

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Efecto de la atenuación de la exportación nuclear exacerbada
sobre la morfología nuclear en fibroblastos de progeria”**

T E S I S

Que presenta

IBT. ELIANETH AMARO ENCARNACIÓN

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis:

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Ciudad de México

AGOSTO, 2018

Este trabajo fué realizado en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la tutoría del Dr. Bulmaro Cisneros Vega y la asesoría del Dr. José Efraín Garrido Gerrero del Departamento de Genética y Biología Molecular y la Dra. Ruth Abigail Pacheco Rivera de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Durante la realización del presente trabajo, la estudiante Elianeth Amaro Encarnación fue apoyada como becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de CVU 705356.

AGRADECIMIENTOS

- ☞ Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega por confiar en mí y permitirme formar parte de su grupo de trabajo, así como por su orientación y apoyo durante la realización de este proyecto.
- ☞ A la Dra. Ruth Abigail Pacheco Rivera y al Dr. José Efraín Garrido Guerrero por su tiempo, apoyo y comentarios que ayudaron a enriquecer este proyecto.
- ☞ A mi mamá, por ser mi gran ejemplo a seguir, por confiar y creer siempre en mí, por apoyarme incondicionalmente en todos los aspectos de mi vida y por animarme a seguir adelante en todo momento; gracias a ti he logrado cumplir otra de mis metas. Te amo.
- ☞ A mis hermanos, Moy y Caro, por siempre creer en mí, por brindarme todo su apoyo y confianza en todo lo que hago, y por darme ánimos cuando más lo necesito. Los amo.
- ☞ A mi sobrino Mateo, por darle alegría a mi vida aún en los momentos más complicados. Te amo.
- ☞ A todos mis seres tan queridos que ya no están conmigo en este momento pero que siempre creyeron en mí y confiaron en que puedo lograr todo lo que me propongo. Gracias por todas sus enseñanzas de vida, siempre los tengo presentes en mi mente y en mi corazón; los quiero eternamente.
- ☞ A Pablo Alberto Franco Urquijo, por acompañarme, ayudarme y apoyarme a lo largo de este camino, y por animarme a seguir a pesar de las circunstancias.

- ☞ A Pablo Gómez Islas, por su apoyo técnico, comentarios y observaciones durante la realización de este proyecto.
- ☞ A mis compañeros de laboratorio, por transmitirme sus conocimientos y por todo su apoyo durante mi estancia con ustedes.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Núcleo	3
1.2. Envoltura nuclear	3
1.3. Lámina nuclear	4
1.4. Láminas	6
1.5. Las Laminopatías	10
1.6. El síndrome de progeria Hutchinson-Gilford.....	11
2. ANTECEDENTES	15
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS.....	23
5.1. Objetivo general	23
5.2. Objetivos específicos.....	23
6. MODELO DE ESTUDIO.....	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
7.1. Cultivo celular	25
7.2. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal	25
7.3. Anticuerpos	26
7.4. Análisis morfométrico de los núcleos.....	27
8. RESULTADOS	28
8.1. Análisis de la morfología nuclear de los fibroblastos normales y HGPS con relación al número de pasajes	28
8.2. La atenuación de la exportación nuclear exacerbada mediante tratamiento con LMB recupera la morfología nuclear de los fibroblastos HGPS ³⁰	
8.3. Comparación de los tratamientos con LMB y FTI sobre la morfología nuclear de los fibroblastos HGPS	32
8.4. Distribución subcelular de las proteínas α -DB y Dp71 en los en los fibroblastos HGPS	33
8.5. Distribución subcelular de la proteína Sp3 en los fibroblastos HGPS	35

9.	DISCUSIÓN	37
10.	CONCLUSIONES	40
11.	PERSPECTIVAS	41

RESUMEN

El síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS) es una enfermedad extremadamente rara pero muy estudiada debido a que su fenotipo se asemeja al envejecimiento natural. Este síndrome es ocasionado por una mutación puntual silenciosa en el gen *LMNA* que genera una variante farnesilada de la lámina A, denominada progerina. La progerina afecta una variedad de procesos celulares, incluyendo la morfología nuclear, la expresión de genes, la reparación del ADN, entre otras. En nuestro laboratorio se ha demostrado que el mecanismo de exportación nuclear está exacerbado en las células HGPS, lo que provoca la deslocalización de proteínas con señales de exportación nuclear (NES). De forma inesperada, la corrección de esta alteración mediante tratamiento con LMB, inhibidor de la exportina CRM1, alivia algunas características celulares del HGPS, como el estrés nucleolar, la senescencia celular y la morfología celular senescente. En este estudio decidimos evaluar si la modulación farmacológica de CRM1 alivia la morfología nuclear aberrante, una característica distintiva de las células HGPS que se ha estudiado ampliamente. De manera interesante, demostramos que el tratamiento con LMB corrige la morfología nuclear aberrante de las células HGPS, lo que resulta en una morfología nuclear parecida a la de los fibroblastos normales. Para tratar de entender el mecanismo molecular del alivio de la morfología nuclear tras el tratamiento con LMB, evaluamos la distribución subcelular de las proteínas Dp71 y α -DB, las cuales tienen NES y están implicadas en el mantenimiento de la estructura nuclear. Ambas proteínas se encontraron deslocalizadas hacia el citoplasma en fibroblastos HGPS, pero recuperan su localización nuclear después del tratamiento con LMB, por lo que pensamos que podrían contribuir al restablecimiento de la morfología nuclear. El efecto del tratamiento con LMB es específico ya que la distribución subcelular del factor de transcripción Sp3, que no contiene NES, no se ve alterada en las células HGPS ni responde a la administración de LMB. En conclusión, el alivio de la morfología nuclear aberrante se debe a la modulación farmacológica de la exportación nuclear exacerbada y es probable que contribuya la acumulación nuclear de las proteínas Dp17 y α -DB.

ABSTRACT

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is an extremely rare but widely studied disease because it resembles natural aging. HGPS is caused by a mutation in the LMNA gene, generating a permanently farnesylated variant of lamina A, named progerin. Progerin affects a variety of cellular processes, including nuclear morphology, gene expression, DNA repair and mitochondrial function. We previously found that the CRM1-mediated nuclear export mechanism is exacerbated in HGPS cells, which in turn provokes mislocalization of proteins bearing nuclear export signals (NES). It is worth to note that attenuation of CRM1 activity through treatment of cells with LMB (specific inhibitor of CRM1) alleviates some HGPS cellular marks, including nucleolar stress, cellular senescence and senescent cell morphology. In this study, we analyzed whether pharmacological modulation of CRM1 has a beneficial effect on the aberrant nuclear morphology of HGPS fibroblasts. Interestingly, we observed that treatment with LMB for 3 or 6 days corrected the defective nuclear shape, resulting in a nuclear morphology similar to that of normal fibroblasts. As an attempt to understand the molecular basis of such a therapeutic effect, we evaluated the subcellular distribution of Dp71 and α -DB in HGPS cells, before and after LMB treatment. These two proteins contain NES in their sequence and have been involved in the maintenance of nuclear architecture. Both proteins were found mislocalized in HGPS fibroblasts, but regained their nuclear distribution upon treatment with LMB. Specificity of the LMB treatment was proved because subcellular distribution of Sp3, a transcription factor without NES, remained unaltered in HGPS cells even after LMB administration. In conclusion, pharmacological modulation of the exacerbated nuclear export mechanism rescued the aberrant nuclear morphology of HGPS cells. Furthermore, recovery of the nuclear accumulation of Dp17 and α -DB might contribute at least in part for this therapeutic effect.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Núcleo

El núcleo es un organelo específico de células eucariotas que contiene la información genética que define la apariencia y el comportamiento de los organismos; este material genético o ADN se encuentra empaquetado dentro del núcleo como un complejo ADN-proteína llamado cromatina, formando a su vez unidades de tamaño variable denominadas cromosomas (Jackson, 2011).

En organismos eucariotes multicelulares, los tipos de células que los conforman están definidos por los distintos genes que expresan; dichos patrones de expresión de genes surgen conforme las células son comprometidas para desempeñar funciones específicas durante el proceso de diferenciación celular, el cual es controlado por la ubicación de las células dentro del organismo durante su desarrollo (Jackson, 2011).

La expresión de genes es regulada a varios niveles en cada célula; el principal paso regulatorio ocurre dentro del núcleo durante la transcripción, cuando el gen es copiado a ARN mensajero (ARNm), que después transfiere la información genética al citoplasma, donde sirve como templado para la síntesis de proteínas durante el proceso de traducción (Jackson, 2011).

1.2. Envoltura nuclear

El núcleo está delimitado por una doble membrana que lo separa del citoplasma y que se conoce como envoltura nuclear (EN), formada por la membrana nuclear externa (MNE) y la membrana nuclear interna (MNI) (Fig. 1) (Hetzer, 2010; Schooley et al., 2012; Burke y Stewart, 2013; Smith et al., 2017); la EN permite el transporte bidireccional selectivo entre el núcleo y el citoplasma mediante los complejos proteicos del poro nuclear, a través de los cuales ocurre el intercambio pasivo de iones y pequeñas moléculas y el transporte activo de macromoléculas (Jackson, 2011; Schooley et al., 2012; Ungricht y Kutay, 2017).

Las dos membranas de la EN se encuentran separadas por un espacio de 40-50 nm de grosor denominado espacio lumenal o perinuclear; sin embargo, ambas membranas se conectan mediante los poros nucleares y las asociaciones entre proteínas intermembranales (Fig. 1) (Schooley et al., 2012; Burke y Stewart, 2013; Smith et al., 2017). La MNE y la MNI son distintas en composición y función (Smith et al., 2017); la MNE tiene múltiples conexiones con el retículo endoplásmico (RE), por lo que es rica en componentes de este organelo, mientras que la MNI, a pesar de interactuar con la MNE en la periferia de cada poro nuclear, contiene su propio arreglo distintivo de 60 o más proteínas integrales de membrana que varían significativamente entre los diferentes tipos de células (Schooley et al., 2012; Burke y Stewart, 2013).

La EN es esencial para la organización global del núcleo, ya que además de regular el movimiento de moléculas dentro y fuera del núcleo, ha sido implicada en la organización de la cromatina y en la regulación de genes, ya que provee sitios de anclaje para dominios de cromatina a través de la denominada lámina nuclear, especialmente aquellos enriquecidos en genes silenciados; además la EN también proporciona sitios de anclaje para el citoesqueleto (Hetzer, 2010; Burke y Stewart, 2013).

1.3. Lámina nuclear

Asociada a la cara nuclear de la MNI y a la periferia de los poros nucleares, se localiza una compleja y delgada matriz de proteínas (de 15-20 nm en mamíferos; Burke y Stewart, 2013), la lámina nuclear (LN) (Fig. 1), la cual tiene un papel importante en la modulación de la morfología del núcleo mediante el aumento de la rigidez de la EN (Dechat et al., 2008; Burke y Stewart, 2013; Smith et al., 2017). La LN está constituida principalmente por proteínas llamadas láminas (Reddy y Comai, 2016; Turgay et al., 2017), las cuales se ensamblan formando una malla filamentosa que sirve como puente entre la EN y la cromatina (Turgay et al., 2017).

Además de proveer estabilidad estructural y mecánica al núcleo, la lámina está involucrada en la mayoría de las funciones nucleares, como son la organización

de la cromatina, la replicación y la reparación del ADN, la regulación transcripcional, y la diferenciación y proliferación celular, por lo que tiene un papel importante en el mantenimiento de la fisiología normal de la célula (Burke y Stewart, 2013; Reddy y Comai, 2016; Charar y Gruenbaum, 2016; Turgay et al., 2017). La lámina funciona como una plataforma de anclaje para dominios de heterocromatina llamados dominios asociados a lámina (LADs, por sus siglas en inglés), y para varias proteínas regulatorias, incluyendo moléculas de señalización y factores de transcripción (Burke y Stewart, 2013; Ungricht y Kutay, 2017).

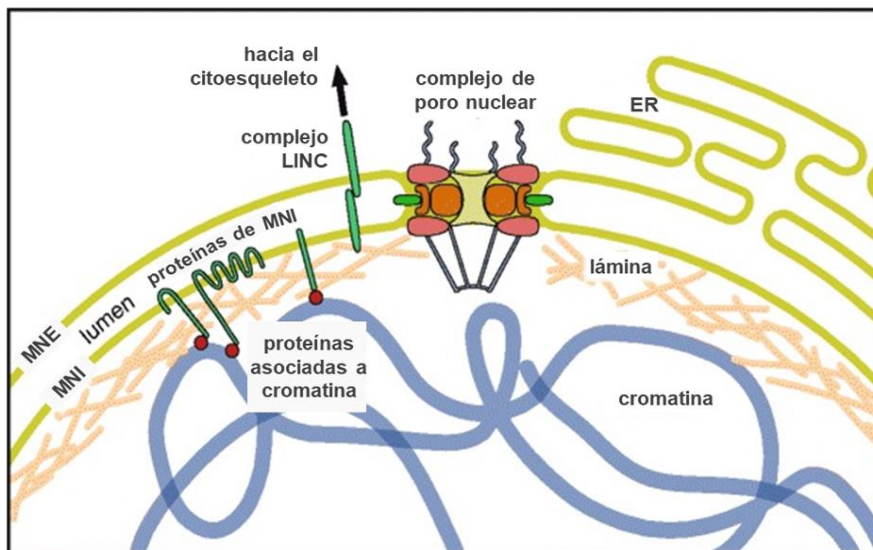


Fig. 1. La envoltura nuclear (Modificada de Schooley et al., 2012). La membrana nuclear interna (MNI) y la membrana nuclear externa (MNE) que componen a la envoltura nuclear (EN), están separadas por un espacio luminal, pero se conectan mediante los complejos de poro nuclear y proteínas intermembranales; la MNE tiene además conexiones con el retículo endoplásmico (RE). La MNI tiene proteínas integrales características. La lámina está asociada a la MNI y a la periferia de los poros nucleares y funciona como una plataforma de anclaje para la cromatina; además se conecta con el citoesqueleto a través de la EN mediante los complejos LINC.

El complejo LINC (Linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton) conecta la LN y la cromatina con los tres componentes del citoesqueleto (microfilamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios) y sus proteínas asociadas, a través de la EN (Fig. 1) (Cau et al., 2014), actuando como vínculo estructural entre el núcleo y el citoplasma; además modula la mecanotransducción desde el citoplasma

y la matriz extracelular hasta el núcleo (Brayson y Shanahan, 2017). El complejo LINC consiste de proteínas con dominio SUN (Sad1/UNC84) en la MNI y proteínas con dominio KASH o nesprinas en la MNE, cuyos dominios lumenales interactúan directamente dentro del espacio perinuclear (Burke y Stewart, 2013; Brayson y Shanahan, 2017).

