



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Bases moleculares del estrés nucleolar presente en el Síndrome
de Progeria de Hutchinson-Gilford”**

Tesis que presenta:

M. en C. Marco Samuel Laredo Cisneros

Para obtener el Grado de:

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de Genética y Biología Molecular

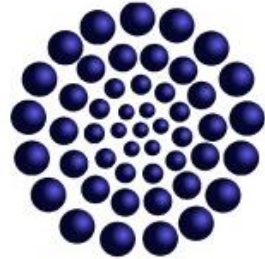
Director de Tesis:

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Ciudad de México

Marzo de 2016

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, mediante el otorgamiento de la beca con número de registro 212716.



El presente proyecto fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección del Dr. Bulmaro Cisneros Vega y la asesoría del Dr. Oscar Hernández Hernández, del Dr. José Efraín Garrido Guerrero, del Dr. Jaime García Mena y de la Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado.



ÍNDICE

	Página
Resumen en español	i
Resumen en inglés	ii
Introducción	1
○ El Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford	1
○ Bases moleculares de la enfermedad	2
○ La lámina nuclear	3
○ Procesamiento de la lámina A y la progerina	5
○ Alteraciones producidas por la progerina	6
○ El nucléolo como sensor de estrés	7
○ Progerina y senescencia	9
○ Tratamientos contra la HGPS	10
Antecedentes	11
○ Los fibroblastos HGPS presentan estrés nucleolar	11
○ El β -dístroglicano colocaliza e interactúa con la lámina A/C y con proteínas nucleolares	11
Justificación	14
Objetivos	14
Materiales y métodos	15
○ Cultivo celular	15
○ Tratamientos celulares	15
○ Vectores utilizados	15
○ Transfección celular y generación de cultivos estables	16
○ Anticuerpos utilizados	16
○ Inmunofluorescencia indirecta	16
○ Ensayo de ligación por proximidad (PLA)	17
○ Análisis de volumen nucleolar y reconstrucción en 3D	17
○ Extracción de proteínas totales	18
○ Inmunodetección en fase sólida	18

○ Inmunoprecipitación	19
○ Análisis estadístico	19
Resultados	20
○ La localización nuclear/nucleolar del β -DG está alterada en los fibroblastos HGPS	20
○ La progerina induce la exclusión del β -DG de los nucléolos en los fibroblastos HGPS y células HeLa	22
○ La deficiencia del β -DG recrea las características de la HGPS en las células HeLa	26
○ La inhibición del transporte nuclear restablece la localización nuclear/nucleolar del β -DG y consecuentemente alivia el estrés nucleolar en los fibroblastos HGPS	28
○ El mecanismo de transporte nuclear de proteínas está exacerbado en los fibroblastos HGPS debido a la sobreexpresión de la exportina CRM1	30
Discusión	34
○ Participación de la progerina en la deslocalización nucleolar del β -DG	34
○ Participación del β -DG en el estrés nucleolar	35
○ Participación del transporte nuclear en la HGPS	36
Conclusiones	39
Bibliografía	40

RESUMEN EN ESPAÑOL

El estudio del Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) ha emergido como una piedra angular para descifrar los mecanismos moleculares que subyacen el envejecimiento. El origen genético de la HGPS es una mutación en el gen *LMNA* que genera la síntesis de la progerina, variante mutante de la lámina A. La expresión de la progerina altera la morfología del núcleo y la integridad de los nucléolos (estrés nucleolar), marcas celulares distintivas de la HGPS, y consecuentemente perturba diferentes procesos nucleares. Dos pasos esenciales para el abordaje terapéutico de la HGPS son la disección de los mecanismos moleculares alterados y la identificación de moléculas diana afectadas por la función aberrante de la progerina. En el presente estudio se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos provenientes de pacientes con HGPS y diferentes estrategias experimentales para analizar la implicación de la proteína β -dístroglicano (β -DG) en la etiología de la HGPS. Se demostró que la progerina induce estrés nucleolar a través de un mecanismo molecular que altera la localización y función del β -DG en los nucléolos. La progerina induce la sobreexpresión de la exportina CRM1, exacerbando el transporte nuclear de proteínas; la hiperactividad del transporte nuclear provoca el escape del β -DG del núcleo y los nucléolos, ya que esta proteína posee una secuencia de transporte nuclear que es reconocida por CRM1; consecuentemente, la exclusión nucleolar del β -DG causa la disgregación de los nucléolos. De manera interesante, el tratamiento con un inhibidor específico de CRM1 (LMB) previene el transporte nuclear del β -DG y restablece la estructura de los nucléolos en los fibroblastos HGPS. El silenciamiento de la expresión del β -DG recrea el estrés nucleolar en las células HeLa, lo que confirma su papel crucial en la arquitectura de los nucléolos. Tomando en consideración que la disgregación de los nucléolos se ha asociado con la inducción de senescencia, el uso de inhibidores de CRM1 para aliviar el estrés nucleolar a través del regreso del β -DG a los nucléolos, representa una estrategia terapéutica atractiva para combatir la HGPS.

RESUMEN EN INGLÉS

The study of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) has emerged as a cornerstone for deciphering the molecular mechanisms underlying aging. The genetic origin of HGPS is a mutation in the *LMNA* gene, which synthesizes progerin, a mutant variant of the lamin A. The expression of progerin alters the nuclear morphology and nucleolar integrity (nucleolar stress), cellular hallmarks of HGPS, and consequently perturbs different nuclear processes. Two essential steps for the therapeutic approach in HGPS are the dissection of altered molecular mechanisms and the identification of target molecules affected by the aberrant function of progerin. In the present study, primary fibroblast cultures from patients with HGPS and different experimental strategies were used to analyze the involvement of β -dystroglycan (β -DG) protein in the etiology of HGPS. It was shown that progerin induces nucleolar stress through a molecular mechanism that alters the location and function of β -DG in the nucleoli. Progerin induces overexpression of the CRM1 exportin, enhancing the nuclear export of proteins; nuclear export overactivity causes the exclusion of β -DG from the nucleus and nucleoli, as this protein has a nuclear export sequence that is recognized by CRM1; consequently the nucleolar exclusion of β -DG causes nucleolar fragmentation. Interestingly, treatment with a specific inhibitor of CRM1 (LMB) prevents nuclear export of β -DG and rescues the structure of nucleoli in HGPS fibroblasts. Silencing the expression of β -DG recreates the nucleolar stress in HeLa cells, which confirms its crucial role in the architecture of the nucleolus. Considering that nucleolar stress has been associated with senescence, the use of inhibitors of CRM1 to rescue nucleolar integrity through the return of β -DG to the nucleoli, represents an attractive therapeutic strategy to combat HGPS.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford

El Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS; por sus siglas en inglés, *Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome*) es un desorden genético raro caracterizado por un envejecimiento acelerado [6].

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1886 por el doctor Jonathan Hutchinson, quien describió el caso de un niño de 3.5 años que tenía la apariencia de un individuo anciano. Más tarde, en 1897 Hastings Gilford reportó un segundo caso con características similares. Es por ello que esta condición médica adquirió el nombre en honor a estos médicos ingleses. El término progeria proviene del griego *pro* “a favor de” y *geron* “viejo”, que significa envejecer prematuramente, y fue acuñado en 1904 para referirse a esta enfermedad [7]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la actualidad el término progeria hace alusión a todas aquellas enfermedades con características de envejecimiento prematuro [8].

Esta enfermedad se presenta en 1 de cada 4 millones de personas en el mundo [9] y actualmente se cuenta con un registro de 350 pacientes diagnosticados con HGPS a lo largo de 46 países alrededor del mundo [10]. Usualmente, las características de la enfermedad no se detectan hasta el segundo año de vida. En estos pacientes se producen alteraciones en varios órganos y tejidos como: hueso, músculo, piel, tejido subcutáneo y vasos sanguíneos, lo que desarrolla el fenotipo de la enfermedad caracterizado por: alopecia, alteraciones en el crecimiento y desarrollo, anomalías óseas, pérdida de grasa corporal, venas craneales prominentes, aterosclerosis, problemas cardíacos y piel de apariencia senil [9] (Figura 1). Aunque su fenotipo es asociado con el envejecimiento, estos pacientes no presentan demencia senil ya que el sistema nervioso no se ve afectado por la enfermedad [11]. Desafortunadamente, esta enfermedad es fatal, ya que los niños afectados mueren a una edad media de 13 años, predominantemente debido a un infarto de miocardio o a un accidente cerebrovascular [12].

Durante más de 100 años la causa de la enfermedad fue un misterio para la comunidad científica, debido a que existía poco interés por investigar las enfermedades raras. Sin embargo, en la última década, ésta ha atraído la atención de diversos grupos científicos debido a dos razones principales. La primera, el avance en la HGPS se ha convertido en un paradigma en la medicina translacional moderna, puesto que la investigación básica se encuentra trabajando de la mano con la medicina clínica, en busca de un nuevos tratamientos. Segunda, los descubrimientos en las enfermedades raras ofrecen nuevas posibilidades para entender mecanismos moleculares y celulares, como el envejecimiento y las enfermedades cardiovasculares en el caso de la HGPS [10].



Figura 1. Imagen de un paciente con HGPS. Niño afectado que presenta el fenotipo clásico de la enfermedad. Tomada de: www.lifeaccordingtosam.com

Bases moleculares de la enfermedad

Esta enfermedad es de tipo autosómica dominante y en la mayoría de los casos los individuos afectados no generan descendencia, debido a que no logran alcanzar la madurez sexual [12]. En el año 2003, mediante el análisis del genoma de pacientes con HGPS, se descubrió la base genética de la enfermedad. Ésta es causada por la sustitución espontánea de un solo nucleótido, evento que ocurre como una mutación *de novo*, dentro del gen *LMNA*. La mutación más recurrente es el cambio de una citosina por una timina en la posición 1824 (c.1824C>T), este

cambio se produce en más del 90% de los individuos afectados y conduce al desarrollo clásico de la enfermedad. Sin embargo, se han reportado otras mutaciones menos frecuentes (c.1821G>A, c.1822G>A y c.1968+1G>A) que se presentan dentro del mismo gen y que conducen al desarrollo de una enfermedad menos severa conocida como progeria atípica [13].

El gen *LMNA* se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 (1q22) y codifica para las proteínas de envoltura nuclear lámina A y lámina C [14]. Está compuesto por 12 exones, los cuales mediante *splicing* alternativo generan los dos tipos de láminas. En los individuos con HGPS, la mutación 1824C>T no modifica el aminoácido en la proteína (Gli608Gli) pero produce la activación de un sitio críptico de *splicing* dentro del exón 11, lo que genera una deleción de 150 pb dentro de este exón. Esto produce una proteína que carece de 50 aminoácidos en una la región cercana al carboxilo terminal (Figura 2). Debido a la perdida de esta región, la proteína sufre un procesamiento postraduccional anormal que origina una forma mutada de la lámina A, denominada progerina, la cual actúa como dominante negativa y es la proteína involucrada en la patogenia de la enfermedad.

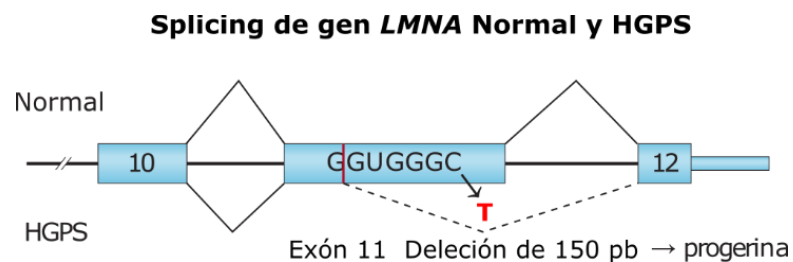


Figura 2. Diferencias de *Splicing* en el gen *LMNA* entre el alelo normal y el alelo HGPS. Mientras que en el alelo normal, el exón 11 completo es utilizado para generar la pre-lámina A, en el alelo mutado presente en la HGPS, la sustitución de una C por una T activa un sitio críptico de *splicing*, lo que elimina una región de 150 pb del exón 11. Modificado de [3]

La lámina nuclear

La lámina nuclear es una red de proteínas de filamentos intermedios tipo V encargadas de proveer la rigidez y estructura de la envoltura nuclear [15]. Estas se clasifican en dos tipos principales, las láminas del tipo A y las del tipo B. Las láminas A son generadas a partir de un mismo gen (*LMNA*), que mediante *splicing*

alternativo produce las láminas A y C [16]; mientras que las láminas B1 y B2 son generadas a partir de los genes *LMNB1* y *LMNB2* respectivamente [17]. Estas proteínas poseen una región central grande organizada en forma de alfa hélice (dominio tipo varilla), la cual es flanqueada por el extremo amino terminal, compuesto por una secuencia globular de 10-20 aminoácidos (dominio tipo cabeza), y por la región carboxilo terminal que posee una secuencia de localización nuclear y un motivo estructural altamente conservado, similar al de las inmunoglobulinas (dominio tipo cola) [18] (Figura 3). Las láminas se autoensamblan formando dímeros mediante las interacciones de sus dominios centrales, posteriormente estos dímeros se acoplan a entre sí mediante la unión de los dominios cabeza y cola. Estos arreglos forman un protofilamento tetramérico antiparalelo y la unión de cuatro protofilamentos genera un filamento de lámina de aproximadamente 10 nm; los filamentos se intercalan hasta formar una red en la periferia del interior del núcleo [18]. Aunque la función principal de las láminas es estructural, recientemente se han implicado en diversos procesos, como en la regulación de genes [19], andamiaje para proteínas nucleares [20, 21], vías de señalización [22] y posicionamiento y organización de la cromatina [23, 24].

