



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

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“LA EXPORTACIÓN NUCLEAR ALTERADA, UN MECANISMO CLAVE EN EL  
SÍNDROME DE PROGERIA Y EL ENVEJECIMIENTO NORMAL”**

**TESIS**

**Que presenta:**

**M en C. ALMA NELY ALAMILLO INIESTA**

Para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS.**

En la especialidad de:

**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.**

Director de Tesis

**Dr. Bulmaro Cisneros Vega**

**Ciudad de México**

**Noviembre 2020**

Este trabajo fue realizado en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N bajo la tutoría del Dr. Bulmaro Cisneros Vega.

El presente trabajo fue apoyado por el CONACyT a través del proyecto 237123

Durante la realización del mismo, la estudiante Alma Nely Alamillo Iniesta fue apoyada como becario del CONACyT con el número de registro 299182

*Dedico este trabajo a mi maravillosa familia, empujando por mí esposo Eduardo y mi hermosa hija, a mi madre, mi padre, y mis hermanos; son el ejemplo de amor, esfuerzo, honradez y humildad que me inspira a trabajar todos los días para ser una mejor persona. Siempre serán mi luz cuando mis días estén nublados, mis alegrías que le den sentido a mi vida, y mi paz que Dios me ha regalado.*

# AGRADECIMIENTOS

A Dios, no existen palabras para agradecer lo que haces en mi vida, mis manos son tus manos y este trabajo es tuyo. Contigo todo y sin ti nada.

A CONACyT por su apoyo para poder realizar este proyecto.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega por la dirección del proyecto y por permitirme estar en su laboratorio.

A la Dra. Sara Luz Morales Lázaro, y a los Doctores Francisco García Sierra, José Efraín Garrido Guerrero y Jaime García Mena, por su ayuda y sus sugerencias hacia mi trabajo.

Al Dr. Javier Hernández Sánchez por su integridad como persona, y por demostrarme que, aunque el panorama pueda ser desalentador, aún existen personas honestas que defienden la verdad.

A Gabriela Mora nuestra secretaria del departamento, por toda su ayuda y calidad como persona, a Viri por ayudarnos en la compra del material y a Pablo Gómez por su ayuda en el laboratorio.

A mi esposo Eduardo, por ser el mejor esposo, amante y amigo, porque es un hombre extraordinario en todos los sentidos, a quien honro, admiro y respeto por su serenidad y fortaleza. Le doy gracias por ayudarme a crecer profesionalmente y confiar en mí, por estar conmigo en este proceso, y por cuidarme y ayudarme tanto cuando esperábamos a nuestra hija. Gracias porque me ha dado una familia maravillosa, porque es la fortaleza y el pilar en cualquier dificultad, y me ha demostrado que no existe mejor regalo y recompensa que la bondad y el amor. Te amo más allá de mí.

A mi mamá, esa mujer hermosa que me ama tanto incondicionalmente; gracias por darme los mejores principios, por ser un excelente ejemplo de vida y convertirme en la mujer que soy, por enseñarme a amarme, respetarme y a comprobar que con esfuerzo siempre alcanzaré todos mis sueños. Te amo mamita.

A mi papá por no dejarme sola y apoyarme siempre, por enseñarme que con esfuerzo siempre se puede alcanzar lo que uno quiere, porque has confiado en mí en cada paso que doy, por demostrarme que tu amor es más grande que la distancia, por abrazarme y recordarme que siempre estarás conmigo. Te amo pa.

A mi hermana Hilda por ser mi mejor amiga y estar siempre cuando la necesito y también cuando no, por hacerme reír y darme unas niñas hermosas que me aman. Porque definitivamente sin ti, mi vida no tendría sentido, te amo hermanini.

A mi hermano Oscar, porque gran parte de lo que soy ahora es por él, porque siempre me retaba a ser mejor y no rendirme, porque siempre fue mi guía y líder a quien admire por su inteligencia y honestidad. Créeme, hermano, que sin ti no sería quien soy, te amo.

A los pastores Arleth y Hernán, mis otros padres, porque me han dado la mejor enseñanza que pude tener, porque fue en el camino que me mostraron, en el que sentí el abrazo de Dios.

A Grace, Isaac, Vick y Dani, soy afortunada de tener a personas tan ejemplares y hermosas en mí vida, estoy muy agradecida de poder conservarlos después de tanto tiempo, mis mejores amigos, los amo. A mis amigos de CINESTAV, Salmita, Juan de Dios, Adri, y Ari, amigos que llegaron para quedarse, gracias por estar en todas las etapas de este trabajo. Los amo.

# Contenido

Resumen .....	8
Abstract .....	9
1. Introducción .....	10
1.1 Envejecimiento y el Síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford (HGPS) .....	10
1.2 La Lámina A y la progerina .....	13
1.3 Terapias contra el HGPS .....	15
2. ANTECEDENTES .....	18
3. JUSTIFICACIÓN .....	25
4. HIPÓTESIS .....	26
5. OBJETIVOS .....	27
5.1 GENERAL .....	27
5.2 PARTICULARES .....	27
6. DIAGRAMA EXPERIMENTAL .....	28
7. METODOLOGÍA .....	29
7.1 Cultivo primario de fibroblastos .....	29
7.2 Anticuerpos y plásmidos .....	30
7.3 Tratamientos .....	31
7.4 Transfecciones .....	31
7.5 Western Blot (WB) .....	31
7.6 Inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal .....	31
7.7 Ensayos cuantitativos de inmunoprecipitación de la cromatina (Q-ChIP) .....	32
7.8 Ensayos de viabilidad celular .....	32
7.9 Ensayo de citoquímica para identificar células senescentes .....	32
7.10 Ensayos de la actividad de promotor .....	33
7.11 Análisis estadístico .....	33
8. RESULTADOS .....	34
8.1 La sobreexpresión de CRM1 se debe a un aumento en la actividad de su promotor inducida por la progerina .....	34
8.2 La sobreexpresión ectópica de CRM1 reproduce el fenotipo senescente del HGPS .....	38
8.3 La sobreexpresión de CRM1 induce la expresión de algunos marcadores de senescencia en las células HeLa a pesar de que el gradiente de Ran se encuentre alterado .....	42

<b>8.4 Participación de la exportina CRM1 en el envejecimiento normal</b> .....	45
<b>8.5 La atenuación farmacológica de CRM1 alivia marcas de senescencia en fibroblastos de individuos de edad avanzada</b> .....	50
<b>8.6 Análisis comparativo de los inhibidores de CRM1 Selinexor y LMB</b> .....	54
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	65
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	66
<b>12. ARTÍCULO</b> .....	67
<b>13. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	68

# FIGURAS

Figura 1.- Procesamiento de la prelamina A en células normales y HGPS. ....	12
Figura 2.- Marcas de envejecimiento celular. ....	14
Figura 3.- Espectro de estrategias de tratamiento contra el HGPS.....	16
Figura 4.- Sobre-expresión de la exportina CRM1 en los fibroblastos HGPS.....	20
Figura 5.- Análisis del viabilidad y muerte celular en células HGPS tratadas con LMB.....	21
Figura 6.- La inhibición farmacológica de CRM1 disminuye algunos marcadores de la senescencia celular en las células con HGPS.....	23
Figura 7.- La actividad del promotor de CRM1 está aumentada en las células HGPS-2. ....	35
Figura 8.- Análisis de la expresión de progerina en células HeLa. ....	37
Figura 9.- La sobreexpresión ectópica de CRM1 induce el fenotipo de envejecimiento prematuro en fibroblastos primarios normales. ....	42
Figura 10.- La exportación nuclear alterada debido a la sobreexpresión de CRM1 se sobrepone a un gradiente de Ran deficiente. ....	45
Figura 11.- La expresión y actividad de CRM1, aumentan durante el envejecimiento normal.....	50
Figura 12.- El tratamiento con LMB restablece el área nucleolar y la marca de heterocromatina H3K9me3 durante el envejecimiento normal.....	53
Figura 13.- El selinexor posee características superiores a LMB. ....	56
Figura 14.- Modelo esquemático que muestra como la sobreexpresión ectópica de CRM1 asemeja el fenotipo senescente presente en el HGPS.....	64

# Resumen

El síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) es una enfermedad de envejecimiento prematuro que no tiene cura, la cual comparte muchos de sus fenotipos característicos con el envejecimiento normal; por lo que la identificación de procesos biológicos desregulados en el HGPS podría ayudar a definir nuevas estrategias terapéuticas para ambas condiciones. La progerina actúa como una proteína dominante negativa de la lámina A que cambia la estructura de la lámina nuclear, dando lugar a los diferentes fenotipos relacionados con la senescencia en el HGPS, sin embargo la relación de esta desregulación de la lámina nuclear con el fenotipo senescente en la progeria es aún desconocido. En este trabajo reportamos por primera vez que la exportación nuclear está exacerbada en el HGPS debido a la sobreexpresión de CRM1, y demostramos que está relacionada directamente con la expresión de progerina; además, observamos que la actividad de promotor de la exportina CRM1 se encuentra elevada en fibroblastos de pacientes con HGPS. En el grupo de trabajo se observó que la inhibición farmacológica de CRM1 recupera varios marcadores celulares asociados al envejecimiento prematuro. Por lo que en este estudio realizamos la sobreexpresión exógena de CRM1 en fibroblastos normales, y observamos que se recrea el fenotipo senescente relacionado con el HGPS, así como, la inhibición farmacológica revierte en su mayoría los fenotipos alterados. Interesantemente también encontramos que los niveles y la actividad de CRM1 aumentan en fibroblastos de individuos de edad avanzada y a su vez la inhibición farmacológica recupera algunos fenotipos relacionados con la senescencia celular. En conjunto, estos hallazgos corroboran que la exportación nuclear alterada mediada por CRM1 es un fenotipo clave en el envejecimiento prematuro y en el envejecimiento normal, por lo que puede ser considerado como una nueva alternativa terapéutica.

# Abstract

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is an incurable premature aging disease which shares many of its characteristic phenotypes with normal aging; therefore, the identification of deregulated biological processes in HGPS could help to discover new therapeutic strategies for both conditions. Progerin acts as a dominant negative protein of lamin A that disrupts the structure of the nuclear lamina, giving rise to the different phenotypes related to senescence in HGPS, however the relationship of this dysregulation of the nuclear lamina with the senescent phenotype in progeria it is still unknown. Here we report for the first time that nuclear export is exacerbated in HGPS due to the overexpression of CRM1, and we show that it is directly related to the expression of progerin; furthermore, we observed that the promoter activity of exportin CRM1 is elevated in fibroblasts from patients with HGPS. It was previously observed that pharmacological inhibition of CRM1 recovers various cellular markers associated with premature aging. For this reason, in this study, the exogenous overexpression of CRM1 in normal fibroblasts, re-capitulates the HGPS cellular phenotype, as well as, the pharmacological inhibition reverses most altered phenotypes. Interestingly, we also found that the levels and activity of CRM1, increase in cells from healthy aged individuals and, in turn, pharmacological inhibition recovers some phenotypes related to cellular senescence. Altogether, these findings corroborate that CRM1-mediated altered nuclear export is a key phenotype in premature aging and normal aging, so it can be considered as a new therapeutic alternative.

# 1. Introducción

## 1.1 Envejecimiento y el Síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford (HGPS)

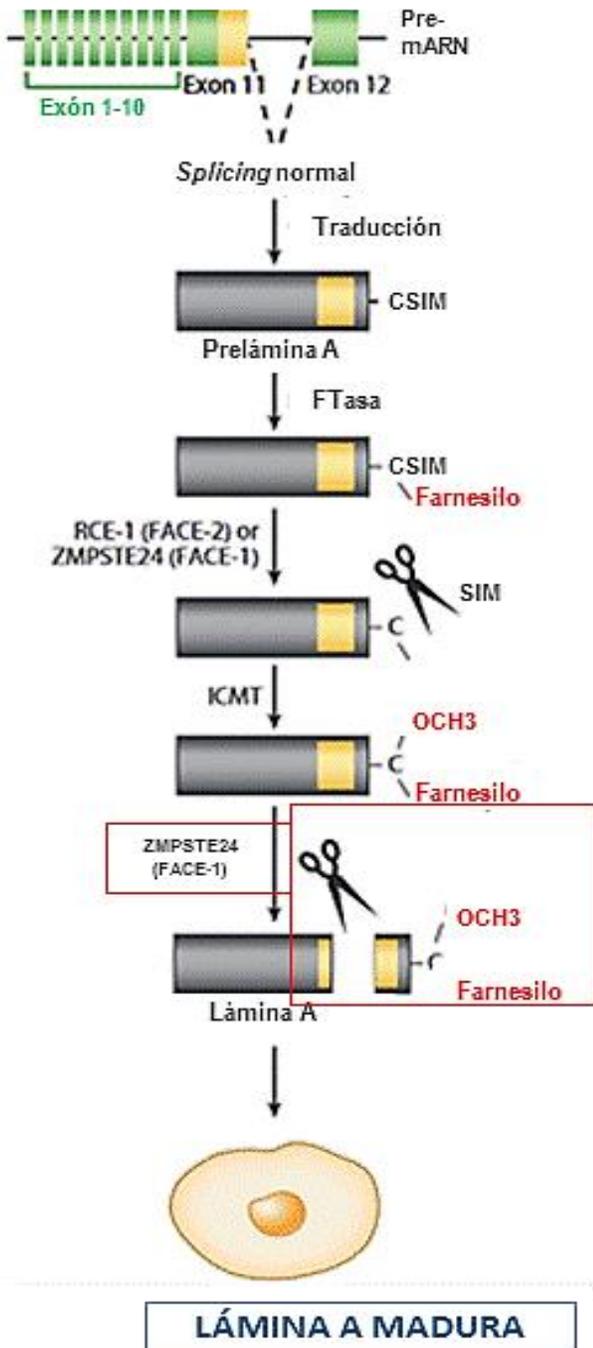
Inicialmente se definió al envejecimiento como la acumulación progresiva de cambios a través del tiempo que están asociados a una mayor susceptibilidad ante las enfermedades (Harman, 1956), pero una definición más actual considera al envejecimiento como la disminución gradual de las capacidades físicas y psicológicas que causan alteraciones morfológicas, metabólicas y cognitivas que limitan la calidad de vida y en última instancia causan la muerte (Lopez-Otin, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer, 2013). Los síndromes progeroides (envejecimiento prematuro) son un grupo de enfermedades monogénicas que se asemejan en algunos aspectos con el envejecimiento natural. La mayoría, si no todos, son causados por mutaciones en los genes de reparación del ADN o láminas nucleares (Ashapkin, Kutueva, Kurchashova, & Kireev, 2019). Estas enfermedades podrían desempeñar un papel importante como modelo en los estudios de los mecanismos naturales de envejecimiento. Una de las enfermedades de envejecimiento acelerado más estudiada es el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS por sus siglas en inglés; Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome), causado por mutaciones en el gen *LMNA* que codifica las proteínas fibrilares nucleares laminas A y C (Kubben & Misteli, 2017).

El HGPS es el síndrome de envejecimiento acelerado más frecuente y ampliamente estudiado. Este ha despertado gran interés, debido a que los fenotipos que presenta son muy similares al envejecimiento normal, por lo tanto, su estudio podría ayudar a encontrar tratamientos para evitar o retrasar la progresión de enfermedades asociadas al envejecimiento. El HGPS afecta a 1 de cada 4–8 millones de recién nacidos y los individuos afectados mueren por ataques al miocardio o accidentes cerebrovasculares alrededor de los 13 años (Hennekam, 2006; Kubben & Misteli, 2017). Las características clínicas de HGPS se manifiestan poco después del nacimiento e incluyen alopecia de cuerpo completo, pérdida de grasa subcutánea y músculo esquelético, distrofia ungueal, rigidez articular, arrugas de la piel, calcificaciones

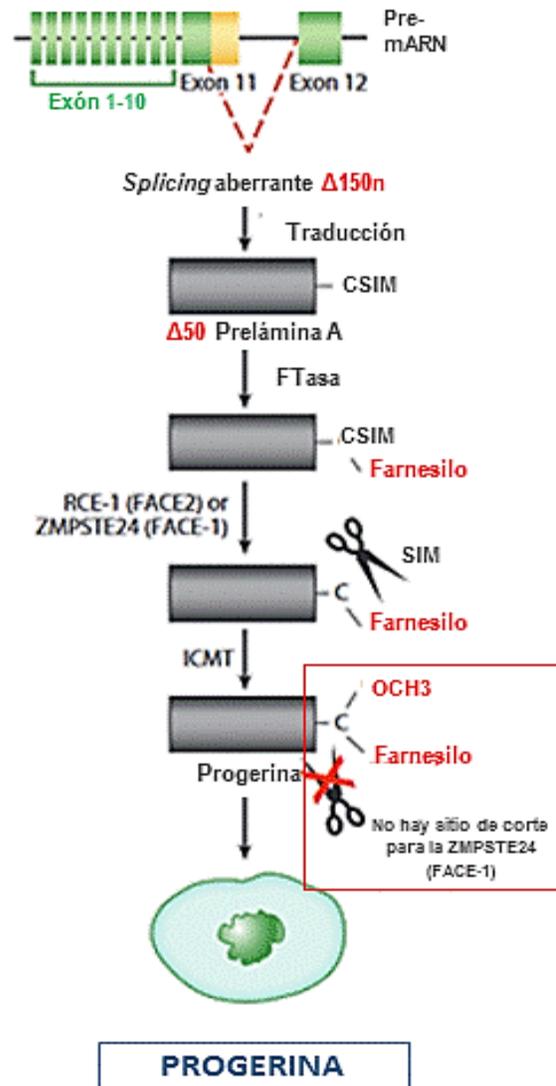
subcutáneas, debilitamiento de la estructura ósea y pérdida de la vista (Hennekam, 2006). La mayoría de estas características están presentes en el envejecimiento normal (Ashapkin et al., 2019).

El HGPS es causado por una mutación puntual *de novo* que se localiza en el exón 11 de uno de los alelos del gen *LMNA*, donde la mutación cambia una citosina por una timina (1824C>T) y expone un sitio crítico de *splicing* que ocasiona la eliminación de 150 nucleótidos en el RNA mensajero maduro. Esto resulta en la síntesis de una variante trunca de la prelámina A que carece de 50 aminoácidos en el extremo carboxilo y se le ha asignado el nombre de progerina ( $\Delta 50$  prelámina A). Debido a que la región faltante contiene un sitio de corte para la enzima Zmpste24, encargada de remover un grupo farnesilo que se agrega a la lámina A durante su maduración, la proteína mutante progerina permanece anormalmente farnesilada (Fig. 1). De esta manera la progerina se acumula en su forma farnesilada y carboximetilada en su extremo C-terminal (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003; Y. Wang et al., 2016). La expresión anormal de prelamina A y progerina causa múltiples alteraciones estructurales y funcionales en la célula.

A



B



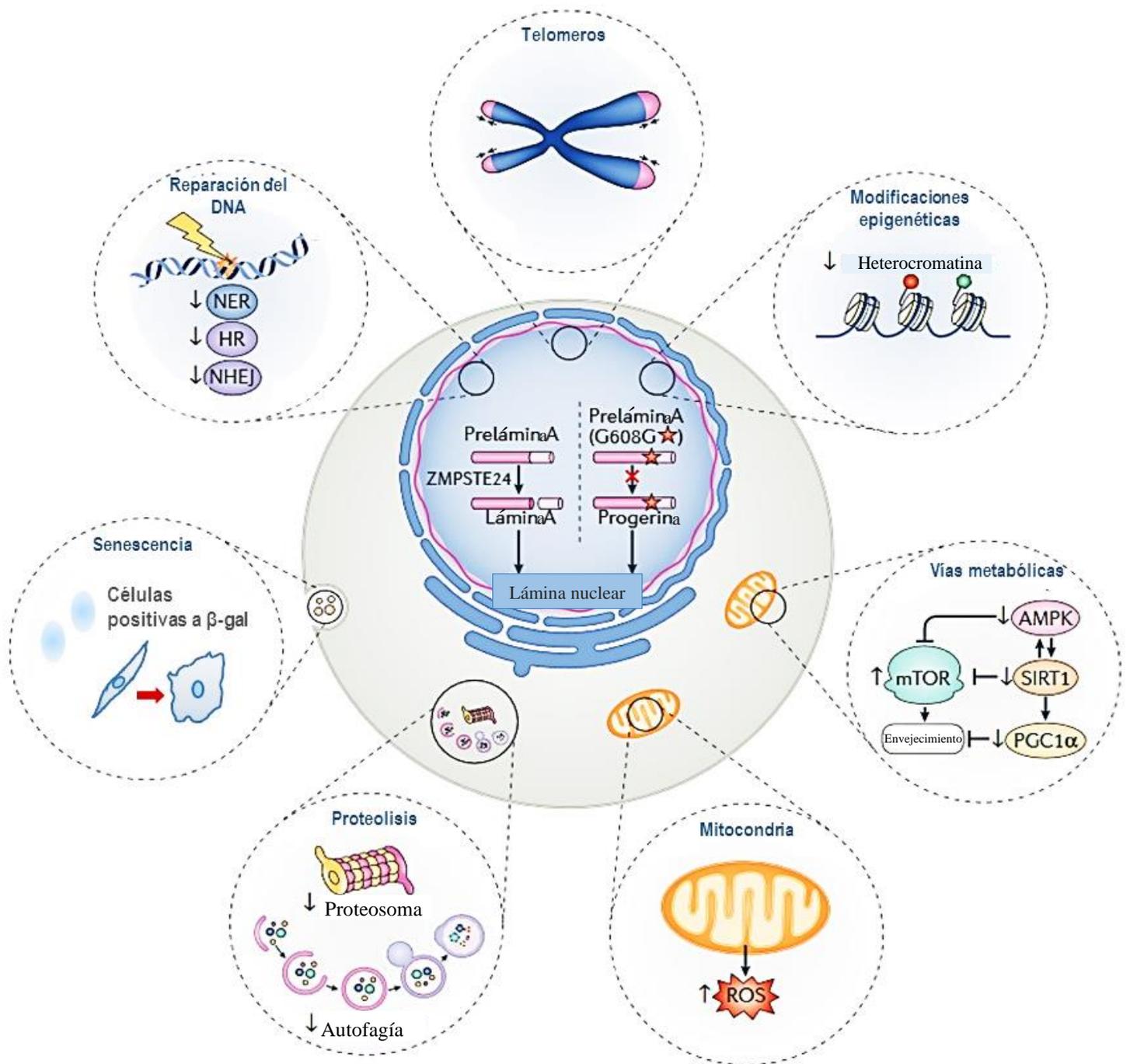
**Figura 1.- Procesamiento de la prelámina A en células normales y HGPS.**

(A) En las células normales se lleva a cabo un splicing normal entre los exones 11 y 12 del gen LMNA, que da lugar a la prelámina A, la cual sufre modificaciones postraduccionales secuenciales para producir la lámina A madura. La acción de la proteasa ZMPSTE24 (también conocida como FACE-1) elimina la región del C-terminal que está farnesilado y carboximetilado. (B) El HGPS es causado por una mutación de novo en el gen LMNA (c.1824C> T; p.G608G), que produce un splicing aberrante entre los exones 11-12. La falta de 50 residuos de aminoácidos que abarcan el sitio de escisión de ZMPSTE24 impide la eliminación de la región del C-terminal, lo que ocasiona que la progerina permanezca farnesilada y carboximetilada, lo que a su vez provoca múltiples alteraciones celulares, envejecimiento prematuro y muerte. [Modificado de (Hamczyk, del Campo, & Andres, 2018)]

## 1.2 La Lámina A y la progerina

El procesamiento de la lámina A (farnesilación y carboxi-metilación) es importante para que la proteína migre del retículo endoplásmico hacia el interior del núcleo y se ancle correctamente en la envoltura nuclear, y su procesamiento final (corte por la metaloproteasa ZMPSTE24) es muy importante para que la proteína madure y lleve a cabo sus funciones. La lámina A forma parte de la lámina nuclear, la cual está compuesta por las láminas tipo A (A, C) y las láminas tipo B (B1 y B2). La lámina contribuye a la asociación de la envoltura nuclear con la heterocromatina periférica y a la integridad nuclear (de Leeuw, Gruenbaum, & Medalia, 2018; Dechat, Adam, Taimen, Shimi, & Goldman, 2010); por lo tanto, su deficiencia altera la plasticidad nuclear y la organización de la cromatina (De Vos et al., 2010; Gruenbaum & Foisner, 2015).

Por su parte, la progerina actúa como una dominante negativa, se acumula en la periferia nuclear e interrumpe las propiedades mecanoquímicas de la lámina nuclear, causando múltiples alteraciones estructurales y funcionales, incluyendo la transducción de señales, la transcripción, la estructura de la cromatina, la morfología nuclear, la reparación de ADN, la función mitocondrial, el ciclo celular, y estabilidad de los telómeros; todas estas alteraciones provocan en última instancia senescencia celular, muerte celular, y la aceleración del envejecimiento del organismo (Dorado & Andres, 2017; Gordon et al., 2014) (Gordon, Cao, & Collins, 2012; Gruenbaum & Foisner, 2015) (Fig. 2). Actualmente se desconocen los mecanismos moleculares que generan todas estas alteraciones en el HGPS.



