



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

*ESTUDIO DEL FOSFOPROTEOMA DE LA ENVOLTURA NUCLEAR
DURANTE LA DIFERENCIACIÓN Y SU CORRELACIÓN CON EL
PRECURSOR PRELAMINA A*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ANDREA CASASOLA

DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. ROBERTO CORIA
DRA. VIVIANA VALADEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO.
AGOSTO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A ustedes tres, a quienes extraño tanto:

Mi mamá en el cielo,

Mi apa, mi ángel en la tierra a quien adoro tanto,

y a Ge, mi gran orgullo, mi siempre herman.

To my home and dreams,

mi todo, mi John.

RESUMEN

La envoltura nuclear es el marco estructural que define al núcleo celular. Además de mantener las propiedades físico-químicas del núcleo, la envoltura nuclear es crucial para la regulación de diversos procesos celulares primordiales, incluyendo el transporte nuclear, la organización del ADN y la estabilidad genómica. La envoltura nuclear se constituye por una bicapa lipídica compuesta a su vez por la membrana nuclear externa, la cual se asocia al retículo endoplásmico (lado citoplásmico), y la membrana nuclear interna, la cual se asocia a la lámina nuclear (lado nucleoplásmico). La lámina nuclear subyacente a la membrana nuclear interna también forma parte de la envoltura nuclear y está compuesta por la familia de las proteínas laminas, como es el caso de la lamina A/C. La eliminación de las laminas y un alto número de mutaciones causan defectos importantes en la estructura nuclear, la traducción de señales citoplasma-núcleo, la dinámica de la cromatina y la expresión génica. Entonces, defectos en la envoltura nuclear pueden resultar en el desarrollo de enfermedades humanas conocidas como laminopatías. Tal es el caso de numerosos síndromes de envejecimiento prematuro, incluyendo el síndrome progeroide Hutchinson-Gilford Progeria (HGPS) y los síndromes progeroides atípicos.

A pesar de la relevancia funcional de la envoltura nuclear, la composición proteica de esta estructura permanece sin conocerse por completo en la mayoría de los sistemas celulares. Sin embargo, diversos mecanismos regulatorios han sido descritos para proteínas específicas, como es el caso de la fosforilación en las laminas, los cuales son esenciales para el ensamblaje y desmantelamiento de la envoltura nuclear en los procesos mitóticos. Además del re-arreglo nuclear durante la mitosis celular, existen otros procesos celulares acompañados de cambios nucleares dramáticos que parecen influir en la regulación sobre programas transcripcionales. Tal es el caso de la diferenciación celular. Hasta la fecha, se desconoce si la envoltura nuclear se remodela durante los procesos de diferenciación celular y cual es el papel de las modificaciones postraduccionales en sus componentes a nivel global.

En este trabajo se caracterizó la envoltura nuclear en términos de la fosforilación de proteínas durante la diferenciación eritroide y muscular en líneas celulares de mamífero (*Mus musculus*). Nuestros estudios se llevaron a cabo mediante el aislamiento de envolturas nucleares por fraccionamiento bioquímico acoplado a espectrometría de masas en tándem.

El presente trabajo permitió el descubrimiento de un gran número de componentes potenciales de la envoltura nuclear y la definición de más de 300 sitios de fosforilación, cuya validación es requerida por estudios futuros. Las proteínas fosforiladas identificadas en la envoltura nuclear incluyen componentes estructurales, complejos de transporte nuclear, metabolismo del RNA, así como factores transcripcionales.

En etapas tempranas, este trabajo se enfocó en el estudio de la proteína precursora de la lamina A, la prelamina A, la cual es fosforilada en células diferenciadas. Este evento corresponde a dos fosfoserinas en el dominio carboxilo terminal, el cual juega un papel crucial en el procesamiento postraduccional del precursor prelamina A. Debido a la amplia variedad de funciones celulares del precursor prelamina A y a su relevancia en síndromes de envejecimiento prematuro como el HGPS, los eventos de fosforilación estudiados representan candidatos importantes para entender el mecanismo molecular que subraya dichos desórdenes.

A la luz de estas investigaciones se desarrolló el anticuerpo monoclonal anti-prelamina A PL-1C7, utilizando como secuencia antigénica el fragmento peptídico en donde se identificaron las fosforilaciones previamente mencionadas en la prelamina A. PL-1C7 se caracterizó y validó, permitiendo el descubrimiento de la distribución de la prelamina A en células de ratón de origen muscular, así como el comportamiento de dicho precursor ante tratamientos químicos que inducen su acumulación e intervienen en su procesamiento postraduccional en el contexto endógeno. Finalmente, PL-1C7 se utilizó para estudiar la relación lamina A/prelamina A en términos de enriquecimiento proteico en células que expresan la prelamina A humana con seis mutaciones puntuales de forma independiente. Las mutaciones evaluadas en la lamina A humana se asocian con el desarrollo de síndromes progeroides y de acuerdo a nuestros resultados desencadenan efectos tanto positivos como negativos en el enriquecimiento de prelamina A.

Este trabajo provee una herramienta de inmunodetección clave para los estudios de la lámina nuclear así como nuevas observaciones en la dinámica de deposición y procesamiento del precursor prelamina A.

ABSTRACT

The nuclear envelope (NE) plays a key role in nuclear structural integrity, chromosomal stability, chromatin organization and gene regulation. In spite of its wide spectrum of functions, it is currently unclear how changes in NE composition affect the ability of the NE to transduce signals. It is clear that nuclear shape changes during many cellular processes, such as senescence, apoptosis and differentiation, and in diseases such as cancer, where nuclear shape is used as a diagnosis. However, previous studies have not demonstrated that these changes arise exclusively from differential nuclear protein composition, raising the possibility that these changes are in part due to post-translational modifications of NE proteins. Since phosphorylation is a key regulator in cellular processes, in which interplay between phosphatases and kinases strictly controls biological processes, and altered or defective phosphorylation signaling pathways often result in various diseases, we studied the NE protein phosphorylation during cellular differentiation. Therefore, we developed a NE isolation protocol in mammalian cells for the purpose of characterizing the NE phosphoproteome during erythroid and muscle differentiation by LC/LS mass spectrometry in terms of phosphorylation enrichment. Since the ultimate purpose of signal transduction through the NE is to transmit extracellular and cytoplasmic stimuli to the nuclear interior to elicit a cellular response; perhaps these signals are mediated primarily through changes in phosphorylation status. Consistently, over eighty NE phosphorylation events occurring during erythroid differentiation and over one hundred during muscle differentiation were detected. These results suggest that protein phosphorylation could serve as a signal for the transition to a differentiated state.

Misregulation of and/or mutations in NE proteins disrupt structural and regulatory NE properties, causing diseases known as laminopathies. For example, mutations in the NE protein Lamin A are the basis for the premature aging syndrome known as Hutchinson-Gilford progeria (HGPS), in which the nucleus undergoes structural and functional alterations that disrupt the differentiation and viability of the cells. Altered Lamin A processing has been linked to senescence, upregulation of p53 targets, telomere erosion, defective DNA repair, increased autophagy, regulated miRNA expression, epigenetic changes and overactivation of NF- κ B signaling at the cellular level. The large effect of Lamin A and its precursors on the central

pathways for the control of cell viability and systemic homeostasis processes make it a potential candidate to be regulated by phosphorylation. As a proof of principal, we focused on Lamin A initially, which is previously known to be upregulated in differentiated erythroid and muscle cells. In particular, we focused our study on two events in the precursor Lamin A at the Carboxyl terminal end. These novel phosphoserines lie at positions just one residue away from the major processing site required for generation of mature Lamin A. Interestingly, these phosphorylatios are deleted in HGPS, raising the possibility that a lack of phosphorylation at these sites are implicated in the regulation of the Lamin A processing and may contribute to the development of progeroid syndrome.

Furthermore, we developed the monoclonal antibody PL-1C7 that specifically recognizes prelamin A. Importantly, PL-1C7 can be used to determine prelamin A localization and accumulation in cells where Lamin A is highly expressed. Our results show that unlike mature lamin A, prelamin A accumulates as discrete and localized foci at the nuclear periphery. Finally, we show that specific laminopathy-associated mutations exhibit both positive and negative effects on prelamin A accumulation, indicating that these mutations affect prelamin A processing efficiency in different manners.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por CONACyT (CVU/Becario 254970/215123), los donativos de la DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN209403, IN203811 y IN201114), CONACyT (42653-Q, 128464 and 220503) (Dr. Félix Recillas Targa, Instituto de Fisiología celular UNAM), los donativos del NIH R01 HL65440 and R37 DK44746) (Dr. Mark Groudine, Fred Hutchinson Cancer Research Center) y el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP). Agradecimientos especiales para el Dr. Félix Recillas Targa, el Dr. Héctor Rincón-Arano (Fred Hutchinson Cancer Research Center), y el Dr. Mark Groudine, cuyo trabajo, guía y experiencia científica fueron cruciales para el planteamiento, desarrollo y culminación del presente proyecto. Se reconoce y agradece especialmente al Dr. Felix Recillas Targa por su contribución intelectual, mentoría y trabajo invaluable a lo largo de este programa. Se reconoce y agradece especialmente al Dr. Héctor Rincón Arano, por su invaluable contribución intelectual, trabajo arduo y sus aportaciones tanto teóricas como experimentales a este proyecto, así como a aquellos que se derivaron del mismo. Se agradece a Dave Scalzo (Fred Hutchinson Cancer Research Center), Dra. Jessica Halow (Fred Hutchinson Cancer Research Center), Dr. Vivek Nandakumar (Fred Hutchinson Cancer Research Center), Dra. Joan Ritland (Fred Hutchinson Cancer Research Center), y Rodrigo Arzate (Posgrado de Ciencias Biomédicas, IFC) por sus valiosas contribuciones.

Agradecimientos para los miembros de comité tutorial: Dr. Félix Recillas-Targa, Dra. Viviana Valadez y Dr. Roberto Coria, por su tiempo y trabajo en la revisión de este proyecto, así como su consejo científico en cada etapa del mismo. Agradecimientos especiales para los integrantes del laboratorio Recillas-Targa, en especial a Georgina Guerrero Avendaño, cuya labor diaria permite el desarrollo, avance y culminación satisfactoria de los proyectos

en el laboratorio. Se agradece a Gianelli Cortés, cuyo trabajo hace posible nuestro trabajo. Agradecimientos especiales para todos los miembros del laboratorio Groudine, cuyo consejo científico, supervisión experimental y colaboración ha sido crucial para mi formación científica, el avance y conclusión del presente trabajo, incluyendo a Christy Majorowicz por su invaluable ayuda en los términos administrativos.

Se reconoce y agradece al Posgrado de Maestría y Doctorado de Ciencias Bioquímicas y a la Dirección General de Estudios de Posgrado-Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente al Dr. Roberto Coria, Leticia García, Sara Noguera, Mtra. Norma Trejo y Adelina González por su ayuda continua e invaluable en términos administrativos, así como en todo lo concerniente a los requerimientos, guía y avance en el programa.

Se reconoce y agradece a la Unidad de Proteómica (Dr. Phil Gafken y Dra. Yuko Ogata, Fred Hutchinson Cancer Research Center) por el enriquecimiento de fosfopéptidos por IMAC y la espectrometría de Masas LC/MS; a la Unidad de Imagen Científica (Dr. Julio Vázquez, Fred Hutchinson Cancer Research Center) por la infraestructura y la guía brindada; a la Unidad de Citometría de Flujo (Dr. Andrew Berger, Dozono Stacey, Reden Brian y Melissa Rojsza, Fred Hutchinson Cancer Research Center) y a la Unidad de desarrollo de Anticuerpos (Dr. Ben Hoffstrom y Norman Boiani, Fred Hutchinson Cancer Research Center).

Agradecimientos a la organización Hutch United (Fred Hutchinson Cancer Research Center), en particular a Dra. Lucie Etienne, Dra. Kiran Dhilion, Dr. Oliver Fragoso, Dr. Tony Abetia, Erin de la Cruz y Dra. Beverly Torok-Storb, cuya mentoría, colaboración y objetivos logrados constituyen un pilar para la culminación de esta etapa.

Se reconoce el Jurado de Examen Doctoral constituido por:

Presidente

Dr. Diego González Halphen

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Secretario

Dra. Rosario Vera Estrella

Instituto de Biotecnología, UNAM

Vocal

Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Vocal

Dr. Alfredo Torres Larios

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Vocal

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Instituto de Química, UNAM

CONTENIDO

DEDICATORIA	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
AGRADECIMIENTOS	7
ABREVIACIONES	14
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABLAS	18
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 Regulación génica y epigenética.	19
1.2 Compartimentalización funcional del genoma: la periferia nuclear.	26
1.3 La envoltura nuclear.	31
Composición lipídica de la envoltura nuclear.	
Composición proteica de la envoltura nuclear.	
Puentes moleculares del citoplasma al nucleoplasma: el complejo del poro nuclear y de unión citoesqueleto-nucleoesqueleto.	
La lámina nuclear.	
Biogénesis de la membrana nuclear.	
1.4 El proteoma de la envoltura nuclear.	55
1.5 Modificaciones postraduccionales en la EN: la fosforilación como objeto de estudio.	57
1.6 La lamina A como un candidato para estudiar la lámina nuclear.	62
Implicaciones de la Lamina A en enfermedades humanas.	

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	68
2.1 Justificación	68
2.2 Objetivos	69
A. Objetivo general	
B. Objetivos específicos	
3. MATERIALES Y MÉTODOS	70
3.1 Líneas celulares	70
3.2 Aislamiento de envolturas nucleares	71
3.3 Enriquecimiento de fosfopéptidos y LC/MS Espectrometría de Masas	74
3.4 Western Blots	76
3.5 Estudios de inmunolocalización	77
Inmunofluorescencias.	
Microscopia y análisis de imágenes.	
3.6 Proteínas de fusión Lamina A.	80
3.7 Ensayos de inhibición de la farnesilación.	81
3.8 Desarrollo del anticuerpo monoclonal anti-Prelamina A (PL-1C7).	81
3.9 Detección de antígeno nuclear por citometría de flujo intracelular (IFC).	83
4. RESULTADOS	
4.1 Estudio del fosfoproteoma de la envoltura nuclear durante la diferenciación en células de mamífero (<i>Mus musculus</i>).	84
Estudio del fosfoproteoma en el linaje eritroide.	
Estudio del fosfoproteoma en el linaje muscular.	
4.2 Estudio de las fosforilaciones en la Lamina A	116

Definición de sitios fosforilados en la lamina A.	
Estudios de localización de la lamina A en el núcleo celular mediante fusiones GFP-Lamina A.	
Análisis de la acumulación del precursor de la Lamina A.	
4.3 Desarrollo del anticuerpo monoclonal anti-prelamina A PL-1C7	123
Caracterización del epítipo de reconocimiento del anticuerpo PL-1C7	
Estudios de la distribución del precursor prelamina A.	
Estudios cuantitativos de enriquecimiento de prelamina A por citometría intracelular.	
4.4 Estudios de detección de prelamina A en mutaciones síndromes progeriodes atípicos.	133
5. DISCUSIÓN	139
5.1 Estudio del fosfoproteoma de la envoltura nuclear durante la diferenciación en células de mamífero (<i>Mus musculus</i>).	139
5.2 Estudio de las fosforilaciones en la Lamina A	144
5.3 Desarrollo del anticuerpo monoclonal anti-Prelamina A PL-1C7	145
5.4 Estudios de detección de prelamina A en mutaciones síndromes progeriodes atípicos.	147
6. CONSLUSIONES	150
7. REFERENCIAS	152
8. ANEXOS	183
Anexo A. Estudio de elementos regulatorios en la región 3' no codificante del dominio α -globina de pollo.	

Anexo B.

- Casasola A, Scalzo D, Nandakumar V, Halow J, Recillas-Targa F, Groudine M, Rincón-Arano H. (2016) Prelamin A processing, accumulation and distribution in normal cells and laminopathy disorders”. *Nucleus*, 7: 84-102.
- Casasola A, LaMacchia J, Arzate R, Recillas Targa F. (2016). "From the extracellular matrix to the nuclear envelope: a functional connection between mechanotransduction and differentiation”. *Revisión sometida*.

ABREVIACIONES

3C	Captura conformacional de cromosomas
Akt	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
AP	Acido fosfático
BAF	Barrier-Autoagregation Factor
C2C12dif	Miotúbulos
C2C12undif	Mioblastos
CAAX	Cisteína- A. alifático- Cisteína- A. alifático–Aminoácido
Cdc	Proteína de control de la división celular (Cell division control protein)
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina (Cyclin-dependent kinase)
CPN	Complejo del Poro Nuclear
CTCF	Proteína de unión CCCTC
CTD	Nuclear Envelope Protein 1 (CNEP-1)
DAG	Diacilglicerol
Dil	Dilución
DR	Dermopatía restrictiva
ELISA	Enzyme-linked Immunoassays
WT	Silvestre (Wild-type)
EN	Envoltura nuclear
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
FG	Fenilalanina-Glicina
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia

FRAP	Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (Fluorescence recovery after photobleaching)
FTInh	Inhibidores de la farnesil-transferasa
G1Edif	Eritroblastos
G1Eundif	Proeritroblastos
HGPS	Síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford (Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome)
IFC	Citometría de flujo intracelular (Intracellular flow cytometry)
Laminas	Láminas –sin acento escrito [la-mi-nas]-
Lamina A/C	–sin acento escrito-
Lamina B	–sin acento escrito-
LAD	Dominios asociados a lamina (Lamin-Associated domains)
LINC	Complejo de unión nucleoesqueleto-citoesqueleto (Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton)
MEF	Fibroblastos embrionicos de ratón
MNE	Membrana Nuclear Externa
MNI	Membrana Nuclear Interna
MSC	Células troncales mesenquimales (Mesenchymal stem cells)
MTRFA	Myocardin related transcription factor A
NEBD	Desensamblaje de la EN (Nuclear envelope breakdown)
NES	Señal de exportación nuclear (Nuclear export signal)
NLC	Señal de localización nuclear (Nuclear localization signal)
NUP	Nucleoporina

ON	Incubación durante la noche
p.e.	Por ejemplo
PKC	Proteína cinasa C (Protein kinase C)
pSer	Fosfoserina
pThr	Fosfotreonina
PtInt	Fosfatidil-Inositol
pTyr	Fosfotirosina
RE	Retículo Endoplásmico
RT	Temperatura ambiente (Room-temperature)
SUN	Proteína Sun Unce-Nuance
TADs	Topology-Associated domains
TAG	Triacilglicerol
YAP/TAZ	Yes-associated protein/Transcriptional coactivator PDZ-binding motif
ZMPSTE24	Metalopeptidasa de zinc STE24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. La compactación del ADN y la compartimentalización nuclear.

Figura 2. La envoltura nuclear.

Figura 3. La lamina A, la ruta de procesamiento.

Figura 4. Recuperación específica de EN mediante fraccionamiento subcelular bioquímico.

Figura 5. La abundancia de fosforilaciones identificadas en las proteínas de la EN de células eritroides se comporta de acuerdo al radio teórico por residuo hidroxilado.

Figura 6. El fosfoproteoma de la envoltura nuclear en células eritroides está constituido principalmente por eventos únicos de fosforilación en las proteínas identificadas.

Figura 7. Proteínas de la EN fosforiladas exclusivamente en un aminoácido por estado de diferenciación.

Figura 8. Comparación de las proteínas de la EN identificadas fosforiladas en cada estado de diferenciación eritroide con las proteínas previamente reportadas en la EN.

Figura 9. El fosfoproteoma de la envoltura nuclear en células eritroides está conformado por proteínas implicadas en una amplia gama de procesos nucleares.

Figura 10. El fosfoproteoma de la EN de células musculares (C2C12) esta constituido principalmente de proteínas nucleares y organizadoras del citoesqueleto.

Figura 11: Localización de las fosforilaciones pSer12, pSer573 y ppSer652653 en la lamina A identificadas en la EN de células tanto eritroides como musculares.

Figura 12. Estudios de localización de la proteína de fusión GFP-Prelamina A WT y las versiones mutantes en los sitios de fosforilación indican su irrelevancia funcional en términos de localización y regulación de la farnesilación.

Figura 13. El epítipo del anticuerpo anti-prelamina A (PL-1C7) corresponde al sitio específico

de reconocimiento de la metaloproteinasa ZMPSTE24.

Figura 14. Detección cuantitativa del enriquecimiento de la proteína prelamina A por el anticuerpo PL-1C7 en citometría de flujo intracelular (IFC).

Figura 15. La distribución de la prelamina A detectada por PL-1C7 sugiere la existencia de sitios específicos y preferenciales de integración y procesamiento en la EN.

Figura 16. El patrón característico de distribución de la prelamina A endógena es detectable con el anticuerpo PL-1C7 en contraste con el anticuerpo 7G11.

Figura 17. La acumulación de la prelamina A endógena ante la inhibición de la farnesilación refleja una distribución difusa en el nucleoplasma.

Figura 18. La acumulación de la prelamina A es detectada en células deficientes ZMPSTE24 así como ante la inhibición de su actividad.

Figura 19. Detección de la prelamina A humana portadora de las mutaciones asociadas a SPA.

Figura 20. El fosfoproteoma de la EN de células eritroides y musculares refleja una dinámica de fosforilación tejido-específica.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Base de datos representativa derivada del software Discovery Proteome en la que se muestran ejemplos de los fosfopéptidos identificados por el análisis de espectrometría de masas.

Tabla 2. Estudios del fosfoproteoma celular en diferentes sistemas.

Tabla 3. Proteínas representativas identificadas en el fosfoproteoma de la EN de células eritroides (G1E).

Tabla 4. Mutaciones asociadas a síndromes atípicos progeroides.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La regulación génica en el núcleo celular.

El núcleo de las células eucariontes es una estructura subcelular altamente organizada en donde se llevan a cabo diversas funciones esenciales como la replicación del ADN, la transcripción y el procesamiento del ARN, el ensamblaje ribosomal, entre muchas otras (Vicek y col., 2001). Estas actividades, así como el metabolismo del ADN, se encuentran reguladas en el nucleoplasma a múltiples niveles. En particular, la regulación de la expresión génica constituye un proceso fundamental y determinante para procesos celulares primordiales como el desarrollo, la diferenciación y la proliferación de las células eucariontes (Recillas-Targa y Escamilla del Arenal, 2004).

La regulación de la expresión génica es controlada por dos mecanismos globales a nivel transcripcional: los procesos genéticos determinados por la secuencia de ADN y los procesos epigenéticos, definidos por la estructura de la cromatina, así como, por los procesos asociados a su remodelamiento. Estos procesos son necesarios para regular de forma coordinada y óptima la transcripción de los genes.

La regulación transcripcional a nivel genético se lleva a cabo principalmente por factores transcripcionales que a su vez se unen a elementos genéticos como las secuencias promotoras (Fedrova y Zink, 2008; Nagai y col., 2011). Además, en numerosos loci se ha identificado la participación de otros elementos regulatorios que controlan de manera tiempo y tejido-específica la expresión génica, tales como, los 'enhancers' o potenciadores y las regiones controladoras del locus (LCRs por sus siglas en inglés). Existen dos modelos propuestos para explicar la función de elementos reguladores: 1) el modelo binario que

sugiere que los *enhancers* incrementan la probabilidad de que un porcentaje mayor de células en una población dada presente una transcripción activa en un determinado locus; y 2) el modelo progresivo, donde el *enhancer* incrementa la transcripción del gene blanco independientemente de la población (García y col., 2016).

La epigenética constituye un perfil único en cada tipo celular, por tanto determina su identidad a través de la regulación de la expresión genética (Sasaki y col., 2008). La regulación epigenética opera desde el nivel primario de organización del ADN hasta los arreglos supra-estructurales de los cromosomas en el espacio nuclear. En el primer nivel, el genoma eucariótico está organizado en cromatina a través del empaquetamiento del ADN en la unidad estructural conocida como nucleosoma. El nucleosoma es un octámero proteínico compuesto por cuatro dímeros de proteínas histonas (H2A, H2B, H3 y H4) y cerca de 147 pares de bases de ADN alrededor de ellas (Luger y col., 1997). Las propiedades bioquímicas intrínsecas de los componentes nucleosomales estabilizan dichas estructuras e interacciones. Por ejemplo, las cargas positivas de las histonas y las cargas negativas de los grupos fosfato en el ADN estabilizan la interacción electrostática entre estas moléculas (Van Holde y col., 1988; Woffe y col., 1999). Esta unidad estructural se une a nucleosomas contiguos a través de las histonas *link* (Marino-Ramírez y col., 2005), permitiendo la oligomerización nucleosomal hasta formar una fibra de 30 nm (Woodcock y col. 2005). A su vez, esta fibra se organiza en asas cromatínicas que se compactan subsecuentemente en niveles de estructuración mayores, comprendiendo desde la fibra de 30 nm hasta las cromátidas de los cromosomas. Entonces, estos diferentes niveles de compactación contienen la información hereditaria independiente a la secuencia de ADN (Henikoff y col., 2004; Rando y col., 2007) y en conjunto, permiten el almacenamiento eficiente del genoma y

proveen mecanismos de regulación especializados para la actividad transcripcional. Por ejemplo, el genoma humano es una molécula de longitud extensa (en una célula somática: 6×10^9 pb, longitud teórica=2 m) altamente organizado en un espacio nuclear restringido (2-10 micrones de diámetro) (Ammunziato, 2013).

En este escenario de alta compactación del ADN, toda célula requiere regular finamente la accesibilidad a la cromatina para dar lugar a los procesos de transcripción y replicación ante procesos celulares como la diferenciación y la división celular, o bien, como respuesta adaptativa ante un estrés o estímulo extracelular (Ammunziato, 2013; Telwar y col., 2014). Los mecanismos que controlan la permisividad en el contexto cromático incluyen la acción de complejos remodeladores de histonas para el posicionamiento nucleosomal, sus componentes y las modificaciones postraduccionales en los mismos (Witt col., 1996; Saha y col., 2002; Ahmad y col., 2002; Fischle y col., 2005; Goldberg y col., 2010; Hake y col., 2006; McKittrick y col., 2004; Sutcliffe y col., 2009)

Las histonas canónicas H2A, H2B, H3 y H4 que conforman el nucleosoma están altamente conservadas evolutivamente (Malik y Heinokoff, 2003), sin embargo, la existencia e incorporación regulada de variantes de dichas proteínas se ha asociado con procesos celulares específicos como su asociación con unidades cromosomales funcionales. Tal es el caso de la variante H3.3 que se encuentra en la cromatina permisiva a la transcripción (Ahmad y Henikoff, 2002; Goldberg y col., 2010; Hake y col., 2006; McKittrick y col., 2004; Sutcliffe y col., 2009). Por otro lado, la variante H3 CENPA se une preferentemente a centrómeros, que por lo regular determinan regiones silenciadas (Witt y col., 1996). Las histonas transmiten señales a través de sus modificaciones covalentes, tales como acetilación, fosforilación, metilación, poli-ADP-ribosilación, ubiquinación, y sumoilación

(Fischle y col., 2005). Estas modificaciones postraduccionales afectan las propiedades bioquímicas de las histonas y por tanto, la estructura cromática a nivel nucleosomal por sus efectos en las interacciones DNA-histonas e histona-histona; o bien, a nivel internucleosomal, afectando interacciones histona-histona internucleosomales. Asimismo, las modificaciones postraduccionales en las histonas constituyen una plataforma para la unión diferencial y regulada de factores transcripcionales y remodeladores de la cromatina. Tal es el caso de las proteínas con bromodominios (por ejemplo [p.e.], Snf2 de complejo SWI/SNF, p300/CREB-binding protein-associated factor y acetiltransferasas de histonas) que se unen a las histonas acetiladas en las lisinas; o bien las proteínas con cromodominios (p.e. CDH1), unidas preferencialmente a histonas trimetiladas en la lisina 4 de la Histona 3 (H3K4me3) (Gaspar-Maia y col., 2009; Hassan y col., 2002; Sanchez y Zhou, 2009).

En conjunto, la dinámica de las histonas y sus modificaciones covalentes controlan la permisividad a la actividad transcripcional sin alterar la secuencia de ADN (McKittrick y col., 2004, Sutcliffe y col., 2009), y por tanto, su distribución y enriquecimiento en el genoma caracteriza secuencias reguladoras específicas de acuerdo a su estatus transcripcional. Por ejemplo, las secuencias de tipo potenciador, o *enhancers*, se caracterizan por el enriquecimiento de la mono-metilación de la lisina 4 en la H3 (H3K4me1) y la acetilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3K27ac) en estado activo (Heintzman y col., 2009). Por otro lado, las secuencias promotoras se caracterizan por la di-metilación de la lisina 4 en la H3 (H3K4me2) y la tri-metilación de la lisina 4 en la H3 (H3K4me3) en la actividad transcripcional (Heintzman y col., 2007). Sin embargo, es importante destacar que existen otros mecanismos implicados en la regulación de la actividad de estas secuencias reguladoras ya que su funcionalidad no está definida exclusivamente por la modificaciones

en las histonas (García y col., 2016).

Evidencias tanto bioquímicas como citológicas sustentan el hecho de que los genes activos se encuentran organizados en regiones de cromatina abierta de manera tejida y tiempo específica, lo que se conoce como dominios transcripcionalmente activos (Recillas-Targa y Razin, 2001). Estos dominios contienen los elementos regulatorios en *cis* necesarios para la expresión de los genes que se encuentran en esa región, los cuales son regulados de manera autónoma (Berger y Fensfeld, 2001). A su vez, los dominios están enmarcados por elementos frontera conocidos como *insulators*, cuya función principal es delimitar el rango de acción de las señales de secuencias regulatorias y la organización topológica del genoma al interior del núcleo (Brushey y col.,2008). La actividad de los *insulators* está definida por la unión de factores nucleares, como es el caso del factor CCCTC (CTCF) en vertebrados (Recillas-Targa y Escamilla del Arenal, 2004). CTCF es una proteína involucrada en diversos procesos celulares incluyendo la impronta genética, la capacidad como bloqueador de enhancer y de barrera contra los efectos de posición en ciertos *insulators* (Phillips y Corces, 2009), interacciones inter-dominios y el anclaje de secuencias específicas a la periferia nuclear (Guelen y col., 2008; Melcer y col., 2010; Phillis-Creminis, 2013).

Los dominios génicos se encuentran inmersos en distintos tipos de cromatina, clasificada de acuerdo al grado de compactación y actividad transcripcional: eucromatina y heterocromatina.

La eucromatina se caracteriza por ser transcripcionalmente activa y está enriquecida principalmente en acetilación de histonas, H3K4me3 así como por la unión de complejos remodeladores de la cromatina como CHD1 (Heintzman y col., 2007; Gaspar Maia y col.,

2009) y la propia maquinaria de transcripción como el factor TFIID (Van Ingen y col., 2008). Las secuencias codificantes embebidas en estas regiones corresponden a genes de expresión ubicua conocidos como *housekeeping genes* en su mayoría, cuya expresión constitutiva es indispensable en todo el ciclo celular. En contraste, la heterocromatina está caracterizada por regiones genómicas condensadas transcripcionalmente silenciadas, usualmente marcadas por las modificaciones de histona H3K9me3 y H3K27me3 (Barski y col., 2007). A su vez, existen dos tipos de heterocromatina: la constitutiva y facultativa. La heterocromatina constitutiva presenta un estado de compactación estable a lo largo del ciclo celular y procesos como el desarrollo, y se caracteriza por la modificación de histonas H3K4me3 y la presencia de proteínas específicas como la proteína de heterocromatina 1 (HP1). Tal es el caso de determinadas unidades funcionales del cromosoma como los telómeros y centrómeros. En contraste, la heterocromatina facultativa se caracteriza por una permisividad a la transcripción altamente regulada en ciertas etapas del desarrollo u otros procesos y esta marcado por trimetilación de la lisina 27 en histona H3 (H3K27me3), desacetilación de histonas y complejos proteicos represivos como el complejo Polycomb. Tal es el caso de la inactivación del cromosoma X en mamíferos (Grendel y Heard, 2014). Evidencias recientes indican que el límite entre heterocromatina facultativa y constitutiva no es estático sino permisivo y dinámico (Boros y col., 2014). Apoyando esta idea, la transcripción de RNAs no codificantes se ha detectado en regiones de heterocromatina (Grendel y Heard, 2014; Cussanelli y Chartrand, 2014), lo cual se ha visto implicado en el mantenimiento de la estructuración represiva de la cromatina, como es el caso de regiones pericentroméricas (Leujene y Alshire, 2011).

Existe una variedad amplia de mecanismos que participan de forma cooperativa en la

regulación epigenética como son: los ARNs no-codificantes, la metilación del ADN, los complejos represores Polycomb y activadores Trithorax, el enriquecimiento de los nucleótidos citosina y guanina (CG) y la organización de los cromosomas (Sasaki y col., 2008; Zhang, y col. 2015). En este escenario, las implicaciones funcionales de los diferentes epigenomas depende del acoplamiento entre el arreglo super-estructural de la cromatina y la organización de ésta dentro del núcleo (Cremer y Cremer, 2010).

