



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

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Efecto de la modulación de la exportación nuclear sobre
la función mitocondrial en el síndrome de progeria”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. EDUARDO FELICIANO MONTEERRUBIO LEDEZMA

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

Agosto 2021

Contenido

Resumen	7
Abstract	8
Introducción.....	9
Síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford	9
La lamina A/C y progerina	10
Alteraciones celulares en HGPS	11
Función mitocondrial dañada en el HGPS	12
Dinámica mitocondrial: del nacimiento a la eliminación	13
Tráfico nuclear en HGPS	18
Antecedentes.....	22
Justificación	24
Hipótesis.....	25
Objetivos.....	26
Objetivo general	26
Objetivos particulares.....	26
Estrategia experimental.....	27
Materiales y métodos	28
Cultivo Celular.	28
Inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal.	28
Tinción de células <i>in vivo con colorantes vitales</i>	29
Determinación de los niveles de ATP.....	30
Microscopía electrónica de transmisión.....	30
Citometría de flujo.....	31
Western blot.	31
Extracción de RNA total.	32
Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR tiempo real).....	32
Análisis estadístico.	33
Resultados y discusión.	33
Conclusiones.....	56
Bibliografía.....	57

Índice de figuras

Figura 1. Procesamiento de la proteína pre-lamina A	12
Figura 2. Dinámica mitocondrial.....	14
Figura 3. Mitofagia.....	16
Figura 4. Autofagia.....	17
Figura 5. Ciclo de importación y exportación núcleo-citoplasma.	20
Figura 6. Análisis de la morfología mitocondrial en cultivos sincronizados de fibroblastos WT	34
Figura 7. Restablecimiento de la morfología mitocondrial de Iso fibroblastos HGPS después del tratamiento con LMB por 6 días.	36
Figura 8. Recuperación de la morfología mitocondrial de los fibroblastos HGPS después del tratamiento con LMB por 3 días.	37
Figura 9. Análisis morfométrico de las mitocondrias de los fibroblastos HGPS.....	38
Figura 10. Determinación de la masa mitocondrial de los fibroblastos HGPS tratados con LMB.....	39
Figura 11. La inhibición farmacológica de CRM1 con LMB restablece el $\Delta\Psi_m$ de las mitocondrias de las células HGPS.....	41
Figura 12. La producción deficiente de ATP que presentan los fibroblastos HGPS se normalizó después del tratamiento con LMB.	42
Figura 13. La expresión disminuida de PGC1- α que presentan los fibroblastos HGPS se restablece con el tratamiento con LMB.....	44
Figura 14. La deslocalización del núcleo hacia el citoplasma de TFEB que presentan los fibroblastos HGPS se revierte después del tratamiento con LMB.	45
Figura 15. PINK1 y Parkina se encuentran activas en HGPS.....	47
Figura 16. Existe una acumulación de autofagosomas en HGPS que se revierte después del tratamiento con LMB.	48
Figura 17. En HGPS existe una deficiencia lisosomal que LMB recupera parcialmente.	49
Figura 18. Los lisosomas en HGPS son funcionales.....	52
Figura 19. Existe una deficiencia en la fusión lisosomal en HGPS que es aliviada con el tratamiento con LMB.....	53
Figura 20. La fusión del autofagosoma con el lisosoma está mediada por STX17. ..	54

Índice de tablas

Tabla 1. Alivio del fenotipo senescente en fibroblastos con HGPS tratados con LMB	23
---	----

Este trabajo se realizó en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Doctor Bulmaro Cisneros Vega. Con el apoyo de CONACyT con el proyecto cuyo número de registro es 705235.

Agradecimientos

A mis padres Claudio y Aurelia por su gran apoyo y soporte no solo durante el aspecto académico durante estos cuatro años sino por su apoyo para construir mi familia.

A mis hermanos: Claudia, César, Rosalva y Verónica, por su respaldo y compañía durante esta etapa de mi vida.

A mi suegra Juana y a mi cuñada Hilda por su apoyo y compañía.

A mi esposa Nely por su amor y compañía, sus consejos y experiencia me han ayudado a conseguir esta meta; su amor y calidez a construir un hogar.

A mis hijos Anel y Emanuel que son mi inspiración y que su amor me alimenta cada día.

A el Doctor Bulmaro por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por dirigir este trabajo.

A Dios por que él ha provisto de todo recurso para lograr esta meta, este trabajo está dedicado a Él.

*Y di mi corazón a inquirir y a buscar con
sabiduría sobre todo lo que se hace debajo del cielo;
este penoso trabajo dio Dios a los hijos de los
hombres para que se ocupen en él. Miré todas las
obras que se hacen debajo del sol; y he aquí todo ello
es vanidad y aflicción de espíritu. Lo torcido no se
puede enderexar, y lo incompleto no puede
contarse.*"

Resumen

El síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford (HGPS) se caracteriza por causar envejecimiento acelerado y prematuro, con síntomas propios del envejecimiento natural. El HGPS es causada por una mutación puntual en el gen *LMNA* que codifica para la proteína lámina A/C (C1824→T), este cambio activa un sitio crítico de splicing que ocasiona la eliminación de 150 pb, lo que se traduce en la pérdida del sitio de corte de la endoproteasa ZMPSTE24, por lo que la proteína mutante denominada progerina, no madura correctamente y permanece farnesilada. La progerina ocasiona múltiples alteraciones celulares que al final desencadenan senescencia celular y envejecimiento a nivel de organismo. Entre estas alteraciones se encuentra la disfunción mitocondrial. En nuestro grupo de trabajo se demostró que la exportación nuclear de proteínas se encuentra aumentada por la sobre-expresión de la exportina CRM1. El tratamiento de fibroblastos provenientes de individuos con HGPS con leptomicina B (LMB), un inhibidor específico de CRM1, normaliza la exportación nuclear y aminora varias marcas de senescencia. Dado que la disfunción mitocondrial favorece la senescencia celular y que el tratamiento con LMB previene la aparición de marcas de senescencia, surgió el interés de evaluar si el tratamiento con LMB tiene la capacidad de aliviar la disfunción mitocondrial en el HGPS. En este trabajo se demostró que la modulación farmacológica de CRM1 con LMB recupera la morfología y función mitocondrial que se encuentra dañada en los fibroblastos HGPS. El mecanismo molecular que subyace el efecto terapéutico de la LMB parece estar en los dos niveles importantes de la dinámica mitocondrial: biogénesis y mitofagia. En parte la activación de la biogénesis mitocondrial, se demostró una recuperación de la expresión del factor de transcripción PGC1- α que ocurre como respuesta al tratamiento con LMB. Mientras que a nivel de mitofagia, los análisis muestran que los niveles de las proteínas PINK1 y parkina parecen indicar actividad de la mitofagia incluso, indican una acumulación de parkina y de autofagosomas en HGPS, en los lisosomas un decremento de LAMP2, así como en el número de los lisosomas, lo que sugieren, por primera vez, que el proceso de autofagia/ mitofagia se encuentran impedido en el HGPS, probablemente en el paso de la fusión entre el lisosoma y el autofagosoma. El tratamiento con LMB recupera parcialmente la función lisosomal y normaliza la cantidad de lisosomas, dando lugar a la eliminación de mitocondrias dañadas.

Abstract

Hutchinson-Gilford progeroid syndrome (HGPS) is characterized by causing accelerated and premature aging, with symptoms typical of natural aging. HGPS is caused by a point mutation in the LMNA gene that codes for the lamina A / C protein (C1824 → T), this change activates a cryptic splicing site that causes the elimination of 150 bp, which translates into loss of the ZMPSTE24 endoprotease cleavage site, so the mutant protein called progerin does not mature properly and remains farnesylated. Progerin causes multiple cellular alterations that ultimately trigger cellular senescence and aging at the organism level. Among these alterations is mitochondrial dysfunction. In our work group it was shown that nuclear protein export is increased by overexpression of CRM1 exportin. Treatment of fibroblasts from individuals with HGPS with leptomycin B (LMB), a specific inhibitor of CRM1, normalizes nuclear export and reduces various senescence marks. Given that mitochondrial dysfunction favors cellular senescence and that LMB treatment prior to the appearance of senescence marks, there was an interest in evaluating whether LMB treatment can alleviate mitochondrial dysfunction in HGPS. In this work, it was demonstrated that the pharmacological modulation of CRM1 with LMB recovers the mitochondrial morphology and function that is damaged in HGPS fibroblasts. The molecular mechanism underlying the therapeutic effect of LMB appears to lie at the two important levels of mitochondrial dynamics: biogenesis and mitophagy. In part the activation of mitochondrial biogenesis, a recovery of the expression of the transcription factor PGC1- α that occurs in response to treatment with LMB was demonstrated. While at the level of mitophagy, the analyzes show that the levels of the PINK1 and parkin proteins seem to indicate mitophagy activity, and even indicate an accumulation of parkin and autophagosomes in HGPS, in lysosomes a decrease in LAMP2, as well as in the number of lysosomes, which suggests, for the first time, that the autophagy/mitophagy process is impeded in HGPS, probably in the step of the fusion between the lysosome and the autophagosome. Treatment with LMB partially restores lysosomal function and normalizes the number of lysosomes, leading to the elimination of damaged mitochondria.

Introducción

Síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford

El síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford (HGPS), también conocido simplemente como progeria, es una enfermedad autosómica dominante que afecta al sector infantil. La incidencia es de 1 en 4 millones de nacimientos. Actualmente se tiene registro de 147 niños que padecen esta enfermedad en todo el mundo, aunque se cree que podría haber un total de 350-400 niños afectados. La esperanza de vida para los niños con HGPS es en promedio de 13 años, actualmente se ha aprobado un fármaco llamado Zokinvy (lonafarnib) un inhibidor de la enzima farnesil transferasa (Ahmed et al., 2018). Los pacientes presentan características propias de la vejez durante el desarrollo, en el primer año de vida comienzan a manifestar los siguientes signos clínicos: esclerodermia en piel, alteraciones craneofaciales como mandíbula retraída, puente nasal angosto, punta nasal angosta, alopecia, pérdida de grasa subcutánea (lipoatrofia), contracturas progresivas de las articulaciones, displasia ósea, uñas distróficas y retraso del nacimiento de los dientes primarios. En los años posteriores comienzan a observarse los signos tardíos, los cuales son: pérdida del oído conductivo, apilamiento de los dientes, lagrimado excesivo, queratitis por exposición, fenómeno de Raynaud (obstrucción de la circulación sanguínea en extremidades por espasmos causados por cambios de temperatura o emociones fuertes) y resistencia a la insulina sin signos visibles o desarrollo de diabetes mellitus. La mayor causa de muerte en estos pacientes es una falla cardiovascular y accidentes cerebrovasculares; estos últimos inician con endurecimiento vascular seguido por la oclusión de los vasos por la formación de placas arterioescleróticas. El HGPS es causada por una mutación en el gen LMNA que da origen a la proteína progerina (Ullrich and Gordon, 2015). Aunque el HGPS tiene un origen patológico, se le ha correlacionado con el envejecimiento normal (pérdida gradual de las funciones biológicas del individuo) (Ashapkin et al., 2019).

La lamina A/C y progerina

El gen LMNA se localiza en 1q22 y consta de 12 exones. Codifica para las proteínas lamina A y lamina C (principales productos), y lamina A Δ 10 y lamina C2 (productos minoritarios). Estas proteínas se localizan en núcleo y en conjunto con las láminas B1 y B2, forman una red en la cara interna de la membrana nuclear interna llamada lámina nuclear, que forma parte de la envoltura nuclear (Maraldi, 2018).

De manera normal la pre-lamina A debe pasar por una serie de modificaciones postraduccionales hasta llegar a la proteína lamina A madura (figura 1a). La pre-lamina A posee en su extremo carboxilo terminal una secuencia CaaX (un residuo de cisteína, 2 aminoácidos alifáticos y 1 residuo que podría ser cualquiera). En el primer paso llamado farnesilación, la enzima farnesil transferasa (FTasa) reconoce la secuencia CaaX de la pre-lamina A y agrega un grupo farnesil en el residuo de cisteína. Posteriormente, la pre-lamina A es procesada por la enzima RCE1 (enzima convertidora de Ras 1), que corta entre los residuos C farnesilado y el primer residuo a del motivo CaaX, que son los últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal. Enseguida, el extremo carboxilo terminal es metilado en el residuo C farnesilado por la enzima ICMT (isoprenil-cisteína carboxil metil-transferasa). Por último, la endoproteasa ZMPSTE24 (zinc metalopeptidasa STE24); corta a la pre-lamina A entre los aminoácidos Y y L de la secuencia de reconocimiento RSYLLG, produciendo un péptido farnesilado y a la lámina A madura (Wang and Casey, 2016).

La mutación en el gen *LMNA* que da origen al HGPS consiste en la transversión de citosina por timina (C1824→T). Esta mutación no cambia al aminoácido traducido (Gly608Gly), sin embargo, activa un sitio crítico de empalme del RNA, resultando en la eliminación de 150 pares de bases en el extremo 3' del exón número 11, que corresponden a 50 aminoácidos cerca del extremo carboxilo terminal. Dentro de estos 50 aminoácidos se encuentra el sitio de corte RSYLLG, que es reconocido por la enzima ZMPSTE24. En consecuencia, la pre-lamina A no

se corta y se produce una proteína pre-lamina A permanentemente farnesilada llamada progerina (figura 1b) (Ahmed et al., 2018).

Alteraciones celulares en HGPS

Debido a que la progerina permanece farnesilada, esta sigue anclada a la membrana nuclear. Esta farnesilación le otorga propiedades hidrofóbicas que le confiere la capacidad de secuestrar diversas proteínas y acumularlas en la envoltura nuclear, tal es el caso de los factores de transcripción NRF2 (factor nuclear derivado de eritroide 2) y PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación) (Serebryanny and Misteli, 2018). En consecuencia, se crean una serie de interacciones aberrantes en la lámina nuclear que causan anormalidades en la morfología nuclear.

Se ha reportado que en el HGPS se presenta estrés oxidativo y una presencia de proteínas oxidadas (Gabriela Viteri. *et al.* 2010). El secuestro de NRF2 en la envoltura nuclear por progerina provoca una pérdida en la actividad antioxidante de NRF2 (Nard Kubben. *et al.* 2016). Este aumento en estrés oxidativo vuelve más propensa a la célula a recibir daño al DNA por especies reactivas de oxígeno (ROS). Adicionalmente, en el HGPS se han reportado deficiencias en la reparación del daño al DNA (Gonzalo and Kreienkamp, 2015), debido en parte al secuestro de PCNA por progerina (Hilton et al., 2017). Además, se han reportado otras deficiencias en células de pacientes con HGPS tales como, pérdida de heterocromatina (Zhang et al., 2016), daño mitocondrial (Xiong et al., 2016), acortamiento telomérico (Benson et al., 2010) expansión nucleolar, aumento en la síntesis de proteínas (Buchwalter and Hetzer, 2017), entre otras alteraciones que desencadenan senescencia celular. Las marcas moleculares asociadas al HGPS también se presentan durante el envejecimiento fisiológico, de ahí el interés de estudiar a la enfermedad de HGPS como un modelo de envejecimiento acelerado.

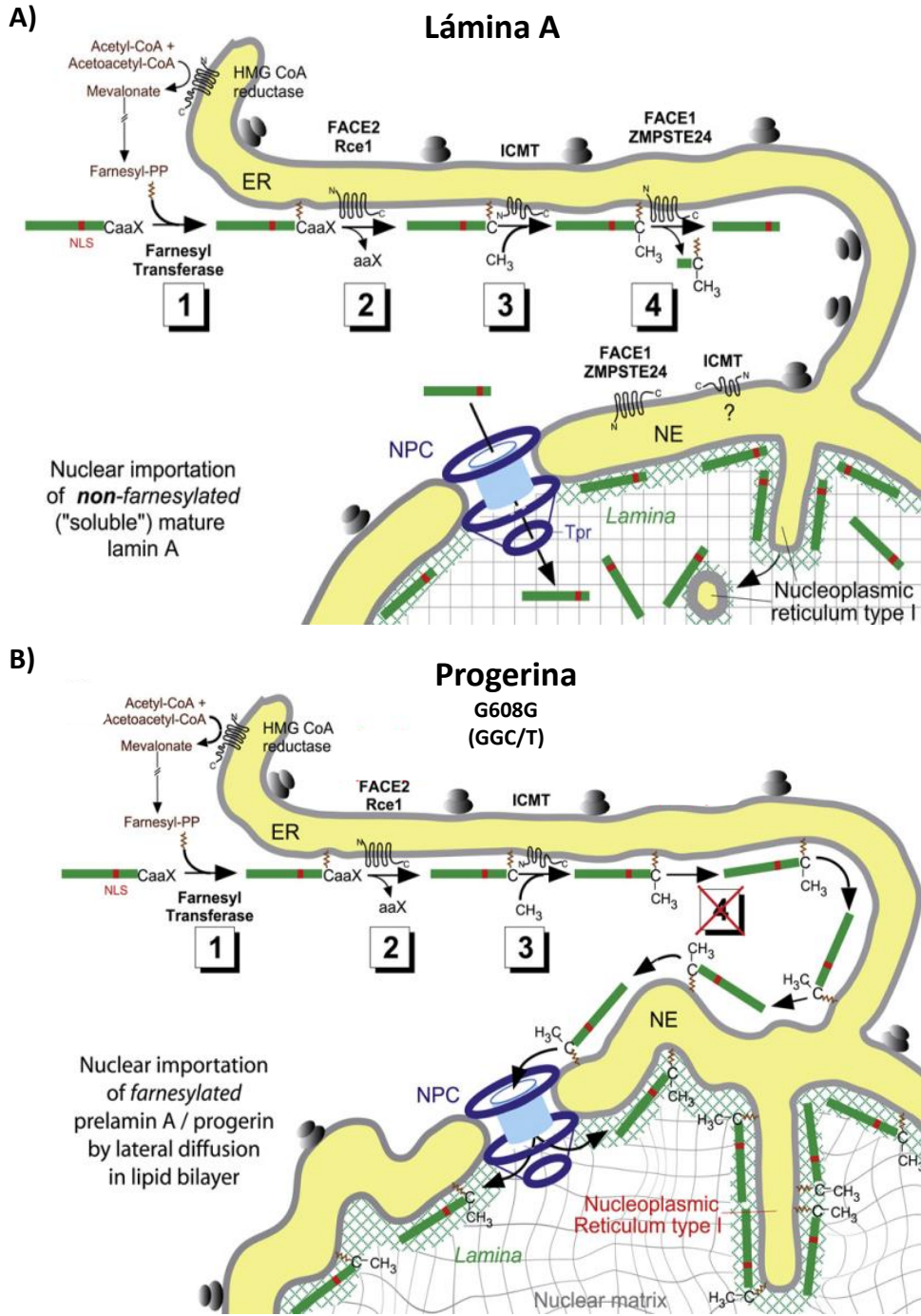


Figura 1. Procesamiento de la proteína pre-lamina A

En el panel A se muestran los pasos de maduración de la proteína pre-lamina A silvestre que da origen a la lámina A madura. En el panel B se muestran la generación de la proteína progerina a partir de la pre-lamina A que contiene la mutación G608G,

que causa HGPS (Cau et al., 2014).