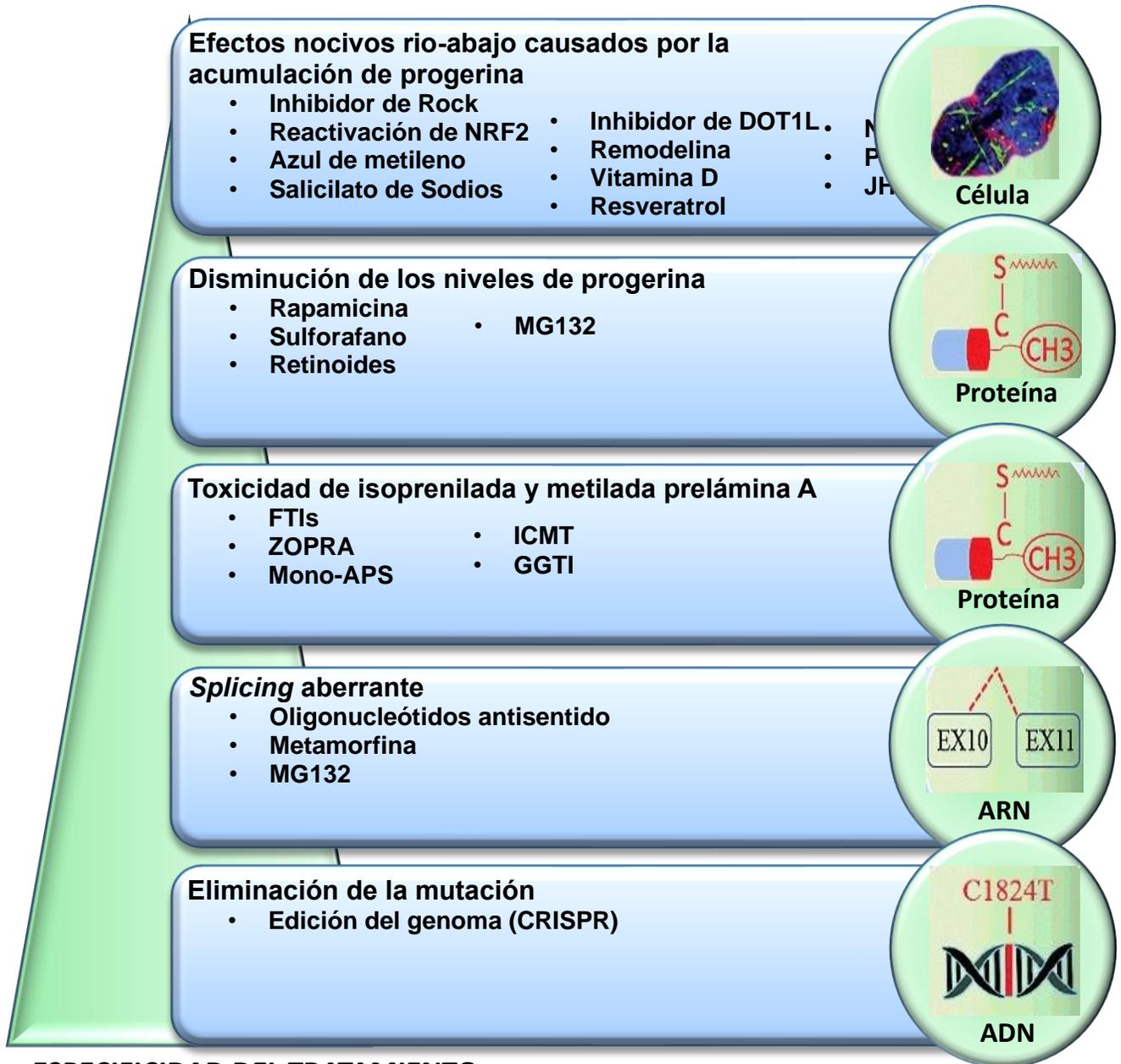
**Figura 2.- Marcas de envejecimiento celular.**

Se muestra una descripción general de los defectos celulares/moleculares que subyacen los trastornos del envejecimiento prematuro y el envejecimiento normal. Estas alteraciones están interconectados e incluyen una deficiencia en la vía de reparación del DNA, pérdida de integridad genómica, una pérdida global de heterocromatina, alteraciones en la señalización metabólica, aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) por disfunción mitocondrial, actividad reducida de las vías proteolíticas promotoras de proteostasis y activación de vías de senescencia [Modificado de (Hamczyk et al., 2018; Kubben & Misteli, 2017)]

### 1.3 Terapias contra el HGPS

Actualmente el desarrollo de terapias para contrarrestar la enfermedad ha tenido muy poca eficiencia; sin embargo, se ha propuesto un amplio espectro de estrategias de tratamiento dirigidas a varios procesos y con diferentes especificidades (Harhoury et al., 2018; Piekarowicz, Machowska, Dzianisava, & Rzepecki, 2019) (Fig. 3).

El uso de un inhibidor de la enzima farnesil-transferasa (FTI), que evita la farnesilación de la progerina, y a su vez el anclaje permanente de la progerina en la membrana nuclear sólo aumenta la expectativa de vida de pacientes en alrededor de 1.6 años. (Gordon et al., 2012; Gordon et al., 2014). El uso de MG132 (un inhibidor del proteosoma), promueve la degradación de progerina mediante autofagia, logrando disminuir la senescencia celular (Harhoury et al., 2017). Al inhibir la vía de señalización de mTOR, mediante rapamicina se observa la degradación de la progerina, lo que da lugar a la recuperación de la morfología nuclear y el retraso de la senescencia (Cao et al., 2011). El tratamiento con el químico JH4, impide la unión de la progerina con la lámina A, mejorando los defectos nucleares y evita la senescencia prematura (Lee et al., 2016). El uso de azul de metileno también disminuye las aberraciones nucleares y alivio la senescencia celular (Xiong et al., 2016) . Por otra parte, el uso de oligonucleótidos morfolinicos que bloquean el *splicing* críptico del gen LMNA, también ha sido ampliamente estudiado, y ha logrado disminuir diversas marcas relacionadas con senescencia celular, sin embargo, su uso clínico es muy limitado debido a la toxicidad que presenta (Osorio et al., 2011; Scaffidi & Misteli, 2005). A pesar del estudio de diferentes tratamientos, únicamente el FTI ha sido usado de forma clínica pero sin resultados muy prometedores.



## ESPECIFICIDAD DEL TRATAMIENTO

**Figura 3.- Espectro de estrategias de tratamiento contra el HGPS.**

Las estrategias de tratamiento se presentan de arriba hacia abajo dependiendo de su especificidad, en donde las estrategias más específicas están en la base de la Figura. Alivio de la enfermedad por medio de la eliminación de la mutación mediante la edición del genoma (CRISPR). Inhibición del *splicing* aberrante usando oligonucleótidos antisentido (AON). Tratamiento con Metformina y MG132 para reducir los niveles de progerina isoprenilada y metilada. Inhibidores de la enzima farnesil transferasa, FTI (ZOledronato-PRAvastatina, ZOPRA, monoaminopirimidinas: mono-APs, inhibidor de la isoprenilcisteína carboximetil transferasa (ICMT), inhibidor de la enzima geranil). Disminución de los niveles de progerina (tratamiento con rapamicina, sulforafano, retinoides o MG132). Alivio de los efectos nocivos río abajo causados por la acumulación de progerina (inhibidor de Rock: Y-27632, factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2: reactivación de NRF2, azul de metileno, salicilato de sodio, Inhibidor de DOT1L: epz-4777, remodelina, vitamina D, resveratrol, N-acetil-cisteína: NAC, pirofosfato inorgánico: PPI y JH4). [Modificado de (Harhour et al., 2018; Piekarowicz, Machowska, Dzianisava, & Rzepecki, 2019)].

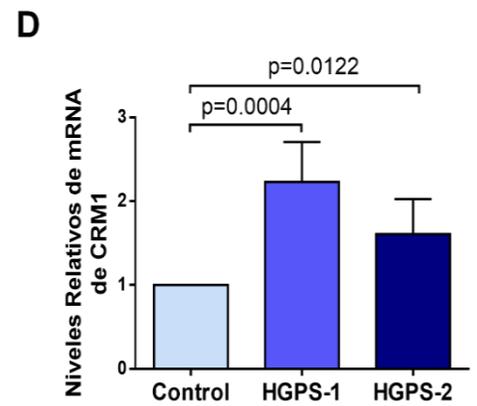
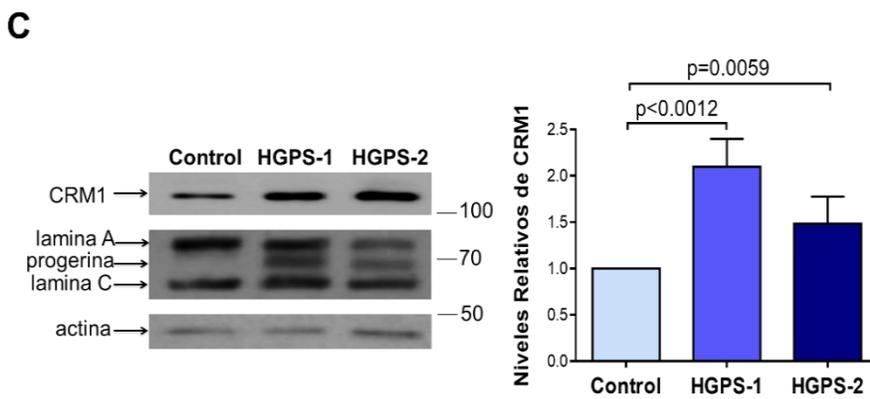
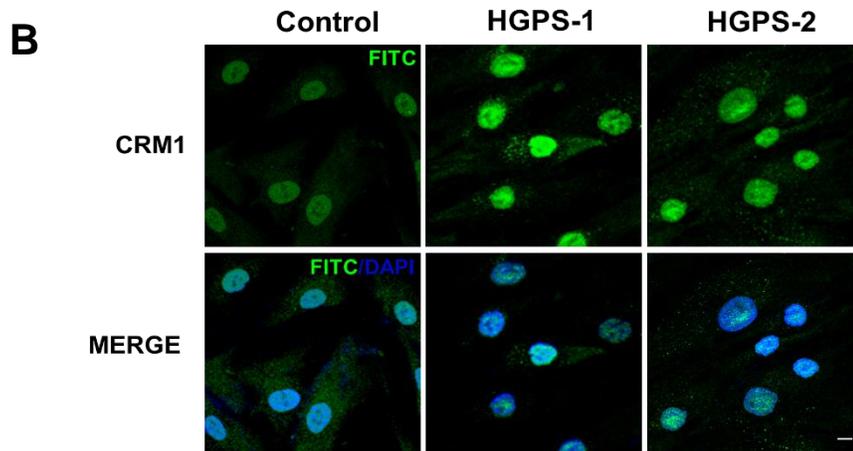
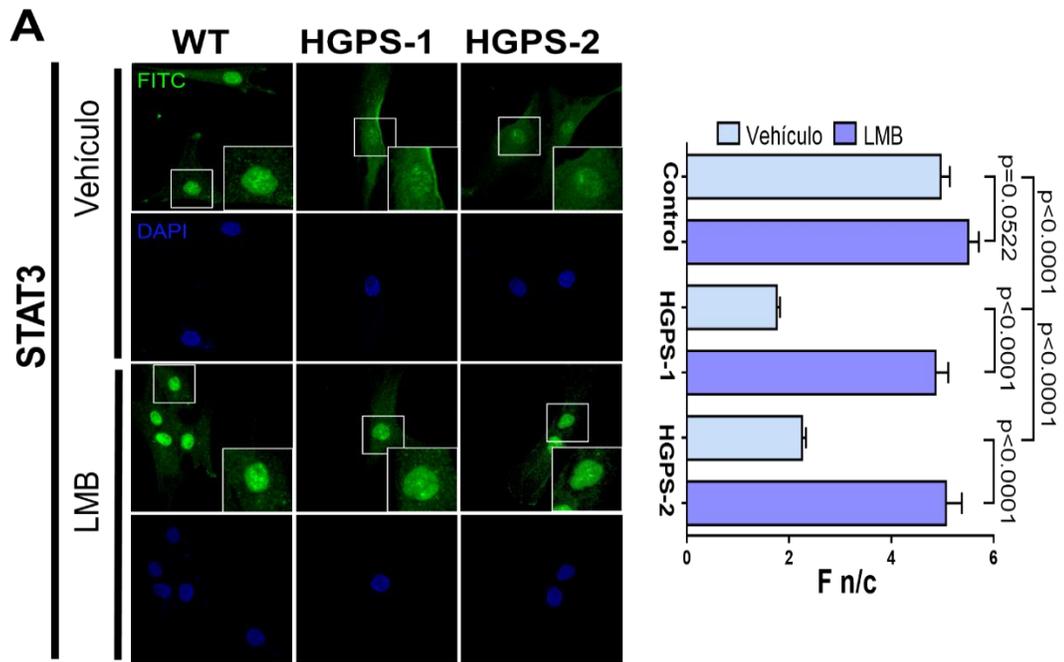
Recientemente, estudios sobre la desregulación del transporte núcleo-citoplasmático en el HGPS, han abierto una nueva posibilidad de tratamiento para la enfermedad.

Se ha reportado un gradiente núcleo-citoplasmático anormal de guanosina 5'-trifosfato (GTP) unido a Ran (RanGTP), lo que ocasiona que la importación nuclear de algunas proteínas que requieren transporte activo dependiente de Ran a través del poro nuclear, se altere (Datta, Snow, & Paschal, 2014; Kelley et al., 2011; Snow, Dar, Dutta, Kehlenbach, & Paschal, 2013). Interesantemente, se ha reportado que la vía de importación no clásica mediada por Transportin-1 (TNPO1) está desregulada, afectando varias proteínas importantes para la regulación celular (NUP153 hnRNPA1, TPR y Ran nuclear) (Larrieu et al., 2018). Se ha reportado en las células con HGPS una fuerte unión de TNPO1 a los microtubulos, y se ha propuesto que la acetiltransferasa NAT10, que tiene una actividad incrementada en estas células, hiperacetila a tubulina, siendo responsable indirecta de la desregulación de TNPO1. La inhibición de NAT10 mediante remodelina, restablece la importación nuclear dependiente de TNPO1 en las células HGPS, permitiendo el transporte y reclutamiento normal de las proteínas antes mencionadas, lo que consecuentemente restablece la reorganización de la cromatina y la transcripción global de genes, evitando así la entrada prematura de las células a senescencia (Larrieu et al., 2018).

Debido a que el gradiente de Ran es importante también para la exportación nuclear, es interesante preguntar si este mecanismo dirigido por la Exportina 1 (XPO 1), también conocida como CRM1 (*chromosomal maintenance 1*, por sus siglas en inglés) está alterado en el HGPS. CRM1 se une a las proteínas cargo a través de una señal de exportación nuclear rica en leucina (NES) y las transporta a través del poro nuclear mediante un gradiente Ran-GTP (Fu, Fung, Cagatay, Baumhardt, & Chook, 2018; Ishizawa, Kojima, Hail, Tabe, & Andreeff, 2015). Dicho mecanismo puede ser inhibido por el fármaco Leptomicina B (LMB), el cual se une covalentemente al sitio activo de la exportina CRM1 en la cisteína 529 (Kudo et al., 1999).

## 2. ANTECEDENTES

Resultados previos del laboratorio, mostraron que el mecanismo de exportación nuclear está alterado en fibroblastos de pacientes con HGPS denominados, HGPS-1 y HGPS-2, en comparación con fibroblastos provenientes de un individuo sano (Control). Al analizarse la localización subcelular de diferentes proteínas que presentan una señal de exportación nuclear (NES; *nuclear export signal*) dependiente de CRM1, se observó que sus niveles nucleares estaban disminuidos en las células con HGPS, y consecuentemente su concentración en el compartimento citoplasmático estaba aumentada. En la Figura 4A se muestra como ejemplo, que la distribución subcelular del factor de transcripción STAT3, está disminuida en el núcleo e incrementada en el citoplasma en las células con HGPS. La cuantificación de la relación núcleo/citoplasma de la señal de fluorescencia corroboró estas observaciones (gráfica de la derecha). De manera interesante, cuando las células con HGPS se trataron con 1nM de LMB (inhibidor específico de CRM1), se recuperó la localización nuclear predominante de ciertas proteínas, incluyendo STAT3, siendo parecida a la localización que se observó en los fibroblastos control (Fig. 4A). En consecuencia, estos resultados indican que la deslocalización de las proteínas se debe a una alteración en la exportación nuclear. Para analizar si este mecanismo alterado podría ser debido a una desregulación en la expresión de la exportina, en el grupo de trabajo se evaluaron los niveles de la exportina CRM1. Como se aprecia en la Figura 4B, el nivel de fluorescencia de CRM1 fue más intenso en las células con HGPS que en las células control, lo que sugiere que los niveles de CRM1 están elevados en los fibroblastos con HGPS. Para corroborar esta hipótesis se midió la concentración de CRM1 mediante ensayos de WB y RT-PCR. Estos experimentos demostraron efectivamente, que los niveles de CRM1 están aumentados en las células HGPS, e interesantemente el incremento en la expresión de CRM1 ocurre a nivel de ARN mensajero (Figura 4C Y 4D), lo que sugirió una posible regulación transcripcional.



**Figura 4.- Sobre-expresión de la exportina CRM1 en los fibroblastos HGPS.**

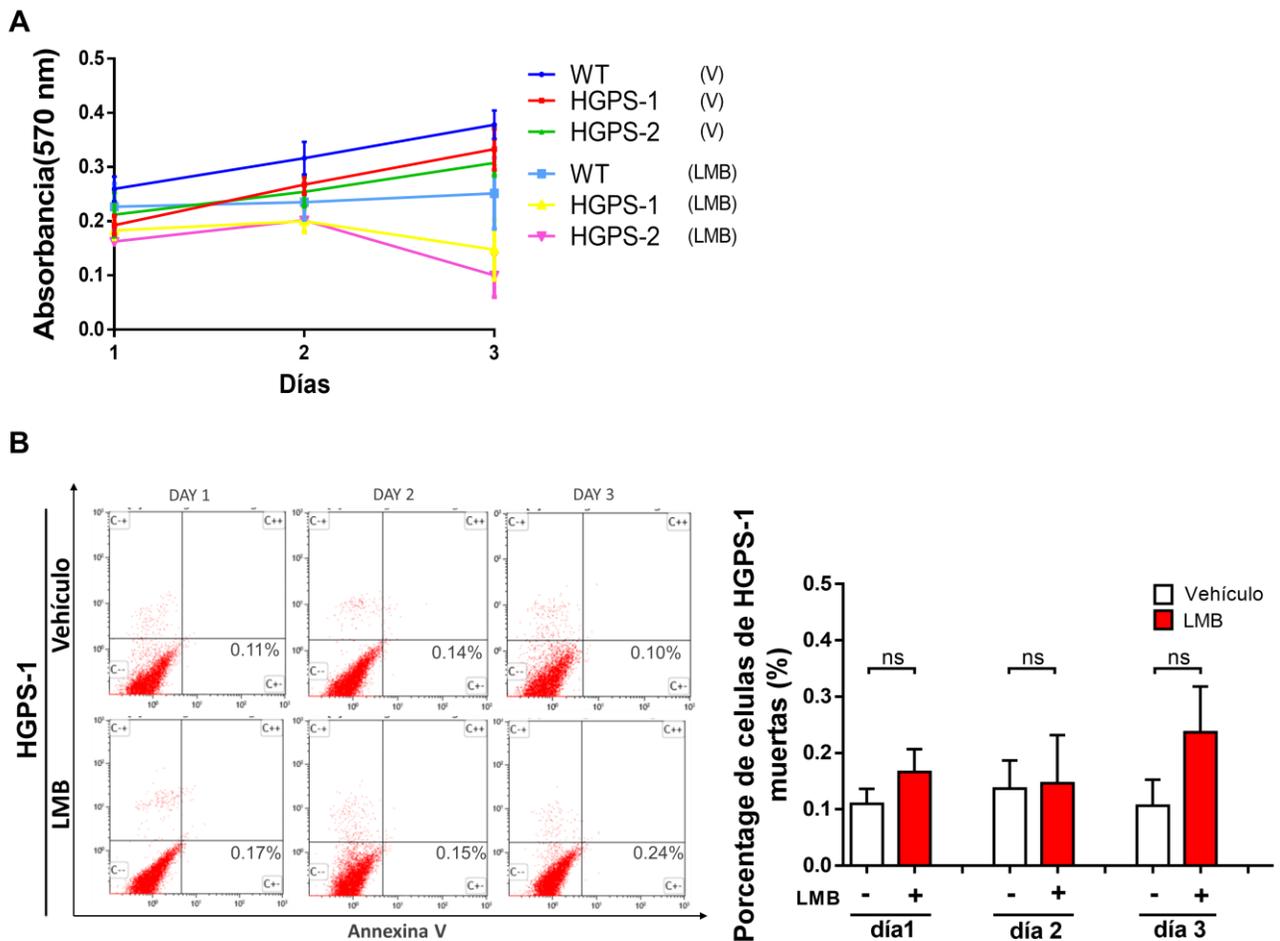
(A) Los cultivos de fibroblastos primarios de individuos con HGPS y de un individuo sano se cultivaron sobre cubreobjetos y se trataron durante 6 días con 1 nM de leptomicina B (LMB) diluida en etanol al 70%, y con el vehículo solamente. Las preparaciones se sometieron a ensayos de IF indirecta para analizar la distribución de las proteínas, STAT-3, B23, ZO2, Dp71 Y HDAC (solo se muestran los resultados para STAT3). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestran imágenes representativas de microscopia confocal de 3 experimentos independientes con cortes ópticos a nivel del núcleo. El tratamiento con LMB restauró los niveles nucleares de las proteínas analizadas en los fibroblastos HGPS. (B) La distribución subcelular de la exportina CRM1 se examinó mediante IF indirecta utilizando anticuerpos anti-CRM1. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. (C) Se obtuvieron lisados de los fibroblastos normales y de HGPS para su análisis mediante WB, utilizando anticuerpos específicos para CRM1 y actina (control de carga). Se cuantificaron los niveles de CRM1, ajustándose con los niveles de actina y las diferencias significativas entre los cultivos celulares se indican con asteriscos (panel inferior). (D) Se cuantificaron los niveles del ARN mensajero de la exportina CRM1 mediante RT-PCR en tiempo real. Los datos representan la media +/- desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas.

*(Fig. 4A proporcionada por Dra. Vélez Aguilar; Fig. 4B por M. en C. Rodríguez Pérez; Fig. 4C en colaboración con M. en C. Rodríguez Pérez; Fig 4D por Dra. Vázquez Limeta).*

Como se observó previamente, el aumento de CRM1 deslocaliza diversas proteínas que tienen NES, y el uso de la LMB reestablece su localización dentro del núcleo. Debido que hay más de 250 proteínas que dependen de la exportina CRM1 y la regulación controlada de su localización subcelular es importante para la proteostasis dentro de las células (Xu, Grishin, & Chook, 2012), fue factible pensar que en el HGPS, la sobreexpresión de la exportina CRM1 está relacionada con el fenotipo característico de la enfermedad, por lo que se planteó como hipótesis, que la atenuación de la actividad exacerbada de CRM1 mediante el tratamiento con LMB a las células con HGPS podría evitar o retrasar la senescencia celular, fenotipo que es característico del HGPS.

Para comprobar esta hipótesis, fue necesario analizar si el tratamiento con LMB afectaba la viabilidad de las células, por lo que realizamos un ensayo de MTT sobre los cultivos celulares con HGPS y el grupo control, tratados con LMB y el vehículo desde el día 1 hasta el día 3. En la Figura 5A se observa que los cultivos control y los cultivos con HGPS presentan una disminución de la viabilidad celular, pero sin que se presente muerte celular (Fig. 5B; medida por Anexina V) (experimentos preliminares que llevaron a la precisión de los objetivos). Estos resultados pueden explicarse debido a la acción que tiene la LMB sobre el ciclo celular, se sabe que este fármaco arresta las células en

la fase GO/G1, sin embargo al no haber muerte celular, es factible pensar que permanecen en un estado de quiescencia (Yoshida et al., 1990).



