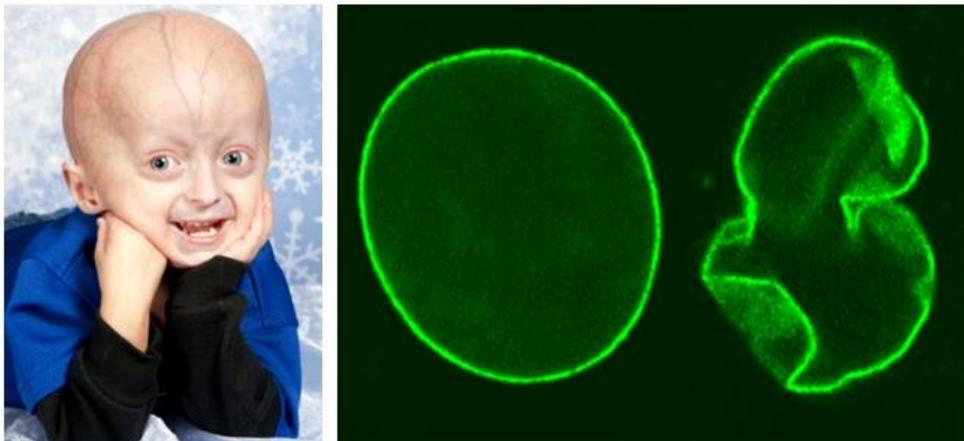


TRABAJO FIN DE MÁSTER

Validación de proteínas moduladas por la sobreexpresión de progerina en células de pacientes con Síndrome de Progeria (HGPS)

Validación de proteínas moduladas pola sobreexpresión de progerina en células de doentes con Síndrome de Progeria (HGPS)

Validation of modulated proteins due to progerin over-expression in Progeria Syndrome (HGPS) cell lines



Sandra Palla Pérez

Entrega: 19 de Junio de 2015/ Defensa: 26 de Junio de 2015

Director: Dra. María del Carmen Arufe Gonda

Codirector: Dr. Jesús Mateos Martín

Validación de proteínas moduladas por la sobreexpresión de progerina en células de pacientes con Síndrome de Progeria (HGPS)

Resumen

El síndrome de la progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), una enfermedad de envejecimiento prematuro, se caracteriza por la sobreexpresión de una isoforma mutada de la lamina A, la progerina o lamina A Δ 50. Esta sobreexpresión de progerina tiene múltiples efectos deletéreos para las células que desembocan principalmente en una fuerte inestabilidad nuclear. Utilizando fibroblastos humanos de pacientes con progeria, se ha estudiado la morfología nuclear clásica de estas células mediante la observación de sus defectos nucleares al microscopio de fluorescencia. Por otro lado, se ha realizado un estudio preliminar de proteínas expresadas diferencialmente en las líneas de pacientes y líneas control mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Por último, mediante la técnica de *Western blot* se ha estudiado la modulación en la expresión de la proteína nucleolina provocada por la presencia de progerina. Así, hemos comprobado como los fibroblastos humanos de pacientes con progeria presentan una marcada reducción en la tasa de crecimiento y una morfología nuclear alterada, con unas prominencias muy características que se conocen como *blebs* y cuya presencia es típica de las células enfermas que sobreexpresan progerina. Por otro lado, utilizando la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF se han identificado las proteínas vimentina y actina B y G, dos proteínas características del citoesqueleto que se ven moduladas ante la sobreexpresión de progerina. Por último, se ha validado mediante *Western blot* la modulación de la proteína nucleolina, que aparece sobreexpresada en las líneas celulares de los pacientes con progeria. Los datos sugieren que esta proteína está implicada en la senescencia típica de estas células, por lo que podría ser utilizada como una posible diana terapéutica en un futuro.

Palabras clave: Hutchinson-Gilford, progeria, progerina, lamina, nucleolina, fibroblastos

Índice

Introducción	1
1. Los síndromes progeroides.....	1
2. El síndrome de la progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS).....	1
2.1 Introducción al HGPS.....	1
2.2 Características clínicas del HGPS.....	1
2.3 Patrón de herencia del HGPS.....	2
2.4 Genes implicados en el HGPS.....	2
3. La lámina nuclear.....	3
3.1 Formación de la lamina A.....	3
3.2 Mutaciones en el gen <i>LMNA</i>	4
3.3 Mutaciones en el gen <i>ZMPSTE24</i>	4
4. Efectos provocados por la sobreexpresión de la proteína progerina.....	5
4.1 Estudios previos en el grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña.....	6
5. Herramientas de aplicación en proteómica: introducción a la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para identificación de proteínas.....	7
Objetivos	8
Material y Métodos	9
1. Muestras celulares de pacientes con progeria y pacientes control.....	9
2. Cultivo de las diferentes líneas celulares.....	9
3. Extracción de proteínas y cuantificación en Nanodrop.....	10
4. Tinción con plata de proteínas compatible con espectrometría de masas.....	10
5. Análisis <i>Western blot</i>	11
6. Análisis de inmunofluorescencia.....	12
7. Huella peptídica y digestión trípica de bandas.....	12
8. Espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.....	13
8.1 Análisis de masas (MS).....	13

8.2 Análisis de masas/masas (MS/MS).....	14
8.3. Identificación de proteínas mediante búsqueda en bases de datos.....	14
Resultados-Discusión	15
1. Cultivo y crecimiento de líneas celulares de fibroblastos procedentes de pacientes con progeria y de sus progenitores sanos.....	15
1.1 Morfología y alteraciones de los fibroblastos humanos con progeria.....	15
1.2 Observación del crecimiento celular de fibroblastos humanos con progeria.....	15
2. Visualización de la morfología nuclear típica de las células que expresan la isoforma mutada progerina.....	16
2.1 Visualización de los defectos celulares nucleares.....	16
2.2 Detección de la lamina A.....	17
3. Estudio preliminar mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (huella peptídica y fragmentación) del proteoma diferencial de líneas celulares de fibroblastos procedentes de pacientes con progeria y controles sanos.....	19
3.1 Cuantificación de la concentración de proteína extraída.....	19
3.2 Corrección de la integridad de proteínas y ajuste de concentración mediante tinción con plata y densitometría.....	20
3.3 Selección de bandas teñidas con plata para espectrometría de masas.....	21
3.4 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.....	22
3.4.1 Espectros de masas y masas/masas.....	22
3.4.2 Identificación de proteínas en bases de datos.....	22
4. Validación de proteínas que previamente han sido descritas como moduladas por la sobreexpresión de la isoforma mutada progerina.....	24
5. Consideraciones metodológicas.....	27
Conclusiones	28
Agradecimientos	29
Bibliografía	30

Introducción

1. Los síndromes progeroides

Los síndromes progeroides (PSs, *progeroid syndromes*) son un grupo de enfermedades genéticas severas y raras caracterizadas por diferentes rasgos clínicos muy característicos y fenotipos de envejecimiento fisiológico prematuro (Ghosh y Zhou, 2014). Entre estos síndromes se incluyen diferentes enfermedades, como son la ataxia-telangiectasia, la anemia de Fanconi, la tricotiodistrofia o síndrome de Tay, el síndrome de Rothmund-Thomson, o el síndrome de Hutchinson-Gilford, entre otros. El tipo de progeria más clásico y más estudiado es el síndrome de la progeria de Hutchinson-Gilford (Rehman *et al.*, 2015; Sinha *et al.*, 2014).

2. El síndrome de la progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS)

2.1 Introducción al HGPS

El síndrome de la progeria de Hutchinson-Gilford [*Hutchinson-Gilford progeria syndrome* (HGPS)] es una enfermedad genética “rara” perteneciente al grupo de las laminopatías y asociada a un característico envejecimiento prematuro. Fue originalmente descrito hace más de 100 años (Gilford, 1904; Hutchinson, 1886) y recibió el nombre de progeria (del griego, *gēras*, que significa vejez). La incidencia del HGPS es de 1 caso entre 4-8 millones y es uniforme en el mundo, (Pollex y Hegele, 2004; Sinha *et al.*, 2014), existiendo actualmente 124 casos conocidos en todo el mundo (Progeria Research Foundation, <http://www.progeriaresearch.org>).

2.2 Características clínicas del HGPS

Los niños con HGPS tienen una apariencia normal al nacer, pero al cabo de un año comienzan a mostrar los efectos de un envejecimiento acelerado (Figura 1) (Brown, 1992; Sinha *et al.*, 2014). Las características faciales más típicas son la micrognatia (mandíbulas pequeñas), desproporción craneofacial, alopecia, ojos grandes, venas pericraneales muy marcadas, lipodistrofia, osteólisis, resistencia a la insulina, y aterosclerosis precoz y severa (Merideth *et al.*, 2008; Sinha *et al.*, 2014). Además, los niños experimentan un crecimiento retardado, son pequeños en estatura y de bajo peso y la piel parece arrugada y se muestra envejecida. Sin embargo, las habilidades cognitivas

no se ven afectadas (Hennekam, 2006); es por ello que el HGPS se considera como un síndrome progeroide segmental, ya que reproduce de forma incompleta el proceso de envejecimiento normal (Baek *et al.*, 2015; Ghosh y Zhou, 2014; Stewart *et al.*, 2007).

A medida que maduran, la enfermedad provoca que los niños envejecan una década por cada año de vida, de manera que, aproximadamente a la edad de 10 años, mostrarán unas condiciones respiratorias, cardiovasculares y artríticas típicas de un anciano. Normalmente, la muerte ocurre a la edad de 13 años (Sinha *et al.*, 2014), con al menos un 90% de los sujetos con HGPS fallecidos a causa de una aterosclerosis progresiva de las arterias coronaria y cerebrovascular (Misteli y Scaffidi, 2005).



Figura 1. Fotografía de un niño de 4 años de edad diagnosticado con el HGPS en la que se pueden observar los rasgos clínicos característicos provocados por la enfermedad. Tomada de *Progeria Research Foundation*, <http://www.progeriaresearch.org>.

2.3 Patrón de herencia del HGPS

El HGPS es normalmente causado por una mutación autosómica dominante esporádica [excepto la variedad que se hereda, el síndrome de Werner (Yu *et al.*, 1996)], ocurriendo como resultado de una mutación puntual *de novo* en el ADN (Guénantin *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2014).

2.4 Genes implicados en el HGPS

El equipo dirigido por Francis Collins en el *National Human Genome Research Institute*, en Maryland, inició la búsqueda de las mutaciones genéticas que causaban el

HGPS mediante un amplio análisis del genoma (Eriksson *et al.*, 2003); así, identificaron una región de 4.82 Mb en el cromosoma 1q que contenía aproximadamente 80 genes conocidos, incluyendo el gen *LMNA*, que codifica para las laminas nucleares A y C. Las mutaciones puntuales *de novo* en este gen son las responsables de aproximadamente un 90% de los casos del HGPS (Eriksson *et al.*, 2003). También se ha visto que el HGPS puede ser provocado por mutaciones en el gen que codifica para la metaloproteasa *ZMPSTE24*.

