulan el "splicing" de una gran variedad de pre-mRNAs (Lee et al., 2012; Septhon et al., 2011; Casafont et al., 2009). TDP43 ha adquirido gran relevancia en neuropatología dado que su disfunción juega un papel fundamental en la patogénesis de diferentes enfermedades de la motoneurona (Lee et al., 2012). El patrón nuclear de expresión de TDP43 en las MN α WT y SMN Δ 7 fue similar, mostrando una distribución difusa por el nucleoplasma que excluía el nucleolo, los "speckles" nucleares y los PARGs (Fig. 50D-F).

Por su parte, las proteínas de la familia de hnRNPs, A2/B1 y M3/M4, implicadas en el empaquetamiento de pre-mRNAs nacientes y en la regulación del "splicing" alternativo (Bekenstein et al., 2013), presentaron una distribución estrictamente nucleoplasmática, pero no fueron detectadas en los PARGs (Fig. 50G-L). Finalmente, las proteínas REF y Y14, dos factores que participan en el tráfico nuclear y exportación de los mRNAs del núcleo al citoplasma (Rodrigues et al., 2001; Kim et al., 2001), mostraron una localización nuclear difusa, excluyendo el nucleolo; en el caso de Y14, estaba también concentrada en "speckles" nucleares. Es destacable, sin embargo, que ninguno de estos dos factores de exportación de mRNAs aparecieron concentrados en los PARGs (Fig. 50M-R).

En resumen podemos concluir que, excluyendo Sam68, los mRNAs poliadenilados retenidos en los PARGs no se asocian con las proteínas de unión a

los mRNA objeto de este estudio, todas ellas muy importantes para su procesamiento y exportación nuclear.

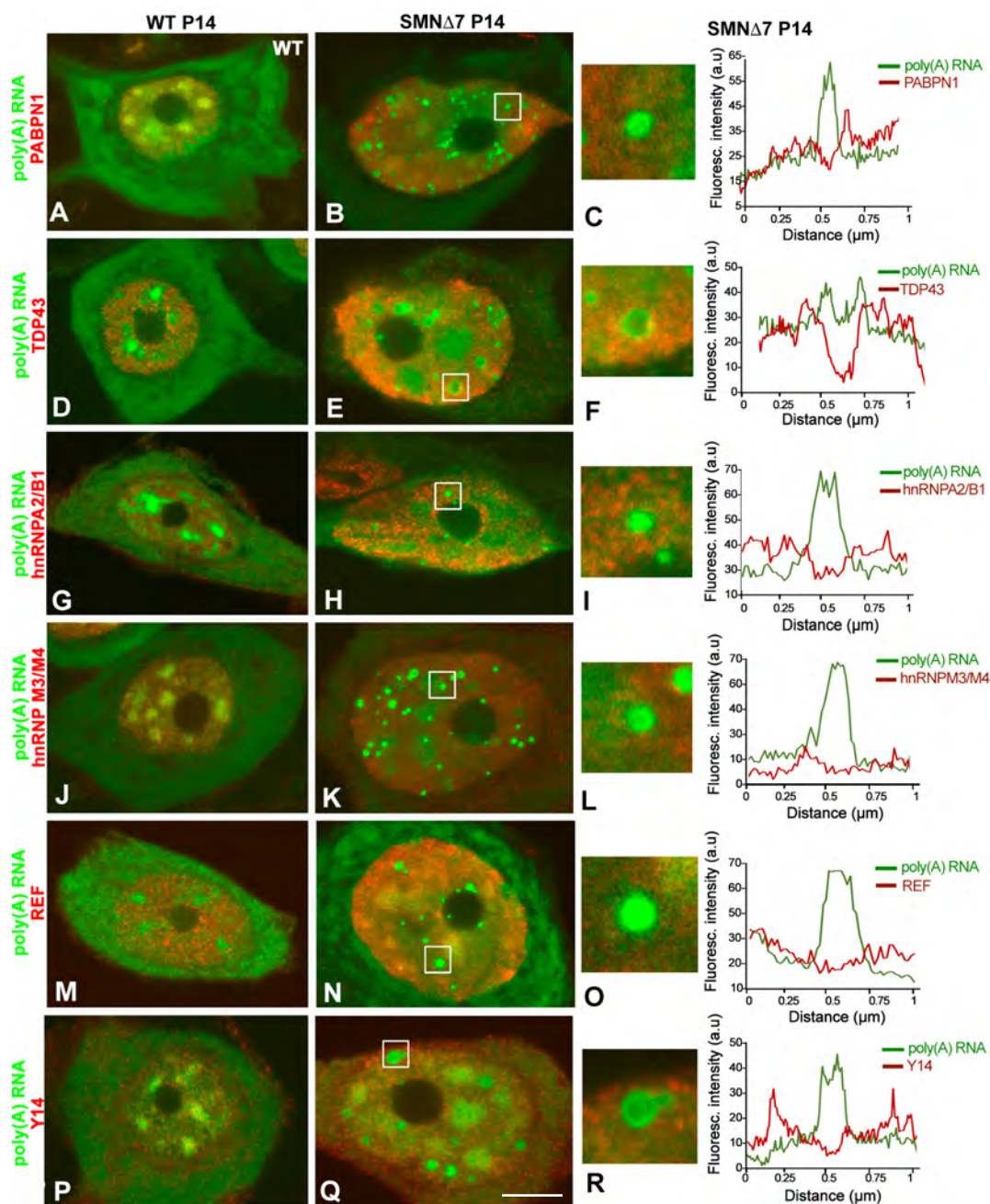


Figura 50. A-R, Doble marcaje en las MN α WT y SMN Δ 7 de los poli(A) RNAs en combinaci3n con las prote3nas implicadas en el procesamiento de los pre-mRNAs. A-C, El marcaje de PABPN1 en la MN α WT muestra un patr3n difuso en el nucleoplasma y concentrada en los "speckles" (A) pero los PARGs carecen de PABPN1 (B-C). D-F, En la MN α -WT TDP43 est1 en el nucleoplasma y excluye los "speckles" (D) y los PARGs (E-F). G-I, La hnRNP A2/B1 tampoco se concentra en "speckles" ni en los PARGs. J-L, La hnRNP M3/M4 se concentra en los "speckles" pero no en los PARGs. M-O, REF no se localiza ni en los "speckles" ni en los PARGs. P-R, Por su parte Y14 s3 se concentra en los "speckles" pero no en los PARGs. Los perfiles de los diferentes marcadores confirman que ninguna de estas prote3nas implicadas en el procesamiento de los pre-mRNAs se concentran en los PARGs. Escala: 4 μ m.

4.2.5 El déficit de SMN induce alteraciones citoplasmáticas en la maquinaria de síntesis proteica en MN α -SMN Δ 7

Una vez conocido que el déficit de SMN altera la organización y función de los CBs, nucleolo y el "splicing" así como la distribución de mRNAs en las MN α -SMN Δ 7, nos pareció fundamental investigar si estos cambios impactaban en la organización estructural y funcional de la maquinaria de síntesis de proteínas, que en las neuronas de proyección como es el caso de las MN α se organiza formando los característicos grumos de Nissl. De hecho, estudios previos han demostrado cromatolisis central acompañada de estrés del retículo endoplásmico en células iPSCs (células madre pluripotentes inducidas) derivadas de pacientes con SMA tipo I (Ito et al., 2011). En base a estos antecedentes, nos pareció importante investigar si las alteraciones nucleares observadas en las MN α de los ratones SMN Δ 7 se acompañaban de una perturbación de la maquinaria de síntesis de proteínas. La tinción citoquímica con IP demostró que los grumos de Nissl, muy prominentes en las MN α -WT (Fig. 51A), exhibían diferentes niveles de disrupción en las MN α -SMN Δ 7 (Fig. 51B-D). Cabe destacar, la existencia de cromatolisis central, de extensión variable, con desplazamiento y marginación de los remanentes de sustancia de Nissl, indicando distintas etapas de degeneración (Fig. 51C, D).

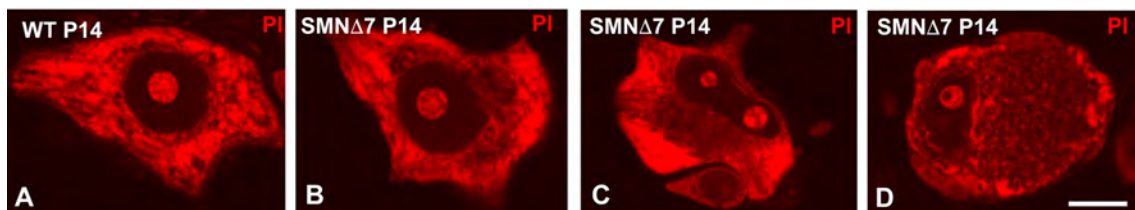


Figura 51. A-B, Ejemplos de una MN α -WT (A) y tres MN α -SMN Δ 7 (B-D) marcadas con IP. Nótese la progresiva marginación de los grumos de Nissl y cromatolisis central con excentricidad nuclear (D). Escala: A-D: 10 μ m.

El análisis ultraestructural confirmó la típica distribución de los polirribosomas libres y asociados al retículo endoplásmico rugoso (RER) y la ordenación de las cisternas en pilas paralelas en las MN α -WT (Fig. 52A). En el caso de las MN α -SMN Δ 7, la maquinaria para la síntesis de proteínas mostraba diferentes niveles de alteración estructural. En algunos casos, las cisternas del RER presentaban extensas áreas libres de polirribosomas (degranulación) (Fig. 52B) y, en otros, dilatación de la luz cisternal (Fig. 52C). Estos datos corroboran que el déficit de SMN perturba el ensamblaje y mantenimiento de la maquinaria de

síntesis de proteínas y, presumiblemente, desregula el equilibrio iónico de las cisternas del RER, dando como resultado su dilatación. Estos hallazgos son consistentes con nuestras previas observaciones en MN α humanas de un paciente con SMA tipo I (Tapia et al., 2012). La disfunción de la maquinaria de la de síntesis de proteínas en las MN α -SMN Δ 7 fue confirmada por la gran abundancia de ribosomas libres en estado monomérico (monorribosomas), es decir, no asociados a mRNAs para formar polirribosomas (Fig. 52C, inset). Esta alteración claramente refleja un bloqueo de la síntesis de proteínas (Lafarga et al., 1997; Baltanas et al., 2011). Por su parte, las áreas de cromatolisis central se caracterizaron por la masiva disociación del RER y pérdida de polirribosomas, un signo evidente de neurodegeneración de las MN α -SMN Δ 7 (Fig. 52D).

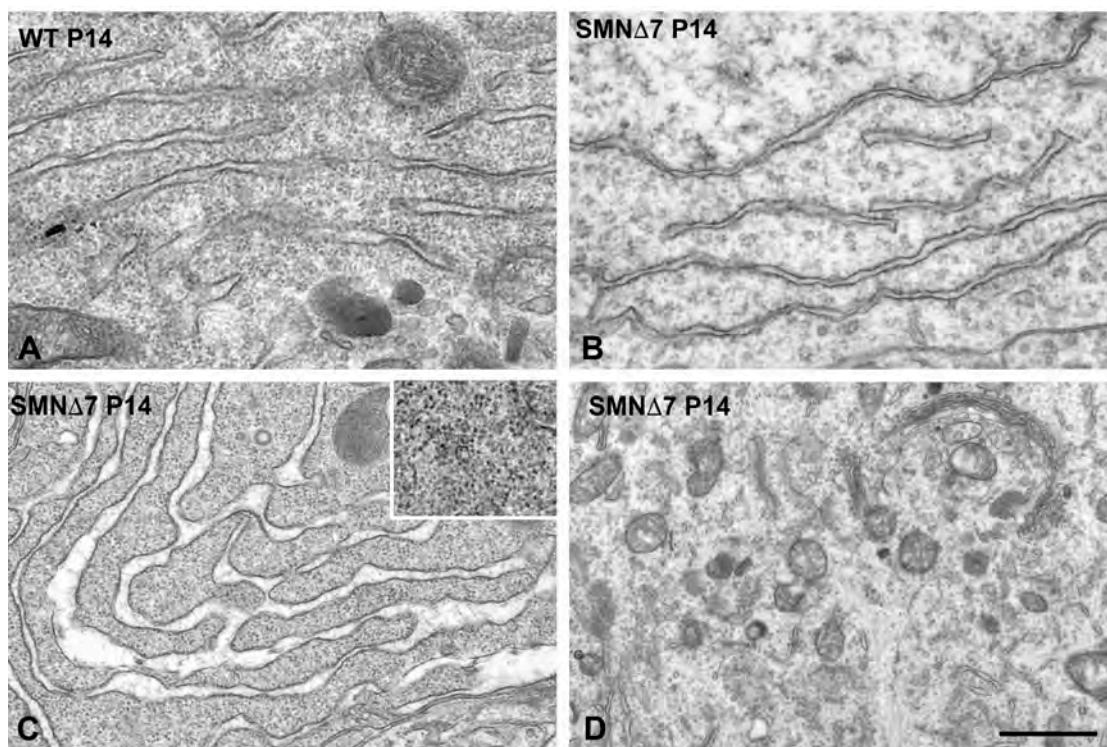


Figura 52. (A) Grupo de Nissl de una MN α -WT con la típica distribución del RER y de los polirribosomas libres. En (C-D) tres detalles de MN α -SMN Δ 7 que ilustran: la pérdida de polirribosomas asociados a las cisternas del RER (B), dilatación de la luz cisternal del RER y monorribosomas (C e inset) y áreas de cromatolisis central (D). Escala: A-D: 2 μ m.

5. Discusión



5.1 DISFUNCIÓN DE LOS CBs Y DEL NUCLEOLO EN LAS MN α DEL RATÓN SMN Δ 7

Nuestros resultados indican que durante el periodo postnatal las MN α del ratón SMN Δ 7 sufren una severa disrupción de los CBs, acoplada con alteraciones nucleolares y de la maquinaria de síntesis de proteínas. Proponemos que la perturbación en las interacciones fisiológicas entre CB y nucleolo representa un componente importante en la disfunción del metabolismo de RNA en las MN α .

Una importante cuestión en la SMA es por qué motoneuronas portadoras de la misma delección o mutación del gene *SMN1* tienen distintos grados de afectación. Nuestros resultados en el modelo murino SMN Δ 7 de SMA confirman la heterogeneidad en la respuesta de las MN α al déficit de SMN. Esta cuestión ha sido parcialmente dilucidada por la reciente observación de que existen marcadas diferencias en los niveles celulares de proteína SMN dentro de una misma población neuronal de un determinado animal, siendo las MN α con reducidos niveles de SMN las que tienen más probabilidades de degenerar y morir (Rodríguez-Muela et al., 2017). Otro factor a considerar es la diferencia de tamaño de las MN α que se relaciona positivamente con la magnitud del campo de inervación periférica, la unidad motora. Sabemos que las neuronas de mayor tamaño tienen una mayor tasa de transcripción para sostener la masa celular y la elevada actividad bioeléctrica y, consecuentemente, demandan mayor actividad de “splicing” de pre-mRNAs, que es dependiente de SMN y de la integridad de los CBs. Además, el número de CBs se correlaciona positivamente con el tamaño neuronal (Pena et al., 2001). Por otra parte, es bien conocido que la severidad de la SMA en humanos y modelos animales se correlaciona con los niveles de SMN (Lefevbre et al., 1997; Burghes & Beattie, 2009; Tisdale & Pellizzoni, 2015). En este contexto, un objetivo esencial de nuestra Tesis es determinar cómo el déficit de SMN impacta en la organización y función de los CBs y afecta al metabolismo nuclear del RNA en las MN α .

5.1.1 Pérdida de CB canónicos en las MN α

Las investigaciones desarrolladas en las dos últimas décadas han permitido demostrar que el CB es una central nuclear que coordina la síntesis y procesamiento de diversas categorías de snRNAs y snRNPs (Machyna et al., 2014;

Sawyer et al., 2016; Trinkl-Mulcahy & Sleeman, 2017). La función mejor conocida del CB es el ensamblaje molecular, SMN dependiente, de snRNPs y snoRNPs necesarias para el procesamiento de pre-mRNAs y pre-rRNAs, respectivamente (Machyna et al., 2013, 2014; Tisdale & Pellizzoni, 2015; Massenet et al., 2017). Los presentes resultados indican que la reducción de SMN induce la pérdida de CBs en la mayoría de las MN α -SMN Δ 7, incluso en aquellas que tenían bien preservada la maquinaria de síntesis de proteínas. Este hallazgo apoya nuestro criterio de que la pérdida de CBs es un signo muy temprano de la disfunción neuronal en la SMA y también es consistente con la idea de que la homeostasis de los CBs es dependiente de SMN (Shpargel & Matera, 2005).

En un estudio previo de nuestro laboratorio, se ha demostrado una reducción de CBs asociada con cromatolisis en MN α de un paciente con SMA tipo I (Tapia et al., 2012). En el presente estudio, en el ratón SMN Δ 7, la pérdida de CBs es consistente con una perturbación del "splicing" demostrada previamente (Zhang et al., 2008; Bäumer et al., 2009; Doktor et al., 2017). En particular, consideramos que la reducción de CBs puede afectar a la biogénesis de snRNPs espliceosomales necesarios para el ensamblaje del espliceosoma (Matera & Wang, 2014), dando como resultado una patología del "splicing". De hecho, en células cultivadas derivadas de pacientes con SMA se ha demostrado una disminución en el ensamblaje de U4/U6-U5 tri-snRNPs, una etapa esencial en la maduración de las snRNPs. Además, este ensamblaje es aproximadamente 10 veces más rápido y eficiente en el CB que en el nucleoplasma, resaltando la importancia que tiene la integridad del CB para la correcta biogénesis de snRNPs (Novotny et al. 2011; Machyna et al., 2013).

Es necesario comentar la ausencia de Gems, cuerpos nucleares enriquecidos en SMN y carentes de coilina (Liu & Dreyfuss, 1996; Navascues et al., 2004), en las MN α de los ratones WT y SMN Δ 7. Sin embargo, la presencia de Gems ha sido previamente señalada en MN α fetales (Lefebvre et al., 1997; Young et al., 2001). En cultivos de líneas celulares neurona-like se ha demostrado un incremento progresivo en el reclutamiento de SMN en los CBs asociado con una pérdida de Gems durante la diferenciación neuronal (Navascués et al., 2004; Clelland et al., 2009), sugiriendo que el ensamblaje de Gems es un proceso transitorio, restringido a una etapa indiferenciada e inmadura de las MN α fetales. En este contexto,

proponemos que la pérdida de CBs, más bien que de Gems, es un rasgo nuclear característico de la disfunción de las MN α en el ratón SMN Δ 7 (Lafarga et al., 2017).

5.1.2 Disrupción de la interacción CB-nucleolo

Nuestro estudio plantea la hipótesis de que la pérdida de CBs perturba la íntima relación estructural y funcional entre CB y el nucleolo, que es característica de las neuronas de los mamíferos (Lafarga et al., 2017; Trinkle-Mulcahy et al., 2017). La función mejor conocida de la asociación entre estas dos organelas es el suministro de snoRNPs maduras al nucleolo, las cuales son esenciales para el procesamiento de pre-rRNAs. El criterio actual es que CB y nucleolo son estructuras funcionalmente acopladas, cuya cooperación es requerida para la maduración de diferentes categorías de snoRNAs y snoRNPs (Massenet et al., 2017). En particular, las pre-snoRNPs son reclutadas en los CBs, un proceso mediado por su interacción con la coilina, donde parecen culminar su maduración, con la participación de los scaRNAs y de la SMN, antes de ser transferidas al nucleolo (Massenet et al., 2017). Es destacable la contribución de SMN a la maduración de las snoRNPs en el CB. Estudios del laboratorio de Dreyfuss, y de otros laboratorios, han demostrado que SMN se une directamente a la fibrilarina y GAR1, y promueve su incorporación a las snoRNPs en el CB antes de ser transportadas al nucleolo (Pellizzoni et al., 2001; Jones et al., 2001; Massenet et al., 2017). El acoplamiento funcional entre CB y nucleolo es particularmente relevante en MN α que tienen elevados requerimientos de biogénesis nucleolar de ribosomas para acomodar su elevada tasa de síntesis de proteínas (Riancho et al., 2014; Lafarga et al., 2017). En este contexto, consideramos que la pérdida de CBs inducida por el déficit de SMN en las MN α -SMN Δ 7 podría afectar a la maduración y transferencia al nucleolo de snoRNPs y, consecuentemente, interferir con el procesamiento de pre-rRNAs. Varias evidencias experimentales refuerzan esta hipótesis. Primero, los snoRNAs son los RNA pequeños más abundantes en el CB y, conjuntamente con las snoRNPs, pueden transitar por el CB antes de ser destinados al nucleolo (Kiss et al., 2002; Machyna et al., 2014; Massenet et al., 2017). Segundo, el snoRNA U3, que es fundamental para el procesamiento de pre-rRNAs, cuando se microinyecta en oocitos de *Xenopus* se incorpora inicialmente en el CB antes de transferirse y concentrarse establemente en el nucleolo (Narayanan et al., 1999). Tercero, la localización en los

CBs de Nopp140, una proteína de las snoRNPs implicada en el transporte de snoRNPs entre el CB y el nucleolo (Isaac et al., 1998; Massenet et al., 2017), está muy reducida en células deficientes de SMN derivadas de pacientes con SMA (Renvoise et al., 2009). Por otra parte, en determinadas condiciones, algunas snRNPs, tales como la U2 snRNP, se localizan en el nucleolo antes de dirigirse a los "speckles" nucleares (Sleeman & Lamond, 1999), sugiriendo que el CB y el nucleolo comparten alguna función en la maduración de las snRNPs. La proteína estructural coilina parece conectar la biogénesis de snRNPs y snoRNPs, haciendo que el CB sea el centro del metabolismo nuclear de los RNAs pequeños (Machyna et al., 2014).

Finalmente, la observación de que algunos miRNA implicados en el silenciamiento génico tienen gran homología con los snoRNAs derivados del CB y se localizan en el nucleolo (Ender et al., 2008; Ono et al., 2011) abre un nuevo horizonte en el análisis de la interacción entre CB y nucleolo.

5.1.3 Relocalización de la coilina en casquetes perinucleolares y en el nucleolo

Resulta de gran interés en nuestros resultados que el déficit de SMN en las MN α -SMN Δ 7, además de provocar la disrupción de los CBs, induce la relocalización de la coilina en la superficie del nucleolo, como casquetes perinucleolares, e incluso dentro del nucleolo. La formación de casquetes perinucleolares de coilina ha sido reportada en células HeLa y neuronas del núcleo supraóptico en condiciones de inhibición de la transcripción (Carmo-Fonseca et al., 1991; Lafarga et al., 1998; Shav-Tal et al., 2005). También se ha descrito en células HeLa en respuesta al daño en el DNA inducido por radiación UV o gamma (Cioce et al., 2006). La relación entre disminución de SMN y formación de casquetes perinucleolares en las MN α está también apoyada por la observación de una dramática reducción de CBs y relocalización peri- e intranucleolar de la coilina en células HeLa knockdown para SMN con siRNA (Shpargel & Matera, 2005).

En los lisados de médula espinal no hemos encontrado variaciones significativas en los niveles de coilina entre las muestras WT y SMN Δ 7, sugiriendo que la coilina disociada de los CBs en las MN α -SMN Δ 7 se relocaliza en los casquetes perinucleolares y en el nucleolo sin necesidad de cambios en su expresión. Estudios

de biología molecular han demostrado que la coilina tiene una secuencia de localización nucleolar (Hebert & Matera, 2000). Además, el destino nucleolar de la coilina en las MN α del ratón SMN Δ 7 puede estar potenciado por su estado hipometilado, como lo demuestra la ausencia de marcaje de la coilina peri- e intranucleolar con el anticuerpo Y12 que reconoce la coilina metilada. En este contexto, es bien conocido que la coilina es simétricamente dimetilada en los residuos de arginina por la metil-arginina transferasa 5 (PRMT5), una modificación que incrementa la afinidad de la coilina tanto por la SMN como por ciertas proteínas del complejo Sm de las snRNPs (Boisvert et al., 2002; Hebert et al., 2002). Nuestros resultados sugieren que el déficit de SMN en las MN α -SMN Δ 7 modifica el interactoma de la coilina y sus PTMs, afectando al ensamblaje de los CBs. De hecho, resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado pérdida de CBs y presencia de coilina intranucleolar en MN α de un paciente con SMA tipo I (Tapia et al., 2012). Más aún, el tratamiento con MTA o Adox, dos inhibidores de la metilación de proteínas, desensambla los CBs y relocaliza la coilina en el nucleolo en células HeLa y neuronas ganglionares del trigémino (Navascues et al., 2008; Tapia et al., 2010).

5.1.4 El déficit de SMN induce alteraciones del “splicing” mayor y menor en la médula espinal del ratón SMN Δ 7

Consideramos que la pérdida de CBs en las MN α -SMN Δ 7 observada en nuestros resultados debe afectar a la biogénesis de snRNPs y, consecuentemente, al “splicing” de pre-mRNAs. Defectos del “splicing” son relativamente frecuentes y acontecen en aproximadamente el 50% de las enfermedades hereditarias humanas, siendo especialmente destacables en cuadros neurodegenerativos (Dredge et al., 2001; Caceres & Kornblihtt, 2002; Ibrahim et al., 2012). En el caso de la SMA, estudios previos en modelos murinos han demostrado que el déficit de SMN produce una severa reducción en la biogénesis de snRNPs espliceosomales y alteraciones del “splicing”, particularmente de los intrones dependientes de U12 snRNA (Zhang et al., 2008; Bäumer et al., 2009; Lotti et al., 2012; Doktor et al., 2017; Jangi et al., 2017). Nuestros resultados en la médula espinal del ratón SMN Δ 7 confirman y extienden estos defectos a otros mRNAs que son especialmente relevantes para la homeostasis de las MN α , incluyendo *Chat*, *Chodl*,

Myh9 y *Myh14*. Estos mRNAs codifican proteínas muy importantes para la homeostasis de las MN α , como la colina acetiltransferasa (*Chat*), implicada en la síntesis del neurotransmisor acetilcolina, condrolectina (*Chodl*), que participa en el crecimiento axonal y en la formación y mantenimiento de la sinapsis mioneural, y las miosinas (*Myh9* y *Myh14*) no musculares, requeridas para el mantenimiento de la morfología neuronal. Los defectos en el “splicing” detectados en nuestro estudio consisten en la acumulación de mRNAs incorrectamente procesados que contienen intrones y son especialmente llamativos en la fase sintomática de la enfermedad (P14), coincidiendo con la máxima incidencia de MN α portadoras de PARGs. Curiosamente, la acumulación de mRNAs con secuencias intrónicas afecta a intrones procesados por el espliceosoma mayor (*Chat* y *Chodl*, dependiente de U2 snRNAs) y por el espliceosoma menor (*Myh9* y *Myh14*, dependiente de U12 snRNAs), lo que sugiere una disfunción global del “splicing” en las MN α -SMN Δ 7. En el caso del mRNA de *Chodl*, se ha demostrado previamente una caída en su expresión en un modelo murino de SMA que ha sido relacionada con defectos en el crecimiento axonal de las MN α (Bäumer et al. 2009; Sleight et al., 2014). No obstante, nuestro estudio se ha realizado en extractos de RNA de la médula espinal donde, conjuntamente con las MN α , coexisten otras poblaciones neuronales y células gliales. Aunque la expresión de los genes estudiados es muy abundante en las MN α , el déficit de SMN, a menor escala, puede afectar a otros tipo celulares por lo que no podemos determinar con precisión los cambios en las formas de “splicing” de mRNAs que específicamente acontecen en las MN α . Para ello será necesario realizar futuros experimentos en cultivos de MN α derivadas de pacientes o modelos murinos de SMA.

5.1.5 Alteraciones nucleolares

Como hemos comentado en la sección de introducción, la SMA es una enfermedad monogénica producida por la delección o mutación del gen *SMN1* que conduce a un déficit de SMN. A nivel nuclear, la consecuencia más importante es la severa reducción de los niveles de snRNPs y la disrupción de los CBs. En este contexto, las alteraciones nucleares observadas en las MN α -SMN Δ 7, particularmente la disminución y reorganización de las unidades de transcripción CF/CFD, la segregación de componentes nucleolares y la retención nucleolar de proteínas

conjugadas con SUMO1, podrían ser, al menos parcialmente, secundarias a la pérdida de CBs y, consecuentemente, a la perturbación de la interacción funcional CB-nucleolo. En este contexto, debemos destacar que este acoplamiento es necesario para la transferencia al nucleolo de las snoRNPs necesarias para el procesamiento de los pre-rRNAs. Además, el déficit de SMN en las MN α -SMN Δ 7 puede interferir con la maduración de las snoRNPs, dado que la proteína SMN dirige el reclutamiento en las snoRNPs de dos proteínas esenciales para su función, fibrilarina y GAR1 (Pellizzoni et al., 2001; Jones et al., 2001; Messenet et al., 2017).

Respecto a la retención intranucleolar de proteínas, nuestros resultados demuestran por vez primera en neuronas la existencia de INoBs inmunorreactivos para SUMO-1, cuya formación es un rasgo muy prominente de las alteraciones nucleolares observadas en las MN α -SMN Δ 7. La presencia de INoBs ha sido señalada en células no-neuronales cultivadas en respuesta a condiciones que producen estrés celular, tales como el daño en el DNA y el tratamiento con inhibidores del proteasoma (Abella et al., 2010; Hutten et al., 2011; Souquera et al., 2015; Brun et al., 2017). Nuestro estudio demuestra que los INoBs carecen de i) proteínas esenciales del nucleolo, incluyendo UBF, fibrilarina, nucleolina y nucleofosmina/B23, ii) componentes fundamentales del CB, tales como coilina y snRNPs, y iii) actividad transcripcional. Sin embargo, los INoBs concentran SUMO1, lo que sugiere que acumulan proteínas conjugadas con SUMO. En este sentido, ha sido establecido que determinadas proteínas nucleares transitan por el nucleolo en su ruta entre el núcleo y citoplasma. Resulta destacable que este tráfico molecular se interrumpe por la acción de agentes que producen estrés celular, conduciendo a la retención nucleolar de proteínas (Abella et al. 2010; Brun et al., 2017). Además, recientemente se ha reportado que algunas proteínas tienen una secuencia de detención nucleolar que es capaz de inmovilizarlas en el nucleolo. Sobre estas bases, consideramos que la formación de INoBs refleja un mecanismo de retención de determinadas proteínas en el nucleolo, probablemente inactivadas mediante su conjugación con SUMO1 (Droescher et al., 2013), que acompaña a la disfunción nucleolar y neurodegeneración de las MN α -SMN Δ 7.

En relación con la reorganización de la maquinaria de transcripción nucleolar, la presencia de numerosas unidades CF/CFD, identificadas a nivel ultraestructural y

con inmunofluorescencia para UBF, es característica de neuronas con elevada actividad de transcripción y de síntesis de proteínas (Lafarga et al., 1999; Berciano et al., 2007; Palanca et al., 2014). Por el contrario, la reducción de su número y el incremento del tamaño de estas unidades de transcripción observada en las MN α -SMN Δ 7 ha sido relacionada con una tasa reducida de transcripción y síntesis de proteínas en otros tipos celulares (Jordan & McGovern, 1981; Raska et al., 2006). La segregación moderada o severa del CFD y CG del nucleolo son también criterios morfológicos de disfunción de la transcripción nucleolar en las MN α -SMN Δ 7. De hecho, la segregación severa de componentes nucleolares es una manifestación característica de la inhibición de la actividad de la RNA pol I en neuronas tratadas con actinomicina D, un inhibidor de la transcripción nucleolar (Casafont et al., 2006; Carmen-Lafita et al., 2016). Consideramos que las alteraciones nucleolares en las MN α reflejan una condición, conocida como "estrés nucleolar", normalmente asociada a la inhibición moderada o severa de la actividad de la RNA pol I (Olson, 2004; Boulon et al. 2010). La inducción de estrés nucleolar en neuronas está emergiendo con fuerza como un sensible indicador de múltiples procesos neurodegenerativos (Baltanas et al., 2011; Hetman & Pietrzak, 2012; Parlato & Kreiner, 2013; García-Esparcia et al., 2015; Hernandez-Ortega et al., 2016).

El análisis por RT-qPCR de la expresión del precursor 45S pre-rRNA sugiere que, al menos parcialmente, la transcripción nucleolar está preservada en las MN α -SMN Δ 7. No obstante, esta interpretación debe valorarse con precaución dado que el análisis cuantitativo refleja la expresión global de todas las poblaciones celulares de la médula espinal y no puede circunscribirse exclusivamente a las MN α . Resulta de especial interés que la ausencia de cambios significativos en los niveles de 45S pre-rRNA y de 18S pre-rRNA en las muestras de la médula espinal del ratón SMN Δ 7, respecto a las muestras WT, se acompañe de un incremento significativo de las formas maduras de 18S, 5,8S y 28S rRNAs. Interpretamos que el incremento de estas formas maduras de rRNA puede resultar de su acumulación y retención en las grandes masas de CG observadas en el nucleolo de las MN α -SMN Δ 7. Esta acumulación de la forma madura de 18S rRNA podría contribuir a la hipertrofia nucleolar y probablemente refleja un defecto en la exportación nucleolar de las partículas pre-ribosomales (Boisvert et al., 2007). Contemplamos un escenario en el que el déficit en la biogénesis de ribosomas y la disfunción en la síntesis de

proteínas (cromatolisis) puede inducir una respuesta reactiva, compensatoria, del nucleolo para mantener la biogénesis de ribosomas requerida para la supervivencia de las MN α -SMN Δ 7. Esta interpretación es consistente con nuestra observación de que la expresión de 45S pre-rRNA, un indicador de la actividad de transcripción de los genes ribosomales (Raska et al., 2006; Boisvert et al., 2007), está preservada y la expresión de genes que codifican las proteínas nucleolares UBF, nucleolina, fibrilarina y nucleofosmina/B23 está aumentada. En cuadros de la neuropatología humana, es destacable que la expresión de 18S rRNA, nucleolina y nucleofosmina/B23 está incrementada en el cortex frontal en la enfermedad de Parkinson (García-Esparcia et al., 2015). De manera similar, un aumento en la expresión de otra forma madura de rRNA, el 28S rRNA, ha sido demostrada en la región C1 del hipocampo en estadios avanzados de la enfermedad de Alzheimer (Hernández-Ortega et al., 2016). En su conjunto, estas observaciones sugieren que, dependiendo del centro nervioso y del estadio de la enfermedad, las neuronas pueden regular al alza la expresión de genes implicados en la función del nucleolo como una respuesta reactiva, compensatoria, que intenta mantener la supervivencia neuronal en procesos neurodegenerativos.

En conclusión, la organización del CB y del nucleolo parecen emerger como indicadores importantes del estado neuronal tanto en condiciones normales como durante la neurodegeneración. Por consiguiente, la regulación de la actividad de estas dos organelas, esenciales para el metabolismo nuclear de los RNA, representa una diana potencial en las futuras estrategias terapéuticas neuroprotectoras orientadas a compensar la disfunción neuronal en cuadros neurodegenerativos.

5.2 DISFUNCIÓN DEL PROCESAMIENTO DE mRNAs POLIADENILADOS EN LAS MN α DEL RATÓN SMN Δ 7

En el presente trabajo de Tesis Doctoral demostramos que el déficit de SMN en las MN α -SMN Δ 7 induce cambios en la distribución nuclear y citoplasmática de los mRNAs poliadenilados, dando como resultado su acumulación nuclear en PARGs inmunorreactivos para Sam68, en paralelo con una reducción de su concentración citoplasmática. Consideramos que la formación de PARGs está relacionada con la perturbación del "splicing" observada en el presente estudio y caracterizada por el

incremento relativo de determinados mRNAs (*Chat*, *Chodl*, *Myh9* y *Myh14*) incorrectamente procesados y conteniendo secuencias intrónicas que, presumiblemente, no pueden ser exportados al citoplasma para su traducción.

Pensamos que la formación *de novo* de PARGs es una manifestación muy temprana (en P5) de la disfunción del metabolismo de los mRNAs, particularmente del “splicing” y de la exportación nuclear al citoplasma, que debe contribuir a la patogénesis de la SMA. Además, la formación de PARGs normalmente se asocia con la reducción severa de los niveles de mRNA poliadenilados en el citoplasma indicando un defecto en la traducción, de acuerdo con nuestros resultados y de otros autores (Tapia et al., 2017; Bernabó et al., 2017).

5.2.1 Caracterización estructural y molecular de los PARGs

Una cuestión importante de la SMA es por qué MN α portadoras de la misma delección o mutación del gen *SMN1* se afectan de forma diferente. Nuestro estudio en el modelo murino *SMN Δ 7* confirma esta heterogeneidad y demuestra que tanto en el periodo presintomático (P5) como en el sintomático (P14) coexisten MN α portadoras de PARGs con neuronas que presentan un patrón normal de distribución de los mRNA poliadenilados. Recientemente, estas diferencias en la vulnerabilidad de las MN α han sido correlacionadas con variaciones individuales en la concentración de SMN en un determinado animal (Rodríguez-Muela et al., 2017).

