

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

***“Efecto de los repetidos CTG de la Distrofia Miotónica de tipo 1  
sobre la estructura y función del núcleo “***

**Tesis que presenta**

M. en C. ARIANA MARIA SANDOVAL DUARTE

**Para obtener el grado de**

Doctora en ciencias

**En la Especialidad de**

Genética y Biología Molecular

**Directores de Tesis:**

DR. BULMARO CISNEROS VEGA

DR. JOSÉ EFRAIN GARRIDO GUERRERO

**Asesores:**

DR. FRANCISCO JAVIER CAMACHO ARROYO

DRA. MARÍA DEL ROCÍO SUÁREZ SÁNCHEZ

DR. OSCAR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DR. JAIME GARCIA MENA

Ciudad de México.

Agosto del 2020.

Este trabajo fue realizado en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N (CINVESTAV), unidad Zacatenco, bajo la tutoría del Dr. Bulmaro Cisneros Vega y el Dr. José Efraín Garrido Guerrero del departamento de Genética y Biología Molecular y bajo la asesoría del Dr. Jaime García Mena perteneciente al mismo departamento, así como del Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo del departamento de Farmacología y los Doctores Oscar Hernández Hernández y María del Rocío Suárez Sánchez ambos pertenecientes al Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

El presente trabajo fue apoyado por el CONACYT a través del proyecto 237123 y por el proyecto con número de referencia 242 de la SEP/CINVESTAV.

Durante la realización del mismo, la estudiante Ariana María Sandoval Duarte fue apoyada como becaria del CONACYT con el número de registro 485071.

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Dios, por permitirme llegar hasta este día y haber logrado uno de los más grandes retos que he presentado hasta ahora en mi vida.
- ❖ A mis padres, por todo su amor, apoyo incondicional y constante motivación para lograr cualquier cosa que me proponga, saben que todo lo que soy es gracias a ustedes.
- ❖ A mi hermana, que a pesar de que la mayor parte del tiempo estamos lejos, siempre la siento muy presente y cerquita en mi vida, gracias también por todo tu amor, apoyo y cariño.
- ❖ A mi novio Alex, que siempre estuvo apoyándome en los momentos de crisis durante el doctorado y fuera de él, por los bonitos momentos de cariño y diversión y por todo lo compartido hasta ahora.
- ❖ Al Dr. Bulmaro Cisneros por recibirme nuevamente en su laboratorio y permitirme desempeñarme dentro de él a pesar de las dificultades con los proyectos, muchas gracias por todas sus enseñanzas, su confianza y su paciencia.
- ❖ A los Doctores José Efraín Garrido Guerrero, Francisco Camacho Arroyo, María del Rocío Suárez Sánchez, Oscar Hernández Hernández y Jaime García Mena por todo su apoyo y consejos durante la realización de este proyecto.
- ❖ A Ricardo y a Ian por su apoyo y enseñanzas al emprender este proyecto juntos en tan bonito tema.

- ❖ A mis compañeros y amigos: Pau, Salma, Gris, Juan de Dios, Wendy, Mau, Nely y Adri que fueron más que mis compañeros en esta estancia doctoral, gracias por su amistad, sus consejos y por los momentos compartidos.
- ❖ A mis amigos Melissa, Adriana, Ramsés, Vale y Christian por su compañía, amistad incondicional y cariño durante ya muchos años y por hacerme sentir en familia a pesar de estar fuera de casa.
- ❖ A mis amigos de generación, Mayram y Alex por todo su apoyo y amistad incondicional.
- ❖ A Pablo, auxiliar del laboratorio, por todos sus consejos, apoyo e invaluable amistad.
- ❖ A la Dra. Rosa María Bermúdez, a Luisa y a los chicos del laboratorio 16 que siempre me apoyaron para resolver dudas o crisis en algún experimento, y por hacerme parte de su grupo, muchas gracias también por su bonita amistad.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓON .....	9
La Distrofia miotónica de tipo 1 (DM1) .....	9
Mecanismos causantes de la DM1 .....	10
El núcleo .....	11
La envoltura nuclear .....	12
La lámina nuclear .....	13
Funciones de la lámina nuclear .....	13
Organización de la cromatina .....	15
El nucleolo .....	15
Antecedentes .....	17
JUSTIFICACIÓN .....	19
HIPÓTESIS .....	19
OBJETIVOS .....	20
Objetivo General .....	20
Objetivos particulares .....	20
MODELO DE ESTUDIO .....	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL .....	22
MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
Cultivo celular .....	23
Inmunofluorescencia indirecta .....	23
Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.....	24
Hibridación <i>in situ</i> .....	25
Hibridación <i>in situ</i> acoplada a Inmunofluorescencia indirecta .....	25
Microscopía confocal y análisis de imágenes .....	26
Transformación bacteriana .....	26
Obtención de ADN plasmídico por columna.....	26
Construcción de vectores .....	27

Transfección celular .....	28
Extracción de proteínas totales .....	29
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	29
Análisis de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida.....	29
Inmunodetección en fase sólida .....	30
Anticuerpos utilizados para Inmunodetección en fase sólida (W.B.).....	30
Análisis del perfil de ciclo celular mediante citometría de flujo .....	31
Ensayo de la actividad de $\beta$ -Galactosidasa .....	32
RESULTADOS .....	33
La expresión de las láminas nucleares y LBR se encuentra alterada en fibroblastos de DM1.....	33
Los fibroblastos de DM1 presentan aumento en la formación de focos de heterocromatina.....	36
Los fibroblastos de DM1 presentan expansión nucleolar y alteración de la expresión de proteínas nucleolares.....	38
La expansión nucleolar en los fibroblastos de DM1 parece estar directamente ligada a la presencia de los repetidos CUG en el núcleo.....	42
Los fibroblastos de DM1 presentan marcas de estrés celular.....	44
Participación del $\beta$ -distroglicano en la función del nucléolo como sensor de respuesta a estrés celular.....	46
La sobreexpresión del dominio intracelular (ICD) del $\beta$ -DG recrea la deslocalización y expresión disminuida de UBF .....	49
DISCUSIÓN .....	54
CONCLUSIONES .....	57
PERSPECTIVAS .....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

## RESUMEN

La Distrofia miotónica de tipo 1 (DM1) es una enfermedad autosómica dominante que afecta múltiples órganos y tejidos y es causada por la presencia de repetidos CTG en el extremo 3' UTR del gen DMPK. Los transcritos de este gen, forman estructuras secundarias aberrantes debido a la presencia de los repetidos CUG, secuestrando de esta manera a proteínas implicadas en el proceso de splicing alternativo dentro del núcleo y provocando la alteración en la expresión genética lo que conlleva al desarrollo de los fenotipos característicos de esta enfermedad.

En este estudio demostramos que altos niveles de las láminas nucleares así como de proteínas implicadas en la formación de heterocromatina, pueden ser la causa de las alteraciones en la morfología nuclear presentes en fibroblastos de DM1. Demostramos además, que el nucleolo, el compartimento nuclear encargado de la biogénesis ribosomal y de sensor el estrés celular; se encuentra afectado por los repetidos CTG/CUG de la DMPK al presentar el fenotipo de expansión nucleolar ocasionado posiblemente por la desregulación de las proteínas B23 y UBF y la activación de vías de respuesta a estrés mediadas por p53 en estos cultivos de DM1.

De manera importante, las alteraciones observadas en los fibroblastos de DM1, se presentan en todos los cultivos analizados, los cuales contienen distinto número de repetidos CTG, sugiriendo la implicación directa de los transcritos mutantes de la DMPK en el desarrollo de estos fenotipos. Esto fue posible comprobarlo, mediante la transfección de 960 repetidos CTG/CUG en fibroblastos control, donde los fenotipos de morfología nuclear aberrante y expansión nucleolar se reproducen. Por lo tanto, este trabajo contribuye al entendimiento de la disfunción nuclear de los fibroblastos de DM1, lo cual puede ser clave en el establecimiento de los fenotipos característicos de esta enfermedad.

## **ABSTRACT**

Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) is an autosomal dominant disease affecting multiple organs and tissues. DM1 is caused by an expanded CTG repeat in the 3' untranslated region of the DMPK gene which in turn is transcribed to originate aberrant RNA structures that sequester alternative splicing factors leading to altered gene expression and to the development of the DM1 phenotype.

Here, we show that high levels of nuclear lamins and heterochromatin proteins can be the mechanism involved in the alterations of the nuclear envelope seen in DM1 fibroblasts. We also demonstrate that the nucleolus, a nuclear compartment responsible for ribosomal biogenesis and sensing cell stress, is affected by the DMPK repeats by presenting nucleolar expansion and the deregulation of the nucleolar proteins UBF and B23 which can probably activate the p53 signalling cascade in DM1 fibroblasts.

Importantly, all these alterations are present in all DM1 cultures analyzed containing different CTG repeat number suggesting direct involvement of the DMPK mutant transcripts in the development of these phenotypes. To prove this, we transfected 960 CTG repeats into control fibroblasts seeing that nuclear morphology alterations and expanded nucleoli were reproduced. Overall, this work contributes to the knowledge of nuclear dysfunction in DM1 fibroblasts which can be a key point for the establishment of the DM1 phenotype.

## INTRODUCCIÓN

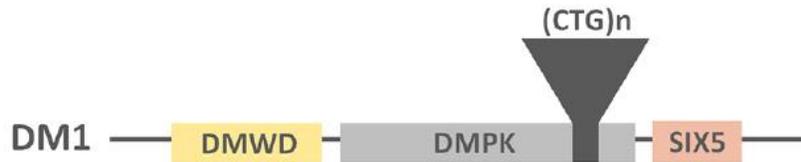
### La distrofia miotónica de tipo 1

La Distrofia miotónica de tipo 1 (DM1) es una enfermedad hereditaria dominante y multisistémica, que afecta a 1 en 8,000 personas a nivel mundial [1]. Por lo tanto, es la distrofia muscular más frecuente en adultos [2].

La DM1 se caracteriza por presentar síntomas como miotonía (contracción muscular sostenida), debilidad muscular progresiva, y distintas anormalidades multisistémicas, incluyendo conducción cardíaca alterada, resistencia a la insulina, atrofia gonadal, cataratas y daño en el sistema nervioso central (SNC; retraso mental y disfunción cognitiva [3]). Esta enfermedad, es causada por una expansión de repetidos del triplete CTG, localizado dentro de la región 3'UTR del gen DMPK (*Dystrophia Myotonica Protein Kinase*), en el cromosoma 19 [3] (Fig.1). Los individuos sanos presentan de 5 a 37 repetidos CTG, mientras que los individuos afectados presentan entre 50 y 4000 CTG; estos pacientes presentan distintos grados de severidad de la enfermedad, que son dependientes de la longitud de los repetidos. Es decir, un tracto más largo de repetidos correlaciona con una mayor severidad de la enfermedad. Los pacientes con DM1 se clasifican en 4 categorías dependiendo de la edad de aparición de los síntomas: Inicio tardío, inicio en la etapa adulta, inicio en la niñez e inicio al momento del nacimiento (congénito) [4]. Un inicio más temprano de la sintomatología correlaciona también con un mayor número de repetidos CTG.

De manera interesante, la expansión de los repetidos varía entre tipos celulares y algunos tejidos, lo que ocasiona que un mismo individuo presente distinta longitud de repetidos en su organismo, fenómeno que se denomina *mosaicismo somático*. Debido a esto, los órganos o tejidos más afectados por la enfermedad son aquellos que contienen mayor número de repetidos CTG, entre los cuales se encuentran el tejido muscular esquelético y cardíaco así como el SNC [5]. De manera importante, las células germinales también presentan esta característica, lo que da lugar al fenómeno denominado "*Anticipación*" el cual se refiere a que la aparición del

fenotipo de la enfermedad ocurre a una menor edad y con mayor severidad en generaciones subsecuentes del individuo afectado inicialmente [6].



**FIG.1. Localización de los repetidos CTG dentro de la región 3'UTR del gen DMPK.** (modificado de [4]). Los repetidos CTG pueden variar en longitud, causando una mayor severidad de los síntomas aquellos pacientes con un mayor número de repetidos.

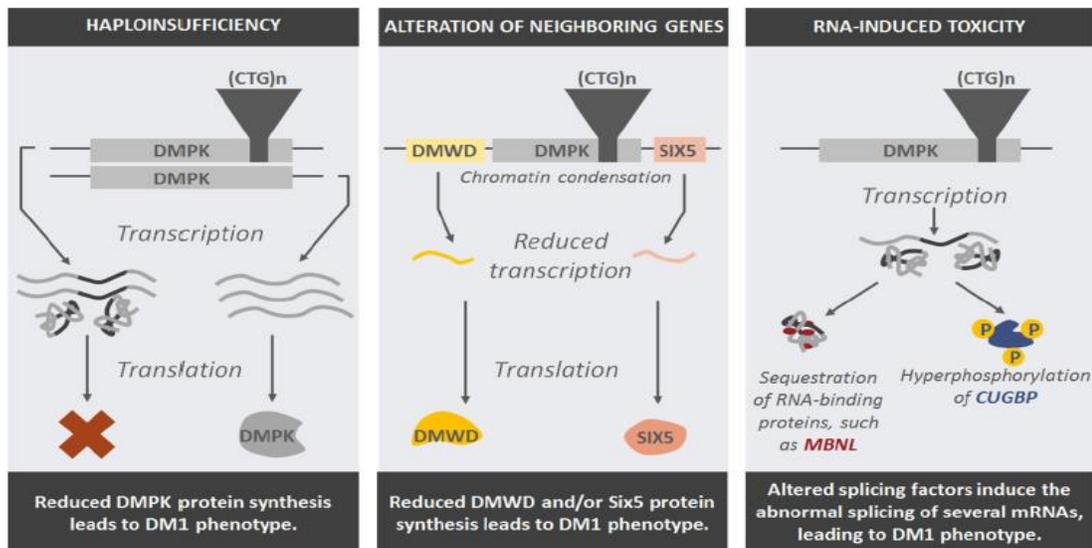
### **Mecanismos moleculares de la DM1**

Hasta la fecha se han propuesto 3 mecanismos moleculares principales que ocasionan la DM1 (Fig. 2):

- Formación de agregados celulares del RNAm de la DMPK. El mecanismo más estudiado, es la formación de agregados nucleares de ARNm del gen DMPK. Se postula que el transcrito que contiene un número anormal de repetidos CUG forma estructuras secundarias que secuestran proteínas de unión a ARN y factores de transcripción [7]. Entre las proteínas que forma un complejo con el ARN mutante están los factores de regulación del *splicing* alternativo MBNL1 y MBNL 2 [8] [9]. Por otra parte, la acumulación nuclear del RNA mutante ocasiona la hiperfosforilación de la proteína CUG-BP1 por la cinasa PKR, que a su vez es activada en respuesta a formación de estructuras de doble cadena de ARN. La sobre-activación de CUG-BP1, altera el proceso de *splicing* y la expresión genética de manera generalizada en las células DM1 (ej., genes que codifican para el receptor a insulina y los canales de cloro) [10].
- Alteración de genes adyacentes al gen DMPK. Los repetidos CTG alteran la estructura de la cromatina promoviendo su compactación, lo que a su vez causa un decremento en la expresión de los genes contiguos al gen DMPK:

DMWD y SIX5, los cuales codifican para una proteína neuronal y para el factor de transcripción SIX5, respectivamente [11]. En este sentido, se ha reportado que un ratón knock-out para SIX5 desarrolla cataratas, presenta baja fertilidad de machos y deficiencias cardíacas [12], características compartidas con la DM1.