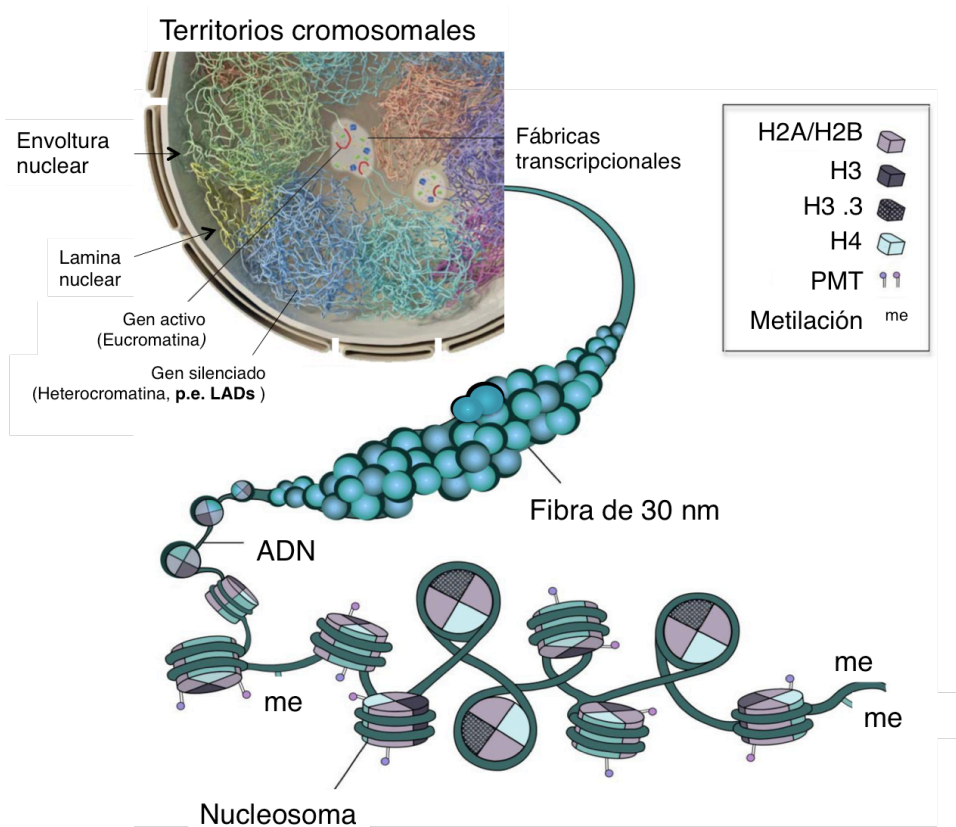


Figura 1. La compactación del ADN y la compartimentalización dentro del núcleo. (Imagen modificada de Rosa y col., 2013 y Dekker y col., 2015)

I.2. Compartimentalización funcional del genoma: la periferia nuclear.

El análisis de la organización tridimensional del genoma dentro del núcleo ha sido posible desde hace varias décadas debido al desarrollo de herramientas de alta resolución, incluyendo el acoplamiento de diversas técnicas de microscopía con las técnicas de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) y sus derivados (p.e. FISH 3D), experimentos de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP), espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS), detección de cromatina marcada con reporteros fluorescentes en tiempo real, la tinción de cromosomas, entre otras (Cremer y col., 2001; Gasser, 2002, Spector, 2003). Asimismo, la evaluación de interacciones cromosomales a diferentes niveles mediante las técnicas de captura de conformación de cromosomas y sus derivados (Chromosome Conformation Capture, 4C, 5C, HiC) han reflejado indicios importantes en la topología global del genoma y la compartimentalización del núcleo (Gasser, 2002; Spector, 2003; Lieberman-Aiden y col., 2009; Cremer y Cremer, 2010, Wu y col, 2013; MacDonald y col. 2016). En paralelo, el uso de secuencias reguladoras de origen bacteriano como es el caso de sistemas operón/represor, así como secuencias de tipo transposonal, proteínas de fusión, sistemas de expresión inducible, sistemas de reclutamiento de la cromatina a compartimentos específicos en el núcleo, así como la eliminación de componentes específicos por ARN de interferencia o recombinación homóloga han permitido el estudio de diversas unidades genómicas a nivel regulatorio. En conjunto, estos enfoques experimentales han permitido el seguimiento espacio-temporal de loci específicos y cromosomas completos dentro del núcleo, y la elucidación de las características básicas en la arquitectura nuclear (Cremer y Cremer, 2010).

Las evidencias que existen en la arquitectura nuclear pueden agruparse en a dos niveles: el nivel genómico o cromosomal y el nivel intra-cromosomal (Gay y col., 2014). A nivel genómico, el ADN se encuentra organizado en territorios cromosomales, los cuales son dominios tridimensionales preestablecidos y discretos que ocupan cada cromosoma (no al azar). En términos evolutivos, estos dominios están conservados dentro del núcleo en interface (Tanabe y col., 2002; Cremer y Cremer, 2001), reflejando una distribución radial de los cromosomas dentro del espacio nuclear de acuerdo a su tamaño (Dekker y col., 2002). En general, los cromosomas de menor tamaño están ubicados en el centro del núcleo. En contraste, los cromosomas mas grandes se distribuyen hacia la periferia. (Tanabe, y col. 2002; Lieberman-Aiden y col., 2009; Dekker y col., 2002). Asimismo, la distribución del genoma en el núcleo se ha correlacionado con la densidad génica, la cual coincide con el arreglo radial no azaroso de los territorios cromosomales (Croft y col., 1999; Murmman, y col., 2001; Neusser, y col., 2007; Cremer y Cremer, 2010). Por ejemplo, el cromosoma 19 de humano (HSA19), cuya densidad génica es alta de acuerdo al tamaño del radio de marcadores genéticos observados (85 Mb, radio=3.7 %) , se ha localizado en el centro en linfocitos, células de epiteliales de colon, progenitores hematopoyéticos y en queratinocitos (Croft y col., 1999; Cremer y col., 2003). Por el contrario, el cromosoma 18, cuya densidad génica es baja (67 Mb, radio=1.7 %) se encuentra asociado en la periferia nuclear (Croft, y col. 1999; Cremer, y col. 2003). Además la densidad génica y el tamaño de los cromosomas, existen otros factores que afectan la distribución cromosomal por ejemplo el enriquecimiento de secuencias de repetidas, la actividad transcripcional, el contenido en GC y el tiempo de replicación (Dimitrova y Gilberlg, 1999; Croft y col., 1999; Grasser y col., 2008; Mayer y col.

2000; Federico y col. 2006; Goetze y col. 2007; Hepperger y col. 2008; Mekhail y Moazed, 2010; Shevelyov y col., 2012, Ragoczy y col., 2014; Zhang y col., 2015).

Los territorios cromosomales son relativamente estables, sin embargo, presentan una dinámica constante que se traduce en diferencias en los procesos celulares como la diferenciación (Cremmer y Cremmer, 2010). Asimismo, los movimientos de la cromatina desde la periferia hacia el centro, la localización y reposicionamiento de dominios génicos y la alta dinámica de la cromatina en interface es causa o consecuencia de la actividad transcripcional, confirman que la remodelación de la cromatina regulada en espacio-temporal es un proceso constante, y requiere la fina organización y compartimentalización del núcleo en territorios cromosómicos (Gasser, 2002; Spector, 2003; Dechat; 2008; Takizawa y col, 2008; Cremmer y Cremmer, 2010; Wu y col., 2013; Zullo y col., 2012).

A nivel intracromosomal, existen diferencias en la dinámica espacio-temporal y en la motilidad de unidades estructurales durante diferentes etapas del ciclo celular. En general, la eucromatina tiende a distribuirse en el centro del núcleo, lo cual tiene un impacto funcional en su permisividad a la transcripción. En contraste, la heterocromatina se ha asociado con la periferia nuclear en general, como es el caso de centrómeros y telómeros. Por ejemplo, los centrómeros en levadura *Saccharomyces cereviceae*, se asocian con el cuerpo del huso polar (por sus siglas en ingles, Spindle Pole body, SPB) la mayor parte del ciclo celular, el cual se aloja en la periferia nuclear (Kitamura y col. 2007). En el caso de células de mamíferos, el arreglo cromosomal es mas complejo y dinámico; sin embargo, los centrómeros presentan la tendencia de agregarse en proximidad a la periferia nuclear, o bien, al nucléolo (Alcobia y col., 2000). Los telómeros también están asociados con la periferia nuclear en levadura, mientras que en metazoarios este escenario sufre cambios

constantes y dinámicos a lo largo del ciclo celular. Sin embargo, en eventos meióticos y post-mitóticos por ejemplo, los telómeros se asocian a la periferia nuclear (Shibuya y col., 2014; Crabbe y col., 2012). Asimismo, las evidencias indican que la asociación de la heterocromatina a la periferia nuclear conlleva al silenciamiento de genes, lo cual apoya la idea de la periferia nuclear como un compartimento altamente represivo mientras que el interior es un compartimento para la actividad transcripcional. (Gasser, 2002; Shevelyov y col., 2012, Schneider y Grosschedl, 2007). Estos mecanismos no son universales, como lo confirman las evidencias de genes dirigidos hacia la periferia, los cuales no son silenciados en todos los casos, o bien la presencia de marcas de cromatina activa transcripcionalmente asociadas con la EN (Kumaran y Spector, 2008; Wu y col., 2013, Gay y col., 2014).

Así como los territorios cromosomales son dinámicos, a nivel intracromosomal, los genes en el mismo cromosoma pueden presentar diferente distribución de acuerdo al tipo celular (Hepperger y col. 2008;). En este contexto local, la estructura cromatínica de los dominios y la configuración espacial de regiones del genoma al interior del núcleo tiene un impacto importante en el control transcripcional (Fraser y col., 2007; Lanctot y col., 2007; Geyer y col. 2011). Por ejemplo, los insulators asociados a CTCF están implicados en la configuración tridimensional de los dominios génicos a través de su capacidad para interactuar con componentes nucleares. Tal es el caso de la interacción entre el insulator 5'HS4 del dominio β -globina y la proteína nucleolar nucleofosmina B23 (Yusufzai y col., 2004). Estudios recientes de la topología global del genoma indican que CTCF se encarga de delimitar y mediar las interacciones intercromosomales formando los dominios topológicos de auto-asociación (TADs por sus siglas en inglés) (Dixon y col., 2012). Los TADs son estables entre diferentes tipos celulares y altamente conservados en especies de

alrededor de 1 Mb, los cuales dividen el genoma en subcompartimentos regulatorios (Dixon y col., 2012). A su vez, se han definido subregiones dentro de los TADs conocidos como SubTADs, las cuales constituyen un nicho único de regulación más dinámicos (Phillips y Creminis y col., 2013; Pope y col., 2014).

La localización de la cromatina en la periferia nuclear tiene un impacto funcional en su permisividad a la transcripción y es un proceso dinámico y altamente regulado en respuesta al desarrollo (Misteli y col., 2005; Finlan y col., 2008; Peric-Hupkes y col., 2010; Zullo y col., 2012; Wu y col., 2013). Por ejemplo, en el caso de los genes co-regulados Igh e Igk, que codifican para la cadena ligera y pesada de las inmunoglobulinas, ambos se encuentran anclados a la lámina nuclear en células progenitoras y se relocalizan al interior del núcleo cuando tiene lugar su activación en linfocitos B. Otras evidencias que sustentan lo anterior es el reposicionamiento del locus de los genes β -globina durante la maduración eritroide (Ragoczy y col. 2006).

Las interacciones ADN-proteína que estabilizan la asociación de secuencias dominios cromosómicos a la periferia nuclear han sido posibles gracias al desarrollo de técnicas como la Identificación de sitios metilados por adenin-metiltransferasa (DAM-ID por sus siglas en inglés), la cual permite seguir el ADN en tiempo real mediante el uso de la enzima procarionte adenin-metiltransferasa fusionada con proteínas de la periferia como la Lamina B1 (van Steensel B, 2000; Vogel y col., 2007; Guelen y col. 2008; Maraldi y col., 2011; Van Bortle y Corces, 2012). Esta técnica ha permitido la definición de dominios asociados a la lamina (Lamin associated domains, LADs) (Guelen y col. 2008; Melcer y col., 2010; Zullo y col., 2012; Ragoczy y col., 2014; Wu y col., 2013). Los LADs son dominios cromatínicos de baja densidad génica en estado represivo, caracterizados por la metilación de lisinas

específicas en la histona H3, demarcados por el factor CTCF (Guelen y col. 2008; Melcer y col., 2010; Zullo y col., 2012). Los LADs representan casi el 60% del genoma y participan en el mantenimiento de los territorios cromosomales (Mauleman y col., 2013; Camps y col., 2014). Los LADs tienen un papel importante en la localización en compartimentos represivos, correlacionándose también con regiones de replicación tardía (Ragoczy y col., 2014). Algunos LADs se han reportado como altamente dinámicos en respuesta a procesos del desarrollo, de manera que su reposicionamiento dentro del núcleo tiene influencia en la actividad transcripcional de los genes contenidos en ellos como el caso de los loci *Ikzf1* y *Bcl11a* (Peric-Hupkes y col., 2010; Wu y col., 2013). Además de la proteína Lamina B1, otras proteínas en la periferia nuclear son importantes para el anclaje de secuencias de ADN y la regulación de la actividad transcripcional como es el caso de las proteínas emerina y Lamina A/C (González-Aguilera et al., 2014; Harr col., 2015). Entonces, el marco estructural que permite esta asociación entre la cromatina y el núcleo se conforma por los componentes de la envoltura nuclear.

1.3. La envoltura nuclear

La envoltura nuclear (EN) es un sistema doble membrana que circunda el nucleoplasma, conteniendo al genoma, la maquinaria transcripcional así como los factores reguladores y adscritos al metabolismo del ADN y ARN. Esta estructura provee el soporte físico y el andamiaje para el núcleo y su contenido, y además tiene un papel fundamental en la regulación de procesos celulares que van desde el tráfico de moléculas citoplasma-núcleo y viceversa hasta la organización del genoma y la regulación de la actividad transcripcional (Hetzer, y col., 2005; Rowat y col., 2006; Guelen y col. 2008; Melcer y col., 2010; Wilson y

Foisnier, 2010; Schneider et. al., 2010; Solovei y col. 2013; Dupont, 2011; Ho y col., 2013; Plessner y col. 2015; Discroll y col. 2015; Shimi y col., 2015; Kelkar y col 2016). Esta bicapa esta formada por la membrana nuclear externa (MNE) e interna (MNI) (Callan y et al., 1950). La MNE es continua con el retículo endoplásmico (RE) y está separada de la MNI por un espacio inter-luminal de 30-50 nm (Hetzer y col., 2005; Kaminski y col., 2014). Ambas membranas se comunican desde el citoplasma hasta el nucleoplasma por complejos proteicos especializados como el complejo del poro nuclear (CPN) y el complejo de unión nucleoesqueleto-citoplasma (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton, LINC) (Hetzer, 2005; Crisp y col 2006; Pandmakumar y col., 2005; Hetzer, 2010)

La EN constituye la interface física citoplasma-núcleo y es una barrera indispensable para: 1) la separación de las propiedades tanto físicas como bioquímicas entre ambos compartimentos celulares como los son rigidez, la elasticidad y el pH; 2) el control de la difusión pasiva de moléculas pequeñas de un compartimento a otro como los iones y moléculas pequeñas (<20 KDa); 3) la translocación regulada de proteínas citoplasma-núcleo como es el caso del factor BRCA por la proteína de EN Nesprina-2; 4) el transporte selectivo de otras moléculas como es el caso de los ribosomas, el ARN y las proteínas asociadas a éste ya sea por canales especializados como el CPN o bien, por rutas de transporte alternativo a través de la fusión de membranas, como es el caso del transporte de ribonucleoproteínas en la sinapsis neuro-muscular en *D. melanogaster* y 4) para evitar el contacto atemporal con los centrosomas (centro organizador de microtúbulos) para el huso mitótico en la segregación de cromosomas (Beck et al. 2004; Beck et al. 2007; Terry et al. 2007; Grunwald, 2011; Wilson y Foissner, 2010; Martins y col., 2012; Speese y col 2012; Hatch y col., 2012; Arnone y col. 2013; Kelkar, 2016). Además, la EN constituye la conexión

física citoplasma-núcleo y juega un papel esencial en las rutas de mecanotransducción (Lombardi, 2011; Dupont y col., 2011; Khatau y col., 2012; Uzer y col. 2015; Telwar y col., 2014; Makhija y col., 2015; Discroll y col. 2015). Por ejemplo, estímulos mecánicos de baja frecuencia en células troncales mesenquimales (MSC) derivadas de la medula ósea desencadenan la reorganización del citoesqueleto e influyen en interacciones entre actina y proteínas transmembranales de la EN, que finalmente se reflejan en cambios transcripcionales (Kim y col. 2012; Chambliss y col., 2013; Uzer y col., 2015;), también, regulan la translocación citoplasma-núcleo de complejos mecanosensores como el co-activador MTRF y el complejo YAP/TAZ en diferentes tipos celulares, incluyendo fibroblastos, células endoteliales y MSC (Dupont, 2011; Ho y col. 2013; Plessner, 2015; Discroll y col., 2015). Asimismo, se ha demostrado que estos mecanismos tienen impacto en la especificación de linaje y propiedades físicas del núcleo, que se correlaciona con la diferenciación e implican componentes específicos de la EN como la proteína Lamina A/C y el complejo LINC (Judex y col. 2005; Rubin, 2007; Rowat y col. 2006; Makhija y col. 2015; Uzer y col. 2015) Por otro lado, hacia el nucleoplasma la EN se asocia con la cromatina, anclando desde unidades funcionales en el cromosoma, como es el caso de los telómeros y los dominios de ADN silenciados transcripcionalmente o de baja densidad génica, como los LADs, los cuales se han visto regulados diferencialmente a lo largo del desarrollo (Grasser y col., 2008; Spector y col., 2008; Guelen y col. 2008; Melcer y col., 2010; Peric-Hupkes y col., 2010, Taddei y col. 2004; Chan y col. 2011; Shibuya, 2014; Harr col. 2015).

El desarrollo de un sistema especializado como la EN es un parteaguas en la evolución de las células eucariontes, resultando en límites físicos entre el citoplasma, el lumen del RE que es continuo con la MNI y el nucleoplasma; y por lo tanto, la composición

especializada en proteínas y lípidos es necesaria para los diferentes microambientes (Hetzer y Wender, 2009).

La composición lipídica de la EN

La existencia de lípidos en el núcleo se ha detectado desde hace cuatro décadas, y su estudio ha demostrado que éstos proveen propiedades estructurales fundamentales para los orgánulos celulares con sistemas endomembranales, como la fluidez y el control de la curvatura de las membranas. Además, los lípidos nucleares regulan los mecanismos de fusión de membranas y están implicados en la regulación de procesos fundamentales como la replicación, la transcripción y la estructura de la cromatina, difiriendo funcionalmente de sus homólogos en el citoplasma (Irvine y col. 2003)

Los lípidos más abundantes en el núcleo son los esfingolípidos, en particular, la esfingomielina y los gangliósidos. Por ejemplo, el esfingolípido SH1, producto del catabolismo de la esfingomielina, regula la transcripción de determinados genes por su asociación con desacetilasas de histonas (HDAC1 y HDAC2) inhibiendo su actividad, lo cual está asociado a la regulación de procesos de diferenciación y proliferación celular (Irvine y col. 2003). Asimismo el diacilglicerol (DAG) se ha visto implicado en la regulación de diversos procesos nucleares.

El DAG se produce por la defosforilación del precursor ácido fosfático (AP), y al ser acilado genera el triacilglicerol (TCG), una molécula esencial para el almacenamiento de energía y ácidos grasos en los cuerpos lipídicos (Siniosoglou, 2009). El DAG participa en la síntesis de los fosfolípidos más abundantes: Fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE) (Gibellini y col. 2010). Asimismo, el DAG regula la translocación de la cinasa PKC en

respuesta al factor de crecimiento de insulina (Insulin growth factor-1, IFG-1) (Divecha y col. 1991) lo que a su vez regula la expresión de genes que controlan de la proliferación celular (Lucki y col. 2012). El segundo mensajero Fosfatidil-Inositol fosfato (PtdIns), intermediario del DAG, actúa en la remodelación de la cromatina y mecanismos de exportación del ARN (Irvine y col. 2003)

En general, los lípidos nucleares se pueden encontrar en dos compartimentos: el dominio intranuclear (cromatina y nucleoplasma) y la EN, lo cual puede ser regulado en diferentes estadios fisiológicos de la célula (Irvi y col. 2003; Lucki col. 2012). Por ejemplo, el enriquecimiento de la esfingomielina así como su distribución en los subdominios nucleares dependen del ciclo celular y el estado de condensación de la cromatina. En paralelo, las enzimas encargadas del metabolismo de la esfingomielina (esfingomielinasa y esfingomielina-sintetasa) regulan su dinámica de localización tanto en la cromatina como en la EN (Lucki y col. 2012). Asimismo, la presencia en el núcleo del DAG así como su intermediario PtdIns varía de acuerdo al ciclo celular (Irvine y col. 2003).

La mayoría de los lípidos en el núcleo se localizan en la EN, donde además de sus funciones estructurales son indispensables para los eventos de fusión en los procesos de transporte nucleoplasma-citoplasma el ensamblaje y desensamblaje de la EN durante la división celular así como, en la regulación de múltiples cascadas de transducción de señales (Domart y col. 2012; Mall y col. 2012, Bahmanyar y col. 2014; Wolinski y col. 2015; Bahmanyar y col. 2015; Barbosa y col. 2015). Tanto la MNI como la MNE están enriquecidas en glicoesfingolípidos, en particular de los gangliósidos GM1 y GD1a (Lucki y col. 2012). GM1 es un regulador del transporte de Ca^{2+} del nucleoplasma al espacio interluminal de la EN, mediante su asociación con intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Leeden y col. 2006), y sus

niveles en la EN están regulados por las enzimas neuraminidase (sialidase) y GM2/GDM. (Lucki y col. 2012). Otras enzimas esenciales para la síntesis de fosfolípidos se han detectado en la EN, como es el caso de la etanolaminafosfotransferasa (ETP), responsable de la catálisis final del FE. (Gibellini y Smith; 2012). Por otro lado, la presencia de colesterol caracteriza a la MNE, así como las propiedades lipídicas similares a las de RE debido a su continuidad. En contraste, la MNI está enriquecida por el fosfolípido fosfatidilserina (Gay y col. 2014), el cual colocaliza con cromatina periférica en núcleo en interface y cromosomas en mitosis (Prudovsky y col. 2012). Esta co-localización es consistente con las interacciones reportadas entre la proteínas histona H2B y el fosfolípido fosfatidilserina en macrófagos (Das y col. 2012). Se ha sugerido que las interacciones fosfatidilserina-cromatina juega un papel importante para el restablecimiento de la envoltura nuclear post-mitosis (Prudovsky, 2012).

Trabajos recientes han demostrado que la regulación del metabolismo del AP está implicado en el ensamblaje y la biogénesis de la EN (Bahmanyar y col. 2014; Domart, et al. 2012; Siniossoglou, 2009; Wolinski, 2015; Bahmanyar, 2015). En vías de la generación del DAG, el AP es desfosforilado por las lipinas (lipina-1, -2, and 3 en mamíferos y PHA1 en levaduras), una reacción fundamental en la biosíntesis de lípidos. La eliminación de los genes de lipinas y sus reguladores (PHA1, Nem1 y SPo7) causa defectos en la morfología del núcleo en levaduras y en algunos casos, afecta la distribución de los cromosomas, así como, la proximidad con el nucléolo (Siniossoglou, 2009). Las mutantes PHA1, Nem1 y SPo7 exhiben una expansión anormal de la membrana nuclear debido a un desbalance en el contenido de glicerolípidos y gliceroesfingolípidos como la FC y FE. Aunado a este desbalance, los defectos de membrana nuclear en las mutantes se deben a una sobrerregulación anormal en la síntesis de otros componentes implicados de la biogénesis de

fosfolípidos, ya que los niveles de AP regulan la transcripción de dichos genes. Adicionalmente, las mutantes en PHA causan cambios de composición de la EN, por lo tanto la estructura de la EN así como su interacción con otras proteínas reguladoras se ve afectada, aunque el mecanismo específico permanece sin elucidarse (Siniosoglou, 2009; Barbosa y col. 2015),

Las lipinas (PHA1) se asocian a dominios específicos de la EN que están en contacto con los cuerpos lipídicos, regulando la síntesis del TAG a partir del DAG. Es por esto que defectos en el almacenaje de TAG redirigen la catálisis a partir del DAG hacia la síntesis fosfolípidos FC y PE, lo que a su vez desencadena defectos en la membrana nuclear (Barbosa y col. 2015). Estas evidencias sugieren que la activación de PHA1 en la EN está implicada en el almacenamiento de lípidos además de la biogénesis de la EN (Barbosa y col. 2015). Otra proteína crucial para el metabolismo del DAG y la vía de biosíntesis de ácidos grasos es la acetil-CoA carboxilasa (MTR7/ACC1) y consistentemente, sus mutaciones resultan en la separación de MNE y MNI (Schneiter y col. 1996).

La continuidad de la MNI con el RE sugiere que cambios estructurales en el mismo, afectan las características de la EN. Consistente con esta hipótesis, la dinámica de la EN depende en la restructuración de dominios de la ER mediado por proteínas (reticulones) y células deficientes en lipinas presentan defectos en su reformación tanto en *C. elegans* como en levaduras (Siniosoglou, 2009). Apoyando estos resultados, el bloqueo de la producción de DAG en células de mamífero también desregula la reformación de la EN y la reorganización del RE después de la mitosis, lo que genera EN incompleta que conlleva a muerte celular (Domart y col. 2012). Asimismo, la proteína CTD Nuclear Envelope Protein 1 (CNEP-1), un activador de la lipinas en la EN, regula el flujo de fosfolípidos entre la EN y el

RE en un gradiente de composición en los diferentes subdominios del RE (Bahmanyarr ,2015). Este control se basa en la limitación de la incorporación de PtdIns en la EN, por tanto la deficiencia de CNEP-1 causa defectos en el desmantelamiento de la EN (NEBD) (Bahmanyarr , 2015). Adicionalmente, la inhibición o disminución por RNAi de las lipinas afecta la formación de DAG, desregula la translocación al núcleo y actividad de la enzima PKC sobre sus proteínas blanco nucleares como la lamina B1, retrasando el desensamblaje de la lámina nuclear en células de mamífero, estructura que subyace la EN y cuyo desmantelamiento es necesario para la mitosis abierta (Mall y col. 2012).

La composición proteica de la EN

La envoltura nuclear esta enriquecida por proteínas transmembranales que pueden ser divididas de acuerdo a la membrana en donde se localizan (Hetzer y col., 2005). La MNE se caracteriza principalmente por tener proteínas con dominios Klarsicht, ANC-1 y Syne (KASH), incluyendo a las proteínas Nesprina-1, -2q, -2b, -3 y 2G (Apel et al. 2000; YI, 2002; Crisp y col. 2005; Wilson y Foisnier, 2010; Hetzer y col. 2010). En contraste, la MNI está enriquecida en proteínas que contienen dominios LEM-3 (LEM) como lo son la emerina, Man-1 y las proteínas del tipo LRR-PDZ (LAP2 α y LAP2 β); proteínas de unión a filamentos intermedios como el receptor de unión a laminas (Lamin-Binding receptor, LBR); y proteínas con dominios de tipo Sad1p y UNC-84 (SUN) como lo son: Sun1 y Sun2 (Dechat y col. 2000; Lin, y col. 2000; Schirmer y Gerace, 2005, Hetzer, 2010; Polychronidou y col. 2011). Asimismo, mas de 60 proteínas conocidas como proteínas transmembranales de la EN (NET) han sido identificadas en la MNI en los últimos años (Schirmer y col. 2003; Korfali y col. 2010). Sin embargo, la función de la mayoría de estas proteínas se desconoce, así

como su localización específica, ya que la presencia exclusiva en la EN no es una generalidad. Por ejemplo, aunado a la localización en la EN, la presencia de la proteína de MNI emerina se ha detectado en el citoplasma y en la membrana plasmática (Manta y col. 2004; Wheeler y col. 2010)

Las proteínas de la MNE están implicadas en el posicionamiento nuclear, el cual es esencial para la migración y polarización celular (Fridkin y col. 2009; Hetzer y col. 2010). Hacia el lado citoplásmico, las proteínas de la MNE, interaccionan con componentes del citoesqueleto como es el caso de la interacción de las nesprinas con las fibras de actina y microtúbulos por proteínas adaptadoras como plectina (Wilhelmsen y col. 2005), interacciones que se estabilizan por la unión de las proteínas kinesina y dineína (Lombardi y col. 2011, Kaminski y col. 2014).

Hacia el nucleoplasma, experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que proteínas de la MNI se asocian directamente con la actina nuclear, como es el caso de la emerina (Lattanzi y col. 2003) Los experimentos *in vitro* sugieren que la asociación con emerina contribuye positivamente a la polimerización de actina, organizando una red de actina en el núcleo (Holaska y col. 2004). Las proteínas de la MNI interactúan con factores transcripcionales como es el caso de la emerina que interactúa con los factores: (BCL-associated transcription factor 1, BCLAF1), Lmo7, β -catenina y GCL (Berk y col, 2013). El factor GCL también se une a Man-1, otra proteína de la MNI, y a su vez al factor transcripcional E2F. Este complejo E2F-Man1-GCL que participa en la activación de genes requeridos para la entrada a la interface celular (Lin y col. 2005; Berk y col. 2013). En contraste, la interacción de GCL y la proteína Lap2 β , juega un papel represor. Lap2 α se ha visto asociado al factor transcripcional Rb (Dorner y col. 2007). Asimismo, la proteína Man-1

se ha reportado unida a las Smads -1, -5 y -8, cuya actividad en la transcripción de sus genes blancos es presuntamente inhibida por dicha interacción (Gruenbaum y col. 2005; Masharamani y col. 2005).

Las proteínas de la EN interactúan con factores de la cromatina, demostrando su papel activo en los mecanismos de regulación epigenética. Las proteínas del tipo LEM (Lap2a, Emerin y Man1) por ejemplo, interaccionan con el factor de barrera de autointegración (Barrier-to-Autointegration Factor, BAF), una proteína fundamental para la viabilidad celular (Zheng y col. 2000; Lin y col. 2005; Dorner y col. 2007), ya que es un factor fundamental para la segregación de cromosomas, la progresión del ciclo celular y el ensamblaje post-mitótico de la EN (Beck y col. 2012). Adicionalmente, Man-1 y LBR interaccionan con el factor epigenético de heterocromatina HP1 (Pyrpasopoulou y col. 1996; Collas y col. 1996). Emerina por su parte, se asocia al componente del complejo represor (NCoR) HDAC3, aumentando su actividad de silenciamiento y sugiriendo un papel en la regulación de los genes (Demmerle y col. 2012). Las proteínas de la EN interaccionan entre ellas como es el caso de la unión detectada in vitro entre Man-1 y emerina (Masharamani y col. 2005). La interacción man1-emerina podría regular tanto positiva como negativamente las funciones de dichas proteínas. Por ejemplo, emerina podría estar regulando negativamente la interacción de Man-1 con otras proteínas de unión e influir en el papel antagonista de Man-1 desde la transducción de señales desencadenada por el factor BMP-4 en la membrana plasmática, hasta sus efectos en el núcleo, inhibiendo la interacción Man-1-Smads (Gruenbaum y col. 2005; Masharamani y col. 2005). Asimismo, la proteína emerina interacciona con las proteínas nesprina-1 y sun-1 (Mislow y col. 2002). La diversidad de los complejos de proteína en la EN sugiere una amplia gama de funciones regulatorias de los

mismos sobre sus efectores corriente abajo. Esto último, puede influenciar en la organización del genoma y regular procesos celulares de manera tejido-específica así como estadio-de diferenciación específica.

En conjunto, la creciente evidencia del amplio papel de las proteínas de EN y la gran diversidad de sus parejas de unión, sobresalta el hecho de que numerosas mutaciones en los genes que codifican estos componentes causan una amplia variedad de enfermedades humanas conocidas como laminopatías (Maraldi y col. 2011; Davison y Lammerding, 2014; Dittimer y col. 2011; Azibani y col. 2014).

Puentes moleculares en la EN: el complejo del poro nuclear y el complejo de unión citoesqueleto-núcleo.

Las membranas de la EN se encuentran intercomunicadas por dos complejos proteicos que conforman el puente físico entre el espacio citoplasmático y el nucleoplasma: el Complejo del Poro Nuclear (Nuclear Pore Complex, NPC; por sus siglas en inglés) y el Complejo de Unión Nucleo-Citoesqueleto (LINC, por sus siglas en inglés), (Beck y col. 2004; Crisp y col. 2005; Pandakumar y col. 2006; Beck y col. 2007; Terry y col. 2007; Alber y col. 2007; Wilson y Foisnier, 2010; Raices y D'Angelo, 2012; Meinke y col. 2015).

El NPC es una estructura de alto peso molecular (60-120 MDa) que atraviesa la EN y conforma el canal de transporte para moléculas de 40-60 KDa, en particular, proteínas asociadas a RNA mensajero (ARNm) (Danesholt, 2001; Beck y col. 2004; Beck y col. 2007; Terry y col. 2007; Raices and D'Angelo, 2012). EL NPC está conservado desde levaduras hasta humanos a nivel estructural; sin embargo, el número, densidad y el tamaño del mismo varía inter-especie y entre tipos celulares (Hetzer y Wente, 2009; Raices y D'Angelo, 2012).

Por ejemplo, alrededor de 15 CPN/mm² se han reportado en células de *S. cereviceae*, mientras que en células humanas transformadas (HeLa) hay cerca de 11 CPN/mm², los cuales presentan un tamaño de 60 y 120 MDa, respectivamente (Hetzer y Wente, 2009). Asimismo, tanto la densidad como la distribución del CPN en la membrana nuclear es diferencial durante el desarrollo y estadios del ciclo celular, aunque la relevancia funcional de estas observaciones se desconoce (Hetzer y Wente, 2009).

El NPC está conformado por alrededor de 30 proteínas conocidas como nucleoporinas (NUPs). Cerca de 400 unidades proteicas, incluyendo NUPs y proteínas del poro de membrana asociadas (Poms) se arreglan en una simetría ortogonal (Alber y col. 2007) dando lugar a los tres dominios del CPN: 1) el anillo luminal central formado por proteínas como Nup45, Nup54, Nup58 y Nup62 ; 2) el anillo periférico en comunicación con el citoplasma en la MNE, de donde se proyectan filamentos proteicos citoplasmáticos, conformado por Nup88; y 3) el anillo periférico en la MNI hacia el nucleoplasma, estructura de la cual se proyectan ocho filamentos que se asocian a un anillo distal proteico para conformar la estructura de “canasta” nuclear y cuyos componentes incluyen Pom121, Nup98, Nup153 y TPR (Alber y col. 2007; Flemming y col. 2009; Makio y col. 2009; Onischenko y col. 2009; Raices y D’Angelo, 2012). El andamiaje básico del CPN se constituye por el complejo Nup107-160, el cual está inmerso establemente en el CPN en la interface celular (>10 h de residencia). En contraste, las NUPS en los anillos periféricos son altamente dinámicos, como es el caso de Nup153 (min o seg de residencia) (Walther y col. 2003; Rabut y col. 2004; D’Angelo y col. 2009). De hacer notar, la composición del CPN se ha reportado diferencial en distintos estadios de diferenciación, como es el caso de mioblastos vs. miotúbulos, así como en la diferenciación de cardiomiocitos. Estas diferencias

se deben a regulación diferencial de la transcripción de genes de las nucleoporinas como Nup210, que resulta en cambios en la estructura del NPC y además pueden tener un efecto en la regulación del genoma por lo que se ha sugerido un modelo de códigos de NPC (Raices y D'Angelo, 2012).

