

EL NUCLEOLO COMO UN REGULADOR DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR

MARIA ROSETE¹, MARIA ROSA PADROS¹, OSVALDO VINDROLA^{1, 2}¹Laboratorio de Bioquímica Celular, Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.²Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen El nucléolo, considerado únicamente como el sitio de síntesis de los ribosomas, actualmente representa una estructura nuclear dinámica que participa en la regulación de importantes procesos celulares. Numerosas evidencias han demostrado que el envejecimiento celular es una de las diversas funciones que son controladas por el nucléolo. Las mutaciones en las proteínas de localización nucleolar promueven el envejecimiento prematuro en levaduras y humanos. La carencia de represión en la transcripción de genes que codifican para el ARNr que se encuentran dañados, y las mutaciones en las helicasas del ADN encargadas de minimizar la formación de círculos extra-cromosómicos del ADN que codifica para el ARNr, provocan modificaciones en la estructura del nucléolo e inducen envejecimiento prematuro en levaduras. De igual manera, en los humanos la carencia de las helicasas del ADN localizadas en el nucléolo y que participan en el mantenimiento de la integridad genómica, favorecen el desarrollo de aquellas enfermedades asociadas con el envejecimiento acelerado. Además, la presencia de algunos componentes de la telomerasa en el nucléolo, indica que parte de la biosíntesis de esta enzima se realiza en esta estructura nuclear, sugiriendo una conexión entre el nucléolo y la síntesis de los telómeros en la regulación del envejecimiento celular. Por otra parte, el nucléolo secuestra proteínas para regular su actividad biológica durante el inicio o término de la vida replicativa celular.

Palabras clave: nucléolo, envejecimiento, síndrome de Werner, p53, telómeros

Abstract *The nucleolus as a regulator of cellular senescence.* The nucleolus has been considered originally only as the site for the ribosome synthesis, but now it is well known that it represents a dynamic nuclear structure involved in important cellular processes. Several evidences have demonstrated that the nucleolus regulates the cellular senescence. Specific mutations on the DNAs codifying for nucleolar proteins induced premature senescence from yeast to human. The failure to repress the genes transcription codifying for damaged rRNA, and the mutations in DNA helicases, which minimizes the formation of DNA extra-chromosomal circles codifying for rRNA, modify the nucleolar structure and induce premature senescence in yeast. Similarly, in humans, the reduction of these DNA helicases levels, which are localized in the nucleoli and participate in maintenance of genomic integrity, helps to the development of those diseases associated with premature senescence. Furthermore, the presence in the nucleolus of some telomerase components, indicates that part of the biosynthesis of this enzyme occurred in this nuclear structure; suggesting a communication between the nucleolus and the synthesis of the telomeres in the regulation of cell senescence. On the other hand, the nucleolus sequesters proteins to regulate its own biological activity, from the start to the end of cellular replication. In addition this nuclear structure is involved in the biosynthesis of most cellular ribonucleoprotein particles, as well as in cell cycle regulation, making it central to gene expression. In conclusion, the nucleolus became a multifunctional subnuclear structure involved from cell proliferation to cell senescence.

Key words: nucleolus, aging, Werner syndrome, p53, telomeres

Uno de los procesos que ocurre normalmente y que comparten todos los seres vivos es el envejecimiento. Naturalmente los organismos crecen, se desarrollan y reproducen, y con el paso del tiempo manifiestan cam-

bios morfológicos y funcionales que inevitablemente los llevan a la muerte. Pero las causas que lo provocan aún no han sido totalmente comprendidas, por lo que la definición de este proceso permanece en discusión. Puede ser explicado desde múltiples puntos de vista, involucrando aspectos fisiológicos, morfológicos, celulares y moleculares. En base a los avances logrados en las investigaciones actuales, se han postulado diversas teorías que explican las bases celulares y moleculares del proceso del envejecimiento celular, donde la participación del nucléolo parece ser una pieza clave en las células eucarióticas.

Recibido: 2-III-2006

Aceptado: 1-XI-2006

Dirección postal: Dr. Osvaldo Vindrola, Laboratorio de Bioquímica Celular. Instituto de Fisiología, BUAP. 14 Sur 6301, Colonia San Manuel, c.p. 72570, Puebla, Pue. México. Apartado Postal 406. 72001. Puebla, Pue. México.

Fax: + (52) (222) 229-5500

e-mail: ovindrol@siu.buap.mx

Tradicionalmente el nucléolo ha sido considerado como la fábrica productora de ribosomas donde se realizan la síntesis y el procesamiento del ARN pre-ribosomal (pre-ARNr). En las últimas décadas esta perspectiva ha cambiado considerablemente, mostrando que ésta es una estructura dinámica donde se realizan numerosas actividades, tales como: el transporte de moléculas que residen en el núcleo hacia el citoplasma, la modificación de ARNs pequeños, el ensamblaje de ribonucleoproteínas, el reclutamiento de proteínas reguladoras y el control del envejecimiento celular¹⁻⁴. En la presente revisión se analizan algunos aspectos que demuestran la participación del nucléolo en el envejecimiento celular.

La estructura del nucléolo

El nucléolo es un compartimiento subnuclear que generalmente está constituido por tres regiones en los eucariontes superiores. Se forma a partir de las regiones organizadoras del nucléolo, donde se encuentran localizadas múltiples copias de los genes que codifican para el pre-ARNr, dispuestas secuencialmente. La primera región denominada centro fibrilar (CF) es la más interna, compuesta por finas fibrillas de ~50Å de diámetro, y contiene los genes que codifican para el pre-ARNr, la ARN polimerasa I, la ADN topoisomerasa I y el factor de transcripción UBF^{5,6} (Fig. 1). Alrededor del CF se encuentra el componente fibrilar denso (CFD), el cual se observa como una capa compacta compuesta principalmente por fibrilarina. Esta proteína está involucrada en la 2'-O-metilación de ribosomas del ARNr y en los primeros estadios del procesamiento de los ARNs^{2,7}. Toda la zona fibrilar está dentro de una región más grande, compuesta principalmente por gránulos de 15-20nm de diámetro, y deno-

minada componente granular (CG); el cual es la tercera región y la más externa que conforma el nucléolo, donde se realiza el ensamblaje de las partículas pre-ribosomales destinadas a ser transportadas al citoplasma. En el CG se concentran la fosfoproteína nucleolar B23 y NOP52, las cuales participan en los estadios intermedios y tardíos de la biogénesis de los ribosomas^{2-4,6-9} (Fig. 1).

La estructura del nucléolo se mantiene por la transcripción de los genes que codifican para el ARN ribosomal (ARNr), la cual es realizada por la ARN polimerasa I¹⁰. Usando pruebas de localización simultánea del ARN naciente con marcadores de la maquinaria transcripcional, se ha demostrado que la transcripción del ADN que codifica para el ARNr se realiza en la zona localizada entre el centro fibrilar y el componente fibrilar denso^{3,11,12}. Algunos autores consideran que varios pre-ARNr nacientes se encuentran en el CF, principalmente en la zona cortical¹³. Los transcritos pre-ARNr resultantes luego pasan por la región CFD donde son cortados y modificados por ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNPs) y enzimas procesadoras. Los ARNs comienzan a ensamblarse con proteínas ribosomales en el CFD y continúan su maduración en los CG desde donde son transportados al citoplasma. Es decir, que la biogénesis de los ribosomas es un proceso vectorial que involucra el movimiento secuencial a través de los tres subcompartimientos nucleolares²⁻⁴.

