



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**“Obtención de fracciones subcelulares
provenientes de fibroblastos sanos y progeroides
tratados con Selinexor para análisis proteómicos”**

T E S I S

Que presenta

LIC. JESÚS YANIEL AYALA CAMEJO

Para obtener el grado de
**MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOLOGÍA CELULAR**

Director de tesis:

DR. EMILIANO FERNANDO NAVARRO GARCÍA

Ciudad de México

Julio, 2023

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Emiliano Fernando Navarro García

Investigador titular del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN

ASESORES

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Investigador titular del Departamento de Genética y Biología molecular,
CINVESTAV-IPN

Dr. Juan Pedro Luna Arias

Investigador titular del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Dr. Emiliano Fernando Navarro García. Durante el desarrollo de este proyecto el estudiante Jesús Yaniel Ayala Camejo contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (Conahcyt) a través de una beca de maestría con número de CVU 1156667.

AGRADECIMIENTOS

Durante el breve período de tiempo en el que se enmarca esta Tesis de Maestría no faltaron las personas que me brindaron su apoyo y sabiduría. Espero que en esta corta cuartilla pueda agradecerles formalmente a todos.

Naturalmente mis padres encabezan esta lista, sin su apoyo durante los últimos 27 años es muy probable que mi presente fuera muy distinto.

Agradezco al Dr. Navarro por recibirme en su laboratorio a sabiendas de que las bacterias no eran lo mío, por su guía durante la realización de esta tesis y por la paciencia que me brinda.

Agradezco al Dr. Bulmaro la oportunidad de poder trabajar en el área del envejecimiento junto a su grupo de investigación y al Dr. Juan Pedro por la asesoría brindada en los momentos pertinentes.

Agradezco a la M. en C. Lucía Chávez y a la M. en C. Jazmín Huerta, por sus consejos y enseñanzas durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al Sr. Israel Flores por su apoyo técnico en el laboratorio.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Landy, Jaime, Arturo, Carla por cada una de las experiencias que me compartieron, por la ayuda que me brindan cuando lo necesito y por los buenos momentos que compartí con ustedes. Agradezco la suerte que tuve de encontrar buenos compañeros como ustedes.

Agradezco también a mis compañeros del laboratorio del Dr. Bulmaro por recibirme como a uno más y brindarme toda su experiencia de trabajo con las células progeroides que solo ellos me podían ofrecer.

Aprovecho la oportunidad para agradecer a mis amistades que día a día contribuyen a que estudiar un postgrado sea un proceso más fácil y menos estresante, que acortan la distancia a nuestra isla y que fungen como familia en cada momento difícil.

A Mai, por llegar en el momento preciso y ser el complemento perfecto que no buscaba ni esperaba encontrar.

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 SÍNDROMES PROGEROIDES	1
1.1.1 <i>Laminopatías</i>	2
1.1.2 <i>Síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford</i>	3
1.2 TRÁFICO NUCLEAR.....	5
1.2.1 <i>Importación nuclear</i>	6
1.2.2 <i>Exportación nuclear</i>	8
1.2.3 <i>Exportina 1: estructura, función y su relación con el HGPS</i>	8
1.3 ANÁLISIS PROTEÓMICO	11
1.3.1 <i>Generalidades del análisis proteómico</i>	11
1.3.2 <i>El marcaje isobárico de los péptidos y la tecnología Orbitrap</i>	12
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 OBJETIVO GENERAL	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 CULTIVO CELULAR	17
5.3 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES NUCLEAR Y CITOPLASMÁTICA	17
5.4 WESTERN BLOT	17
5.5 INMUNOFLUORESCENCIA.....	18
5.6 ANTICUERPOS	18
5.7 ANÁLISIS PROTEÓMICO	19
5.8 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	20
6. RESULTADOS	21
6.1 EL JUEGO DE REACTIVOS NE-PER TM PERMITE LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES Y CITOPLASMÁTICOS PUROS.....	21
6.2 <i>CICLINA B1 ES RETENIDA EN EL NÚCLEO DE LOS FIBROBLASTOS SANOS PERO NO SE PUDO DETECTAR EN LOS EXTRACTOS CITOPLASMÁTICOS</i>	23
6.3 <i>ZO-2 TAMPOCO PUDO SER DETECTADA EN LOS EXTRACTOS CITOPLASMÁTICOS DE LOS FIBROBLASTOS SANOS</i>	25
6.4 <i>P53 ES RETENIDA EN EL NÚCLEO DE LOS FIBROBLASTOS SANOS Y PROGEROIDES CUANDO SON TRATADOS CON SELINEXOR</i>	26
7. DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIONES	32
9. PERSPECTIVAS	33
10. LITERATURA CITADA	34

Índice de Figuras

Figura 1: Proyección de la población mundial, 2022.....	1
Figura 2: Proceso de maduración de los productos del gen <i>LMNA</i> normal y mutado.....	5
Figura 3: Representación esquemática del exporte nuclear (izquierda) y del importe nuclear (derecha) mediado por carioferinas β a través del complejo del poro nuclear.	7
Figura 4: Estructura tridimensional de la exportina 1 (PDB: 7L5E).	9
Figura 5: Esquema del mecanismo de acción del Selinexor.	10
Figura 6: Diagrama esquemático del flujo de trabajo típico de un análisis mediante espectrometría de masas utilizando las etiquetas isobáricas TMT10plex™.....	13
Figura 7: El juego de reactivos NE-PER™ permite la obtención de fracciones citoplasmáticas y nucleares puras.	22
Figura 8: Ciclina B1 es retenida en el núcleo de los fibroblastos sanos pero no se pudo detectar en los extractos citoplasmáticos.	24
Figura 9: ZO-2 no pudo ser detectada en los extractos citoplasmáticos de los fibroblastos sanos.	26
Figura 10: P53 es retenida en el núcleo de los fibroblastos sanos y progeroides cuando son tratados con Selinexor.....	27

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
Cyt	Fracción citoplasmática
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DR	Dermopatía restrictiva
DTAF	5-(4,6-diclorotriazinil) aminofluoresceína
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GO	Ontología de genes
HGPS	Síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford
LC	Cromatografía líquida
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
m/z	Relación masa/carga
MEM	Medio esencial mínimo
MS	Espectrometría de masas
MS-MS	Espectrometría de masas en tándem
NES	Señal de exporte nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
NPC	Complejo del poro nuclear
Nuc	Fracción nuclear
PBS	Solución salina tamponada por fosfatos
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
TMT	Etiqueta de marcaje masivo
XPO1/CRM1	Exportina 1

Resumen

El síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford (HGPS) se caracteriza por un envejecimiento acelerado y prematuro que mimetiza las características propias del envejecimiento biológico. El origen genético más común de esta enfermedad radica en la mutación (C1824→T) en el gen *LMNA*, el cual codifica para las láminas A/C. Este cambio activa un sitio de *splicing* críptico que provoca la eliminación de 50 aminoácidos en la proteína mutada, también conocida como progerina. La progerina provoca múltiples alteraciones celulares que conducen a la senescencia celular y a un envejecimiento generalizado. Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró que en individuos con HGPS, la exportación de proteínas nucleares aumenta por la sobreexpresión de la exportina XPO1 y que el tratamiento de fibroblastos progeroides con Selinexor, un inhibidor específico de XPO1, normaliza la exportación nuclear y disminuye varias marcas de senescencia celular. Sin embargo, aún se desconoce qué proteínas están involucradas en la recuperación del fenotipo normal. Para responder esta interrogante, planeamos estudiar los sub-proteomas de las fracciones nuclear y citoplasmática de los fibroblastos progeroides cuando son tratados con Selinexor y en ausencia de este. En este trabajo implementamos una estrategia de fraccionamiento celular que nos permitió obtener extractos nucleares y citoplasmáticos con la pureza necesaria para estudios proteómicos. También se corroboró la eficacia del Selinexor para retener en el núcleo las proteínas con señal de exporte nuclear y se reforzó a p53 como un excelente candidato para comprobar el efecto de los inhibidores selectivos de exporte nuclear sobre el tráfico núcleo-citoplasmático. Una vez concluido, este estudio contribuirá a dilucidar los mecanismos moleculares que se encuentran afectados en individuos con HGPS, los cuales podrían extrapolarse a lo que sucede durante el envejecimiento fisiológico.

Abstract

Hutchinson-Gilford progeroid syndrome (HGPS) is characterized by accelerated and premature aging that mimics the characteristics of biological aging. The most common genetic origin of this disease lies in the mutation (C1824→T) in the LMNA gene, which codes for lamin A/C. This change activates a cryptic splicing site that causes the deletion of 50 amino acids in the mutated protein, also known as progerin. Progerin causes multiple cellular alterations that lead to cellular senescence and general aging. Recently, our work group demonstrated that in individuals with HGPS, the export of nuclear proteins is increased by the overexpression of the exportin XPO1 and that treatment of progeroid fibroblasts with Selinexor, a specific XPO1 inhibitor, normalizes nuclear export and decreases several brands of cellular senescence. However, it is still unknown which proteins are involved in the recovery of the normal phenotype. To answer this question, we planned to study the sub-proteomes of the nuclear and cytoplasmic fractions of progeroid fibroblasts when treated with and in the absence of Selinexor. In this work we implemented a cell fractionation strategy that allowed us to obtain nuclear and cytoplasmic extracts with the purity necessary for proteomic studies. The efficacy of Selinexor to retain proteins with a nuclear export signal in the nucleus was also confirmed, and p53 was reinforced as an excellent candidate to verify the effect of selective inhibitors of nuclear export on nuclear-cytoplasmic traffic. Once concluded, this study will contribute to elucidate the molecular mechanisms that are affected in individuals with HGPS, which could be extrapolated to what happens during physiological aging.

1. Introducción

1.1 Síndromes progeroides

El crecimiento poblacional mundial del último cuarto de siglo está marcado por un incremento exponencial del número de habitantes que superan los 65 años de vida (Fig. 1). Ante este escenario adquiere vital importancia el estudio del envejecimiento y sus enfermedades asociadas desde un punto de vista molecular y celular, con el fin de desarrollar tratamientos que mejoren la calidad de vida de los individuos geriátricos.

Mediante el empleo de modelos animales con tiempos de vida cortos se han logrado descifrar muchos de los procesos moleculares que subyacen el envejecimiento biológico (Kenyon et al., 1993; Vanhooren & Libert, 2013). En humanos, el envejecimiento se ha estudiado principalmente mediante la identificación de polimorfismos asociados con la extensión del tiempo de vida (Burtner & Kennedy, 2010). Otra aproximación interesante para comprender este fenómeno es el estudio de los síndromes progeroides.

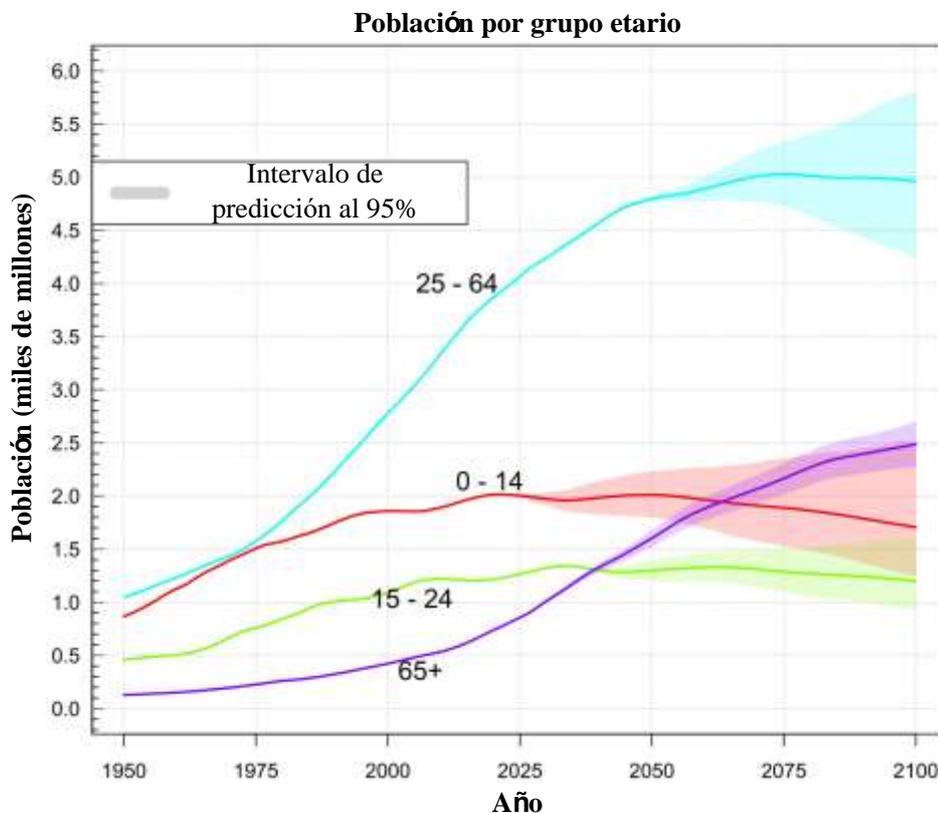


Figura 1: Proyección de la población mundial, 2022.