3. La lámina nuclear

La lámina nuclear es una fina malla proteica cuyo papel es mediar en el mantenimiento de la integridad de la envoltura nuclear, encontrándose bajo la membrana nuclear interna (Burke y Stewart, 2002). Los principales componentes de la lámina nuclear son proteínas filamentosas intermedias que forman las laminas nucleares (Sieprath *et al.*, 2015; Stewart *et al.*, 2007). Las laminas son importantes reguladoras del ensamblaje, estructura, forma y estabilidad mecánica del núcleo, y además intervienen en funciones nucleares pleiotrópicas, como la organización de la cromatina, la expresión génica, la regulación de la transcripción y la replicación y reparación del ADN (Burke y Stewart, 2006; Pacheco *et al.*, 2014).

Existen diferentes tipos de laminas codificadas a su vez por diferentes genes: las laminas de tipo B1 y B2, codificadas por los genes *LMNB1* y *LMNB2*, respectivamente, y las laminas de tipo A, codificadas por el gen *LMNA*, siendo la prelamina A y la lamina C las dos principales isoformas dentro del grupo que derivan del *splicing* alternativo que sufre el gen *LMNA* (Ghosh y Zhou, 2014; Guénantin *et al.*, 2014).

3.1 Formación de la lamina A

La lamina A, una proteína de 664 aminoácidos con un peso molecular de 70 kDa y codificada por el gen *LMNA*, es normalmente sintetizada como una molécula precursora llamada prelamina A. Contiene un motivo CAAX-box en el extremo C-terminal que es sujeto de farnesilación (Beck *et al.*, 1990; Young *et al.*, 2005), un proceso que consiste en la adición de una molécula de farnesilo que permite el anclaje de las laminas a la membrana nuclear interna. Tras una farnesilación en la cisteína, los aminoácidos AAX son eliminados, el grupo farnesil-cisteína es carboximetilado, y finalmente tiene lugar una rotura endoproteolítica por parte de la metaloproteasa

ZMPSTE24, en la que se eliminan los últimos 18 aminoácidos para generar la lamina A madura (Guénantin *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2005). Todas estas modificaciones son necesarias para que la lamina A se pueda asentar en la envoltura nuclear (Figura 2) (Lutz *et al.*, 1992; Rehman *et al.*, 2015).

3.2 Mutaciones en el gen *LMNA*

Las mutaciones puntuales *de novo* que afectan a las laminas de tipo A generan un amplio abanico de enfermedades que se denominan laminopatías, entre las que se encuentra el HGPS, que se considera una laminopatía primaria (Sieprath *et al.*, 2015).

La mayoría de los individuos afectados por el HGPS portan la misma sustitución C>T en el codón 608 [G608G (GGC>GGT)] dentro del exón 11 del gen *LMNA* (Aliper *et al.*, 2015; Scaffidi y Misteli, 2005), que tiene lugar en un dinucleótido CpG altamente mutable. La mutación activa un sitio de *splicing* crítico que resulta en la eliminación de 150 nucleótidos en el ARN mensajero del exón 11 (Figura 2), y a su vez en la falta de 50 aminoácidos esenciales en la proteína truncada que se forma, denominada progerina (Aliper *et al.*, 2015; De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2003; Eriksson *et al.*, 2003; Misteli y Scaffidi, 2005; Rehman *et al.*, 2015). La progerina retiene la caja CAAX, permitiendo la farnesilación en la cisteína y la metilación (Dechat *et al.*, 2007), pero perdiendo el sitio de rotura endoproteolítica de la enzima *ZMPSTE24*, lo que hace que permanezca constitutivamente farnesilada impidiendo que se pueda asentar en la envoltura nuclear (Figura 2) (Goldman *et al.*, 2004; Pollex y Hegele, 2004).

3.3 Mutaciones en el gen *ZMPSTE24*

El gen *ZMPSTE24* (*zinc metallopeptidase STE24*) o *FACE1*, localizado en el brazo corto del cromosoma 1 en la posición 34, codifica para una enzima metaloproteasa que es la responsable de cortar la prelamina A en una posición determinada y eliminar el grupo farnesilo (Figura 2), un paso completamente esencial para la formación de la lamina A madura y para su asentamiento en la lámina nuclear (Quigley *et al.*, 2013). Las mutaciones en el gen que codifica para *ZMPSTE24* conllevan la pérdida de función de la enzima, lo que provoca una acumulación de la prelamina A farnesilada y en consecuencia una deficiencia en la lamina A madura.

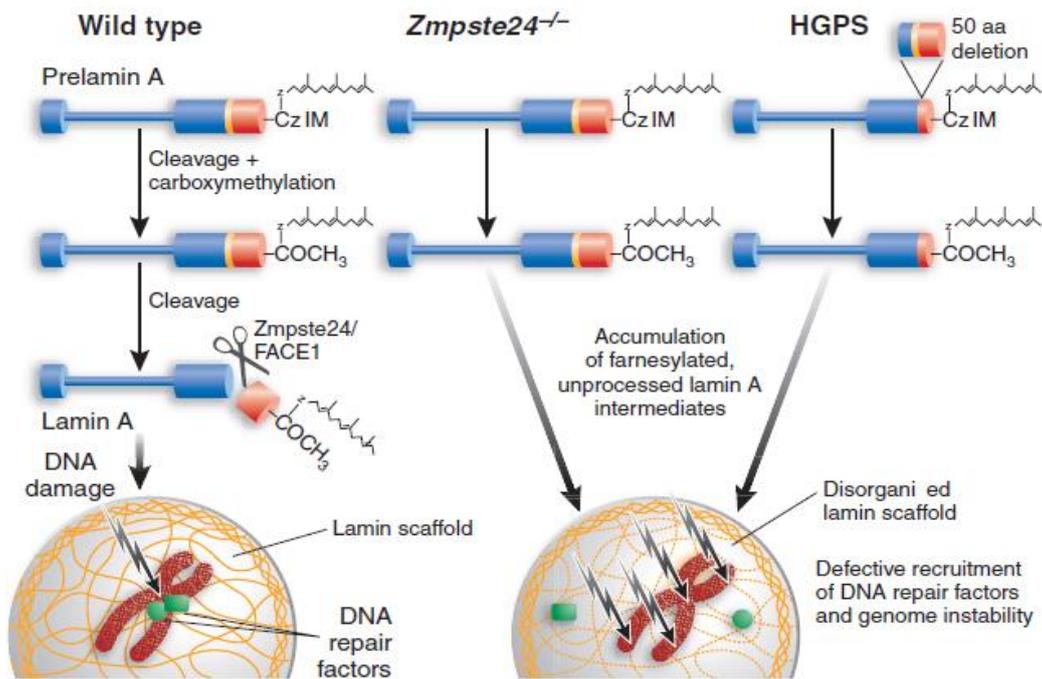


Figura 2. Procesamiento de la lamina A en diferentes situaciones. La maduración de la prelamina A requiere la farnesilación del extremo C-terminal, rotura de los tres aminoácidos C-terminales, carboximetilación de la cisteína farnesilada y rotura de los 15 aminoácidos terminales por la metaloproteasa *ZMPSTE24*. En los casos en los que existe deficiencia en la enzima *ZMPSTE24* o en células con HGPS, la prelamina A o la progerina (respectivamente) permanecen permanentemente farnesiladas, situación que altera la estructura y estabilidad nuclear y afecta al reclutamiento de factores de reparación del ADN. Tomada de Misteli y Scaffidi, 2005.

4. Efectos provocados por la sobreexpresión de la proteína progerina

La formación y sobreexpresión de progerina provoca una deficiencia de la proteína lamina A que afecta gravemente a la capa interna de la membrana nuclear (Eriksson *et al.*, 2003), de manera que una de las características que presenta la enfermedad son graves defectos en la forma nuclear provocados por los defectos en sus membranas (Yang *et al.*, 2005). La progerina provoca que el núcleo se vuelva inestable, lo que parece que conduce al proceso de envejecimiento prematuro característico de la progeria (Sinha *et al.*, 2014). Además, la progerina tiene otros efectos en las células, como son alteraciones en la organización de la cromatina, síntesis de ADN y ARN, mitosis retardada, estrechamiento de la lámina nuclear o activación molecular de ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) y ATR (*ATM- and Rad3-related*) y fosforilación de Chk1/2 (*Checkpoint Kinase 1/2*) y p53, que actúan como puntos de control para la detección de daño en el ADN, lo que provoca el arresto celular (Dechat *et al.*, 2007; McClintock *et al.*, 2006; Musich y Zou, 2009, 2011; Rehman *et al.*, 2015; Scaffidi y Misteli, 2005). Sin embargo, no está claro si estos efectos patológicos se deben a la

permanente farnesilación de la progerina o a la delección de los 50 aminoácidos (Yang *et al.*, 2008).

Las células con HGPS que sobreexpresan progerina presentan una mayor y más rápida senescencia celular, una reducción en la cantidad de células madre y los fenotipos característicos del síndrome progeroide, entre los que destacan formas nucleares aberrantes caracterizadas por la presencia de unas prominencias en las membranas, lo que se conoce como *blebbing* nuclear (Capell *et al.*, 2005).

Por otro lado, se han encontrado evidencias que sugieren la presencia de niveles bajos de progerina en fibroblastos de individuos de edad avanzada o en células normales de pasajes tardíos (McClintock *et al.*, 2007), por lo que cómo la progerina provoca el HGPS y como contribuye al proceso de envejecimiento continúa siendo sujeto de investigación.

4.1 Estudios previos en el grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña

En el último trabajo realizado por Mateos *et al.* (2015) se estudiaron los efectos provocados tras la inducción de la expresión de progerina humana en preadipocitos murinos de ratón (línea celular 3T3L1). De esta manera, pudieron comprobar como existía una disminución en la proliferación celular y la capacidad adipogénica en las células que sobreexpresaban progerina. Concretamente, mediante un amplio análisis utilizando la tecnología iTRAQ, vieron como una gran cantidad de proteínas se encontraban significativamente moduladas en los preadipocitos que sobreexpresaban progerina, estando implicadas en procesos biológicos como el metabolismo lipídico, la estructura del citoesqueleto, la regulación del calcio, el plegamiento de proteínas o la generación de energía en las mitocondrias. La gran relevancia es que, hasta la fecha y en nuestro conocimiento, este es el primer estudio proteómico basado en un análisis iTRAQ para la sobreexpresión de la progerina.