- Haploinsuficiencia de DMPK. El gen *DMPK* codifica para una cinasa que fosforila serinas y treoninas denominada DMPK. Esta proteína disminuye sus niveles de manera considerable en la DM1, debido a que los transcritos mutantes no se exportan al citoplasma para su traducción y se acumulan en el núcleo [4]. En consecuencia, el nivel bajo de la DMPK podría contribuir con el fenotipo de la enfermedad, ya que se ha reportado que participa en la arquitectura nuclear mediante su interacción con proteínas de la envoltura nuclear como la lámina A/C [13].



**FIG.2 Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la Distrofia miotónica tipo 1 [4].** Se observa como los repetidos de ARN o ADN de la DMPK inducen la desregulación de proteínas implicadas en distintos procesos celulares, promoviendo la aparición de la DM1 .

## El núcleo

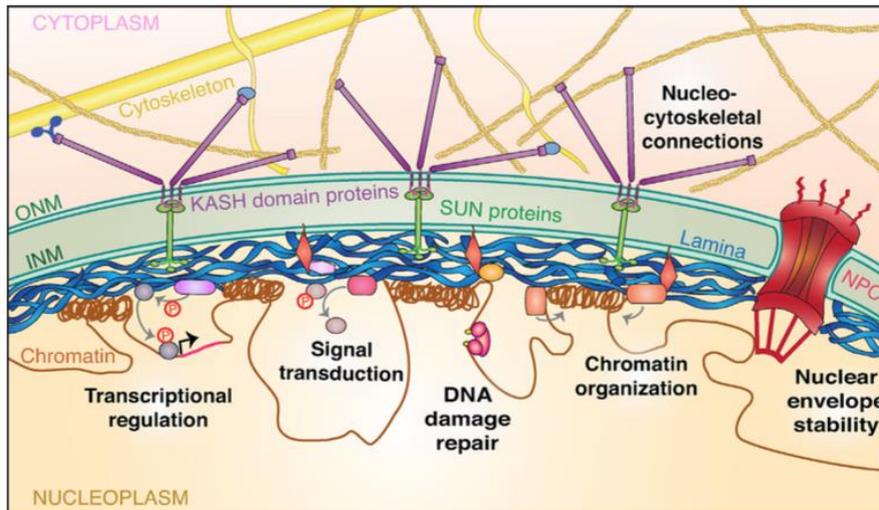
El núcleo de una célula eucariota está rodeado de una estructura membranosa denominada envoltura nuclear. El núcleo contiene la información hereditaria de la célula y controla su crecimiento y reproducción. Para poder realizar estas funciones,

el núcleo se encuentra compuesto por varios compartimentos subnucleares, los cuales están inmersos en una sustancia gelatinosa denominada nucleoplasma. El núcleo orchestra diversos procesos celulares, incluyendo la replicación, transcripción, reparación de DNA, formación de partículas pre-ribosomales, y el *splicing* [14].

### **La envoltura nuclear**

La envoltura nuclear está constituida por dos bicapas de fosfolípidos, la membrana nuclear externa e interna, las cuales se encuentran separadas por un espacio luminal. Adyacente a la membrana nuclear interna, se encuentra la lámina nuclear, que provee soporte a esta estructura y mantiene interacciones con proteínas de la membrana nuclear interna y de distintos compartimentos nucleares, incluyendo el nucleoplasma [15]. La envoltura nuclear contribuye a la integridad estructural del núcleo y a la organización del genoma, mediante la regulación de mecanismos como el transporte de iones y macromoléculas a través del poro nuclear, la regulación de la expresión genética, la reparación del daño al ADN, la mecanotransducción, y actúa como una plataforma para diferentes vías de señalización que responden a estímulos internos y externos (FIG.3) [15].

La importancia de la envoltura nuclear, queda de manifiesto por la existencia de enfermedades denominadas laminopatías, las cuales son causadas por mutaciones en genes que codifican para proteínas pertenecientes a esta estructura. Las células de estos pacientes presentan aberraciones morfológicas de la envoltura nuclear, como invaginaciones o protrusiones de la membrana nuclear interna, e incluso micronúcleos [16].



**FIG.3 La envoltura nuclear y sus funciones [16].** Se observa detalladamente como la envoltura nuclear lleva a cabo distintos procesos celulares y la intercomunicación entre ellos.

### La lámina nuclear

Las láminas forman una red de filamentos intermedios de tipo V denominada lámina nuclear, la cual tiene como principal función proveer soporte y funcionalidad al núcleo. La lamina nuclear se encuentra conformada por 4 proteínas principales, las láminas A y C son codificadas por el gen LMNA y se producen por *splicing* alternativo y las láminas B1 y B2 codificadas por los genes LMNB1 y LMNB2 respectivamente. De manera interesante, las distintas láminas son similares estructuralmente [17]. Las láminas sufren modificaciones post-traduccionales durante su maduración, adquiriendo un grupo farnesilo en el dominio C-terminal, el cual es importante para su integración a la envoltura nuclear a través del ambiente membranoso que la conforma. Es importante notar que la lámina A pierde el grupo farnesilo en la etapa final de su maduración, mientras que las láminas de tipo B lo conservan [17].

### Funciones de las láminas nucleares

Además de proveer un andamio estructural y mecánico para el núcleo, las láminas presentan una gran variedad de funciones:

- *Regulación genética.* Las láminas nucleares pueden regular a varios niveles la expresión genética:
  - Se unen a regiones de la cromatina que se encuentran reprimidas, denominadas LADs (Lamins Associated Domains) evitando así la expresión de genes [18].
  - Mediante el secuestro de factores de transcripción en la envoltura nuclear, para regular la represión de distintos genes. Entre estos factores de transcripción se encuentra Oct-1, el cual es secuestrado por la lámina B1 como respuesta al estrés oxidativo [19], así como Fos, SREBP1 y ERK ½, los cuales interactúan con la lámina A/C [18].
  - Actuando como andamio para la replicación del ADN, mediante su interacción directa con el factor de iniciación de este proceso, PCNA. Esta interacción se lleva a cabo mediante el dominio parecido a inmunoglobulina (Ig) de las láminas [20].
- *Formación de focos de heterocromatina.* Las láminas nucleares, principalmente las de tipo B, interactúan con proteínas de *represión genética* como HP1α y con histonas modificadas que están presentes en la heterocromatina (H3K9me3 y H3K27me3), para formar un complejo de represión que involucra además a la proteína de envoltura nuclear LBR (Lamin B1 Receptor). Esta última interactúa a su vez, con la cromatina, modulando finalmente de manera negativa la expresión de genes [21].
- *Regulación del ciclo celular.* De manera general, las láminas regulan el ciclo celular mediante el control de la disgregación y ensamblaje de la envoltura nuclear durante la mitosis. Además, se ha asociado de manera más específica, a la lámina B1 con la formación del uso mitótico, en conjunto con las proteínas del complejo de proteínas asociadas a Distrofina (DAPC) [22].
- *Modulación de la plasticidad nucleolar.* En años recientes, se ha observado que las láminas nucleares regulan la función del nucléolo. Se ha reportado, que la disminución de las láminas B1 y B2 en células Hela y en células de cáncer colorectal respectivamente, ocasiona alteraciones morfológicas y funcionales del nucléolo [23] [24]. Así mismo, la disminución de la expresión

de la lámina A/C provoca expansión nucleolar en fibroblastos de piel inmortalizados [25].

### **Organización de la cromatina**

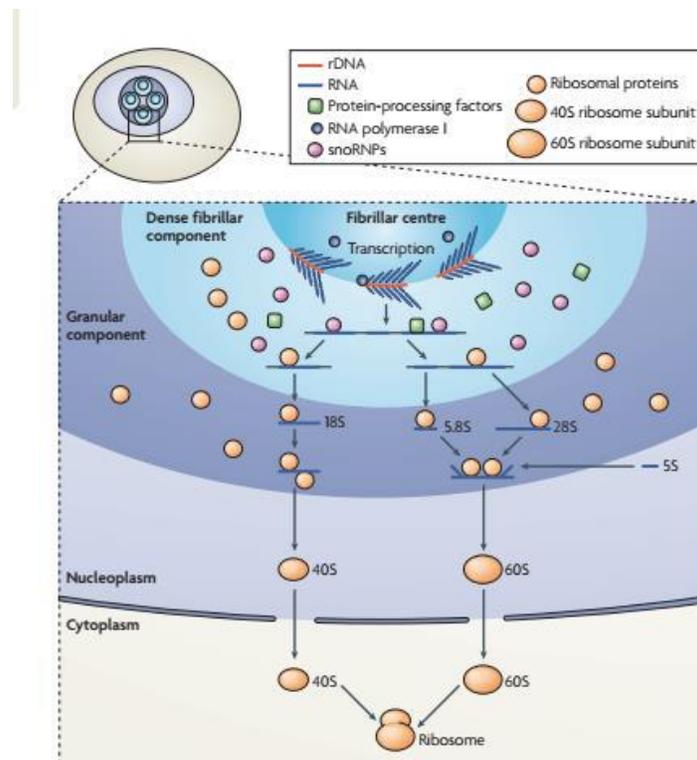
La cromatina, que se encuentra localizada en el nucleoplasma está compuesta por ADN e histonas, y su organización requiere de su interacción con componentes de la envoltura nuclear y de modificaciones postranscripcionales de las histonas, como metilaciones y acetilaciones [26]. Un estado compacto de la cromatina se denomina heterocromatina, mientras que un estado más laxo, eucromatina. Una conformación laxa de la cromatina permite la entrada de la maquinaria de transcripción, mientras que un estado compacto inhibe la expresión de genes [27]. Por lo tanto, las láminas nucleares participan en la regulación epigenética, mediante la formación de focos de heterocromatina, mediante su interacción con marcas de represión, como la histona H3K9me3 [21].

### **Nucléolo**

El nucléolo, es un compartimento nuclear que se ensambla sobre regiones de ADN ribosomal (ADNr) y cuya función principal es la biogénesis ribosomal. La formación de las subunidades ribosomales, ocurre en distintas subregiones del nucléolo, las cuales se distinguen en tres por su morfología particular visualizada mediante microscopia electrónica. La transcripción del ADNr, se lleva a cabo en el borde entre el componente fibrilar (FC) y el componente fibrilar denso (DFC). Inicialmente, se sintetiza un ARNr precursor 47S que es posteriormente procesado y modificado en el DFC para formar las subunidades ribosomales 28S, 18S y 5.8S, con la participación de las ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNPs). Por último, las subunidades maduras 40S y 60S se ensamblan en el componente granular (GC), para ser posteriormente exportadas hacia el citoplasma y llevar a cabo la síntesis de proteínas [28]. Cabe mencionar, que para el estudio de la morfología nucleolar se emplean proteínas marcadoras de cada región nucleolar. Por ejemplo, UBF pertenece al complejo de iniciación de la transcripción del ADNr, por lo que es un marcador del FC, mientras que fibrilarina, la cual participa en el

procesamiento del pre-ARNr, es una proteína marcadora del DFC. Por otra parte, B23, una chaperona que regula la respuesta al estrés celular, se localiza en el GC, delimitando así, el área nucleolar total (Fig. 4).

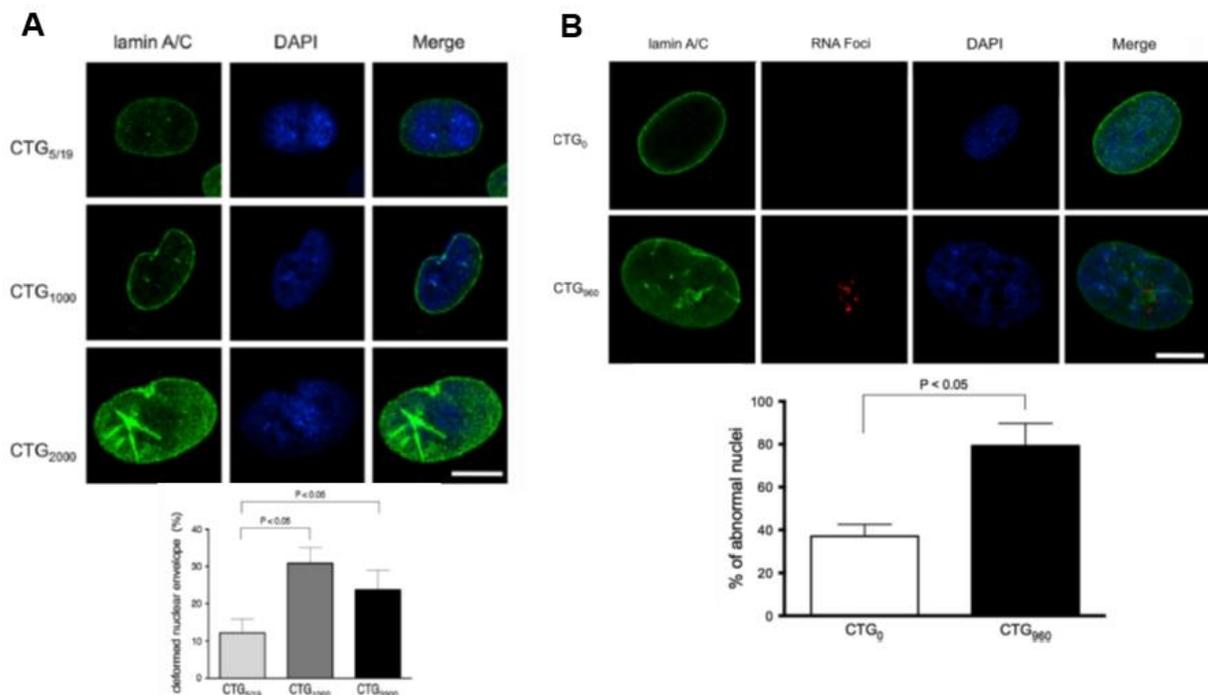
El nucléolo tiene otras funciones además de la biogénesis ribosomal, modula la progresión del ciclo celular y la proliferación, actuando como el principal organelo de respuesta al estrés [28]. El primer mecanismo del nucléolo para responder a estímulos que dañan a la célula, es la detención de la biogénesis ribosomal. Esto lo hace a través del tráfico de distintas proteínas que viajan hacia dentro y fuera del nucléolo (ej. B23), activando en segunda instancia cascadas de señalización como la vía de mTOR que controla la traducción de proteínas, o la vía de p53 que detiene el ciclo celular [29]. Esta respuesta del nucléolo conlleva a la senescencia celular o a la apoptosis.