Modificado a partir de datos de la ONU (<http://population.un.org/wop>).

El término “síndrome progeroide” define a un grupo de enfermedades que reproducen, total o parcialmente, el envejecimiento biológico durante las edades tempranas del desarrollo (Navarro et al., 2006). Dentro de esta categoría se encuentran: el síndrome de Werner, el síndrome de Bloom y el síndrome de Cockayne, por solo citar algunos. Estos síndromes tienen un origen genético heterogéneo, siendo comunes las mutaciones puntuales y las deleciones dentro del marco de lectura (Universal Mutation Database, n.d.). Los principales mecanismos moleculares que se encuentran alterados en estos individuos son la reparación del ADN y la síntesis de las láminas nucleares A/C (Navarro et al., 2006).

1.1.1 Laminopatías

Los síndromes progeroides que presentan deficiencias en las láminas nucleares o en algunas de sus proteínas asociadas entran dentro del grupo de las laminopatías. Tal es el caso de la dermatopatía restrictiva (DR), una de las más severas dentro del espectro de gravedad de estas enfermedades. Los pacientes con DR son diagnosticados durante la etapa fetal y debido al grado de letalidad de esta patología mueren a las pocas semanas de haber nacido (Witt et al., 1986). Aunque aún se desconocen con precisión las causas genéticas de la DR, Navarro y colaboradores (2004) encontraron que siete de los nueve pacientes que estudiaron eran heterocigóticos para la mutación c.1085_1086insT (Phe361fsX379) en el gen *ZMPSTE24* mientras que los dos restantes poseían las sendas mutaciones IVS11 + 1G>A y c.1824C>T en el gen *LMNA*. A pesar de la heterogeneidad genética presente en estos casos, en todos se afectó de alguna manera la síntesis y/o el procesamiento de las láminas A.

El gen *ZMPSTE24* codifica para la proteína ZMPSTE24/FACE1, única metaloproteasa conocida que participa en la maduración postraduccional de las láminas A (Bergo et al., 2002). La inserción de una timina en la posición 1085 provoca un cambio en el marco de lectura que introduce un codón de terminación y genera la síntesis de una metaloproteasa no funcional. Es por ello que cuando la mutación está presente en homocigosis no se detectan láminas A maduras (Navarro et al., 2006).

El gen *LMNA* codifica para las láminas nucleares A/C, las cuales probablemente tienen un papel fundamental en la replicación y transcripción del ADN (Shumaker et al., 2003). Las láminas A también pueden entrelazarse entre ellas y formar junto con los filamentos de láminas B la lámina nuclear, la cual aporta forma y estabilidad a la envoltura nuclear (Tenga & Medalia, 2020). Las mutaciones IVS11 + 1G>A y c.1824C>T generan las variantes truncadas lámina A Δ 90 y lámina A Δ 50 respectivamente. La variante lámina A Δ 50, también conocida como progerina, es la causa más común del síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford (Navarro et al., 2004).

1.1.2 Síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford

El síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford (HGPS, del inglés *Hutchinson-Gilford progeroid syndrome*) o progeria es una enfermedad extremadamente rara con una incidencia estimada al nacer de 1 cada 4 millones de nacidos (Hennekam, 2006). En el 2014, Gordon *et al.* reportaban una prevalencia de la enfermedad en 1 cada 20 millones de habitantes, y en la actualidad se conoce que afecta a 141 individuos. Los pacientes con HGPS viven en promedio unos 14.5 años, el cual es considerablemente menor de lo estimado para un individuo sano. Durante este tiempo los pacientes progeroides desarrollan un fenotipo similar al de un individuo envejecido y al igual que estos, entre sus principales causas de muerte están las enfermedades cardiovasculares y los accidentes cerebrovasculares (Kumar Sinha et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, el origen genético de esta enfermedad radica en la mutación c.1824C>T del gen *LMNA* (Eriksson et al., 2003). Lo anterior es cierto para el 90% de los casos reportados mientras que el resto poseen otras mutaciones en el exón 11 o intrón 11 que también resultan en la síntesis de progerina (L. B. Gordon, 2019). A diferencia de los casos de DR donde la mutación c.1085_1086insT en el gen *ZMPSTE24* es heredada, la mutación c.1824C>T en el gen *LMNA* presente en los individuos con progeria es adquirida *de novo*. En teoría, este cambio de base debería generar una mutación silente en la Gly608 (G608G), sin embargo, lo que tiene lugar es la activación de

un sitio de *splicing* críptico que conlleva a pérdida de 150 pb en el transcrito correspondiente y de 50 aminoácidos en la proteína mutada (Ahmed et al., 2018).

Los aminoácidos ausentes en la progerina están comprendidos entre las posiciones Gln606 y Thr654. Dentro de este grupo de aminoácidos se encuentra uno que es crítico para el posterior procesamiento de las pre-láminas A, la lisina 647. Esta posición constituye el sitio de corte de la metaloproteasa ZMPSTE24, la cual elimina el anclaje de las pre-láminas A en la membrana nuclear interna y permite su asociación con otras láminas A (Coutinho et al., 2009). La síntesis de progerina es tóxica para la célula, debido a que provoca cambios en la morfología nuclear (Goldman et al., 2004), alteraciones en el control de la expresión genética (Columbaro et al., 2005) y afecta el tráfico nuclear (Kelley et al., 2011). Un dato que hace interesante el estudio del rol de la progerina es su presencia en los individuos sanos envejecidos (Scaffidi & Misteli, 2005), es por ello que los tratamientos para aminorar los efectos tóxicos de esta proteína podrían ser interesantes para retardar el envejecimiento biológico en humanos.

Los tratamientos anti-progeria desarrollados hasta la fecha están enfocados principalmente en la inhibición de la síntesis del grupo farnesilo, a través del cual la progerina permanece unida a la membrana nuclear interna, o en el bloqueo de la farnesilación (Kieran et al., 2014). El lonafarnib, único fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de esta enfermedad, es un inhibidor de la farnesiltransferasa (FTasa) que impide el anclaje de la pre-lámina A en la membrana nuclear interna, reduciendo de esta manera la toxicidad de la progerina (Kieran et al., 2014).

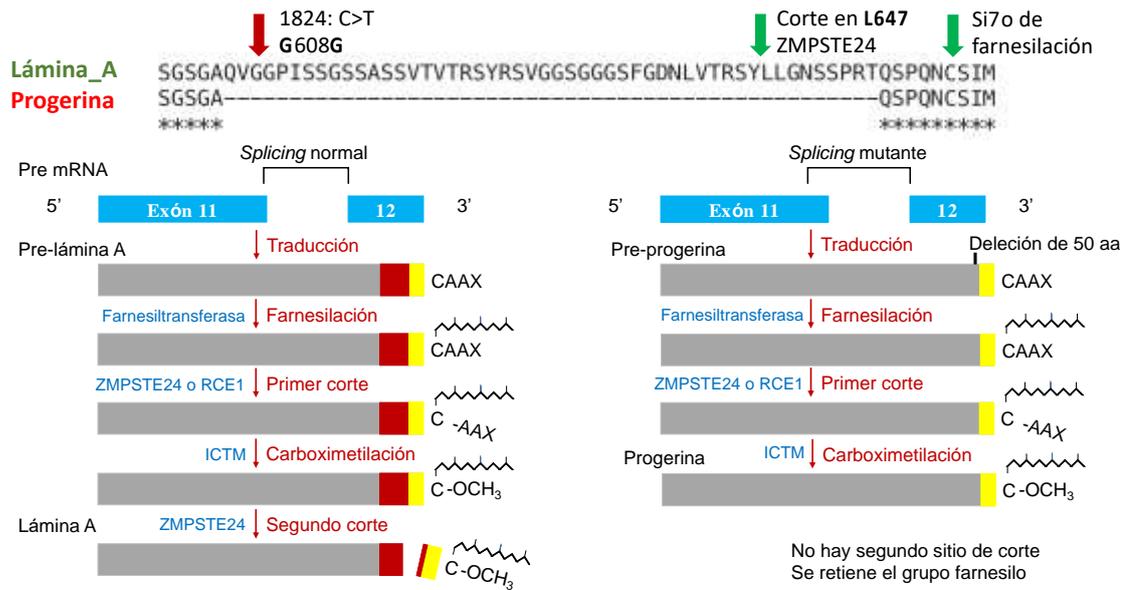


Figura 2: Proceso de maduración de los productos del gen *LMNA* normal y mutado.

Modificado de Gordon y colaboradores (2018).

En la búsqueda de nuevos fármacos para tratar esta enfermedad llama la atención el everolimus, un inhibidor de mTOR capaz de reducir la síntesis de progerina, sin embargo, este aún se encuentra en fase de ensayos clínicos (NCT02579044). En la literatura se plantea además el posible uso de microARNs o de la tecnología CRISPR/Cas9 para lograr efectos a largo plazo, pero los efectos fuera de foco constituyen un riesgo que deben ser ampliamente estudiados en modelos *in vitro* e *in vivo* antes de ser aplicados en la clínica (Harhour et al., 2018). Otra aproximación que podría ser tomada en cuenta en los próximos años es el uso de inhibidores del transporte nuclear, ya que se demostró que en fibroblastos progeroides hay alteraciones del tráfico nuclear causados por la expresión de la progerina (García-Aguirre et al., 2019).

1.2 Tráfico nuclear

En los organismos eucariontes el material genético está separado físicamente del resto de los organelos mediante la envoltura nuclear. En apariencia, este sistema de doble membrana podría constituir una barrera al control celular que se ejerce desde el núcleo, sin embargo, las discontinuidades que presenta en los poros nucleares permiten la comunicación entre el núcleo y el citoplasma celular (Alberts et al., 2015).

El complejo del poro nuclear (NPC, del inglés *Nuclear Pore Complex*) es una estructura macromolecular de unos 125 MDa formada principalmente por proteínas denominadas nucleoporinas (D'Angelo & Hetzer, 2006). A través de este se establece un flujo núcleo-citoplasma que está regulado por el tamaño molecular. Las moléculas menores a los 40 kDa pueden difundir libremente mientras que aquellas que posean un tamaño superior deben asociarse previamente con una carioferina β (Lin & Hoelz, 2019). Las carioferinas β son receptores de tráfico nuclear que median la entrada y salida de proteínas y nucleoproteínas hacia y desde el núcleo (Fig. 3) (Monecke et al., 2014). En las células humanas se han descrito 19 carioferinas, las cuales incluyen receptores de importe denominadas importinas, receptores de exporte denominados exportinas y carioferinas bidireccionales que poseen ambas funciones (Fung & Chook, 2014).

1.2.1 Importación nuclear

Las proteínas nucleares y las citoplasmáticas se sintetizan en los ribosomas libres del citoplasma celular. El hecho de que ambos *pools* proteicos compartan el mismo mecanismo de síntesis supondría un problema para la célula si esta no fuera capaz de diferenciarlos. Lo anterior no ocurre debido a que las proteínas nucleares poseen una señal de localización nuclear (NSL, del inglés *Nuclear Localization Signal*) que está ausente en las proteínas citoplasmáticas (Gerace, 1992). Es importante señalar que algunas proteínas sin NLS pueden entrar al núcleo mediante su asociación con otra proteína que sí la posea. No existe una secuencia consenso para la NSL, pero en todos los casos esta posee una secuencia de aminoácidos básicos que puede ser continua (monopartita) o estar fragmentada en dos secuencias más pequeñas (bipartita). Estas secuencias pueden ser reconocidas directamente por importinas β o requerir de importinas α , las cuales funcionan como moléculas adaptadoras (Y. M. Chook & Süel, 2011).