Numerosas evidencias sugieren que para la formación y el mantenimiento de la estructura nucleolar se necesita que los genes que codifican para el ARNr estén transcripcionalmente activos. Sin embargo, hay evidencias donde se comprueba que la transcripción por la ARN polimerasa I no es suficiente para inducir la formación y aislar la función del nucléolo del resto del núcleo^{3,14}.

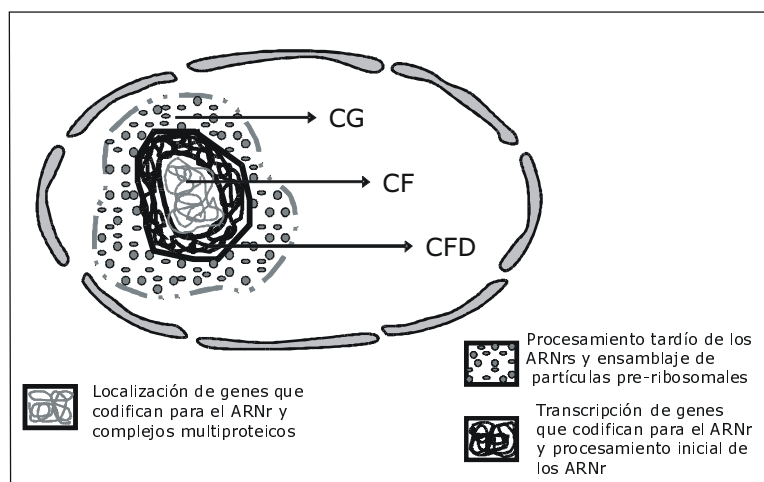


Fig. 1.- Representación esquemática de la estructura del nucléolo. CF: centro fibrilar; CFD: componente fibrilar denso y CG: componente granular.

Esta estructura nucleolar es altamente dinámica. Mediante estudios de video microscopía confocal y por medición de la velocidad de recuperación de fluorescencia o de la pérdida de la señal fluorescente, se ha demostrado que las proteínas nucleolares encargadas de la transcripción (subunidades de la ARN polimerasa I y factores de transcripción) del procesamiento de los ARNs (como B23, NOP52, nucleolina y RPP29) y fibrilarina se intercambian continuamente con el nucleoplasma y con otros compartimientos nucleares, como son los cuerpos de Cajal, "speckles" y "paraspeckles"¹⁵⁻²¹. Debido a estas evidencias varios autores sugieren la existencia de mecanismos de retención específicos para cada compartimiento nuclear^{15, 17-19}.

Los últimos análisis de proteómica nucleolar, realizados en nucléolos aislados de células Hela, han revelado un total de 728 proteínas nucleolares endógenas, algunas de localización permanente y otras que se encuentran en forma transitoria en el nucléolo, dependiendo de los cambios en las condiciones del crecimiento celular. Estos estudios de proteómica indican que el 30% de las proteínas nucleolares aún no han sido caracterizadas y se desconoce su función. Esta información, dicen los autores, son predicciones directas que pueden ser luego testeadas *in vivo* e *in vitro*²²⁻²⁵.

Se ha demostrado además, que algunos factores que se encuentran en el nucléolo también se localizan en regiones subnucleolares que no necesariamente correlacionan con estos tres subcompartimientos bien co-

nocidos (CF, CFD y CG)²⁶. En base a los avances recientes en proteómica nucleolar y a la dinámica de las proteínas nucleolares, algunos autores proponen que la estructura tripartita del nucléolo es aún más compleja, abarcando además otros componentes como cromatina condensada perinucleolar e intranucleolar, intersticios y vacuolas nucleolares^{3, 9}.

Múltiples funciones del nucléolo

Desde que el nucléolo fue descubierto en el siglo XIX y que se encontró, en 1965, que es el sitio nuclear para la síntesis de ribosomas, las principales funciones descritas para este compartimiento subnuclear eran la transcripción del ADN que codifica para el ARNr, el procesamiento del ARNr y el ensamblaje de partículas ribosomales¹⁻¹⁰. Actualmente el nucléolo ha sido redescubierto como un dominio nuclear que participa en la regulación de otras funciones celulares^{1-4, 27} (Fig. 2).

Las principales evidencias que sugieren la participación del nucléolo en el transporte y/o el recambio de ciertos ARN mensajeros, provienen de las investigaciones realizadas en mutantes termosensibles de *Saccharomyces cerevisiae*, que acumulan ARNm en el núcleo. En muchas de estas mutantes se observa fragmentación o alargamiento del nucléolo, lo cual indica una correlación entre el nucléolo y la exportación de ARNm hacia el citoplasma²⁸. La caracterización de las mutacio-

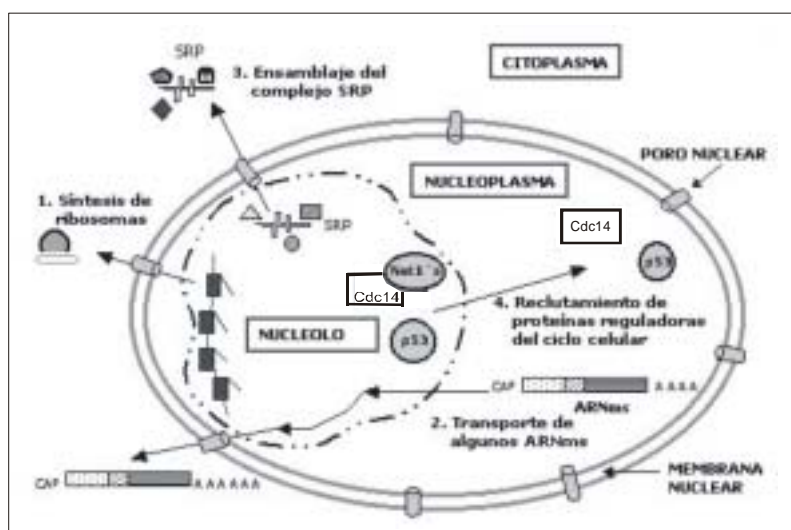


Fig. 2.— El nucléolo es el sitio de regulación de diversas funciones: 1. en el nucléolo los genes que codifican para el ARN ribosomal son transcritos por la ARN polimerasa I, las partículas pre-ribosomales son ensambladas y transportadas a través del poro nuclear hacia el citoplasma para realizar la traducción de los ARNm. 2. el procesamiento y tráfico de ciertos ARNm requieren de la estructura nucleolar. 3. el procesamiento del ARN de la RPS y el acople de esta ribonucleoproteína se realiza en el nucléolo. 4. proteínas reguladoras que controlan el inicio o término del ciclo celular son almacenadas en el nucléolo.

nes presentes en las levaduras termosensibles permitió la identificación de un gen denominado *MTR3*, el cual codifica para una proteína nucleolar de 28 kDa. Esta proteína, al estar mutada provoca una acumulación de los ARNm en el nucléolo y se producen alteraciones en la estructura del mismo²⁹.

En células de mamífero también se ha observado la presencia de ARNm en el nucléolo, como es el caso de los transcritos del oncogen *MYC*³⁰. Varios ácidos nucleicos y antígenos virales interactúan con proteínas nucleolares. En células humanas infectadas, el transporte de los ARNs virales lo realizan dos proteínas que se localizan principalmente en el nucléolo: la proteína REV del virus de inmunodeficiencia tipo 1, y la proteína REX que actúa como un regulador post-transcripcional del virus de la leucemia T^{31, 32}. Se ha encontrado que nucleolina interactúa con la región 3' no codificante del poliovirus y estimula su traducción, por lo cual se facilita la replicación viral³³. Por otra parte, nucleolina y B23 se asocian con antígenos del virus de la hepatitis D y modulan su replicación³⁴. La localización nucleolar de la proteína reguladora ORF57 del virus *Herpes saimiri* es esencial para su actividad en el transporte del ARNm viral desde el núcleo al citoplasma. Cuando se realizan mutaciones puntuales de ORF57 que impiden la localización en el nucléolo, se originan fallas en la exportación nuclear del ARNm viral; proceso que se restaura al reincorporar la señal de localización nucleolar³⁵.