Fun

En el HGPS se ha reportado una morfología mitocondrial fragmentada (encontrándose mitocondrias hinchadas) lo que sugiere una disfuncionalidad mitocondrial. Esta disfuncionalidad se traduce en una baja del potencial de membrana mitocondria ($\Delta\Psi_m$), disminución en la producción de ATP, baja capacidad de consumo de oxígeno. Esta alteración se correlaciona con la pérdida de proteínas que forman parte de los complejos del sistema de transporte de electrones mitocondrial, tales como, la subunidad 1 del citocromo c oxidasa (componente del complejo IV), el citocromo c y la proteína β -ATPasa (componente del complejo V) (Rivera-Torres et al., 2013; Sieprath et al., 2015) . Así mismo, el nivel de PGC1- α , una proteína relevante para la correcta integridad mitocondrial, esta disminuido en el HGPS (Xiong et al., 2016).

Dinámica mitocondrial: del nacimiento a la eliminación.

Para un buen funcionamiento mitocondrial debe existir un equilibrio entre dos procesos muy importantes: biogénesis mitocondrial y mitofagia. Esto permite un recambio de aquellas mitocondrias dañadas por mitocondrias nuevas y funcionales, de esta manera se mantiene la integridad mitocondrial de la célula. El proceso de biogénesis mitocondrial es dirigido por PGC1- α (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011), que actúa como activador de la transcripción de genes relacionados con la función y morfología mitocondrial, como: NRF2; proteína de respuesta al estrés oxidativo, NRF1 (factor nuclear derivado de eritroide 1), TFAM (factor de transcripción mitocondrial A); proteínas para el mantenimiento de la integridad del DNA mitocondrial y transcripción de genes mitocondriales, MFN 1 y 2 (mitofusina 1 y 2), OPA1 (proteínas atrofia óptica 1); promotores de la fusión mitocondrial, FIS1 (fisión mitocondrial 1), DRP1 (dinamina relacionada con la dinamina 1); promotores de la fisión mitocondrial (Li et al., 2017).

Por lo general las mitocondrias se encuentran organizadas en una compleja red distribuida en toda la célula que va alternando entre una estructura ramificada y

otra fragmentada (fig. 2). Las mitocondrias que se encuentran ramificadas tienen alta capacidad energética y una baja producción de ROS. Tienen una morfología alargada (como hilos) y poseen movilidad, esto les permite fusionarse y fisionarse con otras mitocondrias constantemente. El proceso de fusión es mediado por las proteínas OPA1 y MFN 1 y 2. El proceso de fisión es dirigido por la proteína DRP1 y por la proteína Fis1. Por otro lado, las mitocondrias disfuncionales ($\Delta\Psi_m$ despolarizado) son separadas de las estructuras ramificadas mediante fisión mitocondrial, la morfología de estas mitocondrias es circular y no tienen movilidad, algunas podrían incluso estar hinchadas, lo que significa que su permeabilidad está comprometida, debido al establecimiento del poro de transición mitocondrial (MTPT). Posteriormente estas mitocondrias despolarizadas son eliminadas mediante el proceso de mitofagia. (Ashrafi and Schwarz, 2013; Picard et al., 2013).

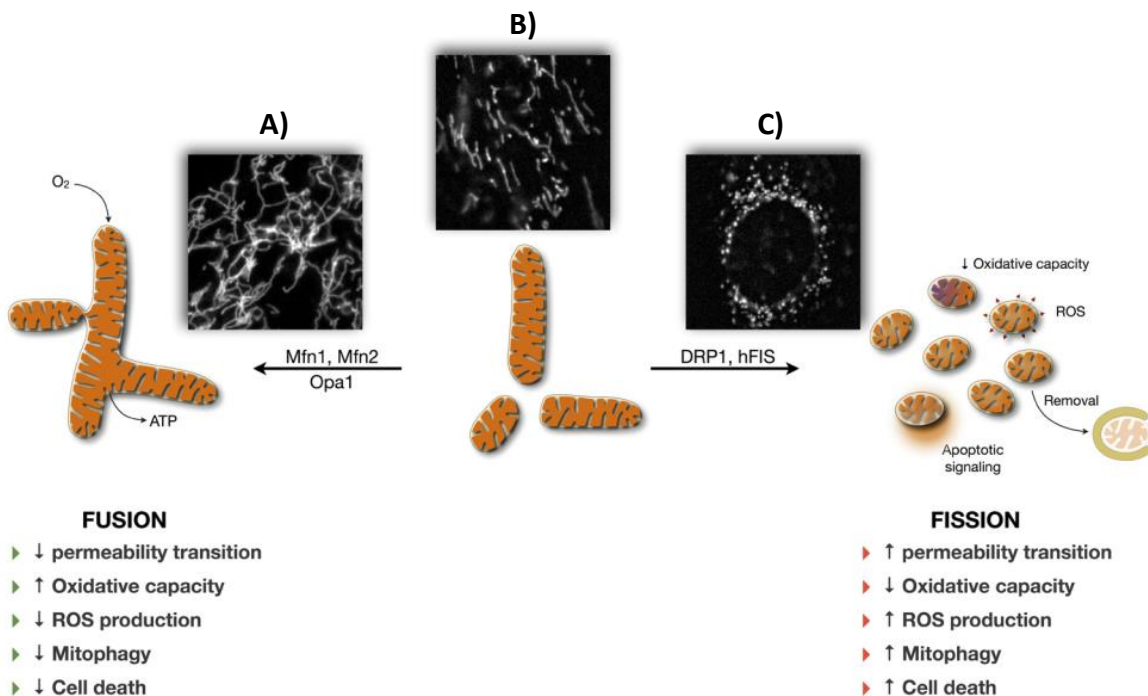


Figura 2. Dinámica mitocondrial.

La mitocondria es un organelo dinámico que cambia constantemente de morfología: A) ramificada, B) intermedia y C) fragmentada (Picard et al., 2013).

La mitofagia es el mecanismo especializado de autofagia por el cual las mitocondrias dañadas son engullidas en autofagosomas, que posteriormente se fusionan con lisosomas para promover su degradación. Esto evita que la mitocondria siga causando daño dentro de la célula a través de la generación de ROS. La mitofagia es iniciada por la despolarización de la mitocondria, que permite que la proteína PINK1 (una serina/treonina cinasa inducida por PTEN) deje de ser importada a la mitocondria para su degradación, en consecuencia, PINK1 se estabiliza en la membrana externa de la mitocondria (fig. 3A). Posteriormente PINK1 fosforila a MFN1, esto favorece que Parkina se una a la membrana mitocondrial externa, donde de igual manera, PINK1 activa a Parkina mediante la fosforilación de la ubiquitina de Parkina. Parkina es una ubiquitina ligasa E3 que ubiquitina a las proteínas de la membrana mitocondrial externa. De esta manera la mitocondria es marcada para su degradación. Parkina se une indirectamente a LC3-II a través de la proteína receptora p62 (fig. 3B) (Ashrafi and Schwarz, 2013; Shi et al., 2018).

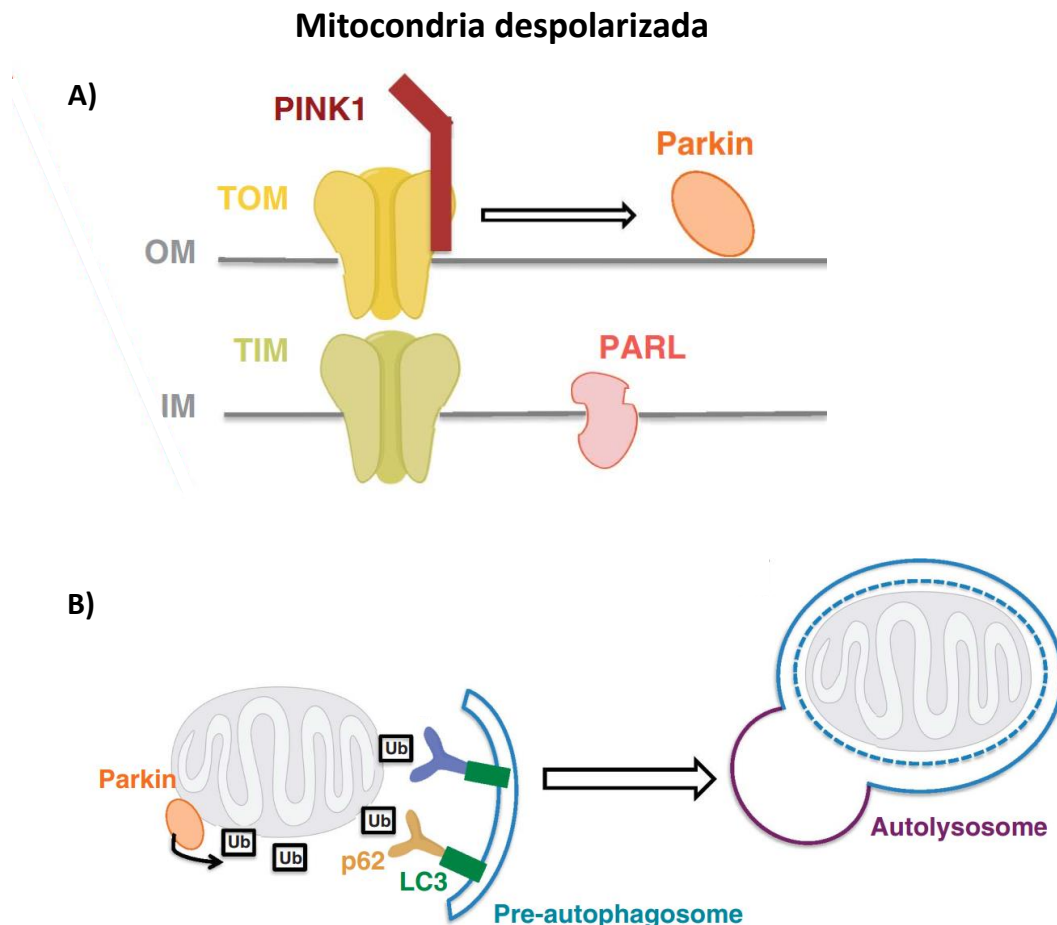


Figura 3. Mitofagia.

A) PINK1 se estabiliza en la membrana mitocondrial externa (OM) y fosforila a Parkina, activando su función como ubiquitina ligasa E3. B) una vez que Parkina está activa, ubiquitina a las proteínas de la OM, lo que permite que el receptor de autofagia p62 y LC3-II se una a las proteínas ubiquitinadas. Esto permite que el pre-autofagosoma madure. Posteriormente el autofagosoma se une con un lisosoma para formar el autolisosoma (Ashrafi and Schwarz, 2013).

Así, como la mitocondria es preparada para su eliminación, el proceso de autofagia debe iniciarse de manera paralela. Esto ocurre de la siguiente manera (fig 4): mediante señales de estrés o ausencia de nutrientes, la quinasa monofosfato de adenosina (AMPK; un sensor bioenergético) inhibe al complejo diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), lo que activa al complejo ULK1, que normalmente esta inhibido por mTOR. Posteriormente, el complejo ULK1 es transportado a regiones lipídicas del retículo endoplasmático o a membranas endosomales. En este lugar, tanto el complejo ULK1 como AMPK fosforilan a Beclina 1. Estas fosforilaciones evitan que inhibidores de la autofagia se unan y en su lugar se conforma el complejo fosfatidil-3-inositol quinasa clase tres (complejo PI3K clase III), conformado por VPS34, VPS15, ATG14L y Beclina 1. Este complejo tiene la función de fosfatidil-3-inositol quinasa, de esta forma prepara a la membrana para que el complejo WIPI se una. La función del complejo WIPI es permitir el arribo de proteínas asociadas a la autofagia (proteínas ATG). El propósito de los pasos mencionados hasta ahora es establecer las condiciones para que la proteína LC3 (ATG8) se una a la porción hidrofílica del fosfolípido de membrana fosfatidiletanolamina (PE). Y esto sucede como se describe a continuación: pro-LC3 es escindida por ATG4, produciendo LC3-I. Después, ATG7, ATG3 y ATG5-12-16, actúan de manera coordinada para unir a LC3-I a PE, dando como resultado a LC3-II. Mientras esto sucede ATG9, que tiene porciones de membrana se encarga de alargar la formación del autofagosoma naciente (fagóforo). Mientras tanto y antes de que el fagóforo cierre, diversos adaptadores como p62 junto con cargos específicos comienzan a ser secuestrados por el fagóforo, estos interactúan de manera directa o indirecta con LC3-II, de tal modo que LC3-II tiene la función de receptor para la autofagia (Metaxakis et al., 2018b).

Una vez que se forma el complejo LC3-II con p62 y Parkina (pre autofagosoma), LC3-II favorece la elongación y el cierre de la membrana para formar el autofagosoma. Finalmente, para que el contenido del autofagosoma sea digerido, tiene que unirse con un lisosoma, este paso es crucial y depende de la unión entre el Receptor de proteína de unión NSF (SNARE) y el complejo de clasificación de proteínas y fusión homotípica de andamiaje (HOPS), para que el contenido se degrade eficientemente, se tiene que acidificar el interior del ahora llamado auto lisosoma, esto permitirá que las proteasas lisosomales se activen (Ashrafi and Schwarz, 2013; Metaxakis et al., 2018b). En el HGPS poco se sabe del proceso de autofagia, no se ha estudiado el mecanismo a detalle, lo que se sabe es que la autofagia podría estar impedida, esto debido a que el uso de diferentes fármacos que inducen autofagia, provocan una disminución de progerina y de las marcas celulares asociadas a la senescencia (Chiarini et al., 2019; Harhour et al., 2017). Incluso se ha observado que la autofagia está aumentada en un ratón progeroide carente de la enzima ZMPSTE24, utilizando marcadores tempranos de la autofagia como mTOR, p62 y LC3 (Mariño et al., 2010; Mariño et al., 2008).

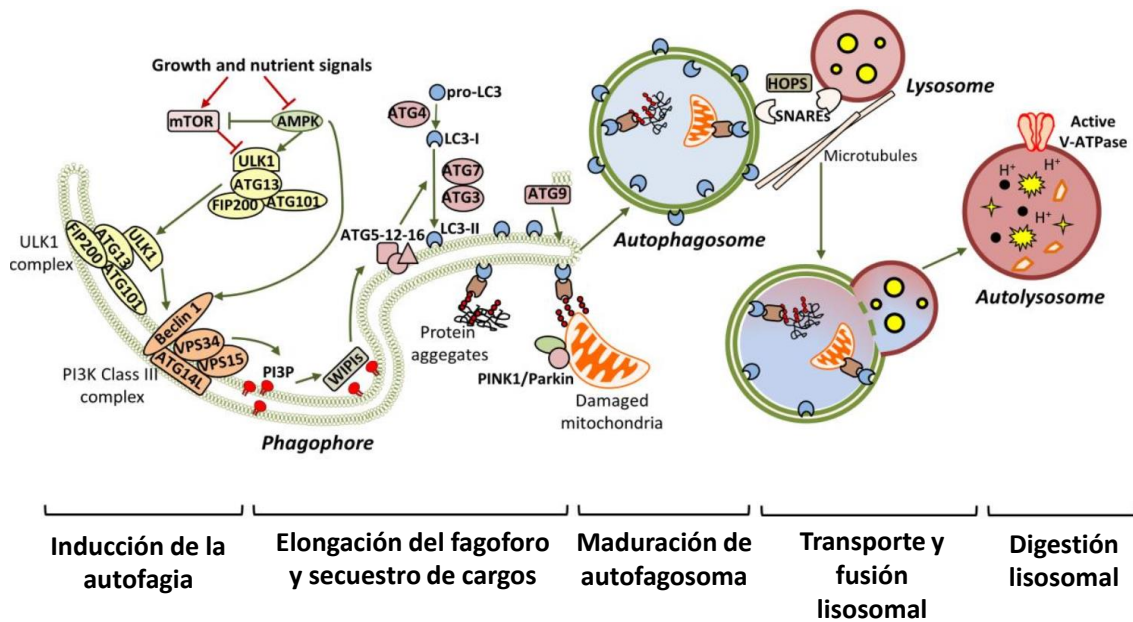


Figura 4. Autofagia.

El proceso de autofagia puede ser resumido en 5 pasos: inducción de la autofagia, elongación del fagoforo y secuestro de cargos, maduración del autofagosoma, transporte y fusión lisosomal, y por último, la digestión de los cargos. Modificado de (Metaxakis et al., 2018b).

Actualmente hay muchos trabajos que señalan al factor de transcripción EB (TFEB) como un regulador maestro en el proceso de autofagia, esto porque activa a genes relacionados con la autofagia y los lisosomas (Settembre et al., 2011). La ausencia en núcleo del TFEB (donde ejerce su función) está relacionada con la enfermedad de Parkinson (Metaxakis et al., 2018a).

Tráfico nuclear en HGPS

De manera normal existen proteínas que están entrando y saliendo del núcleo a través de la envoltura nuclear, cuando se trata de proteínas o moléculas pequeñas lo pueden hacer pasivamente difundiéndose por la membrana o cruzado de manera pasiva el poro nuclear, sin embargo, cuando se trata de moléculas (o complejo de moléculas) de tamaño superior a los 60 kilo dáltones (kDa), se necesitan mediadores. Estos mediadores son un grupo de proteínas llamadas carioferinas. Las carioferinas se dividen en dos grandes grupos, importinas y exportinas. Las importinas son las que se encargan de transportar proteínas cargo del citoplasma hacia el núcleo, lo hacen reconociendo a sus cargos mediante una secuencia de localización nuclear (NLS), la cual puede ser monopartita con un centro de aminoácidos con carga positiva (XXPKKKRKVXXXX, donde X puede ser cualquier aminoácido) o bipartita, con dos centros de aminoácidos con carga positiva (XXKRXXXXXXXXXXKKKXX). Las exportinas transportan cargos del núcleo hacia el citoplasma, de manera similar reconocen una secuencia de exportación nuclear con un centro intercalado de aminoácidos hidrofóbicos (LXXXLXXLXL). Esta entrada y salida de biomoléculas es impulsada y guiada por el gradiente bioenergético de la proteína nuclear relacionada a Ras unida a guanina trifosfato o difosfato (RanGTP/RanGDP).