1.4. Láminas

Las láminas son proteínas pertenecientes al grupo de filamentos intermedios tipo V localizadas mayormente en la LN, pero también se encuentran distribuidas en todo el nucleoplasma, aunque en bajas concentraciones; la organización de las láminas, tanto en la periferia nuclear como dentro del nucleoplasma, está influenciada por la gran cantidad de proteínas que se unen a ellas (Dechat et al., 2008; Burke y Stewart, 2013; Reddy y Comai, 2016); por ejemplo, las láminas asocian con las proteínas LEM (LAP2, Emerina, MAN) de la EN (Brayson y Shanahan, 2017).

Las células de mamíferos tienen dos tipos de láminas: las láminas tipo A, que se expresan en células diferenciadas, y las láminas tipo B, expresadas en todas las células somáticas (Vidal et al., 2012; Reddy y Comai, 2016; Charar y Gruenbaum, 2016). A pesar de que las láminas son consideradas proteínas ubicuas, se ha demostrado que pueden encontrarse diversos niveles de expresión y distintas isoformas en diferentes tipos de células y órganos (Lattanzi et al., 2016).

Las láminas están constituidas por un dominio amino terminal corto (cabeza), un dominio central α -hélice (varilla) y un dominio carboxilo terminal de 200-300 aminoácidos (cola); este último dominio contiene un plegamiento β tipo inmunoglobulina (Ig), una región no estructurada, una señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés), requerida para el transporte de las láminas al núcleo, y una caja CaaX (C=cisteína, a=aminoácido alifático, X=cualquier aminoácido); esta última secuencia de aminoácidos es importante para su procesamiento postraduccional (Fig. 2) (Burke y Stewart, 2013; Gruenbaum y Foisner, 2015; Reddy y Comai, 2016; Charar y Gruenbaum, 2016).

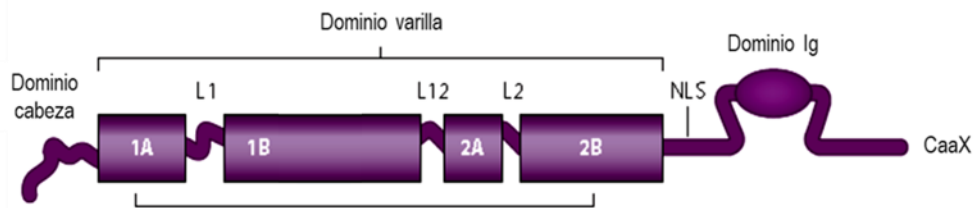


Fig. 2. Estructura de las láminas (Modificada de Gruenbaum y Foisner, 2015). Se muestra la organización de un monómero de lámina: el dominio N-terminal (cabeza); el dominio central (varilla), compuesto por cuatro α -hélices (1A, 1B, 2A, 2B) y tres regiones *linker* (L1, L12, L2); y el dominio C-terminal (cola), que incluye la señal de localización nuclear (NLS), el dominio inmunoglobulina (Ig) y la caja CaaX (C=cisteína, a=aminoácido alifático, X=cualquier aminoácido).

En mamíferos existen tres genes que codifican para las cuatro isoformas principales (A, C, B1, B2) (Fig. 3) y las tres isoformas menores ($A\Delta 10$, C2, B3) de las láminas (Vidal et al., 2012; Gruenbaum y Foisner, 2015; Charar y Gruenbaum, 2016). Las láminas A y C (tipo A), así como la isoforma $A\Delta 10$, son codificadas por el gen *LMNA* y generadas por splicing alternativo, mientras que las láminas B1 y B2 (tipo B) son codificadas por dos genes separados: *LMNB1* y *LMNB2*; las isoformas cortas C2 y B3 codificadas por *LMNA* y *LMNB2*, respectivamente, se expresan solamente en gametos (Burke y Stewart, 2013; Cau et al., 2014; Reddy y Comai, 2016; Charar y Gruenbaum, 2016; Lattanzi et al., 2016).

Las láminas A, B1 y B2 se expresan inicialmente como proteínas citosólicas precursoras, o preláminas, las cuales sufren una serie de modificaciones postraduccionales que involucran su caja CaaX C-terminal para convertirse en láminas maduras, mientras que la lámina C, la cual no tiene caja CaaX, se sintetiza directamente como forma madura mediante splicing alternativo. (Dechat et al., 2008; Cau et al., 2014; Lattanzi et al., 2016).

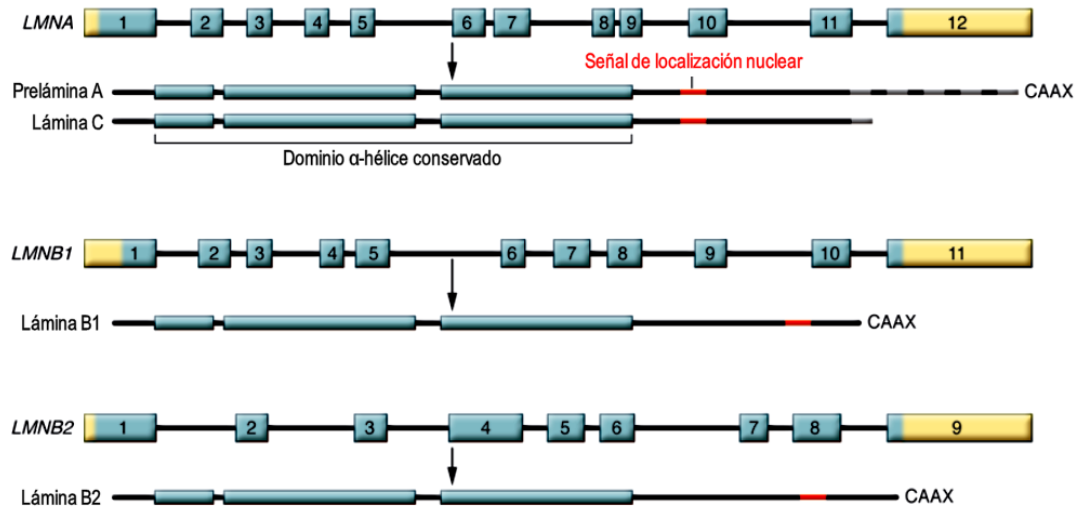


Fig. 3. Genes que codifican las láminas nucleares en mamíferos (Modificada de Worman et al., 2009). Son 3 los genes que codifican para las láminas en los mamíferos. El gen *LMNA* ubicado en el cromosoma 1q21.2 codifica las láminas tipo A, siendo la prelámina A y la lámina C, generadas por splicing alternativo, las más abundantes. El gen *LMNB1* localizado en el cromosoma 5q23.3-q31.1 codifica para la lámina B1 y el gen *LMNB2* que se encuentra en el cromosoma 19p13.3 codifica para la lámina B2, las principales isoformas en células somáticas.

El procesamiento de las preláminas consiste en cuatro pasos; los tres primeros pasos son comunes para las preláminas tipo A y tipo B (Fig. 4) (Cau et al., 2014; Gruenbaum y Foisner, 2015; Reddy y Comai, 2016; Lattanzi et al., 2016; Charar y Gruenbaum, 2016):

- 1) Un grupo farnesilo es adicionado a la cisteína de la caja CaaX por la enzima farnesiltransferasa (FT). El grupo farnesilo hidrofóbico de 15 carbonos facilita el anclaje de la prelámina a la cara citosólica de la membrana del RE o de la MNE, permitiendo así los siguientes pasos del procesamiento, los cuales son llevados a cabo por enzimas que residen en estas membranas, cuyos sitios activos se ubican hacia el citosol.
- 2) Los últimos tres aminoácidos aaX son cortados por una de las dos proteasas, FACE1/ZMPSTE24 o FACE2/Rce1.
- 3) La adición de un grupo metilo al residuo de cisteína C-terminal ejecutada por la enzima isoprenil-cisteína-carboxilo-metiltransferasa (ICMT). El procesamiento

de las láminas tipo B termina en este paso, generando las láminas maduras que están permanentemente farnesiladas y carboximetiladas.

- 4) La prelámina A sufre un segundo corte proteolítico por la enzima FACE1/ZMPSTE24, lo que remueve los últimos 15 aminoácidos del extremo C-terminal, incluyendo el residuo de cisteína farnesilado y carboximetilado, para generar la lámina A madura.

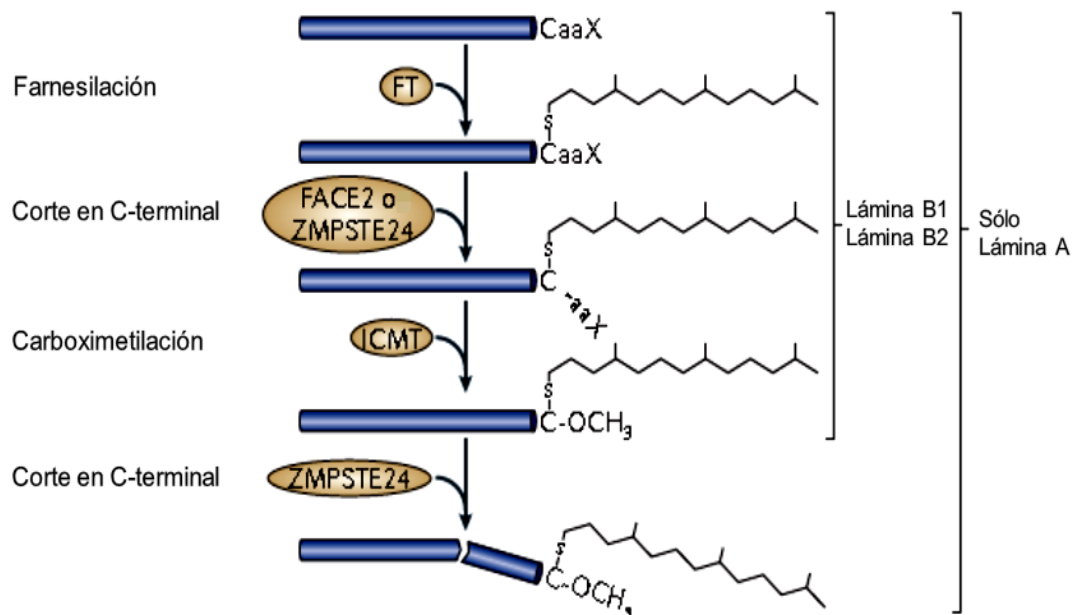


Fig. 4. Procesamiento de las láminas (Modificada de Burke y Stewart, 2013). La farnesilación de las láminas en la cisteína situada en la caja CaaX la lleva a cabo la enzima farnesiltransferasa (FT) y ocurre poco después de la síntesis de estas proteínas; enseguida ocurre la proteólisis de los residuos aaX por la enzima FACE2 para el caso de las láminas tipo B, y por la enzima ZMPSTE24 para el caso de la lámina A. Posteriormente se lleva a cabo la carboximetilación de la cisteína por la enzima ICMT. La lámina A, pero no las láminas tipo B, sufre la remoción de los últimos 15 amino ácidos, incluyendo la cisteína farnesilada, por la enzima ZMPSTE24, dando lugar a la lámina A madura.

La presencia o ausencia del grupo farnesilo determina la localización de las láminas. La farnesilación de las láminas tipo B fortalece su asociación con la MNI dentro de la LN, pero pueden localizarse también en el nucleoplasma perinucleolar y en el retículo nucleoplásmico (RN); por otro lado, la ausencia de dicha modificación en las láminas A y C permite que estas proteínas tengan una asociación más laxa con la EN dentro la LN, y que además formen parte de la matriz

nuclear, distribuyéndose en todo el nucleoplasma (Cau et al., 2014; Reddy y Comai, 2016).

De acuerdo con algunos experimentos de respuesta del núcleo a la deformación, se ha demostrado que las láminas tipo A incrementan la rigidez del núcleo, mientras que las láminas tipo B mantienen la elasticidad nuclear; así, las células de tejidos rígidos contienen mayor cantidad de las láminas tipo A que de las láminas tipo B. Otros estudios señalan que las células tienen la capacidad de adaptar su contenido de láminas en respuesta a las demandas de su microambiente (Ungricht y Kutay, 2017).

1.5. Las Laminopatías

Cuando se altera la integridad de la LN, los procesos que controla esta estructura celular se desregulan, lo que conlleva consecuencias patológicas (Brayson y Shanahan, 2017). Un gran número de mutaciones en las láminas y en las proteínas de unión a lámina se han ligado con un grupo heterogéneo y raro de enfermedades hereditarias llamadas laminopatías, lo que resalta la relevancia de las láminas en la salud humana (Gruenbaum y Foisner, 2015; Gonzalo et al., 2017; Lattanzi et al., 2016; Tariq et al., 2017). La mayoría de los síntomas de las laminopatías se desarrollan durante la infancia o adolescencia, pero algunas laminopatías son letales a muy temprana edad (Dorado y Andrés, 2017).

El gen *LMNA* es el que presenta una mayor frecuencia de mutaciones; la mayoría son mutaciones sin sentido, autosómicas dominantes que pueden interferir con el plegamiento, estabilidad y ensamble de la lámina A, o afectar sus propiedades bioquímicas e interacciones; también se pueden presentar mutaciones silenciosas que, aunque son silenciosas alteran el proceso de *splicing* (Gruenbaum y Foisner, 2015).

Las mutaciones en el gen *LMNA* ocasionan cambios en la abundancia o procesamiento postraducciona l de la lámina A, lo que da lugar a múltiples fenotipos clínicos que se agrupan en cuatro grupos principales de enfermedades:

enfermedades de músculo estriado o distrofias musculares (p.ej. Distrofia muscular Emery-Dreifuss o EDMD), síndromes lipodistróficos (p. ej. Lipodistrofia familiar parcial o FPLD), neuropatía periférica (p.ej. Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2B1 o CMT2B), y desórdenes que causan envejecimiento prematuro como el Síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS), el Síndrome de Werner atípico (AWS), y la Dermopatía restrictiva (RD) (Gruenbaum y Foisner, 2015; Dorado y Andrés, 2017; Gonzalo et al., 2017).

