



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

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

La participación del β -dístroglicano en la senescencia celular

TESIS

que presenta:

M. en C. Guadalupe Elizabeth Jiménez Gutiérrez

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias

En la especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis

Doctor Bulmaro Cisneros Vega

México, CDMX

Junio, 2020

Agradecimientos:

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 12 del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV unidad Zacatenco, bajo la dirección del Doctor Bulmaro Cisneros Vega y fue posible gracias al apoyo de CONACYT, el cual se encargó del financiamiento a través del otorgamiento de la beca con número 442402.

Agradezco profundamente al Doctor Bulmaro Cisneros Vega por su paciencia, su apoyo, su guía, sus consejos y por permitirme formar parte de su grupo de trabajo. También por ser el mejor jefe del mundoooo.

Agradezco a mis asesores por todas las ocasiones en las que estuvieron presentes en mis seminarios con sus aportaciones invaluable que hicieron realidad la publicación de mi trabajo de doctorado.

ÍNDICE

1. Resumen/Summary	4
2. Lista de abreviaciones	6
3. Introducción	7
1.1 El Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPCs)	7
1.2 El Distroglicano	8
1.2.1 El α - Distroglicano.....	9
1.2.2 El β -Distroglicano.....	9
1.3 Funciones del β -Distroglicano	10
1.4 La envoltura nuclear	11
1.5 Los nucléolos.....	15
1.6 La senescencia celular	16
1.7 Biomarcadores de senescencia	17
4. Antecedentes	19
5. Justificación	21
6. Hipótesis	21
7. Objetivo general	21
8. Objetivos específicos	21
9. Estrategia experimental	22
10. Metodología	23
11. Resultados	31
12. Discusión	52
13. Conclusiones	55
14. Bibliografía	56

1. RESUMEN

El β -distinglicano (β -DG) está involucrado en el mantenimiento de la arquitectura y función nuclear. No obstante, su relevancia en los procesos nucleares está aún por determinarse. En este trabajo generamos un modelo DG-nulo a partir de la línea celular C2C12 usando la tecnología de CRISPR-Cas9, para proporcionar nueva información de la función del β -DG en los procesos nucleares. Las células nulas para DG mostraron una disminución en los niveles de lámina B1, por lo que decidimos elucidar la contribución del DG en la senescencia celular, debido al papel central de lámina B1 en este fenotipo. Sorpresivamente, la pérdida de DG provoca que las células C2C12 adquieran características de células senescentes que incluyen el arresto del ciclo celular, el incremento de la actividad de la actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia, la pérdida de heterocromatina, la morfología nuclear aberrante y alteración nucleolar. Nosotros demostramos que la inestabilidad genómica, la activación de la vía de respuesta de daño en el DNA asociada con la falla mitótica, el acortamiento telomérico y la sobre regulación de p53/p21 son causa del fenotipo senescente en las células nulas para DG. Todos estos eventos pueden ultimadamente generar senescencia prematura, lo cual puede impedir la replicación del genoma dañado. En resumen, nosotros presentamos evidencia que apoya el papel del DG en la protección contra la senescencia, a través del mantenimiento de la expresión/localización de la lámina B1 y la adecuada organización del huso mitótico.

Abstract:

Nuclear β -dystroglycan (β -DG) is involved in the maintenance of nuclear architecture and function. Nonetheless, its relevance in defined nuclear processes remains to be determined. In this study we generated a C2C12 cell-based DG-null model using CRISPR-Cas9 technology, to provide insights into the role of β -DG on nuclear processes. Since DG-null cells exhibited decreased levels of lamin B1, we aimed to elucidate the contribution of DG to senescence, owing to the central role of lamin B1 in this pathway. Remarkably the lack of DG enables C2C12 cells to acquire senescent features, including, cell-cycle arrest, increased senescence-associated- β -galactosidase activity, heterochromatin loss, aberrant nuclear morphology and nucleolar disruption. We demonstrated that genomic instability is one driving cause of the senescent phenotype in DG-null cells via the activation of a DNA-damage response associated with mitotic failure, as shown by the presence of multipolar mitotic spindles, which in turn induced the formation of micronuclei and γ H2AX foci (DNA-damage marker), telomere shortening and p53/p21 upregulation. Altogether these events might ultimately lead to premature senescence, to impede replication of damaged genome. In summary, we present evidence supporting a role for DG in protecting against senescence, through the maintenance of proper lamin B1 expression/localization and proper mitotic spindle organization.

2. LISTA DE ABREVIACIONES

DAPC	Complejo de proteínas asociadas a distrofina
DG	Distroglicano
ICD	Dominio intracelular
NPC	Complejos del poro nuclear
NE	Envoltura nuclear
INM	Membrana nuclear interna
ONM	Membrana nuclear externa
SA- β gal	Beta galactosidasa asociada a senescencia
LB1	Lámina B1
gRNA	RNA guía
DG-KO	Células nulas para distroglicano
WT	Células silvestres
NaBu	Butirato de sodio
SSC	Solución salina de citratos
Q-FISH	Hibridación in situ cuantitativa acoplada a fluorescencia
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia

3. INTRODUCCIÓN:

El complejo de Proteínas Asociados a Distrofina (DAPC)

El músculo esquelético es un tejido dinámico que resiste una gran tensión mecánica durante cada contracción muscular. El sarcolema mantiene su integridad gracias al Complejo de Proteínas Asociadas o Distrofina [DAPC, por sus siglas en inglés] el cual contiene dominios de membrana claves para la unión de la matriz extracelular con el citoesqueleto, participando en cadenas de señalización (Gumerson and Michele 2011) (Deyst, Bowe et al. 1995).

El DAPC está compuesto por diferentes proteínas transmembranales (distroglicanos y sarcoglicanos) y proteínas citoplásmicas (distrobrevinas, sintrofinas y sarcospanos), las cuales son abundantes en el sarcolema (**Figura 1**) (Gumerson and Michele 2011).

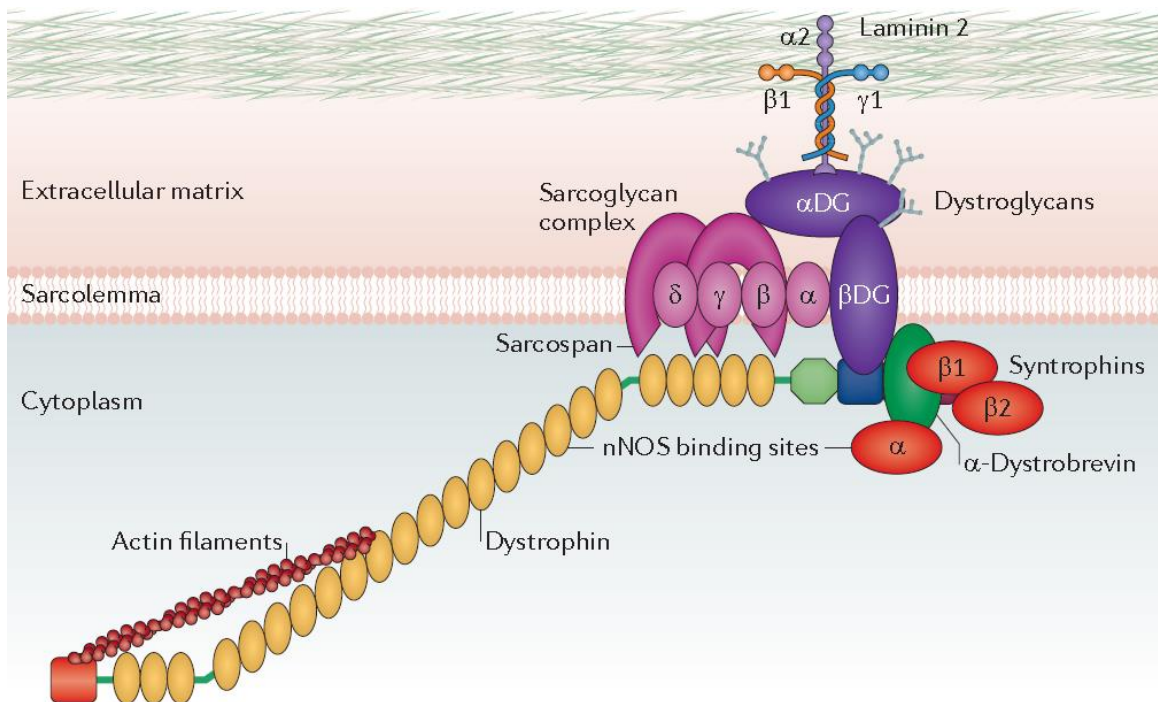


Figura 1. Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC) (Fairclough, Wood et al. 2013)

El Distroglicano

El Distroglicano (DG) es un péptido de 97 KDa que se expresa en una gran diversidad de tipos celulares y es un componente esencial del DAPC (Henry and Campbell 1996, Brown, Torelli et al. 2004). El DG es un receptor extracelular que presenta glicosilaciones, las cuales son indispensables para su función (Barresi and Campbell 2006). La pérdida de la funcionalidad del DG ocasiona diferentes distrofias musculares y se piensa que está implicada en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Batchelor, Higginson et al. 2007). La estructura del DG esta conservada entre diferentes especies de mamíferos y especies inferiores de vertebrados, lo que sugiere que se ha mantenido a lo largo de la evolución (Bozzi, Morlacchi et al. 2009).

El gen DAG1 codifica para el DG, su secuencia codificante está organizada en dos exones separados por un intrón, se localiza en el cromosoma 3p21 del humano y genera un transcrito de 5.8 Kb. Este transcrito da lugar a una proteína precursora que posteriormente por medio de un corte post-traducciona en la serina 654, por las metaloproteasas MMP2 y MMP9, origina dos subunidades, α y β , las cuales se asocian entre si de una manera no covalente (**Figura 2**) (Ibraghimov-Beskrovnya, Ervasti et al. 1992), (Jayasinha, Nguyen et al. 2003).

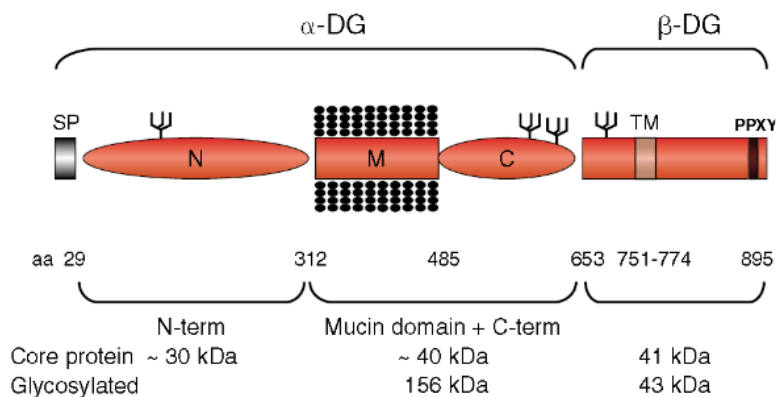


Figura 2. Estructura del Distroglicano, imagen adaptada de (Barresi and Campbell 2006)

El α -Distroglicano

La subunidad α tiene un peso que oscila entre 100 a 200 KDa y se localiza en la parte externa de la membrana plasmática. El α -DG contiene un dominio central parecido a la mucina que está glicosilado y que conecta su dominio N-terminal con el dominio C-terminal del β -DG (Ibraghimov-Beskrovnaya, Ervasti et al. 1992). El α -DG se une con proteínas extracelulares, incluyendo la laminina, la agrina y el perlecano. Se ha demostrado que la glicosilación del α -DG es necesaria para mantener estas interacciones (Barresi and Campbell 2006). La variabilidad en el peso molecular del α -DG se debe al tipo de tejido donde se expresa y a las O-glicosilaciones presentes en el dominio tipo mucina (Barresi and Campbell 2006).

El β -Distroglicano

El β -distroglicano (β -DG) tiene un peso de 43 kDa y es una proteína transmembranal que por medio de su dominio citosólico se ancla a la actina a través de su interacción con la distrofina (Ibraghimov-Beskrovnaya, Ervasti et al. 1992, Muntoni 2004). Un corte posterior por la γ -secretasa y en coordinación con la activación de la vía de NOTCH, origina el dominio intracelular (ICD, por sus siglas en inglés) de 26 kDa que viaja al nucléolo y participa en la respuesta celular al estrés nucleolar, a través de su interacción con UBF (Upstream Binding Factor, por sus siglas en inglés) (Daniel Leocadio 2016) (Azuara-Medina, Sandoval-Duarte et al. 2019).

El β -DG consta de un dominio N-terminal que contiene sitios para N-glicosilación, un dominio transmembranal y un dominio C-terminal citoplásmico de 121 aminoácidos ricos en prolina. Esta última región contiene la secuencia PPXY, por medio de la cual el β -DG se une al dominio WW de la distrofina (Ibraghimov-Beskrovnaya, Ervasti et al. 1992).

Las funciones del β -DG:

El β -DG presenta una amplia gama de funciones en los mamíferos, las cuales se mencionan a continuación:

- *Señalización celular:*

El DG es un receptor de adhesión que conecta la matriz extracelular con el citoesqueleto. El β -DG se fosforila en la tirosina 892 por cinasas de la familia Src. La fosforilación regula la interacción del β -DG con moléculas de señalización, incluyendo la Proteína Cinasa Activada por Mitógenos 2 (MEK2) y la Cinasa Reguladora de Señales Extracelulares (ERK). El β -DG funciona por lo tanto como andamio molecular para regular la vía de señalización de las MAP cinasas, incluyendo las proteínas MERK y ERK. La fosforilación de la tirosina 892 del β -DG regula también su interacción con la distrofina y la caveolina-3 (Spence, Dhillon et al. 2004).

- *Adhesión celular:*

La fosforilación de la tirosina 892 del β -DG permite su interacción con integrinas y con la proteína de adhesión Tks5; a través de estas interacciones el β -DG regula la formación de estructuras de adhesión focal y podosomas (Moore and Winder 2010).

- *Remodelación del citoesqueleto:*

La formación de estructuras ricas en actina, como las fibras de estrés y los filopodios, es crucial para la adhesión, movimiento, morfología y polaridad celular. Se ha demostrado que la ezrina interacciona con el dominio citoplásmico del β -DG para controlar la remodelamiento del citoesqueleto (Batchelor, Higginson et al. 2007).

- *El β -DG en el núcleo:*

Se ha descrito la presencia del β -DG en el núcleo de diversas líneas celulares, lo cual sugiere nuevas funciones para esta proteína (Gonzalez-Ramirez, Morales-

Lazaro et al. 2008). El β -DG interacciona con proteínas de la envoltura nuclear, incluyendo la emerina y las láminas A/C y B1, y con proteínas de los cuerpos de Cajal (p80-coilina) y del nucleolo (Nopp140). De manera interesante, se demostró que una disminución de la expresión del β DG provoca la deslocalización y disminución del nivel de la emerina y la lámina B1, así como una desorganización de los nucleolos y los cuerpos de Cajal y cuerpos (Martinez-Vieyra, Vasquez-Limeta et al. 2013). Estos resultados indican que el β -DG controla la estructura y función del núcleo.

- *El β -DG en el nucléolo:*

Recientemente se demostró que el ICD del β -DG se genera en respuesta a diferentes tipos de estrés, como la irradiación con UV, la acidosis y el estrés oxidativo. El ICD se transporta al nucléolo donde reprime la expresión del RNA ribosomal, mediante su interacción con UBF (Azuara-Medina, Sandoval-Duarte et al. 2019).

La envoltura nuclear

Diversas funciones celulares, incluyendo la transcripción y la traducción requieren el tránsito de macromoléculas entre el citoplasma y el núcleo, este tránsito ocurre a través de canales de proteínas conocidos como complejos del poro nuclear (NPC), presentes en la envoltura nuclear (NE) (Wagstaff and Jans 2009). La NE es una extensión especializada del retículo endoplásmico (RE) que funciona como un filtro selectivo para el paso de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma, proporcionando un microambiente especializado en el núcleo. La NE permite la conexión entre el citoesqueleto y el interior del núcleo. Está compuesta por la membrana interna (INM) y la membrana nuclear externa (ONM), las cuales están separadas por un espacio perinuclear; (**Figura 3**). La INM contiene proteínas membranales que se asocian con las láminas nucleares (Mattaj 2004).

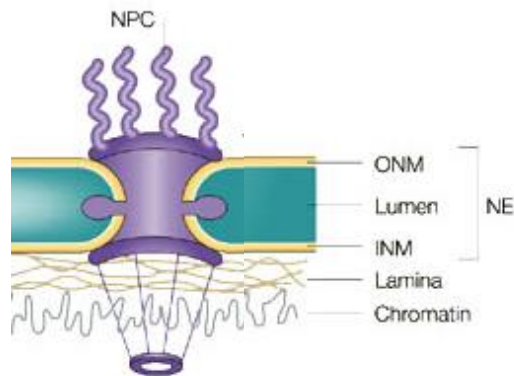


Figura 3. Estructura de la envoltura nuclear, imagen adaptada de (Mataj 2004)

La lámina nuclear esta compuesta por las láminas de tipo A y B. Los vertebrados tienen 3 genes que codifican para las 7 isoformas de las láminas nucleares (*LMNA*, *LMNB1* y *LMNB2*) (**Figura 4**). Las láminas son filamentos intermedios tipo V que conforman una red filamentosa por debajo de la INM. Poseen un dominio central tipo α -hélice, un dominio N-terminal globular y un dominio C-terminal. Las láminas varían entre si en estructura primaria, propiedades bioquímicas y patrones de expresión (Vaughan, Alvarez-Reyes et al. 2001).