El intercambio de biomoléculas entre el núcleo y citoplasma ocurre de la siguiente manera (fig. 5): cuando una proteína tiene su NLS expuesta una importina (por ejemplo: Kap β 2) la reconoce y se une, posteriormente al complejo se une RanGDP, este complejo ternario entra al núcleo, donde se une el factor de intercambio de Ran-guaninas (Ran-GEF) que cambia RanGDP por RanGTP, esta variación provoca el desensamble del complejo ternario y el cargo es liberado. Posteriormente, el RanGDP liberado es usado en el proceso de exportación nuclear. Cuando una proteína expone su NES se une una exportina, la más común es la proteína de mantenimiento cromosómico 1 (CRM1). Al unirse se induce la formación de otro complejo ternario formado por la proteína cargo, CRM1 y RanGTP, el complejo es exportado y se libera la proteína cargo por efecto de la autohidrólisis de RanGTP a RanGDP inducida por RanGAP en el citoplasma. Posteriormente RanGDP puede ser disociada en Ran y GDP o reutilizada en el proceso de importación nuclear (por efecto de otro regulador: p10/NTF2), cerrándose así el ciclo y manteniéndose el gradiente RanGDP/RanGTP activo (Ding and Sepehrmanesh, 2021). Por otra parte CRM1 es importado al núcleo de manera independiente a Ran, uniéndose a la proteína del poro nuclear Nup88 (El-Tanani et al., 2016). Para estudiar el proceso de exportación nuclear se utiliza de manera regular el inhibidor

de CRM1, leptomicina B. Este fármaco se une de manera covalente en la cisteína 529 de CRM1 (Horiuchi et al., 1999).

Importación Exportación

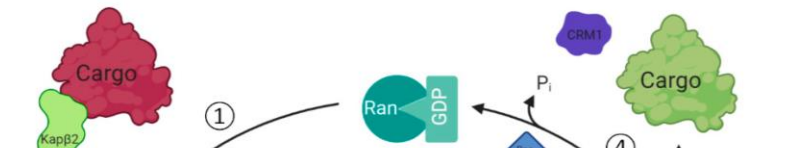
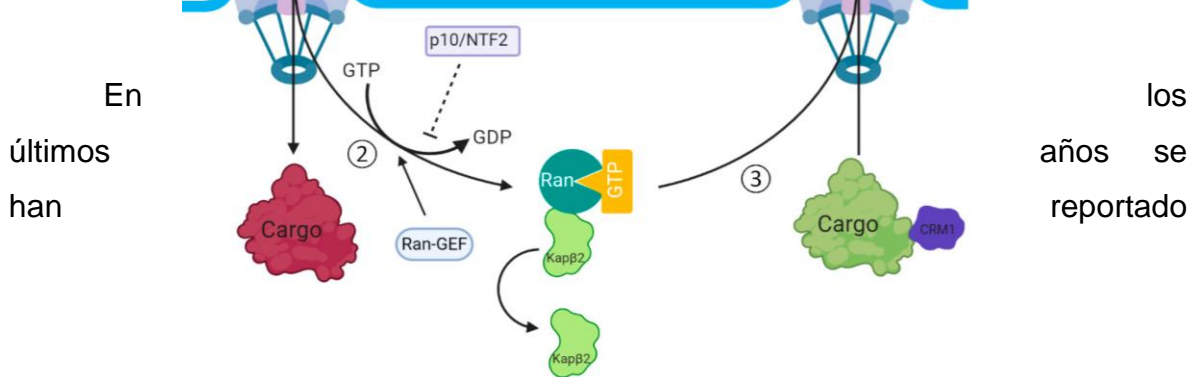


Figura 5. Ciclo de importación y exportación núcleo-citoplasma.

1) Importación del complejo ternario conformado por el cargo, RanGDP y la importina. 2) Liberación del cargo por el intercambio del RanGDP por RanGTP por la acción de Ran-GEF. 3) formación del complejo ternario para la exportación comprendido por el cargo, RanGTP y la exportina. 4) liberación del cargo por efecto de la autohidrólisis de RanGTP inducida por RanGAP (Ding and Sepehrimanesh, 2021).



alteraciones del transporte núcleo-citoplasma en el HGPS, a nivel del gradiente de RanGDP/RanGTP (Datta et al., 2014; Kelley et al., 2011; Snow et al., 2013). Interesantemente, se ha reportado que la vía de importación no clásica mediada por Transportina-1 (TNPO1) está desregulada, debido a una unión aberrante de esta proteína a los microtúbulos, afectando a otras proteínas como: NUP153 hnRNPA1, TPR y Ran nuclear. Esta unión aberrante es debida a una hiperacetilación de los

microtúbulos por la enzima acetiltransferasa NAT10. La inhibición de NAT10 mediante remodelina, libera a TNPO1 y reestablece su función en HGPS, lo que consecuentemente restablece la reorganización de la cromatina y la transcripción génica global, evitando así la entrada prematura de las células a senescencia (Wilson, 2018).

Antecedentes

En nuestro grupo de trabajo se demostró que CRM1 se encuentra sobre expresada en el HGPS, tanto a nivel de mensajero, como de proteína. Esta alteración causa una exportación exacerbada de proteínas con NES del núcleo hacia el citoplasma. Esta sobre actividad de CRM1 fue contrarrestada con el inhibidor LMB. Así mismo, se demostró que la sobre-expresión de CRM1 es consecuencia de la presencia de progerina (García-Aguirre et al., 2019). De hecho, existen cientos de proteínas cuya localización nuclear está regulada por CRM1, que participan en varios mecanismos celulares (Xu et al., 2012).

En nuestro grupo de trabajo surgió el interés de evaluar si los distintos fenotipos celulares asociados con el HGPS (Buchwalter and Hetzer, 2017; Cau et al., 2014; Tiku and Antebi, 2018) pueden ser atenuados con el tratamiento con LMB. De manera interesante se observó el rescate de las siguientes marcas de senescencia celular: expansión nucleolar, morfología celular senescente, pérdida de lámina B1, pérdida de heterocromatina, la morfología nuclear aberrante y arresto celular (Tabla 1) (García-Aguirre et al., 2019). Esto sugiere que la regulación de la exportación nuclear retrasa la senescencia celular en el HGPS, lo que abre la interrogante de analizar si la disfunción mitocondrial puede también ser reparada.

Estudiar la funcionalidad mitocondrial es de suma importancia pues se ha establecido una correlación entre la inducción de estrés mitocondrial y la senescencia (Manzella et al., 2018), es decir, la acumulación de mitocondrias dañadas puede inducir senescencia (Shi et al., 2018). De acuerdo con esta aseveración, la inducción de la mitofagia es suficiente para aliviar las marcas de la senescencia (Rana et al., 2013; Silvestrini et al., 2018). A este respecto se ha reportado que TFEB es una proteína clave en el proceso de autofagia/mitofagia. TFEB presenta una NES dependiente de CRM1 (Li et al., 2018) y su expresión se regula positivamente por PGC1- α (Tsunemi et al., 2012).

Tabla 1. Alivio del fenotipo senescente en fibroblastos con HGPS tratados con LMB

Así mismo, se ha relacionado la acumulación nuclear de HLH-30, proteína ortóloga de TFEB en *C. elegans*, con un aumento en la longevidad de estos nematodos (Silvestrini et al., 2018), lo que implica que la actividad transcripcional de HLH-30 promueve la autofagia y finalmente impacta en la longevidad.

Por otro lado, se ha demostrado que la recuperación de la expresión de PGC1- α es suficiente para recuperar la función mitocondrial y con ello aliviar ciertas marcas de senescencia en el HGPS (Xiong et al., 2016). Dado que la transcripción de PGC1- α es promovida por 2 proteínas que responden al tratamiento con el inhibidor de la exportación nuclear LMB (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011): ATF-2 (Liu et al., 2006) y FOXO1 (Gerst et al., 2015), sería interesante evaluar los niveles de PGC1- α después del tratamiento de fibroblastos de individuos con HGPS con este fármaco.

Fenotipo asociado a HGPS	¿Hubo a alivio tras el tratamiento con LMB?
Morfología nuclear aberrante	Sí
Expansión nucleolar	Sí
Perdida de lámina B1	Sí
Arresto celular	Sí
Perdida de heterocromatina	Sí
β -galactosidasa positivo	Sí
Morfología celular senescente	Sí

Justificación

El estudio del HGPS ha cobrado relevancia en los últimos años, y diversas terapias para tratar esta patología han sido propuestas, utilizando fármacos, terapia génica e incluso dietas (Lai and Wong, 2020). Con base a los descubrimientos de nuestro grupo de trabajo (García-Aguirre et al., 2019), surge la idea de que la desregulación de la exportación nuclear es un mecanismo que conduce a la senescencia. Por lo que el uso de inhibidores de la exportación nuclear que normalizan la actividad de CRM1 y que consecuentemente alivian diferentes marcas de senescencia celular representa una alternativa terapéutica prometedora. En este escenario, es importante definir si la modulación farmacológica de CRM1 con LMB rescata la función mitocondrial en el HGPS.

Hipótesis

El tratamiento con el inhibidor de la exportación nuclear LMB mejorará la función mitocondrial de fibroblastos provenientes de individuos con progeria.

Objetivos

Objetivo general

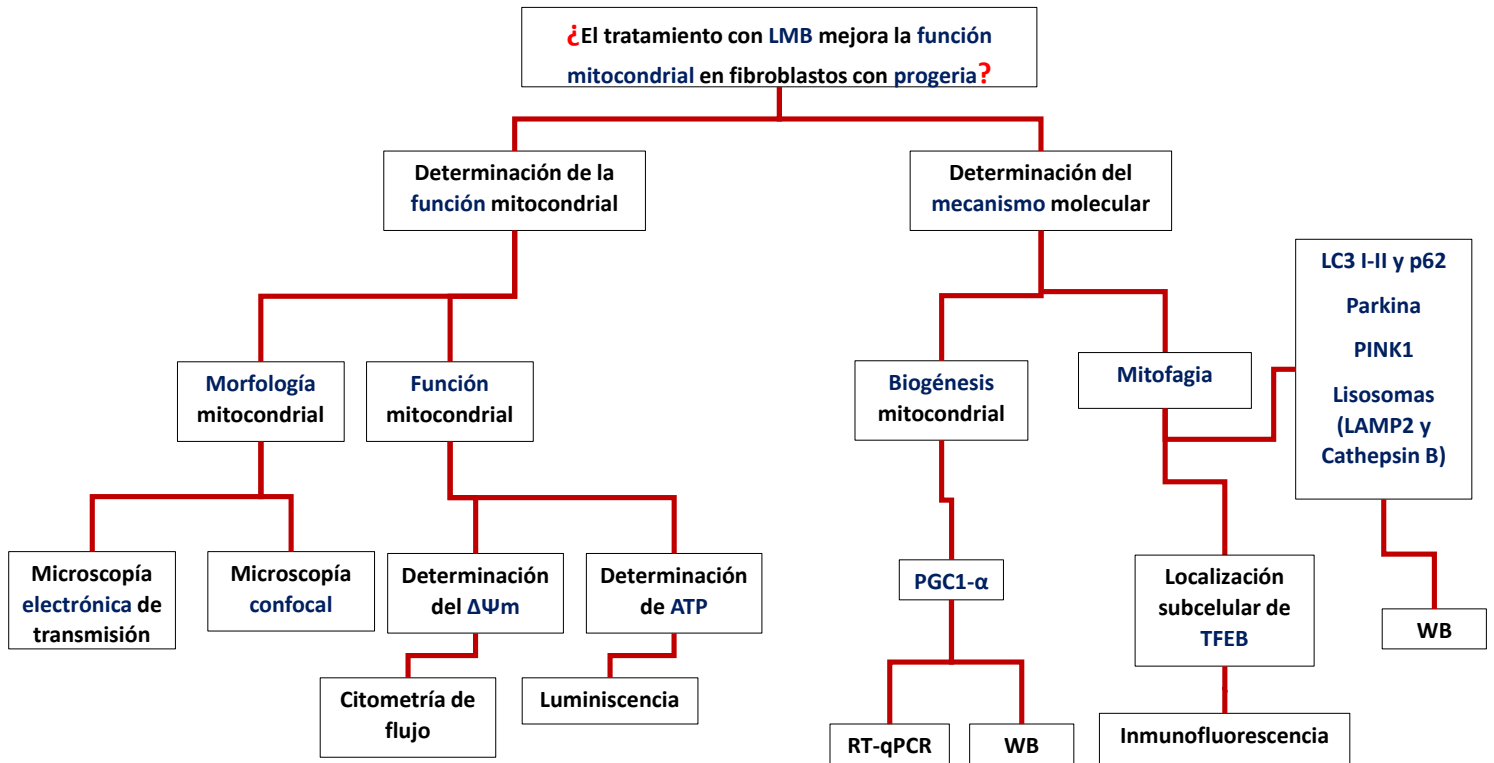
Determinar si la inhibición farmacológica de CRM1 con LMB recupera la función mitocondrial de los fibroblastos provenientes de individuos con HGPS.

Objetivos particulares

- A) Evaluar los parámetros de funcionalidad mitocondrial (morfología mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial, niveles de ATP y producción de ROS) en cultivos de fibroblastos provenientes de individuos con HGPS tratados con el inhibidor de CRM1, LMB:

- B) Determinar el mecanismo por el cual se recupera la función mitocondrial después del tratamiento con LMB:
 - a. Biogénesis mitocondrial
 - b. Mitofagia

Estrategia experimental



Materiales y métodos

Cultivo Celular.

Los cultivos primarios de fibroblastos de piel provenientes de una persona normal a (AG08469, 38 años de edad) y de 2 individuos con HGPS: HGPS-1 (AG11513, 8 años de edad) y HGPS-2 (AG11498, 14 años de edad) (Coriell Cell Repository, Camden NJ) se propagarán en medio MEM suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales, 10% (0.1% cuando se sincronizó el cultivo) de suero fetal bovino inactivado por calor y 50 U/ml de penicilina y estreptomicina, a una temperatura de 37°C y una atmosfera saturada con agua, con 5% de CO₂. Según se indique, los cultivos de fibroblastos primarios fueron tratados con leptomicina B (LMB; Sigma-Aldrich) diluida en el vehículo (etanol al 70%) o con cloroquina diluida en PBS. Los cultivos controles se tratarán con el vehículo solamente.

Inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal.

Las células se lavarán con PBS, se fijarán y permeabilizarán incubándolas durante 10 minutos en una solución al 4% de para-formaldehído. Enseguida, se bloquearán por 10 minutos con suero-BSA al 5-3% respectivamente y se lavarán con PBS. Se agregará el anticuerpo primario apropiado y se incubará toda la noche a 4°C. Después se harán 2 lavados con PBS y se adicionará el anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína o Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) y se incubará 1 o 2 horas a temperatura ambiente. Se procederá con la tinción incubando las células durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente. A final, las células se lavarán con PBS y se incubarán durante una hora a temperatura ambiente con el segundo y tercer anticuerpo secundario. Enseguida, las preparaciones se lavarán con PBS, se incubarán con 1mg/ml de

DAPI (49,6-diamidino-2-phenylindole) por 10 minutos para teñir los núcleos y se montarán sobre portaobjetos con VectaShield (Vector Laboratories, INC), para su posterior observación en un microscopio de epi-fluorescencia acoplado al sistema de láser confocal, TCS-SP2, Leica (Heidelberg, Alemania), usando un objetivo de inmersión Plan Neo Fluor 63x (NA = 1.4). La toma de imágenes se llevó a cabo con el programa Leica LAS AF Lite, y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia y los análisis morfométricos se llevará a cabo con el programa ImageJ versión 1.46j.BIORAD MRC 600. Los anticuerpos primarios usados fueron: anti-TFEB (santa cruz, sc-166736, monoclonal) 1:50, anti-LC3 (MBL, PD014, policlonal) 1:100.

Tinción de células *in vivo con colorantes vitales*

Los fibroblastos WT, HGPS-1 y HAGPS-2, fueron cultivados en cajas p35 con fondo de cristal, posteriormente, según se indique, se sincronizaron y trataron con LMB. Cuando terminó el tratamiento se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con PBS. En seguida, se agregó medio nuevo con suero al 10% y con *Lysotracker DND-99* y/o *Mitotracker Green FM*, a una concentración de 50 nM y 100 nM respectivamente y las preparaciones se incubaron por 20 minutos, durante los últimos 10 minutos se agregó el colorante Hoechst a una concentración de 1 µgr/ml, a una temperatura de 37°C y una atmosfera saturada con agua, con 5% de CO₂. Finalmente se retiró el medio con el colorante, se realizaron 2 lavados con PBS y se agregó medio con suero al 10% nuevo. Se montó la caja con las células teñidas en una cámara húmeda con 5% de CO₂ adaptada al microscopio confocal antes mencionado. Se incubaron las células en la cámara húmeda por 5 minutos y se comenzaron a tomar las imágenes. La toma de las imágenes y su procesamiento se llevó a cabo como se mencionó previamente.

Determinación de los niveles de ATP.

Los niveles de ATP se determinaron usando el kit de Luminescent ATP Detection Assay Kit (ab113849). Se sembraron los cultivos de fibroblastos WT y HGPS en cajas p35, se dejaron a una confluencia del 80-90%, posteriormente fueron tratadas con LMB o con el vehículo solamente por 3 días. Al final fueron cosechadas con tripsina y se contaron 10,000 células por pozo en una caja de 96 pozos. Posteriormente se lisaron y se les agregó los reactivos de quimioluminiscencia, de acuerdo con el manual del fabricante. Finalmente se realizaron las cuantificaciones de luminiscencia en un iluminómetro.

Microscopía electrónica de transmisión.