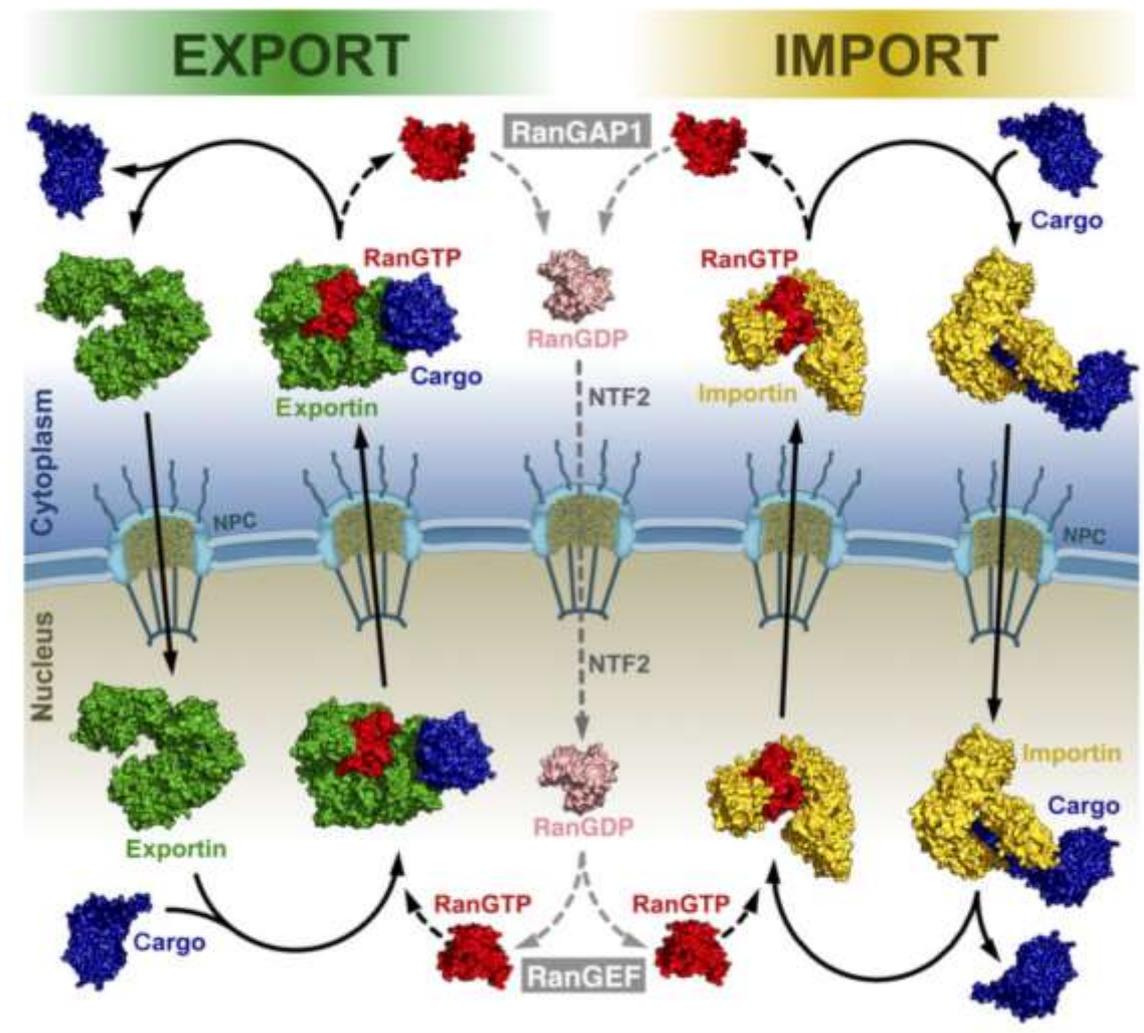


Figura 3: Representación esquemática del transporte nuclear (izquierda) y del transporte nuclear (derecha) mediado por carioferinas β a través del complejo del poro nuclear.

Tomado de Monecke y colaboradores (2014).

En la vía de importación nuclear clásica, la importina α reconoce a través de sus motivos armadillo las NLSs presentes en la proteína cargo y mediante su dominio de unión a carioferinas β se une a la importina β . De esta manera se forma un complejo importina α –importina β –proteína cargo, que se transporta al nucleoplasma (Marfori et al., 2011). Para que este complejo se disocie y se libere la molécula cargo es necesaria la unión de Ran, una GTPasa pequeña perteneciente a la superfamilia de Ras (Y. Chook & Blobel, 2001). La interacción de RanGTP con la importina α provoca un cambio en su dominio de unión a carioferinas β que tiene la doble función de separar el heterodímero α/β y a la molécula cargo de la importina α . En este proceso participan además la

nucleoporina Nup50 y el receptor de exporte para la importina α CAS/RanGTP (Lange et al., 2007).

1.2.2 Exportación nuclear

A grandes rasgos el exporte nuclear es muy similar al importe, se requiere de una carioferina β , se utiliza el gradiente de Ran y existe una señal en la molécula cargo que es reconocida por el receptor de tráfico nuclear. La señal de exportación nuclear (NES, del inglés *Nuclear Export Signal*) contiene una secuencia que es rica en aminoácidos hidrofóbicos como se puede apreciar en la siguiente secuencia consenso: Φ 1-X(2,3)- Φ 2-X(2,3)- Φ 3-X- Φ 4 (Φ : Leu, Ile, Val, Phe o Met y X: cualquier otro aminoácido) (Fung & Chook, 2014). Sin embargo, esta secuencia se encuentra en la mayoría de las proteínas que contienen una hélice α , por lo que se piensa que en el exporte nuclear deben estar involucrados otros factores (Dong et al., 2009).

El exporte nuclear inicia con el reconocimiento de la molécula cargo por parte del receptor de tráfico nuclear. Para que este complejo pueda ser exportado requiere la unión de RanGTP (Fig. 3). En el citoplasma, RanGAP1 estimula la actividad GTPasa de Ran y provoca la separación del complejo que culmina con la liberación de la molécula cargo (Monecke et al., 2014). Una diferencia importante respecto al importe nuclear es que de las ocho exportinas descritas solamente una es capaz de reconocer la NES mientras que varias de las 10 importinas conocidas reconocen la NLS (Tran et al., 2007). El transporte de las casi 400 proteínas con un dominio NES conocido tiene lugar a través de la exportina 1 (Fung et al., 2021).

1.2.3 Exportina 1: estructura, función y su relación con el HGPS

La exportina 1 (XPO 1/CRM1) posee 20 repetidos HEAT, los cuales generalmente están formados por dos hélices antiparalelas A y B que delimitan los lados convexos (externo) y cóncavos (interno) de la proteína respectivamente (Fig. 4) (Dong et al., 2009). De esta manera, mientras las hélices A interactúan con los repetidos de fenilalanina-glicina presentes en las nucleoporinas durante su paso por el NPC las hélices B interactúan con RanGTP (Monecke et al., 2014).

A diferencia de otras exportinas como CAS/Cse1p o de las importinas β , la estructura de la XPO1 posee pocos giros superhelicoidales y se pliega para formar una estructura tipo toroide (Monecke et al., 2009).

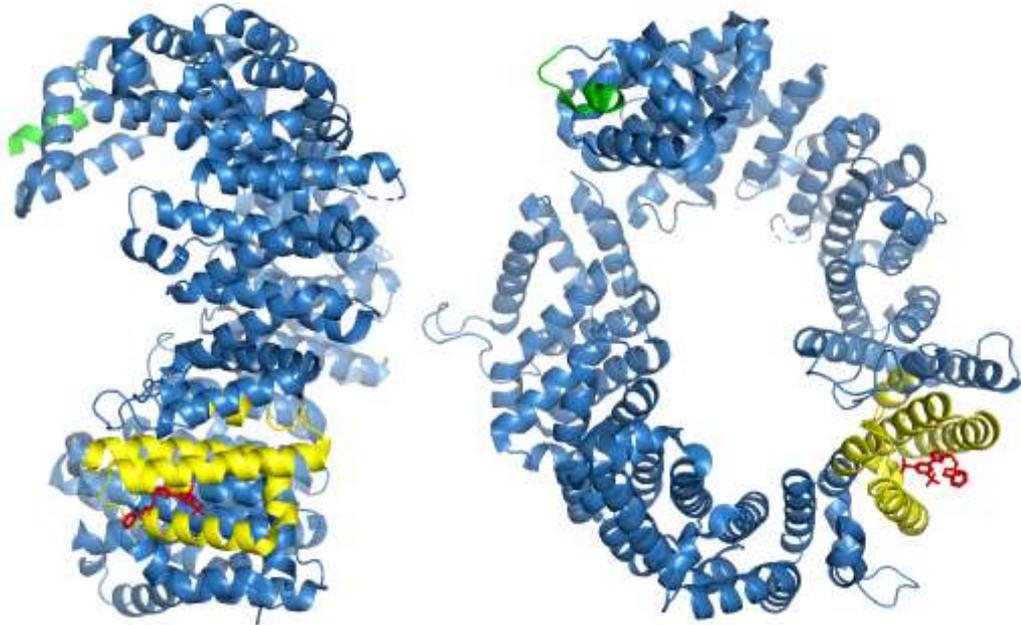


Figura 4: Estructura tridimensional de la exportina 1 (PDB: 7L5E). Se muestra el extremo amino (verde), los motivos HEAT 11 y 12 (amarillo) y el Selinexor (rojo).

Como se mencionó anteriormente, la XPO1 es la única exportina capaz de reconocer la NES y por tanto de transportar estas proteínas hacia el citoplasma. La XPO1 también participa en el tráfico de las subunidades ribosomales 40S y 60S, esta última a través de la proteína adaptadora Nmd3p (Zemp & Kutay, 2007) y de los ARN nucleares pequeños que tengan la capucha de 7-metil-guanosina a través de la proteína PHAX (Ohno et al., 2000). En cualquiera de los casos, la interacción de la XPO1 con el cargo se da a través de un surco hidrofóbico que se forma entre los repetidos HEAT 11 y HEAT 12. En este surco se localiza la lisina 568, que funciona como un filtro selectivo que bloquea la unión de péptidos que no posean una NES (Fung et al., 2017).

Al igual que el resto de las carioferinas β , XPO1 requiere del gradiente de Ran para mantener un tráfico nuclear estable, por lo que la interrupción de este se traduce en una alteración de la comunicación núcleo-citoplasmática. Tal es el caso de los pacientes con el HGPS, donde la sobreexpresión de la progerina disminuye la relación núcleo/citoplasma de Ran e inhibe el importe de la

nucleoporina TPR (del inglés, *Translocated Promoter Region*) (Kelley et al., 2011). La progerina también afecta el exporte nuclear ya que estimula la sobreexpresión de la XPO1 y altera la distribución núcleo-citoplasmática de las proteínas (García-Aguirre et al., 2019). Esta sobreexpresión de la XPO1 fue observada en diversos tipos de cáncer, lo cual estimuló el desarrollo de inhibidores específicos contra la XPO1 (Fig. 5) (Podar et al., 2020).

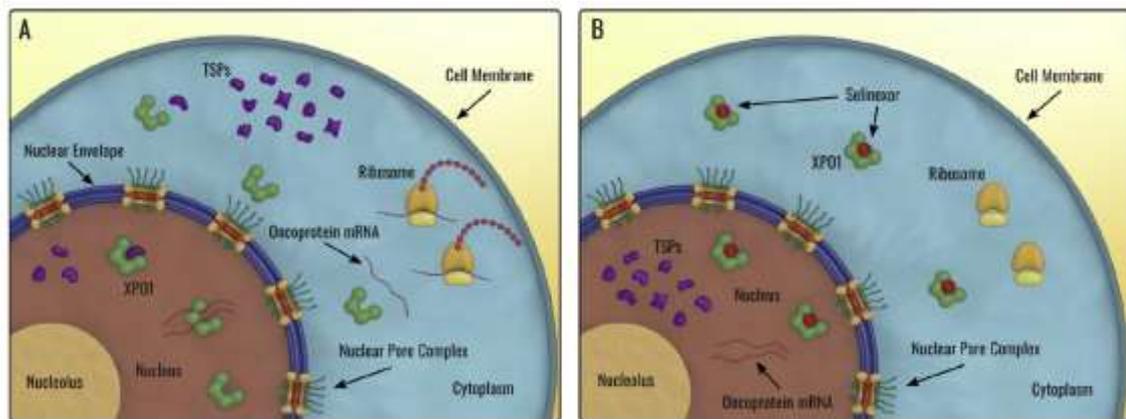


Figura 5: Esquema del mecanismo de acción del Selinexor.

Las células malignas que sobreexpresan la XPO1 fueron: (A) no tratadas con Selinexor, (B) tratadas con Selinexor. Tomado de Benkova y colaboradores (2021).