A nivel molecular, las NUPs se componen de un dominio transmembranal, α -hélices, laminas β -plegadas, dominios WD y secuencias ricas en fenilalanina –glicina (FG). Estas regiones FG se encuentran en el interior del canal formado por el NPC y su naturaleza hidrofóbica provee el medio propicio para la interacción de moléculas cargo y transportadores para el paso citoplasma-nucleoplasma y determina la permeabilidad del CPN (Alber y col. 2007; Terry y col. 2007; Raices y D'Angelo, 2012). La permeabilidad selectiva del CPN se da por transporte activo, el cual es mediado por los transportadores nucleares: importinas (nucleoplasma \rightarrow citoplasma) y exportinas (citoplasma \rightarrow nucleoplasma) (Ribbeck y Görlich, 2002; Pemberton y Paschal, 2005; Poon y Jans, 2005; Frey y col. 2006; Terry col. 2007, Raices y D'Angelo, 2012). El transporte en ambas direcciones es dependiente de RanGTPasas, cuya actividad provee el gradiente de GTP para dicha direccionalidad (Yoneda, 2000; Raices y D'Angelo, 2012). Las importinas median el transporte de moléculas cargo hacia el núcleo por el reconocimiento de la secuencia de señal de localización nuclear (Nuclear-localization signal, NLS, por sus siglas en ingles) en la proteína a transportar, su unión, la asociación con otras proteínas de exportación como el complejo Cas, y su interacción con el NPC (Goldfarb y col. 2004). Una vez en el nucleoplasma, el complejo importina-cargo se une a la proteína RanGTPasa, causando un cambio conformacional que libera a la molécula cargo y subsecuentemente la importina es nuevamente translocada al citoplasma a través del NPC (Pemberton y Paschal, 2005;

Mosammaparast y Pemberton, 2004). En dirección opuesta, las exportinas se unen a sus proteínas blancas por la secuencia de exportación nuclear (NES) y se asocian con proteínas específicas de salida (Goldfarb y col. 2004). La formación de este complejo en el nucleoplasma requiere la unión de la RanGTPasa y en conjunto es transportado al citoplasma por el NPC. Una vez en el dominio citoplasmático del NPC, se requiere la hidrólisis del GTP en la RanGTPasa asociada a la proteína cargo para la disociación irreversible. Esta hidrólisis de GTP se cataliza por la proteína activadora RanGTPasa (RAN GTPase-activating protein, RANGAP, por sus siglas en inglés) en asociación con proteínas de unión a RAN-1 o 2 (RAN-binding proteins RANBP1/ RANBP2). En paralelo con el bajo gradiente de RanGTPasa en el citoplasma y la liberación de la molécula cargo, RanGDP se une al factor de transporte nuclear NTF2 para regresar al nucleoplasma a través del CPN. Finalmente, el factor de intercambio RCC1 restaura los niveles de RanGTPasa en el interior del núcleo. Adicionalmente, se han identificado rutas alternativas de transporte que difieren en los sitios donde las moléculas cargo se unen al NPC o bien, las NUPs que median su transporte (Raices y D'Angelo, 2012)

Hasta ahora se han definido dos mecanismos de ensamblaje del NPC: 1) aquel que ocurre en paralelo con la reformación de la EN después de la mitosis (Guttinger y col. 2009); y 2) la inserción de NPC en la EN en interface (D'Angelo, 2009), el cual permite duplicar el número de CPN para la mitosis. El primer mecanismo inicia en la anafase temprana y ocurre concomitantemente con la reformación de la EN alrededor de la cromatina por la unión de las proteínas ELYS a secuencias específicas de ADN y el reclutamiento de las proteínas de andamiaje Nup170 -160 por las proteínas Ndc1 and Pom121 (Rasala y col. 2006; Dultz y col. 2008; Rasala y col. 2008; Kabachinski y col. 2015). Subsecuentemente, Nup98 se ensambla

seguida de las FG para la estabilización del complejo y el restablecimiento de la actividad (Dultz y col. 2008; Rodenas y col. 2009). El segundo mecanismo de inserción de NPCse basa en la formación *de novo* y el ensamblaje del NPC en ambos lados de la EN intacta y se sugiere que el subcomplejo Nup93 es el primero reclutado a estas estructuras, para finalmente reclutar las NUPs enriquecidas en FG (D'Angelo y col. 2006). Esta inserción es asistida por proteínas deformadoras de membrana, como es el caso de los reticulones, causantes del plegamiento y la fusión de la MNI y MNE. Este mecanismo es dependiente de la asociación con ciertas secuencias de ADN, el sistema de importinas y en parte, de eventos de fosforilación catalizada por cinasas dependientes de ciclinas (Cyclin-dependent kinases Cdk, por sus siglas en inglés), en particular Cdk1 and Cdk2 (Ryan y col. 2002; Onischenko y col. 2005; D'Angelo, 2006; Maeshima y col. 2010).

Acoplado a los mecanismos de transporte del CPN, éste juega un papel importante en la organización del genoma y en la actividad transcripcional a múltiples niveles (Casolari y col., 2004). Consistente con esta creciente evidencia, cerca de un cuarto del genoma total se asocia al poro nuclear en *D. melanogaster* (Vaquerizas y col., 2010). Los mecanismos de organización del ADN por el CPN incluyen: el anclamiento de unidades funcionales cromosomales a la periferia (p.e. telómeros y centrómeros por Nup170), la estabilización de asas cromatínicas (p.e. mediante las Myosin-like proteins Mlp1 y MLp2); la interacción con las marcas de la cromatina (Nup93 la H3K9me3 y la H3K27me3 y el anclaje de genes a través de secuencias específicas de reclutamiento (DNA zip codes) (Brown et al., 2008; Hetzer, 2009; Van de Voss et al., 2013). En el caso del papel del NPC en la transcripción se incluyen: la actividad de barrera contra los efectos de posición por la asociación con regiones libres de heterocromatina (p.e. el papel de la proteína del poro nuclear TPR) o bien,

en loci específicos (p.e. Nup2 en el locus HML); el establecimiento de plataformas permisivas para la transcripción por la asociación a complejos remodeladores de la cromatina (p.e. complejo co-activador de la transcripción SAGA-Trex (SAGA)); el acoplamiento de la regulación epigenética y genética por el interacción con loci silenciados y activos independiente del poro nuclear (p.e. Nup88 y Nup98, Ishi y col. 2002; Dilworth, 2005; Krull y col. 2010; Raices y D'Angelo, 2012). Estos efectos en la actividad transcripcional son tanto represores como activadores, como es el caso de la regulación negativa de la transcripción de genes asociados a la proteína Nup153), en contraste con Nup98, que se asocia al activador CBP/p300 (Kasper y col. 1999; Vaquerizas y col. 2010).

Las proteínas del NPC interaccionan también con otras proteínas de la EN, lo que presuntamente implica papeles adicionales y un panorama mas complejo y altamente regulado en la organización de la cromatina, asi como, en los mecanismos intrínsecos de la EN.

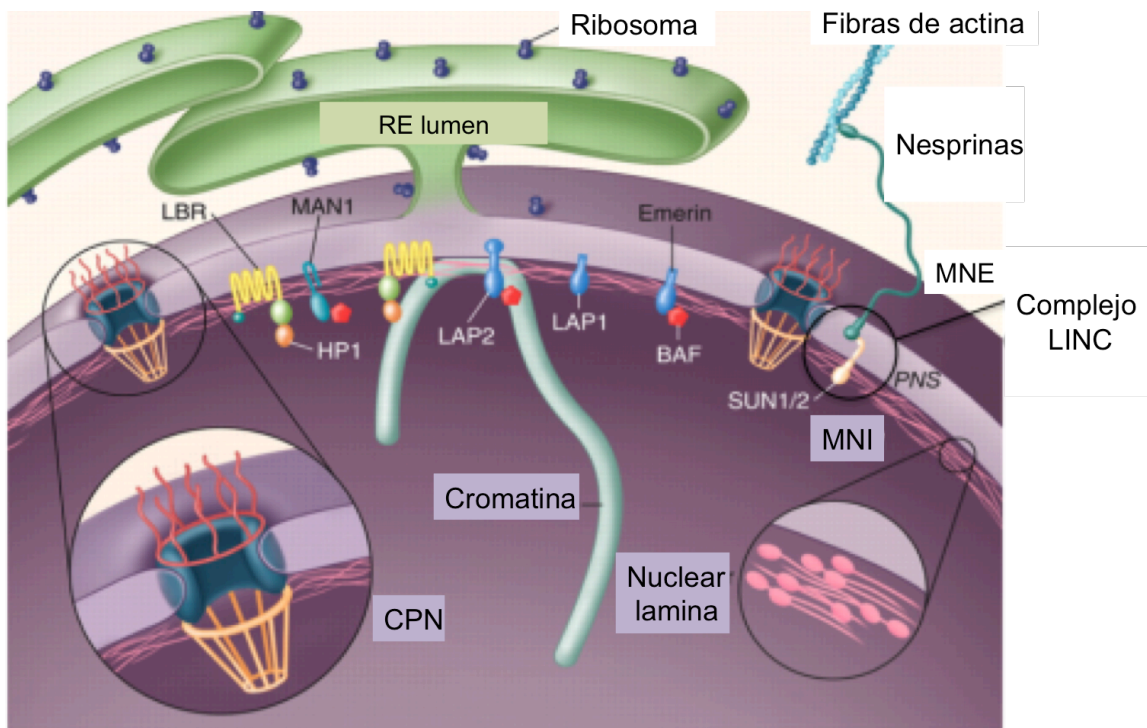


Figura 2. La envoltura nuclear (Imagen modificada de Stewart y col., 2007 por Hallberg lab). La EN está compuesta por dos membranas lipídicas: MNE y la MNI. En el lado citoplasmático, la MNE es continua con el retículo endoplásmico, mientras que en el lado del nucleoplasma, la MNI se asocia a la lámina nuclear. La lámina nuclear está formada por filamentos intermedios del tipo V conocidos como laminas (p.e. lamina A) que se polimerizan de forma regulada para constituir una estructura proteínica estable e insoluble que circunda la EN por el lado nucleoplásmico (Red de proteínas amplificada en rosa). Esta membrana lipídica está intercomunicada del citoplasma al núcleo por complejos proteicos que regulan tanto el transporte como la transducción de señales entre ambos compartimentos. Estos complejos macromoleculares incluyen el NPC (Formado por un anillo central y dos periféricos tanto en el lado citoplásmico como nucleoplásmico, amplificado en la imagen) y el

complejo LINC (Interacción Sun1/2-Nesprinas, indicado en la figura).

Al igual que el NPC, el complejo de unión citoplasma-nucleoesqueleto (LINC) está conservado evolutivamente desde levaduras hasta mamíferos (Starr y Fridolfsson, 2010). LINC constituye el segundo puente molecular que interconecta la EN desde el citoplasma hasta el nucleoplasma, atravesando la MNI y la MNE. Funcionalmente, este complejo es crucial para el mantenimiento de la posición del núcleo en procesos de polarización, migración y diferenciación celular (Mellad y col. 2011; Morgan y col. 2011; Uzer y col. 2015). Además, LINC es un componente clave para las rutas de mecanotransducción hacia el núcleo, las cuales implican la transformación de estímulos mecánicos provenientes del exterior celular en señales bioquímicas que se transducen al interior de la célula (Ho y col. 2013; Kim y col. 2012; Chambliss y col. 2013; Uzer y col. 2015; Discroll y col. 2015). Los eventos de mecanotransducción incluyen desde los mecanismos moleculares de detección del microambiente (p.e. propiedades físicas como rigidez, espacio y composición de la matriz extracelular) hasta respuesta a estímulos (p.e. reorganización del citoesqueleto, regulación del tráfico de moléculas específicas, alteración en las propiedades físicas del núcleo, y/o cambios en el programa genético) (Khatau y col. 2009; Discher y col. 2005; Dupont y col. 2011, Dufort y col. 2011; Khatau y col. 2012; Kim y col. 2012, Kim y col. 2011, Iyer y col. 2012; Chamblis y col. 2013; Ho y col. 2013; Makhija, 2015; Telwar y col. 2014).

LINC está formado por las proteínas nesprinas, localizadas en la MNE, y las proteínas del tipo Sun en la MNI (Figura 2) (Apel y col. 2000; Crisp y col. 2006; Pandmakumar y col. 2005). La familia de las nesprinas está compuesta por cuatro genes que codifican diferentes isoformas de las proteínas: nesprina-1, nesprina-2, nesprina-3 y nesprina-4. Las nesprinas

se componen por un dominio citoplasmático (amino-terminal) y por un dominio luminal (carboxilo-terminal) en la EN conocido como dominio KASH (KASH), (Steward-Hutchinson, 2008; Lombardi y col. 2011; Kaminski, 2014). El dominio citoplasmático de las nesprinas interactúa con componentes del citoesqueleto (Steward-Hutchinson y col. 2008). Particularmente, las proteínas nesprina-1 y -2 interactúan con actina y microtúbulos (Lombardi y col. 2011, Kaminski y col. 2014), mientras que nesprina-3 y nesprina-4 se asocian a otros componentes del citoesqueleto como lo son plectina y kinesin-1. En el otro extremo, el dominio luminal KASH (carboxilo-terminal) de las nesprinas se une a las proteínas del tipo Sun (Crisp y col. 2006; Pandakumar y col. 2005)

Las proteínas Sun están compuestas por un dominio trimétrico (carboxilo-terminal) hacia el lumen de la EN, un dominio transmembranal, y un dominio nucleoplásmico (amino-terminal). El dominio trimétrico en el lumen de la EN interacciona con las nesprinas mientras que el dominio nucleoplásmico interacciona con otras proteínas de la periferia nuclear como las proteínas Lamin A y B (Steward-Hutchinson y col., 2008; Lombardi y col., 2011, Kaminski, 2014). En células somáticas existen dos proteínas Sun: Sun1 y Sun2, mientras que en células germinales masculinas se ha detectado la presencia de Sun3, Sun4 y Sun5.

Las proteínas LINC contribuyen a la regulación de translocación de co-activadores y factores transcripcionales en respuesta a estímulos mecánicos como lo es el co-activador de miocardina MTRF y el YAP/TAZ (Mirelles y col. 2003; Medkane y col. 2009; Dupont, 20011; Ho y col. 2013; Discroll y col. 2015). Asimismo, las nesprinas interaccionan con otros factores transcripcionales en el citoplasma, mediando su translocación hacia el núcleo como es el caso del factor BRCA (Kelkar y col. 2016). La transmisión de señales hacia el núcleo y el remodelamiento del citoesqueleto ultimadamente regula programas transcripcionales en

procesos celulares como la diferenciación. Por ejemplo, LINC es esencial para la diferenciación de células troncales de tipo mesenquimal (MSC) hacia linajes óseos, adipogénicos, musculares y neuronales en respuesta a estímulos mecánicos de baja magnitud (Uzer, 2014; Uzer y col. 2015; Rubin y col. 2002; Judex y col. 2004)

Mutaciones en componentes del complejo LINC y su eliminación por ARNi, dominantes negativas o cassettes de recombinación resultan en defectos en las propiedades mecánicas del núcleo y la transducción de señales en procesos de diferenciación, migración y polarización celular, correlacionándose con enfermedades como ataxia cerebral. Asimismo, los componentes de LINC interactúan con las proteínas de EN como con la emerina, el CPN y las laminas, por tanto, defectos en estos componentes, también contribuyen a la generación de enfermedades causadas por defectos en la lámina nuclear (Sakaki et al. 2001; Mislow et al. 2002; Holaska y col., 2004; Lombardu y lammerding y col., 2010; Berk y col., 2010; Ho y col., 2013).

La lámina nuclear

En metazoarios, existe otra capa de proteínas subyacente a la MNI conocida como lámina nuclear. La lámina nuclear ejerce un papel fundamental en las funciones celulares primordiales como la replicación del ADN, transcripción, el procesamiento del ARN y la reparación del ADN (Shimi y col., 2008; Moir y col., 2000; Shumakker y col., 2008; Guelen y col., 2008, Reddy y col., 2008; Burke y col., 2014; Davison y col, 2014; Schreiber y col, 2013).

La lámina nuclear se compone por filamentos intermedios del tipo V, específicamente por laminas (Figura 2). Las proteínas laminas se dividen en dos grupos de acuerdo a los genes que las codifican, las propiedades bioquímicas y su expresión: laminas del tipo A y

laminas del tipo B. Las laminas tipo A son: la lamina A, C, C2 y Del10, todas ellas productos del splicing alternativo del gen *LMNA* (Röber et al.1989; McKeon y col., 1986). Las laminas tipo B incluyen: la lamina B1 codificada por el gen *LMNB1* y las laminas B2 y B3 codificadas por el gen *LMNB2*. (Goldman y col., 1986; Weber y col., 1990; Biamonti y col., 1992; Lin y col., 1995; Van de Vosse y col., 2011). En general, las laminas del tipo A tienen una carga neta neutra, se vuelven solubles en los procesos de desmantelamiento de la EN durante la mitosis. En contraste, las laminas del tipo B son proteínas ácidas, propiedad que dicta su permanencia en membranas celulares en todo el ciclo celular. La lamina A se expresa en células diferenciadas (Rober y col., 1989; Dechat y col., 2008). En contraste, la expresión de la lamina B1 y B2 es ubicua, Tanto la lamina C2 como la lamina B3 se han detectado únicamente en la línea germinal (Furukawa y col.,1994). Ambos tipos de laminas están implicadas en la regulación de múltiples funciones celulares, sin embargo, hasta ahora existe una polémica creciente en cuanto a su papel esencial para la viabilidad celular. Por ejemplo, anteriormente se consideraba que la eliminación de la lamina B no era esencial para la embriogénesis mientras que resulta letal al nacimiento en ratones (Dechat y col., 2008), sin embargo, la lamina B1 y B2 están implicadas en el desarrollo neuronal (Coffinier y col., 2012; Lee y col., 2014). En el caso de la lamina A/C, se considera que no es necesaria para la viabilidad celular ya que sistemas de cultivo celular deficientes en Lamina A/C proliferan y se expanden normalmente, sin embargo su eliminación *in vivo* resulta letal después de 6 semanas de nacimiento en ratones, reforzando la correlación con su expresión en células diferenciadas (Sullivan, 1999). Estas observaciones han sido confirmadas en células troncales embrionarias de ratón, por la eliminación de todas las laminas, sugiriendo que éstas no son cruciales para la proliferación y autorenovación de células troncales pero si para la

organogénesis (Kim y col. 2013).

En general, las laminas están compuestas por tres dominios estructurales altamente conservados: 1) un dominio cilíndrico central que consiste en cuatro hélices (1A, 1B, 2A, 2B); 2) un dominio de tipo inmunoglobulina; y 3) un carboxilo terminal, que en el caso de la lamina A y las laminas B, termina con un motivo CAAX, cuya isoprenilación es crucial para el anclaje a la EN (Holtz y col 1989; Kitten y col. 1991; Strelkov y col., 2004; Weber y col. 1989).

Las laminas se polimerizan en dímeros en paralelo, formando hélices entrelazadas y subsecuentemente se ensamblan en fibras anti-paralelas para formar filamentos de lamina. A su vez, estos filamentos se ordenan en una configuración lateral originando una matriz insoluble bajo la MNI. (McKeon, y col, 1986; Aebi y col.,1986).

Las laminas interactúan con proteínas de la EN como emerina, Man-1, NUPs, Sun-1 y Sun-2. Además, las laminas presentan dominios de interacción con factores tanto transcripcionales como epigenéticos como es el caso de Rb y BAF (Masharamani y col. 2005, Clements y col., 2000; Lee et al. 2001; Sakaki y col, 2001; Dechat y col., 2000; Berck y col., 2014). Estas interacciones múltiples entre la lámina nuclear y las proteínas de EN, juegan un papel determinante en la integridad estructural del núcleo, la estabilidad cromosómica y la organización de la cromatina (Reddy y col., 2008; Guelen y col, 2008, Shimi y col 2015). Por ejemplo, la asociación de filamentos de lamina A a las proteínas LEM (Lap2B y emerina) media la organización de la cromatina y el anclaje a la EN (Berk y col., 2014). Asimismo, la lamina B y la lamina A se asocian con secuencias específicas de ADN, anclándolas a la periferia e influyendo en la actividad transcripcional (Guelen y col, 2008). En conjunto, la creciente evidencia de sitios de anclaje a dominios cromatínicos e interacciones

de la lámina nuclear demuestran su papel fundamental en la actividad de transcripción (Stuurman y col., 1998; Moir y Spann 2001; Burke y Stewart, 2002).

Biogénesis de la envoltura nuclear

La división celular es un proceso altamente regulado que permite la proliferación celular, un paso fundamental para la transmisión de cromosomas de una generación a otra. La mayor parte de las células animales han desarrollado mecanismos para facilitar la accesibilidad a los centros organizadores de microtúbulos (centrosomas) que generan el huso mitótico de manera altamente regulada, como lo es la mitosis abierta (Kutar y col., 2008). La mitosis abierta se lleva a cabo por la reorganización de la EN en cada división tanto en la célula parental como en las células hijas. Este proceso mitótico requiere la ruptura de la EN (Nuclear Envelope Breakdown; NEBD), que consiste en el desmantelamiento finamente regulado de la EN y sus componentes. La mitosis abierta y el NEBD ocurre en la mayoría de los eucariontes, con algunas excepciones como las levaduras, hongos y *Drosophila*, donde la mitosis es cerrada o semi-abierta, respectivamente. Estas mitosis primitivas requieren la expansión de la EN o bien, la remodelación de la misma sin su disgregamiento total (De Souza y col., 2009, Ding y col., 2012; Friederiches y col., 2012; Arnone y col., 2013) . Al parecer, los diferentes tipos de mitosis han surgido como respuesta adaptativa al microambiente, sin embargo, la presión selectiva que dicta estos mecanismos se desconoce (Arnone y col., 2013).

NEBD se inicia en las primeras etapas de la mitosis (transición profase-prometafase), constituyéndose por los siguientes pasos: la invaginación de la EN alrededor del centrosoma (centro organizador de microtúbulos), seguido por el desmantelamiento del CPN, la

despolimerización de la lámina nuclear y la retracción de los componentes de la EN al RE (Guttinger y col., 2009). La condensación de la cromatina ocurre en paralelo con el NEBD y se debe, en parte, a la regulación por condensinas en el ADN, mientras que su desprendimiento de la EN se regula por las fuerzas generadas por proteínas del citoesqueleto (p.e. Dineína) y de la EN (p.e. Sun1) (Salina y col. 2002).

La NEBD está finamente controlado por diversos *checkpoints* durante la mitosis, por ejemplo las proteínas Mad1 y Mad2, reclutadas en el preensamblaje del huso mitótico en la EN, median el interacciones fallidas con los cinetocoros (transición metafase →anafase; Rodríguez-Bravo y col., 2014). La reformación de la EN en la última etapa mitótica (anafase →telofase) inicia con la reconstitución del RE contiguo al huso mitótico y se da en paralelo con la descondensación de la cromatina (Lu y col., 2011). La reformación de EN ocurre hacia el centro nuclear rodeando los cromosomas. El CPN también se re-ensambla de manera ordenada: 1) el complejo Nup107-160, 2) POM121, y 3) las FG), requiriendo el reclutamiento de la cromatina por sus proteínas tipo Elys (Rasala y col., 2006; D'Angelo y col., 2006)

La NEBD es regulada por eventos de fosforilación a múltiples niveles, incluyendo fosforilaciones en componentes de la EN, la cromatina, el CPN y la lámina nuclear. Por ejemplo, la fosforilación de NUPS se requiere para su desensamblaje, mientras que fosforilaciones en las histonas, como la serina 10, 28 y 80 en la H3 están implicadas en la condensación de cromatina. (Hammond y col., 2014). Entonces, existe una amplia variedad de cinasas que resultan cruciales para este proceso como es el caso de la ciclinaA2/Cdk, Aurora A, cdk1/ciclina B. (Portier y col., 2007; Gong y col., 2007; Hetzer y col., 2009; Swift y col., 2013; Mashima y col., 2013; Wilkins y col., 2014). Por lo tanto, este proceso implica

cambios robustos en el sistema de transporte de citoplasma/núcleo donde el transporte de cinasas se maximiza hacia el núcleo (Gavet y Pines, 2010).

La fosforilación es la modificación postraduccional mas común y mayormente estudiada en los filamentos intermedios, incluyendo a las laminas. Esta modificación covalente y reversible provee un mecanismo idóneo para controlar las propiedades bioquímicas y estructurales de sus blancos de manera rápida y dinámica (Tordvaldson y col. 2015). Las laminas son fosforiladas en diferentes sitios a lo largo del ciclo celular incluyendo la interface y la mitosis (Cerca de 70 sitios se han detectado fosforilados). Tal es el caso de los aminoácidos S22 (N-terminal) y S392 (C-terminal), cuya fosforilación es crucial para la el desensamblaje y solubilización de la lámina nuclear en el NEBD. En particular, la cdk1/ciclina B fosforila las proteínas laminas induciendo su despolimerización (Buendía y col., 2001), asimismo otras cinasas participan en esta dinámica, como es el caso de PKC y Akt. (Tordvaldson y col., 2015). Interesantemente, la dinámica global de la fosforilación tanto en la lámina nuclear como en la EN, asi como su impacto a nivel funcional en procesos celulares permanece sin elucidarse.

1.4 El proteoma de la envoltura nuclear

Los estudios de la composición global de la EN han emergido en paralelo con el desarrollo de nuevas tecnologías y herramientas en proteómica en el último par de décadas. En términos generales, los acercamientos mas fructíferos en la identificación de las proteínas de la EN han sido: 1) El análisis de homología *in silico*, como fue el descubrimiento de las proteínas nesprinas (Apel y col., 2000); y 2) Los estudios a nivel proteómico, ya sea por métodos substractivos o comparativos, los cuales integran y reflejan los resultados de

diversas técnicas experimentales como la purificación por afinidad, ensayos de doble híbrido y fraccionamiento bioquímico (Schirmer y col., 2003; Kavanagh y col., 2007, Dittmer y col., 2014). El método comparativo se basa en el supuesto de que los componentes de la EN poseen las mismas propiedades bioquímicas que las proteínas transmembranales. En contraste, en el método substractivo se excluyen aquellas proteínas de membrana detectadas en vesículas provenientes del aparato de Golgi, retículo endoplásmico, mitocondrias y otros orgánulos para obtener aquellas que están enriquecidas en la EN.

Los trabajos pioneros en el proteoma de la EN se basan en su purificación a través del fraccionamiento subcelular por gradientes de sacarosa y su acoplamiento a espectrometría de masas en tándem (Schirmer y col., 2005; Florens y col., 2008; Korfali y col., 2010). La composición proteica de los organelos celulares es similar entre tejidos en cuanto a proteínas integrales de membrana, con excepción de aquellas que funcionan como receptores o proteínas del complemento tejido-específicas sintetizadas en el retículo endoplásmico y transportadas a la membrana plasmáticas (Korfali y col., 2012). Sin embargo, existen variaciones de composición en la EN de células de diferentes linajes, sugiriendo la existencia de proteínas tejido-específicas en la EN, particularmente en músculo, sangre e hígado tanto en ratón como en humano (Kavanagh y col., 2007; Korfali y col., 2010, Wilki y col., 2011, Heras y col., 2014). Las proteínas detectadas en la EN tejido-específicas corresponden a reguladores de cascadas de señalización y expresión génica, según los análisis de ontología reportados. Sin embargo, estas proteínas son menos abundantes en la EN que las proteínas ubicuas (Schirmer y col., 2005). Además, resulta interesante destacar que dichas proteínas tejido-específicas son las menos conservadas entre humano, ratón y rata en términos evolutivos. La asociación de la EN con diferentes

enfermedades humanas, conocidas como laminopatías, en general está restringidas a fenotipos tejido específicos como la distrofia muscular, dermatopatías, lipodistrofias, afecciones óseas y diversos síndromes de envejecimiento (Korfali y col., 2012). Es posible que exista un patrón no identificado en cuanto a la composición proteica de la EN media las consecuencias tejido-específicas de cada patología (Korfali y col., 2012).

Estudios del proteoma de la EN en leucocitos activos e inactivos por métodos subtractivos, permitieron la definición de más de 2000 proteínas transmembranales asociadas a la EN y reflejaron cambios en este proteoma entre estadios (Florens y col., 2008; Korfali y col., 2010). Algunas de las proteínas diferencialmente expresadas juegan un papel importante en la organización del genoma como es el caso de las proteínas TAPBPL e IAG2 (Korfali y col., 2010). Un alto porcentaje de proteínas de la EN se encontró enriquecido tanto en leucocitos activos como inactivos (aprox. 70%). Estas evidencias sugieren que las proteínas de EN juegan un papel crucial en el la regulación de mecanismos generales como la transición entre estados de diferenciación. Asimismo, es posible que además de la composición proteica de la EN, existan otras señales que influencien funcionalmente su regulación en procesos celulares primordiales.

1.5 . Modificaciones postraduccionales en la EN: la fosforilación como objeto de estudio.

Las modificaciones postraduccionales de proteínas (PMTs por sus siglas en inglés: Posttranslational-modifications) juegan un papel crucial en la regulación funcional de una amplia variedad de procesos celulares en eucariontes, incluyendo los procesos de diferenciación celular (Grotenbreg y Ploegh, 2007). Se han identificado modificaciones

postraduccionales en la mayoría de las proteínas descritas hasta la fecha, incluyendo ubiquinación, sumoilación, carboximetilación y fosforilación. La detección de las PMTs ha sido posible por los avances en las técnicas bioquímicas de purificación de proteínas y espectrometría de masas, conformando una de los métodos más usados para el enriquecimiento, identificación y cuantificación de las mismas (Cain y col., 2014).

Diversas proteínas de la EN están reguladas directa o indirectamente por PMTs, tales son los casos de la lamina A, cuyo precursor, la prelamina A, es farnesilado para su inserción en la EN y subsecuente procesamiento postraduccionales (Glynn y Glover, 2005) como se discutirá en detalle más adelante. La ubiquinación de las proteínas del poro nuclear MLP1 y MLP2, cuya ausencia causa la deslocalización de éstas y defectos en el transporte nuclear (Nagai y col., 2011) y la fosforilación tanto en las laminas del tipo A como en las del tipo B asociados a la regulación del ciclo celular, el NEBD y a su distribución (Kuga y col., 2010; Tordvaldson y col., 2015). Particularmente, la fosforilación en proteínas regula la mayor parte de los procesos celulares como lo es la diferenciación, progresión del ciclo celular y el desarrollo (Hubbard y col., 1993; Hunter, y col., 2002). Asimismo, se estima que cerca de un tercio de la totalidad de las proteínas reportadas presentan un enlace covalente a un grupo fosfato (Ficarro, y col., 2002).

La fosforilación es un mecanismo reversible indispensable para la regulación de las propiedades físicas y bioquímicas de las proteínas, y debido a la carga electrostática negativa que brinda el grupo fosfato actúa a diferentes niveles, incluyendo el cambio de carga de las proteínas, su solubilidad e hidrofobicidad, su conformación y como resultado actividad funcional (Ubersax y col., 2007). Por ejemplo, la fosforilación puede desencadenar efectos alostéricos, crear sitios de unión a proteínas, o bien, causar la desestabilización de

los mismos (Hunter y col., 2007).

El análisis de la fosforilaciones a nivel global mediante el uso de columnas de afinidad y espectrometría de masas en tándem ha surgido en los últimos años, constituyendo una herramienta poderosa para el descubrimiento de eventos de fosforilación a nivel cuantitativo y cualitativo en diferentes procesos celulares (Ficarro y col., 2002; (Aebersold y Mann, 2003; Olsen y col., 2006). Hasta ahora existen estudios globales de la fosforilación en el núcleo a través del ciclo celular en determinados tipos celulares como es el caso de adipocitos humanos (Humphrey et al., 2013; Olsen y col. 2010), así como eventos específicos de fosforilación reportados en proteínas de la EN como las laminas y nucleoporinas (Kosako, 2009; Swift y col., 2013; Travenston y col., 2015). Sin embargo, el fosfoproteoma global de componentes subcelulares específicos como la EN no se ha estudiado. Además, el cambio en el estado de fosforilación en condiciones fisiológicas se ha examinado en diferentes contextos como el ciclo celular, en respuesta a factores de crecimiento (p.e. EGF) y a particulares cascadas de señalización a partir de moléculas extracelulares (p.e. feromonas) (Gruhler y col., 2005; Olsen y col., 2006; Olsen y col., 2010; Humphrey y col. 2015). Por ejemplo, uno o más sitios de fosforilación por proteína (6000 en total) se detectaron en cerca de 2000 proteínas en células de mamífero (HeLa), de los cuales un porcentaje (aprox. 15%) cambia ante la activación por el tratamiento con el factor de crecimiento EGF. La activación por EGF desencadena una cascada de señalización dependiente de cinasas que regula los procesos de proliferación y diferenciación (Hunter y col., 2002 Olsen y col., 2006). Las proteínas detectadas con cambios de fosforilación corresponden a ubiquitin-ligasas, factores de intercambio del nucleótido guanina y factores transcripcionales (Olsen y col., 2006). Es posible que el enriquecimiento de componentes específicos de la EN permita el

descubrimiento de nuevos candidatos implicados en esta transición.

El control de estados diferenciales de fosforilación es alcanzado paralelamente por el incremento o disminución de actividad de cinasas y fosfatasas. Por ejemplo, diferentes blancos de la vía de las cinasas ERK y MAPK se han identificado en la EN, cuyas implicaciones funcionales influyen en el transporte del CPN como es el caso de la Nup50 (Kosako y col., 2009). Adicionalmente, la maximización del transporte de cinasas hacia el nucleoplasma apoya esta idea (Gavet y Pines, 2010; Ono et al 2004, Alvarez-Fernandez y col. 2014). Entonces, el estudio a nivel global del fosfoproteoma de la EN así como la dinámica de las cinasas que lo establecen, representa un campo prometedor para el entendimiento de esta señalización en la EN. Sin embargo, esta dinámica no ha sido evaluada en términos de la diferenciación celular por lo que el presente trabajo se propuso concentrarse en estas investigaciones.