**FIG.4 El nucléolo, su organización y función.** Se delimitan las funciones llevadas a cabo en cada uno de los sub-compartimentos nucleolares. (Modificado de [28])

## ANTECEDENTES

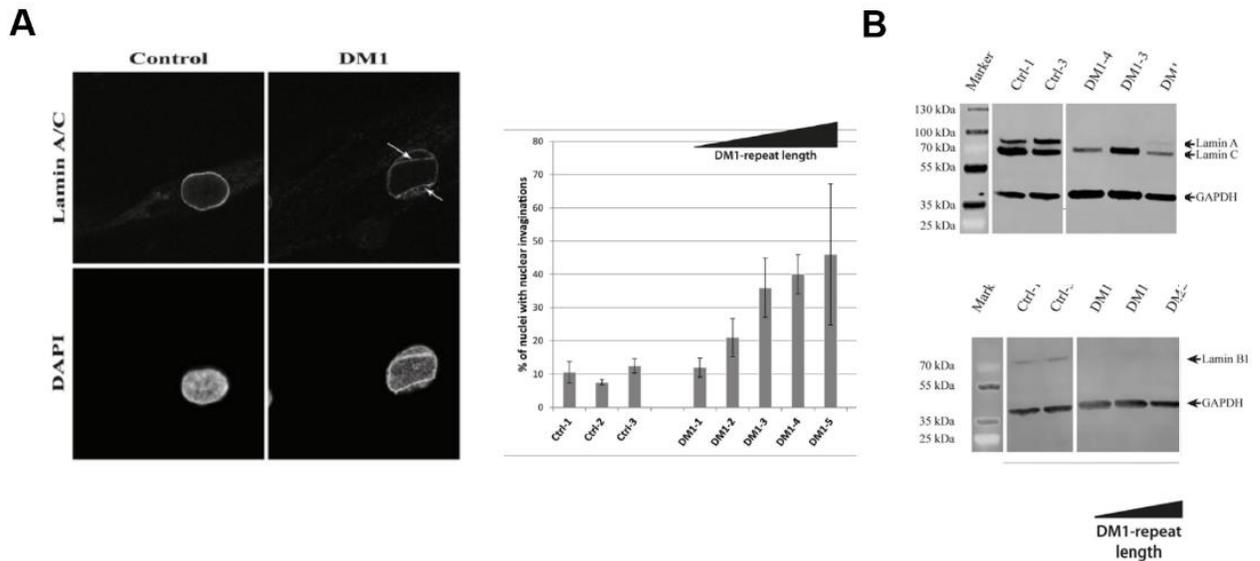
La función de la envoltura nuclear en el contexto de la distrofia miotónica de tipo 1 (DM1) ha sido poco estudiada. El primer estudio que observó una alteración de la envoltura nuclear fue realizado en fibroblastos de piel provenientes de pacientes con DM1, donde se reportó la presencia de células con morfología nuclear aberrante, evidenciadas por medio de una inmunofluorescencia indirecta contra la lámina A/C. Este fenotipo es ocasionado por la presencia de agregados nucleares del transcrito mutante de la DM1, ya que la transfección de un vector que expresa un RNA con 960 repetidos CUG provocó la alteración de la morfología nuclear en fibroblastos primarios provenientes de un individuo normal (Fig. 5) [30].



**FIG.5 Morfología nuclear aberrante en la distrofia miotónica de tipo 1 (DM1).** A) Se llevó a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta contra la lámina A/C, para visualizar la morfología del núcleo. Se observó un número mayor de células con aberraciones nucleares en los cultivos provenientes de pacientes con DM1. B) La expresión exógena de 960 repetidos CTG en fibroblastos control provocó la aparición de daños en la morfología nuclear (Modificado de [31])

Un estudio posterior que apoya estos resultados, reportó que mioblastos provenientes de pacientes con DM1 presentan una disminución de los niveles de

las láminas A/C y B1, lo que contribuye a que estas células exhiban una morfología nuclear aberrante; es importante mencionar que las invaginaciones nucleares son más frecuentes en los cultivos celulares de pacientes con un número mayor de repetidos CTG (Fig. 6) [30].



**FIG.6 Morfología nuclear aberrante en mioblastos de pacientes con DM1.** A) Inmunofluorescencia indirecta dirigida contra la proteína lámina A/C para visualizar el núcleo. Se cuantificaron las células con morfología nuclear aberrante. B) Los mioblastos de pacientes con DM1 presentan una disminución de las láminas A/C y B1 (Modificado de [31]).

## **JUSTIFICACION**

Los agregados del ARN mensajero mutante de la *DMPK* alteran la morfología de la envoltura nuclear; sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares que subyacen esta alteración. Para abordar esta pregunta nos propusimos analizar la red lámina nuclear-heterocromatina- nucléolo en un sistema celular de la DM1.

## **HIPOTESIS**

La presencia del ARNm mutante de la DM1 afecta la expresión y función de las láminas nucleares.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto de los repetidos CTG de la DM1 sobre la expresión de las láminas nucleares y la organización de la heterocromatina y el nucléolo.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar la expresión y distribución subcelular de las láminas nucleares en cultivos de fibroblastos primarios de pacientes con DM1.
2. Analizar la organización de la heterocromatina y la morfología del nucléolo en cultivos de fibroblastos primarios de pacientes con DM1.
3. Analizar si la expresión exógena de los repetidos CTG en fibroblastos de un individuo sano recrea las alteraciones nucleares observadas en los fibroblastos de pacientes con DM1.

## MODELO DE ESTUDIO

Cultivos primarios de fibroblastos de piel pertenecientes a individuos sanos que serán utilizadas como control y de pacientes con Distrofia miotónica tipo 1:

- **AG08469.** Fibroblastos de piel tomados de un hombre sano de 38 años con un número de repetidos CTG en la región 3'UTR del gen DMPK dentro del rango normal (5-37).
- **GM05163.** Fibroblastos de piel tomados de una mujer de 36 años con DM1 con un número aproximado de 400 repetidos CTG en la región 3'UTR del gen DMPK.
- **GM05789.** Fibroblastos de piel tomados de un hombre de 39 años con DM1 el cual contiene alrededor de 500 repetidos CTG en la región 3'UTR del gen DMPK.
- **GM04033.** Fibroblastos de piel tomados de un hombre de 48 años con DM1 el cual contiene alrededor de 1000 repetidos CTG en la región 3'UTR del gen DMPK.
- **GM03132.** Fibroblastos de piel tomados de un hombre de 18 años con DM1 el cual contiene alrededor de 2000 repetidos CTG en la región 3'UTR del gen DMPK.
- **Línea celular C2C12.** Mioblastos de ratón inmortalizados.



## **MATERIALES Y METODOS**

### *Cultivo celular*

Se utilizaron los siguientes cultivos de fibroblastos primarios de piel obtenidos del Instituto Coriell para la investigación médica (Cadmen, New Jersey, USA): AG08469, fibroblastos provenientes de un hombre sano de 38 años que contienen un número de repetidos dentro del rango normal (5-37 CTG); GM05163, fibroblastos provenientes de una mujer de 36 años con DM1 que contienen 400 repetidos CTG en el alelo mutante del gen DMPK; GM03987, fibroblastos provenientes de un hombre de 39 años con DM1 que contienen 500 repetidos CTG en el alelo mutante del gen DMPK; GM04033, fibroblastos provenientes de un hombre de 48 años con DM1 que contienen 1000 repetidos CTG en el alelo mutante del gen DMPK y GM03132, fibroblastos provenientes de un hombre de 18 años con DM1 que contienen 2000 repetidos CTG en el alelo mutante del gen DMPK. Estos cultivos, se propagaron en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v, penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml y piruvato de sodio 1 mM. En la segunda parte de este trabajo se utilizó la línea celular de mioblastos de ratón C2C12. Esta línea celular se propagó en medio Eagle de Dulbecco modificado (DMEM; Invitrogen), suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v, penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml y piruvato de sodio 1 mM. Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

### *Inmunofluorescencia indirecta*

Se sembraron alrededor de 90,000 células de cada cultivo celular sobre cubreobjetos previamente esterilizados en cajas de Petri de 35 mm, para obtener una confluencia de alrededor de 60%. Las preparaciones se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS. Enseguida se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 10 min y se permeabilizaron con Tritón X-100-PBS al 0.2% durante 10 min. Para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos, se adicionó gelatina al 0.5% y suero fetal bovino al 1% en PBS, o una solución de bloqueo con 3% BSA y 5% de SFB durante 20 minutos. Las células se incubaron durante toda la noche a 4°C con

el anticuerpo primario correspondiente. Al día siguiente, las células se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. Transcurrido ese tiempo, las preparaciones se lavaron con PBS y los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (1:500) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron 5 veces con PBS y agua bidestilada, y se secaron posteriormente para montarse sobre portaobjetos con 5  $\mu$ l de VectaShield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE.UU.). Las preparaciones se analizaron posteriormente mediante microscopia confocal.

*Anticuerpos utilizados para Inmunofluorescencia:*

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Dilución</b>
<b>B23</b>	Invitrogen	Ratón	1:70	Anti-ratón verde	1:50
<b>UBF</b>	Santa Cruz	Ratón	1:50 4% BSA	Anti-ratón verde	1:50
<b>Lámina B1</b>	ABCAM	Conejo	1:300	Anti-conejo verde	1:50
<b>H3K9me3</b>	ABCAM	Conejo	1:1500	Anti-conejo verde	1:50
<b>HP1<math>\alpha</math></b>		Conejo	1:100 en buffer IF	Anti-conejo verde	1:50
<b><math>\beta</math>-DG MANDAG</b>	Dr. Manuel Hdez. CINVESTAV	Ratón	1:25	Anti-ratón verde	1:50
<b>FLAG</b>	Cell Signaling	Conejo	1:40 4% BSA	Anti-conejo verde	1:50 4% BSA

### *Hibridación in situ*

Se trabajó en condiciones libres de RNAsas. Se sembraron 90,000 células en cubreobjetos flameados con EtOH y se incubaron 24 h en condiciones estándares de cultivo. Se eliminó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados a temperatura ambiente con PBS 1X estéril. Se fijaron las células incubándolas durante 10 minutos a temperatura ambiente con PFA al 4%, diluido en PBS. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron con tritón al 0.3% (diluido en PBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se incubaron con la solución amortiguadora de prehibridación (SSC 2X, 30% de formamida en agua DEPC) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A partir de este paso las preparaciones se protegieron de la luz. Las muestras se incubaron con la solución amortiguadora de hibridación (SSC 2X, Formamida 30%, BSA 0.02%, vanadil ribonucleósido 2mM [Sigma-Aldrich Inc., MO, USA], complejo de tRNA de levadura 66µg/ml [Sigma-Aldrich], sonda CAG6-Cy3 [Sigma-Aldrich] 1 ng/µl en agua DEPC) durante 2 h a 37°C en cámara húmeda. Se realizaron 2 lavados de 7 minutos cada uno a 42°C con la solución amortiguadora de prehibridación, y dos lavados con la solución amortiguadora SSC 1X de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. Para teñir los núcleos, las preparaciones se incubaron con DAPI (dilución 1:500) durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavaron los cubreobjetos con PBS, luego con agua bidestilada y se dejaron secar al aire. Se montaron en portaobjetos empleando 5 µl de Vecta shield y se sellaron las orillas empleando barniz transparente. Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal y se almacenaron a 4°C.

### *Hibridación in situ acoplada a inmunofluorescencia indirecta*

Los cultivos de fibroblastos se sembraron sobre cubreobjetos flameados con EtOH y se incubaron durante 24 h. Se realizó la hibridación *in situ* como se describió previamente. Las preparaciones se lavaron con SSC 1X y con PBS (dos veces); enseguida se bloquearon los cubreobjetos con las soluciones descritas en el protocolo de inmunofluorescencia indirecta. Posteriormente se incubó el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda y al día siguiente se

realizaron lavados con PBS y las preparaciones se incubaron con el anticuerpo secundario 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavaron las preparaciones nuevamente y los núcleos se tiñeron con DAPI (1:500) durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavaron los cubreobjetos con PBS y enseguida con agua bidestilada, y se dejaron secar al aire. Finalmente, las preparaciones se montaron sobre portaobjetos empleando 5  $\mu$ l de vecta shield y las orillas se sellaron con barniz transparente. Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal y se almacenaron a 4°C.

#### *Microscopia Confocal y análisis de imágenes*

Las muestras se analizaron mediante microscopía confocal (Nikon, Microsystems, Heidelberg, Alemania) utilizando un objetivo 60X y aceite de inmersión. Para el análisis de las imágenes digitalizadas se empleó el programa Image J 1.62. El área nucleolar ( $\mu$ m<sup>2</sup>) se determinó con el plugin 3D Counter. Los datos se analizaron estadísticamente con el software Graph Pad Prism6.

#### *Transformación de bacterias*

Se colocaron alícuotas de 50  $\mu$ l de un cultivo de bacterias competentes *E. coli* B12 en tubos de microcentrifuga de 1.5ml. Enseguida se adicionaron 100 ng de DNA de plásmido y la mezcla se mantuvo en hielo por 30 minutos. Posteriormente el cultivo se incubó a 42°C durante 90 segundos y después se colocó en hielo por 2 minutos. Se adicionaron 800  $\mu$ l de medio LB y la mezcla se incubó a 37°C por 1 hora con agitación constante. Se transfirieron 100  $\mu$ l del cultivo a una placa de agar LB (1% peptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl) suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Finalmente las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

#### *Obtención de ADN de plásmido por columna*

Se sembró una colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$  o Stbl3 (para repetidos CTG), previamente transformada con el plásmido de interés, en 3 ml de LB con ampicilina (100 mg/ml). El cultivo se incubó durante 8 h a 37°C en agitación (200 rpm). Posteriormente se preparó un cultivo a mayor escala inoculando 1 mL del cultivo previo en 1000 mL de

medio LB con ampicilina. El nuevo cultivo bacteriano se incubó con agitación (200 rpm) durante toda la noche a 37°C. Se cosecharon las bacterias por centrifugación (6,000 rpm) durante 15 minutos a 4°C; se resuspendió la pastilla bacteriana en 4 ml de la solución amortiguadora P1 fría (Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 10mM, RNAsa A 100µg/ml) y se homogenizó utilizando vórtex. Para realizar la lisis alcalina, se adicionó 4 ml de la solución amortiguadora P2 (NaOH 200mM, 1% SDS p/v), se mezcló por inversión 6 veces y se dejó en incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 4 ml de la solución amortiguadora P3 fría (Acetato de potasio 3.0M), se mezcló vigorosamente invirtiendo 6 veces, y se incubó la mezcla en hielo escarcha por 15 minutos. Enseguida, se centrifugó a 11,000 rpm por 40 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo Falcon de 25 ml nuevo; para clarificar la suspensión, se volvió a centrifugar a 11,000 rpm por 20 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se equilibró la columna de intercambio con 4 ml de la solución amortiguadora QBT y se drenó por gravedad. Se vertió el sobrenadante en la columna, se lavó dos veces con 10 ml de la solución amortiguadora QC (NaCl 1.0M, MOPS 50mM pH 7.0, isopropanol 15% v/v), y se eluyó el DNA en un tubo Falcon de 25 ml limpio utilizando 5 ml de la solución amortiguadora QF (NaCl 1.25M, Tris-HCl 50 mM pH 8.5, isopropanol 15% v/v). Enseguida se adicionaron 3.5 ml de isopropanol para precipitar el DNA, se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 minutos a 4°C, y se decantó el sobrenadante. Se lavó con EtOH al 70%, se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C, y se decantó con cuidado para recuperar la pastilla de ADN. Se secó la pastilla durante 5 minutos al vacío, y se disolvió en 150 µl de agua milliQ estéril. Se verificó la integridad del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y se cuantificó empleando el Nanodrop (Thermo Scientific).