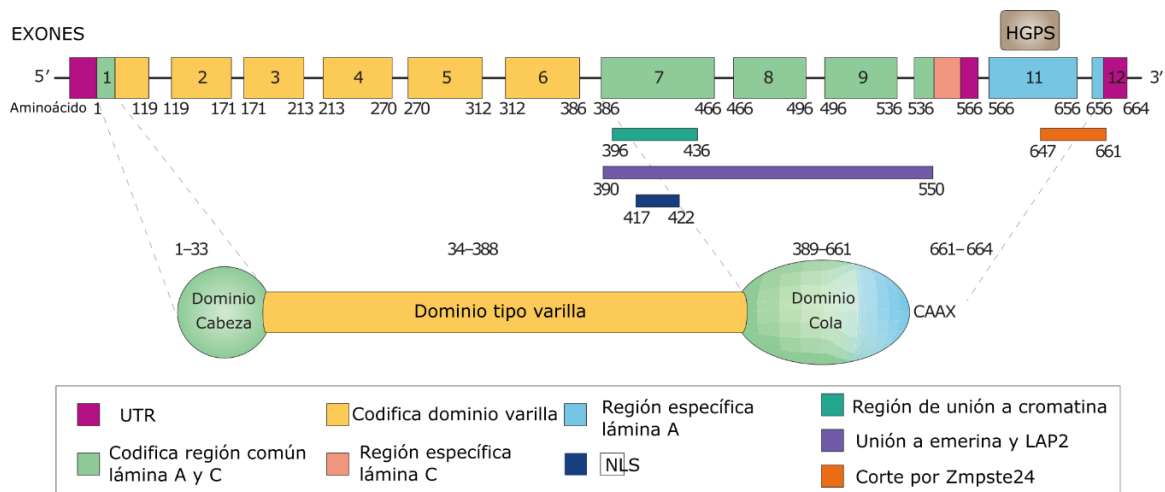


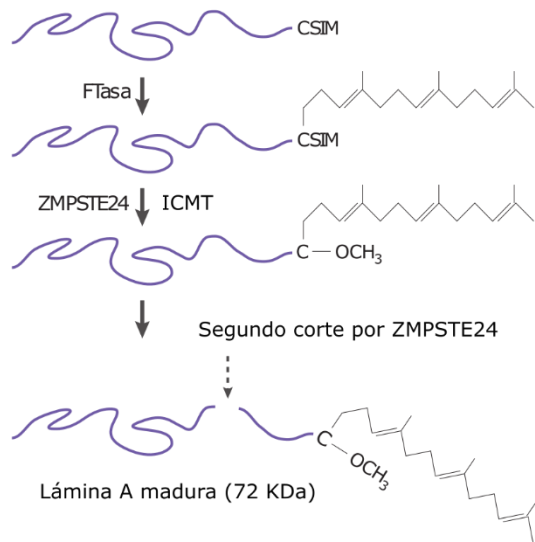
Figura 3. El gen *LMNA* y la proteína lámina A. El gen *LMNA* contiene 57.6 k y consiste de 12 exones que codifican 2 dominios globulares (cabeza y cola), un dominio central tipo varilla alfa hélice. Dentro del dominio cola (residuos 417-42) se encuentra la secuencia de localización nuclear (NLS), mientras que entre los residuos 647-661 se localiza la región del corte por la proteasa Zmpste24, paso necesario para la maduración de la proteína. Modificado de [5].

Procesamiento de la lámina A y la progerina

La proteína lámina A es sintetizada como un precursor de 664 aminoácidos llamado pre-lámina A, el cual sufre una serie de modificaciones postraduccionales para generar la forma madura de la proteína. La pre-lámina A posee un motivo CaaX (Secuencia CSIM en el caso de lámina A) en el extremo carboxilo terminal, que es farnesilado en el residuo de cisteína en el citoplasma de la célula por la enzima farnesiltransferasa (FTasa); posteriormente la metaloproteasa dependiente de zinc Zmpste24 se encarga de eliminar los últimos 3 aminoácidos del motivo en el retículo endoplásmico [25]. El tercer paso es la carboximetilación de la cisteína por acción de la enzima isoprenil carboximetil transferasa (ICMT), proceso que ocurre también en el retículo endoplásmico. Posteriormente, la proteína farnesilada se trasloca al interior del núcleo mediante el uso de su secuencia de localización nuclear (NLS) y la ayuda de las importinas. Una vez dentro del núcleo, es anclada a la envoltura nuclear donde la proteasa Zmpste24 elimina los últimos 15 aminoácidos de la proteína para deshacerse del grupo farnesilo [25]. Esta serie de pasos son necesarios para la correcta localización y función de la proteína, ya que se ha demostrado que la farnesilación es necesaria para la localización de la proteína en la envoltura nuclear [26], sin embargo después de su anclaje, esta farnesilación debe ser eliminada para que la lámina A lleve a cabo sus funciones correctamente. La lámina C es 74 aminoácidos más corta que la lámina A madura y no posee el motivo CaaX, por lo que no puede ser farnesilada y no sufre modificaciones [18].

Por otro lado, en los individuos con HGPS, el procesamiento se realiza de manera incompleta, la progerina es farnesilada, sufre la primer proteólisis, la carboximetilación de la cisteína, y se ancla en la envoltura nuclear; sin embargo, el segundo corte, necesario para la eliminación del grupo farnesilo no se lleva a cabo, debido a que la región deletada, por la activación del sitio crítico de *splicing*, contiene el sitio de reconocimiento para la proteasa Zmpste24 (Figura 4).

Procesamiento normal de lámina A



Procesamiento de la Progerina

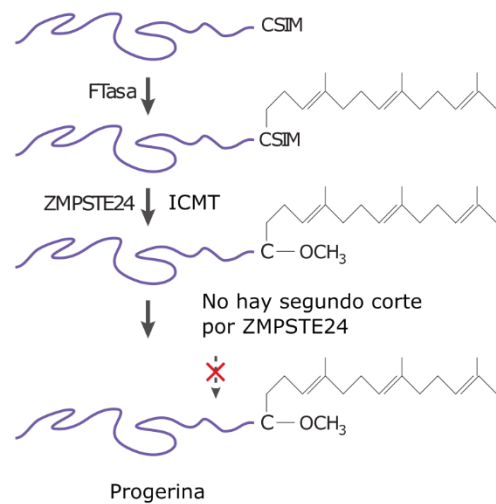


Figura 4. Procesamiento de la lámina A y la progerina. La traducción del ARN mensajero del gen *LMNA* genera la pre-lámina A, la cual requiere de modificaciones postraduccionales para su incorporación y función en la envoltura nuclear. La pre-lámina A posee la secuencia CSIM en el carboxilo terminal que es reconocida por la enzima farnesil transferasa (FTasa) y esta enzima le añade un grupo farnesilo a la cisteína. Posteriormente los últimos 3 aminoácidos (SIM) son removidos por la enzima Zmpste24. Realizado eso, la enzima ICMT lleva a cabo la carboximetilación de la cisteína, y un segundo corte por Zmpste24 elimina los últimos 15 aminoácidos, incluyendo el grupo farnesilo. Este último corte no es realizado en las células HGPS y la lámina A mal procesada (progerina) permanece farnesilada. Modificado de [5].

Alteraciones producidas por la progerina

Existen múltiples teorías acerca de cómo la progerina conduce al fenotipo observado en la HGPS. Uno de los mecanismos propuestos es que se trata de una serie de alteraciones que se van desencadenando de una manera dependiente de la cantidad de progerina presente. Así mismo, se ha demostrado *in vitro* que el nivel de daño en la morfología nuclear es dependiente de la cantidad de progerina presente en la célula y que la cantidad de progerina a su vez, depende del número de pases del cultivo celular [27]. Esta acumulación de la progerina ocurre de manera gradual, puesto que se ha observado que el sitio crítico de *splicing* en la enfermedad no es usado eficientemente, ya que en un estudio usando fibroblastos de individuos con HGPS se encontró que solo un 84.5 % del transcrito del alelo mutado genera progerina [28]. Esta proteína es anclada a la envoltura nuclear pero

debido a la naturaleza hidrofóbica del grupo farnesilo, se comienzan a generar alteraciones en la arquitectura nuclear que incluyen; invaginaciones, lobulaciones y la formación de pliegues de la membrana nuclear. En cultivos de fibroblastos HGPS se ha observado que del 40 al 50% de los fibroblastos muestran una morfología nuclear visiblemente anormal [29]. De igual manera, la progerina se acumula en varios tejidos de los pacientes HGPS, incluyendo piel, corazón, hígado, tejido adiposo, musculo esquelético, endotelio vascular y musculo liso [30, 31]. A nivel celular, la progerina causa varias alteraciones entre las que se encuentran; el agrupamiento de los poros nucleares [5], mal funcionamiento del retículo endoplásmico [32], deslocalización de otras proteínas residentes de la envoltura nuclear [5], desorganización de la heterocromatina [33], inestabilidad genómica [34] y estrés nucleolar [1, 35]. Eventualmente el mal funcionamiento de la célula generado por estas alteraciones produce la activación de la proteína supresora de tumores p53 y la inducción de la senescencia, ya que este fenómeno es una característica del proceso del envejecimiento [36].

El nucléolo como sensor de estrés

Durante mucho tiempo se ha descrito que la función principal del nucléolo es la biogénesis de los ribosomas, sin embargo, recientemente se ha revelado que es una estructura altamente dinámica que posee también la capacidad de funcionar como un sensor de estrés [37]. El estrés nucleolar es el término utilizado para describir las fallas en la función e integridad del nucléolo [38]. Así mismo, se sabe que varios de sus componentes proteicos sufren una relocalización al encontrarse bajo un estímulo de estrés, y este mecanismo involucra la activación de p53 (Tabla 1). El contenido proteico del nucléolo es dinámico y se altera durante condiciones de estrés. La vía ARF-B23-p53 es un claro ejemplo de la reorganización nuclear durante un estímulo de estrés. De manera normal, los niveles de la proteína p53 son mantenidos bajos por acción de la proteína MDM2 [39], una ubiquitin ligasa que se encarga de ubiquitinar a p53 en el núcleo de la célula, una vez poliubiquitinada, p53 viaja hacia el citoplasma para ser degradada por el complejo del proteosoma o bien, es degradada dentro del núcleo. MDM2 puede ser inhibida por la proteína

ARF, la cual se encuentra secuestrada en el nucléolo por su interacción con la proteína B23 [40].

Efecto de diferentes tipos de estrés en la organización del nucléolo		
<i>Tipo de estrés</i>	<i>Estímulo</i>	<i>Efecto en el nucléolo</i>
Daño al ADN	UV-C	Segregación nucleolar
	IR	Desorganización nucleolar
	Camptotecina	Desorganización nucleolar
Infección viral	Adenovirus, coronavirus, etc.	Desorganización nucleolar
Inhibición de ARN pol I / II	Actinomicina D	Desorganización nucleolar y liberación de proteínas ribosomales al citoplasma
	DRB	Desorganización nucleolar
	Alfa amanitina	Desorganización nucleolar
Estrés oncogénico	Activación de c-myc o Ras	Sobre regulación de proteínas ARF y B23
Alteración en biogénesis ribosomal	Mala función de proteínas nucleolares (Bop1, B23, núcleostemina, etc.)	Liberación de las proteínas ribosomales al citoplasma seguido de desorganización nucleolar

Tabla 1. Efecto de diferentes tipos de estrés en la organización nucleolar que produce la activación de p53. Modificado de [4].

En condiciones de estrés, la desorganización del nucléolo libera ARF de su unión con B23, lo que permite que viaje al nucléoplasma e interactúe con MDM2 para que los niveles de p53 incrementen y se produzca el arresto del ciclo celular [4, 38] (Figura 5).

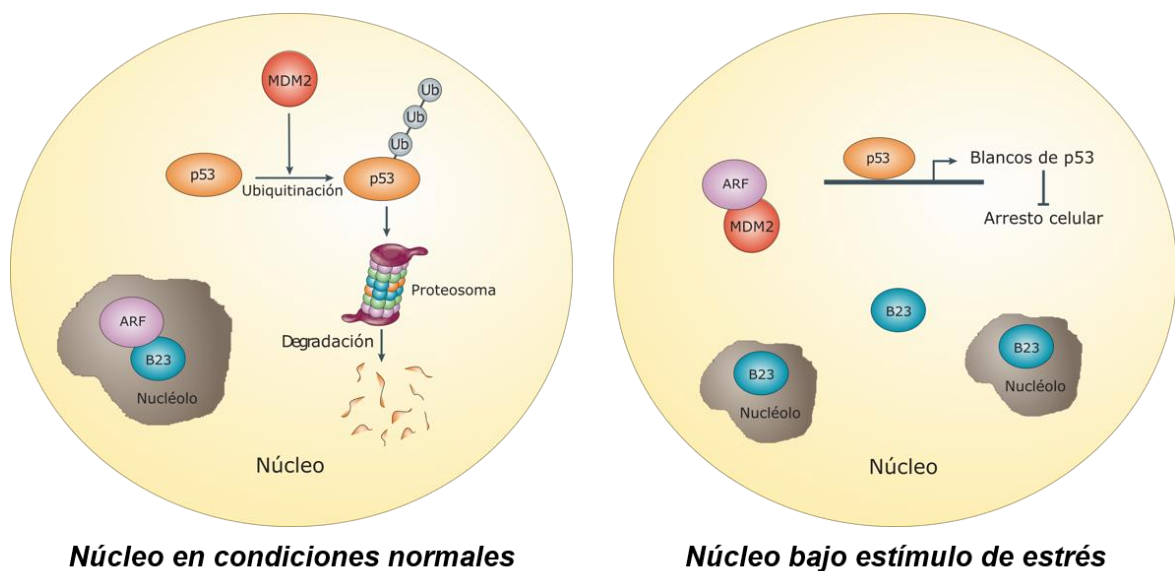


Figura 5 Participación del nucléolo en la respuesta al estrés. *En condiciones normales*, la ubiquitin ligasa MDM2 se encarga de ubiquitinar a la proteína p53, esta modificación sirve como etiqueta de degradación por el complejo del proteosoma, y se lleva a cabo tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula, de esta manera los niveles de p53 se mantienen bajos y la célula permanece en estado proliferativo. Por otro lado, la proteína B23 secuestra a ARF dentro del nucléolo para evitar la unión de ésta con MDM2. *Bajo un estímulo de estrés nucleolar*, el nucléolo se desorganiza, causando la pérdida de la interacción entre B23 y ARF, esto permite que ARF se trasloque al nucleoplasma e interactúe con MDM2, de esta manera p53 no puede ser ubiquitinado y degradado lo que permite un aumento en sus niveles y la activación de los genes responsivos a p53 para iniciar el arresto celular.

Progerina y senescencia

La senescencia celular es el estado de arresto celular en el que las células alcanzan su límite máximo de pases en cultivo [41]. Se sabe que después de aproximadamente 40 pases, las células humanas dejan de proliferar y entran en senescencia [42]. Este fenómeno está ligado al proceso de envejecimiento normal del individuo, ya que las células senescentes se acumulan dentro de estos tejidos causando una alteración de la función de dicho tejido [43]. Existen dos tipos principales de senescencia, la senescencia replicativa, que se refiere a la pérdida de la capacidad de proliferación debido al acortamiento de los telómeros; y la senescencia inducida por estrés, la cual se genera por aquellos factores que causan un daño en la célula, como la activación de oncogenes, el daño al ADN y el aumento en las especies reactivas de oxígeno [44].

Cuando ocurren estos estímulos inductores de senescencia, el nucléolo presenta un estado de estrés, el cual se utiliza como un mecanismo para censurar el daño celular, lo que posteriormente activa la señalización necesaria para inducir la senescencia [43]. Se ha demostrado que al presentarse una condición de estrés, en un estado de pre-senescencia las células presentan un mayor número de nucléolos pequeños [45]. En el cultivo de los fibroblastos HGPS se ha detectado que a partir de la semana 4 de cultivo, la población de células senescentes es de alrededor de un 50% [30]. Estos fibroblastos presentan altos niveles de especies reactivas de oxígeno, posiblemente como resultado de daño al ADN, y una inducción rápida de senescencia [46]. Además, se ha demostrado que presentan un mayor desgaste de

los telómeros cada vez que se realiza la división celular, en comparación con las células control [47]. Recientemente se demostró que la sirtulina SIRT6, una proteína asociada con la longevidad que participa en la reparación del daño al ADN, es activada mediante su unión a la lámina A, lo que produce una rápida respuesta de reparación del daño al material genético [48]. Sin embargo, se ha demostrado que la presencia de progerina es capaz de bloquear la activación de SIRT6, lo que genera inestabilidad genómica y la senescencia [49].