El fosfoproteoma de la EN y la diferenciación eritroide, un modelo de estudio.

Además del NEBD en la mitosis, el núcleo sufre eventos dramáticos de remodelamiento durante la diferenciación celular. En particular, las propiedades fisicoquímicas de este orgánulo cambian drásticamente en la diferenciación de células pluripotentes, como es el caso de la diferenciación de las células troncales hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés) a células diferenciadas (Pajerowski y col. 2007; Bhattacharya y col. 2009; Makhija y col., 2015).

La eritropoyesis es el proceso que origina los eritrocitos terminalmente diferenciados a partir de la proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Este proceso de diferenciación esta acompañado por la disminución en el tamaño celular,

cambios severos en la organización de membranas compactación de la cromatina, y el reposicionamiento de loci específicos como es el caso del dominio β -globina (Chen y col., 2009; Ragoczy y col., 2006). En contraste, con el núcleo de células diferenciadas, el núcleo en HSC es de mayor tamaño, presenta una menor rigidez y un alto porcentaje de fluctuaciones en la EN propensas a la ruptura, lo que refleja su alta plasticidad como células troncales (Kathau y col., 2009; Pajerowski y col. 2007; Makhija y col., 2015). Estas propiedades se han atribuido, en gran parte, a la expresión de laminas del tipo A y su asociación con proteínas como la emerina, cuyo enriquecimiento provee rigidez y estabilidad al núcleo de células diferenciadas (Kathau y col., 2009; Pajerowski y col. 2007; Makhija y col., 2015). Por tanto, células deficientes en componentes específicos de EN, como la Lamina A/C, tienen núcleos frágiles y diversos cambios en la organización del genoma (Kathau y col., 2009; Pajerowski y col. 2007; Kuben y col. 2011).

La composición específica y global de la EN, así como el papel de la fosforilación en este contexto de diferenciación se desconoce. Algunas fosforilaciones de la EN dependen de las propiedades mecánicas del microambiente lo que se correlaciona con la expresión de lamina A en tejidos de alta rigidez como el muscular, óseo y cartilaginoso (Swift y col., 2013). Además, estos patrones de fosforilación mecano sensibles regulan la dinámica de incorporación a la lámina nuclear por cambios estructurales a nivel molecular (Swift y col., 2013). Entonces, la comparación del fosfoproteoma eritroide en la EN con otros sistemas de diferenciación resulta un objeto de estudio prometedor para entender la dinámica en esta estructura subcelular.

1.6 . La lamina A como candidato para estudiar la dinámica nuclear.

La lamina A constituye el miembro más reciente de las laminas en términos evolutivos, presentándose solo en vertebrados (Dittimer y col, 2011; Peter y col.; 2012). En contraste con las laminas del tipo B, cuya aparición data desde los metazoarios, incluyendo invertebrados (Dittimer y col, 2011; Peter y col.; 2012). La proteína lamina A esta implicada en la diferenciación, respuesta a estrés oxidativo, senescencia proliferación y envejecimiento (Schirmer y col., 2014). A nivel funcional, el papel de la lamina A incluye la regulación del mantenimiento de los telómeros, la compartimentalización del núcleo así como la reparación del ADN (González-Suarez y col., 2008; Burke y col., 2014; Davison y col, 2014; Gruebbaum y col. 2015). Además, esta proteína se ha visto correlacionada con diversas cascadas de señalización así como con el anclaje de heterocromatina a la periferia nuclear por uniones proteína-proteína y ADN-proteína (Solovei et al. 2013; Harr y col. 2015).

La lamina A es una proteína sintetizada a partir del gen *LMNA* como un precursor de 664 aminoácidos (665 en ratón), conocido como Prelamina A. Este precursor esta sujeto a una serie de modificaciones postraduccionales para ser transportado al núcleo, la maduración de la proteína y la integración a la lámina nuclear. Estas modificaciones incluyen: 1) la adición de un grupo lipídico (farnesil-isoprenoide) a la cisteína del motivo CAAX (C662) en el carboxilo terminal; 2) la endoproteólisis de los tres aminoácidos del CAAX (S663, I664 y M665) resultado en una proteína de 662 residuos; 3) la carboximetilación de la cisteína C662 por la enzima carboxi-metil transferasa de isoprenil-cisteína; y finalmente, 4) la proteólisis de los últimos 15 aminoácidos del carboxilo terminal (Y647-C662) por la enzima metaloproteinasa de zinc STE24 (ZMPSTE24), lo cual da lugar a una proteína de 646 aminoácidos conocida como Lamina A (Beck y col, 1990; Kilic, 1997; Hennekes, 1994). Las primeras tres modificaciones

En paralelo con la amplia gama de funciones de la lamina A, ésta interacciona con múltiples proteínas, incluyendo componentes del citoesqueleto (p.e. actina); componentes de la envoltura nuclear (pe. Lap2alfa, Sun-1, Sun-2, LAP1, Emerin y nesprina-1); factores transcripcionales (p.e. Rb y SREBP); componentes del complejo de la RNA polimerasa (E2F). (Foisner y Gerace, 1993; Ozaki y col., 1994; Spann y col., 1997; Sasseville y Langelier; 1998; Clements y col., 2000; Lee y col., 2001; Dechat, 2000; Mislow y col., 2002; Lloyd y col., 2002; Holaska y col., 2004; Crisp y col., 2006). Por tanto, un alto número de mutaciones en la proteína lamina A se asocia a la desestabilización de interacciones proteína-proteína, lo que a su vez puede desregular a dichos complejos a nivel funcional. Por ejemplo, el anclamiento de heterocromatina a la periferia nuclear se pierde ante la eliminación de la lamina A/C, causando la relocalización de secuencias al interior nuclear (Solovei y col. 2013). Sin embargo, la eliminación de la lamina A/C se ha reportado como inofensiva para la viabilidad celular (Kim y col., 2013; Shimi y col., 2015). Estos resultados confirman la amplia variedad de funciones y procesos celulares dependientes de la lamina A/C que no se han evaluado, o bien, que no se entienden del todo.

Implicaciones de la EN enfermedades humanas: laminopatías por la lamina A

El interés por el estudio de la envoltura nuclear ha aumentado en la última década debido a su asociación con diferentes laminopatías (Dauer y Worman, 2009). Muchos de estos desórdenes están ligados a mutaciones en los genes que codifican para las proteínas lamina A, emerina y Sun-1, y cuyos efectos a nivel molecular permanece sin elucidarse en muchos casos (Schirmer et al., 2003; Prokocimer et al., 2009).

Las enfermedades causadas por mutaciones en los componentes de la EN se pueden clasificar en dos grupos: laminopatías primarias y secundarias. Las laminopatías primarias se generan por mutaciones en los genes que codifican para la EN como lo son emerina, LBR, MAN-1, nesprina-1 y nesprina- 2 LAP2, lamina B1 y lamina B (Dauer y Worman, 2009; Worman y col., 2010; Schirmer y col., 2010). Las laminopatías secundarias son causadas indirectamente por genes de componentes que regulan a las proteínas de la EN como es el caso de la Dermopatía restrictiva (RD) causada por mutación en ZMPSTE24, resultando en pérdida de función y por ende defectos en el procesamiento de la Lamina A (Navarro y col. 2011).

La mayor parte de las mutaciones identificadas en proteínas de la EN causantes de laminopatías afectan al gen LMNA (González-Suarez et al., 2009). El creciente interés por el estudio de esta proteína Lamina A se debe, entre otras cosas, a la existencia de cerca de 460 mutaciones puntuales (Base de datos de mutaciones UMD-lamin A <http://www.umd.be/LMNA/>) asociadas con laminopatías, incluyendo enfermedades como las distrofia musculares de *Emery-Dreifuss* y *Limb-girdle, displasia mandibular*, y múltiples síndromes de envejecimiento prematuro como el Hutchinson-Gilford progeria (HGSP) (Bonne y col. 1999; Muchir; 2000; Shackleton y col., 2000; Novelli y col., 2002; Eriksson y col., 2003). En estas enfermedades, el núcleo celular sufre alteraciones estructurales y funcionales que interrumpen la diferenciación, proliferación y la viabilidad de las células.

HGPS es el resultado de defectos en la ruta de procesamiento de la prelamina A causada por la mutación G608G. La mutación G608G causa la activación de un sitio de splicing críptico y por tanto, la transcripción de un ARNm de la prelamina A se sintetiza sin el exón 11 y es traducido como la proteína truncada LMNA Δ 50, mejor conocida como progerina

(Eriksson y col., 2003). En contraste con el precursor prelamina A, la progerina no presenta el sitio de corte para ZMPSTE24. Entonces, la progerina puede farnesilarse pero no puede ser procesada y permanece anclada a la EN (Capell y col., 2005; Ericksson y col., 2003; Goldman y col., 2004) Los núcleos progeroides exhiben defectos morfológicos como cambios en tamaño y forma que resultan en alteraciones en la división celular y tasas de proliferación (Goldman y col. 2004; Young y col, 2006; Dechat y col., 2007; Barthelemy y col, 2015), sugiriendo que la acumulación de prelamina A farnesilada afecta la homeostasis. Consistente con esta idea, la inhibición de la farnesilación por tratamientos químicos (p.e. Lovastatina) en células de HGPS bloquea la asociación de la prelamina A con la EN, resultando en la acumulación de la misma en el nucleoplasma y en la reversión del fenotipo progeroide. (Luz, 1992; Dalton, 1995; Cao y col., 2007; Capell y col., 2005; Fong, 2006; Glynn y col., 2005; Verstraeten, 2011). Entonces, el uso de inhibidores de farnesilación en pacientes de HGPS está en etapa de pruebas clínicas (Kieran y col., 2007; Gordon y col., 2012; Gordon y col., 2014). Estos estudios del papel de inhibidores de la farnesilación se han llevado a cabo mediante el uso de proteínas de fusión (GFP-Lamina A) así como con la detección de la proteína endógena lamina A, reportándose la agregación de la proteína en el nucleoplasma bajo los inhibidores únicamente con el uso de las proteínas de fusión (Cao y col., 2007; Capell y col., 2005; Fong, 2006; Glynn y col., 2005; Verstraeten, 2011).

Hasta ahora, HGPS es una de las laminopatías más estudiada, sin embargo, existen diversas mutaciones puntuales en el gen *LMNA* ligadas con el desarrollo de otros fenotipos progeroides. En contraste con la mutación G608G (HGPS), el resto de las mutaciones se localizan en sitios externos al carboxilo terminal por lo que no responden a tratamientos de inhibidores de farnesilación, son menos frecuentes y son menos severas en la mayoría de los

casos (Azibani y col. 2014). Por tanto, estas enfermedades se han definido como Síndromes Progeroides Atípicos (APS, por sus siglas en inglés, Atypical Progeroid Syndromes) y se caracterizan también por defectos en la morfología nuclear y toxicidad celular (Varela y col. 2008; Garg y col. 2009; Chen y col., 2003; Doh y col. 2009; Moulson y col. 2007). En general, los síndromes progeroides presentan fenotipos tejido-específicos en músculo esquelético y cardíaco, tejido epitelial y vascular (Csoka y col., 2004; Moulson y col., 2007; Verstraeten y col. 2006; Olive y col., 2010; Garg y col., 2009). La base de esta especificidad son los patrones de expresión de la lamina A en tejidos con alta rigidez y elasticidad, donde la abundancia de la proteína es directamente proporcional a estas propiedades físicas (Swift y col., 2013). Asimismo, el patrón de fosforilaciones que regula la polimerización de la lamina A también se ha encontrado correlacionada con la rigidez y propiedades mecánicas celulares. (Swift y col., 2013). Diversas mutaciones en el gen de la LMNA que implican defectos en la fosforilación de la lamina A se han visto ligados al desarrollo de síndromes progeroides (Mitsuhashi y col., 2010). Sin embargo, los mecanismos moleculares que definen este tipo de enfermedades permanecen sin elucidar y se conoce mucho menos el papel de la fosforilación sobre estos componentes. Tanto la dinámica de los intermediarios de la maduración de la lamina A, incluyendo la prelamina A, como su implicación en la regulación de determinados procesos celulares y transducción de señales no son del todo entendidos por la falta de herramientas para su detección.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien la función de la envoltura nuclear ha sido foco de estudio en los últimos años, su composición así como variaciones en la localización, su regulación, la diversidad de sus componentes, y su papel regulatorio en procesos como la diferenciación y desarrollo es un campo de la biología celular relativamente inexplorado. Las proteínas de la EN regulan directa o indirectamente la expresión génica, las propiedades físicas del núcleo y la conexión con el citoplasma además de ser primordiales para el mantenimiento de la organización del genoma. Sin embargo, a pesar de la amplia gama de sus funciones, es incierto si cambios en su composición están implicados en la transducción de señales durante la diferenciación celular. En particular, se desconocen las señales que están implicadas en la regulación de estos procesos celulares.

La participación de los eventos de fosforilación en componentes específicos de la EN se ha reportado, sin embargo, es una incógnita si esta modificación postraduccional presenta un patrón específico y dinámico a nivel global ante procesos como la diferenciación en EN. La caracterización del fosfoproteoma subcelular representa un acercamiento prometedor para contestar estas preguntas. Por otro lado, el descubrimiento de los componentes de la EN y los mecanismos moleculares que los regulan es creciente, por tanto, el desarrollo de herramientas para su detección es un parteaguas para la investigación de sus funciones

2.1 Justificación

Dado que la fosforilación regula la mayor parte de los procesos celulares y se ha identificado en al menos un tercio de las proteínas hasta ahora descritas, es posible esperar que esta modificación constituya un mecanismo regulatorio clave para la señalización de la EN

durante la diferenciación celular. Asimismo, el estudio de la dinámica de proteínas específicas en la EN, como es el caso de la lamina A, podría constituir un avance en el entendimiento de la dinámica nuclear global y sus implicaciones en desarrollo de laminopatías.

2.2. Objetivos

Objetivos generales

- A. Caracterizar el fosfoproteoma de la EN de células no diferenciadas e inducidas a la diferenciación en el sistema de eritroide y muscular.
- B. Estudiar la proteína de EN lamina A y su participación en síndromes progeroides.

Objetivos específicos

- A.1 Caracterizar del fosfoproteoma de la EN en la diferenciación eritroide (Línea celular G1E).
- A.2 Caracterizar del fosfoproteoma de la EN en la diferenciación muscular (Línea celular C2C12).
- A.3 Identificar de cinasas potencialmente responsables de estas fosforilaciones a nivel global.
- B.1 Determinar de las fosforilaciones en la lamina A.
- B.2 Generar del anticuerpo PL-1C7 para la detección y el estudio del precursor prelamina A.
- B.3. Validar y caracterizar el anticuerpo anti-prelamina A (PL-1C7) para estudios de inmunolocalización y acumulación de la misma.
- B.4 Evaluar de la acumulación de la prelamina A en síndromes progeroides.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Líneas celulares

Líneas celulares de ratón usadas para los estudios de fosfoproteoma de la EN durante la diferenciación:

- Sistema de diferenciación eritroide (G1E) .

La línea celular G1E recapitula la eritropoyesis a partir de la etapa de colonias formadoras de unidades eritroides (CFU-E) tardía, hasta la etapa de eritroblástica (Weiss y col., 1997.) Estas células se derivan de la eliminación dirigida del gen GATA-1 en el cromosoma X. GATA-1 es un factor transcripcional clave de la hematopoyesis ya que se encuentra asociado con la mayoría de los promotores de los genes en eritrocitos. La inducción hacia la diferenciación se induce en 0.4×10^6 células/ml con la adición de estradiol al medio por 30 h.

- Sistema de diferenciación muscular (C2C12)

Las células C2C12 se derivan del músculo esquelético como mioblastos que pueden fusionarse y diferenciarse a miocitos bajo las condiciones adecuadas (Yaffe y Saxel, 1977). La diferenciación se da por el cultivo de las células a alta confluencia o mediante el reemplazamiento de suero de caballo en el medio.

Líneas celulares de ratón usadas para los estudios de la inmunolocalización de la proteína prelamina A tanto endógena como exógena.

- Fibroblastos wild type (MEF WT, ATCC®).
- Fibroblastos deficientes en lamina A (MEF Lmna^{-/-}, Sullivan y col., 1999).
- Fibroblastos deficientes en ZMPSTE24 (MEF ZMPSTE^{-/-}).

Líneas celulares de humano usadas para los estudios de la inmunolocalización de la proteína prelamina A

- Adenocarcinoma cervical (HeLa, ATCC®)
- Fibroblastos (HFF, ATCC®)

- Rbdomiosarcoma (A-204, ATCC®)
- Osteosarcoma (U2-SO, ATCC®)

Las células G1E se cultivaron en medio modificado Eagle Dulbecco (DMEM), suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS; Thermo Fisher scientific, Cat No. 10437-077), L-Glutamina y eritropoyetina a 37°C y 5% CO₂. Las células adherentes tanto de ratón (C2C12, Zmspte24 and Lmna^{-/-}) como de humano (HeLa, HFF, A-204, U-2 OS) se cultivaron con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS; Thermo fisher scientific, Cat No. 10437-077) y L-Glutamina a 37°C y 5% CO₂.

3.2 Aislamiento de las envolturas nucleares.

El protocolo de purificación de EN se estableció y estandarizo en células eritroides y musculares (G1E y C2C12) tanto no diferenciadas como inducidas (Modificado de Florens y col. 2008, Korfali y col., 2010).

- 1) Lisis celular y aislamiento de núcleos. En el caso de las células adherentes (C2C12), la colección de las mismas se hizo por el tratamiento de Tripsina/EDTA 0.05% y neutralización con medio suplementado con SFB. Las células fueron lavadas con PBS y sujetas a centrifugación (250 g x10 min, 4°C). Las pastillas se resuspendieron en solución de sacarosa con detergente (1x10⁶/ml), disgregándose por fuerza mecánica (Homogenizador de Douncer, 10 veces) e incubándose 5 min en hielo.
- 2) Fraccionamiento subcelular. Las células fueron centrifugadas nuevamente (250 g x 10 min, 4°C) para la recuperación de los núcleos. Los núcleos fueron lavados con

solución de sacarosa sin detergente, se disgregaron por fuerza mecánica (Homogenizador de Douncer, 15 veces) y se les adicionó la solución 2.2 SHKM con KCl (1/10 vol). Esta solución se transfirió a tubos de centrifugación para un rotor de columpio Beckman-Coulter J6-MC se agrego la solución 30% SHKM (1/10 vol) en el fondo con el uso de una jeringa para crear dos fases y se centrifugaron (2000 g, 20 min, 4°C). El sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en la solución 0.25 M SHKM (11 ml). Esta solución se llevo a una concentración final de Sacarosa 1.9 M con la adición de 2.2 SHKM (39 ml). El gradiente se separó en dos tubos de ultracentrifugación (Ultra Beckman, 100x160mm) y a cada uno se le adicionó la solución 2.3 M SHKM (1/5 vol) en el fondo mediante el uso de una jeringa para después centrifugarse (82,000 g; 2h, 4°C). El sobrenadante se descartó por inversión (10 min, 4°C). Posteriormente cada pastilla se resuspendió en la solución de 0.25 SHKM (1 ml) y se homogenizó por fuerza mecánica (Homogenizador Douncer), centrifugándose para recuperar la pastilla que contiene las envolturas nucleares (2000 g, 20 min, 4°C).

- 3) Remoción del contenido nuclear. Con el fin de remover la mayor cantidad de material nucleoplásmico posible, como el ADN, ARN y cromatina, se llevaron a cabo tratamientos con un coctel de endonucleasas. Brevemente, las pastillas se resuspendieron en la solución 10% SHM (1.5×10^6 núcleos/ml) con DNasa (4 U/ml), RNasa (1 μ g/ml) y benzamidina (RT for 15 min). Posteriormente, la solución se transfirió a tubos fríos y se centrífugo en el rotor de columpio (e.g. Beckman-Coulter J6-MC; 2000 g, 10 min, 4°C). Las pastillas se resuspendieron nuevamente en 10% SHM (3×10^6 núcleos/ml) y se transfirieron a tubos limpios, agregándose DNasa (4

U/ml), RNasa 1 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$ benzamidina (RT, 15 min). Las muestras se centrifugaron nuevamente (10 min, 4°C), se resuspendieron en la solución 10% SHM y se hicieron alícuotas (6000 g, 10 min, 4°C). El sobrenadante se descartó y las pastillas se congelaron en nitrógeno líquido para su uso posterior, o bien, se utilizaron para los subsecuentes pasos de extracción o análisis (SDS-PAGE).

- 4) Lavado de envolturas nucleares. Las pastillas se re-suspendieron en solución de lavado (5×10^6 EN/ml) y se incubaron en hielo por 15 min, mezclando ocasionalmente. Se recuperó la pastilla de EN posterior a la centrifugación (20,000g, 30 min, 4°C).
- 5) Extracción de proteínas. Las proteínas se extrajeron por dos métodos: la extracción alcalina y por detergentes.

Extracción alcalina: Las EN se resuspendieron en NaOH 0.1 M (1×10^6 NE/ml) y se incubaron en hielo (10 min). Las EN fueron transferidas a tubos de ultracentrífuga (TLA100.3) y centrifugadas (104,000g, 35 min, 4°C). Se descartó el sobrenadante, la pastilla se lavó con agua destilada y se centrifugó nuevamente para recuperar las proteínas (104,000 g, 35 min, 4°C).

Extracción por detergentes: Las EN se resuspendieron en solución de extracción por detergente (10×10^6 NE/ml, incubándose en hielo por 15 min para después centrifugarse (20000g, 30 min, 4°C). La pastilla se lavó nuevamente con la misma solución sin detergente, centrifugándose nuevamente para recuperar las EN.

- 6) Validación del método. Las integridad de las muestras se analizaron por inmunofluorescencia así como por Western blots. Posteriormente, las EN se

corrieron en un SDS-PAGE para la separación proteica, se tiñeron con azul de Coomasie y se cortaron las bandas de interés.

3.3 Enriquecimiento de fosfopéptidos y LC/MS Espectrometría de Masas (Unidad de Proteómica, FHCRC)

- 1) Digestión con tripsina. Las piezas de gel se destiñeron con bicarbonato de amonio en acetonitrilo (25mM, 50%) y subsecuentemente se deshidrataron con acetonitrilo. Las muestras se rehidrataron con bicarbonato de amonio (100 mM/10 mM DTT) para reducir las cisteínas (56 °C , 1 h). La alquilación de las cisteínas se llevó a cabo por la adición de iodoacetamida (50 mM) en agua (RT, 30 min). Los procesos de hidratación y deshidratación se repitieron. Posteriormente la proteína se digirió con tripsina (5 ng/l; 50 mM bicarbonato de amonio, 37 °C, ON). Los péptidos se extrajeron usando ácido fórmico en agua (5% v/v) y posteriormente acetonitrilo. Los extractos fueron secados.
- 2) Enriquecimiento de fosfopéptidos. Los fosfopéptidos se enriquecieron en una columna de FeCl₃ (Cromatografía de afinidad de metal, IMAC) preparada en fresco usando perlas magnéticas Ni-NTA (Qiagen). Los péptidos se resuspendieron en acetonitrilo (80%, 0.1% TFA) y se cargaron en la columna FeCl₃ (10 µL; 30 min; 1400 rpm, RT). La resina se lavó tres veces con la solución de acetronitrilo of 80%, 0.1% TFA) y se lavó con acido fórmico (1%). Los péptidos se eluyeron dos veces con una solución de fosfato de potasio (pH7). Las muestras fueron desaladas por ZipTip™ C18 (Millipore Corporation) y analizadas por espectrometría de masas en tándem.

- 3) LC-MS/MS análisis. Se utilizó el dispositivo Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplado al aparato de espectrometría de masas Orbitrap Elite (Thermo Scientific). El sistema LC se configuró en un formato [Licklider et.al.], conteniendo una aguja de silica para el nanospray (PicoTip™, 50 µm ID) empacada con medio de fase reversa (Magic C18 AQ 100Å Michrom Bioresources Inc.) (25 cm), y una trampa IntegraFrit™ Capillary (100 µm ID). Las muestras se diluyeron en acetonitril y ácido fórmico (2% y 0.1% en agua, respectivamente) y se cargaron en la columna para separarse en dos fases móviles: A) Ácido fórmico en agua; y B) Ácido acético en acetronilo. Para la separación cromatográfica, se estableció un gradiente de 7% a 35% acetonitrilo en acido formico a un flujo 400 nL/min en 90 min. El espectrómetro se operó en modo MS/MS dependiente con el rango m/z 400-1800. La resolución de masa se fijó a 120,000. Para cada ciclo, los 20 iones mas abundantes se seleccionaron para el análisis MS/MS normalizando al 35% de la energía de colisión. Estos iones se excluyeron dinámicamente por 30 seg.
- 4) Análisis de los datos. Los análisis de los datos se hicieron por el software Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific). Los datos se compararon con la base de datos de las secuencias proteicas de ratón (International Protein Index v3.79), la cual incluye los contaminantes mas comunes. El límite del corte de la tripsina se ajustó a máximo dos sitios. La tolerancia del ion precursor se estableció a 10 ppm, y la tolerancia de fragmentación del ion a 0.6 Da. Para la detección de carbamidometilación de cisteínas, la oxidación de metioninas y la fosforilación en serina, treonina y tirosina se utilizaron modificaciones variables. Se utilizó Sequest

(Eng y col., 1994) para la búsqueda de resultados, la cual se corrió por un percolador para identificar los marcadores (Käll y col., 2007).

3.4 Western Blots

Las EN y extractos nucleares se purificaron como se describió previamente (Modificado de Korfali y col., 2010; Rincón-Arano y col., 2012). Brevemente, las células se resuspendieron en la solución de sacarosa (0.32M Sacarosa, 3mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 0.1mM EDTA y 1.5% NP- 40, coctel de inhibidores de proteasa libres de EDTA, PMSF 1 mM y DTT 0.1 mM), incubándose por 5 min en hielo. Los núcleos se recuperaron después de centrifugarse (1500 g, 10 min) y se lavaron con la solución de sacarosa sin detergente. En el caso de extractos nucleares, estos se resuspendieron en solución de ensayos de radioinmunoprecipitación (RIPA) y fueron sonicados (5 sec, 5X) a una potencia de 40% (Fisher Scientific sonic dismembranator, Model 505). El lisado se incubo en hielo por 10 min y se centrifugó nuevamente (14000 g, 30 min). Tanto los extractos nucleares como EN fueron cuantificadas por el kit BCA (Pierce, Cat. No. 23238). 50 ug-100 ug de proteína se resuspendieron en amortiguador de cargado (Novex life technologies, Cat. no. N00007) para ser corrido en geles de acrilamida 4-20% (BIORAD, Cat. no. 456-1094) a 100 Volts /1 h. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Life technologies, Cat no. 88518) en amortiguador TRIS-Glicina-SDS/20% Metanol a 100 Volts por 2 h. Posteriormente, las membranas se bloquearon en solución de bloqueo LI-COR (LI-COR Odyssey, Cat. no. 927-40000) o con solución de BSA (5% BSA, 0.1 % Tween 20/ TBS= TBST) a 4°C para subsecuentemente ser incubadas con los anticuerpos primarios por 2h (toda la noche, ON, en algunos casos). Las membranas se lavaron tres veces (solución TBS con 0.1 % Tween 20, TBST) y se incubaron

con los anticuerpos secundarios según el caso en solución de bloqueo por 1 h a RT. Las membranas se lavaron nuevamente y la señal se detectó por quimioluminiscencia o por un sistema de imagen infrarroja (LICOR Odyssey, LI-COR Biosciences). Los anticuerpos primarios usados fueron: anticuerpo policlonal anti-PARP de oveja (1:1000 dil; Santa Cruz, sc-9935), anti-prelamin A monoclonal (PL-1C7) de ratón (1mg/ml ; FHCRC), anti-prelamin A monoclonal 7G11 de rata (1µg/ml; Millipore; Cat no. MABT345), anti-β actina de ratón (1:1000 Dil; Cell Signaling technology; Cat no. 3700S), anti-lamin A/C de conejo (1:200 Dil; Abcam, ab108595), anti-FLAG de ratón (1:1000 Dil; Thermo Fisher Scientific PA1-984B). Anticuerpos secundarios: anti-conejo de burro IRDYE 680CW y anti-ratón IRDYE 800CW (1:15000 dil; LI-COR Biosciences, Cat. No. 926-68073 and 926-32212) anticuerpos conjugados con HRP anti-conejo, oveja y ratón (1:15000 dil, Jackson Immunoresearch, 711-036-1552, 705-036-147, 715-036-150).

3.5. Estudios de inmunolocalización

Inmunofluorescencias.

Mioblastos y fibroblastos (C2C12 y MEFs) fueron cultivados en laminillas con cámaras (500,000 cels/cámara; Nunc Lab-Tek, Cat. No. 177399) o bien, en laminas gelatinizadas o con policisteína (G1E). Se succionó el medio de las laminillas y se lavaron con PBS. Las células se fijaron con paraformaldehído (4%/PBS) por 10 min a RT. En el caso de las células con el transgen *GFP-Lmna*, se fijaron 24 h después de la inducción con doxiciclina (0.1 µM). Las laminillas fueron lavadas con PBS (5 min, 3X) para proceder con la permeabilización (0.2% Tritón/PBS, 10 min) y el lavado con PBS (5 min, 3X). En el caso de las células fijadas con metanol, las laminillas se incubaron en metanol frío a -20C por 10 min sin necesidad de

permeabilización. Las laminillas se bloquearon con solución PAT (1% BSA, 0.1% Tween 20 in PBS) por 30 min y después fueron incubadas en una cámara húmeda con los anticuerpos primarios por 2 h (RT). Las laminillas fueron lavadas con PBS/0.02%Tween (5 min 3X) e incubadas con el anticuerpo secundario en solución PAT por 1 h (RT). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-prelamin A PL-1C7 (1:100 sobrenadante o 1 µg/µl para Ab purificado; FHCRC); anti-prelamin A 7G11 de rata (1mg/ml; Millipore), anti-Lamin B policlonal de oveja (1:1000 dil; Santa Cruz Biotechnologies, sc-6217); anti-lamin A/C de conejo (1:200 dil; Abcam, ab108595). Los anticuerpos secundarios incluyen: anti-ratón IgG originado en burro Alexa Fluor-488 (1:200 dil; Invitrogen Life Technologies, Cat no. A21202), anti-conejo IgG originado en burro Alexa fluor-594 (1:200 dil; Invitrogen Life Technologies, Cat no. A21207), anti-ratón IgG originado en burro Alexa fluor-594 (1:200 dil; Invitrogen Life Technologies, Cat no. A21203), anti-rata IgG originado en burro Alexa fluor 595(1:200 dil; Invitrogen Life technologies, Cat no A21209) o anti-rata IgG originado en oveja Alexa fluor-647 (1:200 dil, Cat. no. A31571.) Las laminillas se montaron en Slow Fade Gold con DAPI (Invitrogen Life technologies, Cat No. S36940).

Para la detección de la proteína endógena prelamina A por el anticuerpo PL-1C7 simultánea en MEFs *Lmna*^{-/-} y MEFs, estas células se trataron con tripsina, cuantificaron y fueron mezcladas en partes iguales para cultivarse en una laminilla. Las inmunotinciones fueron realizadas como se describe anteriormente.

Microscopía y análisis de imágenes.

La adquisición de las imágenes se llevó a cabo en el sistema Delta Visión Elite (Applied Precision Inc). 38-60 secciones ópticas se obtuvieron por cada laminilla usando el eje-z cada

0.2 μ m. Proyecciones de 1 μ m se generaron usando el promedio de la señal por canal. El ruido de fondo en las imágenes se corrigió usando el software SoftWoRX (Applied Precision Inc.) y se procesaron en ImageJ (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014). La cuantificación de la señal de la Prelamina A, lamina A y lamina B en la EN se hizo usando los perfiles de intensidad de fluorescencia y un nuevo algoritmo: "Índice de fluctuación relativa". Las graficas de intensidad de fluorescencia se obtuvieron de una línea trazada en un fragmento de la EN de células representativas usando la herramienta Plot profile de ImageJ. Para modelar el índice de fluctuación, las imágenes 3D fueron exportadas como series de 16 bit. Por cada serie se derivó el máximo de intensidad por proyección (maximum intensity projection, MIP) para los canales de DAPI y laminas. Los límites de cada núcleo y su respectivo contorno marcado por lamina se obtuvieron por cada imagen 2D usando un procedimiento de dos pasos: 1) El límite inicial se estimó usando el método de máxima intensidad de Otsu (Otsu y col., 1979). Entonces, se definió el contorno de cada núcleo por el campo vector de gradiente (GVF) basado en el método de segmentación (Xu y col., 1998). Los parámetros fueron estimados experimentalmente de las imágenes, empleando 75 iteraciones para obtener el contorno final del núcleo. El Índice de fluctuación se modeló a partir de dos canales (Canal1: referencia, Lamina B y canal 2: experimental, lamin A o prelamina A) de cada imagen MIP, se normalizó la intensidad alrededor de la EN en los dos canales y se obtuvo el radio entre ambos ($I_{\text{canal1}}/I_{\text{canal2}}$, $I_{\text{canal2}}/I_{\text{canal1}}$) para ser normalizado a un rango final de 0 a 1.

3.6. Proteínas de fusión Lamina A

Desarrollo de líneas estables GFP-Lmna

El cADN de la LMNA codificando los 665 aminoácidos de la prelamina A se clonó en el vector pEGFP-C1 (Clontech) usando los sitios *XhoI* y *BamHI*. El cDNA de la fusión *GFP-Lmna* se transfirió en un sistema de expresión inducible basado en el sistema de transposon Tol2/TRE y de la transposasa Tol2 (Balciunas y col., 2006). Este vector se modificó de su versión original por la introducción de un sistema de tetraciclina usando un sistema de expresión dependiente de doxiciclina (Amin y Groudine, en preparación). El plásmido *GFP-Lmna* se co-transfectó con la transposasa Tol2 (ratio 1:5) en las células MEF *Lmna*^{-/-} y C2C12 con el sistema Fugene HD (Promega, Cat. No. E2311). Las células se seleccionaron con puromicina (2 µg/ml; Invitrogen, Cat. no. A1113802) por dos semanas. La expresión se indujo con Doxiciclina (0.1 µg/ml, Sigma, Cat. no. D9871) por 24h a 37°C.