La leptomicina B fue uno de los primeros fármacos descubiertos con la capacidad de inhibir selectivamente la XPO1. Este se une y alquila a la cisteína 528, lo cual genera un cambio conformacional en la XPO1 que le impide interactuar con otras proteínas (Kudo et al., 1999). A partir de estos datos se diseñaron inhibidores sintéticos que reconocen específicamente a XPO1 y que poseen menor toxicidad que la leptomicina B (Lapalombella et al., 2012). Tal es el caso del Selinexor, el único inhibidor selectivo del exporte nuclear aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA, por sus siglas en inglés). De igual manera que la leptomicina B el Selinexor se une a la XPO1 en la Cys528, pero en este caso la interacción es reversible. En la actualidad, este fármaco se utiliza para tratar pacientes con mieloma múltiple y con linfoma difuso de células B grandes refractario (Benkova et al., 2021) pero su uso podría ser extendido a otras patologías no relacionadas que involucren la sobreexpresión de XPO1.

1.3 Análisis proteómico

1.3.1 Generalidades del análisis proteómico

La proteómica se ocupa del estudio sistemático y exhaustivo de todas las proteínas presentes en una muestra biológica, ya sea una célula, tejido u organismo en particular (Gulcicek et al., 2005). Esta permite el análisis y la caracterización de las proteínas, sus funciones, interacciones y modificaciones, así como la comprensión del papel que desempeñan estas moléculas en los procesos biológicos. Para la identificación y cuantificación de las proteínas, los estudios proteómicos se basan fundamentalmente en la espectrometría de masas, la cual calcula la relación masa/carga (m/z) de los iones generados a partir de las proteínas o los péptidos derivados de ellas (Freeman & Hemby, 2004).

Para identificar las proteínas presentes en una muestra, por lo general se sigue alguna de las siguientes aproximaciones: *top-down* o *bottom-up*. La primera de ellas identifica a las proteínas intactas, lo cual permite obtener información sobre sus posibles modificaciones post-traduccionales (Cai et al., 2016). Dicha estrategia tiene como desventaja el problema que supone el amplio rango dinámico de la muestra, de ahí que las proteínas con baja abundancia no sean identificadas. Esta problemática es resuelta en la proteómica *bottom-up*, ya que la digestión enzimática previa, a la que es sometida la muestra, incrementa la cobertura del análisis y permite la identificación de un gran número de proteínas a partir de los péptidos que la conforman (Miller & Smith, 2023).

En sus inicios, los análisis proteómicos eran meramente cualitativos y solamente aportaban información sobre la identidad de las proteínas que estaban presentes en la muestra. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías como el marcaje metabólico o químico de las muestras permitieron la cuantificación absoluta y/o relativa de las proteínas (Moulder et al., 2018; Rigbolt & Blagoev, 2010). En el caso del marcaje químico destacan dos tecnologías que son muy semejantes en principio, la tecnología iTRAQ (del inglés, *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) y la tecnología TMT (del inglés, *Tandem Mass Tagging*). En ambos casos se utiliza un conjunto de etiquetas isobáricas con distintos isótopos estables de masas similares que permiten el marcaje de los péptidos (Bachor et al., 2019).

1.3.2 El marcaje isobárico de los péptidos y la tecnología Orbitrap

Los juegos de reactivos TMT para etiquetado de masas isobárico permiten la identificación y el análisis cuantitativo de proteínas multiplexadas mediante espectrometría de masas en tándem. Cada etiqueta TMT se une covalentemente a los péptidos en las muestras después de la digestión proteolítica. Luego, las muestras etiquetadas se combinan y se someten a análisis mediante espectrometría de masas (Fig. 6). Durante la fragmentación de los péptidos en el espectrómetro de masas, las etiquetas TMT generan fragmentos con masas características que permiten la cuantificación de los péptidos y, por lo tanto, de las proteínas a las que pertenecen.

El número de muestras que se pueden analizar simultáneamente depende de la cantidad de etiquetas isobáricas que posea el kit. Por ejemplo, con el kit TMT10-plex que posee diez etiquetas isobáricas es posible cuantificar simultáneamente hasta diez muestras diferentes, lo que permite comparaciones entre diferentes condiciones experimentales, como muestras de control y tratadas, o diferentes tipos de células o tejidos (Viner, 2015). Esto ahorra tiempo y costos en comparación con el etiquetado individual de cada muestra y el análisis por separado. Además, el uso de etiquetas isobáricas minimiza las variaciones técnicas y proporciona una mayor precisión en la cuantificación de proteínas (Moulder et al., 2018). En adición a las ventajas antes mencionadas, el sistema TMT está optimizado para su uso con plataformas de Thermo Scientific MS/MS de alta resolución, como los instrumentos Q Exactive, Orbitrap Elite™ y Orbitrap Fusion™ Tribrid™ y que el análisis de datos es totalmente compatible con Proteome Discoverer™ 1.4.

El desarrollo de metodologías de marcaje, tanto metabólicas como químicas, no hubiera tenido un impacto tan notable sobre el avance de la proteómica si no se hubiesen implementado nuevas tecnologías que permitieran analizar a mayor profundidad una muestra biológica. Tal es el caso de la tecnología Orbitrap. Los analizadores de masas Orbitrap están constituidos de dos electrodos, uno externo en forma de barril y otro interno en forma de huso que genera un campo electrostático (Hu et al., 2005). Este diseño permite que los electrones giren múltiples veces alrededor del electrodo interno, de manera que en cada vuelta son detectados y con ello se refuerza la presión del análisis.

Para incrementar el poder de resolución, esta tecnología puede fusionarse con otros analizadores de masas como las trampas de iones lineares y los cuadrupolos (Eliuk & Makarov, 2015).

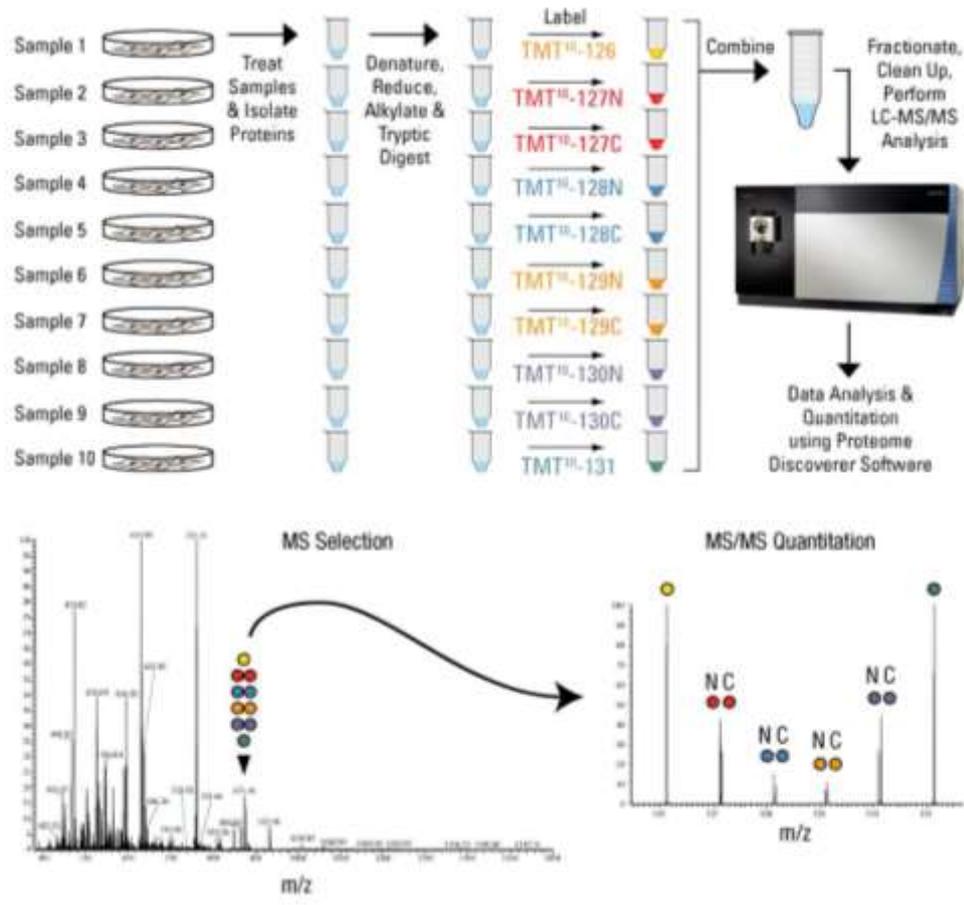


Figura 6: Diagrama esquemático del flujo de trabajo típico de un análisis mediante espectrometría de masas utilizando las etiquetas isobáricas TMT10plex™.

Tomado de ThermoFisher (<https://www.thermofisher.com>).

2. Justificación

Previamente se demostró que la inhibición del transporte nuclear causada por Selinexor alivia el fenotipo envejecido que caracteriza a los fibroblastos progeroides. Sin embargo, aún se desconoce cómo la modulación farmacológica de la exportina 1 es capaz de recuperar el fenotipo sano. Es por ello que se hace pertinente estudiar la relocalización de las proteínas bajo los efectos del Selinexor. Para este fin es conveniente emplear un método que permita el tamizaje y la cuantificación de un gran número de proteínas simultáneamente. Con base en lo anterior, en el presente estudio se empleará el análisis proteómico cuantitativo para determinar los mecanismos celulares que están involucrados en el restablecimiento de un fenotipo normal cuando los fibroblastos progeroides son tratados con Selinexor.

3. Hipótesis

La inhibición del transporte nuclear causada por Selinexor podría relocalizar alguna(s) proteína(s) clave(s) involucrada(s) en los mecanismos que conllevan al envejecimiento celular.

4. Objetivos

4. 1 Objetivo general

Analizar los sub-proteomas de las fracciones nuclear y citoplasmática obtenidos a partir de fibroblastos de progeria tratados o no con Selinexor.

4. 2 Objetivos específicos

1. Implementar el fraccionamiento celular utilizando el juego de reactivos NE-PER™.
2. Corroborar el efecto del Selinexor en los fibroblastos sanos y progeroides.
3. Obtener las fracciones nuclear y citoplasmática provenientes de los fibroblastos progeroides tratados con Selinexor.

5. Materiales y métodos

5.1 Cultivo celular

Se utilizaron fibroblastos de una paciente con HGPS (AG11513, *Coriell Cell Repository*) que posee la mutación c. 1824 C>T en el gen *LMNA* y de un individuo aparentemente sano (GM03440, *Coriell Cell Repository*). Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino (10% v/v), aminoácidos esenciales y no esenciales, penicilina (50 U/ml) y estreptomina (50 U/ml). Las células se trataron con 60 nM de Selinexor (KPT-330, *Kariopharm Therapeutics Inc*) o con vehículo durante 72 h.

5.3 Obtención de las fracciones nuclear y citoplasmática

El fraccionamiento se realizó utilizando el juego de reactivos de extracción nuclear y citoplasmática NE-PER™ (*ThermoFisher Scientific, Inc.*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se cuantificaron mediante el método de Bradford. La integridad de las proteínas en ambas fracciones se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras mientras que la posible contaminación entre los extractos se determinó mediante *Western blot*, utilizando marcadores residentes de cada fracción.

5.4 Western blot

Las proteínas de las fracciones nuclear y citoplasmática se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS y se transfirieron a una membrana de PVDF (Immubilon P^{SQ}, Millipore). Se bloqueó con leche descremada al 5% (m/v) disuelta en PBS-T durante 30 min a temperatura ambiente en agitación. Se retiró el exceso de leche y se incubó con los anticuerpos primarios: anti-ciclina B1, anti-GAPDH, anti-lámina B1, anti-ZO-2, anti-p53 y anti-nucleolina durante 16 h a 4°C en agitación. Se lavó tres veces con PBS-T durante 10 min en agitación fuerte y se incubó con los anticuerpos anti-isotipos correspondientes durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. La membrana se lavó otras tres veces con PBS-T durante 10 min en agitación fuerte. Las proteínas se detectaron con Immubilon™ (Merck) y la reacción se visualizó utilizando el equipo LI-COR Odyssey®.