En relación con los PARGs, fueron inicialmente descritos en nuestro laboratorio en neuronas ganglionares del trigémino tratadas con Bortezomib, un inhibidor del proteasoma (Casafont et al., 2010; Palanca et al., 2014). No obstante, el presente estudio aporta la primera demostración de estas estructuras en MN α de la SMA. Los PARGs representan una nueva entidad nuclear claramente distinguible por su estructura y composición molecular de otras estructuras nucleares, tales como “speckles” nucleares, CBs, Gems y clastosomas (Liu & Dreyfuss, 1996; Lafarga et al., 2002; Lamond & Spector, 2003; Cioce & Lamond, 2005; Machyna et al., 2013). Los PARGs comparten con los “speckles” nucleares la presencia de poli(A) RNAs; sin embargo, carecen de snRNPs esliceosomales y su estructura de cuerpos nucleares redondeados y muy bien definidos difiere claramente de los agregados irregulares de granulaciones intercromatínicas que configuran los “speckles” nucleares (Lamond & Spector, 2003; Lafarga et al., 2017). Respecto a

los CBs y Gems, es destacable que la coilina (CBs) y el factor SMN (Gems) están ausentes en los PARGs. Finalmente, los PARGs también carecen del proteasoma 20S, un marcador molecular de los clastosomas, factorías proteolíticas del núcleo enriquecidas en proteasomas catalíticos, ubiquitina y proteínas sustrato del proteasoma (Lafarga et al., 2002; Carmo-Fonseca et al., 2010).

Respecto a la dinámica de formación de los PARGs, éstos son ya detectables en el periodo presintomático (P5), pero su número se incrementa notablemente durante la fase sintomática (P14) de la SMA murina, reflejando la bien conocida asincronía en el inicio de la degeneración de las MN α -SMN Δ 7 (Tarabal et al., 2014). Proponemos que la formación de PARGs en las MN α -SMN Δ 7 refleja una respuesta de estrés celular que comporta una severa disfunción del metabolismo de los mRNAs, especialmente del "splicing". De acuerdo con esta hipótesis, el "splicing" de pre-mRNA está emergiendo como una importante diana patogénica de muchos agentes estresantes que producen inhibición o desregulación del "splicing" (Biamonti & Caceres, 2009). En el caso de la SMA, varios estudios han demostrado que la hiperactividad de la respuesta de estrés del retículo endoplásmico y la existencia de defectos en el "splicing" son componentes característicos de la degeneración de las MN α en la SMA (Zhang et al., 2008; Lotti et al., 2012; Ng et al., 2015; Doktor et al., 2017; Jangi et al., 2017; presentes resultados). Además, estudios de nuestro laboratorio han reportado la formación de PARGs en respuesta al estrés proteotóxico inducido por la inhibición del proteasoma en neuronas ganglionares del trigémino. Es interesante notar que esta condición experimental también produce disfunción del metabolismo del RNA y disrupción de la maquinaria de síntesis de proteínas (Casafont et al., 2010; Palanca et al., 2014).

5.2.2 Los PARGs concentran el factor regulador del "splicing" Sam68

Un importante hallazgo de nuestro estudio es la acumulación de Sam68 en los PARGs detectada con inmunocitoquímica óptica y ultraestructural en las MN α -SMN Δ 7. Sam68 es un miembro de la familia STAR (*signal transducer and activator of RNA*) que se une a RNA y DNA y está implicado en la transducción de señales, transcripción y regulación del "splicing" de determinados pre-mRNAs (Hartmann et al., 1999; Matter et al., 2002; Rajan et al., 2008; Richard 2010). Como regulador del "splicing", Sam68 promueve la inclusión o exclusión de exones en determinados

pre-mRNA neuronales, incluyendo *SMN2*, *Bcl-x* y *Nrxn 1* (Paronetto et al., 2007; Richard, 2010; Iijima et al., 2011). En el caso de los genes *SMN*, Sam68 regula el “splicing” del gen *SMN2* pero no del *SMN1*. En particular, Sam68 se une directamente al pre-mRNA *SMN2* y actúa como un represor de la inclusión del exón 7 en los transcritos de *SMN2* (Pedrotti et al., 2010, Pagliarini et al., 2015).

En nuestros resultados no encontramos variaciones significativas en los niveles de mRNA y proteína de Sam68 en la médula espinal de los ratones *SMNΔ7* en comparación con los WT. Aunque la acumulación de Sam68 en los PARGs podría reducir sus niveles en el nucleoplasma, facilitando potencialmente la inclusión del exón 7 en los transcritos del gen *SMN2* (Pedrotti et al., 2010, Pagliarini et al., 2015), la redistribución parcial de Sam68 en los PARGs no parece corregir el defecto del “splicing” de *SMN2* en el ratón *SMNΔ7*. De hecho, hemos confirmado que los niveles de *SMN* en la médula espinal del ratón *SMNΔ7* están muy reducidos en la fase sintomática (P14) de la SMA murina (Tapia et al., 2017, presentes resultados). Sin embargo, resulta de gran interés que la presencia de PARGs enriquecidos en Sam68 en las MNα-*SMNΔ7* se acompaña de una disfunción del “splicing” alternativo de dos genes regulados por Sam68: *Bcl-x* y *Nrxn-1*. Es bien conocido que Sam68 se une al mRNA *Bcl-x* y, dependiendo de su nivel intracelular, regula el balance del “splicing” alternativo de este gen para producir transcritos de la forma pro-apoptótica *Bcl-x(s)* o de la forma anti-apoptótica *Bcl-x(L)* (Boise et al., 1993). En particular, mientras el incremento de la expresión de Sam68 favorece el “splicing” de la forma *Bcl-x(s)*, la reducción de sus niveles promueve la generación de transcritos *Bcl-x(L)* (Paronetto et al., 2007). En este contexto, nuestra observación por RT-qPCR de una reducción de la ratio *Bcl-x(s)/Bcl-x(L)* mRNAs en los extractos de RNA de la médula espinal de los ratones *SMNΔ7*, en comparación con las muestras WT, está de acuerdo con una modulación a la baja de la actividad de Sam68 como regulador del “splicing” del gen *Bcl-x*.

En relación con los cambios en el “splicing” del *Nrxn-1* mRNA, en los extractos de RNA de la médula espinal de los ratones *SMNΔ7* hemos demostrado una disminución de la ratio *Nrxn1 4(-)/Nrxn-1 4(+)*, con un incremento relativo de la isoforma que incluye el exón 20 en el segmento 4 (ASA4) en el *Nrxn1* mRNA. Es destacable que las proteínas codificadas por estas dos isoformas de *Nrxn1* mRNAs, neurexina 4(+) y neurexina 4(-), muestran diferentes interactomas con proteínas

que son mediadores clave en la formación y mantenimiento de las sinapsis, incluyendo las neuroliginas (para revisión, ver Iijima et al., 2011). Por ejemplo, estudios previos han mostrado que la neurexina 4(+) se une muy débilmente al receptor post-sináptico para la neuroligina-1B, lo que afecta a la adhesión y estabilidad de la sinapsis (Dean et al., 2003; Chih et al., 2006). Considerados en su conjunto, nuestros resultados sobre las variaciones en el splicing alternativo de *Bclx* y *Nrxn1* mRNAs, ambos dependientes de Sam68, sugieren que el reclutamiento de Sam68 en los PARGs afecta a su función normal en la regulación del “splicing”.

Existen evidencias experimentales de que la acumulación nuclear de pre-mRNAs inmaduros o aberrantes puede ser inducida por un amplio rango de errores en el procesamiento de mRNAs que impiden el reclutamiento de factores reguladores de la exportación nuclear de estos mRNAs (Schmid & Jensen, 2010). Sobre esta base, planteamos la posibilidad de que los PARGs puedan contener mRNAs poliadenilados e incorrectamente procesados unidos a Sam68 que no pueden ser exportados. Así, los PARGs carecen de otras proteínas de unión a RNA implicadas en el empaquetamiento de los mRNA nacientes (hnRNPA2/B1), regulación del “splicing” (hnRNPM3/M4 y TDP43) y poliadenilación (PABPN1), que normalmente se asocian secuencialmente a los mRNAs en las distintas etapas de su procesamiento. Nuestra idea de un defecto en la exportación nuclear de los mRNAs acumulados en los PARGs está reforzada por la ausencia en estos gránulos de dos proteínas de unión al RNA, REF e Y14, que permiten acoplar el “splicing” de pre-mRNAs con la exportación nuclear de mRNAs maduros (Zhou et al., 2000; Dreyfuss et al., 2002). Finalmente, los PARGs no contienen la proteína PABPN1 que, además de operar en la poliadenilación de los pre-mRNAs (Kühn & Whale, 2000), también participa activamente en la exportación nuclear de mRNAs maduros (Apponi et al., 2010). Por tanto, el deficiente reclutamiento de estos factores de exportación nuclear en los mRNAs poliadenilados de las $MN\alpha$ -SMN Δ 7 podría contribuir a su retención nuclear en PARGs y, consecuentemente, a una severa disfunción del metabolismo del mRNA.

5.2.3 Alteraciones de la maquinaria de síntesis de proteína

Nuestros resultados demuestran que la pérdida de CBs, las alteraciones nucleolares y la disfunción del “splicing” de pre-mRNAs se asocian a una disminución

significativa de la concentración de mRNAs poliadenilados en el citoplasma y de distintos niveles de cromatolisis, el proceso de disolución de la sustancia de Nissl (para revisión ver, Moon, 2018). En su conjunto, estas alteraciones indican que la disfunción del metabolismo nuclear de RNAs, como era de esperar, repercute en la traducción con una importante perturbación de la maquinaria de síntesis de proteínas. En particular, hemos observado distintos grados de cromatolisis central que, en sus formas más severas, se acompaña de excentricidad nuclear, un signo avanzado de degeneración de las MN α -SMN Δ 7 (Tapia et al., 2012).

En nuestro estudio, la cromatolisis frecuentemente se acompaña de i) dilatación de las cisternas del RER, que refleja una perturbación de las bombas iónicas con retención intraluminal de fluidos, ii) degranulación de las cisternas del RER, con pérdida de polirribosomas asociados a la membrana, y iii) disgregación de polirribosomas en monorribosomas. En particular, es destacable la abundancia de monorribosomas no asociados al mRNA para formar los polirribosomas y, consecuentemente, carentes de actividad funcional en la síntesis de proteínas (Baltanás et al., 2011; Moon, 2018). Todos estos signos reflejan una severa disfunción de la maquinaria de síntesis de proteínas que frecuentemente acompaña a la neurodegeneración, tanto en cuadros de la neuropatología humana como en varios modelos experimentales, tales como la axotomía o el tratamiento con inhibidores del proteasoma (Baltanás et al., 2011; Tapia et al., 2014; Palanca et al., 2014; Moon, 2018). Entre los mecanismos que operan en la cromatolisis existen evidencias experimentales de la activación de varias familias de ribonucleasas que degradan el rRNA (para revisión, Moon, 2018).

La existencia de una severa disfunción de la maquinaria de síntesis de proteínas está también reforzada por la reducción de la señal citoplasmática de poli(A) RNAs detectada con hibridación *in situ* en las MN α -SMN Δ 7. Este hallazgo claramente indica una disminución de la concentración citoplasmática de mRNAs poliadenilados y, consecuentemente, una reducida disponibilidad para su traducción en proteínas neuronales. Esta caída de los niveles citoplasmáticos de mRNAs es consistente con la existencia de cromatolisis y con la acumulación de monorribosomas carentes del molde de mRNA. Además, un estudio reciente del transcriptoma y translatoma en un modelo murino de SMA, utilizando técnicas modernas de secuenciación, ha demostrado un déficit en la traducción en las MN α -

SMN Δ 7, con un amplio repertorio de mRNAs que presentan una deficiente traducción (Bernabó et al., 2017). Finalmente, hemos observado que las MN α -SMN Δ 7 son incapaces de formar gránulos de estrés citoplasmáticos, que representan una respuesta potencial de neuroprotección permitiendo el almacenamiento transitorio y estabilización de ciertos mRNAs durante la fase de inhibición de la traducción inducida por el estrés celular (Anderson & Kedersha, 2006).

6. Conclusiones



CONCLUSIONES:

De nuestro estudio de Tesis Doctoral en el modelo murino SMN Δ 7 de atrofia muscular espinal se derivan las siguientes conclusiones:

1. El déficit de SMN interfiere con el ensamblaje de CBs canónicos en las MN α .
2. El déficit de SMN afecta al "splicing" del espliceosoma mayor y menor e induce la retención de intrones en cuatro mRNAs (*Chat*, *Chodl*, *Myh9* y *Myh14*) de gran importancia para la homeostasis de las MN α .
3. El déficit de SMN afecta a la organización estructural, molecular y funcional del nucleolo en las MN α .
4. La acumulación de SUMO1 en INoBs puede reflejar la retención nucleolar de proteínas conjugadas con SUMO1 en las MN α .
5. En las MN α , el déficit de SMN altera el procesamiento y la distribución subcelular de los mRNAs poliadenilados, induciendo su retención nuclear en PARGs.
6. El "secuestro" de Sam68 en los PARGs afecta al "splicing" alternativo de dos mRNAs (*Bcl-x* y *Nrxn1*) dependientes de este regulador del "splicing" y de gran importancia en las MN α .
7. La ausencia en los PARGs de determinadas proteínas de unión a mRNA necesarias para su procesamiento y exportación sugiere que estos gránulo acumulan mRNAs poliadenilados incorrectamente procesados que no pueden ser exportados.
8. La retención nuclear de mRNAs poliadenilados reduce sus niveles citoplasmáticos y afecta severamente a la traducción y proteostasis neuronal.
9. La disfunción, SMN-dependiente, del procesamiento nuclear de mRNAs y rRNAs es un componente importante en la fisiopatología de la SMA.

7. Bibliografía

- Abdelmohsen, K. & Gorospe, M. RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biol.* 9, 799–808 (2012).
- Abella, N. et al. Nucleolar disruption ensures nuclear accumulation of p21 upon DNA damage. *Traffic* 11, 743–55 (2010).
- Akhtar, A. & Becker, P. B. The histone H4 acetyltransferase MOF uses a C2HC zinc finger for substrate recognition. *EMBO Rep.* 2, 113–118 (2001).
- Anderson, P. & Kedersha, N. RNA granules: Figure 1. *J. Cell Biol.* 172, 803–808 (2006).
- Andrade, L. E. et al. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J. Exp. Med.* 173, 1407–19 (1991).
- Apponi, L. H. et al. Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1058–1065 (2010).
- Arias Escayola, D. & Neugebauer, K. M. Dynamics and Function of Nuclear Bodies during Embryogenesis. *Biochemistry* 57, 2462–2469 (2018).
- Baltanás, F. C. et al. Nucleolar disruption and cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in Purkinje cells. *Brain Pathol.* 21, 374–388 (2011).
- Bäumer, D. et al. Alternative Splicing Events Are a Late Feature of Pathology in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *PLoS Genet.* 5, e1000773 (2009).
- Bednar, J. et al. Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. *Mol. Cell* 66, 384–397.e8 (2017).
- Bekenstein, U. & Soreq, H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: From structural insights to post-transcriptional regulatory roles. *Mol. Cell. Neurosci.* 56, 436–446 (2013).
- Belzil, V. V., Gendron, T. F. & Petrucelli, L. RNA-mediated toxicity in neurodegenerative disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 56, 406–419 (2013).
- Bengochea, R. et al. Nuclear speckles are involved in nuclear aggregation of PABPN1 and in the pathophysiology of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol. Dis.* 46, 118–129 (2012).

- Berciano, M. T. et al. Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons. *J. Struct. Biol.* 158, 410–20 (2007).
- Bernabò, P. et al. In Vivo Translatome Profiling in Spinal Muscular Atrophy Reveals a Role for SMN Protein in Ribosome Biology. *Cell Rep.* 21, 953–965 (2017).
- Biamonti, G. & Caceres, J. F. Cellular stress and RNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* 34, 146–53 (2009).
- Bohmann, K., Ferreira, J. A. & Lamond, A. I. Mutational analysis of p80 coilin indicates a functional interaction between coiled bodies and the nucleolus. *J. Cell Biol.* 131, 817–31 (1995).
- Boise, L. H. et al. *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597–608 (1993).
- Boisvert, F.-M. et al. Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* 159, 957–69 (2002).
- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J. & Lamond, A. I. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 574–85 (2007).
- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M. & Lamond, A. I. The Nucleolus under Stress. *Mol. Cell* 40, 216–227 (2010).
- Bowerman, M. et al. Therapeutic strategies for spinal muscular atrophy: SMN and beyond. *Dis. Model. Mech.* 10, 943–954 (2017).
- Bowerman, M. et al. Glucose metabolism and pancreatic defects in spinal muscular atrophy. *Ann. Neurol.* 72, 256–268 (2012).
- Boyer, J. G., Ferrier, A. & Kothary, R. More than a bystander: The contributions of intrinsic skeletal muscle defects in motor neuron diseases. *Frontiers in Physiology* (2013). doi:10.3389/fphys.2013.00356
- Brun, S. et al. SUMO regulates p21Cip1 intracellular distribution and with p21Cip1 facilitates multiprotein complex formation in the nucleolus upon DNA damage. *PLoS One* 12, e0178925 (2017).

- Burghes, A. H. M. & Beattie, C. E. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 597–609 (2009).
- Burghes, A. H. M. When Is a Deletion Not a Deletion? When It Is Converted. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 9–15 (1997).
- Burnett, B. G. et al. Regulation of SMN protein stability. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1107–15 (2009).
- C, R. Über Zelltheilung. *Morph Jb* 10:214–330, (1885).
- Cáceres, J. F. & Kornblihtt, A. R. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* 18, 186–93 (2002).
- Cajal, S. Un sencillo método de coloración selectiva del retículo protoplasmático y sus efectos en diversos órganos nerviosos. *Trab Lab Invest Biol* 2, 129–221 (1903).
- Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Carvalho, M. T. & Lamond, A. I. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *J. Cell Biol.* 117, 1–14 (1992).
- Carmo-Fonseca, M., Berciano, M. T. & Lafarga, M. Orphan nuclear bodies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000703 (2010).
- Carvalho, T. et al. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J. Cell Biol.* 147, 715–28 (1999).
- Casafont, I., Navascués, J., Pena, E., Lafarga, M. & Berciano, M. T. Nuclear organization and dynamics of transcription sites in rat sensory ganglia neurons detected by incorporation of 5'-fluorouridine into nascent RNA. *Neuroscience* 140, 453–62 (2006).
- Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O., Berciano, M. T. & Lafarga, M. TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons. *J. Struct. Biol.* 167, 235–241 (2009).
- Casafont, I., Berciano, M. T. & Lafarga, M. Bortezomib induces the formation of nuclear poly(A) RNA granules enriched in Sam68 and PABPN1 in sensory ganglia neurons. *Neurotox. Res.* 17, 167–78 (2010).

- Catez, F., Dalla, N., Marcel, V. & Zorbas, C. Ribosome biogenesis : An emerging druggable pathway for cancer therapeutics Nucleus Nucleolus rRNA Cyttoplasm Cyt yt oplasm C yt oplasm Nucleus. 159, 74–81 (2019).
- Cauchi, R. J. SMN and Gemins: 'we are family' ... or are we?: insights into the partnership between Gemins and the spinal muscular atrophy disease protein SMN. *Bioessays* 32, 1077–89 (2010).
- Chen, W. C. W. et al. HHS Public Access. 33, 557–573 (2016).
- Chih, B., Gollan, L. & Scheiffele, P. Alternative Splicing Controls Selective Trans-Synaptic Interactions of the Neuroligin-Neurexin Complex. *Neuron* 51, 171–178 (2006).
- Cho, S. & Dreyfuss, G. A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev.* 24, 438–42 (2010).
- Cioce, M., Boulon, S., Matera, A. G. & Lamond, A. I. UV-induced fragmentation of Cajal bodies. *J. Cell Biol.* 175, 401–13 (2006).
- Cioce, M. & Lamond, A. I. Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 105–31 (2005).
- Clelland, A. K., Kinnear, N. P., Oram, L., Burza, J. & Sleeman, J. E. The SMN Protein is a Key Regulator of Nuclear Architecture in Differentiating Neuroblastoma Cells. *Traffic* 10, 1585–1598 (2009).
- Cmarko, D. et al. Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem. Cell Biol.* 113, 181–7 (2000).
- Coover, D. D. et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1205–1214 (1997).
- Cremer, T. & Cremer, C. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and . *Eur. J. Histochem.* 50, 223–72
- Cremer, T. & Cremer, C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* 2, 292–301 (2001).

- Cremer, T. & Cremer, C. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories. *Eur. J. Histochem.* 50, 161–76
- Cremer, T. & Cremer, M. Chromosome territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1–22 (2010).
- Curmi, F. & Cauchi, R. J. The multiple lives of DEAD-box RNA helicase DP103/DDX20/Gemin3. *Biochem. Soc. Trans.* 46, 329–341 (2018).
- Cutter, A. & Hayes, J. J. HHS Public Access. 589, 2914–2922 (2016).
- Dachs, E. et al. Defective neuromuscular junction organization and postnatal myogenesis in mice with severe spinal muscular atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 444–61 (2011).
- Daniely, Y., Dimitrova, D. D. & Borowiec, J. A. Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6014–22 (2002).
- De Magistris, P. & Antonin, W. The Dynamic Nature of the Nuclear Envelope. *Curr. Biol.* 28, R487–R497 (2018).
- Dean, C. et al. Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat. Neurosci.* 6, 708–716 (2003).
- Dekker, J. & Heard, E. Structural and functional diversity of Topologically Associating Domains. *FEBS Lett.* 589, 2877–84 (2015).
- Delgado-Villar, M. D. Modificaciones de la cromatina, regulación génica y cáncer. *Monogr. la Real Acad. Nac. Farm.* 24, 139–183 (2009).
- Dixon, J. R., Gorkin, D. U. & Ren, B. Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization. *Mol. Cell* 62, 668–680 (2016).
- Doktor, T. K. et al. RNA-sequencing of a mouse-model of spinal muscular atrophy reveals tissue-wide changes in splicing of U12-dependent introns. *Nucleic Acids Res.* 45, 395–416 (2017).
- Dredge, B. K., Polydorides, A. D. & Darnell, R. B. The splice of life: Alternative splicing and neurological disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 43–50 (2001).
- Dreyfuss, G., Kim, V. N. & Kataoka, N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 195–205 (2002).

- Droescher, M., Chaugule, V. K. & Pichler, A. SUMO rules: regulatory concepts and their implication in neurologic functions. *Neuromolecular Med.* 15, 639–60 (2013).
- Emmott, E., Jovanovic, M. & Slavov, N. Ribosome Stoichiometry: From Form to Function. *Trends Biochem. Sci.* xx, 1–15 (2018).
- Ender, C. et al. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol. Cell* 32, 519–28 (2008).
- Farley-Barnes, K. I. et al. Diverse Regulators of Human Ribosome Biogenesis Discovered by Changes in Nucleolar Number. *Cell Rep.* 22, 1923–1934 (2018).
- Farley, K. I., Surovtseva, Y., Merkel, J. & Baserga, S. J. Determinants of mammalian nucleolar architecture. *Chromosoma* 124, 323–331 (2015).
- Fernandez, R. et al. cAMP-dependent reorganization of the Cajal bodies and splicing machinery in cultured Schwann cells. *Glia* 40, 378–388 (2002).
- Fischer, U., Englbrecht, C. & Chari, A. Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 718–731 (2011).
- Friese, A. et al. Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor *Err3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13588–93 (2009).
- Fyodorov, D. V., Zhou, B.-R., Skoultchi, A. I. & Bai, Y. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 192–206 (2017).
- Galganski, L., Urbanek, M. O. & Krzyzosiak, W. J. Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res.* 45, 10350–10368 (2017).
- Gall, J. G. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 273–300 (2000).
- Gama-Carvalho, M. et al. Targeting of U2AF65 to sites of active splicing in the nucleus. *J. Cell Biol.* 137, 975–87 (1997).
- Garcia-Esparcia, P. et al. Altered machinery of protein synthesis is region- and stage-dependent and is associated with α -synuclein oligomers in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 76 (2015).

- Gerace, L. & Huber, M. D. NIH Public Access. 177, 24–31 (2013).
- Gerace, L. & Tapia, O. Messages from the voices within: regulation of signaling by proteins of the nuclear lamina. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52, 14–21 (2018).
- Gibbons, J. G., Branco, A. T., Yu, S. & Lemos, B. Ribosomal DNA copy number is coupled with gene expression variation and mitochondrial abundance in humans. *Nat. Commun.* 5, 4850 (2014).
- Govoni, A., Gagliardi, D., Comi, G. P. & Corti, S. Time Is Motor Neuron: Therapeutic Window and Its Correlation with Pathogenetic Mechanisms in Spinal Muscular Atrophy. *Mol. Neurobiol.* 55, 6307–6318 (2018).
- H, C., YT, H., TH, G. & KME, F. The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* in press, (2018).
- Hansen, J. C. et al. The 10-nm chromatin fiber and its relationship to interphase chromosome organization. *Biochem. Soc. Trans.* 46, 67–76 (2018).
- Harada, Y. et al. Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J. Neurol.* 249, 1211–1219 (2002).
- Hartmann, A. M., Nayler, O., Schwaiger, F. W., Obermeier, A. & Stamm, S. The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59(fyn). *Mol. Biol. Cell* 10, 3909–26 (1999).
- Hebert, M. D. Signals controlling Cajal body assembly and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1314–7 (2013).
- Hebert, M. D. & Poole, A. R. Toward an understanding of regulating Cajal body activity by protein modification. *RNA Biol.* 1–18 (2016). doi: 10.1080/15476286.2016.1243649
- Hebert, M. D., Shpargel, K. B., Ospina, J. K., Tucker, K. E. & Matera, A. G. Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev. Cell* 3, 329–37 (2002).
- Hebert, M. D. & Matera, A. G. Self-association of Coilin Reveals a Common Theme in Nuclear Body Localization. *Mol. Biol. Cell* 11, 4159–4171 (2000).

- Henderson, A. S., Warburton, D. & Atwood, K. C. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 3394–8 (1972).
- Henras, A. K. et al. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2334–2359 (2008).
- Hernández-Ortega, K., Garcia-Esparcia, P., Gil, L., Lucas, J. J. & Ferrer, I. Altered Machinery of Protein Synthesis in Alzheimer's: From the Nucleolus to the Ribosome. *Brain Pathol.* 26, 593–605 (2016).
- Hetman, M. & Pietrzak, M. Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends Neurosci.* 35, 305–14 (2012).
- Hirsch, N. P. Neuromuscular junction in health and disease. *Br. J. Anaesth.* 99, 132–8 (2007).
- Hoffmann, I. & Birnstiel, M. L. Cell cycle-dependent regulation of histone precursor mRNA processing by modulation of U7 snRNA accessibility. *Nature* 346, 665–668 (1990).
96. Hsieh-Li, H. M. et al. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 24, 66–70 (2000).
- Hughes, B. W., Kusner, L. L. & Kaminski, H. J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle Nerve* 33, 445–61 (2006).
- Hurlé González, Juan Mario & García-Porrero, J. A. *Neuroanatomía Humana*. (Editorial Médica Panamericana, 2014).
- Hutten, S. et al. An intranucleolar body associated with rDNA. *Chromosoma* 120, 481–499 (2011).
- Ibrahim, F., Nakaya, T. & Mourelatos, Z. RNA Dysregulation in Diseases of Motor Neurons. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7, 323–352 (2012).
- Iijima, T. et al. SAM68 regulates neuronal activity-dependent alternative splicing of neurexin-1. *Cell* 147, 1601–14 (2011).
- Isaac, C., Yang, Y. & Meier, U. T. Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *J. Cell Biol.* 142, 319–29 (1998).
- Ito, Y., Shibata, N., Saito, K., Kobayashi, M. & Osawa, M. New insights into the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Brain Dev.* 33, 321–331 (2011).

- Jangi, M. et al. SMN deficiency in severe models of spinal muscular atrophy causes widespread intron retention and DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E2347–E2356 (2017).
- Jones, K. W. et al. Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J. Biol. Chem.* 276, 38645–51 (2001).
- Jones, M. J., Goodman, S. J. & Kobor, M. S. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* 14, 924–932 (2015).
- Jordan, E. G. & McGovern, J. H. The quantitative relationship of the fibrillar centres and other nucleolar components to changes in growth conditions, serum deprivation and low doses of actinomycin D in cultured diploid human fibroblasts (strain MRC-5). *J. Cell Sci.* 52, 373–89 (1981).
- Kebede, A. F., Schneider, R. & Daujat, S. Novel types and sites of histone modifications emerge as players in the transcriptional regulation contest. *FEBS J.* 282, 1658–1674 (2015).
- Kim, V. N. et al. The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *EMBO J.* 20, 2062–2068 (2001).
- KISS, T., FAYET, E., JADY, B. E., RICHARD, P. & WEBER, M. Biogenesis and Intranuclear Trafficking of Human Box C/D and H/ACA RNPs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 407–417 (2006).
- Kiss, T. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109, 145–8 (2002).
- Kolb, S. J., Battle, D. J. & Dreyfuss, G. Molecular functions of the SMN complex. *J. Child Neurol.* 22, 990–4 (2007).
- Kolb, S. J. & Kissel, J. T. Spinal Muscular Atrophy. *Neurol. Clin.* 33, 831–46 (2015).
- Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705 (2007).
- Kressler, D., Hurt, E. & Baßler, J. A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends Biochem. Sci.* 42, 640–654 (2017).
- Kressler, D., Hurt, E. & Baßler, J. Driving ribosome assembly. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1803, 673–683 (2010).

- Kühn, U. & Wahle, E. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1678, 67–84 (2004).
- La Bella, V., Cisterni, C., Salaün, D. & Pettmann, B. Survival motor neuron (SMN) protein in rat is expressed as different molecular forms and is developmentally regulated. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2913–23 (1998).
- Lafarga, M., Andrés, M. A., Fernández-Viadero, C., Villegas, J. & Berciano, M. T. Number of nucleoli and coiled bodies and distribution of fibrillar centres in differentiating Purkinje neurons of chick and rat cerebellum. *Anat. Embryol. (Berl.)* 191, 359–67 (1995).
- Lafarga, M., Berciano, M. T. & Blanco, M. The perineuronal net in the fastigial nucleus of the rat cerebellum. A Golgi and quantitative study. *Anat. Embryol. (Berl.)* 170, 79–85 (1984).
- Lafarga, M., Berciano, M. T., Garcia-Segura, L. M., Andres, M. A. & Carmo-Fonseca, M. Acute osmotic/stress stimuli induce a transient decrease of transcriptional activity in the neurosecretory neurons of supraoptic nuclei. *J. Neurocytol.* 27, 205–17 (1998).
- Lafarga, M., Hervás, J. P., Santa-Cruz, M. C., Villegas, J. & Crespo, D. The 'accessory body' of Cajal in the neuronal nucleus. A light and electron microscopic approach. *Anat. Embryol. (Berl.)* 166, 19–30 (1983).
- Lafarga, M. et al. Apoptosis induced by methylazoxymethanol in developing rat cerebellum: organization of the cell nucleus and its relationship to DNA and rRNA degradation. *Cell Tissue Res.* 289, 25–38 (1997).
- Lafarga, M., Andres, M. A., Berciano, M. T. & Maquiera, E. Organization of nucleoli and nuclear bodies in osmotically stimulated supraoptic neurons of the rat. *J. Comp. Neurol.* 308, 329–339 (1991).
- Lafarga, M. et al. Clastosome: A Subtype of Nuclear Body Enriched in 19S and 20S Proteasomes, Ubiquitin, and Protein Substrates of Proteasome. *Mol. Biol. Cell* 13, 2771–2782 (2002).
- Lafarga, M., Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O. & Berciano, M. T. Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus. *Chromosoma* 118, 437–43 (2009).

- Lafarga, M., Tapia, O., Romero, A. M. & Berciano, M. T. Cajal bodies in neurons. *RNA Biology* 14, 712–725 (2017).
- Lafarga, V. et al. CBP-mediated SMN acetylation modulates Cajal body biogenesis and the cytoplasmic targeting of SMN. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 527–546 (2018).
- Lafita-Navarro, M. D. C. et al. MXD1 localizes in the nucleolus, binds UBF and impairs rRNA synthesis. *Oncotarget* 7, 69536–69548 (2016).
- Lamond, A. I. & Carmo-Fonseca, M. Localisation of splicing snRNPs in mammalian cells. *Mol. Biol. Rep.* 18, 127–33 (1993).
- Lamond, A. I. & Spector, D. L. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 605–12 (2003).
- Larance, M. & Lamond, A. I. Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 269–280 (2015).
- Lawrence, M., Daujat, S. & Schneider, R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet.* 32, 42–56 (2016).
- Le, T. T. et al. SMN D 7 , the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene , extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum. Mol. Genet.* 14, 845–857 (2005).
- Le, T. T. et al. Nucleolus and chromatin. *Cell* 2, 657–667 (2018).
- Lee, E. B., Lee, V. M. Y. & Trojanowski, J. Q. Gains or losses: Molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience* 13, 38–50 (2012).
- Lefebvre, S. et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155–65 (1995).
- Lefebvre, S. et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 16, 265–269 (1997).
- Leung, A. K. L. et al. NOPdb: Nucleolar Proteome Database. *Nucleic Acids Res.* 34, D218–D220 (2006).
- Li, D. K., Tisdale, S., Lotti, F. & Pellizzoni, L. SMN control of RNP assembly: from post-transcriptional gene regulation to motor neuron disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 32, 22–9 (2014).

- Lindström, M. S. et al. Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene* 37, 2351–2366 (2018).
- Liu, Q. & Dreyfuss, G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* 15, 3555–3565 (1996).
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408 (2001).
- Lorson, C. L. et al. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.* 19, 63–6 (1998).
- Lotti, F. et al. An SMN-Dependent U12 Splicing Event Essential for Motor Circuit Function. *Cell* 151, 440–454 (2012).
- Lu, L. et al. Nucleolar stress: Is there a reverse version? *J. Cancer* 9, 3723–3727 (2018).
- Lu, X. et al. The effect of H3K79 dimethylation and H4K20 trimethylation on nucleosome and chromatin structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1122–4 (2008).
- Lupiáñez, D. G. et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* 161, 1012–1025 (2015).
- Machyna, M., Heyn, P. & Neugebauer, K. M. Cajal bodies: where form meets function. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 4, 17–34 (2013).
- Machyna, M. et al. The coilin interactome identifies hundreds of small noncoding RNAs that traffic through Cajal bodies. *Mol. Cell* 56, 389–99 (2014).
- Mao, Y. S., Zhang, B. & Spector, D. L. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* 27, 295–306 (2011).
- Markowitz, J. A., Singh, P. & Darras, B. T. Spinal muscular atrophy: a clinical and research update. *Pediatr. Neurol.* 46, 1–12 (2012).
- Massenet, S., Bertrand, E. & Verheggen, C. Assembly and trafficking of box C/D and H/ACA snoRNPs. *RNA Biol.* 14, 680–692 (2017).
- Mata-Garrido, J., Casafont, I., Tapia, O., Berciano, M. T. & Lafarga, M. Neuronal accumulation of unrepaired DNA in a novel specific chromatin domain:

- structural, molecular and transcriptional characterization. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 41 (2016).
- Mata-Garrido, J. et al. Persistent accumulation of unrepaired DNA damage in rat cortical neurons: nuclear organization and ChIP-seq analysis of damaged DNA. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 68 (2018).
- Matera, A. G., Terns, R. M. & Terns, M. P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 209–20 (2007).
- Matera, A. G. & Wang, Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 108–21 (2014).
- Matter, N., Herrlich, P. & K?nig, H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 420, 691–695 (2002).
- Mayer, C., Bierhoff, H. & Grummt, I. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev.* 19, 933–941 (2005).
- McGinty, R. K., Henrici, R. C. & Tan, S. Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. *Nature* 514, 591–596 (2014).
- McGinty, R. K. & Tan, S. Nucleosome structure and function. *Chem. Rev.* 115, 2255–2273 (2015).
- Meier, U. T. RNA modification in Cajal bodies. *RNA Biol.* 14, 693–700 (2017).
- Misteli, T. & Spector, D. L. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat. Biotechnol.* 15, 961–4 (1997).
- Misteli, T. Cell biology: Nuclear order out of chaos. *Nature* 456, 333–4 (2008).
- Misteli, T. Concepts in nuclear architecture. *BioEssays* 27, 477–487 (2005).
- Monani, U. R. et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 9, 333–9 (2000).
- Moon, L. D. F. Chromatolysis: Do injured axons regenerate poorly when ribonucleases attack rough endoplasmic reticulum, ribosomes and RNA? *Dev. Neurobiol.* 78, 1011–1024 (2018).
- Narayanan, A. et al. Nucleolar localization signals of Box H/ACA small nucleolar RNAs. *EMBO J.* 18, 5120–5130 (1999).