Desarrollo de plásmidos 3XFLAG- hLmna

El plásmido portador del cADN de la LMNA humana (hLmna) fusionada con el péptido 3XFLAG se obtuvo de GeneCopoeia (ORF, EX-Z3407-M12). Fragmentos sintéticos de ADN con las mutaciones asociadas a fenotipos progeroides en la lamina A previamente reportadas se diseñaron e introdujeron independientemente en el 3XFLAG-LMNA por el reemplazo del extremo carboxilo-terminal usando el sistema Gibson (NEB, Cat. #E5510S). Los plásmidos fueron transfectados transitoriamente en MEFs *Lmna*^{-/-} (1x10⁵ células/Transfección) usando lipofectamina (3000 lipofectamin kit, ThermoFisher Scientific, Cat. No. L3000008). Para su análisis, las células se trataron con tripsina/0.05% EDTA 48 h

después de la transfección y se prepararon para western blots o inmunofluorescencias como se describió anteriormente.

3.7 Tratamientos de inhibición

Inhibición de la farnesilación

El inhibidor de la farnesil-transferasa Lonafarnib se uso a 3.2 μ M. En el caso de las células con *GFP-Lmna*, el inhibidor se agregó a las células 4 h después de la inducción con doxiciclina. Las células se prepararon para Western blot o Inmunofluorescencia como se ha descrito.

Inhibición de la actividad de ZMPSTE24

El inhibidor de proteasas de HIV C2C12 Indinavir (IDV, H₂O, 20 μ M) se agregó a mioblastos cultivados en laminillas por 24 h. Las células se lavaron, fijaron y analizaron como se describió anteriormente.

3.8. Desarrollo del anticuerpo monoclonal PL-1C7

El anticuerpo monoclonal PL-1C7 se generó por la Unidad de tecnología de anticuerpos del Fred Hutchinson Cancer Research Center. Brevemente, ratones Balb/c, CD1, y Swiss Webster se inmunizaron con el péptido sintético TRSYLLGNSSPR (CHIScientific), correspondiente al carboxilo terminal de la prelamina A (Figura 3) con la proteína adyuvante KLH. Los esplenocitos se aislaron de los ratones con alto título, se fusionaron con FoxNY mielomas (BTX, Harvard Apparatus), y posteriormente los hibridomas

secretores del anticuerpo específico para el péptido se identificó y fue aislado con ClonePixII. Los anticuerpos de las clonas seleccionadas se validaron por citometría de flujo. Las clonas validadas se sub-clonaron usando ClonePixII y fueron validadas nuevamente por citometría de flujo. EL anticuerpo PL-1C7 se caracterizó y el epítipo se mapeo a TRSYLLGNSSPR por inmunoensayos tipo ELISA.

Péptidos y mapeo del epítipo PL-1C7

Se utilizaron los siguientes péptidos sintéticos (Thermo Scientific) para los ensayos de ELISA:

pLMNA_WT: TRSYLLGNSSPR

pLMNA_1: AAAAYLLGNSSPR

pLMNA_2: TRSAAAGNSSPR

pLMNA_3: TRSYLLAAASPR

pLMNA_4: TRSYLLGNSAAA

pLMNA_Mat: GSFGDNLVTRSY

pLMNA_Frag: LLGNSSPRTQS

3.9. Detección de antígeno nuclear por citometría de flujo intracelular.

Las células de interés fueron cultivadas en cajas de cultivo de 10 cm (1×10^6). En el caso de las células GFP-Lmna las células se cultivaron 12 h antes de la inducción con doxiciplina. Después de 24 h las células se lavaron con PBS, tripsinizaron (Thermo Fisher Scientific, Cat no. R-001-100) y fueron recuperadas después de la centrifugación (400 g, 5 min). Las células se fijaron con formaldehído (PFA 3%; 2% Sacarosa/PBS, RT, 10 min) Las células se lavaron con PBS (3X) y se permeabilizaron con 0.2% Tritón/PBS. Se aplicó otro lavado con PBS (3X) y se resuspendieron en solución de bloqueo (2% BSA, 4% FBS in PBS) por 3 h a 4°C. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo por 12 h a 4°C. Las células se lavaron con 0.2% Tween/PBS (3X) y se incubaron con los anticuerpos secundarios por 30 min a 4°C, para lavarse subsecuentemente con PBS (3X) y analizarse por citometría de flujo usando el citómetro BD Canto cytometer (BD Biosciences). Se analizaron 1×10^4 eventos por población. Los anticuerpos primarios utilizados incluyen: anti-prelamin A de ratón PL-1C7 (1:5 dil sobrenadante o 1 μ g/muestra del purificado FHCRG); anti-Lamin B de oveja (1:200 dil, Santa Cruz Biotechnologies, sc-6217); anti-Lamin A/C de conejo (1:10 dil; Abcam, ab133256). Los anticuerpos secundarios usados fueron: anti-ratón de burro IgG Alexa Fluor-488 (1:500 dil; Invitrogen Life Technologies, Cat no. A21202), anti-conejo de burro IgG Alexa fluor-594 (1:500 dil; Invitrogen Life Technologies, Cat no. A21203).

4. RESULTADOS

4.1. Estudio del fosfoproteoma de la envoltura nuclear durante la diferenciación en células de mamífero (*Mus musculus*).

Validación del aislamiento de EN

La integridad de las EN aisladas se confirmó mediante la detección de la proteína específica de EN Lamina B por inmunofluorescencia en los pasos de purificación (Figura 4A). La presencia de componentes del citoesqueleto en las EN se descartó por la inmunotinción de la proteína actina en su forma polimerizada (Faloidina conjugada), mientras que la eliminación del contenido nucleoplásmico a lo largo del tratamiento fue corroborada mediante la detección del ADN (DAPI), cuya señal disminuyó considerablemente después de los lavados de alta astringencia (Figura 4A). Sin embargo, el material nucleoplásmico no se disoció en su totalidad en las EN como lo reflejó la presencia de ADN en las muestras finales, sugiriendo dos posibilidades: 1) existen interacciones entre la cromatina (o ADN) y componentes de la EN altamente estables que resisten los tratamientos digestión de ADN por la DNasa y de lavados de alta astringencia, protegiendo potencialmente los sitios de accesibilidad a las endonucleasas; y/o 2) Es posible que las altas concentraciones de sales usadas para desestabilizar el polímero de la lámina nuclear desencadene la precipitación de proteínas nucleares con unión al ADN, lo que a su vez protege la digestión por endonucleasas.

El enriquecimiento de proteínas características de la EN se demostró por Western blots de las muestras de células G1E no diferenciadas y diferenciadas (G1Eundif ; +

Estradiol, 30h = G1Edif) mediante la detección de las proteínas lamina B, emerina y LAP2, en contraste con extractos nucleares, donde el factor transcripcional Brg-1 se encontró enriquecido (Figura 4B). Trabajos previos demostraron que el RE es un contaminante común en el fraccionamiento subcelular de las EN (Schimer, 2003; Florens y col. 2008; Korfali y col., 2010) debido a su continuidad con la MNE, por lo que la ausencia de esta contaminación se comprobó mediante la detección de la proteína calreticulina (Figura 4B).

Posterior a la confirmación de la integridad de las EN, las proteínas se obtuvieron por dos métodos: 1) extracción alcalina (NaOH), y 2) extracción por detergentes y sales (1% β -D- octil glucosido, NaCl 400 mM) como se describe en la sección Materiales y Métodos. La utilización de estos métodos diferenciales de extracción permitió la purificación de proteínas con diversas características bioquímicas. La extracción alcalina por ejemplo, busca desestabilizar las interacciones proteína-proteína, sin solubilizar las membranas, favoreciendo el enriquecimiento de proteínas transmembranales (Florens y col., 2008; Korfali y col, 2010). En contraste, el uso de detergentes y sales en la extracción proteica permite la desestabilización de los lípidos, sin perturbar el polímero de la lámina nuclear, por lo tanto permite el enriquecimiento de proteínas insolubles y asociadas a la lamina (Florens y col., 2009; Korfali y col, 2010). Consistente con estos principios, posterior al enriquecimiento de fosfopéptidos y la secuenciación por espectrometría de masas, las proteínas transmembranales Nup210 y Sun1 (componentes del NPC y LINC, respectivamente) (Raíces y D'Ángelo, 2010), fueron detectadas en las EN procesadas por métodos de extracción alcalinos. En contraste, las proteínas de la lámina nuclear lamina A y la lamina B se detectaron en la extracción proteica por detergentes y sales.

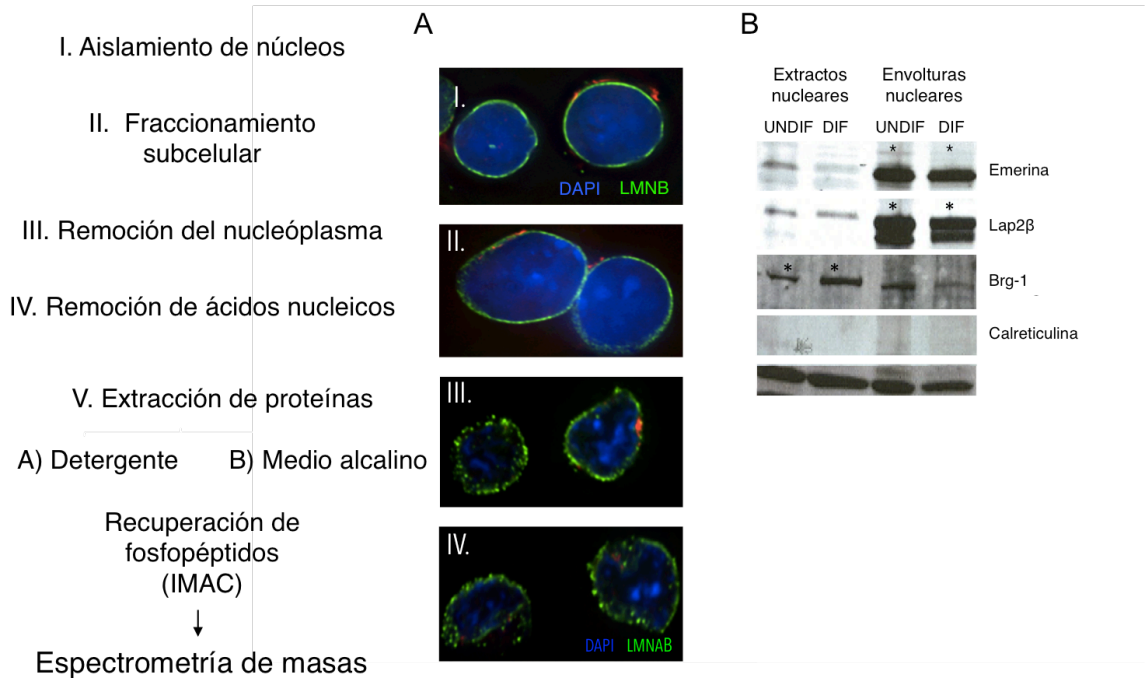


Figura 4. Enriquecimiento de EN mediante fraccionamiento subcelular bioquímico. A) EN analizadas por la inmunodetección de la proteína Lamina B (Verde) y el ADN (DAPI) en los cuatro primeros pasos de purificación. B) Inmunodetección por Western blot de proteínas específicas de EN (Emerina y Lap2B), el factor transcripcional Brg-1 y la proteína específica del RE: calreticulina, en las EN aisladas de G1Eundif y G1Edif, en contraste con su enriquecimiento en extractos nucleares.

Estudio del fosfoproteoma durante la diferenciación en líneas celulares del linaje eritroide (G1E).

El estudio del fosfoproteoma de la EN de este trabajo combinó la extracción de proteínas de las EN aisladas, el enriquecimiento de fosfopéptidos mediante el uso de una columna de afinidad de metal (FeCl_3 , IMAC), espectrometría de masas en tándem de alta

precisión (LC-MS/MS), el análisis de los datos por el software Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific) y subsecuentes acercamientos analíticos *in silico*.

Los experimentos del fosfoproteoma de la EN se corrieron por duplicado, consistiendo en dos experimentos independientes (Exp1 y Exp2) con dos muestras cada uno: G1E no diferenciadas (Proeritroblastos, G1Eund) y G1E diferenciadas (Eritroblastos, G1Edif). Una tasa de falso descubrimiento (FDR) de 1% aplicado a los péptidos y luego a nivel de proteína por el software Protein Discovery, resultó en la identificación de 1017 y 909 fosfopéptidos para Exp1 y Exp2, respectivamente. La discrepancia entre los dos experimentos se debe a la diferencia en el enriquecimiento de péptidos extraídos de las EN por métodos alcalinos (Exp1= 308 y Exp2=200), mientras que en ambos experimentos se identificaron el mismo número de fosfopéptidos de las EN aisladas por detergentes y sales (Exp1= 709, Exp2=709). La disparidad detectada en las muestras obtenidas por los métodos de extracción alcalina se puede deber a las siguientes posibilidades: 1) variaciones técnicas en la preparación de las EN entre Exp1 y Exp2, particularmente en la extracción de proteínas; 2) abundancia diferencial de los fosfopéptidos por procesos regulatorios en determinado momento fisiológico de la población celular, dado que las células analizadas no están sincronizadas; 3) variaciones en el enriquecimiento de fosfopéptidos por la columna de afinidad de metal (IMAC), la cual se ha reportado diferencial ante cambios de pH y condiciones de elución y 4) variaciones intrínsecas del ajuste de las condiciones para la secuenciación en el espectrómetro de masas. Sin embargo, en la mayor parte los resultados confirman la reproducibilidad y alta sensibilidad del acoplamiento entre el aislamiento de EN, la extracción de proteínas y su secuenciación. Los fosfopéptidos se obtuvieron en una base de datos generada en la Unidad de

Proteómica (FHCRC), donde cada fosfopéptido identificado se denominó con el nombre del gen que codifica la proteína, así como se presentan los parámetros cuantitativos en la secuenciación por espectrometría de masas como se muestran en la Tabla 1. Por cada estado de diferenciación y residuo se obtuvo una tabla con los fosfopéptidos identificados, los cuales se analizaron manualmente para seleccionar los péptidos representados en los dos experimentos.

Fixed Modifications	Search Enzyme: trypsin
C @ 57.021	Search Engine: X! Tandem (k-score)
Variable Modifications	Mass Spec Type: Thermo Scientific LTQ Orbitrap
C^ @ -17.027	
E^ @ -18.011	
M' @ 15.995	
Q^ @ -17.027	
S" @ 79.966	
T~ @ 79.966	
Y# @ 79.966	

All peptides matching the following query:

Peptide Filter: (FractionalDeltaMass <= 15) AND (PeptideProphetErrorRate <= 0.05) AND (Peptide CONTAINS ~)
 Peptide Sort: GeneName ASC

Expect	Ion%	CalcMH+	dMass	fdMass	PepProphet	Peptide	SeqHits	Gene Name
0.3400	57%	1657.8309	+0.0020	0.0020	0.8230	K.VQGTGVT~PPP	4	2210010A19Rik
4.4000	92%	897.4230	+0.0020	0.0020	0.8322	TPLGTR.S	1	Ahctf1
0.0220	37%	1819.9102	+0.0050	0.0050	0.9935	R.SLT~PPFR.V	5	Bat2d
0.2700	63%	1125.6068	+0.0010	0.0010	0.9895	K.AFGSGIDIKPGT ~PPIGGR.S R.AYVLIT~PLR.N	1	C79407

Tabla 1. Base de datos representativa derivada del software Discovery Proteome en la que se muestran ejemplos de los fosfopéptidos identificados por espectrometría de masas (Unidad de proteómica, FHCRC).

En total se definieron 523 sitios de fosforilación en 392 proteínas localizadas en la envoltura nuclear. En general, los eventos de fosforilación se dan en su mayoría en los aminoácidos hidroxilados serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr) (Ghelis y col. 2011), los cuales representan cerca del 17% de los aminoácidos en las proteínas existentes (Echols y col., 2002). Distintos trabajos de fosfoproteoma han reportado la relación de estas fosforilaciones por aminoácidos (Tabla 2). Los primeros estudios del fosfoproteoma en fibroblastos de pollo por ejemplo, revelaron una relación del 90%, 10% y 0.05% para pSer, pThr y pTyr, respectivamente (Hunter y Sefton, 1980); el cual ha sido redefinido en el caso de tejidos de ratón (pSer, pThr y pTyr : 90%, 8% y 2%;) y en distintos análisis de células humanas (pSer, pThr y pTyr : 86.4%, 11.8% y 1.8%) (Tabla 1) (Hunter y Sefton, 1980; Olsen y col., 2006; Huttlin y col., 2010 Olsen y col., 2010; Sharma y col. 2014). Consistente con estos estudios, la relación global de las fosforilaciones en la EN de las células G1E correspondió a: 85.57%, 13.66% y 0.75% para pSer, pThr y pTyr, respectivamente (Figura 5). En particular, estos resultados son congruentes con los estudios del fosfoproteoma de hESC ante procesos de diferenciación por el morfógeno BMP y otros protocolos de diferenciación (p.e. Análogo DAG) (Rigbolt y col., 2011; Van Hoof, y col., 2010).

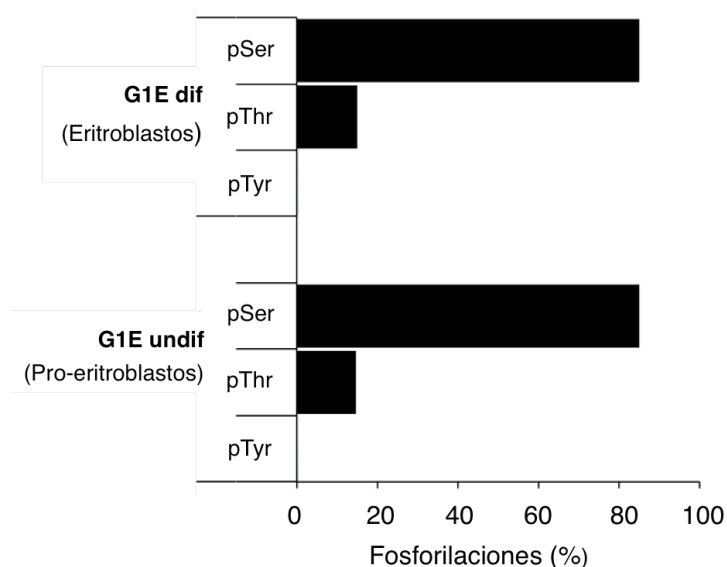


Figura 5. La abundancia de fosforilaciones identificadas en las proteínas de la EN de células eritroides se comporta de acuerdo al ratio teórico por residuo hidroxilado. (Serina=pSer, Treonina=pThr y Tirosina=pTyr)

Si bien los resultados del fosfoproteoma de las EN reportados en este trabajo no pueden compararse directamente con los estudios reportados por otros grupos, dado las diferencias en los modelos de estudio, condiciones experimentales y los métodos de análisis (p.e. métodos cuantitativos por el uso de aminoácidos marcados por isótopos; el tipo celular analizado; el número de fosfopéptidos detectados; entre otros), la consistencia en la abundancia de fosfoserinas, fosfotreoninas y fosfotirosinas en la EN es significativa.

pSer (%)	PThr (%)	pTyr (%)	Tipo celular (Especie)	Respuesta a:	Ref./Método/Fracción celular
90	10	0.05	Fibroblastos (<i>G. Gallus</i>)	Infección viral	Hunter y col., 1980 Ab and 2D-SDSPAGE
86.4	11.8	1.8	HeLa (S3) (<i>H. sapiens</i>)	EGF	Olsen y col., 2006 SILAC/Extractos nucleares
83	10	2	Tejidos (<i>M. musculus</i>)		Hutlin y col., 2010 Lisados totales
82	14	4	hESC (<i>H. sapiens</i>)		Brill y col., 2009 Lisados totales
80.6	17.54	1.59	hESC (<i>H. sapiens</i>)	Diferenciación	Van Hoof y col., 2010 SILAC/Lisados totales
79.9	17.39	2.939	hESC (<i>H. sapiens</i>)	Diferenciación	Rigtoni y col., 2011 SILAC/ Lisados totales
87.32	11.82	0.8667	Hela (S3) (<i>H. sapiens</i>)	Mitosis	Humprey y col., 2015 EasyPhos/ Lisados totales
84.1	15.5	0.4 (+ INH→ 4)	Hela (S3) (<i>H. sapiens</i>)	EGF and mitosis	Sharma y col., 2014 / Lisados totales
85.57	13.66	0.75	G1E (M. musculus)	Diferenciación	Presente tesis doctoral Envolturas nucleares

Tabla 2. Estudios del fosfoproteoma celular en diferentes sistemas. Definición del radio de fosforilación en los residuos hidroxilados serina (pSer), treonina (pThr) y tirosina (pTyr), detectados por diversos grupos de investigación . (SILAC= Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture, método cuantitativo).

La baja abundancia de la fosforilación en tirosinas detectada en la EN es consistente con los estudios previos (Tabla 2). Esta fosforilación se da en proteínas abundantes, en contraste con lo que sugieren los reportes pioneros de fosfoproteómica (Olsen y col., 2006; Grulén y col., 2005; Sharma y col., 2014). Por tanto, la disminución en fosfotirosinas se puede explicar por las siguientes razones: 1) el bajo número de tirosina-cinasas celulares, en comparación con la cantidad de serina/treonina-cinasas; 2) la regulación negativa prevalente en las tirosina-cinasas; 3) la labilidad de la fosfotirosina, acompañada de la alta actividad de tirosina-fosfatasas; y 4) el papel de la fosfotirosinas como reguladores en las proteínas, más que como componentes estructurales (Olsen y col., 2006; Hunter y Safran, 1980; Hunter y col., 2009; Olsen y col., 2010; Sharma y col., 2014; Humphrey y col., 2015).

Soportando las hipótesis previas, el 1.7% del genoma humano codifica para proteínas quinasas, correspondiendo a 518 genes, de los cuales únicamente 90 codifican para tirosina cinasas (Robinson y col., 2000; Manning y col., 2002; Subramani y col., 2013). Además, solo 32 de estas tirosina quinasas son intracelulares, mientras que las 58 restantes son receptores de membrana (Manning y col., 2002, Miranda-Savedra y col., 2006). Las tirosina-cinasas constituyen el 6% del total de cinasas existentes en mamíferos y se correlaciona con la abundancia de sus ortólogos en plantas donde representan el 4% (Bentem y col., 2008), lo cual abre preguntas interesantes respecto a la evolución de esta familia de proteínas y la modificación que catalizan. Estas aseveraciones explican el enriquecimiento casi nulo de fosfotirosinas en la EN, ya que el fraccionamiento subcelular usado en este estudio permite la detección de proteínas intracelulares.

Adicionalmente, las tirosina-cinasas se encuentran en estado inactivo la mayor parte del ciclo celular, catalizando una fosforilación lábil que es regulada por numerosas

fosfatasa (Sharma y col., 2014). En conjunto, estos factores proveen una dinámica de recambio constante de la fosforilación en tirosinas que ha dificultado su detección (Olsen y col., 2006). Apoyando estas ideas, la optimización reciente de condiciones de análisis del fosfoproteoma en extractos nucleares acoplado con el uso de inhibidores de fosfatasa específicas para tirosinas (Pervanadato) permitió el incremento en el enriquecimiento de pTyr (10X, Tabla1) (Sharma y col., 2014.). Dicho acercamiento experimental es presumiblemente útil para redefinir la fosforilación en tirosinas en estudios futuros.

Se analizó el número de fosforilaciones por proteína detectada en la EN de las células eritroides (G1Eund y G1Edif). La mayor parte de las proteínas de la EN presentaron una sola fosforilación (83% de 392 proteínas en G1Eund y G1Edif, respectivamente), mientras que el resto presentaron dos o más fosforilaciones (16.7% de 392 proteínas) (Figura 6A). Estos resultados son consistentes con dos trabajos independientes en células pluripotentes humanas (hESC), donde la mayor parte de las proteínas encontraron fosforiladas en un solo sitio (90% de 3067 y 66% de 15,004) (Von Hoof, 2010; Rogtoni y col., 2011) así como en células terminalmente diferenciadas (Hela) ante la estimulación con el factor de crecimiento EGF (64% de 6600) (Olsen y col., 2006). En contraste, la optimización del acercamiento experimental cuantitativa mediante la comparación de una librería de péptidos no modificados y los péptidos fosforilados correspondientes, reportó la identificación de cerca de 40,000 fosfopéptidos, correspondiendo a 7,500 proteínas, en donde la mayor parte de las proteínas están fosforiladas en más de un sitio (Sharma y col., 2014). Esto es consistente con los perfiles de fosfoproteoma de tejidos de ratón donde el 80% de 284,000 fosfopéptidos presentaron más de un sitio de fosforilación (Huttlin y col., 2010). Por tanto, una posibilidad viable es que el enriquecimiento de fosforilaciones sito-

específicas en la EN tiene una relevancia biológica en procesos de diferenciación celular, sugiriendo que la complejidad en la regulación de este proceso implica una amplia gama de eventos regulatorios corriente abajo de las fosforilaciones en la EN. Asimismo, otra posibilidad es las fosforilaciones menos lábiles en la EN (potencialmente componentes principales de la estructura proteica), presentan resistencia al multi-tratamiento para la obtención de EN y por tanto, son aquellas mas enriquecidas.

Análisis bioinformáticos mediante la colaboración con Rodrigo Arzate (Posgrado de Ciencias biomédicas, Instituto de Fisiología Celular) se confirmó la preponderancia de las fosforilaciones en un sitio único en las proteínas de la EN para los dos estados (80% y 82% en proeritroblastos y eritroblastos, respectivamente) (Figura 6B). Estas observaciones no excluyen que los péptidos identificados con mas de una fosforilación jueguen un papel regulatorio en la diferenciación, ya que estudios previos han detectado que la mayor parte de las proteínas con fosforilaciones reguladas (77%), tienen al menos otro fosfopéptido, el cual es regulado independientemente. Este análisis también reveló que la mayor cantidad de las proteínas fosforiladas en un sitio único son diferencialmente reguladas entre los dos estadios (86%) (Figura 6C).

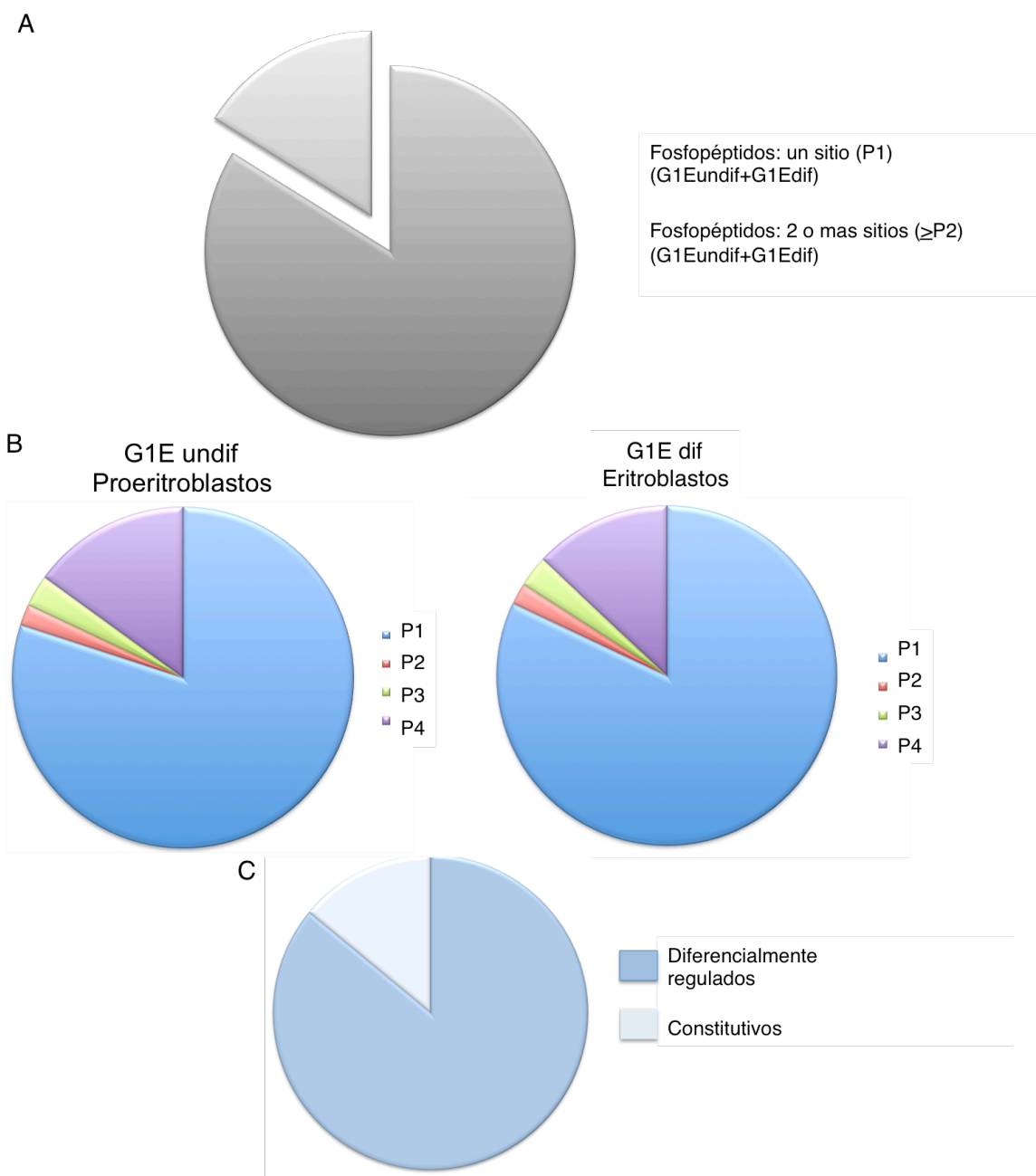


Figura 6. El fosfoproteoma de la envoltura nuclear en células eritroides está constituido principalmente por eventos únicos de fosforilación en las proteínas identificadas. Porcentaje de proteínas de la EN identificadas con un sitio fosforilado (P1, gris) y con 2 o mas sitios ($P_{\geq 2}$, blanco). B. Distribución de porcentajes específicos en los dos estadios de diferenciación para proteínas con un sitio fosforilado (P1, azul), dos (P2,

rojo), tres (P3, verde) y cuatro (P4, morado). C. Sitios únicos de fosforilación diferencialmente regulados entre proeritroblastos y eritroblastos (diferencialmente regulados).

Se analizó el porcentaje de fosfopéptidos representados por estadio de diferenciación, permitiendo la identificación de 75.8% de las proteínas fosforiladas solo en proeritroblastos (G1Eundif) y el 24.3 % de ellas fosforiladas solo en células diferenciadas (G1Edif) (Figura 7).

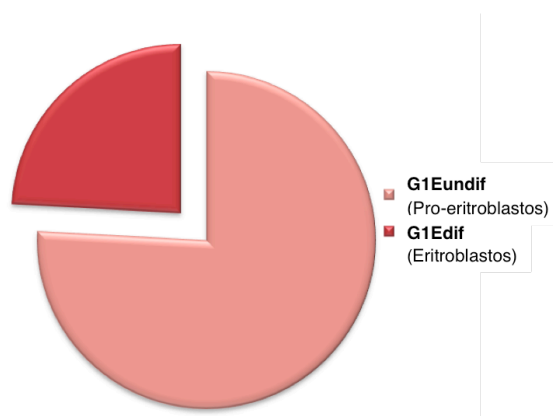


Figura 7. Proteínas de la EN fosforiladas en un aminoácido por estadio de diferenciación. Proeritroblastos (G1Eundif, rojo pálido) vs Eritroblastos (G1Edif, rojo intenso).

Los resultados del fosfoproteoma de la EN reportados en este trabajo (23.4% de sitios diferencialmente regulados post-inducción) son comparables con el comportamiento del fosfoproteoma ante diversas respuestas celulares y modelos. Por ejemplo, en levaduras, 19.81% de las fosforilaciones son reguladas en respuesta a feromonas, 10% de

fosforilaciones son reguladas en respuesta a insulina en células de ratón; 20% y 15.56% en respuesta a procesos de división celular y al factor de crecimiento EGF, en células humanas, mientras que 9% de las fosforilaciones son reguladas en respuesta al daño del ADN por radiación iónica en linfocitos B (Gruhler y col., 2005; Olsen y col., 2006, Betzinnen y col., 2010; Olsen y col., 2010; Sharma y col. 2014; Humprey y col. 2015; Huang y col., 2016). En conjunto, estos resultados sugieren que la mayor parte de las fosforilaciones en las células son estables y se encuentran en estado basal, presentando una tendencia de cambios relevantes entre el 10-25% de fosforilaciones reguladas, que se conserva desde levaduras a mamíferos a nivel tanto celular como subcelular. Por otro lado, la utilización de técnicas recientemente desarrolladas de fosfoproteómica, en paralelo con estudios de alta resolución y mayor cobertura de secuenciación por espectrometría de masas, permitirá la validación de estas observaciones en la EN en términos cuantitativos.

Se identificó un número de proteínas equiparable con las fosforilaciones en sitio único de las células diferenciadas con fosforilaciones en diferentes residuos tanto en proeritroblastos como eritroblastos. Dado que las fosforilaciones en diferentes residuos de la misma proteína suelen regular diferentes funciones, se ha sugerido que estos eventos se deben estudiar sitio-específicamente y no así en el contexto de la proteína completa (Olsen y col., 2006). Entonces, en ese escenario el porcentaje de proteínas de EN fosforiladas solo en eritroblastos (24.3 %, G1Edif), asciende a casi 40%.

Estudios del análisis del fosfoproteoma en células pluripotentes hESC en comparación con células diferenciadas definió 45% de sitios de fosforilación regulados, mientras que estudios con diferentes protocolos de diferenciación encontraron 35% y 50% (Análogo del DAG y BMP) de fosforilaciones reguladas (Van Hoof y col., 2009; Bill y col.,

2010; Rigbolt y col., 2011). Estos resultados comparados con el 24.3-40% de sitios diferencialmente regulados en células eritroides (G1E) reportado en este trabajo, sugieren que distintas cascadas de fosforilación regulan la diferenciación ante diversos estímulos, confirmando además que el programa genético de las células de estudio influye en estos patrones de fosforilación. En este sentido, es posible pensar que el fosfoproteoma en las hESC se modifica drásticamente durante la diferenciación, ya que los cambios y adaptaciones moleculares son de mayor magnitud, en contraste con células progenitoras, cuyo linaje celular ha sido especificado, como es el caso de los proeritroblastos estudiados en el presente trabajo.