5.5 Inmunofluorescencia

Los efectos del Selinexor sobre la localización de proteínas nucleares se comprobó mediante microscopía confocal. Para ello las células se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 35 mm y se mantuvieron en las condiciones de cultivo antes mencionadas. Se trataron con Selinexor (60 nM) durante 24 h. Se fijaron con paraformaldehído (4% v/v) durante 20 min y se lavaron tres veces con abundante PBS. Se permeabilizaron con tampón IF (Tritón 0.1%, SDS 0.02% y BSA 10 mg/ml) durante 10 min y se lavaron otras tres veces. Se incubó con los anticuerpos primarios anti-ciclina B1 y anti-p53 a 4°C en cámara húmeda durante 16 h. A continuación, se realizaron ciclos de tres lavados con PBS e incubación con diferentes reactivos. Primero se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-ratón biotinilado en el caso de ciclina B1 y anti-conejo conjugado a FITC durante 1 h a temperatura ambiente y luego con DAPI (1:500) y DTAF (1:500) en caso de ser necesario. Se lavó otras tres veces y se montaron en un portaobjetos con 5 µl de VectaShield. Las muestras se analizaron mediante microscopía confocal utilizando un microscopio Leica TCS SP8.

5.6 Anticuerpos

Para la realización de los ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Tabla 1: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados

Proteína diana	No. de catálogo	Casa comercial	Dilución
GAPDH	sc-32233	<i>Sta. Cruz Biotechnology</i>	WB 1:4000
Lámina B1	ab-16048	Abcam	WB 1:4000
Ciclina B1	sc-752	<i>Sta. Cruz Biotechnology</i>	WB 1:2000 IF 1:50
ZO-2	2847	<i>Cell Signaling</i>	WB 1:750
P53	sc-6243	<i>Sta. Cruz Biotechnology</i>	WB 1:2000 IF 1:50
Nucleolina	—	—	WB 1:2000
IgG de ratón	G-21040	Invitrogen	WB 1:25000
IgG de conejo	A16104	Invitrogen	WB 1:25000

IgG de ratón	115-095-003	Jackson ImmunoResearch	IF 1:50
IgG de conejo	111-065-003	Jackson ImmunoResearch	IF 1:500

5.7 Análisis proteómico

5.7.1 Digestión enzimática, marcaje y fraccionamiento de la muestra

Las proteínas alquiladas y reducidas provenientes del SDS-PAGE se digerirán con tripsina (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade*, Promega, Madison WI, EEUU) en una proporción de tripsina:proteína de 1:30 (m/m) durante toda la noche a 37°C. Se añadirá una solución de tripsina recién preparada a 1:60 (m/m) durante 4 h a 37°C. Las muestras de péptidos se marcarán con reactivos TMT 10-plex de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU) y se agruparán para su posterior procesamiento. Para el análisis a través de nano-LC-MS/MS las muestras se fraccionarán usando cartuchos de intercambio catiónico (SCX) (Thermo Scientific, Bellefonte, PA, EE. UU.), se desalinizarán con cartuchos C18 y se secarán en un concentrador de vacío CentriVap (Labconco, Kansas, Missouri, EEUU).

5.7.2 LC-MS/MS

Las muestras se analizarán mediante nano-LC-MS/MS utilizando un espectrómetro de masas *Orbitrap Fusion Tribrid* (Thermo-Fisher Scientific, San Jose, CA) acoplado a una fuente de nanoiones *EASY spray* (Thermo-Fisher Scientific, San Jose, CA, EEUU). Se reconstituirán con ácido fórmico al 0.1% en agua de grado LC-MS (Disolvente A) y se inyectarán 20 µL en una columna trampa nanoviper C18 (3 µm, 75 µm x 2 cm, Dionex) a una tasa de flujo de 3 µL/min en un sistema UltiMate 3000 RSLC (Dionex, Sunnyvale, CA). Después de este procedimiento, se separarán en una columna *EASY spray* C-18 RSLC (2 µm, 75 µm x 25 cm), usando un gradiente de 100 min con un flujo de 300 nL/min, y usando el solvente A junto con ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo al 90 % (Disolvente B). Se utilizará el siguiente gradiente: 10 min de disolvente A, 7-20 % de disolvente B en 25 min, 20 % de disolvente B durante 15 min, 20-25 % de disolvente B durante 15 min, 25-95 % de disolvente B durante 20 min y 8

min de disolvente A. El espectrómetro de masas se usará en modo de iones positivos con un voltaje de nanopulverización establecido en 3,5 kV y una temperatura de la fuente de 280°C. Los espectros se procesarán con el software *Proteome Discoverer*TM 2.1 (PD, Thermo Fisher Scientific Inc.) y las búsquedas se realizarán con el software Mascot 2.4.1 (Matrix Science Inc., Boston, MA, EE. UU.), SQUEST HT y los motores de búsqueda de la base de datos MS AMANDA.

5.8 Análisis bioinformático

El análisis proteómico cuantitativo mediante marcaje isobárico genera una matriz de datos que contiene, entre otros parámetros, las proteínas identificadas y el radio tratamiento/control de cada una. A partir de estos datos se realizará un enriquecimiento de términos GO empleando el servidor web: *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID por sus siglas en inglés; <https://david-d.ncifcrf.gov/>). Este análisis nos permitirá identificar cuáles proteínas se encuentran sub o sobre-representadas en cada fracción celular cuando las células se tratan con Selinexor. Para estudiar las vías biológicas en las que están insertadas estas proteínas se realizará un enriquecimiento de vías en la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG del inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <https://www.genome.jp/kegg/>). Por último, estudiaremos las posibles relaciones entre las proteínas que por alguna razón sean relevantes para este trabajo utilizando la base de datos STRING (<https://string-db.org/cgi/input.pl>).

6. Resultados

6.1 *El juego de reactivos NE-PER™ permite la obtención de extractos nucleares y citoplasmáticos puros*

Para determinar cuáles proteínas estaban siendo retenidas en el núcleo bajo los efectos del Selinexor era necesario separar la fracción nuclear de la fracción citoplasmática. Para ello empleamos el juego de reactivos NE-PER™. Este contiene un conjunto de tampones de lisis y detergentes que permiten la ruptura escalonada de las células, de manera que se pueda separar el citoplasma de los núcleos intactos antes de proceder a la extracción nuclear.

El fraccionamiento celular se realizó a partir de un millón de células siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, se determinó la posible contaminación cruzada entre las fracciones mediante inmunodetección en fase sólida utilizando las proteínas residentes de núcleo y citoplasma, lámina B1 y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, por sus siglas en inglés) respectivamente. La fracción citoplasmática obtenida no se contaminó con proteínas nucleares mientras que la fracción nuclear si contuvo proteínas citoplasmáticas (Fig. 7A).

Esta contaminación constituía una limitante para determinar los posibles blancos indirectos del Selinexor. Lo anterior se debe a que las proteínas con localización núcleo-citoplasmática que no sean afectadas por el fármaco podrían aumentar su concentración nuclear como resultado de la contaminación y constituirían falsos positivos. Por otra parte, dentro de las proteínas que si son retenidas en el núcleo por el Selinexor, la contaminación impediría conocer cuáles son más susceptibles a los efectos del fármaco.

Para reducir la contaminación se incorporaron al protocolo original dos ciclos consecutivos de lavado y centrifugado después de obtener la fracción citoplasmática y antes de lisar los núcleos. Esto nos permitió disminuir la contaminación entre las muestras hasta el punto de no ser detectable en inmunodetecciones en fase sólida (Fig. 7B).

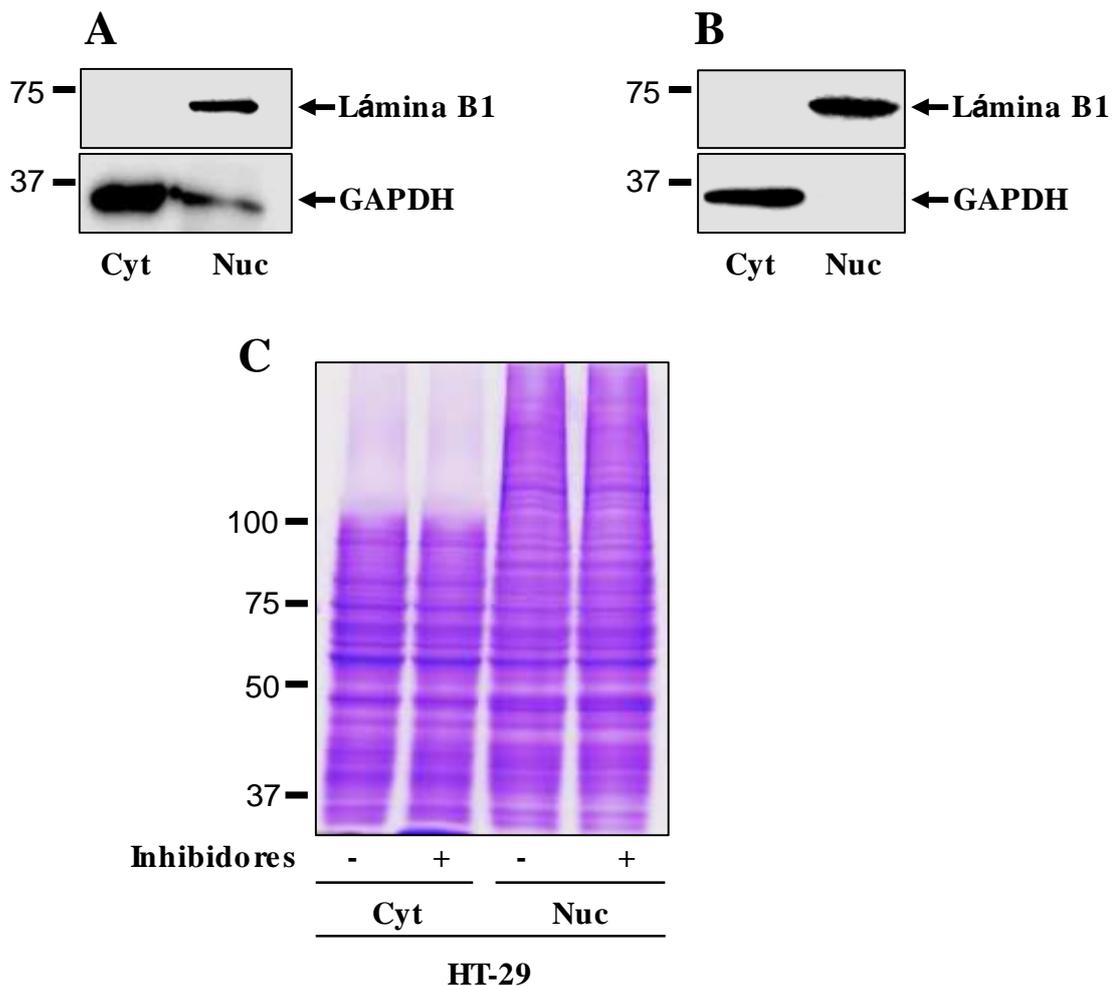


Figura 7: El juego de reactivos NE-PER™ permite la obtención de fracciones citoplasmáticas y nucleares puras.

(A) Ensayo de *Western blot* para determinar la posible contaminación entre las fracciones nucleares y citoplasmáticas cuando los extractos son obtenidos siguiendo las instrucciones del fabricante. (B) *Western blot* de las fracciones nucleares y citoplasmáticas cuando se incorporan dos pasos de lavado con PBS y centrifugado antes de lisar los núcleos a las instrucciones del fabricante. (C) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de las fracciones nucleares y citoplasmáticas cuando son obtenidas en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas. Cyt: Fracción citoplasmática, Nuc: Fracción nuclear.

La aproximación proteómica que vamos a realizar involucra la obtención de péptidos mediante la digestión triptica de las proteínas, por lo que otro aspecto a tener en cuenta a la hora de preparar las muestras era la calidad de las fracciones. Para evitar la degradación proteica causada por las proteasas presentes en la muestra generalmente se utilizan inhibidores de proteasas, sin embargo, se sabe que la presencia de inhibidores de proteasas en la muestra

puede afectar la identificación de las proteínas (Clifton et al., 2011) . Como no utilizamos inhibidores de proteasas durante la obtención de los extractos, teníamos que asegurar que las muestras no estaban degradadas y que eran apropiadas para análisis de masas.

Para comprobar que las muestras no se estaban degradando realizamos dos fraccionamientos, en unos de ellos añadimos inhibidores de proteasas a los detergentes y en el otro no. Para realizar el fraccionamiento utilizamos células HT-29 porque eran más fáciles de cultivar. Encontramos que la ausencia de inhibidores durante el proceso de extracción no afecta dramáticamente la calidad de las muestras (Fig. 7C), por lo que estas eran aptas para ser analizadas mediante espectrometría de masas.

6.2 Ciclina B1 es retenida en el núcleo de los fibroblastos sanos pero no se pudo detectar en los extractos citoplasmáticos

Una vez implementado el fraccionamiento celular procedimos a comprobar los efectos del Selinexor en los fibroblastos sanos. La inhibición de exportina 1 mediada por este fármaco provoca la retención en el núcleo de las proteínas con señal de exporte nuclear, y en el laboratorio ya habíamos observado que retenía a ciclina B1, por lo que decidimos comprobar el efecto del Selinexor utilizando esta proteína como control.

Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo contra ciclina B1 encontramos que efectivamente si se acumuló en el interior nuclear de manera significativa (Fig. 8). Para comprobar este efecto detectamos ahora a ciclina B1 en las fracciones celulares mediante inmunodetección en fase sólida. Como ciclina B1 se encuentra principalmente en la fracción citoplasmática pensamos que la retención nuclear debía verse reflejada como una disminución de ciclina B1 en el citoplasma. En estos ensayos no fuimos capaces de detectar a ciclina B1 ni en los extractos totales de fibroblastos sanos que usamos como control ni en las fracciones citoplasmáticas tratadas o no con Selinexor (Fig. 8C).

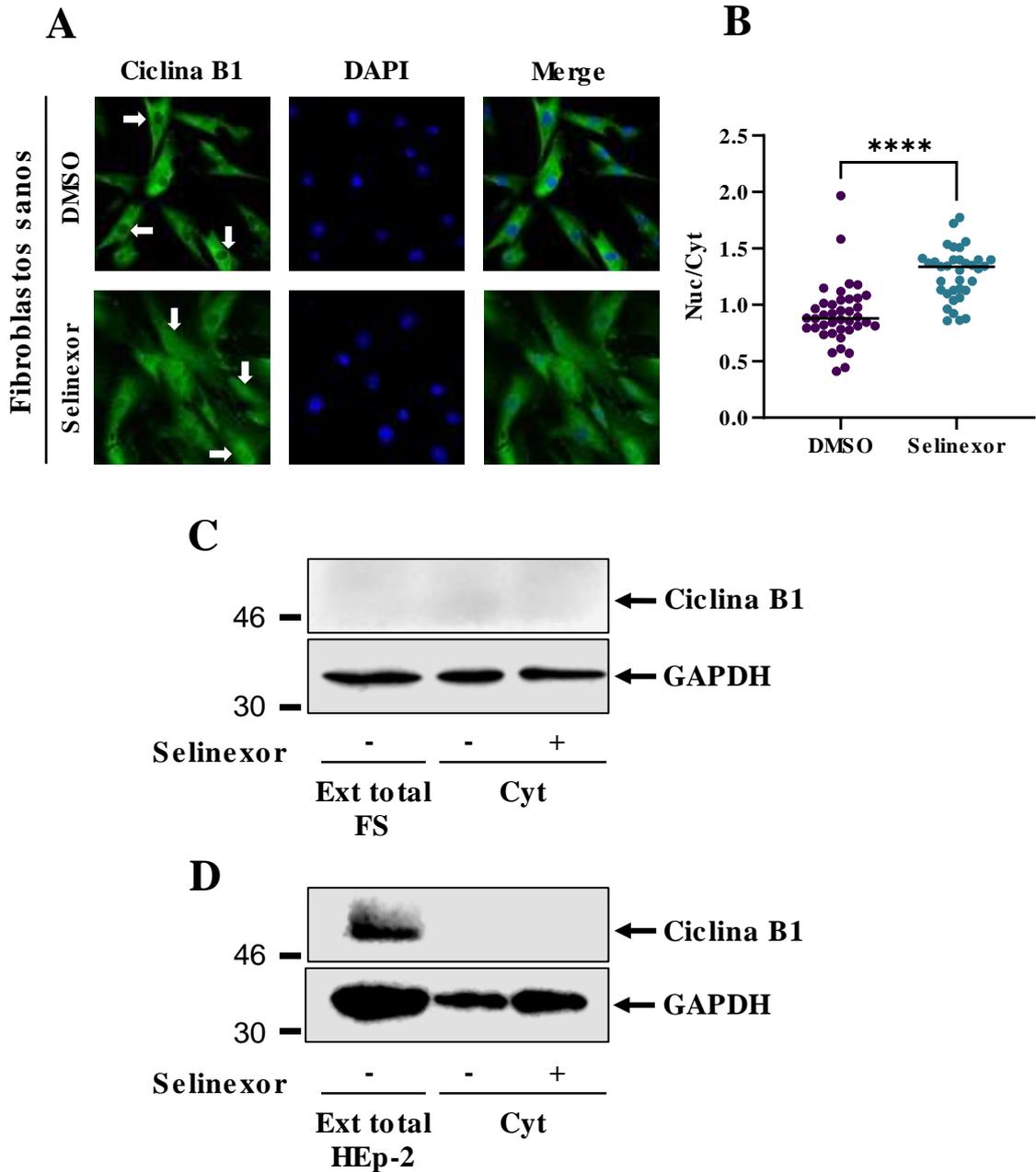


Figura 8: Ciclina B1 es retenida en el núcleo de los fibroblastos sanos, pero no se pudo detectar en los extractos citoplasmáticos.

(A) Ensayo de inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo dirigido contra ciclina B1 (verde). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). (B) Cuantificación del radio núcleo/citoplasma de ciclina B1. (C) Ciclina B1 no pudo ser detectada ni en el extracto total de fibroblastos sanos ni en los extractos citoplasmáticos tratados o no con Selinexor. (D) Ciclina B1 si fue detectada en el extracto total de células Hep-2, las cuales por ser cancerosas deben tener niveles más elevados de ciclina B1. Con esto queda descartado un posible problema con el anticuerpo. FS: Fibroblastos sanos, Cyt: Fracción citoplasmática, Ext. Total: Extracto total.

Para descartar que fuera un problema del anticuerpo repetimos este experimento pero ahora utilizando como control un extracto total de células

HEp-2, las cuales son cancerosas y poseen una mayor expresión de ciclina B1. Encontramos que el anticuerpo reconoció a ciclina B1 en el extracto total de células HEp-2 pero no en los extractos citoplasmáticos de fibroblastos sanos (Fig. 8D). La ausencia de señal en los extractos citoplasmáticos probablemente se debió a una baja concentración de ciclina B1, dificultando su detección a las concentraciones de anticuerpo empleadas por lo que decidimos buscar la presencia de otra proteína con señal de exporte nuclear que nos permitiera comprobar la retención nuclear tanto por inmunofluorescencia como por *Western blot*.

6.3 ZO-2 tampoco pudo ser detectada en los extractos citoplasmáticos de los fibroblastos sanos

La proteína de las uniones estrechas, ZO-2, también posee señal de exporte nuclear y ya estaba reportado que se retiene en el núcleo cuando las células se tratan con leptomicina B (García-Aguirre et al., 2019), otro inhibidor de la exportina 1, por lo que decidimos comprobar el efecto del Selinexor utilizando esta proteína. Como ya habíamos visto que a pesar de detectar la acumulación nuclear en ensayos de inmunofluorescencia no logramos hacerlo por *Western blot*, probamos primero con esta última metodología. Como se muestra en la Figura 9, ZO-2 tampoco fue detectada en las fracciones celulares, sin embargo, en el extracto total de células HT-29 que son células epiteliales con elevada expresión de ZO-2 si fue detectada. Lo anterior también parece ser un problema de concentración de la proteína más que del anticuerpo, y una vez más buscamos otra proteína con señal de exporte nuclear que corroborara el efecto nuclear en ambos ensayos.

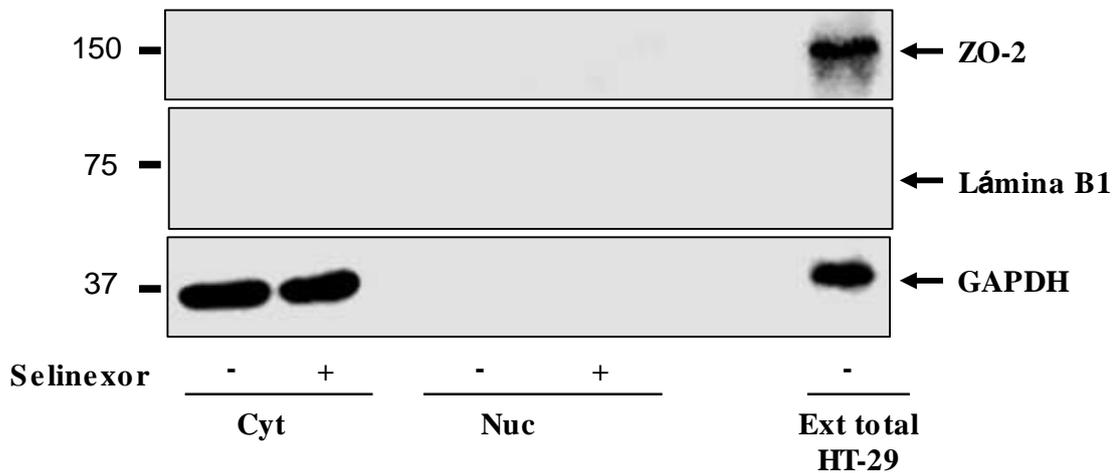


Figura 9: ZO-2 no pudo ser detectada en los extractos citoplasmáticos de los fibroblastos sanos.

Ensayo de *Western blot* para comprobar la acumulación de ZO-2 en el núcleo cuando las células son tratadas con Selinexor. Cyt: Fracción citoplasmática, Nuc: Fracción nuclear.

6.4 P53 es retenida en el núcleo de los fibroblastos sanos y progeroides cuando son tratados con Selinexor

Teniendo en cuenta que p53 es una de las proteínas que más se ha reportado su acumulación nuclear mediada por Selinexor (Guo et al., 2022; Nguyen et al., 2022; Subhash et al., 2018) la consideramos como un posible candidato para comprobar el efecto de este fármaco en nuestro modelo de estudio. Para ello, cultivamos los fibroblastos sanos y progeroides de manera rutinaria y los tratamos durante 24 h con 60 nM de Selinexor o vehículo según correspondiera. Finalmente se obtuvieron las fracciones nuclear y citoplasmática y se realizó la inmunodetección en fase sólida. En este caso, aunque mantuvimos a lámina B1 como control de pureza de la fracción nuclear incluimos a nucleolina como control de carga, puesto que como mencionamos anteriormente el Selinexor afecta los niveles de lámina B1 en las células progeroides.

Tanto en los fibroblastos sanos como progeroides se pudo detectar a p53 en ambas fracciones. Como era de esperar, el tratamiento con Selinexor disminuyó los niveles de p53 citoplasmáticos y los incrementó de manera proporcional en las fracciones nucleares (Fig. 10A). Para corroborar el resultado anterior evaluamos la retención de p53 en el núcleo mediante inmunofluorescencia. Como se observa en la Figura 10B, el Selinexor acumula

de manera significativa a p53 en el núcleo, tanto de las células sanas como de las progeroides.