- Narcís, J. O. et al. Accumulation of poly(A) RNA in nuclear granules enriched in Sam68 in motor neurons from the SMN Δ 7 mouse model of SMA. *Sci. Rep.* 8, 9646 (2018).
- Navascues, J. et al. SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *J. Struct. Biol.* 163, 137–46 (2008).
- Navascues, J., Berciano, M., Tucker, K., Lafarga, M. & Matera, A. G. Targeting SMN to Cajal bodies and nuclear gems during neuritogenesis. *Chromosoma* 112, 398–409 (2004).
- Németh, A. & Grummt, I. Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52, 105–111 (2018).
- Neugebauer, K. M. Special focus on the Cajal Body. *RNA Biol.* 14, 669–670 (2017).
- Newell-Litwa, K. A., Horwitz, R. & Lamers, M. L. Non-muscle myosin II in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Dis. Model. Mech.* 8, 1495–1515 (2015).
- Ng, S.-Y. et al. Genome-wide RNA-Seq of Human Motor Neurons Implicates Selective ER Stress Activation in Spinal Muscular Atrophy. *Cell Stem Cell* 17, 569–84 (2015).
- Novotný, I., Blažíková, M., Stanečková, D., Herman, P. & Malinsky, J. In vivo kinetics of U4/U6-U5 tri-snRNP formation in Cajal bodies. *Mol. Biol. Cell* 22, 513–523 (2011).
- Ogawa, L. M. & Baserga, S. J. Crosstalk between the nucleolus and the DNA damage response. *Mol. Biosyst.* 13, 443–455 (2017).
- Ojeda Sahagún, J. L. & Icardo de la Escalera, J. M. *Neuroanatomía humana: aspectos funcionales y clínicos.* (Elsevier España, 2005).
- Olson, M. O. J. & Dundr, M. The moving parts of the nucleolus. *Histochem. Cell Biol.* 123, 203–16 (2005).
- Ono, M. et al. Identification of human miRNA precursors that resemble box C/D snoRNAs. *Nucleic Acids Res.* 39, 3879–3891 (2011).
- Pagliardini, S. et al. Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum. Mol. Genet.* 9, 47–56 (2000).

- Pagliarini, V. et al. SAM68 is a physiological regulator of SMN2 splicing in spinal muscular atrophy. *J. Cell Biol.* 211, 77–90 (2015).
- Palanca, A., Casafont, I., Berciano, M. T. & Lafarga, M. Reactive nucleolar and Cajal body responses to proteasome inhibition in sensory ganglion neurons. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 848–59 (2014).
- Parlato, R. & Kreiner, G. Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle? *J. Mol. Med. (Berl)*. 91, 541–7 (2013).
- Paronetto, M. P., Achsel, T., Massiello, A., Chalfant, C. E. & Sette, C. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *J. Cell Biol.* 176, 929–939 (2007).
- Pedrotti, S. et al. The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy. *EMBO J.* 29, 1235–1247 (2010).
- Pellizzoni, L., Baccon, J., Charroux, B. & Dreyfuss, G. The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr. Biol.* 11, 1079–88 (2001).
- Pellizzoni, L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep.* 8, 340–5 (2007).
- Pena, E., Berciano, M. T., Fernandez, R., Ojeda, J. L. & Lafarga, M. Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* 430, 250–63 (2001).
- Peters, A. H. F. M. & Schübeler, D. Methylation of histones: Playing memory with DNA. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 230–238 (2005).
- Platani, M., Goldberg, I., Swedlow, J. R. & Lamond, A. I. In vivo analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *J. Cell Biol.* 151, 1561–74 (2000).
- Prakash, K. & Fournier, D. Evidence for the implication of the histone code in building the genome structure. *BioSystems* 164, 49–59 (2018).
- Rajan, P. et al. Regulation of gene expression by the RNA-binding protein Sam68 in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 505–507 (2008).

- Raska, I., Shaw, P. J. & Cmarko, D. New insights into nucleolar architecture and activity. *Int. Rev. Cytol.* 255, 177–235 (2006).
- Razin, S. V. & Gavrillov, A. A. Structural–Functional Domains of the Eukaryotic Genome. *Biochem.* 83, 302–312 (2018).
- Renvoisé, B. et al. The loss of the snoRNP chaperone Nopp140 from Cajal bodies of patient fibroblasts correlates with the severity of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1181–9 (2009).
- Riancho, J. et al. Compensatory Motor Neuron Response to Chromatolysis in the Murine hSOD1G93A Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 1–13 (2014).
- Richard, S. Reaching for the stars: Linking RNA binding proteins to diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 693, 142–57 (2010).
- Rodrigues, J. P. et al. REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1030–5 (2001).
- Rodriguez-Muela, N. et al. Single-Cell Analysis of SMN Reveals Its Broader Role in Neuromuscular Disease. *Cell Rep.* 18, 1484–1498 (2017).
- Sawyer, I. A., Sturgill, D., Sung, M.-H., Hager, G. L. & Dundr, M. Cajal body function in genome organization and transcriptome diversity. *BioEssays* 38, 1197–1208 (2016).
- Schmid, M. & Jensen, T. H. Nuclear quality control of RNA polymerase II transcripts. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 1, 474–85 (2010).
- Schneider, R. & Grosschedl, R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev.* 21, 3027–3043 (2007).
- Schöfer, C. & Weipoltshammer, K. Nucleolus and chromatin. *Histochem. Cell Biol.* 150, 209–225 (2018).
- Selenko, P. et al. SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat. Struct. Biol.* 8, 27–31 (2001).
- Sephton, C. F. et al. Identification of Neuronal RNA Targets of TDP-43-containing Ribonucleoprotein Complexes. *J. Biol. Chem.* 286, 1204–1215 (2011).

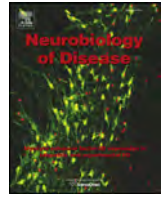
- Sexton, T. & Cavalli, G. The role of chromosome domains in shaping the functional genome. *Cell* 160, 1049–59 (2015).
- Shav-Tal, Y. et al. Dynamic Sorting of Nuclear Components into Distinct Nucleolar Caps during Transcriptional Inhibition. *Mol. Biol. Cell* 16, 2395–2413 (2005).
- Shogren-Knaak, M. et al. Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. *Science* (80-.). 311, 844–847 (2006).
- Shpargel, K. B. & Matera, A. G. Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 17372–17377 (2005).
- Singh, R. N., Howell, M. D., Ottesen, E. W. & Singh, N. N. Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochim. Biophys. acta. Gene Regul. Mech.* 1860, 299–315 (2017).
- Sleeman, J. E. & Lamond, A. I. Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr. Biol.* 9, 1065–74 (1999).
- Sleigh, J. N. et al. Chondrolectin affects cell survival and neuronal outgrowth in in vitro and in vivo models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 23, 855–69 (2014).
- Smirnov, E., Cmarko, D., Mazel, T., Hornáček, M. & Raška, I. Nucleolar DNA: the host and the guests. *Histochem. Cell Biol.* 145, 359–72 (2016).
- Stępiński, D. The nucleolus, an ally, and an enemy of cancer cells. *Histochem. Cell Biol.* 0, 0 (2018).
- Stifani, N. Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 293 (2014).
- Surovtseva, V. & Baserga, S. J. by Changes in Nucleolar Number. 22, 1923–1934 (2018).
- Tapia, O. et al. The SMN Tudor SIM-like domain is key to SmD1 and coilin interactions and to Cajal body biogenesis. *J. Cell Sci.* 127, 939–946 (2014).
- Tapia, O., Bengoechea, R., Berciano, M. T. & Lafarga, M. Nucleolar targeting of coilin is regulated by its hypomethylation state. *Chromosoma* 119, 527–540 (2010).

- Tapia, O. et al. Reorganization of Cajal bodies and nucleolar targeting of coilin in motor neurons of type I spinal muscular atrophy. *Histochem. Cell Biol.* 137, 657–667 (2012).
- Tapia, O. et al. Cellular bases of the RNA metabolism dysfunction in motor neurons of a murine model of spinal muscular atrophy: Role of Cajal bodies and the nucleolus. *Neurobiol. Dis.* 108, 83–99 (2017).
- Tarabal, O. et al. Mechanisms involved in spinal cord central synapse loss in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73, 519–35 (2014).
- Tiku, V. & Antebi, A. Nucleolar Function in Lifespan Regulation. *Trends Cell Biol.* 28, 662–672 (2018).
- Tisdale, S. & Pellizzoni, L. Disease mechanisms and therapeutic approaches in spinal muscular atrophy. *J. Neurosci.* 35, 8691–700 (2015).
- Tiziano, F. D., Melki, J. & Simard, L. R. Solving the puzzle of spinal muscular atrophy: What are the missing pieces? *Am. J. Med. Genet. Part A* 161, 2836–2845 (2013).
- Torres-Benito, L., Neher, M. F., Cano, R., Ruiz, R. & Tabares, L. SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals. *PLoS One* 6, e26164 (2011).
- Trinkle-Mulcahy, L. & Sleeman, J. E. The Cajal body and the nucleolus: “In a relationship” or “It’s complicated”? *RNA Biol.* 14, 739–751 (2017).
- Tripodi, M. & Arber, S. Regulation of motor circuit assembly by spatial and temporal mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 615–23 (2012).
- Tsekrekou, M., Stratigi, K. & Chatzinikolaou, G. The nucleolus: In genome maintenance and repair. *Int. J. Mol. Sci.* 18, (2017).
- Vagnarelli, P. Mitotic chromosome condensation in vertebrates. *Exp. Cell Res.* 318, 1435–41 (2012).
- Verhaart, I. E. C. et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy—a literature review. doi:10.1186/s13023-017-0671-8
- Walker, J. M. *The Nucleolus IN Series Editor.*

- Walker, M. P. et al. SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum. Mol. Genet.* (2008). doi:10.1093/hmg/ddn234
- Webster, M., Witkin, K. L. & Cohen-Fix, O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J. Cell Sci.* 122, 1477–1486 (2009).
- Weiss, M. S. et al. A critical examination of the recently reported crystal structures of the human SMN protein. *Hum. Mol. Genet.* 25, ddw298 (2016).
- Wirth, B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum. Mutat.* 15, 228–237 (2000).
- Wischnitzer, S. The submicroscopic morphology of the interphase nucleus. *Int. Rev. Cytol.* 34, 1–48 (1973).
- Xie, W. et al. The chromatin remodeling complex NuRD establishes the poised state of rRNA genes characterized by bivalent histone modifications and altered nucleosome positions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8161–6 (2012).
- Young, P. J. et al. Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN. *Exp. Cell Res.* 265, 252–61 (2001).
- Zellforschung, T. B.-A. für & 1909, undefined. Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. [ci.nii.ac.jp](https://ci.nii.ac.jp/naid/10024028641/) at <<https://ci.nii.ac.jp/naid/10024028641/>>
- Zhang, Z. et al. SMN Deficiency Causes Tissue-Specific Perturbations in the Repertoire of snRNAs and Widespread Defects in Splicing. *Cell* 133, 585–600 (2008).
- Zhou, Z. et al. The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* 407, 401–405 (2000).
- Zou, T. et al. SMN deficiency reduces cellular ability to form stress granules, sensitizing cells to stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* 31, 541–50 (2011).

8. Artículos





Cellular bases of the RNA metabolism dysfunction in motor neurons of a murine model of spinal muscular atrophy: Role of Cajal bodies and the nucleolus



Olga Tapia ^{a,1}, Josep Oriol Narcís ^{a,1}, Javier Riancho ^b, Olga Tarabal ^c, Lúdia Piedrafita ^c, Jordi Calderó ^c, Maria T. Berciano ^a, Miguel Lafarga ^{a,*}

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

^b Service of Neurology, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL-CIBERNED, Santander, Spain

^c Department of Experimental Medicine, School of Medicine, University of Lleida and “Institut de Recerca Biomèdica de Lleida” (IRBLLEIDA), Lleida, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2017

Revised 1 August 2017

Accepted 16 August 2017

Available online 18 August 2017

Keywords:

Spinal muscular atrophy

Motor neurons

Cajal bodies

Nucleolar dysfunction

Protein synthesis machinery

ABSTRACT

Spinal muscular atrophy (SMA) is caused by a homozygous deletion or mutation in the survival motor neuron 1 (*SMN1*) gene that leads to reduced levels of SMN protein resulting in degeneration of motor neurons (MNs). The best known functions of SMN is the biogenesis of spliceosomal snRNPs. Linked to this function, Cajal bodies (CBs) are involved in the assembly of spliceosomal (snRNPs) and nucleolar (snoRNPs) ribonucleoproteins required for pre-mRNA and pre-rRNA processing. Recent studies support that the interaction between CBs and nucleoli, which are especially prominent in neurons, is essential for the nucleolar rRNA homeostasis.

We use the *SMNΔ7* murine model of type I SMA to investigate the cellular basis of the dysfunction of RNA metabolism in MNs. SMN deficiency in postnatal MNs produces a depletion of functional CBs and relocalization of coilin, which is a scaffold protein of CBs, in snRNP-free perinucleolar caps or within the nucleolus. Disruption of CBs is the earliest nuclear sign of MN degeneration. We demonstrate that depletion of CBs, with loss of CB-nucleolus interactions, induces a progressive nucleolar dysfunction in ribosome biogenesis. It includes reorganization and loss of nucleolar transcription units, segregation of dense fibrillar and granular components, retention of SUMO-conjugated proteins in intranucleolar bodies and a reactive, compensatory, up-regulation of mature 18S rRNA and genes encoding key nucleolar proteins, such as upstream binding factor, fibrillarin, nucleolin and nucleophosmin.

We propose that CB depletion and nucleolar alterations are essential components of the dysfunction of RNA metabolism in SMA.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cajal bodies (CBs) are nuclear structures that were discovered by Cajal in mammalian neurons (for review, see Lafarga et al., 2009; Lafarga et al., 2017). They contain coilin, which is a molecular marker of CBs, the survival of motor neuron (SMN) protein, the nucleolar protein fibrillarin, small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) and small nucleolar ribonucleoproteins (snoRNPs) required for pre-mRNA and pre-rRNA processing, respectively, as well as small Cajal body RNAs (scaRNAs) (for a review, see Cioce et al., 2006; Gall, 2000; Machyna et al., 2013). CBs are transcription dependent nuclear structures, and

their number positively correlates with the transcriptional activity and the cellular demand for pre-mRNA and pre-rRNA processing (Cioce et al., 2006; Lafarga et al., 1991; Lafarga et al., 2017; Machyna et al., 2013; Pena et al., 2001). The best known function of CBs is the maturation and assembly of uridine-rich (U) spliceosomal snRNPs, which are composed of U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs, that belong to the major spliceosome, and U11, U12, U4atac/U6atac and U5 snRNPs that correspond to the minor spliceosome (Fischer et al., 2011; Machyna et al., 2013; Tisdale and Pellizzoni, 2015). Mature snRNPs are released from CBs and assembled into the spliceosome to participate in pre-mRNA splicing (Matera and Wang, 2014). CBs also play a critical role in the biogenesis of the U7 snRNP and snoRNAs and snoRNPs. Whereas U7 snRNP is involved in the specific 3' end processing of histone pre-mRNAs, snoRNAs and snoRNPs concentrate in and traffic through CBs prior to their transfer to the nucleolus, where they participate in the pre-rRNA processing (Kiss, 2002; Machyna et al., 2014; Massenet et al., 2017). The binding of the scaffold protein coilin with snRNAs and snoRNAs

* Corresponding author at: Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Avd. Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain.
E-mail address: lafargam@unican.es (M. Lafarga).

¹ These authors contributed equally to the work reported here.

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

couples the biogenesis of both categories of non-coding RNA, which makes CBs the cellular center of their metabolism (Machyna et al., 2014).

The nucleolus is the most prominent nuclear structure responsible for the synthesis and processing of ribosomal (rRNA) transcripts and pre-ribosome subunits assembly. In projection neurons, such as spinal cord motor neurons (MNs), the nucleolus commonly has a reticulated configuration composed of numerous small fibrillar centers (FCs) surrounded by a shell of dense fibrillar component (DFC), irregular masses of granular component (GC) and nucleolar interstices (Riancho et al., 2014). This structural organization reflects the sequential processing steps of the enzymes and regulatory factors involved in rRNA synthesis and processing. Thus, FCs are sites of storage for the transcription machinery of ribosomal genes, including RNA polymerase I (RNA polI) and the transcription factor upstream binding factor (UBF). Active ribosomal genes are located at the DFC, where transcription and initial processing of pre-rRNA 45S takes place to yield the mature rRNAs 5.8S, 18S and 28S. This process is guided by snoRNPs containing the nucleolar proteins fibrillarin and dyskerin/NAP57 (Boisvert et al., 2007; Casafont et al., 2006; McStay, 2016; Raska et al., 2006; Smirnov et al., 2016). In particular, base-pairing with snoRNAs guides two essential modifications of pre-RNAs, methylation by fibrillarin and pseudouridylation by dyskerin/NAP57 (Feric et al., 2016). Both modifications are crucial for the correct RNA folding and assembly with ribosomal proteins (Gigova et al., 2014). Therefore, transcription of ribosomal DNA (rDNA) and the first steps for pre-rRNA processing occur in the FC/DFC structural and functional units (Smirnov et al., 2016). Pre-ribosomal particles emerging from the DFC are then transferred to the GC, where they interact with chaperones, particularly nucleophosmin (NPM/B23), and assembly ribosomal proteins (Feric et al., 2016). Mature ribosomal particles in the GC ultimately exit the nucleolus and are exported to the cytoplasm for ribosome assembly (Boisvert et al., 2007; Feric et al., 2016; Raska et al., 2006).

In addition to the conventional role of the nucleolus as a ribosome factory, a recent study supports the view that the nucleolus is capable of capturing and immobilizing proteins that have a peptidic code, known as the nucleolar detention sequence (NoDS), in response to several environmental stimuli. This post-translational regulatory mechanism is mediated by the expression of a category of long ncRNA, which is produced in the rDNA intergenic spacer and interacts with the NoDS of target proteins (Audas et al., 2012). In addition, the nucleolus is a central hub for sensing and coordinating cellular stress responses (Boulon et al., 2010; Olson, 2004). In this line, p53-dependent disturbance of nucleolar functions can be associated with a phenomenon known as nucleolar stress, in which an impairment of rDNA transcription occurs (Bursac et al., 2014; Nicolas et al., 2016; Parlato and Liss, 2014). Morphological and biochemical manifestations of nucleolar dysfunction are associated with several neurological disorders, including Parkinson's and Alzheimer's diseases, amyotrophic lateral sclerosis and cerebellar ataxias (Baltanas et al., 2011; Hernandez-Ortega et al., 2016; Hetman and Pietrzak, 2012; Parlato and Kreiner, 2013; Riancho et al., 2016; Zufiria et al., 2016).

Recent evidence supports that the interaction between the CB and the nucleolus plays an essential role in nuclear RNA homeostasis, particularly in rRNA biogenesis (Lafarga et al., 2017; Machyna et al., 2014; Trinkle-Mulcahy and Sleeman, 2017). In mammalian neurons, the close functional relationship between CBs and the nucleolus is reflected by their frequent physical association (Berciano et al., 2007; Lafarga et al., 2017; Pena et al., 2001; Raska et al., 1990). Physically, the CB specifically associates with the nucleolar DFC, and they share fibrillarin, Nopp140 and snoRNPs proteins, which provides a molecular link for a nucleolus-CB interaction (Isaac et al., 1998; Lafarga et al., 2017; Trinkle-Mulcahy and Sleeman, 2017). A dynamic interaction between these two nuclear structures is also demonstrated by the observation of CBs moving to and from nucleoli in living cells (Platani et al., 2000). Moreover, neuronal stimulation by activation of *N*-methyl-D-aspartate

receptors significantly increases CB-nucleolar association and protein synthesis in relation to unstimulated neurons. Interestingly, this neuronal response is mediated by the translocation of the postsynaptic protein AIDA-1 to the nucleus (Jordan et al., 2007). In this context, CB-nucleolar association may facilitate the transfer of snoRNPs from CBs to the nucleolus, where they are involved in the pre-rRNA processing (Machyna et al., 2014; Massenet et al., 2017).

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disorder that produces progressive degeneration and death of MNs, which results in muscular atrophy and paralysis (Soler-Botija et al., 2002). SMA is caused by a homozygous deletion or mutation in the survival motor neuron 1 (*SMN1*) gene that leads to reduced levels of full-length SMN protein (Lefebvre et al., 1995; Lefebvre et al., 1997). Type I SMA (Werdnig-Hoffmann disease) is the most common genetic cause of infant mortality (Burghes and Beattie, 2009; Coady and Lorson, 2011; Frugier et al., 2002). Although the expression of an *SMN1* duplicated gene, *SMN2*, is preserved in SMA patients, *SMN2* expression cannot fully compensate for the loss of SMN protein and ultimately fails to prevent the disease (Coover et al., 1997; Lefebvre et al., 1997). Thus, the majority of the mRNA transcripts from *SMN2* generate an alternatively spliced isoform that lacks exon 7 and encodes a truncated form of the SMN protein (*SMNΔ7*) that is rapidly degraded (Cho and Dreyfuss, 2010). Only ~10% of the *SMN2* transcripts undergo a normal splicing and encode the full-length SMN protein (Coady and Lorson, 2011; Frugier et al., 2002; Lefebvre et al., 1995; Monani, 2005).

The best-known functions of SMN are the biogenesis of spliceosomal snRNPs, the axonal transport of certain mRNAs and the formation and maintenance of the neuromuscular junctions (Goulet et al., 2013). Additionally, other proposed functions of SMN include an architectural role in the assembly of sarcomeres (Rajendra et al., 2007). SMN interacts with Gemin proteins (Gemin 2–8) and Unrip to form the SMN complex, which is essential for the cytoplasmic steps of snRNP biogenesis (Matera and Wang, 2014). Within the nucleus, the SMN complex concentrates in CBs, as a part of snRNPs, and in “Gems” (for the Gemini of Cajal bodies). Gems are coilin-negative and SMN complex-positive structures with an unknown function (Liu and Dreyfuss, 1996; Navascues et al., 2004; Young et al., 2001).

The aim of the present study is to analyze the structural and molecular reorganization of CBs and nucleoli of spinal cord MNs in response to reduced SMN levels in a transgenic *SMNΔ7* mouse model of SMA, which exhibits symptoms and neuropathological alterations similar to type I SMA patients. The transgene contains two copies of the human *SMN2* gene and a human SMN cDNA that lacks exon 7 (*SMNΔ7*) in the genetic background of an *Smn*^{-/-} mouse (Le et al., 2005).

Our results demonstrate that reduced SMN levels in MNs disrupt CB-nucleolar interactions with depletion of canonical CBs and redistribution of coilin within the nucleolus and as perinucleolar caps free of SMN and snRNPs. This neuronal response is accompanied by a severe reorganization of nucleolar components and retention of SUMO1-conjugated proteins in intranucleolar bodies, although a basal rRNA transcription is preserved. Collectively, these results support a severe dysfunction of spliceosomal snRNP and snoRNP biogenesis as well as perturbation of rRNA processing. Therefore, the dysfunction of CBs in SMA MNs seems to have a profound impact not only on the organization of the mRNA splicing machinery but also on the biogenesis of ribosomes and protein synthesis activity as it is reflected by the chromatolysis.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The *Smn*^{+/-}, *SMN2*^{+/+}, *SMNΔ7*, heterozygote knockouts for mice *Smn* (FVB·Cg-Tg[*SMN2**delta7]4299Ahmb Tg[*SMN2*]89Ahmb *Smn1tm1Msdl*/J, stock number 005025), purchased from The Jackson Laboratory (Sacramento, USA), were crossed to generate *Smn*^{-/-}, *SMN2*^{+/+}, *SMNΔ7*^{+/+} (hereafter referred to as *SMNΔ7*) mice and

Smn^{+/+}, *SMN2*^{+/+}, *SMNΔ7*^{+/+} wild-type for *Smn* (hereafter referred to as WT) mice. *SMNΔ7* mice exhibit a severe postnatal SMA phenotype with a mean lifespan of two weeks (Le et al., 2005). Animal care and handling was in accordance with the Spanish legislation (Spanish Royal Decree 53/2013 BOE) and the guidelines of the European Commission for the accommodation and care of laboratory animals (revised in Appendix A of the Council Directive 2010/63/UE). The experimental plan was examined and approved by the Ethics Committee of the University of Cantabria and the Committee for Animal Care and Use of the University of Lleida. At postnatal day (P) 0, identification of WT and *SMNΔ7* mice was carried out by genotyping with PCR. DNA was extracted from the tail, as previously described (Cervero et al., 2016). Age-matched WT littermates of mutant animals were used as controls. At selected postnatal time, animal sacrifice was performed by quick decapitation.

2.2. Immunofluorescence and confocal microscopy

For immunofluorescence, five mice per group (WT and *SMNΔ7*) at P13–P15 were perfused under deep anesthesia with pentobarbital (50 mg/kg) with 3.7% paraformaldehyde (freshly prepared) in PBS and post-fixed for 6 h and washed in PBS. Transversal sections (160 μm thick) of spinal cord were obtained with a vibratome and small tissue fragments from the anterior horn were dissected out. Samples were transferred to a drop of PBS on a siliconized slide and squash preparations of dissociated MNs were performed following the procedure previously reported (Pena et al., 2001; Riancho et al., 2015). The samples were sequentially treated with 0.5% Triton X-100 in PBS for 45 min, 0.1 M glycine in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) for 30 min and 0.05% Tween 20 in PBS for 5 min. Then, the samples were incubated for 3 h with the primary antibody containing 1% BSA at room temperature, washed with 0.05% Tween 20 in PBS, incubated for 45 min in the specific secondary antibody conjugated with FITC or TexasRed or Cy3 (Jackson, USA), washed in PBS and mounted with the ProLong anti-fading medium (Invitrogen).

Confocal images were obtained with a LSM510 (Zeiss, Germany) laser scanning microscope using a 63× oil (1.4 NA) objective. In order to avoid overlapping signals, images were obtained by sequential excitation at 488 nm and 543 nm, to detect FITC and TexasRed or Cy3, respectively. Images were then processed using Photoshop software.

For the morphometric and quantitative analysis, five animals per group (WT and *SMNΔ7*) were used and at least 25 MNs per animal were sampled. The study was performed on confocal images of dissociated MNs using a 63× oil objective and the Zeiss LSM510 software for image analysis. The morphometric determination of the nucleolar diameter was performed on mononucleolate MNs stained with propidium iodide for the cytochemical detection of nucleic acids. This procedure is a very useful marker of neuronal nucleoli and Nissl substance (Palanca et al., 2014b). Neurons, larger than 20 μm, with prominent nucleoli and Nissl bodies were sampled. For the quantitative analysis of the number of fibrillar centers per nucleolus we used mononucleolate MNs immunostained for UBF, a marker of fibrillar centers. UBF positive nucleolar spots were counted on serial confocal sections of the whole nucleolus. The proportion of MNs containing canonical CBs, coilin-positive perinucleolar caps and intranucleolar coilin was estimated in preparations of dissociated MNs double immunolabeled for both coilin and SMN.

2.3. Antibodies

The following primary antibodies were used. Mouse monoclonal antibodies anti-UBF (F-9) (Santa Cruz Lab. La Jolla, CA, USA, dilution 1:100 immunofluorescence IF); anti-SMN (BD transduction laboratories, dilution 1:50 IF and 1:500 western blot WB); anti-fibrillarlin (Abcam, dilution 1:500 IF); anti-BrdU (Clone BU-33, Sigma-Aldrich, dilution 1:50 immunogold); anti-TMG-cap (NA02A, Oncogene, dilution 1:100 IF);

and anti-Y12 (Abcam, ab3138, dilution 1:50 IF). Rabbit polyclonal antibodies anti-coilin 204/10 (Bohmann et al., 1995, dilution 1:300 IF, 1:100 immunogold), anti-fibrillarlin (Jansen et al., 1991, dilution 1:100, immunogold), anti-SUMO1 (FL-101, Santa Cruz Lab. La Jolla, CA, USA, dilution 1:100 IF, 1:50 immunogold); anti-nucleolin (Abcam ab22758, dilution 1:50 immunogold), and anti-Histone H3 (Pierce, dilution 1:10,000 WB). Human anti-Sm (Smith) autoimmune serum C45 that recognizes spliceosomal Sm proteins (Gama-Carvalho et al., 1997) (dilution 1:100 IF).

2.4. Conventional and immunoelectron microscopy

For conventional ultrastructural examination of MNs, WT ($n = 3$) and *SMNΔ7* ($n = 3$) mice were perfused under deep anesthesia with 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Transversal sections (500 μm thick) were obtained with a vibratome and anterior horn tissue fragments were dissected out, rinsed in 0.1 M phosphate buffer, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in acetone and embedded in araldite (Durcupan, Fluka, Switzerland). Ultrathin sections stained with uranyl acetate and lead citrate were examined with a JEOL 201 electron microscope.

For immunoelectron microscopy of fibrillarlin, nucleolin, coilin and SUMO1 WT and *SMNΔ7* mice were perfused with 3.7% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Tissue fragments of the anterior horn were washed in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in increasing concentrations of methanol at -20°C , embedded in Lowicryl K4 M at -20°C and polymerized with ultraviolet irradiation. Ultrathin sections were mounted on nickel grids and sequentially incubated with 0.1 M glycine in PBS for 15 min, 5% BSA in PBS for 30 min and the primary antibody for 2 h at 37°C . After washing, sections were incubated with the specific secondary antibodies coupled to either 10 nm or 15 nm gold particles (BioCell, UK; diluted 1:50 in PBS containing 1% BSA). Following immunogold labeling, the grids were stained with lead citrate and uranyl acetate and examined with a JEOL 201 electron microscope. As controls, ultrathin sections were treated as described above without the primary antibody.

2.5. Electron microscopy in situ transcription assay with 5'-fluorouridine

Active transcription sites were labeled by the incorporation of 5'-fluorouridine (5'-FU) into nascent RNA, as previously reported (Casafont et al., 2006). Briefly, under anesthesia both WT ($n = 3$) and *SMNΔ7* ($n = 3$) mice were given an intravenous injection of 5'-FU (Sigma, UK) at doses of 5 μl/g from a stock solution of 0.4 M 5'-FU in 0.9% saline. Forty-five minutes following the injection of the halogenated nucleotide, all animals were perfused under anesthesia with 3.7% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Tissue fragments from the anterior horn were processed as indicated above for immunogold electron microscopy. Ultrathin sections were sequentially incubated with 0.1 M glycine in PBS for 15 min, 5% BSA in PBS for 30 min and the primary mouse monoclonal anti-BrdU (Clone BU-33, Sigma-Aldrich, UK), diluted 1:25 in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, containing 1% BSA and 0.1 M glycine, for 1 h at 37°C . After washing, the sections were incubated with a goat anti-mouse secondary antibody coupled to 10-nm gold particles (BioCell, UK; diluted 1:50 in PBS containing 1% BSA). Following immunogold labeling, the grids were stained with lead citrate and uranyl acetate and examined with a JEOL 201 electron microscope. As controls, ultrathin sections were treated as described above but with the primary antibody being omitted.

2.6. Real time quantitative PCR (RT-qPCR) for relative gene expression analysis

Five *SMNΔ7* and three WT mice were used for RT-qPCR studies. Mice were decapitated after being anesthetized and the lumbar spinal cord was quickly removed and frozen in liquid nitrogen. RNA was isolated

with Trizol following the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad) and purified with the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) as previously reported (Delgado-Calle et al., 2011; Riancho et al., 2015).

One μg of RNA was reverse-transcribed to first-strand cDNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) using random hexamers as primers. The cDNA concentration was measured in a spectrophotometer (Nanodrop Technologies ND-1000) and adjusted to 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. The expression of rRNAs candidates 45S, 18S, and rRNA precursors containing the 5' junction span of mature 18S was determined by RT-qPCR using gene-specific SYBRGreen (Takara) based primers. The expression of mRNAs of *Smn*, *SMN2* and the nucleolar components UBF (*Ubf1*), nucleophosmin/B23 (*Npm1*), nucleolin (*Ncl*) and fibrillarin (*Fbn1*) were determined using TaqMan predesigned probes (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Each individual RT-qPCR assay was done in triplicate. The threshold cycle (Ct) for each well was determined. The results were normalized to housekeeping genes, phosphoglycerate kinase 1 (*Pgk1*) or *Gapdh*, which had no significant variation in expression across the sample sets and therefore were chosen as normalizers in our experiments. Relative gene expression was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ equation (Livak and Schmittgen, 2001). Each value in this work represents the mean \pm SD of the independent samples obtained under the same conditions and compared to two replicated RT-qPCR analysis. Data were analyzed using Student's *t*-tests for comparisons. Statistical significance was set at $p < 0.05$. All the analyses were carried out using GraphPad Prism 7 software for Mac. SYBRGreen based specific primers for murine rRNAs were: for 45S 5'-gaacgggtggtgtcgtt-3' and 5'-gcgtctcgtctcgtctact-3', for mature rRNA 18S 5'-gatgtagtcgacctg-3' and 5'-ccaaggaaggcagcagc-3' and for 18S 5' junction precursors 5'-cgctctctactcgttg-3' and 5'-ggagaggagcagcagc-3'.

2.7. SDS-PAGE and immunoblotting

Spinal cords from CD1 ($n = 3$), WT ($n = 3$) and SMN Δ 7 ($n = 3$) mice were lysed independently at 4 °C in a buffer containing 50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 1 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, and 10% glycerol and supplemented with complete protease inhibitor cocktail EDTA-free and PhosSTOP (Roche, Laval, Canada). Spinal cord samples were sonicated for 5 cycles of 30 s ON/OFF at 4 °C using a Bioruptor Plus (Diadode) and left on ice for 20 min. Samples were then cleared by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min at 4 °C. Proteins were separated on 4–20% NuPage TG SDS-PAGE gels (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membranes using standard procedures. Mouse monoclonal anti-SMN and rabbit polyclonal anti-coilin and anti-Histone H3 were used. Protein bands were detected with an Odyssey™ Infrared-Imaging System (Li-Cor Biosciences) according to Odyssey™ Western-Blotting Protocol. Immunoblots were developed with anti-mouse IRDye800DX or anti-rabbit IRDye680DX (Rockland Immunochemicals, USA) secondary antibodies. For the quantitative analysis of the blots ImageJ software was used (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>).

2.8. Statistical analysis

For comparisons, data were analyzed using Student's *t*-test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. All the analyses were carried out using GraphPad Prism 7 software for Mac.

3. Results

3.1. Disruption of Cajal bodies and relocation of coilin in MNs of SMN Δ 7 mice

To determine the reorganization of CBs in SMN Δ 7 mice, we performed immunostaining for coilin in dissociated MNs counterstained with propidium iodide for the cytochemical detection of RNAs. At P13–P14, neuronal bodies from WT MNs were well preserved after

dissociation and exhibited prominent nucleoli and extensive cytoplasmic areas occupied by the RNA-rich protein synthesis machinery, the Nissl substance (Fig. 1a). With coilin immunolabeling, CBs appeared to be sharply defined round nuclear bodies frequently attached to the nucleolus (Fig. 1a). In SMN Δ 7 MNs, disruption of CBs was associated with the redistribution of coilin mainly in perinucleolar caps and less frequently within the nucleolus (Fig. 1b). Interestingly, these coilin-positive caps were even observed in MNs with a relatively well-preserved Nissl substance (Fig. 1b), which indicates that this CB alteration is an early nuclear hallmark in MNs of the SMN Δ 7 mice.

Next, we investigated whether perinucleolar caps contain SMN, an essential constituent of canonical CBs, using immunofluorescence (Carvalho et al., 1999). Co-staining for SMN and coilin revealed the typical cytoplasmic distribution of SMN and its nuclear colocalization with coilin in CBs of WT MNs (Fig. 1c–e). Remarkably, SMN was not or was barely detected in both the cytoplasm and coilin-positive perinucleolar caps (Fig. 1f–h). The quantitative analysis of the mean number of CBs per nucleus and the proportion of MNs containing perinucleolar caps and intranucleolar coilin was performed in preparations co-immunostained for coilin and SMN. A depletion of canonical CBs accompanied by approximately 87% of MNs carrying perinucleolar caps and 10% displaying intranucleolar coilin was observed in SMN Δ 7 mice (Fig. 1i).

To correlate the depletion of CBs and the formation of perinucleolar caps of coilin with the expression levels of SMN in SMN Δ 7 mice we performed RT-qPCR and western blot analysis in tissue lysates from the spinal cord at P13–P14. The absence of expression of the mouse *Smn* gene and the expression of the human *SMN2* transgene were demonstrated by RT-qPCR (Fig. 1j). Similarly, the severe reduction of SMN protein levels in SMN Δ 7 mice compared to WT animals, was confirmed by western blot analysis (Fig. 1k). Regarding coilin, despite its important reorganization in the SMN Δ 7 mice, no differences in protein levels were detected (Fig. 1k).

To further investigate whether the CBs and perinucleolar caps of WT and SMN Δ 7 MNs contained other canonical constituents of CBs we performed double immunolabeling for coilin in combination with antibodies for either fibrillarin or spliceosomal snRNP components. As shown in Fig. 2a, the nucleolus-attached CBs of WT neurons contained fibrillarin and were intensely immunostained with the anti-TMG-cap antibody, which recognizes the 5' cap of spliceosomal snRNAs, or with a human autoimmune serum (C45), which recognizes Sm proteins of snRNPs. In contrast, perinuclear caps were not or were only weakly stained with the anti-snRNP antibodies (Fig. 2b).