De especial interés fue encontrar que la expresión de la nucleolina se encontraba alterada en aquellos preadipocitos que sobreexpresaban progerina (Mateos *et al.*, 2015). La nucleolina es una de las proteínas no ribosomales más abundantes del nucléolo (Tajrishy *et al.*, 2011), donde se encuentra unida al pre-ARN ribosomal, y no se

encuentra en los ribosomas citoplasmáticos maduros, lo que sugiere que simplemente está implicada en las fases iniciales de la biogénesis ribosomal. En este proceso, está implicada en numerosas funciones, como son la estructura cromatínica del ADN ribosómico, regulación de la transcripción por la ARN polimerasa I o maduración del pre-ARN ribosómico y ensamblaje de los pre-ribosomas (Ginisty *et al.*, 1999). Se sabe también que la nucleolina no solamente se localiza en el nucléolo, sino que también se encuentra en el citoplasma y en la membrana celular, donde podría estar implicada en funciones como el transporte de moléculas o interacciones específicas nucleolina-proteínas o nucleolina-ARN (Berger *et al.*, 2015). Sin embargo, la fracción nucleolar representa más de un 90% del total de nucleolina celular (Scherl *et al.*, 2002).

A nuestro conocimiento, prácticamente no existe ningún estudio en el que se relacione la expresión de la nucleolina con la expresión de la progerina, por lo que este es uno de los aspectos que se tratarán en este trabajo.

5. Herramientas de aplicación en proteómica: introducción a la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para identificación de proteínas

Las herramientas proteómicas son de gran importancia para el estudio cualitativo y cuantitativo de las proteínas o el proteoma de un determinado tipo celular, tejido u organismo en un determinado estado del desarrollo. En la última década ha habido un incremento masivo en la utilización de estas herramientas, debido en gran parte a los avances en la espectrometría de masas (Mateos *et al.*, 2014). La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos, separándolos en función de su relación masa/carga.

El MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) es una técnica de espectrometría de masas de ionización suave que permite detectar moléculas termolábiles, como son las proteínas, de forma intacta, empleando como fuente de ionización un láser. En el espectrómetro de masas se produce la separación de las especies iónicas de una muestra, en función de su relación masa/carga (m/z). El espectro de masas de cada compuesto se denomina huella peptídica y es una representación gráfica de los fragmentos peptídicos obtenidos de una muestra, por orden creciente de masa frente a su abundancia relativa. Dado que la mayoría de los iones formados poseen una sola carga, la relación “ m/z ” es normalmente equivalente a “ m ”.

Objetivos

El objetivo de este trabajo consiste en validar los resultados obtenidos previamente en un modelo de sobreexpresión de progerina humana en preadipocitos murinos de ratón, utilizando líneas celulares de fibroblastos humanos de pacientes con progeria. Los resultados obtenidos se compararán con los recogidos en la literatura, tanto en el caso de líneas humanas como en otros modelos animales.

Por lo tanto, los objetivos planteados son los siguientes:

- Cultivo y crecimiento de líneas celulares de fibroblastos procedentes de pacientes con el síndrome de la progeria y de sus progenitores sanos.
- Visualización de la morfología celular típica y los defectos nucleares de las células que sobreexpresan la isoforma mutada progerina mediante observación al microscopio de fluorescencia.
- Realización de un estudio preliminar del proteoma diferencial de líneas celulares de fibroblastos procedentes de pacientes y controles sanos, utilizando la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para la realización de un análisis de masas (MS) y masas masas (MS/MS).
- Validación mediante *Western blot* de proteínas que previamente han sido descritas como moduladas en un modelo celular de preadipocitos murinos que expresan establemente la isoforma mutada progerina, con el fin de estudiar su nivel de expresión.

Material y Métodos

1. Muestras celulares de pacientes con progeria y pacientes control

Las muestras celulares de fibroblastos humanos de la piel de pacientes con progeria y pacientes control proceden del repositorio celular Coriell (Coriell Cell Repositories, NJ, USA). Las muestras celulares de progeria proceden de niños, y las muestras celulares control proceden de sus progenitores (no afectados por la enfermedad). De esta manera, se trabaja con un total de seis líneas celulares que se denominan y relacionan de la siguiente forma:

- C3512 (control) – PG3513 (progeria)
- C3257 (control) – PG3199 (progeria)
- C8468 (control) – PG8467 (progeria)

2. Cultivo de las diferentes líneas celulares

Las células de las diferentes líneas con progeria se mantienen en crioviales en tanques con nitrógeno líquido en la unidad de Criobiología del Materno Infantil, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. Las células se descongelaron siguiendo un protocolo básico de descongelación: se preparó un tubo Falcon de 15 ml y se añadieron 10 ml de medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) con suero bovino fetal al 10%, penicilina al 1%, y estreptomycin al 1% (Sigma-Aldrich). El contenido del criovial se fue descongelando poco a poco con ese medio, llevando todo su contenido al tubo Falcon. Seguidamente se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos para que las células se depositaran en un precipitado; se desechó el sobrenadante y se volvieron a resuspender de nuevo con medio DMEM. Seguidamente se cultivaron en placas Petri de tamaño adecuado y se introdujeron en estufa a 37°C, de manera que las células se adhirieron a la placa. Se comprobó a diario el crecimiento de cada línea celular, renovando el medio cuando fue necesario. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90% se sacaron de la placa utilizando tripsina 2% (Sigma-Aldrich) para posteriormente realizar otro pase en más placas, aumentando así la cantidad de células hasta obtener la deseada.

3. Extracción de proteínas y cuantificación en Nanodrop

Una vez alcanzada la confluencia adecuada (aproximadamente 80-90%), las placas con las células se lavaron 3 veces con suero salino para eliminar los restos de medio antes de realizar el “raspado” de células de la superficie adherente con un *scraper*. Para ello se prepararon 300 µl de tampón de lisis con 3 µl de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y 3 µl de cóctel inhibidor por placa; se echó en la placa, se rasparon las células con el *scraper*, y finalmente se recogieron en un tubo *eppendorf*. Las muestras se hirvieron a 100°C durante 5 minutos en un bloque térmico. Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 minutos. Finalmente se recogieron los sobrenadantes y se llevaron a cuantificar en el Nanodrop 1100 (Thermo), que nos dio un valor de la concentración de proteína de cada muestra en las unidades µg/µl mediante lectura de la absorbancia a 280 nm.

4. Tinción con plata de proteínas compatible con espectrometría de masas

Partiendo de la cuantificación de la concentración de proteína calculada en el Nanodrop para cada línea celular, se realizó una tinción con plata de proteínas en geles de poliacrilamida. En este caso se sigue el protocolo basado en el método propuesto por Rabilloud (1990), que es compatible con un análisis posterior con espectrometría de masas. Se prepararon geles de acrilamida al 10% en los que se cargó en cada carril el volumen adecuado de cada muestra celular, tomando como referencia para hacer los cálculos la cuantificación de proteína obtenida en el Nanodrop. El gel se cargó usando para cada condición 2 µg de proteína extraída. Se dejaron correr las muestras durante aproximadamente 1 hora a 70-120 V. Una vez terminado, los geles se fijaron mediante dos períodos de 30 minutos en etanol:acético:agua en una proporción 40:10:50. A continuación se realizaron dos lavados de 10 minutos con agua ultrapura y desionizada. Seguidamente los geles se sensibilizaron durante 1 minuto con Tiosulfato Sódico 0.02%. Se volvieron a realizar dos lavados de 1 minuto cada uno con agua, y a continuación el gel se impregnó con Nitrato de Plata 0.2% con Formalina 0.075% aproximadamente 45 minutos para teñir las proteínas. Se realizó un lavado de 5-10 segundos con agua, y posteriormente se reveló el gel con Carbonato Sódico 3%, Formalina 0.025% y Tiosulfato Sódico 12.5 mg/l, esperando el tiempo necesario hasta que se vieron las bandas correspondientes a las proteínas. Por último se paró el revelado con una solución Stop de Tris 3% y acético 10%.

La imagen que se obtuvo se escaneó mediante el *software* Photoshop Elements y se cuantificó mediante el *software* Image Quant 5.2 (GE Healthcare), que nos permitió corregir los errores en la cuantificación de las concentraciones obtenidas en el Nanodrop y ajustarlas para conocer el volumen real de proteína a cargar en un *Western blot*.

5. Análisis Western blot

Todos los experimentos de *Western blot* se realizaron usando para cada condición 15 µg de la proteína total extraída. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: *mouse* monoclonal Lamin A+C (Acris Antibodies), *rabbit* polyclonal nucleolin (Abnova), *mouse* α-tubulin (Sigma); los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-*mouse* y anti-*rabbit* (Amersham).

Se preparó un gel de acrilamida al 7.5% de 1.5 mm de grosor y se cargaron las muestras, dejando correr el gel a 120 V durante el tiempo necesario. A continuación se realizó la transferencia del gel a una membrana, para lo que se preparó tampón de transferencia (TT) 1x al 12% de metanol; la membrana se activó realizando cuatro lavados sucesivos de 1 minuto cada uno de la siguiente manera: metanol, agua, metanol, agua. Finalmente se añadió el TT 1x con metanol. La transferencia se realizó durante 1 hora a 0.15 Amperios. A continuación se bloqueó la membrana preparando 2.5 gramos de leche (Sigma) en 50 ml de TBS (*Tris-Buffered Saline*) con Tween (TTBS) durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se añadió el anticuerpo primario en una dilución 1:1000 (en leche) y se incubó *overnight* en cámara fría a 4°C y en rotación. Una vez finalizado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TTBS. A continuación se preparó el anticuerpo secundario en una dilución 1:1000 (en leche), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en rotación. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TTBS y 2 lavados de 5 minutos cada uno con TBS (sin Tween).

Finalmente se añadió a la membrana Luminol [ECL™ *Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare, Amersham Biotechnology, UK)] y se introdujo en la cámara de revelado Las-3000 (Fujifilm). Los datos se observaron con el *software* Image Reader Las-3000 Pro (Fujifilm) y el análisis por densitometría de la intensidad de las bandas se realizó utilizando el *software* Image Quant 5.2 (GE Healthcare).

6. Análisis de inmunofluorescencia

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: *mouse* α -Lamin A+C (Acris Antibodies) y *rabbit* α -Nucleolin (Abnova); los anticuerpos secundarios utilizados fueron: α -*mouse*-FITC (Isotiocianato de fluoresceína) y α -*rabbit*-PE (Ficoeritrina) (Amersham).

Se sembraron células de cada línea celular y se cultivaron hasta alcanzar la confluencia adecuada (80-90%). Posteriormente se realizó un conteo de células en cámara Neubauer. A continuación se sembraron portaobjetos con cámaras de cultivo con una condición de 25000 células para las líneas control y 40000 células para las líneas de progeria, y se introdujeron en estufa a 37°C. Al día siguiente, los portaobjetos con las células se lavaron dos veces con PBS (*Phosphate Buffered Saline*). A continuación las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS. El siguiente paso fue permeabilizar las células con Triton x100 al 0.1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación las células se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se incubaron con BSA (*Bovine Serum Albumin*) 3% en PBS durante 1 hora. A continuación las células se lavaron dos veces con PBS. Se añadieron los anticuerpos primarios, diluidos 1/50 (en el caso de la lamina A+C) o 1/1000 (en el caso de la nucleolina) en PBS-BSA a temperatura ambiente y en cámara húmeda, incubando durante 1 hora. A continuación se lavaron las cámaras de los portaobjetos con PBS durante 5 minutos, y posteriormente se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos 1/5000 en PBS-BSA en cámara húmeda y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se lavaron las cámaras con PBS-Triton 3 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente, y finalmente se quitaron las cámaras siguiendo las instrucciones del fabricante. Se embebieron los portaobjetos en medio de montaje Vectashield con DAPI (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole*) y se observaron en el microscopio de fluorescencia Olympus BX61.