Los fibroblastos se trataron con 1 nM de LMB o con el vehículo solamente por 3 días. Posteriormente se retiró el medio y se realizarán 2 lavados con PBS. Las células se fijaron con glutaraldehído al 3.5% por 30 minutos, enseguida se cosecharon y se centrifugaron a 1200 RPM por 5 minutos. Se continuó con la fijación por 1 hora adicional y se centrifugaron nuevamente. Las pastillas celulares se lavaron 3 veces con PBS y las células se tiñeron con acetato de uranilo por 1 hora. Enseguida se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con tetra óxido de osmio al 1% por 30 minutos a temperatura ambiente, y se incubaron una hora en hielo. Posteriormente, las preparaciones se lavaron 3 veces con agitación en PBS y se prosiguió con la deshidratación: Las preparaciones se incubaron por 15 minutos secuencialmente con etanol al 50%, 60%, 70%, 80% y 90% y tres veces con etanol al 100%. Se procedió a embeber las muestras con resina, incubándolas 2 horas en agitación en una solución 1:1 de etanol al 100% y resina. Seguido de una incubación por 2 horas en una solución 1:3 de etanol y resina, y finalmente incubando las muestras 2 veces por 2 horas con resina al 100%. Para concluir el procedimiento, las muestras se colocaron en el molde la preparación se etiquetaron y se polimerizaron por 2 días a 70°C. Se obtuvieron secciones ultra-finas de los bloques utilizando un ultra micrótomo Reichert Jung, y se montaron en rejillas de cobre. Las

placas se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión en el microscopio JEM 1400 (JEOL, Ltd., Japan).

Citometría de flujo.

Los fibroblastos WT, HGPS-1 y HGPS-2 se cultivaron y se trataron con LMB o con el vehículo solamente (ver Métodos). Posteriormente las células se cosecharon usando tripsina diluida con PBS 1:2. Después, se lavaron con PBS y se contaron 300,000 células para su posterior tinción. Para determinar el perfil de ciclo celular, las células se tiñeron con Hoechst (3 µg/ml; longitud de onda de excitación 361, emisión 497) y se incubaron por 50 minutos a una temperatura de 37°C en una atmosfera saturada con agua y con 5% de CO₂. Para determinar la masa mitocondrial, las células se tiñeron con *Mitotracker Green FM* (longitud de onda de excitación 579, emisión 599) a una concentración de 100 nM y se incubaron por 20 minutos como se mencionó anteriormente. Para determinar el $\Delta\Psi_m$, las células se tiñeron con el colorante que se une de manera dependiente al potencial de membrana mitocondrial *MitoTracker Red CMXRos* (longitud de onda de excitación 490, emisión 516) a una concentración de 10 nM y se incubaron 20 minutos como se describió previamente. Finalmente, las células se centrifugaron y se colocaron en medio fresco con el colorante correspondiente. Las células se transportaron en hielo para ser analizadas en el citómetro de flujo citoflex. Se procedió con la lectura y se tomaron 10,000 eventos por repetición.

Western blot.

Los extractos de proteínas se analizaron en geles de acrilamida al 10%, 12% y 15% con SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales se bloquearon con la solución amortiguadora TBS-T y 5% de leche baja en grasas. Enseguida, las membranas se incubarán con el anticuerpo primario apropiado y después de lavarse se les agregó el anticuerpo secundario. La señal se reveló con el sistema de ECL

(Amersham) sobre placas de rayos X. La cuantificación de los niveles de las proteínas de interés se llevó a cabo mediante análisis de densitometría de las placas de rayos X, utilizando un sistema de captura de imágenes (Bio-Rad Laboratories). Los valores de la proteína de interés se estandarizaron con los valores de la proteína de control de carga (actina). Los anticuerpos usados fueron los siguientes: anti-TOM20 (Santa cruz, sc-17764, monoclonal; 1:300), anti-PGC1- α (Termo Fisher, PA572948, policlonal; 1:500), anti-LC3 (MBL, PD014, policlonal; 1:500), anti-LAMP2 (Sigma, L0668, policlonal; 1:2000), anti-catepsina B (Termo Fisher, PA5-47975, policlonal de ratón; 1:2000), anti-p62 (Cell signaling, 5114, policlonal; 1:2000), anti-PINK1 (Santa cruz, 38CT20.8.5, monoclonal; 1:300), anti-parkina (Santa cruz, sc-32282, monoclonal; 1:300).

Extracción de RNA total.

El RNA total se aisló de los cultivos de fibroblastos primarios mediante el uso del reactivo comercial TRIzol Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) y del kit de extracción de RNA Direc-zol RNA MiniPrep (Zymo Research), siguiendo las indicaciones del fabricante. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific, Inc.). La integridad del RNA se verificó mediante su corrimiento en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Finalmente, las muestras se almacenaron a -70°C hasta el momento de su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR tiempo real).

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo utilizando el kit KAP SYBR FAST *one step*, utilizando 100 ng de RNA por reacción y 100 nM de cada oligonucleótido, y el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La expresión del RNA mensajero de PGC1- α se cuantificó y se normalizó con respecto a actina (control interno). Las secuencias de los oligonucleótidos que se emplearon fueron las siguientes: PGC1- α forward 5'- ATCCTCTTCAAGATCCTGCT -3', reverse 5'-GACTCTCGCTTCTCATACTCTC-3'; actina forward 5'-CAGACAGCGAAAGGATGAG-3', reverse 5'-CAGACAGCGAAAGGATGAG-3'.

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 DE (desviación 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 ANOVA los datos se representaron como 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).

Resultados y discusión.

La modulación farmacológica de CMR1 mediante tratamiento con LMB restablece la función mitocondrial

Como un primer paso para analizar si la modulación farmacológica de la actividad de CRM1, mediante tratamiento con LMB, restablece la función mitocondrial en los fibroblastos de individuos con HGPS, decidimos evaluar inicialmente la morfología mitocondrial de los cultivos WT, HGPS-1 Y HGPS-2, tratados con LMB o con el vehículo solamente (control). Los fibroblastos WT se sincronizaron en la fase G0/G1 previo al tratamiento con LMB, (Fig. 6), debido a que en esta fase del ciclo celular las mitocondrias muestran su morfología típica ramificada (Antico Arciuch et al., 2012). La morfología mitocondrial se observó usando el colorante vital *Mitotracker Green FM*, el cual tiñe las mitocondrias de manera independiente al potencial de membrana mitocondrial.

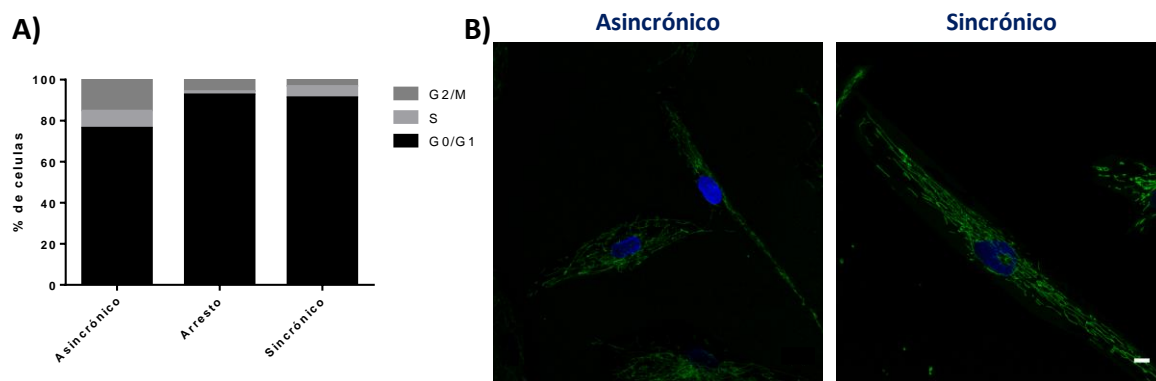


Figura 6. Análisis de la morfología mitocondrial en cultivos sincronizados de fibroblastos WT

A) los fibroblastos WT se cultivados en medio suplementado con 10% de suero (cultivo asincrónico), o con 0.1% de suero por 24 horas (arresto del ciclo celular). Posterior al tratamiento de arresto celular, los cultivos se incubaron en medio con 10% de suero por 24 horas (condiciones de un cultivo sincrónico). Posteriormente las células se cosecharon, se tiñeron con Hoechst y se analizaron mediante citometría de flujo (10,000 eventos) para obtener el perfil de ciclo celular. B) Las mitocondrias se tiñeron con el colorante vital *Mitotracker Green FM* y se observaron en un microscopio confocal. Las imágenes corresponden a proyecciones máximas. La barra de la escala corresponde a 10 μ m.

Tras el arresto celular utilizando medio con 0.1% de suero, se obtuvo un 92.5% de células en la fase G0/G1, mientras que en el cultivo sincrónico se obtuvo

un 91.1% de células en la fase G0/G1, respecto al cultivo asincrónico que presenta un 76.2% de células en la fase G0/G1 (fig. 6A). Posteriormente se analizó la morfología de las mitocondrias del cultivo sincronizado en la fase G0/G1 y del cultivo asincrónico. Se observaron mitocondrias más alargadas y ramificadas en los cultivos sincronizados, con respecto al cultivo asincrónico (Fig. 6B). Este análisis nos permitió posteriormente el análisis comparativo de la morfología mitocondrial de los fibroblastos HGPS-1 y HGPS-2 con los fibroblastos WT, tratados y no tratados con LMB. Los cultivos de fibroblastos WT, HGPS-1 y HGPS-2 se trataron con LMB a una concentración de 1nM y 50nM por 6 días (Fig. 7), o con LMB a las concentraciones de 1nM y 50nM por 3 días (Fig. 8). La sincronización de los cultivos se realizó utilizando medio con suero al 0.1% por 2 días o por 24 horas antes de terminar el tratamiento con LMB. Posteriormente, las células se crecieron en medio con suero al 10%. La morfología mitocondrial predominante en los fibroblastos WT fue alargada y ramificada con zonas coloreadas con un verde más intenso, lo que corresponde con la tinción de mitocondrias reticulares que poseen capacidades respiratorias y energéticas normales. En los fibroblastos HGPS-1 tratadas con el vehículo solamente, se observaron mitocondrias con morfología alargadas y otras con morfología acortada. Así mismo, encontramos mitocondrias fragmentadas e hinchadas. De manera similar, en los cultivos HGPS-2 observamos una cantidad significativa de mitocondrias fragmentadas y zonas de mitocondrias coloreadas con un verde poco intenso, lo cual corresponde con mitocondrias hinchadas/dañadas. En conclusión, la morfología de las mitocondrias de los cultivos HGPS-1 y HGPS-2 sugiere una pérdida de funcionalidad mitocondrial.

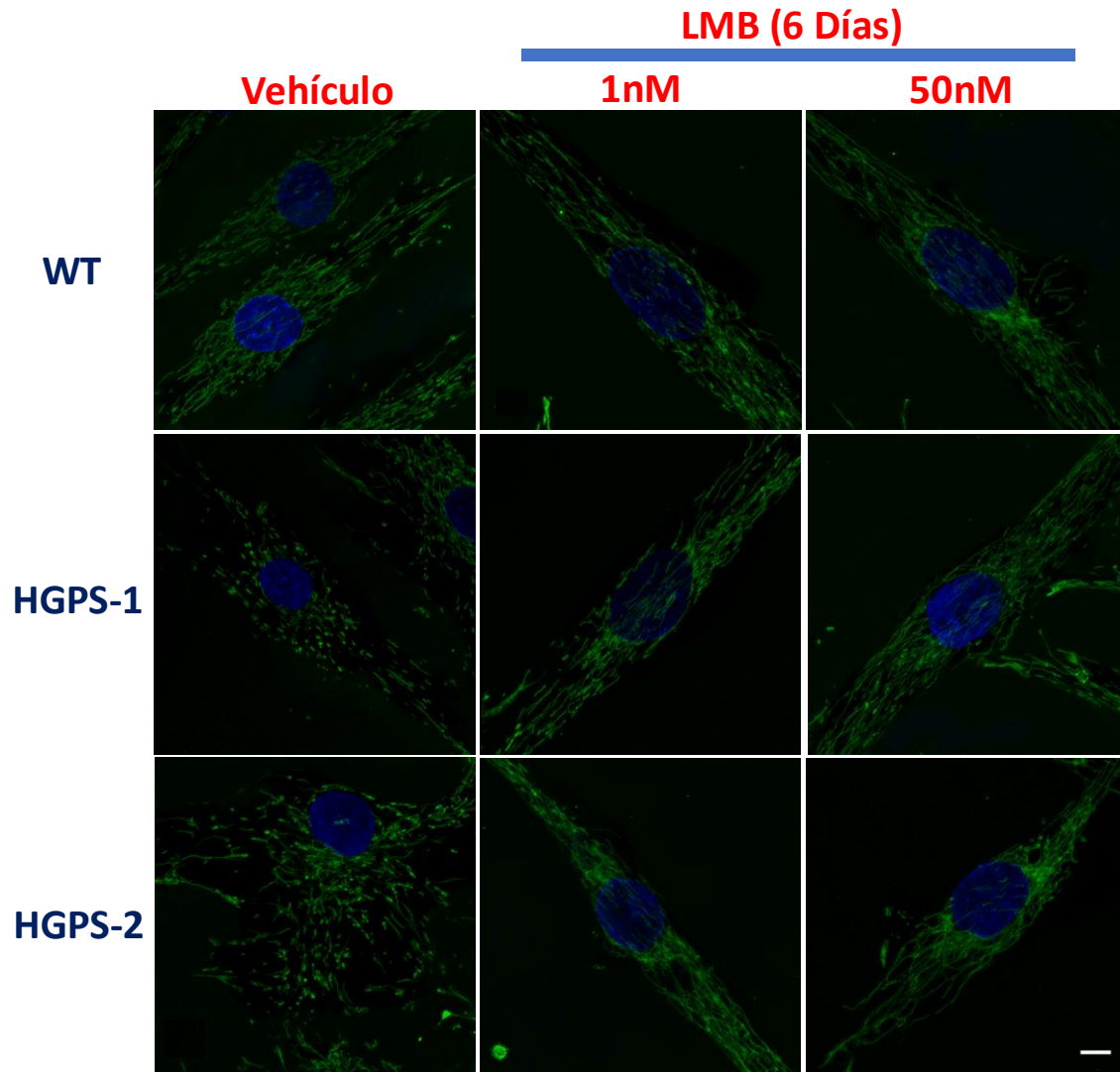


Figura 7. Restablecimiento de la morfología mitocondrial de Iso fibroblastos HGPS después del tratamiento con LMB por 6 días.

Los fibroblastos WT, HGPS-1 y HGPS-2 fueron cultivados y tratados con 1nM y 50nM de LMB por 3 días. Los cultivos se sincronizaron previamente en la fase G0/G1. Las células se tiñeron con el colorante vital *Mitotracker Green FM* y las imágenes corresponden a proyecciones máximas. La barra de la escala corresponde a 10 μ m.

De manera interesante, después del tratamiento con LMB se observó la recuperación de la morfología ramificada y alargada de las mitocondrias con su

arreglo reticular típico en los cultivos HGPS-1 y HGPS-2 (Fig. 7 y 8). Estos resultados sugieren que se restableció la funcionalidad mitocondrial. Debido a que el efecto de la LMB fue similar con las diferentes concentraciones usadas y con los diferentes periodos de tratamiento, elegimos el tratamiento con 1 nM de LMB por tres días para evitar el efecto tóxico de la LMB.

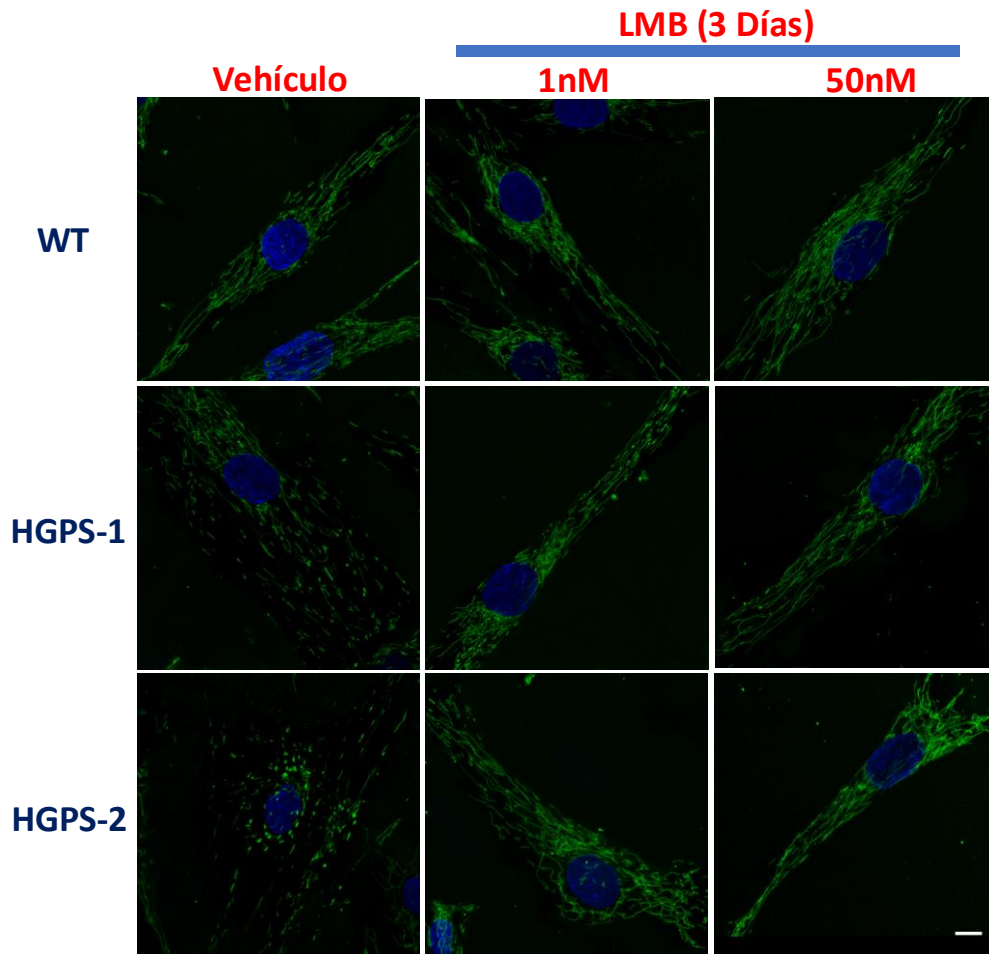


Figura 8. Recuperación de la morfología mitocondrial de los fibroblastos HGPS después del tratamiento con LMB por 3 días.