Tratamientos contra la HGPS

El descubrimiento de que la progerina permanece farnesilada, inmediatamente abrió las puertas para probar un tipo de droga que inhibe la función de la farnesil transferasa, la cual se había desarrollado previamente como un potencial fármaco anti-tumoral [10, 50]. El uso de inhibidores de la farnesil transferasa (FTI's) es actualmente el tratamiento más esperanzador para esta enfermedad. Estos han sido probados en cultivo y en modelos animales y se ha demostrado que son capaces de restablecer la morfología nuclear de las células HGPS, así como algunas alteraciones funcionales [51-53]. El inhibidor de la farnesil transferasa denominado Lonafarnib, se empleó en ensayos clínicos en un grupo de 26 niños con HGPS [54]. La utilización de este fármaco mostró mejorar la calidad de vida de los pacientes, causó un aumento en su peso corporal, una mejoría en la estructura ósea y un mejor funcionamiento vascular. Desafortunadamente, el uso de esta droga solo logró prolongar la expectativa de vida media de estos pacientes en 1.6 años [54, 55].

En la actualidad el uso de nuevas drogas como las estatinas [52, 56] y la rapamicina [57, 58] han mostrado ser eficientes en cultivos celulares y modelos animales de la HGPS; sin embargo, el mecanismo de acción principal se centra en revertir las alteraciones morfológicas nucleares causadas por la progerina. Por lo que es importante dirigir la atención hacia nuevos blancos terapéuticos [59] ya que estas nuevas drogas eventualmente podrían ser incorporadas como parte de una terapia combinada, donde por un lado se revierte el daño nuclear y por otro lado se restablezcan las funciones celulares más afectadas.

ANTECEDENTES

Los fibroblastos HGPS presentan estrés nucleolar

Los fibroblastos HGPS son más sensibles al daño mecánico [60] y son sumamente sensibles ante diferentes tipos de estrés [29]. El estrés celular es censado por el nucléolo, lo que puede manifestarse mediante la desorganización de estas estructuras [38]. Eventualmente el estrés nucleolar causa la activación de p53, lo que conlleva a que la célula entre en un estado no proliferante y se convierta en senescente [43, 61], característica celular de la HGPS [29].

Un grupo de investigadores demostraron que una proporción considerable de los fibroblastos HGPS presenta nucléolos anormales. Mediante inmunofluorescencia indirecta de doble marcaje, se utilizó un anticuerpo contra la proteína Ki-67 (marcador de proliferación celular) y un anticuerpo para detectar a la proteína nucleolar fibrilarina. De manera interesante, los fibroblastos HGPS que presentaron un nucléolo desorganizado (estrés nucleolar), no se encontraban en estado proliferativo (Figura 6). Lo que sugiere que la ausencia de proliferación está relacionada con el estrés nucleolar. De igual forma, la población de fibroblastos con nucléolos anormales incrementó con el número de pases celulares, por lo que presumiblemente la desorganización nucleolar depende de la cantidad acumulada de progerina. La cuantificación de los resultados de fluorescencia mostró que en los fibroblastos HGPS con pocos pases, el porcentaje de células con nucléolos anormales es de 33 %, y este porcentaje aumentó hasta un 95% en cultivos con un gran número de pases [1].

El β -dístroglicano colocaliza e interactúa con la lámina A/C y con proteínas nucleolares

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo demostró que el β -dístroglicano (β -DG), una proteína transmembranal que originalmente se describió como componente del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPS) [62], se transporta hacia el interior del núcleo debido a que posee una señal de localización nuclear funcional que es reconocida por el complejo de importinas $\alpha 2/\beta 1$ [63].

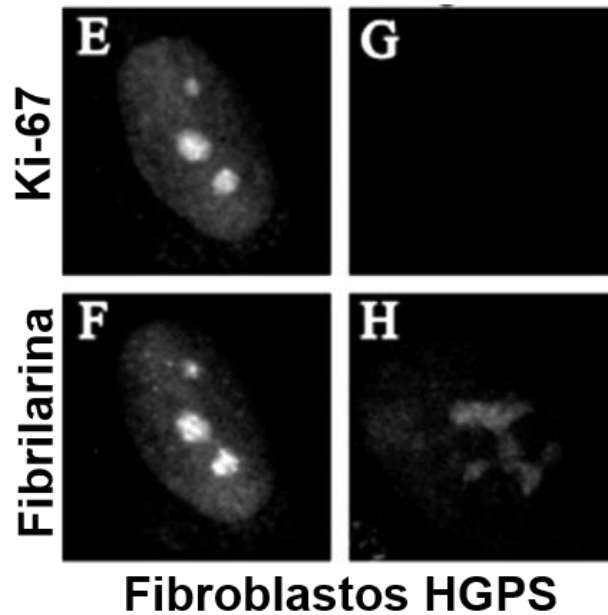


Figura 6. Distribución del nucléolo en fibroblastos HGPS. Los fibroblastos HGPS se usaron para realizar una inmunofluorescencia indirecta doble, usando un anticuerpo anti-fibrilarina para detectar los nucléolos (F y H) y un anticuerpo anti Ki-67 para detectar aquellas células que se encuentran en estado proliferativo (E y G). Los fibroblastos con un estrés nucleolar no se encuentran en esta proliferativo. Modificado de [1].

Se demostró mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta que una vez dentro del núcleo, el β -dístroglicano colocaliza con las proteínas lámina A/C en la envoltura nuclear, y con Nopp140 en el nucléolo; lo que demuestra que esta proteína es residente de varias regiones nucleares. De igual manera, se evidenció mediante ensayos de inmunoprecipitación empleando extractos proteicos totales, que el β -dístroglicano interactúa con las proteínas lámina A/C y Nopp140 (Figura 7), lo que hace suponer que lleva a cabo alguna función relacionada con la envoltura nuclear o el nucléolo respectivamente. Así mismo, la localización nuclear del β -dístroglicano juega un papel importante para mantener la estructura y organización nuclear [2].

Recientemente se evidenció que el β -dístroglicano también posee una secuencia de exporte nuclear (NES) funcional y que su exporte es mediado por la exportina CRM1 (Vélez-Aguilera G., datos de tesis de doctorado), por lo que esta proteína presenta un tráfico núcleo-citoplasma activo, aunque hasta la fecha poco se sabe de la función de esta proteína dentro del núcleo.

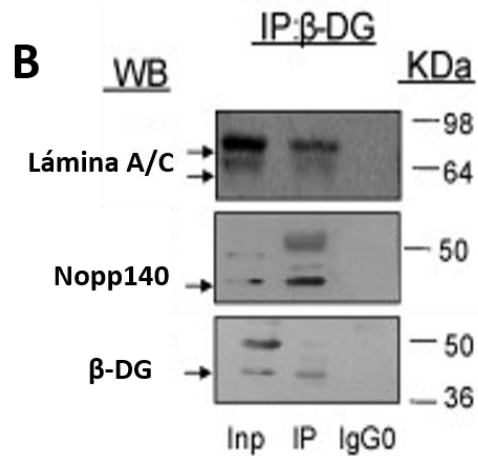
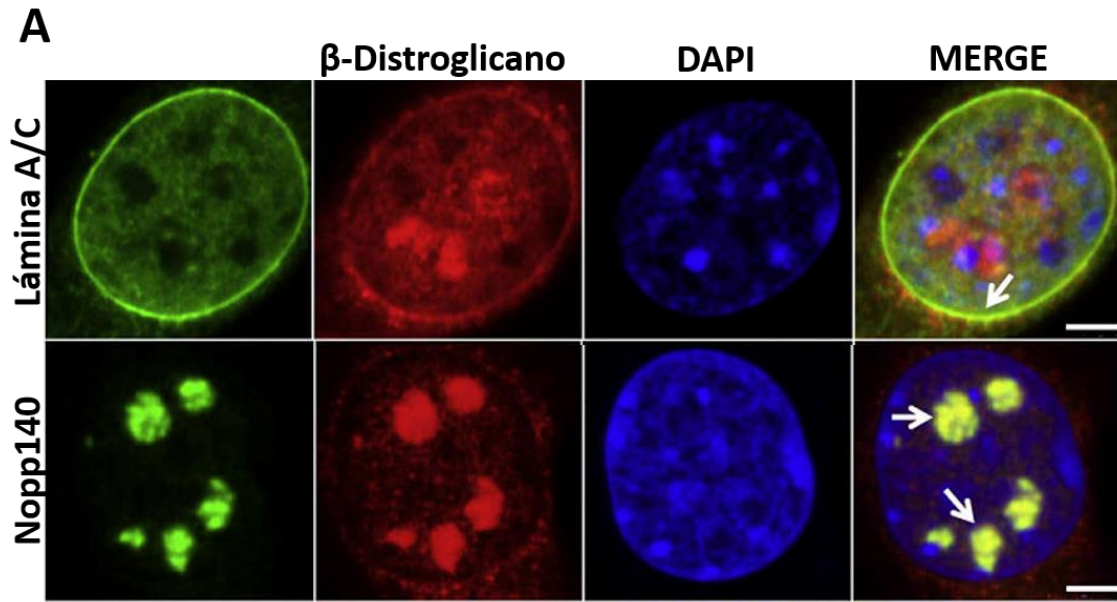


Figura 7. Colocalización e interacción del β -Distroglicano con proteínas de la envoltura nuclear y nucléolo. A.- Las células C2C12 se utilizaron para realizar una inmunofluorescencia indirecta doble y detectar la colocalización entre el β -Distroglicano (β -DG) y las proteínas de envoltura nuclear lámina A/C o el β -DG y la proteína nucleolar Nopp140. La flecha indica las zonas de colocalización. B.- Extractos protéicos totales de células C2C12 se emplearon para realizar una inmunoprecipitación, empleando un anticuerpo irrelevante (IgG⁰) o un anticuerpo anti β -DG, la membrana se reveló usando un anticuerpo anti β -DG y un anticuerpo anti lámina A/C o anti-Nopp140, para detectar la interacción entre el β -DG y estas dos proteínas. Modificado de [2].

JUSTIFICACIÓN

Tomando en consideración la relación que existe entre el β -dístroglicano y la proteína lámina A, es importante analizar la participación del β -dístroglicano en el Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford

OBJETIVO GENERAL

Analizar la implicación del β -dístroglicano en el estrés nucleolar presente en el Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar las alteraciones en los niveles proteicos y la localización del β -dístroglicano en los fibroblastos HGPS.
2. Evaluar la participación de la progerina en la exclusión nucleolar del β -dístroglicano presente los fibroblastos HGPS.
3. Evaluar la participación del β -dístroglicano en el estrés nucleolar.
4. Analizar la participación del transporte nuclear en la localización nucleolar del β -dístroglicano.
5. Analizar la participación de la exportina CRM1 en el estrés nucleolar de los fibroblastos HGPS

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Cultivos primarios de fibroblastos de piel provenientes de dos pacientes con HGPS (AG01972 y AG11498) y de un individuo sano utilizado como control (AG09309) (Coriell Cell Repository, Camdem, NJ) se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con aminoácidos esenciales, 15% de suero fetal bovino inactivado por calor y 50 U/ml de penicilina/estreptomicina. La línea celular HeLa (ATCC) se cultivó en medio DMEM suplementado con 1 mM de piruvato de sodio, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 50 U/ml de penicilina/estreptomicina. Todos los cultivos se crecieron a una temperatura de 37 °C y en una atmosfera de CO₂ al 5%.

Tratamientos celulares

Para inhibir el exporte nuclear mediado por CRM1, los cultivos primarios de fibroblastos se cultivaron durante 6 días en medio de cultivo con 50 nM de Leptomicina B (LMB; Sigma-Aldrich), diluida en etanol al 70%. Por otro lado, fibroblastos primarios de pacientes con HGPS se cultivaron durante 7 días en presencia del inhibidor de la enzima farnesil transferasa (FTI-277; Sigma-Aldrich), diluido en DMSO, con la finalidad de restablecer la morfología nuclear característica de estos cultivos. Los cultivos controles se trataron con el respectivo vehículo únicamente y al finalizar los tratamientos, las células se fijaron y se analizaron mediante microscopía confocal.

Vectores utilizados

Los plásmidos pBABE-puro-GFP, pBABE-puro-laminA-GFP y pBABE-puro-progerin-GFP fueron generados por Tom Mistelli (NIH, Bethesda, USA) y adquiridos mediante Addgene (Cambridge Ma., USA). El plásmido que expresa un ARN interferente para lamina A/C (pRNAT-H1.1/Neo-Imna) fue donado y generado por Ruth Rodríguez (CINVESTAV, México). Los plásmidos que expresan un ARN interferente para el distroglicano (pSIREN-RetroQ-DAG) y un ARN interferente control fueron donados por el Dr. Steve Winder (The University of Sheffield, UK).

Transfección celular y generación de cultivos estables

Se preparó un tubo con 100 µl de medio DMEM sin antibióticos ni suero y 4 µl de Lipofectamina 2000™ (Invitrogen™, CA, USA) y otro tubo con 100 µl de medio DMEM sin antibióticos ni suero y con 3 µg de plásmido. Ambos tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se mezclaron las dos soluciones para dejar reposar la mezcla por otros 20 minutos más a temperatura ambiente. Finalmente, el complejo lípido-ADN se añadió a una caja de cultivo de 35 mm que contenía células crecidas previamente hasta un 70% de confluencia. Las células transfectadas se cultivaron 24 horas y posteriormente se utilizaron para ensayos de inmunofluorescencia indirecta o inmunodetección en fase sólida. Para la generación de cultivos celulares estables, se transfectaron células HeLa con plásmidos que confieren resistencia a neomicina (pRNAT-H1.1/Neo) o puromicina (pSIREN-RetroQ) y que codifican para un ARN de interferencia o un ARN control. Los cultivos de células transfectadas con los plásmidos pRNAT-H1.1/Neo se crecieron en presencia de medio de cultivo con 400 µg/ml de G418 (Sigma-Aldrich) durante 10-15 días, mientras que los cultivos transfectados con los plásmidos pSIREN-RetroQ se crecieron durante 7 días en presencia de medio de cultivo con 2 µg/ml de puromicina (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Anticuerpos utilizados

Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: anti-β-DG policlonal (C20) [Santa Cruz Biotechnology, CA, USA], anti-β-DG monoclonal (7D11) [Santa Cruz Biotechnology, CA, USA], anti-β-DG monoclonal (MANDAG) [cortesía de Steve Winder, Universidad de Sheffield], anti-lámina A/C monoclonal (ab8984) [Abcam, Cambridge, UK], anti-lámina A/C policlonal (sc-20681) [Santa Cruz Biotechnology, CA, USA], anti-B23 policlonal (sc-5564) [Santa Cruz Biotechnology, CA, USA], anti-GAPDH (6C5) [Santa Cruz Biotechnology, CA, USA] y anti-CRM1 [NovusBiologicals, CO, USA].