1.6. El síndrome de progeria Hutchinson-Gilford

Entre las distintas laminopatías, el síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS, por sus siglas en inglés) es el más estudiado, a pesar de ser un desorden genético extremadamente raro, con una tasa de incidencia de 1 por cada 4-8 millones de nacimientos. El HGPS ha llamado la atención de los investigadores debido a su singular fenotipo clínico que asemeja aspectos del envejecimiento fisiológico y que se manifiesta a una edad muy temprana (después de los 12 meses de edad); este fenotipo incluye osteoporosis, pérdida de grasa subcutánea, atrofia de la piel, alopecia, rigidez de las articulaciones, lipodistrofia de las extremidades y región facial, displasia esquelética, y enfermedad cardiovascular (Deepu et al., 2015; Charar y Gruenbaum, 2016; Vidak y Foisner, 2016; Tariq et al., 2017; Dorado y Andrés, 2017; Gonzalo et al., 2017). Los pacientes con progeria mueren a una edad promedio de 14.6 años, predominantemente por infarto del miocardio (Vidak y Foisner, 2016; Dorado y Andrés, 2017; Gonzalo et al., 2017).

La mutación causante de este síndrome es la más común entre las ligadas al envejecimiento prematuro (Gruenbaum y Foisner, 2015). Se trata de una mutación puntual silenciosa dominante *de novo* (c.1824C>T: GGC>GGT; p. G608G) en el exón 11 del gen *LMNA*, la cual activa un sitio críptico donador de *splicing*, generándose la síntesis de una variante de la prelámina A que carece de 50 aminoácidos, dentro de los cuales se localiza el sitio de corte para la enzima FACE1/ZMPSTE24; esta isoforma, denominada progerina, permanece farnesilada y carboximetilada permanentemente debido a que el sitio de corte proteolítico se localiza dentro de los aminoácidos eliminados por el *splicing* alternativo (Fig. 5). La

consecuencia funcional es que lo progerina no puede insertarse eficientemente en la LN y queda anclada a la MNI (Fig. 6) (Gruenbaum y Foisner, 2015; Charar y Gruenbaum, 2016; Reddy y Comai, 2016; Vidak y Foisner, 2016; Dorado y Andrés, 2017; Brayson y Shanahan, 2017; Tariq et al., 2017; Gonzalo et al., 2017).

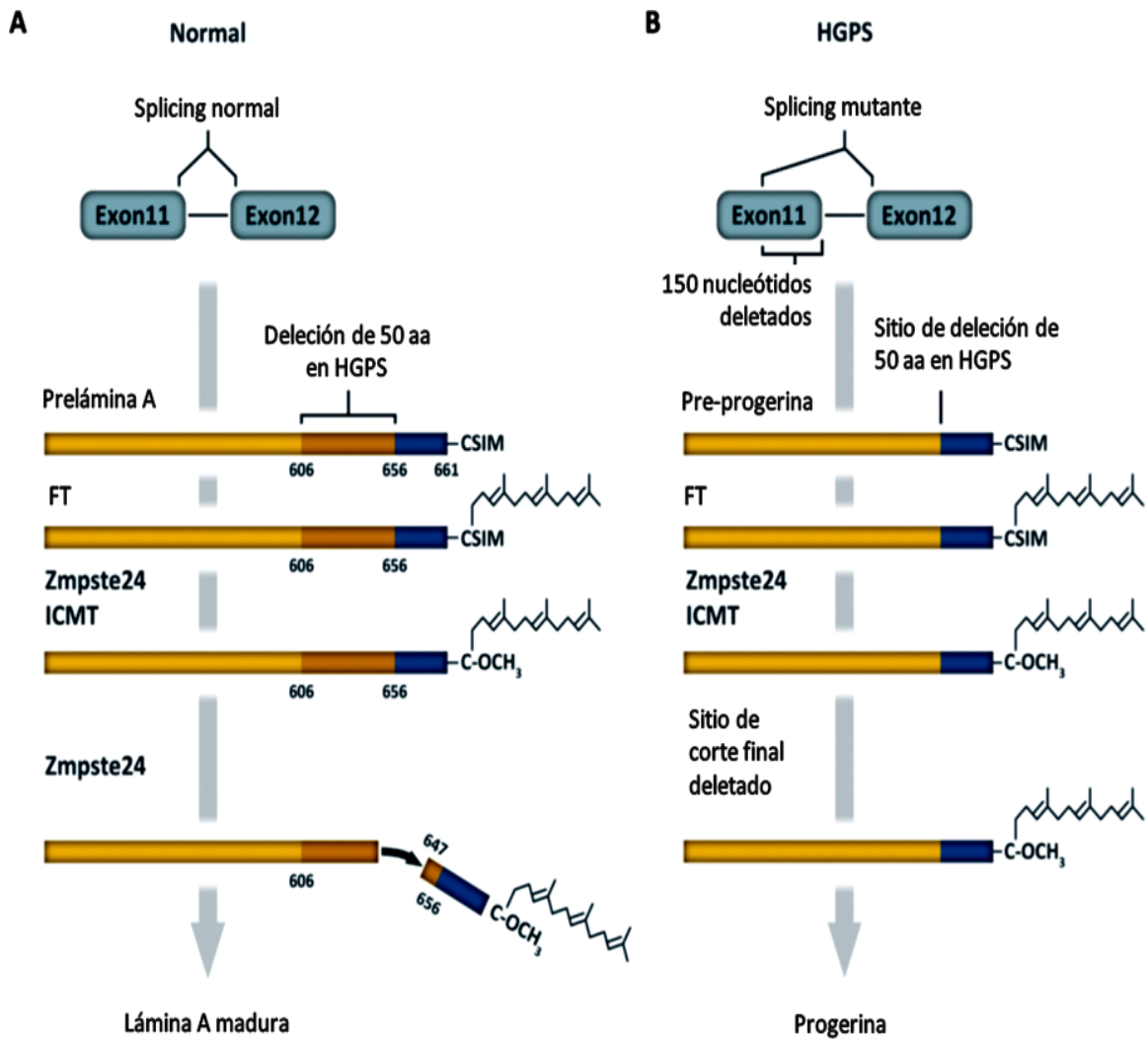


Fig. 5. Procesamiento anormal de la lámina A en el HGPS (Modificada de Gonzalo et al., 2017). (A) La lámina A madura se produce a partir de la prelámina A, la cual sufre farnesilación y metilación de un residuo de cisteína en el extremo C-terminal. Finalmente, el corte por la proteasa Zmpste24 entre los residuos 646-647 remueve el extremo C-terminal farnesilado. (B) En pacientes con HGPS, una mutación en el exón 11 activa un sitio crítico de *splicing*, lo que ocasiona la eliminación de 50 aminoácidos de la proteína precursora, incluyendo el sitio de corte final de Zmpste24, y la acumulación de la progerina farnesilada.

La progerina se expresa en múltiples tejidos, principalmente de origen mesenquimal como piel, hueso, músculo esquelético, tejido adiposo, corazón y arterias (Vidak y Foisner, 2016). La expresión de progerina provoca una reducción en los niveles de la lámina B1, así como el adelgazamiento y la desorganización global de la LN (Prokocimer et al., 2013; Tariq et al., 2017). Además, la progerina causa daños severos en la célula, especialmente en el núcleo (Fig. 6), ocasionando defectos en el ciclo celular y diferenciación, apoptosis y senescencia celular prematura (Reddy y Comai, 2016; Prokocimer et al., 2013).

Algunos de los fenotipos celulares más prominentes del HGPS son una morfología nuclear aberrante caracterizada por lobulaciones, alteraciones en la organización de la cromatina y en las marcas epigenéticas, desregulación de genes, aumento de daño al ADN, alteración en la distribución y funcionamiento de los poros nucleares, aberraciones teloméricas, y disfunción mitocondrial (Prokocimer et al., 2013; Reddy y Comai, 2016; Vidak y Foisner, 2016; Tariq et al., 2017; Brayson y Shanahan, 2017; Gonzalo et al., 2017). La inestabilidad de la heterocromatina y la disfunción de los poros nucleares parecen ser los responsables del reclutamiento deficiente de factores de reparación en los sitios de daño al ADN (Brayson y Shanahan, 2017), mientras que la morfología nuclear anormal es la que aparentemente inicia el proceso patológico (Tariq et al., 2017).

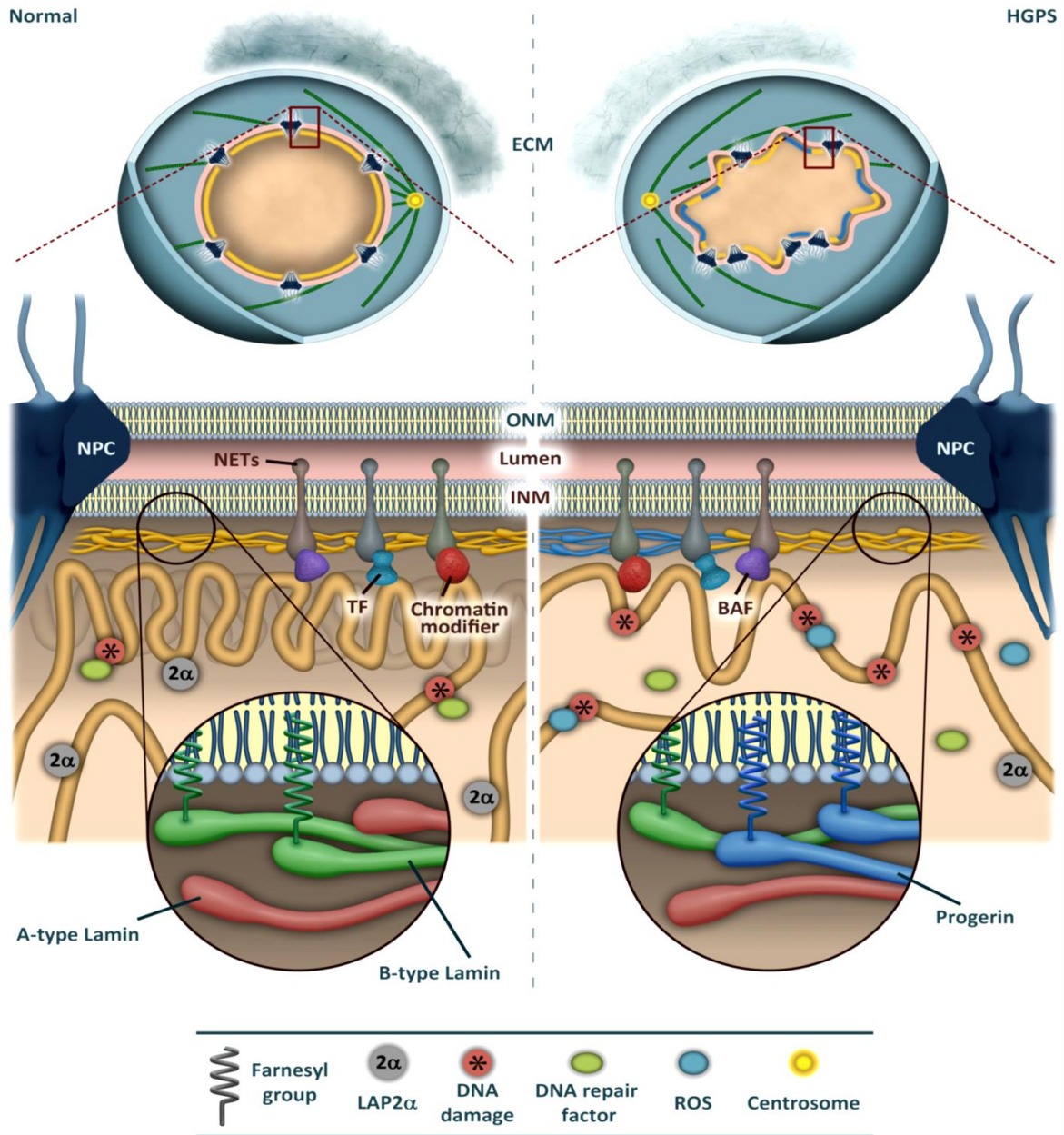


Fig. 6. La expresión de la progerina altera la organización nuclear y la estabilidad del genoma (Gonzalo et al., 2017). Las células de pacientes con HGPS se caracterizan por una serie de alteraciones que incluyen la expresión reducida de componentes de la matriz extracelular (ECM), protuberancias en la envoltura nuclear, agrupación de complejos de poro nuclear (NPC), pérdida de heterocromatina periférica, y reorganización de microtúbulos. La expresión de progerina afecta también la dinámica de las proteínas transmembranales de la envoltura nuclear (NETs, por sus siglas en inglés), incluyendo la emerina, y sus interacciones con las proteínas asociadas a la cromatina, como BAF, factores de transcripción (TF) y modificadores de la cromatina. Las células de progeria tienen mayores niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño al ADN, mientras que la proteína LAP2 α está regulada a la baja. ONM: Membrana nuclear externa; INM: Membrana nuclear interna.

2. ANTECEDENTES

La progerina daña la envoltura nuclear, provocando una cascada de alteraciones celulares y moleculares, incluyendo defectos en la morfología del núcleo y del nucléolo, pérdida de heterocromatina, daño al ADN y acortamiento de telómeros; sin embargo, no se conoce con precisión cómo ejerce su efecto sobre cada proceso celular. Es posible que la progerina altere un proceso celular clave y que este a su vez expanda los daños río abajo. En nuestro grupo de trabajo se decidió explorar esta posibilidad tomando en consideración que el transporte de proteínas a través del poro nuclear podría ser una función primaria que está dañada en las células de progeria, ya que la progerina altera la arquitectura nuclear y causa agrupamiento anormal de poros nucleares. El transporte activo de proteínas entre el núcleo y el citoplasma es mediado por un grupo de proteínas llamadas importinas y exportinas, y modulado por el gradiente núcleo-citoplasma de la proteína Ran GTPasa. Consistente con esta idea, previamente se demostró que el gradiente de Ran está afectado en el síndrome de progeria, lo que provoca una reducción en los niveles nucleares de ciertas proteínas (Kelley et al., 2011). Por lo tanto, decidimos analizar si el transporte de proteínas recíproco, es decir la exportación nuclear, está afectado en las células HGPS. Escogimos diferentes proteínas nucleares que contienen señales de exportación nuclear (NES, por sus siglas en inglés) reconocidas por la exportina CRM1 (B23, STAT3 y ZO-2). De manera interesante, se observó una disminución en la intensidad de la señal en el núcleo y un aumento de la misma en el citoplasma de los fibroblastos HGPS, en comparación con los fibroblastos control, sugiriendo una deslocalización de las proteínas del núcleo hacia el citoplasma, lo que se confirmó mediante la cuantificación de la relación núcleo/citoplasma de la señal de fluorescencia (Fn/c) para cada proteína (Fig. 7). Para discernir si su localización aberrante se debe a una falla en la importación o en la exportación nuclear, los cultivos celulares se trataron por 24 horas con el fármaco Leptomycin B (LMB), inhibidor de la exportina CRM1. Después del tratamiento los fibroblastos HGPS recuperaron la acumulación nuclear de las tres proteínas analizadas (Fig. 7), lo que demuestra que su deslocalización hacia el

citoplasma se debe a un aumento en su exportación nuclear mediada por CRM1 y no a una deficiencia en el proceso de importación nuclear.