El nucléolo también participa en la biogénesis de la partícula de reconocimiento del péptido señal (RPS). En los mamíferos, el complejo RPS consiste de una molécula de ARN de ~300 nucleótidos de longitud a la cual se asocian seis proteínas, ya sea como monómeros (RPS19 y RPS54) o como heterodímeros (RPS9/14 y RPS68/72). De tal manera que el complejo RPS contiene dos dominios bien definidos: S y Alu. El dominio S está formado por la secuencia central del ARN y las proteínas RPS19, RPS54 y el heterodímero RPS68/72; mientras que las proteínas RPS9 y RPS14 se unen a las secuencias 5' y 3' del ARN y conforman el dominio Alu, el cual está involucrado en el arresto de la elongación y en la exportación nuclear del complejo RPS^{26, 35, 36}.

Dicho complejo RPS se une a una secuencia señal de aminoácidos presente en los precursores de las proteínas que se secretan y en las proteínas de la membrana plasmática. El complejo RPS posee un receptor específico en el retículo endoplásmico, que a su vez está asociado a un canal de agua a través del cual las proteínas ingresan a la vía secretoria. Aunque el complejo RPS realiza su función en el citoplasma, la transfección de las proteínas RPS fusionadas a la proteína fluorescente verde (PFV) reveló que algunas de ellas se encuentran presentes tanto en el nucléolo como en el nucleoplasma. Cuando las moléculas de ARN fluorescente del complejo RPS son inyectadas en los núcleos de células de ma-

mífero, se observa que éstas se dirigen y localizan rápidamente en el nucléolo. Estas evidencias demuestran que el ensamblaje parcial de las RPS puede ocurrir en el nucléolo^{26, 36-38}.

Realizando estudios de hibridización *in situ* con doble marcaje, se ha confirmado que una fracción significativa del complejo RPS no coincide espacialmente con el RNA 28S ribosomal, sino que se concentra en un sitio intranucleolar diferente a las localizaciones clásicas de biosíntesis de ribosomas, sugiriendo que existen regiones nucleolares especializadas en otras funciones³⁹.

El nucléolo también participa en el almacenamiento de proteínas reguladoras del ciclo celular. La actividad de estas proteínas reguladoras es modulada mediante un mecanismo altamente ordenado, donde el estado de fosforilación es uno de los aspectos cruciales para controlar en qué momento estas proteínas realizan su actividad. Estudios de inmunolocalización revelan que Cdc14, una fosfatasa crítica para finalizar la mitosis, está localizada en el nucléolo durante las fases G1, S, G2 y en la metafase del ciclo celular. Cdc14 es reclutada hacia el nucléolo cuando interacciona con la proteína nucleolar CFI1/NET1, la cual evita la disponibilidad de Cdc14 activa en el nucleoplasma, asegurando el avance ordenado del ciclo celular. Cuando se requiere finalizar la mitosis Cdc14 es liberada del nucléolo en la etapa de anafase, y favorece la fosforilación de NET1 por los complejos ciclina B1- o ciclina B2-Cdk, asegurando el término del ciclo celular^{40, 41}.

La proteína supresora de tumor Retinoblastoma (pRB), inhibe el crecimiento y la proliferación celular por medio de la regulación transcripcional de genes involucrados en el ciclo celular y que son transcritos por la ARN polimerasa II. También se ha demostrado que pRB puede inhibir la síntesis de ARNr por la ARN polimerasa I, a través de la asociación con el factor UBF. Se ha observado que durante la diferenciación celular hay una disminución de la actividad transcripcional del ADN ribosomal y una rápida acumulación de pRB en el nucléolo⁴².

Varias ubiquitin ligasas, denominadas E3, se agregan y permanecen inmobilizadas en el nucléolo en respuesta a diferentes señales inhibitorias, como es el caso de dos diferentes enzimas E3: MDM2 y la proteína supresora de tumor von Hippel-Lindau (VHL); las cuales probablemente se unen a proteínas del andamiaje nucleolar. Una vez finalizado el estímulo, el nucléolo libera rápidamente MDM2 y VHL, las cuales pasan de un estado estático a uno de alta movilidad. Según los autores, el secuestro temporal de ambas enzimas en el nucléolo altera las propiedades dinámicas de estas ubiquitin ligasas, y representa un mecanismo celular de regulación de reacciones enzimáticas⁴³.

Además de producir y procesar los transcritos ARNr, el nucléolo también está involucrado en el procesamien-

to de algunos ARNt. Este proceso se lleva a cabo por una serie de reacciones enzimáticas que incluyen la remoción del extremo 5' del pre-ARNt, seguido de la ruptura del extremo 3', splicing y modificaciones nucleotídicas⁴⁴.

La proteína del síndrome Cockayne B (CSB) es esencial para la reparación del ADN acoplado a la transcripción, proceso que depende de la elongación de la ARN polimerasa II. Cuando CSB acoplada a PFV es expresada a niveles fisiológicos en fibroblastos humanos normales, se localiza en el nucleoplasma y se acumula en el nucléolo. En base a estos resultados, los autores proponen que algunas de las vías metabólicas de reparación del ADN dañado se llevarían a cabo en el nucléolo⁴⁵.

Definición del envejecimiento

Los estudios realizados para discernir los mecanismos que disparan el envejecimiento han generado la formulación de diversas hipótesis que explican este proceso. En opinión de muchos científicos la duración de la vida está determinada por un programa genético intrínseco de cada especie. En este campo se han logrado grandes avances, ya que actualmente se cuenta con la identificación de varios genes que incrementan o disminuyen la duración de la vida. Por ejemplo, las mutaciones en los genes *SIR* (reguladores de información silente) y en el gen *WRN* (Síndrome de Werner), producen envejecimiento prematuro en levaduras y en humanos, respectivamente⁴⁶⁻⁵².

Otros investigadores argumentan que la duración de la vida está delimitada por la velocidad del metabolismo, de tal manera que es más corta en aquellos organismos que tienen un metabolismo alto. Esto se ha observado en modelos como el nematodo *Caenorhabditis elegans* en estado adulto, donde la activación de un mecanismo que induce un estado latente conocido como vía Dauer y que reduce el metabolismo, aumenta la duración de vida del mismo^{53, 54}. Debido a estos hallazgos, algunos investigadores piensan que reduciendo la ingesta diaria de calorías se puede lograr que los organismos alarguen su tiempo de vida. Se ha comprobado que el interruptor que dispara el envejecimiento es la acumulación de daños en el ADN que son generados por productos tóxicos del metabolismo. Como parte del metabolismo normal en las células se generan radicales libres como anión su-peróxido O_2^- , H_2O_2 y anión hidroxilo $>OH^-$, los cuales, en reacciones adicionales dan origen a moléculas de oxígeno reactivo extremadamente dañinas para macro-moléculas biológicas⁵⁵⁻⁵⁷.

En el ADN, estos agentes oxidantes producen alteración de bases, rompimiento de cadenas simples, intercambio de cromátidas hermanas y unión covalente de proteínas al ADN. Con el paso del tiempo, estos ADN dañados se acumulan lentamente y un mecanismo

genético responde iniciando el proceso de envejecimiento celular⁵⁵⁻⁵⁷.