Inmunofluorescencia indirecta

Células HeLa cultivadas sobre cubreobjetos se lavaron con PBS (Phosphate Buffered Saline: 8 g/l de NaCl, 0.2 g/l de KCl, 1.44 g/l de Na₂HPO₄ y 0.24 g/l de KH₂PO₄, pH 7.4) para eliminar el medio de cultivo remanente y se sumergieron durante 10 minutos en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% diluido en PBS. Después, las células se lavaron con PBS y se permeabilizaron durante 5 minutos con una solución de Tritón X-100 al 0.2%. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron nuevamente con PBS y se cubrieron con la solución de bloqueo (5% de BSA y 3% de suero fetal bovino diluido en PBS) durante 30 minutos; al terminar el bloqueo, los cubreobjetos se lavaron nuevamente, se montaron sobre una gota de la dilución del anticuerpo primario y se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente el anticuerpo primario fue lavado, se montaron los cubreobjetos sobre una gota de la dilución del anticuerpo secundario acoplado un fluoróforo [FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA), Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) o CY5 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA)], durante una hora a temperatura ambiente, y los núcleos se contratiñeron con DAPI (49,6-diamidino-2-phenylindole). Finalmente, los cubreobjetos se montaron usando VectaShield (Vector Laboratories, CA, USA) y se analizaron mediante un microscopio confocal TCS-SP8 Leica (Heidelberg, Alemania) o Nikon C2+ (Tokio, Japón).

Ensayo de ligación por proximidad (PLA)

Para detectar las interacciones de proteínas endógenas en células fijadas, se empleó el kit Duolink & PLA[®] (Sigma-Aldrich, MI, USA), de acuerdo a las instrucciones del proveedor, y las muestras se analizaron mediante microscopía confocal. La señal de fluorescencia se consideró como una interacción entre las proteínas especificadas.

Análisis de volumen nucleolar y reconstrucción en 3D

Para el análisis de volumen nucleolar, se empleó el programa ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Se analizaron cortes ópticos de 0.4 μm de grosor, obtenidos mediante un microscopio confocal Nikon C2+ (Tokio, Japón), usando un objetivo 60X de inmersión en aceite con 1.4 de apertura numérica (N.A.). A las imágenes se

les realizó una limpieza con el filtro median (valor de 3), se definió la segmentación mediante la conversión de la imagen a una imagen binaria y se realizó el análisis del área de cada nucléolo en cada uno de sus cortes ópticos, excluyendo las partículas con un tamaño menor a 0.5 μm . Posteriormente, el área del nucléolo en cada uno de sus cortes ópticos fue empleado para calcular el volumen total del nucléolo. Para la reconstrucción en 3D se emplearon cortes ópticos de 0.4 μm de grosor y se realizó una reconstrucción tridimensional mediante iso-superficie, empleando el *plugin 3D viewer* (Benjamin Schmid, Universidad de Wuzburgo, Alemania).

Extracción de proteínas totales

Cajas de cultivo de 70 mm con a una confluencia celular del 80%, se lavaron con PBS y se cosecharon usando 200 μl de solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 1mM PMSF y 1x Complete™ [Sigma-Aldrich]) con ayuda de un gendarme. La suspensión se sonicó 3 veces a 3.5 micrones de amplitud durante 15 segundos en hielo y finalmente la muestra se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 3 minutos para eliminar la fracción insoluble.

Inmunodetección en fase sólida

Los extractos proteicos se desnaturalizaron al agregarles la solución amortiguadora Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 10% β -mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol y 0.125 M Tris-HCl pH 6.8) y calentarlos a 100 °C durante 5 minutos. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 10% con SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, usando una cámara de transferencia semi-húmeda durante una hora a 20 volts en presencia de la solución amortiguadora de transferencia Bjerrum (48 mM Tris, 39 mM glicina y 20% metanol). Posteriormente, la membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% en TBS-T (25 mM Tris-Base, 140 mM NaCl, 3 mM KCl y 0.05% Tween-20) durante una hora en agitación leve y se incubó con la dilución apropiada del anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente se lavó el anticuerpo primario usando TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano durante una hora a temperatura

ambiente y en agitación. La detección de las proteínas deseadas se realizó mediante el revelado de la señal quimio-luminiscente al usar el reactivo de detección ECL (Promega, WI, USA).

Inmunoprecipitación

Se incubaron 500 µg de extractos totales de proteínas con 10 µl de perlas de proteína G-agarosa (Invitrogen, CA, USA), previamente equilibradas mediante 3 lavados con la solución amortiguadora de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 1mM PMSF y 1x Complete™ [Sigma-Aldrich]), durante 2 horas en agitación a 4 °C. Las perlas se eliminaron mediante centrifugación y el sobrenadante se incubó toda la noche a 4 °C con 2 µg del anticuerpo anti-β-distroglicano o un anticuerpo irrelevante (IgG), posteriormente, se agregaron 10 µl de proteína G-agarosa y se continuó la incubación por 4 horas a 4 °C. Los complejos se recuperaron mediante centrifugación a 2000 *g* por 3 minutos, se lavaron las perlas 3 veces con PBS (Phosphate Buffered Saline: 8 g/l de NaCl, 0.2 g/l de KCl, 1.44 g/l de Na₂HPO₄ y 0.24 g/l de KH₂PO₄, pH 7.4) para eliminar las proteínas no unidas al complejo y finalmente se eluyeron las proteínas con 10 µl de la solución amortiguadora laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol y 0.125 M Tris-HCl pH 6.8) para posteriormente ser analizadas mediante inmunodetección en fase sólida.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba de t-Student y cualquier valor de *p* menor a 0.05 se consideró como un cambio significativo.

RESULTADOS

La localización nuclear/nucleolar del β -DG está alterada en los fibroblastos HGPS

Los avances más significativos sobre la identificación de los mecanismos moleculares que subyacen el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford se han obtenido mediante el estudio de fibroblastos primarios de piel provenientes de pacientes con HGPS. Por lo tanto, seleccionamos este modelo celular para analizar la implicación del β -DG en la etiología de la HGPS. Como primer paso analizamos la distribución subcelular del β -DG en cultivos de fibroblastos primarios provenientes de dos diferentes pacientes con HGPS (AG11498 y AG01972), y de un individuo normal (AG09309) como control, mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IF) y microscopia confocal utilizando el anticuerpo comercial anti- β -DG denominado C20. Ambos cultivos de fibroblastos HGPS exhibieron el fenotipo celular característico de la enfermedad, presencia de núcleos deformes, con lobulaciones, invaginaciones de la membrana nuclear, y nucléolos disgregados, lo que se evidenció mediante inmunotinción para la lámina A/C y la proteína nucleolar B23 respectivamente; en contraste, los fibroblastos normales presentaron núcleos con forma ovalada y nucléolos íntegros (Fig. 8 A, imágenes magnificadas). Por lo que respecta al β -DG, la proteína se distribuyó en diferentes compartimentos celulares de los fibroblastos normales, incluyendo la membrana plasmática, el citoplasma, la envoltura nuclear, el nucleoplasma y los nucléolos; en esta última región el β -DG colocalizó con la proteína nucleolar B23. De manera interesante, la distribución subcelular del β -DG se alteró drásticamente en los fibroblastos HGPS; disminuyó la intensidad de la fluorescencia en el nucleoplasma, y se perdió la inmunotinción en los nucléolos (Fig. 8 A; imágenes magnificadas, flechas). La cuantificación de las imágenes determinó que el número de células con tinción nucleolar para el β -DG disminuyó significativamente en los cultivos de fibroblastos HGPS (~35%), con respecto al cultivo control (Fig. 8 A, panel inferior).

Para evaluar los niveles del β -DG en los fibroblastos HGPS se realizaron ensayos de inmunodetección en fase sólida empleando a la proteína gliceraldehído 3-fosfato

deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. A pesar de que la inmunotinción del β -DG disminuyó en el núcleo de los fibroblastos HGPS (Fig. 8), sus niveles totales aumentaron ~50% con respecto al cultivo de fibroblastos normales (Fig. 8 B), lo que se confirmó mediante el análisis de densitometría (panel de la derecha).

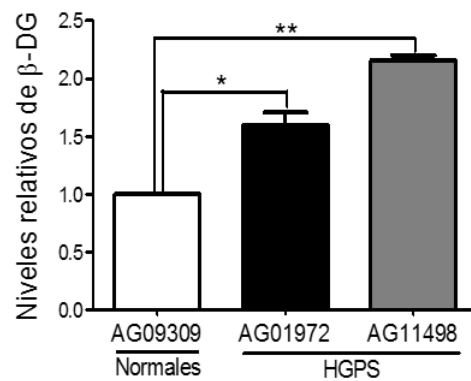
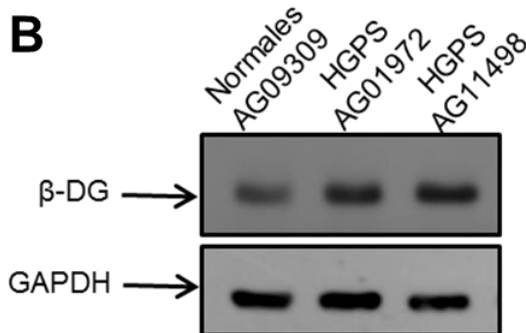
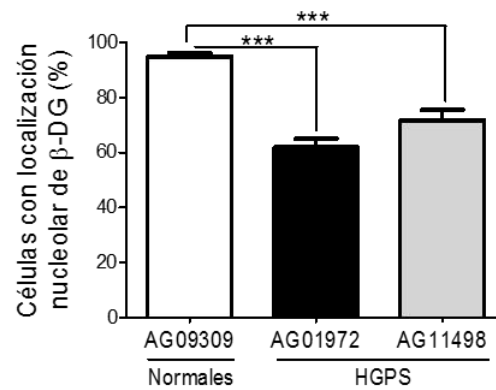
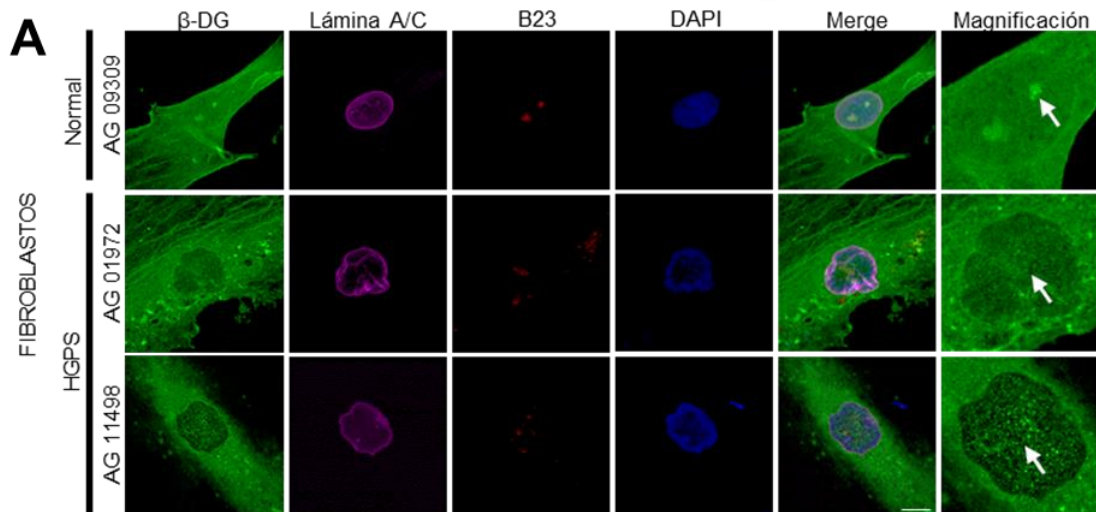


Figura 8. La localización nucleolar del β -DG se pierde en los fibroblastos primarios de individuos con HGPS. A.- Los fibroblastos primarios normales y HGPS se sometieron a una triple inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra la lámina A/C, β -DG y la proteína nucleolar B23, y los núcleos se contra-tiñeron con DAPI. Se muestran imágenes de microscopía confocal representativas de cinco experimentos independientes, con cortes ópticos a nivel del núcleo de las células. Las flechas sobre las imágenes amplificadas indican la localización del β -DG en los nucléolos de los fibroblastos normales y la pérdida de esta señal en los fibroblastos HGPS. Se cuantificaron 200 células de cada cultivo y se obtuvo el porcentaje de células con localización nucleolar del β -DG (panel inferior). B.- Se obtuvieron lisados de fibroblastos normales y HGPS para analizar las proteínas β -DG y GAPDH (control de carga) mediante inmunodetección en fase sólida y se cuantificaron sus niveles (panel derecho). Los asteriscos en cada gráfica denotan una diferencia significativa entre los cultivos celulares.

La progerina induce la exclusión del β -DG de los nucléolos en los fibroblastos HGPS y células HeLa

Tomando en consideración que la progerina altera la morfología y función del núcleo debido a que permanece farnesilada por acción de la enzima FTasa, diferentes inhibidores de esta enzima se han utilizado para revertir la sintomatología de la HGPS. Por lo tanto, decidimos analizar si la deslocalización del β -DG de los nucléolos está relacionada directamente con la farnesilación de la progerina. Primeramente se trataron los fibroblastos HGPS (AG01972) con el inhibidor de la FTasa (denominado FTI-277) diluido en DMSO, o sólo con el vehículo, durante un periodo de 7 días. Se realizó una inmunofluorescencia indirecta para detectar la lámina A/C con la finalidad de determinar que las condiciones de tratamiento empleadas son las apropiadas para restablecer la morfología nuclear y evitar la formación de pliegues en la envoltura nuclear (Fig. 9 A). Posteriormente, mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta triple se analizó la distribución de la lámina A/C, el β -DG y la proteína nucleolar B23, y se demostró que el tratamiento con el inhibidor FTI-277 restaura la localización del β -DG en el nucleoplasma y los nucléolos de los fibroblastos HGPS (Fig. 9 B). El número de fibroblastos HGPS con tinción del β -DG en los nucléolos aumento del 50 a 90% después del tratamiento (panel inferior).