Como primer acercamiento para validar la localización de las proteínas fosforiladas en la EN, se comparó si éstas han sido reportadas previamente en la literatura como parte de esta estructura. En particular, se usó la base de datos de las proteínas de membrana de la EN (NETs) definidas por el grupo de Schirmer (Schirmer y col., 2003; Schirmer y col., 2005; Korfali y col., 2010). Cerca del 65% de las proteínas fosforiladas detectadas en la EN fueron previamente reportadas como proteínas de la EN (Figura 8), incluyendo la lamina B1, lamina A, Sun2 y LAP2 así como proteínas del poro nuclear como Nup98, Nup88, Nup210 y Pom121, cuya detección confirma la eficiencia de la purificación de la EN.

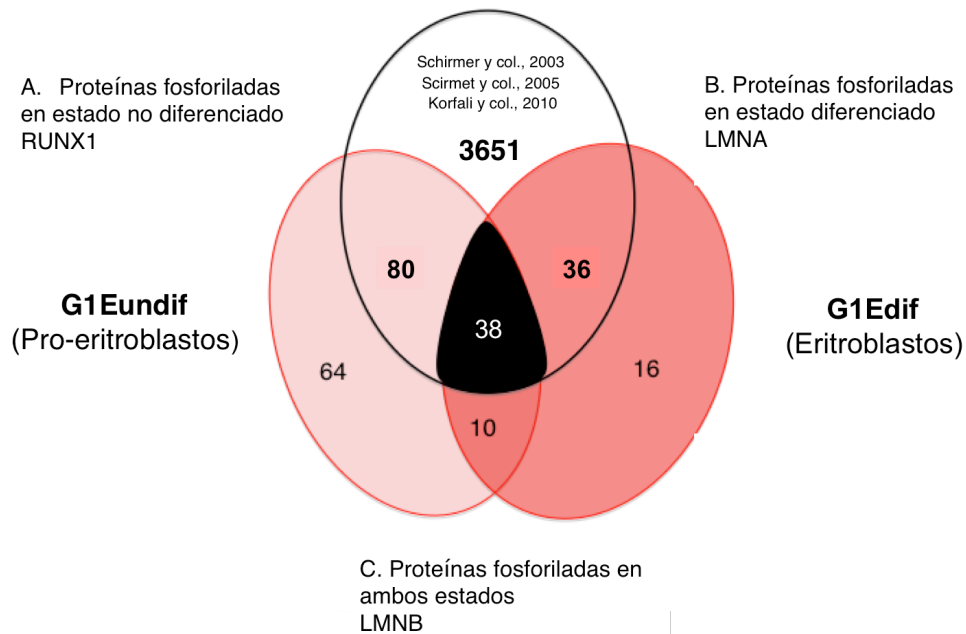


Figura 8. Comparación de las proteínas fosforiladas de la EN identificadas en cada estado de diferenciación eritroide con las proteínas previamente reportadas en la EN. El diagrama de Venn representa la validación de cerca del 65% de las proteínas de EN identificadas fosforiladas en este trabajo en comparación con la base de datos de 3651 proteínas de EN reportadas por el grupo de Schirmer (NETs), incluyendo sus análisis en células de hígado, musculo y leucocitos.

La comparación de las proteínas fosforiladas con las NETS confirmó la definición de tres grupos de proteínas en la EN de células eritroides: a) proteínas fosforiladas en ambos estados (G1Eundif y G1Edif), como el caso de Lamina B y la DNA (citosina-5)-metal-transferasa 1, DNMT1; b) proteínas fosforiladas en células no diferenciadas, como el factor Runx1 (G1Eundif) y c) proteínas fosforilados en células diferenciadas (G1Edif) como es el caso de la lamina A (Figura 8).

La detección de diversos eventos de fosforilación característicos y definidos en estudios previos por estado de diferenciación (G1Eundif o G1Edif) o bien para ambos, funcionaron controles positivos del fosfoproteoma de la EN. Por ejemplo, la fosforilación pSer22 en el factor epigenético represor de diferenciación Runx1 y la pSer12 en el factor transcripcional Gata2b se detectó solo en la EN de proeritroblastos (G1Eundif), ambos con función regulatoria temprana y preponderante en progenitores eritroides (Kuvardina y col., 2006; Butko y col., 2015). En contraste, la fosforilación pSer275 en el factor transcripcional GATA1 fue únicamente detectada en G1Edif, consistente con el papel de GATA1 en la diferenciación eritroide y con la activación de su expresión desencadenada por la adición de estradiol en el sistema de inducción usado en este trabajo. En contraste, la fosforilación pThr21 de la lamina B fue detectada tanto en G1Eundif como en G1Edif como se ha reportado previamente (Huttlin y col., 2010; Bennetzen y col., 2010; Rigbolt y col., 2011; Parker BL, 2014; Sharma y col., 2014) . Debido a estas observaciones, es posible pensar que el resto de las fosforilaciones identificadas son relevantes a nivel funcional en las proteínas encontradas en la EN, por lo que a continuación se discuten algunas de las funciones de dichas proteínas e hipótesis al respecto, lo cual sería viable explorar siempre y cuando se lleve a cabo una validación cuantitativa de las mismas en estudios futuros.

Este análisis global del fosfoproteoma permitió la identificación de un número considerable de proteínas nunca antes reportadas como parte de la EN, como es el caso de los factores reguladores epigenéticos EHNZ2 (pThr487) y la DNMT1 (pThr671), ambas fosforiladas en G1Eundif y G1Edif. EHNZ2 es una lisina-metil-transferasa de histonas, perteneciente al complejo represor Polycomb, que cataliza la modificación H3K27me1, me2 y me3 (Bredfelt y Walker, 2010). DNMT1 es una metiltransferasa del ADN que

presuntamente se une a ENHZ2, cuya actividad en la histonas precede la metilación del ADN para la represión transcripcional cooperativa de genes implicados en el desarrollo, diferenciación y supresores de tumores (Vire y col., 2006; Schlesinger y col., 2007; Bredfeldt y Walker, 2010). Evidencias indirectas apoyan la localización de EZH2 y DNMT1 en la EN, como es el caso del enriquecimiento de marcas de la cromatina catalizadas por EZH2 (H3K27me3) en los límites de los LADs y de zonas hipermetiladas del ADN en proximidad a la periferia nuclear durante la inactivación del cromosoma X (Guelen et al., 2008; Hasewaga y col., 2010; Zullo et al., 2012; Meuleman et al., 2013; Van Bortle et al., 2013). La actividad de EHNZ2 es regulada en parte, por modificaciones postraduccionales como pThr487, previamente reportada como producto de la actividad de la cinasa Cdk1. La fosforilación pThr487 regula negativamente a EHNZ2, dirigiendo a esta proteína a su degradación por el proteosoma e impactando en la represión de genes clave para la proliferación (Wu y col., 2011; Kaneko y col., 2010). Adicionalmente el evento de fosforilación pThr487 se ha reportado sobre-representado en leucemias específicas (FLB1), donde altera la localización de EHNZ2 (hacia el citoplasma), lo que presuntamente afecta su actividad (Trost y col., 2012). Por otro lado, la DNMT1 juega un papel fundamental en la preservación del patrón de metilación del ADN durante la replicación y aunque se han reportado mas de 40 eventos de fosforilación importantes para su regulación (Rogtoni y col., 2011), el sitio identificado en el presente análisis (pSer671) es nuevo en su especie, por lo que su validación y relevancia funcional deberá ser develada por trabajos futuros.

La mayor parte de las proteínas fosforiladas en la EN identificadas en el presente estudio corresponde a proteínas nucleares según los análisis de ontología (70%), consistente con lo que se esperaba (Figura 9). Este enriquecimiento es consistente con la

recuperación de fosfoproteínas nucleares en estudios previos en extractos nucleares de células humanas ante la respuesta a EGF celulares (Olsen y col, 2006), redefiniendo la localización de proteínas en la EN. En particular, se detectó que un número elevado de sitios fosforilados se encuentran en proteínas implicadas en el metabolismo del ARN, del ADN, en factores transcripcionales y en proteínas de la EN (Figura 9), apoyando lo encontrado en otros estudios del fosfoproteoma ante respuestas metabólicas y señales de diferenciación de células pluripotentes (p.e. Acido retinoico y el análogo de DAG) (Tabla 1; Olsen y col., 2006; Von Hoof y col.,2010). Nuestro acercamiento permitió la identificación de factores transcripcionales tanto activadores como represores fosforilados en la EN. Por ejemplo, el factor activador Gtf2i se detectó fosforilado en proeritroblastos (G1Eundif) en pThr557, modificación catalizada presuntamente por la cinasa Cdk2 (Chi y col., 2008). El factor transcripcional negativo Runx1, fosforilado en el residuo pSer22 y localizado en la EN de acuerdo a nuestros resultados, regula la represión de los genes de diferenciación eritroide mediante mecanismos epigenéticos (Brettingham-Moore y col., 2015). Por el otro lado, también se detectaron fosforilaciones en proteínas con un papel regulador dual, como es el caso del factor transcripcional Mybbp1a, el cual puede actuar como una activador o represor dependiendo de las proteínas a las que se asocia y las secuencias específicas de ADN (Mori y col., 2012). Mybbp1a se detectó fosforilado en los residuos pSer1174 y pSer1253 en ambos estados (G1Eundif y G1Edif), mientras que los eventos de fosforilación pThr573 y pSer574 se detectan solo en G1Eundif o G1Edif, respectivamente. Por tanto, es posible pensar que estas fosforilaciones diferenciales podrían tener una relevancia funcional sobre el rol de Mybbp1a como activador o represor.

Por otro lado, un porcentaje significativo de fosforilaciones se detectó en proteínas del citoesqueleto (19%; Figura 9), estos resultados generan la pregunta si pertenecen a una contaminación relevante, la cual tiene que ser evadida mediante una optimización futura o bien, si estos componentes del citoesqueleto tienen una localización en la EN. Cada vez existen mas estudios que confirman la interacción entre componentes de la EN y el citoesqueleto (p.e. la interacción de nesprinas con proteínas como dineína, actina y miosina); la localización de proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto en la EN (p.e. filamina A); así como eventos de translocación desde el citoplasma al núcleo y en dirección opuesta por diferentes mecanismos que implican componentes tanto citoplasmáticos como nucleares (Pandakumar y col., 2006; Mellad y col., 2012; Kim y col., 2012; Hatch y col., 2012; Tokjander y col., 2012; Kelkar y col., 2016). Por tanto, el estudio y la validación de la localización de estos componentes en la envoltura nuclear y su la futura caracterización de las fosforilaciones en este subcompartimento celular posiblemente llevará a la confirmación y redefinición de los mecanismos moleculares que regulatorios.

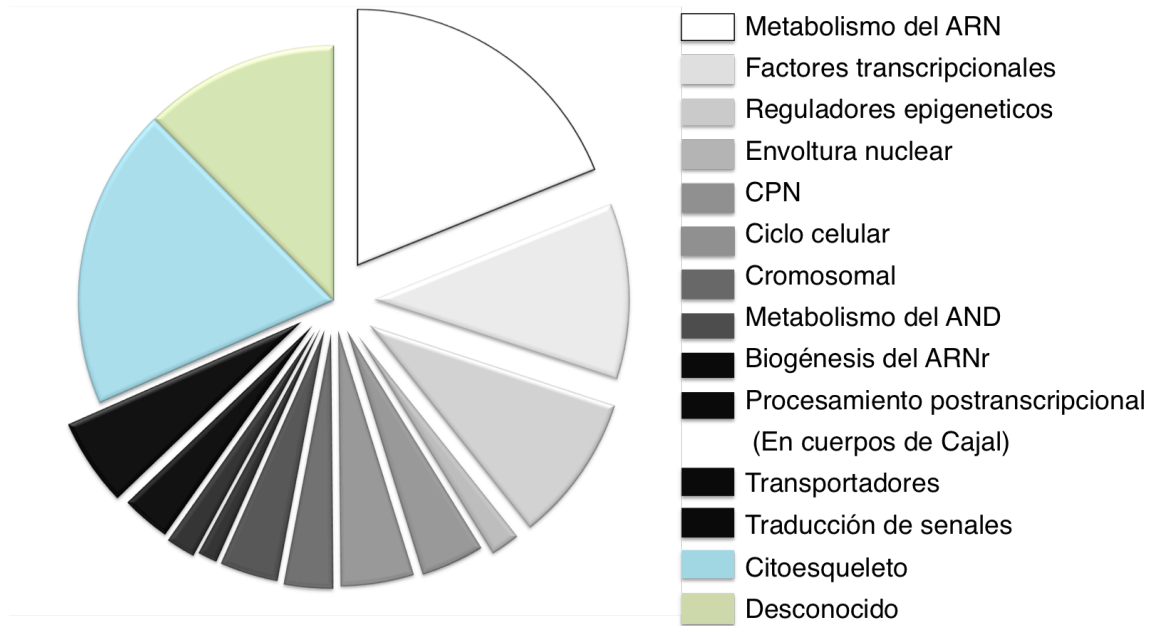


Figura 9. El fosfoproteoma de la envoltura nuclear en células eritroides está conformado por proteínas implicadas en una amplia gama de procesos nucleares. Análisis de *Gene ontology* demostraron las categorías funcionales, la mayoría nucleares (blanco a negro en la gráfica) y la presunta localización en la EN tanto en proeritroblastos (G1Eundif) como eritroblastos (G1Edif).

Un alto porcentaje de proteínas fosforiladas en G1Eundif corresponden a componentes celulares relacionados con compactación de la cromatina y control epigenético como es el caso de la proteína centromérica CENPA (pSer16) y las histona linker H1.2 (pSer36), sugiriendo su importancia regulatoria en estados celulares no diferenciados. Asimismo, se encontró un número considerable de proteínas implicadas en el metabolismo del ARN, incluyendo aquellas que residen en otros subcompartimentos celulares, como es el caso de la nucleolina C23 (pSer360 y pSer618), un marcador del

nucléolo que participa en la maduración de ARNr, el ensamblaje ribosomal, entre otros (Ginisty y col., 1999). Por tanto, el estudio integral de la expresión a nivel de ARNm y proteína permitirá la validación cuantitativa de estos resultados, así como estudios subsecuentes de inmunolocalización o bien, detección por proteínas de fusión serán necesarios para elucidar la relevancia funcional de las fosforilaciones cuyo papel es desconocido.

A partir de estos resultados se definió un candidato principal para la validación y el subsecuente estudio funcional de las fosforilaciones identificadas. En particular, este estudio se enfocó en las fosforilaciones de la proteína lamina A (pSer12, pSer573 y pSer653), las cuales se detectaron en células diferenciadas (eritroblastos, G1Edif).

Además de ser una proteína con una expresión preferente en células diferenciadas, la lamina A es indispensable para diferentes procesos como la organización de la cromatina, procesos de mecano-transducción, control del ciclo celular, regulación de las secuencias teloméricas y la regulación de las propiedades físicas del núcleo, entre otros (González-Suarez y col., 2008; Burke y col., 2014; Davison y col., 2014; Gruebbaum y col., 2015; Solovei et al., 2013; Harr y col., 2015). Asimismo, la estructura y dinámica de ensamblaje de la lamina A en la lámina nuclear es dependiente de diversos eventos de fosforilación en diferentes dominios, como es el caso de las fosforilaciones pSer22 y pSer394 (Heald y McKeon, 1990; Mall y col., 2012; Kochin y col., 2014).

Estudios biofísicos acoplados a análisis bioquímicos han demostrado recientemente la abundancia preferencial de la lamina A en tejidos con propiedades mecánicas específicas (alta rigidez y elasticidad), como es el caso de los tejidos muscular y óseo (Swift y col., 2013). Estudios de espectrometría de masas en tándem permitieron la definición de

sitios de fosforilación (pSer390 y pSer404) como mecanosensores definitivos del medio (Swift y col., 2013). Consistente con estos descubrimientos, mutaciones en el gen LMNA, particularmente aquellos que caen en el carboxilo terminal de la proteína, causan un alto número de presentaciones clínicas que afectan tejidos musculares y esqueléticos principalmente (Azibani y col., 2014). En particular, dichas fosforilaciones se localizan en un fragmento peptídico que es eliminado de forma aberrante en células de pacientes con HGPS. Por tanto, en vías de elucidar la relevancia funcional de las fosforilaciones pSer12, pSer573 y pSer653 en la lamina A y su correlación con las presentaciones clínicas progeroides se procedió a confirmar su presencia en el linaje muscular, donde presuntamente estarían presentes en el caso de estar implicadas en la regulación del procesamiento de la lamina A.

Categorías funcionales	Proteína	G1Eundif (Proeritroblastos)	G1Edif (Eritroblastos)
Metabolismo del ARNm	LARP1	251	ND
	HNRPI	ND	509
Organización de la cromatina	DNMT1	761	761
	NUCL	608, 350	
Nuclear lamina	LMNB	T21	T21
	LMNA	ND	12,573,643
Envoltura nuclear	NUP88	522	ND
	NUP98	889	889
Metabolismo del ADN	PRKAR2B	110	110
	RFC1	83	1049
Transporte de ATP	AKAP1	1348, 55,64,101103	197
	JSRP1	188,192	188,192
Proteínas de unión a leótidos	APLF	ND	41
	CCT8	ND	42
Factores transcripcionales (Negativos)	NCOR2	374, 1131	374, 1131,778
	RUNX-1	22	
Factores transcripcionales (Positivos)	GATA2b	138	ND
	GATA1	ND	275
Quinasas	CDK1	16	16
	PRKRA	18	18,167

Tabla 3. Proteínas representativas identificadas en el fosfoproteoma de la EN en células eritroides (G1E). Clasificación por categoría funcional de acuerdo a los análisis de *Gene ontology* (Columna 1), proteínas identificadas en la EN denotadas por el nombre del gen que las codifica (Columna 2) e identificación de los eventos de fosforilación por residuo específico en cada una de ellas (números: No. Aminoácido; ND: no fosforilación detectada) por estado de diferenciación (Columna 3 y 4).

Estudio del fosfoproteoma durante la diferenciación en líneas celulares del linaje muscular (C2C12) : La lamina A.

Tanto el protocolo de purificación de envolturas nucleares como el enriquecimiento e identificación de fosfopéptidos en la EN se optimizó en células musculares de ratón (C2C12) en su estado no diferenciado (mioblastos, C2C12undif) y en su estado diferenciado (miotúbulos, C2C12dif).

En total se obtuvieron 1579 y 1177 fosfopéptidos para el Exp1 y el Exp2, respectivamente. Y los análisis posteriores se restringieron nuevamente a aquellos fosfopéptidos representados en dos experimentos independientes, correspondiendo a un total de 414 fosfoproteínas divididas en tres grupos: 1) 79 proteínas fosforiladas únicamente en mioblastos (C2C12undif); 2) 186 Proteínas fosforiladas únicamente en miotúbulos (C2C12dif); y 3) 149 Proteínas fosforiladas en ambos estados.

Dentro de las proteínas fosforiladas en los progenitores musculares se encontró la proteína SETD2, una metiltransferasa de histonas que específicamente metila la lisina 36 de la histona H3 (H3K36me3) que controla positivamente la actividad transcripcional de diversos genes. SETD2 se encontró fosforilada en mioblastos en los residuos 121, 153 y 155 ,y si bien es cierto que estas fosforilaciones no han sido identificadas previamente, es posible pensar que son relevantes para su función en células progenitoras. Consistente con esta idea, trabajos recientes han demostrado el papel de SETD2 en el control de la diferenciación en células troncales de ratón (ESc) hacia el linaje endodérmico, potencialmente por la activación de genes implicados en la cascada de señalización ERK (Zhang y col., 2014).

En el segundo grupo (proteínas fosforiladas en C2C12dif) podemos encontrar por ejemplo, la proteína Titina (TTN), fosforilada en los sitios: pSer25780, pSer25782, pSer2034, pSer652, pSer315 y pSer264. TTN es una proteína clave para el ensamblaje de la maquinaria contráctil en células musculares y se ha reportado como componente organizador de los cromosomas en estas células (Rassier y col., 2015; Roberts y col., 2015).

En el caso de proteínas fosforilados en ambos estados, se definió el factor receptor nuclear co-represor Ncor2 forforilado en pSer374 y pSer1131. Ncor2 es una proteína ubicua que induce la condensación de la cromatina por ser la unidad catalítica de asociación a proteínas desacetilasas de histonas (HDACS), regulando la respuesta de diferenciación (Hudson y col., 2015) . La fosforilación pSer374 en Ncor2 se recuperó en las EN sujetas a la extracción proteica por detergentes, consistente con observaciones previas respecto a su posición en la periferia nuclear con HDAC3 (Demmerle y col, 2012); mientras que la pSer1131 se identificó en el enriquecimiento de fosfopéptidos por métodos alcalinos. Estas observaciones apuntan a que las fosforilaciones proporcionan diferentes propiedades estructurales en la proteína Ncor2 que impactan en su solubilización y por tanto en su detección por diferentes métodos. Además, estudios sobre Ncor2 así como sobre otras proteínas (Tabla 3) sugieren que dicha proteína podría estar presente en las células como dos fosfoisoformas diferenciales. Este podría ser el caso de otras fosfoproteínas como la cinasa PRPF4B, donde los eventos pSer18 y pSer20 se detectaron enriquecidos por detergentes y métodos alcalinos, respectivamente. Entonces, estudios futuros determinaran si estas fosforilaciones son concomitantes en la proteínas o sí corresponden a diferentes isoformas. Otra posibilidad que explicaría la existencia de diferentes isoformas es que estas

fosforilaciones son el resultado de fosfopéptidos de células que están en distinta parte del ciclo celular, ya que estas células no están sincronizadas, por tanto es posible que incluso se recuperen fosfoisoformas con actividad diferencial.

El fosfoproteoma de la EN de células musculares reveló un número considerable de proteínas específicas de EN, incluyendo la lamina B1, lamina B2, lamina A, LAP2 y Sun2, también identificadas en células eritroides (G1Eundif/dif). Las proteínas de EN LBR, emerina y nesprina-1 (Syne1) también fueron identificadas en las células musculares, a diferencia del fosfoproteoma eritroide donde no se identificaron. Estos resultados son consistentes con el papel de emerina y nesprina-1 en eventos de organización del citoesqueleto en células adherentes, rutas de mecano-transducción, eventos de motilidad y contracción (Muntoni y col., 2006; Ho y col., 2013). Asimismo, el papel regulatorio de emerina y su expresión preponderante en tejidos musculares conllevan a que mutaciones puntuales o desregulación de sus proteínas de unión desencadene desórdenes tan severos como la distrofia muscular Emery-Dreifus (Muntoni y col., 2006; Ho y col., 2013; Azibani y col., 2014).

Adicionalmente, ciertas proteínas de la EN se detectaron fosforiladas diferencialmente en células musculares y eritroides. Por ejemplo, la proteína Sun2 se detectó fosforilada en los residuos pSer12 y pSer118 en C2C12dif y en pSer120, pSer122 y pSer123 en ambos estadios de C2C12, mientras que en células G1E, el sitio pSer576 de Sun2 se detectó modificado en ambos estadios (G1Eundif y dif); pSer527 en G1Eundif; y pSer56 en G1Edif. Sun2 es un componente principal del complejo LINC y así como interactúa con componentes de la lámina nuclear en el interior de la EN, también interactúa con componentes del citoesqueleto indirectamente por la proteína de unión nesprina,

localizada en la MNE, mediando la formación de estructuras de actina especializadas en la periferia nuclear (Fridkin y col., 2009; Mellad y col., 2010; Stewart –Hutchinson y col., 2008; Kim y col., 2012; Kim y col., 2013; Chamblis y col., 2014). Por tanto, es posible pensar que las fosforilaciones diferenciales en C2C12 y G1E contribuyen a la regulación en fenómenos de transducción de señales y establecimiento de propiedades del núcleo de manera linaje-específica.

Las proteínas del poro nuclear Nup88 y Pom121 fueron identificadas fosforiladas también en células musculares. La proteína Nup88 se registró fosforilada en pSer527 en células diferenciadas eritroides (G1Edif), mientras que en células musculares se fosforila tanto en mioblastos como miotúbulos en el mismo residuo (C2C12undif). Asimismo, la fosforilación pSer159 en la proteína Pom121 detectada en células G1Edif no fue detectada en células C2C12, en contraste el patrón de fosforilación es mas complejo tanto en C2C12undif y C2C12dif, consistiendo en los eventos pSer164 ,pSer172,pSer173,pSer176. Adicionalmente, el fosfoproteoma de EN musculares reflejo fosforilaciones específicas en las proteínas de poro Nup214, Nup133, Nup188 Nup93, Nup107, las cuales no se identificaron en las células eritroides.

Análisis bioinformáticos preliminares por Rodrigo Arzate (Instituto de Fisiología Celular) sugieren que las fosfoproteínas detectadas en la EN de miotúbulos (C2C12dif), no son las mismas que las fosfoproteínas en la EN de células diferenciadas eritroides (G1Edif). Adicionalmente, a la luz del presente trabajo, la EN presenta un patrón característico de PMTs como la fosforilación, crucial para el control de los programas de diferenciación y la fisiología celular. En resumen, estos resultados sugieren dos ideas principales: 1) tanto la composición como la fosforilación de los componentes EN es diferencial en distintos linajes

celulares, y 2) es posible que la fosforilación en estas proteínas sea relevante para rutas de señalización específicas para cada tipo celular.

Los análisis de ontología de las proteínas fosforiladas en la EN de células C2C12 reflejaron el enriquecimiento de proteínas implicadas en una amplia variedad de procesos celulares, conformando 73 conjuntos funcionales anotados (DAVE software). Estos conjuntos fueron analizados manualmente, en términos de su significancia y categoría funcional para ser agrupados en 21 categorías funcionales, incluyendo el metabolismo del ARN, organización de la cromatina, apoptosis, reguladores del ciclo celular y factores transcripcionales (Figura 10A). Interesantemente, uno de los conjuntos mas sobrerrepresentados en C2C12 se constituye por proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto y proteínas de adhesión. Esto es interesante ya que en fechas recientes se ha demostrado la conexión tanto física como funcional entre la EN y los componentes citoplasmáticos en múltiples cascadas de mecanotransducción (Khatau y col., 2009; Khatau y col., 2012; Kim 2012; Kim y col., 2013; Ho y col., 2013; Chamblis y col., 2013). Asimismo, diversas proteínas de adhesión en la membrana plasmática se han encontrado como sensores a señales extracelulares, a su vez- transmitiendo señales hacia el citoplasma y subsecuentemente al núcleo, confirmando que las interacciones tanto físicas como funcionales entre estos compartimentos son mucho mas estrechas de lo que se pensaba (Hayes y col., 1990; Legate y col., 2009; Ghassemi y col., 2005). Por ejemplo, en células adherentes la proteína de la ECM fibronectina interactúa con los receptores plasmáticos conocidos como integrinas, los cuales a su vez desencadenan la formación de adhesiones focales en que a su vez se interconectan con filamentos de actina que forman estructuras especializadas en el núcleo dependiendo de las señales externas del medio (Khatau y col.,

2012; Kim y col., 2012; Plessner y col., 2015; Makhija y col., 2015), los cuales a su vez se conectan con componentes del complejo LINC (Kim y col., 2012). Mutantes o células deficientes en Lamina A interrumpen esta señalización, o bien la translocación de complejos mecanosensores y reguladores transcripcionales del citoplasma al núcleo (Khatau y col., 2012; Ho y col., 2013).

Es posible que el enriquecimiento de fosforilaciones en proteínas de la EN implicadas en categorías funcionales concernientes a la organización del citoesqueleto y moléculas de adhesión subraya su implicación en los procesos de mecanotransducción, motilidad, migración, mantenimiento de las propiedades físicas del núcleo y la dinámica diferencial de dichas proteínas en células musculares. Otro ejemplo es la proteína ABR, fosforilada en mioblastos (C2C12undif). ABR se encarga de regular positivamente la ruta de señalización de las RhoGTPasas por Rho, Rac y Cdc42 (Vaughan y col., 2011). Esta cascada esta implicada en la reorganización del citoesqueleto por actina y miosina con papel fundamental en procesos de motilidad, migración y plasticidad nuclear (Disanza y col., 2015), por tanto podría explicar su sobre-representación en la EN de células musculares. Asimismo, un número considerable de proteínas implicadas en las cascadas de RhoGTPasas (p.e. Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor), sistema motriz (p.e. la cadena pesada de la proteína no muscular Miosina 10) así como adhesiones focales (p.e. proteína de unión a actina Filamina B) se encontraron en la EN como se ha reportado en estudios independientes de mecanotransducción, especificación de linaje y reorganización del citoesqueleto, resultados que apuntan la implicación de la fosforilación de la EN en sistemas de transporte núcleo-citoplasma, citoesqueleto así su potencial implicación en procesos de miogénesis (McBeath y col., 2004; Tojkander y col., 2012; Shao y col., 2015).

Soportando estas ideas, se compararon aquellas proteínas identificadas fosforiladas en la EN tanto en mioblastos como en miotúbulos que por *Gene ontology* correspondieron a componentes nucleares o de la envoltura nuclear con aquellas proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto y moléculas de adhesión. Sorprendentemente la mayor parte de las proteínas de estos dos grupos (citoesqueleto/ núcleo) se encuentra exclusivamente en un grupo o en otro, sugiriendo que estas proteínas se asocian a las proteínas nucleares y su significativa ocurrencia en la EN se da por interacciones estables que permiten su purificación en la EN (Figura 10 B). Además, estos resultados sugieren que las clasificaciones funcionales basadas en estudios previos podrían ser redefinidas a la luz de los resultados de estudios a gran escala como el presente.

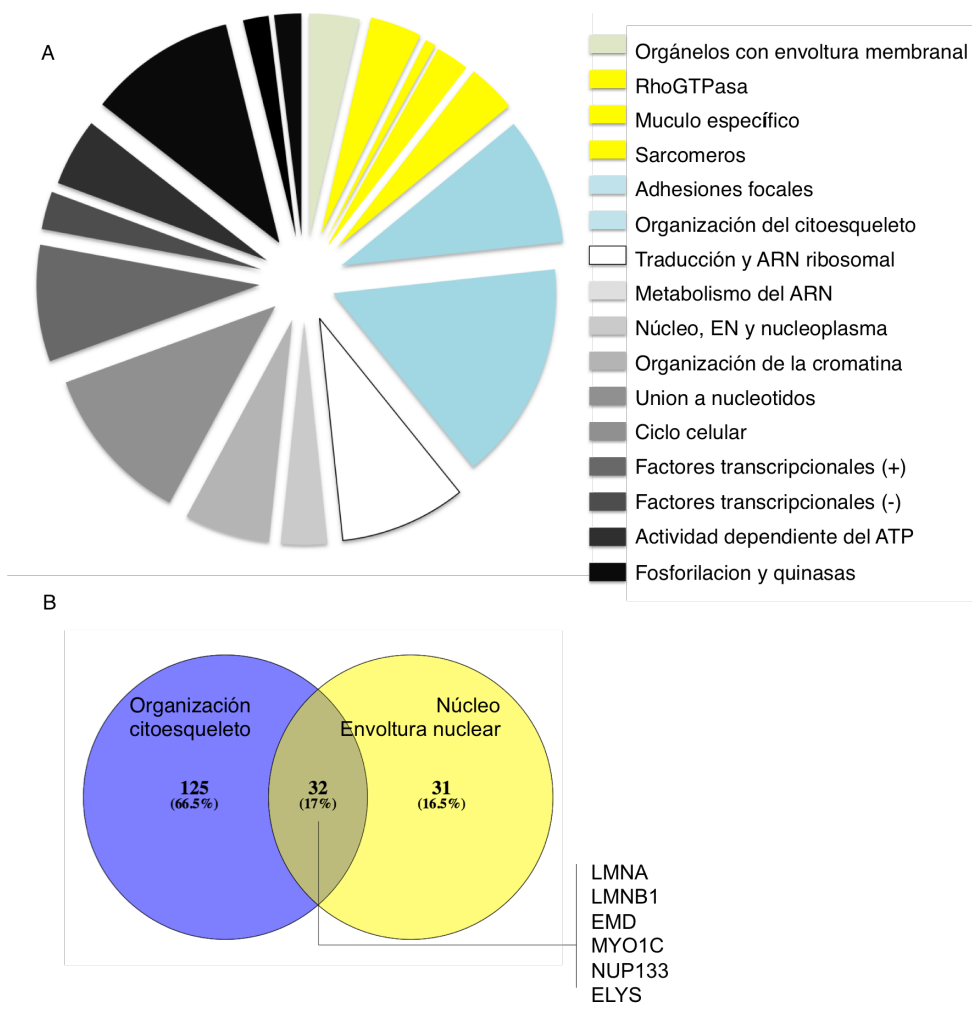


Figura 10. El fosfoproteoma de la EN de células musculares (C2C12) esta constituido principalmente de proteínas nucleares y organizadoras del citoesqueleto. A. Se presentan lo diferentes conjuntos de fosfoproteínas definidos por los análisis de *Gene ontology*, confirmando la alta abundancia de componentes reguladores de actividades nucleares (Escala de grises, blanco → negro), aquellas proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto y sistemas de mecano-transducción (en azul) así como las proteínas tejido específicas para procesos moleculares preponderantes en células musculares (en amarillo) B. Diagrama de Venn que representa el número de proteínas cuya función corresponde a actividades nucleares de organización del citoesqueleto, en

éste se pueden encontrar las proteínas de la EN como lamina B1 (LMNB1), lamina A (LMNA) y emerina (EMN) así como componentes del citoesqueleto como la miosina (MYO1C).