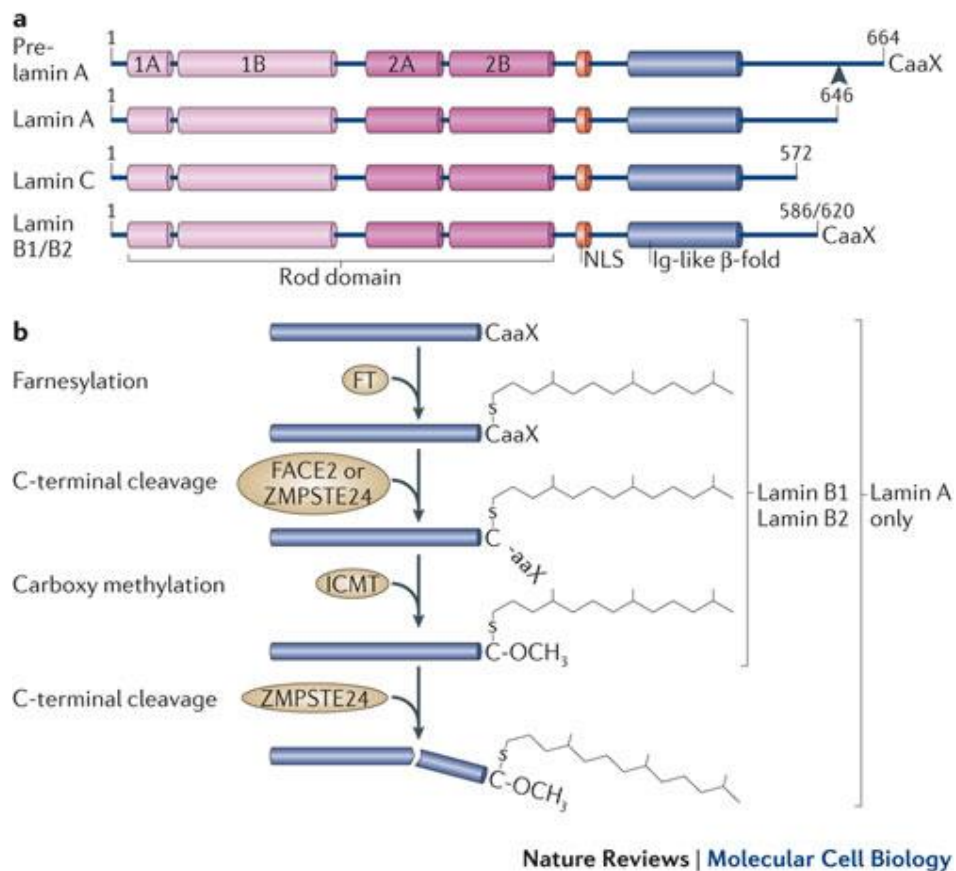


Figura 4. Estructura y procesamiento de las láminas tipo A y tipo B (Burke and Stewart 2013).

Las láminas de tipo A, codificadas por el gen *LMNA*, son el mayor componente de la lámina nuclear en las células animales. Proporcionan soporte mecánico a la envoltura nuclear. La lámina A participa además en la organización de la cromatina, la transcripción y la apoptosis (Dechat, Vlcek et al. 2000) (Ranade, Pradhan et al. 2019). La expresión de las láminas de tipo A se regulan a través del desarrollo, su expresión comienza a la mitad del desarrollo embrionario y están presentes en la mayoría de las células diferenciadas. La lámina A contiene una señal de localización nuclear (NLS) que se sitúa entre los dominios central y C-terminal. Contiene además la secuencia CaaX (C, cisteína; a, aminoácido alifático; X, cualquier otro

aminoácido) en su dominio C-terminal (cisteína-serina-isoleucina-metionina). El procesamiento de la secuencia CaaX es esencial para que madure la lamina A. Así, la cisteína de la secuencia CaaX se farnesila, posteriormente se carboximetila. En el último paso de maduración, los últimos 15 aminoácidos del extremo C-terminal, incluyendo la cisteína farnesilada, son escindidos por la enzima ZMPSTE24, para permitir así el acomodo correcto de la lámina A en la parte interna de la NE.

Las láminas de tipo B son producto de dos genes distintos. La lámina B1 (LB1; 64 kDa) es codificada en humanos por el gen *LMNB1*, el cual se localiza en el cromosoma 5q23.3. Las láminas B2 y B3 son productos del gen *LMNB2*, que está localizado en el cromosoma 19p13.3. Las láminas de tipo B contienen una cisteína prenilada en su extremo C-terminal, importante para su anclaje a la membrana nuclear interna. Las láminas de tipo A y B forman redes por separado pero también pueden interactuar entre sí (Adam, Butin-Israeli et al. 2013) (Hutchison 2014).

Las láminas B se expresan constitutivamente a través del desarrollo y cada célula expresa por lo menos un tipo de lámina B, lo que sugiere que son esenciales para la supervivencia celular. La lámina B1 controla la morfología nuclear y la condensación de los cromosomas durante la interfase; regula también la migración neuronal durante el desarrollo del cerebro (Camps, Erdos et al. 2015) y la función y estructura del nucleolo, esto último por medio de su interacción con B23 (Martin, Chen et al. 2009).

Por otra parte, la LB1 mantiene la proliferación celular y de forma notable, su expresión disminuye drásticamente cuando las células se vuelven senescentes. La disminución del nivel de la lámina B1 ocasiona un retraso en la fase S del ciclo celular, debido a un aplazamiento del proceso en las asas de replicación del DNA; por esta razón se cree que la LB1 está involucrada en la reparación de daño al DNA (Liu, Sun et al. 2015) (Butin-Israeli, Adam et al. 2015).

La inducción de la senescencia prematura ligada a la pérdida de LB1 requiere la acción de las vías de señalización de Rb y de p53. Se sabe que la vía de señalización de p53 se activa con el silenciamiento de la expresión de la LB1 y

consecuentemente se activa la expresión de genes blanco de p53, por ejemplo p21 (Shimi, Butin-Israeli et al. 2011, Freund, Laberge et al. 2012).

La cromatina interacciona con la lámina B1 a través de sus dominios de asociación con la lámina (LADs), y de esta manera la primera regula la expresión de genes.

Los nucléolos

Los nucléolos son las estructuras más prominentes del núcleo de las células eucariotas, cuya morfología refleja el estado de actividad o de diferenciación de las células. El nucléolo carece de membrana y tiene alto contenido de RNA. A pesar de su densidad, el nucléolo es un compartimento muy dinámico, su contenido proteico cambia constantemente debido al movimiento de proteínas entre el nucléolo y el nucleoplasma. Los nucléolos son la maquinaria de producción del RNA ribosomal y son necesarios por lo tanto para la biogénesis ribosomal. Están organizados en los siguientes compartimentos; centros fibrilares (FC), componente fibrilar denso (DFC) y componente granular (GC). La transcripción de los repetidos de rDNA ocurre en el límite entre el FC y el DCF, y la mayoría de las subunidades de la RNA polimerasa I (RNA pol I) se ubica en la región de los FC. El ensamble de las subunidades ribosomales se completa en el GC, donde los rRNA nucleolares codificados se ensamblan con proteínas ribosomales. De manera reciente, los nucléolos se han implicado en otras funciones celulares, incluyendo mitosis, ciclo celular y respuesta al estrés. (The Nucleolus, Mark O. J. Olson, 2011).

Los nucléolos son considerados como sensores de estrés celular, debido a que regulan la actividad de la enzima ubiquitina ligasa de tipo E3 denominada HDM2; esta a su vez regula negativamente a p53, proteína clave en la respuesta celular al estrés (Boisvert, van Koningsbruggen et al. 2007). Bajo condiciones normales, p53 tiene una vida media corta, pero ante un estrés (daño al DNA, choque térmico, hipoxia, etc.) se estabiliza y dispara una cascada de eventos moleculares que conllevan al arresto del ciclo celular, a la senescencia celular o la apoptosis. La estabilidad de p53 en humanos se regula por HDM2 y p14ARF. La proteína HDM2 induce la degradación de p53 por el proteosoma. Por otra parte, diversos estímulos,

incluyendo vías de estrés y señalización oncogénica, incrementan la expresión de p14ARF, inactiva y secuestra a HDM2 en el nucleolo, de esta manera inhibe la ubiquitinación y posterior degradación de p53. p14ARF es una proteína nucleolar que se regula positivamente ante fallas en el procesamiento de los precursores ribosomales 47S, 45S y 32S, (Boisvert, van Koningsbruggen et al. 2007). Por otra parte, la proteína nucleolar B23 interacciona con p14ARF, inhibiendo así la acción de esta última sobre p53 (Lindström and Zhang 2006).

La senescencia celular

La senescencia se define como el arresto permanente del ciclo celular en respuesta a una condición de estrés que compromete la estabilidad genómica de la célula. Una de las características principales de la senescencia es la pérdida de la proliferación, sin embargo, las células permanecen viables y metabólicamente activas. (Kuilman, Michaloglou et al. 2010).

Se han descrito dos mecanismos que inducen la senescencia celular. El primer mecanismo es la senescencia replicativa, que se observó inicialmente en los cultivos primarios de fibroblastos humanos, con un número finito de divisiones. Esta observación se relaciona con la teoría propuesta por Hayflick, quien señaló que el número de veces que las células pueden dividirse es finito debido al proceso de envejecimiento o senescencia. La senescencia replicativa se ocasiona por el desgaste de los telómeros, debido a que la enzima denominada telomerasa pierde eficiencia para completar la replicación de los extremos de los cromosomas. Cuando se llega a un acortamiento crítico de los telómeros, se produce una respuesta de daño al DNA (DDR), que se caracteriza por la aparición de la forma fosforilada de la histona H2AX (YH2AX). Después de la señal de DDR, se activan las cinasas CHK1 y CHK2 que junto con p53 provocan el arresto al ciclo celular. (Kuilman, Michaloglou et al. 2010).

El otro tipo de senescencia conocida como senescencia prematura se origina por diferentes tipos de estrés celular, incluyendo la falta de nutrientes, la radiación

ionizante o con luz UV, los cambios epigenéticos, el estrés oxidativo y la activación de oncogenes, entre otros (McHugh and Gil 2018). En la senescencia inducida por oncogenes (OIS) participan las proteínas p53, p16^{INKA4} y RB. En las células humanas, p16^{INKA4} parece tener un papel más importante que p53 ya que algunas células dependen únicamente de la acción de p16^{INKA4} para volverse senescentes en respuesta a oncogenes. La pérdida de la expresión de los oncogenes puede también ocasionar senescencia. Por ejemplo, el incremento en la actividad de RAS seguida de la pérdida de NF1 desencadena senescencia (Dulic 2013).

Biomarcadores de senescencia

Las células senescentes poseen características distintivas que permiten su identificación (Carnero 2013). A continuación, se mencionan algunas de estas características.

- *Cambios morfológicos.* Las células senescentes son alargadas y aplanadas, y comúnmente multinucleadas.
- *Arresto en la fase G0/G1.* Las células senescentes están permanentemente arrestadas en la fase G0/G1, por lo tanto, muestran un nivel elevado de inhibidores del ciclo celular.
- *Alteración lisosomal-vacuolar.* Los desechos celulares que resisten la degradación en la senescencia inducida por estrés, se acumulan en las vacuolas lisosomales. Las alteraciones en el reciclaje lisosomal genera daño en las mitocondrias y especies reactivas de oxígeno.
- *Actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia.* Esta enzima se detecta mediante histoquímica empleando su sustrato artificial, X-gal. La actividad de SA- β -gal se eleva en las células senescentes.
- *Alteración en la metilación del DNA.* El estado de metilación influye en la expresión génica y la organización de la cromatina. La metilación del DNA disminuye en las células senescentes.

- *Focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF)*: La senescencia conlleva la generación y acumulación de distintas estructuras de cromatina. La formación de SAHF coincide con el reclutamiento de proteínas heterocromáticas y del supresor de tumores pRB, que se requiere para silenciar a promotores de genes con cajas E2F. La formación de SAHF y la represión de promotores depende de la integridad de la vía de pRB.
- *Estrés oxidativo*. El estrés oxidativo es el resultado de la respuesta de daño al DNA.
- *Daño al DNA*: En la senescencia replicativa se desencadena por el acortamiento telomérico. Entre los marcadores de daño al DNA se encuentra la histona H2AX fosforilada (YH2AX).

4. ANTECEDENTES

Previamente se describió la presencia del β -DG en el núcleo de diferentes líneas celulares (Gonzalez-Ramirez, Morales-Lazaro et al. 2008). El mecanismo de importación nuclear del β -DG es dependiente de una señal de localización nuclear (NLS) que se encuentra en el dominio citoplasmático, entre los aminoácidos 776 y 782. Las importinas α/β reconocen la NLS y el β -DG es transportado al núcleo por un mecanismo dependiente de Ran (Lara-Chacón, de León et al. 2010).

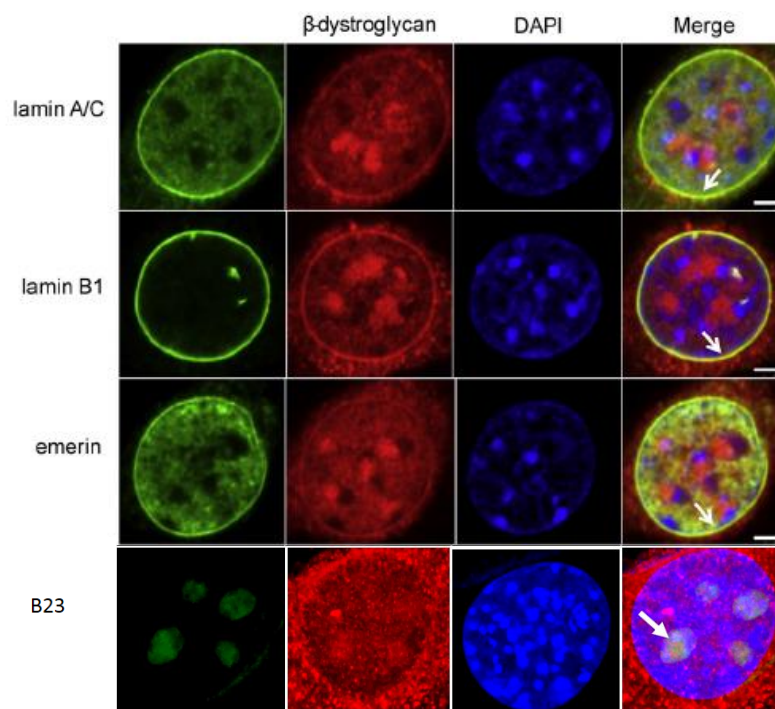


Figura 6. Co-localización del β -Distroglicano con proteínas de diferentes compartimentos nucleares en las células C2C12. Imagen adaptada de (Martinez-Vieyra, Vasquez-Limeta et al. 2013)

Dentro del núcleo, el β -DG interacciona con diferentes proteínas incluyendo a las proteínas de la envoltura nuclear emerina, lámina A/C y lámina B1; la proteína de los cuerpos de procesamiento alternativo llamada SC35; la proteína de los cuerpos de Cajal p80-coilina y la proteína nucleolar B23 (**Figura 6**). De manera interesante, una disminución (**Figura 7**) o un aumento de la expresión del β -DG provoca la deslocalización de las diferentes proteínas nucleares mencionadas previamente y defectos en la morfología nuclear. Estos resultados indican que el β -DG lleva a cabo una función crucial en el núcleo (Martinez-Vieyra, Vasquez-Limeta et al. 2013) (Vélez-Aguilera, de Dios Gómez-López et al. 2018) .

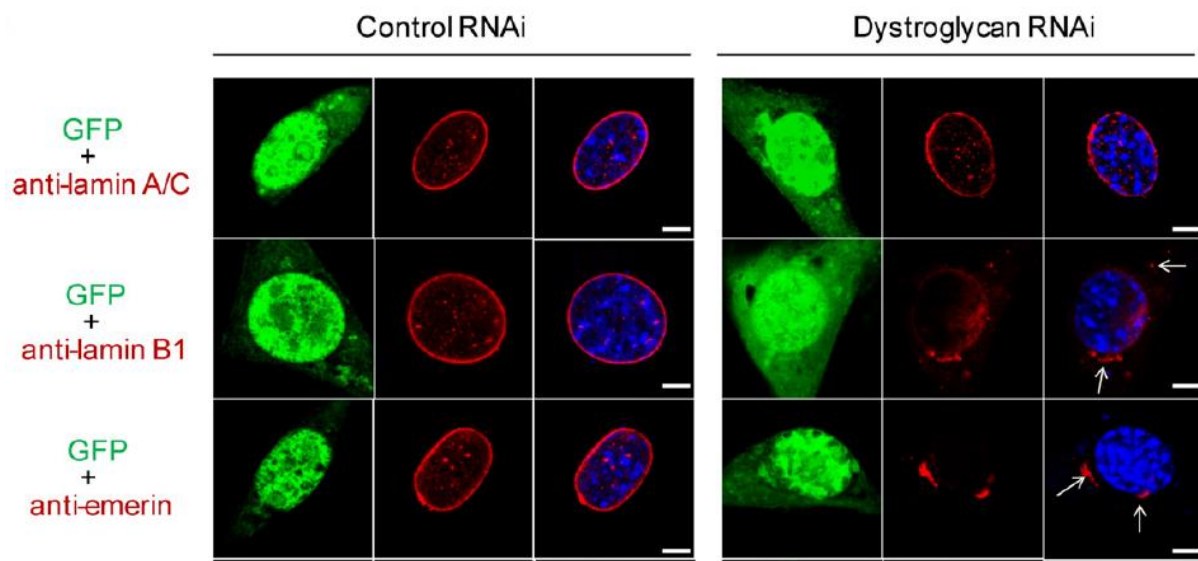


Figura 7. La disminución de la expresión del β -DG en células C2C12, mediante tratamiento con un RNA interferente (RNAi) dirigido contra el gen DAG1, provoca la deslocalización de las proteínas de la envoltura nuclear indicadas. Imagen adaptada de (Martínez-Vieyra, Vásquez-Limeta et al. 2013).

5. JUSTIFICACIÓN:

La generación y caracterización de un modelo celular que no exprese el distroglicano es un paso necesario para definir el mecanismo molecular que le permite al β -DG participar en el mantenimiento y función de la envoltura nuclear.

6. HIPÓTESIS:

La ausencia del distroglicano generará la senescencia celular a través de su efecto negativo sobre la lámina B1.