7. Huella peptídica y digestión trípica de bandas

A partir del gel teñido con plata, se escogieron una serie de bandas de las obtenidas en el gel y se cortaron para la identificación de diferentes proteínas de las líneas de pacientes con progeria y las líneas de sus progenitores sanos.

Las bandas cortadas a partir del gel se lavaron dos veces con unos 100 µl de agua. Se prepararon dos soluciones de desteñido con Ferricianuro potásico 30 mM en agua y Tiosulfato sódico 100 mM en agua, y se mezclaron en una proporción 50/50. Se añadieron 50 µl de la mezcla de desteñido a cada banda y se incubaron durante 15 minutos hasta que las bandas perdieron el color oscuro. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con 100 µl de agua, y posteriormente otros 3 lavados de 5 minutos cada uno con 20 µl de Acetonitrilo (AcN), tras los cuales se dejaron secar las bandas durante 2 minutos. Se añadieron 30 µl de Ditiotreitól (DTT) 10 mM, y se realizó una incubación de 45 minutos a 56°C. A continuación se retiró el DTT y se añadieron 20 µl de AcN, incubando 1 minuto. Se retiró y se añadieron 30 µl de Iodoacetamida (IAA), y se incubó durante 15 minutos en oscuridad. Se retiró la IAA y se añadieron 20 µl de AcN, realizando una incubación de 10 minutos. Se retiró y se añadieron 20 µl de Bicarbonato Amónico (AmBi), incubando 10 minutos. Se retiró y se realizaron dos lavados con 20 µl de AcN cada uno, incubando 10 minutos. Se retiró el AcN y se dejó secar durante 1 minuto. Posteriormente se añadieron 20 µl de tripsina 12 ng/µl en AmBi 25 mM a 4°C, incubando en hielo durante 2-3 horas. Se retiró el exceso de tripsina, se añadieron 10 µl de AmBi y se incubó a 37°C *overnight*. Al día siguiente se agitó en *vortex* durante 1 hora; a continuación se dio un pulso en centrífuga, se sonicó 3 minutos y se dio otro pulso. Finalmente se recogió 1 µl del extracto crudo para su análisis por espectrometría de masas.

El resto del contenido se pasó a otro tubo nuevo y se siguieron extrayendo los péptidos con tres incubaciones sucesivas con 50 µl de AcN 50% H₂O 50% TFA (Ácido trifluoroacético) 0.1%. Cada extracción se realizó durante 30 minutos agitando en el *vortex*, sonicación de otros 30 minutos y pulso en centrífuga. Los sobrenadantes obtenidos sucesivamente se juntaron con el extracto crudo. Finalmente las muestras se secaron en la *speed-vac*.

8. Espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF

8.1 Análisis de masas (MS)

La placa para MALDI se cargó con las muestras sometidas a la digestión triptica. Se depositó también la mezcla de calibración sobre la posición de los calibrantes que viene indicada en la placa, y esta se introdujo en el soporte magnético

[Opti-TOF™ Magnetic Holder (# 4350840 ABSciex)] en la “posición de carga” en el sistema 4800 MALDI-TOF/TOF. Utilizando el *software* Series Explorer 4000 se seleccionó la opción “cargar placa” y se esperó a que se establecieran las condiciones de alto vacío adecuadas.

En primer lugar se disparó manualmente con el láser (con baja intensidad) sobre uno de los calibrantes, de manera que el MALDI midió los valores de masa de esos calibrantes. Posteriormente se ajustó a alto voltaje, y comenzamos a disparar manualmente sobre las muestras para la adquisición de los valores de masas. Finalmente, utilizando el *software* Series Explorer 4000, se obtuvo una representación gráfica de los fragmentos peptídicos obtenidos para cada muestra en función de los valores masa/carga y abundancia relativa (huella peptídica).

8.2 *Análisis de masas/masas (MS/MS)*

Una vez realizado el análisis de masas, se escogió uno de los muchos péptidos obtenidos para cada muestra y se fragmentó mediante una fuente de aire comprimido, de manera que se pudo secuenciar para realizar un análisis de masas/masas. Finalmente, utilizando el *software* Series Explorer 4000, obtuvimos los espectros de fragmentación derivados de un péptido precursor característico de cada muestra (fragmentación).

8.3 *Identificación de proteínas mediante búsqueda en bases de datos*

Los espectros de MS y MS/MS se cargaron en la base de datos Swissprot disponible en la web www.matrixscience.com, y se seleccionaron los siguientes parámetros de búsqueda:

- Especie: *Homo Sapiens*
- Enzima de digestión: tripsina
- Modificaciones fijadas: carbamidometil (C)
- Modificaciones variables: acetil (N-terminal) y oxidación (M)
- Peptide tol.: 100 ppm (partes por millón)

Solo fueron seleccionadas las proteínas identificadas con un nivel del 95% de confianza, o un ProtScore de 1.3.

Resultados-Discusión

1. Cultivo y crecimiento de líneas celulares de fibroblastos procedentes de pacientes con progeria y de sus progenitores sanos

1.1 Morfología y alteraciones de los fibroblastos humanos con progeria

Los fibroblastos de los individuos con HGPS se caracterizan por presentar una morfología y tamaño alterados (Figura 3); estas células presentan una forma irregular y más pequeña de lo habitual en comparación con las células de los individuos sanos. Esta morfología aberrante está presente en aproximadamente un 80% de las células de las líneas celulares con HGPS.

1.2 Observación del crecimiento celular de fibroblastos humanos con progeria

Se observó el crecimiento a diario de las diferentes células y se pudo comprobar como las líneas celulares de progeria crecían de forma muy lenta (Figura 3), necesitando al menos una semana para alcanzar una confluencia del 80-90%, mientras que las líneas celulares control sanas mostraban una tasa de crecimiento adecuada, alcanzando una confluencia del 80-90% a los dos-tres días. De esta manera se corroboraron los resultados obtenidos en los preadipocitos murinos de ratón transducidos con progerina, en los que también se observaba una disminución de la proliferación celular ante la sobreexpresión de progerina (Mateos *et al.*, 2015).

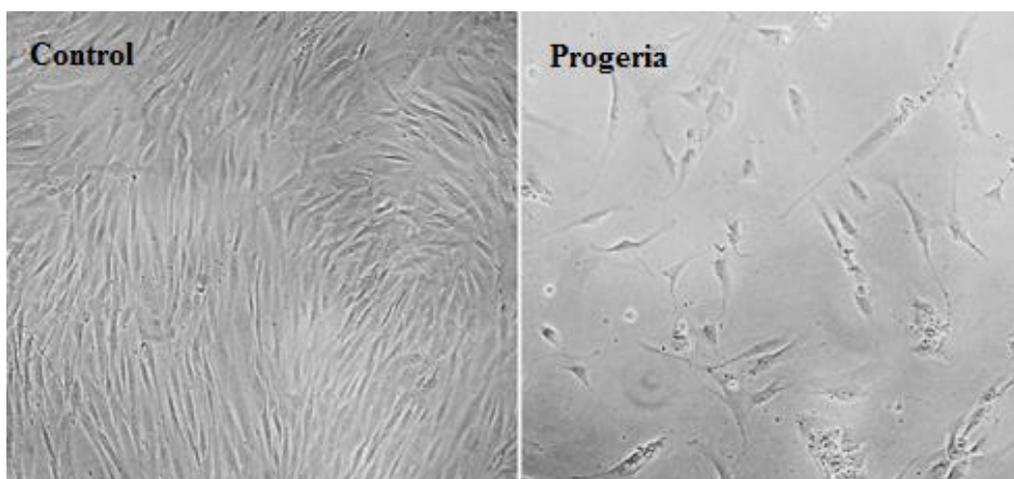


Figura 3. Imágenes de una de las líneas celulares control y una de las líneas celulares de progeria al microscopio óptico, en las que se pueden observar las diferencias en el crecimiento a los dos-tres días tras el cultivo en placa.

2. Visualización de la morfología nuclear típica de las células que expresan la isoforma mutada progerina

2.1 Visualización de los defectos celulares nucleares

La deficiencia en las proteínas laminas provocada por la expresión de la isoforma progerina conlleva una pérdida de la estabilidad e integridad nuclear en las células y genera defectos morfológicos en sus membranas (Lammerding *et al.*, 2006), tal y como se puede observar en las células de progeria, cuyos núcleos teñidos con DAPI (azul) presentan los típicos *blebs* en sus membranas nucleares (Figura 4), unas estructuras en forma de evaginaciones o prominencias muy llamativas y características de las células que sobreexpresan progerina, como ya se describió en la literatura. Así, la observación de estas estructuras nos permite corroborar la sobreexpresión de progerina en las membranas nucleares de nuestras líneas celulares con progeria.

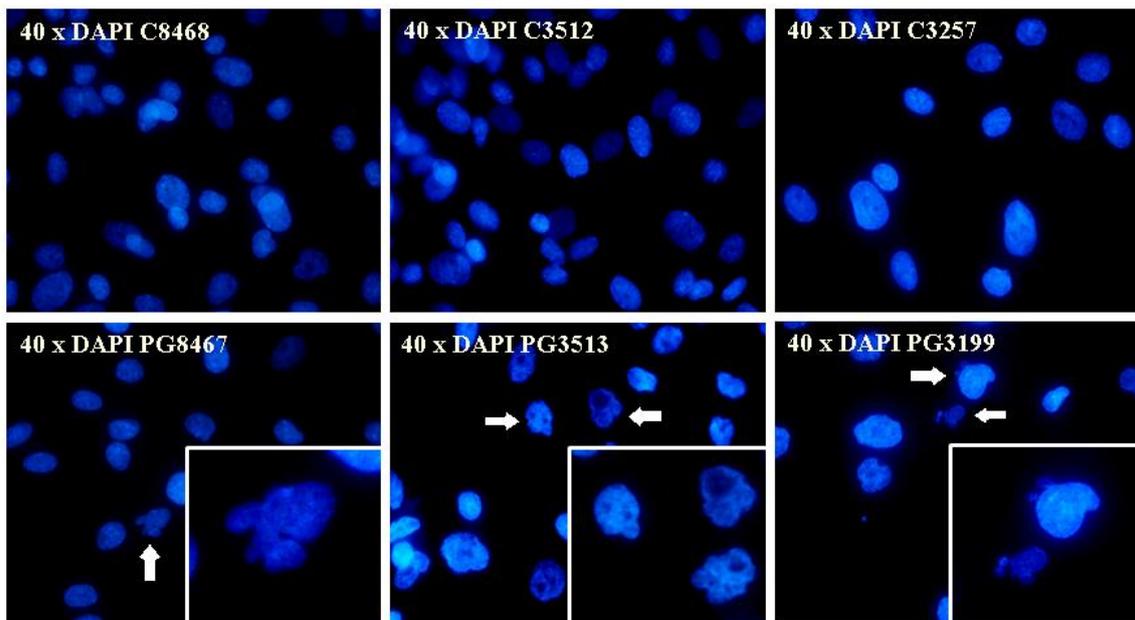


Figura 4. Imágenes al microscopio de fluorescencia (40 x) de las líneas con progeria (abajo) y de las líneas control de sus progenitores sanos (arriba). Se pueden observar los típicos *blebs* en los núcleos de las células con progeria (flechas blancas; detalle ampliado en recuadro), que están ausentes en las líneas control, cuyas células son sanas.