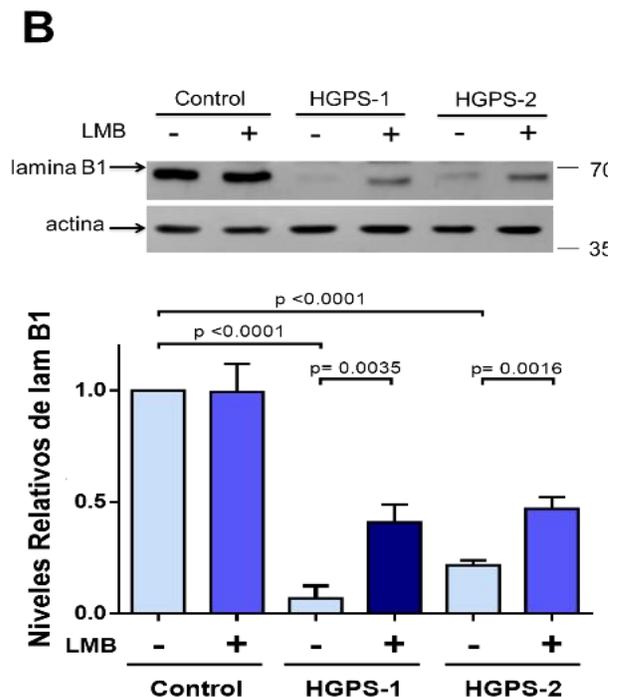
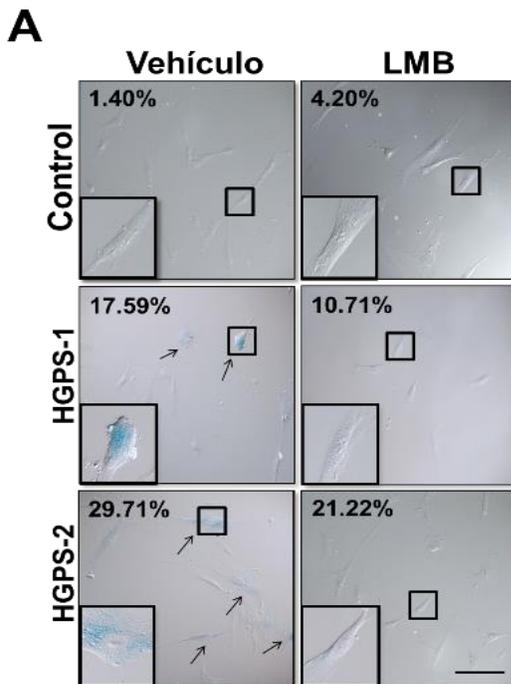
**Figura 5.- Análisis del viabilidad y muerte celular en células HGPS tratadas con LMB.**

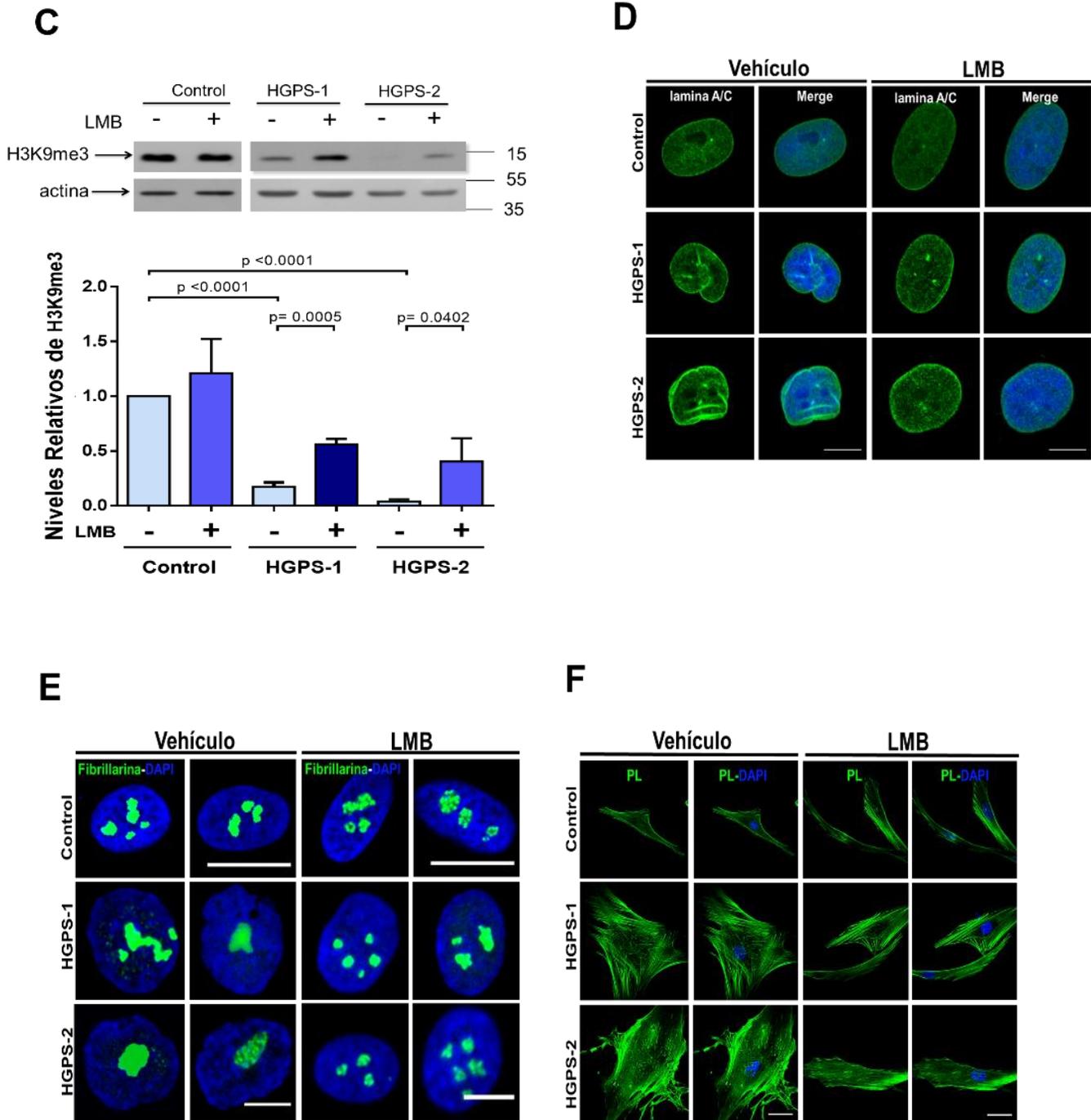
(A) La viabilidad de las células control y HGPS tratadas con LMB 1 nM o con el vehículo solamente. Se evaluó durante un período de 3 días mediante ensayos con MTT. Se muestran los datos de tres ensayos independientes. (B) Las células se trataron con LMB 1 nM o vehículo durante 3 días antes de teñirse con anexina V y yoduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo. Porcentaje de muerte celular de tres experimentos independientes.

Como siguiente paso, se procedió a analizar si el tratamiento con LMB facilitaría la recuperación del fenotipo senescente de las células con HGPS. De manera notable, después del tratamiento con LMB, se observó una disminución en cuanto al número de células teñidas positivamente para la enzima  $\beta$ -galactosidasa (SA- $\beta$ -gal), un marcador relacionado directamente con la senescencia celular (Fig. 6A). Así mismo, también se observó una recuperación parcial de los niveles de proteína de la lámina B1 después del tratamiento con LMB (Fig. 6B). Los bajos niveles de lámina B1 están estrechamente

relacionados con la aparición de senescencia celular. Otro fenotipo característico del HGPS es la pérdida de la heterocromatina, por lo tanto se evaluó este marcador mediante el análisis de la histona H3K9me3 (marcador de heterocromatina). En apoyo a la hipótesis planteada, se observó que las células con HGPS tratadas con LMB recuperan los niveles de proteína de la histona H3K9me3 (Fig. 6C). La morfología nuclear aberrante y la expansión nucleolar (evaluadas por tinción para lámina A/C y para fibrilarina, respectivamente) que se presentan en las células con HGPS (características relacionadas con la senescencia celular), disminuyeron como respuesta a la acción de la LMB, indicando que la regulación de esos fenotipos puede estar estrechamente relacionada con la exportación nuclear (Fig. 6D y E). Por último, la expansión de la superficie celular como característica morfológica alterada en la senescencia de los fibroblastos HGPS, también se recuperó después del tratamiento con LMB (Fig. 6F).

En conjunto, estos resultados indicaron que el fenotipo celular del HGPS se reduce después de que la actividad exacerbada de la exportina CRM1 se atenúa usando la LMB. Por lo tanto, la desregulación de la exportación puede ser uno de los mecanismos centrales que desencadenan la senescencia celular.





**Figura 6.- La inhibición farmacológica de CRM1 disminuye algunos marcadores de la senescencia celular en las células con HGPS.**

(A) Los fibroblastos control y HGPS se trataron durante 2 días con LMB 1 nM o con el vehículo solamente. Se evaluó la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa y se muestran imágenes representativas de su expresión activa. Barra = 100  $\mu$ m. El porcentaje de células senescentes se calculó a partir de 3 experimentos independientes ( $n = 300$  células para cada condición). (B) Los lisados de fibroblastos control y HGPS, previamente tratados durante 6 días con LMB o con el vehículo 50 nM, se analizaron mediante WB, usando anticuerpos contra la lámina B1 y actina (control de carga). Se evaluaron cuantitativamente los niveles de lámina B1 (panel inferior). (C) Los lisados de las células HGPS tratadas con LMB o con el

vehículo se analizaron mediante WB usando anticuerpos contra H3K9me3 y actina (control de carga). Se muestran los niveles relativos de H3K9me3 (gráfica inferior). Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba "t" no pareada. (D) Los fibroblastos control y HGPS se trataron durante 3 días con LMB 50 nM o con el vehículo solamente. Posteriormente las células se inmunomarcaron para lámina A / C y se analizaron por IF. (E) Los fibroblastos control y HGPS, se inmunotñieron contra fibrillarina para visualizar los nucléolos. Barra, 10  $\mu$ m. (F) Los fibroblastos control y HGPS se tiñeron, marcando con faloidina para visualizar el cito-esqueleto de actina. Barra, 50  $\mu$ m. (Fig. 6A, 6B, 6C y 6F proporcionadas por M.en C..García Aguirre; Fig. 6D, por M. en C. Amaro Encarnación; Fig. 6E en colaboración con Dra. Vélez Aguilar).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El hecho de que la modulación farmacológica de la actividad exacerbada de la exportina CRM1 recupera algunas marcas celulares/moleculares, relacionadas del fenotipo senescente de las células HGPS, sugiere que la hiperactividad de exportación nuclear es un mecanismo central en el HGPS. Por lo tanto, sería importante evaluar si la sobreexpresión de la exportina CRM1 es suficiente para recrear algunas características del fenotipo de senescencia celular en fibroblastos.

Además, debido a la estrecha relación del fenotipo senescente en el HGPS con el envejecimiento normal, es factible pensar que la actividad desregulada de la exportación nuclear también sea parte de los cambios moleculares que se presentan durante el envejecimiento celular.

## 4. HIPÓTESIS

La hiperactividad del mecanismo de exportación nuclear de proteínas producida por una sobreexpresión de la exportina CRM1, inducirá senescencia celular en fibroblastos normales. Debido a que el mecanismo exacerbado de exportación nuclear mediado por CRM1 parece mediar alteraciones celulares en el síndrome progeroide, es factible también que en cierta medida este mecanismo juegue un papel durante envejecimiento normal.

# 5. OBJETIVOS

## 5.1 GENERAL

Estudiar la participación de la exportina CRM1 en el desarrollo de la senescencia celular asociada al HGPS.

## 5.2 PARTICULARES

### **1.-Identificar el mecanismo que provoca la sobreexpresión de CRM1 en el HGPS y/o en el envejecimiento fisiológico.**

- a) Estudiar la actividad del promotor de CRM1 en fibroblastos con HGPS.
- b) Analizar la sobreexpresión de la proteína progerina en un sistema heterólogo (HeLa) y evaluar los niveles de la exportina CRM1, así como su relación con la senescencia celular.
- c) Identificar la actividad de unión de factores de transcripción que regulan la actividad del promotor de CRM1.

### **2.- Definir si la sobreexpresión de la exportina CRM1 recrea los fenotipos característicos del HGPS.**

- a) Sobreexpresar la exportina CRM1 en fibroblastos normales.
- b) Analizar marcas celulares/moleculares relacionadas con la senescencia celular (células positivas a  $\beta$ -gal, lámina B1, H3K9me3 y expansión celular).

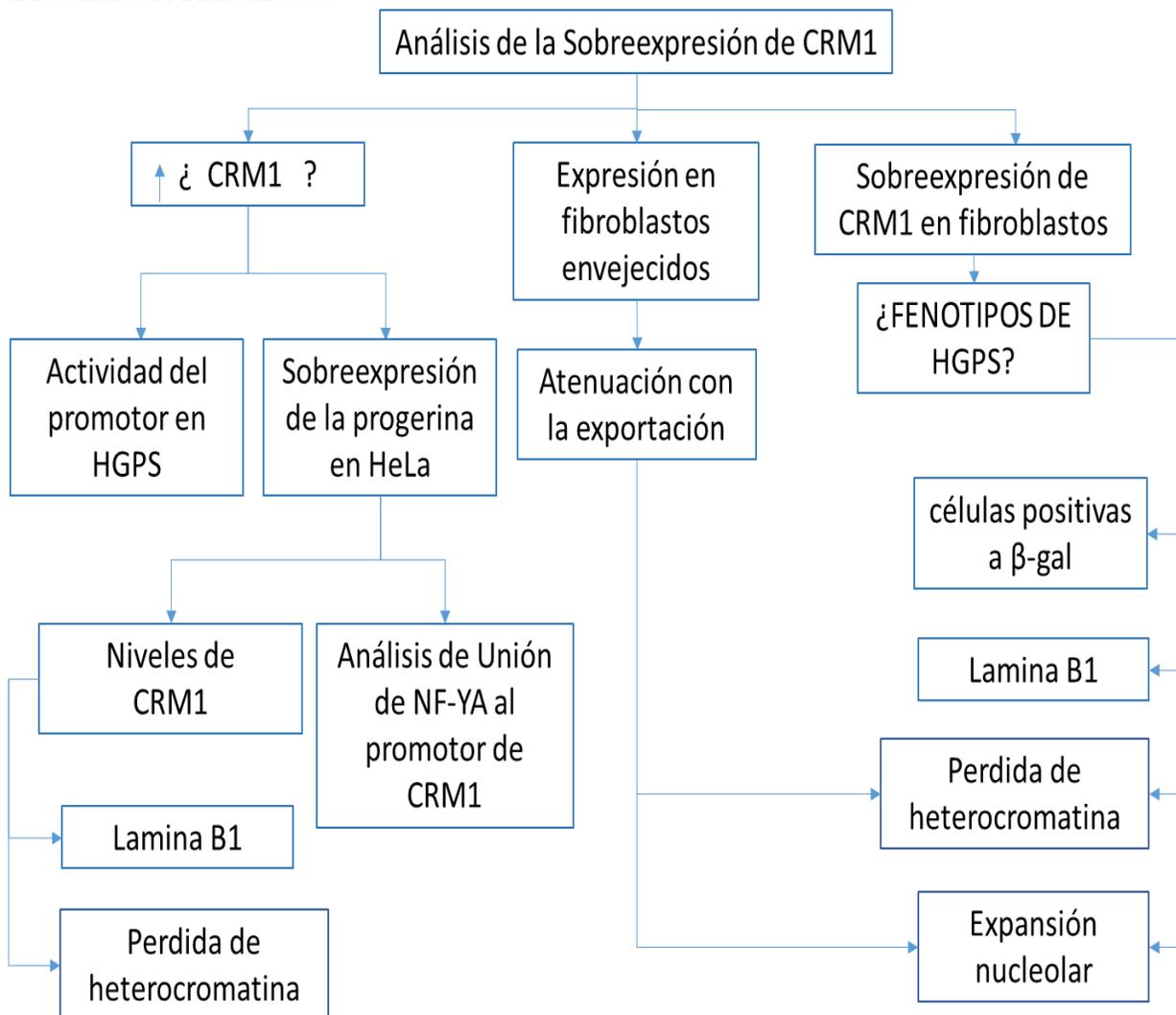
### **3.- Determinar si la sobreexpresión/hiperactividad de la exportina CRM1 ocurre en el envejecimiento normal.**

- a) Evaluar los niveles y actividad de la exportina CRM1 en fibroblastos provenientes de individuos de edad avanzada.
- b) Analizar las marcas moleculares de la senescencia celular en fibroblastos provenientes de individuos de edad avanzada.

### **4.- Evaluar comparativamente el efecto de los inhibidores de la exportina CRM1: selinexor y Leptomycin B.**

- a) Analizar la localización subcelular de proteínas con NES.
- b) Evaluar la viabilidad celular después del tratamiento con los dos fármacos.

## 6. DIAGRAMA EXPERIMENTAL



# 7. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de esta propuesta se realizaron una combinación de metodologías y técnicas bioquímicas y moleculares, así como un análisis morfológico por microscopía confocal.

## 7.1 Cultivo primario de fibroblastos

Cultivo celular. Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos de piel (Coriell Cell Repository, Camden NJ) que se mantuvieron y propagaron en medio MEM suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 50 U/ml de penicilina y estreptomicina, a una temperatura de 37°C y en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. La línea celular humana de cáncer de útero HeLa (ATCC® CCL-2™) se cultivó en medio DMEM bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

**TABLA 1** Lista de cultivos de fibroblastos usados en este estudio

<b>Cultivo</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>Mutación en LMNA</b>	<b>Edad del donador</b>	<b>Genero</b>
<b>AG08469 (WT)</b>	Coriell	None	38	M
<b>AG11513 (HGPS-1)</b>	Coriell	G608G	8	F
<b>AG11498 (HGPS-2)</b>	Coriell	G608G	14	M
<b>AG08470</b>	Coriell	None	10	F
<b>AG06290</b>	Coriell	None	74	M
<b>AG10884</b>	Coriell	None	87	M
<b>AG07725</b>	Coriell	None	91	M

## 7.2 Anticuerpos y plásmidos

Los anticuerpos y plásmidos utilizados en este estudio se enlistan en la Tabla 2.

**TABLA 2** Lista de anticuerpos y plásmidos usados en este estudio

<b>ANTICUERPOS</b>				
<b>ANTICUERPO</b>	<b>PROVEEDOR</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>Dilución</b>	
			<b>WB</b>	<b>IF</b>
<b>STAT3</b>	Santa Cruz Biotechnology (Cat: sc-482)	Policlonal de conejo	1:3000	1:50
<b>B23</b>	Santa Cruz Biotechnology Cat: sc-6013-a)	Policlonal de conejo	1:3000	1:50
<b>CRM1</b>	Novus Biologicals, (Cat: NB100-79802)	Policlonal de conejo	1:4000	1:250
<b>Lámina B1</b>	Abcam (Cat: ab16048)	Policlonal de conejo	1:3000	1:250
<b>Fibrillarina</b>	Abcam (Cat: ab5821)	Policlonal de conejo	N/A	1:50
<b>H3K9me3</b>	Abcam (Cat: ab8898)	Policlonal de conejo	1:3000	1:1500
<b>ZO-2</b>	Zymed Laboratories (Cat: 71-1400)	Policlonal de conejo	1:1000	1:200
<b>FLAG</b>	Cell Signaling Technology (Cat: 2368)	Policlonal de conejo	1:1000	N/A
<b>Lámina A/C</b>	Santa Cruz Biotechnology (Cat: sc-20681)	Policlonal de conejo	1:4000	N/A
<b>NTF2</b>	Santa Cruz Biotechnology (Cat: sc-80008)	Monoclonal de ratón	1:150	1:50
<b>Actina</b>	Dr. Manuel Hernández, CINVESTAV, México	Monoclonal de ratón	1:3000	N/A
<b>NF-YA</b>	Santa Cruz Biotechnology (Cat: sc-17753 X)	Monoclonal de ratón	N/A	N/A
<b>PLÁSMIDOS</b>				
<b>NOMBRE</b>		<b>PROVEEDOR</b>		
<b>pBABE-puro-GFP-wt-lámina A</b>		Addgene		
<b>pBABE-puro-GFP-progerina</b>		Addgene		
<b>pFLAG-hCRM1</b>		Addgene		
<b>p3xFLAG-CMV-10</b>		Addgene		
<b>Flag-CRM1</b>		Este estudio		
<b>CSHCTR001-nH1</b>		GeneCopoeia		
<b>CS-HSH090209-nH1-01a</b>		GeneCopoeia		
<b>pCRM1promoter</b>		Este estudio		

### **7.3 Tratamientos**

Los fibroblastos se trataron durante 1, 3 o 6 días con leptomicina B (LMB; Sigma-Aldrich) utilizando una concentración de 1 nM o 50Mm. El fármaco se diluyó en etanol a una concentración final de 0.1%. Los cultivos controles se trataron únicamente con el vehículo del fármaco.

### **7.4 Transfecciones**

Los fibroblastos se transfectaron con Lipofectamina 3,000 siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen). Se obtuvieron fibroblastos transfectados de forma estable cultivándolos durante 12 días con 200 µg/mL de G418 (Invitrogen). Las células HeLa se sometieron a transfección doble, utilizando el vector pFlag-CRM1 y un vector que expresa un siRNA (shRNA) dirigido contra el factor de transporte nuclear humano 2 (NUTF2) o un shRNA control (GeneCopoeia inc.).

Las células HeLa se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen), y para obtener cultivos transfectados establemente, las células se mantuvieron en presencia de 1µg/ml de puomicina y 800 µg/mL de G418 durante 6 días.

### **7.5 Western Blot (WB)**

Los extractos de proteínas se separaron en geles de acrilamida al 10% y 12% con SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales se bloquearon con leche descremada al 5% en la solución amortiguadora TBS-T y. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario apropiado y después de lavarse se agregó el anticuerpo secundario. La señal se reveló con ECL (Amersham) sobre placas de rayos X. Se realizó análisis de densitometría de las placas de rayos X, utilizando un sistema de captura de imágenes (Bio-Rad Laboratories), y los valores se estandarizaron con un control de carga (actina o calnexina).

### **7.6 Inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal.**

Las células se lavaron con la solución amortiguadora de cito-esqueleto (PBS con

pH=7.4), se fijaron y se permeabilizaron por incubación en una solución de paraformaldehído al 2% y 0.5% de Tritón X100 durante 15 minutos. Enseguida, las células se bloquearon por 20 minutos con gelatina al 0.5% y suero fetal bovino al 1% y se lavaron con PBS. Se agregó el anticuerpo primario apropiado y después de lavarse con PBS se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína o Cy3. Las preparaciones se lavaron con PBS, se incubaron con DAPI por 10 minutos para teñir el núcleo y se montaron sobre portaobjetos con VectaShield (Vector Laboratoires, INC), para su posterior observación en un microscopio de epi-fluorescencia acoplado al sistema confocal. Se utilizó el software image J para el análisis digitalizado de las imágenes.

## **7.7 Ensayos cuantitativos de inmunoprecipitación de la cromatina (Q-ChIP)**

Los ensayos Q-ChIP se realizaron según (Morales-Lazaro et al., 2010) utilizando 7-8 µg de anticuerpos anti-NF-YA de ratón o 7-8 µg de IgG de ratón (control irrelevante). Se usaron 20 ng de ADN para realizar ensayos cuantitativos de PCR (qPCR), usando SYBR Green e iniciadores específicos para amplificar la región promotora de CRM1 (van der Watt & Leaner, 2011).

## **7.8 Ensayos de viabilidad celular**

La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo 3- (4,5-dimetiltiazol-2-5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), como se describió anteriormente (Velez-Aguilera et al., 2018).

## **7.9 Ensayo de citoquímica para identificar células senescentes**

Los fibroblastos HGPS y del grupo control se sembraron sobre cubreobjetos de 18x18 mm contenidos en cajas petri de 35 mm, y se les adicionó 1.5 mL de medio de cultivo. Las células se incubaron por 24 horas y en seguida se lavaron con 2 ml de la solución amortiguadora de Fosfato Salino (PBS) 1X. Se adicionó 1 mL de solución fijadora 1X (2% de formaldehído, 0.2% de glutaraldehído en PBS, SIGMA) durante 7 minutos a

temperatura ambiente y posteriormente las células se lavaron dos veces con 3 mL de PBS 1X. Se adicionó a las preparaciones 1 mL de la solución de tinción de  $\beta$ -Galactosidasa [1mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-inolil- $\beta$ -D-Galactospiranosido (X-gal) en dimetilformamida (20 mg/ml stock); 40 mM ácido cítrico / fosfato de sodio a pH 6.0; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM ferricianuro potásico, SIGMA] y se incubaron a 37°C durante toda la noche en una incubadora seca sin CO<sub>2</sub>. Las preparaciones se lavaron con PBS, se dejaron secar y posteriormente se montaron en un portaobjetos con 6  $\mu$ L de VectaShield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE.UU.) Las células se observaron mediante microscopía de campo claro para cuantificar las células teñidas de azul que expresan la  $\beta$ -Galactosidasa (células senescentes).

### **7.10 Ensayos de la actividad de promotor**

Los fibroblastos WT, HGPS - 1 y HGPS - 2 se transfectaron como se describió anteriormente, utilizando un vector que expresa la luciferasa Firefly bajo el control del promotor de CRM1 humano y un vector que expresa la luciferasa de Renilla (control para normalizar la eficiencia de transfección entre los diferentes cultivos). Después de 48 h, se midió la actividad de la luciferasa usando el kit Dual Luciferase Assay (Promega).

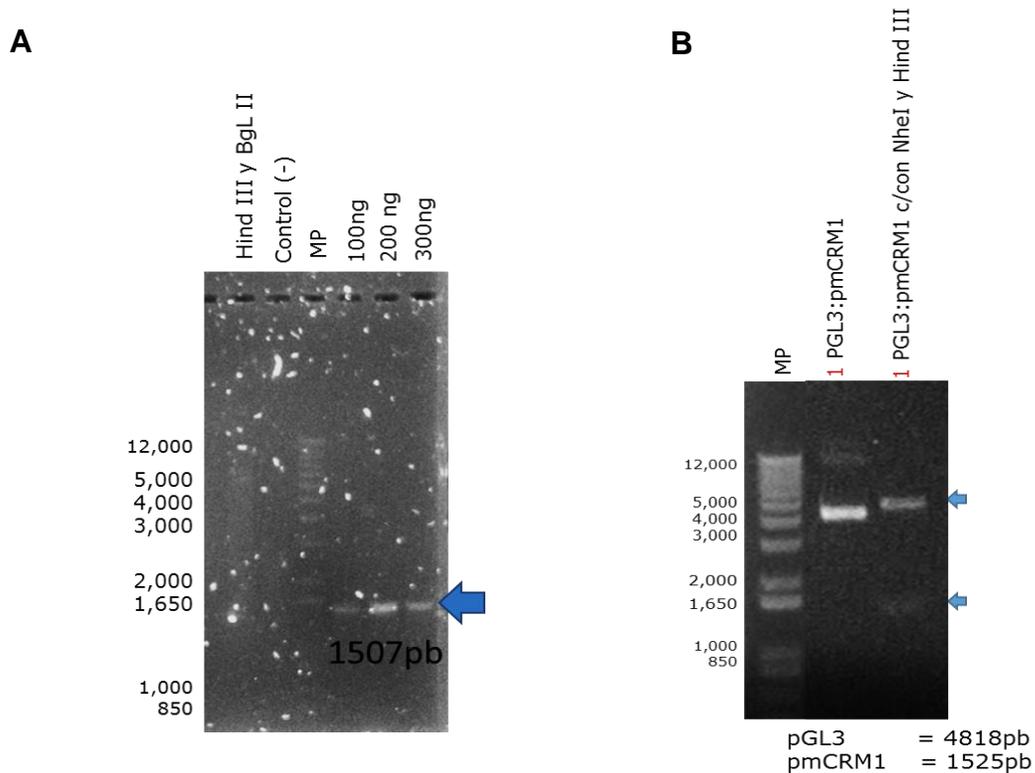
### **7.11 Análisis estadístico**

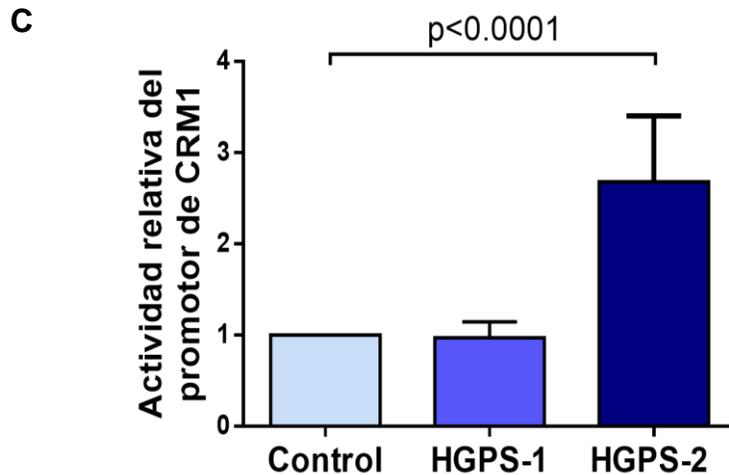
El análisis estadístico de los diferentes experimentos se llevó a cabo mediante la prueba "t" de Student no pareada. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de una serie de tres experimentos separados, y los valores de  $p < 0.05$  se tomaron como estadísticamente significativos. Cuando se señala, el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba "U" no paramétrica exacta de Mann-Whitney y los datos se representaron la media  $\pm$  SEM, o la media  $\pm$  SD de una serie de tres experimentos separados. Los valores de  $p < 0.05$  se tomaron como estadísticamente significativos. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 5 (San Diego).