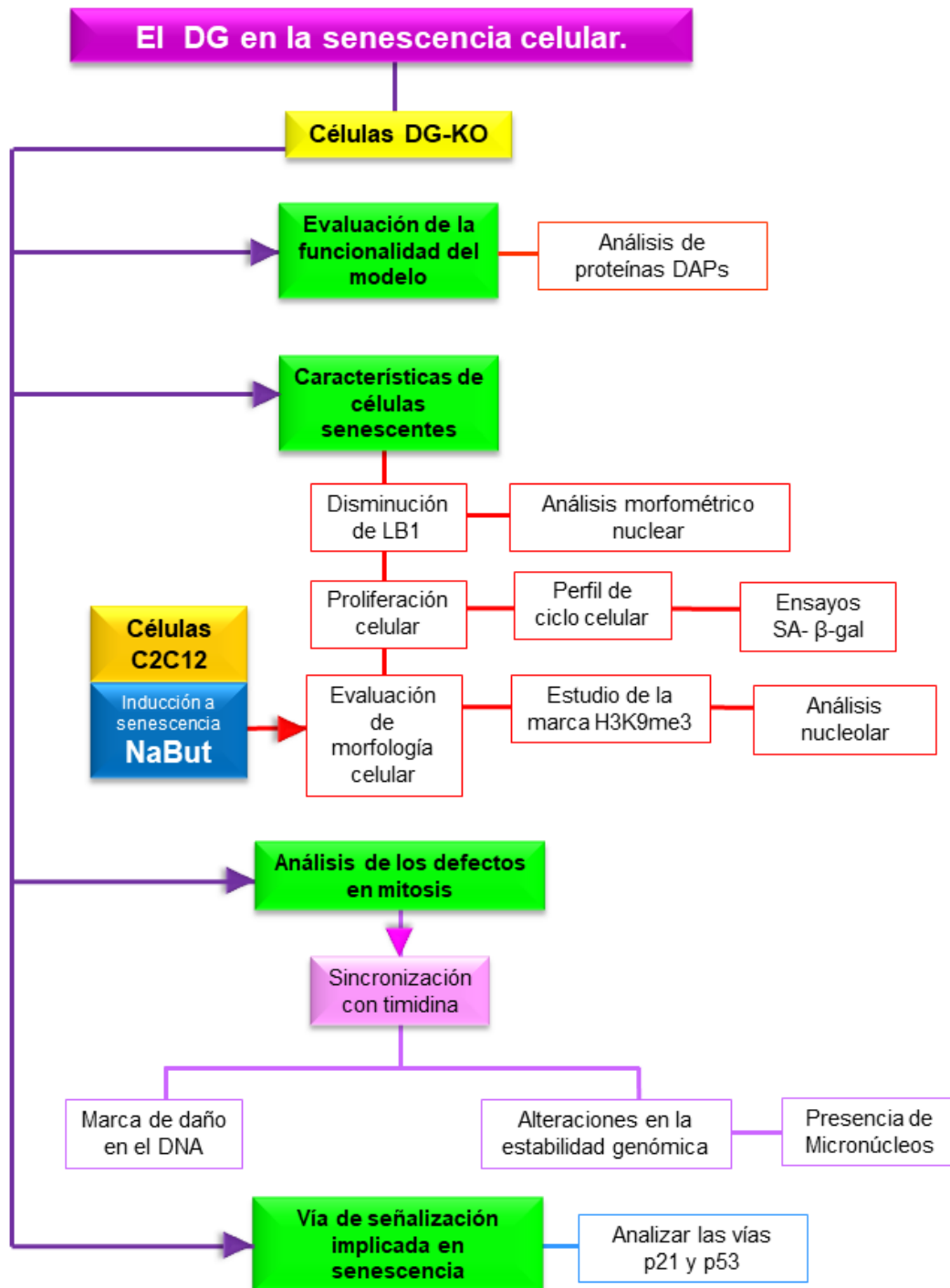
7. OBJETIVO GENERAL:

Definir la participación del β -DG en las funciones celulares asociadas con la lámina B1.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Obtener y caracterizar un modelo celular con la expresión nula del DG (clonas DG-KO).
2. Analizar la distribución y el nivel proteico de la lámina B1 en las células DG-KO y caracterizar su fenotipo senescente.
3. Analizar la mitosis de las células DG-KO.
4. Determinar la via de señalización que induce la senescencia celular en las células DG-KO.

9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



10. METODOLOGÍA

Cultivo celular y tratamientos

La línea celular C2C12, proveniente de mioblastos de ratón (Yaffe and Saxel 1977) se cultivó en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina y 1 mM de piruvato de sodio, las células se incubaron a 37°C y en una atmósfera con una concentración de CO₂ al 5%. Para la inducción de la senescencia, las células fueron tratadas con butirato de sodio (NaBu 5 mM, Sigma-Aldrich, St Louis) diluido en PBS 1X o sólo con el vehículo. Para analizar a las células en mitosis, éstas se arrestaron en la fase S del ciclo celular mediante un doble bloqueo con timidina (2 mM). Posteriormente fueron liberadas del arresto con lavados de PBS 1X y se les añadió medio fresco durante 3 – 4 horas (metafase – anafase).

Generación de las células C2C12 DG-KO por CRISPR-Cas

Se diseñaron dos RNA guías diferentes contra el primer exón del gen *Dag1* usando la herramienta en línea crispr.mit.edu: gRNA1 (5' CCGACAACAGCCGTACCGTC 3') y gRNA2 (5' CCAGACGGTACGGCTGTTGT 3'). Los RNA guías se clonaron en el plásmido con la proteína roja fluorescente (RFP, por sus siglas en inglés) pSpCas9(BB) (modificado del plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP, el cual fue un noble regalo de Feng Zhan – Addgene plasmid # 48138; http://n2t.net/addgene:48138;RRID:Addgene_48138). Las células C2C12 se transfectaron con los plásmidos gRNA1- ó gRNA2-Cas9-RFP usando lipofectamina *LTX with plus reagent* (Thermo Fisher Scientific), después de 48 horas las células positivas para RFP se seleccionaron usando FACSaria (BD Biosciences). Después de su expansión, las células se colectaron en solución amortiguadora de disociación celular libre de enzimas (Gibco) e incubaron en hielo durante 5 minutos con el anticuerpo anti-CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, 2.4G2, BD Biosciences). Posteriormente las células se incubaron con el anticuerpo anti-α-DG (IIH6C4) en

hielo durante 30 minutos y se lavaron con PBS 1X, después las células se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón IgG-Alexa Fluor 488 en hielo durante 20 minutos y se lavaron con PBS para ser resuspendidas en la solución amortiguadora para el FACS (10% FBS en PBS). Las células con tinción negativa para el α -DG se seleccionaron por FACS y se expandieron. Las células WT que fueron incubadas con o sin el anticuerpo IH6C4 se usaron para generar los cuadrantes para tinción positiva o negativa de α -DG, respectivamente. Posterior a la expansión, las células ya seleccionadas se sometieron a una segunda ronda de selección negativa para α -DG y se colectaron células individuales en una placa de 96 multipozos para su expansión clonal. Se analizaron las clonas DG-KO por ensayos de western-blot usando anticuerpos contra β -DG (MANDAG2). Se obtuvieron dos clonas, DG-KO1 y DG-KO2 las cuales se expandieron y caracterizaron por secuenciación de la región de DNA marcada por los RNA guías, para confirmar la interrupción del gen *Dag1*. Los cultivos entre los pasajes 6 y 12 se usaron en todos los experimentos.

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se indican en la siguiente tabla:

Anticuerpo primario	Marca, # de catálogo	Origen del anticuerpo	Dilución IF	Dilución WB
Lámina A/C	SCB, SC-20681	Ratón, monoclonal	-----	1:10,000
Lámina B1	AbCam, ab16048	Conejo, policlonal	1:150	1:3,000
γ - Tubulina	SCB, SC-10732	Conejo, policlonal	1:50	-----
α - Tubulina	SCB SC-32293	Ratón, monoclonal	1:50	-----
H3K9me3	AbCam ab8898	Conejo, policlonal	1:1500	1:3,000
γ -H2AX	Millipore #07-164	Conejo, policlonal	1:100	-----
p53	Cell Signaling, #2524	Ratón, monoclonal	-----	1:500

p21	Cell Signaling	Ratón, monoclonal	-----	1:500
β-DG	MANDAG	Ratón, monoclonal	-----	1:250
DP71	Genemed synthesis, +78DP71	Conejo, policlonal	-----	1:100
α-Distrobrevina	Transduction, 610766	Ratón, monoclonal	-----	1:1000
β2-Sintrofina	SCB, SC-13766	Cabra, policlonal	-----	1:100
B23	Thermofisher scientific FC-61991	Ratón, monoclonal	1:100	1:1000
Actina	Dr. Manuel Hernández, CINVESTAV	Ratón, monoclonal	-----	1:3,000

Tabla 3. Especificaciones para el uso de los anticuerpos.

Inmunofluorescencia y análisis de las imágenes

Los cultivos celulares se sembraron sobre cubreobjetos hasta alcanzar una confluencia del 70 – 80 %. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS 1X, después se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 10 minutos y se permeabilizaron con tritón en PBS al 0.2%. De nuevo los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS 1X y se bloquearon con gelatina al 1% diluida en suero fetal bovino al 0.5% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS 1X. Enseguida los cubreobjetos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C para después lavar los cubreobjetos con Tritón al 0.05% en PBS 1X durante 5 minutos y se incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario correspondiente en una cámara húmeda y protegida de la luz. En donde está indicado, la F-actina se tiñó usando faloidina conjugada con

TRITC (Sigma-Aldrich St. Louis, Mo. USA) a una dilución 1:500 en PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las preparaciones se lavaron una vez más con PBS 1X durante 5 minutos y se procedió con la tinción de núcleos agregando una solución con 0.2 µg/ml de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) durante 20 minutos, las muestras se montaron con Vecta-Shield (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA). Las preparaciones se analizaron por microscopía confocal de escaneo láser (CLSM por sus siglas en inglés; Eclipse Ti Series, Nikon Corporation Healthcare Business Unit, Japan) usando un objetivo de inmersión de 63x (NA = 1.2). El análisis digital de imágenes se llevó a cabo con el software ImageJ, 1.49 (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA. <http://imagej.nih.gov/ij>). Para el análisis morfométrico nuclear, las imágenes crudas se calibraron y se convirtieron a una escala de grises de 8-bits para establecer un umbral de selección de los núcleos de interés. Después, se midieron los parámetros del área nuclear y el índice de circularidad como se describió previamente (Filippi-Chiela, Oliveira et al. 2012). El área nucleolar se calculó sobre las proyecciones máximas de las imágenes, usando la herramienta *3D objects counter* como se describió previamente (García-Aguirre, Alamillo-Iniesta et al. 2019). Para cuantificar la intensidad de fluorescencia de los focis de γ -H2AX (marcador de daño en el DNA) y H3K9me3 (marcador de heterocromatina) se usó la función *Find Maxima* de ImageJ, tal como se describió previamente en (Zhang, Sun et al. 2016). Para las gráficas de las imágenes analizadas se utilizó el software Prism 6.

Western Blot

Las células C2C12 se sembraron sobre cajas P70 o P100 a una confluencia aproximada del 80%. Posteriormente se lavaron con 1 ml de PBS 1X para enseguida añadirles 95 µL de la solución amortiguadora de lisis (Tabla 4). Las cajas se incubaron con esta solución de lisis durante 20 minutos a 4°C con movimiento constante. Posteriormente, se recolectó el lisado con un gendarme y a una centrifugación de 2 minutos a 4°C a 12,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se realizó una curva de calibración utilizando de 1 a 5 µg/µL de albúmina de suero

bovino (BSA, por sus siglas en inglés). Los valores obtenidos se utilizaron para hacer el gráfico de regresión lineal y obtener la concentración de proteínas presentes en los extractos proteicos por el método de Bradford. Para la electroforesis de proteínas se prepararon geles desnaturizantes de proliacrilamida-SDS al 10 o 15% (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) (Tabla 5) y se corrieron a 20 mA durante aproximadamente 2 horas. Posterior a la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories Inc, Berkeley, California) a 15 o 20 volts durante 15 o 60 minutos (gel al 15 o al 10%, respectivamente). Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche en polvo baja en grasa diluida en TBST (100 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 0.5 % (v/v) y enseguida se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los respectivos anticuerpos primarios. La señal específica de las proteínas se obtuvo usando los anticuerpos secundarios correspondientes y mediante el sistema de potenciamiento de la quimioluminiscencia (ECL TM; Amersham Pharmacia, GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Buffer de lisis	
Reactivos	Cantidad
Solución de lisis 5X	200 µL
PMSF	10 µL
Na ₃ VO ₄	20 µL
NaF	50 µL
NaMo ₃ O ₄	10 µL
Complete	143 µL
H ₂ O	567 µL
Volumen total	1 mL

Tabla 4. Reactivos utilizados para la preparación de la solución amortiguadora de lisis.

Gel separador	10 %	15 %
Reactivos	Cantidad	Cantidad
Agua mili-Q	3.1 mL	1.85 mL
Acrilamida / Bisacrilamida al 30%	2.5 mL	3.75 mL
Tris- HCl , 4X, pH 8.8	1.88 mL	1.88 mL
APS, 10%	50 μ L	50 μ L
TEMED	10 μ L	10 μ L

Gel concentrador	
Reactivos	Cantidad
Agua mili-Q	2.143 mL
Acrilamida / Bisacrilamida al 30%	0.457 mL
Tris- HCl , 4X, pH 6.8	0.879 μ L
APS, 10%	17.8 μ L
TEMED	5 μ L

Tabla 5. Reactivos utilizados para la preparación de los geles desnaturalizantes de proliacrilamida-SDS al 10 o 15%.

Análisis de telómeros mediante Q-FISH

El proceso se basó en una metodología previamente descrita (Tichy, Sidibe et al. 2017). Las células fijadas en los cubreobjetos se permeabilizaron con tritón al 0.2% durante 12 minutos. Posteriormente, se preincubaron por separado los cubreobjetos y la enzima RNAsa (1ug/ml) a 37°C durante 10 minutos, para enseguida añadir la RNAsa a los cubreobjetos y dejar incubando durante 20 minutos a 37°C. Después los cubreobjetos se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS1X, y se dejaron secar. Los cubreobjetos y la sonda bloqueada con el 10% de BSA (1ug/ μ l) se precalentaron por separado a 80°C durante 10 minutos. Posteriormente la sonda se incubó con los cubreobjetos en una cámara húmeda durante 2 horas y media a 80°C. Posteriormente a esta incubación, los cubreobjetos se dejaron a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente se prepararon las soluciones de lavado que

contienen solución salina de citratos (SSC) con 0.1% de tween20: SSC2X, SSC1X y SSC0.5X. Estas soluciones se precalentaron a 60°C durante 10 minutos para después hacer lavados a 60°C durante 10 minutos con SSC2X, después con SSC1X y finalmente con SSC0.5X. Los cubreobjetos se lavaron de nuevo con la solución salina de citrato a 60°C durante 3 minutos e incubaron con DAPI durante 11 minutos. Enseguida se montaron los cubreobjetos con Vecta-Shield. Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ usando la herramienta *find-maxima* para contar los focos e intensidad de pixeles correspondientes a los telómeros.

Análisis de la β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β gal)

Las células se cultivaron en cubreobjetos y posteriormente se tiñeron de acuerdo con el protocolo del estuche de tinción para la β -galactosidasa (Sigma-Aldrich con número de catálogo CS0030). Las células se contabilizaron y analizaron en el microscopio de campo claro.

Citometría de flujo y proliferación celular

Las células cultivadas se levantaron del substrato con tripsina y se concentraron en pastilla por centrifugación, la pastilla se lavó 3 veces con PBS1X. Posteriormente la pastilla de células se disolvió lenta y delicadamente con etanol al 80% para su fijación durante 30 minutos. Después las células se tiñeron con una solución de DAPI 1 μ g/ml (Sigma-Aldrich) en tritón al 0.1% durante 20 minutos. Las células ya teñidas se transfirieron a tubos de citometría y su perfil de ciclo celular se leyó en un citómetro BD LSR-Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). El análisis del perfil de ciclo celular se hizo con el software ModFit LT s (Verity Software House, Topsham, ME). Para los estudios de proliferación celular, las células se sembraron por triplicado en placas de 12 multipozos (Corning, Costar) a una densidad de 1×10^3 células/ml. La proliferación celular se evaluó durante 10 días usando el estuche comercial (Sigma-Aldrich) de MTT [Bromuro de 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol], siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placa Spectra Max Plus384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

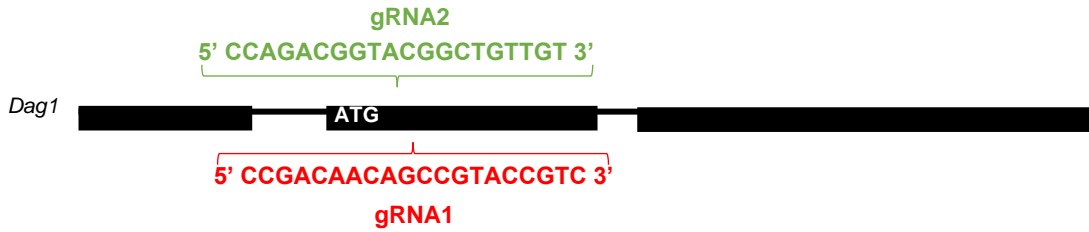
11. RESULTADOS

11.1 Generación y caracterización de un modelo celular nulo para la expresión del distroglicano (DG-KO) basado en la línea muscular de ratón C2C12

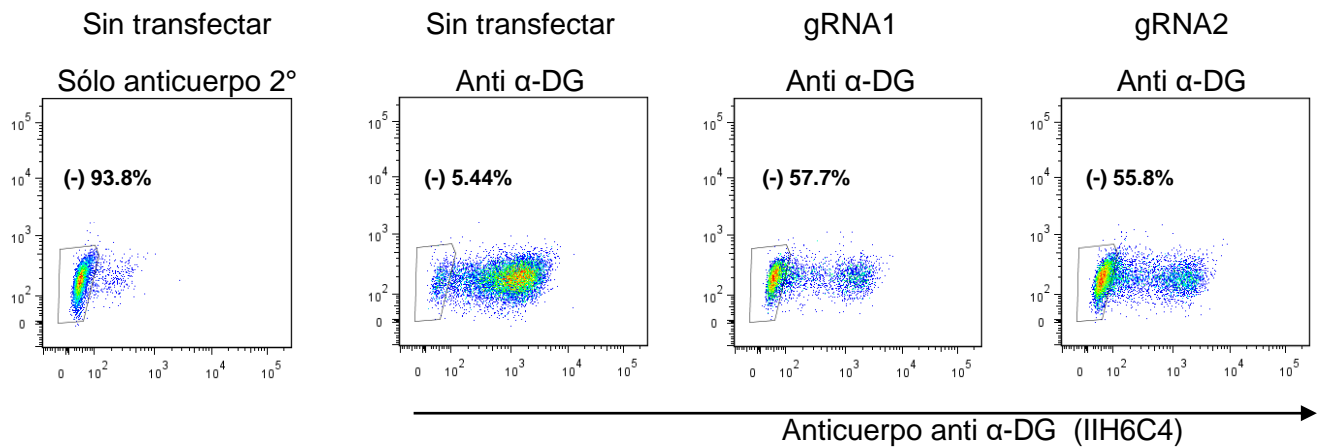
Para analizar con detalle la función del β -DG en la envoltura nuclear, creamos un modelo nulo para la expresión del DG (DG-KO) a partir de la línea celular C2C12, empleando el sistema CRISPR/Cas9. Para silenciar la expresión del DG, las células C2C12 se transfectaron con un vector que expresa Cas9, la proteína roja fluorescente (RFP, por sus siglas en inglés) y cada uno de los dos RNA guías; gRNA1 (5'CCGACAACAGCCGTACCGTC3') y gRNA2 (5'CCAGACGGTACGGCTGTTGT3'), dirigidos contra el primer exón del gen *Dag1* de ratón (Figura 10.1.1). Después de una ronda de selección positiva para RFP y dos rondas de selección negativa de la inmunotinción contra DG, por medio de la selección de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), las células se expandieron y de esta manera se obtuvieron dos clonas distintas; DG-KO1 y DG-KO2 (Figura 10.1.2; ver la Metodología para más detalles). Enseguida se llevó a cabo la secuenciación de DNA para verificar la edición genética del gen *Dag1*. Se encontró que ambas clonas, contienen eliminaciones pequeñas que generaron codones de paro cerca del primer exón del gen *Dag1*. El marco de lectura de las clonas DG-KO genera únicamente péptidos pequeños por lo que se considera que carecen de actividad biológica.