Tanto la participación de la proteína lamina A como la emerina y la miosina son consistentes con los resultados de diversos estudios que señalan el papel activo de la EN en los procesos de reorganización del citoesqueleto y viceversa, y en los procesos de plasticidad nuclear desencadenados por el citoesqueleto (Khatau y col, 2012; Kamisnki y col., 2014; Telwar y col., 2013; Iyer y col., 2012; Kim y col., 2012; Chamblis y col., 2013)

Por otro lado, los eventos de fosforilación detectados en la proteína lamina A en células eritroides pSer12, pSer573 y pSer653 también se detectaron en células musculares diferenciadas, un hallazgo consistente con la hipótesis previa para la continuación de su estudio a nivel funcional. Una de las preguntas que emerge de estos análisis por ejemplo, es si dichas fosforilaciones en la lamina A contribuyen a su implicación en la organización del citoesqueleto, y las propiedades físicas nucleares, o bien a otros procesos celulares.

4.2. Estudio de las fosforilaciones en la Lamina A.

Definición de sitios fosforilados en la prelamina A

La proteína lamina A se detectó fosforilada en tres residuos: Ser12; Ser573 y Ser652 (Figura 11), los cuales han sido detectados en los estudios de fosforilación recientes (Kotchin y col., 2014), posterior a nuestros descubrimientos. En general, las fosforilaciones en el amino-terminal como pSer12 se han correlacionado con la regulación del ensamblaje

y el recambio de la lámina nuclear en procesos mitóticos (Tordvaldson y col., 2015), mientras que el papel de la fosforilación en la Ser573 y Ser653 en el carboxilo-terminal permanecen sin elucidar. Debido a que la espectrometría de masas no permite definir el sitio fosforilado entre dos residuos contiguos (Dophoure y col. 2012), se estudiaron ambas fosforilaciones la pSer652 como la fosforilación pSer653 (referidas como ppSer652653).

El fragmento peptídico donde se definió el evento ppSer652653 corresponde al extremo carboxilo terminal del precursor prelamina A (664 residuos en total), el cual subsecuentemente se modifica post-traduccionalmente por la adición de un grupo lipídico para posteriormente procesarse proteolíticamente por la metaloproteinasas ZMPSTE24 para originar la Lamina A madura (646 residuos en total), la cual es habilitada para polimerizarse y formar la lámina nuclear (Strelkov y col., 2004).

En particular, este trabajo se centró en el estudio de esta fosforilación (ppSer652-653), dado que se ubica en el fragmento peptídico que se pierde en la proteína progerina discutida previamente (Antecedentes). Brevemente, la progerina es una proteína truncada cuyo sitio de procesamiento proteolítico se pierde y por ende la proteína se queda en estado "precursor", quedándose anclada constitutivamente a la EN por su grupo lipídico farnesil, lo cual causa el síndrome de envejecimiento prematuro HGPS (Erickson y col., 2003)

La confirmación de la fosforilación del evento ppSer652-653 se llevo mediante el uso de los péptidos marcados con el isótopo P32 por la Unidad de espectrometría de masas (Fred Hutchinson Cancer Research Center) (Figura 11) y posteriormente fue confirmada por los reportes del grupo de Goldman (Kotchin y col., 2014).

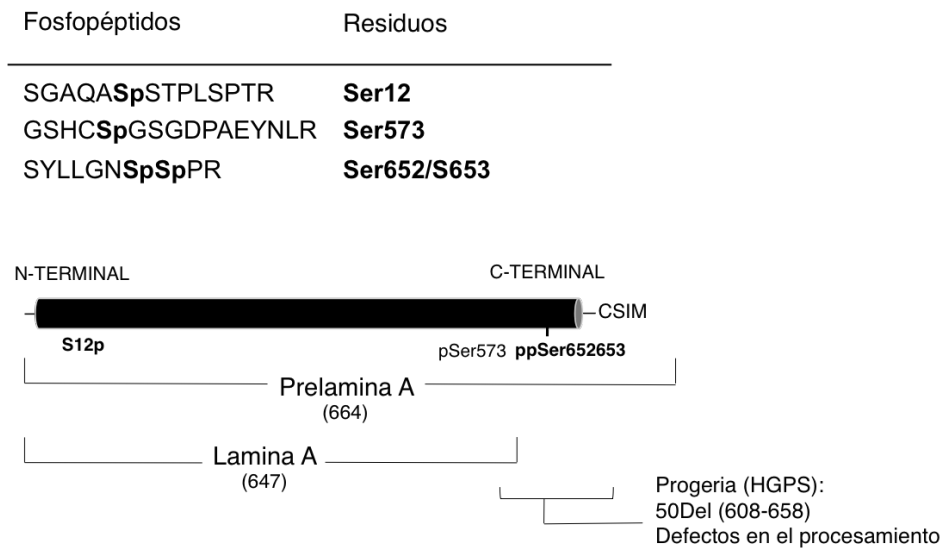


Figura 11: Localización de las fosforilaciones pSer12, pSer573 y ppSer652653 en la lamina A identificadas en la EN de células tanto eritroides como musculares. Se muestra la distribución de los eventos de fosforilación detectados en células diferenciadas en la lamina A, así como la interesante ubicación de ppSer652653 en el fragmento, cuya eliminación en HGPS es responsable de defectos en el procesamiento y del síndrome.

Estudios de localización de la prelamina A en el núcleo celular mediante fusiones GFP-Prelamina A

La localización en el núcleo de la proteína prelamina A es regulada primordialmente por la señal de localización nuclear (NLS) y la adición del grupo farnesil (CAAX), aunque diversos estudios han demostrado que el grupo lipídico no es indispensable, tal es el caso de mutantes en la cisteína modificada por la farnesil-transferasa que aun se localiza en la EN así como la proteína Lamina C que carece del dominio de deposición del grupo farnesil (CAAX) (Capell y col. 2005). Entonces, para estudiar el papel de las fosforilaciones

ppSer652-653 en la localización de la prelamina A se llevaron a cabo estudios de distribución usando la proteína de fusión con la proteína precursora prelamina A WT y otras variantes portadoras de mutaciones puntuales en los residuos fosforilados ppSer652-653, que imitan las fosforilaciones (fosfomimético), la bloquean (fosforesistente) o bien, conceden la carga opuesta. Se desarrollaron mutaciones puntuales en el plásmido GFP-Prelamina A Tol2 para la subsecuente generación de líneas estables independientes en células C2C12, donde la expresión de la lamina A es inducible con Doxyciclina (Dox). Entonces, las líneas estables a analizar fueron: 1) GFP-Prelamina A con los sitios WT a fosforilar ppSer652653 (GFP-LMNA_SS); 2) GFP-Prelamina A donde se replica la carga negativa del grupo fosfato por el reemplazo de las serinas por ácido glutámico (GFP-LMNA_DD); 3) GFP-Prelamina A que antagoniza las cargas del fosfato con los aminoácidos positivos en la posición 652653 (GFP-LMNA_KK); y 4) la GFP-Prelamina A, cuya fosforilación en los residuos 652653 es nula por el reemplazo de alaninas (GFP-LMNA_AA) así como el reemplazo de cada serina 652 y 653 independiente.

Los análisis de localización por microscopía después en las líneas GFP-LMNA indicaron que las fosforilaciones bajo estudio no parecen estar implicadas en la localización de la lamina A en la EN (Figura 12). De forma importante, se observó la acumulación ectópica (citoplasma) de la proteína de fusión en ciertos casos (Figura 12, Control GFP_LMNA_KK(+)); sin embargo, estas observaciones que serán detalladas más adelante en los ensayos de inhibidores de farnesil-transferasa (FTIh) indican los posibles efectos de la sobreexpresión de la proteína exógena, siendo un fenómeno sin relevancia biológica. Posteriormente, se evaluó la distribución de la prelamina A en respuesta al inhibidor de la farnesil-transferasa (FTIh), la cual adiciona el grupo lipídico en la prelamina A para su

inserción en la EN de células WT (Beck y col, 1994; Holtz y col, 1991; Sineski y col., 2002; Hennekes y col., 1994). Estudios previos han demostrado que el tratamiento con FTInh desencadena la acumulación de la lamina A en el nucleoplasma (Capell y col., 2005), de manera que si la fosforilación ppSer65253 fuera indispensable para la adición del grupo farnesil en el CAAX, el fenotipo de acumulación en respuesta a FTInh sería nulo. Sin embargo, los resultados confirman la acumulación de la GFP-Prelamina A en el nucleoplasma ante el tratamiento del FTInh, tanto en la versión WT (GFP-LMNA_SS) como el resto de las variantes, sugiriendo que la fosforilación no regula la deposición del grupo lipídico (Figura 12) . Debido a las observaciones anteriores en cuanto a la irrelevancia de las fosforilaciones en la localización de la prelamina en la EN y el procesamiento a nivel de farnesilación así como a otros factores técnicos, como el hecho de una mutación no deseada en nuestras células estables de trabajo, en las siguientes etapas de este proyecto se prosiguió a estudiar al precursor prelamina A en condiciones endógenas. En particular, nos enfocamos en caracterizar la acumulación así como la distribución de la prelamina A en términos cuantitativos.

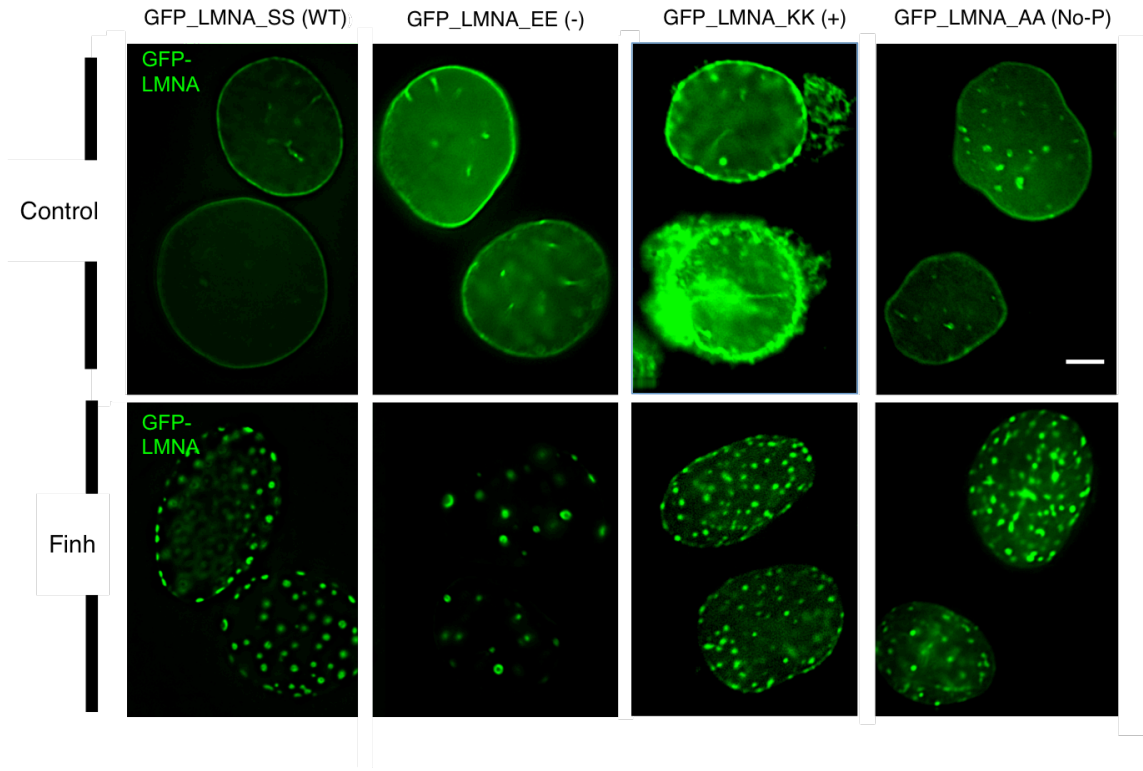


Figura 12. Estudios de localización de la proteína de fusión GFP-Prelamina A WT (GFP-LMNA_SS) y las versiones mutantes indican la irrelevancia funcional de las fosforilaciones ppSer652653 en términos de localización y regulación de la farnesilación. Panel superior: células representativas de las cuatro en líneas estables musculares expresando de forma inducible la proteína de fusión WT y las tres mutantes 24 h post-Dox (De izquierda a derecha: GFP-LMNA_SS, GFP-LMNA_EE, GFP-LMNA_KK, GFP-LMNA_AA). ***Nótese la expresión aberrante y ectópica de la proteína GFP-LMNA_KK, ejemplificando el efecto de la sobreexpresión de la proteína de fusión y no así una fenotipo relevante.*** Panel inferior: las mismas cuatro líneas estables musculares expresando de forma inducible la proteína de fusión tratadas con FTInh.

Análisis de la acumulación del precursor de la Prelamina A

Hasta ahora se han definido tres pasos cruciales en el procesamiento de la prelamina A que causan su acumulación: 1) el bloqueo de la farnesilación (Kitten y col., 1991; Sinensky y col., 1994; Young y col., 2006; Capell y col., 2005); 2) el bloqueo de la carboximetilación en la cisteína del motivo CAAX (Weber y col., 1989; Burgos y col., 2009); y 3) el bloqueo del corte proteolítico por la metaloproteínasa ZMPSTE24 (Kilic y col., 1997; Pendas y col., 2002). Esta acumulación de la prelamina A se ha detectado por: 1) la inmunodetección de la proteína en células tratadas con el inhibidor (FTInh) o bien por el análisis de proteínas de fusión con mutaciones puntuales en el CAAX (Sinensky y col., 1994; Capell y col., 2005; Goldman y col., 2004; Lee y col., 2010; Davies y col., 2010); 2) la eliminación genética de las proteínas responsables de la carboximetilación (Ictm) (Burgos y col., 2009; Ibrahim y col., 2013); y 3) La eliminación de la proteína ZMPSTE24, o bien su inhibición de actividad por los inhibidores de ZMPSTE24 (inhibidores de proteasa de HIV) (Coffinier y col., 2007; Carón y col., 2007). Entonces, otra posible función de las fosforilaciones ppSer652-653 es la regulación del recambio de la proteína prelamina A por la lamina A o su papel regulatorio en el procesamiento de esta proteína. Sin embargo, es importante destacar que la acumulación de este precursor se ha evaluado previamente con anticuerpos dirigidos contra la lamina A que reconocen tanto la proteína madura como el precursor lamina A, o bien que reconocen estadios intermedios de la proteína Prelamina A (Prelamin A-farnesil; Prelamin A-no farnesilada; prelamina A carboximetilada) o bien anticuerpos policlonales (Sinensky y col., 1994). Hasta la fecha ninguno de los anticuerpos que se han generado para el reconocimiento específico del precursor Prelamina A ha reconocido el epítipo específico para esta proteína (Lee y col., 2010; Davies y col., 2010).

Por tanto, en el presente trabajo se propuso desarrollar un anticuerpo específico contra la prelamina A.

4.3 Desarrollo del anticuerpo monoclonal anti-Prelamina A PL-1C7.

Caracterización del epítipo de reconocimiento del anticuerpo PL-1C7

El anticuerpo PL-1C7 se generó en ratón usando la secuencia peptídica que corresponde al fragmento carboxilo-terminal tanto de la lamina A madura como de la prelamina A (Dr. Héctor Rincón Arano, Unidad de Anticuerpos, FHCRC) (Figura 13A), el cual contiene las fosforilaciones ppSer652653.

El reconocimiento del extremo carboxilo-terminal de la prelamina A por el anticuerpo PL-1C7 se demostró mediante Western blots con el uso de la proteína de fusión GST-CAAX, que incluye los aminoácidos V629-M664 (Figura 13B). Posteriormente, se diseñaron los siguientes péptidos sintéticos: pLA_WT compuesto por la secuencia de aminoácidos WT de la Prelamina A detectada por espectrometría de masas (pLAWT; TRSYLLGNSSPR; T644-R655); y péptidos con sustituciones de alaninas en tripletes como sigue: pLA_1 (AAAYLLGNSSPR) pLA_2 (TRSAAAGNSSPR) pLA_3 (TRSYLLAAASPR) pLA_4, (TRSYLLAAASPR). Asimismo se diseñaron péptidos que corresponden a los productos finales del corte por ZMPSTE24: pLA_Mat (GSFGDNLVTRSY) correspondiendo a la lamina A madura y pLA_Frag (LLGNSSPRTQS) producto final de la prelamina A. Los análisis del Dr. Hector Rincón-Arano (HRA, FHCRC) usando estos péptidos por inmunoensayos tipo ELISA ayudaron a la detección del epítipo del anticuerpo PL-1C7 (Figura 13C).

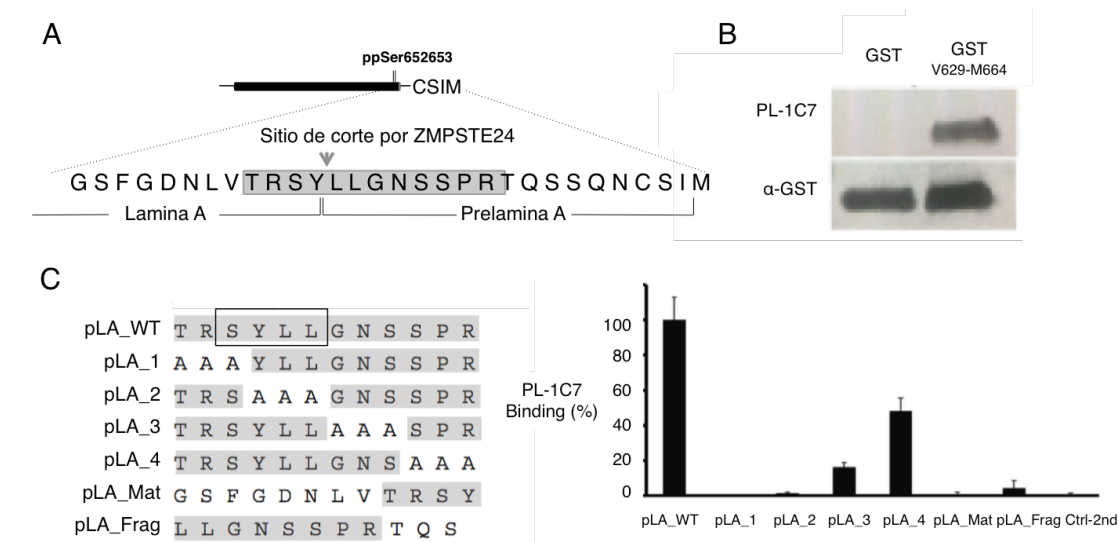


Figura 13. El epítipo del anticuerpo anti-prelamina A (PL-1C7) corresponde al sitio específico de reconocimiento de la metaloproteínasa ZMPSTE24. A. Representación del carboxilo terminal de la prelamina A que contiene la secuencia antigénica (sombreada) utilizada para la generación del anticuerpo PL-1C7. B. Inmunodetección del carboxilo-terminal de la prelamina A por el anticuerpo PL-1C7 en la proteína de fusión generada *in vitro* (carril izq. control: GST sin proteína de fusión; carril der. proteína de fusión GST_V626-M664). C. Cuantificación de la unión antigénica del anticuerpo PL-1C7 a la batería de siete péptidos sintéticos (pLA_WT a pLA_Frag) por inmunoensayos tipo ELISA (HRA).

Los resultados demostraron que el epítipo de PL-1C7 corresponde al sitio de corte en la prelamina A reconocido por la metaloproteínasa ZMPSTE24, y es únicamente cuando está intacto que presenta el reconocimiento mas significativo a la prelamina A (Figura 13C).

Para confirmar estas observaciones se optimizo la cuantificación de prelamina A por citometría de flujo intracelular (IFC), donde el sistema de expresión inducible GFP-LMNA WT fue estandarizado para estos fines (Figura 14A). Las células sin inducción se utilizaron

como marco de referencia para la señal negativa en donde el enriquecimiento para GFP-LMNA y la prelamina A es nulo (Figura 14B). La proteína de fusión GFP-Prelamina A fue detectada posterior al tratamiento con Dox (Figura 14C), en donde la señal de fluorescencia de la GFP corresponde tanto a la proteína precursora (Prelamina A) como a la madura (Lamina A). Esto fue confirmado mediante la inmunotinción nuclear en solución con el anticuerpo anti-LMNA/C (anti-LMNA), el cual reconoce tanto la prelamina A como la lamina A (Figura 14D). Posteriormente, se llevo a cabo la inmunodetección intracelular de la prelamina A utilizando el anticuerpo PL-1C7 (post-Dox), reflejando el enriquecimiento del precursor en el mayor porcentaje de las células analizadas (Figura 14E). Estos resultados se confirmaron por la cuantificación de la acumulación de la prelamina A en respuesta al tratamiento del FTInh (Figura 14F).

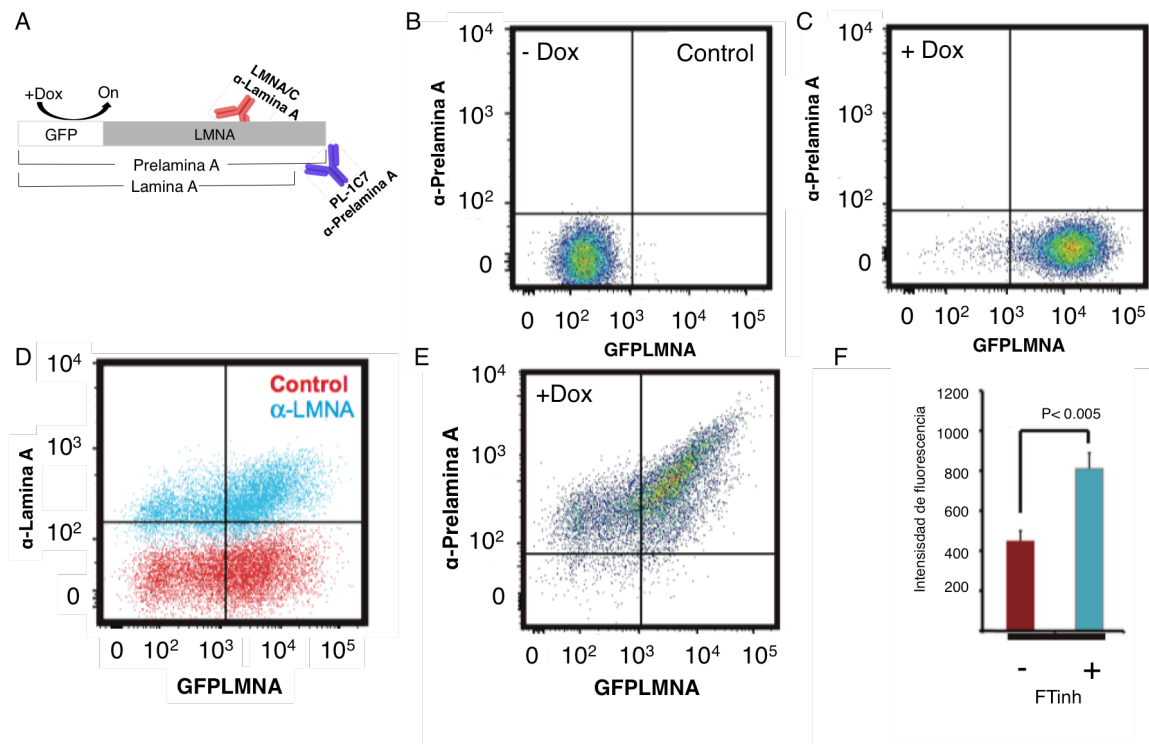


Figura 14. Cuantificación del enriquecimiento de la proteína prelamina A por el anticuerpo PL-1C7 en citometría de flujo intracelular (IFC). A. Esquema de la proteína de fusión GFP-Prelamina A donde se representa el reconocimiento del anticuerpo anti-LMNA (Lamina A madura y prelamina A) y el anticuerpo PL-1C7 (Prelamina A). **B.** Control: Células sin Dox. (Plot IFC: en el eje de las 'x' se representa la señal de fluorescencia de la GFP (lamina A+prelamina A) y en el eje 'y' la señal de fluorescencia emitida por el reconocimiento de PL1C7 (prelamina A). **C.** Control positivo (lamina A+prelamina A): Células post-Dox (GFP+) sin la inmunodetección con PL-1C7 o anti-LMNA. **D.** Doble control positivo: Células post-Dox (GFP+) inmunoteñidas con el anticuerpo anti-LMNA (lamina A+prelamina A). **E.** Cuantificación de la prelamina A: Células post-Dox (GFP+) inmunoteñidas con el anticuerpo PL-1C7 (prelamina A). **F.** Detección cuantitativa de la prelamina A ante FTInh: Células post-Dox (GFP+) tratadas con FTInh, inmunoteñidas con el anticuerpo PL-1C7 (prelamina A).

Estudios de la distribución del precursor Prelamina A

La distribución específica de la prelamina A se analizó en la línea estable de fibroblastos de ratón (MEFs) con la proteína de fusión GFP-Prelamina A (WT) mediante estudios de inmunolocalización utilizando el anticuerpo PL-1C7. Estas células fueron inducidas con Dox, fijadas, inmunoteñidas con PL1C7 (Prelamina A), anti-Lamina AC (Lamina A y Prelamina A) y anti-lamina B (Lamina B) y analizadas por microscopía (Figura 15). La prelamina A presentó una localización característica en la EN, correspondiendo a un patrón puntuado o bien, de menor continuidad alrededor de la EN relativamente a las proteínas lamina A y lamina B (Figura 15A-A''). Estos resultados se confirmaron en el

contexto de la prelamina A endógena donde las células mioblásticas (C2C12) presentaron una distribución discontinua en contraste con la lamina A y la lamina B (Figura 15B-B”).

Estudios cuantitativos para medir la coexistencia de la señal de inmunotinción por cada anticuerpo (PL-1C7, Lamina A y Lamina B) se llevaron a cabo en las imágenes derivadas de las inmunotinciones y los análisis por microscopía mediante el desarrollo de un algoritmo analítico denotado: ‘Índice de fluctuación’. En términos generales, el índice de fluctuación mide la coexistencia de dos señales de fluorescencia emitidas por el reconocimiento de las proteínas de interés por los anticuerpos utilizados a nivel de píxeles. En particular, en este estudio se analizaron las señales alrededor de la EN (Figura 15C). El índice de fluctuación es relativo a una señal de referencia, en este caso la Lamina B (LMNB) cuya señal es continua en la EN. Por cada píxel donde no coexisten las señales del anticuerpo a evaluar y el de referencia (Escenario a. PL-1C7/LMNB o Escenario b. LMNAC/LMNB) el algoritmo asigna un valor positivo que es aditivo. En contraste, con el escenario donde las señales de inmunotinciones se alinean completamente (LMNB/LMNB) y el índice de fluctuación corresponde a ‘0’ (Figura 15C’).

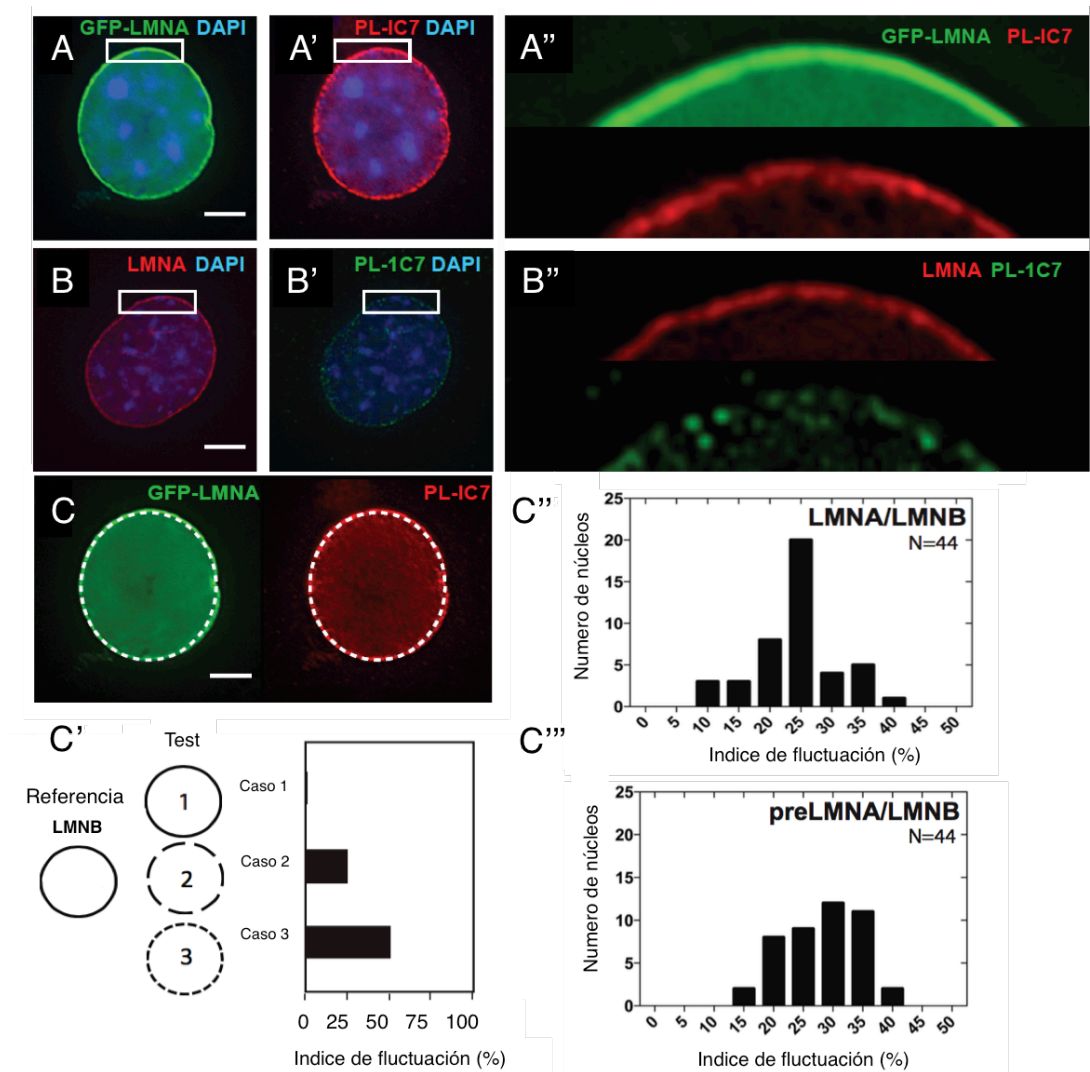


Figura 15. La distribución de la prelamina A develada por PL-1C7 sugiere la existencia de sitios específicos y preferenciales de integración y procesamiento en la EN. A-A'' Núcleo representativo de células transgénicas MEF GFP-Prelamina A inducidas con Dox (GFP+ = lamina A+Prelamina A en verde) e inmunoteñidas con PL-1C7 (Prelamina A en rojo). B-B'' Núcleo representativo de células C2C12 WT inmunoteñidas con el anticuerpo anti-LMNA (lamina A+Prelamina A en rojo) y con PL-1C7 (Prelamina A en verde). C Delimitación del área a analizar por el 'Índice de fluctuación' en cada canal de detección. C' Esquematización del 'Índice de fluctuación' en casos hipotéticos de comparación con la señal de referencia (Caso 1, 2 o 3/LMNB). C'' Distribución de la

frecuencia del 'Índice de fluctuación' por núcleo analizado (N=44) entre las señales LMNA/LMNB . C” Distribución de la frecuencia del 'Índice de fluctuación' por núcleo analizado (N=44) entre las señales Prelamina A/LMNB.

Con la finalidad de descartar que la distribución específica de la prelamina A identificada con el anticuerpo PL-1C7 correspondía a una señal inespecífica o ruido de fondo, estas observaciones fueron validadas cualitativamente en células no transgénicas MEF WT y MEF nulas en lamina A (MEF LMNA^{-/-}). Ambos tipos celulares fueron mezclados a un radio de 1:1 y cultivados en las mismas laminillas para posteriormente tratarlas simultáneamente por los procesos de fijación e inmunotinción por los anticuerpos anti-LMNA, PL-1C7 y Lamina B, confirmando las observaciones previas de distribución de la prelamina A endógena únicamente en los MEF WT (Determinados por la señal LMNA) (Figura 16A). Estas observaciones se compararon con la detección de la prelamina A endógena por anticuerpo 7G11 reportado previamente (Lee y col., 2010), cuya afinidad o bien especificidad por el precursor es significativamente menor (Figura 16B).

En resumen, estos estudios de inmunolocalización confirmaron el patrón específico (discontinuo) de distribución de la prelamina A, sugiriendo la integración sitio-específica de esta proteína en la EN, donde es posible que la maquinaria de procesamiento que controla su maduración (p.e. Icmt, ZMPSTE24) se encuentre.