Pero existen en la célula también sistemas enzimáticos que detectan y reparan el ADN dañado, para mantener y controlar la integridad genómica; por lo cual, otra de las teorías actuales sobre las causas del envejecimiento celular se centran en las fallas de este sistema de reparación. Tanto en humanos como en ratones, las mutaciones en determinadas proteínas y otros defectos en las vías que protegen la integridad del genoma causan envejecimiento prematuro⁵⁸⁻⁶⁰.

Proteínas localizadas en el nucléolo que participan en la determinación de la duración de la vida en *Saccharomyces cerevisiae*

El estudio de los genes que participan en el proceso del envejecimiento ha sido posible gracias a las investigaciones realizadas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Durante la última década se ha propuesto que el reloj que determina la duración de la vida y, por lo tanto, el envejecimiento en las levaduras es la formación de círculos de ADN extra-cromosómicos⁶¹. En cada ciclo celular, los círculos extra-cromosómicos (CEC) se replican vía recombinación homóloga de las múltiples copias de los genes que codifican para los ARNr, los cuales se segregan de manera asimétrica en las células madres e hijas. Así, las levaduras madres sufren un incremento exponencial de CEC (1000 en células viejas), los cuales se consideran marcadores del envejecimiento y de la muerte celular^{61, 62}.

Por otra parte, el avance ordenado del ciclo celular en *S. cerevisiae* depende parcialmente de la represión de la expresión de los genes situados en el sitio HM (levaduras tipo α o α), y en los telómeros. La represión de estos sitios genómicos es realizada por diversas proteínas, como son los reguladores de la información silente (*SIR* 2-4), y por los extremos amino terminal de las histonas H3 y H4^{46, 47}. Mediante estudios de inmunohistoquímica se conoce que los complejos *SIR*2, *SIR*3 y *SIR*4 están localizados en los extremos de los cromosomas y en los sitios HMR o HML (Fig. 3). En las levaduras tipo salvajes, las proteínas *SIR*2 también están localizadas en el nucléolo, y participarían en la organización de la cromatina dentro de los genes que codifican para el ARNr, favoreciendo la represión de la transcripción y deteniendo la recombinación de dichos genes^{47, 48}.

Usando cepas de levaduras mutantes en los genes *SIR*2, 3 y 4 se determinó que el nucléolo es otro sitio de acción fisiológica para los complejos proteicos *SIR*. Las mutaciones en el gen *SIR*4 provocan una dramática acumulación de la proteína *SIR*3 en el nucléolo, la cual es dependiente de la integridad de *SIR*2. Además, el hecho de que *SIR*4 no forme complejos funcionales se re-

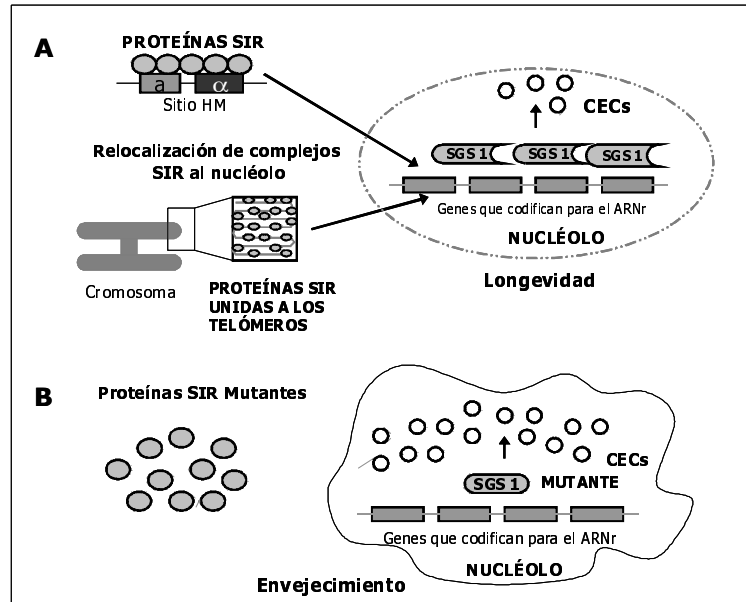


Fig. 3.— Participación del nucléolo en la regulación del envejecimiento en *Saccharomyces cerevisiae*. A. la presencia de la proteína SGS1 en el nucléolo inhibe la formación de CECs. La redistribución de las proteínas SIR desde los telómeros y sitios HM hacia el nucléolo reprimen la transcripción de genes que codifican para el ARNr que están mutados, promoviendo la longevidad. B. las mutaciones en las helicasas de ADN de la familia RECQ, como la proteína SGS1, provocan la formación acelerada de círculos de ADN extra-cromosómicos (CECs) durante la recombinación de las repeticiones de genes que codifican para el ARNr. Los complejos SIR mutantes no pueden inhibir adecuadamente la expresión de copias de genes que codifican para el ARNr que están dañados, conduciendo al envejecimiento celular prematuro y modificación en la estructura del nucléolo.

fleja en un considerable aumento en la duración de la vida de las levaduras mutantes. Aún más, en las levaduras salvajes también se observa que las proteínas SIR3 se redistribuyen desde los telómeros y sitios HM hacia el nucléolo cuando las levaduras están envejeciendo normalmente⁴⁹. Durante la vida de las levaduras, el ADN que codifica para el ARNr sufre daños que conducen al envejecimiento de las células madre, pero la re-localización de los complejos SIR en el nucléolo contrarresta el efecto del daño genético por mutación e hiper-recombinación, promoviendo la longevidad⁵⁰.

Se han encontrado 7 miembros de la familia homóloga a SIR2 en mamíferos, denominadas SIRT1-7, con diferente localización celular, actividad de deacetilación de proteínas y efectos en la longevidad celular. SIRT6 se asocia con la heterocromatina y SIRT7 se localiza en el nucléolo, sitio donde actúa la proteína SIR2 de levaduras. Pero la sobre-expresión de cada una de estas proteínas SIRTs no aumenta la duración de vida en fibroblastos humanos normales o en células epiteliales de próstata⁶³. Sin embargo, los ratones deficientes de SIRT6 desarrollan severos defectos metabólicos a las 2-3 semanas de edad, que derivan en la muerte a las 4 semanas. Los autores concluyen que la carencia de

SIRT6 genera inestabilidad genómica, por fallas en los mecanismos de reparación del ADN, y en consecuencia los ratones desarrollan un fenotipo degenerativo similar al envejecimiento⁶⁰.

Otras evidencias que apoyan la participación del nucléolo como regulador del envejecimiento son los estudios sobre el gen *SGS1* de *S. cerevisiae*. Este gen codifica para la proteína SGS1, que es un miembro de la familia de las helicasas del ADN RECQ. El uso de mutantes en el gen *SGS1* ha revelado un mecanismo por el cual la pérdida de alguna proteína de esta familia de helicasas de ADN puede causar envejecimiento prematuro (Fig. 3). Mediante estudios de inmunolocalización se demostró que la proteína SGS1 está concentrada en el nucléolo, donde actúa para suprimir la formación de CEC. En ausencia de SGS1, los CEC se forman rápidamente y se replican en las siguientes divisiones celulares, produciendo envejecimiento celular. Además, las mutaciones en el gen *SGS1* producen reducción en la vida celular, fragmentación nucleolar, re-localización de reguladores de información silente e incremento del tamaño celular, características que también son observadas cuando las levaduras salvajes envejecen⁶⁴ (Fig. 3).