Posteriormente, las clonas DG-KO se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida con un anticuerpo dirigido contra el β -distroglicano (Figura 11.1.3).

A



B



C

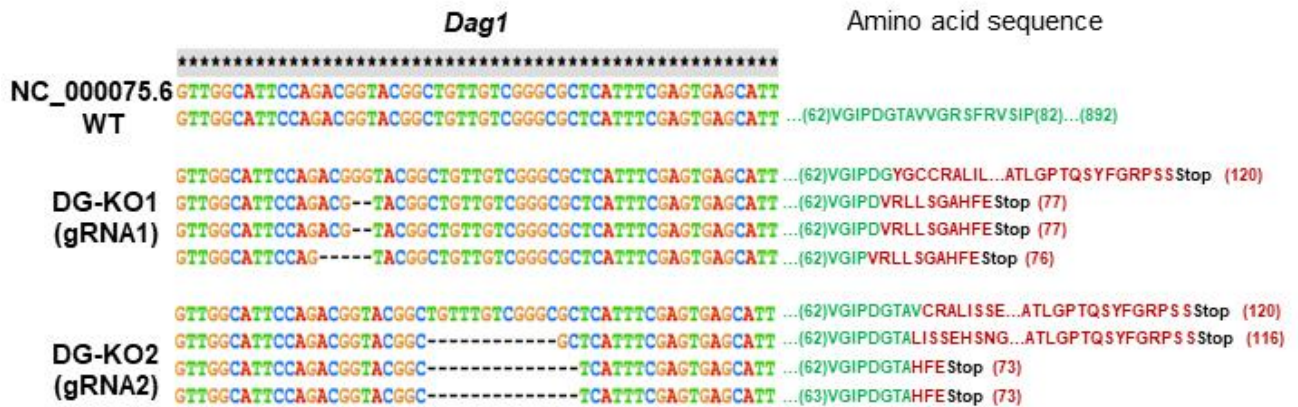
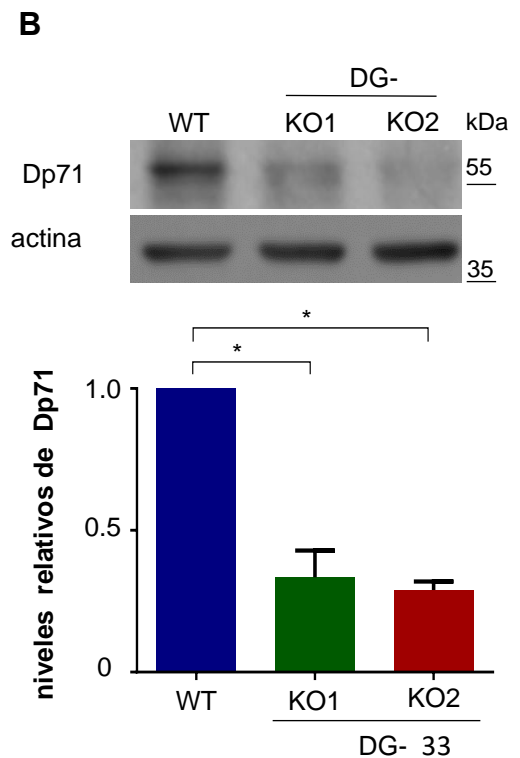
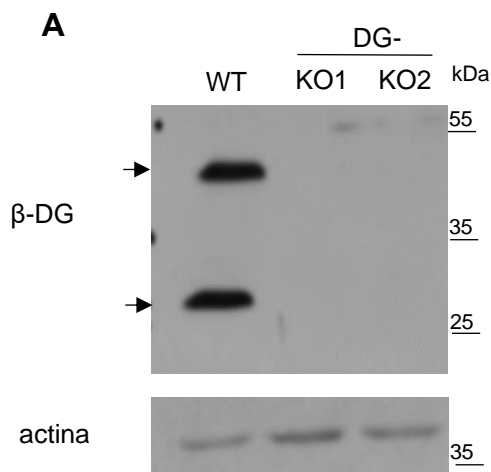


Figura 11.1.1. Clonas DG-KO generadas por CRISPR/Cas9. (A) En el esquema se muestra la secuencia de los RNA guías (gRNA1 y gRNA2) que se diseñaron contra el primer exón del gen *Dag1*. (B) Las células C2C12 transfectadas con gRNA1, gRNA2 o con ningún gRNA (células no

transfectadas) se analizaron por medio de FACS, utilizando un anticuerpo contra α -DG (IIH6C4). Las células no transfectadas incubadas solamente con anticuerpo secundario se emplearon para ajustar el cuadrante de la población celular negativa para la tinción contra el α -DG [α -DG (-)]. Los porcentajes corresponden a la población α -DG (-). (C) Se muestra el alineamiento de la secuencia del gen *Dag1* de ratón, en donde se observa las eliminaciones que portan las clonas DG-KO1 y DG-KO2 (guiones negros), en comparación con la secuencia del gen nativo. La secuencia de aminoácidos muestra la posición de los codones de paro que se generan en las clonas DG-KO1 y DG-KO2.

Debido a la relación funcional del DG con las proteínas asociadas a la distrofina (DAPS, por sus siglas en inglés), decidimos analizar los niveles proteicos de la distrofina Dp71, la α -distrobrevina y la β -2 sintrofina en las clonas DG-KO. De acuerdo a lo esperado, los lisados de las clonas DG-KO1 y DG-KO2 no mostraron expresión del β -DG, (Figura 11.1.4 A; proteína de 43 kDa y de 26 kDa), y adicionalmente, mostraron una disminución dramática en el nivel de las DAPs analizadas, en comparado con las células WT (Figura 11.1.4 B-D). Estos resultados validan a las clonas DG-KO1 y DG-KO2 como un modelo de estudio para el DG, incluyendo la función del β -DG en procesos asociados con la envoltura nuclear (NE, por sus siglas en inglés).



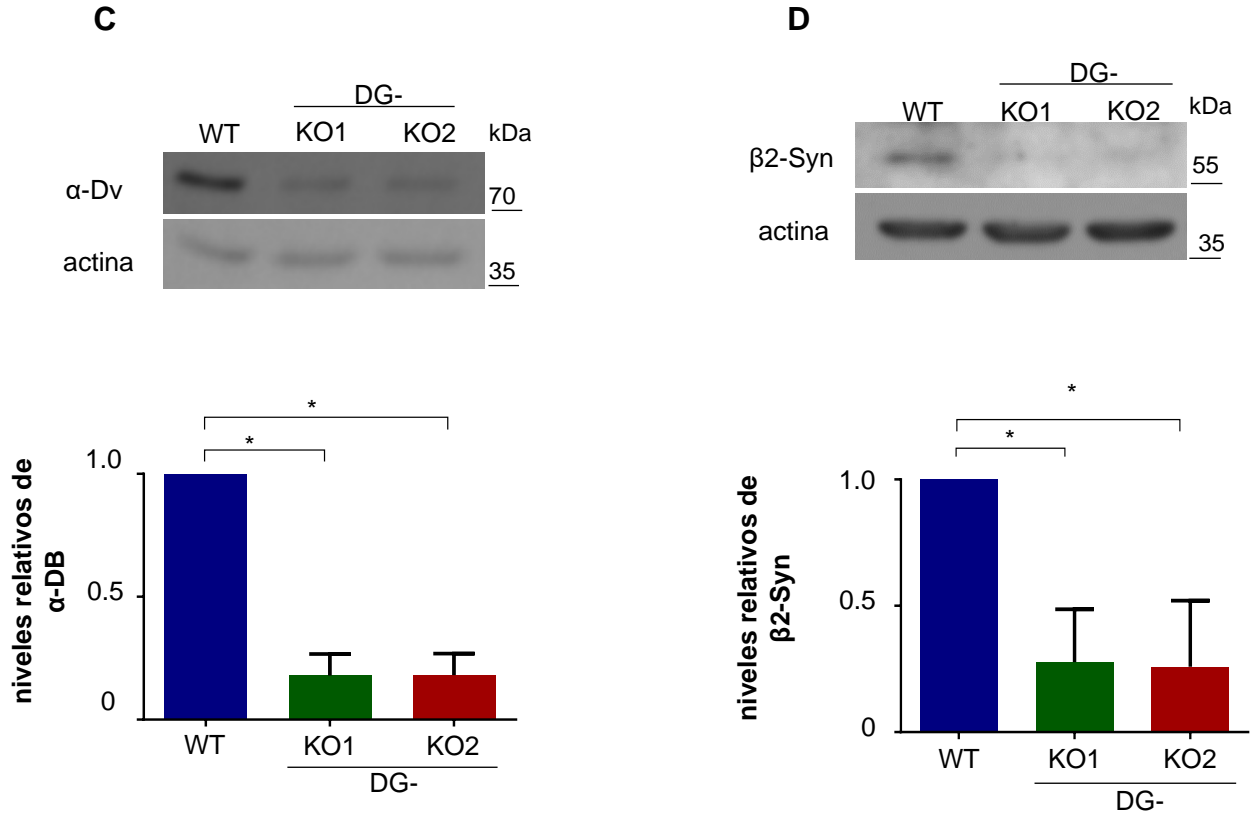


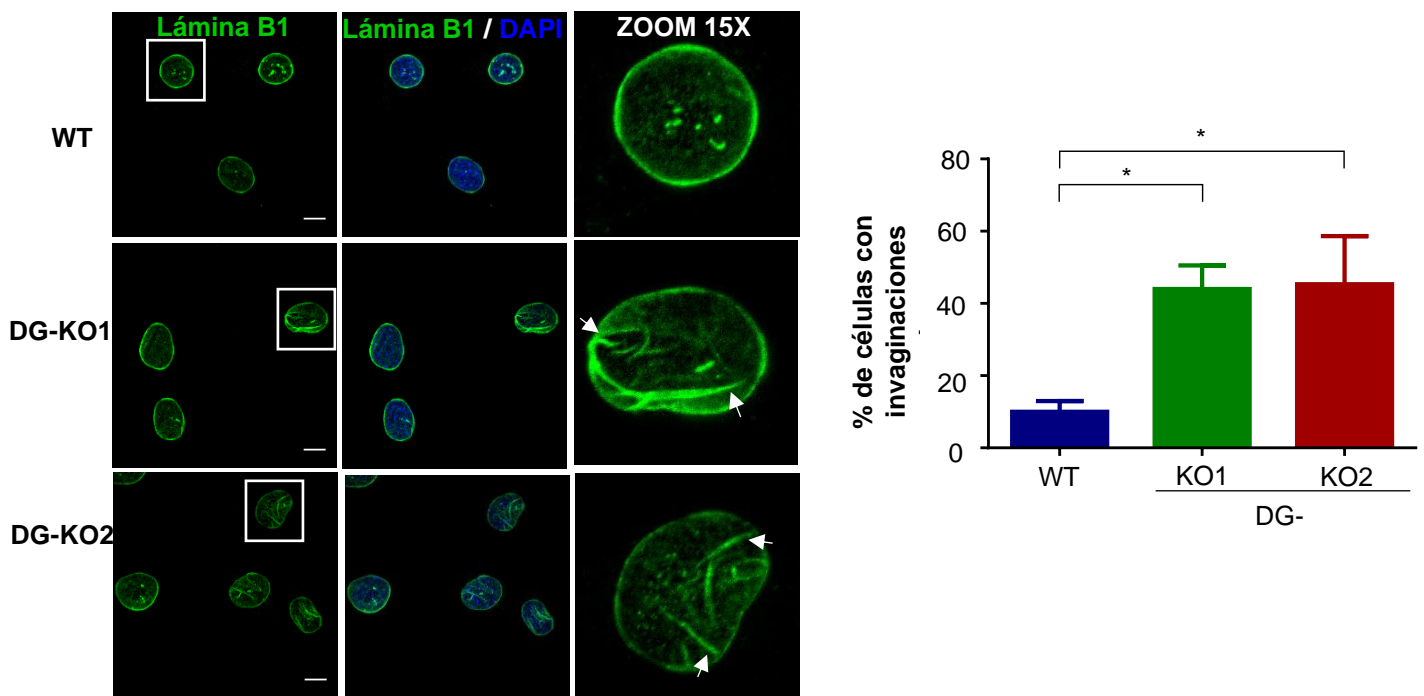
Figura 11.1.2. Disminución de los niveles proteicos de las DAPs en las clonas DG-KO. los lisados de las células WT, DG-KO1 y DG-KO2 se evaluaron por SDS-PAGE/WB usando anticuerpos específicos contra el β-DG (A), la Dp71 (B), la α-distrobrevina (C), la β-2 sintrofina (D) y la actina (control de carga). Se muestran gels representativos de tres experimentos independientes. Las gráficas de la parte inferior de la figura muestran los niveles relativos de las proteínas analizadas. Las diferencias significativas se obtuvieron con el análisis de ANOVA unifactorial y la posterior prueba de Dunnett; * $p < 0.05$ en comparación con WT.

11.2 La ausencia del DG altera la distribución y los niveles de la lámina B1

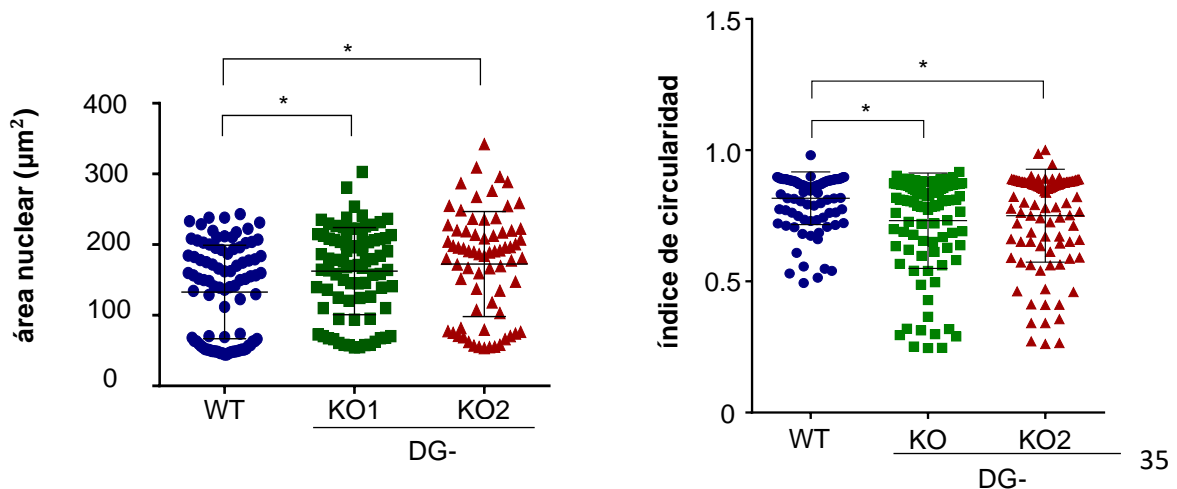
Ya que la lámina B1 interacciona con el β-DG y es una proteína esencial de la NE (Martínez-Vieyra, Vásquez-Limeta et al. 2013), decidimos evaluar el impacto que causa la falta del DG sobre la distribución y expresión proteica de la lámina B1. De manera interesante, observamos una disminución en la intensidad de fluorescencia de la lámina B1, acompañada por la presencia de deformaciones de la morfología nuclear (invaginaciones) en las clonas DG-KO1 y DG-KO2 (Figura 11.2 A).

Consistentemente, el porcentaje de células con morfología nuclear aberrante fue considerablemente mayor en las clonas DG-KO1 y DG-KO2, en comparación con las células WT (gráfica de la derecha). El análisis morfométrico de los núcleos nuclear (área nuclear e índice de circularidad) demostró que existen diferencias significativas en la forma nuclear entre las células WT y las clonas DG-KO1 y DG-KO2 (Figura 11.2 B). En concordancia con las imágenes de microscopia confocal, observamos una disminución significativa del nivel proteico de la lámina B1 en las clonas DG-KO1 y DG-KO2 (Figura 11.2 C).