It is well established that symmetrical dimethylation of coilin increases its affinity for SMN, modulating coilin interaction with snRNPs and regulating CB formation (Boisvert et al., 2002; Hebert et al., 2002; Hebert and Matera, 2000; Hebert and Poole, 2017; Tapia et al., 2010). This prompted us to investigate whether the methylation state of coilin influenced its nuclear targeting in SMN Δ 7 MNs. To do this, we used the monoclonal Y12 antibody, which recognizes dimethylated coilin (Boisvert et al., 2002; Clelland et al., 2009). Interestingly, whereas coilin and Y12 fluorescent signals were strongly colocalized in canonical CBs of WT MNs (Fig. 2a), a weak colocalization signal of Y12 was observed in coilin-positive perinucleolar caps of SMN Δ 7 MNs (Fig. 2b). The fluorescence intensity profile of coilin and Y12 measured across a line confirmed the hypomethylated state of coilin in perinucleolar caps (Fig. 2c). Next, we investigated whether coilin was also redistributed within the nucleolus in the SMN Δ 7 MNs. Double immunolabeling experiments for fibrillarin and coilin revealed that a large portion of the nucleolar surface was covered by small perinucleolar caps and the presence of coilin-positive intranucleolar aggregates in approximately 13% of MNs from the SMN Δ 7 mice (Fig. 2d). Immunostaining for Y12 of nucleoli carrying intranucleolar coilin showed its hypomethylated state, as confirmed by the fluorescence intensity profile of Y12 and coilin (Fig. 2c, d). In conclusion, coilin hypomethylation induced by reduced SMN levels could affect the nuclear targeting of coilin and the assembly of canonical CBs in SMN Δ 7 MNs.

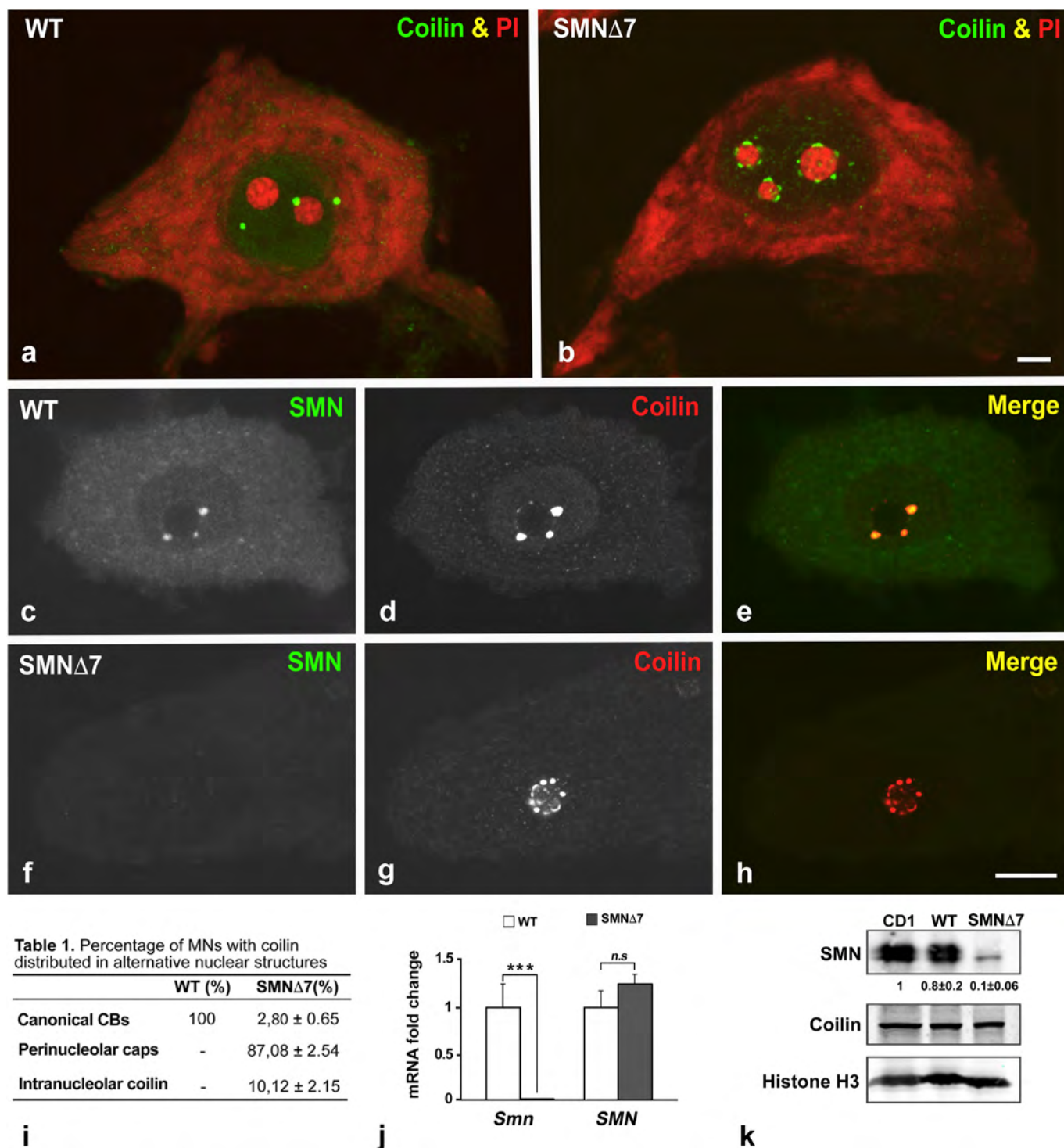


Fig. 1. (a and b) Representative examples of dissociated MNs from WT (a) and SMN Δ 7 (b) mice immunolabeled for coilin and counterstained with propidium iodide (PI). Note the prominent free and nucleolus-attached CBs in the WT MN and the redistribution of coilin as numerous small perinucleolar caps in the SMN Δ 7 MN. Scale bar: 5 μ m. (c–h) Double immunostaining for coilin (red) and SMN (green) of MNs from WT (c–e) and SMN Δ 7 (f–h) mice. Whereas coilin and SMN colocalize in perinucleolar canonical CBs in the WT neuron, the perinucleolar caps of the SMN Δ 7 neuron lack SMN. Note in this neuron the presence of intranucleolar coilin. Scale bar: a–b, 5 μ m; c–h, 7 μ m. (i) Quantitative analysis of the proportion of MNs carrying canonical CBs (coilin and SMN positive), perinucleolar caps and intranucleolar coilin in WT and SMN Δ 7 mice. Data are expressed as mean \pm SD from WT ($n = 5$) and SMN Δ 7 ($n = 5$) mice. CB number were counted on at least 25 MNs from each animal. (j) Quantitative PCR of the expression levels of the endogenous *Smn* gene and *SMN2* transgenes confirmed the absence of *Smn* expression in the SMN Δ 7 mice and the expression of *SMN2* in both WT and SMN Δ 7 mice. Data are expressed as mean \pm SD from WT ($n = 3$) and SMN Δ 7 ($n = 5$) mice. Statistical significance was evaluated by Student's *t*-test, *** $p < 0.0005$. (k) Western blotting of SMN in spinal cord lysates from non-transgenic CD1 and transgenic WT and SMN Δ 7 mice shows the dramatic reduction of SMN protein levels in the SMN Δ 7 mice. Protein levels were normalized to histone H3. The blot is representative of three independent experiments.

The reorganization of CBs and the relocation of coilin in MNs from the SMN Δ 7 mice were validated by electron microscopy analysis. In MNs from WT mice, CBs were frequently found attached to the

nucleolus and exhibited the typical morphology of dense coiled threads (Fig. 3a). The coiled threads of CBs appeared to be specifically decorated with immunogold particles of coilin immunoreactivity (Fig. 3b).

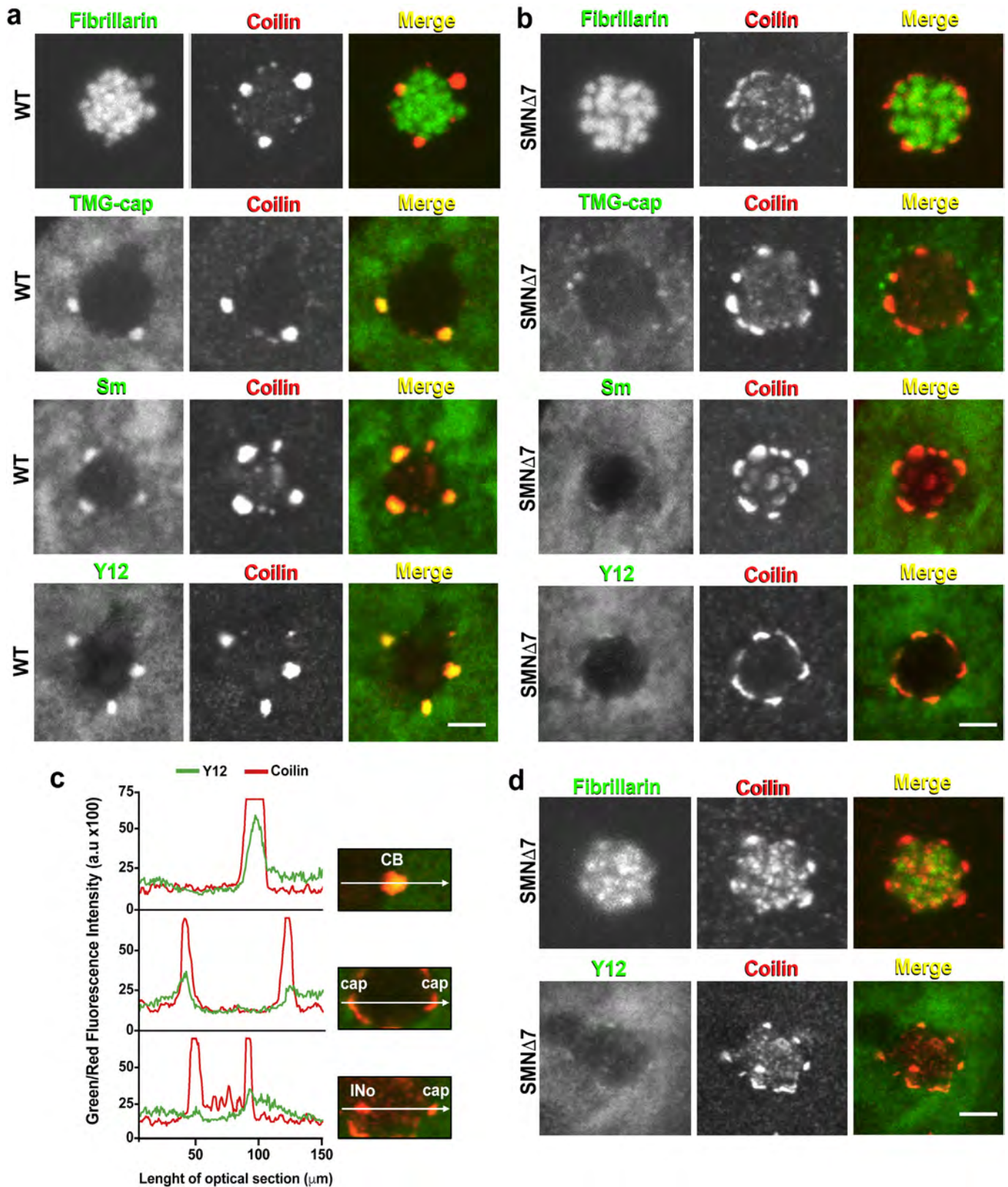


Fig. 2. Organization of canonical perinucleolar CBs and perinucleolar caps in MNs from WT (a) and SMN Δ 7 (b and d) mice. (a) Note the colocalization of the coilin, snRNAs (TMG-cap antibody), Sm complex and Y12 (dimethylated coilin) signals in canonical CBs of WT MNs. (b) In contrast, coilin-positive perinucleolar caps from the SMN Δ 7 MNs lack or have a weak signal of fibrillarlin, snRNA, Sm and Y12. (c) Linear profile across a CB and perinucleolar caps of fluorescent intensity of coilin and Y12 signals confirmed the strong colocalization of both signals in a canonical CB from a WT MN, as well as the weak Y12 signal in perinucleolar caps and the presence of intranucleolar coilin in MNs from the SMN Δ 7 mice. (d) Double immunolabeling for coilin and either fibrillarlin or Y12 illustrating the presence of intranucleolar coilin in MNs from the SMN Δ 7 mice. Scale bar: a-b and d, 2.5 μ m.

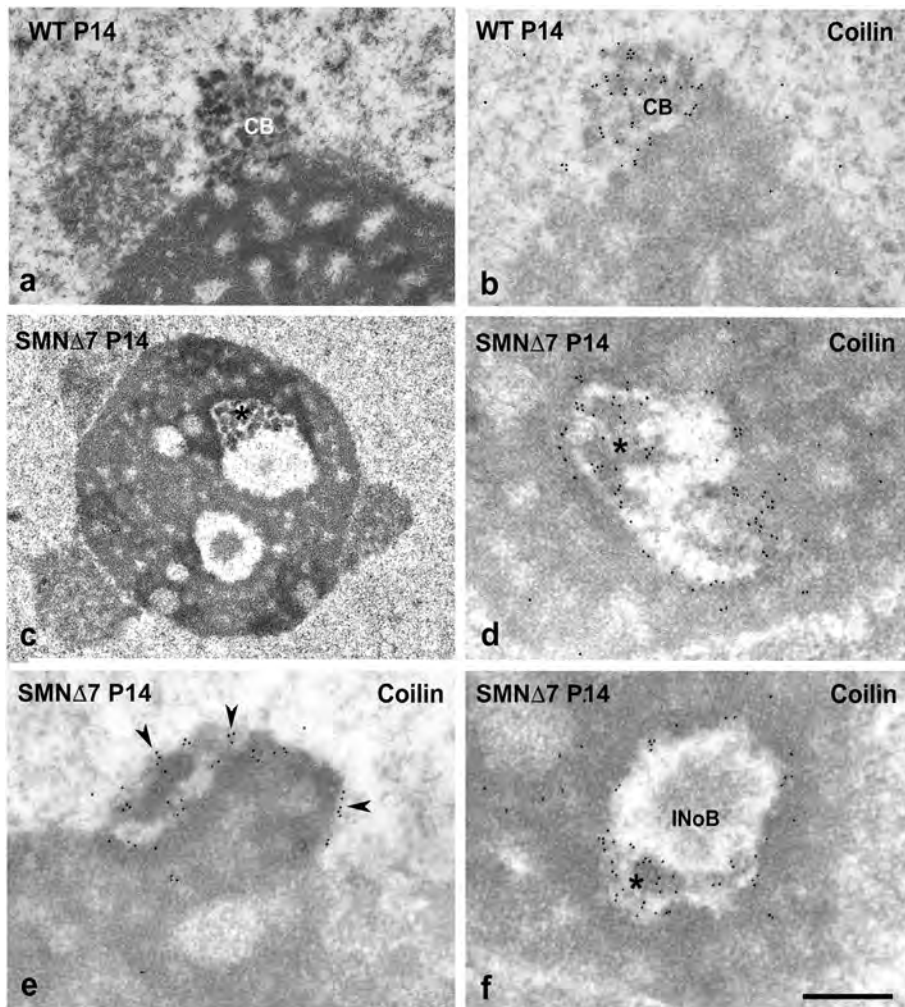


Fig. 3. Electron microscopy images of MNs from WT (a–b) and SMN Δ 7 mice (c–f) illustrating the organization of CBs, perinucleolar caps and intranucleolar coilin. (a–b) Typical nucleolus-attached CB with conventional electron microscopy (a) and immunogold for coilin (b). Gold particles decorate the coiled threads of the CB. (c) Nucleolus carrying a CB-like structure (asterisk) within a nucleolar cavity. (d–f) Coilin immunogold illustrates the presence of coilin-positive aggregates within nucleolar cavities (asterisks in c and f) and as a perinucleolar cap (arrowheads in e). Scale bar: a–b, 500 nm; c, 1 μ m; d–f, 250 nm.

Importantly, intranucleolar residual CBs, which may preserve the coiled thread organization (Fig. 3c), and less structured intranucleolar and perinucleolar coilin aggregates (perinucleolar caps) decorated with immunogold particles were found in some MNs from the SMN Δ 7 animals (Fig. 3d–f).

3.2. Structural, molecular and functional reorganization of the nucleolus in SMN Δ 7 MNs

As indicated above, the nucleolus plays an essential role in ribosome biogenesis, which dynamically accommodates the cytoplasmic translation demands. In the case of SMA MNs, an important issue to be addressed is whether the perturbation of CB-nucleolus interactions due to CB depletion affects the nucleolar organization and function in the ribosome biogenesis and contributes to the SMA molecular pathophysiology.

First, we analyzed variations in the nucleolar size, which is a parameter that is related to the rate of pre-rRNA synthesis and processing (Berciano et al., 2007; Lafarga et al., 1991; Raska et al., 2006). We performed a morphometric analysis of the nucleolar diameter in mononucleolated-dissociated MNs stained with propidium iodide. The nucleolar diameter of SMN Δ 7 MNs showed a significant increase at the late stage (P15) of the disease as compared to the WT ones (Fig. 4a–d). In fact, nucleolar hypertrophy was observed in some MNs with prominent central chromatolysis (Fig. 4c, d).

Next, we investigated the reorganization of FC/DFC nucleolar transcription units (Smirnov et al., 2016) in SMN Δ 7 MNs. We used electron microscopy analysis and immunostaining for UBF, which is a transcription factor of ribosomal genes and is a reliable marker of FCs in mammalian neurons (Berciano et al., 2007; Palanca et al., 2014b). With electron microscopy, FCs appeared as numerous small-size circular areas surrounded by a ring of DFC (Fig. 5a), which corresponded to the immunofluorescence of UBF-positive nucleolar spots distributed throughout the nucleolar body (Fig. 5a, inset). A profound reorganization of the FC/DFC transcription units was commonly observed in MNs from the SMN Δ 7 mice. They included their marginal segregation within the nucleolar body and the formation of enlarged FCs (Fig. 5b, c, insets). Moreover, the quantitative analysis of UBF-positive nucleolar spots revealed a significant reduction in both the mean number of FCs per nucleolus and their packing density (number/ μ m²) (Fig. 5c, inset; e, f). These changes were accompanied by other nucleolar alterations, such as the segregation of large masses of GC and the formation of nucleolar cavities, which frequently contained an electron-dense intranucleolar body (INoB) (Fig. 5b–d, insets).

Since the formation of INoBs in non-neuronal culture cell lines has been associated with the nucleolar retention of SUMO-conjugated nuclear proteins under conditions of nucleolar stress (Abella et al., 2010; Brun et al., 2017), we analyze whether SUMOylated proteins are concentrated in the INoBs of the SMN Δ 7 MNs. Double immunolabeling of

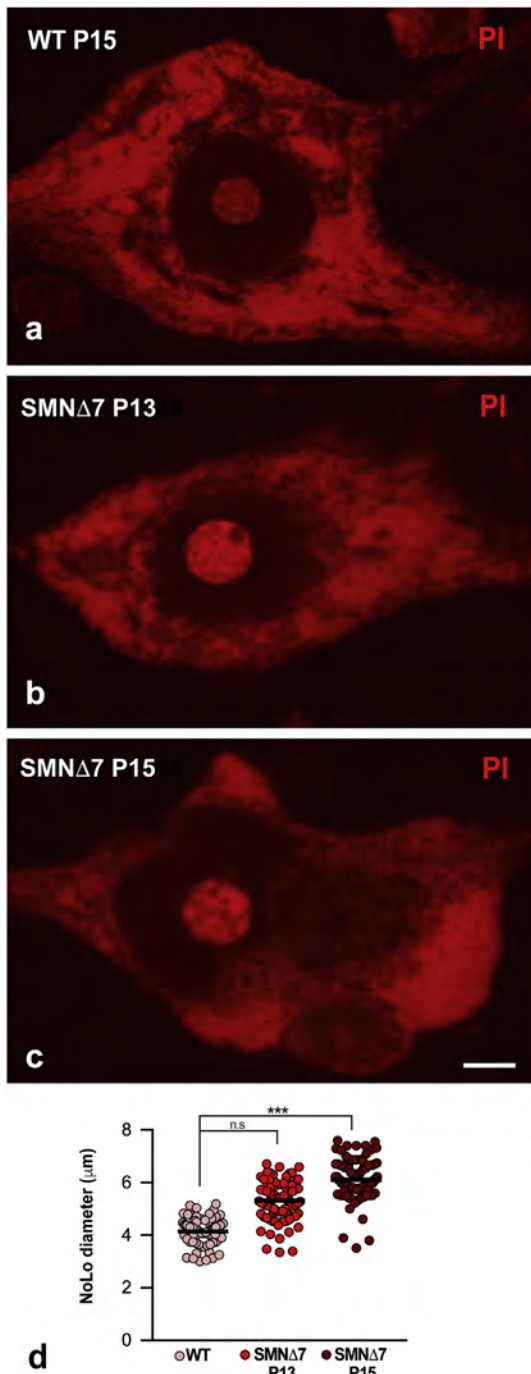


Fig. 4. Representative examples of dissociated MNs from a WT (a) and SMNΔ7 (b–c) mice stained with propidium iodide (PI) for nucleic acids. Note the enlarged nucleoli in SMNΔ7 MNs and a chromatolytic area in panel c. Scale bar: a–c, 5 μm. (d) The morphometric analysis of the nucleolar diameter demonstrates a significant increase in nucleolar size of SMNΔ7 MNs at P15. Nucleolar diameter was measured on at least 25 nucleoli from each WT ($n = 5$), SMNΔ7 at P13 ($n = 5$) and SMNΔ7 at P15 ($n = 5$) mice. The horizontal black line within the scatter dot plots represents the mean for each group. Statistical significance was evaluated by Student's *t*-test, *** $p < 0.0005$, n.s. not significant.

WT MNs for SUMO1 and UBF revealed the presence of numerous UBF-positive FCs and the absence of SUMO1 signal in the nucleolus, even though SUMO1 was diffusely distributed in the nucleoplasm and concentrated at the nuclear envelope of these neurons (Fig. 6a). In contrast, several SUMO1-positive intranucleolar spots, which did not colocalize with UBF-positive FCs, appeared in MNs from the SMNΔ7 mice (Fig. 6b, c). With immunoelectron microscopy, gold particles of SUMO1 immunoreactivity decorated INoBs specifically within nucleolar cavities

(Fig. 6d, e). INoBs appeared to be surrounded by a clear halo, which separated them from the lining of cavities immunolabeled for fibrillarlin (Fig. 6f) or nucleolin (Fig. 6g), which are two molecular components of the DFC. In conclusion, nucleolar retention of SUMOylated proteins is an essential component of the nucleolar response of MNs in SMNΔ7 mice.

The structural and molecular reorganization of the nucleolus in MNs from the SMNΔ7 mice was confirmed with nucleolin immunogold electron microscopy. Nucleolin is a multifunctional nucleolar protein of the DFC that directly interacts with both the rDNA and pre-rRNA. It is involved in the transcription of ribosomal genes and in the first step of pre-rRNA processing (for a review, see Ogawa and Baserga, 2017). In WT MNs, gold particles of nucleolin immunoreactivity mainly decorate the shell of DFC that surrounded FCs (Fig. 7a). This localization in the DFC was preserved in the nucleoli of SMNΔ7 MNs in which nucleolin was conspicuously absent from the enlarged FCs, INoBs and GC (Fig. 7b, c). Moreover, we found fragmented nucleoli with nucleolin immunolabeling forming a reticulated pattern on the DFC in nucleolar fragments (Fig. 7d). Although nucleolin can relocate from the nucleolus to chromatin compartments under cellular stress conditions (Daniely et al., 2002), we did not detect nucleolin in both euchromatin and heterochromatin domains in MNs from the SMNΔ7 mice (Fig. 7b–d).

To establish a possible relationship between nucleolar alterations and nucleolar transcription of ribosomal genes in SMNΔ7 MNs, we performed an *in situ* transcription assay at ultrastructural level. The procedure is based on the incorporation of 5'-FU into nascent RNA 45 min after its intraperitoneal injection. In WT MNs immunogold particles of 5'-FU incorporation were mainly detected on the DFC of the nucleolus, which is the site of transcription of ribosomal genes (Casafont et al., 2006; Cmarko et al., 2000; Raska et al., 2006), whereas FCs were free of immunolabeling (Fig. 8a, b). Gold particles of 5'-FU immunoreactivity were also detected on the euchromatin, which corresponds to the transcription of protein-coding genes (Fig. 8b). As a negative control of the transcription assay, the transcriptionally silent perinucleolar heterochromatin clumps and the DNA-free CBs lacked newly synthesized RNAs (Fig. 8a, b). Interestingly, nucleolar transcription was preserved in the nucleoli of SMNΔ7 MNs. Gold particles preferentially decorated the DFC surrounding the enlarged, transcriptionally silent, FCs, whereas lower particle densities were observed on the GC (Fig. 8c–e). Moreover, in nucleoli with a severe segregation of nucleolar components, 5'-FU incorporation was predominantly localized in the segregated mass of DFC (Fig. 8e). Importantly, double labeling for 5'-FU incorporation and SUMO1 revealed the absence of transcription in INoBs, which were strongly immunolabeled for SUMO1 (Fig. 8f).

To further investigate the relationship between nucleolar alterations and pre-rRNA synthesis and processing, we determined the expression levels of 45S pre-rRNA, intermediate precursors of the 18S rRNA (43S, 34S and 29S), and mature 18S rRNA in spinal cord tissue extracts from WT and SMNΔ7 mice using RT-qPCR (Fig. 9a). The 45S rRNA is very short lived and is considered as an indicator of RNA polymerase I activity, which governs the transcription of ribosomal genes (Mayer et al., 2005). A slight but non-significant reduction of the 45S rRNA was detected in SMNΔ7 mice as compared to the WT ones. Similarly, non-significant variations in the levels of 18S rRNA precursors were observed (Fig. 9b). However, the level of mature 18S rRNA increasing by ~2-fold in SMNΔ7 samples compared to WT ones (Fig. 9b) suggests a nucleolar retention of this mature form of rRNA. The next step was to investigate the expression levels of genes encoding UBF, a transcription factor of the ribosomal genes, as well as fibrillarlin, nucleolin and nucleophosmin/B23, three key proteins for pre-rRNA processing and assembly of pre-ribosomal particles (Boisvert et al., 2007; Raska et al., 2006). Interestingly, the four genes were up-regulated in spinal cord tissue samples from the SMNΔ7 mice (Fig. 9c), which suggests a reactive neuronal response to the dysfunction of protein synthesis machinery in SMNΔ7 mice (Ng et al., 2015). However, it should be noted that these RT-qPCR data included

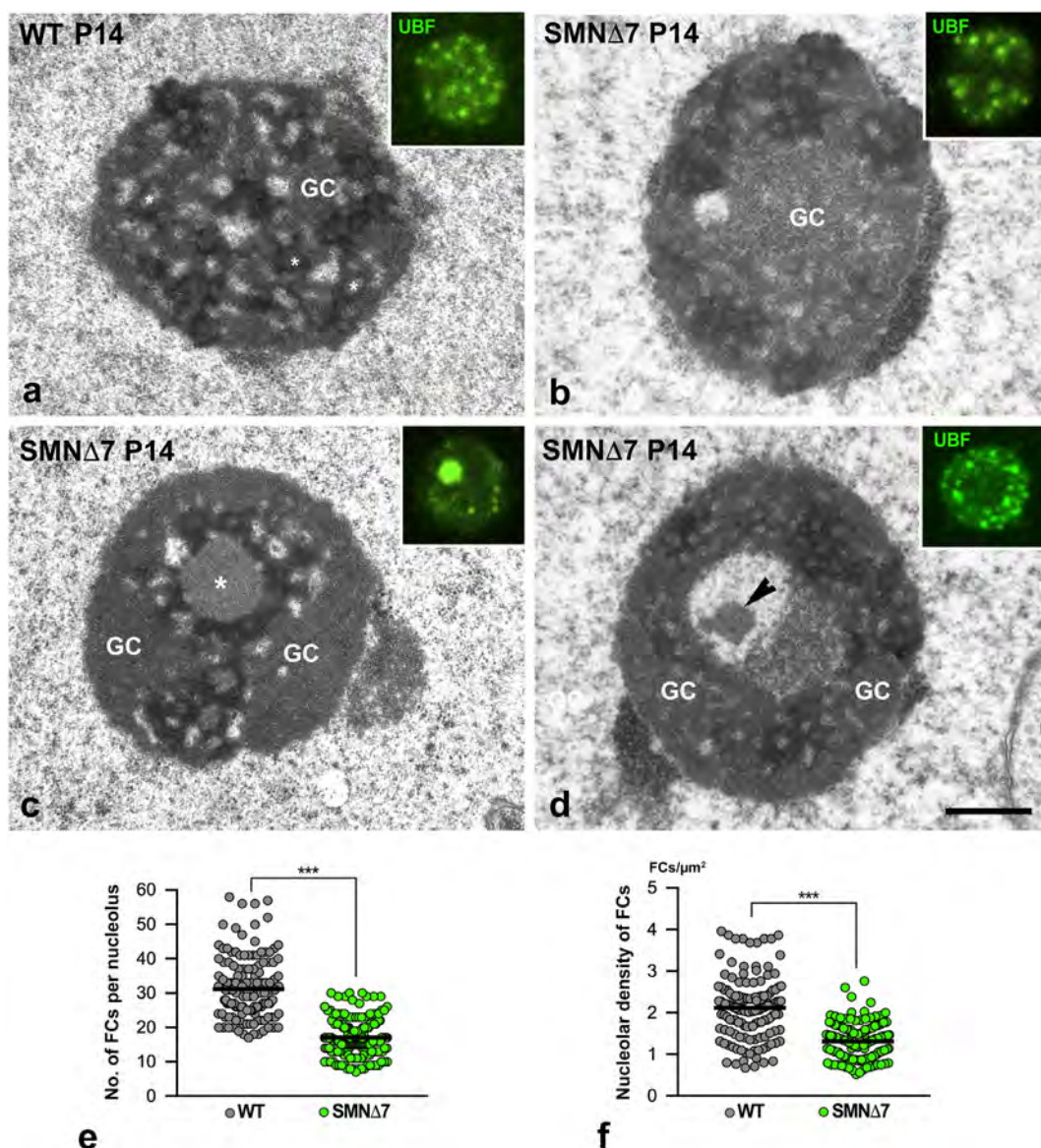


Fig. 5. Electron micrographs of nucleolar alterations in MNs from the SMN Δ 7. (a) Typical nucleolus of a WT MN with a reticulated configuration composed of numerous FCs (asterisks) surrounded by a thin shell of DFC and associated mass of GC. Inset. Distribution of FCs immunolabeled for UBF. (b–d) Nucleolar alterations in MNs include the formation of enlarged FCs (c, asterisk), the segregation of large masses of GC (b–d) and the formation of nucleolar cavities containing INoBs (d). Insets illustrate the redistribution of FCs immunolabeled for the UBF. Scale: a–d, 1.5 μ m. (e–f) Quantitative analysis of the mean number of FCs per nucleolus (e) and of the number of FCs per nucleolar area (f) in WT and SMN Δ 7 MNs immunolabeled for the UBF. The number of FCs was counted on at least 25 nucleoli of each WT ($n = 5$) and SMN Δ 7 ($n = 5$) mice. The horizontal black line within the scatter dot plots represents the mean for each group. Statistical significance was evaluated by Student's t -test, *** $p < 0.0005$.

the whole spinal cord, not only to MNs. Therefore, the involvement of other cell populations in the nucleolar response of SMN Δ 7 MNs cannot be excluded.

3.3. SMA-induced cytoplasmic alterations of the protein synthesis machinery in SMN Δ 7 MNs

Since a key function of the nucleolus is the biogenesis of ribosomes, it prompted us to investigate whether the nucleolar alterations observed in SMN Δ 7 MNs have an impact on the structural organization of the protein synthesis machinery. In fact, previous studies have reported central chromatolysis (disruption of Nissl bodies) in MNs from type I SMA patients (Ito et al., 2011; Tapia et al., 2012) as well as hyper-activation of the endoplasmic reticulum (ER) stress pathway in SMA patient-

derived iPSCs (induced pluripotent stem cells), which underlies MN death in SMA (Ng et al., 2015).

With conventional hematoxylin-eosin staining, WT MNs exhibited strong cytoplasmic basophilia at P14–P15, which reflects the great abundance of polyribosomes. This feature was also confirmed by the prominent Nissl bodies detected with propidium iodide staining for RNAs (Fig. 10a, c). In contrast, in addition to the MN loss previously reported (Tarabal et al., 2014), an overall reduction of cytoplasmic basophilia was found in most SMN Δ 7 MNs (Fig. 10b). In addition, these MNs exhibited different levels of central chromatolysis and some exhibited nuclear eccentricity, which reflects distinct stages of MN degeneration (Fig. 10d–f).

The ultrastructural analysis of WT MNs at P14 revealed the typical arrangement of the rough endoplasmic reticulum (RER) as orderly arrays of nearly parallel flattened cisterns. Between the cisterns numerous

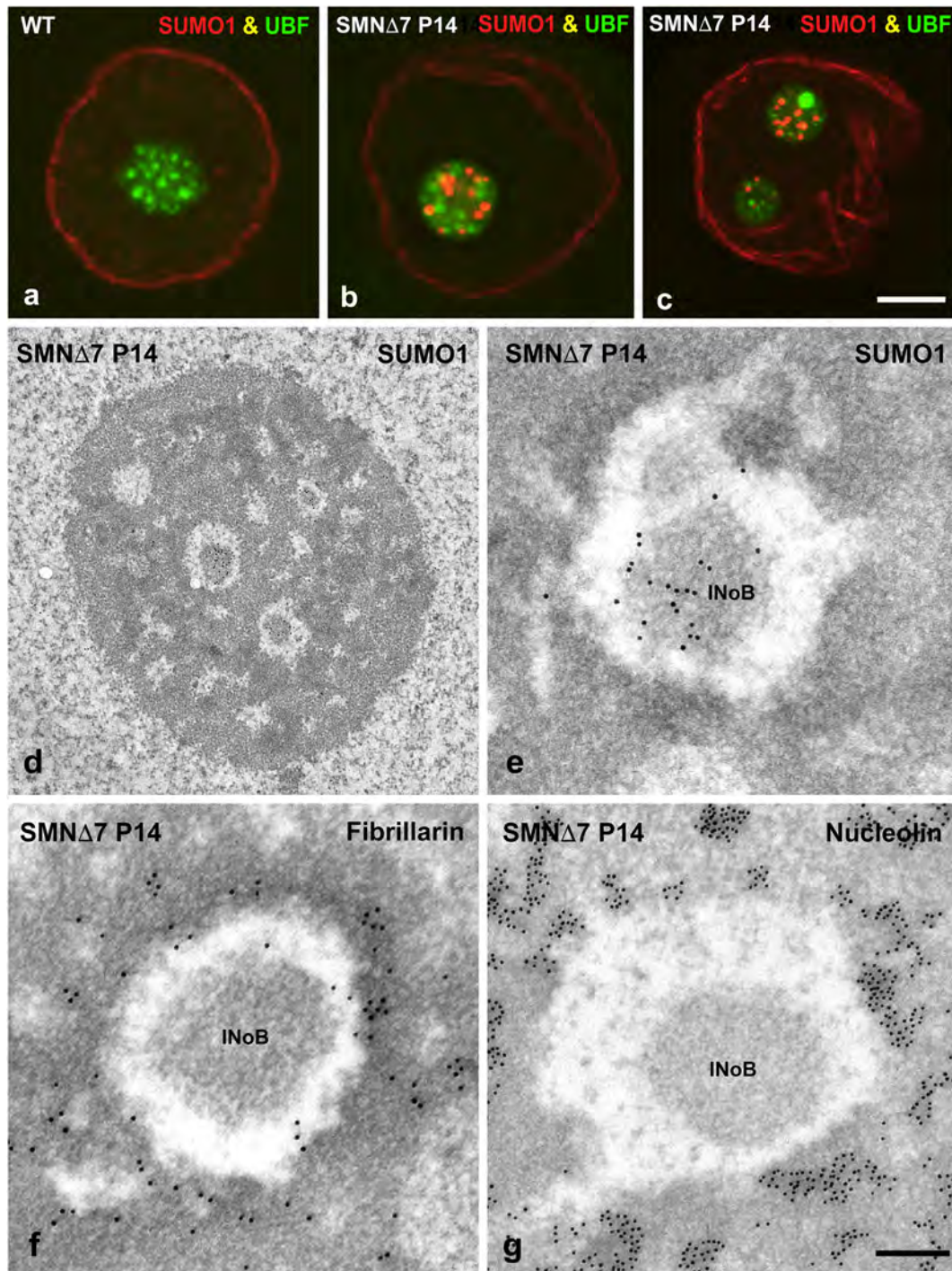


Fig. 6. Formation of INoB in SMNΔ7 MNs. (a) Double immunolabeling for UBF and SUMO1 in a WT MN illustrates a diffuse nuclear staining of SUMO1 and its concentration at the nuclear envelope. SUMO1 is not detected in the UBF-positive nucleolus. (b–c) In contrast, several SUMO1-positive intranucleolar spots, which do not colocalize with UBF, appear in nucleoli from the SMNΔ7 MNs. Immunogold electron micrographs for the detection of SUMO1 (d–e), fibrillarin (f) and nucleolin (g) show the concentration of SUMO1 in INoBs, and the absence of fibrillarin and nucleolin in these bodies, but their presence in the DFC lining the INoB-containing nucleolar cavities. Scale bar: a–c, 5 μm; d, 1 μm; e–g, 500 nm.

free polyribosomes were observed (Fig. 10g). Several structural alterations of the RER were associated with the SMNΔ7 phenotype in MNs at P14–P15. They include the presence of large stretches of the cisternal membranes that are free of polyribosomes (Fig. 10h) and the dilation of the cisternal lumen, which reflects a disturbed ionic balance (Fig. 10i). Disassembly of polyribosomes led to the appearance of numerous monoribosomes, which presumably lack mRNA templates (Fig. 10i, inset) and indicates a blockade of protein synthesis (Baltanas et al., 2011; Lafarga et al., 1997). Moreover, extensive RER-poor chromatolytic areas were observed (Fig. 10j). In conclusion, nucleolar alterations in

MNs from SMNΔ7 mice are associated with a severe perturbation of the protein synthesis machinery.