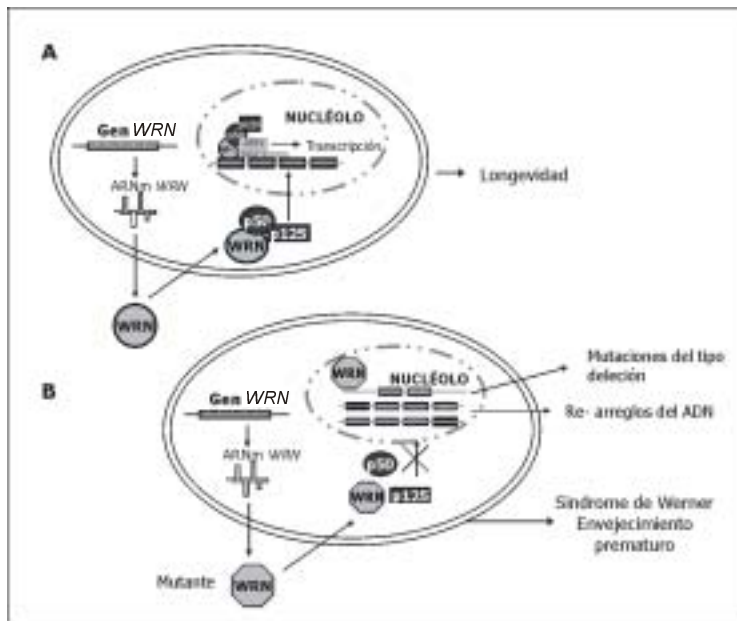


Fig. 4. Modelo que explica la participación de la proteína WRN en el envejecimiento celular en humanos. A.- en condiciones normales, la helicasa WRN, moviliza al complejo p50/p125 hacia el nucleolo para facilitar la transcripción del ADN que codifica para el ARNr promoviendo la longevidad. B.- la proteína WRN mutante es incapaz de reclutar a la subunidad p50/p125 de la polimerasa δ hacia el nucleolo, evitando la transcripción del ADN que codifica para el ARNr. Además, la actividad de helicasa de la proteína WRN afectada en las proteínas mutantes favorece la inestabilidad genómica y los re-arreglos cromosómicos en el ADN del nucleolo, causando el desarrollo del síndrome de Werner, que es una enfermedad con síntomas de envejecimiento prematuro.

Localización nucleolar de las helicasas del ADN en enfermedades de envejecimiento prematuro en humanos

Con respecto al análisis del envejecimiento en humanos, los esfuerzos han estado orientados al estudio del síndrome de Werner, un raro desorden recesivo autosómico con muchas características de envejecimiento prematuro. Las manifestaciones de esta enfermedad incluyen cataratas oculares bilaterales, encanecimiento y pérdida del cabello, osteoporosis, diabetes mellitus tipo II, arterioesclerosis acelerada y cáncer. Eventualmente, los pacientes con síndrome de Werner mueren por enfermedades cardiovasculares o cáncer en la cuarta o quinta década de la vida⁵¹.

El gen *WRN*, responsable de este desorden, codifica para la proteína WRN que está constituida por 1 432 aminoácidos y posee un dominio central de siete motivos característicos presentes en las helicasas del ADN del tipo RECQ⁵¹. El extremo N-terminal de la proteína WRN nativa posee actividad de helicasa del ADN dependiente de ATP en dirección 3' a 5', por lo que WRN desenrolla cuádruplex específicos del ADN. Basándose en estas funciones enzimáticas, se ha sugerido que WRN modifica las estructuras complejas del ADN que aparecen durante la replicación y/o la recombinación⁶⁵.

Las cepas de *S. cerevisiae* que tienen mutaciones en el gen *SGS1* presentan defectos en la replicación del ADN. Estas deficiencias en la replicación también se han observado en el síndrome de Werner. Además, en explantes de fibroblastos de pacientes con este síndrome se ha demostrado una enorme inestabilidad genómica que incluye re-arreglos en el ADN que codifica para el ARNr, así como un incremento en la frecuencia de mutaciones de tipo deleción⁵².

Usando técnicas de inmunofluorescencia indirecta y fraccionamiento subcelular se demostró que la proteína WRN, al igual que *SGS1*, tiene una localización predominantemente nucleolar. Sin embargo, las mutaciones en el gen *WRN* no causan cambios en la morfología nucleolar, como ocurre con las levaduras mutantes en el gen *SGS1*. La presencia de la proteína WRN en el nucleolo indica un posible papel en la determinación de la duración de la vida en las células humanas, como sucede con *SGS1* en las levaduras⁶⁶.

La proteína p50, una subunidad esencial de la ADN polimerasa δ involucrada principalmente en la replicación del ADN, se asocia directamente con el extremo C-terminal de WRN *in vitro* e interactúa con dicha proteína *in vivo* (Fig. 4). Por medio de estudios de localización subcelular, también se demostró que WRN recluta a la subunidad catalítica p50/p125 de la ADN polimerasa δ

hacia el nucléolo. *In vivo* las proteínas nativas WRN forman complejos con p125 y p50, los cuales son aislados predominantemente en fracciones enriquecidas de proteínas nucleolares⁶⁵. Por lo que existe la posibilidad de que WRN sea parte de la maquinaria de replicación del ADN y que esta helicasa regule el reclutamiento de la ADN polimerasa δ a sitios específicos del inicio de la replicación, facilitando la duplicación del ADN gracias a sus propiedades de helicasa. Por lo tanto, una de las funciones de la proteína WRN sería la de modificar directamente la replicación del ADN vía interacción con p50 e inducir la re-localización de la ADN polimerasa δ dentro del núcleo⁶⁵ (Fig. 4).

La función de WRN en los fibroblastos normales está relacionada con la transcripción del ARNr. Se ha observado que cuando los fibroblastos son activados, WRN es reclutada hacia el nucléolo. Además, la inhibición de la transcripción del ARNr con actinomicina D libera a la proteína WRN del nucléolo. La co-inmunoprecipitación de WRN con la subunidad RPA40 de la ARN polimerasa I y la reducción en la transcripción del ADNr en células procedentes de pacientes con síndrome de Werner indican que WRN está íntimamente relacionada con la síntesis de ARNr⁶⁷.

Por las evidencias experimentales mencionadas anteriormente, se ha sugerido que la proteína WRN juega un rol activo en los procesos metabólicos de ADNr, ADNr/ARNr y ARNr^{52, 65-68}.

Estudios más recientes indican que cuando se produce un arresto en la replicación o daños al ADN, como consecuencia de estímulos internos y/o externos, WRN puede moverse desde el nucléolo al nucleoplasma en discretos cuerpos nucleares donde co-localiza parcialmente con otras proteínas como son: PML, RPA, TRF2 y RAD51, formando complejos proteicos de manera reversible. Esta dinámica del movimiento de WRN es regulada por modificaciones post-traduccionales (fosforilación, acetilación, etc) de esta proteína^{68, 69}.

Además, mediante la tecnología de pequeños ARNs de interferencia, se ha demostrado que la proteína WRN actúa directamente en el proceso de reparación de la excisión de bases del ADN dañado inducido por agentes alquilantes, a través de sus dominios con actividades de helicasa y exonucleasa, y en asociación con la polimerasa β ^{69, 70}.

Cabe destacar que WRN es una proteína multifuncional y participa en diversos procesos celulares, aunque en esta revisión se analizan exclusivamente sus funciones en el contexto general del nucléolo como dominio nuclear durante la senescencia.

El nucléolo y la regulación de p53

La proteína supresora de tumor p53 juega un papel crucial en la inducción del arresto del ciclo celular, en la

reducción de la proliferación de cánceres, en la apoptosis y en la determinación del envejecimiento replicativo celular. A través del uso de mutantes dominantes negativos que suprimen la función de p53 endógena, se ha observado un retraso importante en el envejecimiento replicativo. Por otro lado, se sabe que la inmortalización de las células en cultivo requiere de la pérdida funcional de p53. Por el contrario, una excesiva actividad de p53 puede imponer un fenotipo de envejecimiento irreversible en células cancerosas^{71, 72}.