A



B



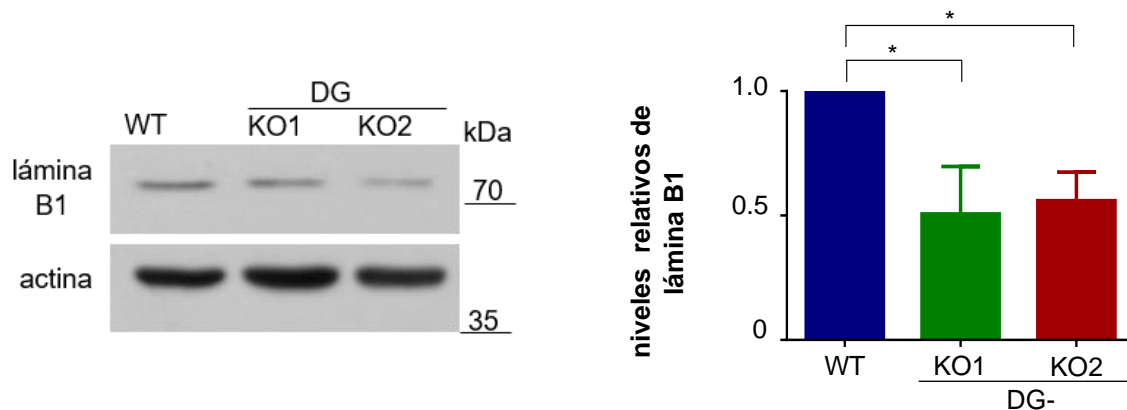
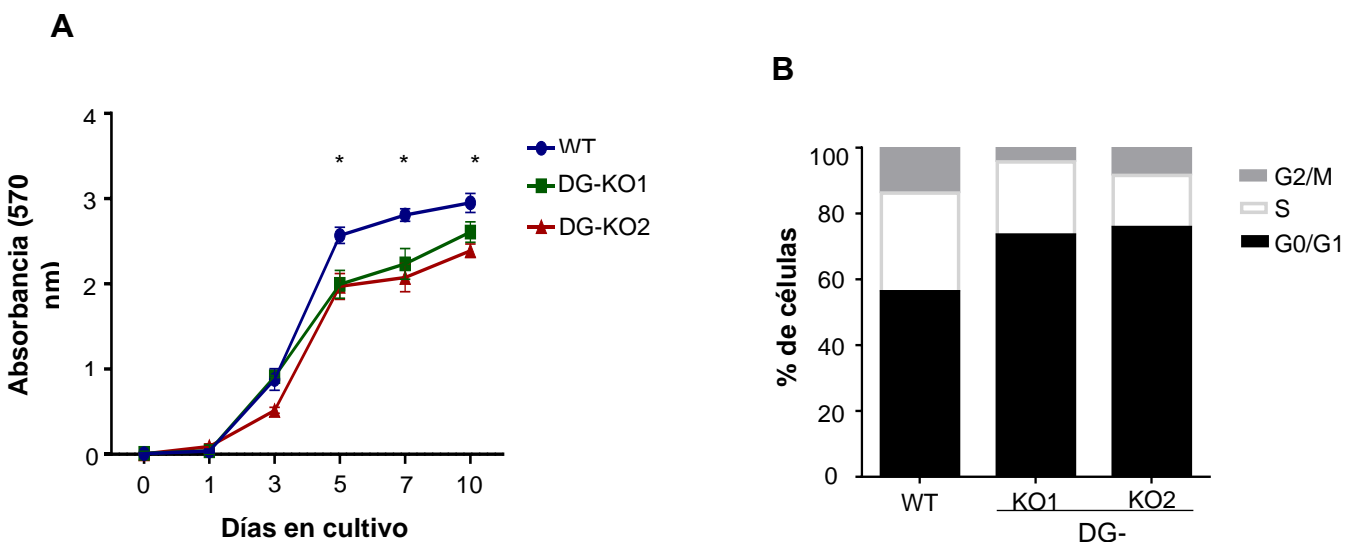


Figura 11.2. Las clonas DG-KO muestran alteraciones en la distribución y nivel proteico de la lámina B1. (A) Las células WT, DG-KO1 y DG-KO2, cultivadas sobre cubreobjetos, se fijaron, y se inmunotñeron para la lámina B1. Los núcleos se decoraron con DAPI previo al análisis por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas. Barra de escala, 10 μ m. La gráfica de la derecha muestra el porcentaje de núcleos con invaginaciones en cada cultivo celular obtenido de tres experimentos independientes ($n=100$ núcleos por cada cultivo celular; $*p<0.05$ comparado con WT, análisis de ANOVA unifactorial y posterior prueba de Dunnett). (B) Se llevó a cabo un análisis morfométrico sobre los núcleos de las células WT, DG-KO1 y DG-KO2, como se describe en la Metodología ($n=100$ núcleos por cada cultivo celular, obtenidos de tres experimentos independientes; $*p<0.05$ comparado con WT, análisis estadístico de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn). (C) Los lisados de las células WT, DG-KO1 y DG-KO2 se sometieron a ensayos de SDS-PAGE/WB, usando anticuerpos contra la lámina B1 y la actina (control de carga). Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. La gráfica de la derecha muestra la expresión relativa de la lámina B1 (análisis de ANOVA unifactorial seguido por la prueba de Dunnett; $*p<0.05$ comparado con WT).

10.3 La ausencia del DG induce características asociadas con la senescencia celular

La disminución de la lámina B1 es un paso necesario durante la transición hacia la senescencia celular (Freund, Laberge et al. 2012, Dreesen, Chojnowski et al. 2013). Por lo tanto, la caída del nivel de la proteína lámina B1 que presentan las clonas DG-KO podrían predisponerlas a adquirir el fenotipo senescente. Para corroborar esta hipótesis, analizamos diferentes marcas de senescencia celular en las células nulas para el DG. De manera interesante, las clonas DG-KO mostraron una menor proliferación, medida mediante ensayos MTT, y un aumento en el porcentaje de células en la fase G0/G1 del ciclo celular, en comparación con las células WT (Figura 11.3.1 A y B). El arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular es un indicativo de la senescencia celular, por lo tanto, nos propusimos identificar la presencia de células senescentes en los cultivos DG-KO, por medio de una tinción para la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal por sus siglas en inglés). Encontramos un incremento en el número de células senescentes en los cultivos de las clonas DG-KO1 y DG-KO2 (20 – 25%), en comparación con las células WT (5%) (Figura 11.3.1 C).



C

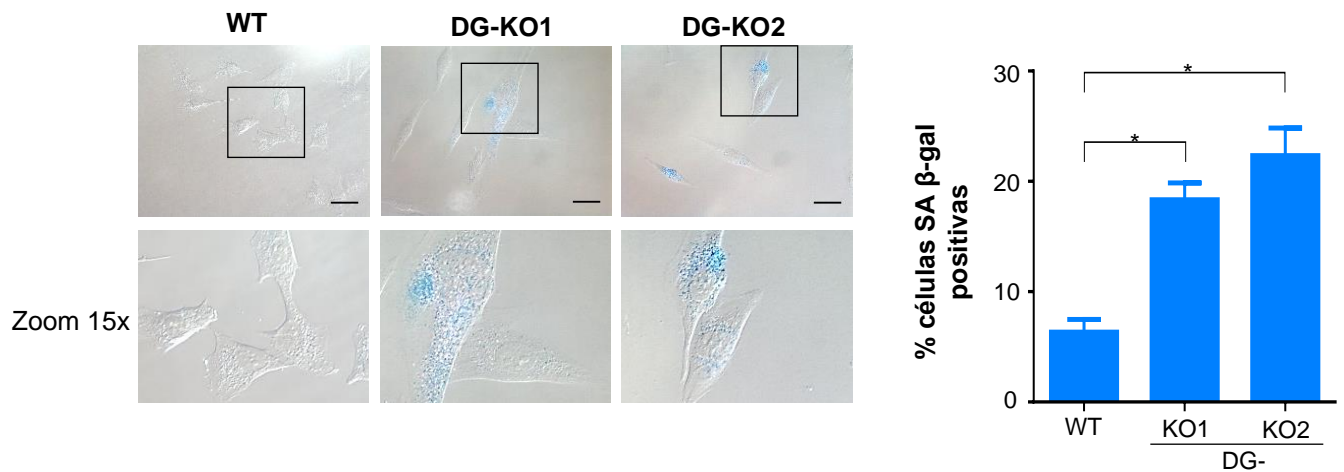


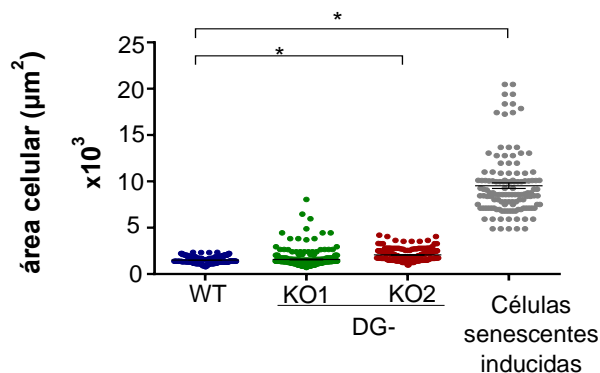
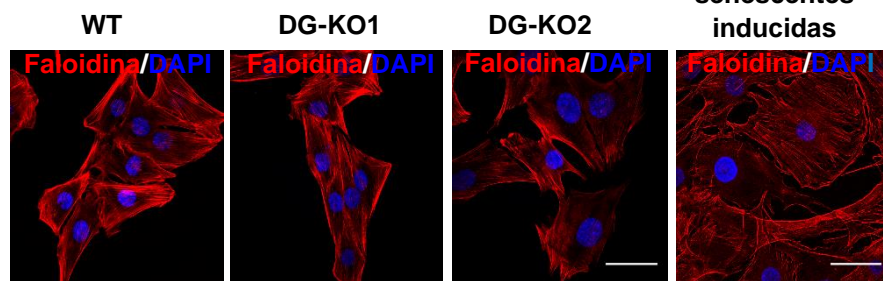
Figura 11.3.1 Las células DG-KO presentan baja proliferación, un arresto en la fase G0/G1 y senescencia celular. (A) La proliferación celular de los cultivos WT, DG-KO1 y DG-KO2 se evaluó durante un período de 9 días por medio de ensayos MTT. Los datos corresponden a tres experimentos independientes, y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de ANOVA unifactorial; $*p < 0.05$ en comparación con las células WT. (B) Se obtuvo el perfil del ciclo celular de cultivos asincrónicos de las células WT, DG-KO1 y DG-KO2 mediante citometría de flujo. Se muestra una gráfica representativa de tres experimentos independientes. (C) Se identifican las células senescentes por medio de la cuantificación de la actividad de la enzima SA β-gal. Se muestran fotos representativas de microscopio de campo claro; barra, 50 μm. La gráfica de la derecha muestra el porcentaje de células senescentes de cada cultivo celular, calculado a partir de tres experimentos independientes ($n=200$ células por cada cultivo); $*p < 0.05$ en comparación con las células WT, prueba de ANOVA unifactorial y después la prueba de Dunnett.

Se sabe que las células senescentes presentan una morfología más extendida y aplanada, además de estrés nucleolar y pérdida de la heterocromatina periférica (Wang and Dreesen 2018), entre otras características. Por lo tanto, decidimos analizar si las células DG-KO presentan estas características, usando las células WT inducidas a senescencia mediante tratamientos con butirato de sodio (NaBu) como control positivo. El NaBu es un inhibidor de las desacetilasas de histonas que genera senescencia mediante un arresto irreversible del ciclo celular (Petrova,

Velichko et al. 2016). La morfología celular se analizó mediante la tinción con faloidina para decorar la actina filamentosa y la posterior medición de la superficie celular. Las células WT tratadas con NaBu mostraron una morfología celular aplanada y expandida que contrastó notoriamente con la morfología poligonal típica de las células no tratadas (Figura 11.3.1 A). Las células DG-KO2, pero no las células DG-KO1, mostraron un incremento sutil pero estadísticamente significativa de la superficie celular, en comparación con las células WT (Figura 11.3.2 A y gráfica de la derecha). Por otro lado, se observó una disminución notoria de la inmunotinción para la histona H3K9me3 (proteína marcadora de la heterocromatina) en las clonas DG-KO1 y DG-KO2, esta disminución fue similar a la observada para las células WT inducidas a senescencia con NaBu (ver la Figura 11.3.2 B y la gráfica de la derecha que muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia). Finalmente, la morfología nucleolar se evaluó mediante la inmunotinción de la proteína nucleolar B23 y la posterior cuantificación del área nucleolar. Encontramos que los cultivos DG-KO1 y DG-KO2 contienen nucléolos disgregados con un área menor, en comparación con las células WT (Figura 11.3.2 C y gráfica a la derecha). Sin embargo, la disgregación nucleolar fue mucho más evidente en las células WT inducidas a senescencia.

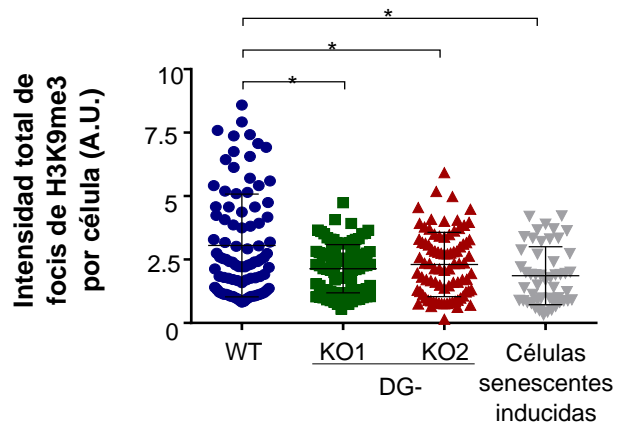
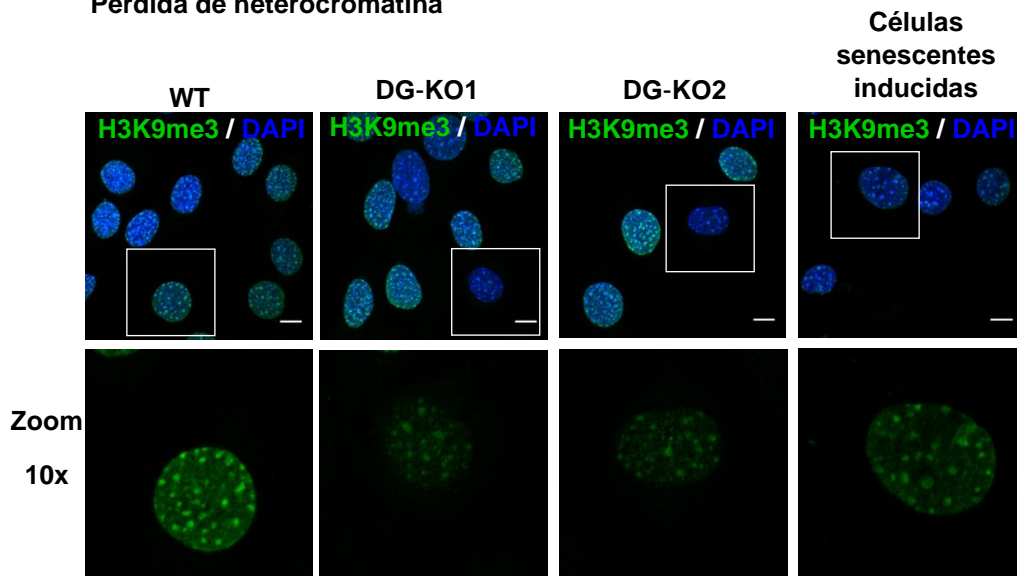
A

Morfología celular senescente



B

Pérdida de heterocromatina



C

Disgregación nucleolar

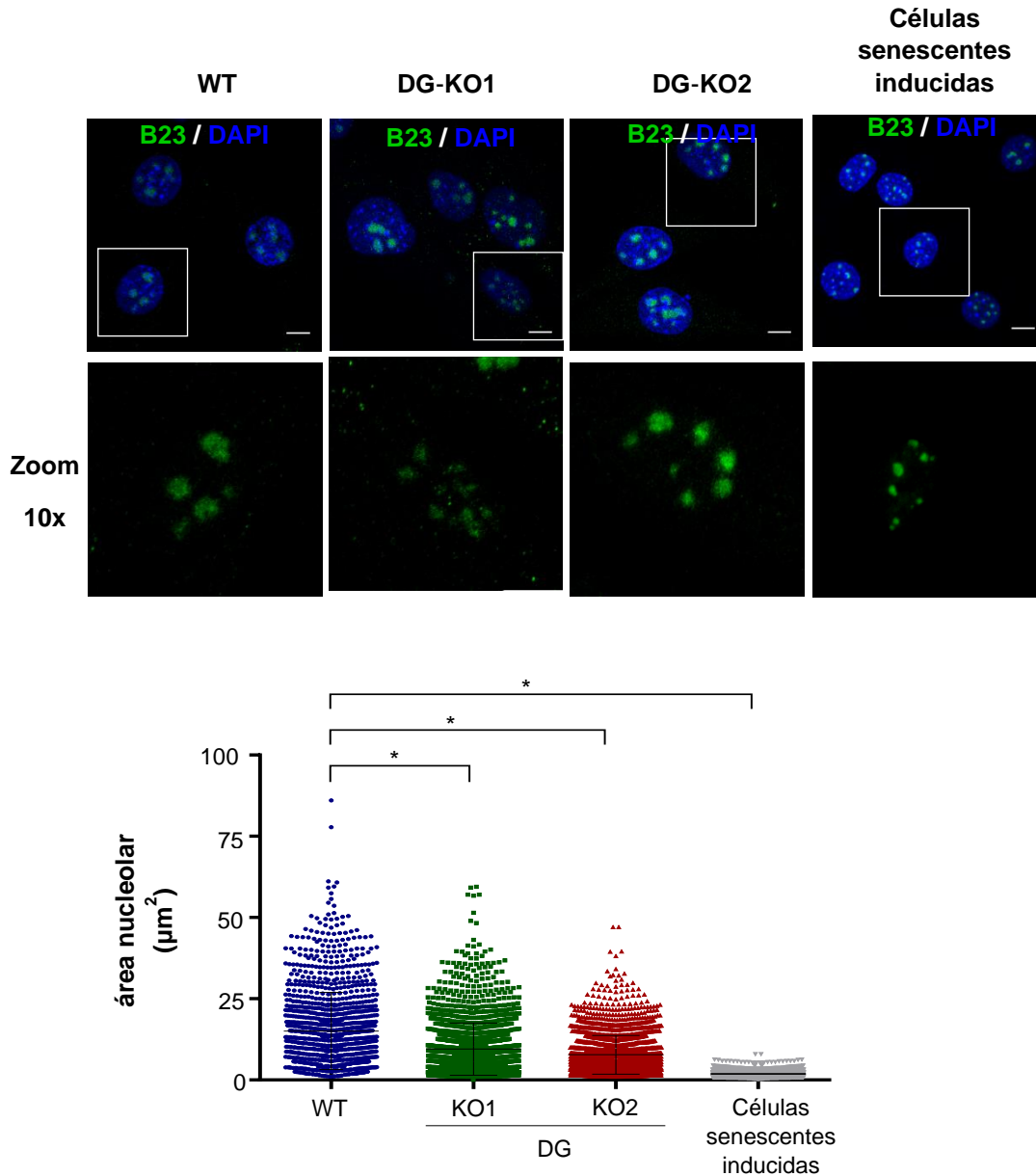


Figura 11.3.2 Las células DG-KO adquieren características senescentes. Las células WT, DG-KO1 y DG-KO2, así como las células WT inducidas a senescencia por medio de tratamiento con NaBu, se sembraron sobre cubreobjetos y se fijaron, previo a su análisis por CLSM. (A) Morfología celular senescente. Las células se tiñeron con DAPI y faloidina para visualizar los núcleos y el citoesqueleto de actina respectivamente. Se muestran imágenes representativas, barra, 50 μm . En la parte inferior, se muestra el área celular calculada con el programa ImageJ; las diferencias significativas se determinaron mediante el análisis de Kruskal-Wallis seguido por prueba de Dunn ($n=200$ células por cada cultivo celular y de tres experimentos independientes); $*p<0.05$ en comparación con las células