# 8. RESULTADOS

## 8.1 La sobreexpresión de CRM1 se debe a un aumento en la actividad de su promotor inducida por la progerina

Para determinar si el aumento de la expresión de CRM1 es controlado a nivel transcripcional, como se ha reportado en cáncer (van der Watt & Leaner, 2011), decidimos analizar la actividad de su promotor en los fibroblastos de pacientes con HGPS. Para este fin realizamos la amplificación de la región promotora completa de CRM1 reportada por van der Watt y Leaner en el 2011 (1500 pares de bases) (Fig. 7A), y posteriormente la clonamos en el vector reportero pGL3, en donde la expresión/actividad de la luciferasa quedó bajo el control del promotor de la exportina CRM1 (Fig. 7B). Interesantemente, observamos un aumento significativo en la actividad del promotor de CRM1 en las células HGPS-2 (Fig. 7C).



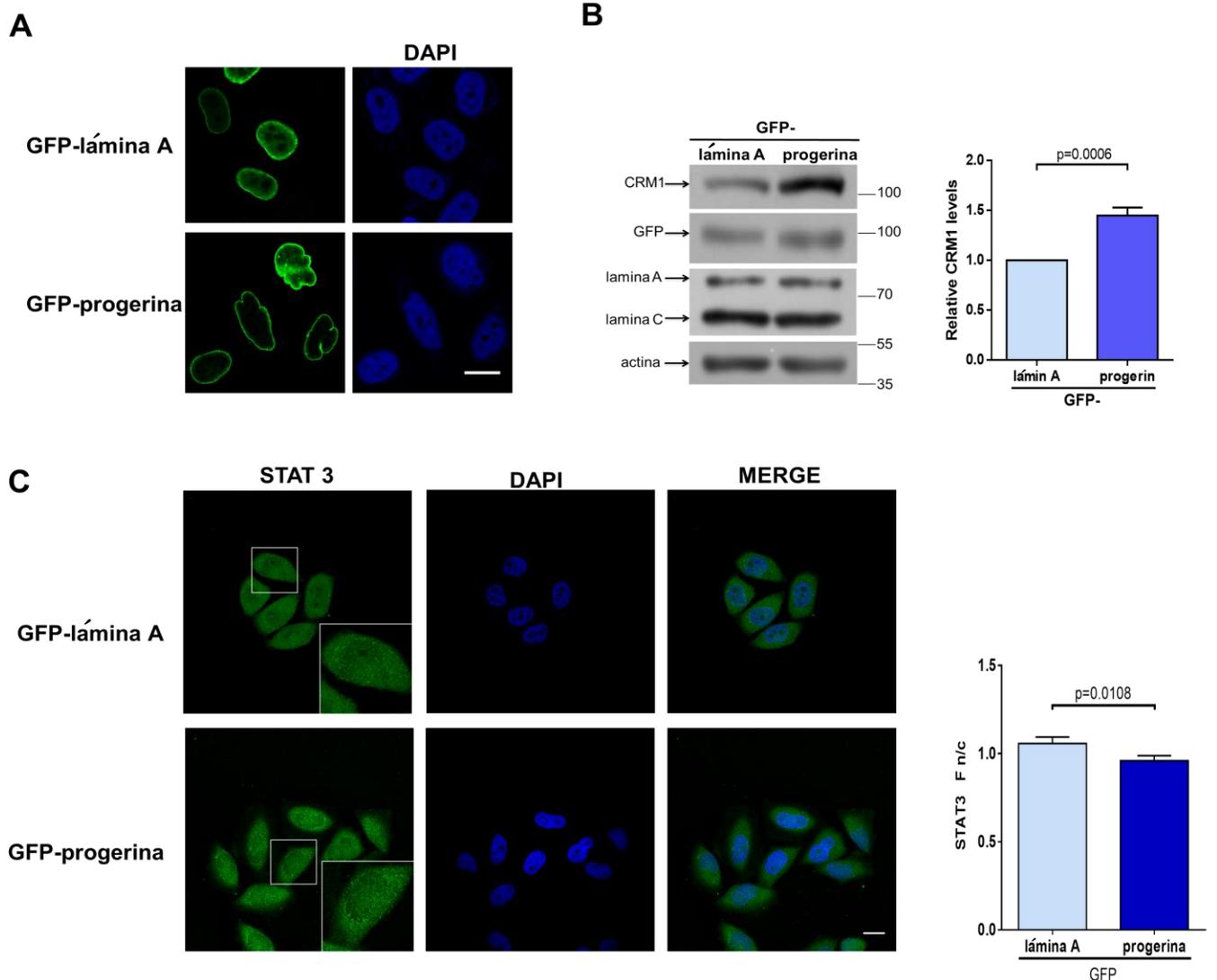


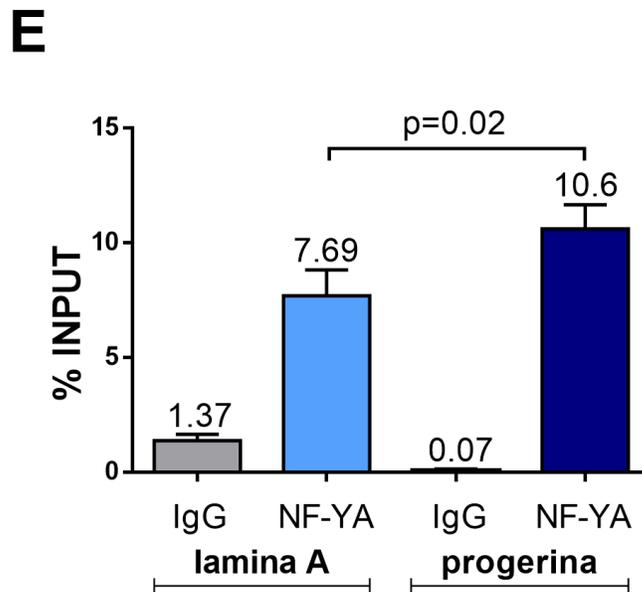
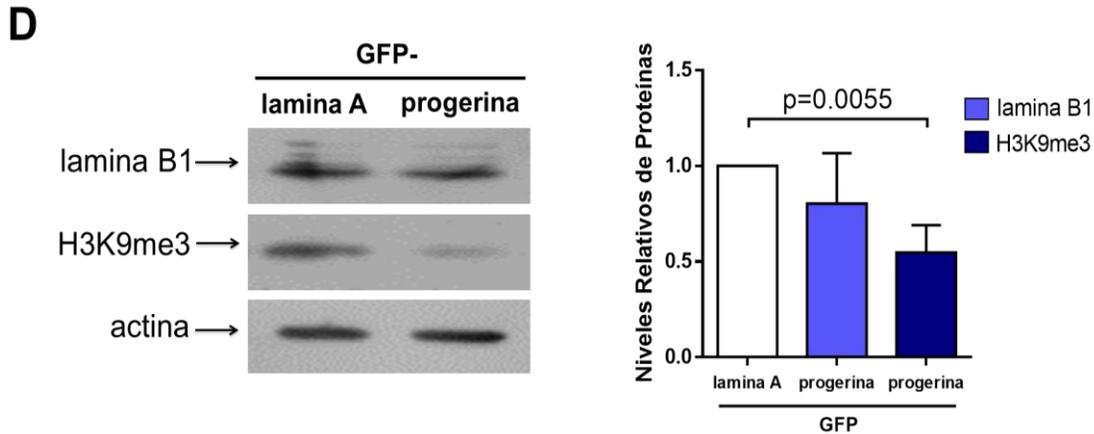
**Figura 7.- La actividad del promotor de CRM1 está aumentada en las células HGPS-2.**

(A) La amplificación de la región promotora de CRM1 mediante PCR fue vista en un gel de agarosa a distintas concentraciones. (B) Carril 2: se observa la clonación del vector reportero pGL3 con el promotor de CRM1. Carril 3: se observa la restricción con enzimas específicas con las que fue clonado el promotor (NheI y Hind III). (C) Las células WT y HGPS1-2 se transfectaron con el vector reportero que expresa la Luciferasa bajo el control del promotor humano de CRM1 y el vector que expresa la luciferasa Renilla (control para normalizar la eficacia de transfección). La actividad de las enzimas se estimó 48 h post-transfección. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (prueba de "t" no pareada).

Debido a que la sobreexpresión de la exportina CRM1 puede estar relacionada con la presencia de progerina, decidimos analizar si la expresión de progerina en un sistema heterólogo (células HeLa), podría generar un aumento en los niveles de la exportina CRM1. Para ello se realizó la transfección de un vector que expresa la proteína recombinante GFP-progerina, o de un vector que expresa la fusión GFP-lamina A (control). Como se ha reportado previamente (Noda et al., 2015), la expresión de progerina genera una morfología nuclear aberrante (Fig. 8A). Interesantemente, la presencia de progerina causó un aumento del 40% en la concentración de la exportina CRM1 (Fig. 8B). Para verificar si la sobreexpresión de CRM1 se refleja en un aumento de su actividad, se analizó la localización subcelular de una proteína nuclear con NES (STAT 3). Observamos una disminución estadísticamente significativa de la señal nuclear STAT 3 (Fig.8C). Así mismo, analizamos si la hiperactividad de CRM1 induce algunas características de senescencia celular (perdida de lámina B1 y el marcador de heterocromatina H3K9me3), (Freund, Laberge, Demaria, & Campisi, 2012; Sidler, Kovalchuk, & Kovalchuk, 2017; A. S. Wang, Ong, Chojnowski, Clavel, & Dreesen, 2017). La presencia de progerina en las células HeLa generó una disminución de la

histona H3K9me3 pero no de lámina B1 (Fig. 8D). Finalmente, decidimos analizar si la sobreexpresión exógena de progerina en las células HeLa, induce la actividad del promotor de CRM1. Se ha reportado que el factor de transcripción NF-YA regula positivamente al promotor de CRM1 (van der Watt & Leaner, 2011). Mediante ensayos ChIP-qPCR se evaluó la actividad de unión de NF-YA al promotor de CRM1, y se encontró un incremento de ~30% en las células transfectadas con GFP-progerina, con respecto a las que expresan GFP-lamina A (Fig. 8E). Estos resultados indican que en el HGPS la progerina induce la actividad del promotor de CRM1, generando un aumento de los niveles de la exportina CRM1, lo que consecuentemente ocasiona un desbalance en la homeostasis de proteínas, y en última instancia la inducción de senescencia celular.





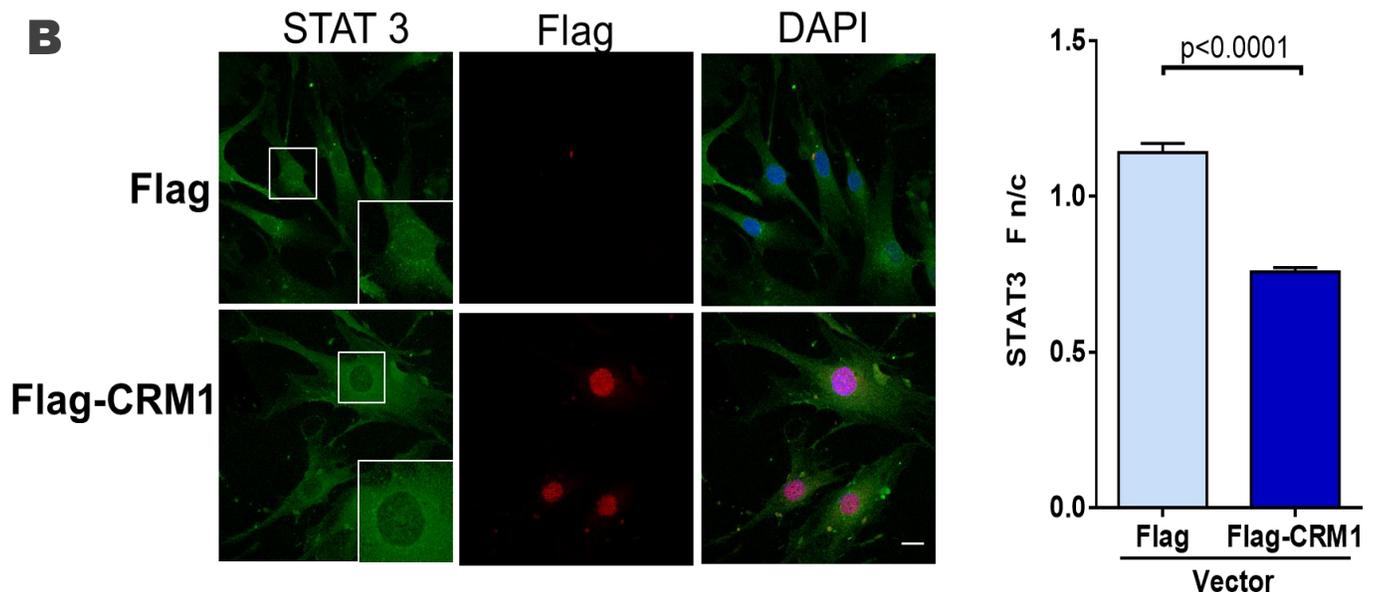
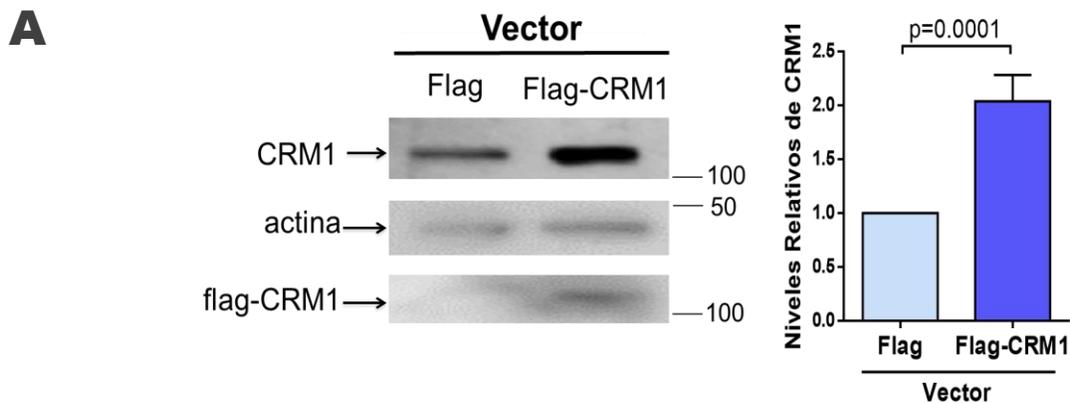
**Figura 8.- Análisis de la expresión de progerina en células HeLa.**

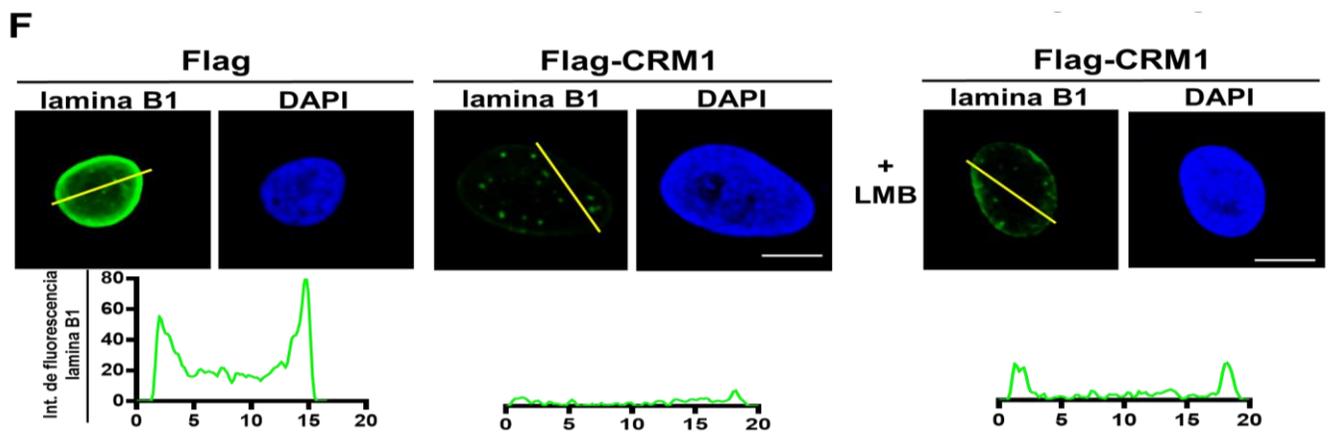
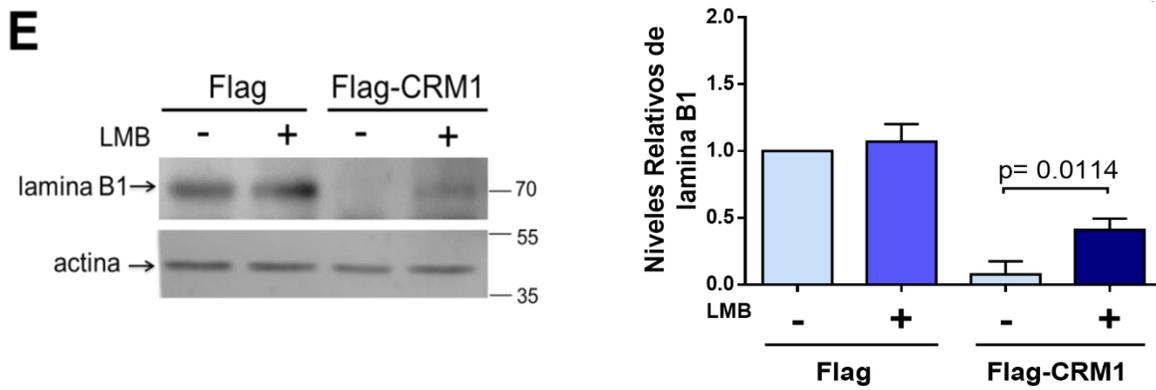
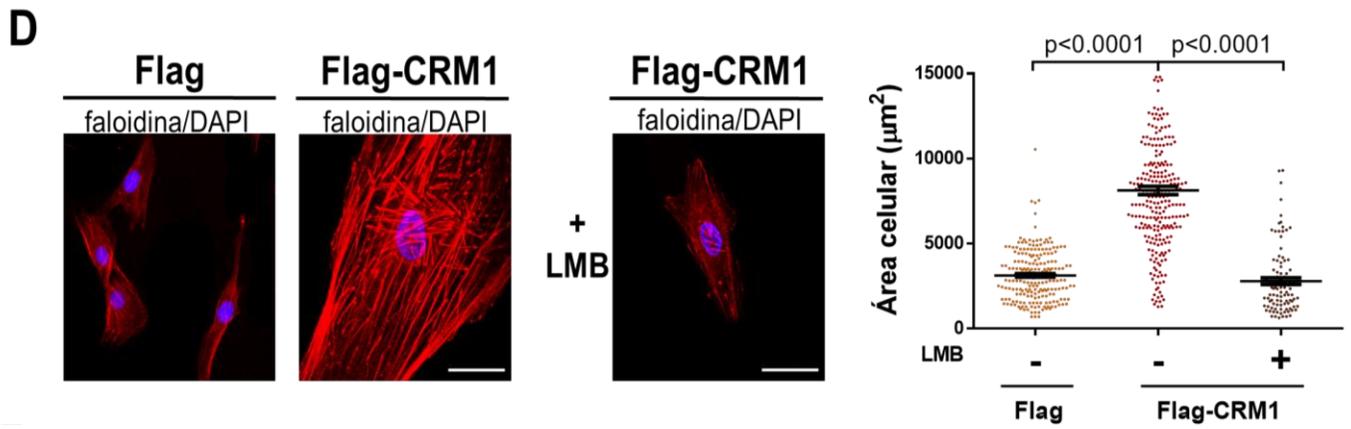
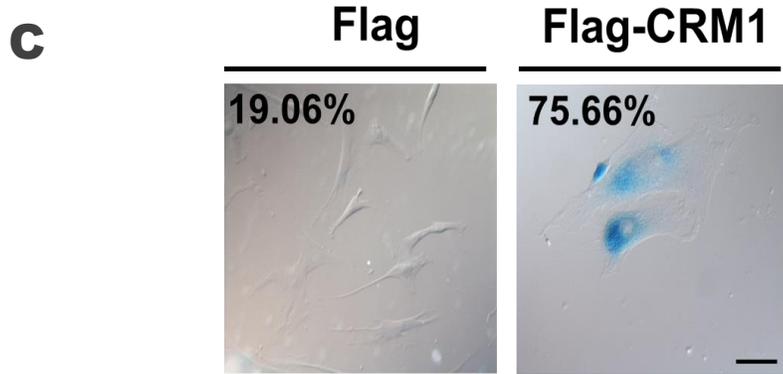
Las células HeLa se transfectaron de manera estable para expresar GFP-lamina A o GFP progerina. (A) La morfología nuclear se analizó mediante IF. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra, 80  $\mu$ M. (B) Los lisados de las células HeLa que expresan GFP-lamina A o GFP-progerina se sometieron a WB, usando anticuerpos contra CRM1, GFP o actina (control de carga). (C) Se analizó por microscopia confocal la distribución de STAT 3 (proteína que contiene NES). Barra, 80  $\mu$ m (D) Los lisados se sometieron a WB, usando anticuerpos contra la lámina B1. La histona H3K9m3 y actina (control de carga). La expresión relativa de proteínas se calculó a partir de tres experimentos independientes, los valores de "p" denotan diferencias significativas de los promedios  $\pm$ SD (prueba de "t" de Student no pareada). (E) Las células HeLa que expresaban GFP-lamina A o GFP-progerina se sometieron a inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), utilizando anticuerpo anti-NF-YA, seguido de ensayos de PCR para amplificar la región promotora de CRM1. Los datos corresponden a dos ensayos independientes realizados por triplicado. (Fig. 8E, en colaboración con la Dra. Sara Morales)