Sin embargo, un ligero aumento en los niveles de una proteína p53 truncada puede provocar un fenotipo temprano de envejecimiento en ratones que presentan una mutación en un alelo del gen *p53*. Los ratones mutantes (*p53+/mt*) muestran una disminución del 20% en la duración de vida, osteoporosis, atrofia generalizada, disminución de la tolerancia al estrés, reducción de la respuesta regenerativa a varios estímulos estresantes y una mayor resistencia a desarrollar tumores espontáneos cuando se comparan con los ratones controles (*p53+/+*). Estas evidencias experimentales sugieren también un rol de p53 en la regulación de la longevidad^{73, 74}.

Se ha observado que algunas señales oncogénicas inducen estabilización de p53 por la proteína p19^{ARF}. En células de ratón, p19^{ARF} está localizada exclusivamente en el nucléolo. La sobre-expresión de p19^{ARF} conduce al reclutamiento de MDM2 hacia el nucléolo, que normalmente se encuentra en el núcleo y el citoplasma, evitando que MDM2 se una a p53, lo que conduce a la estabilización de p53, y por consiguiente, al arresto del ciclo celular⁷⁷.

En células humanas, p14^{ARF} se localiza fundamentalmente en el nucléolo donde interacciona con otras dos importantes proteínas nucleolares: B23 y topoisomerasa I. Se ha demostrado que es necesaria la integridad funcional del motivo central de la proteína B23 para lograr su unión a p14^{ARF} y así mantener y estabilizar los niveles necesarios de p14^{ARF} en el nucléolo⁷⁸⁻⁸⁰. Por otra parte, la proteína MDM2, la cual es una enzima E3 ubiquitin ligasa, actúa como uno de los principales reguladores de las funciones de p53. En células normales la unión de MDM2 a p53 incrementa la sensibilidad de p53 a la proteólisis en el citoplasma, manteniendo de esta manera niveles bajos de p53^{4, 75, 76}. Bajo condiciones de estrés celular, por ejemplo, por daño al ADN (irradiación UV) o por activación oncogénica, el nucléolo se desarma, p14^{ARF} pierde su interacción con B23 y se transloca en forma inmediata y transitoria desde el nucléolo hacia el nucleoplasma formando un complejo con MDM2^{76, 78-81}. Así p14^{ARF} inhibe la capacidad de unión de MDM2 con p53, lo cual resulta en una disminución de la degradación de p53, y los niveles de dicho factor aumentan, causando arresto del ciclo celular^{4, 76-81}.

Además, existen otras conexiones entre el nucléolo y la regulación de p53. Las proteínas nucleolares B23 y

nucleolina también se unen directamente a p53, y probablemente regulan su estabilidad. Cuando el nucléolo se desarma por condiciones de estrés celular, B23 y nucleolina se redistribuyen en el nucleoplasma para unirse a p53, y así evitan su degradación en el citoplasma^{4,76-80}.

En base a todos los resultados expuestos, se ha propuesto que el nucléolo actúa como un centro sensor del estrés celular, como un dominio secuestrador y/o protector de la degradación de proteínas nucleolares (ARF y B23), y como regulador de las vías de activación de p53⁷⁶⁻⁸¹.

En otros estudios se demostró que p53 se asocia físicamente con la proteína WRN. Esta interacción específica involucra parte del extremo C-terminal de WRN y un dominio regulador del estado funcional de p53. La unión de WRN a p53 induce un aumento de la transcripción dependiente de p53, ya que WRN inhibe un dominio regulador negativo induciendo la activación de este factor. Probablemente p53 recluta a WRN a genes específicos, donde la actividad de helicasa de WRN puede facilitar la transcripción por medio de la apertura del templado de ADN^{68, 82, 83}.

Existirían dos diferentes escenarios con respecto a la interacción entre p53 y WRN. En un primer plano, la pérdida de la función de p53 o de WRN resulta en un incremento en la inestabilidad genómica, y por lo tanto en un aumento en la predisposición al cáncer, lo que sugiere que las dos proteínas pueden poseer actividades similares y actuar sinérgicamente para prevenir el daño genético. Por otro lado, p53 y WRN actúan de manera antagónica en cuanto al envejecimiento. Así, la pérdida de la función de p53 suprime el envejecimiento y facilita la inmortalización celular, mientras que la pérdida de la función adecuada de WRN, facilita el envejecimiento prematuro^{82, 83}.

Telómeros y nucléolo

Una de las teorías más aceptadas sobre el envejecimiento es la "hipótesis del telómero", la cual propone que la longitud de los extremos de los cromosomas determinan la duración de la vida celular, por lo que el acortamiento de los telómeros causa una pérdida gradual de la capacidad replicativa e induce envejecimiento celular, mientras que el alargamiento de los telómeros prolonga la duración de la vida, o también, la transformación maligna celular⁸⁴.

La telomerasa es una ribonucleoproteína con actividad de transcriptasa reversa que sintetiza las secuencias repetitivas de ADN características de los telómeros, estabilizando la longitud y manteniendo su integridad⁸⁵. En los humanos, la telomerasa está constituida por tres componentes básicos: una subunidad de ARN esencial, la subunidad catalítica, y la proteína 1 asociada a la

telomerasa. Se ha demostrado que el ARN y la subunidad catalítica de la telomerasa presentan una localización nucleolar, a partir de lo cual se sugiere que parte del ensamblaje de la telomerasa se produce en el nucléolo⁸⁵. El análisis del ARN de la telomerasa reveló que posee un dominio H/ACA el cual es característico de los pequeños ARNs nucleolares. Usando inyección del ARN de la telomerasa en ovocitos de *Xenopus* se encontró que el transporte de este ARN se lleva a cabo por la misma vía que los pequeños ARNs nucleolares. También se observó que la distribución y la retención en el nucléolo del ARN de la telomerasa depende del dominio H/ACA⁸⁶.

Además, las proteínas hSTAU y L22, que interactúan con el ARN de la telomerasa, son proteínas que se encuentran localizadas en el nucléolo y en el citoplasma⁸⁷. En fibroblastos humanos normales, se ha demostrado que la nucleolina se une al complejo telomerasa activo a través de interacciones proteína-proteína y proteína-ARN. Dos regiones diferentes de la molécula de nucleolina son las responsables de dicha interacción: la región central que contiene el dominio de unión al ARN (RBD1) y la región carboxilo terminal que comprende los dominios de unión al ARN (RBD4) y RGG. Estas regiones interactúan con la subunidad que presenta actividad de transcriptasa reversa de la telomerasa⁸⁸. Los autores demuestran que la nucleolina es necesaria para la localización nucleolar y la dinámica intracelular del complejo telomerasa, pero que no modula la actividad enzimática de la telomerasa humana⁸⁸.