WT. (B) Pérdida de heterocromatina. Las preparaciones celulares se inmunotñieron para la histona H3K9me3 y los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI. Se muestran imágenes representativas (barra, 10 μ m). En la parte inferior se observa la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los focos de la histona H3K9me3 (ver la Metodología para más detalles). Las diferencias significativas se determinaron mediante el análisis de Kruskal-Wallis seguido por prueba de Dunn ($n=100$ células por cada cultivo y de tres experimentos independientes); $*p<0.05$ en comparación con WT. (C) Área nucleolar. Las preparaciones celulares se inmunotñieron con anticuerpos dirigidos contra la proteína nucleolar B23, y los núcleos se decoraron con DAPI. Se muestran imágenes representativas (barra, 10 μ m). En la parte inferior se presenta el área de los nucléolos (ver la Metodología para mayores detalles). Las diferencias significativas se obtuvieron mediante el análisis de Kruskal-Wallis seguido por la prueba de Dunn ($n=1,300$ nucléolos por cada cultivo celular y de tres experimentos independientes); $*p<0.05$ en comparación con las células WT.

Los resultados descritos anteriormente sugieren que las clonas DG-KO presentan un fenotipo senescente incipiente, en ausencia de cualquier estímulo que induzca senescencia. Por lo tanto, creemos que la ausencia del DG sensibiliza a las células C2C12 antes los estímulos que inducen senescencia. Para probar nuestra idea, tratamos a las células DG-KO1, DG-KO2 y WT con NaBu. Encontramos que después de cinco días de tratamiento el porcentaje de células senescentes fue significativamente mayor en las clonas DG-KO (60-70%) que en las células WT (30%) (Figura 11.3.3 A y gráfica inferior), mientras que después de 10 días de tratamiento, el porcentaje de células senescentes fue similar (~75%) entre las células WT y los cultivos DG-KO (Figura 11.3.3 A y gráfica inferior).

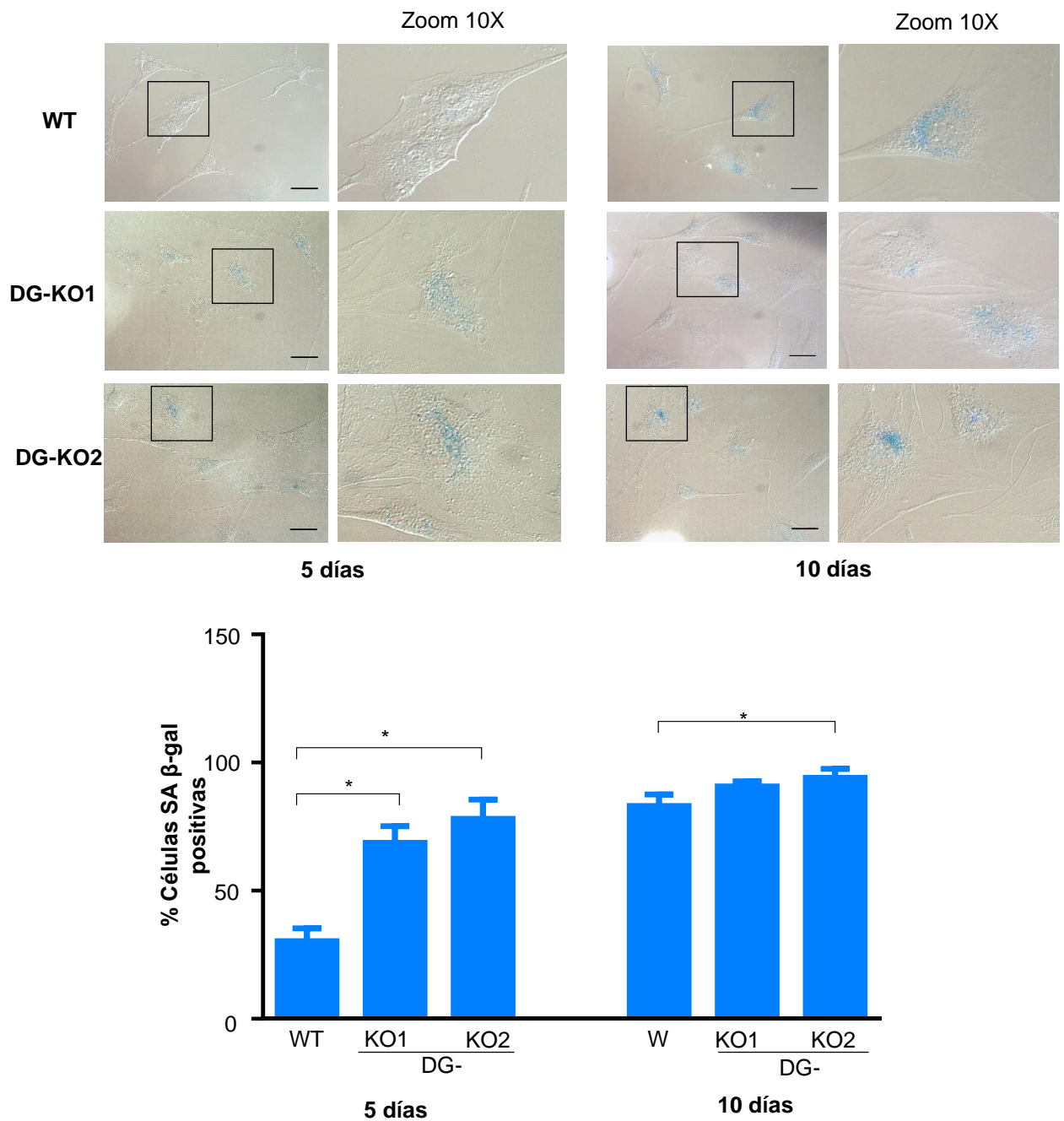
A**Inducción a senescencia mediada por NaBu**

Figura 11.3.3. La ausencia del DG aumenta la sensibilidad de las células C2C12 en la inducción de la senescencia. (A) Los cultivos WT, DG-KO1 y DG-KO2 se indujeron a senescencia, por medio de tratamiento con NaBu por 5 o 10 días. Las células senescentes se identificaron mediante la actividad de la enzima SA β-gal y las imágenes se adquirieron por microscopía de campo claro. Barra, 50 μm.

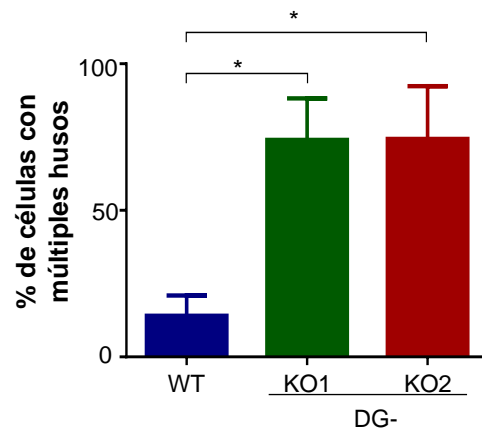
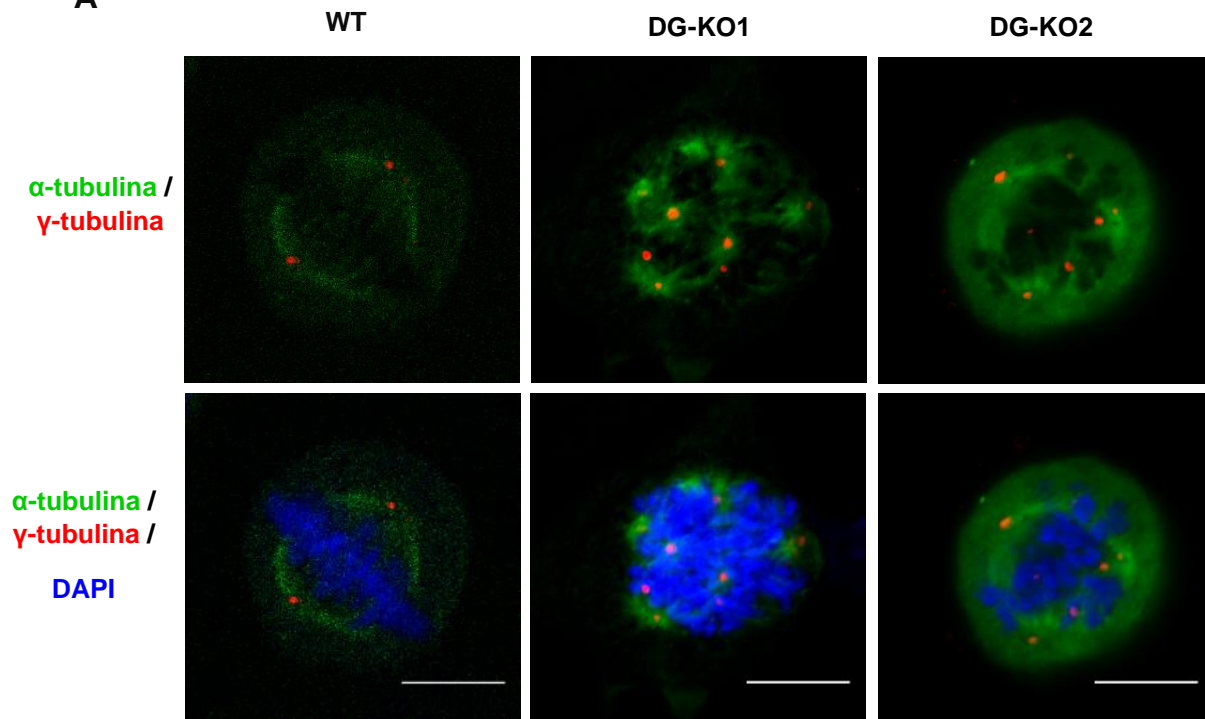
*La grafica de la parte inferior muestra el porcentaje de células senescentes de cada cultivo celular. Los datos corresponden a tres experimentos independientes (n=100 por cada cultivo) las diferencias significativas fueron determinadas por análisis el de ANOVA unifactorial y la posterior prueba de Dunnett; *p<0.05 en comparación con WT.*

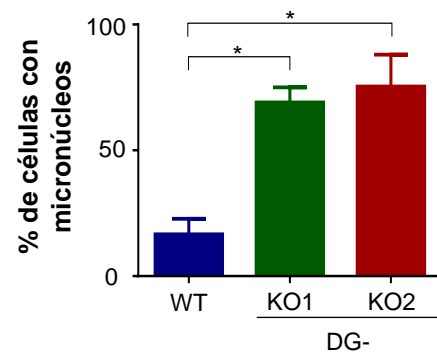
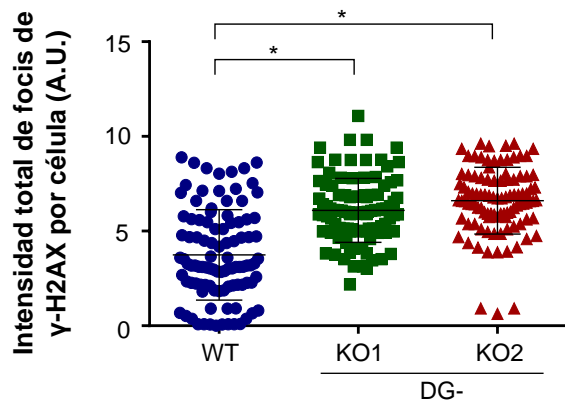
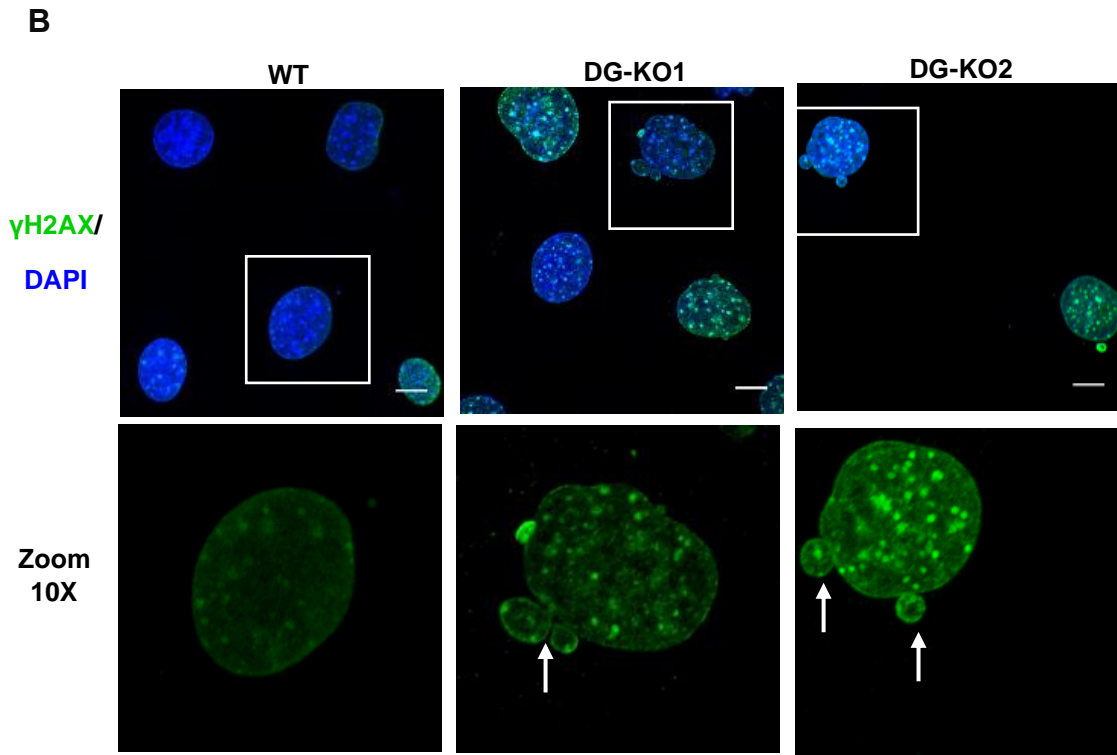
10.4 Las clonas DG-KO presentan mitosis multipolares aberrantes las cuales resultan en la formación de micronúcleos y la activación de la respuesta de daño en el DNA mediada por p53

Hasta este punto de nuestra investigación, es difícil predecir cómo en las células C2C12 la pérdida del DG inicia el programa de senescencia. No obstante, estudios previos de nuestro grupo de trabajo proporcionan una pista para resolver este enigma. Previamente mostramos que la disminución del DG ocasiona un incremento en el número de centrosomas en las células C2C12 (Martínez-Vieyra, Vásquez-Limeta et al. 2013). Tomando en consideración la función de los centrosomas en el ensamble del huso mitótico, es probable que la presencia de múltiples centrosomas en las células DG-KO genere mitosis aberrantes y en última instancia inestabilidad genómica. Para evaluar esta hipótesis, las células WT, DG-KO1 y DG-KO2 se arrestaron en la fase S del ciclo celular por medio de tratamiento con timidina, y posteriormente se liberaron para permitir que progresaran hacia la mitosis. Enseguida, las células se inmunotñieron con anticuerpos anti- α -tubulina y anti- γ -tubulina para ver por microscopía confocal los husos mitóticos y los centrosomas respectivamente. De manera interesante, un porcentaje alto de las células DG-KO1 y DG-KO2 (~80%) presentaron husos mitóticos múltiples y un alineamiento multidireccional de los cromosomas, mientras que solo unas cuantas células WT mostraron mitosis aberrantes (Figura 11.4 A). Ya que el tratamiento con timidina puede generar respuesta de daño en el DNA, a través de una disminución en la progresión de las asas de replicación (Bolderson, Scolah et al. 2004), analizamos si las células DG-KO tienen una respuesta al daño en el DNA más sensible/eficiente que las células WT, por medio del monitoreo de los focos de tinción de la histona γ -H2Ax (marcador de reparación de daño en el DNA) (Podhorecka, Skladanowski et