Los fibroblastos WT, HGPS-1 y HGPS-2 fueron tratados con 1nM y 50nM de LMB por 3 días. Previamente al tratamiento con LMB, los cultivos se sincronizaron en fase 0/G1. Las células se tiñeron con el colorante vital *Mitotracker Green FM* y las imágenes corresponden a proyecciones máximas. La barra de la escala corresponde a 10 μ m.

Posteriormente se llevó a cabo el análisis morfométrico de las mitocondrias calculando los siguientes parámetros: área mitocondrial, circularidad y diámetro de feret (la distancia más larga entre dos puntos de un cuerpo cilíndrico). Encontramos que tanto el área mitocondrial (Fig. 9-B) como el diámetro de feret disminuyen en los cultivos HGPS, con respecto a los cultivos WT (Fig. 9-D). De manera consistente con las imágenes de microscopía confocal el análisis morfométrico confirmó que el tratamiento con LMB provoca que los valores morfométricos de las mitocondrias de las células ahora se asemejen a los valores de las mitocondrias de los cultivos WT (Fig. 9-C). Dado que se encontró que el área mitocondrial de los fibroblastos HGPS se recuperaron en respuesta al tratamiento con LMB, decidimos evaluar la masa

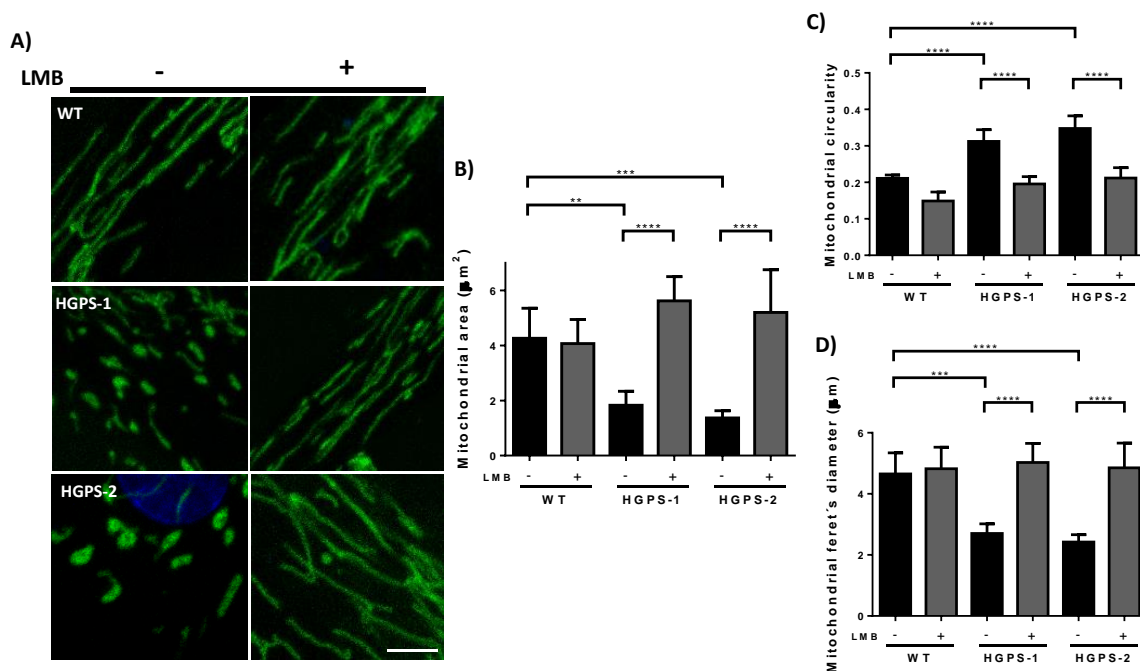
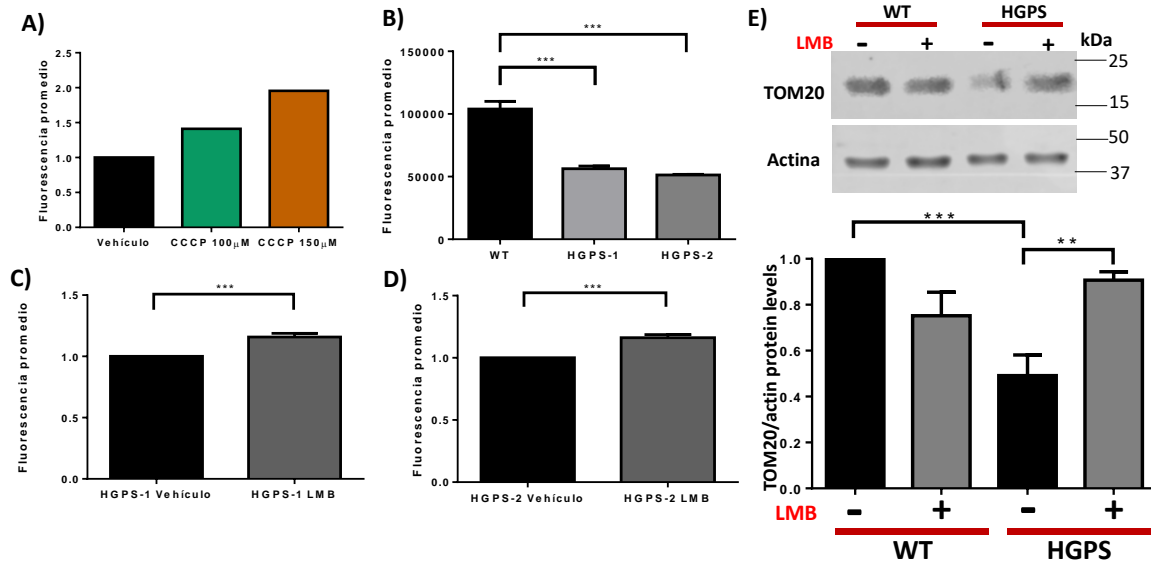


Figura 9. Análisis morfométrico de las mitocondrias de los fibroblastos HGPS.

A) Se muestran imágenes representativas de mitocondrias teñidas con el colorante *Mitotracker Green FM* y analizadas por microscopía confocal. Se muestran las gráficas con los parámetros de área mitocondrial (B), circularidad (C) y diámetro de fetet (D) mitocondrial. Se evaluaron 20 células por condición de cada uno de tres experimentos independientes. Los valores corresponden al promedio \pm SD, y las diferencias significativas se obtuvieron mediante la prueba de ANOVA de una vía. La barra de la escala corresponde a 10 μ m.

mitocondrial. En primera instancia utilizamos el colorante vital *Mitotracker Green FM* para llevar a cabo ensayos de citometría de flujo.

Para corroborar la funcionalidad del colorante reactivo *Mitotracker green*, despolarizamos el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) con el ionóforo liposoluble carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP). Se ha reportado que el tratamiento con altas concentraciones de CCCP daña las mitocondrias despolarizándolas y activando el proceso de mitofagia, pero dañando a los lisosomas evitando que la mitofagia concluya con éxito, permitiendo la acumulación



de restos mitocondriales no degradados (Lombardo et al., 2018). Por lo tanto, este

Figura 10. Determinación de la masa mitocondrial de los fibroblastos HGPS tratados con LMB.

A) Se evaluó la masa mitocondria de los fibroblastos WT tratados con las concentraciones de CCCP indicadas o con el vehículo solamente por 20 minutos. Enseguida, las células se tiñeron con el colorante *Mitotracker green* para medir la masa mitocondrial mediante citometria de flujo. (Ver métodos). (B). Se evaluó la masa mitocondria de los fibroblastos WT, HGPS-1 y HGPS-2 como se indica en el apartado A. Los fibroblastos WT (C) y HGPS-1 (D) fueron tratados con 1nM de LMB o con el vehículo solamente por 3 días. Previo al tratamiento los cultivos se sincronizaron en fase G0/G1. Las células se cosecharon y se tiñeron con *Mitotracker Green FM* y se evaluó por citometría de flujo la masa mitocondrial de 10,000 eventos de 3 experimentos independientes. Se graficó la fluorescencia promedio respecto al vehículo \pm SD. Para el análisis estadístico se realizó la prueba t de Student, con un 95% de confianza. (E). Se evaluó la masa mitocondrial por WB utilizando un anticuerpo anti-TOM20 y empleando los valores de actina como control de carga. Se muestra un gel representativo (arriba) de tres experimentos independientes. La grafica de la parte inferior corresponde al análisis estadístico con la prueba ANOVA de una vía y con un 95% de confianza.

reactivo provocaría finalmente un aumento de la masa mitocondrial.

De acuerdo con lo esperado, el tratamiento con CCCP induce un aumento en la masa mitocondrial, lo que nos indica que el colorante *Mitotracker green* funciona adecuadamente para evaluar este parámetro. Los fibroblastos HGPS muestran una disminución significativa de la masa mitocondrial (Fig. 10-B), por lo que aparentemente la disfunción mitocondrial de los cultivos HGPS no tiene relación con la perturbación del $\Delta\Psi_m$, a diferencia del tratamiento con CCCP. Interesantemente el tratamiento con LMB recupera la masa mitocondrial de los fibroblastos HGPS (Fig. 10-C y D). Para confirmar estos hallazgos se evaluó la masa mitocondrial por otro método, la determinación de los niveles de TOM20 por WB. TOM20 es una proteína exclusiva y constitutiva de las mitocondrias, por lo que la determinación de sus niveles nos da una medición creíble de la cantidad de mitocondrias (Contino et al., 2017). En concordancia con los ensayos previos, el nivel de TOM20 disminuyen en los fibroblastos HGPS, con respecto a los fibroblastos WT, pero la cantidad de esta proteína mitocondrial se recupera a un nivel similar al del cultivo WT, después del tratamiento con LMB. Para ahondar sobre el efecto que tiene el tratamiento con LMB sobre la función mitocondrial, se evaluó el $\Delta\Psi_m$ de las mitocondrias utilizando el colorante vital *MitoTracker Red CMXRos*, el cual se une a las mitocondrias de manera dependiente del $\Delta\Psi_m$. Como un primer paso se probó la funcionalidad del Mitotracker mediante tratamiento de los fibroblastos WT con CCCP. De acuerdo con lo esperado, la incubación con CCCP reduce el $\Delta\Psi_m$ de los fibroblastos WT (Fig. 11-A). Después se determinó el $\Delta\Psi_m$ de los cultivos WT y HGPS. En concordancia con la literatura, las mitocondrias de los fibroblastos HGPS muestran una disminución del $\Delta\Psi_m$ (fig. 11-B). En apoyo al efecto positivo de la LMB sobre la fisiología mitocondrial, los fibroblastos HGPS recuperaron su $\Delta\Psi_m$ después del tratamiento con este fármaco (Fig. 11-C y D).

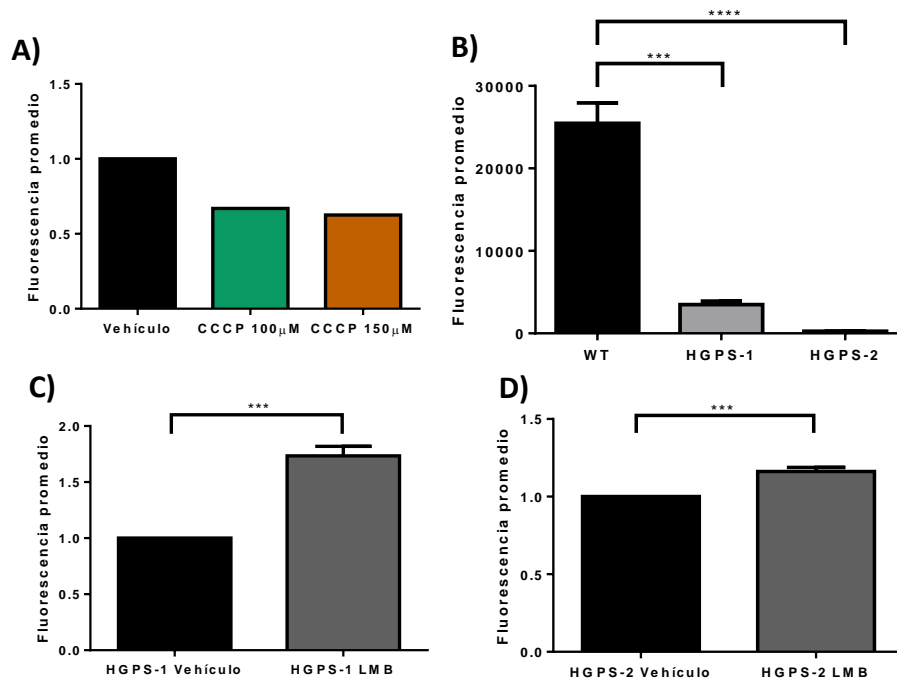


Figura 11. La inhibición farmacológica de CRM1 con LMB restablece el $\Delta\Psi_m$ de las mitocondrias de las células HGPS.

A) Los fibroblastos WT fueron tratados con CCCP a las concentraciones indicadas por 20 minutos, posteriormente se tiñeron con el colorante *Mitotracker* rojo o verde y se evaluó el $\Delta\Psi_m$ de las mitocondrias a través de la medición de la fluorescencia mediante citometría de flujo (10, 000 eventos, n=1). (B) Se mido el $\Delta\Psi_m$ de las mitocondrias de los fibroblastos WT y HGPS como se describió en el apartado A. (C y D) Se calculó el $\Delta\Psi_m$ de las mitocondrias de los fibroblastos HGPS1 y HGPS 2 tratados con LMB o con el vehículo solamente. Se graficó la fluorescencia promedio \pm SD respecto a las células control. Para el análisis estadístico se realizó la prueba t de Student con un 95% de confianza.

Se prosigió a evaluar los niveles relativos de ATP que producen las mitocondrias de los cultivos WT y HGPS. Se observó una disminución estadísticamente significativa de los niveles de ATP en los fibroblastos HGPS, y de manera interesante, los niveles de ATP de los fibroblastos HGPS niveles se recuperaron después del tratamiento con LMB (Fig. 12). En su conjunto, los resultados demuestran que el tratamiento con LMB recupera la funcionalidad mitocondrial de las células HGPS.

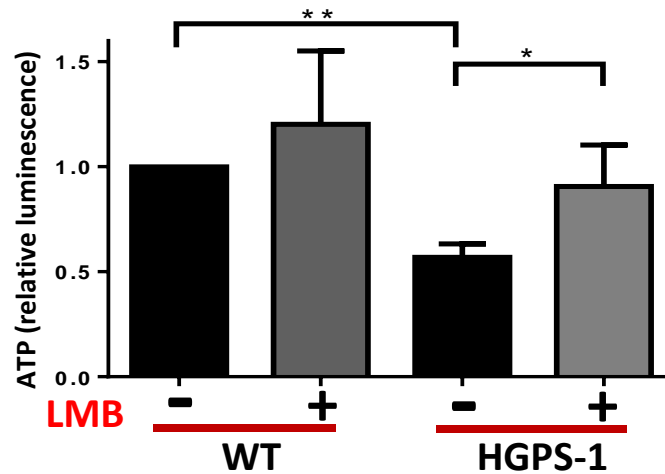


Figura 12. La producción deficiente de ATP que presentan los fibroblastos HGPS se normalizó después del tratamiento con LMB.

Se evaluaron los niveles de ATP en los fibroblastos WT y HGPS-1 tratados con 1nM de LMB o con el vehículo solamente por 3 días LMB. (ver métodos). Se graficó la intensidad de luminiscencia promedio \pm SD y las diferencias significativas se obtuvieron mediante la prueba ANOVA de una vía con un 95% de confianza.

La modulación farmacológica de CRM1 con LMB restaura la fisiología mitocondrial a través de la inducción de la mitogénesis.

Con el propósito de identificar el mecanismo que permite la recuperación de la fisiología mitocondrial a través del tratamiento de los cultivos HGPS con el inhibidor de CRM1 (LMB), evaluamos la implicación de dos procesos celulares: a) la biogénesis mitocondrial y b) la mitofagia. Para abordar la primera hipótesis evaluamos la expresión del factor de transcripción maestro de la biogénesis mitocondrial, la proteína PGC1- α . Mediante ensayos de inmunodetección en fase sólida determinamos que el nivel de PGC1- α disminuye drásticamente en los fibroblastos HGPS; no obstante, el tratamiento de estos cultivos con LMB incrementó el nivel de PGC1- α hasta alcanzar una concentración similar a la de los fibroblastos silvestres (Fig. 13-A). De manera similar, el transcrito de PGC1- α fue indetectable en los fibroblastos HGPS, pero después del tratamiento con LMB

muestra un incremento notorio (Fig. 13-B). En su conjunto estos resultados implican que la normalización de la exportación nuclear a través del tratamiento con LMB, induce la expresión de PGC1- α y probablemente la inducción de sus genes blancos también, los cuales controlan la biogénesis mitocondrial (Xiong et al., 2016), con ello mejorando la capacidad energética celular a través de una mejora funcional de las mitocondrias (Wu et al., 1999) e incluso teniendo un efecto anti senescente (Kim et al., 2019; Sahin et al., 2011). Por otro lado, en el cultivo WT se observa una disminución sorpresiva del PGC1- α , pero solo a nivel de proteína, no a nivel de mRNA, sugiriendo que esta disminución se debe a una regulación a nivel de proteína. Se ha reportado que PGC1- α es una proteína de vida media corta (menos de 30 min) que es susceptible a ser degradado por el sistema ubiquitina-proteasoma en el núcleo (Trausch-Azar et al., 2010), a través de diversos mecanismos: como el frío mediante la proteína anillo de dedo 34 (RNF34) y SCF^{Cdc4}, que son ubiquitina-ligasas E3 que favorece la degradación de PGC1- α ubiquitinada (Olson et al., 2008; Wei et al., 2012); la acetilación de PGC1- α (Kim et al., 2019); y por la subunidad 20S del proteasoma (sin la subunidad reguladora 19S) de manera NQO1-NADH dependiente (Adamovich et al., 2013). Además, se ha reportado que la desacetilación de la proteína PGC1- α promueve la estabilización de sus niveles y su localización nuclear, promoviendo su actividad promotora y la correcta función mitocondrial, por otro lado, PGC1- α es fosforilada por GSK3 β para su eliminación por la proteasoma en el núcleo (Anderson et al., 2008). Por tanto, para explicar por un lado la subida en los niveles de PGC1- α en HGPS y la bajada en WT es esencial estudiar tanto la acetilación de PGC1- α como su fosforilación por GSK3 β .