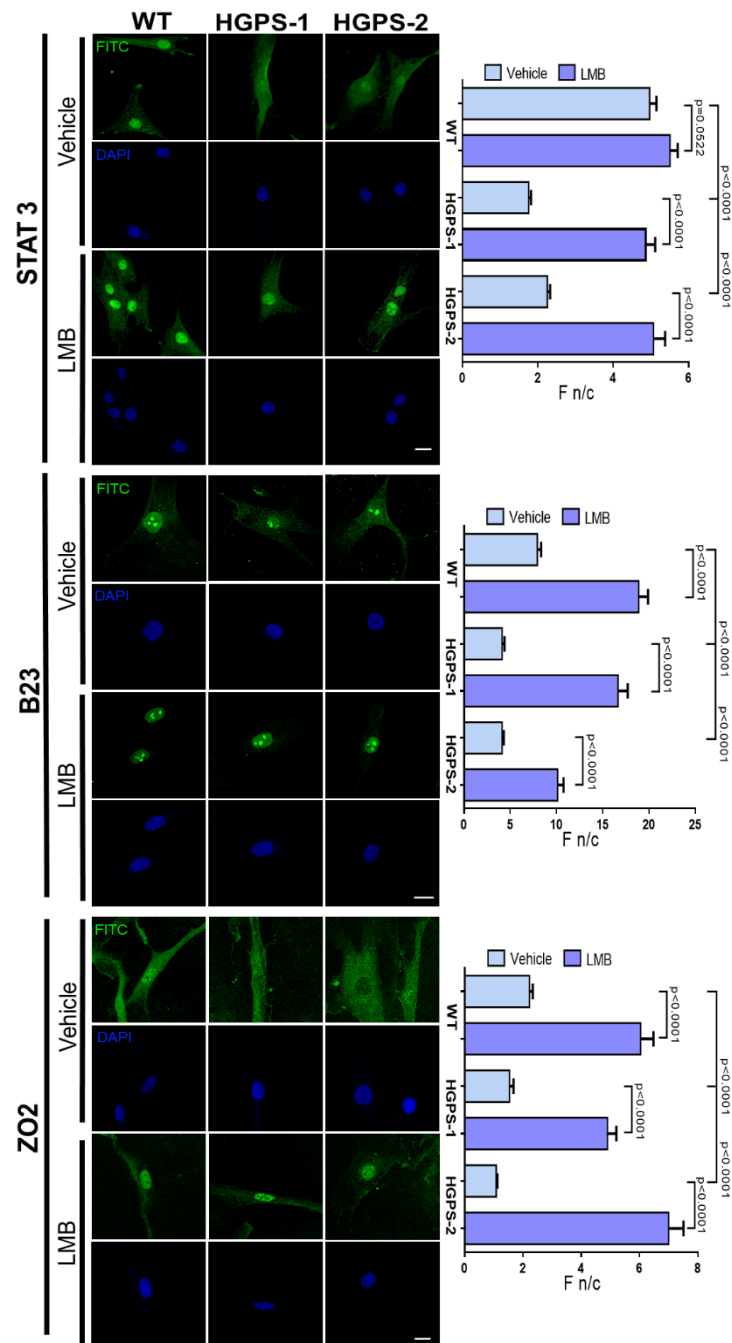


Fig. 7. Tres diferentes proteínas nucleares que tiene señal de exportación nuclear (NES) están deslocalizadas hacia el citoplasma en los fibroblastos HGPS (Vélez-Aguilera y Rodríguez-Pérez, datos no publicados). Se muestran los experimentos de IFI para las proteínas STAT3, B23 y ZO-2 (verde) en los fibroblastos de progeria (HGPS1 y HGPS2) y en los fibroblastos normales.

De acuerdo con los resultados del restablecimiento de la localización subcelular de proteínas después del tratamiento con LMB, se procedió a evaluar la expresión de CRM1 en los fibroblastos HGPS. Se observó un aumento de CRM1 en el núcleo de los fibroblastos HGPS mediante IFI, en comparación con los fibroblastos control (Fig. 8A), lo cual se confirmó por ensayos de inmunodetección en fase sólida (Fig. 8B), y RT-qPCR (Fig. 8C). Estos resultados sugieren que el mecanismo de exportación nuclear mediado por la exportina CRM1 se encuentra exacerbado en las células de pacientes con HGPS, debido a la sobreexpresión a nivel transcripcional de CRM1.

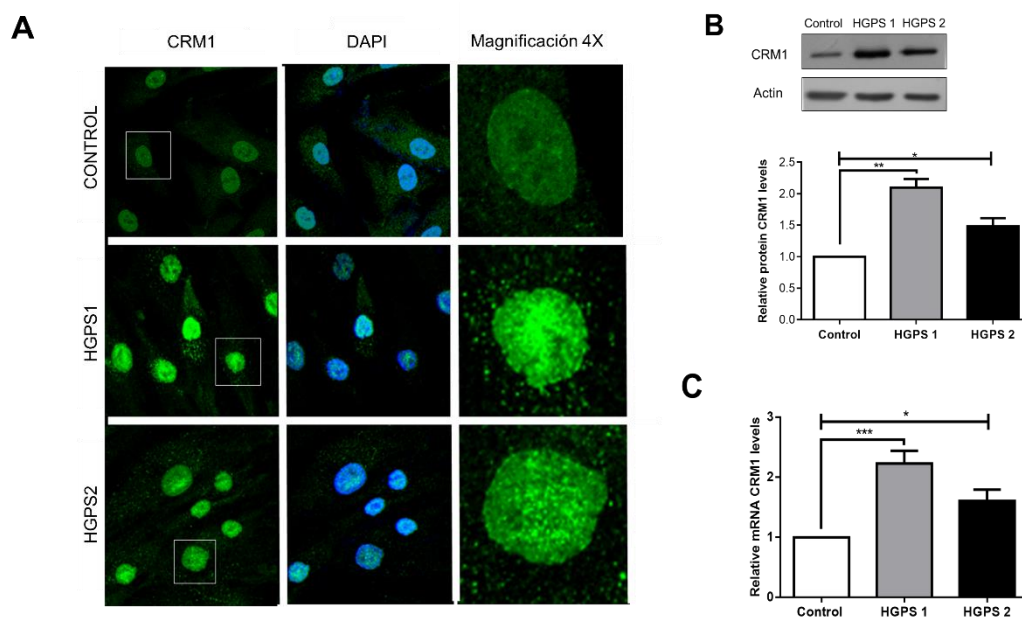


Fig. 8. Los niveles de la exportina CRM1 están aumentados en fibroblastos HGPS (Rodríguez-Pérez y Vásquez-Limeta, datos no publicados). (A) Ensayo de IFI contra CRM1 (verde) en fibroblastos HGPS1 y HGPS2. Cuantificación de CRM1 por Western blot (B) y por RT-qPCR (C) en los diferentes cultivos de fibroblastos.

Debido a que la LMB mitiga el mecanismo de exportación nuclear mediado por CRM1, nuestro grupo de trabajo decidió abordar la hipótesis de que la atenuación de la exportación nuclear exacerbada podría aminorar el fenotipo de las células HGPS.

La progerina provoca un fenotipo de estrés nucleolar que se caracteriza por una disminución del número de nucléolos y un aumento en su tamaño (Fig. 9A, B y C). Por lo tanto, se evaluó el efecto de LMB sobre la morfología del nucléolo mediante ensayos de IFI contra la proteína nucleolar fibrilarina. Los resultados mostraron que en las células tratadas con LMB disminuye el área nucleolar y aumenta el número de nucléolos (Fig. 10A, B y C), lo que asemeja la estructura de los nucléolos de los fibroblastos normales. En conclusión, la disminución de la exportación nuclear exacerbada alivia el estrés nucleolar de las células de progeria.

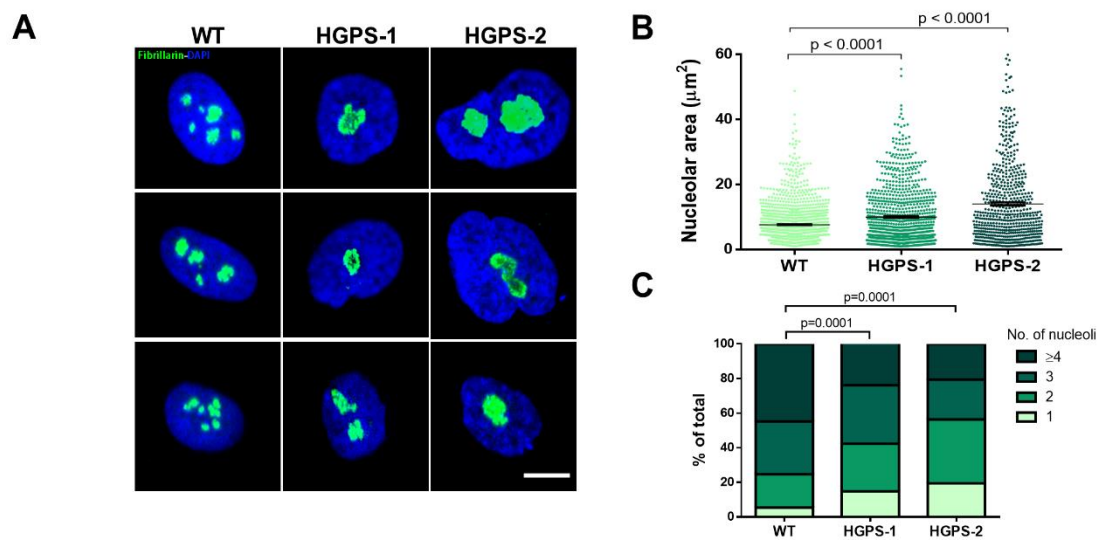


Fig. 9. Los fibroblastos de progeria presentan estrés nucleolar (Vélez-Aguilera y García-Aguirre, datos no publicados). (A) IFI contra fibrilarina (verde), (B) medición del área nucleolar (μm^2), y (C) cuantificación de nucléolos en los fibroblastos normales y HGPS1 y HGPS2.

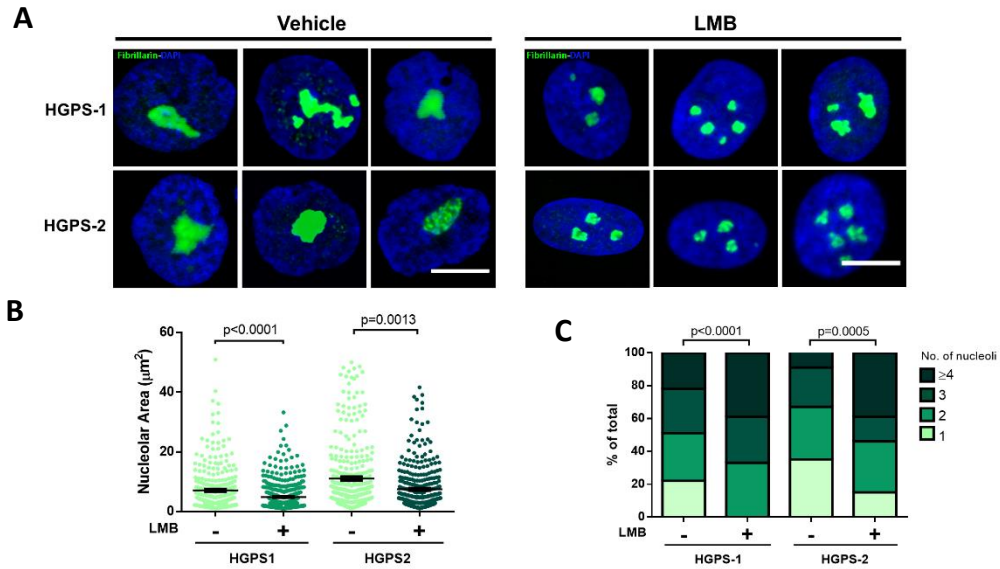


Fig. 10. La disminución de la exportación nuclear mediante LMB alivia el estrés nucleolar de los fibroblastos HGPS (Vélez-Aguilera y García-Aguirre, datos no publicados). (A) IFI contra fibrilarina (verde), (B) medición del área nucleolar (μm^2), y (C) cuantificación del número de nucléolos en los fibroblastos HGPS1 y HGPS2 tratados con LMB o solamente con el vehículo.

Un siguiente paso fue evaluar el efecto de la disminución de la exportación nuclear sobre la senescencia celular, característica distintiva de las células HGPS, utilizando la actividad de la β -Galactosidasa (SA- β Gal) y los niveles de lámina B1 como marcadores senescentes. Sorprendentemente los fibroblastos HGPS tratados con LMB presentaron una disminución considerable en el número de células senescentes (Fig. 11A) y una recuperación de los niveles de lámina B1 (Fig. 11B y C).

Los fibroblastos HGPS presentan una morfología senescente, es decir que las células son más extendidas y por tanto tienen un mayor tamaño (Fig. 12A). Se evaluó efecto de la LMB sobre este fenotipo celular mediante tinción con faloidina, observándose que al atenuar la exportación nuclear exacerbada mediante el uso de LMB, la forma de las células de progeria se recupera (Fig. 12B).