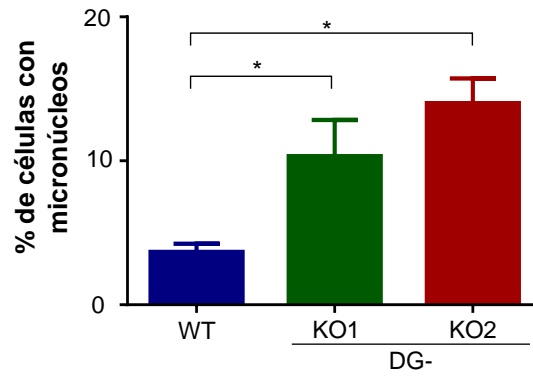
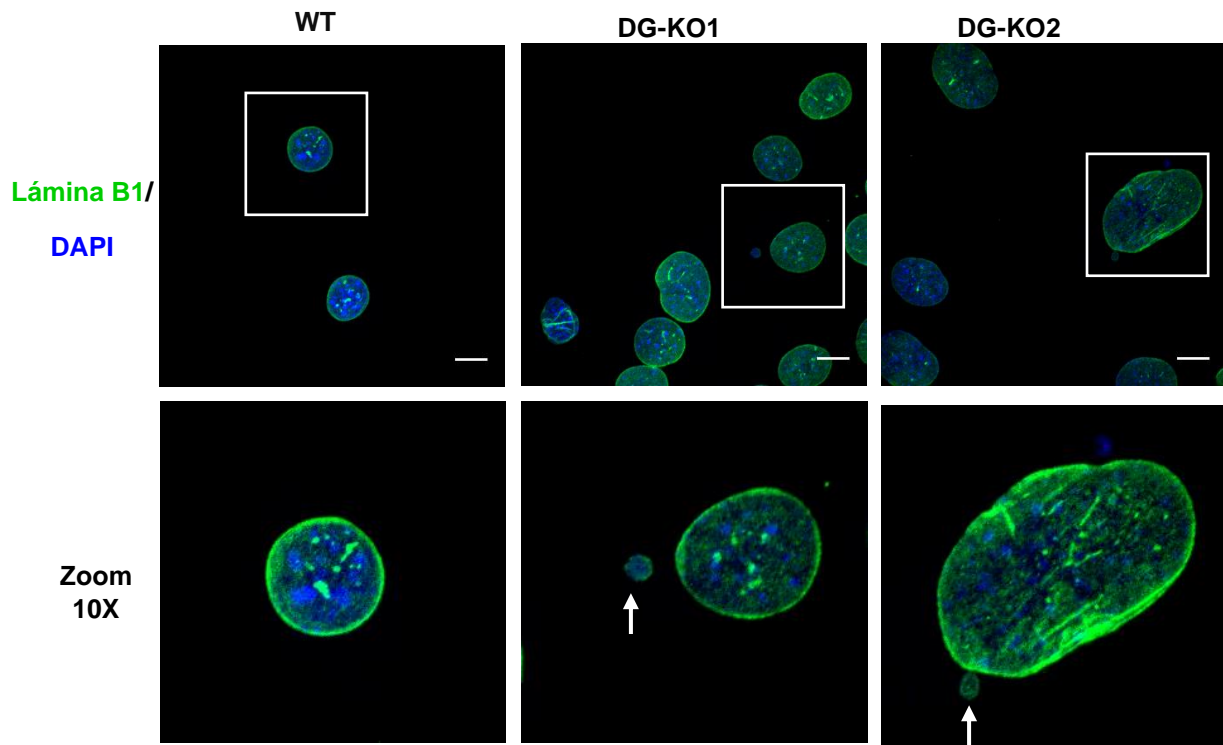
al. 2010). De manera consistente con nuestra hipótesis, observamos un incremento notorio en la intensidad de la fluorescencia de los focos teñidos con anticuerpos contra la histona γ -H2Ax en las células DG-KO después del tratamiento con timidina, en comparación con las células WT (Figura 11.4 B). Aunado a lo anterior, encontramos también un número alto de micronúcleos como respuesta al tratamiento con timidina en los cultivos de las clonas DG-KO1 (75%) y DG-KO2 (hasta 90%), en comparación con las células WT (20%). La presencia de los micronúcleos es otra evidencia de daño en el DNA e inestabilidad cromosómica (Maass, Rosing et al. 2018). Para confirmar estos resultados, analizamos si las células DG-KO no sincronizadas con timidina generan micronúcleos en ausencia de agentes que dañan al DNA. Después de una inmunotinción para la lámina B1 encontramos un número de micronúcleos más alto en las células DG-KO1 (8%) y DG-KO2 (10%), en comparación con las células WT (4%) (Figura 11.4 C). Una mitosis aberrante y el daño al DNA pueden activar la vía de señalización de p53/p21 en las células nulas para el DG, y consecuentemente inducir senescencia celular. De acuerdo con esta idea, el nivel de p53 se incrementó en las células DG-KO tratadas con timidina, en comparación con las células WT, mientras que p21 aumentó solamente en la clona DG-KO1 (Figura 11.4 D). En su conjunto, estos resultados sugieren que la ausencia del DG genera mitosis multipolares, lo que a su vez induce la respuesta de daño en el DNA a través de la activación de p53 y el arresto del ciclo celular.

A

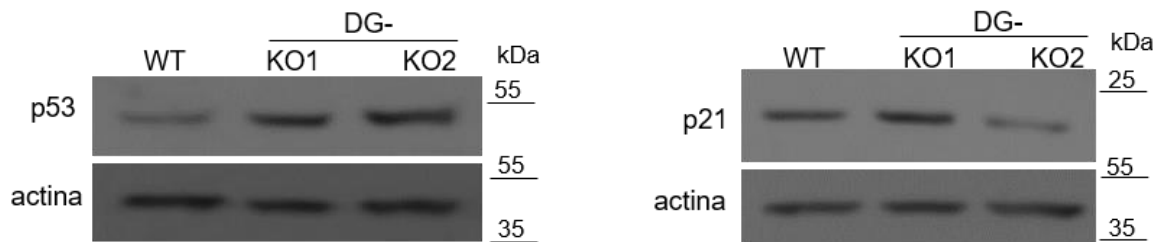




C



D

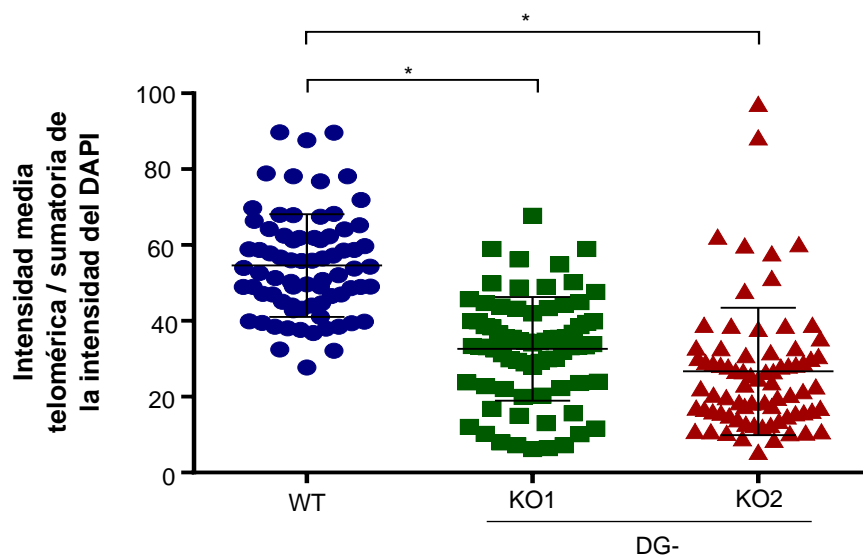
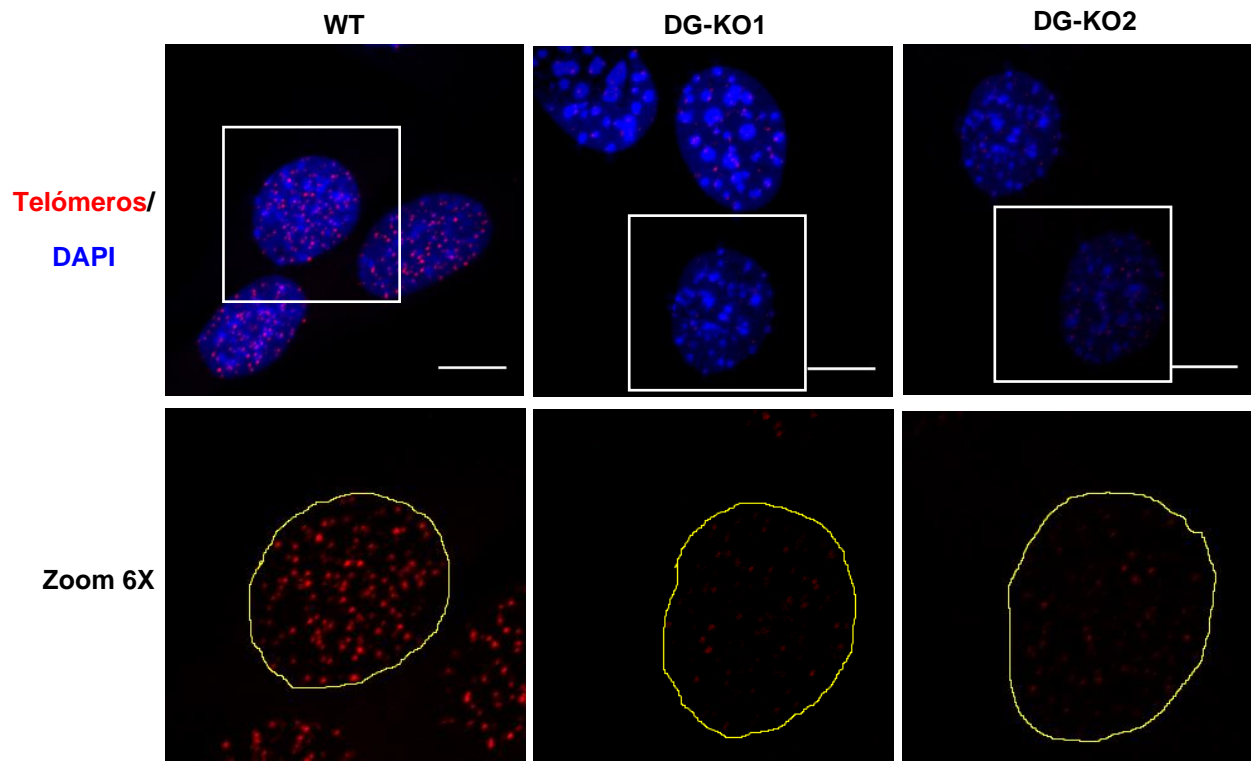


*Figura 11.4.1 Las células DG-KO presentan una mitosis aberrante que activa la respuesta de daño al DNA dependiente de p53. (A) Las células WT, DG-KO1 y DG-KO2 se sembraron sobre cubreobjetos y se arrestaron en la fase S del ciclo celular por medio de doble tratamiento con timidina. Posteriormente se liberaron por 4 horas para permitir su progresión hacia la mitosis. Las preparaciones celulares se inmunotñieron con anticuerpos contra la α -tubulina y la γ -tubulina para visualizar los husos mitóticos y los centrosomas, respectivamente. Posteriormente se contra-tñieron con DAPI para visualizar los núcleos y se sometieron a microscopía confocal. La gráfica de la parte inferior muestra el porcentaje de husos mitóticos múltiples en cada cultivo celular después de llevar a cabo tres experimentos independientes (n=50 células de cada cultivo); el análisis estadístico se llevó a cabo con análisis de ANOVA unifactorial y posterior prueba de Dunnett; *p<0.05 en comparación con WT. (B) Las células WT, DG-KO1 y DG-KO2 se trataron con timidina como se describió en el panel A. Las preparaciones celulares se tñieron con anticuerpos contra la histona γ H2Ax y con DAPI para visualizar los núcleos, previo al análisis por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. En la gráfica de la parte inferior se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los focos de la histona γ H2Ax (análisis de Kruskal-Wallis seguido por prueba de Dunn) y el porcentaje de micronúcleos (análisis de ANOVA unifactorial y posterior prueba de Dunnett) observados en cada cultivo celular (n=100 células por cada cultivo); *p<0.05 comparado con las células WT. (C) Los cultivos asincrónicos de células WT, DG-KO1 y DG-KO2 se inmunotñieron con anticuerpos contra la lámina B1 y se hizo una contratñición con DAPI para visualizar los núcleos, previo al análisis por microscopía confocal. En la gráfica de la parte inferior de la figura se muestra el porcentaje de células con micronúcleos (n=100 células por cada cultivo celular). Las diferencias significativas se determinaron con el análisis de ANOVA unifactorial y la posterior prueba de Dunnett; *p<0.05 en comparación con WT. (D) Los lisados de las células WT, DG-KO1 y DG-KO2, tratados con timidina como se describe en el panel A, se analizaron mediante ensayos de inmunotñición en fase sólida, usando anticuerpos específicos contra p53, p21 o actina (control de carga). Se muestran placas de rayos X representativas de dos experimentos independientes.*

Ya que la respuesta de daño al DNA puede inducir acortamiento telomérico independientemente de la actividad de la telomerasa (Hewitt, Jurk et al. 2012), procedimos a estimar la longitud de los telómeros en las células deficientes de DG a través de hibridación *in situ* cuantitativa acoplada a fluorescencia (Q-FISH), empleando como sonda a un oligonucléotido marcada con fluoresceína (Figura 11.4.2). Esta técnica asume que la sonda hibrida cuantitativamente con la secuencia

de repetidos de los telómeros, de tal manera que la intensidad de la fluorescencia obtenida mediante la hibridación se relaciona directamente con la longitud de los telómeros (Hultdin, Grönlund et al. 1998, O'Sullivan, Finley et al. 2004). Observamos que la intensidad de la fluorescencia de los focos de hibridación fue marcadamente menor en las células DG-KO, en comparación con las células WT (Figura 11.3.4).

A



*Figura 11.3.4 Las células DG-KO presentan un acortamiento telomérico. Las células WT, DG-KO1 y DG-KO2 se sometieron a hibridación in situ cuantitativa (Q-FISH), utilizando una sonda que hibrida con la región de los repetidos teloméricos (ver la Metodología para más detalles), y los núcleos se tiñeron con DAPI. Las preparaciones se analizaron por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes; barra, 10 μ m. En la gráfica de la parte inferior se muestra la cuantificación de la longitud relativa de los telómeros (intensidad media de la fluorescencia de los telómeros/sumatoria de la intensidad de fluorescencia del DAPI (n=75 células por cada cultivo celular). Las diferencias significativas se calcularon mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el análisis de Dunn; * $p < 0.05$, en comparación con las células WT.*

12. DISCUSIÓN

En este estudio generamos un modelo celular basado en la línea de mioblastos de ratón C2C12 que no expresa el DG (α -DG y β -DG), por medio del empleo de la tecnología CRISPR-Cas9. En la literatura existen pocos modelos para el estudio del DG y en particular nuestro grupo de trabajo está interesado en definir la función nuclear del β -DG. En estudios de nuestro laboratorio se evidenció la participación del β -DG en el mantenimiento de la estructura y función de la NE (Martínez-Vieyra, Vásquez-Limeta et al. 2013, Vélez-Aguilera, de Dios Gómez-López et al. 2018), sin embargo, la base molecular de su función nuclear se desconoce. Obtuvimos dos clonas que no expresan al DG, las cuales denominamos DG-KO1 y DG-KO2. Ambas clonas presentan una disminución en el nivel de las proteínas Dp71, α -distrobrevina y β 2-sintrofina (Ervasti and Sonnemann 2008). Estas tres proteínas pertenecen junto con el β -DG al complejo de proteínas que se asocian con la distrofina (DAPC, por sus siglas en inglés). El hecho de que la ausencia del DG afecte el nivel de estas proteínas validó nuestro modelo celular.

Enfocamos nuestro estudio en la interacción del β -DG con la lámina B1 que hemos descrito previamente (Martínez-Vieyra, Vásquez-Limeta et al. 2013), debido a que la lámina B1 participa en una plétora de procesos nucleares, incluidos la remodelación de la heterocromatina, la progresión del ciclo celular, la morfología nuclear, la expresión de genes, el procesamiento alternativo y la senescencia celular (Dechat, Pflieger et al. 2008). De hecho, la disminución del nivel de la proteína lámina B1 es un evento necesario para la célula transite hacia un estado senescente (Shimi, Butin-Israeli et al. 2011, Lukášová, Kovařík et al. 2018).

Debido a que en nuestros primeros experimentos encontramos que el nivel de la lámina B1 disminuyó significativamente en las clonas DG-KO1 y DG-KO2, especulamos que estas células podrían adquirir un fenotipo senescente. Consistente con nuestra idea, las células DG-KO mostraron diferentes marcas de senescencia en ausencia de cualquier estímulo, incluyendo disminución de la proliferación celular, arresto en la fase G0/G1, aumento de células con tinción positiva para la enzima SA β -gal (marcador de senescencia), disgregación

nucleolar, morfología celular senescente y pérdida de heterocromatina. A pesar de que estas características fueron más prominentes en las células WT inducidas a senescencia mediante tratamiento con NaBu, las células DG-KO respondieron más rápido a la inducción de senescencia con NaBu que las células WT. Nuestros resultados sugieren que la ausencia del DG hace que las células DG-KO adquieran un estado pre-senescente que vuelve más sensibles a los estímulos que provocan senescencia. La senescencia celular se induce por diferentes estímulos, incluyendo una duplicación celular exhaustiva, daño al DNA, estrés oxidativo, acortamiento telomérico y estímulos oncogénicos (Martins, Sousa et al. 2020, Prieto, Graves et al. 2020). En un intento por descifrar cómo es que la pérdida de DG genera senescencia prematura, recurrimos a resultados previos de nuestro laboratorio que podrían conectar al DG con daño al DNA; previamente demostramos que la disminución del nivel del DG en las células C2C12 causa un aumento en el número de centrosomas (Martínez-Vieyra, Vásquez-Limeta et al. 2013), esta anomalía podría ocasionar a su vez husos mitóticos multipolares (Gergely and Basto 2008, Vitre and Cleveland 2012). En apoyo a nuestra idea, observamos frecuentemente husos mitóticos múltiples en los cultivos de las clonas DG-KO, en comparación con las células WT. Además, las células DG-KO presentaron micronúcleos y acortamiento telomérico, dos características que indican daño al DNA e inestabilidad genómica (Lerit and Poulton 2016). La formación de los micronúcleos ocurre con mayor frecuencia cuando las células DG-KO se someten al tratamiento con timidina. Esto se explica porque la timidina disminuye la progresión de las asas de replicación de DNA, lo que induce la respuesta del daño al DNA (Bolderson, Scolah et al. 2004).