### *Construcción de vectores*

Los vectores de expresión 3xFlag-β-DG-ICD WT, 3xFlag-β-DG-ICD Y890E y 3xFlag-β-DG-ICD Y890A se generaron mediante amplificación por PCR utilizando como molde los plásmidos WT-DG-GFP, DGY890E-GFP y DGY890A-GFP

respectivamente (Gracida-Jiménez *et al.*, 2017). Brevemente, la secuencia de cDNA que codifica para el dominio intracelular del  $\beta$ -DG (ICD; aminoácidos 774-895) se amplificó por PCR empleando la ADN polimerasa de alta fidelidad Pfu turbo (Stratagene) y diferentes pares oligonucleótidos dirigidos contra la secuencia del  $\beta$ -DG-ICD, los cuales contenían sitios de restricción para las enzimas HindIII y EcoRI. El oligonucleótido *forward* 5'-CCTAAGCTTTATCGCAAGAAGAGGAAGGGC-3' se utilizó para todas las construcciones y los oligonucleótidos *reverse* que se usaron fueron los siguientes: ICD WT, 5'-CTGAATTCTTAAGGGGGAACATACGGAGGG-3'; ICD E890A, 5'-CTGGAATCCTTAAGGGGGAAC**CTCC**GGAGGG-3' e ICD Y890A, 5'-CTGAATTCTTAAGGGGGAAC**TGCC**GGAGGG-3. Los productos de PCR se sometieron a doble digestión con las enzimas Hind III y EcoRI y se clonaron en el vector p3xFlag-CMV-10, digerido previamente con las mismas enzimas. La integridad de las construcciones se confirmó por secuenciación de *Sanger*.

#### *Transfección celular*

Los cultivos de fibroblastos control se transfectaron transitoriamente con los plásmidos PQBI-DM y PQBI-960. El día previo a la transfección, se sembraron las células en una caja Petri de 35 mm a una confluencia de 60-70%. Se mezclaron 100  $\mu$ l de medio DMEM con 2  $\mu$ g de ADN de plásmido (sin suero y sin antibióticos) y 100  $\mu$ l de medio DMEM (sin suero y sin antibióticos) con 3  $\mu$ l de Lipofectamina 3000 (Invitrogen). Las preparaciones se incubaron por separado durante 5 minutos y posteriormente se mezclaron y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla de transfección se agregó a las células y la preparación se incubó a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 96 h, las células se fijaron con PFA al 4%, los núcleos se tiñeron con DAPI y las preparaciones se sometieron a ensayos de FISH/inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal. Las células C2C12 se transfectaron transitoriamente con los plásmidos PQBI-GFP,  $\beta$ -DG-ICD-GFP y 3XFlag- $\beta$ -DG-ICD, utilizando 4  $\mu$ g de ADN de plásmido y 7  $\mu$ L de lipofectamina 2000. Para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta acoplados a transfección celular, las células se sembraron sobre portaobjetos, previamente colocados sobre cajas de 35 mm, y se utilizaron 2  $\mu$ g de

ADN y 4  $\mu$ l de lipofectamina. Las muestras se procesaron 24 horas después de la transfección.

#### *Extracción y cuantificación de proteínas totales*

Los cultivos celulares se sembraron sobre cajas Petri de 70 mm a una confluencia de 80% (aproximadamente 450,000 células), se lavaron con 2 ml de PBS para cosecharon las células con PBS con la ayuda de un gendarme. Las preparaciones celulares se centrifugaron y a las pastillas se les adicionó 100  $\mu$ l de la solución amortiguadora de lisis (50 mM Tris-HCl pH=7.4, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1% Tritón, 1x complete) para incubarse en agitación por 30 minutos a 4°C. Para completar la lisis celular, la suspensiones se sometieron a tres rondas de sonicación a 3.5 micrones durante 15 segundos, con descansos entre cada ciclo de 10 segundos. Las mezclas se centrifugaron a 12000 g's durante 2 minutos para eliminar restos celulares, y el sobrenadante se recuperó en un tubo limpio. A partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l se realizó una curva estándar (0-5  $\mu$ g/ $\mu$ l) y se prepararon diluciones de las muestras problema. Se adicionó el reactivo de Bradford (BIO-RAD) y se determinó la absorbancia a 595nm. Se registraron los datos para obtener una curva estándar y se le realizó una regresión lineal. Los valores obtenidos de las muestras problema se interpolaron en la curva estándar para determinar la concentración de proteínas. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso posterior.

#### *Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida*

Se prepararon geles de poliacrilamida-SDS (gel separador al 10%: 2.5 ml de acrilamida 30%/ bisacrilamida 0.8%, 1.88 ml de Tris-base/SDS pH=[8.8], 3.125 ml de agua miliQ, 50  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% w/v y 10  $\mu$ l de TEMED; gel concentrador al 4%: 0.650  $\mu$ l de acrilamida 30%/ bisacrilamida 0.8%, 1.250 ml de Tris-base/SDS pH==[6.8.], 3.05 ml de agua miliQ, 25  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% w/v y 10  $\mu$ l de TEMED). Para el análisis de la histona H3K9me3 el gel separador se concentró al 15%. Posteriormente se adicionó solución amortiguadora

de carga a las muestras de proteínas y se igualaron los volúmenes, enseguida se calentaron las muestras a 95 °C por 5 minutos y se colocaron sobre los pozos del gel. El gel se sometió a electroforesis en solución amortiguadora de corrida (Tris-base 3 g/l, glicina 14.4 g/l y SDS 1g/l) a una corriente constante de 20 miliamperes durante 2 horas.

#### *Inmunodetección en fase sólida*

Una cantidad de 40 µg de proteína total de cada muestra se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE), como se indicó previamente. Las muestras de proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara semi-húmeda con una corriente de 20 volts durante 1, h utilizando la solución amortiguadora de transferencia (Tris-Glicina 1X-Metanol 20%). Para el caso de H3K9me3, la transferencia duró 17 min. La membrana se bloqueó durante 1 h con 15% de leche en polvo baja en grasa diluida en la solución amortiguadora de Tris-salino-Tween-20 (TBS-T) 1X, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Posteriormente, las membranas se incubaron en agitación constante durante toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario de interés diluido en TBS-T 1X. Enseguida, las membranas se lavaron 3 veces durante 5, 10 y 15 minutos con la misma solución amortiguadora y se incubaron por 1 h con agitación constante a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima *horse radish peroxidase*. Las membranas se lavaron nuevamente por 5, 10 y 15 minutos con TBS-T 1Xy se sometieron a revelado para visualizar las proteínas de interés, utilizando el reactivo de quimioluminiscencia (ECL) y placas fotográficas.

#### *Anticuerpos utilizados en este estudio para inmunodetección en fase sólida.*

<b>Anticuerpo primarios</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Anticuerpo Secundarios</b>	<b>Dilución</b>
B23 (Invitrogen)	Ratón	1:2000	Anti-ratón (Millipore)	1:10,000, 3% leche

UBF (Sta. Cruz)	Ratón	1:250 3% leche	Anti-ratón (Millipore)	1:10,000, 3% leche
Lámina B1 (ABCAM)	Conejo	1:3000	Anti-conejo	1:8,000 3% leche
Lámina B2 (Sta. Cruz)	Ratón	1:500 3% leche	Anti-ratón (Millipore)	1:5000, 3% leche
Lámina A/C (Sta. Cruz)	Conejo	1:4000	Anti-conejo	1:10,000 3% leche
LBR (ABCAM)	Ratón	1:500	Anti-ratón (Millipore)	1:5000, 3% leche
H3K9me3 (ABCAM)	Conejo	1:1000	Anti-conejo	1:3,000 3% leche
HP1 $\alpha$	Conejo	1:3000	Anti-conejo	1:3,000 3% leche
Actina (Dr. Manuel Hernández. CINVESTAV)	Ratón	1:3000	Anti-ratón (Millipore)	1:10,000 3% leche

#### *Análisis del perfil de ciclo celular mediante citometría de flujo*

Se sembraron alrededor de 450,000 fibroblastos (confluencia del 60%) en cajas Petri de 70 mm y pasadas 24 h se agregó tripsina para despegar las células de las cajas y someterlas a centrifugación (1000 rpm). Las pastillas obtenidas se resuspendieron en 100  $\mu$ l de medio de cultivo y se les agregó etanol frío al 80%. Las mezclas se incubaron durante 30 min en agitación a 4 °C para fijar a las células, enseguida se sometieron a centrifugación durante 5 min a 6000 rpm para eliminar el etanol. Posteriormente se permeabilizaron las células y se tiñeron los núcleos con una solución de tritón al 0.1% con DAPI en PBS, incubándose a temperatura ambiente durante 30 min y agitando los tubos cada 10 minutos en vortex. Por último, las células se transfirieron a tubos para citometría y se realizaron las lecturas a una longitud de onda de excitación de 405 nm en el equipo FORTESSA.

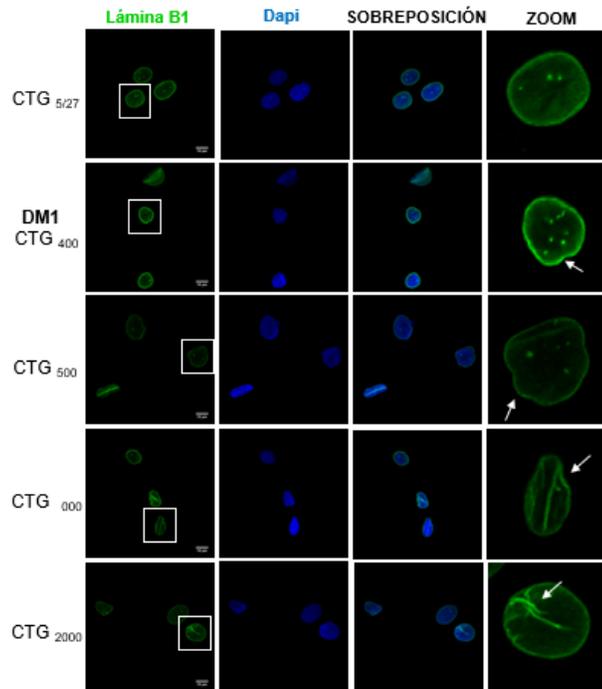
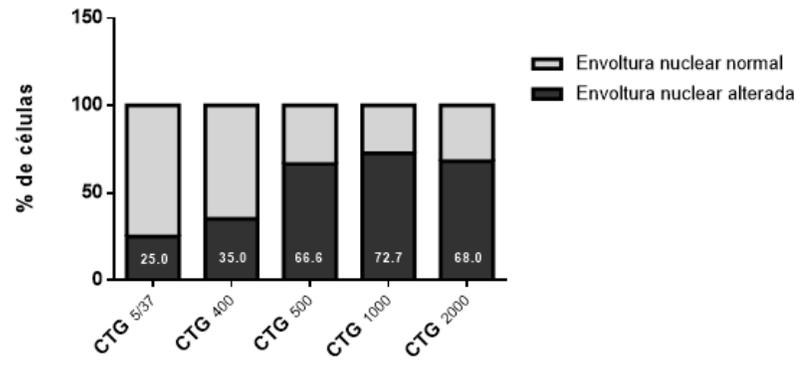
*Ensayo para medir la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa asociada a Senescencia.*

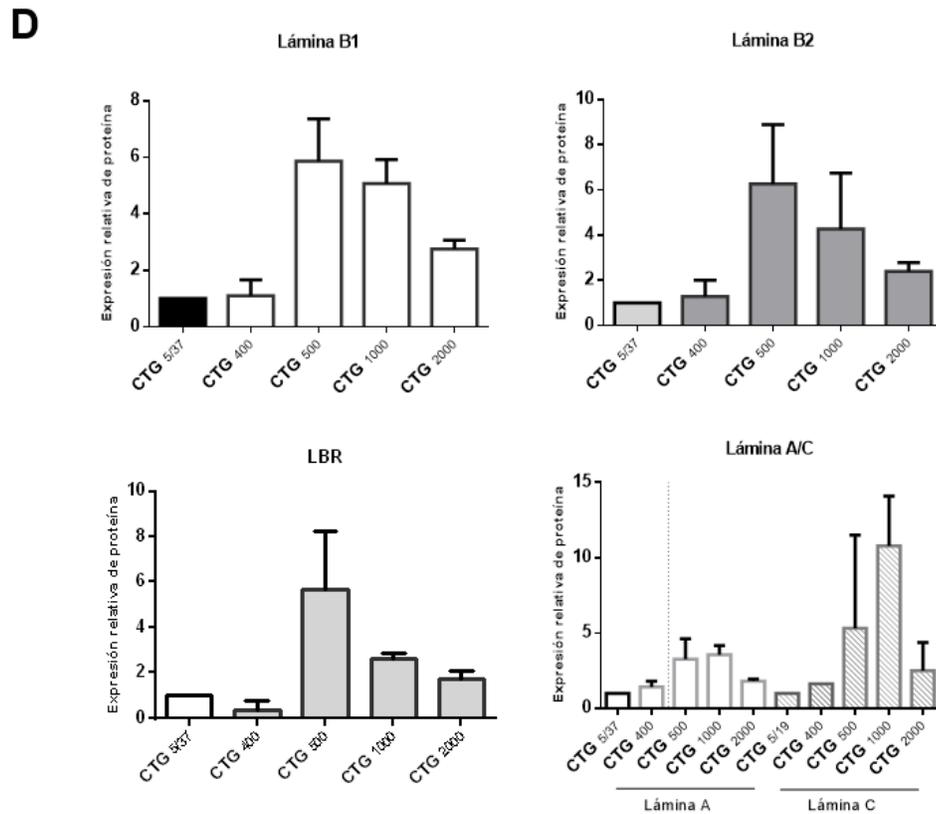
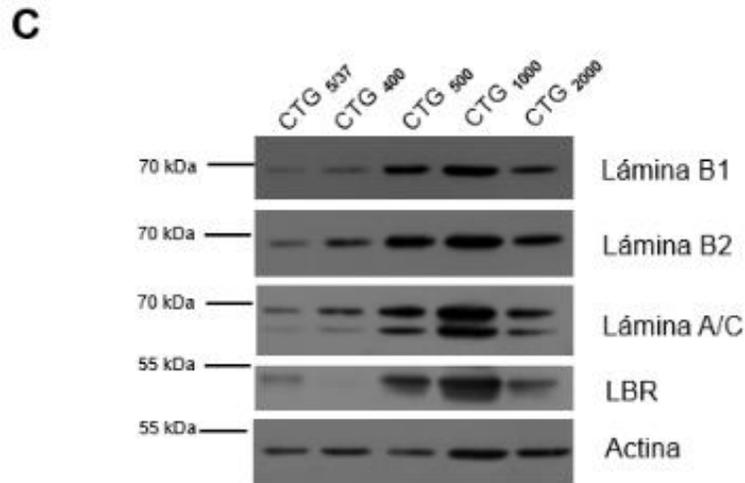
Se sembraron alrededor de 70,000 fibroblastos (confluencia del 60%) en cajas Petri de 35 mm, y después de 24 h las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con PFA 4% durante 10 min. Posteriormente las células se incubaron a 37°C durante toda la noche con una mezcla de tinción para visualizar la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (reactivo A, B, X-gal, agua mili Q filtrada), y las cajas se sellaron con Parafilm. Enseguida se lavaron las células con PBS para eliminar los cristales formados, y se montaron sobre portaobjetos con 5  $\mu$ l de Vecta shield, sellándolos con barniz de uñas transparente. La tinción de las células se visualizó mediante microscopio de campo claro.