La sobreexpresión de progerina que permanece permanentemente farnesilada se ha considerado tóxica para las células (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2003; Eriksson *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha determinado que la utilización de inhibidores de la farnesilación proteica (en concreto de la farnesiltransferasa) incrementarían la esperanza

de vida en pacientes con HGPS (Gordon *et al.*, 2014) reduciendo los defectos en la morfología nuclear (Wang *et al.*, 2008), como los ya descritos y observados *blebs*.

Se ha comprobado como la sobreexpresión de progerina también interfiere en la expresión, diferenciación y renovación de las células madre mesenquimales en tejidos de origen mesenquimal (Guénantin *et al.*, 2014). En otros tejidos, como son los neurales, los estudios realizados han sugerido que están protegidos ante los efectos deletéreos provocados por la sobreexpresión de progerina (Baek *et al.*, 2015).

Los estudios genéticos realizados tanto en humanos como en otros modelos animales demuestran que los altos niveles de progerina están asociados con fenotipos enfermos severos (Moulson *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006), mientras que unos niveles muy reducidos de progerina pueden ser encontrados en organismos de edad avanzada sin provocar fenotipos enfermos (Arancio *et al.*, 2014; Baek *et al.*, 2015). Es por ello que la sobreexpresión de progerina se considera como un biomarcador del envejecimiento celular normal y además, podría estar potencialmente ligada a la diferenciación terminal y senescencia en individuos de edad avanzada (McClintock *et al.*, 2007). Así, el HGPS se asemeja en gran medida (siendo prácticamente indistinguible) al envejecimiento normal, presentando numerosas alteraciones en común como pueden ser la activación de la vía mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), respuesta reducida a factores de crecimiento epidérmicos (EGF, *epidermal grow factor*), incremento de la fosforilación de p38 (regulador clave en la respuesta proinflamatoria en células envejecidas) o activación de diferentes vías mitocondriales (Aliper *et al.*, 2015).

2.2 Detección de la lamina A

Mediante un análisis de inmunofluorescencia y posterior observación al microscopio, se comprobó la presencia de la lamina A en las membranas nucleares utilizando anticuerpos específicos para la detección de esta proteína. Así, pudimos observar una señal fluorescente verde (FITC) alrededor de los núcleos celulares teñidos de azul (DAPI) (Figura 5); dicha señal se corresponde con la presencia de las diferentes isoformas de la lamina A en las membranas de nuestras células.

Tal y como se describió anteriormente, una de las características principales de las líneas celulares con progeria es que presentan una deficiencia en la lamina A madura

debido a la acumulación de progerina, lo que provoca una fuerte inestabilidad nuclear que tiene numerosos efectos perjudiciales para las células.

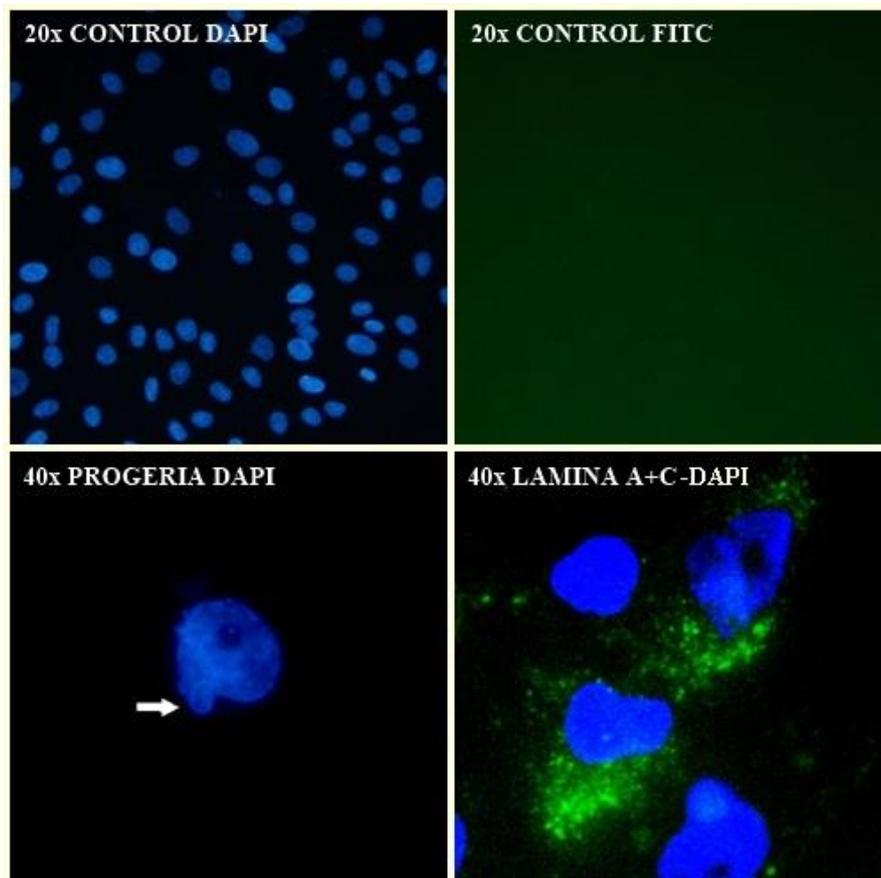


Figura 5. Análisis inmunofluorescente de las líneas celulares con progeria. Arriba a la izquierda se representa el control para DAPI, y arriba a la derecha el control para FITC, en el que no se observa fluorescencia de fondo. Abajo a la izquierda, una célula de progeria en la que se observa una protuberancia característica de las células que sobreexpresan progerina; abajo a la derecha se observa la señal fluorescente de la lamina A en las células de progeria. Las imágenes mostradas corresponden a la línea celular de progeria 3513.

Se ha visto que las laminas de tipo A tienen un papel importante en la homeostasis redox intracelular. De este modo, la reducción de las proteínas lamina A y C en líneas celulares de progeria, así como la acumulación de la progerina, provocan un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que conllevan una hiperpolarización celular y apoptosis (Sieprath *et al.*, 2015) en las células de progeria, lo que podría conducir a la marcada reducción en la tasa de crecimiento celular en comparación con las líneas celulares control sanas.

En un modelo de ratón para el HGPS, Hernandez *et al.* (2010) comprobaron que una variante de la lamina A provocaba un arresto proliferativo que se debía a la

incapacidad para producir una matriz extracelular (MEC) funcional. Estos defectos están asociados con la inhibición de la señalización canónica de Wnt, tanto en células de progeria humanas como de ratón. Defectos en la señalización de Wnt, que afectan a la síntesis de la MEC, pueden ser críticos para el desarrollo del HGPS, ya que se han visto en ratones defectos esqueléticos y apoptosis en los vasos sanguíneos mayores próximos al corazón. Estos resultados establecen una unión funcional entre la envuelta nuclear/lámina y la superficie celular/MEC y puede aportar datos acerca del papel de la señalización de Wnt y la MEC no solo en el HGPS, sino también en el envejecimiento.

Por último, cabe destacar que existen diferentes mutaciones en el gen *LMNA* que provocan síndromes que recuerdan a la progeria y otras enfermedades de este tipo (Csoka *et al.*, 2004; Plasilova *et al.*, 2004). Las mutaciones en el gen *LMNA* son únicas en el sentido de que no se conoce otro gen cuyas mutaciones provoquen tantas enfermedades diferentes. El estudio de las laminopatías y otras mutaciones en proteínas que se encuentran en la envoltura nuclear permite obtener conocimientos sobre la arquitectura del núcleo y su papel en la regulación de las funciones nucleares, como la organización de la cromatina y la interacción entre el núcleo y el citoesqueleto.

3. Estudio preliminar mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (huella peptídica y fragmentación) del proteoma diferencial de líneas celulares de fibroblastos procedentes de pacientes con progeria y controles sanos

3.1 Cuantificación de la concentración de proteína extraída

Las muestras con la proteína extraída de cada línea celular se cuantificaron en el Nanodrop, que nos proporcionó un valor de la concentración de proteína de cada muestra, siendo los valores obtenidos los que se observan en la tabla (Tabla 1).

Línea celular	Nanodrop (µg/µl)
PG3513	1,67
PG3199	0,59
PG8467	2,11
C3512	2,77
C3257	0,95
C8468	1,23

Tabla 1. Representación del valor de la concentración de proteína de cada línea celular obtenido en el Nanodrop.

3.2 Corrección de la integridad de proteínas y ajuste de concentración mediante tinción con plata y densitometría

La tinción con plata supuso un gran avance en la detección de proteínas en el rango de nanogramos, por lo que a lo largo de la historia se han desarrollado diferentes métodos para llevar a cabo esta técnica (Rabilloud, 1990). Como ya se explicó anteriormente, en este caso se siguió el protocolo propuesto por Rabilloud (1990), y tras su realización se pudo observar la aparición de múltiples bandas correspondientes a proteínas (Figura 6).

La imagen que se obtuvo se sometió a un análisis por densitometría para corregir los errores en la cuantificación de las concentraciones de proteína obtenidas en el Nanodrop, ajustándolas para saber cuál era el volumen de proteína real. El *software* utilizado nos permitió calcular un volumen determinado para cada carril de muestra. Los volúmenes de la densitometría se normalizaron con respecto al carril más intenso para calcular el ratio para cada muestra (se divide el valor de volumen de cada una de ellas entre el valor de volumen mayor). Una vez obtenido el ratio de cada una de las muestras se multiplicó por el valor obtenido en el Nanodrop, de manera que obtuvimos la concentración corregida de proteína para cada línea celular. Todos los datos se muestran en la Tabla 2.