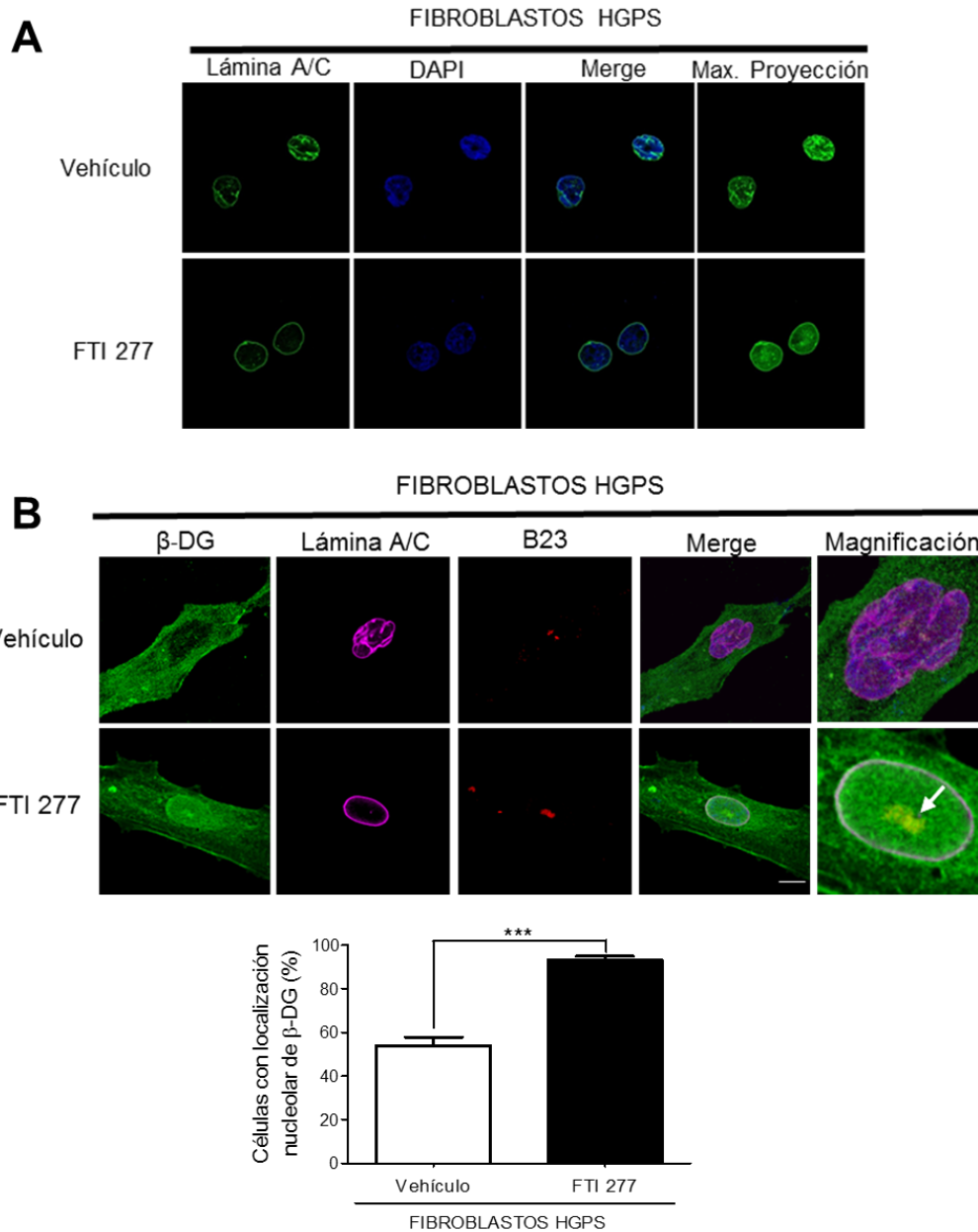


Figura 9. La inhibición de la farnesilación de la progerina evita la deformación de los núcleos y restablece la localización nuclear/nucleolar del β -DG en los fibroblastos HGPS. A.- Los fibroblastos HGPS se trataron con el inhibidor FIT-277 diluido en DMSO o solo con el vehículo (control) durante 7 días para determinar que estas condiciones son las adecuadas para restablecer la morfología nuclear (ver la proyección máxima). B.- Los fibroblastos HGPS se trataron con el inhibidor FIT-277 diluido en DMSO o solo con el vehículo (control). Enseguida se sometieron a una inmunotinción indirecta triple utilizando anticuerpos contra β -DG, lámina A/C y B23. Se muestran cortes ópticos obtenidos mediante microscopía confocal. La flecha en la imagen amplificada muestra la recuperación de la tinción del β -DG en los nucléolos de los fibroblastos HGPS tratados con el inhibidor FIT-277. Se analizaron 200 células y se determinó el porcentaje de fibroblastos que recuperó la tinción nucleolar del β -DG después del tratamiento con el inhibidor (panel inferior).

El efecto de la progerina sobre los niveles y distribución del β -DG implica una relación funcional entre ambas proteínas, por lo que decidimos evaluar si estas proteínas interactúan entre sí. Con este propósito llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación utilizando lisados totales de fibroblastos normales y HGPS empleando un anticuerpo anti- β -DG o un anticuerpo irrelevante (IgG) para inmunoprecipitar. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida empleando el anticuerpo anti- β -DG C20 y un anticuerpo contra la lámina A/C que reconoce también la progerina. El inmunoprecipitado obtenido con el anticuerpo anti- β -DG pero no el del anticuerpo irrelevante (IgG) contiene al β -DG (Fig. 10), lo que demuestra la especificidad del ensayo. De acuerdo a nuestra premisa, recuperamos las láminas A y C unidas al β -DG en los fibroblastos normales (panel izquierdo) y de manera inesperada, encontramos que el β -DG interactúa preferencialmente con la progerina en los fibroblastos HGPS (panel derecho).

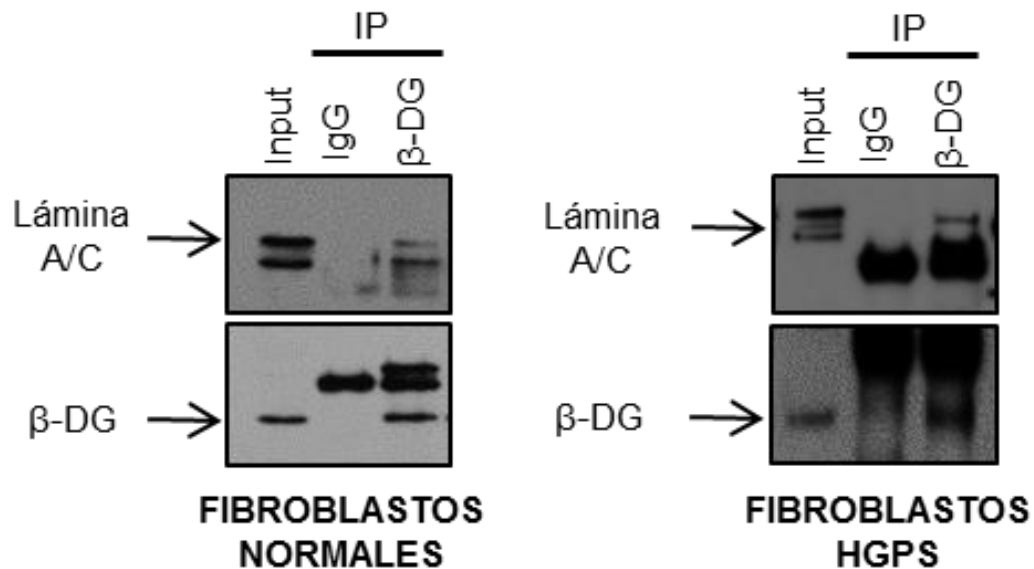


Figura 10. El β -DG interactúa con la progerina en los fibroblastos HGPS. Se obtuvieron lisados totales de los fibroblastos control y HGPS y se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti- β -DG o un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo (IgG). Los precipitados se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos contra lámina A/C y progerina y contra β -DG. Input, extracto sin inmunoprecipitar; IP, inmunoprecipitación.

Con la finalidad de examinar con mayor detalle el impacto de la progerina sobre la localización nuclear/nucleolar del β -DG, decidimos recrear este fenómeno en las células HeLa. Para ello se decidió comprobar primeramente si en este modelo celular existe también la interacción entre el β -DG y la lámina A/C. Con este fin se realizó un ensayo de ligación por proximidad (PLA); las células HeLa se fijaron y se incubaron solamente con un anticuerpo anti lámina A/C (control negativo), con anticuerpos anti-lámina A/C y anti- SUN1 (control positivo) y con anticuerpos anti-lámina A/C y anti- β -DG. Las señales de interacción entre las moléculas mencionadas se aprecian como puntos fluorescentes rojos. Esta señal se observó claramente en la interacción entre la lámina A/C y SUN1 y entre la lámina A/C y el β -DG, pero no se presentó al usar solamente el anticuerpo anti-lamina A/C, lo que demuestra la especificidad del ensayo (Fig. 11, magnificación).

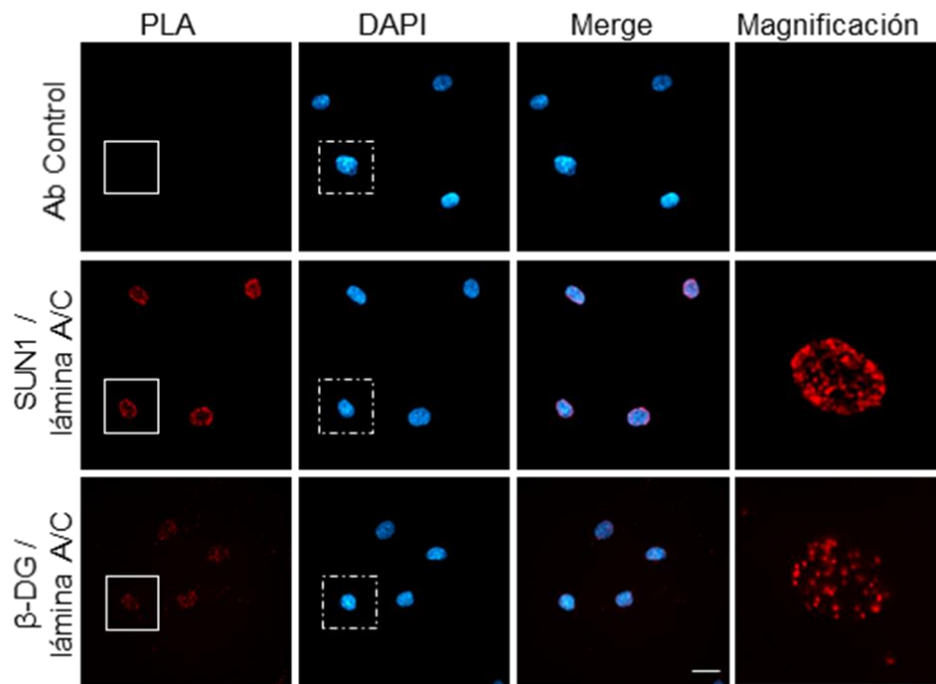


Figura 11. El β -DG interactúa con la lámina A/C en las células HeLa. Las células HeLa se fijaron y se incubaron solamente con un anticuerpo anti-lámina A/C (control negativo), con anticuerpos anti lámina-A/C y anti-SUN1 (control positivo de la interacción) y con anticuerpos anti-lámina A/C y anti- β -DG. La señal fluorescente roja indica la interacción de las proteínas analizadas.

Una vez comprobada la interacción entre el β -DG y la lámina A/C, se transfectaron transitoriamente células HeLa con un vector que sobre-expresa la proteína verde fluorescente únicamente (GFP) o la lámina A o la progerina fusionadas a GFP, y después de 48 h se analizó la localización subcelular del β -DG. En concordancia con lo obtenido con los fibroblastos HGPS, la sobreexpresión de la progerina ocasiona la deformación de los núcleos y la pérdida de señal del β -DG en los nucléolos de las células HeLa, en comparación con la sobreexpresión de la lámina A o la GFP (Fig. 12). Interesantemente, la deslocalización del β -DG ocurre únicamente en las células que presentan daño evidente en la envoltura nuclear, ya que aquellas células que expresan progerina pero que no presentan daño en la envoltura, aún exhiben al β -DG en los nucléolos (Fig. 12, flecha). Adicionalmente, observamos que la ausencia del β -DG en los nucléolos correlaciona con la baja inmunotinción de la proteína nucleolar B23. La implicación de esta serie de resultados es que la progerina perturba la localización del β -DG en los nucléolos, y más importante aún, que la ausencia del β -DG en los nucléolos altera su integridad, lo que sugiere que esta proteína es necesaria para el correcto ensamblaje y/o estabilidad de estas estructuras nucleares no membranosas.

La deficiencia del β -DG recrea las características de la HGPS en las células HeLa

Si el β -DG es un determinante de la HGPS se espera que el silenciamiento de su expresión genere un fenotipo similar al de la HGPS. Para probar esta premisa se transfectaron establemente células HeLa con un vector de expresión que produce un RNA de interferencia (RNAi) específico para el β -DG o un RNAi que no reconoce ningún RNA celular (control), y examinamos el impacto del silenciamiento de la expresión del β -DG sobre la estructura del núcleo/núcleolo. Debido a que la transfección de fibroblastos primarios es muy ineficiente y a que las células HeLa se han usado exhaustivamente para estudiar la relación de las láminas con la arquitectura y función del núcleo, elegimos esta última línea celular como modelo para esta serie de experimentos.

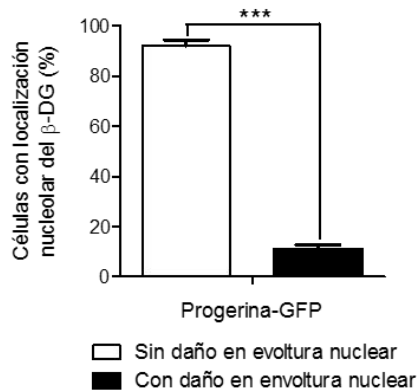
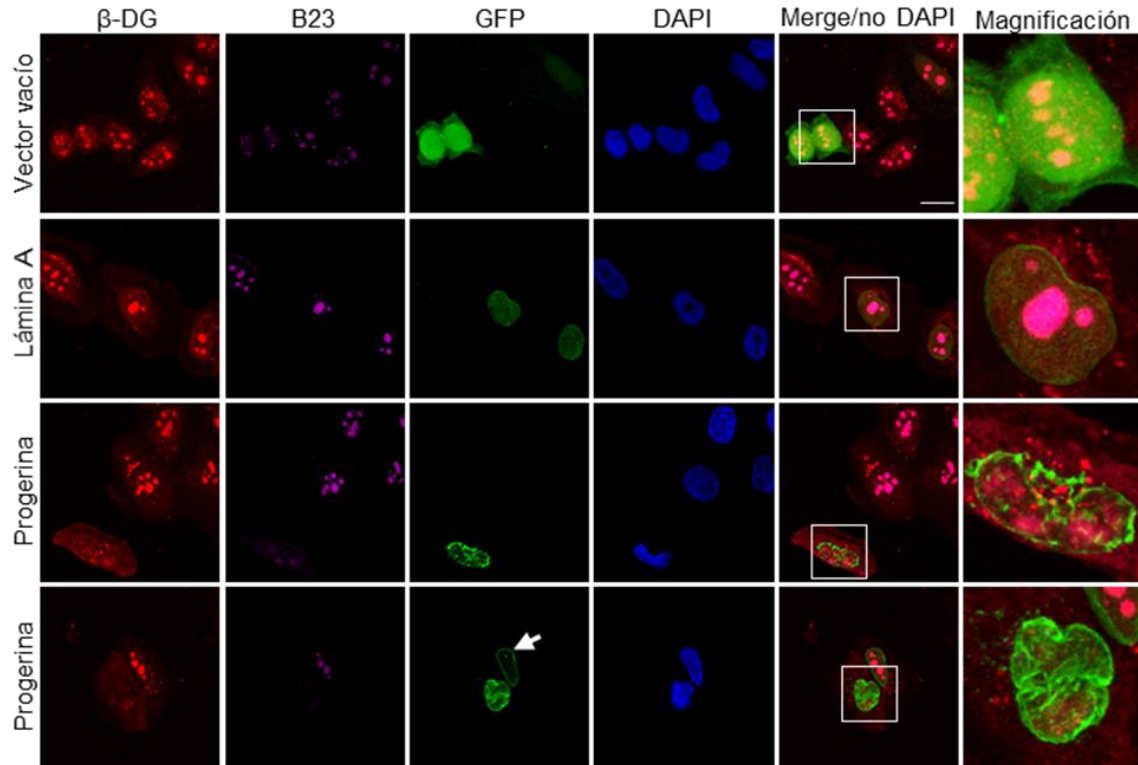


Figura 12. Las células HeLa se transfectaron transitoriamente con vectores que expresan las proteínas de fusión GFP-lamina A y GFP-progerina o GFP solamente (vector vacío), y 48 h después se procesaron para IF con anticuerpos contra el β -DG y la proteína nucleolar B23. Los núcleos se contratiñeron con DAPI y las preparaciones se analizaron por microscopia confocal para obtener cortes ópticos a nivel del núcleo que son representativos de tres experimentos independientes. La fecha muestra una célula que sobreexpresa progerina pero que no presenta daño en la envoltura nuclear, por lo que el β -DG se encuentra presente en el nucléolo de esta célula. En las imágenes amplificadas se muestran la inmunotinción del β -DG en los nucléolos de las células HeLa que sobreexpresan al vector vacío o la lámina A, y la ausencia de esta señal en los nucléolos disgregados presentes en las células HeLa que sobreexpresan la progerina y presentan daño en la envoltura nuclear. La cantidad de células con localización nucleolar del β -DG en las células transfectadas con el vector vacío o con la lámina A no presentaron diferencia en sus valores, es por ellos que estas cuantificaciones se omitieron de la gráfica.