## RESULTADOS

### **La expresión de las láminas nucleares y del receptor de la lámina B1 (LBR) se encuentra alterada en los fibroblastos de pacientes con DM1**

Tomando en consideración que previamente se observó que fibroblastos provenientes de pacientes con DM1 presentan una morfología de la envoltura nuclear alterada [30], se decidió analizar la distribución subcelular de la lámina B1 en diferentes cultivos primarios de fibroblastos provenientes de pacientes con DM1. Observamos núcleos con morfología aberrante en los fibroblastos de pacientes con DM1, entre las anormalidades de la envoltura nuclear observadas se incluyen invaginaciones y protrusiones (Fig. 8A). De manera interesante, el porcentaje de núcleos deformes es mayor en los fibroblastos de pacientes que presentan un número mayor de repetidos CTG (Fig. 8B). Estos resultados son consistentes con lo reportado previamente en mioblastos provenientes de pacientes con DM1 [31]. Enseguida, analizamos mediante ensayos de western blot el nivel de las láminas B1, B2 y A/C y de LBR. Con excepción del cultivo de fibroblastos con 400 repetidos CTG, existe un aumento en el contenido de estas proteínas de la envoltura nuclear en los fibroblastos DM1, en comparación con los fibroblastos provenientes de un individuo normal (Fig. 8C y 8D). Estos resultados sugieren que las anormalidades de la envoltura nuclear observadas en los fibroblastos DM1 podrían deberse al aumento en los niveles de estas proteínas.

**A****B**

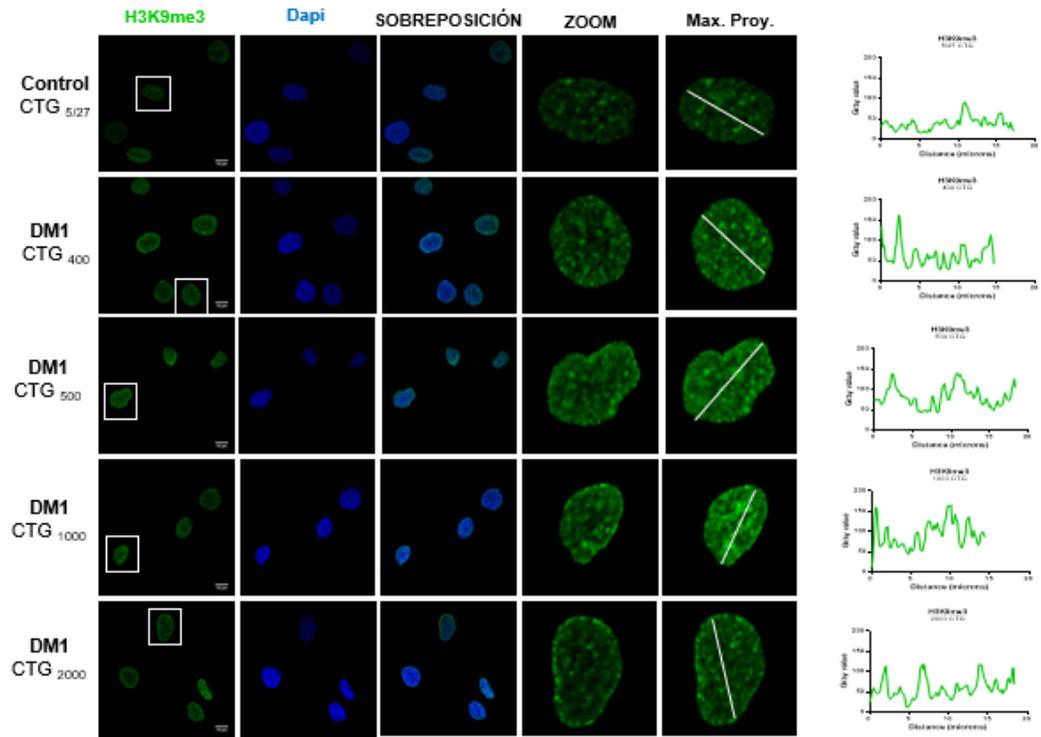
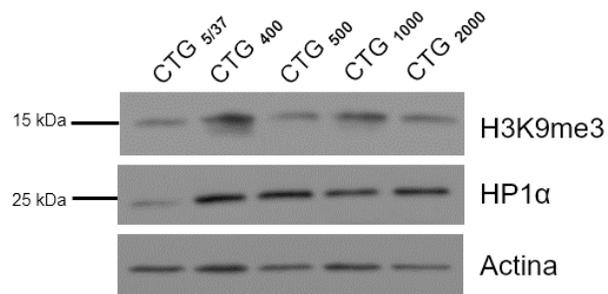


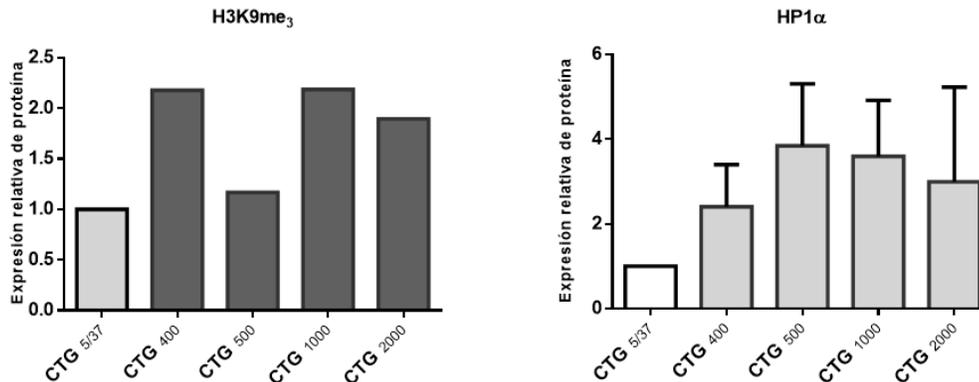
**FIG.8. El nivel de las láminas nucleares (B1, B2 y A/C) y de LBR se incrementa en los fibroblastos provenientes de pacientes con DM1.** A) Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para analizar la localización de la lámina B1. Se encontraron aberraciones en la morfología nuclear, indicadas con una flecha. B) Cuantificación de núcleos amorfos en los diferentes cultivos primarios de fibroblastos. C) El nivel de las láminas nucleares y de LBR proteínas nuclear se analizó

mediante ensayos de inmunodetección en fase sólida. D) Cuantificación de los niveles de las láminas nucleares y de LBR mediante densitometría (resultados de 2 ensayos independientes).

### **Los fibroblastos de DM1 exhiben aumento en la formación de focos de heterocromatina.**

Una de las funciones de las láminas de tipo B y de LBR es modular negativamente la expresión genética mediante su interacción con la cromatina, fenómeno que se puede monitorear a través de la visualización de agregados de heterocromatina que contienen a la histona H3K9me3. Debido a que observamos niveles elevados de las láminas tipo B y de LBR en los fibroblastos DM1, decidimos analizar la distribución de H3K9me3 mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal. De manera global, observamos focos de H3K9me3 con una mayor intensidad de inmunofluorescencia en los fibroblastos de DM1, en comparación con los fibroblastos normales. Sin embargo, no encontramos una relación directa entre la intensidad de fluorescencia de la marca de H3K9me3 y el número de repetidos CTG, ya que el cultivo con 2,000 repetidos CTG mostró agregados de H3K9me3 comparativamente menos teñidos que aquellos de los cultivos con 400, 500 y 1,000 tripletes CTG (Fig. 9A). Estas observaciones se confirmaron mediante la cuantificación de inmunofluorescencia a través de un trazo que cruza el área nuclear (ver gráficas de la derecha). De manera consistente, demostramos mediante ensayos de inmuno-detección en fase sólida que los fibroblastos DM1 presentan una mayor cantidad de H3K9me3, en comparación con las fibroblastos normales, pero nuevamente evidenciamos que no existe una relación directa entre la longitud de los tripletes CTG y el nivel de la histona H3K9me3 (Fig. 9B-C). Enseguida, decidimos analizar la expresión de la proteína HP1 $\alpha$ , ya que esta proteína enlaza directamente a la lámina B1 con la cromatina. Encontramos un aumento de HP1 $\alpha$  en los fibroblastos de DM1, en comparación con el cultivo de fibroblastos de un individuo normal (Fig. 9C). En conclusión, los fibroblastos de DM1 muestran una expresión elevada de dos marcas de heterocromatina H3K9me3 y HP1 $\alpha$ , lo que indica que los repetidos CTG alteran la distribución de la heterocromatina y probablemente la expresión de genes.

**A****B**

**C**

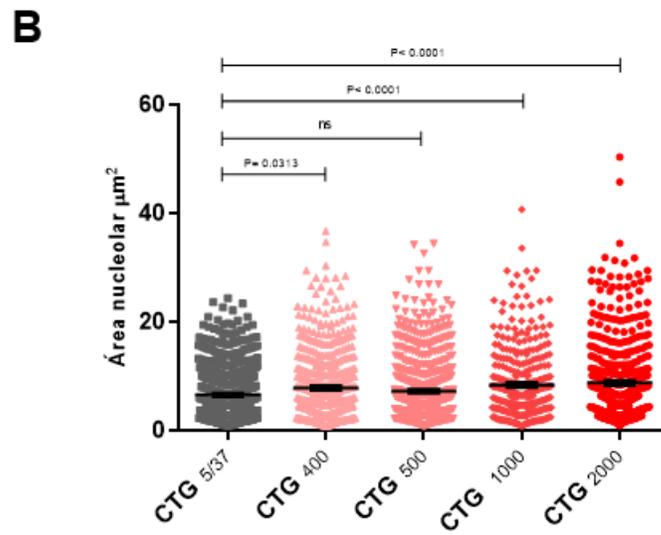
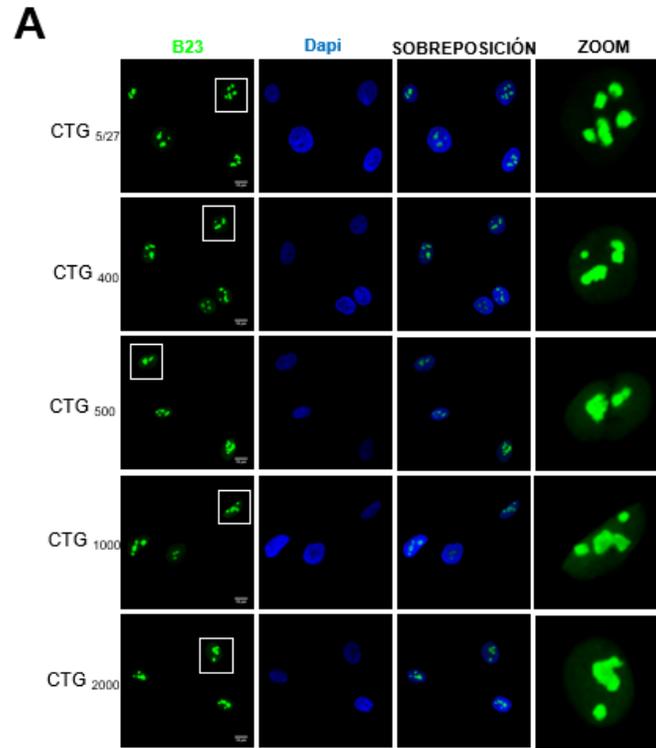
**Figura 9. Acumulación de focos de la marca de heterocromatina H3K9me<sub>3</sub> en fibroblastos de DM1.** A) Se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar a la histona H3K9me<sub>3</sub>. Se observa una mayor cantidad de focos teñidos para H3K9me<sub>3</sub> en los cultivos de fibroblastos de pacientes con DM1. En las gráficas de la derecha se muestra la cuantificación de la intensidad de inmunofluorescencia de los focos de H3K9me<sub>3</sub> en los diferentes cultivos, mediante un trazo que cruza el núcleo utilizando el programa Image J. B) Se muestran ensayos de inmunodetección en fase sólida para la histona H3K9me<sub>3</sub> y la proteína HP1 $\alpha$ , en fibroblastos de pacientes con DM1 C) Los niveles de H3K9me<sub>3</sub> y proteína HP1 $\alpha$  se cuantificaron por medio de densitometría de las placas de rayos X (resultados de 2 ensayos independientes).

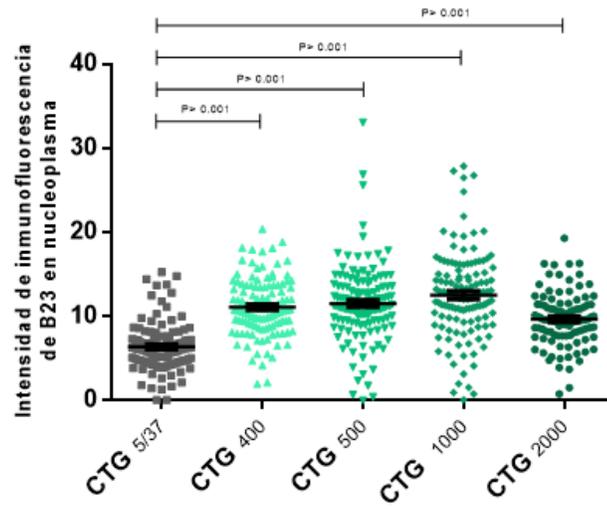
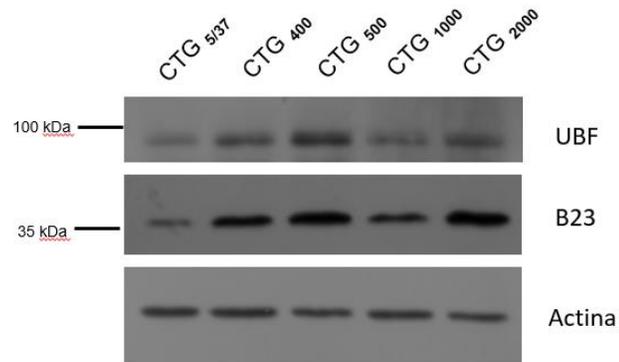
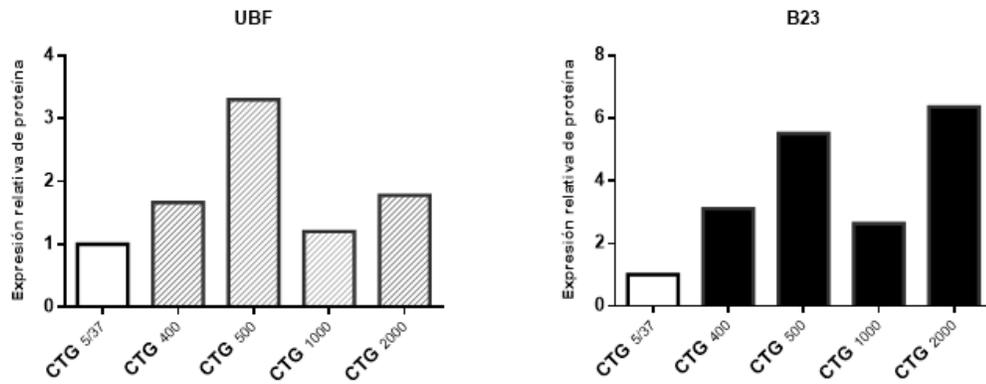
### **Los fibroblastos de DM1 presentan expansión nucleolar y expresión alterada de proteínas nucleolares**

Se ha reportado, que las láminas B modulan la plasticidad y función del nucléolo. [23-25]. Por lo tanto, exploramos si la expresión elevada de las láminas B que exhiben los fibroblastos de DM1 tiene un impacto sobre la morfología del nucléolo. Para visualizar los nucléolos utilizamos ensayos de inmunofluorescencia para la proteína nucleolar B23, la cual pertenece al componente granular (GC) del nucléolo. Observamos que los nucléolos de los fibroblastos de DM1 tienen un mayor tamaño en relación con los nucléolos del cultivo de un individuo normal, siendo más evidente la expansión nucleolar en los cultivos de fibroblastos que contienen un mayor número de repetidos (1,000 y 2,000 CTG) (Fig. 10A). Estas observaciones se corroboraron mediante la cuantificación del área nucleolar (Fig. 10B). Además, observamos de manera interesante la deslocalización de B23 hacia el nucleoplasma

en todos los cultivos de DM1, en comparación con lo observado en el cultivo proveniente de un individuo sano. Esto de igual forma se corroboró mediante la cuantificación de la intensidad de inmunofluorescencia de esta proteína en esta zona del núcleo (10C).