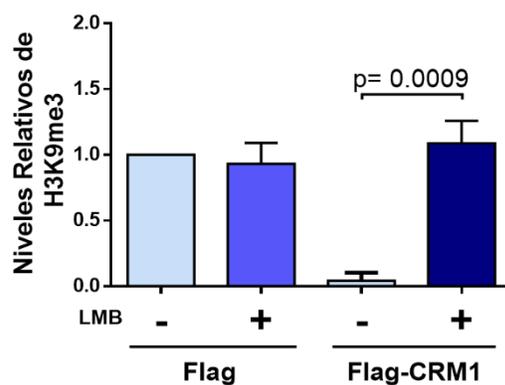
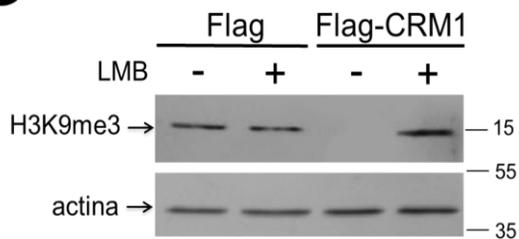
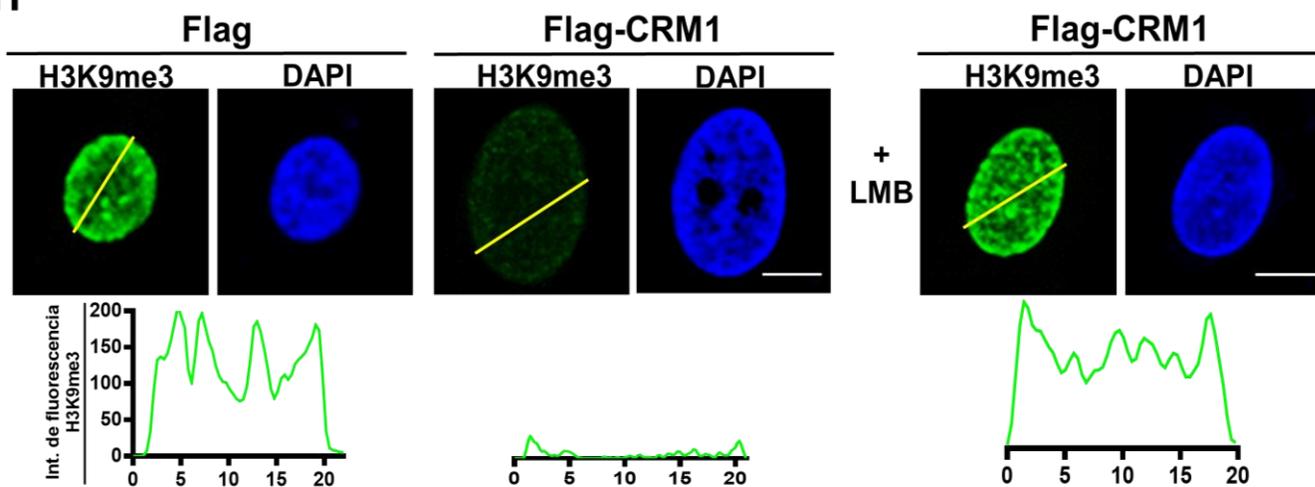
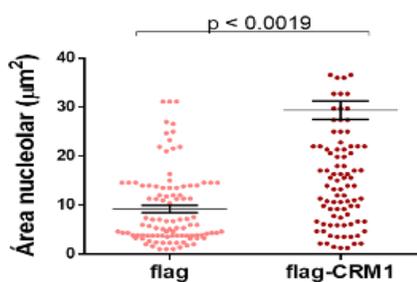
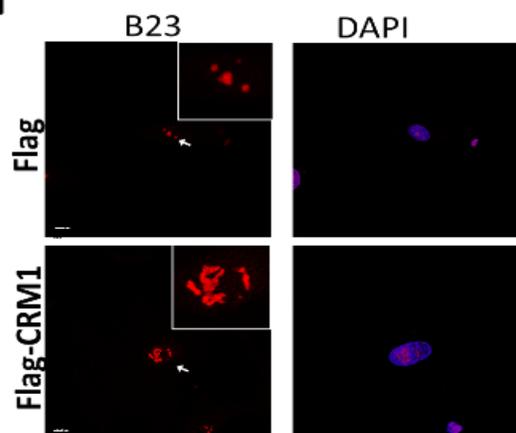
## **8.2 La sobreexpresión ectópica de CRM1 reproduce el fenotipo senescente del HGPS**

Tomando en consideración que la inhibición farmacológica de CRM1 mitiga el fenotipo senescente de las células con HGPS, nos planteamos la hipótesis de que la sobreexpresión de CRM1 es un determinante central en el desarrollo de un fenotipo similar al HGPS. Para probar esta idea decidimos analizar si la sobreexpresión ectópica de CRM1 en fibroblastos normales es suficiente para reproducir el fenotipo senescente característico del HGPS. Se diseñó un plásmido que expresa CRM1 fusionado a la Flag (FLAG-CRM1) y con éste se transfectaron de manera estable cultivos de fibroblastos provenientes de un individuo sano. Como control se transfectaron las mismas células con un vector conteniendo únicamente la secuencia de la etiqueta. Después de un periodo de selección de 12 días en presencia de neomicina (cultivos estables), se observó un aumento de aproximadamente el doble en la cantidad de CRM1 en las células transfectadas con FLAG-CRM1, en comparación con las células que expresaron únicamente FLAG (Fig. 9A). La hiperactividad de la exportina CRM1 en las células que expresan FLAG-CRM1 se confirmó mediante la inmunofluorescencia para STAT 3 (proteína blanco de CRM1), en donde se observó que STAT 3 se deslocaliza hacia el citoplasma (Fig. 9B). Notablemente los cultivos que sobreexpresaron CRM1 contienen un 75% de células senescentes, mientras que aquellos que únicamente expresaron a FLAG, solamente presentaron un 19% de células senescentes (Fig. 9C). Las células senescentes se identificaron por medio de la tinción positiva para SA- $\beta$ -gal. Otro parámetro que está relacionado con la senescencia celular es la expansión celular (Ogrodnik, Salmonowicz, Jurk, & Passos, 2019), y puede notarse claramente que la sobreexpresión de la exportina CRM1 generó una morfología extendida y aplanada que es corregida al inhibir la exportación nuclear con la droga LMB, corroborando que el fenotipo senescente es debido a la sobreexpresión de la exportina CRM1 (Fig. 9D). Como se mencionó previamente, la disminución de lámina B1 y la pérdida de la heterocromatina son características adicionales relacionadas con senescencia celular. Por lo tanto, suponiendo que la alteración de la exportación nuclear puede ser un mecanismo clave en la senescencia celular, decidimos evaluar estos dos marcadores en las células que sobreexpresan CRM1. Interesantemente se encontró que en los

fibroblastos transfectados con FLAG-CRM1 se presentó una disminución en la fluorescencia que corresponde a los niveles de lámina B1 (Fig. 9E y 9F), y en aquellos para la histona H3K9me3, (marcador de heterocromatina) (Fig. 9G y 9H). Estos fenotipos se recuperaron cuando las células que sobreexpresaron FLAG-CRM1 se trataron con LMB, lo que confirmó que este efecto fue producido por una actividad exacerbada de CRM1. Finalmente, debido a que el área nucleolar es una característica distintiva del fenotipo senescente del HGPS, analizamos este parámetro en las células que sobreexpresaron CRM1, encontrando de manera interesante que los fibroblastos que sobreexpresaron FLAG-CRM1 presentaron un aumento en el área nucleolar. En conjunto estos resultados nos indican que la sobreexpresión de CRM1, es suficiente para reproducir un fenotipo de senescencia celular en fibroblastos normales.





**G****H****I**

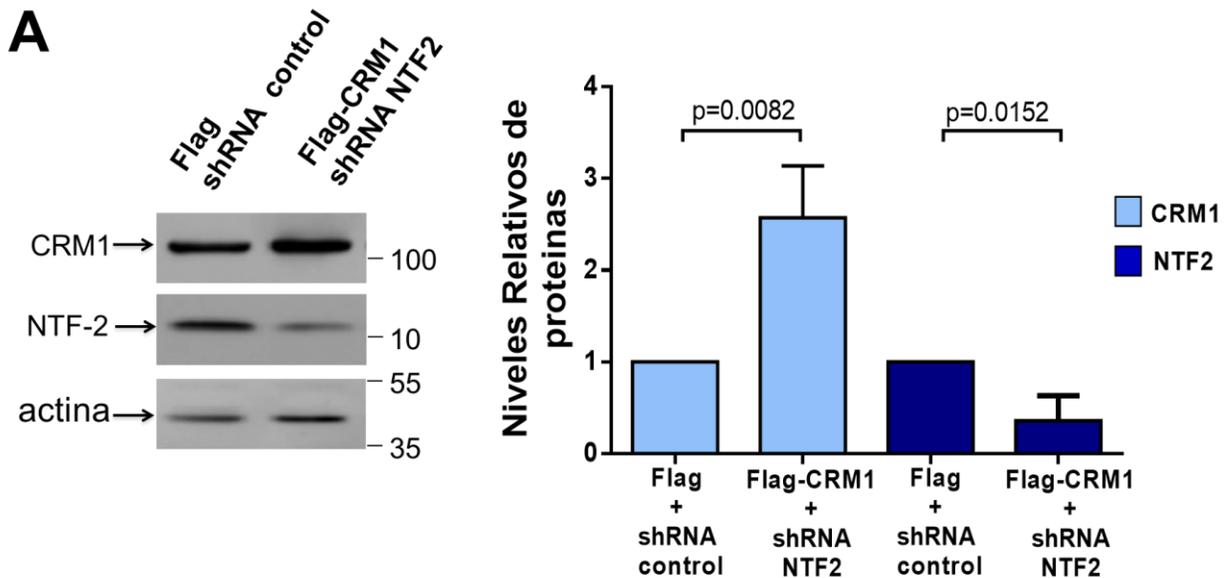
**Figura 9.- La sobreexpresión ectópica de CRM1 induce el fenotipo de envejecimiento prematuro en fibroblastos primarios normales.**

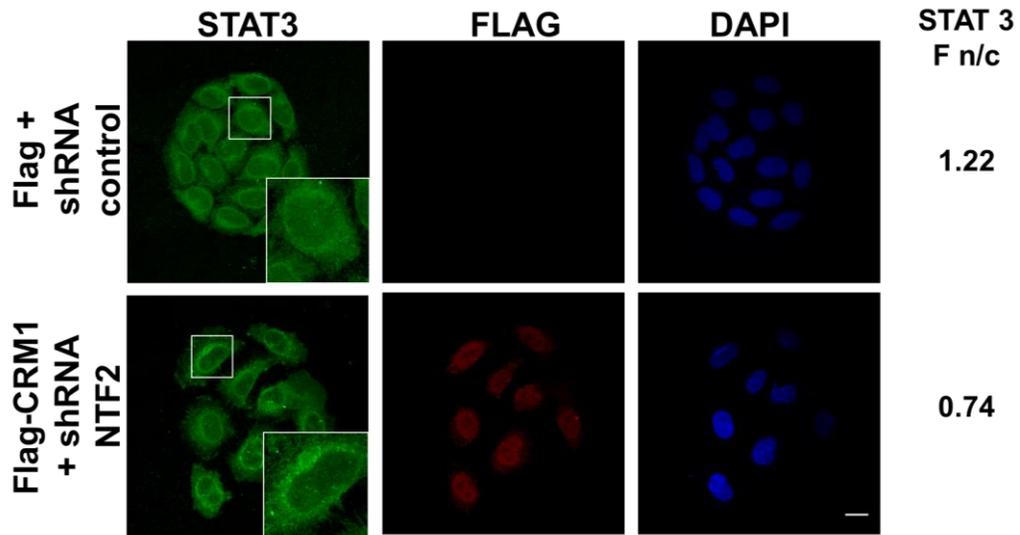
Los fibroblastos primarios humanos derivados de un donante sano se transfectaron de manera estable para expresar FLAG-CRM1 o FLAG solamente. (A) Los lisados se sometieron a WB, usando anticuerpos contra CRM1, Flag o actina (control de carga). Se muestran los niveles relativos de CRM1 (panel derecho). (B) Ensayos de inmunofluorescencia que muestran la distribución subcelular de STAT 3. Se determinó como parámetro cuantitativo la relación de intensidad núcleo / citoplasma ( $n / c$ ) (gráfica). Barra, 10  $\mu\text{m}$ . (C) Se midió la actividad de  $\beta$ -galactosidasa y se estimó el porcentaje de células senescentes a partir de 3 experimentos independientes ( $n = 300$  células para cada condición). Barra, 100  $\mu\text{m}$  (A - B) Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de "t" de Student. (D) Los fibroblastos transfectados se tiñeron con faloidina-rodamina para visualizar el cito-esqueleto de actina. Los fibroblastos que expresan Flag-CRM1 se trataron durante 3 días con 50 nM de LMB o con el vehículo. Posteriormente se tiñeron con faloidina-rodamina y se analizaron mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Barra, 50  $\mu\text{m}$ . Se cuantificó el área celular ( $n > 150$  células) y las diferencias significativas entre los diferentes cultivos celulares se determinaron mediante la prueba "U" de Mann-Whitney (E) Los lisados de fibroblastos que expresaron Flag o Flag-CRM1 y que fueron tratados previamente durante seis días con 50 nM de LMB o con el vehículo, se analizaron mediante WB, con anticuerpos contra la lámina B1 y actina (control de carga). Se muestran los niveles relativos de lámina B1. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba "t" de Student no apareada. (F) Los fibroblastos transfectados con o sin tratamiento con LMB, se inmunotiñeron para lamina B1, y se muestran imágenes representativas. Barra, 10  $\mu\text{m}$ . La gráfica muestra el patrón de fluorescencia para la lámina B1 trazada sobre un vector lineal que ocupa el diámetro mayor de la estructura. (G) Los fibroblastos normales que expresaron Flag o Flag-CRM1 de forma estable se trataron como se indica en el inciso (E) y posteriormente se analizaron mediante WB, utilizando anticuerpos contra H3K9me3. Se muestran los niveles relativos de H3K9me3 y las diferencias significativas entre los cultivos celulares se determinaron mediante la prueba de "t" de student no pareada. (H) La distribución nuclear de H3K9me3 se analizó en fibroblastos transfectados con o sin tratamiento con LMB. El análisis cuantitativo muestra el perfil de fluorescencia generado por los anticuerpos anti-H3K9me3. (I) Los fibroblastos control y aquellos con fenotipo HGPS, se inmunotiñeron para B23 que permite visualizar la integridad de los nucléolos y posteriormente, se analizaron mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Barra, 10  $\mu\text{m}$ . Se cuantificó el área nucleolar ( $n > 100$  nucléolos por condición de tres experimentos independientes), las diferencias significativas entre los diferentes cultivos celulares se determinaron mediante la prueba "U" de Mann-Whitney panel derecho.

**8.3 La sobreexpresión de CRM1 induce la expresión de algunos marcadores de senescencia en las células HeLa a pesar de que el gradiente de Ran se encuentre alterado**

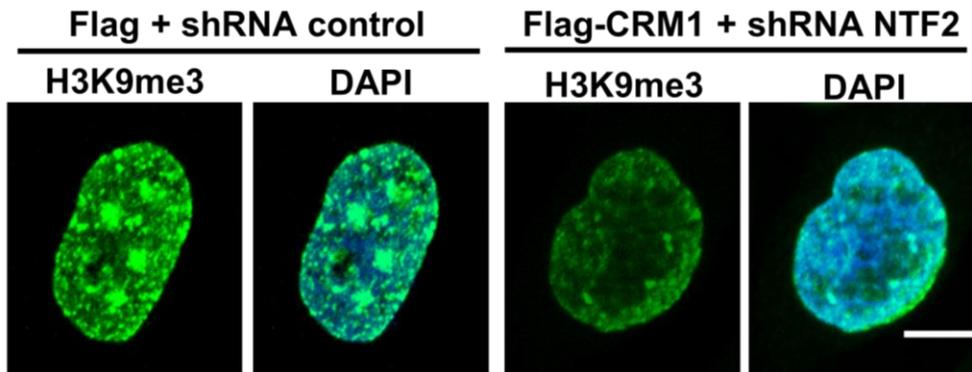
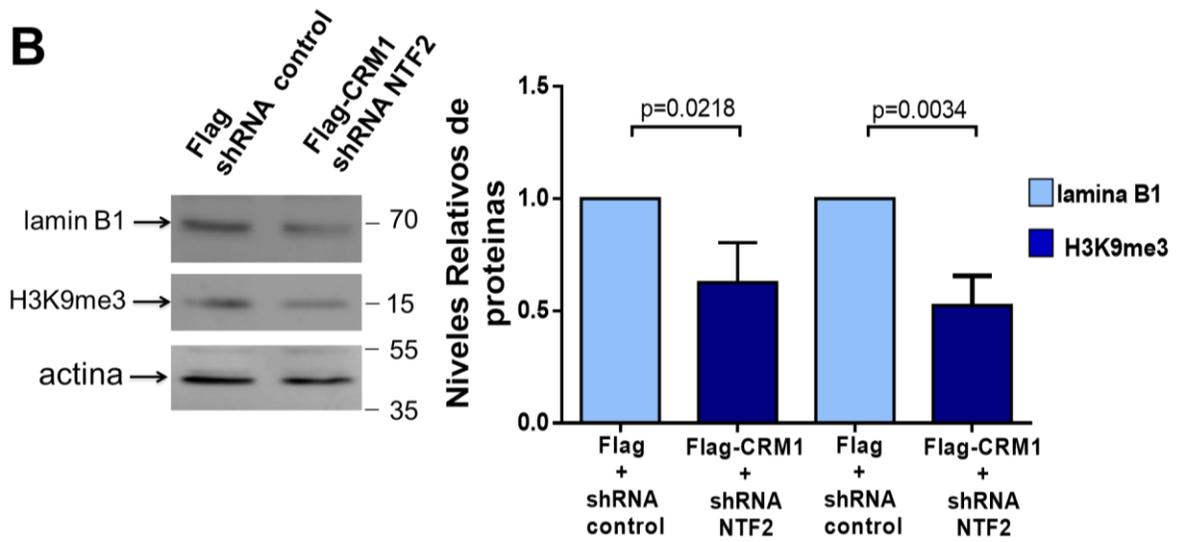
La exportación e importación nuclear de moléculas, son procesos regulados por el establecimiento de un gradiente de Ran entre núcleo y citoplasma en una gran cantidad de células (Lui & Huang, 2009). Se ha reportado que este gradiente se encuentra dañado en el HGPS. Por lo tanto, en función de nuestros resultados previos, decidimos evaluar en nuestro sistema celular si la sobreexpresión de CRM1 produciría una exportación nuclear exacerbada a pesar de que el gradiente de Ran se encuentre alterado funcionalmente. Con este fin, en las células HeLa se realizó un silenciamiento en la expresión del factor de transporte nuclear 2 (NTF2), el cual regula positivamente el gradiente de Ran, y además, es importante para su importación (Smith, Brownawell,

& Macara, 1998). Bajo esta condición experimental de silenciamiento de NTF2 en células HeLa, se cotransfectó CRM1 de manera estable y en otro grupo experimental solo se transfectaron los plásmidos vacíos como control (Fig. 10A, panel superior). Consistente con nuestra hipótesis, a pesar de la disminución de NTF2 que daña el gradiente de RAN, observamos una hiperactividad de CRM1, como lo demuestra el hecho de que la proteína STAT 3 (blanco de CRM1) se encuentra deslocalizada hacia el citoplasma (Fig. 10A, panel inferior). Consecuentemente, la actividad exacerbada de CRM1 indujo el desarrollo de algunas características de la senescencia celular en este sistema: disminución de los niveles de lámina B1 y de la histona H3K9me3 (proteína marcadora de heterocromatina perinuclear) (Fig.10B panel superior). También puede observarse la disminución de la histona H3K9me3 a nivel de inmunofluorescencia (Fig. 10B panel inferior). Colectivamente estos resultados demuestran, que la sobreexpresión de CRM1, es suficiente para generar un fenotipo senescente independientemente del gradiente de Ran.





**B**



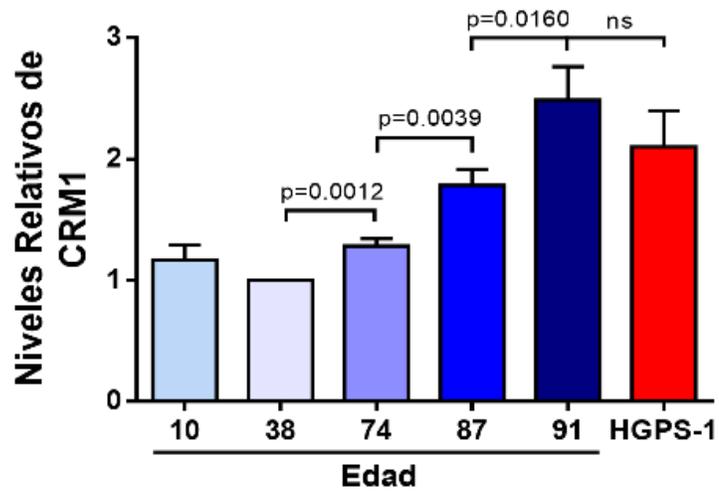
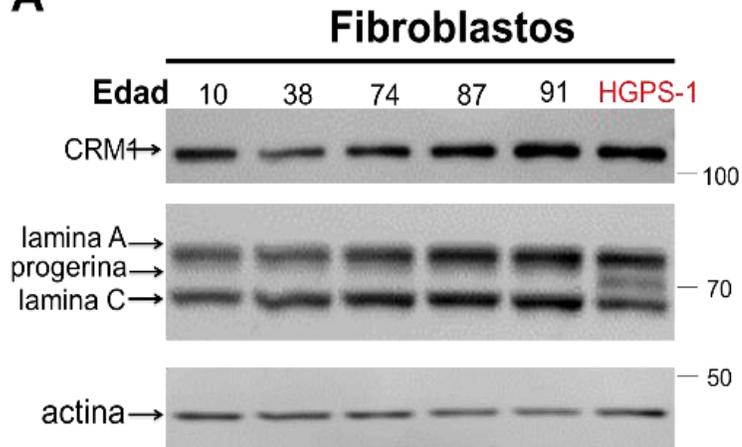
**Figura 10.- La exportación nuclear alterada debido a la sobreexpresión de CRM1 se sobrepone a un gradiente de Ran deficiente.**

Las células HeLa se sometieron a una transfección doble utilizando el vector que expresa Flag-CRM1 o solamente Flag, y un vector que expresa un shRNA dirigido al silenciamiento del gen de NTF2 o un shRNA irrelevante. (A) Los lisados de las células transfectadas se analizaron mediante WB, usando anticuerpos contra CRM1, NTF2 y actina (control de carga). Panel central: los niveles relativos de proteína se evaluaron a partir de tres experimentos independientes (prueba de *t* de Student no pareada). Panel derecho: la distribución de STAT3 se analizó en las células transfectadas mencionadas anteriormente. F n/c, se refiere a la relación de la señal de fluorescencia entre el núcleo y el citoplasma. Barra, 20  $\mu$ m (B) Los lisados celulares de células co-transfectadas se analizaron mediante WB, con anticuerpos contra lámina B1, H3K9me3 y actina (control de carga). Panel central: los datos corresponden a 3 experimentos independientes (prueba *t* de Student no pareada). Panel derecho: la distribución nuclear de H3K9me3 se analizó en las células transfectadas mencionadas anteriormente. Barra, 20  $\mu$ m.

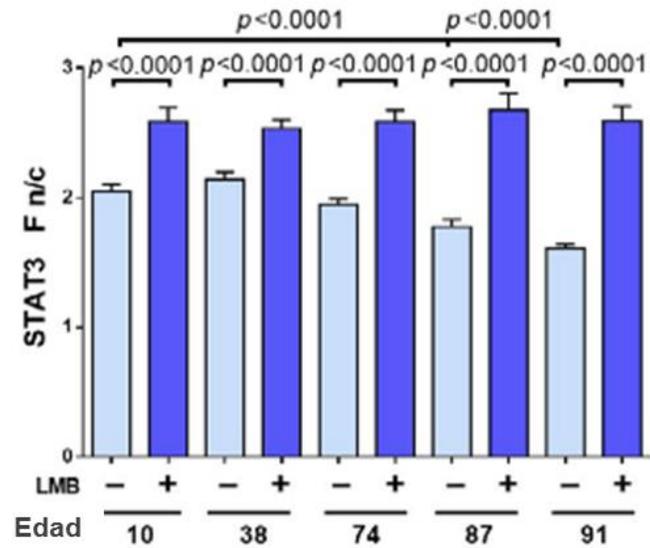
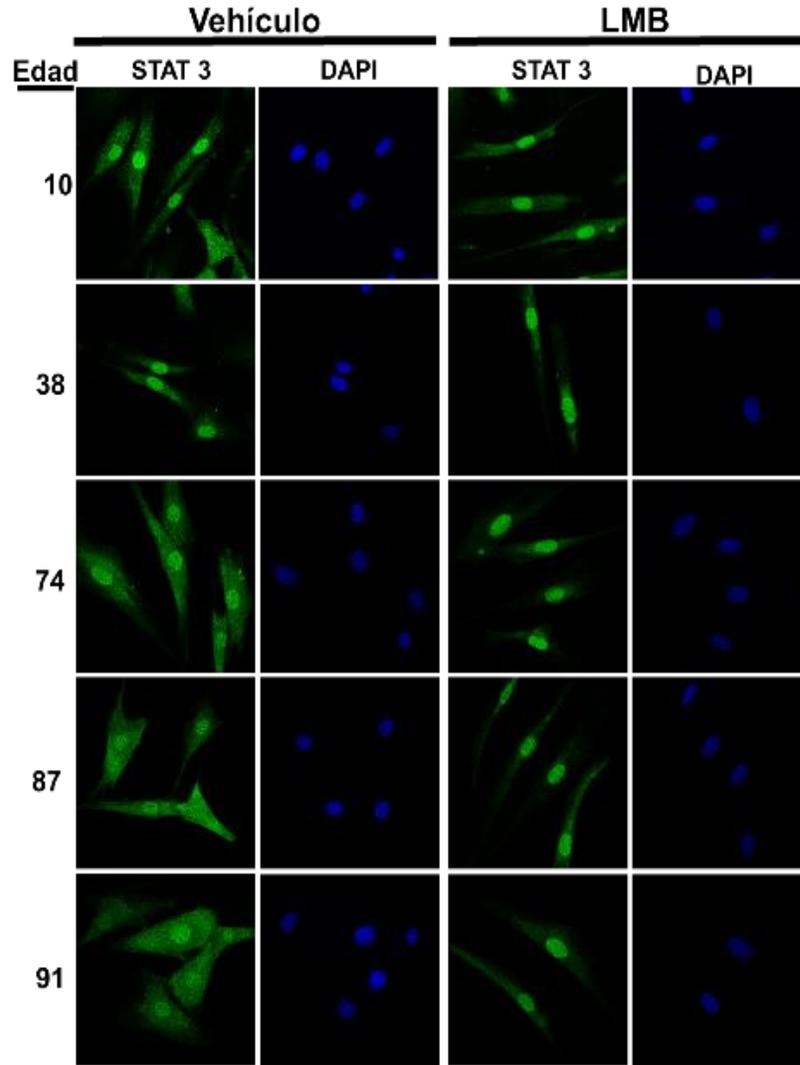
#### **8.4 Participación de la exportina CRM1 en el envejecimiento normal**