Las células HeLa que expresan el RNAi contra el β -DG exhibieron una disminución drástica en los niveles de esta proteína, en comparación con las células que expresan el RNAi control, lo que demuestra la efectividad del tratamiento; además, observamos que los niveles proteicos de la lámina A y de la proteína nucleolar B23 no se alteraron significativamente (Fig. 13 A). De manera interesante, la baja expresión del β -DG ocasionó deformación de los núcleos y disgregación de los nucléolos (Fig. 13 B), dos características distintivas de las células HGPS, lo que se evidenció mediante la inmunotinción para la lámina A/C y la proteína nucleolar B23 respectivamente. El análisis de las imágenes de microscopía confocal reveló que los nucléolos son más numerosos en las células con baja expresión del β -DG que en las células HeLa que expresan el RNAi control y la reconstrucción tridimensional de las imágenes demostró fehacientemente que las células con deficiencia del β -DG contienen núcleos amorfos y nucléolos con un volumen significativamente menor (Fig. 13 C).

La inhibición del transporte nuclear restablece la localización nuclear/nucleolar del β -DG y consecuentemente alivia el estrés nucleolar en los fibroblastos HGPS

El β -DG se transporta al núcleo mediante el reconocimiento de una señal de localización nuclear, presente en su dominio citoplásmico, por parte de las importinas y regresa al citoplasma mediante el mecanismo de transporte nuclear, el cual es mediado por el reconocimiento de una señal de transporte nuclear (NES) por parte de la exportina CRM1 [Vélez-Aguilera G; Tesis doctoral]. Por lo tanto, la ausencia del β -DG en los nucléolos sugiere que su tráfico nuclear está alterado en los fibroblastos HGPS. Es posible que el transporte nuclear del β -DG este dañado o alternativamente, que una vez que el β -DG ingresa al núcleo es exportado rápidamente de regreso al citoplasma; cualquier de estas dos situaciones comprometería la localización de la proteína en el nucleoplasma y los nucléolos. Decidimos probar la segunda hipótesis mediante el tratamiento de los fibroblastos HGPS con leptomicina B (LMB), un inhibidor selectivo de la exportina CRM1, molécula central del transporte nuclear de proteínas.

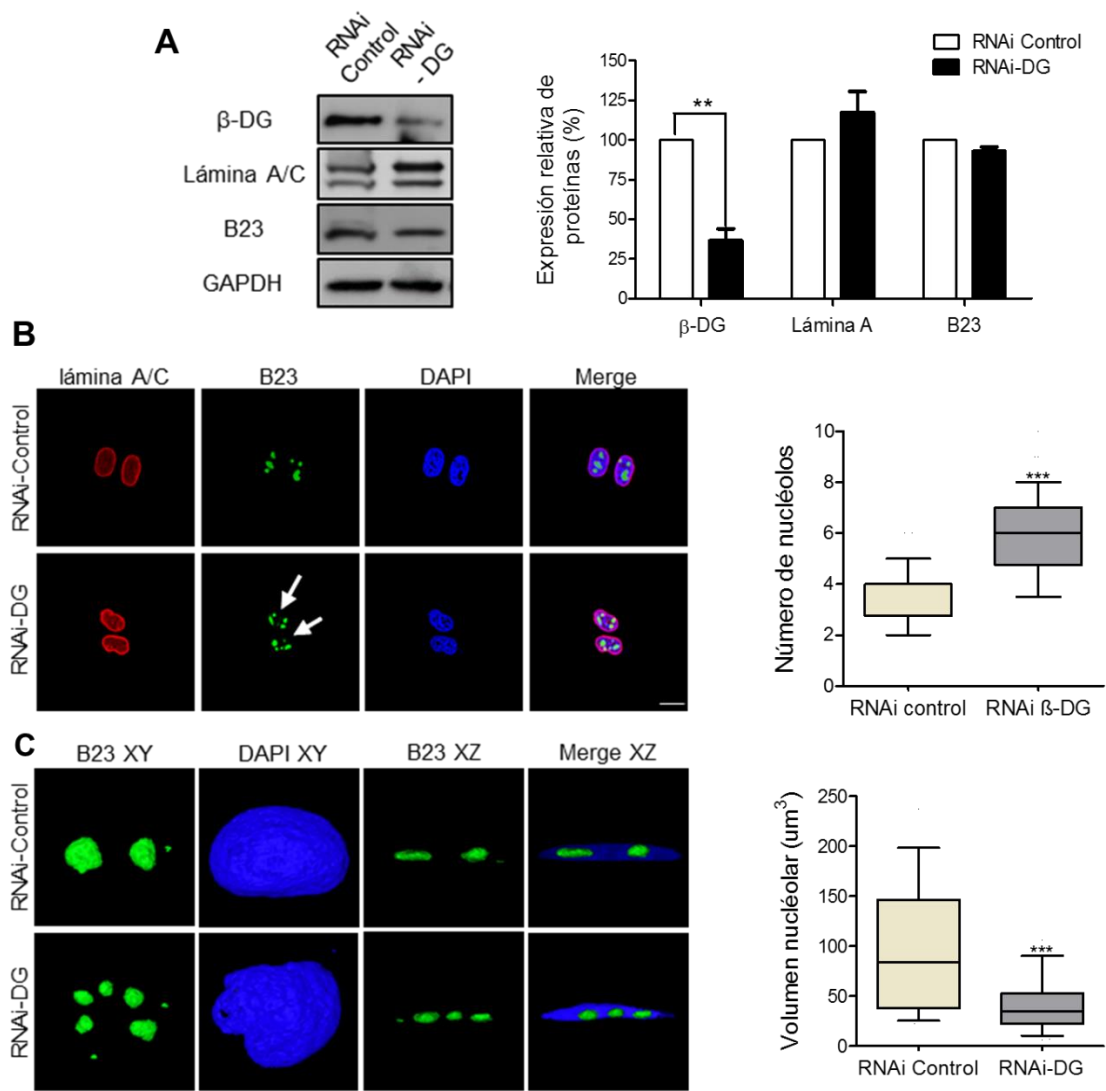


Figura 13. El silenciamiento de la expresión del β -DG induce núcleos deformes y nucléolos disgregados. A.- Las células HeLa que expresan de manera estable un RNAi contra el β -DG o un RNAi control se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida, empleando anticuerpos específicos para β -DG, lámina A/C, B23 y GAPDH (control de carga). Se cuantificaron los niveles de las diferentes proteínas (panel derecho). B.- Las células HeLa que expresan el RNAi contra el β -DG o el RNAi control se analizaron por IF y microscopía confocal, utilizando anticuerpos contra la lámina A/C y la proteína nucleolar B23. Se analizaron 200 células y se cuantificó el número de nucléolos por célula en los dos diferentes cultivos (panel derecho). C.- Se llevó a cabo la reconstrucción tridimensional del núcleo y los nucléolos (se muestran imágenes representativas). A partir del análisis de 100 células se calculó el volumen de los nucléolos de cada cultivo celular mediante el programa Image J. Las diferencias significativas se indican con asteriscos en cada gráfica.

El tratamiento con LMB aumentó aparentemente la señal nuclear del β -DG en los fibroblastos normales (Fig. 14 A), y la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia confirmó la acumulación nuclear del β -DG como respuesta al tratamiento, en comparación con las células tratadas solamente con el vehículo (Fig. 14 A, panel derecho). De manera interesante, la inhibición del transporte nuclear restableció la tinción del β -DG en el nucleoplasma y los nucléolos en los dos diferentes cultivos de fibroblastos HGPS (Fig. 14 B), y el análisis cuantitativo de las imágenes determinó que el número de células con tinción nucleolar del β -DG se incrementó en un ~40% después del tratamiento con LMB en ambos cultivos de fibroblastos HGPS (Fig. 14 B, panel derecho). Notablemente, el regreso del β -DG a los nucléolos alivió el estrés nucleolar, ya que el volumen de los nucléolos aumentó significativamente en los fibroblastos tratados con LMB (Fig. 14 C). La mejoría en la estructura de los nucléolos está relacionada directamente con el regreso del β -DG al nucléolo de los fibroblastos HGPS y no se debe a un efecto inespecífico del tratamiento con LMB, como lo demuestra el hecho de que el volumen de los nucléolos de los fibroblastos normales no se altera por el tratamiento con LMB.

Estos resultados implican que los bajos niveles del β -DG presentes en el nucleoplasma y su ausencia en los nucléolos se deben a que sufre un transporte nuclear exacerbado en los fibroblastos HGPS y más importante aún, nuestros hallazgos demuestran que se requiere la presencia del β -DG para preservar la integridad de los nucléolos.

El mecanismo de transporte nuclear de proteínas está exacerbado en los fibroblastos HGPS debido a la sobreexpresión de la exportina CRM1

Con base a nuestros resultados razonamos que el transporte nuclear exacerbado del β -DG podría deberse a una alteración global del mecanismo de transporte nuclear de proteínas. Para probar esta hipótesis analizamos la distribución subcelular y/o los niveles de la exportina CRM1 en los fibroblastos HGPS. Observamos mediante ensayos de IF y microscopía confocal un aumento notorio en la tinción nuclear de la exportina CRM1 en los dos cultivos de fibroblastos HGPS (Fig. 15 A).

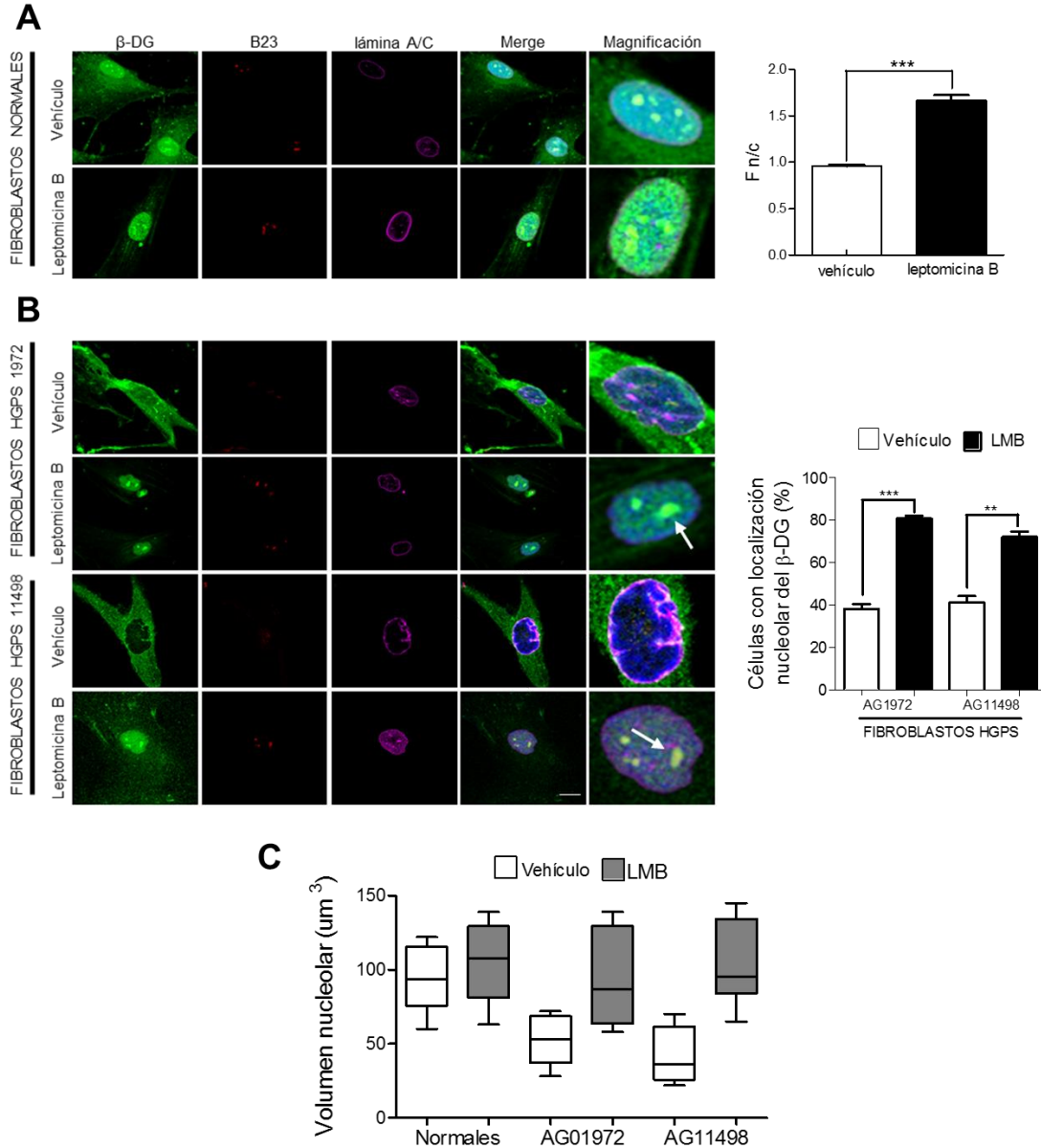


Figura 14. El tratamiento con el inhibidor del transporte nuclear LMB restaura la localización nuclear/nucleolar del β -DG y alivia el estrés nucleolar en los fibroblastos HGPS. A y B.- Los cultivos de fibroblastos normales y HGPS se trataron durante 6 días con leptomicina B (LMB), inhibidor específico de la exportina CRM1, o con el vehículo solamente. Enseguida las preparaciones se sometieron a ensayos de IF para analizar la distribución de las proteínas β -DG, B23 y lámina A/C, y los núcleos se contratiñeron con DAPI. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal con cortes ópticos a nivel del núcleo. Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia presente en citoplasma y núcleo de los fibroblastos normales mediante el programa Image J, y se obtuvo el cociente F n/c de las células tratadas con LMB o solo con el vehículo (A, panel derecho). Se analizaron 200 células y se cuantificó el número de células con tinción nucleolar del β -DG presente en cada cultivo (B, panel derecho). C.- Se calculó mediante el programa Image J, el volumen de los nucléolos de 100 células de cada cultivo, tratadas con el vehículo solamente o con LMB. Las diferencias significativas se indican con asteriscos en cada gráfica. Realizado en colaboración con la M.C Ruth Rodríguez.