Posteriormente, debido a que el fenómeno de expansión nucleolar se ha asociado con una mayor biosíntesis ribosomal, evaluamos los niveles de la proteína de inicio de la transcripción UBF así como de B23 mediante inmuno-detección en fase sólida. Los niveles de UBF y B23 se incrementaron de manera notoria en los fibroblastos provenientes de pacientes con DM1, en comparación con el cultivo de un individuo sano, siendo los cultivos con 500 y 2000 repetidos CTG los que presentaron un nivel más alto de UBF y B23 respectivamente (Fig. 10D y E).

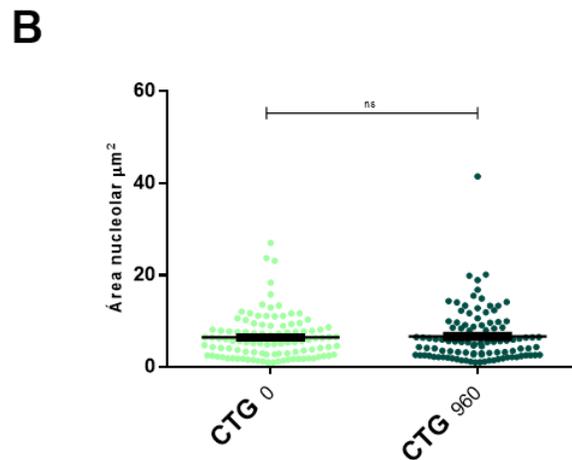
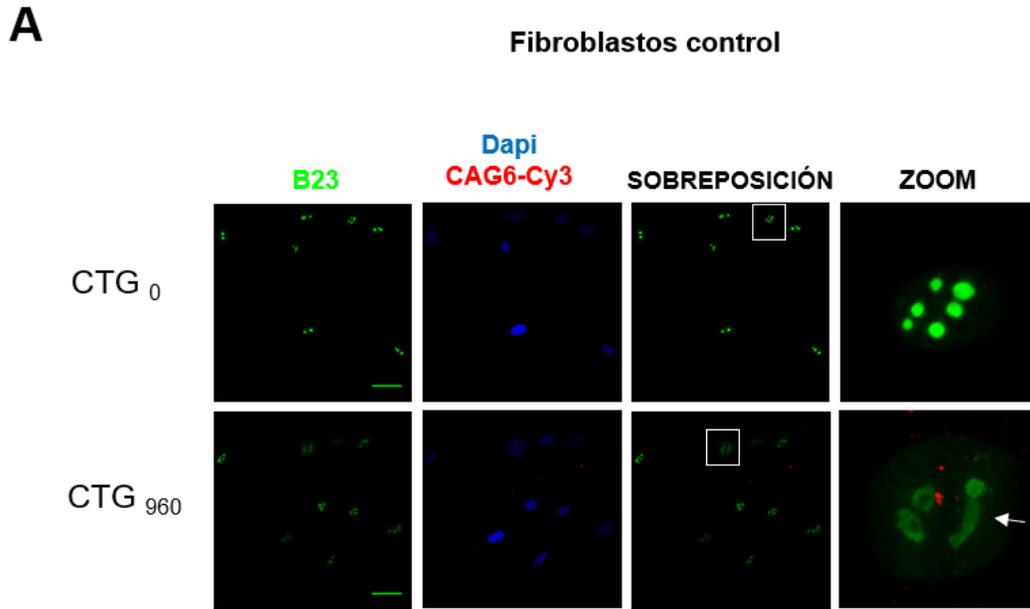


**C****D****E**

**FIG.10. Los fibroblastos de DM1 presentan expansión nucleolar y un incremento en el nivel de las proteínas nucleolares UBF y B23.** A) Se muestran ensayos de inmunofluorescencia indirecta para observar la proteína nucleolar B23. B) Se presenta la cuantificación del área nucleolar en los diferentes cultivos de fibroblastos primarios, utilizando el programa Image J (n>300 núcleos provenientes de 3 ensayos independientes y para cada cultivo celular). C) Se cuantificó la intensidad de inmunofluorescencia de B23 en el nucleoplasma de los fibroblastos DM1, mediante el programa Image J (n>100 núcleos provenientes de un solo ensayo). D) Se analizaron las proteínas nucleolares B23 y UBF mediante ensayos de inmunodetección en fase sólida. E) El nivel de expresión de las proteínas nucleolares se cuantificó mediante densitometría, a partir de los resultados de un solo ensayo.

### **Los fibroblastos normales presentan expansión nucleolar en respuesta a la expresión exógena de repetidos CTG**

Debido a que previamente observamos que los fibroblastos provenientes de pacientes con DM1 presentan expansión nucleolar, decidimos averiguar si la expresión de los repetidos CTG causa esta alteración celular, ya que se sabe, que la presencia de dobles cadenas de ARN inducen vías de señalización de respuesta a estrés [32]. Los fibroblastos de un individuo sano se transfectaron con plásmidos que expresan 0 o 960 repetidos CTG, y posteriormente se realizó la técnica de FISH acoplada a IFI para detectar tanto la proteína nucleolar B23 como los agregados del ARNm mutante de la DMPK. De manera interesante, observamos que las células que contienen agregados nucleares presentan nucléolos de un tamaño mayor, con respecto a los fibroblastos transfectados con el vector que no contiene repetidos CTG. Adicionalmente, observamos la presencia de B23 en el nucleoplasma de las células con agregados del transcrito mutante, lo cual es indicativo de una respuesta nucleolar al estrés celular [33](Fig. 11A). La cuantificación del área nucleolar y de la intensidad de fluorescencia de B23 en el nucleoplasma confirmaron estas observaciones (Fig. 11B). Estos resultados sugieren que los repetidos CTG de la DMPK inducen estrés celular, lo que desencadena la respuesta del nucléolo.

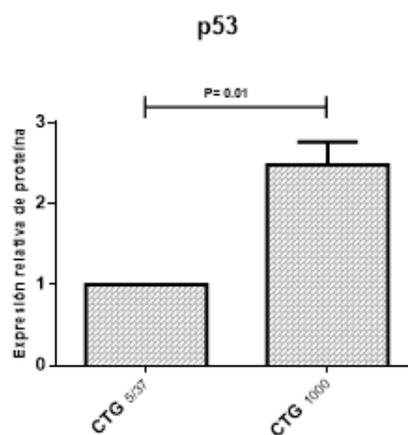
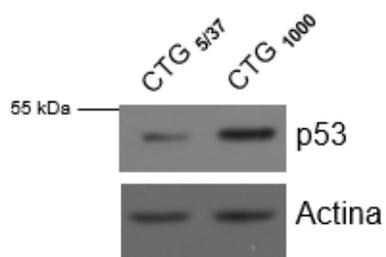
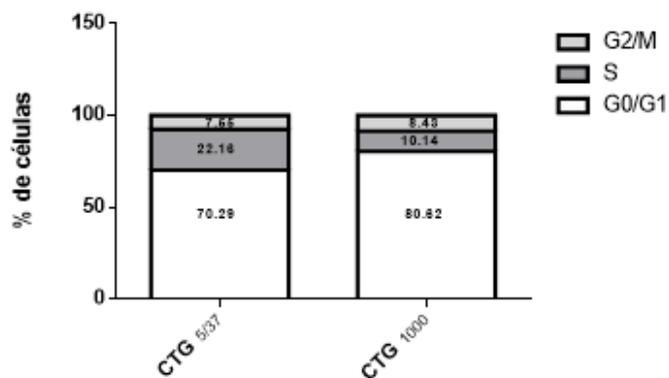
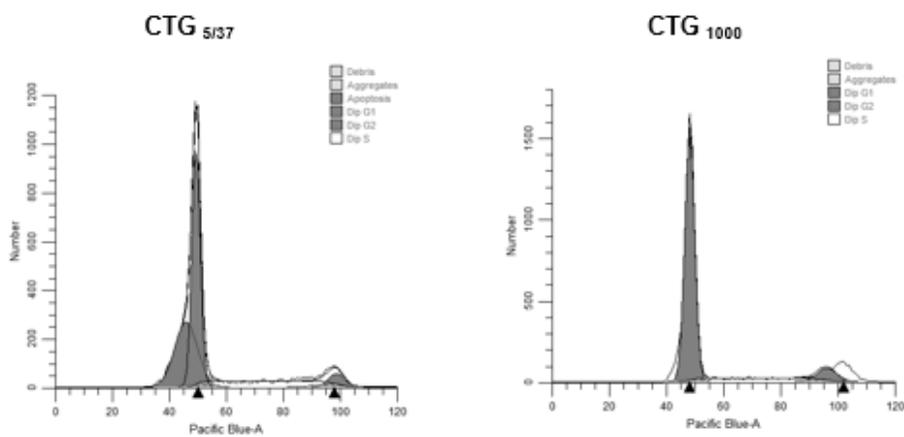


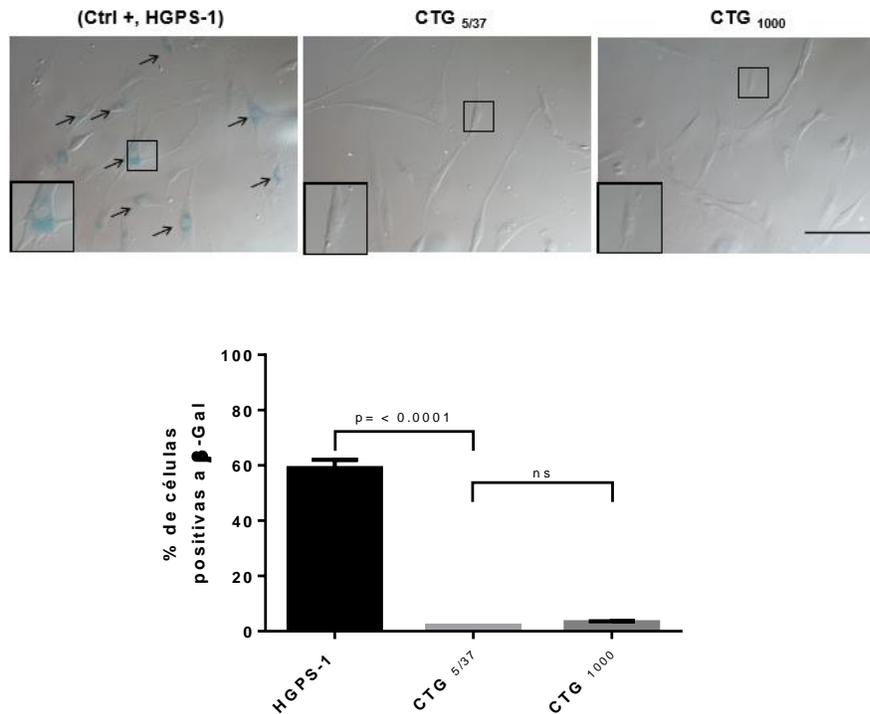
**FIG.11. La expresión exógena de los repetidos CTG ocasiona expansión nucleolar en fibroblastos de un individuo sano.** A) Se muestra un ensayo típico de FISH para detectar los agregados del ARNm mutante de la DM1 el cual se encuentra acoplado al ensayo de IFI para observar a la par a la proteína nucleolar B23 en fibroblastos control transfectados de manera transitoria con plásmidos que contienen 0 o 960 repetidos CTG. B) Se cuantificó el área nucleolar en los cultivos señalados, utilizando el programa Image J. (Resultados de 1 ensayo independiente).

### **Los fibroblastos de DM1 presentan marcas de estrés celular**

Tomando en consideración que el aumento y deslocalización hacia el nucleoplasma de B23 podría activar la vía de señalización de p53 [33], decidimos analizar esta última proteína en los cultivos de fibroblastos de un individuo con DM1 que presenta 1,000 CTG y de un individuo sano, por medio de ensayos de inmunodetección en fase sólida. Observamos, que los niveles de p53 aumentaron dos veces en el cultivo con 1,000 CTG, en comparación con el cultivo control (Fig. 12A). Enseguida, procedimos a evaluar el perfil de ciclo celular mediante citometría de flujo en los cultivos mencionados anteriormente, debido a que la inducción de p53 podría conducir a un arresto del ciclo celular [34]. Encontramos que en el cultivo de DM1 el porcentaje de células aumenta en la fase G0/G1 y concomitantemente se reduce en la fase S (Fig.12B), lo que implica que estas células tienen un retraso en la progresión de la fase G0/G1 a la fase S.

El arresto en la fase G0/G1 es indicativo de senescencia celular [34], por lo tanto analizamos la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, un marcador clásico de células senescentes. La actividad de esta enzima aumenta en la senescencia debido a la sobreproducción lisosomal que se produce como respuesta al estrés [35, 36]. Observamos que no existe actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en los fibroblastos de DM1 con 1,000 repetidos CTG, en comparación con los fibroblastos control (Fig. 12 C). Como control positivo de la actividad de esta enzima utilizamos fibroblastos provenientes de un paciente con síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS). Colectivamente nuestros resultados sugieren que los fibroblastos de DM1 tienen activa una vía de respuesta a estrés celular que provoca la respuesta del nucléolo, a través del aumento del nivel de B23, de su deslocalización hacia nucleoplasma y del incremento de p53, lo que en última instancia provoca el arresto del ciclo celular.