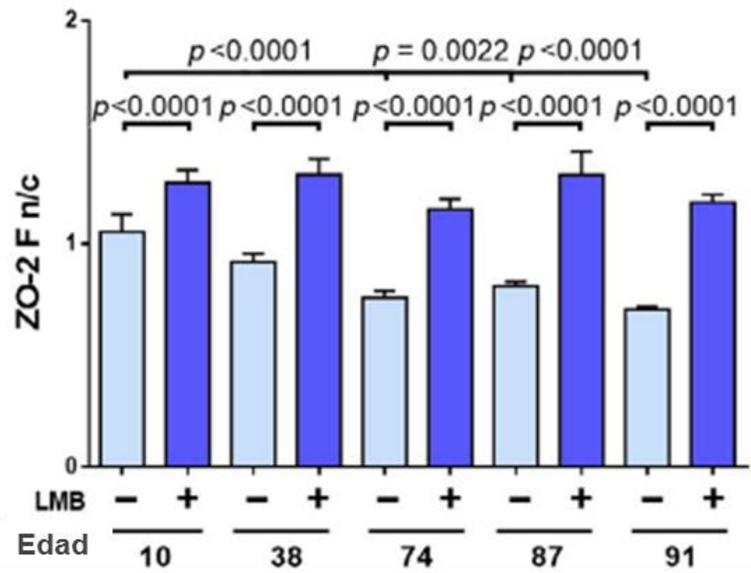
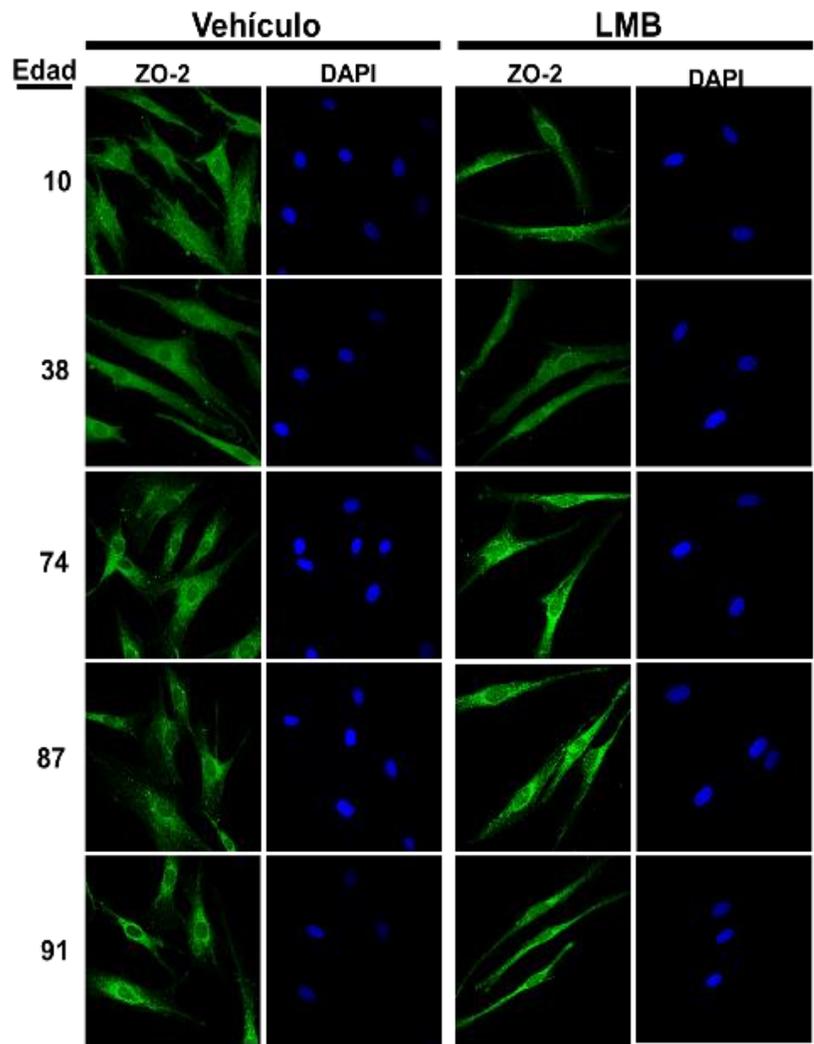
El HGPS y el envejecimiento normal, comparten varias características, por lo que el primero se ha utilizado como modelo de estudio para entender el envejecimiento. Por esta situación en este trabajo se decidió averiguar si la sobreexpresión de la exportina CRM1 es una característica que está presente también en el envejecimiento normal. Con este fin evaluamos los niveles de CRM1 en diferentes cultivos de fibroblastos provenientes de individuos de diferentes edades (10-91 años).

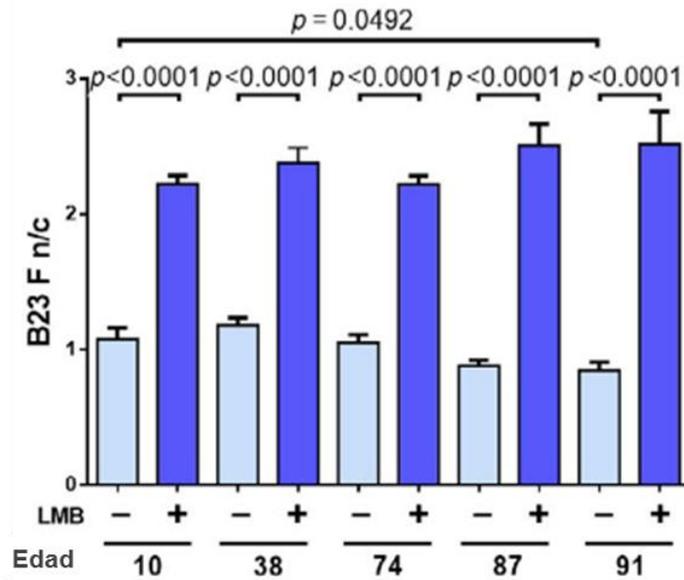
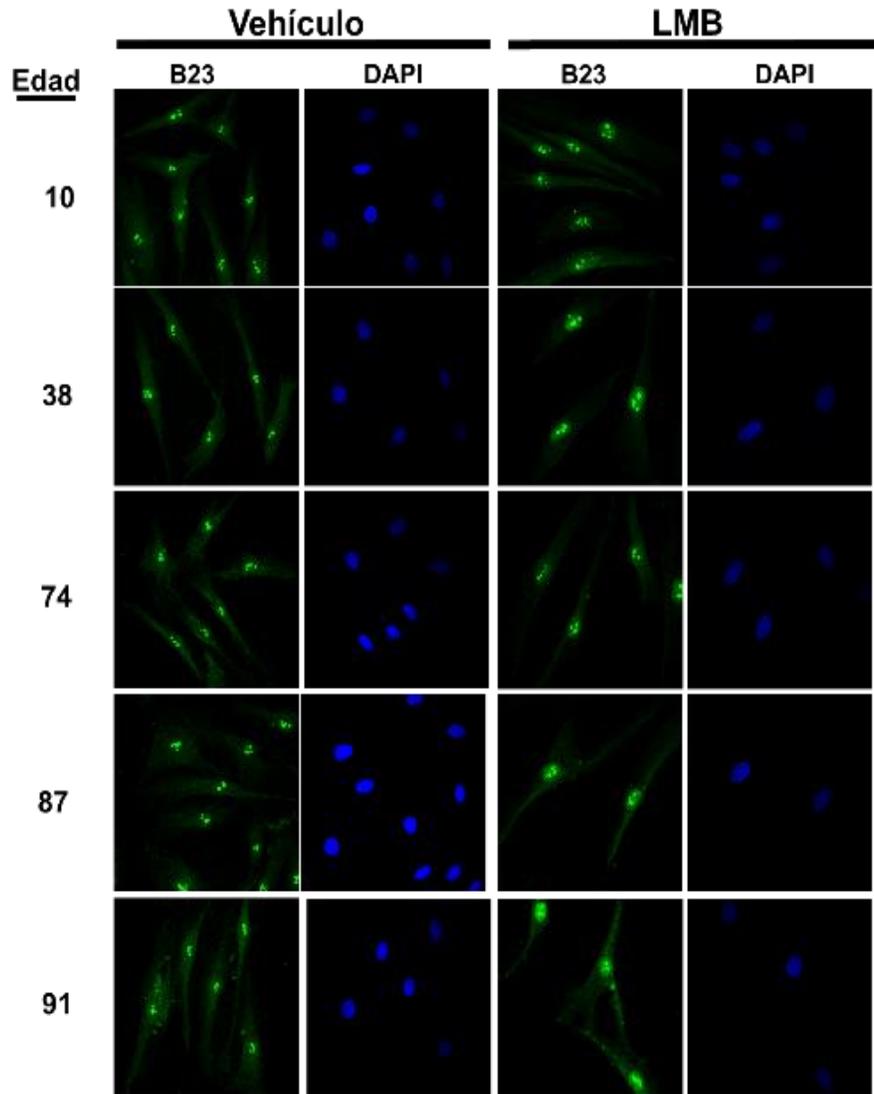
Interesantemente, se observó que existe una correlación directamente proporcional entre el aumento de CRM1 y la edad de los individuos (Fig. 11). Para determinar si la sobreexpresión de CRM1 da lugar a una mayor actividad del mecanismo de exportación nuclear, analizamos la distribución subcelular de STAT3, Z0-2 y B23 (proteínas blanco de CRM1). Observamos que existe una deslocalización de estas proteínas hacia citoplasma en los fibroblastos de individuos de edad avanzada (74-91 años), en comparación con los cultivos de fibroblastos de individuos jóvenes (10-38 años). El tratamiento con LMB reestablece la localización nuclear de las tres proteínas, de manera similar a la distribución que se presenta en las células de individuos jóvenes (Fig.11B). La cuantificación de la relación de la fluorescencia nuclear y citoplasmática (Fn/c) confirmó estas observaciones. Estos resultados nos indican que la sobreexpresión/hiperactividad de CRM1 es una propiedad desregulada que se comparte entre el envejecimiento normal y el HGPS.

**A**

**B**





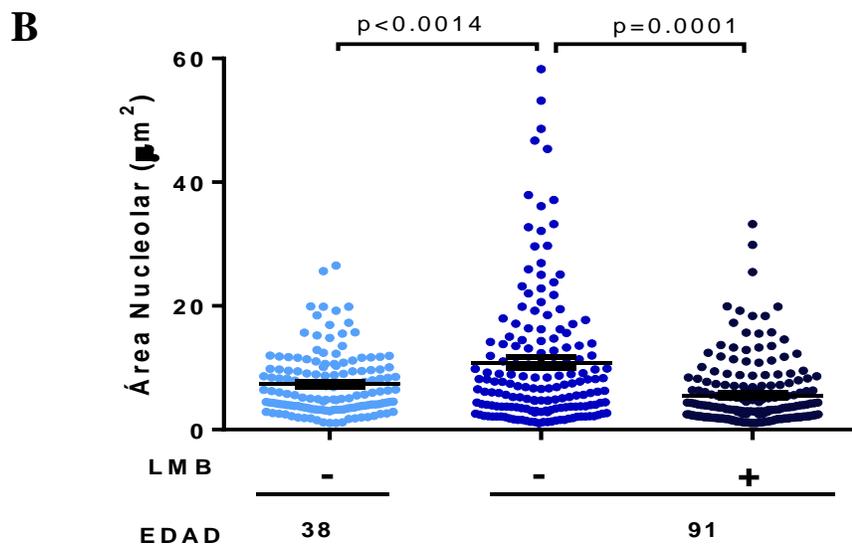
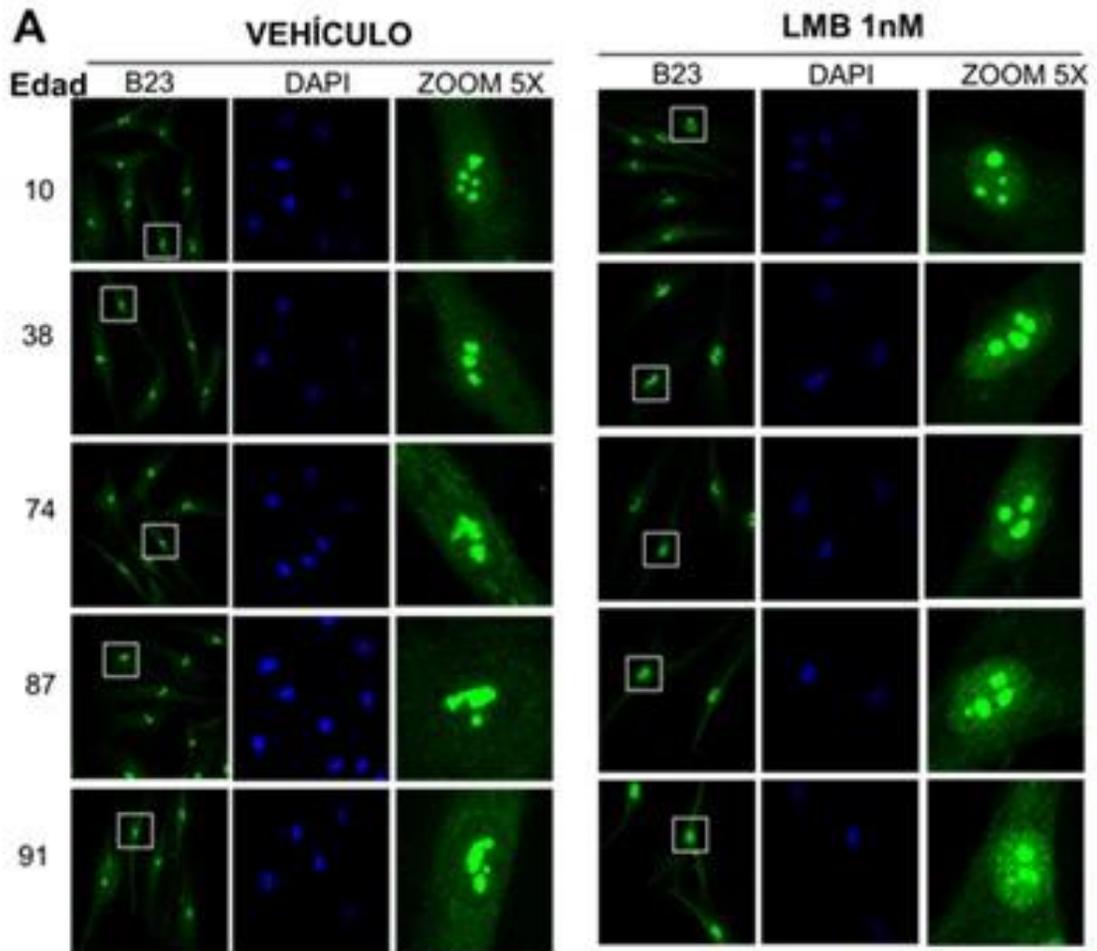


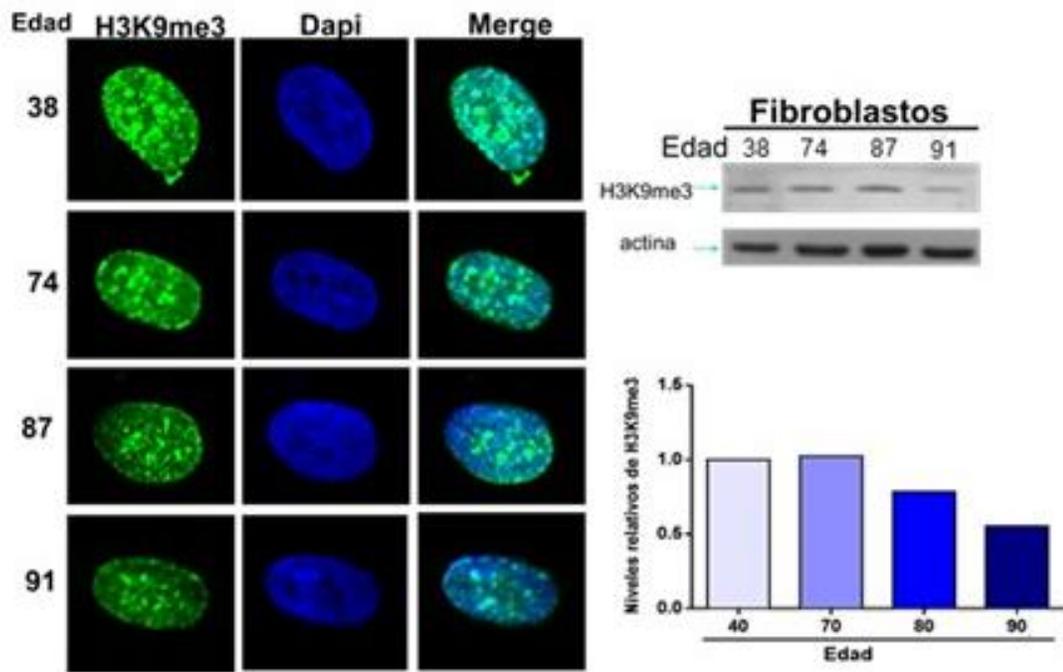
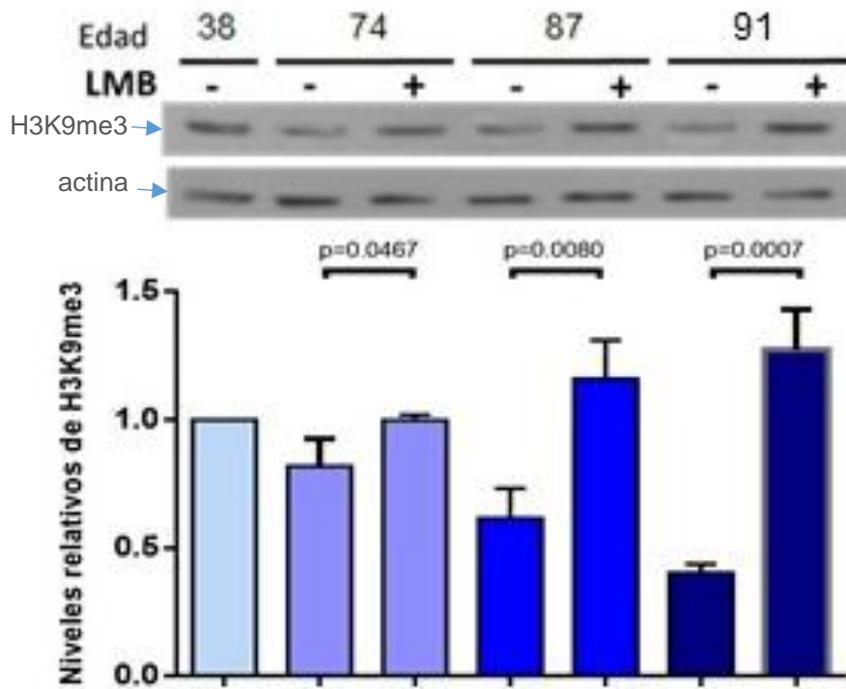
**Figura 11.- La expresión y actividad de CRM1, aumentan durante el envejecimiento normal.**

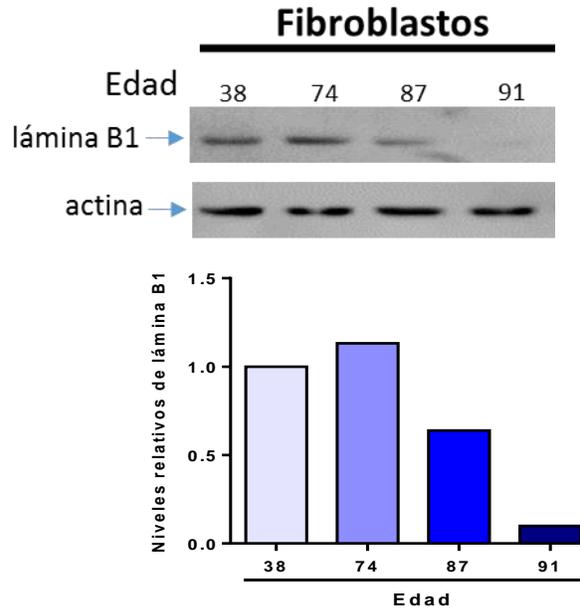
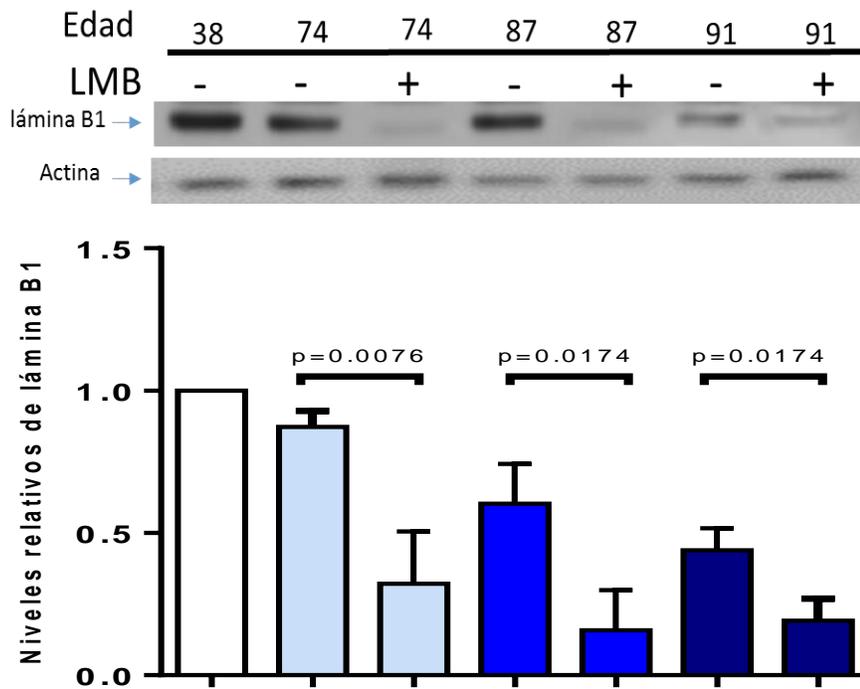
(A) Se analizaron cultivos primarios de fibroblastos humanos provenientes de individuos sanos con diferentes edades y un cultivo de fibroblastos de un individuo con HGPS (HGPS-1) mediante WB, usando anticuerpos contra CRM1, lamina A / C y actina (control de carga). La expresión relativa de CRM1 se muestra en el panel inferior, y las diferencias significativas entre los diferentes cultivos se calcularon mediante la prueba de  $t$  de Student no pareada. (B) Se evaluó la localización subcelular de tres proteínas que contienen NES (STAT3, Z0-2 y B23) en los cultivos de fibroblastos indicados. Los cultivos se trataron previamente con LMB o con su vehículo por 24 horas. Barra, 20  $\mu$ m, se calculó la relación de la fluorescencia nuclear y citoplasmática ( $F_n / c$ ) para las tres proteínas ( $n = 50$  células), y las diferencias significativas entre los cultivos celulares se obtuvieron mediante la prueba  $U$  y se graficaron los promedios  $\pm$ SD.

**8.5 La atenuación farmacológica de CRM1 alivia marcas de senescencia en fibroblastos de individuos de edad avanzada.**

Como se mencionó previamente, el envejecimiento normal y el HGPS comparten algunas características del fenotipo de senescencia celular. Por lo tanto, decidimos analizar si el tratamiento con LMB alivia tres marcas de senescencia, la expansión nucleolar, la pérdida de heterocromatina y la pérdida de lámina B1 (Buchwalter & Hetzer, 2017; Gonzalo, Kreienkamp, & Askjaer, 2017; Sidler et al., 2017), en los cultivos de fibroblastos de individuos de edad avanzada. Como se aprecia en la Figura 12A, la expansión nucleolar es más notoria en las células de donadores de mayor edad (87 y 91 años). Notablemente esta alteración se redujo después del tratamiento con LMB (Fig. 12A). La cuantificación del área nucleolar de los fibroblastos tratados con LMB o solo con su vehículo, confirmó esta observación. Después del tratamiento con LMB el tamaño de los nucléolos del individuo de 91 años fue similar al del individuo de 38 años (Fig. 12B). Con respecto a la pérdida de la heterocromatina y la pérdida de lámina B1, se observó que las células de individuos de edad avanzada (87 y 91 años) presentaron una disminución notoria de las dos marcas de senescencia, con respecto a las células de un individuo joven (38 años) (Fig. 12C y 12E). Finalmente, observamos que la disminución de los niveles de H3K9me3 se recuperaron como respuesta al tratamiento con LMB (Fig. 12D), sin embargo no los niveles de lámina B1 (Fig. 12F), indicando que posiblemente la recuperación de la heterocromatina es independiente de la lámina B1. Estos resultados corroboran que la exportación nuclear exacerbada es también un mecanismo clave durante el envejecimiento normal.