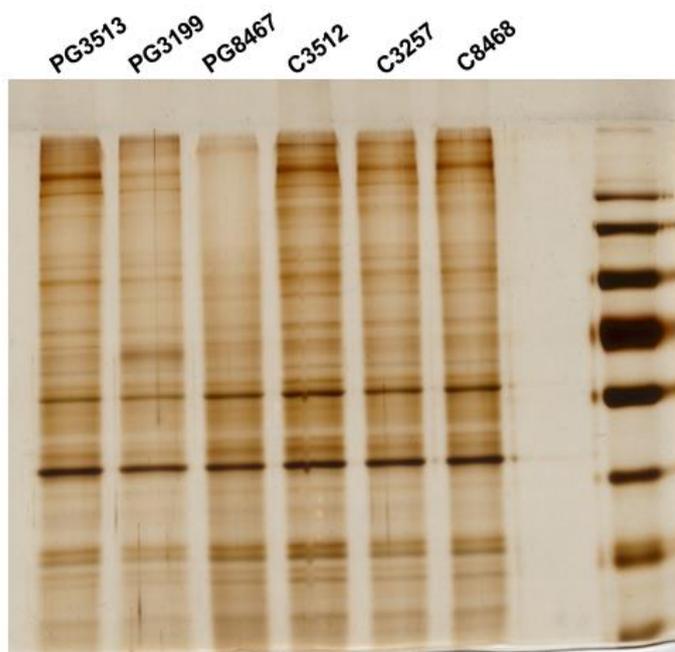


Figura 6. Imagen del gel obtenido tras la tinción con plata de proteínas.

Línea	Volumen	Ratio	Cuantificación Nanodrop	Concentración corregida
PG3513	13037286,28	0,84	1,67	1,41
PG3199	10426549,65	0,67	0,59	0,4
PG8467	11725340,28	0,76	2,11	1,6
C3512	15464794,28	1	2,77	2,77
C3257	12208872,65	0,79	0,95	0,75
C8468	12931830,28	0,84	1,23	1,03

Tabla 2. Resultados de la densitometría del gel teñido con plata. En la primera columna se representa el nombre de las líneas celulares; en la segunda, el valor de volumen proporcionado por el *software* de densitometría; en la tercera, el ratio de volumen normalizado; en la cuarta, la concentración de proteína cuantificada en el Nanodrop; en la quinta, la concentración corregida de proteína, obtenida tras multiplicar el ratio por los valores obtenidos en el Nanodrop.

3.3 Selección de bandas teñidas con plata para espectrometría de masas

A partir del gel teñido con plata, se escogieron una serie de bandas de las obtenidas en el gel y se cortaron para la identificación diferencial de proteínas en las líneas de pacientes con progeria y en las líneas de sus progenitores sanos (Figura 7).

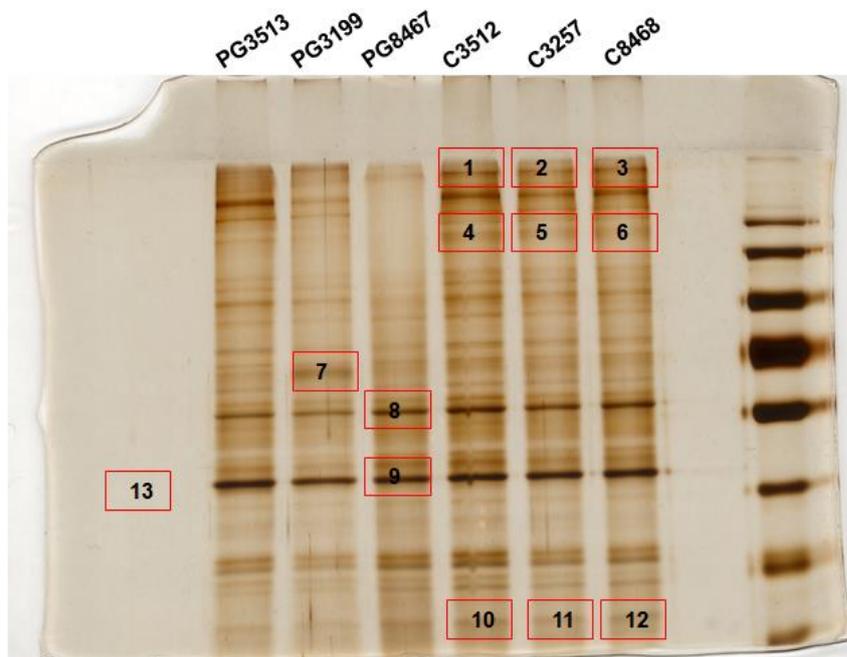


Figura 7. Imagen del gel obtenido tras la tinción con plata de proteínas en el que se indican mediante recuadros rojos y números las proteínas escogidas para la identificación por espectrometría de masas.

3.4 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF

3.4.1 Espectros de masas y masas/masas

Mediante el análisis de masas en el MALDI-TOF/TOF se analizaron los péptidos cortados con tripsina a partir de la digestión triptica de las bandas seleccionadas en el gel teñido con plata. De esta manera se obtuvo una representación gráfica de las especies iónicas de cada muestra (es decir, de cada banda), ordenadas en función de su relación masa/carga frente a su abundancia relativa; estos datos representan la huella peptídica de cada muestra (datos no mostrados). Posteriormente, mediante el análisis de masas se escogió un péptido precursor para cada muestra de los obtenidos anteriormente mediante el análisis de masas, de manera que se fragmentó para obtener una representación gráfica de las especies iónicas de cada muestra, ordenadas de nuevo en función de su relación masa/carga frente a su abundancia relativa; estos datos representan el espectro de fragmentación de cada muestra (datos no mostrados).

3.4.2 Identificación de proteínas en bases de datos

Los datos de la espectrometría de masas y masas/masas realizada con el MALDI-TOF/TOF para cada muestra se cargaron en la base de datos SwissProt en la web www.matrixscience.com, lo que nos permitió identificar las proteínas vimentina (mediante huella peptídica y fragmentación) y actina B y G (mediante huella peptídica) humanas, correspondientes a las bandas 8 y 9 del gel, respectivamente. El resto de los datos analizados de cada muestra, correspondientes a su vez a cada una de las bandas seleccionadas en el gel, no dieron ningún resultado concluyente dentro de nuestro intervalo de confianza (95%), por lo que no se pudo llegar a la identificación de otras proteínas.

La identificación de proteínas obtenida mediante esta base de datos nos proporciona un vínculo a la web de Matrix Science en el que se nos especifica más información acerca de las proteínas identificadas, como es el fragmento de la secuencia de bases de la proteína y los péptidos con los que se ha encontrado coincidencia para su identificación (Figuras 8, 9, 10, 11).

Tal y como se comprobó en el estudio realizado por Mateos *et al.* (2015), la expresión de progerina en los preadipocitos murinos de ratón provocaba la modulación de un gran número de componentes estructurales del citoesqueleto, especialmente aquellos implicados en el correcto mantenimiento de la malla filamentosa que conecta el núcleo, el retículo endoplasmático y la mitocondria. Como vemos, en nuestro estudio también se han identificado las proteínas vimentina y actina B y G, dos proteínas muy características del citoesqueleto. A pesar de que en nuestro caso no se realizó un estudio cuantitativo acerca de la expresión de estas proteínas, sí que podemos comprobar mediante observación en el gel como las proteínas se encuentran diferencialmente expresadas.

Protein sequence coverage: 43%				
Matched peptides shown in bold red .				
1	MSTRSVSSSS	YRR MFGGPGT	ASRPSSRSY	VTTSTRTYSL GSALRPSTSR
51	SLYASSPGGV	YATR SSAVRL	RSSVPGVRL	QDSVDFSLAD AINTEFKNTR
101	TNEKVELQEL	NDRFANYIDK	VR FLEQQNKI	LLAELEQLKG QGKSRLGDLY
151	EEEMRELRRQ	VDQLTNDKAR	VEVERDNLAE	DIMRLREKLQ EEMLQREEAE
201	NTLQSFQDV	DNASLARLDL	ERKVESLQEE	IAFLKKLHEE EIQLQAAQIQ
251	EQHVQIDVDV	SKPDLTAALR	DVRQQYESVA	AKNLQEAEEW YKSK FADLSE
301	AANRNDALR	QAKQESTEYR	RQVQSLTCEV	DALKGTNESL ERQMREMEEN
351	FAVEAANYQD	TIGRLQDEIQ	NMKEEMARHL	REYQDLLNVK MALDIEIATY
401	RKLLEGEESR	ISLPLPNFSS	LNLRETNLDS	LPLVDTHSKR TLLIKTVETR
451	DGQVINETSQ	HHDDLE		

Figura 8. Fragmento de la secuencia de la proteína vimentina en la que se representan en rojo los péptidos con los que la base de datos ha encontrado coincidencia y que han permitido la identificación, utilizando los espectros de masas (huella peptídica).

Protein sequence coverage: 9%				
Matched peptides shown in bold red .				
1	MSTRSVSSSS	YRR MFGGPGT	ASRPSSRSY	VTTSTRTYSL GSALRPSTSR
51	SLYASSPGGV	YATR SSAVRL	RSSVPGVRL	QDSVDFSLAD AINTEFKNTR
101	TNEKVELQEL	NDRFANYIDK	VR FLEQQNKI	LLAELEQLKG QGKSRLGDLY
151	EEEMRELRRQ	VDQLTNDKAR	VEVERDNLAE	DIMRLREKLQ EEMLQREEAE
201	NTLQSFQDV	DNASLARLDL	ERKVESLQEE	IAFLKKLHEE EIQLQAAQIQ
251	EQHVQIDVDV	SKPDLTAALR	DVRQQYESVA	AKNLQEAEEW YKSK FADLSE
301	AANRNDALR	QAKQESTEYR	RQVQSLTCEV	DALKGTNESL ERQMREMEEN
351	FAVEAANYQD	TIGRLQDEIQ	NMKEEMARHL	REYQDLLNVK MALDIEIATY
401	RKLLEGEESR	ISLPLPNFSS	LNLRETNLDS	LPLVDTHSKR TLLIKTVETR
451	DGQVINETSQ	HHDDLE		

Figura 9. Fragmento de la secuencia de la proteína vimentina en la que se representan en rojo los péptidos con los que la base de datos ha encontrado coincidencia y que han permitido la identificación, utilizando los espectros de masas (fragmentación).