La inducción de la expresión de PGC1- α explica la aparición de nuevas mitocondrias en los cultivos HGPS tratados con LMB; sin embargo, no explica la desaparición de mitocondrias dañadas (hinchadas) que ocurre después del tratamiento. Por lo tanto, decidimos abordar la segunda hipótesis que plantea que el tratamiento con LMB induce el proceso de mitofagia, el cual se encarga de eliminar las mitocondrias dañadas.

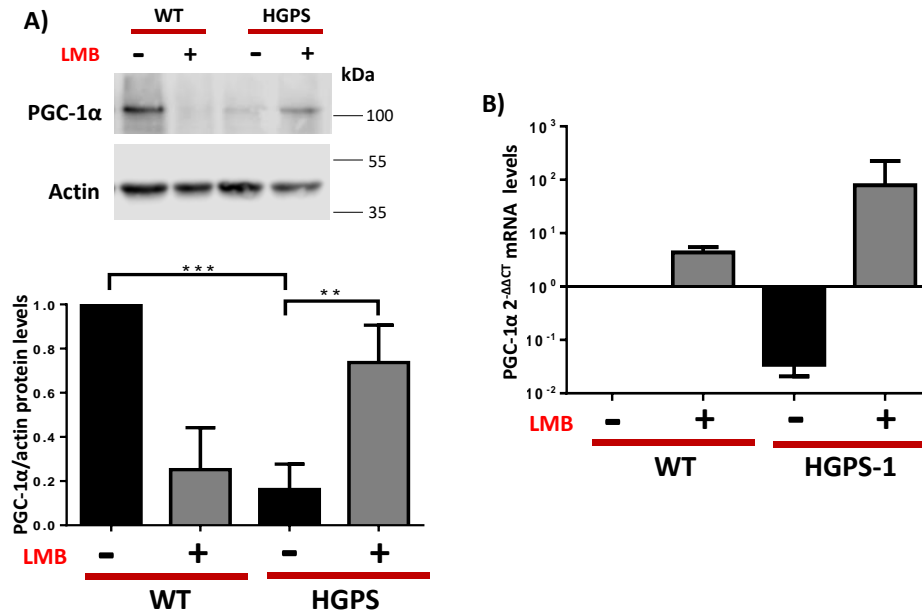


Figura 13. La expresión disminuida de PGC1- α que presentan los fibroblastos HGPS se restablece con el tratamiento con LMB.

Se determinaron los niveles de PGC1- α a nivel de proteína (A) y mRNA (B) mediante ensayos de Western blot y RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR), respectivamente. (A). Se muestra un gel representativo (arriba) y el análisis densitométrico de tres experimentos independientes (panel inferior), donde se usaron los niveles de actina para normalizar los resultados (control de carga). Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm SD y las diferencias significativas se obtuvieron mediante la prueba ANOVA de una vía con un 95% de confianza. Para la determinación de los niveles de mRNA se realizaron 2 experimentos independientes y se promedió el valor $\text{Log}_2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \pm$ SD.

La modulación farmacológica de CRM1 con LMB en HGPS promueve la eliminación de mitocondrias dañadas, mediante mitofagia.

Para analizar el proceso de mitofagia evaluamos cuatro pasos importantes: (a) la correcta localización del factor de transcripción maestro (TFEB), que regula genes tanto de autofagia como de mitofagia y el funcionamiento lisosomal; (b) las marcas iniciales de la mitofagia: PINK1 y parkina; (c) la conversión de LC3-I a LC3-II (cantidad de autofagosomas); y (d) la función lisosomal. Normalmente TFEB debe estar en el núcleo para activar sus genes blancos, sin embargo, debido a que TFEB contiene una NES funcional (Li et al., 2018) es posible que se encuentre deslocalizado en los fibroblastos HGPS por la actividad exacerbada de CRM1. De acuerdo con nuestra predicción, observamos una deslocalización de TFEB del núcleo hacia el citoplasma en una fracción de los fibroblastos HGPS, con respecto al cultivo WT. Sin embargo, TFEB se relocalizó hacia el núcleo después del

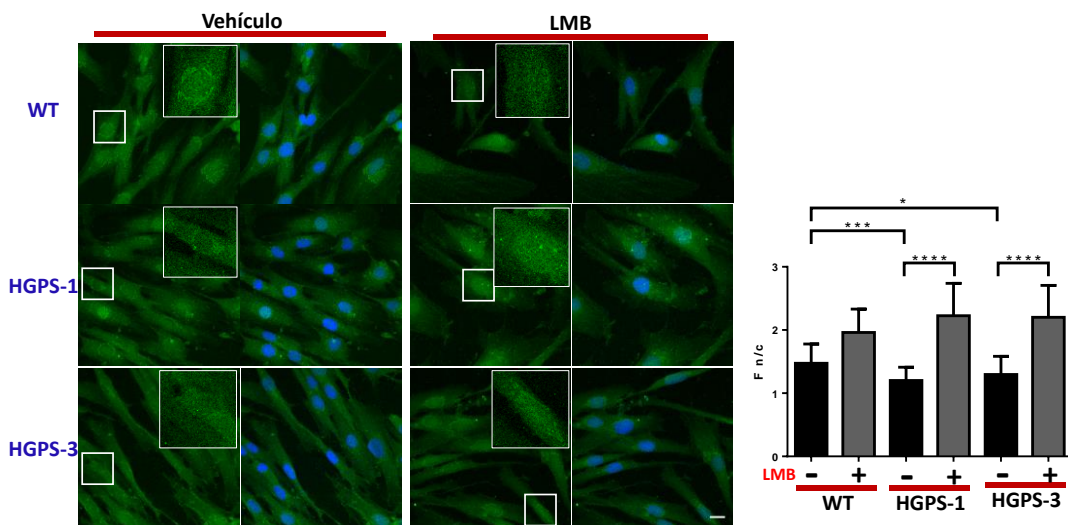


Figura 14. La deslocalización del núcleo hacia el citoplasma de TFEB que presentan los fibroblastos HGPS se revierte después del tratamiento con LMB.

Se determinó la localización subcelular de TFEB mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta en los cultivos WT, HGPS-1 y HGPS-3 tratados con LMB o con el vehículo solamente. Se muestran las imágenes representativas de tres experimentos independientes. La barra de la escala corresponde a 10µm. Se cuantificó la relación núcleo/citoplasma de la señal fluorescente que generó el anticuerpo anti-TFEB ($F_n/F_c \pm SD$), y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba ANOVA de una vía con un 95% de confianza (panel derecho)

tratamiento de los fibroblastos HGPS con LMB (Fig. 14): Estos resultados indican

que el proceso de autofagia/mitofagia podría estar alterado en las células HGPS, y que la relocalización nuclear de TFEB después del tratamiento con LMB podría restablecer el flujo de la autofagia, en caso de que se encuentre dañado. Por lo tanto, procedimos a evaluar los niveles de PINK1 y parkina. PINK1 es una cinasa de serina/treonina que promueve la unión de parkina a las mitocondrias despolarizadas para promover su degradación mediante autofagia (Kumar and Reichert, 2021). Como un control positivo se activó el proceso de mitofagia mediante el tratamiento de las células con CCCP. De manera inesperada, observamos la fosforilación de PINK1 en los cultivos HGPS sometidos o no a tratamiento con CCCP (Fig. 15-A). Así mismo, encontramos un aumento en el nivel de parkina en los fibroblastos HGPS sin tratamiento, con respecto a los fibroblastos WT (Fig. 15-B) además de una disminución de parkina después del tratamiento con CCCP a bajas concentraciones (10 μ M), esto podría deberse a que Parkina podría estar siendo eliminada por mitofagia o por proteasoma o a que el anticuerpo no detecta a parkina ubiquitinada (Aguileta et al., 2015). Interesantemente, el contenido de parkina disminuyó en HGPS con el tratamiento con LMB hasta un nivel que asemeja al observado en los fibroblastos WT sugiriendo que LMB regresando a los niveles de mitofagia basal y que debido a que la mitofagia no está alterada en el cultivo WT tratado con LMB no se ven diferencias significativas respecto a WT sin tratamiento, además que no hay acumulación de mitocondrias dañadas en el cultivo WT con y sin LMB, por tanto el proceso de mitofagia no está anormalmente dañado ni activado.

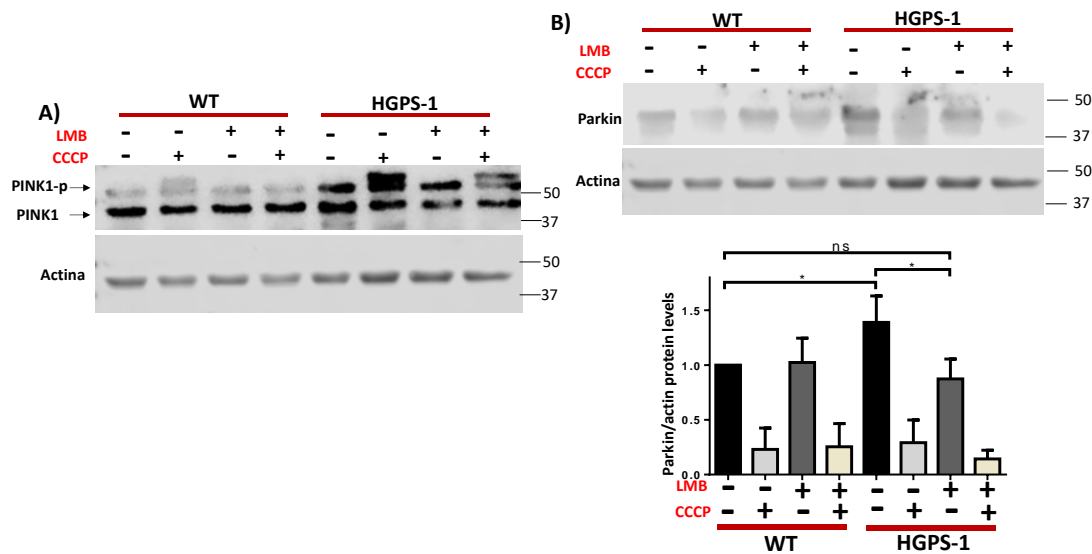


Figura 15. PINK1 y Parkina se encuentran activas en HGPS.

Para la determinación de los niveles de las proteínas PINK1 (A) y parkina (B) tratados con CCCP y LMB. Se muestra un gel representativo de cada experimento y el gráfico estadístico (panel B, abajo) el promedio de los niveles de parkina \pm SD de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó la prueba ANOVA de una vía con un 95% de confianza.

Tanto la presencia de PINK1 como de parkina sugieren que el proceso de marcaje de las mitocondrias dañadas está activo. Incluso se observa un aumento en los niveles de parkina y posiblemente de la fosforilación de PINK1 en HGPS. Esto podría sugerir dos cosas, primeramente, que la mitofagia está aumentada o que el aumento de estas marcas corresponde a la acumulación de mitocondrias dañadas que se observaron en el estudio morfométrico de las mitocondrias previamente, es decir las mitocondrias hinchadas que observamos podrían estar marcadas para su degradación, sin embargo, esto no sucede.

El siguiente paso importante en el proceso de mitofagia y en general de la autofagia es la conversión de LC3-I a LC3-II. Para poder observar esta conversión es importante usar inhibidores de la autofagia, como cloroquina (CQ), este inhibidor alcaliniza lisosomas, previniendo la fusión entre lisosomas y autofagosomas, de esta manera se previene la degradación y acumula a LC3-II, dándonos una idea

confiable de la cantidad de autofagosomas en la célula a través de la determinación de la relación LC3-II/LC3-I (Klionsky et al., 2021).

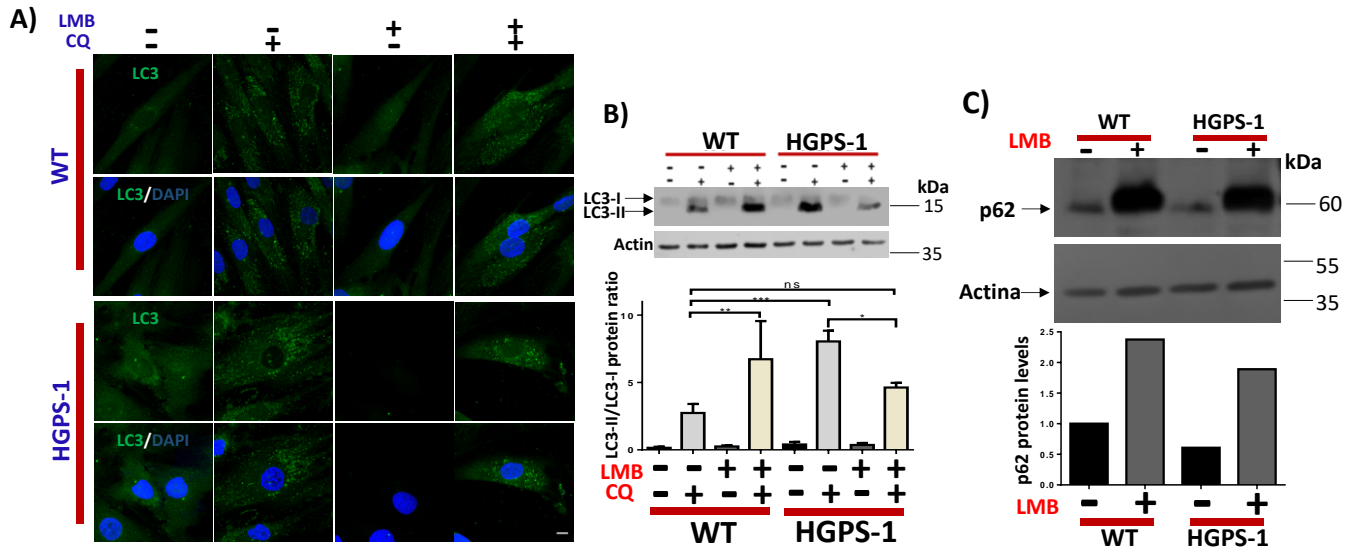


Figura 16. Existe una acumulación de autofagosomas en HGPS que se revierte después del tratamiento con LMB.

Por inmunofluorescencia (A) y WB (B) se evaluó la presencia de autofagosomas utilizando el anticuerpo anti-LC3 para ver la acumulación de LC3-II. Las células fueron tratadas con o sin LMB (en las condiciones previamente establecidas) y CQ (50 μ M por 12 h). Se determinaron los niveles de p62 (C). Se muestra un gel representativo de cada experimento y el gráfico estadístico de la relación LC3-II/LC3-I y p62 (panel B y C, abajo, respectivamente) con el promedio de los niveles \pm SD de tres experimentos independientes para LC3-II/LC3-I y de uno para p62. Para el análisis estadístico se realizó la prueba ANOVA de una vía con un 95% de confianza. La barra de la escala es igual a 5 μ m.

El resultado fue el siguiente, primero es importante establecer que el tratamiento con CQ fue útil para acumular a LC3-II, por tanto, para determinar la razón LC3-II/LC3-I y evaluar la presencia de autofagosomas (fig. 16-A y B). De manera sorprendente, la relación LC3-II/LC3-I aumenta en HGPS tratada con CQ, respecto al grupo WT tratado con CQ, sugiriendo un aumento en la presencia de autofagosomas. Además, resultó interesante observar que con el tratamiento con LMB y CQ en el cultivo WT la relación LC3-II/LC3-I aumentó, respecto al grupo WT tratado con CQ, mientras que en el grupo HGPS tratado con LMB y CQ disminuyó respecto al grupo HGPS tratado con CQ, acercándose a valores semejantes al

grupo WT tratado con CQ (fig. 16-A y B). Aparentemente en las WT la LMB aumentó el flujo porque se acumularon más autofagosomas con la CQ.

Aquí observamos efectos diferentes de LMB en la relación LC3-II/LC3-I, en WT un aumento, el cual es consistente por el resultado previo de la acumulación en el núcleo de TFEB con el tratamiento con LMB (fig. 14), además se ha reportado que la acumulación de TFEB en el núcleo promueve la autofagia (Silvestrini et al., 2018) y aumenta la relación LC3-II/LC3-I (Zhou et al., 2021) en individuos sanos. Sin embargo, en HGPS ocurre algo totalmente diferente, sin LMB la relación LC3-II/LC3-I se encuentra de por sí aumentada, sin embargo, encontramos en este cultivo una acumulación de mitocondrias dañadas (fig. 9) y un aumento en la presencia de las proteínas parkina y de PINK1-p (fig. 15) por lo que pareciera que el proceso de mitofagia estuviera alterado, pero no en los primeros pasos, porque LC3-I es capaz de convertirse a LC3-II. Sorpresivamente, LMB recupera la relación LC3-II/LC3-I en HGPS a niveles del cultivo WT, parece que LMB sí tiene un efecto benéfico no solo en la salud mitocondrial si no en el proceso de autofagia. Y que la acumulación desmedida de autofagosomas bajo ciertas circunstancias puede ser nocivo o incluso puede ser indicador de una autofagia impedida en pasos más tardíos (Montiel et al., 2020; Torres-Esquivel et al., 2020).

Para entrar más en detalle evaluamos a la proteína p62 (fig. 14-C), este es el correceptor que se une tanto a LC3-II como a las mitocondrias dañadas para su eliminación, interesantemente observamos que existe una disminución en los



Figura 17. En HGPS existe una deficiencia lisosomal que LMB recupera parcialmente.

Por inmunofluorescencia (A) y WB (B) se evaluó la presencia de lisosomas utilizando el colorante vital *lysotracker DND-99* y el anticuerpo anti-LAMP2, respectivamente. Las células fueron tratadas con o sin LMB. En el panel A se muestran las imágenes representativas de las fluorescencias (izquierda) y el gráfico del número de lisosomas promedio \pm SD por célula. En el panel B se muestra un gel con los niveles de la proteína LAMP2 normalizados con actina representativo de 3 experimentos, abajo a la izquierda el gráfico de los niveles de proteína promedio \pm SD de la proteína completa 100 kDa y abajo a la derecha el gráfico de los niveles del fragmento de LAMP2 de 30 kDa promedio \pm SD. Para el análisis estadístico se realizó la prueba ANOVA de una vía con un 95% de confianza. La barra de la escala es igual a 10 μ m.

niveles de p62 en el cultivo con HGPS, respecto al grupo WT, indicando que si existe una degradación autofágica tanto de LC3-II como de p62 (fig. 14). Sin embargo, con el tratamiento con LMB se observa un aumento notorio en ambos cultivos, esto podría deberse a que la expresión de p62 podría estar siendo promovida por TFEB (Settembre et al., 2011). En la literatura se ha reportado que el flujo autofágico puede estar impedido, pero a su vez pueden estarse activando señales que podrían indicar lo contrario: como un aumento en la presencia de mitocondrias dañadas, la activación de PINK1 y parkina y un aumento en la relación LC3-II/LC3-I (Padman et al., 2013), a pesar de que las proteínas receptoras de cargos como LC3-II (Saetre et al., 2015) o incluso p62 estén siendo degradadas en el cultivo HGPS sin tratamiento, como es el caso de este trabajo.