**C****D**

**E****F**

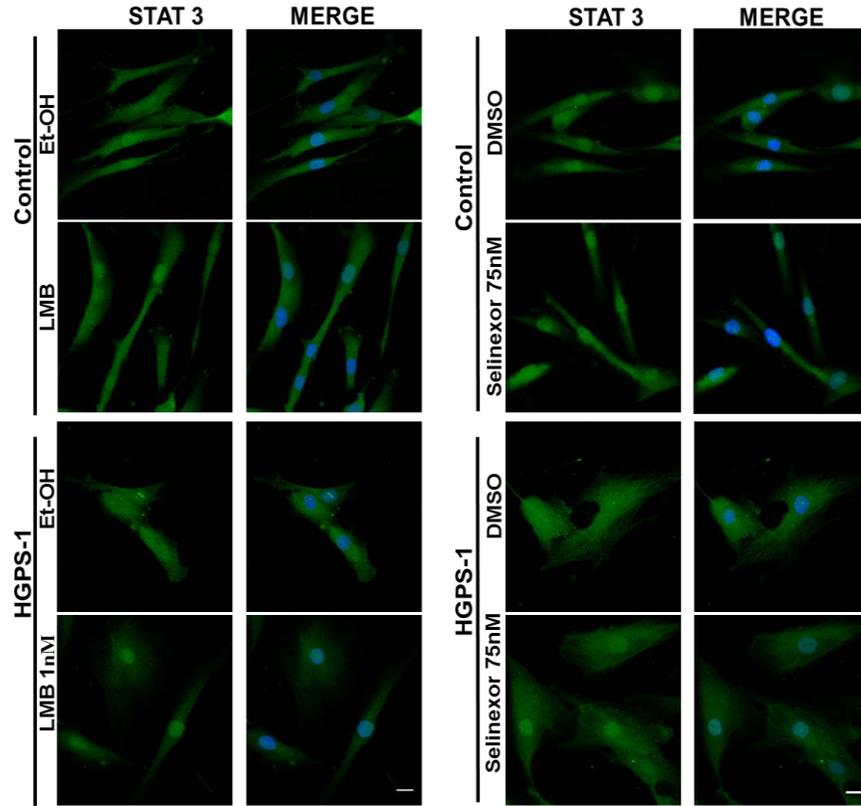
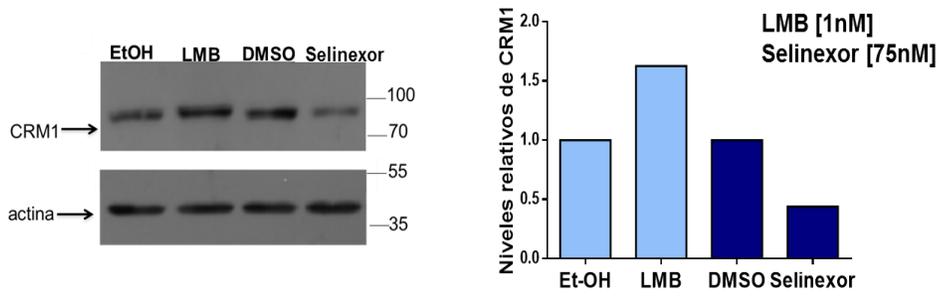
**Figura 12.- El tratamiento con LMB restablece el área nucleolar y la marca de heterocromatina H3K9me3 durante el envejecimiento normal.**

(A) Los fibroblastos de individuos de diferentes edades se inmunotñieron para B23 con la finalidad de decorar los nucléolos. Los fibroblastos se trataron previamente durante seis días con 1 nM de LMB o con su vehículo. B) Se determinó el área nucleolar ( $n > 500$  nucléolos para cada condición) y las diferencias significativas entre los cultivos celulares se determinaron mediante la prueba "U" de Mann-Whitney. Barra, 10  $\mu$ m. (C) Los cultivos de fibroblastos de individuos de diferentes edades se inmunotñieron para la histona H3K9m3 para visualizar la cromatina periférica. Los lisados de los fibroblastos se analizaron mediante WB, utilizando anticuerpos contra H3K9m3 y actina (control de carga). Se muestran los niveles

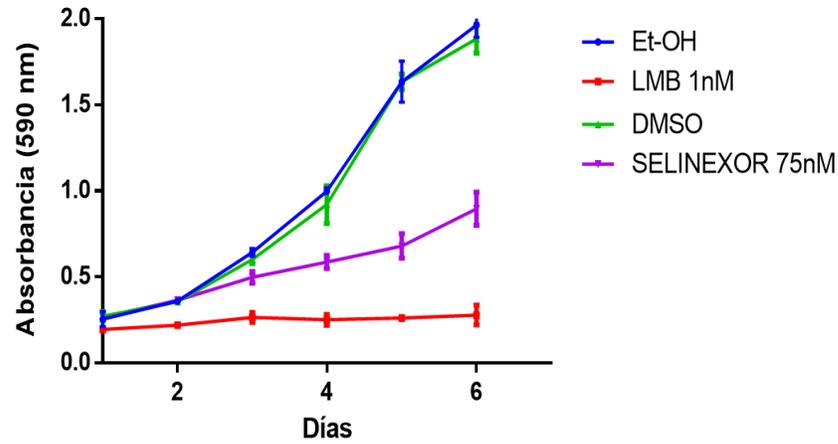
relativos de H3K9me3 (dos experimentos). (D) Los niveles de la H3K9me3 se analizaron en los fibroblastos de individuos de diferentes edades WB, utilizando anticuerpos específicos para la H3K9me3 y actina (control de carga). Los fibroblastos se trataron previamente durante seis días con 1 nM de LMB o con su vehículo. Se muestran los niveles relativos de la lámina B1. Los datos representan los promedios  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (prueba de "t" no pareada). (E) Los lisados de los fibroblastos se analizaron mediante WB, utilizando anticuerpos contra lámina B1 y actina (control de carga). Se muestran los niveles relativos de lámina B1 (dos experimentos). (F) Los niveles de lámina B1 se analizaron en los fibroblastos de individuos de diferentes edades WB, utilizando anticuerpos específicos para lámina B1 y actina (control de carga). Los fibroblastos se trataron previamente durante seis días con 1 nM de LMB o con su vehículo. Se muestran los niveles relativos de la lámina B1. Los datos representan los promedios  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (prueba de "t" no pareada).

## **8.6 Análisis comparativo de los inhibidores de CRM1 Selinexor y LMB**

Los resultados previos demuestran que la modulación farmacológica de la exportina CRM1 es un tratamiento prometedor para el HGPS; sin embargo, la elevada toxicidad del fármaco LMB, podría complicar el escalamiento de esta estrategia terapéutica a un modelo preclínico. Por lo tanto, se planteó la utilización de un inhibidor sintético de CRM1 llamado selinexor / KPT- 330, el cual se une de manera reversible a la exportina CRM1, disminuyendo así la toxicidad celular (A. Y. Wang & Liu, 2019). Como un primer paso llevamos a cabo un estudio comparativo entre los fármacos LMB y selinexor / KPT- 330 con respecto a su capacidad para inhibir la exportación nuclear del factor de transcripción STAT 3, en cultivos de fibroblastos provenientes de un individuo sano y de un paciente con HGPS. Observamos que ambos fármacos relocalizan hacia el núcleo a STAT3 con similar eficacia (Fig.13A). Se ha reportado que el selinexor disminuye los niveles de CRM1 en diferentes líneas de cáncer (Garg et al., 2017). Por lo que decidimos evaluar si el selinexor mantiene esa propiedad en cultivos de fibroblastos humanos e, interesantemente observamos que los niveles de CRM1 disminuyen al utilizar selinexor, en contraste con el aumento de CRM1 que provoca el tratamiento con LMB (Fig.13B). Esta característica del selinexor es una ventaja adicional importante sobre el LMB para modular la exportación nuclear exacerbada que se presenta en el HGPS. Finalmente comparamos la toxicidad celular que provocan ambos fármacos, mediante un ensayo de MTT que mide la viabilidad celular. Observamos que el selinexor induce una menor toxicidad respecto a la LMB (Fig. 13C). Con base a estos resultados, el paso siguiente es evaluar la capacidad del selinexor para aliviar las marcas de senescencia celular presentes en el HGPS.

**A****B**

C



**Figura 13.- El selinexor posee características superiores a LMB.**

(A) Se analizaron cultivos de fibroblastos de un paciente con HGPS (HGPS-1) y de un individuo sano (control). Se evaluó la localización subcelular de STAT3 (proteína que contiene NES) en células tratadas durante 24 horas con 1nM de LMB o 75nM de Selinexor con sus respectivos vehículos solamente. Barra, 20  $\mu$ m. (B) Los lisados de los cultivos de fibroblastos que se indican se analizaron mediante WB, usando anticuerpos contra CRM1 y actina (control de carga). En la gráfica de la derecha se muestra los niveles relativos de CRM1 (dos experimentos). (C) Se cuantificó la proliferación celular de los cultivos de fibroblastos que se indican, previamente tratados con 1 nM de LMB o con 75 nM de selinexor o tratados con sus respectivos vehículos solamente. La proliferación celular se midió durante un período de 6 días mediante ensayos MTT. Los datos representan los promedios de  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (prueba de "t" no pareada).

## 9. DISCUSIÓN

El HGPS es ocasionado por una mutación en el gen LMNA que da lugar a la síntesis de una variante mutante de la lámina A, llamada progerina, la cual genera diversos fenotipos relacionados con la senescencia celular (Ghosh & Zhou, 2014); sin embargo, los mecanismos y bases moleculares de la senescencia celular, relacionadas con la función de la progerina, aún se desconocen. La senescencia celular se ha definido como la pérdida del potencial de proliferación de las células, caracterizándose por un arresto del ciclo celular y otros marcadores de alteración funcional (Munoz-Espin & Serrano, 2014; Sharpless & Sherr, 2015; Young, Narita, & Narita, 2013). El HGPS ha sido un modelo clave para el estudio de las bases moleculares de la senescencia celular relacionada con el envejecimiento fisiológico en función de la coincidencia en diversas alteraciones que se han observado en el desarrollo de estos procesos.

En nuestro grupo de trabajo, la M. en C. Rodríguez Pérez, demostró por primera vez que el mecanismo de exportación nuclear de proteínas está alterado en el HGPS debido a la sobreexpresión de la exportina CRM1. Se conoce que esta exportina es el principal sistema de exportación de proteínas del núcleo al citoplasma, el cual regula la exportación nuclear de más de 250 proteínas diferentes implicadas en diversas vías de señalización que rigen las funciones de las células mediante el reconocimiento de una señal de exportación nuclear (NES), la cual está presente en la proteína a exportar (Ishizawa et al., 2015; Xu et al., 2012). La actividad exacerbada de la exportina CRM1 fue evidente al observar la incorrecta localización subcelular en el citoplasma de diferentes proteínas con NES, como son, STAT-3 (se muestra en este estudio), FAK, ZO2, ciclina B1, y Dp71. El aumento en la expresión de la exportina CRM1, además de observarse a nivel de proteína, también fue evidente a nivel de ARN mensajero lo que sugiere que este incremento de expresión está regulado a nivel transcripcional. En este trabajo demostramos mediante el ensayo de actividad de luciferasa, que en el cultivo HGPS-2 la regulación positiva de la exportina está controlada a nivel del promotor. Debido a que sólo uno de los dos cultivos utilizados en este estudio mostró este aumento en la actividad del promotor, y para confirmar que este fenómeno es debido a la enfermedad de HGPS y no al fondo genético del individuo, es necesario que la

actividad del promotor de CRM1 se analice en otras líneas celulares de pacientes con HGPS.

Por otra parte, se ha reportado que la alteración de la exportación nuclear, puede causar una desregulación de la proteostasis celular tanto en el núcleo como en el citoplasma (Nguyen, Holloway, & Altura, 2012). Por lo que en este trabajo demostramos principalmente que la desregulación del sistema de exportación de proteínas nucleares está directamente relacionada con la expresión de progerina, además de que esta desregulación determina críticamente la mayoría de los defectos celulares del HGPS. Interesantemente demostramos que la expresión ectópica de la progerina en células HeLa produjo un incremento en los niveles de la exportina CRM1, observándose la actividad elevada de la exportación, en la deslocalización hacia el citoplasma de la proteína STAT3. A su vez, pudo observarse que se reproduce la pérdida del marcador de la heterocromatina perinuclear (H3K9me3), el cual es uno de los fenotipos presentes en el HGPS y envejecimiento fisiológico (Molina-Serrano, Kyriakou, & Kirmizis, 2019; Tsurumi & Li, 2012; Zhang et al., 2016). El aumento de CRM1 debido a la progerina en células HeLa correlacionó con una mayor actividad de unión del factor NF-YA a la región promotora de CRM1; se ha reportado que los factores de transcripción NF-YA y Sp1 regula positivamente al promotor de CRM1, y que p53 actúa como un represor (van der Watt & Leaner, 2011). Por su parte el factor NF-YA mantiene una interacción directa con la lámina A, la cual regula de forma negativa su función en complejo con las otras subunidades de NF-Y (NF-YB y NF-YC) (Belluti et al., 2018; Cicchillitti et al., 2017). Se ha reportado que la presencia de progerina, disminuye la localización nucleoplasmática de la lámina A (Belluti et al., 2018; Vidak et al., 2018), por lo hipotetizamos que hay una mayor expresión de NF-YA que se encuentra más libre en el nucleoplasma, lo que le permite llevar a cabo su unión con el promotor de CRM1. Por otra parte, respecto a p53 (represor del promotor de CRM1), a pesar de que se ha reportado que la vía de señalización de p53 está activa en el HGPS, y hay una elevada expresión de la proteína (von Muhlinen et al., 2018), recientemente se descubrió que la progerina puede interactuar con la región media y el carboxilo terminal de p53, y la lámina A sólo con la región media (Yoon et al., 2019), así mismo, se ha reportado que la progerina tiene la

capacidad de secuestrar factores de transcripción en la lámina nuclear (Infante et al., 2014; Kubben et al., 2010; Kubben et al., 2016), por lo que no se descarta que la progerina esté secuestrando o impidiendo algunas funciones de p53, entre ellas su interacción con el promotor de CRM1.

Debido a la importancia del sistema de exportación nuclear en la proteostasis celular, era previsible suponer que la exportación nuclear alterada, mediada por CRM1 podría ser parte de los mecanismos básicos en el desarrollo de la senescencia en el HGPS. Por lo que en nuestro grupo de trabajo, la Dra. Vélez Aguilera, el M. en C. García Aguirre y la M. en C. Amaro Encarnación, evaluaron la inhibición de la actividad de CRM1 mediante el tratamiento farmacológico con LMB de las células con HGPS y se encontró una recuperación de fenotipos que se han relacionado con la senescencia celular, como fueron: la recuperación de la morfología nuclear, la disminución de células senescentes positivas a SA- $\beta$ -gal, la recuperación de los niveles proteicos de la lámina B1, y la heterocromatina perinuclear, el alivio de la morfología celular senescente y la expansión nucleolar. Esto nos indicó que la corrección de la exportación nuclear alterada mediante la LMB tiene un efecto terapéutico sobre el fenotipo celular del HGPS, sin embargo, era importante demostrar que la sobreexpresión de CRM1, era importante en el desarrollo de la enfermedad.

En este trabajo se demostró que la exportación nuclear alterada es un mecanismo clave y principal en el desarrollo de la senescencia celular. La sobreexpresión ectópica de la exportina CRM1, reprodujo varias características asociadas con la senescencia celular en cultivos de fibroblastos de individuos sanos, como son: aumento de células senescentes (marcador  $\beta$ -Gal), morfología celular senescente, la expansión nucleolar, la disminución de la proteína lamina B1 y disminución de la histona H3K9me3 (marcadora de heterocromatina) (Fig. 14). Por lo tanto, estos resultados nos indican que a pesar de la ausencia de progerina, la sobreexpresión de la exportina CRM1 es suficiente y es el mecanismo intermedio que recrear la senescencia celular que está presente en el HGPS. Se han llevado a cabo estudios de la relación entre el transporte nuclear y el envejecimiento (Martins, Sousa, Pereira, da Cruz, & Rebelo, 2020), sin embargo, este es el primer trabajo que relaciona la exportación nuclear alterada con el envejecimiento normal y prematuro.

La envoltura nuclear es una unidad organizadora central que mantiene todos los componentes que permiten el transporte de proteínas del núcleo al citoplasma e inversamente; uno de los principales componentes es la lámina nuclear, la cual está conformada por las láminas tipo A (A y C) y las láminas tipo B (B1 y B2). La lámina A se ha relacionado con la senescencia celular a través de la vía de p53 en el HGPS (von Muhlinen et al., 2018; Yoon et al., 2019), y la lámina B1 se ha relacionado su aumento o disminución con la senescencia celular, por lo que aún no está claro su papel en el HGPS (Barascu et al., 2012; Dreesen, Chojnowski, et al., 2013; Dreesen, Ong, Chojnowski, & Colman, 2013; Shimi et al., 2011). Nosotros observamos una disminución de la lámina B1 y aumento de células senescentes, por lo que no se descarta que sea la razón del desencadenamiento de la senescencia celular, sin embargo, aún falta estudiar la vía de p53 al aumentar la expresión de CRM1, ya que es la principal vía de senescencia celular que se ha estudiado en el HGPS.

Respecto a la integridad de la cromatina, el cual es el principal componente que se encarga de la expresión o represión de genes, tanto las láminas A, como las B, son necesarias. La lámina A se une a la cromatina a través de la interacción con las proteínas que se encuentran en la membrana nuclear interna y contienen el dominio LEM (LAP2, emerina y MAN2) (Haraguchi et al., 2001; Samwer et al., 2017). Como se mencionó previamente, en presencia de progerina hay una disminución de la lámina A en el nucleoplasma, lo que da lugar a la desorganización de la cromatina, ya que está controlada activamente por las interacciones cromosómicas entre cadenas formadas por la lámina A en todo el núcleo y no solo en la periferia nuclear (Bronshtein et al., 2015). Por su parte las láminas tipo B se unen al receptor de la lámina B (LBR), que interactúa con HP1, la cual se une al marcador de heterocromatina perinuclear H3K9me3 (Polioudaki et al., 2001). En este trabajo, la pérdida de la marca de heterocromatina H3K9me3 se puede atribuir tanto a la disminución de los niveles de la lámina B1 (Lukášová, Kovarčík, Bacíková, Falk, & Kozubek, 2017), como a la ausencia de la proteína HP1 que presenta una NES dependiente de CRM1 y ya se ha reportado que se encuentra disminuida en el nucleoplasma en el HGPS (Charó, Galigniana, & Piwien-Pilipuk, 2018; Shumaker et al., 2006), y además, a la ausencia de Sirtuina 2 una desacetilasa dependiente de NAD (SirT2), pues también contiene una NES

dependiente de CRM1 (North & Verdin, 2007). Nosotros observamos, que después de la sobreexpresión ectópica de CRM1, al corregir la exportación nuclear alterada con LMB, se restableció por completo la heterocromatina, pero la lámina B1 sólo en muy poca cantidad, lo que sugiere que puede haber otras vías relacionadas con la recuperación de la heterocromatina tras el tratamiento con LMB, como puede ser el restablecimiento de HP1 y SirT2 en el núcleo; además se ha reportado que el sólo aumento de la heterocromatina, rescata la morfología nuclear en el HGPS, por lo que podría ser un fenotipo importante y central en la senescencia celular (Stephens et al., 2018). Por lo anterior, es importante estudiar también los niveles y la localización de la lámina A al sobreexpresar CRM1, y observar si se pierde del nucleoplasma como sucede en el HGPS, así mismo observar su localización después del tratamiento con LMB.

Por otra parte, uno de los principales componentes nucleares que se ve afectado durante la senescencia celular es el nucléolo, el cual se encarga principalmente de la biogenesis ribosomal. Se ha reportado que en fibroblastos de individuos de edad avanzada y en el HGPS, hay una expansión en el área nucleolar, así como una elevada síntesis de proteínas (Buchwalter & Hetzer, 2017), interesantemente en este trabajo se observó que en los fibroblastos que sobreexpresan de manera ectópica a CRM1, el área nucleolar también aumenta, lo cual puede atribuirse a una desregulación de la cromatina, ya que se ha reportado que existen dominios asociados al nucleolo (NAD) que se asocian con la cromatina y son regulados por la lámina A, ayudando a mantener su integridad (Briand & Collas, 2020; Guelen et al., 2008; van Koningsbruggen et al., 2010). Por otra parte hay proteínas que son importantes para mantener la integridad del nucleolo, como es B23 que contiene una NES dependiente de CRM1 y se ha asociado con estructuras de ribonucleoproteínas nucleolares, además de ser un sensor de estrés para el nucleolo, por lo que no se descarta que su localización sea importante para la integridad del nucleolo (Cela, Di Matteo, & Federici, 2020; Yao et al., 2010).

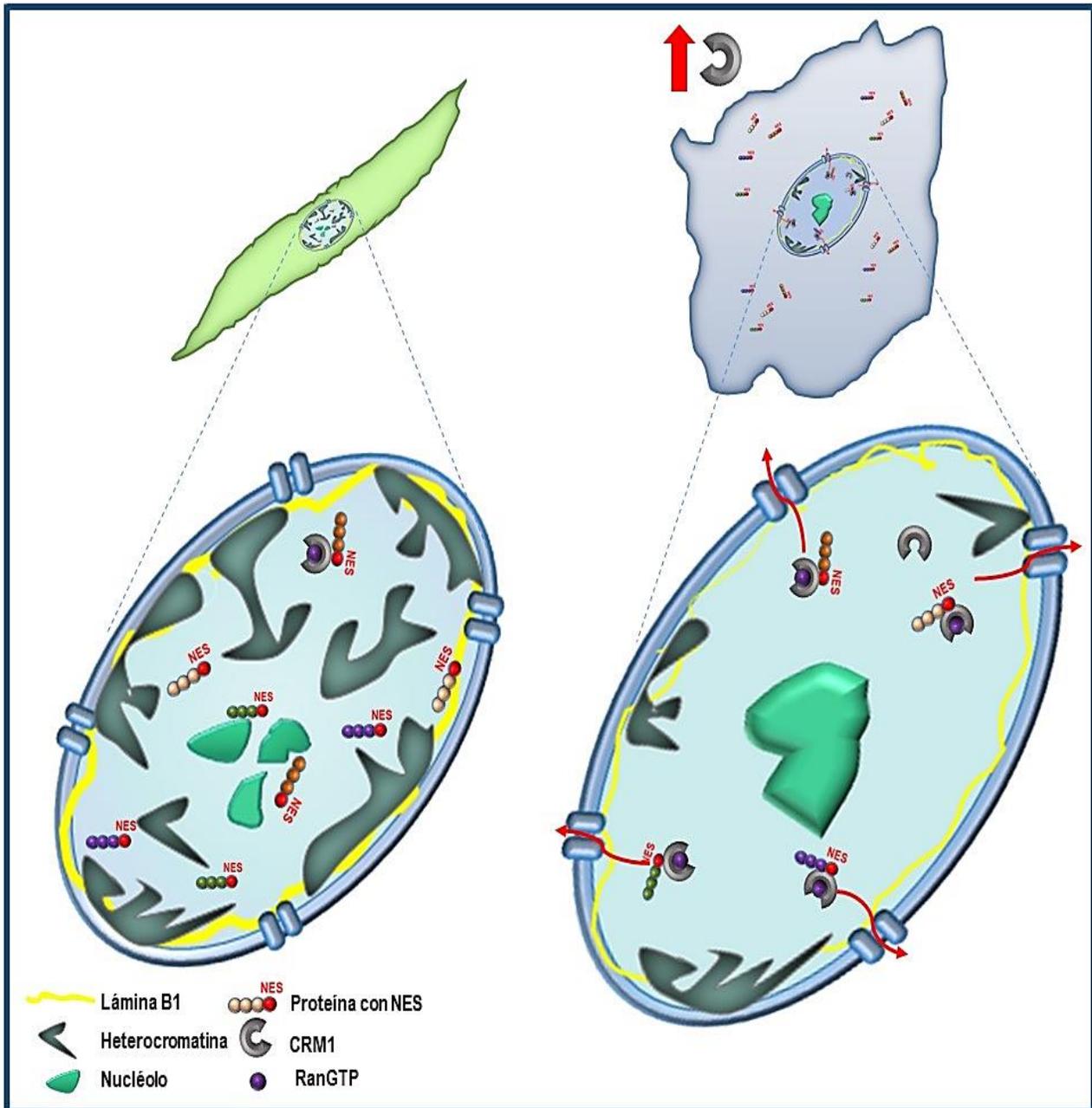
Existe una estrecha relación del HGPS con el envejecimiento normal, por lo que decidimos evaluar cómo se encontraba la expresión de la exportina CRM1 en fibroblastos de individuos de edad avanzada. Notablemente, encontramos un aumento en los niveles de la exportina CRM1 a pesar de que estos cultivos no expresan

progerina. Se ha reportado que en el envejecimiento fisiológico y en el HGPS existe una disminución de la lámina A nucleoplasmática (Scaffidi & Misteli, 2006), por lo que es viable proponer que existe una disminución en la unión del factor NF-YA con la lámina A, lo que consecuentemente dejaría libre al factor de transcripción para unirse al promotor de CRM1 y regular positivamente la expresión de la exportina CRM1, como ocurre en las células cancerígenas (van der Watt & Leaner, 2011).

La inhibición farmacológica de CRM1 con LMB, recuperó dos alteraciones fenotípicas del envejecimiento en cultivos de fibroblastos de individuos viejos: la expansión nucleolar y los bajos niveles de la histona marcadora de heterocromatina perinuclear (H3K9me3). Estos resultados nos confirmaron que la alteración de la proteostasis debido a la hiperactividad aberrante de la exportina CRM1 es un determinante tanto del envejecimiento fisiológico, como del envejecimiento prematuro, además de la importancia de mantener la estructura de la cromatina, pues a pesar de que el tratamiento con LMB no restableció los niveles de la lámina B1, sí se recuperó el área nucleolar que se ha visto relacionada con la heterocromatina; se ha reportado que en ausencia de las láminas B, las regiones de unión a la cromatina son reposicionadas con dominios LAD dependientes de la lámina A, pero no así, las regiones nucleoplasmáticas reguladas por la lámina A, pues esta se pone en contacto preferentemente con la cromatina alrededor de los nucléolos (Kind & van Steensel, 2014; Padeken & Heun, 2014; Sen Gupta & Sengupta, 2017), por lo tanto es importante analizar la localización de la lámina A y su posible redistribución en el núcleo después del tratamiento. Así mismo, es importante el estudio de la vía de p53 relacionada con la senescencia celular, después del tratamiento con LMB. En su conjunto, estos resultados confirman que el aumento de CRM1 también es importante en el envejecimiento normal, así como la modulación farmacológica de CRM1 con un inhibidor selectivo puede recuperar algunos los fenotipos anormales relacionados con senescencia celular.