4. Discussion

The present data revealed that during the postnatal period, spinal cord MNs from the SMNΔ7 mice undergo a disruption of CBs, which is coupled with severe alterations in the nucleolus and protein synthesis machinery. We propose that the disturbance of physiological interactions between

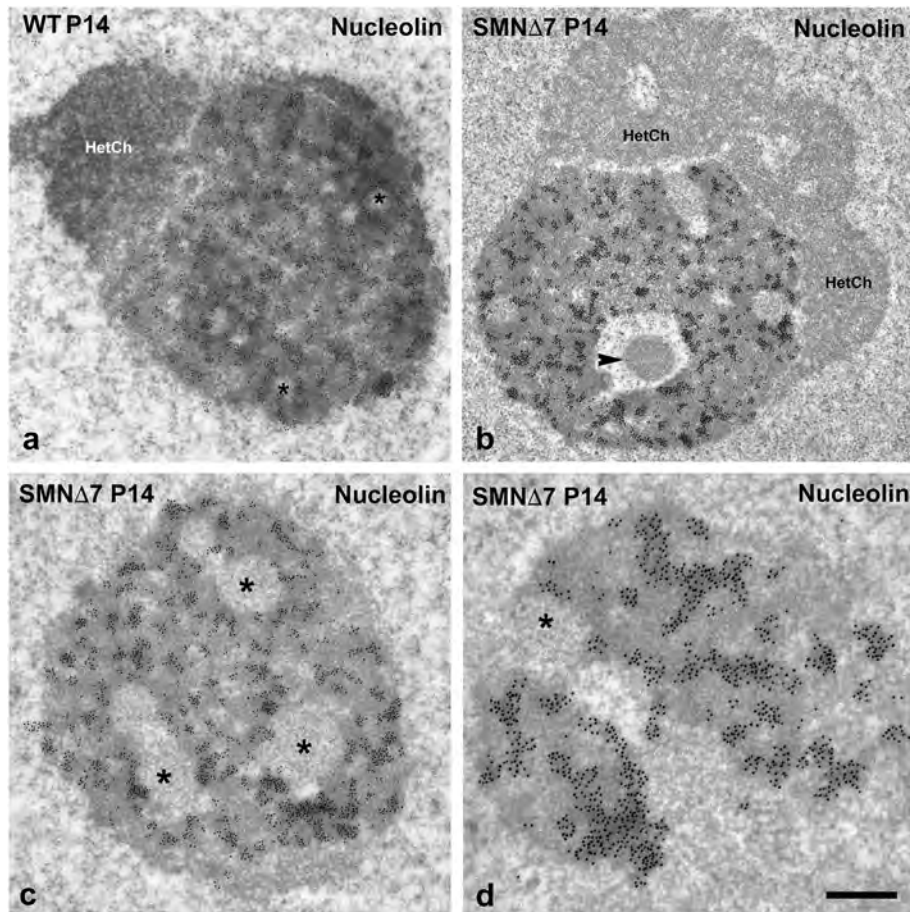


Fig. 7. (a–d) Immunogold electron microscopy of nucleolin in nucleoli from WT (a) and SMN Δ 7 (b–d) MNs. Gold particles decorate the DFC in all nucleoli. Whereas numerous small transcription units (FC/DFC) are seen (asterisks) in the WT nucleolus (a), a few large FCs (asterisks) appear in SMN Δ 7 nucleoli (b–d). Note a nucleolin-negative INoB (b, arrowhead) and a fragmented nucleolus with a reticulated pattern of nucleolin immunoreactivity on the DFC (d). Nucleolin labeling was not detected in euchromatin domains and heterochromatin (HetCh) masses. Scale bar: a–b, 1.5 μ m; c, 1.2 μ m; d, 700 nm.

CBs and nucleoli is an important component of the dysfunction of nuclear RNA metabolism in SMA MNs.

A poorly understood aspect in SMA is why MNs harboring the same deletion or mutation of the *SMN1* gene are differently affected. Our results in SMN Δ 7 mice confirm this heterogeneity with different levels of neuronal dysfunction reflected by the magnitude of nucleolar alterations and chromatolysis. In this context, a recently reported single-cell analysis of SMN has shown that there are marked variations in the SMN protein levels for each cell among MNs from the same subject that specifies which neurons are more or less likely to die (Rodríguez-Muela et al., 2017). The authors suggest that SMN is an essential regulator of MN survival.

Since SMA disease severity correlates with SMN protein levels in humans and mice (Burghes and Beattie, 2009; Lefebvre et al., 1997; Tisdale and Pellizzoni, 2015), a major goal of understanding the cellular and molecular pathophysiology of the disease is to determine how the reduced levels of SMN impact on the organization and function of CBs and the effects on nuclear RNA metabolism in MNs.

4.1. Depletion of canonical Cajal bodies

It is well established that the CB is a common central hub for small RNAs and small RNPs of different classes within the nucleus (Machyna et al., 2014; Sawyer et al., 2016; Trinkle-Mulcahy and Sleeman, 2017). The best known function of the CB is the SMN-dependent assembly of both spliceosomal snRNPs and nucleolar snoRNPs required for pre-mRNA and pre-rRNA processing, respectively (Machyna et al., 2013; Machyna et al., 2014; Massenet et al., 2017; Matera and Wang, 2014).

Our results show that the SMN deficiency-induced depletion of CBs is an overall manifestation of MNs in the SMN Δ 7 mice, even in neurons with well-preserved protein synthesis machinery. This finding supports that CB loss is an early sign of MN dysfunction in SMA.

We have previously reported a decrease in the number of canonical CBs associated with chromatolysis in MNs from a patient with type I SMA (Tapia et al., 2012). In the case of the SMN Δ 7 mice, the depletion of CBs is consistent with the perturbation of the splicing previously reported in SMN-deficient MNs (Bäumer et al., 2009; Doktor et al., 2017; Tsuiji et al., 2013; Zhang et al., 2008). In this vein, the depletion of CBs reported here could impact the biogenesis of spliceosomal snRNPs required for the assembly of functional spliceosomes, which results in a splicing pathology. In fact, depletion of CBs in cultured cells derived from SMA patients is associated with a decreased U4/U6-U5 tri-snRNP assembly, a key maturation step of spliceosomal snRNPs. Importantly, this assembly of snRNPs is approximately 10-fold faster in CBs than in nucleoplasm, which supports the key role of CB integrity for efficiently snRNP biogenesis (Machyna et al., 2013; Novotny et al., 2011). Moreover, recent molecular studies have reported that SMN deficiency causes tissue-specific widespread defects in splicing (Tsuiji et al., 2013; Zhang et al., 2008). The majority of introns are processed by the major (U2-dependent) spliceosome, and only a few hundred introns are spliced by the minor (U12-dependent) spliceosome (Fischer et al., 2011; Tisdale and Pellizzoni, 2015). While leaving open the possibility that SMN deficiency can affect the activity of the major spliceosome (Jodelka et al., 2010; Zhang et al., 2008), several studies indicate that splicing of some, but not all, minor introns is particularly affected in patient cells and animal models of SMA (Boulisfane et al., 2011; Doktor et

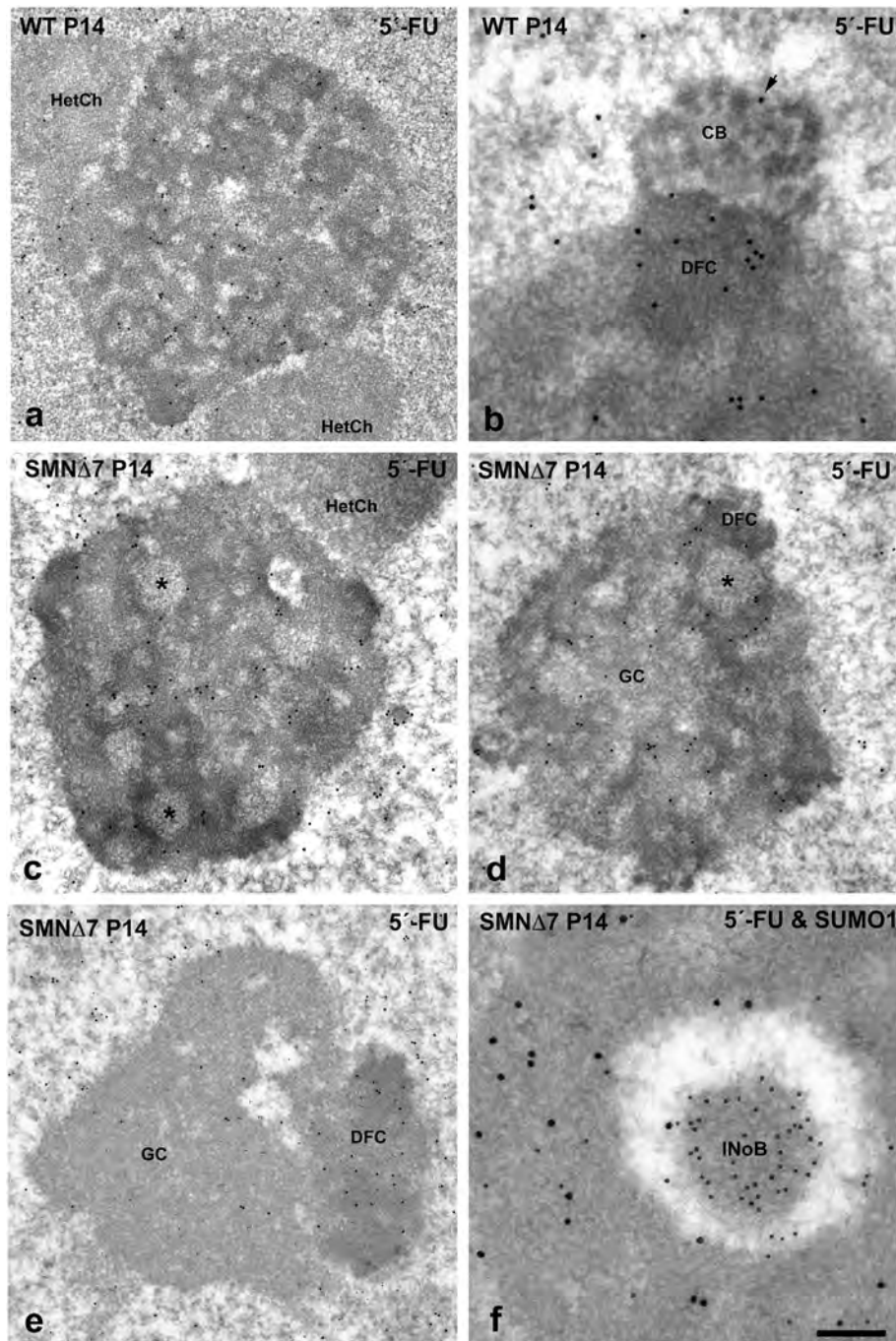


Fig. 8. *In situ* transcription assay at ultrastructural level. Immunogold particles label nucleolar sites of 5'-FU incorporation. (a–b) Newly synthesized RNAs are detected on the DFC of nucleoli and euchromatin, whereas perinucleolar heterochromatin masses (HetCh) and CB are free of labeling. (c–e) 5'-FU incorporation is preserved in the DFC surrounding large FCs or forming segregated mass in nucleoli from the SMN Δ 7 MNs. Double immunolabeling for SUMO1 (small particles) and 5'-FU incorporation (large particles) demonstrates the absence of nascent RNA in an INoB and its presence in the DFC. Scale bar: a and c–e, 1 μ m; b, 400 nm; f, 150 nm.

al., 2017; Gabanella et al., 2007; Jangi et al., 2017; Lotti et al., 2012). In conclusion, our results are consistent with the view that CB homeostasis requires SMN (Shpargel and Matera, 2005).

It is noteworthy that we have not found Gems, which are coilin-free nuclear bodies that concentrate SMN (Cauchi, 2014; Liu and Dreyfuss, 1996; Navascues et al., 2004), in both WT and SMN Δ 7 postnatal (P13–P14) MNs. Nevertheless, Gems have previously been reported in fetal MNs (Lefebvre et al., 1997; Young et al., 2001). Studies using neuron-like cell lines reported an increased recruitment of SMN to CBs and progressive colocalization of Gems and CBs during neuronal differentiation (Clelland et al., 2009; Navascues et al., 2004), which suggests that the presence of Gems is restricted to fetal immature neurons. In this

context, we propose that depletion of CBs, rather than Gems (Cauchi, 2014; Lafarga et al., 2017), is a nuclear hallmark for postnatal maturing MNs from the SMN Δ 7 mice.

4.2. Perturbation of the Cajal body-nucleolus interactions

We propose that the breakdown of canonical CBs may perturb the close functional relationship between CBs and the nucleolus reported in mammalian neurons (Lafarga et al., 2017; Trinkle-Mulcahy and Sleeman, 2017). The best known functional interaction between these two structures is the targeting of mature snoRNPs to the nucleolus.

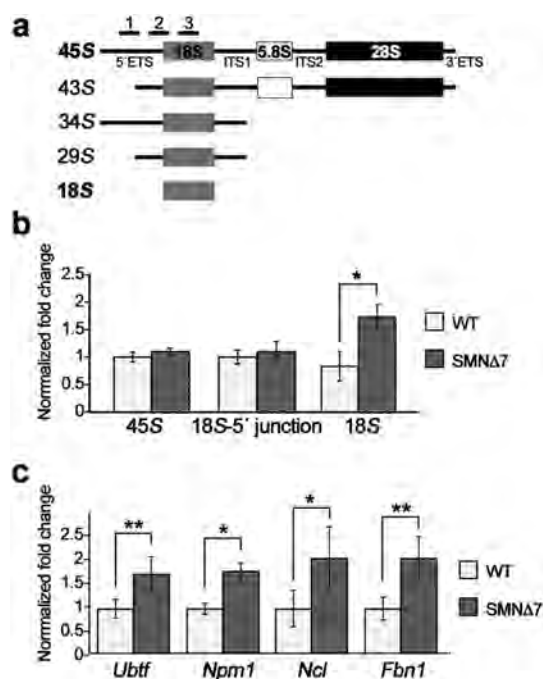


Fig. 9. (a) Schematic representation of the 45S repeating unit of the rDNA repetitive sequence. ETS, external transcribed sequence; ITS, internal transcribed sequence. Intermediate products of processing the 45S precursor that ultimately give rise to mature 18S. Primers to 45S (1), 18S 5' junction precursors (2) and mature 18S (3) are indicated. (b) Representative RT-qPCR analysis of the relative expression levels of rRNA precursor 45S, 18S rRNA intermediates, mature 18S rRNA and (c) genes encoding the major nucleolar proteins UBF (*Ubf1*), nucleophosmin/B23 (*Npm1*), nucleolin (*Ncl*) and fibrillarin (*Fbn1*) in spinal cord tissue RNA extracts from WT ($n = 3$) and SMNΔ7 ($n = 5$) mice. Bars represent mean \pm SD. Statistical significance was evaluated by Student's *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. Each RT-qPCR was repeated in at least three replicates.

The frequent association of canonical CBs with nucleoli, which we reported in WT MNs, is consistent with the view that CBs and nucleoli are functionally coupled in the processing of different classes of snoRNAs and snoRNPs (Massenet et al., 2017). This is particularly relevant in MNs that have very high requirements for ribosome biogenesis to accommodate a great rate of protein synthesis (Lafarga et al., 2017; Riancho et al., 2014). We postulate that the SMN-deficient depletion of CBs in SMNΔ7 MNs may also impact the assembly and traffic of snoRNPs as well as nucleolar functions in pre-rRNA processing. Indeed, snoRNAs are the most abundant family of small nuclear RNAs found in CBs, and some snoRNAs and snoRNPs traffic through CBs before being routed to nucleoli (Kiss, 2002; Machyna et al., 2014; Massenet et al., 2017). In this vein, the transient localization of micro-injected U3 snoRNA, which is essential for rRNA processing, to CBs prior to their steady-state concentration in nucleoli has been reported in *Xenopus* oocytes (Narayanan et al., 1999). This traffic seems to be dependent on the nuclear exportin CRM1 (Boulon et al., 2004; Sleeman, 2007). In SMA cellular models, it has been shown that the localization of the snoRNP associated proteins Nopp140 and dyskerin/NAP57 in CBs is reduced in primary SMA-derived and SMN-deficient cells (Renvoise et al., 2009), which suggests that there is defective snoRNP assembly. In fact, Nopp140 shuttles between the nucleolus and the CB, which indicates that it may function in the transport of snoRNPs between these two structures (Isaac et al., 1998; Massenet et al., 2017). Interestingly, siRNA knockdown experiments have demonstrated that SMN is necessary for accumulation of Nopp140 in CBs (Renvoise et al., 2009). Therefore, the reduced Nopp140 levels in CBs from the SMN-deficient cells might interfere with the transport of snoRNPs to the nucleolus.

In addition to the nucleolar traffic of snoRNAs and snoRNPs, experimental evidence indicates that under certain conditions spliceosomal snRNPs and some components of the Sm protein complex of snRNPs localize to the nucleolus before nuclear speckles (Sleeman and Lamond,

1999; Yu et al., 2001). This observation suggests that CBs and nucleoli share a role in the modification and assembly of some spliceosomal snRNPs such as the U2 snRNPs. In conclusion, the disassembly of canonical CBs found in SMNΔ7 MNs could compromise the supply of both snRNPs to the spliceosome, and snoRNPs to the nucleolus, which results in a dysfunction of splicing and the nucleolus. The scaffold CB protein coilin seems to link snRNP and snoRNP biogenesis, making CBs the center of small nuclear RNA metabolism (Machyna et al., 2013; Machyna et al., 2014).

A further dimension to the close interactions between CBs and nucleoli comes from the observation that some miRNAs, which are involved in post-transcriptional gene silencing, have homology to CB-derived snoRNAs and exhibit a nucleolar localization (Ender et al., 2008; Ono et al., 2011).

4.3. Relocalization of coilin to perinucleolar caps and/or to the nucleolus

In addition to CB disassembly, we found that SMN deficiency in MNs from the SMNΔ7 mice often resulted in relocalization of coilin to perinucleolar caps and/or the nucleolus. The formation of perinucleolar caps has been reported under conditions of transcriptional inhibition in HeLa cell lines and in osmotically stressed rat supraoptic neurons (Carmo-Fonseca et al., 1992; Lafarga et al., 1998; Navascues et al., 2008; Shav-Tal et al., 2005) as well as in HeLa cells following DNA damage induced by UV- or gamma-irradiation (Cioce et al., 2006; Gilder et al., 2011). Similarly, previous observations in SMN knockdown HeLa cells by siRNA have demonstrated a dramatic reduction in CB numbers with coilin relocalization to perinucleolar caps and nucleoli (Shpargel and Matera, 2005). Collectively, these experimental conditions might disrupt transcription, which leads to a reduced demand for mRNA splicing and fewer or total depletion of CBs.

By western blotting, we have not found variations in protein levels of coilin in the spinal cord of the SMNΔ7 mice, which suggests that coilin disassembled from disrupted CBs in MNs relocalizes to perinucleolar caps and/or the nucleolus. Coilin contains a cryptic nucleolar localization signal (Hebert and Matera, 2000), and the nucleolar targeting of coilin observed here in MNs may be promoted by a hypomethylated state shown with the Y12 antibody. Coilin has been demonstrated to be subject to symmetrical dimethylation of arginines by methyl arginine transferase 5 (PRMT5), a modification that increases the affinity of coilin for interacting with both SMN and some Sm proteins of snRNPs (Boisvert et al., 2002; Hebert et al., 2002). SMN-deficiency in the SMN Δ7 mouse seems to change both the coilin interactome and post-translational modifications affecting CB assembly. In fact, we have previously demonstrated the presence of intranucleolar coilin in MNs from a type I SMA patient (Tapia et al., 2012), and treatment with inhibitors of protein methylation (MTA, Adox) disassembles CBs and induces nucleolar targeting of coilin in MCF7 cells as well as the formation of perinucleolar caps in trigeminal ganglion neurons (Navascues et al., 2008; Tapia et al., 2010).

4.4. Nucleolar alterations

Since SMA has a monogenic cause, which is the deletion or mutation of the *SMN1* gene, the primary consequence at the nuclear level of the SMN deficiency is the severe reduction of snRNP biogenesis and the disruption of CBs. In this context, we consider that the nucleolar alterations reported in this study for MNs from SMNΔ7 mice can be, at least in part, secondary to the dysfunction of CBs. We have observed different levels of nucleolar alterations among SMNΔ7 MNs, which reflects the heterogeneity of the neuronal response mentioned before. These alterations included retention of SUMOylated proteins in INoBs, reduction in the number and reorganization of FC/DFC transcription units, as well as segregation of DFC and GC.

As far as we know, this is the first observation of SUMO1-positive INoBs in neurons, which represents a prominent feature of the nucleolar

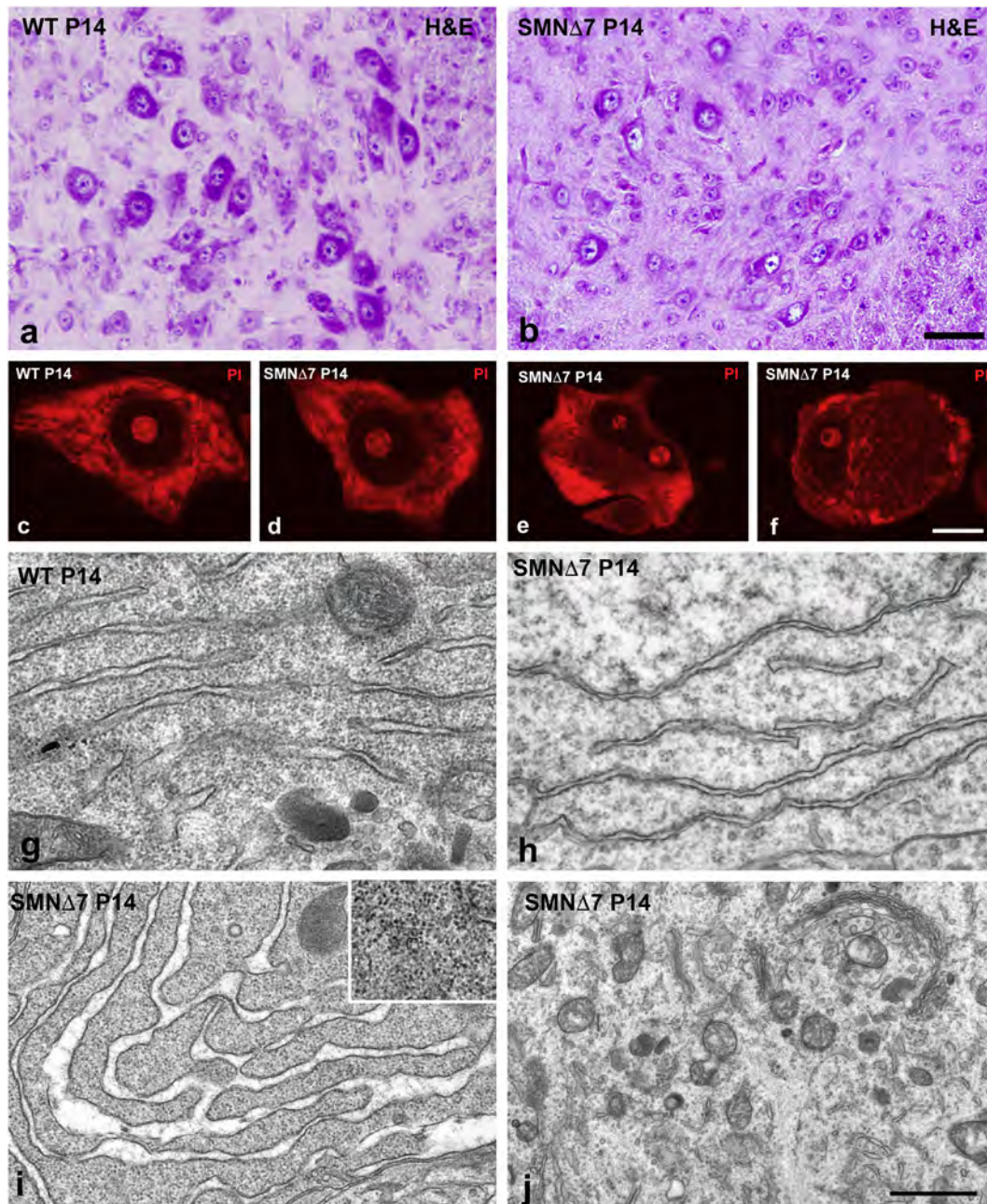


Fig. 10. (a–b) Panoramic micrographs taken from the anterior horn of spinal cord from WT (a) and SMN Δ 7 (b) mice stained with hematoxylin and eosin. Note the neuronal loss and the reduction of cytoplasmic basophilia in the SMN Δ 7 sample. (c–f) Dissociated MNs stained with propidium iodide (PI) for the cytochemical detection of RNAs in nucleoli and Nissl substance. Note the progressive central chromatolysis and nuclear eccentricity in SMA MNs (d–f). (g–j) Electron micrographs of MN cytoplasm from a WT (g) and SMN Δ 7 (h–j) mice. Whereas the WT neuron exhibits typical arrays of RER and numerous membrane-bound and free polyribosomes, SMN Δ 7 neurons show loss of polyribosomes with degranulation of RER cisterns (h), dilation of cisternal lumen and disaggregation of polyribosomes into monoribosomes (i, inset), as well as chromatolytic areas (j). Scale bar: a–b, 50 μ m; c–f, 10 μ m; g–j, 2 μ m.

alterations found in MNs of SMA mice. INoBs have been reported in cultured non-neuronal cells, and their formation is promoted by cellular stressors, such as DNA damage or proteasome inhibition (Abella et al., 2010; Hutten et al., 2011; Souquere et al., 2015; Brun et al., 2017). As revealed in this study, INoBs lack major nucleolar proteins such as UBF, nucleolin, nucleophosmin and fibrillarin, and they are also transcription-free nucleolar compartments. Moreover, the concentration of the post-translational modifier SUMO1 suggests that they accumulate or actively produce SUMOylated proteins. Other molecular components previously identified in INoBs from non-neuronal cultured cell lines include DNA repair factors, proteasomes, nuclear exportin CRM1 and some pre-mRNA processing factors (Hutten et al., 2011). However, we have not localized snRNP components and coilin in INoBs. In this context, it has

been established that several nuclear proteins transit through the nucleolus on their way from the nucleus to the cytoplasm and that some cellular stressors inhibit this traffic, which leads to nucleolar retention of proteins (Abella et al., 2010). Furthermore, a nucleolar detention signal that is able to immobilize proteins in the nucleolus has recently been identified (Audas et al., 2012). In this context, the formation of INoBs seems to reflect a mechanism of retention of nuclear proteins under conditions of nucleolar insufficiency in degenerating SMN Δ 7 MNs.

Regarding the nucleolar transcription machinery, the presence of numerous tiny FC/DFC units, which were found in this study with UBF immunostaining and ultrastructural analysis, in WT nucleoli is characteristic of actively protein-synthesizing cells with high transcriptional activity (Berciano et al., 2007; Jordan and McGovern, 1981; Lafarga et

al., 1991; Palanca et al., 2014b). In contrast, the reduction in number and increase in size of these transcription units observed in SMNΔ7 MNs was associated with low rates of transcription and protein synthesis in other cell types (Jordan and McGovern, 1981; Raska et al., 2006; Smirnov et al., 2016). The dysfunction of nucleolar transcription in MNs of SMNΔ7 is also supported by the moderate or severe segregation of DFC and GC in separate masses. In fact, a severe nucleolar segregation is a typical manifestation of the impairment of RNA polymerase I activity in neurons following treatment with actinomycin D, which is an inhibitor of nucleolar transcription (Carmen Lafita-Navarro et al., 2016; Casafont et al., 2006).

The alterations observed in SMA MNs are consistent with a partial nucleolar insufficiency, which may result in nucleolar stress and contribute to neurodegeneration. The nucleolar stress response, which is induced by the impairment of rRNA synthesis (Boulon et al., 2010; Olson, 2004), is emerging as an important sensor of neuronal dysfunction in several neurodegenerative disorders (Baltanas et al., 2011; Garcia-Esparcia et al., 2015; Hernandez-Ortega et al., 2016; Hetman and Pietrzak, 2012; Parlato and Kreiner, 2013). Interestingly, our results from the *in situ* transcription assay and expression levels of the 45S pre-rRNA indicate that, at least in part, a basal level of ribosomal gene transcription is preserved in MNs of SMNΔ7 mice. Additionally, we detected increased nucleolar size and augmented levels of the mature 18S rRNA, but not of its precursors 43S, 34S or 29S. The lack of significant changes in the expression levels of 45S rRNA and 18S pre-rRNA intermediates suggests that the associated increase in mature 18S rRNA is simply caused by nucleolar retention in the accumulated GC, which reflects defective processing and export of this rRNA. This defect may result in an increase in nucleolar size unaccompanied by activation of nucleolar functions. Indeed, the up-regulation of genes encoding UBF, nucleolin, fibrillarin and nucleophosmin1/B23 in the spinal cord may be a reactive and neuroprotective cellular response to nucleolar dysfunction. Such a compensatory response to the disorganization of both nucleolar transcription and protein synthesis (chromatolysis) machinery might be essential for neuronal survival until advanced stages of neuronal degeneration. Importantly, the increase in 18S rRNA and up-regulation of genes encoding nucleolin and nucleophosmin1 have been reported in the frontal cortex in Parkinson's disease at Braak stages 5–6 (Garcia-Esparcia et al., 2015). Moreover, increased expression of 28S rRNA occurs in the CA1 region of the hippocampus at advanced stages of Alzheimer's disease (Hernandez-Ortega et al., 2016). Similarly, inhibition of the proteasome with Bortezomib in rat sensory ganglion neurons, which produces neurodegeneration, is associated with nucleolar hypertrophy and up-regulation of genes encoding rRNA and several major nucleolar proteins (Palanca et al., 2014a,b). Collectively, these data suggest that, dependent on the nervous center and disease stage, neurons can up-regulate genes related to nucleolar functions as an attempt to prevent neuronal death.

In conclusion, the organization of CBs and nucleoli is emerging as a reliable indicator of the neuronal status under physiological and neurodegenerative conditions. In this context, the stimulation of CB and nucleolar functions may provide a therapeutic strategy to compensate for degenerative neuronal dysfunction.

Acknowledgments

The authors wish to thank Raquel García-Ceballos for technical assistance. The authors are also indebted to Prof. A. I. Lamond (University of Dundee), for the rabbit anti-coilin antibody, and to Prof. Maria Carmo-Fonseca (IMM, Lisbon) for the rabbit anti-fibrillarin antibody and anti-Sm human autoimmune serum, and Prof. Josep E. Esquerda for critical reading of the manuscript and helpful suggestions. This work was supported by the following grants: "Dirección General de Investigación de Spain (BFU2014-54754-P)", "Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED; CB06/05/0037)" from Spain, and "Ministerio de Economía y Competitividad" of Spain

cofinanced by FEDER (SAF2015-70801-R). Dr. Tapia is a recipient of a grant from SMA Europe cofinanced by FundAME (Spain) and "Instituto de Investigación Valdecilla" (IDIVAL; Next-Val) from Santander, Spain.

References

- Abella, N., Brun, S., Calvo, M., Tapia, O., Weber, J.D., Berciano, M.T., Lafarga, M., Bachs, O., Agell, N., 2010. Nucleolar disruption ensures nuclear accumulation of p21 upon DNA damage. *Traffic* 11, 743–755.
- Audas, T.E., Jacob, M.D., Lee, S., 2012. Immobilization of proteins in the nucleolus by ribosomal intergenic spacer noncoding RNA. *Mol. Cell* 45, 147–157.
- Baltanas, F.C., Casafont, I., Weruaga, E., Alonso, J.R., Berciano, M.T., Lafarga, M., 2011. Nucleolar disruption and Cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in purkinje cells. *Brain Pathol.* 21, 374–388.
- Bäumer, D., Lee, S., Nicholson, G., Davies, J.L., Parkinson, N.J., Murray, L.M., Gillingwater, T.H., Ansorge, O., Davies, K.E., Talbot, K., 2009. Alternative splicing events are a late feature of pathology in a mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS Genet.* 5, 1000773.
- Berciano, M.T., Novell, M., Villagra, N.T., Casafont, I., Bengoechea, R., Val-Bernal, J.F., Lafarga, M., 2007. Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons. *J. Struct. Biol.* 158, 410–420.
- Bohmann, K., Ferreira, J.A., Lamond, A.I., 1995. Mutational analysis of p80 coilin indicates a functional interaction between coiled bodies and the nucleolus. *J. Cell Biol.* 131, 817–831.
- Boisvert, F.M., Cote, J., Boulanger, M.C., Cleroux, P., Bachand, F., Autexier, C., Richard, S., 2002. Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* 159, 957–969.
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J., Lamond, A.I., 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 574–585.
- Boulsifane, N., Choleza, M., Rage, F., Neel, H., Soret, J., Bordonne, R., 2011. Impaired minor tri-snRNP assembly generates differential splicing defects of U12-type introns in lymphoblasts derived from a type I SMA patient. *Hum. Mol. Genet.* 20, 641–648.
- Boulon, S., Verheggen, C., Jady, B.E., Girard, C., Pesca, C., Paul, C., Ospina, J.K., Kiss, T., Matera, A.G., Bordonne, R., Bertrand, E., 2004. PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Mol. Cell* 16, 777–787.
- Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M., Lamond, A.I., 2010. The nucleolus under stress. *Mol. Cell* 40, 216–227.
- Brun, S., Abella, N., Berciano, M.T., Tapia, O., Jaumot, M., Freire, R., Lafarga, M., Agell, N., 2017. SUMO regulates p21Cip1 intracellular distribution and with p21Cip1 facilitates multiprotein complex formation in the nucleolus upon DNA damage. *PLoS One* 12, e0178925.
- Burghes, A.H., Beattie, C.E., 2009. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 597–609.
- Bursac, S., Brdovcak, M.C., Donati, G., Volarevic, S., 2014. Activation of the tumor suppressor p53 upon impairment of ribosome biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 817–830.
- Carmen Lafita-Navarro, M., Blanco, R., Mata-Garrido, J., Liano-Pons, J., Tapia, O., Garcia-Gutierrez, L., Garcia-Alegria, E., Berciano, M.T., Lafarga, M., Leon, J., 2016. Mxd1 localizes in the nucleolus, binds UBF and impairs rRNA synthesis. *Oncotarget* 7, 69536–69548.
- Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Carvalho, M.T., Lamond, A.I., 1992. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *J. Cell Biol.* 117, 1–14.
- Carvalho, T., Almeida, F., Calapez, A., Lafarga, M., Berciano, M.T., Carmo-Fonseca, M., 1999. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: a link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J. Cell Biol.* 147, 715–728.
- Casafont, I., Navascues, J., Pena, E., Lafarga, M., Berciano, M.T., 2006. Nuclear organization and dynamics of transcription sites in rat sensory ganglia neurons detected by incorporation of 5'-fluorouridine into nascent RNA. *Neuroscience* 140, 453–462.
- Cauchi, R.J., 2014. Gem depletion: amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy crossover. *CNS. Neurosci. Ther.* 20, 574–581.
- Cervero, C., Montull, N., Tarabal, O., Piedrafita, L., Esquerda, J.E., Caldero, J., 2016. Chronic treatment with the AMPK agonist AICAR prevents skeletal muscle pathology but fails to improve clinical outcome in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *Neurotherapeutics* 13, 198–216.
- Cho, S., Dreyfuss, G., 2010. A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev.* 24, 438–442.
- Cioce, M., Boulon, S., Matera, A.G., Lamond, A.I., 2006. UV-induced fragmentation of Cajal bodies. *J. Cell Biol.* 175, 401–413.
- Clelland, A.K., Kinnear, N.P., Oram, L., Burza, J., Sleeman, J.E., 2009. The SMN protein is a key regulator of nuclear architecture in differentiating neuroblastoma cells. *Traffic* 10, 1585–1598.
- Cmarko, D., Verschure, P.J., Rothblum, L.I., Hernandez-Verdun, D., Amalric, F., van Driel, R., Fakan, S., 2000. Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem. Cell Biol.* 113, 181–187.
- Coady, T.H., Lorson, C.L., 2011. SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 546–564.
- Covert, D.D., Le, T.T., McAndrew, P.E., Strasswimmer, J., Crawford, T.O., Mendell, J.R., Coulson, S.E., Androphy, E.J., Prior, T.W., Burghes, A.H., 1997. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1205–1214.
- Daniely, Y., Dimitrova, D.D., Borowiec, J.A., 2002. Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation. *Mol. Cell Biol.* 22, 6014–6022.
- Delgado-Calle, J., Arozamena, J., Garcia-Renedo, R., Garcia-Ibarbia, C., Pascual-Carra, M.A., Gonzalez-Macias, J., Riancho, J.A., 2011. Osteocyte deficiency in hip fractures. *Calcif. Tissue Int.* 89, 327–334.