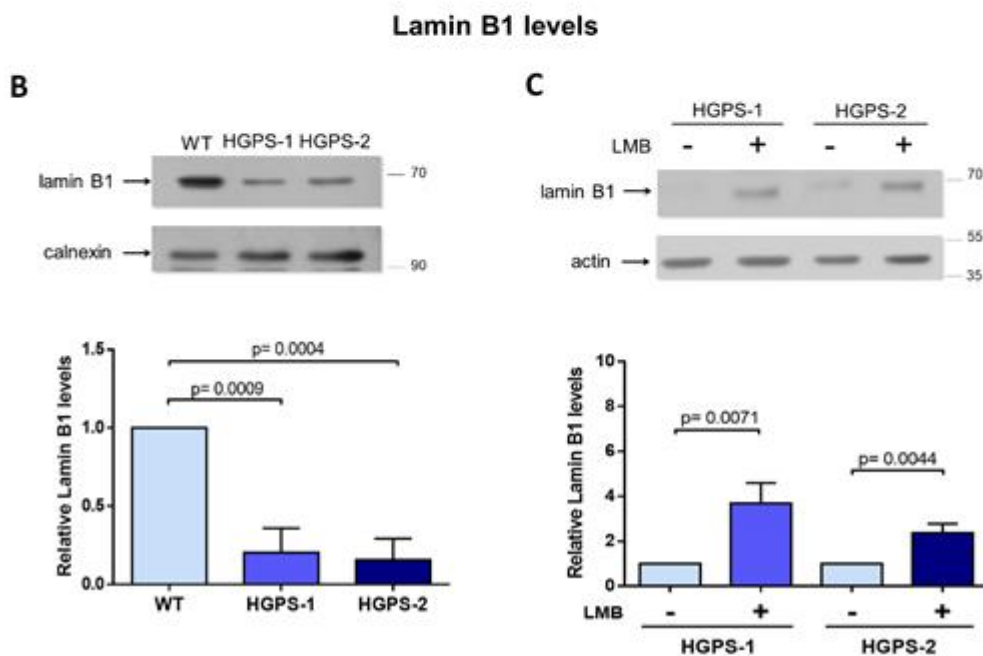
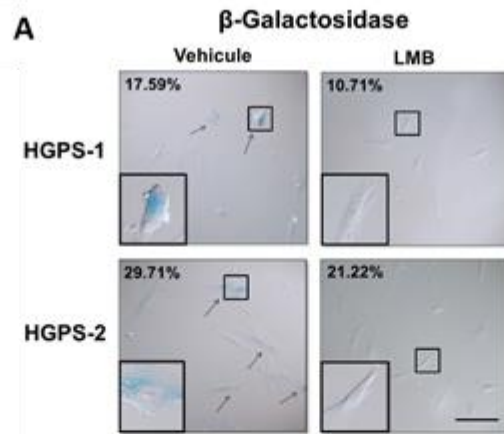


Fig. 11. La atenuación de la exportación nuclear exacerbada con LMB disminuye la senescencia celular de los fibroblastos HGPS (García-Aguirre, datos no publicados). (A) Ensayo de SA-βGal (color azul) sobre fibroblastos HGPS1 y HGPS2 tratados con LMB. (B y C) Cuantificación de la lámina B1 por ensayos de Western blot en los fibroblastos normales y HGPS1 y HGPS2 (B). (C) Cuantificación de la lámina B1 por ensayos de Western blot en los fibroblastos HGPS1 y HGPS2 tratados con LMB o con el vehículo.

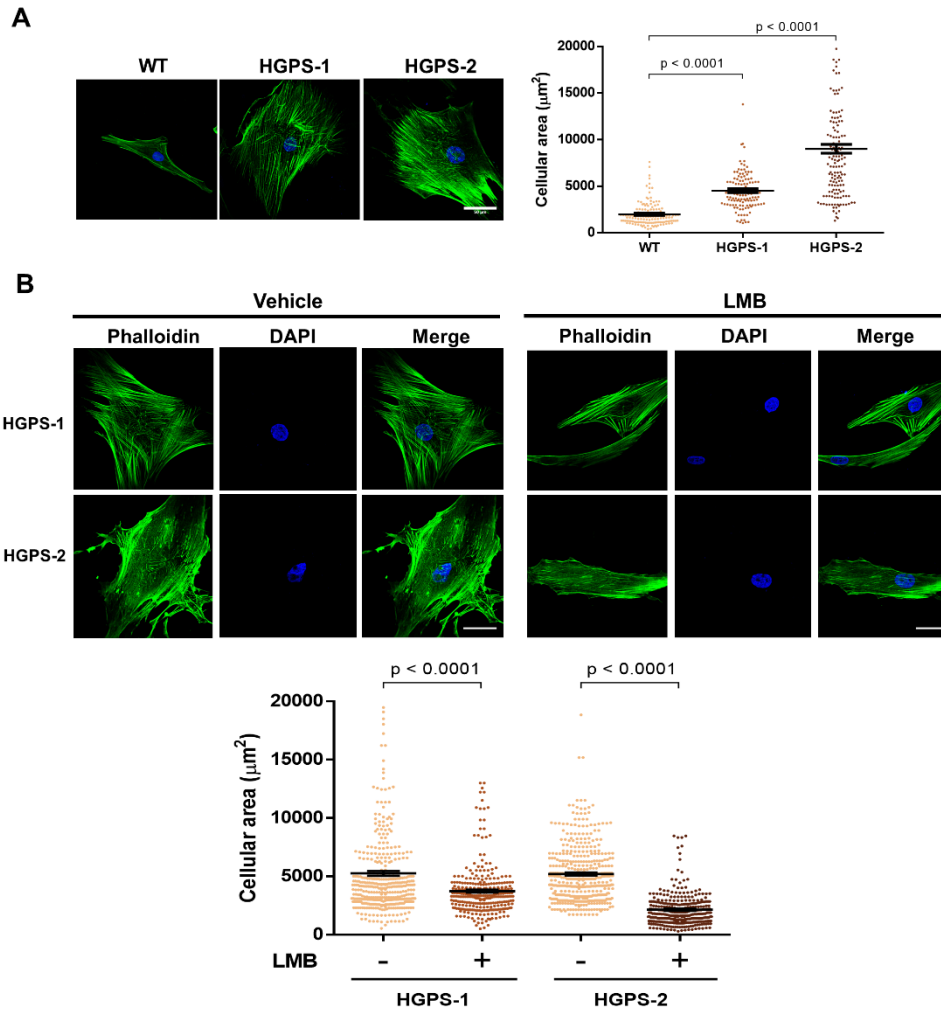


Fig. 12. La disminución de la exportación nuclear por medio de tratamiento con LMB alivia la morfología celular senescente de los fibroblastos HGPS (García-Aguirre, datos no publicados). (A) Tinción con faloidina (verde) para visualizar el citoesqueleto de actina de los fibroblastos normales y HGPS1 y HGPS2. (B) Los fibroblastos HGPS1 y HGPS2 se trataron con LMB o con el vehículo solamente y posteriormente se tiñeron con faloidina para visualizar el citoesqueleto de actina.

3. JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio se ha estudiado el efecto benéfico de la atenuación de la exportación nuclear exacerbada mediante tratamiento con LMB sobre el fenotipo celular de los fibroblastos HGPS. Hemos observado que este tratamiento alivia algunas características de las células de progeria, como el estrés nucleolar, la senescencia celular y la morfología celular senescente; sin embargo, es necesario evaluar si el rescate del fenotipo HGPS mediante la modulación farmacológica de CRM1 abarca otros defectos presentes en estas células. En este estudio decidimos analizar el efecto del fármaco LMB sobre la morfología nuclear aberrante, una característica distintiva de células HGPS que se ha estudiado ampliamente.

4. HIPÓTESIS

La atenuación de la exportación nuclear exacerbada mediante Leptomycin B mejorará la morfología nuclear de fibroblastos de progeria.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

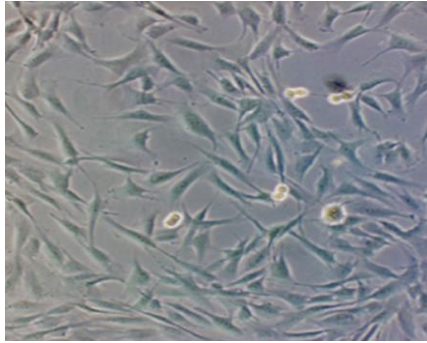
Evaluar el efecto de la atenuación de la exportación nuclear exacerbada mediante LMB sobre la morfología nuclear en fibroblastos de progeria.

5.2. Objetivos específicos

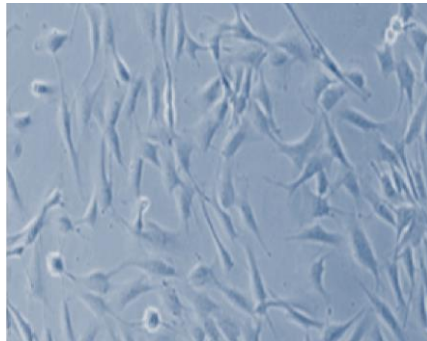
1. Evaluar la morfología nuclear de fibroblastos normales y HGPS a través del número de pasajes de los cultivos.
2. Analizar la morfología nuclear de fibroblastos HGPS tratados con LMB.
3. Analizar la localización subcelular de dos proteínas relacionadas con la lámina nuclear y que contienen NES (α -DB y Dp71) en fibroblastos HGPS tratados con LMB.

6. MODELO DE ESTUDIO

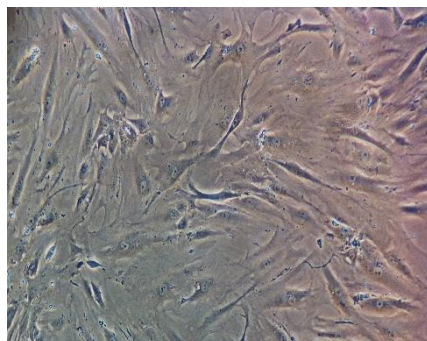
Células AG08469 (Control): Fibroblastos humanos de tejido de piel provenientes de un individuo sano (caucásico), padre de un niño afectado.



Células AG11513 (HGPS1): Fibroblastos humanos de tejido de piel provenientes de una paciente caucásica con HGPS de 8 años de edad.



Células AG11498 (HGPS2): Fibroblastos humanos de tejido de piel de un paciente con HGPS de sexo masculino, de 14 años de edad, que presentaba además daño cardiovascular.



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivo celular

Se utilizaron fibroblastos provenientes de dos pacientes con HGPS (AG11513 y AG11498, Coriell Cell Repository) con la mutación LMNA G608G y como control del estudio se emplearon fibroblastos de un individuo sano (AG08469 Coriell Cell Repository). Los cultivos celulares se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 50 U/mL de penicilina y estreptomicina. Las células se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂. Cuando se indica, los cultivos fueron tratados con 50 nM de Leptomicina B (LMB; Sigma-Aldrich) diluida en etanol al 70% durante 6 días o con 10µM de inhibidor de farnesiltransferasa (FTI; FTI-277, Sigma-Aldrich) diluido en DMSO. Los cultivos se trataron de forma paralela solamente con el vehículo correspondiente, etanol al 70% o DMSO, respectivamente.

7.2. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para la lámina A/C, α-DB, Dp71 y Sp3. Las células se sembraron sobre cubreobjetos estériles en cajas de 35 mm y se incubaron toda la noche a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5%. Al día siguiente se removió el medio de cultivo y las células se lavaron con 2 mL de PBS; enseguida se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10 min y se permeabilizaron y bloquearon como indica la tabla 1. Las células se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. Transcurrido ese tiempo, las preparaciones se lavaron con PBS y para teñir los núcleos se adicionó DAPI (1:600 a partir de un stock de 0.1 µg/µL, Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron con PBS y agua Milli-Q, se dejaron secar y posteriormente se montaron en portaobjetos con VectaShield

(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA). Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal (SPE/SP8 Leica, Heidelberg, Alemania).

Tabla 1. Condiciones de permeabilización y bloqueo para ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

		Permeabilización	Bloqueo
Lam A/C	Ac. Santa Cruz Biotechnology	Tritón X-100-PBS al 0.2%, 10 min	BSA 3%, SFB 5% en PBS; 30 min
	Ac. DSHB	Solución amortiguadora IF (Tritón 0.1%, SDS 0.02%, BSA 10 mg/mL en PBS), 10 min	
α -DB		Tritón X-100-PBS al 0.2%, 10 min	BSA 8%, SFB 10% en PBS; 20 min
Dp71		Tritón X-100-PBS al 0.2%, 10 min	Gelatina 0.5% y SFB 1% en PBS, 20 min
Sp3		Tritón X-100-PBS al 0.2%, 10 min	BSA 3%, SFB 5% en PBS; 20 min

7.3. Anticuerpos

Para los ensayos de inmunofluorescencia se emplearon los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal de conejo anti-lámina A/C (1:200+5%BSA) (sc-20681, Santa Cruz Biotechnology); anticuerpo monoclonal de ratón anti-lámina A/C (1:10+solución amortiguadora IF) (MANLAC3(4C10), DSHB, Universidad de Iowa); anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -Distrobrevina (1:10+5%BSA) (610766, Transduction Laboratories); anticuerpo policlonal de conejo anti-Dp71 (1:25+3%BSA) (+78); anticuerpo policlonal de conejo anti-Sp3 (1:25+3%BSA) (sc-644, Santa Cruz Biotechnology).

7.4. Análisis morfométrico de los núcleos

Para analizar la morfología nuclear los diferentes cultivos de fibroblastos se sometieron a ensayos de IFI para la lámina A/C y después se seleccionaron al azar >200 núcleos por cada condición experimental y se analizaron mediante el Plugin NII del programa ImageJ (Filippi-Chiela et al., 2012). Se obtuvieron mediciones para los parámetros de contorno nuclear (perímetro^2 (elipse) / $4\pi \times \text{área}$) y razón de radio (radio mayor/radio menor) (Lammerding et al., 2005, Filippi-Chiela et al., 2012, Rodríguez et al., 2014) y se graficaron posteriormente.

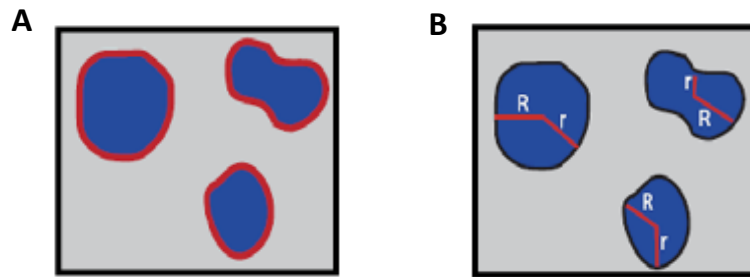


Fig. 13. Representación de los parámetros considerados para el análisis morfométrico nuclear (Tomado y modificado de Filippi-Chiela et al., 2012). (A) Contorno nuclear y (B) razón de radio.