De acuerdo con estas últimas evidencias, en un trabajo más reciente, se observa el movimiento de los dos principales componentes del complejo telomerasa en células de carcinoma cervical HeLa durante las diferentes fases del ciclo celular⁸⁹. En la fase G1, el ARN de la telomerasa se localiza en los Cuerpos de Cajal; mientras que la subunidad catalítica lo hace en distintos cuerpos nucleares en el nucleoplasma, es decir que ambos componentes se encuentran distribuidos en estructuras intranucleares separadas. En la fase S temprana, los dos componentes se asocian al nucléolo, la subunidad catalítica se distribuye en el interior del mismo, y el ARN de la telomerasa se encuentra en la periferia o en los Cuerpos de Cajal cercanos al nucléolo. En la fase S media, es cuando se observa la co-localización de las subunidades en el complejo telomerasa y en los telómeros⁸⁹. Por lo que los autores sugieren que el ensamblado de la telomerasa humana ocurre específicamente durante la fase S, que es cuando se produce la síntesis de los telómeros; y se desarma, o se destruye en el caso de la subunidad con actividad de transcriptasa reversa, después de cada ciclo celular, quizás durante la fase M que es cuando los dos componentes principales no se acumulan en estructuras subnucleares^{89, 90}.

Todos estos datos indicarían que existe una relación entre la biogénesis, actividad y tráfico intranuclear del complejo telomerasa y el nucléolo, donde ambos participan en la regulación de la vida replicativa y el envejecimiento celular⁸⁶⁻⁹⁰.

Aunque la investigación en el control del envejecimiento ha avanzado enormemente, es preciso realizar estudios básicos sobre todos los mecanismos intracelulares involucrados en este proceso. Sería necesario conocer si la desregulación en la transcripción del ADN que codifica para el ARNr es suficiente para iniciar el proceso de envejecimiento celular, y analizar cuidadosamente cómo el nucléolo controla el reclutamiento y biosíntesis de las proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular. Más aún teniendo en cuenta que el nucléolo es un dominio nuclear altamente dinámico, cuyo número, tamaño y forma varía ampliamente dependiendo del tipo celular en estudio, de la fase del ciclo celular y de las condiciones de cultivo¹⁸⁻²¹. Además, cabe considerar los últimos análisis de proteómica²²⁻²⁵ donde aún no queda totalmente claro si el nucléolo cuenta estrictamente con componentes estructurales para su mantenimiento; o como se ha sugerido de estudios en levaduras, que dicho mantenimiento estructural obedece, en parte, a un sistema de interacciones transitorias y funcionales de sus componentes¹⁵⁻¹⁷.

Por otra parte, con los avances logrados hasta la fecha en el conocimiento del nucléolo como un regulador del envejecimiento celular, se abren nuevas líneas de investigación en las ciencias básicas y expectativas en la medicina para el desarrollo de terapias que prolonguen la duración o que mejoren las condiciones de vida durante el envejecimiento normal de los individuos.

Agradecimientos: Este trabajo fue apoyado por el Proyecto CONACYT: 37882-N y por Fondos Institucionales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, María Rosete es Candidata a Dr. en Ciencias Biomédicas, becaria de CONACYT (N° 14 4292) y becaria del Programa de Becas Nacionales para estudios de postgrado de la Dirección General de Estudios de Postgrado UNAM. El Dr. Vindrola es Investigador *ad honorem* del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Buenos Aires, Argentina.

Bibliografía

- Olson OJ, Dunder M, Szebeni A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 189-96.
- Lam YW, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI. The nucleolus. *J Cell Sci* 2005; 118: 1335-7.
- Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 325-34.
- Lo SJ, Lee CC, Lai HJ. The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings. *Cell Res* 2006; 16: 530-8.
- Scheer U, Rose KM. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1431-5.
- Mélèse T, Xue Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 319-24.
- Hernández-Verdun D. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol* 2006; 125: 127-37.
- Thiry M, Lafontaine DLJ. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 194-9.
- Derenzini M, Pasquinelli G, O'Donohue MF, Ploton D, Thiry M. Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem* 2006; 54: 131-45.
- Scheer U, Hock R. Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 385-90.
- Medina FJ, Cerdido A, de Carcer G. The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. *Eur J Histochem* 2000; 44: 117-31.
- Huang S. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol* 2002; 157: 739-41.
- Cheutin T, O'Donohue MF, Beorchia A, et al. Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. *J Cell Sci* 2002; 115: 3297-307.
- Le Pance S, Masson C, Héliot L, Chassery JM, Junéra HR, Verdun DH. 3-D organization of ribosomal transcription unites after DRB inhibition of RNA polymerase II transcription. *J Cell Sci* 1999; 112: 2145-54.
- Misteli T. The concept of self-organization in cellular architecture. *J Cell Biol* 2001; 155: 181-5.
- Colau G, Thiry M, Leduc V, Bordonne R, LaFontaine DL. The small nucleolar RNA cap trimethyltransferase is required for ribosome synthesis and intact nucleolar morphology. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 7976-86.
- Lewis JD, Tollervey D. Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. *Science* 2000; 288: 1385-9.
- Dunder M, Misteli T, Olson MO. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol* 2000; 150: 433-46.
- Dunder M, Hebert MD, Karpova TS, et al. In vivo kinetics of Cajal Body components. *J Cell Biol* 2004; 164: 831-42.
- Leung AK, Gerlich D, Miller G, et al. Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol* 2004; 166: 787-800.
- Leung AK, Lamond AI. The dynamics of the nucleolus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2003; 13: 39-54.
- Scherl A, Coute Y, Deon C, et al. Functional proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* 2002; 13: 4100-9.
- Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* 2002; 12: 1-11.
- Andersen JS, Lam YW, Leung AK et al. Nucleolar proteomic dynamics. *Nature* 2005; 433: 77-83.
- Leung AK, Trinkle-Mulcahy L, Lam YW, Andersen JS, Mann M, Lamond AI. NOPdb: Nucleolar Proteome Database. *Nucleic Acids Res* 2006; 34 (Database issue): D218-20.
- Politz JC, Lewandowski L, Pederson T. Signal recognition particle RNA localization within the nucleolus differs from the classical sites of ribosome synthesis. *J Cell Biol* 2002; 159: 411-8.
- Olson MOJ, Hingorani K, Szebeni A. Conventional and non-conventional roles of the nucleolus. *Int Rev Cytol* 2002; 219: 199-266.
- Kadowaki T, Hitomi M, Chen S, Tartakoff AM. Nuclear