- Doktor, T.K., Hua, Y., Andersen, H.S., Broner, S., Liu, Y.H., Wiecekowska, A., Dembic, M., Bruun, G.H., Krainer, A.R., Andresen, B.S., 2017. RNA-sequencing of a mouse-model of spinal muscular atrophy reveals tissue-wide changes in splicing of U12-dependent introns. *Nucleic Acids Res.* 45, 395–416.
- Ender, C., Krek, A., Friedlander, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., Meister, G., 2008. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol. Cell* 32, 519–528.
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T.S., Mitrea, D.M., Zhu, L., Richardson, T.M., Kriwacki, R.W., Pappu, R.V., Brangwynne, C.P., 2016. Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell* 165, 1686–1697.
- Fischer, U., Englbrecht, C., Chari, A., 2011. Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 718–731.
- Frugier, T., Nicole, S., Cifuentes-Diaz, C., Melki, J., 2002. The molecular bases of spinal muscular atrophy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 294–298.
- Gabanelia, F., Butchbach, M.E., Saieva, L., Carissimi, C., Burghes, A.H., Pellizzoni, L., 2007. Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One* 2, e291.
- Gall, J.G., 2000. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 273–300.
- Gama-Carvalho, M., Krauss, R.D., Chiang, L., Valcarcel, J., Green, M.R., Carmo-Fonseca, M., 1997. Targeting of U2AF65 to sites of active splicing in the nucleus. *J. Cell Biol.* 137, 975–987.
- García-Esparcia, P., Hernandez-Ortega, K., Koneti, A., Gil, L., Delgado-Morales, R., Castano, E., Carmona, M., Ferrer, I., 2015. Altered machinery of protein synthesis is region- and stage-dependent and is associated with alpha-synuclein oligomers in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 76.
- Gigova, A., Duggimpudi, S., Pollex, T., Schaefer, M., Kos, M., 2014. A cluster of methylations in the domain IV of 25S rRNA is required for ribosome stability. *RNA* 20, 1632–1644.
- Gilder, A.S., Do, P.M., Carrero, Z.L., Cosman, A.M., Broome, H.J., Velma, V., Martinez, L.A., Hebert, M.D., 2011. Coilin participates in the suppression of RNA polymerase I in response to cisplatin-induced DNA damage. *Mol. Biol. Cell* 22, 1070–1079.
- Goulet, B.B., Kothary, R., Parks, R.J., 2013. At the "junction" of spinal muscular atrophy pathogenesis: the role of neuromuscular junction dysfunction in SMA disease progression. *Curr. Mol. Med.* 13, 1160–1174.
- Hebert, M.D., Matera, A.G., 2000. Self-association of coilin reveals a common theme in nuclear body localization. *Mol. Biol. Cell* 11, 4159–4171.
- Hebert, M.D., Poole, A.R., 2017. Toward an understanding of regulating Cajal body activity by protein modification. *RNA Biol.* 1–18.
- Hebert, M.D., Shpargel, K.B., Ospina, J.K., Tucker, K.E., Matera, A.G., 2002. Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev. Cell* 3, 329–337.
- Hernandez-Ortega, K., García-Esparcia, P., Gil, L., Lucas, J.J., Ferrer, I., 2016. Altered machinery of protein synthesis in Alzheimer's: from the nucleolus to the ribosome. *Brain Pathol.* 26, 593–605.
- Hetman, M., Pietrzak, M., 2012. Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends Neurosci.* 35, 305–314.
- Hutten, S., Prescott, A., James, J., Riesenberger, S., Boulon, S., Lam, Y.W., Lamond, A.I., 2011. An intranuclear body associated with rDNA. *Chromosoma* 120, 481–499.
- Isaac, C., Yang, Y., Meier, U.T., 1998. Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *J. Cell Biol.* 142, 319–329.
- Ito, Y., Shibata, N., Saito, K., Kobayashi, M., Osawa, M., 2011. New insights into the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Brain and Development* 33, 321–331.
- Jangi, M., Fleet, C., Cullen, P., Gupta, S.V., Mekhoubad, S., Chiao, E., Allaire, N., Bennett, C.F., Riggo, F., Krainer, A.R., Hurt, J.A., Carulli, J.P., Staropoli, J.F., 2017. SMN deficiency in severe models of spinal muscular atrophy causes widespread intron retention and DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E2347–E2356.
- Jansen, R.P., Hurt, E.C., Kern, H., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., Lapeyre, B., et al., 1991. Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. *J. Cell Biol.* 113, 715–729.
- Jodelka, F.M., Ebert, A.D., Duelli, D.M., Hastings, M.L., 2010. A feedback loop regulates splicing of the spinal muscular atrophy-modifying gene, SMN2. *Hum. Mol. Genet.* 19, 4906–4917.
- Jordan, E.G., McGovern, J.H., 1981. The quantitative relationship of the fibrillar centres and other nucleolar components to changes in growth conditions, serum deprivation and low doses of actinomycin D in cultured diploid human fibroblasts (strain MRC-5). *J. Cell Sci.* 52, 373–389.
- Jordan, B.A., Fernholz, B.D., Khatri, L., Ziff, E.B., 2007. Activity-dependent AIDA-1 nuclear signaling regulates nucleolar numbers and protein synthesis in neurons. *Nat. Neurosci.* 10, 427–435.
- Kiss, T., 2002. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109, 145–148.
- Lafarga, M., Andres, M.A., Berciano, M.T., Maquieira, E., 1991. Organization of nucleoli and nuclear bodies in osmotically stimulated supraoptic neurons of the rat. *J. Comp. Neurol.* 308, 329–339.
- Lafarga, M., Lerga, A., Andres, M.A., Polanco, J.L., Calle, E., Berciano, M.T., 1997. Apoptosis induced by methylazoxymethanol in developing rat cerebellum: organization of the cell nucleus and its relationship to DNA and rRNA degradation. *Cell Tissue Res.* 289, 25–38.
- Lafarga, M., Berciano, M.T., Garcia-Segura, L.M., Andres, M.A., Carmo-Fonseca, M., 1998. Acute osmotic/stress stimuli induce a transient decrease of transcriptional activity in the neurosecretory neurons of supraoptic nuclei. *J. Neurocytol.* 27, 205–217.
- Lafarga, M., Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O., Berciano, M.T., 2009. Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus. *Chromosoma* 118, 437–443.
- Lafarga, M., Tapia, O., Romero, A.M., Berciano, M.T., 2017. Cajal bodies in neurons. *RNA Biol.* 1–14.
- Le, T.T., Pham, L.T., Butchbach, M.E., Zhang, H.L., Monani, U.R., Coovert, D.D., Gavrilina, T.O., Xing, L., Bassell, G.J., Burghes, A.H., 2005. SMN2Delta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum. Mol. Genet.* 14, 845–857.
- Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Bulet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., 1995. Identification and characterization of spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155–165.
- Lefebvre, S., Bulet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G., Melki, J., 1997. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 16, 265–269.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods* 25, 402–408.
- Liu, Q., Dreyfuss, G., 1996. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* 15, 3555–3565.
- Lotti, F., Imlach, W.L., Saieva, L., Beck, E.S., Hao, L.T., Li, D.K., Jiao, W., Mentis, G.Z., Beattie, C.E., McCabe, B.D., Pellizzoni, L., 2012. An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function. *Cell* 151, 440–454.
- Machyna, M., Heyn, P., Neugebauer, K.M., 2013. Cajal bodies: where form meets function. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 4, 17–34.
- Machyna, M., Kehr, S., Straube, K., Kappel, D., Buchholz, F., Butter, F., Ule, J., Hertel, J., Stadler, P.F., Neugebauer, K.M., 2014. The coilin interactome identifies hundreds of small noncoding RNAs that traffic through Cajal bodies. *Mol. Cell* 56, 389–399.
- Massenet, S., Bertrand, E., Verheggen, C., 2017. Assembly and trafficking of box C/D and H/ACA snoRNPs. *RNA Biol.* 1–13.
- Matera, A.G., Wang, Z., 2014. A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 108–121.
- Mayer, C., Bierhoff, H., Grummt, I., 2005. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev.* 19, 933–941.
- McStay, B., 2016. Nucleolar organizer regions: genomic 'dark matter' requiring illumination. *Genes Dev.* 30, 1598–1610.
- Monani, U.R., 2005. Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* 48, 885–896.
- Narayanan, A., Lukowiak, A., Jady, B.E., Dragon, F., Kiss, T., Terns, R.M., Terns, M.P., 1999. Nucleolar localization signals of box H/ACA small nucleolar RNAs. *EMBO J.* 18, 5120–5130.
- Navascues, J., Berciano, M.T., Tucker, K.E., Lafarga, M., Matera, A.G., 2004. Targeting SMN to Cajal bodies and nuclear gems during neurogenesis. *Chromosoma* 112, 398–409.
- Navascues, J., Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, M.T., Lafarga, M., 2008. SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *J. Struct. Biol.* 163, 137–146.
- Ng, S.Y., Soh, B.S., Rodriguez-Muela, N., Hendrickson, D.G., Price, F., Rinn, J.L., Rubin, L.L., 2015. Genome-wide RNA-seq of human motor neurons implicates selective ER stress activation in spinal muscular atrophy. *Cell Stem Cell* 17, 569–584.
- Nicolas, E., Parisot, P., Pinto-Monteiro, C., de Walque, R., De Vleeschouwer, C., Lafontaine, D.L., 2016. Involvement of human ribosomal proteins in nucleolar structure and p53-dependent nucleolar stress. *Nat. Commun.* 7 (11390).
- Novotny, I., Blazikova, M., Stanek, D., Herman, P., Malinsky, J., 2011. *In vivo* kinetics of U4/U6.U5 tri-snRNP formation in Cajal bodies. *Mol. Biol. Cell* 22, 513–523.
- Ogawa, L.M., Baserga, S.J., 2017. Crosstalk between the nucleolus and the DNA damage response. *Mol. Biosyst.* 13, 443–455.
- Olson, M.O., 2004. Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci. STKE* 2004, e10.
- Ono, M., Scott, M.S., Yamada, K., Avolio, F., Barton, G.J., Lamond, A.I., 2011. Identification of human miRNA precursors that resemble box C/D snoRNAs. *Nucleic Acids Res.* 39, 3879–3891.
- Palanca, A., Casafont, I., Berciano, M.T., Lafarga, M., 2014a. Proteasome inhibition induces DNA damage and reorganizes nuclear architecture and protein synthesis machinery in sensory ganglion neurons. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1961–1975.
- Palanca, A., Casafont, I., Berciano, M.T., Lafarga, M., 2014b. Reactive nucleolar and Cajal body responses to proteasome inhibition in sensory ganglion neurons. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 848–859.
- Parlato, R., Kreiner, G., 2013. Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle? *J. Mol. Med. (Berl)* 91, 541–547.
- Parlato, R., Liss, B., 2014. How Parkinson's disease meets nucleolar stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 791–797.
- Pena, E., Berciano, M.T., Fernandez, R., Ojeda, J.L., Lafarga, M., 2001. Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* 430, 250–263.
- Platani, M., Goldberg, I., Swedlow, J.R., Lamond, A.I., 2000. *In vivo* analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *J. Cell Biol.* 151, 1561–1574.
- Rajendra, T.K., Gonsalves, G.B., Walker, M.P., Shpargel, K.B., Salz, H.K., Matera, A.G., 2007. A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J. Cell Biol.* 176, 831–841.
- Raska, I., Ochs, R.L., Andrade, L.E., Chan, E.K., Burlingame, R., Peebles, C., Gruol, D., Tan, E.M., 1990. Association between the nucleolus and the coiled body. *J. Struct. Biol.* 104, 120–127.
- Raska, I., Shaw, P.J., Cmarko, D., 2006. New insights into nucleolar architecture and activity. *Int. Rev. Cytol.* 255, 177–235.
- Renvoise, B., Colasse, S., Bulet, P., Viollet, L., Meier, U.T., Lefebvre, S., 2009. The loss of the snoRNP chaperone Nopp140 from Cajal bodies of patient fibroblasts correlates with the severity of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1181–1189.
- Riancho, J., Ruiz-Soto, M., Villagrà, N.T., Berciano, J., Berciano, M.T., Lafarga, M., 2014. Compensatory motor neuron response to chromatolysis in the murine hSOD1 G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Riancho, J., Ruiz-Soto, M., Berciano, M.T., Berciano, J., Lafarga, M., 2015. Neuroprotective effect of Bexarotene in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 250.

- Riancho, J., Gonzalo, I., Ruiz-Soto, M., Berciano, J., 2016. Why do motor neurons degenerate? Actualization in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia* <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2015.12.001> (in press).
- Rodriguez-Muela, N., Litterman, N.K., Norabuena, E.M., Mull, J.L., Galazo, M.J., Sun, C., Ng, S.Y., Makhortova, N.R., White, A., Lynes, M.M., Chung, W.K., Davidow, L.S., Macklis, J.D., Rubin, L.L., 2017. Single-cell analysis of SMN reveals its broader role in neuromuscular disease. *Cell Rep.* 18, 1484–1498.
- Sawyer, I.A., Sturgill, D., Sung, M.H., Hager, G.L., Dundr, M., 2016. Cajal body function in genome organization and transcriptome diversity. *BioEssays* 38, 1197–1208.
- Shav-Tal, Y., Blechman, J., Darzacq, X., Montagna, C., Dye, B.T., Patton, J.G., Singer, R.H., Zipori, D., 2005. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol. Biol. Cell* 16, 2395–2413.
- Shpargel, K.B., Matera, A.G., 2005. Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17372–17377.
- Sleeman, J., 2007. A regulatory role for CRM1 in the multi-directional trafficking of splicing snRNPs in the mammalian nucleus. *J. Cell Sci.* 120, 1540–1550.
- Sleeman, J.E., Lamond, A.I., 1999. Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr. Biol.* 9, 1065–1074.
- Smirnov, E., Cmarko, D., Mazel, T., Hornacek, M., Raska, I., 2016. Nucleolar DNA: the host and the guests. *Histochem. Cell Biol.* 145, 359–372.
- Soler-Botija, C., Ferrer, I., Gich, I., Baiget, M., Tizzano, E.F., 2002. Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* 125, 1624–1634.
- Souquere, S., Weil, D., Pierron, G., 2015. Comparative ultrastructure of CRM1-nucleolar bodies (CNoBs), Intranucleolar bodies (INBs) and hybrid PML/p62 bodies uncovers new facets of nuclear body dynamic and diversity. *Nucleus* 6, 326–338.
- Tapia, O., Bengoechea, R., Berciano, M.T., Lafarga, M., 2010. Nucleolar targeting of coilin is regulated by its hypomethylation state. *Chromosoma* 119, 527–540.
- Tapia, O., Bengoechea, R., Palanca, A., Arteaga, R., Val-Bernal, J.F., Tizzano, E.F., Berciano, M.T., Lafarga, M., 2012. Reorganization of Cajal bodies and nucleolar targeting of coilin in motor neurons of type I spinal muscular atrophy. *Histochem. Cell Biol.* 137, 657–667.
- Tarabal, O., Caraballo-Miralles, V., Cardona-Rossinyol, A., Correa, F.J., Olmos, G., Llado, J., Esquerda, J.E., Caldero, J., 2014. Mechanisms involved in spinal cord central synapse loss in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73, 519–535.
- Tisdale, S., Pellizzoni, L., 2015. Disease mechanisms and therapeutic approaches in spinal muscular atrophy. *J. Neurosci.* 35, 8691–8700.
- Trinkle-Mulcahy, L., Sleeman, J.E., 2017. The Cajal body and the nucleolus: "In a relationship" or "It's complicated"? *RNA Biol.* 1–13.
- Tsuiji, H., Iguchi, Y., Furuya, A., Kataoka, A., Hatsuta, H., Atsuta, N., Tanaka, F., Hashizume, Y., Akatsu, H., Murayama, S., Sobue, G., Yamanaka, K., 2013. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol. Med.* 5, 221–234.
- Young, P.J., Le, T.T., Duncley, M., Nguyen, T.M., Burghes, A.H., Morris, G.E., 2001. Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN. *Exp. Cell Res.* 265, 252–261.
- Yu, Y.T., Shu, M.D., Narayanan, A., Terns, R.M., Terns, M.P., Steitz, J.A., 2001. Internal modification of U2 small nuclear (sn)RNA occurs in nucleoli of *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.* 152, 1279–1288.
- Zhang, Z., Lotti, F., Dittmar, K., Younis, I., Wan, L., Kasim, M., Dreyfuss, G., 2008. SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* 133, 585–600.
- Zufiria, M., Gil-Bea, F.J., Fernandez-Torron, R., Poza, J.J., Munoz-Blanco, J.L., Rojas-Garcia, R., Riancho, J., de Munain, A.L., 2016. ALS: a bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Prog. Neurobiol.* 142, 104–129.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Accumulation of poly(A) RNA in nuclear granules enriched in Sam68 in motor neurons from the SMN Δ 7 mouse model of SMA

J. Oriol Narcís¹, Olga Tapia¹, Olga Tarabal², Lúdia Piedrafito², Jordi Calderó², Maria T. Berciano^{1,3} & Miguel Lafarga¹

Spinal muscular atrophy (SMA) is a severe motor neuron (MN) disease caused by the deletion or mutation of the *survival motor neuron 1 (SMN1)* gene, which results in reduced levels of the SMN protein and the selective degeneration of lower MNs. The best-known function of SMN is the biogenesis of spliceosomal snRNPs, the major components of the pre-mRNA splicing machinery. Therefore, SMN deficiency in SMA leads to widespread splicing abnormalities. We used the SMN Δ 7 mouse model of SMA to investigate the cellular reorganization of polyadenylated mRNAs associated with the splicing dysfunction in MNs. We demonstrate that SMN deficiency induced the abnormal nuclear accumulation in euchromatin domains of poly(A) RNA granules (PARGs) enriched in the splicing regulator Sam68. However, these granules lacked other RNA-binding proteins, such as TDP43, PABPN1, hnRNPA12B, REF and Y14, which are essential for mRNA processing and nuclear export. These effects were accompanied by changes in the alternative splicing of the Sam68-dependent *Bcl-x* and *Nrxn1* genes, as well as changes in the relative accumulation of the intron-containing *Chat*, *Chodl*, *Myh9* and *Myh14* mRNAs, which are all important for MN functions. PARG-containing MNs were observed at presymptomatic SMA stage, increasing their number during the symptomatic stage. Moreover, the massive accumulations of poly(A) RNA granules in MNs was accompanied by the cytoplasmic depletion of polyadenylated mRNAs for their translation. We suggest that the SMN-dependent abnormal accumulation of polyadenylated mRNAs and Sam68 in PARGs reflects a severe dysfunction of both mRNA processing and translation, which could contribute to SMA pathogenesis.

The processing of mRNAs includes three essential modifications, capping, splicing and polyadenylation, which mainly occur at the sites of transcription (co-transcriptional)^{1,2}. An analysis of the human transcriptome revealed that >90% of protein-coding genes undergo alternative splicing, which generates multiple mRNA variants that encode the vast proteomic repertoire required for the protein interactome³. Another fundamental modification of most mRNAs is the addition of a polyadenosine tail at the 3' end. Polyadenylation is a modification necessary not only for the stability of mRNAs but also for their nuclear export⁴. Poly(A)-binding protein nuclear 1 (PABPN1) plays a critical role in polyadenylation by strongly enhancing the processivity of poly(A) polymerase⁴. Upon the completion of co-transcriptional processing, mRNAs are exported to the cytoplasm as parts of messenger ribonucleoprotein particles for translation and degradation. During their nuclear journey, mRNAs associate with several RNA-binding proteins that contribute to the regulation of their processing and exportation.

On their nuclear route, some normal and incompletely spliced mRNAs are trafficked and may be retained in nuclear speckles^{2,5-7}. These nuclear compartments store, assemble and recycle splicing factors and are also enriched in poly(A) RNAs and several mRNA processing factors, including PABPN1⁸⁻¹¹.

¹Department of Anatomy and Cell Biology and "Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)", University of Cantabria-IDIVAL, Santander, Spain. ²Department of Experimental Medicine, School of Medicine, University of Lleida and "Institut de Recerca Biomèdica de Lleida" (IRBLLEIDA), Lleida, Spain. ³Present address: Department of Molecular Biology and CIBERNED, University of Cantabria-IDIVAL, Santander, Spain. J. Oriol Narcís and Olga Tapia contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.L. (email: lafargam@unican.es)

Defects in pre-mRNA splicing or polyadenylation often prevent the recruitment of mRNA export factors, resulting in the nuclear retention of immature or aberrant pre-mRNAs¹². Thus, some abnormal mRNA transcripts may accumulate in nuclear inclusions under pathological conditions, such as oculopharyngeal muscular dystrophy, myotonic dystrophy type 1 and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome^{6,13–15}. Moreover, we have previously reported that the dysfunction of nuclear RNA processing in the sensory ganglion neurons upon proteasome inhibition induces the nuclear aggregation of polyadenylated mRNAs and the RNA-binding protein Sam68 (src-associated protein in mitosis of 68kD) into a new nuclear structure called the “poly(A) RNA granule” (PARG)^{16,17}. The sequestration of crucial RNA-binding proteins in nuclear inclusions or granules may prevent their normal function, and contribute to disease pathogenesis¹⁸.

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disease characterized by the progressive degeneration and loss of spinal cord and brainstem motor neurons (MNs)^{19,20}. SMA is caused by a homozygous deletion or mutation in the *survival of motor neuron 1 (SMN1)* gene that results in decreased levels of the full-length SMN protein^{21,22}. SMA patients carry a nearly identical *SMN1* gene paralogue named *SMN2*, which differs from *SMN1* by a C to T transition in exon 7^{22,23}. Although both the *SMN1* and *SMN2* genes encode the SMN protein, approximately 90% of the *SMN2* mRNA transcripts generate an alternatively spliced isoform that lacks exon 7 and encodes a truncated form of the SMN protein (SMN Δ 7) that is rapidly degraded²⁴. Therefore, *SMN2* expression cannot fully compensate for the deficiency of the full-length SMN protein. The best-known function of SMN is the biogenesis of spliceosomal snRNPs (for a review, see^{25,26}). Linked to this function, SMN deficiency in SMA produces alterations in this snRNP repertoire and causes widespread splicing defects that result in a severe dysregulation of mRNA metabolism in MNs^{27–31}. Splicing alterations in the spinal cord in murine SMA models include widespread intron retention, particularly of minor U12 introns, as well as a time-dependent differential expression of a number of exons associated with neurodevelopmental and cell stress pathways^{27–29,31,32}. In addition to the dysfunction of pre-mRNA processing, as a pathogenic factor in SMA, recent studies identified ribosome biology and translation efficiency as key processes affected by SMN depletion, which may also contribute to MN degeneration and SMA pathogenesis^{33,34}.

The aim of this work is to analyze the subcellular reorganization of polyadenylated mRNAs and certain RNA-binding proteins induced by the SMN-dependent dysfunction of pre-mRNA splicing in MNs from the SMN Δ 7 mouse model of SMA. Our results demonstrate the nuclear accumulation of poly(A) RNAs in PARGs enriched in the RNA-binding protein Sam68, which is an alternative splicing regulator of pre-mRNAs^{35–37}. The formation of PARGs associates with variations in the alternative splicing regulation of several mRNAs, including the Sam68-dependent *Bcl-x* and *Nrxn-1* mRNAs. Moreover, the massive accumulation of PARGs in MNs is accompanied by cytoplasmic depletion of polyadenylated mRNAs, supporting the existence of a severe dysfunction of both mRNA processing and translation, which may be an important pathogenic factor in SMA.

Results

Distribution of polyadenylated RNAs in wild-type MN perikarya. With the exception of histone mRNAs, all mRNAs are polyadenylated and have a poly(A) tail that is essential for their exportation and stability^{1,4}. Therefore, *in situ* hybridization of poly(A) RNAs with an oligonucleotide poly(dT) probe, which recognizes the poly(A) tail, is a good approach for studying the perikaryal distribution of global mRNAs in MNs.

After staining with propidium iodide (PI), a cytochemical fluorescent staining for nucleic acid detection, dissociated MNs from wild-type (WT) mice exhibited a prominent nucleolus and large RNA-rich cytoplasmic areas of the Nissl substance, a classic name used to designate the neuronal protein synthesis machinery (for a review, see³⁸ (Fig. 1A). Immunolabeling for the TMG-cap and coilin, which are markers of nuclear speckles and Cajal bodies, respectively, revealed the organization of these two nuclear compartments involved in mRNA processing. As shown in Fig. 1B,C, several nuclear speckles and at least one Cajal body were prominent nuclear structures in WT MNs. We next performed fluorescence *in situ* hybridization for the detection of poly(A) RNAs in dissociated WT MNs. Poly(A) RNAs, in addition to being diffusely distributed throughout the nucleus, excluding the nucleolus, were concentrated in nuclear speckles (Fig. 1D,E). As expected, in the cytoplasm, poly(A) RNAs were accumulated in the Nissl substance, the main site of mRNA translation (Fig. 1D,E). Triple labeling for poly(A) RNA in combination with the TMG-cap and PABPN1, two molecular markers of nuclear speckles, demonstrated the accumulation of poly(A) RNAs in these nuclear compartments (Fig. 1E–H), as confirmed by plotting the fluorescence intensity profile across a line (Fig. 1I).

Polyadenylated mRNA relocates in nuclear poly(A) RNA granules in SMN Δ 7 MNs. Next, we analyzed whether the dysfunction of RNA metabolism in SMN Δ 7 MNs affects the nuclear and cytoplasmic organization of poly(A) RNAs. *In situ* hybridization revealed an important nuclear reorganization of poly(A) RNA in some SMN Δ 7 MNs during both the late-presymptomatic (postnatal day [P]5) and symptomatic (P14) stages, compared with the staining pattern of WT MNs (Figs 1E, 2A–F). There were notable variations in poly(A) RNA signal intensity in nuclear speckles and, very remarkably, the *de novo* formation and accumulation of round and sharply defined bodies enriched in poly(A) RNA, which were identified as PARGs¹⁶ (Fig. 2B–F).

The PARGs, which ranged from 0.1 to 1.5 μ m in diameter, were distributed throughout the nucleus, excluding the nucleolus. They frequently appeared in close proximity to the nucleolus and nuclear speckles (Fig. 2B,C,E). Two structural configurations of PARGs were found: compact nuclear bodies and ring-shaped structures with a poly(A) RNA-rich ring enclosing a hybridization signal-poor central region (Fig. 2C,F). Quantitative analysis showed a significant increase in the percentage of SMN Δ 7 MN-containing PARGs at P14 in comparison to the P5 (28% vs 17%) (Fig. 2G). Most commonly, the PARG number ranges from a very few to more than 50 per nucleus. However, some MNs showed very small, countless, PARGs (Fig. 2F).

Interestingly, MNs harboring a large number of PARGs commonly exhibited a weaker poly(A) RNA hybridization signal in the cytoplasm (Fig. 2E,F). Moreover, the cytoplasmic accumulation of poly(A) RNAs in stress

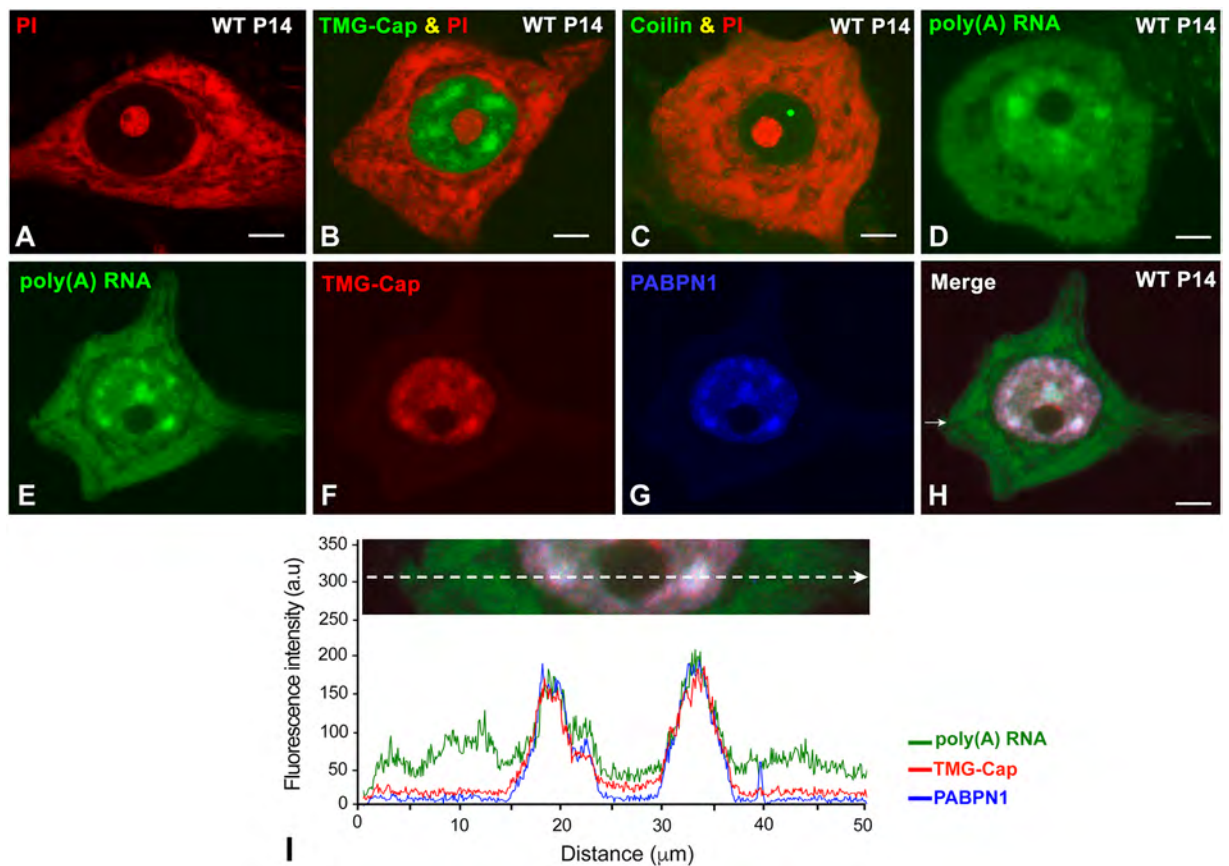


Figure 1. Dissociated spinal cord MNs from WT mice at P14. (A) Propidium iodide (PI) staining of the nucleolus and Nissl substance. (B) Immunostaining for snRNP splicing factors with the anti-TMG-cap antibody shows the typical concentration of splicing factors in nuclear speckles. The samples were counterstained with PI. (C) Immunostaining for coilin illustrates a typical Cajal body free in the nucleoplasm. The samples were counterstained with PI. (D) FISH for poly(A) RNAs shows a diffuse nuclear pattern, which excludes the negative nucleolus, in addition to be concentrated in nuclear speckles. In the cytoplasm, poly(A) RNAs accumulate in irregular areas corresponding to the Nissl substance. (E–I) Triple labeling for poly(A) RNAs, the TMG-cap and PABPN1, demonstrating the colocalization of these three fluorescent signals in nuclear speckles, as revealed by the plot of fluorescence intensity profiles across a line. Scale bar: 5 μm.

granules^{39,40} was not observed in SMNΔ7 MNs. Changes in the relative concentration of poly(A) RNA in the cytoplasm were validated by a densitometric analysis of the fluorescence hybridization signal intensities at P14. Several measurements of the poly(A) RNA signal intensities were performed in the peripheral cytoplasm, where the Nissl substance is largely distributed in MNs. A significant reduction of the relative poly(A) RNA concentration was detected in the Nissl substance of PARG-containing MNs, compared with PARG-free MNs, from both SMNΔ7 and WT mice (Fig. 2H).

Electron microscopy analysis of PARG-containing MNs revealed structural features of neuronal dysfunction, including a paucity of the protein synthesis machinery, nuclear shape aberrations with nuclear envelope invaginations (Fig. 3A) and nucleolar segregation of the granular component (Fig. 3B,C), as we have recently reported³⁴. Ultrastructural analysis confirmed the presence of two categories of PARGs: rounded, compact electron-dense bodies (Fig. 3A) and larger spherical bodies composed of an electron-dense capsule enclosing an amorphous matrix of very low electron density (Fig. 3A, left inset). In addition, PARGs normally appeared to be closely surrounded by a layer of perichromatin granules (Fig. 3C, left inset), which are sites of storage for hnRNP complexes⁴¹. Importantly, PARGs localized in euchromatin domains, wherein co-transcriptional pre-mRNA processing occurs^{1,2}, and they frequently appeared in close proximity to the nucleolus (Fig. 3B) and interchromatin granule clusters (Fig. 3A, right inset), the ultrastructural counterpart of nuclear speckles⁹.

The PARG is a distinct nuclear compartment. To establish the identity of the PARG as a distinct nuclear structure in SMA MNs, we performed double labeling for poly(A) RNA in combination with molecular markers of nuclear compartments, such as coilin (Cajal bodies), SMN (gems), the TMG-cap (nuclear speckles) and the proteasome 20S (clastosomes). In a recent study, we demonstrated that the reduced levels of SMN in MNs from SMNΔ7 mice were associated with a severe depletion of Cajal bodies³⁴, nuclear structures involved in the biogenesis of both spliceosomal snRNPs and nucleolar snoRNPs (for a review, see^{42,43}). Co-staining for poly(A) RNA and coilin confirmed the depletion of typical Cajal bodies in SMNΔ7 MNs. Nevertheless, small coilin-positive

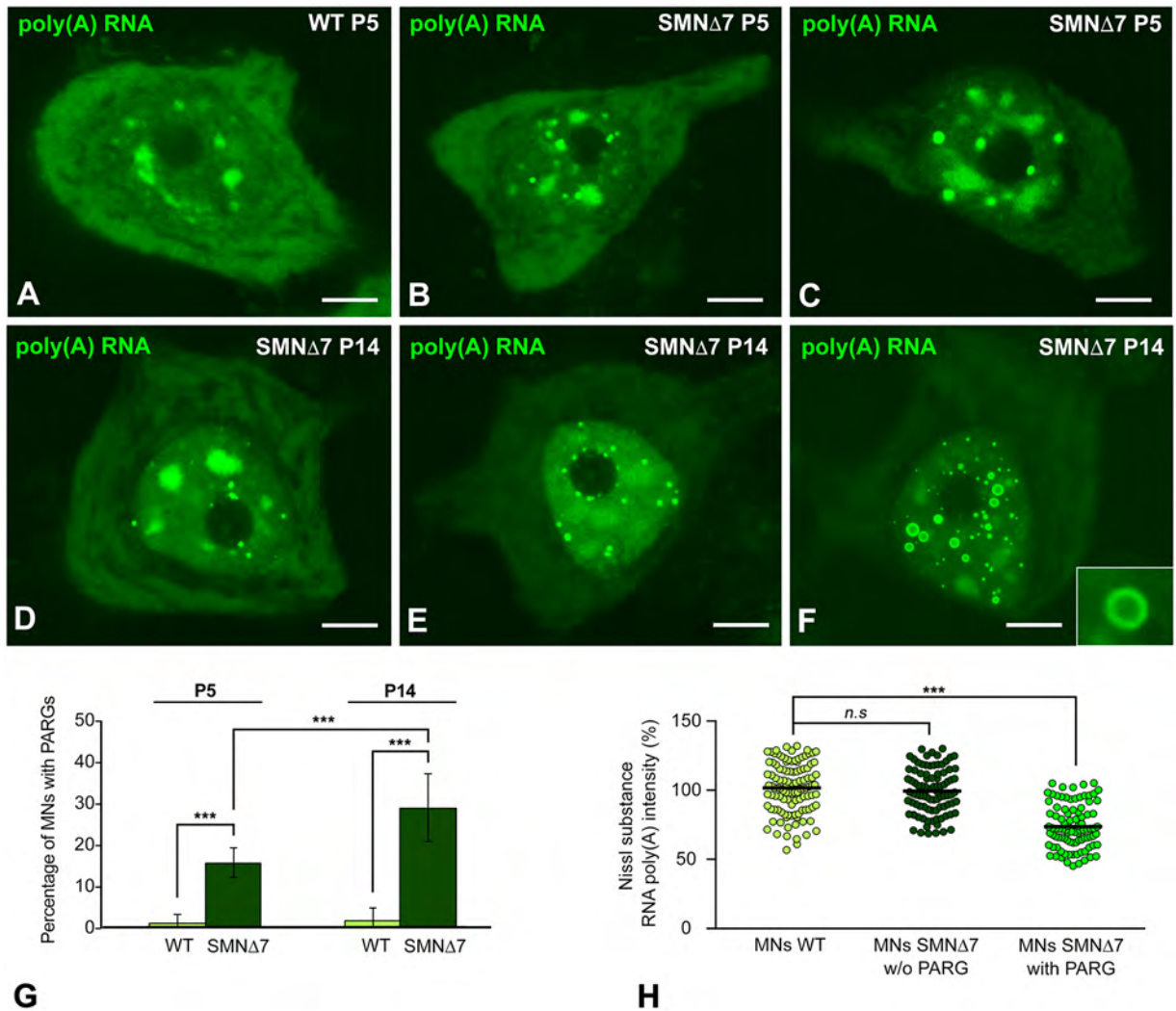


Figure 2. FISH for poly(A) RNAs in WT and SMN Δ 7 MNs at P5 and P14. **(A)** Typical distribution of Poly(A) RNA concentrated in nuclear speckles and the Nissl substance and diffuse in the nucleoplasm in a WT MN at P5. **(B,C)** Formation of PARGs in SMN Δ 7 MNs at P5. Note the association of PARGs with the nucleolus and nuclear speckles **(B,C)** and the reduced hybridization signal in the Nissl substance in panel C. **(D–F)** Distribution of poly(A) RNAs in SMN Δ 7 MNs at P14 showing three progressive stages of PARG accumulation in neuronal perikarya. Note the presence of two categories of PARGs, compact **(D,E)** and ring-shaped **(F and inset)**, and the cytoplasmic depletion of poly(A) RNAs in MNs containing a large number of PARGs **(E,F)**. Scale bar: 4 μ m. **(G)** Proportion of MNs containing PARGs at P5 and P14. PARGs are already visible at P5 but the percentage of MNs containing PARGs notably increases during the late symptomatic stages (P14); *p* values from data comparison of the percentage of PARG-containing MNs: WT vs. SMN Δ 7 = 3.1E-9 at P5 and 2.7E-8 at P14; SMN Δ 7 P5 vs. SMN Δ 7 P14 = 1.5E-4 (***) *p* < 0.0005). **(H)** Scatter dot plots of the fluorescence intensity signals of poly(A) RNAs in the peripheral cytoplasm (Nissl substance) of WT and SMN Δ 7 MNs at P14. Each dot represents the fluorescence signal of poly(A) RNA intensity from a single MN (mean of four measurements). The horizontal black line represents the mean for each group normalized to 100% of the WT group. A significant reduction in the relative concentration of poly(A) RNAs is observed in PARG-containing SMN Δ 7 MNs (*n* = 93) compared with both WT and SMN Δ 7 MNs without PARGs (*n* = 112 and *n* = 90, respectively). *p* = 4.8E-24 from WT and SMN Δ 7 data comparison (***) *p* < 0.0005).

and poly(A) RNA-negative residual Cajal bodies were occasionally found adjacent to PARGs, but as two clearly distinct nuclear structures (Fig. 4A). Similarly, gems, SMN-positive and coilin-negative nuclear bodies^{43,44}, were never observed in SMN Δ 7 MNs, and SMN was not concentrated in PARGs (Fig. 4B). Moreover, PARGs did not concentrate spliceosomal snRNPs, which typically appeared to be enriched in nuclear speckles immunolabeled for the TMG-cap of spliceosomal snRNAs (Fig. 4C). Finally, the catalytic 20S proteasome, a molecular marker of clastosomes, which are nuclear bodies enriched in ubiquitylated proteins and active 20S proteasomes⁴⁵, was not concentrated in PARGs (Fig. 4D).