Existe una deficiencia lisosomal en HGPS la cual es revertida parcialmente con el tratamiento con LMB.

Como se mencionó previamente, es posible que la autofagia esté impedida en pasos posteriores, para probar esta hipótesis procedimos a evaluar la salud lisosomal. El primer abordaje fue cuantificar el número de lisosomas por célula. Sorprendentemente en HGPS se observó una disminución significativa del número de lisosomas respecto al grupo WT y con el tratamiento con LMB hay una recuperación parcial (fig. 17-A). Para corroborar estos resultados se midieron los niveles de LAMP2, una proteína exclusiva y constitutiva de los lisosomas (Alessandrini et al., 2017). De manera consistente se encontró una disminución significativa de los niveles de LAMP2 y después del tratamiento con LMB una recuperación parcial (fig. 17-B), además, se encontró la presencia de un fragmento de LAMP2 de 30 kDa, este fragmento indica que la membrana lisosomal ha perdido su integridad, comprometiendo la funcionalidad lisosomal (Boya and Kroemer, 2008; Gómez-Sintes et al., 2016; Montiel et al., 2020). Se ha reportado que la disminución en los niveles de LAMP2 está relacionado con la acumulación de vacuolas autofágicas, es decir es causal del impedimento autofágico (Eskelinen, 2006), por otro lado, dado que la funcionalidad lisosomal está íntimamente relacionada con la autofagia y la regula mediante mTOR y TFEB (Laplante and Sabatini, 2012;

Roczniak-Ferguson et al., 2012), la promoción de la correcta actividad lisosomal está relacionada con efectos anti edad y la prolongación de la vida (Carmona-Gutierrez et al., 2016). A la luz de estos resultados es evidente proponer que la causa del impedimento en la mitofagia se encuentra a nivel lisosomal.

Está claro que existe una deficiencia lisosomal, por tanto, nos preguntamos si la actividad lisosomal estaba comprometida, para esto evaluamos la presencia de la enzima catepsina B. Catepsina B es una pre-pro-apoenzima que tiene la función de cisteína proteasa, es de las principales proteasas que hay en los lisosomas. Catepsina B tiene que ser cortada en dos ocasiones para llegar a su forma madura y activa. El primer corte ocurre en el retículo endoplasmático (pro-catepsina B) y el ultimo corte, que es un auto corte, ocurre solamente en el lisosoma bajo condiciones de pH ácido y (4.5 a 5) (Cavallo-Medved et al., 2011). Por tanto, observar la

presencia de la forma de catepsina B madura nos dará una idea de la actividad lisosomal.

Para abordar esta pregunta, primero se demostró que el auto-corte depende

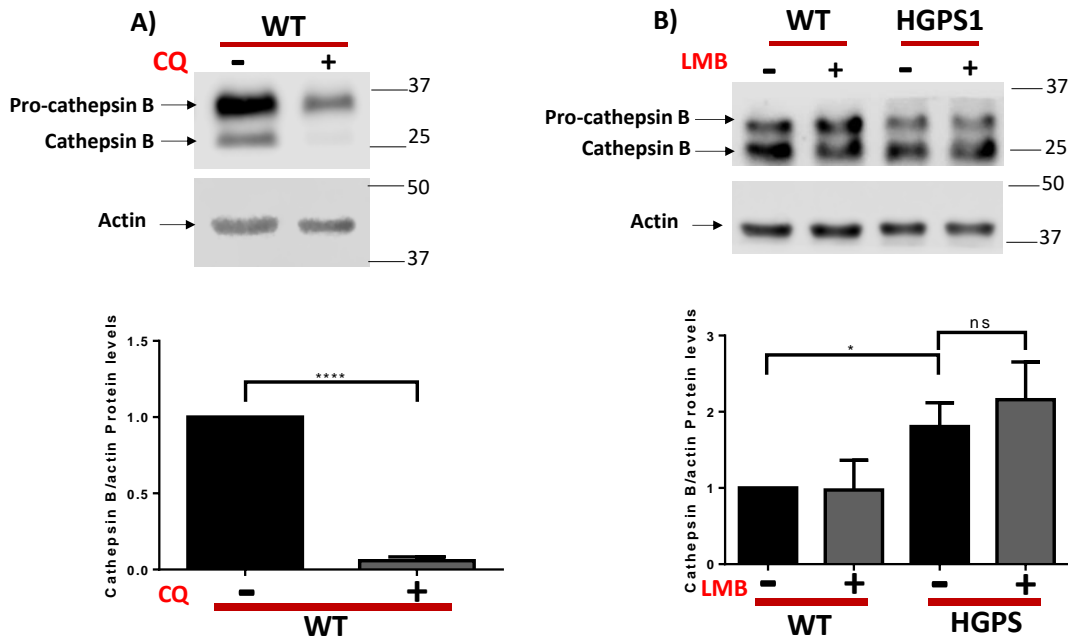


Figura 18. Los lisosomas en HGPS son funcionales.

Por WB se evaluó la expresión de catepsina B madura utilizando el anticuerpo anti-Catepsina B. Las células fueron tratadas con o sin LMB (a las condiciones previamente establecidas). En el panel A se muestra un gel representativo de 3 experimentos y el gráfico (abajo) de los niveles promedio de catepsina madura \pm SD. En el panel B se muestra un gel representativo de 3 experimentos con los niveles de catepsina B madura \pm SD. Se utilizó a actina como control de carga. Para el análisis estadístico se empleó la prueba de *t* de Student con una confianza del 95%.

realmente del pH lisosomal, para ello se utilizó CQ un agente alcalinizante de los lisosomas que impediría la maduración de pro-catepsina B a catepsina B. Y como era de esperarse cuando se trató al cultivo WT con CQ el corte se evitó en su totalidad (fig. 18-A), por lo tanto, el corte de catepsina B resulta un buen abordaje para evaluar la función lisosomal. Posteriormente se determinaron los niveles de catepsina B en los cultivos WT y HGPS con y sin tratamiento con LMB. Interesantemente en HGPS se encontró un aumento en la presencia de catepsina B madura (fig. 18-B) lo que indica que los lisosomas son funcionales, esto es consistente con que, tanto LC3-II como p62 (fig. 16) sí están siendo degradadas en

HGPS (Mariño et al., 2008). Cuando se compararon HGPS con y sin tratamiento con LMB no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (fig. 18-A), esto sugiere que LMB no tiene algún efecto sobre la actividad de los lisosomas en HGPS. Hasta ahora los resultados arrojan que, aunque los lisosomas son funcionales, existe una baja cantidad de lisosomas por célula y de LAMP2 en HGPS

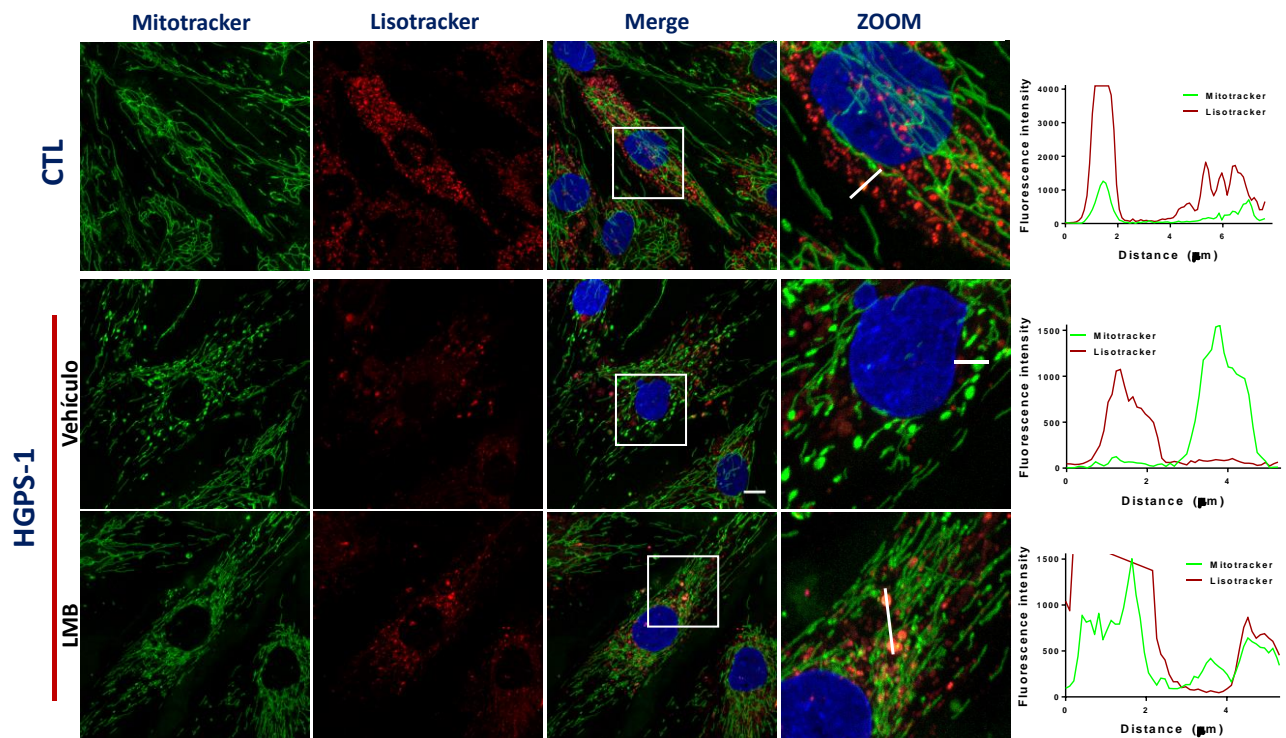


Figura 19. Existe una deficiencia en la fusión lisosomal en HGPS que es aliviada con el tratamiento con LMB.

Los fibroblastos WT y HGPS-1 fueron cultivados y tratados con LMB, bajo las condiciones establecidas anteriormente, al final del tratamiento se tiñeron con los colorantes vitales *mitotracker green*, *lysotracker DND-99* y Hoechst. A la derecha se muestran las gráficas de intensidad de fluorescencia de los colorantes *mitotracker green* y *lysotracker DND-99*. La barra de la escala es igual a 10µm.

respecto al cultivo WT y que después del tratamiento con LMB hay una recuperación parcial de ambos parámetros.

Los hallazgos previos nos llevaron a hipotetizar que el defecto en la mitofagia podría estar a nivel de la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas. Por lo que se realizaron colocalizaciones entre lisosomas y mitocondrias, utilizando los colorantes *lysotracker DND-99* y *mitotracker gree*, respectivamente. El racional es el siguiente, se ha reportado que LAMP2 participa de manera determinante en la fusión entre lisosomas y autofagosomas, de tal manera que su ausencia podría impedir que este paso se lleve a cabo (Hubert et al., 2016). El resultado (fig. 19) muestra que en HGPS hay una ausencia de colocalización entre las mitocondrias hinchadas y los lisosomas, sugiriendo que el paso de fusión entre lisosomas y autofagosomas podría estar dañado. Además, después de tratar con LMB las mitocondrias dañadas sorprendentemente disminuyen y se puede observar que ahora los lisosomas ahora están colocalizando con las mitocondrias. Esto posiblemente se deba a que los niveles de LAMP2 están siendo recuperados, y con ello se promueve la fusión entre lisosomas y autofagosomas. El mecanismo podría ser a través de la proteína sintaxina 17 (STX17). STX17 es un factor del receptor sensible a la N-etilmaleimida soluble de unión proteica (SNARE) tipo Qa en el autofagosoma, que cumple una función esencial en el proceso de fusión con el

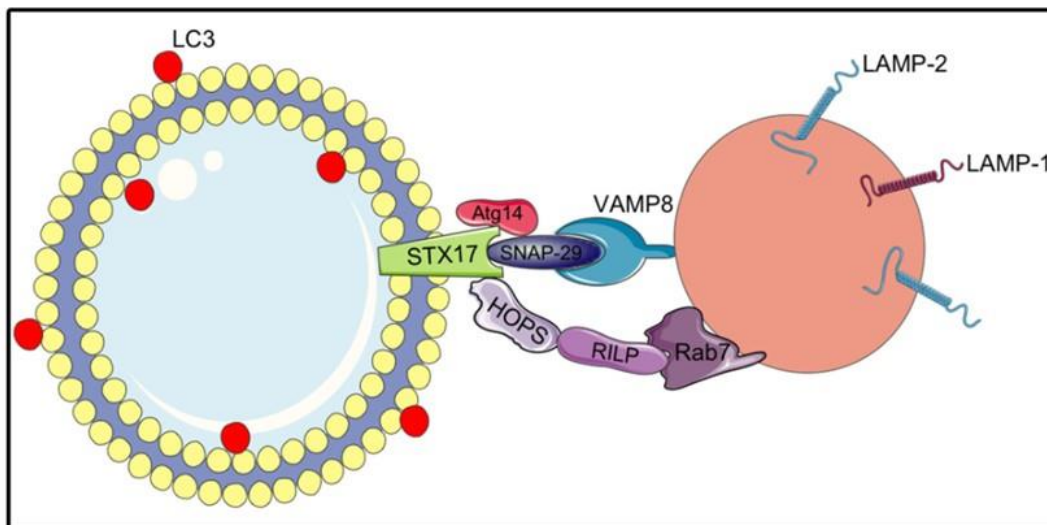


Figura 20. La fusión del autofagosoma con el lisosoma está mediada por STX17.

STX17 es esencial para la formación del complejo de unión R-SNARE y Qa-SNARE. (Hubert et al., 2016)

lisosoma (fig. 20) a través de la proteína del R-SNARE llamada proteína de

membrana asociada a vesículas 8 (VAMP8) del lisosoma formando un complejo de unión mediante la proteína asociada al sinaptosoma 29 (SNAP29) (Viret and Faure, 2019).

Más interesante aún, se ha reportado que la ausencia de LAMP2, interfiere con la correcta localización de STX17 y otras proteínas como SNAP29 y la proteína vacuolar asociada a proteínas de clasificación 33A (VPS33: que forma parte del complejo HOPS) en los autofagosomas y de esta manera se impide la correcta fusión entre el lisosoma y el autofagosoma, provocando una acumulación aberrante de autofagosomas (Hubert et al., 2016). Además, se ha revelado la importancia de STX17 en el proceso de mitofagia en concreto, pues STX17 induce mitofagia mediante su traslocación a la mitocondria después de la eliminación de la proteína Fis1 de la membrana mitocondrial externa (Xian et al., 2019).

Respecto al proceso de autofagia y a través del estudio de marcadores de los pasos tempranos de la autofagia (mTOR, LC3 y p62), antes se creía que estaba aumentada en progeria (Mariño et al., 2008), lo cual resultaba sorprendente pues durante el envejecimiento fisiológico este proceso se deteriora (Mariño et al., 2010). Sin embargo, publicaciones recientes refieren que el proceso de autofagia puede estar impedido incluso si encontramos un aumento en marcadores como el recambio de LC3-I-LC3-II y en la cantidad de autofagosomas (Klionsky et al., 2021; Saetre et al., 2015), incluso esta acumulación puede ser nociva (Torres-Esquivel et al., 2020) o indicar impedimento en la mitofagia (Padman et al., 2013). De esta manera, resulta novedoso que por primera vez se reporta que la autofagia está impedida en HGPS, pero no en los pasos iniciales sino en el paso de la fusión lisosomal con el autofagosoma, a causa de una deficiencia lisosomal.

Conclusiones

- 1) La modulación farmacológica de CRM1 con LMB recuperó la morfología mitocondrial de los fibroblastos HGPS.
- 2) La modulación farmacológica de CRM1 mediante tratamiento con LMB recuperó el potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), la masa mitocondrial y la producción de ATP de los fibroblastos HGPS.
- 3) La inhibición farmacológica de CRM1 mediante tratamiento con LMB restableció los niveles de expresión de PGC1- α a nivel de mRNA y proteína.
- 4) Se demostró que HGPS presenta una acumulación de autofagosomas y después del tratamiento con LMB, esta acumulación disminuye.
- 5) Se demostró que en HGPS existe un aumento en la presencia de parkina y de p-PINK1 y el tratamiento con LMB regresa los niveles de parkina a niveles comparables con el grupo WT sin tratamiento.
- 6) Se demostró que en HGPS existe una disminución en el número de lisosomas por célula, en los niveles de LAMP2 y en la presencia del fragmento de LAMP2 de 30 kDa, que es parcialmente recuperada con LMB.
- 7) Se demostró que la actividad lisosomal medida por la presencia de catepsina B está aumentada en HGPS.
- 8) Se demostró que existe una deficiencia en la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma, la cual es revertida con LMB.