Consistente con una respuesta de daño al DNA exacerbada en las células DG-KO, encontramos un aumento en la señal fluorescente de la forma fosforilada de la histona H2Ax (γ -H2Ax) después de la exposición a timidina, en comparación con las células WT. La histona γ -H2Ax organiza la reparación del DNA reclutando factores de reparación alrededor de los sitios de rupturas de la doble cadena del DNA (DSBs, por sus siglas en inglés), incluyendo MRE11/NBS1/RAD50, MDC1, 53BP1 y BRCA1 (Podhorecka, Skladanowski et al. 2010, Georgoulis, Vorgias et al. 2017).

En apoyo a la noción de que la deficiencia de DG hace que la célula sea más sensible al daño en el DNA, observamos una activación fuerte de la vía de p53 en las clonas DG-KO tratadas con timidina, en comparación con las células WT. Sin embargo, la activación de p21, que es un blanco de p53 solo ocurrió en una clona DG-KO. Por lo tanto, no se pueda descartar que la heterogeneidad entre las células DG-KO1 y DG-KO2 se deba a efectos de clonación; por ejemplo, alteraciones no deseadas en otros sitios del genoma por el sistema CRISPR-Cas.

Un enigma de nuestro estudio es, ¿cómo las células DG-KO adquieren múltiples centrosomas? Una marca frecuente de las células cancerosas (Gönczy 2015). Un número anormal de centrosomas puede ser el resultado de una duplicación anormal de los centrosomas, y/o fallas en la citocinesis. A la fecha se conocen varias proteínas que regulan el ciclo de duplicación de los centrosomas, incluyendo Polo-like-kinasa-4, la ciclina dependiente de la cinasa 2, y SPD-2 (Pihan 2013). Sin embargo, ninguna de éstas se han relacionado con el DG hasta ahora. A este respecto, es importante mencionar que el β -DG se localiza en el surco y cuerpo medio del aparato de la citocinesis (Higginson, Thompson et al. 2008); por lo tanto, podemos proponer que la ausencia del DG provoca amplificación centrosomal a través de un daño en la citocinesis. No obstante, el hecho de que no observamos células binucleadas en los cultivos de las clonas DG-KO se opone a esta hipótesis. Por otro lado, considerando que las láminas de tipo B están involucradas en el ensamble y mantenimiento del huso mitótico en *Xenopus* (Tsai, Wang et al. 2006), es posible que los husos mitóticos multipolares se deban a la disminución de la lámina B1 que se observa en las células DG-KO. Se requieren experimentos adicionales para elucidar la función del DG en la duplicación de los centrosomas y la organización de la mitosis. A pesar de que la edición genómica por CRISPR-Cas9 abate la expresión del α -DG y del β -DG, creemos que el fenotipo senescente de las clonas DG-KO está ligado a la deficiencia nuclear del β -DG, debido a que la lámina B1, que es una proteína clave para la senescencia celular, interacciona con el β -DG (Martínez-Vieyra, Vásquez-Limeta et al. 2013, Vélez-Aguilera, de Dios Gómez-López et al. 2018). No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que la ausencia del α -DG influye en el fenotipo senescente de las células DG-KO, a través

de la alteración de la señalización que ocurre a través del eje matriz extracelular/citoesqueleto/núcleo (Hieda 2019).

13.CONCLUSIONES

En resumen, nuestros datos son consistentes con la hipótesis que postula que interferir en la función del distroglicano produce aberraciones en la mitosis, que activan la respuesta de daño en el DNA dependiente de p53, arrestan la progresión del ciclo celular e inducen el fenotipo senescente para evitar la propagación del daño en el genoma.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. The Nucleolus, Mark O. J. Olson 2011, eBook ISBN 978-1-4614-0514-6, Publisher Springer-Verlag New York. DOI:10.1007/978-1-4614-0514-6
2. Springer-Verlag New York. DOI:10.1007/978-1-4614-0514-6
3. Adam, S. A., V. Butin-Israeli, M. M. Cleland, T. Shimi and R. D. Goldman (2013). "Disruption of lamin B1 and lamin B2 processing and localization by farnesyltransferase inhibitors." Nucleus **4**(2): 142-150.
4. Azuara-Medina, P. M., A. M. Sandoval-Duarte, S. L. Morales-Lazaro, R. Modragon-Gonzalez, G. Velez-Aguilera, J. D. Gomez-Lopez, G. E. Jimenez-Gutierrez, R. Tiburcio-Felix, I. Martinez-Vieyra, R. Suarez-Sanchez, G. Langst, J. J. Magana, S. J. Winder and A. Ortega (2019). "The intracellular domain of beta-dystroglycan mediates the nucleolar stress response by suppressing UBF transcriptional activity." Nucleus **10**(3): 196.
5. Barresi, R. and K. P. Campbell (2006). "Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease." J Cell Sci **119**(Pt 2): 199-207.
6. Batchelor, C. L., J. R. Higginson, Y. J. Chen, C. Vanni, A. Eva and S. J. Winder (2007). "Recruitment of Dbl by ezrin and dystroglycan drives membrane proximal Cdc42 activation and filopodia formation." Cell Cycle **6**(3): 353-363.
7. Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, J. Navascués and A. I. Lamond (2007). "The multifunctional nucleolus." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 574-585.
8. Bolderson, E., J. Scorch, T. Helleday, C. Smythe and M. Meuth (2004). "ATM is required for the cellular response to thymidine induced replication fork stress." Hum Mol Genet **13**(23): 2937-2945.
9. Bozzi, M., S. Morlacchi, M. G. Bigotti, F. Sciandra and A. Brancaccio (2009). "Functional diversity of dystroglycan." Matrix Biol **28**(4): 179-187.
10. Brown, S. C., S. Torelli, M. Brockington, Y. Yuva, C. Jimenez, L. Feng, L. Anderson, I. Ugo, S. Kroger, K. Bushby, T. Voit, C. Sewry and F. Muntoni (2004). "Abnormalities in alpha-dystroglycan expression in MDC1C and LGMD2I muscular dystrophies." Am J Pathol **164**(2): 727-737.
11. Burke, B. and C. L. Stewart (2013). "The nuclear lamins: flexibility in function." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(1): 13-24.
12. Butin-Israeli, V., S. A. Adam, N. Jain, G. L. Otte, D. Neems, L. Wiesmüller, S. L. Berger and R. D. Goldman (2015). "Role of lamin b1 in chromatin instability." Mol Cell Biol **35**(5): 884-898.
13. Camps, J., M. R. Erdos and T. Ried (2015). "The role of lamin B1 for the maintenance of nuclear structure and function." Nucleus **6**(1): 8-14.
14. Carnero, A. (2013). "Markers of cellular senescence." Methods Mol Biol **965**: 63-81.
15. Daniel Leocadio, A. M., and Steve J. Winder (2016). "gamma-Secretase Dependent Nuclear Targeting of Dystroglycan. Daniel Leocadio, Andrew Mitchell, and Steve J. Winder." J Cell Biochem **117**(10): 2436.
16. Dechat, T., K. Pflieger, K. Sengupta, T. Shimi, D. K. Shumaker, L. Solimando and R. D. Goldman (2008). "Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin." Genes Dev **22**(7): 832-853.

17. Dechat, T., S. Vlcek and R. Foisner (2000). "Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics." J Struct Biol **129**(2-3): 335-345.
18. Deyst, K. A., M. A. Bowe, J. D. Leszyk and J. R. Fallon (1995). "The alpha-dystroglycan-beta-dystroglycan complex. Membrane organization and relationship to an agrin receptor." J Biol Chem **270**(43): 25956-25959.
19. Dreesen, O., A. Chojnowski, P. F. Ong, T. Y. Zhao, J. E. Common, D. Lunny, E. B. Lane, S. J. Lee, L. A. Vardy, C. L. Stewart and A. Colman (2013). "Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence." J Cell Biol **200**(5): 605-617.
20. Dulic, V. (2013). "Senescence regulation by mTOR." Methods Mol Biol **965**: 15-35.
21. Ervasti, J. M. and K. J. Sonnemann (2008). "Biology of the striated muscle dystrophin-glycoprotein complex." Int Rev Cytol **265**: 191-225.
22. Fairclough, R. J., M. J. Wood and K. E. Davies (2013). "Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches." Nat Rev Genet **14**(6): 373-378.
23. Filippi-Chiela, E. C., M. M. Oliveira, B. Jurkovski, S. M. Callegari-Jacques, V. D. da Silva and G. Lenz (2012). "Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities." PLoS One **7**(8): e42522.
24. Freund, A., R. M. Laberge, M. Demaria and J. Campisi (2012). "Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker." Mol Biol Cell **23**(11): 2066-2075.
25. García-Aguirre, I., A. Alamillo-Iniesta, R. Rodríguez-Pérez, G. Vélez-Aguilera, E. Amaro-Encarnación, E. Jiménez-Gutiérrez, A. Vásquez-Limeta, M. Samuel Laredo-Cisneros, S. L. Morales-Lázaro, R. Tiburcio-Félix, A. Ortega, J. J. Magaña, S. J. Winder and B. Cisneros (2019). "Enhanced nuclear protein export in premature aging and rescue of the progeria phenotype by modulation of CRM1 activity." **18**(5): e13002.
26. Georgoulis, A., C. E. Vorgias, G. P. Chrousos and E. P. Rogakou (2017). "Genome Instability and γ H2AX." Int J Mol Sci **18**(9).
27. Gergely, F. and R. Basto (2008). "Multiple centrosomes: together they stand, divided they fall." Genes Dev **22**(17): 2291-2296.
28. Gönczy, P. (2015). "Centrosomes and cancer: revisiting a long-standing relationship." Nat Rev Cancer **15**(11): 639-652.
29. Gonzalez-Ramirez, R., S. L. Morales-Lazaro, V. Tapia-Ramirez, D. Mornet and B. Cisneros (2008). "Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis." J Cell Biochem **105**(3): 735-745.
30. Gumerson, J. D. and D. E. Michele (2011). "The dystrophin-glycoprotein complex in the prevention of muscle damage." J Biomed Biotechnol **2011**: 210797.
31. Henry, M. D. and K. P. Campbell (1996). "Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **8**(5): 625-631.
32. Hewitt, G., D. Jurk, F. D. Marques, C. Correia-Melo, T. Hardy, A. Gackowska, R. Anderson, M. Taschuk, J. Mann and J. F. Passos (2012). "Telomeres are favoured

- targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence." Nat Commun **3**: 708.
33. Hieda, M. (2019). "Signal Transduction across the Nuclear Envelope: Role of the LINC Complex in Bidirectional Signaling." Cells **8**(2).
 34. Higginson, J. R., O. Thompson and S. J. Winder (2008). "Targeting of dystroglycan to the cleavage furrow and midbody in cytokinesis." Int J Biochem Cell Biol **40**(5): 892-900.
 35. Hultdin, M., E. Grönlund, K. Norrback, E. Eriksson-Lindström, T. Just and G. Roos (1998). "Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry." Nucleic Acids Res **26**(16): 3651-3656.
 36. Hutchison, C. J. (2014). "B-type lamins in health and disease." Semin Cell Dev Biol **29**: 158-163.
 37. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., J. M. Ervasti, C. J. Leveille, C. A. Slaughter, S. W. Sernett and K. P. Campbell (1992). "Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix." Nature **355**(6362): 696-702.
 38. Jayasinha, V., H. H. Nguyen, B. Xia, A. Kammesheidt, K. Hoyte and P. T. Martin (2003). "Inhibition of dystroglycan cleavage causes muscular dystrophy in transgenic mice." Neuromuscul Disord **13**(5): 365-375.
 39. Kuilman, T., C. Michaloglou, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2010). "The essence of senescence." Genes Dev **24**(22): 2463-2479.
 40. Lara-Chacón, B., M. B. de León, D. Leocadio, P. Gómez, L. Fuentes-Mera, I. Martínez-Vieyra, A. Ortega, D. A. Jans and B. Cisneros (2010). "Characterization of an Importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan." J Cell Biochem **110**(3): 706-717.
 41. Lerit, D. A. and J. S. Poulton (2016). "Centrosomes are multifunctional regulators of genome stability." Chromosome Res **24**(1): 5-17.
 42. Lindström, M. S. and Y. Zhang (2006). "B23 and ARF: friends or foes?" Cell Biochem Biophys **46**(1): 79-90.
 43. Liu, N. A., J. Sun, K. Kono, Y. Horikoshi, T. Ikura, X. Tong, T. Haraguchi and S. Tashiro (2015). "Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage." Faseb j **29**(6): 2514-2525.
 44. Lukášová, E., A. Kovařík and S. Kozubek (2018). "Consequences of Lamin B1 and Lamin B Receptor Downregulation in Senescence." Cells **7**(2).
 45. Maass, K. K., F. Rosing, P. Ronchi, K. V. Willmund, F. Devens, M. Hergt, H. Herrmann, P. Lichter and A. Ernst (2018). "Altered nuclear envelope structure and proteasome function of micronuclei." Exp Cell Res **371**(2): 353-363.
 46. Martin, C., S. Chen, A. Maya-Mendoza, J. Lovric, P. F. Sims and D. A. Jackson (2009). "Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli." J Cell Sci **122**(Pt 10): 1551-1562.
 47. Martinez-Vieyra, I. A., A. Vasquez-Limeta, R. Gonzalez-Ramirez, S. L. Morales-Lazaro, M. Mondragon, R. Mondragon, A. Ortega, S. J. Winder and B. Cisneros (2013). "A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts." Biochim Biophys Acta **1833**(3): 698-711.

48. Martínez-Vieyra, I. A., A. Vásquez-Limeta, R. González-Ramírez, S. L. Morales-Lázaro, M. Mondragón, R. Mondragón, A. Ortega, S. J. Winder and B. Cisneros (2013). "A role for β -dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts." *Biochim Biophys Acta* **1833**(3): 698-711.
49. Martins, F., J. Sousa, C. D. Pereira, E. S. O. A. B. da Cruz and S. Rebelo (2020). "Nuclear envelope dysfunction and its contribution to the aging process." e13143.
50. Mattaj, I. W. (2004). "Sorting out the nuclear envelope from the endoplasmic reticulum." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(1): 65-69.
51. McHugh, D. and J. Gil (2018). "Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues." **217**(1): 65-77.
52. Moore, C. J. and S. J. Winder (2010). "Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs." *Cell Commun Signal* **8**: 3.
53. Muntoni, F. (2004). "Journey into muscular dystrophies caused by abnormal glycosylation." *Acta Myol* **23**(2): 79-84.
54. O'Sullivan, J. N., J. C. Finley, R. A. Risques, W. T. Shen, K. A. Gollahon, A. H. Moskovitz, S. Gryaznov, C. B. Harley and P. S. Rabinovitch (2004). "Telomere length assessment in tissue sections by quantitative FISH: image analysis algorithms." *Cytometry A* **58**(2): 120-131.
55. Petrova, N. V., A. K. Velichko, S. V. Razin and O. L. Kantidze (2016). "Small molecule compounds that induce cellular senescence." *Aging Cell* **15**(6): 999-1017.
56. Pihan, G. A. (2013). "Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprogramming in cancer." *Front Oncol* **3**: 277.
57. Podhorecka, M., A. Skladanowski and P. Bozko (2010). "H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy." *J Nucleic Acids* **2010**.
58. Prieto, L. I., S. I. Graves and D. J. Baker (2020). "Insights from In Vivo Studies of Cellular Senescence." **9**(4).
59. Ranade, D., R. Pradhan, M. Jayakrishnan, S. Hegde and K. Sengupta (2019). "Lamin A/C and Emerin depletion impacts chromatin organization and dynamics in the interphase nucleus." **20**(1): 11.
60. Shimi, T., V. Butin-Israeli, S. A. Adam, R. B. Hamanaka, A. E. Goldman, C. A. Lucas, D. K. Shumaker, S. T. Kosak, N. S. Chandel and R. D. Goldman (2011). "The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence." *Genes Dev* **25**(24): 2579-2593.
61. Spence, H. J., A. S. Dhillon, M. James and S. J. Winder (2004). "Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade." *EMBO Rep* **5**(5): 484-489.
62. Tichy, E. D., D. K. Sidibe, M. T. Tierney, M. J. Stec, M. Sharifi-Sanjani, H. Hosalkar, S. Mubarak, F. B. Johnson, A. Sacco and F. Mourkioti (2017). "Single Stem Cell Imaging and Analysis Reveals Telomere Length Differences in Diseased Human and Mouse Skeletal Muscles." *Stem Cell Reports* **9**(4): 1328-1341.
63. Tsai, M. Y., S. Wang, J. M. Heidinger, D. K. Shumaker, S. A. Adam, R. D. Goldman and Y. Zheng (2006). "A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly." *Science* **311**(5769): 1887-1893.
64. Vaughan, A., M. Alvarez-Reyes, J. M. Bridger, J. L. Broers, F. C. Ramaekers, M. Wehnert, G. E. Morris, W. G. F. Whitfield and C. J. Hutchison (2001). "Both emerin

- and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope." J Cell Sci **114**(Pt 14): 2577-2590.
65. Vélez-Aguilera, G., J. de Dios Gómez-López, G. E. Jiménez-Gutiérrez, A. Vásquez-Limeta, M. S. Laredo-Cisneros, P. Gómez, S. J. Winder and B. Cisneros (2018). "Control of nuclear β -dystroglycan content is crucial for the maintenance of nuclear envelope integrity and function." Biochim Biophys Acta Mol Cell Res **1865**(2): 406-420.
 66. Vitre, B. D. and D. W. Cleveland (2012). "Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy." Curr Opin Cell Biol **24**(6): 809-815.
 67. Wagstaff, K. M. and D. A. Jans (2009). "Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms." Traffic **10**(9): 1188-1198.
 68. Wang, A. S. and O. Dreesen (2018). "Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging." Front Genet **9**: 247.
 69. Yaffe, D. and O. Saxel (1977). "Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle." Nature **270**(5639): 725-727.
 70. Zhang, H., L. Sun, K. Wang, D. Wu, M. Trappio, C. Witting and K. Cao (2016). "Loss of H3K9me3 Correlates with ATM Activation and Histone H2AX Phosphorylation Deficiencies in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." PLoS One **11**(12): e0167454.