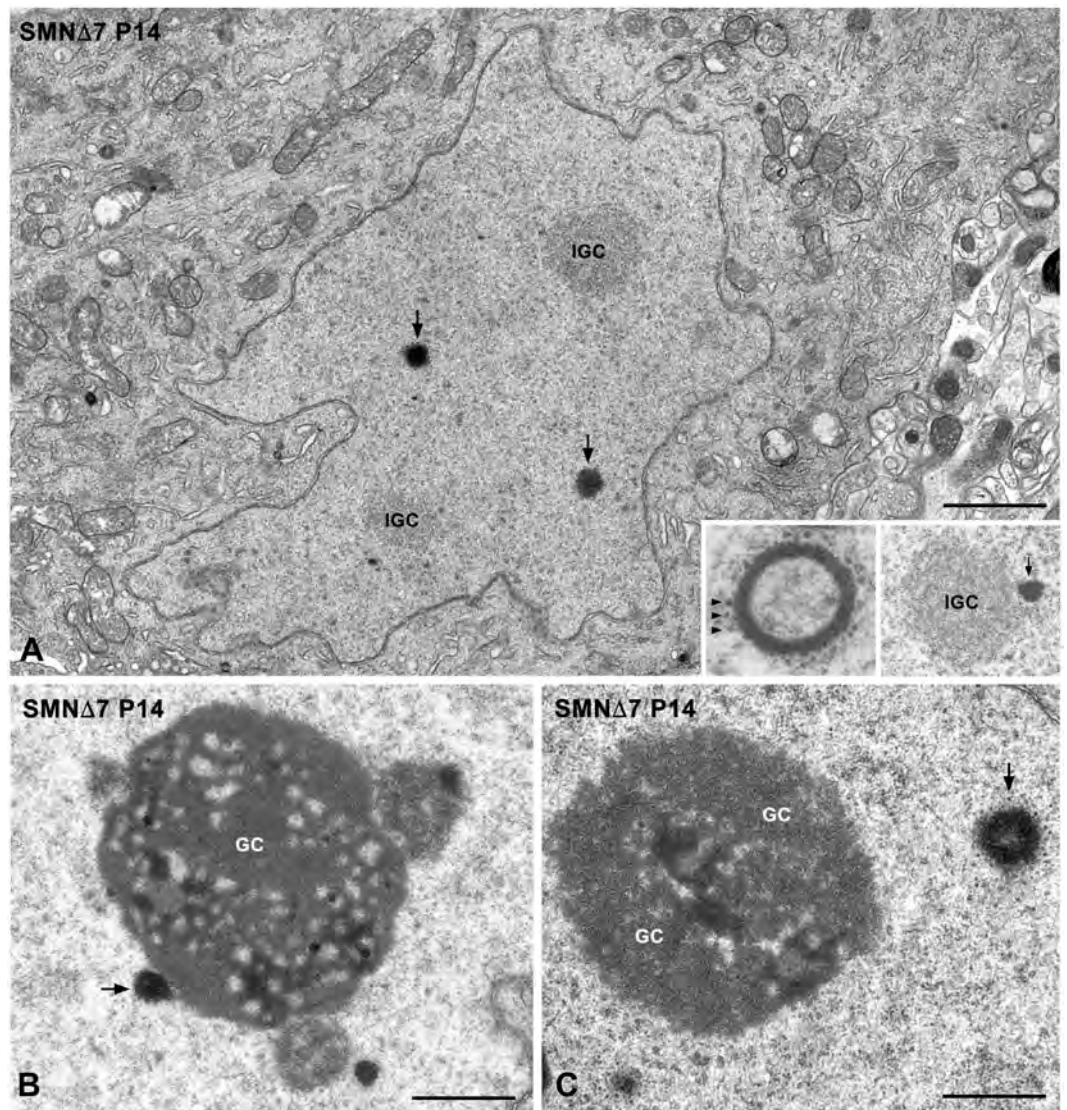


Figure 3. Electron micrograph of a PARG-containing MN during the end-stage of disease (P14). **(A)** The cytoplasm is poor in rough endoplasmic reticulum cisterns; note the abnormal nuclear morphology with numerous invaginations of the nuclear envelope. The nucleus exhibits two compact PARGs (arrows) and two interchromatin granule clusters (IGC). Left inset: detail of a ring-shaped PARGs surrounded by perichromatin granules (arrows). Right inset: interchromatin granule cluster with an associated PARG (arrow). Scale bar: 2 μ m. **(B,C)** Nucleoli of SMN Δ 7 MNs at P14, showing the segregation of large masses of the granular component (GC), the presence of a nucleolus-attached PARG (arrow in panel B) and a ring-shaped PARG free in the nucleoplasm and surrounded by perichromatin granules (arrow in panel C). Scale bar: 1 μ m.

PARGs concentrate the RNA-binding protein Sam68. Since the RNA-binding protein Sam68 is a regulator of SMN2 alternative splicing⁴⁶, we investigated its nuclear reorganization in SMN-deficient MNs from the SMN Δ 7 mice. In WT MNs, co-staining for Sam68 and poly(A) RNA revealed a predominant nuclear localization of Sam68, which excluded the nucleolus and poly(A) RNA-positive nuclear speckles (Fig. 5A–C). The nuclear distribution was non-homogeneous, with extensive areas of diffuse staining, and a few irregular domains in which higher levels of Sam68 accumulation were observed (Fig. 5B). Although the basic nuclear pattern of Sam68 immunostaining was preserved in SMN Δ 7 MNs, this splicing regulator was strongly concentrated in PARGs (Fig. 5D–F). Plot of fluorescence intensity profiles of poly(A) RNA and Sam68 across a line confirmed the colocalization of both signals in PARGs from SMN Δ 7 MNs, as well as the absence of Sam68 in nuclear speckles (Fig. 5G,H). Similarly, immunogold electron microscopy for Sam68 showed that both the compact and the ring-shaped PARGs were decorated with numerous gold particles (Fig. 5I,J).

We next investigated whether the accumulation of Sam68 in PARGs was associated with changes in Sam68 mRNA and protein levels in tissue extracts from the spinal cord at P5 and P14. Although we observed a trend indicating the downregulation of Sam68 mRNA levels in SMN Δ 7 mice, this decrease was not significant in the qRT-PCR validation (Fig. 5K). Similarly, western blotting analysis revealed no significant changes in Sam68

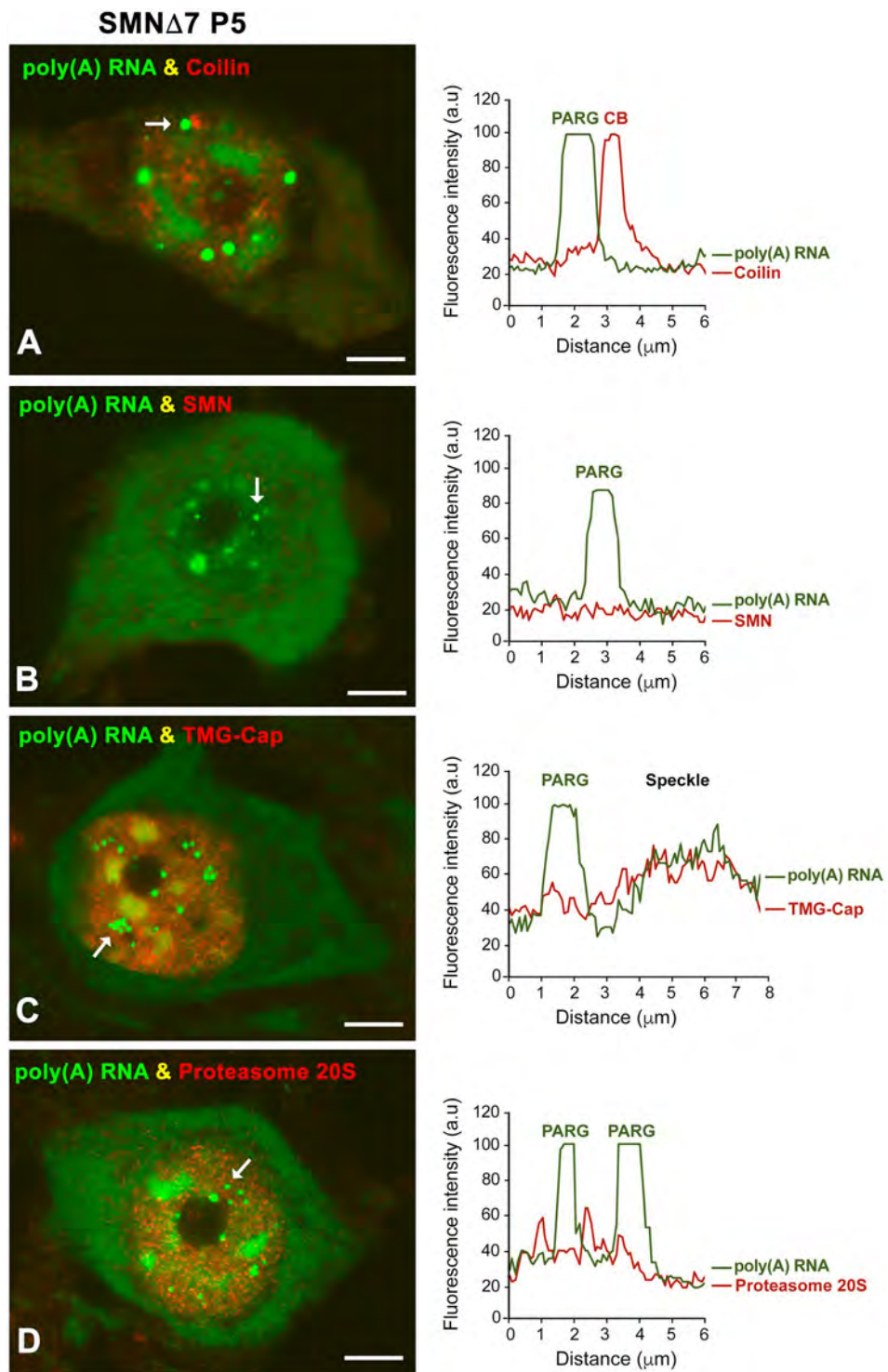


Figure 4. (A–D) Double labeling for poly(A) RNAs in combination with molecular markers of Cajal bodies (coilin, **A**), nuclear speckles of splicing factors (TMG-cap, **C**), gems (SMN, **B**) and clastosomes (20S proteasome, **D**) demonstrates that the PARG is a distinct nuclear structure. The plot of fluorescence intensity profiles across a line clearly demonstrates a lack of concentration of these molecular markers in PARGs. Scale bar: 4 μm .

protein levels in samples from SMN Δ 7 mice compared with those from WT littermates (Fig. 5L). However, as expected, a severe reduction of the SMN protein levels was observed in SMN Δ 7 mice (Fig. 5L).

Previous studies have demonstrated that Sam68 regulates the alternative splicing of two important genes for neuronal function, *Bcl-x* and *Nrxn1*, which encode an apoptotic regulatory factor and the presynaptic membrane protein neurexin, respectively^{37,47}. These studies also suggest that the relocation of Sam68 in nuclear foci affects the alternative splicing of its pre-mRNA targets⁴⁷. This finding prompted us to investigate whether the partial

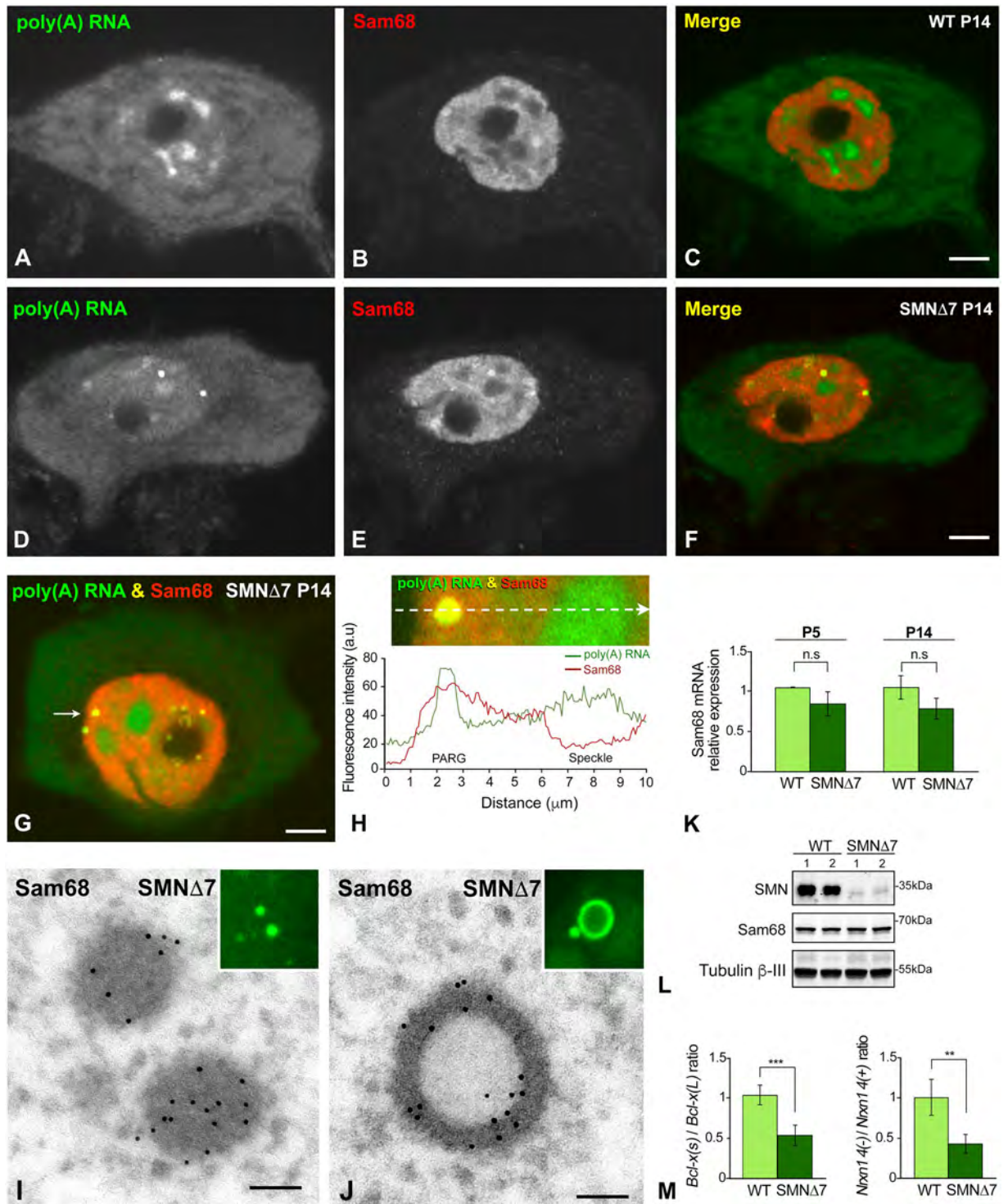


Figure 5. (A–H) Representative examples of double labeling for poly(A) RNAs and Sam68 in WT (A–C) and SMN Δ 7 (D–H) MNs at P14. (A–C) In the WT MNs, Sam68 exhibits a diffuse nuclear localization with a few areas of higher intensity. (D–F) In the SMN Δ 7 MN, Sam68, in addition to being diffusely distributed throughout the nucleus, appears highly concentrated in two PARGs (F). Note the absence of Sam68 in nuclear speckles and the cytoplasmic depletion of poly(A) RNA. Scale bar: 3 μ m. (G,H) The plot of the fluorescence intensity profiles of poly(A) RNAs and Sam68 across a line confirms the colocalization of both signals in a PARG and the concentration of poly(A) RNA, but not of Sam68, in a nuclear speckle. Scale bar: 3 μ m. (I,J) Representative electron micrographs of immunogold electron microscopy localization of Sam68 in dense and ring-shaped PARGs. Scale bar: 200 nm. Insets, FISH detection of poly(A) RNAs in PARGs. (K) qRT-PCR of the relative levels of Sam68 mRNA in spinal cord extracts from WT (n = 3) and SMN Δ 7 mice (n = 5). No significant differences (n.s) were found when comparing WT and SMN Δ 7 samples during both the P5 and P14. (L) Representative western blot of Sam68 protein levels showing the dramatic reduction of SMN protein levels in spinal cord lysates from SMN Δ 7 mice, compared with WT mice, and the absence of significant changes in

Sam68 protein levels between WT and SMN Δ 7 mice at the P14. **(M)** qRT-PCR of the *Bcl-x(s)/Bcl-x(L)* and *Nrxn14(-)/Nrxn1 4(+)* mRNA ratios in spinal cord extracts from WT and SMN Δ 7 mice at P14. A significant increase in the relative abundance of the *Bcl-x(L)* and *Nrxn 4(+)* splicing variants was detected in the SMN Δ 7 mice. *p* values from WT and SMN Δ 7 data comparison: 3.3E-4 for *Bcl-x(s)/Bcl-x(L)* and 4.4E-3 for *Nrxn1 4(-)/Nrxn1 4(+)* mRNA ratios (***p* < 0.005; ****p* < 0.0005).

relocation of this splicing regulator in PARGs is associated with changes in the balance of *Bcl-x* and *Nrxn1* splicing isoforms. The *Bcl-x* transcript is alternatively spliced to generate the antiapoptotic *Bcl-x(L)* or the proapoptotic *Bcl-x(s)* variants⁴⁸. Real-time PCR quantification of these two variants in spinal cord extracts showed a significant decrease of the *Bcl-x(s)/Bcl-x(L)* ratio in SMN Δ 7 mice compared with the WT mice (Fig. 5M). Similarly, we found a significant reduction of the *Nrxn1 4(-)/Nrxn1 4(+)* ratio in SMN Δ 7 mice (Fig. 5M), which reflects a higher relative abundance of the isoform 4(+), which includes exon 20 in the *Nrxn1* alternatively spliced segment 4 (AS4).

PARGs did not concentrate other RNA-binding proteins involved in mRNA processing and export. Having demonstrated the concentration of Sam68 in PARGs, we then proceeded to investigate the possible accumulation in these granules of other RNA-binding proteins involved in nuclear mRNA processing and export, such as PABPN1, TDP43 (TAR DNA-binding protein 43), hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) A2/B1, hnRNP M3, Y14 and REF/Aly.

Since PABPN1 binds to the poly(A) tail of polyadenylated RNAs⁴ and is required for efficient poly(A) RNA export from the nucleus⁴⁹, we investigated changes in its nuclear pattern and protein levels in WT and SMN Δ 7 mice. PABPN1 was concentrated in nuclear speckles in both WT and SMN Δ 7 MNs (Figs 6A, 7B–D), but not in PARGs (Fig. 7F), suggesting that PABPN1 is not linked to the poly(A) RNAs within these granules. Moreover, western blotting analysis revealed significantly reduced PABPN1 levels in the spinal cord of SMN Δ 7 mice compared with those of WT animals (Fig. 7E).

TDP43 plays a central role in the pathogenesis of MN diseases⁵⁰. This protein is a component of the hnRNP particles that regulate the splicing of a variety of pre-mRNAs^{50–52}. TDP43 immunolabeling showed a diffuse nuclear localization, excluding nuclear speckles and the nucleolus, in both WT and SMN Δ 7 MNs, but the protein was not detectable in pathological PARGs (Figs 6B, 7G). Similarly, immunostaining for two hnRNP family proteins, A2/B1 and M3/M4, which are involved in packing nascent pre-mRNA and in alternative splicing regulation^{53,54}, revealed their diffuse nuclear distribution in both WT and SMN Δ 7 MNs (Figs 6C,D, 7H,I). No labeling of PARGs was detectable for the A2/B1 and M3/M4 proteins (Fig. 7H,I).

To further investigate the possible concentration of post-spliced mRNA-binding proteins in PARGs, we focused on the detection of REF/Aly and Y14, two RNA-binding proteins that are directly implicated in the nuclear trafficking and export of mRNAs from the nucleus^{55,56}. REF and Y14 showed a diffuse nuclear localization, which excluded the nucleolus, in addition to being concentrated in nuclear speckles in both WT and SMN Δ 7 MNs (Figs 6E,F, 7J,K). Interestingly, neither export factor was accumulated in pathological PARGs (Fig. 7J,K). The lack of colocalization of REF/Aly and Y14 proteins with poly(A) RNA-positive PARGs was confirmed by the representation of their fluorescence intensity profiles across a line (Fig. 7F–K).

Accumulation of intron-containing pre-mRNAs encoding essential proteins for MN function in the SMN Δ 7 mice. Previous studies have demonstrated that SMA severity correlates with the decreased assembly of spliceosomal snRNP complexes, which leads to widespread defects in the splicing of genes expressed in MNs^{27,29,31}. On this basis, we investigated whether the nuclear accumulation of polyadenylated mRNAs in PARGs was associated with the splicing dysfunction of four genes, *Chat*, *Chodl*, *Myh9* and *Myh14*, which are important for MN maturation and synapse development and function^{28,57}. These genes encode choline acetyltransferase (*Chat*) and chondrolectin (*Chodl*), which are processed by the major U2-dependent spliceosome, and the non-muscle myosin II isoforms IIA (*Myh9*) and IIC (*Myh14*), which are processed by the minor U12-dependent spliceosome. Splicing efficiency was analyzed by estimating the percentage of the unspliced (exon-intron sequence) forms of the *Chodl*, *Chat*, *Myh9* and *Myh14* pre-mRNAs by qRT-PCR in spinal cord RNA extracts. Importantly, we found that in relation to WT samples, samples from P5 SMN Δ 7 animals had a significant increase in the proportion of unspliced forms of the *Chat* and *Myh14* mRNAs, while the accumulation of the unspliced forms was extended to the four examined pre-mRNAs (*Chodl*, *Chat*, *Myh9* and *Myh14*) during the late symptomatic stage (P14), (Fig. 8A,B). No significant changes in unspliced *Actb* (the beta-actin house-keeping gene) pre-mRNAs were detected when samples from WT and SMN Δ 7 mice were compared at P5 or P14 (Fig. 8A,B).

Discussion

The present study demonstrates that the SMN deficiency in SMN Δ 7 MNs affects the nuclear distribution of polyadenylated mRNAs, resulting in their progressive accumulation in Sam68-positive PARGs. During the symptomatic stage, this neuronal response is associated with an increased proportion of intron-containing *Chat*, *Chodl*, *Myh9* and *Myh14* mRNAs. The accumulation of poly(A) RNAs in PARGs appears to be an early (P5) cellular manifestation of the nuclear mRNA metabolism dysfunction in SMA MNs, which could contribute to SMA pathogenesis. Moreover, MNs that contain numerous PARGs frequently exhibit other signs of neuronal dysfunction. These signs include the segregation of the granular component of the nucleolus and cytoplasmic reduction of polyadenylated mRNAs, which support defective ribosome biogenesis and translation, according to previous studies in SMA mice^{33,34}. Collectively, the nuclear accumulation of poly(A) RNAs in PARGs is consistent with the splicing alterations reported here and in previous studies in SMA MNs^{27–29,31}.

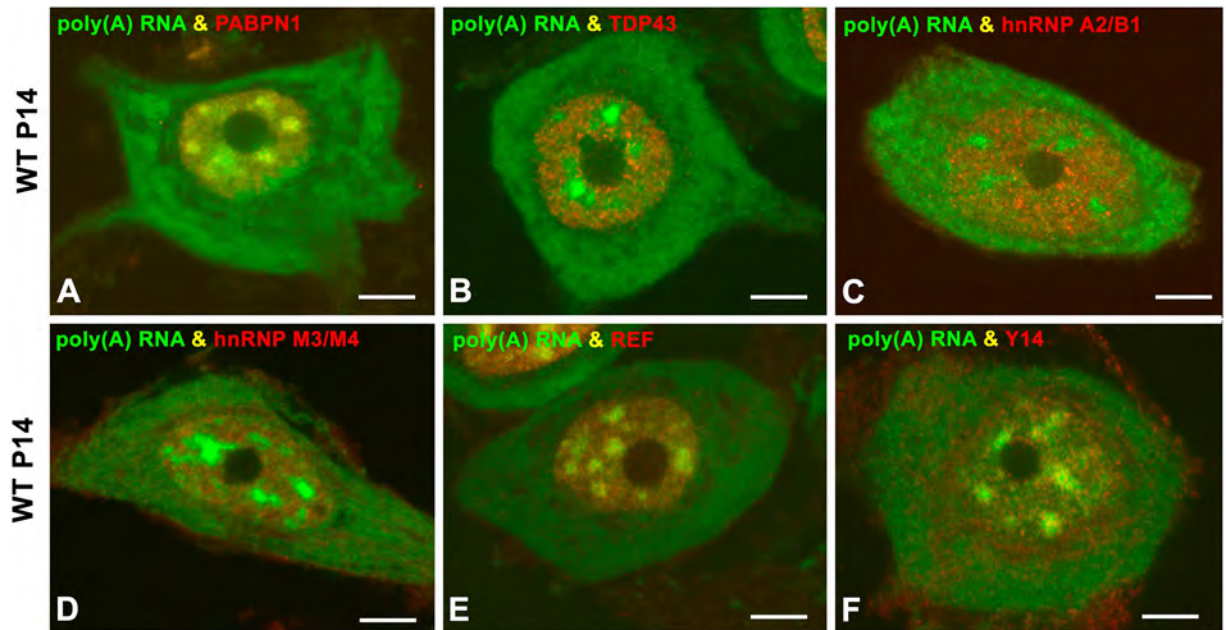


Figure 6. (A–F) Double labeling for poly(A) RNAs and the RNA-binding proteins PABPN1 (A), TDP43 (B), hnRNP A2/B1 (C), hnRNP M3/M4 (D), REF (E) and Y14 (F) in WT MNs at the P14 stage. Whereas all proteins exhibit a nuclear localization, PABPN1 and REF appear concentrated in nuclear speckles. Scale bar: 4 μ m.

A poorly understood aspect of SMA is why MNs that carry the same deletion or mutation of the *SMN1* gene are affected differently. Our results confirm this heterogeneity, showing that at both P5 and P14, affected MNs carrying PARGs coexist with other MNs that have an apparently normal pattern of poly(A) RNA distribution. In this regard, differences in the pathogenic vulnerability of MNs have recently been correlated with individual differences in SMN protein levels in MNs from a particular SMA mouse⁵⁸.

Although we have previously reported the presence of PARGs in sensory ganglion neurons upon proteasome inhibition^{16,17}, the present work provides the first demonstration that these structures are present in SMA MNs. The PARG represents a distinct nuclear entity that is clearly distinguishable by its structure and molecular composition from other nuclear compartments, such as nuclear speckles⁹, Cajal bodies^{43,59,60}, gems⁴⁴ and clastosomes⁴⁵. PARGs share with nuclear speckles the presence of poly(A) RNAs; however, PARGs lack spliceosomal snRNPs and display an ultrastructural configuration as sharply defined nuclear bodies that is clearly different from the interchromatin granule clusters of nuclear speckles^{9,43}. Cajal bodies, the nuclear structures involved in spliceosomal snRNP biogenesis⁴², are depleted in *SMN Δ 7* MNs³⁴; additionally, the Cajal body marker coilin was not detected in PARGs. Similarly, gems, SMN-positive and coilin-negative nuclear bodies of unknown function^{43,44}, have been reported in fetal MNs⁶¹, but they are absent in postnatal and mature MNs from both WT and *SMN Δ 7* mice³⁴. Moreover, we did not detect SMN in PARGs. Finally, these RNA granules also lack the 20S proteasome, a molecular marker of clastosomes, which are nuclear proteolytic factories enriched in catalytic proteasomes, ubiquitylated proteins and proteasome substrates^{45,62}.

PARG-containing MNs were already observed at P5, but they increased in number during the late symptomatic stages (P14), presumably reflecting the well-established asynchrony at the beginning of the MN degeneration in *SMN Δ 7* mice⁶³. We propose that the formation of PARGs in *SMN Δ 7* MNs reflects a stress-related dysfunction of RNA metabolism, essentially in pre-mRNA splicing. Consistent with this view, pre-mRNA splicing has emerged as a well-known and important target of several stressing agents, resulting in alternative splicing dysregulation and splicing inhibition⁶⁴. In the case of SMA, several studies demonstrated that the hyperactivation of the endoplasmic reticulum stress pathway and widespread defects in splicing underlie the neurodegeneration observed in SMA MNs^{27,29,31,32,65}. Moreover, we have previously reported the formation of PARGs following proteasome inhibition-induced proteotoxic stress in rat sensory ganglion neurons, an experimental condition that produces a dysfunction of RNA metabolism and a disruption of the protein synthesis machinery^{16,17}.

An important finding in this study is the accumulation of Sam68 in PARGs. Sam68 is a member of the STAR (signal transducer and activator of RNA) family of RNA-binding proteins that bind both RNA and DNA and are involved in signal transduction, transcription and alternative splicing regulation^{36,66–68}. As a splicing regulator, Sam68 may promote exon inclusion or exclusion in certain neural pre-mRNAs, including *SMN2*, *Bcl-x* and *Nrxn 1*^{36,37,47}. Regarding *SMN* genes, Sam68 is a physiological regulator of *SMN2*, but not of *SMN1*, splicing. Thus, Sam68 directly binds to the *SMN2* pre-mRNA and acts as a splicing repressor of exon 7 inclusion in *SMN2* transcripts^{46,69}. In the present study, we detected no significant changes in the mRNA and protein levels of Sam68 in the spinal cords of *SMN Δ 7* mice compared with the WT animals. Although the accumulation of Sam68 in PARGs should reduce its nucleoplasmic levels, potentially facilitating the inclusion of exon 7 in *SMN2* transcripts^{46,69}, its partial relocation in PARGs does not correct the defective *SMN2* splicing in *SMN Δ 7* mice. In fact, SMN protein levels

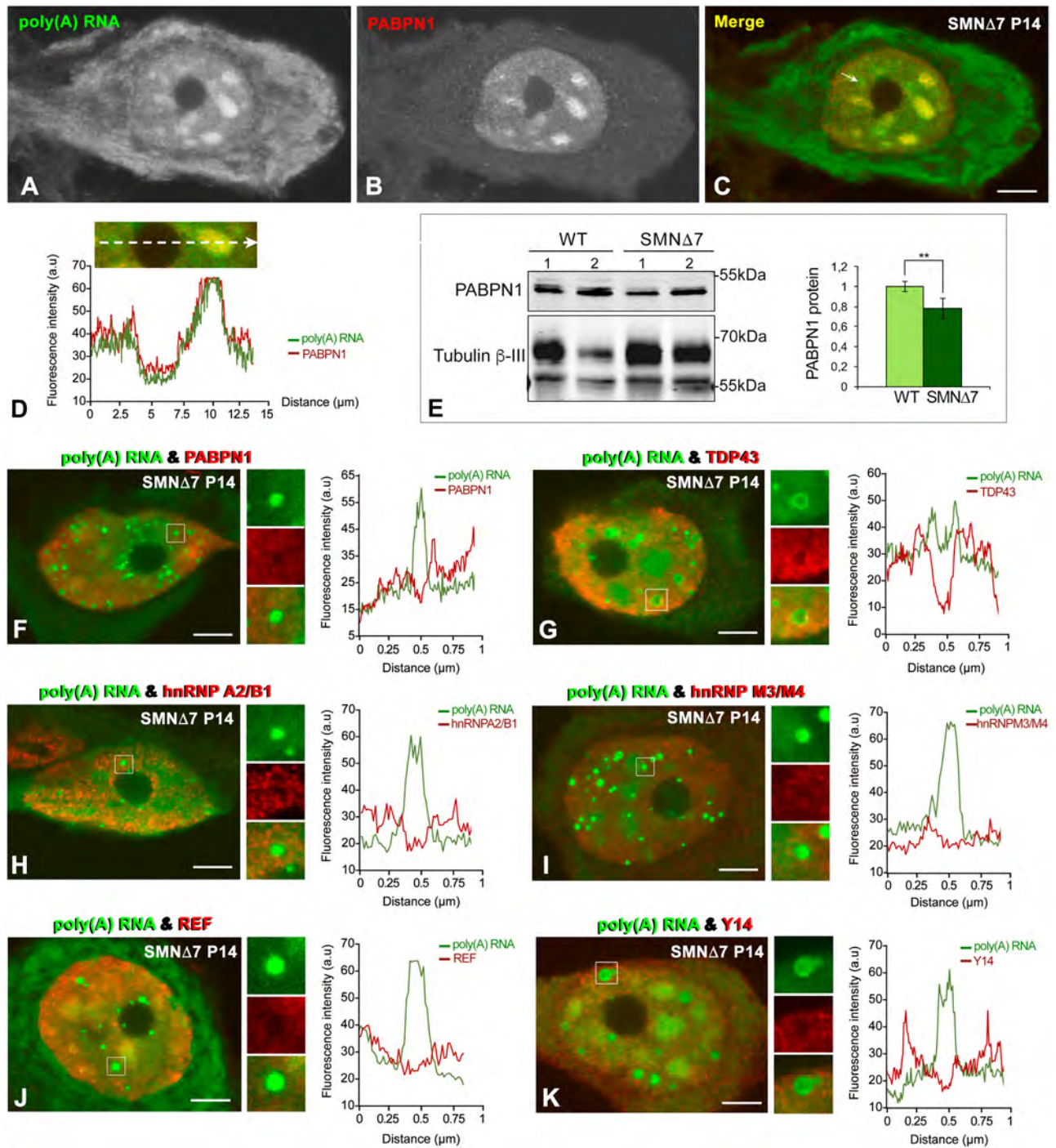


Figure 7. (A–D) Double labeling for poly(A) RNA and PABPN1 shows the colocalization of both molecules in nuclear speckles in a PARG-free MN from an SMN Δ 7 mouse. Scale bar: 5 μ m. (E) Representative western blotting analysis of PABPN1 levels in spinal cord lysates from WT and SMN Δ 7 mice. Western blot bands for PABPN1 were normalized to Tubulin β -III, which showed double immunoreactive bands at approximately 70 kDa and 55 kDa. We choose the 55 kDa band for normalization purposes since 50–55 kDa is the predicted and apparent molecular weight of Tubulin β -III in WB analyses. The larger 70 kDa band observed could be due to cross-reactivity with a protein related to Tubulin β -III or a post-translationally modified form of Tubulin β -III. The bars represent a densitometric analysis of the WB bands for PABPN1 normalized to the 55 kDa Tubulin β -III band and expressed as the mean \pm SD of three independent experiments (WT (n = 3) vs SMN Δ 7 (n = 5)). p value from WT and SMN Δ 7 data comparison: $4.3E-3$ (** $p < 0.005$). (F–K) Double labeling for poly(A) RNAs and the RNA-binding proteins PABPN1 (F), TDP43 (G), hnRNP A2/B1 (H), hnRNPM3/M4 (I), REF (J) and Y14 (K) reveals an absence of the colocalization of poly(A) RNA with these RNA-binding proteins in PARGs, which was confirmed by plots of their respective fluorescence intensity profiles across a line. Scale bar: 4 μ m.