Protein sequence coverage: 28%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MDDIAALVV DNGSGMCKAG FAGDDAPRAV FPSIVGRPRH QGVMVGMGQK
51  DSYVGDEAQS KRGILTLKYP IEHGIVTNWD DMEKIWHHTF YNELRVAPEE
101 HPVLLTEAPL NPKANREKMT QIMFETFNTF AMYVAIQAVL SLYASGRITG
151 IVMDSGDGVI HTVPIYEGYA LPHAILRLDL AGRDLTDYLM KILTERGYSF
201 TTAEREIVR DIKEKLCYVA LDFAQEMATA ASSSSLEKSY ELPDGQVITI
251 GNERFRCPEA LFQPSFLGME SCGIHETTFN SIMKCDVDIR KDLYANTVLS
301 GGTTMYPGIA DRMQKEITAL APSTMKIKII APPERKYSVW IGGSSILASLS
351 TFQQMWISKQ EYDESGPSIV HRKCF

```

Figura 10. Fragmento de la secuencia de la proteína actina B en la que se representan en rojo los péptidos con los que la base de datos ha encontrado coincidencia y que han permitido la identificación, utilizando los espectros de masas (huella peptídica).

Protein sequence coverage: 28%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MEEEIAALVI DNGSGMCKAG FAGDDAPRAV FPSIVGRPRH QGVMVGMGQK
51  DSYVGDEAQS KRGILTLKYP IEHGIVTNWD DMEKIWHHTF YNELRVAPEE
101 HPVLLTEAPL NPKANREKMT QIMFETFNTF AMYVAIQAVL SLYASGRITG
151 IVMDSGDGVI HTVPIYEGYA LPHAILRLDL AGRDLTDYLM KILTERGYSF
201 TTAEREIVR DIKEKLCYVA LDFAQEMATA ASSSSLEKSY ELPDGQVITI
251 GNERFRCPEA LFQPSFLGME SCGIHETTFN SIMKCDVDIR KDLYANTVLS
301 GGTTMYPGIA DRMQKEITAL APSTMKIKII APPERKYSVW IGGSSILASLS
351 TFQQMWISKQ EYDESGPSIV HRKCF

```

Figura 11. Fragmento de la secuencia de la proteína actina G en la que se representan en rojo los péptidos con los que la base de datos ha encontrado coincidencia y que han permitido la identificación, utilizando los espectros de masas (huella peptídica).

4. Validación de proteínas que previamente han sido descritas como moduladas por la sobreexpresión de la isoforma mutada progerina

Como ya se citó anteriormente, en el modelo de preadipocitos murinos de ratón transducidos con la isoforma mutada progerina se observó una alteración en la expresión de la proteína nucleolina (Mateos *et al.*, 2015). Para poder comprobar si esta situación también se daba en fibroblastos humanos de pacientes con progeria, se realizó un análisis por *Western blot* con el fin de validar la modulación que sufre la nucleolina. Utilizando como control de carga la proteína α -tubulina (para poder afirmar que las diferencias observadas se deben a diferencias en el nivel de expresión y no en la carga de proteína), se pudo observar como las tres líneas celulares de progeria mostraban un aumento en la expresión de nucleolina (Figura 12), y por lo tanto una acumulación desregulada de esta proteína.

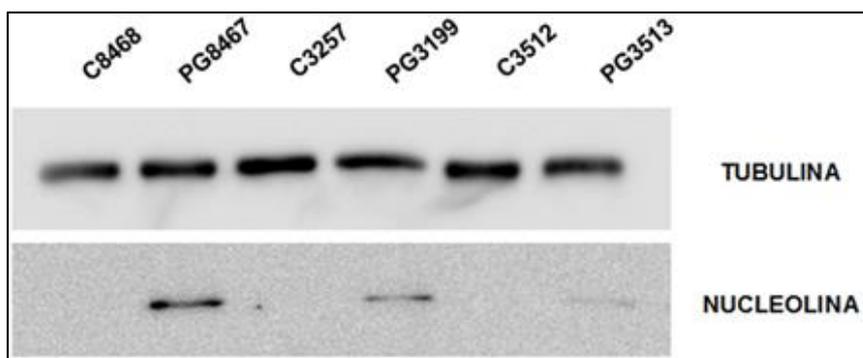


Figura 12. Análisis *Western blot* para la proteína nucleolina, utilizando como control de carga la proteína tubulina. Se pueden apreciar las diferencias en la expresión de nucleolina en las líneas de progeria y las líneas control.

Además, tras la realización del *Western blot* se llevó a cabo un análisis de imagen por densitometría y posterior análisis estadístico para corroborar que las diferencias observadas en la expresión de nucleolina entre las líneas de progeria y las líneas control eran estadísticamente significativas. Para ello, en primer lugar, se realizó un análisis por densitometría tanto de la tubulina como de la nucleolina, y se normalizaron los datos (volumen de densitometría nucleolina/volumen de densitometría tubulina) para cada línea celular, tal y como se muestra en la Tabla 3. Posteriormente, utilizando el programa R, se llevó a cabo el test no paramétrico de Kruskal-Wallis por parejas (control-progeria) en el que se obtuvo un p -valor < 0.05 , por lo que pudimos confirmar que las diferencias en la expresión de nucleolina observadas en las líneas celulares de progeria respecto a las líneas celulares control, son estadísticamente significativas (Figura 13).

	TUBULINA	NUCLEOLINA	NORMALIZACIÓN	Corrección x 100 para R
Nombre	Volumen	Volumen	Ratio NCL/TUBULINA	Volumen
Control 1	10079728	119737	0,011878991	1,187899118
Progeria 1	12476566	2293157	0,183797128	18,37971282
Control 2	15182087	205083	0,013508222	1,350822189
Progeria 2	12674340	945406	0,074592129	7,459212866
Control 3	13673547	15907	0,001163341	0,116334116
Progeria 3	11032158	212671	0,019277371	1,927737076

Tabla 3. Resultados de la densitometría realizada para la tubulina y la nucleolina, en los que se pueden observar los valores de volumen para cada una de ellas, el ratio nucleolina/tubulina, y una corrección multiplicando por 100 con el fin de poder utilizar estos datos para el análisis estadístico en R.

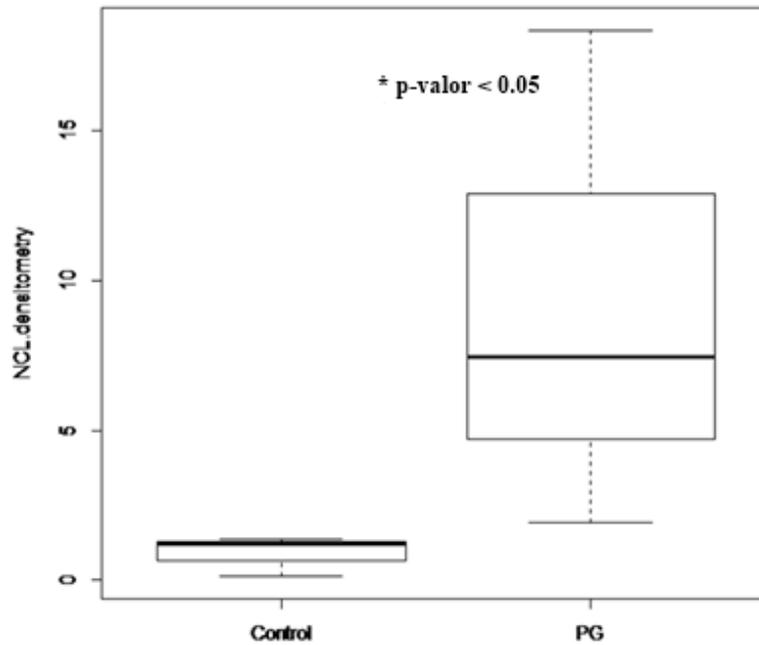


Figura 13. Diagrama de cajas obtenido tras la realización del test estadístico Kruskal-Wallis, en el que se observa que las diferencias entre las líneas celulares control y de progeria son estadísticamente significativas.

La nucleolina nucleolar está implicada en funciones como el silenciamiento génico, la regulación del ciclo celular y la senescencia (Tajrishi *et al.*, 2011), por lo que la elevada expresión de esta proteína en células con HGPS podría estar implicada en la baja tasa de crecimiento celular y senescencia típicas de estas células.

Sin embargo, todavía no se conoce como esta alteración en la expresión de nucleolina podría contribuir al desarrollo del HGPS. Por un lado, podría ser que la enfermedad en sí y el estado patológico del paciente provocara una desregulación en la expresión de esta proteína, mientras que por otro lado podría ser que la desregulación de la nucleolina contribuyera a la iniciación o a la progresión de la enfermedad.

En otros estudios se ha visto también que la expresión de la nucleolina está alterada en numerosos cánceres (Berger *et al.*, 2015). Sin embargo, no se conocen mutaciones ni variantes de *splicing* del gen que codifica para la nucleolina que estén asociadas a enfermedades.

En un futuro, se plantea estudiar esta proteína mediante técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos adecuados. Por otro lado, la realización de estudios utilizando ARN interferentes permitiría disminuir o aumentar la expresión de nucleolina en células enfermas, para así poder comprobar como las variaciones en el

nivel de expresión afectan al fenotipo y a la proliferación celular. Es por ello que esta proteína podría ser utilizada como una diana terapéutica.

5. Consideraciones metodológicas

Como se puede comprobar en las imágenes presentadas del análisis inmunofluorescente para la lamina A y C, la señal detectada es muy tenue y no se presenta como un contorno definido en la membrana de los núcleos celulares, tal y como debería ocurrir, por lo que realmente las imágenes no serían válidas para confirmar la detección de la lamina A/C. Este problema puede deberse probablemente a que la dilución de anticuerpo utilizada no es correcta (el nuevo lote de anticuerpo no estaba titulado), por lo que la señal fluorescente detectada es muy débil y poco precisa. Otra opción sería que las células no se permeabilizaron correctamente durante el protocolo, lo que explicaría que la señal observada fuera tan débil.

En cuanto al estudio preliminar del proteoma diferencial de las diferentes líneas celulares, solo se han identificado las proteínas vimentina y actina B y G, que se caracterizan por identificarse muy bien por MALDI. En cuanto a otras proteínas, es importante destacar que aquellas que tienen un elevado peso molecular se identifican mal, ya que poseen muchas secuencias repetidas que no se digieren bien con la tripsina. Por otro lado, aquellas proteínas que tienen un bajo peso molecular presentan pocos péptidos trípticos para su identificación. Es por ello que para una identificación mejorada, en un futuro lo siguiente a realizar sería una identificación de proteínas utilizando el extracto peptídico de las muestras.

Conclusiones

El estudio realizado ha demostrado como la sobreexpresión de la progerina está asociada a fenotipos enfermos severos, provocando múltiples efectos deletéreos en las células que afectan principalmente a la estabilidad e integridad nuclear. De esta manera, podemos confirmar que los resultados obtenidos en el modelo de preadipocitos murinos de ratón transducidos con progerina también se cumplen en líneas celulares de fibroblastos humanos con progeria.

Por lo tanto, los resultados han permitido extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha comprobado y observado cómo las líneas celulares de fibroblastos humanos de pacientes con progeria presentaban una clara disminución en la tasa de crecimiento, una morfología alterada y un tamaño reducido en comparación con las líneas celulares control sanas.
- Se ha observado mediante microscopía de fluorescencia que las líneas celulares de progeria muestran una morfología irregular y deformaciones en sus contornos celulares, así como núcleos caracterizados por el típico *blebbing* nuclear; todas estas características contribuyen a la perjudicial situación de inestabilidad y pérdida de integridad nuclear.
- Se ha analizado de forma preliminar el proteoma diferencial de líneas de pacientes con progeria y líneas de controles sanos mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, lo que nos ha permitido identificar las proteínas vimentina y actina B y G, dos proteínas características del citoesqueleto que se ven alteradas ante la sobreexpresión de la isoforma mutada progerina.
- Se ha validado la modulación que sufre la proteína nucleolina ante la sobreexpresión de progerina, pudiendo comprobar mediante *Western blot* que la nucleolina aparece sobreexpresada en pacientes con progeria, lo que podría contribuir al fenotipo senescente típico de estas células.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias en especial tanto a mi directora del Trabajo Fin de Máster, Dra. María del Carmen Arufe Gonda, como a mi codirector, Dr. Jesús Mateos Martín, por todo lo que me han enseñado y ayudado durante estos meses de trabajo.