- mRNA accumulation causes nucleolar fragmentation in yeast mtr2 mutant. *Mol Biol Cell* 1994; 5: 1253-63.
29. Kadowaki T, Schneiter R, Hitomi M, Tartakoff AM. Mutations in nucleolar proteins lead to nucleolar accumulation of polyA+ RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 1103-10.
 30. Bond VC, Wold B. Nucleolar localization of myc transcripts. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 3221-30.
 31. Zang G, Zapp ML, Yan G, Green MR. Localization of HIV-1 RNA in mammalian nuclei. *J Cell Biol* 1996; 135: 9-18.
 32. Adachi Y, Copeland TD, Hatanaka M, Oroszlan S. Nucleolar targeting signal of Rex protein of human T-cell leukemia virus type I specifically binds to nucleolar shuttle protein B-23. *J Biol Chem* 1993; 268: 13930-4.
 33. Izumi RE, Valdez B, Banerjee R, Srivastava M, Dasgupta A. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* 2001; 76: 17-29.
 34. Huang WH, Yung BYM, Syu WJ, Lee YHW. The nucleolar phosphoprotein B23 interacts with hepatitis delta antigens and modulates the hepatitis delta virus RNA replication. *J Biol Chem* 2001; 276: 25166-175.
 35. Boyne JR, Whitehouse A. Nucleolar trafficking is essential for nuclear export of intronless herpesvirus mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 15190-5.
 36. Politz JC, Yarovoi S, Kilroy SM, Gowda K, Zwieb C, Pederson T. Signal recognition particle components in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 55-60.
 37. Dani HM, Singh J, Singh S. Advances in the structure and functions of signal recognition particle in protein targeting. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003; 17: 303-7.
 38. Ciuffo LF, Brown JD. Nuclear export of yeast signal recognition particle lacking RPS54p by the Xpo1p/Crm1p NES-dependent pathway. *Curr Biol* 2000; 10: 1256-64.
 39. Grosshans H, Deinert K, Hurt E, Simos G. Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. *J Cell Biol* 2001; 153: 745-62.
 40. Visintin R, Amon A. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 372-7.
 41. Azzam R, Chen SL, Shou AS, et al. Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science* 2004; 305: 516-9.
 42. Comai L. The nucleolus: a paradigm for cell proliferation and aging. *Braz J Med Biol Res* 1999; 12: 1473-8.
 43. Mekhail K, Khacho M, Carrigan A, Hache R, Gunaratnam L, Lee S. Regulation of ubiquitin ligase dynamics by the nucleolus. *J Cell Biol* 2005; 170: 733-44.
 44. Paushkin SV, Patel M, Furia BS, Peltz SW, Trotta CR. Identification of a human endonuclease complex reveals a link between tRNA splicing and pre-mRNA 3' end formation. *Cell* 2004; 117: 311-21.
 45. van den Boom V, Citterio E, Hoogstraten D, et al. DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *J Cell Biol* 2004; 166: 27-36.
 46. Thompson JS, Ling X, Grunstein M. Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* 1994; 369: 245-7.
 47. Gartenberg MR. The Sir proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: mediators of transcriptional silencing and much more. *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 132-7.
 48. Gotta M, Strahl-Bolsinger S, Renaud H, et al. Localization of Sir2p: the nucleolus as a compartment for silent information regulators. *EMBO J* 1997; 16: 3243-55.
 49. Kennedy BK, Gotta M, Sinclair DA, et al. Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae*. *Cell* 1997; 89: 381-91.
 50. Guarente L. Link between aging and the nucleolus. *Genes Dev* 1997; 11: 2449-55.
 51. Yu C, Oshima J, Fu Y et al. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996; 272: 258-62.
 52. Fukuchi K, Martin GM, Monnat RJ Jr. Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5893-7.
 53. Lakowski B, Siegfried H. Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* 1996; 272: 1010-3.
 54. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Runkun G. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997; 277: 942-6.
 55. Jazwinski SM. Longevity, genes, and aging. *Science* 1996; 273: 54-9.
 56. Pennisi E. Do fateful circles of DNA cause cells to grow old? *Science* 1998; 279: 34.
 57. Gems D. Ageing. Yeast longevity gene goes public. *Nature* 2001; 410: 154-5.
 58. Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H, Vijg J. Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science* 2003; 299: 1355-9.
 59. Lombard DB, Cha KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 2005; 120: 497-512.
 60. Motoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 2006; 124: 315-29.
 61. Guarente L, Ruvkun G, Amasino R. Aging, life span, and senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11034-6.
 62. Ashrafi K, Sinclair D, Gordon JI, Guarente L. Passage through stationary phase advances replicative in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9100-5.
 63. Michischita E, Park JY, Burneskis J, Barret JC, Horikawa I. Evolutionary conserved and non-conserved cellular localization and functions of human SIRT protein. *Mol Cell Biol* 2005; 16: 4623-35.
 64. Sinclair DA, Mills K, Guarente L. Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast sgs 1 mutants. *Science* 1997; 277: 1313-16.
 65. Szekely A, Chen Y, Chunyu Z, Oshima J, Weissman SM. Werner protein recruits DNA polymerase δ to the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11365-70.
 66. Marciniak RA, Lombard DB, Johnson FB, Guarente L. Nucleolar localization of the Werner syndrome protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6887-92.
 67. Shiratori M, Suzuki T, Itoh C, Goto M, Furuichi Y, Matsumoto T. WRN helicase accelerates the transcription of ribosomal RNA as a component of an RNA polymerase I associated complex. *Oncogene* 2002; 21: 2447-54.
 68. Opresko PL, Cheng WH, von Kobbe C, Harrigan JA, Bohr VA. Werner syndrome and the function of the Werner protein: what they can teach us about the molecular aging process. *Carcinogenesis* 2005; 24: 791-802.
 69. Karmakar P, Bohr VA. Cellular dynamics and modulation of WRN protein is DNA damage specific. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 1146-58.
 70. Harrigan JA, Wilson DM, Prasad R, et al. The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase beta. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 745-54.
 71. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999; 18: 6145-57.
 72. Duncan EL, Wadhwa R, Kaul SC. Senescence and im-

- mortalization of human cells. *Biogerontology* 2000; 1: 103-21.
73. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, et al. p53 mutant mice that display ageing associated phenotypes. *Nature* 2002; 415: 45-53.
 74. Dumble M, Gazza C, Tyner S, Venkatachalam S, Donehower LA. Insights into ageing obtained from p53 mouse models. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1019: 171-7.
 75. Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2 master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 2000; 242: 15-29.
 76. Olson MOJ, Dunder M. The moving parts of the nucleolus. *Histochem Cell Biol* 2005; 123: 203-216.
 77. Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 20-6.
 78. Gjerset RA, Bandyopadhyay K. Regulation of p14ARF through subnuclear compartmentalization. *Cell Cycle* 2006; 5: 686-90.
 79. Lindstrom MS, Zhang Y. B23 and ARF: friends or foes? *Cell Biochem Biophys* 2006; 46: 79-90.
 80. Enamoto T, Lindstrom MS, Jin A, Ke H, Zhang Y. Essential role of the B23/NPM core domain in regulating ARF binding and B23 stability. *J Biol Chem* 2006; 281: 18463-72.
 81. Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, et al. Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1258-71.
 82. Blander G, Kipnis J, Martínez FL, Yu C, Schellenberg GD, Oren M. Physical and functional interaction between p53 and the Werner's syndrome protein. *J Biol Chem* 1999; 274: 29463-9.
 83. Brosh RM, Karmakar P, Sommers JA, et al. p53 modulates the exonuclease activity of Werner syndrome protein. *J Biol Chem* 2001; 276: 35093-102.
 84. Johnson FB, Marciniak RA, Guarente L. Telomeres, the nucleolus and aging. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 332-8.
 85. Etheridge KT, Banik SR, Armbruster BN, Zhu Y, Terns RM, Counter CM. The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human telomerase. *J Biol Chem* 2002; 277: 24764-70.
 86. Lukowiak AA, Narayana A, Li ZH, et al. The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus. *RNA* 2001; 7: 1833-44.
 87. Le S, Sternglanz R, Greider CW. Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 999-1010.
 88. Khurts S, Masutomi K, Delgermaa L, et al. Nucleolin interacts with telomerase. *J Biol Chem* 2004; 279: 51508-15.
 89. Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 955-65.
 90. Kim JH, Park SM, Kang MR, et al. Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT. *Genes Dev* 2005; 19: 776-81.

Behind every piece of scientific research and discovery is a human story. Science affects everyone, not merely the scientists. The research done in a lab today may mean a whole new lifestyle for people around the world in five or ten years. Write that story, and readers will be with you to the last paragraph. It's not easy, but it can be done if you remember three words: Science is people.

Detrás de cada trabajo de investigación científica y de cada descubrimiento hay una historia humana. La ciencia nos afecta a todos, no meramente a los científicos. La investigación que se lleva a cabo en el laboratorio hoy puede significar un cambio en el estilo de vida en el mundo entero dentro de cinco o diez años. Escriba esa historia, y sus lectores lo seguirán hasta el último párrafo. No es fácil, pero se puede lograr si se recuerdan estas tres palabras: Ciencia es gente.

David Richie

Writing and selling science articles. In: *The writer's handbook.* Sylvia K. Burak (ed), Boston: The writer Inc., 1983, p 377