8. RESULTADOS

8.1. Análisis de la morfología nuclear de los fibroblastos normales y HGPS con relación al número de pasajes

Se procedió a analizar la morfología nuclear de los fibroblastos normales y HGPS1 y HGPS2 mediante ensayos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-lámina A/C. En los fibroblastos control se observaron núcleos con la forma típica de elipse, mientras que los fibroblastos HGPS presentaron núcleos con morfología aberrante caracterizada por la presencia de protuberancias y pliegues de la envoltura nuclear (Fig. 14).

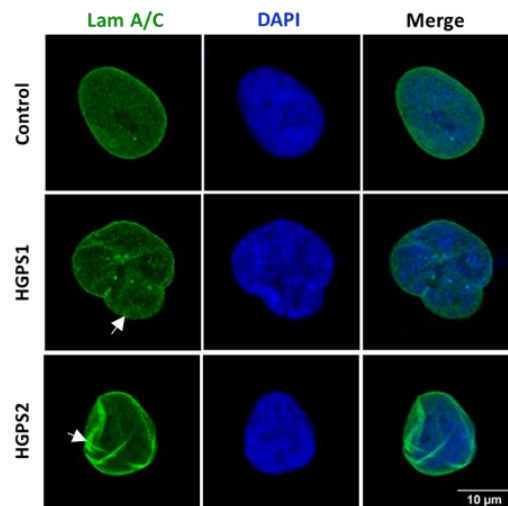


Fig. 14. Morfología nuclear de los fibroblastos y HGPS. Se muestran ensayos de inmunofluorescencia para la proteína lámina A/C en fibroblastos normales y HGPS, utilizando el anticuerpo anti-lámina A/C DSHB (verde); los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) previo al análisis por microscopía confocal. Se observa la presencia de protuberancias y pliegues en los fibroblastos HGPS1 y HGPS2 (flechas blancas).

Posteriormente se monitoreó la morfología nuclear durante diferentes pasajes de los cultivos de fibroblastos normales y HGPS. Se llevó a cabo un análisis morfométrico de los núcleos en los pasajes 2, 3, 4 y 5 de cada cultivo, empleando el Plugin NII de ImageJ, como se describe en la sección de Materiales y métodos. El parámetro del contorno nuclear es un indicativo de irregularidad morfológica, mientras que la razón de radio es proporcional al tamaño nuclear. De acuerdo con

la medición del contorno nuclear, los núcleos de los fibroblastos HGPS1 y HGPS2 presentan irregularidades morfológicas desde el pasaje 2 hasta el pasaje 5, en comparación con los fibroblastos control (Fig. 15A). Por lo que respecta a la medición de la razón de radio, los núcleos de los fibroblastos HGPS1 y HGPS2 muestran un menor tamaño que los núcleos de los fibroblastos control a lo largo de todos los pasajes analizados (Fig. 15B).

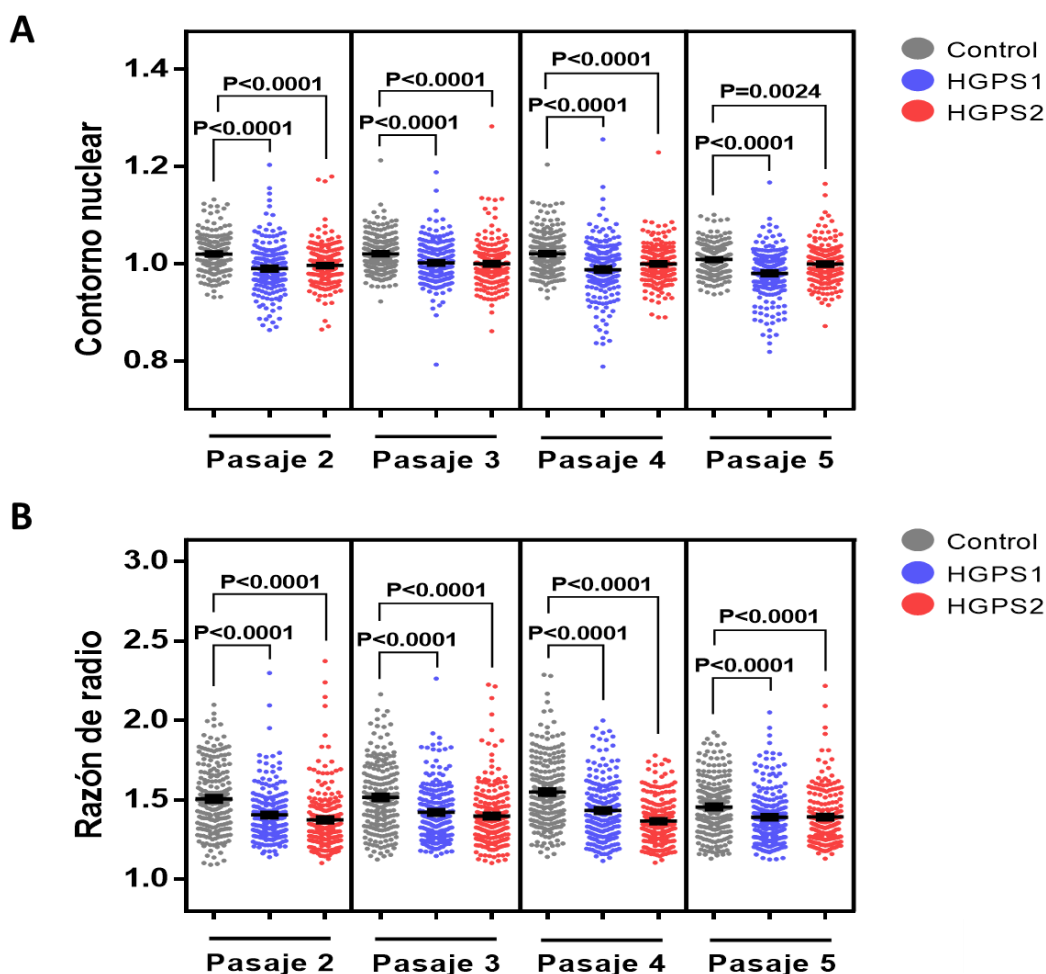


Fig. 15. Análisis morfométrico nuclear de los fibroblastos control y HGPS en relación al número de pasajes. (A) Gráfica de contorno nuclear de los fibroblastos normales y HGPS. Se observa una diferencia significativa entre los fibroblastos control y HGPS1 y HGPS2 del pasaje 2 al 5. (B) Gráfica de la razón de radio de los fibroblastos normales y HGPS. Los valores de los fibroblastos HGPS1 y HGPS2 son más pequeños con respecto a los valores de los fibroblastos control desde el pasaje 2 hasta el pasaje 5. n>200 núcleos. Los datos se analizaron mediante la prueba estadística Mann Whitney.

8.2. La atenuación de la exportación nuclear exacerbada mediante tratamiento con LMB recupera la morfología nuclear de los fibroblastos HGPS

Debido a que existe una diferencia significativa entre la morfología nuclear de los fibroblastos normales y HGPS independientemente del número de pasajes de los cultivos, se seleccionó el pasaje 3 para realizar los siguientes ensayos, ya que en este punto se han analizado los fenotipos de las células HGPS mencionados anteriormente.

Para evaluar el efecto de la atenuación de la exportación nuclear exacerbada sobre la morfología nuclear en los fibroblastos HGPS, se procedió a tratar fibroblastos normales y HGPS con LMB durante 3 y 6 días y enseguida se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia indirecta contra la lámina A/C. De manera interesante, se observó una clara recuperación de la morfología nuclear de los fibroblastos HGPS tanto a los 3 días (Fig. 16A) como a los 6 días (Fig. 16D) de tratamiento con LMB; los datos del contorno nuclear y de la razón de radio confirmaron estas observaciones, ya que se observó una diferencia significativa entre los fibroblastos HGPS tratados con LMB y los fibroblastos HGPS tratados solamente con el vehículo tanto al día 3 (Fig. 16B y C) como al día 6 (Fig. 16E y F) de tratamiento. En su conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con LMB alivia la morfología nuclear de los fibroblastos HGPS y la asemeja a la de los fibroblastos normales.

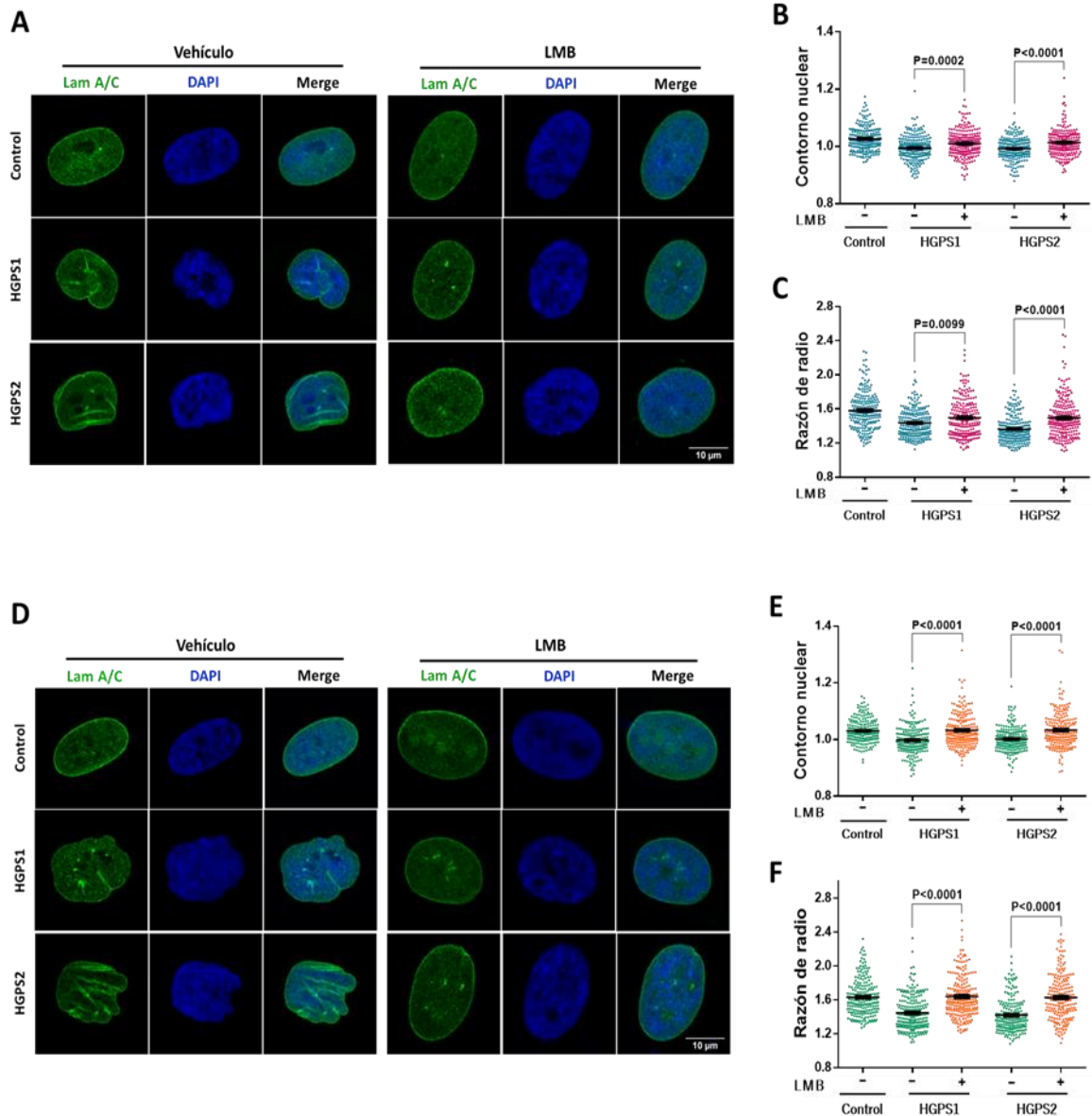


Fig. 16. La atenuación de la exportación nuclear exacerbada de los fibroblastos HGPS recupera la morfología nuclear. (A y D) Ensayos de IFI para la lámina A/C en los fibroblastos normales y HGPS tratados con LMB o con el vehículo durante 3 (A) y 6 (D) días. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) previo al análisis por microscopía confocal. Se aprecia una clara recuperación de la morfología nuclear en los fibroblastos HGPS1 y HGPS2 tratados con LMB. (B, C, E y F) Gráficas de los valores de contorno nuclear y razón de radio de los fibroblastos control y HGPS tratados con LMB o con el vehículo por 3 (B, C) y 6 días (D, F). Los valores de los fibroblastos HGPS1 y HGPS2 tratados con LMB se asemejan a los valores de los fibroblastos normales. $n > 200$ núcleos. Los datos se analizaron mediante la prueba estadística Mann Whitney.

8.3. Comparación de los tratamientos con LMB y FTI sobre la morfología nuclear de los fibroblastos HGPS

Se ha reportado previamente que el inhibidor de la enzima farnesiltransferasa (FTI), el cual se emplea actualmente como agente terapéutico para la progeria, mejora la morfología nuclear aberrante de las células HGPS; por esta razón, decidimos comparar el efecto de ambos tratamientos (FIT y LMB) en los fibroblastos HGPS. Se corroboró que el FTI mejora la forma nuclear de las células HGPS ya que se observaron núcleos redondos después del tratamiento; sin embargo, estos núcleos presentaron forma de dona (Fig. 17B). En contraste, los núcleos de los fibroblastos HGPS tratados durante 3 y 6 días con LMB (Fig. 17C) se asemejan más a los núcleos ovalados de los fibroblastos normales (Fig. 17A).