También me gustaría dar las gracias a todo el personal del INIBIC, en especial a Juan Fafián Labora, tanto por su compañía dentro del laboratorio como por la ayuda prestada en todo momento.

Bibliografía

- Aliper AM, Csoka AB, Buzdin A, Jetka T, Roumiantsev S, Moskalev A, Zhavoronkov A. **2015**. Signaling pathway activation drift during aging: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts are comparable to normal middle-age and old-age cells. *Aging (Albany NY)* 7 (1): 26-37.
- Arancio W, Pizzolanti G, Genovese SI, Pitrone M, Giordano C. **2014**. Epigenetic involvement in Hutchinson-Gilford progeria syndrome: a mini-review. *Gerontology* 60 (3): 197-203.
- Baek JH, Schmidt E, Viceconte N, Strandgren C, Pernold K, Richard TJ, Van Leeuwen FW, Dantuma NP, Damberg P, Hultenby K, Ulfhake B, Mugnaini E, Rozell B, Eriksson M. **2015**. Expression of progerin in aging mouse brains reveals structural nuclear abnormalities without detectable significant alterations in gene expression, hippocampal stem cells or behavior. *Human Molecular Genetics* 24 (5): 1305-1321.
- Beck LA, Hosick TJ, Sinensky M. **1990**. Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *The Journal of Cell Biology* 110 (5): 1489-1499.
- Berger CM, Gaume X, Bouvet P. **2015**. The roles of nucleolin subcellular localization in cancer. *Biochimie* 113: 78-85.
- Brown WT. **1992**. Progeria: a human-disease model of accelerated aging. *American Journal of Clinical Nutrition* 55: 1222S-1224S.
- Burke B, Stewart CL. **2002**. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 575-585.
- Burke B, Stewart CL. **2006**. The laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 7: 369-405.
- Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, Gordon LB, Der CJ, Cox AD, Collins FS. **2005**. Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (36): 12879-12884.

Csoka AB, Cao H, Sammak PJ, Constantinescu D, Schatten GP, Hegele RA. **2004**. Novel lamin A/C gene (LMNA) mutations in atypical progeroid syndromes. *Journal of Medical Genetics* 41: 304-308.

De Sandre-Giovannoli, A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, Lévy N. **2003**. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300 (5628): 2055.

Dechat T, Shimi T, Adam SA, Rusinol AE, Andres DA, Spielmann HP, Sinensky MS, Goldman RD. **2007**. Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (12): 4955-4960.

Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS. **2003**. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423 (6937): 293-298.

Ghosh S, Zhou Z. **2014**. Genetics of aging, progeria and lamin disorders. *Current Opinion in Genetics & Development* 26:41-46.

Gilford H. **1904**. Ateleiosis and progeria: continuous youth and premature old age. *British Medical Journal* 2: 914-918.

Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. **1999**. Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science* 112 (Pt 6): 761-772.

Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, Collins FS. **2004**. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (24): 8963-8968.

- Gordon LB, Massaro J, D'Agostino RB Sr, Campbell SE, Brazier J, Brown WT, Kleinman ME, Kieran MW; Progeria Clinical Trials Collaborative. **2014**. Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Circulation* 130 (1): 27-34.
- Guénantin AC, Briand N, Bidault G, Afonso P, Béréziat V, Vazier C, Lascols O, Caron-Debarle M, Capeau J, Vigouroux C. **2014**. Nuclear envelope-related lipodystrophies. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 29: 148-157.
- Hennekam RC. **2006**. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A* 140A (23): 2603-2624.
- Hernandez L, Roux KJ, Wong ES, Mounkes LC, Mutalif R, Navasankari R, Rai B, Cool S, Jeong JW, Wang H, Lee HS, Kozlov S, Grunert M, Keeble T, Jones CM, Meta MD, Young SG, Daar IO, Burke B, Perantoni AO, Stewart CL. **2010**. Functional coupling between the extracellular matrix and nuclear lamina by Wnt signaling in progeria. *Developmental Cell* 19 (3): 413-425.
- Hutchinson J. **1886**. Case of congenital absence of hair, with atrophic condition of the skin and its appendages, in a boy whose mother had been almost wholly bald from alopecia areata from the age of six. *Lancet* I: 923.
- Lammerding J, Fong LG, Ji JY, Reue K, Stewart CL, Young SG, Lee RT. **2006**. Lamin A and Lamin C but Not Lamin B1 Regulate Nuclear Mechanics. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (35): 25768-25780.
- Lutz RJ, Trujillo MA, Denham KS, Wenger L, Sinensky M. **1992**. Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (7): 3000-3004.
- Mateos J, Fernández P, Fafián J, Blanco F, Arufe MC. **2014**. Proteomic Applications in the Study of Human Mesenchymal Stem Cells. *Proteomes* 2: 53-71.
- Mateos J, Landeira A, Fafián JA, Fernández P, Lesende I, Fernández P, Fernández M, Delmiro A, Martín MA, Blanco FJ, Arufe MC. **2015**. iTRAQ-based analysis of progerin expression reveals mitochondrial dysfunction, reactive oxygen species accumulation and altered proteostasis. *Stem Cell Research & Therapy* 6 (1):119.

- McClintock D, Gordon LB, Djabali K. **2006**. Hutchinson-Gilford progeria mutant lamin A primarily targets human vascular cells as detected by an anti-Lamin A G608G antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (7): 2154-2159.
- McClintock D, Ratner D, Lokuge M, Owens DM, Gordon LB, Collins FS, Djabali K. **2007**. The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PLoS ONE* 2 (12): e1269.
- Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith AC, Perry MB, Brewer CC, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B, Brooks BP, Gerber LH, Turner ML, Domingo DL, Hart TC, Graf J, Reynolds JC, Gropman A, Yanovski JA, Gerhard-Herman M, Collins FS, Nabel EG, Cannon RO 3rd, Gahl WA, Inrone WJ. **2008**. Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *New England Journal of Medicine* 358 (6): 592-604.
- Misteli T, Scaffidi P. **2005**. Genome instability in progeria: when repair gets old. *Nature Medicine* 11 (7): 718-719.
- Moulson CL, Fong LG, Gardner JM, Farber EA, Go G, Passariello A, Grange DK, Young SG, Miner JH. **2007**. Increased progerin expression associated with unusual LMNA mutations causes severe progeroid syndromes. *Human Mutation* 28 (9): 882-889.
- Musich PR, Zou Y. **2009**. Genomic instability and DNA damage responses in progeria arising from defective maturation of prelamin A. *Aging* 1 (1): 28-37.
- Musich PR, Zou Y. **2011**. DNA-damage accumulation and replicative arrest in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Biochemical Society Transactions* 39 (6): 1764-1769.
- Pacheco LM, Gomez LA, Dias J, Ziebarth NM, Howard GA, Schiller PC. **2014**. Progerin expression disrupts critical adult stem cell functions involved in tissue repair. *Aging (Albany NY)* 6 (12): 1049-1063.
- Plasilova M, Chattopadhyay C, Pal P, Schaub NA, Buechner SA, Mueller H, Miny P, Ghosh A, Heinemann K. **2004**. Homozygous missense mutation in the lamin A/C

- gene causes autosomal recessive Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Journal of Medical Genetics* 41: 609-614.
- Pollex RL, Hegele RA. **2004**. Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clinical Genetics* 66 (5): 375-381.
- Progeria Research Foundation (PRF) webpage. Disponible en: http://www.progeriaresearch.org/meet_the_kids.html, visitado el 25 Mayo 2015.
- Quigley A, Dong YY, Pike AC, Dong L, Shrestha L, Berridge G, Stansfeld PJ, Sansom MS, Edwards AM, Bountra C, von Delft F, Bullock AN, Burgess-Brown NA, Carpenter EP. **2013**. The structural basis of ZMPSTE24-dependent laminopathies. *Science* 339 (6127): 1604-1607.
- Rabilloud T. **1990**. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: A 10-year synthesis. *Electrophoresis* 11 (10): 785-794.
- Rehman NA, Rehman AA, Ashraf IN, Ahmed S. **2015**. Can Hutchinson-Gilford progeria syndrome be cured in the future? *Intractable & Rare Diseases Research* 4 (2):111-112.
- 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.
- Scherl A, Coute Y, Deon C, Calle A, Kindbeiter K, Sanchez JC, Greco A, Hochstrasser D, Diaz JJ. **2002**. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Molecular Biology of the Cell* 13: 4100-4109.
- Sieprath T, Corne TD, Nooteboom M, Grootaert C, Rajkovic A, Buysschaert B, Robijns J, Broers JL, Ramaekers FC, Koopman WJ, Willems PH, De Vos WH. **2015**. Sustained accumulation of prelamin a and depletion of lamin A/C both cause oxidative stress and mitochondrial dysfunction but induce different cell fates. *Nucleus* 21: 1-11.
- Sinha JK, Ghosh S, Raghunath M. **2014**. Progeria: A rare genetic premature ageing disorder. *Indian Journal of Medical Research* 139 (5): 667-674.

- Stewart CL, Kozlov S, Fong LG, Young SG. **2007**. Mouse models of the laminopathies. *Experimental Cell Research* 313 (10): 2144-2156.
- Tajrishi MM, Tuteja R, Tuteja N. **2011**. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Communicative & Integrative Biology* 4 (3): 267-275.
- Wang Y, Panteleyev AA, Owens DM, Djabali K, Stewart CL, Worman HJ. **2008**. Epidermal expression of the truncated prelamin A causing Hutchinson-Gilford progeria syndrome: effects on keratinocytes, hair and skin. *Human Molecular Genetics* 17 (15): 2357-2369.
- Yang SH, Andres DA, Spielmann HP, Young SG, Fong LG. **2008**. Progerin elicits disease phenotypes of progeria in mice whether or not it is farnesylated. *The Journal of Clinical Investigation* 118 (10): 3291-3300.
- Yang SH, Bergo MO, Toth JI, Qiao X, Hu Y, Sandoval S, Meta M, Bendale P, Gelb MH, Young SG, Fong LG. **2005**. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (29): 10291-10296.
- Yang SH, Meta M, Qiao X, Frost D, Bauch J, Coffinier C, Majumdar S, Bergo MO, Young SG, Fong LG. **2006**. A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *The Journal of Clinical Investigation* 116 (8): 2115-2121.
- Young SG, Fong LG, Michaelis S. **2005**. Prelamin A, Zmpste24, misshapen cell nuclei, and progeria--new evidence suggesting that protein farnesylation could be important for disease pathogenesis. *The Journal of Lipid Research* 46 (12): 2531-2558.
- Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD. **1996**. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272 (5259): 258-262.