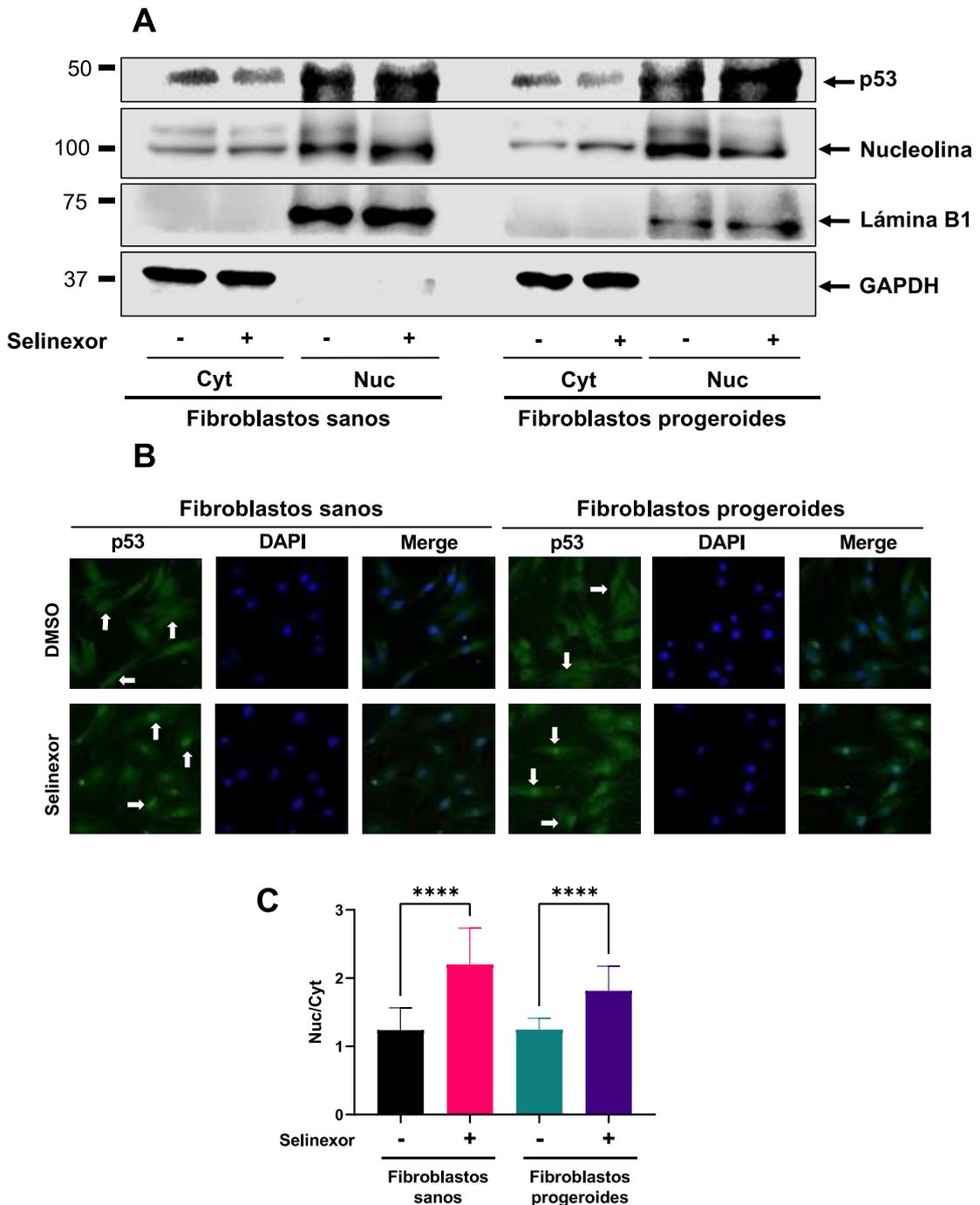


Figura 10: P53 es retenida en el núcleo de los fibroblastos sanos y progeroides cuando son tratados con Selinexor.

(A) Ensayo de *Western blot* para comprobar la retención nuclear mediada por Selinexor. Se observa la disminución de p53 en el citoplasma y el aumento correspondiente en la fracción nuclear. (B) Inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo dirigido contra p53 (verde). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). (C) Cuantificación del radio núcleo/citoplasma de las células tratadas con vehículo o Selinexor. Cyt: Fracción citoplasmática, Nuc: Fracción nuclear.

7. Discusión

El síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford es considerado un excelente modelo para estudiar el envejecimiento biológico en los humanos (Carrero et al., 2016). En este sentido se han llevado a cabo numerosos descubrimientos que permiten relacionar el envejecimiento prematuro característico de la progeria con el envejecimiento fisiológico. Tal es el caso de la sobreexpresión de la exportina 1 presente en los individuos progeroides y geriátricos (García-Aguirre et al., 2019), la cual provoca un incremento del transporte nuclear.

Para mitigar la exacerbada exportación nuclear causada por la exportina 1 se han desarrollado inhibidores selectivos del transporte nuclear que retienen a las proteínas con señal de exportación nuclear en el interior del núcleo (Lapalombella et al., 2012). Uno de ellos es el Selinexor, el cual restablece parcialmente el fenotipo normal en las células progeroides (Datos no publicados). Basados en estos datos, consideramos necesario estudiar los subproteomas de las fracciones nuclear y citoplasmática de fibroblastos sanos y progeroides cuando son tratados con Selinexor, con la finalidad de comprender mejor el rol de este fármaco en la recuperación del fenotipo sano.

El primer reto que tuvimos que franquear fue la obtención de fracciones celulares lo suficientemente puras como para ser utilizadas en análisis de espectrometría de masas, puesto que la pureza de las muestras es crítica en los estudios de proteómica comparativa (Freeman & Hemby, 2004). La obtención de los extractos nuclear y citoplasmáticos se realizó mediante fraccionamiento diferencial con detergentes, un método que ha sido utilizado previamente para obtener fracciones subcelulares con fines proteómicos (Lee et al., 2010). Sin embargo, en lugar de utilizar reactivos preparados *in house* empleamos el kit comercial NE-PER™ con el objetivo de disminuir la variabilidad entre cada fraccionamiento.

Siguiendo las instrucciones del fabricante las muestras nucleares se contaminaban con proteínas citoplasmáticas, lo cual era de esperarse ya que el kit NE-PER™ tiene un margen del 10% de contaminación cruzada. Para reducir esta contaminación introdujimos pasos de lavado antes de lisar la membrana nuclear de manera análoga a lo descrito por Holden y Horton (2009). De esta

manera logramos obtener fracciones lo suficientemente puras para ser utilizadas en estudios proteómicos.

Los análisis proteómicos por lo general son llevados a cabo mediante alguna de las siguientes metodologías: secuenciando directamente las proteínas intactas (*top-down*) o identificando las proteínas a partir de los péptidos producidos por la digestión enzimática de la muestra (*bottom-up*). En nuestro caso vamos a utilizar la segunda aproximación, la cual permite la identificación y cuantificación de miles de proteínas provenientes de una muestra compleja (Dupree et al., 2020). Sin embargo, esta estrategia tiene como desventaja que la identificación puede ser afectada por la presencia de inhibidores de proteasas en la muestra, lo cual exigió que prescindieramos de ellos durante la preparación de los extractos (Clifton et al., 2011). A pesar de esto, comprobamos que la ausencia de inhibidores no afectó considerablemente la calidad de las muestras.

El rendimiento de la fracción citoplasmática fue superior al reportado por el fabricante, puesto que para dos millones de células obtuvimos entre 600 y 800 μg de proteína cuando debía estar entre 200 y 500 μg . Probablemente esto se deba a que los fibroblastos poseen mayor tamaño, ya que está reportado que existe una correlación positiva entre el volumen celular y los niveles de expresión de las proteínas (Lundberg et al., 2008). Por otra parte, el rendimiento de la fracción nuclear si fue el esperado ya que según el fabricante debíamos obtener entre 100 y 200 μg de proteína y obtuvimos entre 100 y 150 μg por cada dos millones de células.

Por otra parte, comprobamos el efecto del Selinexor mediante la relocalización de proteínas con señal de exporte nuclear. De manera similar a lo reportado por García-Aguirre y colaboradores (2019) utilizando leptomicina B, nosotros encontramos que ciclina B1 se acumula en el núcleo bajo los efectos del Selinexor. Probablemente esto se debe a que Selinexor promueve la degradación proteosomal de la exportina 1, con lo cual disminuye su expresión e impide la salida de las proteínas con señal de exporte nuclear (Kwanten et al., 2023). A pesar de que la retención nuclear de ciclina B1 se observó claramente por inmunofluorescencia, este efecto no pudo ser detectado en los ensayos de *Western blot*. Consideramos que esto pudo deberse a la baja concentración celular de ciclina B1 en fibroblastos provenientes de cultivos primarios, ya que

como se sabe los niveles celulares de ciclina B1 son muy bajos durante la mayor parte del ciclo celular (Frisa & Jacobberger, 2009).

De manera similar a lo sucedido con ciclina B1, es muy probable que los niveles de ZO-2 en los extractos subcelulares de los fibroblastos sanos sean demasiado bajos como para poder ser detectados por *Western blot*. Esta idea se sustenta en lo descrito por (Itoh y colaboradores (1999), quienes encontraron que ZO-2 estaba presente en los fibroblastos de rata 3Y1 pero no en las células L (tipo de fibroblasto) de ratón. Lo anterior parece indicar que los niveles de ZO-2 varían en los diferentes tipos de fibroblastos, de manera que los fibroblastos en cuestión podrían tener niveles muy bajos de ZO-2 y por eso no fuimos capaces de detectarla.

Utilizando a p53 como control de la retención nuclear mediada por Selinexor sí tuvimos éxito en ambas detecciones, la inmunofluorescencia y el *Western blot*. Aunque los niveles de p53 intracelulares son bajos, las señales en el *Western blot* de ambas fracciones fueron lo suficientemente intensas como para afirmar que se corresponden con esta proteína. Una posible explicación para este fenómeno es que a pesar de que p53 es degradada en cuestión de minutos se está sintetizando continuamente, de esta manera su concentración se mantiene en un estado estacionario en condiciones normales (Ozaki & Nakagawara, 2011). También se podría pensar que la acumulación de p53 en el interior nuclear impediría su degradación, lo cual está en concordancia con la degradación principalmente proteosomal de p53 (Chao, 2015). Lo anterior coincide con nuestros resultados de inmunofluorescencia, donde vimos que bajo los efectos del Selinexor la señal de p53 se localiza fundamentalmente en el núcleo.

A pesar de que la mayoría de los reportes en la literatura coinciden en que el tratamiento con Selinexor incrementa los niveles nucleares de p53 de manera similar a lo que nosotros encontramos, hay discrepancia en cuanto al efecto de este fármaco sobre los niveles citoplasmáticos de p53. Algunos autores plantean que el Selinexor incrementa los niveles citoplasmáticos de p53 (Nguyen et al., 2022; Subhash et al., 2018) mientras que otros reportan una disminución de p53 citoplasmática bajo los efectos de este fármaco (Guo et al., 2022). En

concordancia con el último autor, nosotros encontramos que hay una reducción de los niveles de p53 citoplasmáticos cuando las células se tratan con Selinexor.

En conjunto, nuestros resultados muestran que el juego de reactivos NE-PER™ es una buena opción para obtener fracciones nucleares y citoplasmáticas puras. Además, refuerzan a p53 como un excelente candidato para comprobar el efecto de los inhibidores selectivos de exporte nuclear sobre el tráfico núcleo-citoplasmático.

8. Conclusiones

En la presente tesis demostramos la capacidad del juego de reactivos NE-PER™ para la obtención de fracciones subcelulares con la pureza y calidad necesarias para ser analizadas mediante espectrometría de masas. Además, comprobamos el efecto del Selinexor sobre los fibroblastos sanos y progeroides mediante dos aproximaciones diferentes, inmunofluorescencia y *Western blot*, usando como proteína control a p53. Esto dará paso a la obtención de los extractos nucleares y citoplasmáticos, tanto de células normales como de células progeroides, que serán analizados posteriormente mediante espectrometría de masas.

9. Perspectivas

Los resultados presentados en esta tesis constituyen el primer paso de avance para comprender cómo el Selinexor contribuye a la recuperación del fenotipo sano en los fibroblastos progeroides. A partir de los extractos obtenidos se identificarán y cuantificarán las proteínas sensibles al efecto del Selinexor, las cuales constituirían el “*selinexoma*” de las células bajo estudio. Para continuar este trabajo habrá que demostrar experimentalmente las interpretaciones derivadas del análisis proteómico.