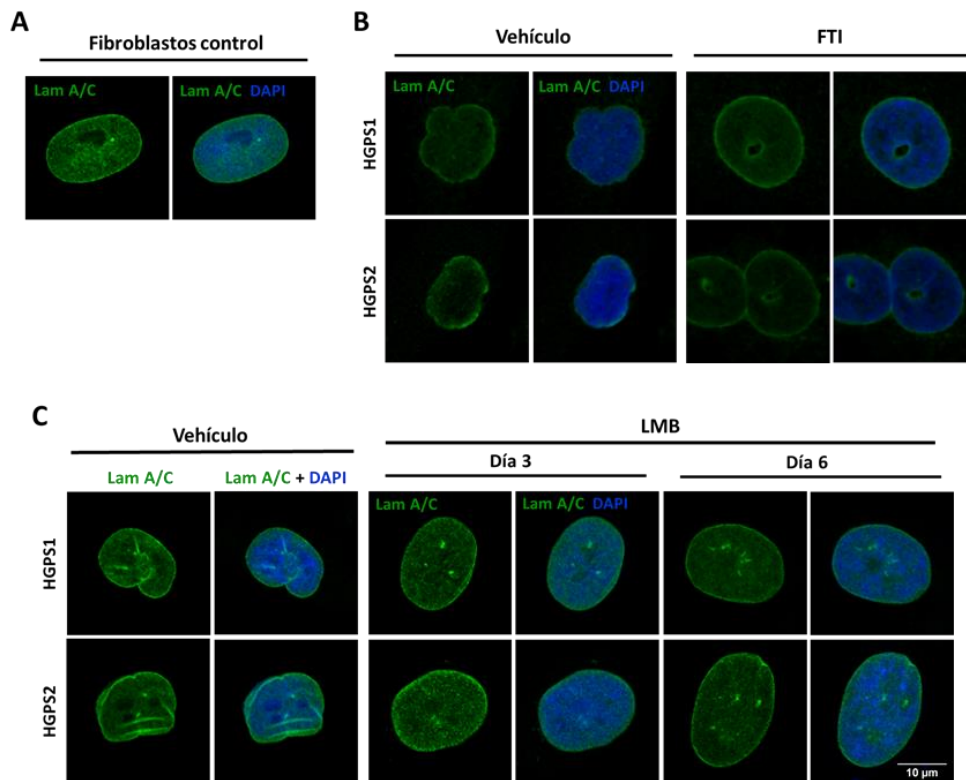


Fig. 17. La morfología nuclear de los fibroblastos HGPS tratados con LMB es más parecida a la de los fibroblastos normales que la de los fibroblastos HGPS tratados con FTI. (A) IFI para la lámina A/C sobre fibroblastos normales. **(B)** IFI para la lámina A/C sobre fibroblastos HGPS tratados con FTI. **(C)** IFI para la lámina A/C sobre fibroblastos HGPS tratados por 3 y 6 días con LMB. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) previo al análisis por microscopía confocal.

8.4. Distribución subcelular de las proteínas α -DB y Dp71 en los en los fibroblastos HGPS

Previamente se ha reportado que las proteínas α -Distrobrevina (α -DB) y Dp71 se localizan en el núcleo e interaccionan con la lámina nuclear en diferentes líneas celulares, lo que sugiere su participación en el mantenimiento de la estructura nuclear (Fuentes-Mera et al., 2006; González-Ramírez et al., 2008). Además, estas dos proteínas contienen señales de exportación nuclear (NES) reconocidas por la exportina CRM1. Por lo tanto, se procedió a analizar si la localización nuclear de estas dos proteínas se ve alterada en las células HGPS debido a la sobreexpresión de CRM1. Con este fin, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta en los fibroblastos normales HGPS tratados con LMB o solamente con el vehículo durante 24 horas.

Para el caso de la Dp71 se observó una deslocalización de la proteína del núcleo hacia el citoplasma en los fibroblastos HGPS tratados con el vehículo, en comparación con los fibroblastos normales (Fig. 18A, panel izquierdo). De manera interesante, se observó un restablecimiento de la distribución nuclear de la proteína en los fibroblastos HGPS tratados con LMB (Fig. 18A, panel derecho). Estas observaciones se confirmaron mediante la cuantificación de la Fn/c, en donde se observó una disminución de la señal nuclear de la proteína en los fibroblastos HGPS tratados solamente con el vehículo, con respecto a los fibroblastos normales (Fig. 18B) y un aumento significativo de la señal de la proteína dentro del núcleo en los fibroblastos HGPS después del tratamiento con LMB (Fig. 18C).

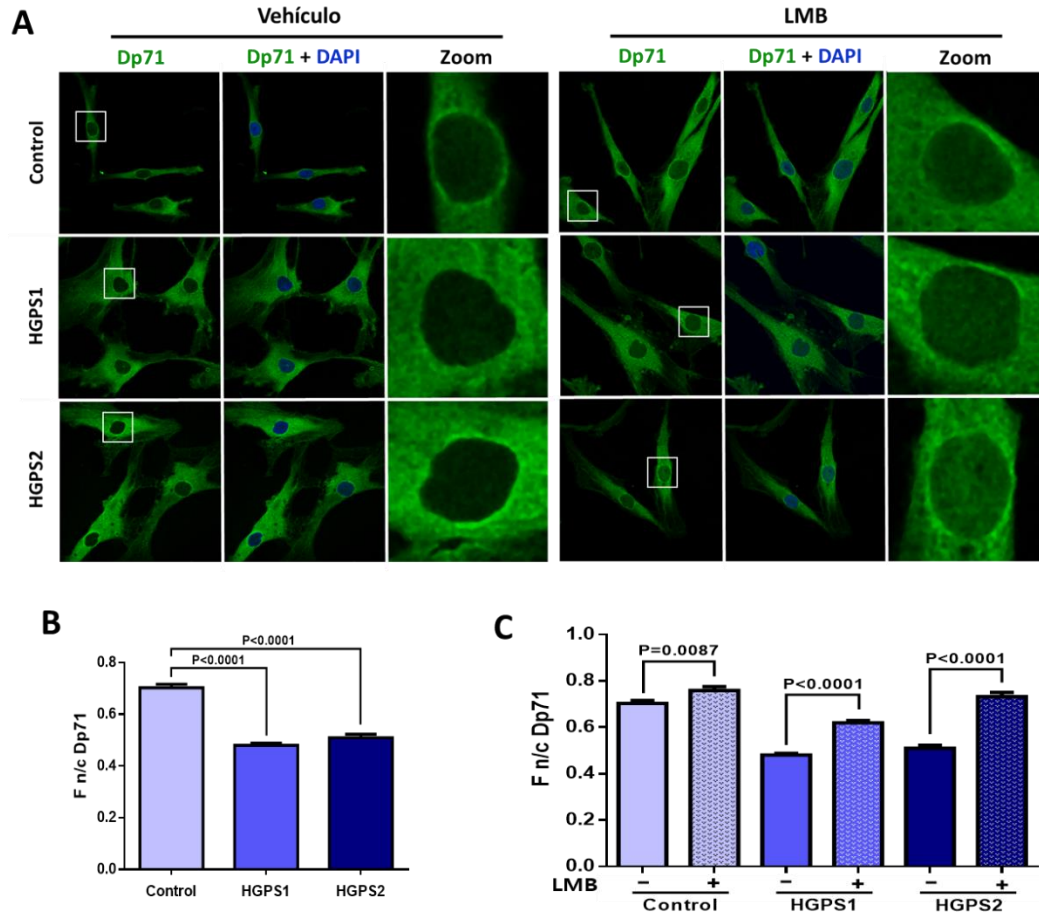


Fig. 18. Distribución subcelular de la Dp71 en los fibroblastos normales y HGPS tratados con LMB o con el vehículo. (A) IF para la Dp71 (verde) en fibroblastos normales y HGPS tratados con el vehículo o con LMB. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) previo al análisis por microscopía confocal. (B) Se observa la cuantificación de la Fn/c de los fibroblastos control y HGPS tratados con el vehículo. (C) Se observa la cuantificación de la Fn/c de los fibroblastos control y HGPS tratados con LMB o con el vehículo solamente. n=100 células. Para el análisis de los datos se aplicó la prueba t no pareada.

Por lo que respecta a la α -DB, ésta proteína se encontró deslocalizada del núcleo hacia el citoplasma en los fibroblastos HGPS1 tratados con el vehículo, pero no en los fibroblastos HGPS2 (Fig. 19A, panel izquierdo). Después del tratamiento con LMB se observó una acumulación nuclear de la α -DB en ambos cultivos HGPS (Fig. 19A, panel derecho). estas observaciones se corroboraron mediante la cuantificación de la Fn/c (Fig. 19B y C).

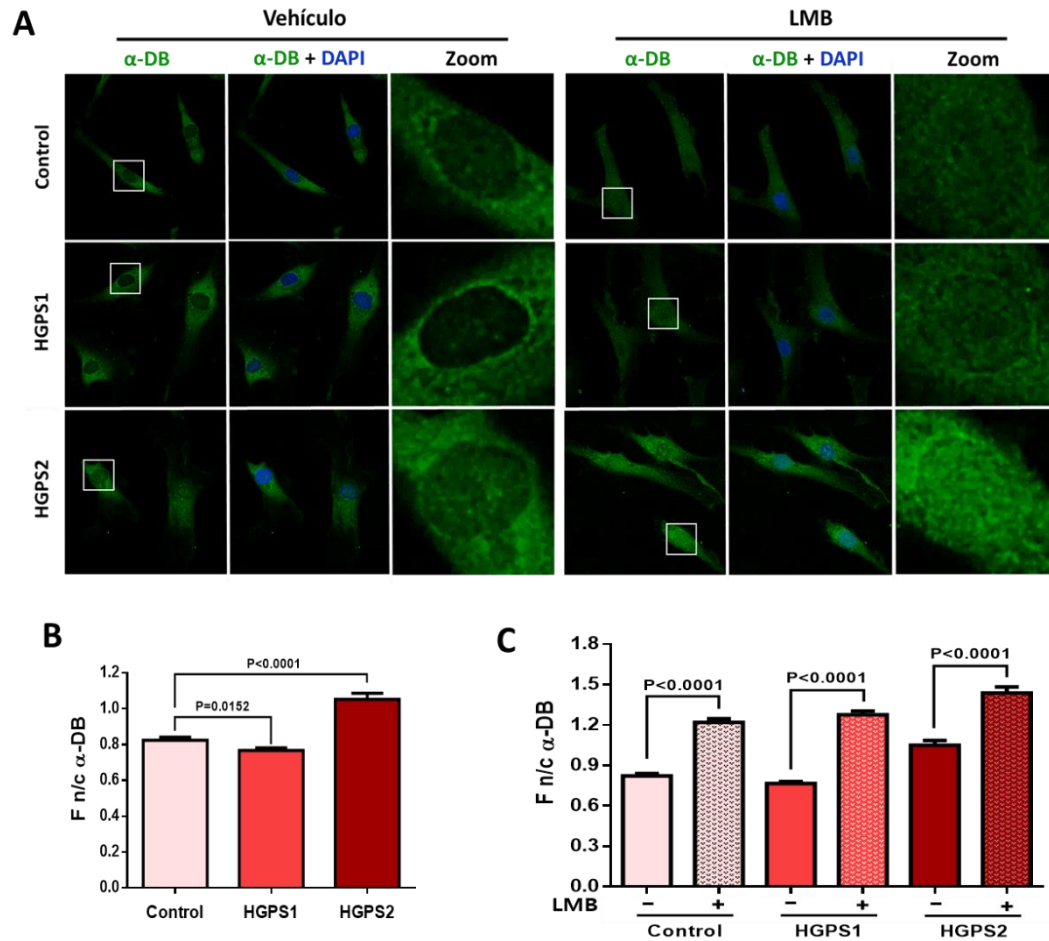


Fig. 19. Distribución subcelular de la α -DB en los fibroblastos normales y HGPS tratados con LMB o con el vehículo solamente. (A) Se muestra la IFI para la α -DB (verde) en los fibroblastos normales y HGPS tratados con LMB o con el vehículo solamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) previo al análisis por microscopía confocal. (B) Se muestra la gráfica con las mediciones de la Fn/c para los fibroblastos normales y HGPS tratados con LMB o sólo con el vehículo. (C) Se presenta la gráfica de los resultados de la Fn/c en los fibroblastos normales y HGPS tratados LMB o con el vehículo solamente LMB. n=50 células. Los datos se analizaron con la prueba estadística t no pareada.

8.5. Distribución subcelular de la proteína Sp3 en los fibroblastos HGPS

Con la finalidad de demostrar que la sobreexpresión de la exportina CRM1 presente en los fibroblastos HGPS afecta específicamente la localización nuclear de proteínas que presentan exportación nuclear, se analizó la distribución subcelular del factor de transcripción Sp3, el cual carece de NES (Suske, 2016),

mediante ensayos de IFI y microscopía confocal se observó que la distribución nuclear característica de Sp3 no se altera en los fibroblastos HGPS, sin importar el tratamiento por 24 horas con LMB o con vehículo (Fig. 20).

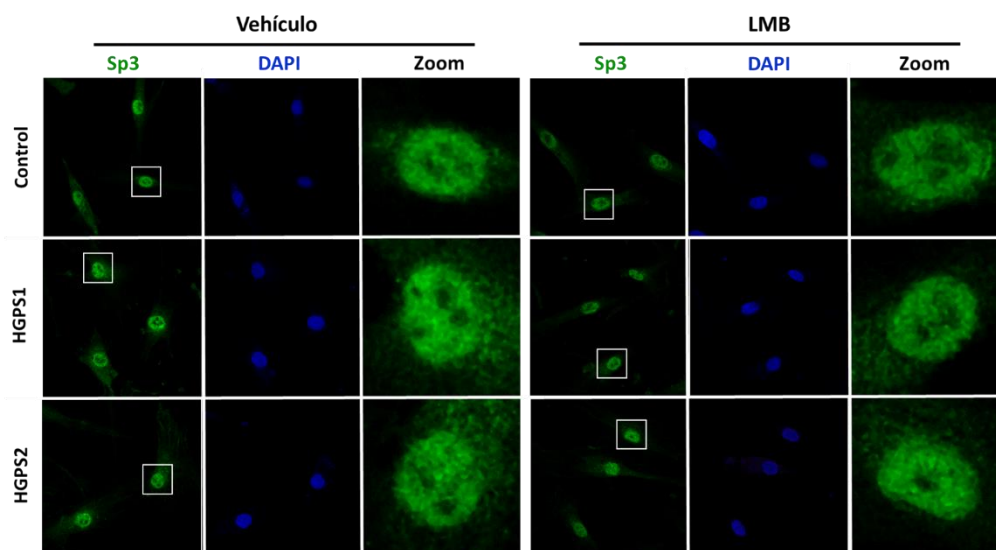


Fig. 20. La distribución subcelular de la proteína Sp3 en los fibroblastos normales y HGPS no cambia con el tratamiento con LMB. Se muestra los ensayos de IFI de los fibroblastos normales y HGPS, utilizando un anticuerpo anti-Sp3 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) previo al análisis por microscopía confocal. Se aprecia la misma distribución subcelular de la proteína Sp3 en los fibroblastos control y HGPS tratados con LMB o con el vehículo solamente.