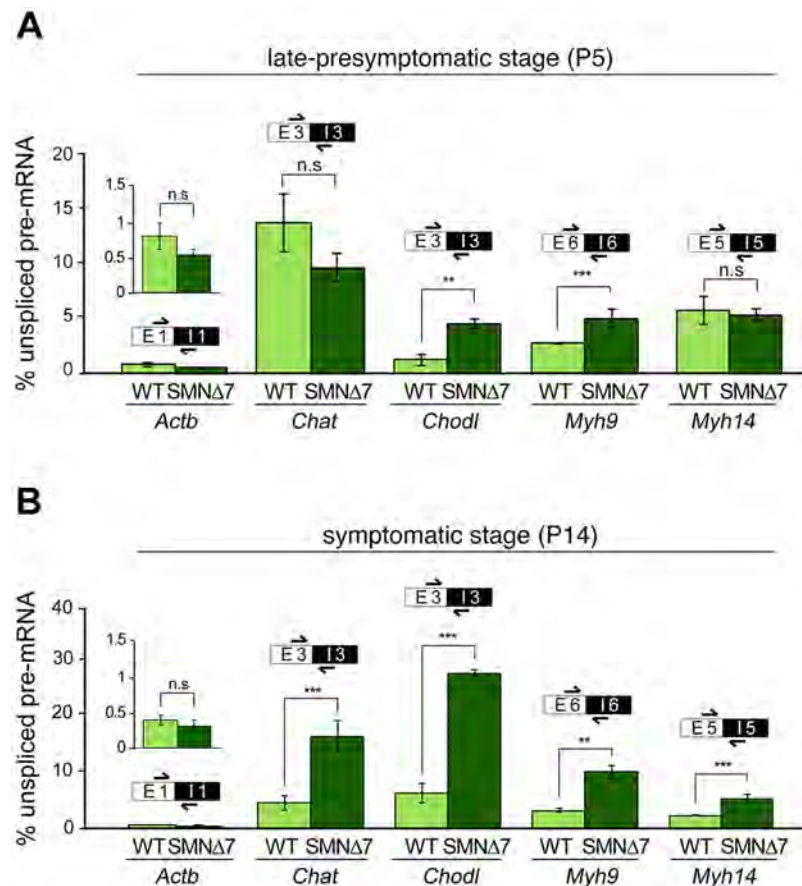


Figure 8. (A,B) qRT-PCR determination of the intron-containing (unspliced) *Chat*, *Chodl*, *Myh9* and *Myh14* pre-mRNAs reveals a significant increase of the relative abundance of their unspliced pre-mRNAs in the spinal cords of SMNΔ7 mice compared with WT mice at P14 (B). *p* values from WT and SMNΔ7 data comparison at P14: 2.1E-3 for *Chat*, 3.5E-4 for *Chodl*, 6.3E-4 for *Myh9* and 2.2E-4 for *Myh14* (***p* < 0.005; ****p* < 0.0005). (A) During the late presymptomatic stage (P5), this increase was only detected in *Chodl* and *Myh9* pre-mRNAs. *p* value from WT and SMNΔ7 data comparison at P5: 2.1E-3 for *Chodl* and 3.5E-4 for *Myh9* (***p* < 0.005; ****p* < 0.0005). No significant changes (*n.s.*) in unspliced *Actb* pre-mRNAs were detected when samples from WT and SMNΔ7 mice were compared at either P5 or P14. The bars represent the mean ± SD of the relative fraction of the total RNA transcript that is unspliced pre-mRNA from WT (*n* = 3) and SMNΔ7 mice (*n* = 5). qRT-PCR analyses were always confirmed in triplicate.

are dramatically reduced in the spinal cords of the SMNΔ7 mice during the symptomatic stages (present results and³⁴). However, our results show changes in the alternative splicing regulation of the Sam68-dependent *Bcl-x* and *Nrxn-1* mRNAs in the spinal cords of SMNΔ7 mice. It is well-established that Sam68 binds *Bcl-x* mRNA, and its intracellular levels regulate the balance of alternative splicing to produce pro-apoptotic *Bcl-x(s)* transcripts or anti-apoptotic *Bcl-x(L)* transcripts⁴⁸. In particular, whereas the upregulation of Sam68 enhances *Bcl-x(s)* splicing, its downregulation promotes the production of *Bcl-x(L)* transcripts⁴⁷. In this context, our finding of a reduction of the *Bcl-x(s)/Bcl-x(L)* ratio in the SMNΔ7 mice, compared with WT littermates, is consistent with a downregulation of Sam68.

Regarding *Nrxn1* transcripts, changes in alternative splicing regulation result in a decreased *Nrxn1* 4(-)/*Nrxn1* 4(+) ratio, with a relative increase in the isoform that includes exon 20 in *Nrxn1* alternatively spliced segment 4 (AS4). Importantly, the neurexin protein 4(+) and 4(-) variants show different interactomes with proteins that are key mediators of synaptic formation and maintenance, including neuroligins (for a review, see³⁷). Thus, previous studies have demonstrated that neurexin 4(+) exhibits weak binding with the neuroligin-1B post-synaptic receptor, which affects synaptic adhesion^{70,71}. In this context, the Sam68-dependent relative abundance of neurexin 4(+) in SMNΔ7 mice might contribute to the synaptic dysfunction observed in SMA MNs^{22,25}. Collectively, our results suggest that the recruitment of Sam68 into PARGs impacts on its normal function in splicing regulation. In this line, recent studies have shown that Sam-68 deficient preadipocytes exhibit alternative splicing imbalances in components of the mTOR signaling pathway that lead to defective adipogenic differentiation⁷².

The nuclear accumulation of immature or aberrant pre-mRNAs can be triggered by a wide range of errors in mRNA processing, which prevent the recruitment of mRNA export factors¹². We believe that PARGs may

contain incorrectly processed polyadenylated transcripts bound to Sam68, but lack other RNA-binding proteins involved in packing nascent mRNA (hnRNPA2/B1), splicing regulation (hnRNPM3/M4 and TDP43) and polyadenylation (PABPN1). Consistent with the nuclear accumulation of poly(A) RNA in PARGs, REF and Y14, two RNA-binding proteins that link pre-mRNA splicing to nuclear export^{73,74}, are not detectable in these granules. Moreover, we observed a reduction of the levels of PABPN1, a protein that, in addition to polyadenylation, is also involved in mRNA export from the nucleus⁴⁹. Therefore, a deficiency of this export factor in SMN Δ 7 MNs could also contribute to the accumulation of poly(A) RNA in PARGs.

Alternative splicing defects account for nearly 50% of human inherited diseases⁷⁵, and missplicing events are particularly prominent in neurodegenerative diseases^{76,77}. Previous studies in mouse models of SMA have demonstrated SMN-dependent downregulated spliceosomal snRNPs and altered alternative splicing, preferentially in U12-dependent introns^{27–29,31}. Our results extend the splicing defects in SMA MNs. Thus, we demonstrate here the accumulation of incompletely spliced (intron-containing) *Chat*, *Chodl*, *Myh9* and *Myh14* pre-mRNAs during the late symptomatic stage (P14), when a higher incidence of PARG-containing MNs occurs. Interestingly, the accumulation of intron-containing mRNAs impacts the transcripts processed by both the minor (*Myh9* and *Myh14*) and major (*Chat*, *Chodl*) spliceosomes, suggesting a global splicing dysfunction. Importantly, reduced *Chodl* expression has been demonstrated in SMA mouse MNs and linked to MN outgrowth defects^{28,78}.

Although MN functions, such as axonal RNA transport and translation control at the neuromuscular junction, are altered in SMA⁷⁹, spliceosome dysfunction plays a critical role in SMA pathogenesis (for a review, see³⁰). We propose that the abnormal accumulation of polyadenylated RNAs in PARGs reported here, together with the previously demonstrated depletion of canonical (coilin-, SMN- and snRNP-positive) Cajal bodies^{34,80,81} are two cellular manifestations of the global splicing dysfunction in SMA MNs. Notably, an enhancement of the nuclear poly(A) RNA signal, which is associated with the formation of cytoplasmic stress granules, has been reported in a cellular model of *C9orf72* amyotrophic lateral sclerosis⁸², suggesting that the nuclear accumulation of polyadenylated mRNAs may be a more general mechanism in the pathogenesis of MN diseases.

The reduction of the cytoplasmic poly(A) RNA signal in MNs containing a large number of PARGs supports a decrease in the translation efficiency, with reduced availability of polyadenylated mRNAs for protein synthesis. Consistent with this notion, by ultrastructural and immunocytochemical analyses, we have previously reported nucleolar alterations and a severe disruption of the protein synthesis machinery in MNs from the SMN Δ 7 mice³⁴. Furthermore, a recent study on the transcriptome and translome in SMA mice, by means of next-generation sequencing, provides an important catalogue of the mRNAs with altered translation efficiency³³. The negative impact of the reduced levels of cytoplasmic poly(A) RNAs on translation might be reinforced by the failure of SMN Δ 7 MNs to recruit these RNAs into cytoplasmic stress granules, which is a protective cellular mechanism for the transient storage and stabilization of mRNAs during the stress-induced inhibition of translation⁴⁰.

In conclusion, SMN deficiency in SMN Δ 7 MNs causes an abnormal nuclear accumulation of polyadenylated RNAs in PARGs and the cytoplasmic depletion of these RNAs. This neuronal response suggests a defective mRNA processing, export and translation and is also consistent with the widespread splicing defects reported in SMA MNs. The present study provides additional support for the hypothesis that the dysfunction of nuclear mRNA metabolism plays a critical role in MN degeneration and consequently in SMA pathogenesis.

Material and Methods

Animals. The *Smn*^{+/-}, *SMN2*^{+/+}, *SMN Δ 7*^{+/+}, heterozygous knockouts for mouse *Smn* (FVB. Cg-Tg[SMN2*delta7]4299Ahmb Tg[SMN2]89Ahmb *Smn*1tm1Msd/J, stock number 005025), which were purchased from The Jackson Laboratory (Sacramento, USA), were crossed to generate *Smn*^{-/-}, *SMN2*^{+/-}, *SMN Δ 7*^{+/-} (hereafter referred to as SMN Δ 7) mice and *Smn*^{+/+}, *SMN2*^{+/+}, *SMN Δ 7*^{+/+} mice that were wild-type for *Smn* (hereafter referred to as WT). SMN Δ 7 mice exhibit a severe postnatal SMA phenotype with a mean lifespan of approximately two weeks^{63,83}. Animal care and handling were performed in accordance with the Spanish legislation (Spanish Royal Decree 53/2013 BOE) and the guidelines of the European Commission for the Accommodation and Care of Laboratory Animals (revised in Appendix A of the Council Directive 2010/63/UE). The experimental plan was examined and approved by the Ethics Committee of the University of Cantabria and the Committee for Animal Care and Use of the University of Lleida. On postnatal day (P) 0, the identification of WT and SMN Δ 7 mice was carried out by genotyping with PCR. DNA was extracted from the tail, as previously described⁶³. Age-matched WT littermates of mutant animals were used as controls.

Immunofluorescence and confocal microscopy. For immunofluorescence, four mice per group (WT and SMN Δ 7) at P5 and P14 were perfused, under deep anesthesia with pentobarbital (50 mg/kg), with 3.7% paraformaldehyde (freshly prepared) in phosphate-buffered saline (PBS). The spinal cords were rapidly dissected, removed, post-fixed for 6 hours and washed in PBS. Transverse sections (160 μ m thick) of the spinal cord were obtained with a vibratome, and small tissue fragments from the anterior horn were dissected out. The samples were transferred to a drop of PBS on a positively charged slide (Superfrost Plus, Thermo Scientific, Germany), and squash preparations of dissociated MNs were generated following the previously reported procedure⁸⁴. The samples were sequentially treated with 0.5% Triton X-100 in PBS for 45 minutes, 0.1 M glycine in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) for 30 minutes and 0.05% Tween 20 in PBS for 5 minutes. Then, the samples were incubated for 3 hours with the primary antibody containing 1% BSA at room temperature, washed with 0.05% Tween 20 in PBS, incubated for 45 minutes in the specific secondary antibody conjugated to FITC, TexasRed or Cy3, or Cy5 (Jackson, USA) and counterstained with PI for the detection of nucleic acids. The slides were then washed in PBS and mounted with the ProLong Anti-Fading Medium (Invitrogen) or Vectashield (Vector, USA).

Confocal images were obtained with an LSM510 (Zeiss, Germany) laser scanning microscope using a 63x oil (1.4 NA) objective. To avoid overlapping signals, images were obtained by sequential excitation at 488 nm,

543 nm and 633 nm, to detect FITC, TexasRed or Cy3, and Cy5, respectively. Fluorescence profiles of confocal intensity signals across a line were generated to analyze the spatial association between PARGs and the nuclear speckles (TMG-Cap), Cajal bodies (coilin), gems (SMN), clastosomes (20S proteasome) and the RNA-binding proteins PABPN1, Sam68, TDP43, hnRNP A2/B1, hnRNP M3/M4, REF and Y14. Images were processed using Photoshop software.

The following primary antibodies were used for immunofluorescence: the mouse monoclonal antibodies anti-SMN (610646, BD Transduction Laboratories, USA), anti-TMG-cap (NA02A, Oncogene), anti-REF (ab6141, Abcam), anti-Y14 (ab5828, Abcam) and anti-hnRNPM3/M4 (ab9548, Abcam), the rabbit polyclonal antibodies anti-PABPN1 (sc-67017, Santa Cruz Biotechnology), anti-proteasome 20 S subunit α 5 (ab11437, Abcam), anti-Sam68 (sc-333, Santa Cruz Biotechnology), anti-coilin 204/10 (204.3 serum⁸⁵), and anti-TDP43 (10782-2-AP, Proteintech Inc. Group), and the goat polyclonal antibody anti-hnRNPA2/B1 (sc-10035, Santa Cruz Biotechnology).

In situ hybridization and quantification. Tissue fragments from the ventral horn of the spinal cord fixed with 3.7% paraformaldehyde were processed for fluorescence *in situ* hybridization (FISH). MN perikarya were then dissociated as described above. Preparations of MNs were permeabilized with TBS-E-SDS for 15 minutes at 37°C, washed three times in 6x SSPE-0.1% Tween 20 for 15 minutes, and incubated with the probe containing tRNA for 3 hours at 42°C in a humidified chamber. An oligo dT₍₅₀₎mer, 5'-end labeled with biotin (MWG-Biotech, Germany) was used as a probe for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to poly(A) RNA. The hybridization mixture contained 80 ng of oligo dT(50), 2xSSC, 1 mg/ml tRNA, 10% dextran sulfate and 25% formamide. After hybridization, the MNs were washed in 6xSSC for 15 minutes, and then washed in 4x SSC-0.1% Tween 20 for 15 minutes at room temperature. The hybridization signal was detected with FITC-avidin for 30 minutes. For the amplification of the hybridization signal, neuronal samples were incubated with avidin-biotin for 30 minutes, washed in 4x SSC-0.1% Tween 20 for 15 minutes and then incubated with FITC-avidin for 30 minutes. All samples were mounted with Vectashield (Vector, USA). Some samples were also processed for double- or triple-labeling experiments combining poly(A) RNA detection with immunofluorescence for TMG-cap, PABPN1, Sam68, TDP43, hnRNP A2/B1, hnRNPM3/M4, REF or Y14.

The quantitative analysis of the proportion of SMN Δ 7 MNs containing PARGs was performed in squash preparations processed for FISH with the poly(dT) probe. The proportion of neurons containing these granules was estimated by direct examination of the different focal planes throughout neuronal nuclei, using a 40 \times objective. Quantification was performed on at least 100 MNs from three WT and SMN Δ 7 mice.

The fluorescence intensity of poly(A) RNAs in the Nissl substance was quantified using the confocal Zeiss LSM 5 image analysis system. At least 30 confocal images of MNs per animal from WT (n = 3) and SMN Δ 7 (n = 3) mice were recorded using a 63x oil objective. For each MN, four measurements of poly(A) RNA signal intensity in the peripheral cytoplasm, where the RNA-rich Nissl substance is largely distributed, were made. The values were corrected for background staining by subtraction of a blank measurement taken outside the cell.

Electron microscopy. For conventional ultrastructural examination of MNs, WT and SMN Δ 7 mice (n = 3 per group) were perfused under deep anesthesia with 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Transverse sections (500 μ m thick) were obtained with a vibratome, and anterior horn tissue fragments were dissected out, rinsed in 0.1 M phosphate buffer, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in acetone and embedded in araldite (Durcupan, Fluka, Switzerland). Ultrathin sections stained with uranyl acetate and lead citrate were examined with a JEOL 201 electron microscope.

For immunoelectron microscopy of Sam68, WT and SMN Δ 7 mice were perfused with 3.7% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Tissue fragments of the ventral horn were washed in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in increasing concentrations of methanol at -20°C, embedded in Lowicryl K4M at -20°C and polymerized with ultraviolet irradiation. Ultrathin sections were mounted on nickel grids and sequentially incubated with 0.1 M glycine in PBS for 15 min, 5% BSA in PBS for 30 min and the primary antibody for 2 h at 37°C. After washing, the sections were incubated with the specific secondary antibodies coupled to 10 nm gold particles (BioCell, UK; diluted 1:50 in PBS containing 1% BSA). Following immunogold labeling, the grids were stained with lead citrate and uranyl acetate and examined with a JEOL 201 electron microscope. As controls, ultrathin sections were treated as described above without the primary antibody.

Real time quantitative PCR (qRT-PCR) for relative gene expression analysis. Five SMN Δ 7 (n = 5) and 3 WT (n = 3) mice were used for qRT-PCR studies. The mice were decapitated after being anesthetized and the lumbar spinal cord was quickly removed and frozen in liquid nitrogen. RNA was isolated with Trizol following the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad) and purified with the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany).

One microgram of RNA was reverse-transcribed to first-strand cDNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) using random hexamers as primers. The cDNA concentration was measured in a spectrophotometer (Nanodrop Technologies ND-1000) and adjusted to 0.5 μ g/ μ l. The expression of the mRNAs candidates *Sam68* (Sam68), *Actb* (β -actin), *Chat* (choline O-acetyltransferase), *Chodl* (chondrolectin), *Myh9* (Myosin-9) and *Myh14* (Myosin-14), as well as the long and short isoforms of *Bcl-x* (Bcl-XL and Bcl-XS), and *Nrxn1 4(-)* and *Nrxn1 4(+)* variants (neurexin 4(+)) and neurexin 4(-)) was determined by qRT-PCR using gene-specific SYBR Green- based primers (Takara). RT-qPCRs was performed with three biological replicates and technical triplicates/duplicates of each cDNA sample. The threshold cycle (Ct) for each well was determined. The results were normalized to the 45 S ribosomal gene transcripts, which had no significant variation in expression across the sample sets and was therefore chosen as a normalizer in our experiments. Relative gene expression was calculated according to the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} equation⁸⁶. Each value in this

work represents the mean \pm SD of independent samples obtained under the same conditions and compared to two replicated qRT-PCR analyses. The SYBR Green-based specific primers for murine RNAs were as follows: for the *Sam68* mRNA 5'-CTCCAGCTAGGCCAGTGAA-3' and 5'-TTGTGGGTAAAGCAACAGGA-3'; for the unspliced pre-mRNA of *Actb* containing intron 1, 5'-GACTCCCAGCAC ACTGAACT-3' and 5'-CTCAGGGCAGGTGAA ACTGT-3; for the spliced mRNA of *Actb* 5'-CAGCCTTCCTTCTTGGGTATG-3' and 5'-GGCATAGAGGTCTTT ACGGATG-3'; for the unspliced pre-mRNA of *Chat* containing intron 3, 5'-CTTGGGGCCAGTCTGATAGC-3' and 5'-GGACACATGGCTAGAAGGGG-3'; for the spliced mRNA of *Chat*, 5'-CTGGCTTACTACAGGCTTTACC-3' and 5'-GTGGCCGATCTGATGTTGT-3'; for the unspliced pre-mRNA of *Chodl* containing intron 3, 5'-GCTGTTGTCTCCCGCATCTT-3' and 5'-AAGTGGAAG CGTTTGGGA TT-3'; for the spliced mRNA of *Chodl*, 5'-GAAGCAGGCATAATCCCAATC-3' and 5'-TTC CCAAAGCA ACCAGTATCA-3; for the unspliced pre-mRNA of *Myh9* containing intron 6, 5'-CACTTGTGTGGC ATTGGGAC-3' and 5'-AAGAAGGACCT CTCCTCCGA-3'; for the spliced mRNA of *Myh9*, 5'-TGGTGCCAAC ATGGA GACTTAT-3' and 5'-CCAGACAGCAG GTAGTAGAAGA-3'; for the unspliced pre-mRNA of *Myh14* containing intron 5, 5'-TCACCCTGAAAAGATGCC-3' and 5'-TCGAAGGTCCAGACAGGCAT-3'; for the spliced mRNA of *Myh14*, 5'-GGAGCA AACATCGAGACCTATC-3' and 5'-GGTAGAAGATATGG AAGCTGCATT-3'. For the long form of *Bcl-x* (*Bcl-x(L)*), 5'-GAGTTACCGGCGACCCA-3' and 5'-CGACAGCAA GCAGGTACAA-3'; for the short form of *Bcl-x* (*Bcl-x(s)*), 5'-GCTGCCTACCAGAACCTTATC-3' and 5'-GGCTCAACCAGTCCATTGT-3'; for the exon 20 containing *Nrxn1* variant (*Nrxn1 4(+)*), 5'-TAGTTGATGAATGGCTACTCGACAAA-3' and 5'-GACTCAGTTG TCATAGAGGAAGGCAC-3'; for the exon 20 skipped *Nrxn1* variant (*Nrxn1 4(-)*), 5'-GCTACCCTGCAGGGCGT-3' and 5'-GAGGTGGACATCTCAGACTGCAT-3'.

SDS-PAGE and immunoblotting. Spinal cords from WT ($n = 3$) and SMN Δ 7 mice ($n = 5$) were lysed at 4°C in a buffer containing 50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 1 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, and 10% glycerol, and supplemented with EDTA-free complete protease inhibitor cocktail and PhosSTOP (Roche). The spinal cord samples were sonicated for 5 cycles of 30 seconds ON/OFF at 4°C using a Bioruptor Plus (Diadode) and left on ice for 20 min. The samples were then cleared by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min at 4°C. The proteins were separated on 4–20% NuPage TG SDS-PAGE gels (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membranes using standard procedures. Mouse monoclonal anti-Tubulin β -III (Sigma T8660) and rabbit polyclonal anti-PABPN1 and anti-Sam68 were used. Protein bands were detected with an OdysseyTM Infrared-Imaging System (Li-Cor Biosciences) according to the OdysseyTM Western-Blotting Protocol. Immunoblots were developed with anti-mouse IRDye800DX or anti-rabbit IRDye680DX (Rockland Immunochemicals, USA) secondary antibodies. For the quantitative analysis of the blots, ImageJ software was used (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>).

Statistical analysis. For comparisons between WT and SMN Δ 7 samples, data were analyzed using the GraphPad Prism 7 software and an unpaired Student's *t*-test. Significance was established at $p \leq 0.05$.

References

- Moore, M. J. & Proudfoot, N. J. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* **136**, 688–700 (2009).
- Girard, C. *et al.* Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion. *Nat. Commun.* **3**, 994 (2012).
- Poulos, M. G., Batra, R., Charizanis, K. & Swanson, M. S. Developments in RNA splicing and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a000778 (2011).
- Kühn, U. & Wahle, E. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1678**, 67–84 (2004).
- Johnson, C. *et al.* Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35 domain. *J. Cell Biol.* **150**, 417–32 (2000).
- Smith, K. P., Byron, M., Johnson, C., Xing, Y. & Lawrence, J. B. Defining early steps in mRNA transport: mutant mRNA in myotonic dystrophy type I is blocked at entry into SC-35 domains. *J. Cell Biol.* **178**, 951–64 (2007).
- Bahar Halpern, K. *et al.* Nuclear Retention of mRNA in Mammalian Tissues. *Cell Rep.* **13**, 2653–62 (2015).
- Calado, A. & Carmo-Fonseca, M. Localization of poly(A)-binding protein 2 (PABP2) in nuclear speckles is independent of import into the nucleus and requires binding to poly(A) RNA. *J. Cell Sci.* **113**(Pt 12), 2309–18 (2000).
- Lamond, A. I. & Spector, D. L. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 605–612 (2003).
- Tavanez, J. P., Calado, P., Braga, J., Lafarga, M. & Carmo-Fonseca, M. *In vivo* aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1. *RNA* **11**, 752–62 (2005).
- Hall, L. L., Smith, K. P., Byron, M. & Lawrence, J. B. Molecular anatomy of a speckle. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **288**, 664–75 (2006).
- Schmid, M. & Jensen, T. H. Nuclear quality control of RNA polymerase II transcripts. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **1**, 474–85 (2010).
- Qurashi, A., Li, W., Zhou, J.-Y., Peng, J. & Jin, P. Nuclear accumulation of stress response mRNAs contributes to the neurodegeneration caused by Fragile X premutation rCGG repeats. *PLoS Genet.* **7**, e1002102 (2011).
- Bengochea, R. *et al.* Nuclear speckles are involved in nuclear aggregation of PABPN1 and in the pathophysiology of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol. Dis.* **46**, 118–29 (2012).
- Klein, P. *et al.* Nuclear poly(A)-binding protein aggregates displace a pre-mRNA outside of SC35 speckle causing its abnormal splicing. *Nucleic Acids Res.* **44**, 10929–10945 (2016).
- Casafont, I., Berciano, M. T. & Lafarga, M. Bortezomib induces the formation of nuclear poly(A) RNA granules enriched in Sam68 and PABPN1 in sensory ganglia neurons. *Neurotox. Res.* **17**, 167–78 (2010).
- Palanca, A., Casafont, I., Berciano, M. T. & Lafarga, M. Reactive nucleolar and Cajal body responses to proteasome inhibition in sensory ganglion neurons. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 848–59 (2014).
- Renoux, A. J. & Todd, P. K. Neurodegeneration the RNA way. *Prog. Neurobiol.* **97**, 173–189 (2012).
- Soler-Botija, C., Ferrer, I., Gich, I., Baiget, M. & Tizzano, E. F. Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* **125**, 1624–34 (2002).

20. Talbot, K. & Tizzano, E. F. The clinical landscape for SMA in a new therapeutic era. *Gene Ther.* <https://doi.org/10.1038/gt.2017.52> (2017).
21. Lefebvre, S. *et al.* Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**, 155–65 (1995).
22. Burghes, A. H. M. & Beattie, C. E. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 597–609 (2009).
23. Lefebvre, S. *et al.* Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* **16**, 265–269 (1997).
24. Monani, U. R. *et al.* The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*($-/-$) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 333–9 (2000).
25. Cauchi, R. J. SMN and Gemins: 'we are family' ... or are we?: insights into the partnership between Gemins and the spinal muscular atrophy disease protein SMN. *Bioessays* **32**, 1077–89 (2010).
26. Matera, A. G. & Wang, Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 108–21 (2014).
27. Zhang, Z. *et al.* SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* **133**, 585–600 (2008).
28. Bäumer, D. *et al.* Alternative splicing events are a late feature of pathology in a mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS Genet.* **5**, e1000773 (2009).
29. Lotti, F. *et al.* An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function. *Cell* **151**, 440–54 (2012).
30. Tisdale, S. & Pellizzoni, L. Disease Mechanisms and Therapeutic Approaches in Spinal Muscular Atrophy. *J. Neurosci.* **35**, 8691–8700 (2015).
31. Doktor, T. K. *et al.* RNA-sequencing of a mouse-model of spinal muscular atrophy reveals tissue-wide changes in splicing of U12-dependent introns. *Nucleic Acids Res.* **45**, 395–416 (2017).
32. Jangi, M. *et al.* SMN deficiency in severe models of spinal muscular atrophy causes widespread intron retention and DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E2347–E2356 (2017).
33. Bernabò, P. *et al.* *In Vivo* Translatome Profiling in Spinal Muscular Atrophy Reveals a Role for SMN Protein in Ribosome Biology. *Cell Rep.* **21**, 953–965 (2017).
34. Tapia, O. *et al.* Cellular bases of the RNA metabolism dysfunction in motor neurons of a murine model of spinal muscular atrophy: Role of Cajal bodies and the nucleolus. *Neurobiol. Dis.* **108**, 83–99 (2017).
35. Lukong, K. E. & Richard, S. Sam68, the KH domain-containing superSTAR. *Biochim. Biophys. Acta* **1653**, 73–86 (2003).
36. Richard, S. Reaching for the stars: Linking RNA binding proteins to diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **693**, 142–57 (2010).
37. Iijima, T. *et al.* SAM68 regulates neuronal activity-dependent alternative splicing of neurexin-1. *Cell* **147**, 1601–14 (2011).
38. Peters, A., Palay, S. L. & Webster, H. deF. *The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells.* (Oxford University Press 1970).
39. Hua, Y. & Zhou, J. Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules. *FEBS Lett.* **572**, 69–74 (2004).
40. Anderson, P. & Kedersha, N. RNA granules: Figure 1. *J. Cell Biol.* **172**, 803–808 (2006).
41. Biggogera, M. & Fakan, S. Fine structural specific visualization of RNA on ultrathin sections. *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 389–95 (1998).
42. Machyna, M., Heyn, P. & Neugebauer, K. M. Cajal bodies: where form meets function. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4**, 17–34 (2013).
43. Lafarga, M., Tapia, O., Romero, A. M. & Berciano, M. T. Cajal bodies in neurons. *RNA Biology* **14**, 712–725 (2017).
44. Liu, Q. & Dreyfuss, G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* **15**, 3555–65 (1996).
45. Lafarga, M. *et al.* Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2771–82 (2002).
46. Pedrotti, S. *et al.* The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy. *EMBO J.* **29**, 1235–47 (2010).
47. Paronetto, M. P., Achsel, T., Massiello, A., Chalfant, C. E. & Sette, C. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *J. Cell Biol.* **176**, 929–939 (2007).
48. Boise, L. H. *et al.* Bcl-X, a Bcl-2 Related Gene That Functions As a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death. *Cell* **74**, 597–608 (1993).
49. Apponi, L. H. *et al.* Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1058–1065 (2010).
50. Lee, E. B., Lee, V. M. Y. & Trojanowski, J. Q. Gains or losses: Molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience* **13**, 38–50 (2012).
51. Sephton, C. F. *et al.* Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.* **286**, 1204–15 (2011).
52. Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O., Berciano, M. T. & Lafarga, M. TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons. *J. Struct. Biol.* **167**, 235–241 (2009).
53. Bekenstein, U. & Soreq, H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: From structural insights to post-transcriptional regulatory roles. *Mol. Cell. Neurosci.* **56**, 436–446 (2013).
54. Smith, R., Rathod, R. J., Rajkumar, S. & Kennedy, D. Nervous translation, do you get the message? A review of mRNPs, mRNA–protein interactions and translational control within cells of the nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3917–3937 (2014).
55. Rodrigues, J. P. *et al.* REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1030–1035 (2001).
56. Kim, V. N. *et al.* The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *EMBO J.* **20**, 2062–2068 (2001).
57. Newell-Litwa, K. A., Horwitz, R. & Lamers, M. L. Non-muscle myosin II in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Dis. Model. Mech.* **8**, 1495–1515 (2015).
58. Rodriguez-Muela, N. *et al.* Single-Cell Analysis of SMN Reveals Its Broader Role in Neuromuscular Disease. *Cell Rep.* **18**, 1484–1498 (2017).
59. Gall, J. G. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 273–300 (2000).
60. Cioce, M. & Lamond, A. I. Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 105–31 (2005).
61. Young, P. J. *et al.* Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN. *Exp. Cell Res.* **265**, 252–61 (2001).
62. Carmo-Fonseca, M., Berciano, M. T. & Lafarga, M. Orphan nuclear bodies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000703 (2010).
63. Tarabal, O. *et al.* Mechanisms involved in spinal cord central synapse loss in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **73**, 519–35 (2014).
64. Biamonti, G. & Caceres, J. F. Cellular stress and RNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 146–53 (2009).
65. Ng, S.-Y. *et al.* Genome-wide RNA-Seq of Human Motor Neurons Implicates Selective ER Stress Activation in Spinal Muscular Atrophy. *Cell Stem Cell* **17**, 569–84 (2015).
66. Hartmann, A. M., Nayler, O., Schwaiger, F. W., Obermeier, A. & Stamm, S. The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59(fyn). *Mol. Biol. Cell* **10**, 3909–26 (1999).
67. Matter, N. & Herrlich, P. & K'nig, H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* **420**, 691–695 (2002).
68. Rajan, P. *et al.* Regulation of gene expression by the RNA-binding protein Sam68 in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 505–507 (2008).

69. Pagliarini, V. *et al.* SAM68 is a physiological regulator of SMN2 splicing in spinal muscular atrophy. *J. Cell Biol.* **211**, 77–90 (2015).
70. Dean, C. *et al.* Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat. Neurosci.* **6**, 708–716 (2003).
71. Chih, B., Gollan, L. & Scheiffele, P. Alternative Splicing Controls Selective Trans-Synaptic Interactions of the Neuroligin-Neurexin Complex. *Neuron* **51**, 171–178 (2006).
72. Song, J. & Richard, S. Sam68 Regulates S6K1 Alternative Splicing during Adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 1926–1939 (2015).
73. Zhou, Z. *et al.* The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* **407**, 401–405 (2000).
74. Dreyfuss, G., Kim, V. N. & Kataoka, N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 195–205 (2002).
75. Cáceres, J. F. & Kornblihtt, A. R. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* **18**, 186–93 (2002).
76. Dredge, B. K., Polydorides, A. D. & Darnell, R. B. The splice of life: alternative splicing and neurological disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 43–50 (2001).
77. Ibrahim, F., Nakaya, T. & Mourelatos, Z. RNA Dysregulation in Diseases of Motor Neurons. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **7**, 323–352 (2012).
78. Sleight, J. N. *et al.* Chondrolectin affects cell survival and neuronal outgrowth in *in vitro* and *in vivo* models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 855–69 (2014).
79. Rossoll, W. *et al.* Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J. Cell Biol.* **163**, 801–12 (2003).
80. Tapia, O. *et al.* Reorganization of Cajal bodies and nucleolar targeting of coilin in motor neurons of type I spinal muscular atrophy. *Histochem. Cell Biol.* **137**, 657–67 (2012).
81. Sapaly, D. *et al.* Small-molecule flunarizine increases SMN protein in nuclear Cajal bodies and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Sci. Rep.* **8** (2018).
82. Rossi, S. *et al.* Nuclear accumulation of mRNAs underlies G4C2-repeat-induced translational repression in a cellular model of C9orf72 ALS. *J. Cell Sci.* **128**, 1787–99 (2015).
83. Le, T. T. *et al.* SMN Δ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 845–57 (2005).
84. Pena, E., Berciano, M. T., Fernandez, R., Ojeda, J. L. & Lafarga, M. Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* **430**, 250–63 (2001).
85. Bohmann, K., Ferreira, J. A. & Lamond, A. I. Mutational analysis of p80 coilin indicates a functional interaction between coiled bodies and the nucleolus. *J. Cell Biol.* **131**, 817–31 (1995).
86. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

Acknowledgements

The authors wish to thank Raquel García-Ceballos for technical assistance. We are also grateful to Prof. A. I. Lamond (University of Dundee, UK) for anti-coilin antibody (204.10). The authors are also indebted to Prof. Josep E. Esquerda for critical reading of the manuscript and helpful suggestions. This work was supported by grants from: “Dirección General de Investigación” of Spain (BFU2014-54754-P and SAF2015-70801-R, cofinanced by FEDER) and “Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla-IDIVAL (NVAL17/22). Dr. Tapia is the recipient of a grant from SMA Europe and FundAME (Spain).

Author Contributions

M.L., M.T.B., O. Tapia. and J.C. conceived and designed the experiments. O.N., O. Tapia., O. Tarabal, L.P., J.C., M.T.B. and M.L. performed the experiments and analyzed the data. M. L., M.T.B. and J.C. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27821-3>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018