**A****B**

**C**

**FIG.12. Los fibroblastos de DM1 presentan marcas de estrés celular no asociadas con senescencia celular.** A) Se muestra un ensayo típico de inmunodetección en fase sólida para observar p53 en los fibroblastos de pacientes con DM1 y de un individuo sano. *Grafica de la derecha.* Se cuantificaron los niveles de p53 a partir de tres ensayos independientes, mediante densitometría. B) Se muestran las gráficas del ciclo celular de los fibroblastos control y DM1, obtenidas mediante citometría de flujo. C) Ensayo típico de detección de la actividad de la enzima β-galactosidasa asociado a senescencia. Se utilizó como control positivo de senescencia celular un cultivo de fibroblastos de un paciente con progeria Hutchinson-Gilford (HGPS-1).

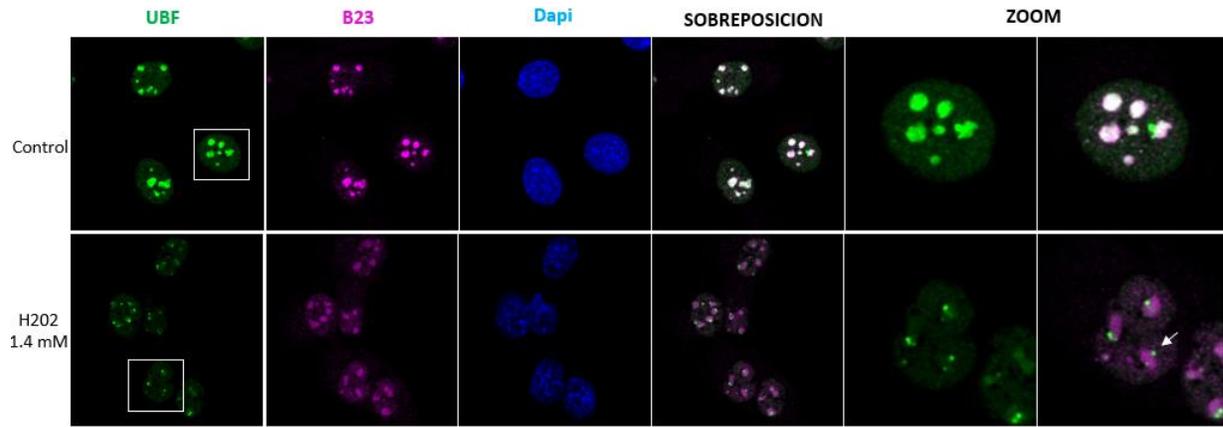
### **Participación del β-distroglicano en la función del nucléolo como sensor de respuesta a estrés celular**

El estudio del nucléolo como organelo de respuesta a estrés celular es un campo ampliamente estudiado. Se ha descrito que diferentes tipos de estrés activan la respuesta nucleolar, lo que se refleja en cambios dramáticos en su organización y composición, provocando finalmente cambios en la síntesis de ARN ribosomal y el

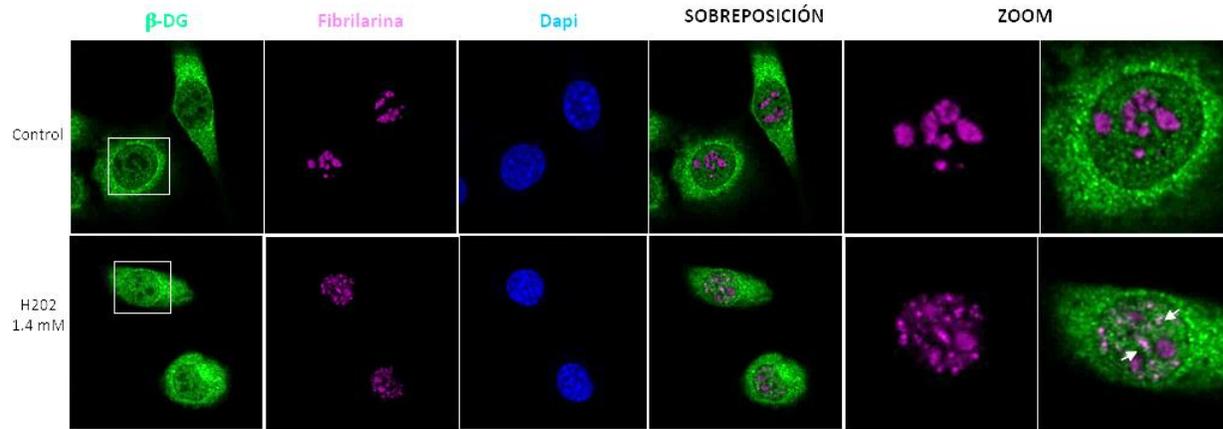
crecimiento celular. Recientemente nuestro grupo de trabajo describió la localización de la proteína  $\beta$ -dístroglicano ( $\beta$ -DG) en el nucléolo. Por lo que decidimos averiguar la función potencial de esta proteína en el contexto de la respuesta del nucléolo al estrés celular.

De manera interesante, el fragmento intracelular de la proteína  $\beta$ -dístroglicano de 26 kDa (ICD), generado por la acción de la enzima  $\gamma$ -secretasa, se acumula después de que las células C2C12 se sometieron a diferentes tipos de estrés celular, incluyendo tratamientos con peróxido de hidrógeno, acidosis (pH=6) y radiación con luz UV. Así mismo, la intensidad de la fluorescencia del factor de transcripción del ADNr, UBF, disminuyó drásticamente y se deslocalizó hacia el nucleoplasma como respuesta al estrés (Fig.13A). Esta redistribución de UBF se asemeja a lo que se observa cuando se inhibe la actividad de la ARN Polimerasa I con actinomicina [36]. Apreciamos además que B23 se deslocalizó hacia el nucleoplasma para mediar la respuesta nucleolar al estrés (Fig.13A), como se ha reportado previamente en otros sistemas [33]. Posteriormente analizamos si el  $\beta$ -DG sufre cambios en su distribución en las células C2C12 después del tratamiento con 1.4 mM de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Encontramos que la inmunofluorescencia del  $\beta$ -DG se acumula en el núcleo como podemos observar en la gráfica de cuantificación de la señal para esta proteína en ambos compartimentos celulares. Esto además, fue concomitante con una cierta desorganización de los nucléolos teñidos para fibrilarina (Fig. 13B y C). Estos resultados sugieren que el ICD del  $\beta$ -DG se produce para contribuir con la señalización que se dispara durante la respuesta del nucléolo al estrés.

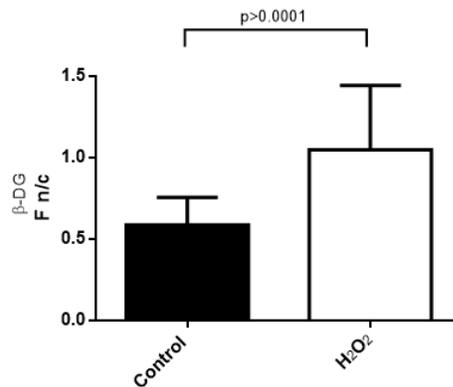
**A**



**B**



**C**



**FIG.13. Re-distribución del  $\beta$ -dístroglicano y las proteínas nucleolares UBF y B23 en las células C2C tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** A) Las células C2C12 se trataron por 4 horas con 1.4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y subsecuentemente se sometieron a ensayo de inmunofluorescencia indirecta doble para visualizar UBF y B23. B) Se muestra un ensayo típico de inmunofluorescencia indirecta doble para marcar al  $\beta$ -DG y a la fibrilarina en las células C2C12 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del  $\beta$ -dístroglicano en el núcleo (F n/c), mediante el programa Image J (n>150 células de 3 ensayos independientes). La acumulación nuclear del  $\beta$ -DG después de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue estadísticamente significativa (prueba t de student no paramétrica).

### **La sobreexpresión del dominio intracelular (ICD) del $\beta$ -DG recrea la deslocalización y expresión disminuida de UBF**

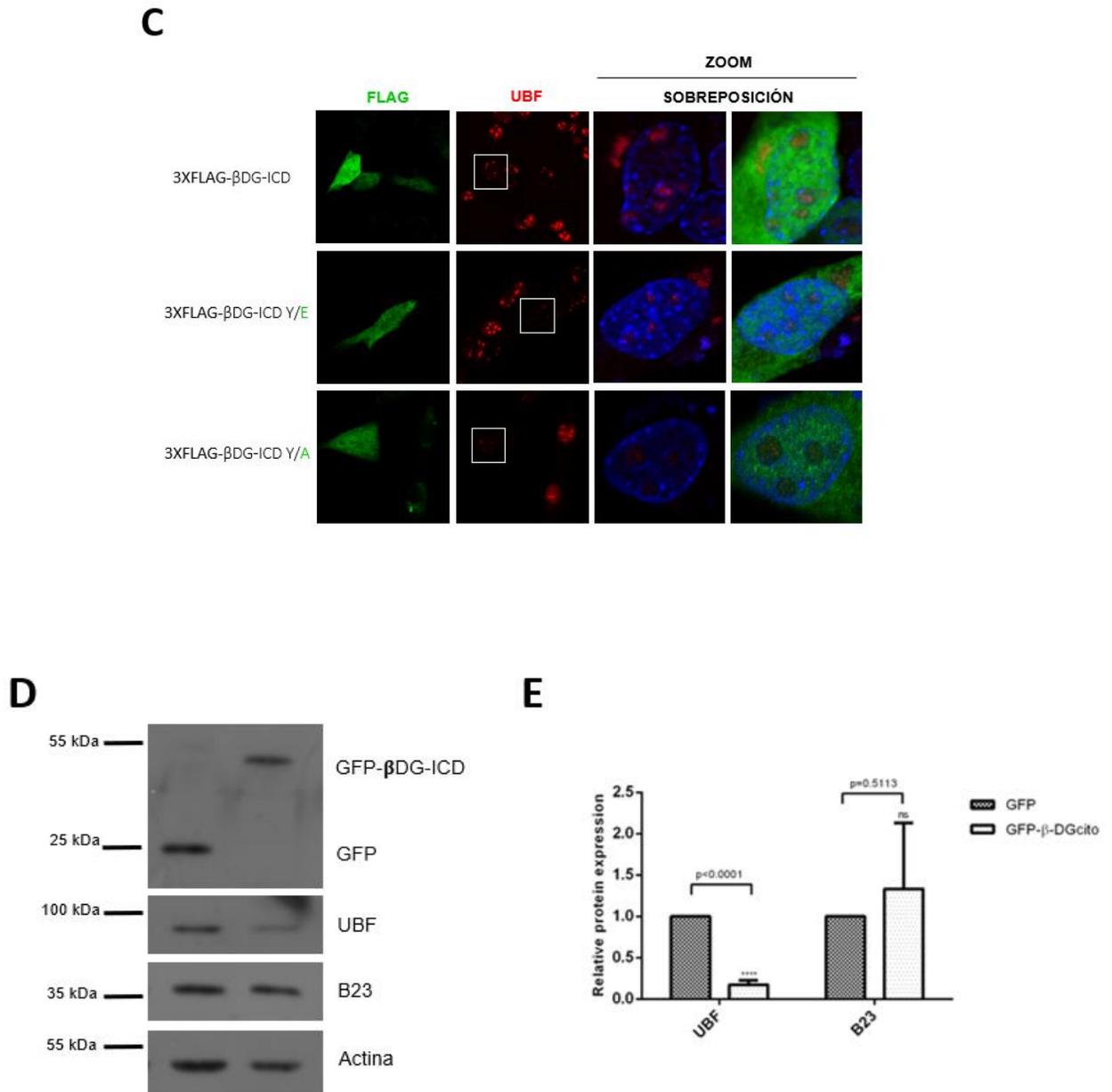
Con base en los resultados mencionados arriba, especulamos que el efecto negativo sobre UBF que provoca el estrés oxidativo podría estar mediado por el ICD del  $\beta$ -DG. Para abordar esta hipótesis, sobre-expresamos el ICD del  $\beta$ -DG fusionado a GFP (Fig. 14A) en las células C2C12, para mimetizar los efectos del estrés oxidativo. De manera interesante, observamos una inmunotinción disminuida y deslocalización de UBF hacia la periferia de los nucléolos y citoplasma en las células que expresan exógenamente el ICD del  $\beta$ -DG (Fig.14B). En contraste, la distribución de B23 permaneció inalterada (Fig. 14B). Resultados similares se obtuvieron cuando se sobre-expresó el ICD del  $\beta$ -DG fusionado a la bandera 3Xflag que pesa alrededor de 3 kDa (Fig. 14A y C). Adicionalmente evaluamos si la fosforilación del ICD del  $\beta$ -DG en la tirosina 890 determina su efecto sobre UBF, debido a que esta

modificación post-traducciona l modula el transporte nuclear del  $\beta$ -DG [37]. Con este fin, se clonaron y sobre-expresaron en las células C2C12 tres variantes del ICD unidas a 3Xflag, las cuales presentan cambios en la tirosina 890 con el objetivo de simularla (cambio de aminoácidos Y/E) o impedir (cambio de aminoácidos Y/A) la fosforilación. Encontramos que la deslocalización de UBF hacia el nucleoplasma y citoplasma se mantiene después de la sobre-expresión de cualquier de las variantes de ICD (Fig.14C), lo que indica que la fosforilación de la tirosina 890 no modula este fenómeno.

Por último, evaluamos los niveles de UBF y B23 en las células que sobreexpresan el ICD del  $\beta$ -DG mediante inmunodetección en fase sólida. Observamos una disminución del 80% de UBF, mientras que B23 no presentó cambio alguno en su expresión (Fig.14D y E).

Colectivamente estos resultados indican que el efecto negativo sobre la actividad y localización de UBF que se observa después del tratamiento con  $H_2O_2$ , es efectivamente mediado por el ICD del  $\beta$ -DG, lo que confirma su función moduladora de la respuesta del nucleolo al estrés celular.





**Figura 14. La sobreexpresión del dominio intracelular del  $\beta$ -dístroglicano ( $\beta$ -DG-ICD) modula negativamente la expresión y localización de UBF.** A) Esquema de las construcciones que expresan el ICD de  $\beta$ -DG fusionado a GFP o a 3Xflag. B) Las células C2C12 se transfectaron transitoriamente con plásmidos que expresan GFP o ICD-GFP. Las células se sometieron a inmunofluorescencia indirecta doble con anticuerpos específicos para UBF y B23 a las 24 horas post-transfección. C) Transfección transitoria en células C2C12 para expresar las variantes del ICD del  $\beta$ -DG fusionadas a 3Xflag y analizar mediante inmunofluorescencia indirecta la localización de UBF. D) Las células C2C12 que expresan el ICD de  $\beta$ -DG fusionado a GFP se sometieron a ensayos

de inmunodetección en fase sólida, utilizando anticuerpos contra GFP, UBF, B23 y actina (control de carga). E) Los niveles de expresión de UBF y B23 se cuantificaron mediante densitometría. Las diferencias significativas se obtuvieron mediante la prueba t de student no paramétrica, a partir de tres ensayos independientes.