Bibliografía

- Adamovich, Y., A. Shlomai, P. Tsvetkov, K.B. Umansky, N. Reuven, J.L. Estall, B.M. Spiegelman, and Y. Shaul. 2013. The protein level of PGC-1 α , a key metabolic regulator, is controlled by NADH-NQO1. *Molecular and cellular biology*. 33:2603-2613.
- Aguileta, M.A., J. Korac, T.M. Durcan, J.F. Trempe, M. Haber, K. Gehring, S. Elsasser, O. Waidmann, E.A. Fon, and K. Husnjak. 2015. The E3 ubiquitin ligase parkin is recruited to the 26 S proteasome via the proteasomal ubiquitin receptor Rpn13. *The Journal of biological chemistry*. 290:7492-7505.
- Ahmed, M.S., S. Ikram, N. Bibi, and A. Mir. 2018. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Premature Aging Disease. *Molecular neurobiology*. 55:4417-4427.
- Alessandrini, F., L. Pezzè, and Y. Ciribilli. 2017. LAMPs: Shedding light on cancer biology. *Seminars in oncology*. 44:239-253.
- Anderson, R.M., J.L. Barger, M.G. Edwards, K.H. Braun, C.E. O'Connor, T.A. Prolla, and R. Weindruch. 2008. Dynamic regulation of PGC-1 α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging cell*. 7:101-111.
- Antico Arciuch, V.G., M.E. Elguero, J.J. Poderoso, and M.C. Carreras. 2012. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxidants & redox signaling*. 16:1150-1180.
- Ashapkin, V.V., L.I. Kutueva, S.Y. Kurchashova, and Kireev, II. 2019. Are There Common Mechanisms Between the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and Natural Aging? *Frontiers in genetics*. 10:455.
- Ashrafi, G., and T.L. Schwarz. 2013. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell death and differentiation*. 20:31-42.
- Benson, E.K., S.W. Lee, and S.A. Aaronson. 2010. Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *Journal of cell science*. 123:2605-2612.
- Boya, P., and G. Kroemer. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*. 27:6434-6451.
- Buchwalter, A., and M.W. Hetzer. 2017. Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging. *Nature communications*. 8:328.
- Carmona-Gutierrez, D., A.L. Hughes, F. Madeo, and C. Ruckenstein. 2016. The crucial impact of lysosomes in aging and longevity. *Ageing research reviews*. 32:2-12.
- Cau, P., C. Navarro, K. Harhour, P. Roll, S. Sigaudy, E. Kaspi, S. Perrin, A. De Sandre-Giovannoli, and N. Levy. 2014. Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Seminars in cell & developmental biology*. 29:125-147.
- Cavallo-Medved, D., K. Moin, and B. Sloane. 2011. Cathepsin B: Basis Sequence: Mouse. *The AFCS-nature molecule pages*. 2011.
- Chiarini, F., C. Evangelisti, V. Cenni, A. Fazio, F. Paganelli, A.M. Martelli, and G. Lattanzi. 2019. The Cutting Edge: The Role of mTOR Signaling in Laminopathies. *International journal of molecular sciences*. 20.
- Contino, S., P.E. Porporato, M. Bird, C. Marinangeli, R. Opsomer, P. Sonveaux, F. Bontemps, I. Dewachter, J.-N. Octave, L. Bertrand, S. Stanga, and P. Kienlen-Campard. 2017. Presenilin 2-Dependent Maintenance of Mitochondrial Oxidative Capacity and Morphology. *Frontiers in Physiology*. 8.
- Datta, S., C.J. Snow, and B.M. Paschal. 2014. A pathway linking oxidative stress and the Ran GTPase system in progeria. *Molecular biology of the cell*. 25:1202-1215.
- Ding, B., and M. Sepehrmanesh. 2021. Nucleocytoplasmic Transport: Regulatory Mechanisms and the Implications in Neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*. 22.

- El-Tanani, M., H. Dakir el, B. Raynor, and R. Morgan. 2016. Mechanisms of Nuclear Export in Cancer and Resistance to Chemotherapy. *Cancers*. 8.
- Eskelinen, E.L. 2006. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular aspects of medicine*. 27:495-502.
- Fernandez-Marcos, P.J., and J. Auwerx. 2011. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American journal of clinical nutrition*. 93:884s-890.
- García-Aguirre, I., A. Alamillo-Iniesta, R. Rodríguez-Pérez, G. Vélez-Aguilera, E. Amaro-Encarnación, E. Jiménez-Gutiérrez, A. Vásquez-Limeta, M. Samuel Laredo-Cisneros, S.L. Morales-Lázaro, R. Tiburcio-Félix, A. Ortega, J.J. Magaña, S.J. Winder, and B. Cisneros. 2019. Enhanced nuclear protein export in premature aging and rescue of the progeria phenotype by modulation of CRM1 activity. *Aging cell*. 18:e13002.
- Gerst, F., G. Kaiser, M. Panse, T. Sartorius, A. Pujol, A.M. Hennige, F. Machicao, R. Lammers, F. Bosch, H.U. Haring, and S. Ullrich. 2015. Protein kinase Cdelta regulates nuclear export of FOXO1 through phosphorylation of the chaperone 14-3-3zeta. *Diabetologia*. 58:2819-2831.
- Gómez-Sintes, R., M.D. Ledesma, and P. Boya. 2016. Lysosomal cell death mechanisms in aging. *Ageing research reviews*. 32:150-168.
- Gonzalo, S., and R. Kreienkamp. 2015. DNA repair defects and genome instability in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Current opinion in cell biology*. 34:75-83.
- Harhour, K., C. Navarro, D. Depetris, M.G. Mattei, X. Nissan, P. Cau, A. De Sandre-Giovannoli, and N. Lévy. 2017. MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO molecular medicine*. 9:1294-1313.
- Hilton, B.A., J. Liu, B.M. Cartwright, Y. Liu, M. Breitman, Y. Wang, R. Jones, H. Tang, A. Rusinol, P.R. Musich, and Y. Zou. 2017. Progerin sequestration of PCNA promotes replication fork collapse and mislocalization of XPA in laminopathy-related progeroid syndromes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 31:3882-3893.
- Horiuchi, K., N. Amizuka, S. Takeshita, H. Takamatsu, M. Katsuura, H. Ozawa, Y. Toyama, L.F. Bonewald, and A. Kudo. 1999. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 14:1239-1249.
- Hubert, V., A. Peschel, B. Langer, M. Gröger, A. Rees, and R. Kain. 2016. LAMP-2 is required for incorporating syntaxin-17 into autophagosomes and for their fusion with lysosomes. *Biology Open*. 5:1516-1529.
- Kelley, J.B., S. Datta, C.J. Snow, M. Chatterjee, L. Ni, A. Spencer, C.S. Yang, C. Cubeñas-Potts, M.J. Matunis, and B.M. Paschal. 2011. The defective nuclear lamina in Hutchinson-gilford progeria syndrome disrupts the nucleocytoplasmic Ran gradient and inhibits nuclear localization of Ubc9. *Molecular and cellular biology*. 31:3378-3395.
- Kim, S.B., J.I. Heo, H. Kim, and K.S. Kim. 2019. Acetylation of PGC1α by Histone Deacetylase 1 Downregulation Is Implicated in Radiation-Induced Senescence of Brain Endothelial Cells. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 74:787-793.
- Klionsky, D.J., A.K. Abdel-Aziz, S. Abdelfatah, M. Abdellatif, A. Abdoli, S. Abel, H. Abeliovich, M.H. Abildgaard, Y.P. Abudu, A. Acevedo-Arozena, I.E. Adamopoulos, K. Adeli, T.E. Adolph, A. Adornetto, E. Aflaki, G. Agam, A. Agarwal, B.B. Aggarwal, M. Agnello, P. Agostinis, J.N. Agrewala, A. Agrotis, P.V. Aguilar, S.T. Ahmad, Z.M. Ahmed, U. Ahumada-Castro, S. Aits, S. Aizawa, Y. Akkoc, T. Akoumianaki, H.A. Akpinar, A.M. Al-Abd, L. Al-Akra, A. Al-Gharaibeh, M.A. Alaoui-Jamali, S. Alberti, E. Alcocer-Gómez, C. Alessandri, M. Ali, M.A. Alim Al-Bari, S. Aliwaini, J. Alizadeh, E. Almacellas, A. Almasan, A. Alonso, G.D. Alonso, N. Altan-Bonnet, D.C. Altieri, M.C. Álvarez É, S. Alves, C. Alves da Costa, M.M. Alzaharna, M. Amadio, C. Amantini,

- C. Amaral, S. Ambrosio, A.O. Amer, V. Ammanathan, Z. An, S.U. Andersen, S.A. Andrabi, M. Andrade-Silva, A.M. Andres, S. Angelini, D. Ann, U.C. Anozie, M.Y. Ansari, P. Antas, A. Antebi, Z. Antón, T. Anwar, L. Apetoh, N. Apostolova, T. Araki, Y. Araki, K. Arasaki, W.L. Araújo, J. Araya, C. Arden, M.A. Arévalo, S. Arguelles, E. Arias, J. Arikath, H. Arimoto, A.R. Ariosa, D. Armstrong-James, L. Arnauné-Pelloquin, A. Aroca, D.S. Arroyo, I. Arsov, R. Artero, D.M.L. Asaro, M. Aschner, M. Ashrafizadeh, O. Ashur-Fabian, A.G. Atanasov, A.K. Au, P. Auburger, H.W. Auner, L. Aurelian, et al. 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1). *Autophagy*. 17:1-382.
- Kumar, R., and A.S. Reichert. 2021. Common Principles and Specific Mechanisms of Mitophagy from Yeast to Humans. *International journal of molecular sciences*. 22.
- Lai, W.-F., and W.-T. Wong. 2020. Progress and trends in the development of therapies for Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Aging cell*. 19:e13175.
- Laplante, M., and D.M. Sabatini. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 149:274-293.
- Li, L., H.J. Friedrichsen, S. Andrews, S. Picaud, L. Volpon, K. Ngeow, G. Berridge, R. Fischer, K.L.B. Borden, P. Filippakopoulos, and C.R. Goding. 2018. A TFEB nuclear export signal integrates amino acid supply and glucose availability. *Nature communications*. 9:2685.
- Li, P.A., X. Hou, and S. Hao. 2017. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. *Journal of neuroscience research*. 95:2025-2029.
- Liu, H., X. Deng, Y.J. Shyu, J.J. Li, E.J. Taparowsky, and C.D. Hu. 2006. Mutual regulation of c-Jun and ATF2 by transcriptional activation and subcellular localization. *The EMBO journal*. 25:1058-1069.
- Lombardo, T., M.G. Folgar, L. Salaverry, E. Rey-Roldán, E.M. Alvarez, M.C. Carreras, L. Kornblihtt, and G.A. Blanco. 2018. Regulated Cell Death of Lymphoma Cells after Graded Mitochondrial Damage is Differentially Affected by Drugs Targeting Cell Stress Responses. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 122:489-500.
- Manzella, N., Y. Santin, D. Maggiorani, H. Martini, V. Douin-Echinard, J.F. Passos, F. Lezoualc'h, C. Binda, A. Parini, and J. Mialet-Perez. 2018. Monoamine oxidase-A is a novel driver of stress-induced premature senescence through inhibition of parkin-mediated mitophagy. *Aging cell*. 17:e12811.
- Mariño, G., A.F. Fernández, and C. López-Otín. 2010. Autophagy and aging: lessons from progeria models. *Advances in experimental medicine and biology*. 694:61-68.
- Mariño, G., A.P. Ugalde, N. Salvador-Montoliu, I. Varela, P.M. Quirós, J. Cadiñanos, I. van der Pluijm, J.M.P. Freije, and C. López-Otín. 2008. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Human Molecular Genetics*. 17:2196-2211.
- Metaxakis, A., C. Ploumi, and N. Tavernarakis. 2018a. Autophagy in Age-Associated Neurodegeneration. *Cells*. 7.
- Metaxakis, A., C. Ploumi, and N. Tavernarakis. 2018b. Autophagy in Age-Associated Neurodegeneration. *Cells*. 7:37.
- Montiel, T., L.A. Montes-Ortega, S. Flores-Yáñez, and L. Massieu. 2020. Treatment with the Ketone Body D-β-hydroxybutyrate Attenuates Autophagy Activated by NMDA and Reduces Excitotoxic Neuronal Damage in the Rat Striatum In Vivo. *Current pharmaceutical design*. 26:1377-1387.
- Olson, B.L., M.B. Hock, S. Ekholm-Reed, J.A. Wohlschlegel, K.K. Dev, A. Kralli, and S.I. Reed. 2008. SCFCdc4 acts antagonistically to the PGC-1α transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis. *Genes & development*. 22:252-264.

- Padman, B.S., M. Bach, G. Lucarelli, M. Prescott, and G. Ramm. 2013. The protonophore CCCP interferes with lysosomal degradation of autophagic cargo in yeast and mammalian cells. *Autophagy*. 9:1862-1875.
- Picard, M., O.S. Shirihai, B.J. Gentil, and Y. Burrelle. 2013. Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 304:R393-406.
- Rana, A., M. Rera, and D.W. Walker. 2013. Parkin overexpression during aging reduces proteotoxicity, alters mitochondrial dynamics, and extends lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:8638-8643.
- Rivera-Torres, J., R. Acin-Perez, P. Cabezas-Sanchez, F.G. Osorio, C. Gonzalez-Gomez, D. Megias, C. Camara, C. Lopez-Otin, J.A. Enriquez, J.L. Luque-Garcia, and V. Andres. 2013. Identification of mitochondrial dysfunction in Hutchinson-Gilford progeria syndrome through use of stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *Journal of proteomics*. 91:466-477.
- Roczniak-Ferguson, A., C.S. Petit, F. Froehlich, S. Qian, J. Ky, B. Angarola, T.C. Walther, and S.M. Ferguson. 2012. The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Science signaling*. 5:ra42.
- Saetre, F., L.K. Hagen, N. Engedal, and P.O. Seglen. 2015. Novel steps in the autophagic-lysosomal pathway. *The FEBS journal*. 282:2202-2214.
- Sahin, E., S. Colla, M. Liesa, J. Moslehi, F.L. Müller, M. Guo, M. Cooper, D. Kotton, A.J. Fabian, C. Walkey, R.S. Maser, G. Tonon, F. Foerster, R. Xiong, Y.A. Wang, S.A. Shukla, M. Jaskelioff, E.S. Martin, T.P. Heffernan, A. Protopopov, E. Ivanova, J.E. Mahoney, M. Kost-Alimova, S.R. Perry, R. Bronson, R. Liao, R. Mulligan, O.S. Shirihai, L. Chin, and R.A. DePinho. 2011. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*. 470:359-365.
- Serebryanny, L., and T. Misteli. 2018. Protein sequestration at the nuclear periphery as a potential regulatory mechanism in premature aging. *The Journal of cell biology*. 217:21-37.
- Settembre, C., C. Di Malta, V.A. Polito, M. Garcia Arencibia, F. Vetrini, S. Erdin, S.U. Erdin, T. Huynh, D. Medina, P. Colella, M. Sardiello, D.C. Rubinsztein, and A. Ballabio. 2011. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*. 332:1429-1433.
- Shi, R., M. Guberman, and L.A. Kirshenbaum. 2018. Mitochondrial quality control: The role of mitophagy in aging. *Trends in cardiovascular medicine*. 28:246-260.
- Sieprath, T., T.D. Corne, M. Nooteboom, C. Grootaert, A. Rajkovic, B. Buysschaert, J. Robijns, J.L. Broers, F.C. Ramaekers, W.J. Koopman, P.H. Willems, and W.H. De Vos. 2015. Sustained accumulation of prelamin A and depletion of lamin A/C both cause oxidative stress and mitochondrial dysfunction but induce different cell fates. *Nucleus (Austin, Tex.)*. 6:236-246.
- Silvestrini, M.J., J.R. Johnson, A.V. Kumar, T.G. Thakurta, K. Blais, Z.A. Neill, S.W. Marion, V. St Amand, R.A. Reenan, and L.R. Lapierre. 2018. Nuclear Export Inhibition Enhances HLH-30/TFEB Activity, Autophagy, and Lifespan. *Cell reports*. 23:1915-1921.
- Snow, C.J., A. Dar, A. Dutta, R.H. Kehlenbach, and B.M. Paschal. 2013. Defective nuclear import of Tpr in Progeria reflects the Ran sensitivity of large cargo transport. *The Journal of cell biology*. 201:541-557.
- Tiku, V., and A. Antebi. 2018. Nucleolar Function in Lifespan Regulation. *Trends in cell biology*. 28:662-672.
- Torres-Esquivel, C., T. Montiel, M. Flores-Méndez, and L. Massieu. 2020. Effect of β -Hydroxybutyrate on Autophagy Dynamics During Severe Hypoglycemia and the Hypoglycemic Coma. *Frontiers in cellular neuroscience*. 14:547215.
- Trausch-Azar, J., T.C. Leone, D.P. Kelly, and A.L. Schwartz. 2010. Ubiquitin proteasome-dependent degradation of the transcriptional coactivator PGC-1{alpha} via the N-terminal pathway. *The Journal of biological chemistry*. 285:40192-40200.

- Tsunemi, T., T.D. Ashe, B.E. Morrison, K.R. Soriano, J. Au, R.A. Roque, E.R. Lazarowski, V.A. Damian, E. Masliah, and A.R. La Spada. 2012. PGC-1 α rescues Huntington's disease proteotoxicity by preventing oxidative stress and promoting TFEB function. *Science translational medicine*. 4:142ra197.
- Ullrich, N.J., and L.B. Gordon. 2015. Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Handbook of clinical neurology*. 132:249-264.
- Viret, C., and M. Faure. 2019. Regulation of Syntaxin 17 during Autophagosome Maturation. *Trends in cell biology*. 29:1-3.
- Wang, M., and P.J. Casey. 2016. Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 17:110-122.
- Wei, P., D. Pan, C. Mao, and Y.X. Wang. 2012. RNF34 is a cold-regulated E3 ubiquitin ligase for PGC-1 α and modulates brown fat cell metabolism. *Molecular and cellular biology*. 32:266-275.
- Wilson, K.L. 2018. Nuclear import pathway key to rescuing dominant progerin phenotypes. *Science signaling*. 11.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R.C. Scarpulla, and B.M. Spiegelman. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 98:115-124.
- Xian, H., Q. Yang, L. Xiao, H.-M. Shen, and Y.-C. Liou. 2019. STX17 dynamically regulated by Fis1 induces mitophagy via hierarchical macroautophagic mechanism. *Nature communications*. 10:2059.
- Xiong, Z.M., J.Y. Choi, K. Wang, H. Zhang, Z. Tariq, D. Wu, E. Ko, C. LaDana, H. Sesaki, and K. Cao. 2016. Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria. *Aging cell*. 15:279-290.
- Xu, D., A. Farmer, G. Collett, N.V. Grishin, and Y.M. Chook. 2012. Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database. *Molecular biology of the cell*. 23:3677-3693.
- Zhang, H., L. Sun, K. Wang, D. Wu, M. Trappio, C. Witting, and K. Cao. 2016. Loss of H3K9me3 Correlates with ATM Activation and Histone H2AX Phosphorylation Deficiencies in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *PloS one*. 11:e0167454.
- Zhou, L., Z. Liu, S. Chen, J. Qiu, Q. Li, S. Wang, W. Zhou, D. Chen, G. Yang, and L. Guo. 2021. Transcription factor EB-mediated autophagy promotes dermal fibroblast differentiation and collagen production by regulating endoplasmic reticulum stress and autophagy-dependent secretion. *International journal of molecular medicine*. 47:547-560.