10. Literatura citada

- Ahmed, M. S., Ikram, S., Bibi, N., & Mir, A. (2018). Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome: A Premature Aging Disease. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 55, Issue 5, pp. 4417–4427). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0610-7>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. W.W. Norton.
- Bachor, R., Waliczek, M., Stefanowicz, P., & Szewczuk, Z. (2019). Trends in the design of new isobaric labeling reagents for quantitative proteomics. *Molecules*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/molecules24040701>
- Benkova, K., Mihalyova, J., Hajek, R., & Jelinek, T. (2021). Selinexor, selective inhibitor of nuclear export: Unselective bullet for blood cancers. In *Blood Reviews* (Vol. 46). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100758>
- Bergo, M. O., Gavino, B., Ross, J., Schmidt, W. K., Hong, C., Kendall, L. V., Mohr, A., Meta, M., Genant, H., Jiang, Y., Wisner, E. R., van Bruggen, N., D Carano, R. A., Michaelis, S., Griffey, S. M., & Young, S. G. (2002). *Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.192460799
- Burtner, C. R., & Kennedy, B. K. (2010). Progeria syndromes and ageing: What is the connection? In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 8, pp. 567–578). <https://doi.org/10.1038/nrm2944>
- Cai, W., Tucholski, T. M., Gregorich, Z. R., & Ge, Y. (2016). Top-down Proteomics: Technology Advancements and Applications to Heart Diseases. *Expert Review of Proteomics*, 13(8), 717–730. <https://doi.org/10.1080/14789450.2016.1209414>
- Carrero, D., Soria-Valles, C., & López-Otín, C. (2016). Hallmarks of progeroid syndromes: Lessons from mice and reprogrammed cells. In *DMM Disease Models and Mechanisms* (Vol. 9, Issue 7, pp. 719–735). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dmm.024711>
- Chao, C. C.-K. (2015). Mechanisms of p53 degradation. *Clinica Chimica Acta*, 438, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.015>
- Chook, Y., & Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 703–715. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(01\)00264-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(01)00264-0)
- Chook, Y. M., & Süel, K. E. (2011). Nuclear import by karyopherin- β s: Recognition and inhibition. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1813, Issue 9, pp. 1593–1606). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.014>

- Clifton, J., Huang, F., Rucevic, M., Cao, L., Hixson, D., & Josic, D. (2011). Protease inhibitors as possible pitfalls in proteomic analyses of complex biological samples. *Journal of Proteomics*, *74*(7), 935–941. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.010>
- Columbaro, M., Capanni, C., Mattioli, E., Novelli, G., Parnaik, V. K., Squarzoni, S., Maraldi, N. M., & Lattanzi, G. (2005). Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *62*(22), 2669–2678. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5318-6>
- Coutinho, H. D. M., Falcão-Silva, V. S., Gonçalves, G., & da Nóbrega, R. (2009). Molecular ageing in progeroid syndromes: Hutchinson-Gilford progeria syndrome as a model. In *Immunity and Ageing* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1186/1742-4933-6-4>
- D'Angelo, M. A., & Hetzer, M. W. (2006). The role of the nuclear envelope in cellular organization. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 63, Issue 3, pp. 316–332). <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5361-3>
- Dong, X., Biswas, A., Süel, K. E., Jackson, L. K., Martinez, R., Gu, H., & Chook, Y. M. (2009). Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. *Nature*, *458*(7242), 1136–1141. <https://doi.org/10.1038/nature07975>
- Dupree, E. J., Jayathirtha, M., Yorkey, H., Mihasan, M., Petre, B. A., & Darie, C. C. (2020). A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field. *Proteomes*, *8*(3), 14. <https://doi.org/10.3390/proteomes8030014>
- Eliuk, S., & Makarov, A. (2015). Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. In *Annual Review of Analytical Chemistry* (Vol. 8, pp. 61–80). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040325>
- Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A. B., Boehnke, M., Glover, T. W., & Collins, F. S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, *423*(6937), 293–298. <https://doi.org/10.1038/nature01629>
- Freeman, W. M., & Hemby, S. E. (2004). Proteomics for Protein Expression Profiling in Neuroscience. *Neurochemical Research*, *29*(6), 1065–1081. <https://doi.org/10.1023/B:NERE.0000023594.21352.17>
- Frisa, P. S., & Jacobberger, J. W. (2009). Cell Cycle-Related Cyclin B1 Quantification. *PLoS ONE*, *4*(9), e7064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007064>

- Fung, H. Y. J., & Chook, Y. M. (2014). Atomic basis of CRM1-cargo recognition, release and inhibition. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 27, pp. 52–61). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.03.002>
- Fung, H. Y. J., Fu, S.-C., & Chook, Y. M. (2017). Nuclear export receptor CRM1 recognizes diverse conformations in nuclear export signals. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.23961>
- Fung, H. Y. J., Niesman, A., & Chook, Y. M. (2021). An update to the CRM1 cargo/NES database NESdb. *Molecular Biology of the Cell*, 32(6), 467–469. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-11-0694>
- García-Aguirre, I., Alamillo-Iniesta, A., Rodríguez-Pérez, R., Vélez-Aguilera, G., Amaro-Encarnación, E., Jiménez-Gutiérrez, E., Vásquez-Limeta, A., Samuel Laredo-Cisneros, M., Morales-Lázaro, S. L., Tiburcio-Félix, R., Ortega, A., Magaña, J. J., Winder, S. J., & Cisneros, B. (2019). Enhanced nuclear protein export in premature aging and rescue of the progeria phenotype by modulation of CRM1 activity. *Aging Cell*, 18(5). <https://doi.org/10.1111/accel.13002>
- Gerace, L. (1992). Molecular trafficking across the nuclear pore complex. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 4).
- Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R., & Collins, F. S. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(24), 8963–8968. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402943101>
- Gordon, L. B. (2019). *The Progeria Handbook* (L. Gordon, Ed.; 2nd ed.). www.progeriaresearch.org
- Gordon, L. B., Shappell, H., Massaro, J., D'Agostino, R. B., Brazier, J., Campbell, S. E., Kleinman, M. E., & Kieran, M. W. (2018). Association of lonafarnib treatment vs no treatment with mortality rate in patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 319(16), 1687–1695. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.3264>
- Guo, Y., Liu, Z., Duan, L., Shen, H., Ding, K., & Fu, R. (2022). Selinexor synergizes with azacitidine to eliminate myelodysplastic syndrome cells through p53 nuclear accumulation. *Investigational New Drugs*, 40(4), 738–746. <https://doi.org/10.1007/s10637-022-01251-5>
- Harhour, K., Frankel, D., Bartoli, C., Roll, P., De Sandre-Giovannoli, A., & Lévy, N. (2018). An overview of treatment strategies for hutchinson-gilford progeria syndrome. In *Nucleus* (Vol. 9, Issue 1, pp. 265–276). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1460045>

- Hennekam, R. C. M. (2006). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Review of the phenotype. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 140(23), 2603–2624. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31346>
- Holden, P., & Horton, W. A. (2009). Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines. *BMC Research Notes*, 2(1), 243. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-243>
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., & Cooks, R. G. (2005). The Orbitrap: A new mass spectrometer. In *Journal of Mass Spectrometry* (Vol. 40, Issue 4, pp. 430–443). <https://doi.org/10.1002/jms.856>
- Itoh, M., Morita, K., & Tsukita, S. (1999). Characterization of ZO-2 as a MAGUK Family Member Associated with Tight as well as Adherens Junctions with a Binding Affinity to Occludin and α Catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5981–5986. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5981>
- Kelley, J. B., Datta, S., Snow, C. J., Chatterjee, M., Ni, L., Spencer, A., Yang, C.-S., Cubeñas-Potts, C., Matunis, M. J., & Paschal, B. M. (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(16), 3378–3395. <https://doi.org/10.1128/mcb.05087-11>
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., & Tabtlang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type.
- Kieran, M. W., Gordon, L. B., & Kleinman, M. E. (2014). The role of the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib in the treatment of Progeria. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 2(1), 95–105. <https://doi.org/10.1517/21678707.2014.872028>
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M., & Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9112–9117. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9112>
- Kumar Sinha, J., Ghosh, S., & Raghunath, M. (2014). Progeria: A rare genetic premature ageing disorder. In *Indian J Med Res* (Vol. 139).
- Kwanten, B., Deconick, T., Walker, C., Wang, F., Landesman, Y., & Daelemans, D. (2023). E3 ubiquitin ligase ASB8 promotes selinexor-induced proteasomal degradation of XPO1. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114305>
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2007). Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin α . In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 282, Issue 8, pp. 5101–5105). <https://doi.org/10.1074/jbc.R600026200>

- Lapalombella, R., Sun, Q., Williams, K., Tangeman, L., Jha, S., Zhong, Y., Goettl, V., Mahoney, E., Berglund, C., Gupta, S., Farmer, A., Mani, R., Johnson, A. J., Lucas, D., Mo, X., Daelemans, D., Sandanayaka, V., Shechter, S., McCauley, D., ... Byrd, J. C. (2012). Selective inhibitors of nuclear export show that CRM1/XPO1 is a target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *120*(23), 4621–4634. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-429506>
- Lee, Y. H., Tan, H. T., & Chung, M. C. M. (2010). Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics. *PROTEOMICS*, *10*(22), 3935–3956. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000289>
- Lin, D. H., & Hoelz, A. (2019). *The Structure of the Nuclear Pore Complex (An Update)*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917>
- Lundberg, E., Gry, M., Oksvold, P., Kononen, J., Andersson-Svahn, H., Pontén, F., Uhlén, M., & Asplund, A. (2008). The correlation between cellular size and protein expression levels — Normalization for global protein profiling. *Journal of Proteomics*, *71*(4), 448–460. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.06.014>
- Marfori, M., Mynott, A., Ellis, J. J., Mehdi, A. M., Saunders, N. F. W., Curmi, P. M., Forwood, J. K., Bodén, M., & Kobe, B. (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1813*(9), 1562–1577. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.013>
- Miller, R. M., & Smith, L. M. (2023). Overview and considerations in bottom-up proteomics. *The Analyst*, *148*(3), 475–486. <https://doi.org/10.1039/D2AN01246D>
- Monecke, T., Dickmanns, A., & Ficner, R. (2014). Allosteric control of the exportin CRM1 unraveled by crystal structure analysis. In *FEBS Journal* (Vol. 281, Issue 18, pp. 4179–4194). <https://doi.org/10.1111/febs.12842>
- Monecke, T., Güttler, T., Neumann, P., Dickmanns, A., Görlich, D., & Ficner, R. (2009). Crystal Structure of the Nuclear Export Receptor CRM1 in Complex with Snurportin1 and RanGTP. *Science*, *324*(5930), 1087–1091. <https://doi.org/10.1126/science.1173388>
- Moulder, R., Bhosale, S. D., Goodlett, D. R., & Laheesmaa, R. (2018). Analysis of the plasma proteome using iTRAQ and TMT-based Isobaric labeling. *Mass Spectrometry Reviews*, *37*(5), 583–606. <https://doi.org/10.1002/mas.21550>
- Navarro, C. L., Cau, P., & Lévy, N. (2006). Molecular bases of progeroid syndromes. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 15, Issue SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl214>
- Navarro, C. L., De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Boccaccio, I., Boyer, A., Geneviève, D., Hadj-Rabia, S., Gaudy-Marqueste, C., Smitt, H. S., Vabres, P., Faivre, L., Verloes, A., Van Essen, T., Flori, E., Hennekam, R., Beemer,

- F. A., Laurent, N., Le Merrer, M., Cau, P., & Lévy, N. (2004). Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Human Molecular Genetics*, 13(20), 2493–2503. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh265>
- Nguyen, R., Wang, H., Sun, M., Lee, D. G., Peng, J., & Thiele, C. J. (2022). Combining selinexor with alisertib to target the p53 pathway in neuroblastoma. *Neoplasia*, 26, 100776. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100776>
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M., & Mattaj, I. W. (2000). PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell*, 101(2), 187–198. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80829-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80829-6)
- Ozaki, T., & Nakagawara, A. (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers*, 3(1), 994–1013. <https://doi.org/10.3390/cancers3010994>
- Podar, K., Shah, J., Chari, A., Richardson, P. G., & Jagannath, S. (2020). Selinexor for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 21(4), 399–408. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1707184>
- Rigbolt, K. T. G., & Blagoev, B. (2010). *Proteome-Wide Quantitation by SILAC* (pp. 187–204). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-780-8_11
- Scaffidi, P., & Misteli, T. (2005). Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature Medicine*, 11(4), 440–445. <https://doi.org/10.1038/nm1204>
- Shumaker, D. K., Kuczmarski, E. R., & Goldman, R. D. (2003). The nucleoskeleton: Lamins and actin are major players in essential nuclear functions. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 358–366). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00050-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00050-4)
- Subhash, V. V., Yeo, M. S., Wang, L., Tan, S. H., Wong, F. Y., Thuya, W. L., Tan, W. L., Peethala, P. C., Soe, M. Y., Tan, D. S. P., Padmanabhan, N., Baloglu, E., Shacham, S., Tan, P., Koeffler, H. P., & Yong, W. P. (2018). Anti-tumor efficacy of Selinexor (KPT-330) in gastric cancer is dependent on nuclear accumulation of p53 tumor suppressor. *Scientific Reports*, 8(1), 12248. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30686-1>
- Tenga, R., & Medalia, O. (2020). Structure and unique mechanical aspects of nuclear lamin filaments. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 64, pp. 152–159). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.017>
- Tran, E. J., Bolger, T. A., & Wente, S. R. (2007). SnapShot: Nuclear Transport. *Cell*, 131(2), 420-420.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.015>
- Universal Mutation Database* . (n.d.). Retrieved January 10, 2023, from www.umd.be/LMNA

- Vanhooren, V., & Libert, C. (2013). The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.010>
- Viner, R. (2015). *The world leader in serving science Multiplexed protein quantification using the isobaric TMT method: Improving reproducibility and protein coverage with PD 2.1.*
- Witt, D. R., Hayden, M. R., Holbrook, K. A., Dale, B. A., Baldwin, V. J., & Taylor, G. P. (1986). Restrictive Dermopathy: A Newly Recognized Autosomal Recessive Skin Dysplasia. In *American Journal of Medical Genetics* (Vol. 24).
- Zemp, I., & Kutay, U. (2007). Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. In *FEBS Letters* (Vol. 581, Issue 15, pp. 2783–2793). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.013>