9. DISCUSIÓN

La expresión de progerina provoca diferentes daños en las células de progeria, como son una morfología nuclear aberrante, alteraciones en la organización de la cromatina, desregulación de genes, aumento de daño del ADN, disfunción mitocondrial y alteración en la distribución y funcionamiento de los poros nucleares, entre otras; sin embargo, aún no se conoce con certeza cómo es que la progerina desencadena toda esta serie de alteraciones celulares. Posiblemente la progerina afecta inicialmente algún mecanismo celular clave dando lugar al desarrollo de daños secundarios en las células. De manera importante, en nuestro grupo de trabajo se encontró que el mecanismo de exportación nuclear mediado por la exportina CRM1 está exacerbado en el síndrome de progeria, lo cual puede estar ocasionando la deslocalización de una amplia diversidad de proteínas que contienen señales de exportación nuclear (NES) en su secuencia y que están implicadas en varios mecanismos esenciales para el correcto funcionamiento celular. Además, mediante la expresión exógena de progerina en un sistema celular ortólogo (células HeLa) también se demostró que existe una relación directa entre la presencia de progerina y el aumento de los niveles de la exportina CRM1. Por esta razón creemos que la exportación nuclear exacerbada es un mecanismo clave provocado por la progerina, el cual desencadena defectos en distintos mecanismos celulares debido a la deslocalización nuclear de una gran cantidad de proteínas.

En este contexto, debido a que la Leptomycin B (LMB) disminuye el mecanismo de exportación nuclear por medio de la inhibición de la actividad de CRM1, en nuestro grupo de trabajo se decidió evaluar el efecto de este fármaco sobre el fenotipo de las células HGPS, bajo la hipótesis de que probablemente aminoraría las anomalías celulares. Interesantemente, se ha observado que este tratamiento alivia algunas características de las células HGPS, como el estrés nucleolar, la senescencia celular y la morfología celular senescente; no obstante, es necesario determinar si el rescate del fenotipo celular en el HGPS mediante la modulación farmacológica de CRM1 comprende otros de los defectos que presentan estas células.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del fármaco LMB sobre la morfología nuclear aberrante de las células HGPS, una característica distintiva que ha sido ampliamente descrita y estudiada; para ello se utilizaron fibroblastos provenientes de pacientes con progeria como modelo de estudio. De manera muy interesante, mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta de la lámina A/C y el análisis morfométrico de los núcleos, se observó una clara recuperación de la morfología nuclear de los fibroblastos HGPS tratados durante 3 y 6 días con LMB.

Con base en estos resultados, decidimos comparar la morfología nuclear de los fibroblastos tratados con LMB con la morfología nuclear de fibroblastos tratados con FTI (inhibidor de farnesiltransferasa), ya que previamente se ha demostrado que este último fármaco provoca una mejoría significativa de la morfología nuclear en células de progeria (Glynn y Glover, 2005; Yang et al., 2006). Sin embargo, notamos que el tratamiento con FTI promueve la formación de núcleos redondos en forma de dona, lo cual se ha reportado que da lugar a otros defectos celulares (Verstraeten et al., 2011). En contraste, el tratamiento de los fibroblastos HGPS con LMB da como resultado una morfología nuclear semejante a la de los fibroblastos normales. Por todo lo anterior podemos decir que la atenuación de la exportación nuclear exacerbada mediante LMB induce la recuperación de la morfología nuclear de las células de progeria a su condición normal.

Una vez que observamos el alivio de la morfología nuclear aberrante en las células de progeria, surgió la inquietud de explorar los posibles mecanismos que pudieran estar contribuyendo a la mejoría de este fenotipo celular. Como ya se ha dicho, las láminas nucleares ayudan al mantenimiento de la estructura nuclear; sin embargo, se ha descrito que además de la pérdida de lámina A en el síndrome de progeria también existe una disminución de los niveles de la lámina B1 (Kubben et al., 2016), por lo que es lógico pensar que este fenómeno está implicado en los defectos nucleares que presentan las células HGPS. De manera importante, nuestro grupo de trabajo demostró que proteínas asociadas a distrofina como la α -DB y la Dp71, cuya exportación nuclear es mediada por CRM1, son necesarias para mantener de la estabilidad de la lámina B1 (Fuentes-Mera et al., 2006; González-

Ramírez et al., 2008; Suárez-Sánchez et al., 2014). Por lo tanto, es plausible proponer que la α -DB y la Dp71 pudieran estar deslocalizadas hacia el citoplasma en las células de progeria debido al incremento de la exportación nuclear, lo que provocaría la desestabilización de la lámina B1 y dañaría en última instancia la forma del núcleo. Al normalizarse la exportación nuclear mediante tratamiento con LMB, estas dos proteínas se acumularían nuevamente en el núcleo contribuyendo a la estabilidad de la lámina B1 y a la arquitectura nuclear. Como se mencionó anteriormente, en el laboratorio hemos observado un incremento en los niveles de la lámina B1 tras el tratamiento de las células HGPS con LMB, lo cual es consistente con esta hipótesis.

Bajo esta tesitura, procedimos a analizar la distribución subcelular de la α -DB y la Dp71 en fibroblastos HGPS. Confirmamos que la localización subcelular de la proteína Dp71 está alterada en las células HGPS y que su distribución nuclear se restablece al inhibir la exportación nuclear con LMB. Para el caso de la proteína α -DB, sólo se observó su deslocalización hacia el citoplasma en los fibroblastos HGPS1, restableciéndose su localización nuclear al usar LMB. Es probable que estas diferencias se deban a que los cultivos de HGPS provienen de pacientes que se encontraban en distintas etapas de progresión de la patología cuando se aislaron los fibroblastos. Se requieren experimentos adicionales que nos permitan identificar las moléculas y/o mecanismos implicados en el alivio del fenotipo HGPS ante el tratamiento con LMB.

Por último, para demostrar que los fenómenos que hemos observado en el laboratorio son debidos a la acumulación nuclear de proteínas cuya exportación nuclear es mediada por la exportina CRM1, decidimos analizar la distribución subcelular de una proteína nuclear que no contiene NES, el factor de transcripción Sp3. De acuerdo a lo esperado, la distribución nuclear de Sp3 se mantuvo inalterada entre los fibroblastos normales y HGPS, y tampoco cambio su distribución después del tratamiento con LMB.

10. CONCLUSIONES

- ❖ La atenuación de la exportación nuclear exacerbada mediante LMB corrige la morfología nuclear aberrante en células de progeria.
- ❖ La morfología nuclear de los fibroblastos HGPS tratados con LMB es muy semejante a la de los fibroblastos normales.
- ❖ La Dp71 está deslocalizada hacia el citoplasma en los fibroblastos HGPS, pero su distribución se restablece tras el tratamiento con LMB.
- ❖ La α -DB se encuentra deslocalizada hacia el citoplasma solamente en los fibroblastos HGPS1 y después del tratamiento con LMB recupera su localización nuclear.

11. PERSPECTIVAS

- Analizar los niveles proteicos de la α -DB y la Dp71 antes y después del tratamiento con LMB.
- Analizar la distribución subcelular y niveles proteicos del β -DG (proteína asociada a la lámina nuclear) en los fibroblastos HGPS, antes y después del tratamiento con LMB.

REFERENCIAS

1. Brayson, D., & Shanahan, C. M. (2017). Current insights into LMNA cardiomyopathies: Existing models and missing LINC. *Nucleus*, 8(1), 17–33. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1260798>.
2. Burke, B., & Stewart, C. L. (2012). The nuclear lamins: flexibility in function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(1), 13–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3488>.
3. Cau, P., Navarro, C., Harhour, K., Roll, P., Sigaudy, S., Kaspi, E., Perrin, S., De Sandre-Giovannoli, A. and Lévy, N. (2014). Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 29, 125-147. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.03.021>.
4. Charar, C., & Gruenbaum, Y. (2016). Lamins and metabolism. *Clinical Science*. 131(2), 105-111. <http://dx.doi.org/10.1042/cs20160488>.
5. Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L., & Goldman, R. D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev*. 22, 832–853. <https://doi.org/10.1101/gad.1652708.832>.
6. Deepu, S. D., Sam, A., Nair, V. R., Kuriakose, T., Jiju, V., & Mathews, S. M. (2015). Review Article: A Review on Progeria. *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences*, 2 (3), 261-265.
7. Dorado, B., & Andrés, V. (2017). A-type lamins and cardiovascular disease in premature aging syndromes. *Current Opinion In Cell Biology*, 46, 17-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2016.12.005>.
8. Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, Jurkovski B, Callegari-Jacques SM, Silva VDd, Lenz G (2012) Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear Irregularities. *Plos One*. 7(8), e42522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042522>.
9. Fuentes-Mera, L., Rodríguez-Muñoz, R., González-Ramírez, R., García-Sierra, F., González, E., Mornet, D., & Cisneros, B. (2006). Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the

- nucleus of HeLa cells: Members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix. *Experimental Cell Research*, 312(16), 3023-3035. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.06.002>.
10. Glynn, M.W. & Glover, T.W. (2005). Incomplete processing of mutant lamin A in Hutchinson–Gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 2959–2969 <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi326>.
 11. González-Ramírez, R., Morales-Lázaro, S., Tapia-Ramírez, V., Mornet, D., & Cisneros, B. (2008). Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis. *Journal Of Cellular Biochemistry*, 105(3), 735-745. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.21870>.
 12. Gonzalo, S., Kreienkamp, R., & Askjaer, P. (2017). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Research Reviews*, 33, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.007>.
 13. Gruenbaum, Y., & Foisner, R. (2015). Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. *Annual Review Of Biochemistry*, 84(1), 131-164. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034115>.
 14. Hetzer, M. (2010). The Nuclear Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), a000539-a000539. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000539>.
 15. Jackson, D. A. (2011). *The Cell Nucleus: Biogenesis, Structure, and Function*. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*.
 16. Kelley, J., Datta, S., Snow, C., Chatterjee, M., Ni, L., & Spencer, A. et al. (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. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.05087-11>.

17. Kubben N., Zhang W., Wang L., Voss T.C., Yang J., Qu J., Liu G.-H., Misteli T. (2016). Repression of the antioxidant NRF2 pathway in premature aging, *Cell*, 165, 361–1374. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.017>.
18. Lammerding J., Hsiao J., Schulze P.C., Kozlov S., Stewart C.L., Lee R.T. (2005). Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. *J. Cell. Biol.*, 170(5), 81-91. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200502148>.
19. Lattanzi, G., Politano, L., Benedetti, S., D'Apice, M., Maggi, L., Carboni, N., & Scarano, E. (2016). Emerging perspectives on laminopathies. *Cell Health And Cytoskeleton*, 25. <http://dx.doi.org/10.2147/chc.s59507>.
20. Martínez-Vieyra, I., Vásquez-Limeta, A., González-Ramírez, R., Morales-Lázaro, S., Mondragón, M., & Mondragón, R. et al. (2013). A role for β -dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(3), 698-711. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.11.019>.
21. Prokocimer, M., Barkan, R. and Gruenbaum, Y. (2013). Hutchinson-Gilford progeria syndrome through the lens of transcription. *Aging Cell*, 12(4), 533-543. <https://doi.org/10.1111/accel.12070>.
22. Reddy, S., & Comai, L. (2016). Recent advances in understanding the role of lamins in health and disease. *F1000research*, 5, 2536. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.9260.1>.
23. Rodriguez R., Hernandez-Hernandez O., Magana J.J., Gonzalez-Ramirez R., Garcia-Lopez E.S., Cisneros B. (2015) *Mol. Biol. Rep.* 42, 479-488. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3791-4>.
24. Schooley, A., Vollmer, B., & Antonin, W. (2012). Building a nuclear envelope at the end of mitosis: coordinating membrane reorganization, nuclear pore complex assembly, and chromatin de-condensation, 539–554. <https://doi.org/10.1007/s00412-012-0388-3>.
25. Smith, E. R., Meng, Y., Moore, R., Tse, J. D., Xu, A. G., & Xu, X. (2017). Nuclear envelope structural proteins facilitate nuclear shape changes

- accompanying embryonic differentiation and fidelity of gene expression. *BMC Cell Biology*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12860-017-0125-0>.
26. Suárez-Sánchez, R., Aguilar, A., Wagstaff, K., Velez G., Azuara-Medina, P., Gomez, P., Vásquez-Limeta, A., Hernández-Hernández, O., Lieu, K., Jans, D., Cisneros, B. (2014). Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin α/β and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1843, 985–1001. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.027>.
 27. Suske, G. (2016). NF-Y and SP transcription factors - New insights in a long-standing liaison. *Biochim. Biophys. Acta*, 1860, 590–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.08.011>.
 28. Tariq, Z., Zhang, H., Chia-liu, A., Shen, Y., Gete, Y., Xiong, Z., Losert, W. (2017). Lamin A and microtubules collaborate to maintain nuclear morphology, 1034(May). <https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1320460>.
 29. Turgay, Y., Eibauer, M., Goldman, A. E., Shimi, T., Khayat, M., Ben-harush, K., Medalia, O. (2017). The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature Publishing Group*, 543(7644), 261–264. <https://doi.org/10.1038/nature21382>.
 30. Ungricht, R., & Kutay, U. (2017). Mechanisms and functions of nuclear envelope remodelling. *Nature Publishing Group*, 18(4), 229–245. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.153>.
 31. Verstraeten, V.L., Peckham, L.A., Olive, M., Capell, B.C., Collins, F.S., Nabel, E.G., Young, S.G., Fong, L.G., and Lammerding, J. (2011). Protein farnesylation inhibitors cause donut-shaped cell nuclei attributable to a centrosome separation defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 4997–5002. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019532108>.
 32. Vidak, S., & Foisner, R. (2016). Molecular insights into the premature aging disease progeria. *Histochemistry and Cell Biology*, 145(4), 401–417. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1411-1>.

33. Vidal, C., Bermeo, S., Fatkin, D., & Duque, G. (2012). Role of the nuclear envelope in the pathogenesis of age-related bone loss and osteoporosis. *BoneKEy Reports*, 1(5), 1–7. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2012.62>.
34. Worman, H. J., Fong, L. G., Muchir, A., & Young, S. G. (2009). Review series Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy, 119(7), 1825–1836. <https://doi.org/10.1172/JCI37679>.
35. Yang, S.H., Meta, M., Qiao, X., Frost, D., Bauch, J., Coffinier, C. et al. (2006) A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *J. Clin. Invest.*, 116, 2115–2121. <https://doi.org/10.1172/JCI28968>.