La cuantificación más precisa mediante inmunodetección en fase sólida corroboró la sobreexpresión de la exportina CRM1 en los fibroblastos HGPS (Fig. 15 B), y el análisis cuantitativo reveló un aumento del 100 y 50% en los fibroblastos mutantes AG1972 y AG011498 respectivamente.

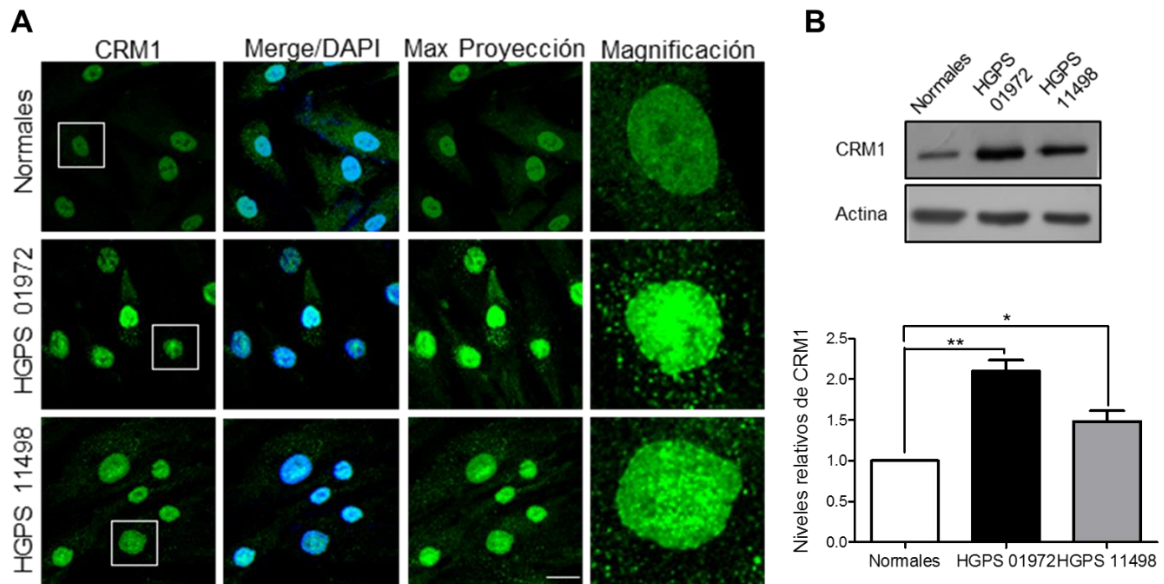


Figura 15. Sobreexpresión e hiperactividad de la exportina CRM1 en los fibroblastos HGPS. A.- La distribución subcelular de la exportina CRM1 se examinó mediante IF indirecta utilizando anticuerpos anti-CRM1. Previo al análisis por microscopía confocal los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. B.- Se obtuvieron lisados totales de los fibroblastos normales y HGPS para su análisis mediante inmunodetección en fase sólida, utilizando anticuerpos específicos para CRM1 y actina (control de carga). Se cuantificaron los niveles de CRM1, ajustándose con los niveles de actina (panel inferior). Las diferencias significativas entre los cultivos celulares se indican con asteriscos. Realizado en colaboración con la M.C Ruth Rodríguez.

Para discernir si la sobreexpresión de la exportina CRM1 acelera globalmente el transporte nuclear de proteínas en los fibroblastos HGPS y que el efecto no es específico sobre β -DG, analizamos la localización nuclear de la distrofina Dp71 y la ciclina B1, proteínas cuyo transporte nuclear es mediado por CRM1. Consistente con nuestra premisa, la localización nuclear de la Dp71 (Fig.16 A), y de ciclina B1 (Fig.16 B), están disminuidas significativamente en los fibroblastos HGPS, como lo confirmó la cuantificación de la fluorescencia (Fn/c; paneles derechos), lo que implica que

existe una mayor actividad del transporte nuclear de proteínas en los fibroblastos HGPS.

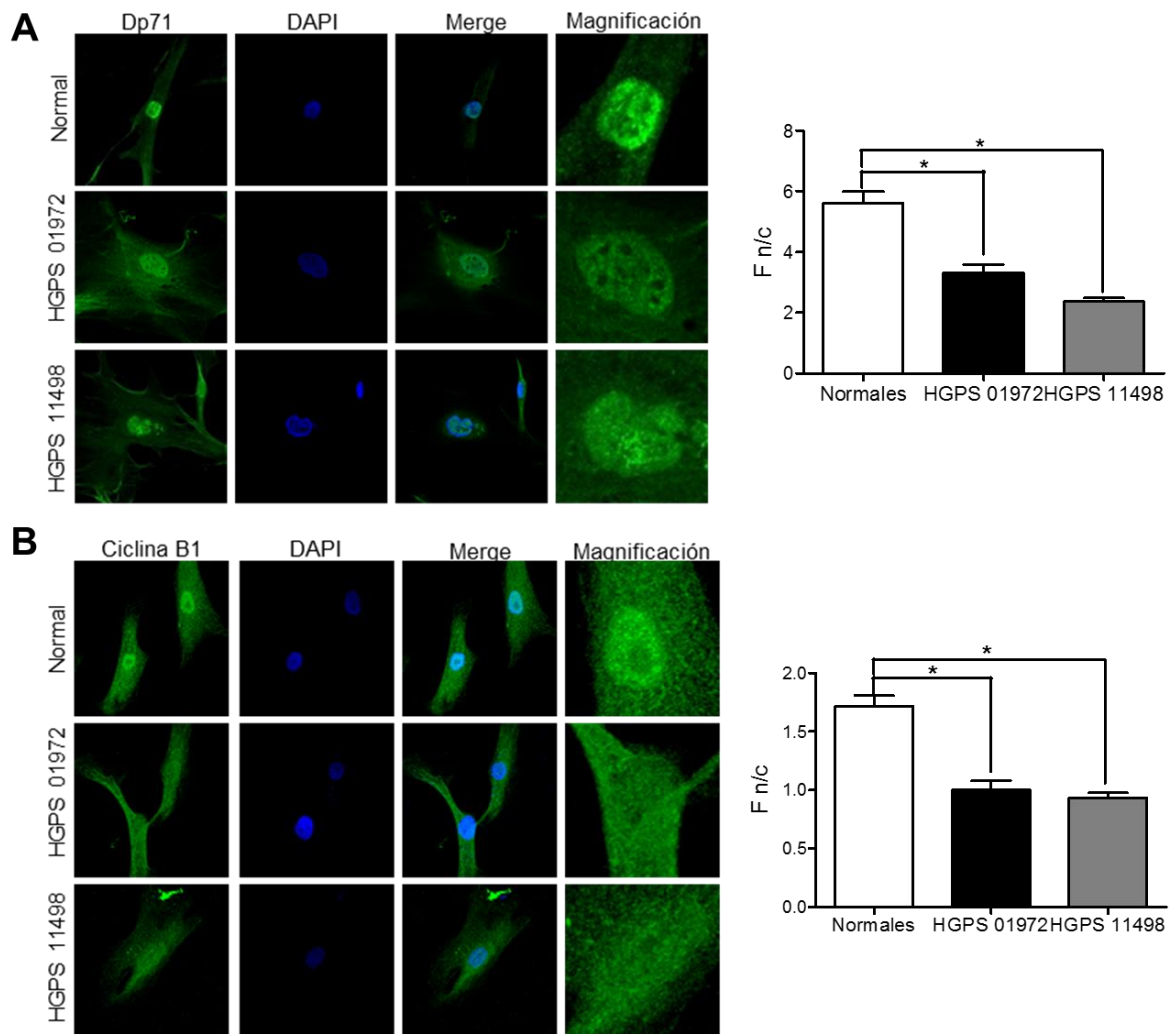


Figura 16. El mecanismo de transporte nuclear exacerbado es generalizado en los fibroblastos HGPS. Se analizó la distribución subcelular de la distrofina Dp71 (A) y la ciclina B1 (B) en los fibroblastos normales y HGPS mediante IF indirecta y microscopía confocal. Las células se contratiñeron con DAPI para visualizar los núcleos. Se presentan imágenes representativas de tres experimentos independientes. Se cuantificó la fluorescencia del núcleo y citoplasma y se obtuvo el cociente F n/c. Las diferencias significativas entre los cultivos de fibroblastos se indican con asteriscos. Realizado en colaboración con la M.C Ruth Rodríguez.

DISCUSIÓN

Las enfermedades raras poseen eventos patológicos que proveen una oportunidad única para estudiar procesos fisiológicos. El síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) es una de las enfermedades raras más desconcertantes, debido a que comparte similitudes con el proceso normal de envejecimiento, tanto a nivel molecular como clínico [64]. En últimos años esta enfermedad ha logrado captar la atención de la comunidad científica ya que su estudio podría proporcionar el entendimiento de las bases moleculares asociadas al envejecimiento y las enfermedades cardiovasculares. Este padecimiento es causado por la acumulación de la progerina en la envoltura nuclear, lo que afecta diversos procesos fundamentales del núcleo, incluyendo la expresión de genes, organización de la cromatina, estabilidad de los telómeros e integridad del núcleo y el nucléolo [65]. Sin embargo, los mecanismos moleculares de cómo la progerina desencadena estos eventos apenas comienzan a conocerse.

Por otro lado, el β -dístroglicano (β -DG) es una proteína que forma parte del complejo de proteínas asociadas a distrofina en la membrana plasmática. Recientemente, se ha descrito que esta proteína no solo reside en la membrana y el citoplasma sino que también se localiza en el núcleo, en donde interactúa con las proteínas de la envoltura nuclear lámina A/C y emerina y con la proteína de nucléolo Nopp140 [2]. Debido a la relación que presenta el β -DG con la envoltura nuclear y los nucléolos, es importante explorar su participación en la HGPS. En este trabajo se presentan evidencias experimentales de la participación del β -dístroglicano en la etiología de la HGPS.

Participación de la progerina en la deslocalización nucleolar del β -DG

Empleando cultivos primarios de fibroblastos HGPS como modelo de estudio, descubrimos que una proporción de estos fibroblastos presentan alteraciones en la expresión y la localización subcelular del β -dístroglicano. La localización de esta proteína se pierde de los nucléolos y sus niveles dentro del núcleo son menores comparados con los fibroblastos control (Figura 8 A). A pesar de esto, los niveles totales de la proteína son mayores en los fibroblastos HGPS (Figura 8 B) lo que

sugiere que su disminución nuclear no se debe a que existe menor cantidad de la proteína sino a su redistribución del núcleo hacia el citoplasma.

Cuando el cultivo de fibroblastos HGPS es tratado con el inhibidor de la farnesil transferasa (FTI), la droga es capaz de restablecer la morfología nuclear y de restablecer la localización nuclear/nucleolar del β -DG (Figura 9 B), lo que indica que se requiere que la progerina se farnesile y se acumule en la envoltura nuclear para que ocurra la exclusión nucleolar del β -DG. Mediante ensayos de inmunoprecipitación se demostró que la interacción que existe entre el β -DG y las láminas A/C en los fibroblastos normales cambia en los fibroblastos HGPS, ya que en estos últimos el β -DG se asocia preferencialmente con la progerina. Este resultado es similar al observado por otro grupo de trabajo, donde se demostró que SUN1, una proteína de la envoltura nuclear, interactúa preferencialmente con la progerina en los fibroblastos HGPS, evitándose de esa forma su interacción con la lámina A [32].

De manera interesante, la sobreexpresión de la progerina en células HeLa causa la pérdida de la localización nucleolar del β -DG, pero este fenómeno se presenta exclusivamente en las células que presentan un daño evidente de la envoltura nuclear (Figura 12). Esto indica que la ausencia nucleolar del β -DG se produce por una serie de eventos: primeramente la progerina requiere ser farnesilada para anclarse en la envoltura nuclear y una vez que se acumula ahí, comienza a causar daños en la arquitectura nuclear, lo que finalmente conduce a la exclusión nucleolar del β -DG.

Participación del β -DG en el estrés nucleolar

Un fenómeno que llamó nuestra atención fue que tanto en los fibroblastos HGPS como las células HeLa que sobreexpresan la progerina, pierden la localización nucleolar del β -DG y presentan nucléolos disgregados (Figuras 8 y 12), lo que implica que el β -DG participa en el estrés nucleolar. En apoyo a esta idea, al disminuir la expresión del β -DG en las células HeLa se encontró que la tinción de la proteína nucleolar B23 disminuye, el número de nucléolos aumenta y el volumen nucleolar disminuye (Figura 13). De esta forma, se demuestra que el β -DG está

implicado en la integridad de los nucléolos. En el caso de los fibroblastos HGPS, el daño de la envoltura nuclear causa la exclusión nucleolar del β -DG y como consecuencia sobreviene la disgregación de los nucléolos. Presumiblemente, esta desorganización nucleolar está relacionada con el arresto del ciclo celular y la inducción de la senescencia que ocurre en la HGPS (Figura 6).

Participación del transporte nuclear en la HGPS

El β -DG es una proteína que posee una secuencia de localización nuclear (NLS) en su región citoplasmática, esta secuencia es reconocida por las importinas $\alpha 2/\beta 1$ [63] para que la proteína sea transportada al interior del núcleo, una vez ahí, juega un papel importante en la estructura y la función de la envoltura nuclear [2]. Sin embargo, esta proteína también posee una secuencia de transporte nuclear (NES), la cual es reconocida por la exportina CRM1, para mediar el tráfico de la proteína desde el interior del núcleo hacia el citoplasma de la célula (Vélez-Aguilera G; Tesis de doctorado), donde es necesaria para regular procesos celulares como la adhesión y la remodelación del citoesqueleto [66, 67]. Es evidente que el balance entre los mecanismos de transporte e importación nuclear determina de manera precisa los niveles del β -DG que se requieren en cada compartimento celular, de acuerdo con las necesidades fisiológicas de la célula. Tomando en consideración que los fibroblastos HGPS no presentan tinción para el β -DG en los nucléolos, es posible que en estas células exista alguna desregulación en los mecanismos de importación y/o transporte nuclear. En este trabajo se demostró que el transporte nuclear se encuentra exacerbado en los fibroblastos HGPS. Al inhibir la función de la exportina CRM1 mediante el uso de la droga Leptomycin B (LMB) se observó que los niveles nucleares del β -DG aumentaron considerablemente en los fibroblastos HGPS y de manera sorprendente, este tratamiento restableció la localización del β -DG en los nucléolos y alivió el estrés nucleolar (Figura 14). Estos resultados indican que el transporte nuclear del β -DG no se encuentra afectado en los fibroblastos HGPS, ya que con el uso de la LMB la proteína se acumula en el núcleo y se localiza en el nucléolo para conferirle estabilidad. Se demostró que los fibroblastos HGPS poseen mayores niveles proteicos de la exportina CRM1 (Figura 15), lo que explica porque

el β -DG no permanece en los nucléolos, ya que es exportado rápidamente hacia el citoplasma por medio de esta exportina. Finalmente, mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta y la cuantificación de la relación de fluorescencia núcleo/citoplasma, determinamos que el transporte nuclear exacerbado no es específico para el β -DG sino que era una característica generalizada en los fibroblastos HGPS, ya que al analizar otras proteínas que poseen un transporte nuclear dependiente de CRM1, comprobamos que presentan una menor localización en el nuclear, en comparación con los fibroblastos normales (Figura 16).