Actualmente existen varios inhibidores específicos de CRM1 que se utilizan en protocolos terapéuticos para tratar el cáncer, en donde se ha observado que el tratamiento con estos fármacos detiene la progresión de diferentes tumores. Particularmente el fármaco selinexor [KPT-330] es tolerado por los pacientes en

ensayos clínicos. En el presente se llevó a cabo un análisis comparativo entre el efecto de dos inhibidores de CRM1, LMB y selinexor [KPT-330], sobre fibroblastos con HGPS. Se encontró que el tratamiento con selinexor [KPT-330], obtuvo una mejor relocalización de STAT 3 hacia el núcleo, en comparación al efecto observado con LMB. Esto puede deberse a que la unión del selinexor con la exportina CRM1 es reversible (A. Y. Wang & Liu, 2019), mientras que LMB se une covalentemente, y por ende irreversiblemente a la exportina CRM1. El uso de selinexor [KPT-330] proporciona otras ventajas adicionales: a) disminuye los niveles de la exportina CRM1 en los fibroblastos HGPS, y b) ocasiona una menor toxicidad sobre los cultivos de fibroblastos HGPS, en comparación con LMB. Por lo tanto, selinexor [KPT-330] es el fármaco apropiado para llevar a cabo experimentos preclínicos utilizando el modelo murino del HGPS.



**Figura 14.- Modelo esquemático que muestra como la sobreexpresión ectópica de CRM1 asemeja el fenotipo senescente presente en el HGPS.**

Izquierda. Las células de un individuo sano exhiben un área celular fusiforme, además de la correcta localización de la heterocromatina y la lámina B1, y una morfología normal de los nucléolos. Derecha. Las células que sobreexpresan CRM1, exhiben una exportación nuclear exacerbada, lo que da lugar a una morfología celular senescente, una regulación negativa de la lámina B1, la pérdida de la heterocromatina perinuclear y un área nucleolar expandida.

# 10. CONCLUSIONES

- 1) La regulación positiva de la exportina está controlada a nivel del promotor en una línea celular de HGPS.
- 2) El factor NF-YA tiene una mayor actividad de unión a la región promotora de CRM1 en las células que expresan de forma ectópica a la progerina.
- 3) La sobreexpresión de la exportina CRM1 recrea el fenotipo de senescencia celular en fibroblastos normales.
- 4) La sobreexpresión/hiperactividad de la exportina CRM1 es una marca molecular asociada con el envejecimiento normal.
- 5) La inhibición de la exportación exacerbada de CRM1 en individuos de edad avanzada, recupera dos marcas relacionadas con la senescencia celular.
- 6) El selinexor [KPT-330] posee propiedades terapéuticas superiores a la LMB para aliviar las marcas de envejecimiento.

# 11.PERSPECTIVAS

- Analizar la actividad del promotor de CRM1 en otras líneas celulares del HGPS.
- Determinar si el factor NF-YA tiene una mayor expresión en el HGPS, debido a la falta de interacción con la lámina A (proteína que reprime en conjunto con las otras NF-Ys la expresión de NF-YA)
- Evaluar otras marcas moleculares relacionadas con el fenotipo senescente del HGPS al sobreexpresar de manera ectópica a CRM1, como son: la morfología nuclear y la sub-localización de la lámina A, la actividad mitocondrial y el daño al DNA.
- Estudiar otras proteínas que pudieran estar relacionadas con el aumento de H3K9me3, como son: la localización de HP1 y sirT2
- Analizar la vía de p53 relacionada con senescencia celular en el HGPS al corregir la exportación nuclear alterada.
- Estudiar la vía de p53 al sobreexpresar de manera ectópica a CRM1.
- Evaluar otras marcas moleculares en individuos de edad avanzada al corregir la exportación nuclear alterada mediada por CRM1, tales como: la morfología nuclear y la sub-localización de la lámina A, las células senescentes (positivas a  $\beta$ -gal), la morfología celular senescente, la actividad mitocondrial y el daño al DNA.
- Estudiar otras marcas moleculares al inhibir la exportación nuclear alterada en el HGPS con Selinexor, en comparación con LMB.

# 12. ARTÍCULO

Aging Cell

Open Access

ANATOMICAL SOCIETY



IF 7.346

ORIGINAL ARTICLE | Open Access |

## Enhanced nuclear protein export in premature aging and rescue of the progeria phenotype by modulation of CRM1 activity

Ian García-Aguirre, [Alma Alamillo-Iniesta](#), Ruth Rodríguez-Pérez, Griselda Vélez-Aguilera, Elianeth Amaro-Encarnación, Elizabeth Jiménez-Gutiérrez, Alejandra Vásquez-Limeta ... [See all authors](#) ▾

First published: 15 July 2019 | <https://doi.org/10.1111/accel.13002>

[Ian García-Aguirre and Alma Alamillo-Iniesta contributed equally to this work.](#)

SECTIONS

PDF

TOOLS

SHARE

### Abstract

The study of Hutchinson–Gilford progeria syndrome (HGPS) has provided important clues to decipher mechanisms underlying aging. Progerin, a mutant lamin A, disrupts nuclear envelope structure/function, with further impairment of multiple processes that culminate in senescence. Here, we demonstrate that the nuclear protein export pathway is exacerbated in HGPS, due to progerin-driven overexpression of CRM1, thereby disturbing nucleocytoplasmic partitioning of CRM1-target proteins. Enhanced nuclear export is central in HGPS, since pharmacological inhibition of CRM1 alleviates all aging hallmarks analyzed, including senescent cellular morphology, lamin B1 downregulation, loss of heterochromatin, nuclear morphology defects, and expanded nucleoli. Exogenous

# 13. BIBLIOGRAFÍA

- Ashapkin, V. V., Kutueva, L. I., Kurchashova, S. Y., & Kireev, I. (2019). Are There Common Mechanisms Between the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and Natural Aging? *Front Genet*, *10*, 455. doi:10.3389/fgene.2019.00455
- Barascu, A., Le Chalony, C., Pennarun, G., Genet, D., Imam, N., Lopez, B., & Bertrand, P. (2012). Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *Embo j*, *31*(5), 1080-1094. doi:10.1038/emboj.2011.492
- Belluti, S., Semeghini, V., Basile, V., Rigillo, G., Salsi, V., Genovese, F., . . . Imbriano, C. (2018). An autoregulatory loop controls the expression of the transcription factor NF-Y. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, *1861*(5), 509-518. doi:10.1016/j.bbagr.2018.02.008
- Briand, N., & Collas, P. (2020). Lamina-associated domains: peripheral matters and internal affairs. *Genome Biol*, *21*(1), 85. doi:10.1186/s13059-020-02003-5
- Bronshtein, I., Kepten, E., Kanter, I., Berezin, S., Lindner, M., Redwood, A. B., . . . Garini, Y. (2015). Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior. *Nat Commun*, *6*, 8044. doi:10.1038/ncomms9044
- Buchwalter, A., & Hetzer, M. W. (2017). Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging. *Nat Commun*, *8*(1), 328. doi:10.1038/s41467-017-00322-z
- Cao, K., Blair, C. D., Faddah, D. A., Kieckhafer, J. E., Olive, M., Erdos, M. R., . . . Collins, F. S. (2011). Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J Clin Invest*, *121*(7), 2833-2844. doi:10.1172/jci43578
- Cela, I., Di Matteo, A., & Federici, L. (2020). Nucleophosmin in Its Interaction with Ligands. *Int J Mol Sci*, *21*(14). doi:10.3390/ijms21144885
- Charó, N. L., Galigniana, N. M., & Piwien-Pilipuk, G. (2018). Heterochromatin protein (HP)1 $\gamma$  is not only in the nucleus but also in the cytoplasm interacting with actin in both cell compartments. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, *1865*(2), 432-443. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.11.015
- Cicchillitti, L., Corrado, G., Carosi, M., Dabrowska, M. E., Loria, R., Falcioni, R., . . . Vizza, E. (2017). Prognostic role of NF-YA splicing isoforms and Lamin A status in low grade endometrial cancer. *Oncotarget*, *8*(5), 7935-7945. doi:10.18632/oncotarget.13854
- Datta, S., Snow, C. J., & Paschal, B. M. (2014). A pathway linking oxidative stress and the Ran GTPase system in progeria. *Mol Biol Cell*, *25*(8), 1202-1215. doi:10.1091/mbc.E13-07-0430
- de Leeuw, R., Gruenbaum, Y., & Medalia, O. (2018). Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions. *Trends Cell Biol*, *28*(1), 34-45. doi:10.1016/j.tcb.2017.08.004
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., . . . Levy, N. (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*, *300*(5628), 2055. doi:10.1126/science.1084125

- De Vos, W. H., Houben, F., Hoebe, R. A., Hennekam, R., van Engelen, B., Manders, E. M., . . . Van Oostveldt, P. (2010). Increased plasticity of the nuclear envelope and hypermobility of telomeres due to the loss of A-type lamins. *Biochim Biophys Acta*, 1800(4), 448-458. doi:10.1016/j.bbagen.2010.01.002
- Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T., & Goldman, R. D. (2010). Nuclear lamins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(11), a000547. doi:10.1101/cshperspect.a000547
- Dorado, B., & Andres, V. (2017). A-type lamins and cardiovascular disease in premature aging syndromes. *Curr Opin Cell Biol*, 46, 17-25. doi:10.1016/j.ceb.2016.12.005
- Dreesen, O., Chojnowski, A., Ong, P. F., Zhao, T. Y., Common, J. E., Lunny, D., . . . Colman, A. (2013). Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. *J Cell Biol*, 200(5), 605-617. doi:10.1083/jcb.201206121
- Dreesen, O., Ong, P. F., Chojnowski, A., & Colman, A. (2013). The contrasting roles of lamin B1 in cellular aging and human disease. *Nucleus*, 4(4), 283-290. doi:10.4161/nucl.25808
- Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., . . . Collins, F. S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 423(6937), 293-298. doi:10.1038/nature01629
- Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell*, 23(11), 2066-2075. doi:10.1091/mbc.E11-10-0884
- Fu, S. C., Fung, H. Y. J., Cagatay, T., Baumhardt, J., & Chook, Y. M. (2018). Correlation of CRM1-NES affinity with nuclear export activity. *Mol Biol Cell*, 29(17), 2037-2044. doi:10.1091/mbc.E18-02-0096
- Garg, M., Kanojia, D., Mayakonda, A., Ganesan, T. S., Sadhanandhan, B., Suresh, S., . . . Koeffler, H. P. (2017). Selinexor (KPT-330) has antitumor activity against anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo and enhances sensitivity to doxorubicin. *Sci Rep*, 7(1), 9749. doi:10.1038/s41598-017-10325-x
- Ghosh, S., & Zhou, Z. (2014). Genetics of aging, progeria and lamin disorders. *Curr Opin Genet Dev*, 26, 41-46. doi:10.1016/j.gde.2014.05.003
- Gonzalo, S., Kreienkamp, R., & Askjaer, P. (2017). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res Rev*, 33, 18-29. doi:10.1016/j.arr.2016.06.007
- Gordon, L. B., Cao, K., & Collins, F. S. (2012). Progeria: translational insights from cell biology. *J Cell Biol*, 199(1), 9-13. doi:10.1083/jcb.201207072
- Gordon, L. B., Massaro, J., D'Agostino, R. B., Sr., Campbell, S. E., Brazier, J., Brown, W. T., . . . Kieran, M. W. (2014). Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Circulation*, 130(1), 27-34. doi:10.1161/circulationaha.113.008285
- Gruenbaum, Y., & Foisner, R. (2015). Lamins: nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annu Rev Biochem*, 84, 131-164. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034115
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., . . . van Steensel, B. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by

- mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453(7197), 948-951. doi:10.1038/nature06947
- Hamczyk, M. R., del Campo, L., & Andres, V. (2018). Aging in the Cardiovascular System: Lessons from Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Annu Rev Physiol*, 80, 27-48. doi:10.1146/annurev-physiol-021317-121454
- Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K. K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., . . . Hiraoka, Y. (2001). BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *J Cell Sci*, 114(Pt 24), 4575-4585.
- Harhouri, K., Frankel, D., Bartoli, C., Roll, P., De Sandre-Giovannoli, A., & Levy, N. (2018). An overview of treatment strategies for Hutchinson-Gilford Progeria syndrome. *Nucleus*, 9(1), 246-257. doi:10.1080/19491034.2018.1460045
- Harhouri, K., Navarro, C., Depetris, D., Mattei, M. G., Nissan, X., Cau, P., . . . Levy, N. (2017). MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO Mol Med*, 9(9), 1294-1313. doi:10.15252/emmm.201607315
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11(3), 298-300. doi:10.1093/geronj/11.3.298
- Hennekam, R. C. (2006). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A*, 140(23), 2603-2624. doi:10.1002/ajmg.a.31346
- Infante, A., Gago, A., de Eguino, G. R., Calvo-Fernández, T., Gómez-Vallejo, V., Llop, J., . . . Rodríguez, C. I. (2014). Prelamin A accumulation and stress conditions induce impaired Oct-1 activity and autophagy in prematurely aged human mesenchymal stem cell. *Aging (Albany NY)*, 6(4), 264-280. doi:10.18632/aging.100651
- Ishizawa, J., Kojima, K., Hail, N., Jr., Tabe, Y., & Andreeff, M. (2015). Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein. *Pharmacol Ther*, 153, 25-35. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.06.001
- Kelley, J. B., Datta, S., Snow, C. J., Chatterjee, M., Ni, L., Spencer, A., . . . Paschal, B. M. (2011). The defective nuclear lamina in Hutchinson-gilford progeria syndrome disrupts the nucleocytoplasmic Ran gradient and inhibits nuclear localization of Ubc9. *Mol Cell Biol*, 31(16), 3378-3395. doi:10.1128/mcb.05087-11
- Kind, J., & van Steensel, B. (2014). Stochastic genome-nuclear lamina interactions: modulating roles of Lamin A and BAF. *Nucleus*, 5(2), 124-130. doi:10.4161/nucl.28825
- Kubben, N., & Misteli, T. (2017). Shared molecular and cellular mechanisms of premature ageing and ageing-associated diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(10), 595-609. doi:10.1038/nrm.2017.68
- Kubben, N., Voncken, J. W., Demmers, J., Calis, C., van Almen, G., Pinto, Y., & Misteli, T. (2010). Identification of differential protein interactors of lamin A and progerin. *Nucleus*, 1(6), 513-525. doi:10.4161/nucl.1.6.13512
- Kubben, N., Zhang, W., Wang, L., Voss, T. C., Yang, J., Qu, J., . . . Misteli, T. (2016). Repression of the Antioxidant NRF2 Pathway in Premature Aging. *Cell*, 165(6), 1361-1374. doi:10.1016/j.cell.2016.05.017
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., . . . Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent

- modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16), 9112-9117. doi:10.1073/pnas.96.16.9112
- Larrieu, D., Vire, E., Robson, S., Breusegem, S. Y., Kouzarides, T., & Jackson, S. P. (2018). Inhibition of the acetyltransferase NAT10 normalizes progeric and aging cells by rebalancing the Transportin-1 nuclear import pathway. *Sci Signal*, 11(537). doi:10.1126/scisignal.aar5401
- Lee, S. J., Jung, Y. S., Yoon, M. H., Kang, S. M., Oh, A. Y., Lee, J. H., . . . Park, B. J. (2016). Interruption of progerin-lamin A/C binding ameliorates Hutchinson-Gilford progeria syndrome phenotype. *J Clin Invest*, 126(10), 3879-3893. doi:10.1172/jci84164
- Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
- Lui, K., & Huang, Y. (2009). RanGTPase: A Key Regulator of Nucleocytoplasmic Trafficking. *Mol Cell Pharmacol*, 1(3), 148-156. doi:10.4255/mcpharmacol.09.19
- Lukášová, E., Kovarčík, A., Bacíková, A., Falk, M., & Kozubek, S. (2017). Loss of lamin B receptor is necessary to induce cellular senescence. *Biochem J*, 474(2), 281-300. doi:10.1042/bcj20160459
- Martins, F., Sousa, J., Pereira, C. D., da Cruz, E. S. O. A. B., & Rebelo, S. (2020). Nuclear envelope dysfunction and its contribution to the aging process. *Aging Cell*, 19(5), e13143. doi:10.1111/accel.13143
- Molina-Serrano, D., Kyriakou, D., & Kirmizis, A. (2019). Histone Modifications as an Intersection Between Diet and Longevity. *Front Genet*, 10, 192. doi:10.3389/fgene.2019.00192
- Morales-Lazaro, S. L., Gonzalez-Ramirez, R., Gomez, P., Tapia-Ramirez, V., de Leon, M. B., & Cisneros, B. (2010). Induction of dystrophin Dp71 expression during neuronal differentiation: opposite roles of Sp1 and AP2alpha in Dp71 promoter activity. *J Neurochem*, 112(2), 474-485. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06467.x
- Munoz-Espin, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(7), 482-496. doi:10.1038/nrm3823
- Nguyen, K. T., Holloway, M. P., & Altura, R. A. (2012). The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *Int J Biochem Mol Biol*, 3(2), 137-151.
- Noda, A., Mishima, S., Hirai, Y., Hamasaki, K., Landes, R. D., Mitani, H., . . . Kodama, Y. (2015). Progerin, the protein responsible for the Hutchinson-Gilford progeria syndrome, increases the unrepaired DNA damages following exposure to ionizing radiation. *Genes Environ*, 37, 13. doi:10.1186/s41021-015-0018-4
- North, B. J., & Verdin, E. (2007). Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PLoS One*, 2(8), e784. doi:10.1371/journal.pone.0000784
- Ogrodnik, M., Salmonowicz, H., Jurk, D., & Passos, J. F. (2019). Expansion and Cell-Cycle Arrest: Common Denominators of Cellular Senescence. *Trends Biochem Sci*, 44(12), 996-1008. doi:10.1016/j.tibs.2019.06.011
- Osorio, F. G., Navarro, C. L., Cadinanos, J., Lopez-Mejia, I. C., Quiros, P. M., Bartoli, C., . . . Lopez-Otin, C. (2011). Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med*, 3(106), 106ra107. doi:10.1126/scitranslmed.3002847
- Padeken, J., & Heun, P. (2014). Nucleolus and nuclear periphery: velcro for heterochromatin. *Curr Opin Cell Biol*, 28, 54-60. doi:10.1016/j.ceb.2014.03.001

- Piekarowicz, K., Machowska, M., Dzianisava, V., & Rzepecki, R. (2019). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome-Current Status and Prospects for Gene Therapy Treatment. *Cells*, *8*(2). doi:10.3390/cells8020088
- Polioudaki, H., Kourmouli, N., Drosou, V., Bakou, A., Theodoropoulos, P. A., Singh, P. B., . . . Georgatos, S. D. (2001). Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep*, *2*(10), 920-925. doi:10.1093/embo-reports/kve199
- Samwer, M., Schneider, M. W. G., Hoefler, R., Schmalhorst, P. S., Jude, J. G., Zuber, J., & Gerlich, D. W. (2017). DNA Cross-Bridging Shapes a Single Nucleus from a Set of Mitotic Chromosomes. *Cell*, *170*(5), 956-972.e923. doi:10.1016/j.cell.2017.07.038
- Scaffidi, P., & Misteli, T. (2005). Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med*, *11*(4), 440-445. doi:10.1038/nm1204
- Scaffidi, P., & Misteli, T. (2006). Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*, *312*(5776), 1059-1063. doi:10.1126/science.1127168
- Sen Gupta, A., & Sengupta, K. (2017). Lamin B2 Modulates Nucleolar Morphology, Dynamics, and Function. *Mol Cell Biol*, *37*(24). doi:10.1128/mcb.00274-17
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*, *15*(7), 397-408. doi:10.1038/nrc3960
- Shimi, T., Butin-Israeli, V., Adam, S. A., Hamanaka, R. B., Goldman, A. E., Lucas, C. A., . . . Goldman, R. D. (2011). The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev*, *25*(24), 2579-2593. doi:10.1101/gad.179515.111
- Shumaker, D. K., Dechat, T., Kohlmaier, A., Adam, S. A., Bozovsky, M. R., Erdos, M. R., . . . Goldman, R. D. (2006). Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(23), 8703-8708. doi:10.1073/pnas.0602569103
- Sidler, C., Kovalchuk, O., & Kovalchuk, I. (2017). Epigenetic Regulation of Cellular Senescence and Aging. *Front Genet*, *8*, 138. doi:10.3389/fgene.2017.00138
- Smith, A., Brownawell, A., & Macara, I. G. (1998). Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol*, *8*(25), 1403-1406. doi:10.1016/s0960-9822(98)00023-2
- Snow, C. J., Dar, A., Dutta, A., Kehlenbach, R. H., & Paschal, B. M. (2013). Defective nuclear import of Tpr in Progeria reflects the Ran sensitivity of large cargo transport. *J Cell Biol*, *201*(4), 541-557. doi:10.1083/jcb.201212117
- Stephens, A. D., Liu, P. Z., Banigan, E. J., Almassalha, L. M., Backman, V., Adam, S. A., . . . Marko, J. F. (2018). Chromatin histone modifications and rigidity affect nuclear morphology independent of lamins. *Mol Biol Cell*, *29*(2), 220-233. doi:10.1091/mbc.E17-06-0410
- Tsurumi, A., & Li, W. X. (2012). Global heterochromatin loss: a unifying theory of aging? *Epigenetics*, *7*(7), 680-688. doi:10.4161/epi.20540
- van der Watt, P. J., & Leaner, V. D. (2011). The nuclear exporter, Crm1, is regulated by NFY and Sp1 in cancer cells and repressed by p53 in response to DNA damage. *Biochim Biophys Acta*, *1809*(7), 316-326. doi:10.1016/j.bbagr.2011.05.017
- van Koningsbruggen, S., Gierlinski, M., Schofield, P., Martin, D., Barton, G. J., Ariyurek, Y., . . . Lamond, A. I. (2010). High-resolution whole-genome sequencing reveals

- that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli. *Mol Biol Cell*, 21(21), 3735-3748. doi:10.1091/mbc.E10-06-0508
- Velez-Aguilera, G., de Dios Gomez-Lopez, J., Jimenez-Gutierrez, G. E., Vasquez-Limeta, A., Laredo-Cisneros, M. S., Gomez, P., . . . Cisneros, B. (2018). Control of nuclear beta-dystroglycan content is crucial for the maintenance of nuclear envelope integrity and function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1865(2), 406-420. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.11.013
- Vidak, S., Georgiou, K., Fichtinger, P., Naetar, N., Dechat, T., & Foisner, R. (2018). Nucleoplasmic lamins define growth-regulating functions of lamina-associated polypeptide 2 $\alpha$  in progeria cells. *J Cell Sci*, 131(3). doi:10.1242/jcs.208462
- von Muhlinen, N., Horikawa, I., Alam, F., Isogaya, K., Lissa, D., Vojtesek, B., . . . Harris, C. C. (2018). p53 isoforms regulate premature aging in human cells. *Oncogene*, 37(18), 2379-2393. doi:10.1038/s41388-017-0101-3
- Wang, A. S., Ong, P. F., Chojnowski, A., Clavel, C., & Dreesen, O. (2017). Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. *Sci Rep*, 7(1), 15678. doi:10.1038/s41598-017-15901-9
- Wang, A. Y., & Liu, H. (2019). The past, present, and future of CRM1/XPO1 inhibitors. *Stem Cell Investig*, 6, 6. doi:10.21037/sci.2019.02.03
- Wang, Y., Lichter-Konecki, U., Anyane-Yeboah, K., Shaw, J. E., Lu, J. T., Ostlund, C., . . . Worman, H. J. (2016). A mutation abolishing the ZMPSTE24 cleavage site in prelamin A causes a progeroid disorder. *J Cell Sci*, 129(10), 1975-1980. doi:10.1242/jcs.187302
- Xiong, Z. M., Choi, J. Y., Wang, K., Zhang, H., Tariq, Z., Wu, D., . . . Cao, K. (2016). Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria. *Aging Cell*, 15(2), 279-290. doi:10.1111/accel.12434
- Xu, D., Grishin, N. V., & Chook, Y. M. (2012). NESdb: a database of NES-containing CRM1 cargoes. *Mol Biol Cell*, 23(18), 3673-3676. doi:10.1091/mbc.E12-01-0045
- Yao, Z., Duan, S., Hou, D., Wang, W., Wang, G., Liu, Y., . . . Wu, M. (2010). B23 acts as a nucleolar stress sensor and promotes cell survival through its dynamic interaction with hnRNPU and hnRNPA1. *Oncogene*, 29(12), 1821-1834. doi:10.1038/onc.2009.473
- Yoon, M. H., Kang, S. M., Lee, S. J., Woo, T. G., Oh, A. Y., Park, S., . . . Park, B. J. (2019). p53 induces senescence through Lamin A/C stabilization-mediated nuclear deformation. *Cell Death Dis*, 10(2), 107. doi:10.1038/s41419-019-1378-7
- Yoshida, M., Nishikawa, M., Nishi, K., Abe, K., Horinouchi, S., & Beppu, T. (1990). Effects of leptomycin B on the cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells. *Exp Cell Res*, 187(1), 150-156. doi:10.1016/0014-4827(90)90129-x
- Young, A. R., Narita, M., & Narita, M. (2013). Cell senescence as both a dynamic and a static phenotype. *Methods Mol Biol*, 965, 1-13. doi:10.1007/978-1-62703-239-1\_1
- Zhang, H., Sun, L., Wang, K., Wu, D., Trappio, M., Witting, C., & Cao, K. (2016). Loss of H3K9me3 Correlates with ATM Activation and Histone H2AX Phosphorylation Deficiencies in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *PLoS One*, 11(12), e0167454. doi:10.1371/journal.pone.0167454