## DISCUSION

La envoltura nuclear es la estructura que delimita el interior del núcleo del citoplasma y de esta manera protege el genoma. Su integridad es importante ya que funciona como andamiaje para que la célula ejecute funciones esenciales, incluyendo la organización del genoma, la expresión de genes, la reparación de daño al ADN, la mecano-transducción y la señalización celular [15]. La envoltura nuclear está compuesta por las membranas nucleares interna y externa y el poro nuclear. En la membrana nuclear se encuentran embebidas diferentes proteínas estructurales y por debajo de esta estructura esta la lámina nuclear. Alteraciones en proteínas de la envoltura nuclear ocasionan diversas enfermedades genéticas que en su conjunto son denominadas laminopatías, así como distintos tipos de cáncer [17, 38].

Recientemente nuestro grupo de trabajo reportó la presencia de alteraciones en la morfología nuclear de fibroblastos primarios provenientes de individuos con DM1 [30], debido a la deslocalización de la lámina A/C y la proteína de membrana nuclear interna emerina. Estos resultados sugieren que la disfunción de la envoltura nuclear podría ser parte de los mecanismos moleculares de la DM1. Tomando en cuenta estos antecedentes, decidimos analizar la conexión funcional entre las láminas nucleares y la heterocromatina en cultivos de fibroblastos de pacientes con DM1. Mediante el análisis de la localización de las láminas nucleares A/C, B1 y B2 revelamos que los fibroblastos DM1 presentan alteraciones morfológicas de la envoltura nuclear y que estas deformaciones son más frecuentes y severas en fibroblastos de pacientes con DM1 con un mayor número de repetidos CTG. Se ha reportado que la disminución de las láminas nucleares A/C y B1 ocasiona deformaciones de la morfología nuclear [15]. No obstante, encontramos de manera inesperada que el nivel de las láminas A/C, B1 y B2 se incrementa en los fibroblastos de DM1, con respecto a los fibroblastos de un individuo normal. Con excepción del cultivo con 2000 repetidos CTG, parece que la cantidad de las láminas se incrementa proporcionalmente con un aumento en el número de repetidos. En la literatura encontramos que niveles altos de lámina B1, debido a la duplicación del

gen LMNB1, causan una morfología nuclear aberrante y una mayor rigidez nuclear en fibroblastos provenientes de pacientes con Leucodistrofia dominante autosomal (ADLD) [39]. Este fenotipo se reprodujo cuando sobre-expresaron la lámina B1 en fibroblastos silvestres [40]. Por lo tanto, el exceso de las láminas nucleares probablemente ocasiona un desbalance en la red de interacciones proteína-proteína de la envoltura nuclear de los fibroblastos de DM1.

Previamente se ha asociado a la lámina B1 y al receptor de la lámina B1 (LBR) con la arquitectura de la heterocromatina y senescencia celular inducida por oncogenes [41], por lo que procedimos a analizar el estado de la heterocromatina en cultivos de fibroblastos de DM1. De manera interesante, observamos un aumento de LBR, la histona H3K9me3 (marcador de heterocromatina) y de la proteína de unión a cromatina HP1 $\alpha$  en los fibroblastos DM1, lo que confirma que el desbalance de los niveles de las lamina B1 impacta consecuentemente a LBR y a componentes de la heterocromatina. Específicamente se ha reportado en fibroblastos provenientes de pacientes con ADLD que alteraciones en la organización de la heterocromatina dañan en segundo término la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos [42], lo que finalmente perturba la producción de mielina en el SNC, marca molecular distintiva de la ADLD [43, 44]. A este respecto, es interesante comentar que se han reportado déficit cognitivo, retraso mental y alteraciones neuropatológicas que incluye déficit de mielina, en la DM1 [45, 46], lo que sugiere que podría presentarse una desregulación del eje lámina nuclear-cromatina en la DM1. Se ha reportado que la desorganización de la heterocromatina daña la morfología nuclear [47], de hecho el tratamiento con inhibidores de histonas acetil transferasas (HDACs) y demetiladas (HDMTs) rescata la estructura del núcleo [47]. Por lo tanto, las aberraciones de la envoltura nuclear que exhiben los fibroblastos DM1 podrían ser debidas en primer lugar a la perturbación de la heterocromatina. En apoyo a esta hipótesis, se demostró previamente que la presencia de los repetidos CTG en la región 3' UTR del gen DMPK promueve una conformación más compacta y por lo tanto menos activa de la cromatina [48].

Considerando que las láminas nucleares regulan también la plasticidad del nucléolo, exploramos la posibilidad de que el aumento en la cantidad de las láminas

nucleares, mediado por los repetidos CTG, se reflejará en la morfología de los nucléolos. De manera interesante, los fibroblastos de DM1 presentaron nucléolos de mayor tamaño (expansión nucleolar), en comparación con los fibroblastos de un individuo normal. La expansión nucleolar es una característica de las células senescentes y cancerosas que se presenta por un aumento anormal de la biogénesis ribosomal y en última instancia de la traducción [25, 49, 50]. Consistentemente, encontramos un incremento en el nivel del factor de transcripción del ADNr UBF, un incremento y deslocalización del nucléolo al nucleoplasma de B23, y un aumento de p53. Mientras que el nivel alto de UBF sugiere que la síntesis de ARNr se aumenta en los fibroblastos DM1, la deslocalización de B23 y el incremento de p53 implican una respuesta del nucléolo al estrés celular mediada por la vía de señalización de p53/p21 [33]. Es importante mencionar que demostramos que la expansión del nucléolo se origina por los repetidos CTG, ya que la transfección de fibroblastos control con un vector que expresa repetidos CTG en un número patológico recrea el aumento de tamaño de los nucléolos.

La activación de p53 generalmente conduce a un arresto del ciclo celular y finalmente a la senescencia [51]. Sin embargo, aunque los fibroblastos DM1 con 1000 CTG presentan un arresto en la fase G0/G1, no encontramos células senescentes en estos cultivos.

El estancamiento que sufre la ADN Pol II durante la replicación, debido a la presencia de los repetidos CTG del gen *DMPK*, podría ser la señal de estrés (activación de la reparación del daño al ADN) que activa a p53 [53, 54]. De manera interesante, el mismo p53 tiene la capacidad de unirse a los repetidos CTG [52]. Se requieren estudios posteriores para definir la función de p53 en los fibroblastos de DM1.

## CONCLUSIONES

1. Los fibroblastos DM1 presentan un aumento en el nivel de las láminas nucleares.
2. Diferentes componentes de la red lámina nuclear-heterocromatina están alterados en los fibroblastos DM1.
3. La presencia de los agregados del ARNm mutante de la DM1 causan expansión nucleolar y aumento de las proteínas nucleolares UBF y B23, así como arresto en la fase G0/G1 debido posiblemente a la acumulación de p53.

## PERSPECTIVAS

- Analizar como los agregados de ARNm mutante de la DMPK, causan la desregulación de los niveles de las láminas nucleares en fibroblastos de DM1.
- Analizar si la alteración de los niveles de las láminas de tipo B se encuentra directamente ligada a la aparición de los focos de heterocromatina y la expansión nucleolar observada en fibroblastos de DM1.
- Investigar si la modulación de marcas de heterocromatina mediante el uso de inhibidores, impacta sobre la morfología nuclear de los fibroblastos de DM1.
- Averiguar si los altos niveles de heterocromatina en fibroblastos de DM1 se encuentran regulando de manera negativa la expresión de proteínas implicadas en la aparición de los fenotipos característicos de la DM1.
- Disminuir la presencia de los agregados de ARNm mutante de la DMPK mediante el uso de oligos anti-sentido y analizar si esto causa la restitución de los fenotipos alterados en fibroblastos de DM1.
- Analizar a detalle la posible activación de p53 en el nucleolo y su implicación en la respuesta a estrés originada por los agregados de ARNm mutante en fibroblastos de DM1.

- Analizar la posible alteración de la biogénesis ribosomal en fibroblastos de DM1.

## REFERENCIAS

1. Harper, P.S., et al., *99th ENMC international workshop: myotonic dystrophy: present management, future therapy. 9-11 November 2001, Naarden, The Netherlands*. Neuromuscul Disord, 2002. **12**(6): p. 596-9.
2. Nguyen, C.E. and C. Campbell, *Myotonic dystrophy type 1*. CMAJ, 2016. **188**(14): p. 1033.
3. Schara, U. and B.G. Schoser, *Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary on current aspects*. Semin Pediatr Neurol, 2006. **13**(2): p. 71-9.
4. Mateos-Aierdi, A.J., et al., *Muscle wasting in myotonic dystrophies: a model of premature aging*. Front Aging Neurosci, 2015. **7**: p. 125.
5. Anvret, M., et al., *Larger expansions of the CTG repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(9): p. 1397-400.
6. Lopez de Munain, A., et al., *Prevalence of myotonic dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country, Spain)*. Neurology, 1993. **43**(8): p. 1573-6.
7. Ebralidze, A., et al., *RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy*. Science, 2004. **303**(5656): p. 383-7.
8. Miller, J.W., et al., *Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy*. EMBO J, 2000. **19**(17): p. 4439-48.
9. Sicot, G., G. Gourdon, and M. Gomes-Pereira, *Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(R2): p. R116-23.
10. Osborne, R.J., et al., *Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(8): p. 1471-81.
11. Frisch, R., et al., *Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy*. Mol Genet Metab, 2001. **74**(1-2): p. 281-91.
12. Wakimoto, H., et al., *Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene*. J Interv Card Electrophysiol, 2002. **7**(2): p. 127-35.
13. Harmon, E.B., et al., *Myotonic dystrophy protein kinase is critical for nuclear envelope integrity*. J Biol Chem, 2011. **286**(46): p. 40296-306.

14. Guo, T. and Y. Fang, *Functional organization and dynamics of the cell nucleus*. Front Plant Sci, 2014. **5**: p. 378.
15. Malhas, A.N. and D.J. Vaux, *Nuclear envelope invaginations and cancer*. Adv Exp Med Biol, 2014. **773**: p. 523-35.
16. Bell, E.S. and J. Lammerding, *Causes and consequences of nuclear envelope alterations in tumour progression*. Eur J Cell Biol, 2016. **95**(11): p. 449-464.
17. Chow, K.H., R.E. Factor, and K.S. Ullman, *The nuclear envelope environment and its cancer connections*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(3): p. 196-209.
18. Ho, C.Y. and J. Lammerding, *Lamins at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 9): p. 2087-93.
19. Malhas, A.N., C.F. Lee, and D.J. Vaux, *Lamin B1 controls oxidative stress responses via Oct-1*. J Cell Biol, 2009. **184**(1): p. 45-55.
20. Shumaker, D.K., et al., *The highly conserved nuclear lamin Ig-fold binds to PCNA: its role in DNA replication*. J Cell Biol, 2008. **181**(2): p. 269-80.
21. Olins, A.L., et al., *Lamin B receptor: multi-tasking at the nuclear envelope*. Nucleus, 2010. **1**(1): p. 53-70.
22. Villarreal-Silva, M., et al., *Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells*. Neurochem Res, 2010. **35**(3): p. 366-73.
23. Martin, C., et al., *Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 10): p. 1551-62.
24. Sen Gupta, A. and K. Sengupta, *Lamin B2 Modulates Nucleolar Morphology, Dynamics, and Function*. Mol Cell Biol, 2017. **37**(24).
25. Buchwalter, A. and M.W. Hetzer, *Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 328.
26. Harr, J.C., et al., *Directed targeting of chromatin to the nuclear lamina is mediated by chromatin state and A-type lamins*. J Cell Biol, 2015. **208**(1): p. 33-52.
27. Roth, S.Y., J.M. Denu, and C.D. Allis, *Histone acetyltransferases*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 81-120.
28. Boisvert, F.M., et al., *The multifunctional nucleolus*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 574-85.
29. Boulon, S., et al., *The nucleolus under stress*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 216-27.
30. Rodríguez, R., et al., *Altered nuclear structure in myotonic dystrophy type 1-derived fibroblasts*. Mol Biol Rep, 2015. **42**(2): p. 479-88.
31. Meinke, P., et al., *Myotonic Dystrophy-A Progeroid Disease?* Front Neurol, 2018. **9**: p. 601.
32. Tian, B., et al., *Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR*. RNA, 2000. **6**(1): p. 79-87.

33. Yang, K., et al., *A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13599.
34. Loaliza, N. and M. Demaria, *Cellular senescence and tumor promotion: Is aging the key?* Biochim Biophys Acta, 2016. **1865**(2): p. 155-67.
35. Burton, D.G. and V. Krizhanovsky, *Physiological and pathological consequences of cellular senescence*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(22): p. 4373-86.
36. Shav-Tal, Y., et al., *Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(5): p. 2395-413.
37. Gracida-Jiménez, V., et al., *Retrograde trafficking of  $\beta$ -dystroglycan from the plasma membrane to the nucleus*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9906.
38. 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.
39. Ferrera, D., et al., *Lamin B1 overexpression increases nuclear rigidity in autosomal dominant leukodystrophy fibroblasts*. FASEB J, 2014. **28**(9): p. 3906-18.
40. Barascu, A., et al., *Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation*. EMBO J, 2012. **31**(5): p. 1080-94.
41. Narita, M., et al., *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. Cell, 2003. **113**(6): p. 703-16.
42. Padiath, Q.S., *Lamin B1 mediated demyelination: Linking Lamins, Lipids and Leukodystrophies*. Nucleus, 2016. **7**(6): p. 547-553.
43. Rolyan, H., et al., *Defects of Lipid Synthesis Are Linked to the Age-Dependent Demyelination Caused by Lamin B1 Overexpression*. J Neurosci, 2015. **35**(34): p. 12002-17.
44. Padiath, Q.S., *Autosomal Dominant Leukodystrophy: A Disease of the Nuclear Lamina*. Front Cell Dev Biol, 2019. **7**: p. 41.
45. Minnerop, M., et al., *The brain in myotonic dystrophy 1 and 2: evidence for a predominant white matter disease*. Brain, 2011. **134**(Pt 12): p. 3530-46.
46. de León, M.B. and B. Cisneros, *Myotonic dystrophy 1 in the nervous system: from the clinic to molecular mechanisms*. J Neurosci Res, 2008. **86**(1): p. 18-26.
47. Stephens, A.D., et al., *Chromatin histone modifications and rigidity affect nuclear morphology independent of lamins*. Mol Biol Cell, 2018. **29**(2): p. 220-233.
48. Brouwer, J.R., et al., *Transcriptionally Repressive Chromatin Remodelling and CpG Methylation in the Presence of Expanded CTG-Repeats at the DM1 Locus*. J Nucleic Acids, 2013. **2013**: p. 567435.
49. Dillinger, S., T. Straub, and A. Németh, *Nucleolus association of chromosomal domains is largely maintained in cellular senescence despite massive nuclear reorganisation*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0178821.

50. Hein, N., et al., *The nucleolus: an emerging target for cancer therapy*. Trends Mol Med, 2013. **19**(11): p. 643-54.
51. Golomb, L., S. Volarevic, and M. Oren, *p53 and ribosome biogenesis stress: the essentials*. FEBS Lett, 2014. **588**(16): p. 2571-9.
52. Walter, K., et al., *tumor suppressor p53 binds with high affinity to CTG.CAG trinucleotide repeats and induces topological alterations in mismatched duplexes*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42497-507.
53. Pearson, C.E., K. Nichol Edamura, and J.D. Cleary, *Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(10): p. 729-42.
54. Mirkin, S.M., *Expandable DNA repeats and human disease*. Nature, 2007. **447**(7147): p. 932-40.