El estrés nucleolar es una característica distintiva de la HGPS, pero también se presenta en el cáncer [68] y en diferentes padecimientos neurodegenerativos, incluyendo las enfermedades de Alzheimer [69], Parkinson [70, 71] y Huntington [72]. Sin embargo, hasta este trabajo no se conocían las bases moleculares que subyacen el estrés nucleolar en la HGPS, ni el impacto de este fenómeno sobre la enfermedad. Recientemente se han iniciado ensayos clínicos para tratar diferentes tipos de cáncer con análogos de la LMB, ya que las células cancerosas presentan un transporte nuclear aumentado de diversos factores anti-oncogénicos [73-75]. Un ejemplo es el fármaco KPT 330, el cual se ha empleado como terapia para atacar leucemias y tumores sólidos [75-77]. Tomando en cuenta lo anterior, los inhibidores de CRM1 podrían ser utilizados como una alternativa terapéutica para aliviar el estrés nucleolar de la HGPS, a través de la recuperación de la localización nucleolar del β -DG. Consideramos que los hallazgos obtenidos en este trabajo ayudarán a reorientar el paradigma de estudio y tratamiento de la HGPS y de otras patologías asociadas con el estrés nucleolar (Figura 17).

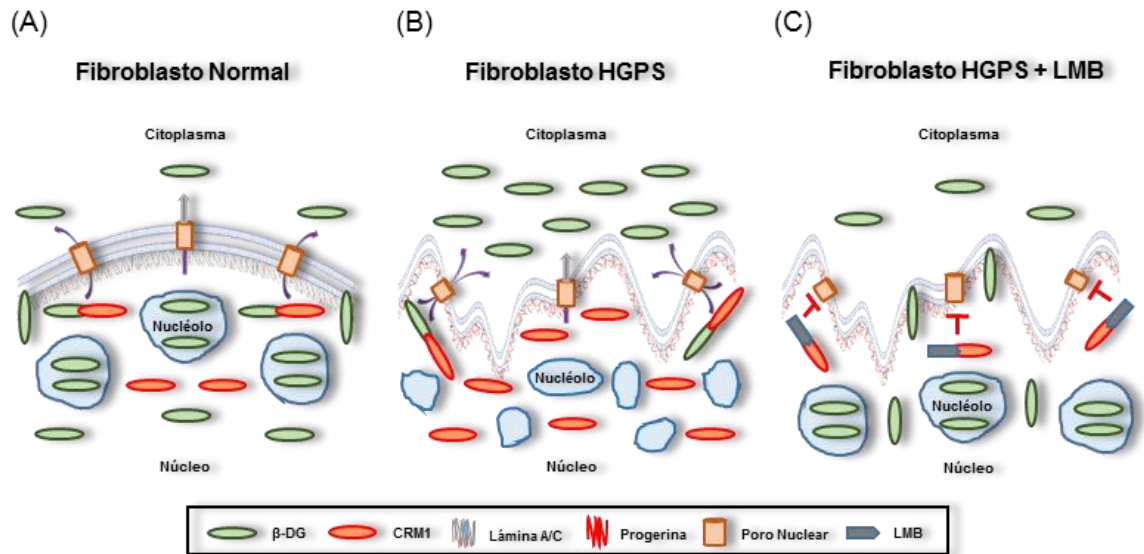


Figura 17. Esquema de los mecanismos moleculares del estrés nucleolar en la HGPS. (A) El β -DG se localiza en el nucleoplasma y los nucléolos, y una fracción de la proteína se exporta hacia el citoplasma a través del poro nuclear, mediante la acción de la exportina CRM1. (B) La progerina induce la sobreexpresión de la exportina CRM1, lo que conlleva a un transporte nuclear exacerbado del β -DG. La deficiencia nuclear/nucleolar del β -DG ocasiona la disgregación de los nucléolos. (C) La inhibición del transporte nuclear, mediante tratamiento con LMB, inhibidor específico de la exportina CRM1, restablece la localización nuclear/nucleolar del β -DG y restituye la estructura de los nucléolos.

CONCLUSIONES

- La localización nuclear/nucleolar y los niveles del β -DG están alterados en los fibroblastos HGPS.
- El β -DG interacciona preferencialmente con la progerina en los fibroblastos HGPS.
- La ausencia nucleolar del β -DG se debe al daño en la envoltura nuclear producido por la progerina.
- El β -DG está implicado en el mantenimiento de la integridad de los nucléolos y la morfología nuclear.
- La exclusión del β -DG de los nucléolos de los fibroblastos HGPS se debe a su exporte nuclear exacerbado.
- Los fibroblastos HGPS presentan un exporte nuclear exacerbado debido a la sobreexpresión de CRM1.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mehta, I.S., J.M. Bridger, and I.R. Kill, *Progeria, the nucleolus and farnesyltransferase inhibitors*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(Pt 1): p. 287-91.
2. Martinez-Vieyra, I.A., et al., *A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(3): p. 698-711.
3. Scotti, M.M. and M.S. Swanson, *RNA mis-splicing in disease*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(1): p. 19-32.
4. Boulon, S., et al., *The nucleolus under stress*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 216-27.
5. Capell, B.C. and F.S. Collins, *Human laminopathies: nuclei gone genetically awry*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(12): p. 940-52.
6. Kudlow, B.A., B.K. Kennedy, and R.J. Monnat, Jr., *Werner and Hutchinson-Gilford progeria syndromes: mechanistic basis of human progeroid diseases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(5): p. 394-404.
7. Sarkar, P.K. and R.A. Shinton, *Hutchinson-Guilford progeria syndrome*. Postgraduate Medical Journal, 2001. **77**(907): p. 312-317.
8. Cabanillas, R., et al., *Nestor-Guillermo progeria syndrome: a novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations*. Am J Med Genet A, 2011. **155a**(11): p. 2617-25.
9. Hennekam, R.C., *Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(23): p. 2603-24.
10. Gordon, L.B., et al., *Progeria: a paradigm for translational medicine*. Cell, 2014. **156**(3): p. 400-7.
11. Jung, H.J., et al., *Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(7): p. E423-31.
12. Merideth, M.A., et al., *Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. N Engl J Med, 2008. **358**(6): p. 592-604.
13. Reunert, J., et al., *Neonatal progeria: increased ratio of progerin to lamin A leads to progeria of the newborn*. Eur J Hum Genet, 2012. **20**(9): p. 933-7.
14. Eriksson, M., et al., *Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 293-8.
15. Dechat, T., et al., *Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin*. Genes Dev, 2008. **22**(7): p. 832-53.
16. Lin, F. and H.J. Worman, *Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C*. J Biol Chem, 1993. **268**(22): p. 16321-6.
17. Burke, B. and C.L. Stewart, *The nuclear lamins: flexibility in function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(1): p. 13-24.
18. Dechat, T., et al., *Nuclear lamins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(11): p. a000547.
19. Gonzalez, J.M., et al., *Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope*. J Cell Biol, 2008. **183**(4): p. 653-66.
20. Wilson, K.L. and R. Foisner, *Lamin-binding Proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(4): p. a000554.
21. Vaughan, A., et al., *Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 14): p. 2577-90.
22. Rodriguez, J., et al., *ERK1/2 MAP kinases promote cell cycle entry by rapid, kinase-independent disruption of retinoblastoma-lamin A complexes*. J Cell Biol, 2010. **191**(5): p. 967-79.

23. Bronshtein, I., et al., *Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8044.
24. Gotzmann, J. and R. Foissner, *Lamins and lamin-binding proteins in functional chromatin organization*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1999. **9**(3-4): p. 257-65.
25. Barrowman, J., et al., *Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CaaX processing compartment*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(12): p. 5398-408.
26. Lutz, R.J., et al., *Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 3000-4.
27. Goldman, R.D., et al., *Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 8963-8.
28. Reddel, C.J. and A.S. Weiss, *Lamin A expression levels are unperturbed at the normal and mutant alleles but display partial splice site selection in Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. J Med Genet, 2004. **41**(9): p. 715-7.
29. Coutinho, H.D., et al., *Molecular ageing in progeroid syndromes: Hutchinson-Gilford progeria syndrome as a model*. Immun Ageing, 2009. **6**: p. 4.
30. McClintock, D., L.B. Gordon, and K. Djabali, *Hutchinson-Gilford progeria mutant lamin A primarily targets human vascular cells as detected by an anti-Lamin A G608G antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2154-9.
31. Olive, M., et al., *Cardiovascular pathology in Hutchinson-Gilford progeria: correlation with the vascular pathology of aging*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(11): p. 2301-9.
32. Chen, Z.J., et al., *Dysregulated interactions between lamin A and SUN1 induce abnormalities in the nuclear envelope and endoplasmic reticulum in progeric laminopathies*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 8): p. 1792-804.
33. Shumaker, D.K., et al., *Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(23): p. 8703-8.
34. Liu, B., et al., *Genomic instability in laminopathy-based premature aging*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 780-5.
35. Kar, B., et al., *Quantitative nucleolar proteomics reveals nuclear re-organization during stress-induced senescence in mouse fibroblast*. BMC Cell Biol, 2011. **12**: p. 33.
36. Varela, I., et al., *Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 564-8.
37. Olson, M.O., *Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus?* Sci STKE, 2004. **2004**(224): p. pe10.
38. James, A., et al., *Nucleolar stress with and without p53*. Nucleus, 2014. **5**(5): p. 402-26.
39. Holmberg Olausson, K., M. Nister, and M.S. Lindstrom, *p53 -Dependent and -Independent Nucleolar Stress Responses*. Cells, 2012. **1**(4): p. 774-98.
40. Korgaonkar, C., et al., *Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(4): p. 1258-71.
41. Bhatia-Dey, N., et al., *Cellular Senescence as the Causal Nexus of Aging*. Front Genet, 2016. **7**: p. 13.
42. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
43. Mehta, I.S., et al., *Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 250-63.

44. Munoz-Espin, D. and M. Serrano, *Cellular senescence: from physiology to pathology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(7): p. 482-496.
45. Bemiller, P.M. and L.H. Lee, *Nucleolar changes in senescing WI-38 cells*. Mech Ageing Dev, 1978. **8**(6): p. 417-27.
46. Richards, S.A., et al., *The accumulation of un-repairable DNA damage in laminopathy progeria fibroblasts is caused by ROS generation and is prevented by treatment with N-acetyl cysteine*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(20): p. 3997-4004.
47. Huang, S., et al., *Accelerated telomere shortening and replicative senescence in human fibroblasts overexpressing mutant and wild-type lamin A*. Exp Cell Res, 2008. **314**(1): p. 82-91.
48. Ghosh, S., et al., *Lamin A Is an Endogenous SIRT6 Activator and Promotes SIRT6-Mediated DNA Repair*. Cell Rep, 2015. **13**(7): p. 1396-406.
49. Endisha, H., et al., *Restoring SIRT6 Expression in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Cells Impedes Premature Senescence and Formation of Dysmorphic Nuclei*. Pathobiology, 2015. **82**(1): p. 9-20.
50. Berndt, N., A.D. Hamilton, and S.M. Sebti, *Targeting protein prenylation for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(11): p. 775-91.
51. Capell, B.C., et al., *Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(36): p. 12879-84.
52. Wang, Y., C. Ostlund, and H.J. Worman, *Blocking protein farnesylation improves nuclear shape abnormalities in keratinocytes of mice expressing the prelamin A variant in Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Nucleus, 2010. **1**(5): p. 432-9.
53. Yang, S.H., et al., *Treatment with a farnesyltransferase inhibitor improves survival in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(1-2): p. 36-9.
54. Gordon, L.B., et al., *Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(41): p. 16666-16671.
55. Gordon, L.B., et al., *Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Circulation, 2014. **130**(1): p. 27-34.
56. Varela, I., et al., *Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging*. Nat Med, 2008. **14**(7): p. 767-72.
57. Graziotto, J.J., et al., *Rapamycin activates autophagy in Hutchinson-Gilford progeria syndrome: implications for normal aging and age-dependent neurodegenerative disorders*. Autophagy, 2012. **8**(1): p. 147-51.
58. Cao, K., et al., *Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells*. Sci Transl Med, 2011. **3**(89): p. 89ra58.
59. Smallwood, D.T. and S. Shackleton, *Lamin A-linked progerias: is farnesylation the be all and end all?* Biochem Soc Trans, 2010. **38**(Pt 1): p. 281-6.
60. Philip, J.T. and K.N. Dahl, *Nuclear mechanotransduction: response of the lamina to extracellular stress with implications in aging*. J Biomech, 2008. **41**(15): p. 3164-70.
61. Benson, E.K., S.W. Lee, and S.A. Aaronson, *Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 15): p. 2605-12.
62. Ibraghimov-Beskrovnya, O., et al., *Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix*. Nature, 1992. **355**(6362): p. 696-702.

63. Lara-Chacon, B., et al., *Characterization of an Importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan*. J Cell Biochem, 2010. **110**(3): p. 706-17.
64. Lopez-Otin, C., et al., *The hallmarks of aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-217.
65. Ghosh, S. and Z. Zhou, *Genetics of aging, progeria and lamin disorders*. Curr Opin Genet Dev, 2014. **26**: p. 41-6.
66. Spence, H.J., et al., *Ezrin-dependent regulation of the actin cytoskeleton by beta-dystroglycan*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(15): p. 1657-68.
67. Thompson, O., et al., *Dystroglycan, Tks5 and Src mediated assembly of podosomes in myoblasts*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3638.
68. Woods, S.J., et al., *The nucleolus as a fundamental regulator of the p53 response and a new target for cancer therapy*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1849**(7): p. 821-9.
69. Pietrzak, M., et al., *Epigenetic silencing of nucleolar rRNA genes in Alzheimer's disease*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22585.
70. Rieker, C., et al., *Nucleolar disruption in dopaminergic neurons leads to oxidative damage and parkinsonism through repression of mammalian target of rapamycin signaling*. J Neurosci, 2011. **31**(2): p. 453-60.
71. Parlato, R. and B. Liss, *How Parkinson's disease meets nucleolar stress*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(6): p. 791-7.
72. Tsoi, H. and H.Y. Chan, *Expression of expanded CAG transcripts triggers nucleolar stress in Huntington's disease*. Cerebellum, 2013. **12**(3): p. 310-2.
73. Ishizawa, J., et al., *Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein*. Pharmacol Ther, 2015. **153**: p. 25-35.
74. Ranganathan, P., et al., *Preclinical activity of a novel CRM1 inhibitor in acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **120**(9): p. 1765-73.
75. Garzon, R., et al., *Phase I Trial of Selinexor (KPT-330), A First-In-Class Oral Selective Inhibitor Of Nuclear Export (SINE) In Patients (pts) With Advanced Acute Myelogenous Leukemia (AML)*. Blood, 2013. **122**(21): p. 1440-1440.
76. Etchin, J., et al., *KPT-330 inhibitor of CRM1 (XPO1)-mediated nuclear export has selective anti-leukaemic activity in preclinical models of T-cell acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2013. **161**(1): p. 117-27.
77. Abdul Razak, A.R., et al., *First-in-Class, First-in-Human Phase I Study of Selinexor, a Selective Inhibitor of Nuclear Export, in Patients With Advanced Solid Tumors*. J Clin Oncol, 2016.