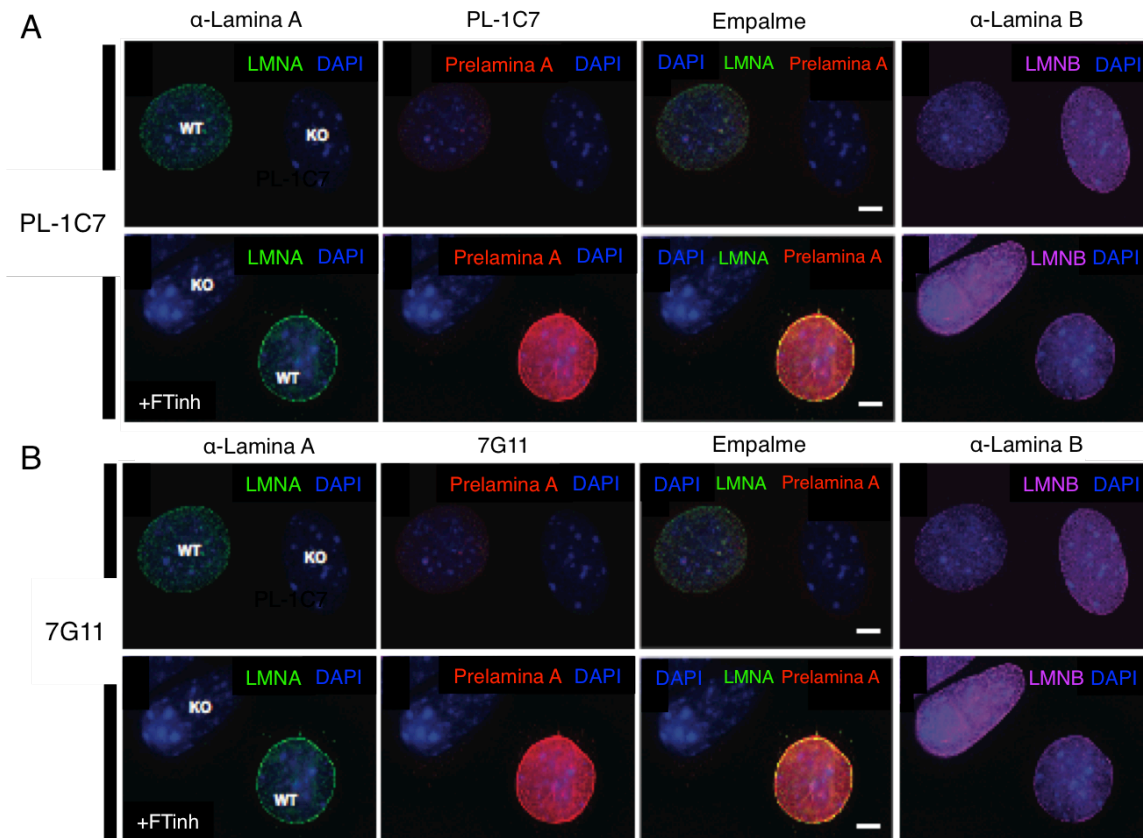


Figura 16. El patrón característico de distribución de la prelamina A endógena es detectable con el anticuerpo PL-1C7 en contraste con el anticuerpo anti-prelamin 7G11 (Lee y col., 2010). A. Núcleos representativos de células no transgénicas MEF WT y MEF LMNA^{-/-} sujetas al tratamiento simultáneo de inmunotinción con DAPI (ADN en azul); anti- LMNA (lamina A+Prelamina A en verde); PL-1C7 (Prelamina A en rojo); y anti-LMNB (Lamina B en magenta); EMPALME (lamina A+Prelamina A en amarillo); B. Núcleos representativos de células no transgénicas MEF WT y MEF LMNA^{-/-} sujetas al tratamiento simultáneo de inmunotinción con DAPI (ADN en azul); anti- LMNA (lamina A+Prelamina A en verde); 7G11 (Prelamina A en rojo); y anti-LMNB (Lamina B en magenta). Las imágenes fueron modificadas a máxima saturación en términos de brillo y contraste demostrando la señal nula por la prelamina A endógena detectada por 7G11 en contraste con PL-1C7.

Acumulación de la Prelamina A endógena en células de ratón y humanas por la inhibición de la farnesilación

El estudio de las fosforilaciones ppSer652653 en las líneas GFP-prelamina A del presente trabajo, reflejó la formación de agregados intracelulares de la Prelamina A en respuesta a tratamientos con inhibidores de la farnesilación, así como otros estudios (Capelli y col. 2009). Estos agregados de prelamina A se han reportado en líneas celulares transgénicas que expresan proteínas de fusión principalmente, por lo que en este trabajo se propuso investigar la distribución de la prelamina A bajo el mismo tratamiento en el contexto endógeno.

La acumulación anormal de la proteína de fusión GFP-Prelamina A en el nucleoplasma se confirmó en la línea transgénica MEFs 24 h posterior a la inducción con Dox y al tratamiento con FTInh (Figura 17A). En contraste, tanto MEFs WT y C2C12 WT presentaron una acumulación difusa de la prelamina A en el nucleoplasma ante el inhibidor, sin la aparición detectable de agregados (Figura16B-C). Estos resultados fueron confirmados en cuatro diferentes líneas celulares humanas (Rhabdo-miosarcoma, RD; Osteosarcoma, U2-OS; fibroblastos humanos, HFFRD; y adenocarcinoma, HeLa) (Figura 17D). La acumulación de la prelamina A inducida por FTInh se demostró también por Western blots (Figura17E) y en diferentes condiciones de fijación (Figura17F). En conjunto, estos resultados demuestran que la acumulación de la prelamina A se da ante la inhibición de la farnesilación sin causar la formación de los agregados previamente descritos, sugiriendo que posiblemente la sobreexpresión o bien la presencia de la etiqueta GFP conlleva a la agregación anormal de la prelamina A.

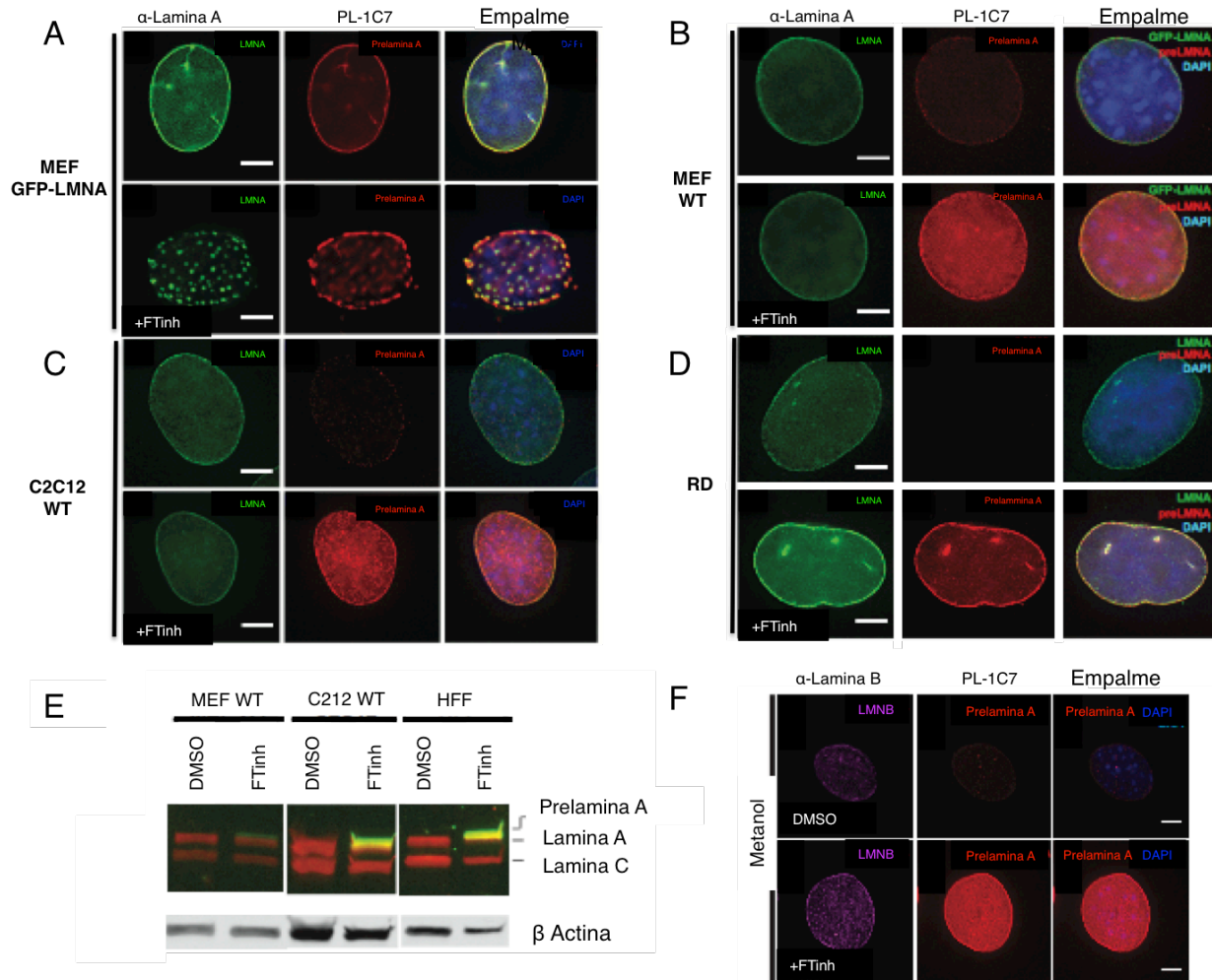


Figura 17. La acumulación de la prelamina A endógena ante la inhibición de la farnesilación refleja una distribución difusa en el nucleoplasma. A. GFP-Prelamina A MEF inmunotinción con PL-1C7 (Prelamina A en rojo) y DAPI (ADN en azul). **B.** MEF WT inmunotinción con anti-LMNA (lamina A+Prelamina A en verde), PL-1C7 (Prelamina A en rojo) y DAPI (ADN en azul). **C.** C2C12 WT inmunotinción con anti-LMNA (lamina A+Prelamina A en verde), PL-1C7 (Prelamina A en rojo) y DAPI (ADN en azul). **D.** C2C12 WT inmunotinción con anti-LMNA (lamina A+Prelamina A en verde), PL-1C7 (Prelamina A en rojo) y DAPI (ADN en azul). **E.** RD inmunotinción con anti-LMNA (lamina A+Prelamina A en verde), PL-1C7 (Prelamina A en rojo) y DAPI (ADN en azul). **E.** Detección de la

prelamina A endógena en células tratadas sin y con FTInh por Western blot usando PL-1C7; anti-LMNA (Lamina A+Prelamina A) y anti-actina como control.

4.4 Estudios de detección de prelamina A en síndromes progeriodes atípicos.

Entre los síndromes humanos asociados con defectos en el procesamiento de la prelamina A se encuentra la dermatopatía restrictiva (RD), uno de los laminopatías más severas caracterizada por defectos en el crecimiento, defectos en la piel y ligamentos, y causante de muerte en el periodo perinatal (Witt y col., 1986 en Moulson y col., 2007). RD es una enfermedad causada por mutaciones en la proteína ZMPSTE24 (Moulson col., 2005; Navarro y col., 2005). Si bien, la obtención de muestras de pacientes de RD es una limitación, se han desarrollado ratones deficientes en ZMPSTE24 (ZMPSTE24 $-/-$) que recapitulan el fenotipo de RD en dicho modelo (Leung y col., 2001). Por tanto, la línea celular estable en fibroblastos derivada de ratones ZMPSTE24 $-/-$ (MEF ZMPSTE24 $-/-$) fue utilizada para detectar la prelamina A mediante estudios de inmunolocalización usando el anticuerpo PL-1C7, demostrando la acumulación y enriquecimiento del precursor, en contraste con MEFs WT tanto por inmunofluorescencias y Western blots (Figura 18A-B). Consistente con estos resultados, se detectó la acumulación de la prelamina A con el anticuerpo PL-1C7 ante el uso del inhibidor de la actividad de ZMPSTE24 Idenavir (Figura 18C). Dichos resultados confirman el papel potencial de esta herramienta de análisis en células de pacientes RD por Western blot, inmunotinciones y potencialmente por IFC.

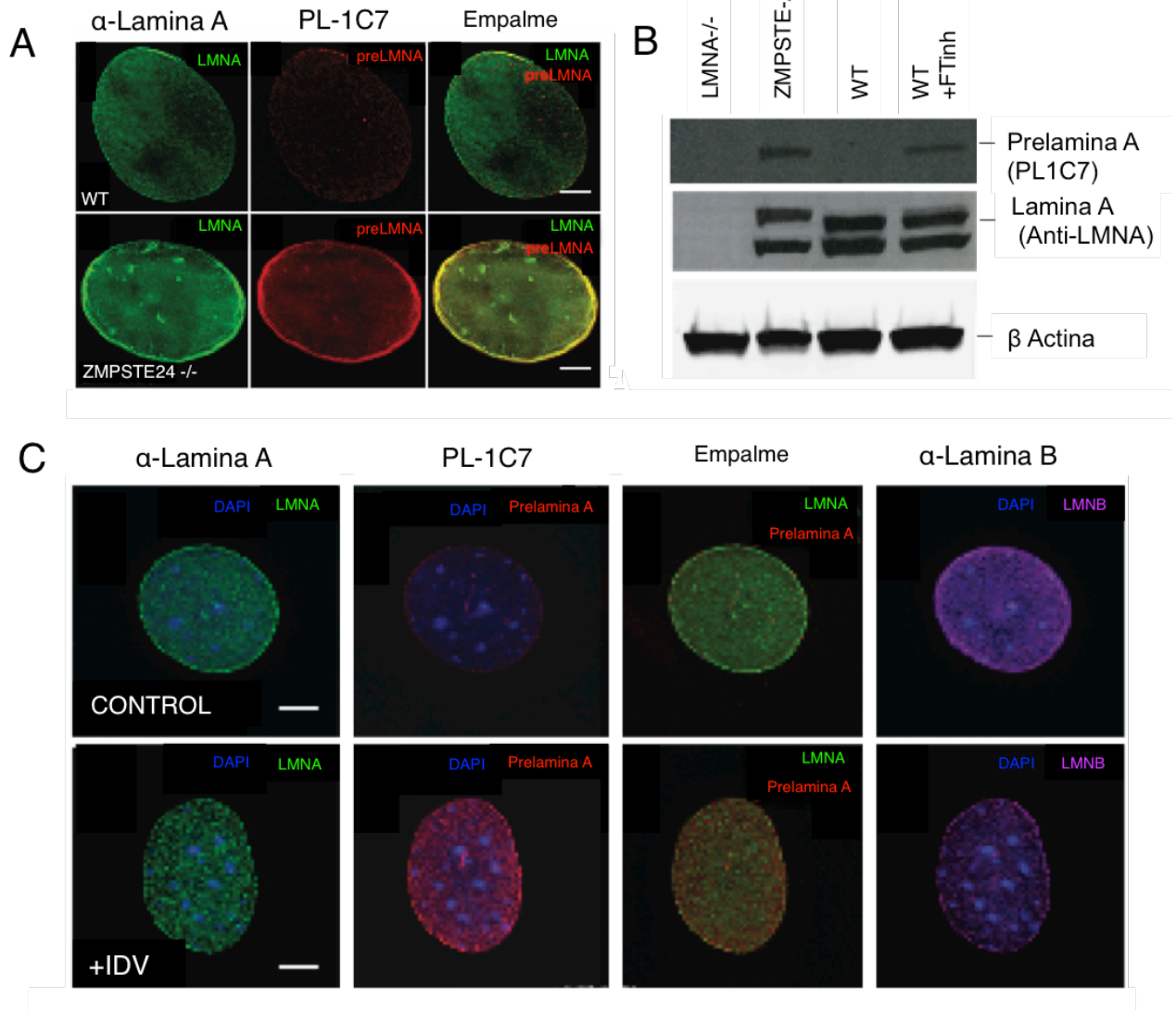


Figura 18. La acumulación de la prelamina A es detectada en células deficientes ZMPSTE24 así como ante la inhibición de su actividad. A. Núcleos representativos de MEF WT (Panel superior) y MEF ZMPSTE24^{-/-} (Panel inferior), inmunotinción con anti-LMNA (lamina A+Prelamina A en verde), PL-1C7 (Prelamina A en rojo) y DAPI (ADN en azul). **B.** Inmunodetección por Western blot de la acumulación de prelamina A (PL-1C7) en células ZMPSTE^{-/-} y tratadas con FTInh en contraste con MEFs LMNA^{-/-} y MEF WT, tanto la lamina A como la Prelamina A fue detectada por el anti-LMNA y como control de cargado se utilizó el actina B. **C.** Núcleos representativos de C2C12 WT

(Panel superior) y C2C12 WT tratadas con el inhibidor Idenavir (Panel inferior), inmunotinción con anti-LMNA (lamina A+Prelamina A en verde), PL-1C7 (Prelamina A en rojo), lamina B (lamina B en magenta) y DAPI (ADN en azul).

Además de los síndromes HGPS y RD existen un número creciente de laminopatías causadas por mutaciones en el gen LMNA. Estas mutaciones no se localizan exclusivamente en el carboxilo terminal o bien no son resultado de la proteína truncada progerina (mutación clásica de HGPS) y por tanto las enfermedades que desencadenan se conocen como Síndromes Progeroides Atípicos (SPA). Tal es el caso de aquellas causadas por las mutaciones R527C, T528M, M540T, K542N. Asimismo, los SPA incluyen otras mutaciones en el carboxilo terminal de la prelamina A, cuyo mecanismo molecular se desconoce como es el caso G608S y R644H (Tabla 3). Las implicaciones moleculares responsables del desarrollo de estas enfermedades es desconocido, por lo que en el presente trabajo se analizó el enriquecimiento de la prelamina A (PL-1C7) con respecto a la proteína madura en células de ratones nulos en lamina A (MEF LMNA^{-/-}) expresando variantes de la lamina humana marcada con el péptido FLAG (FLAG-prelamin A-WT; FLAG-hPrelamin A-R527C; FLAG-hPrelamin A-T528M; FLAG-hPrelamin A-M540T; FLAG-hPrelamin A-K542N; FLAG-hPrelamin A-G608S; FLAG-hPrelamin A-R644H).

Mutante	Mutación (cADN)	Aminoácido	Nomenclatura
R527C	c.1579C>T	527	p.Arg527Cys
T528M	c.1583C>T	528	p.Thr528Met
M540T	c.1619T>C	540	p.Met540Thr
K542N	c.1626G>C	542	p.Lys542Asn
G608S	c.1822G>A	608	p.Gly608Ser
T623S	c.1868C>G	623	p.Thr623Ser

Tabla 4. Mutaciones asociadas a Síndromes Atípicos Progeroides (SPA).

Mutaciones puntuales en la lamina A que se estudiaron en el presente trabajo, cuya presencia se ha reportado en células de pacientes con SPA. Cinco de estas mutaciones afectan aminoácidos ajenos al sitio de procesamiento de la prelamina A (R527C, T528M, M540T, K542N, G608S), es decir son independientes a la mutación causante de la progeria clásica HGPS (laminADel50 o progerina).

Los estudios de inmunolocalización por fluorescencia y microscopía no revelaron cambios dramáticos en la distribución o acumulación de la prelamina A en las mutantes evaluadas en células con baja expresión y alta expresión del transgen en comparación con la versión WT (Figura 19A y C). Consistente con el mapeo del epítipo PL-1C7, no se detectó prelamina A en las células transfectadas con la variante FLAG-Prelamina A-R644H en ninguno de los dos niveles de expresión, la cual tampoco se detectó bajo tratamientos de inhibición de farnesilación (Figura 19B).

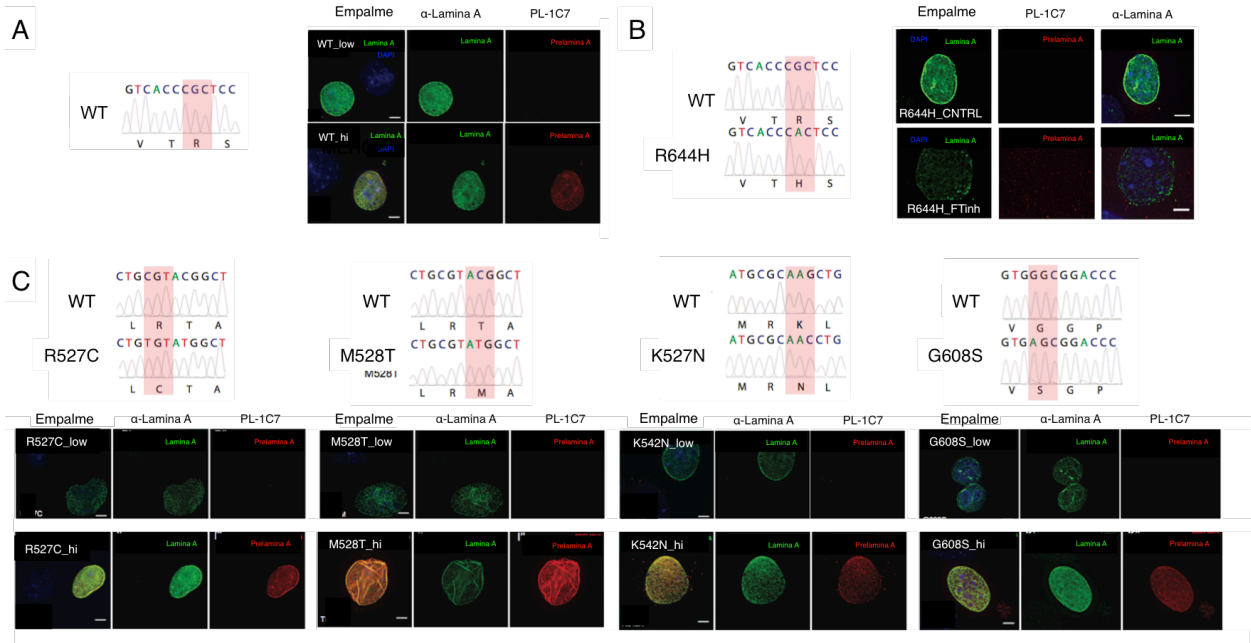


Figura 19. Detección de la prelamin A humana portadora de las mutaciones

asociadas a SPA. A. Control. MEF LMNA^{-/-} transfectados con la versión

FLAG_hPrelamina A_WT e inmunoténidos con anti-LMNA (Lamina A y prelamin A en

verde), PL1C7 (Prelamina A en rojo); Panel superior: núcleo representativo con baja

expresión de la proteína de fusión FLAG_hPrelamina A; Panel inferior: núcleo

representativo con alta expresión de fusión FLAG_hPrelamina A. Las células MEF LMNA^{-/-}

transfectadas con la versión FLAG_hPrelamina A_R644H y tratadas para la inmunotinción

con anti-LMNA (Lamina A y prelamin A en verde), PL1C7 (Prelamina A en rojo); Panel

superior: núcleo representativo con alta expresión; Panel inferior: núcleo representativo con

alta expresión+ Finh. C MEF LMNA^{-/-} transfectados con la versiones FLAG_hPrelamina

A_R527H FLAG_hPrelamina A_M528T FLAG_hPrelamina A_K542N y FLAG_hPrelamina

A_R608H y tratados para la inmunotinción con anti-LMNA (Lamina A y prelamin A en

verde), PL1C7 (Prelamina A en rojo); Panel superior: núcleo representativo con baja expresión; Panel inferior: núcleo representativo con alta expresión.

Finalmente, análisis cuantitativos por Western blots indicaron que el ratio prelamina A/lamina A fue significativamente diferente en las mutantes FLAG-hPrelamin A-M540T, FLAG-hPrelamin A-K542N y FLAG-hPrelamin A-G608S, mientras que el resto fue equivalente a la versión WT (Rincón-Arano y David Scalzo en Casasola y col., 2016). Estos resultados indican que la mutante G608S tiene un enriquecimiento significativo en prelamina A relativo al comportamiento de la WT. En contraste, en las mutantes M540T y K542N se observa una disminución en la cantidad de prelamina A en las células transfectadas, por lo que sugieren defectos en el procesamiento y recambio de la proteína. En conjunto, estos resultados confirman la relevancia de la prelamina A en su dinámica de recambio y su implicación en los síndromes progeroides reportados para las mutaciones M540T, K542N y G608S, y el la eficiencia del anticuerpo PL-1C7 para el estudio de estos síndromes.

5. DISCUSIÓN

5.1 Estudio del fosfoproteoma de la envoltura nuclear durante la diferenciación en células de mamífero (*Mus musculus*).

En el presente estudio se aplicó el análisis global de fosfoproteómica para caracterizar la dinámica de fosforilación en la envoltura nuclear de células de ratón del linaje eritroide y muscular (Líneas celulares G1E y C2C12) en el proceso de diferenciación. Los análisis bioinformáticos permitieron la identificación de una cantidad importante de factores transcripcionales, reguladores del ciclo celular y reguladores epigenéticos que parecen ser parte de la EN y estar reguladas por eventos de fosforilación. Por tanto, estas fosfoproteínas pertenecen a categorías funcionales nucleares consistentemente con el protocolo optimizado en el presente trabajo (Figura 9 y Figura 10).

Las EN de células eritroides y musculares, se encuentran enriquecidas de fosfoproteínas que apoyan la fisiología celular en cada sistema, por ejemplo, un alto porcentaje de factores transcripcionales únicos de la eritropoyesis se detectaron en las células eritroides (G1E) como Runx1, Gata1, Gata2b, entre otros (Kuvardina y col., 2006; Butko y col., 2008). En el caso de las células de musculo (C2C12), se identificaron proteínas específicas miogénicas en la EN, como la proteína α -actina (aparato contráctil en musculo esquelético), miosinas (MYH10) y TTN (Bandman y col., 1992; Rassier y col., 2015).

De las 392 fosfoproteínas identificadas en células eritroides (G1E) y en 414 en células musculares (C2C12) tanto en estado no diferenciado como diferenciado, únicamente 73 se identificaron en ambos fosfoproteomas de la EN. Estas proteínas

corresponden principalmente a reguladores de la biogénesis ribosomal, splicing y procesamiento del ARN y proteínas de la lámina nuclear (Figura 20A). Estos resultados son congruentes con la formación de la nuclear lamina por lamina A y B, por ejemplo. En el caso de reguladores epigenéticos como SETD, se encontraron fosforilados en diferentes residuos (Ampliamente discutido en resultados, sección III). Estas observaciones sugieren dos posibilidades 1) La relevancia linaje-específica de la fosforilación en la EN, controlando procesos intrínsecos de la fisiología en cada tipo celular; o 2) El sistema de enriquecimiento de fosfopéptidos utilizados para ambos sistemas podría influir en esta detección.

Apoyando la primera, los factores transcripcionales fosforilados tanto positiva como negativamente en la EN se detectaron exclusivamente en células eritroides (G1E), o en musculares (C2C12) (Figura20B). Estos resultados sugieren el papel potencial de la señalización de la fosforilación tanto en la diferenciación como a nivel tejido específico en la EN apoyando que aquellas proteínas en la EN tejido-específica podrían ser reguladores de la homeostasis celular en cada linaje celular, como es el caso de proteínas identificadas en hígado, músculo y leucocitos (Schirmer y col., 2005; Korfali y col., 2010; Korfali y col., 2012).

Una cantidad importante de proteínas clasificadas como componentes del citoesqueleto se identificaron en los dos linajes analizados (19% y 25% del total de fosfoproteínas en células eritroides y musculares, respectivamente). La presencia de componentes del citoesqueleto en la EN crea diversas preguntas interesantes que contestar, tales como si hay interacciones proteína-proteína que formen puentes moleculares citoplasma-núcleo, cual es el papel de dichas asociaciones en la diferenciación, o bien si dichas que constituyen un campo de investigación a explorar. En

este sentido, diversos estudios han demostrado la presencia de proteínas reguladoras de la organización del citoesqueleto en la EN (Lattanzi y col., 2003; Holaska y col., 2004; Berck y col., 2013, Khatau y col., 2009; Mellad y col., 2010; Fridkin y col., 2010; Gay y col., 2011; Kim y col., 2012; Chambliss y col., 2013; Tokjander y col., 2012; Shao y col., 2015; Ho y col., 2013; Artherton y col., 2015). En general, dichas proteínas se han encontrado implicadas en la regulación de procesos de mecano-transducción, el mantenimiento de las propiedades físicas del núcleo, así como en la diferenciación celular (p.e. el nucleador de actina filamina A, las adhesiones focales y las fibras de actina perinuclear) (Gay y col., 2011; Khatau, 2012; Kim y col., 2012; Chambliss y col., 2013; Plessner y col., 2015; Shao y col., 2015; Discroll y col., 2015). Interesantemente, las proteínas citoplasmáticas detectadas fosforiladas en la EN de células eritroides y musculares tampoco se conservan (Figura 20C), lo que se apoya en la dinámica diferencial del citoesqueleto en ambos sistemas celulares, en paralelo con su posible potencial en la regulación de las propiedades físicas del núcleo a nivel tejido-específico.

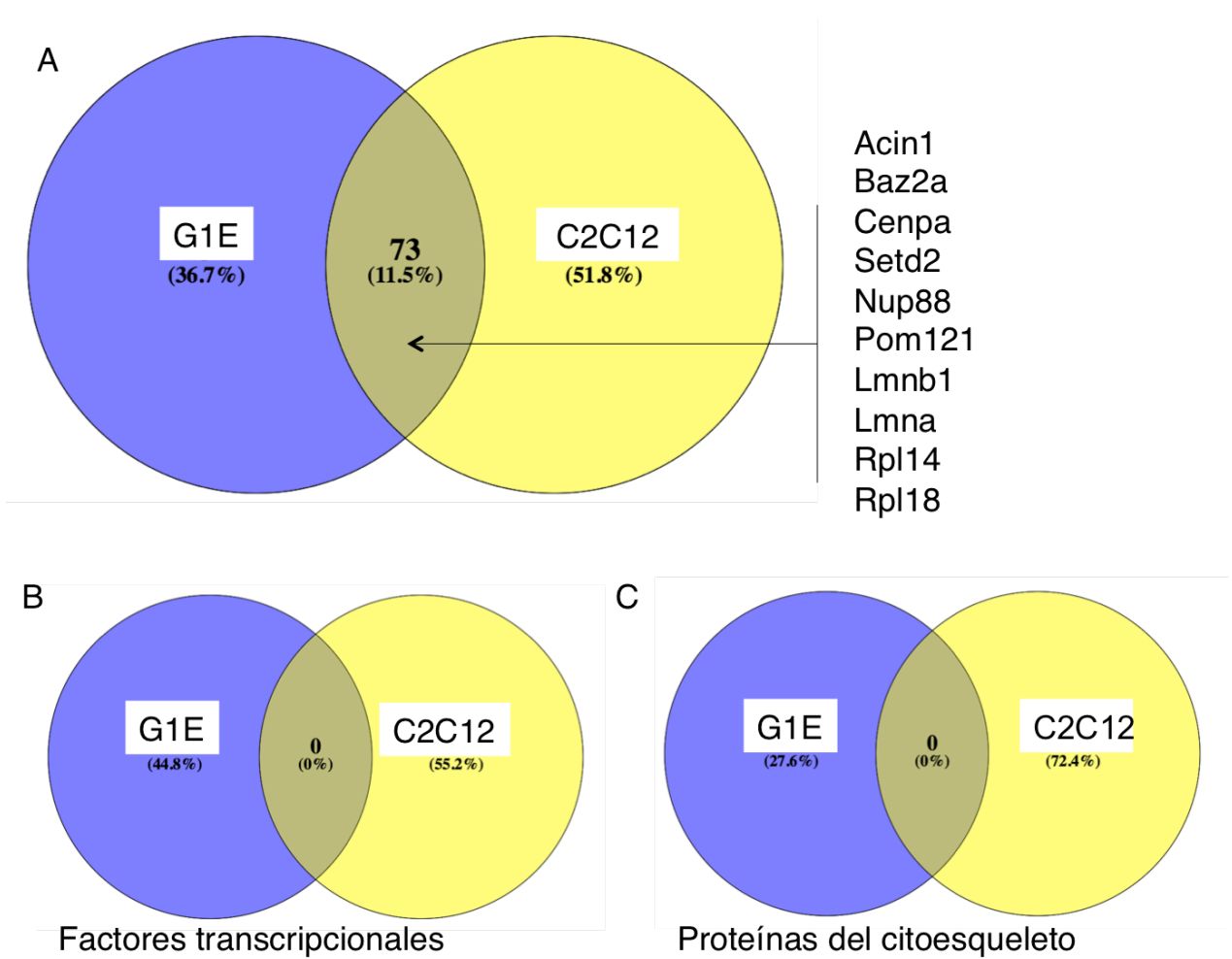


Figura 20. El fosfoproteoma de la EN de células eritroides y musculares refleja una dinámica de fosforilacion linaje celular-específica. A. Diagrama de Venn que representa las fosfoproteínas de EN identificadas en cada sistema celular, incluyendo precursores y células diferenciadas (G1E en azul, C2C12 en amarillo). La categoría funcional de las proteínas compartidas se identificó por el software DAVE. B. Representación por diagrama de Venn de las proteínas que corresponden a factores transcripcionales tanto positivos como negativos en células eritroides (G1E en azul) y musculares (C2C12 en amarillo). C. Representación por diagrama de Venn de las proteínas que corresponden a actividades de

organización del citoesqueleto en células eritroides (G1E en azul) y musculares (C2C12 en amarillo).

Por otro lado, es posible que determinado porcentaje de las fosfoproteínas detectadas en este estudio correspondan a interacciones reguladas (temporales) entre los componentes de la EN y los factores transcripcionales, histonas, entre otros. Tal es el caso del factor transcripcional Bclaf1, cuya fosforilación en los residuos Ser655, Ser175 y Ser394 se detectó tanto en G1Eundif como en G1Edif, mientras que las fosforilaciones pSer493 y pSer221 se encontraron únicamente en proeritroblastos (G1Eundif). Bclaf1 se asocia con complejos diferenciales con las proteínas de EN Lap2, Emerina y Man1, y dependiendo de la proteína de unión ejerce un papel represor o activador (Beck y col. 2014), por tanto, las fosforilaciones diferenciales entre estado diferenciado y no diferenciado (pSer493 y pSer221) en células eritroides podrían reflejar un mecanismo de regulación en este contexto.

El presente estudio del fosfoproteoma permitió encontrar una red regulatoria entre fosfoproteínas y cinasas potenciales de acción en la EN por medio de análisis de predicción *in silico* (iGPS y Networkin). A largo plazo esto podría constituir la base para vislumbrar mecanismos de regulación a nivel global en la EN.

Si bien, este trabajo propone proceder con análisis cuantitativos, la validación por los análisis de *Gene ontology* y la extensiva revisión de la literatura proveen evidencias claras de la relevancia de los mismos. Por otro lado, a pesar de los avances en los análisis a gran escala de modificaciones postraduccionales, la detección de fosforilaciones sigue siendo un reto debido a la necesidad de emplear diversos pasos métodos de enriquecimiento de

fosfopéptidos, la baja abundancia de los mismos y la necesidad de aplicar análisis altamente complejos de LC-MS/MS (Olsen y col., 2006; Olsen i col, 2010; Sharma y col., 2014; Humprey y col., 2015; Piccotti y col., 2016). Por tanto, la aplicación combinatoria de métodos cuantitativos del proteoma y los perfiles de expresión de RNA constituye un acercamiento integrativo y prometedor para construir un panorama holístico del fosfoproteoma en la EN, sin embargo, relacionar la expresión del transcrito con la abundancia de una proteína no es factible, ya que casi siempre no existe una correlación directa entre estos dos aspectos.

5.2 Estudio de las fosforilaciones en la Lamina A.

De todas las fosforilaciones detectadas s en las EN de células eritroides y musculares, un número escaso se identificó conservada entre ambos sistemas. Tal es el caso de la lamina A, la cual se detectó fosforilada en tres residuos p12, p573, p652653 como se ha discutido. Esto sugiere que dichas fosforilaciones están implicadas en mecanismos de regulación basales o corriente abajo hacia las rutas de diferenciación celular, que posiblemente no son linaje-específicos por si mismos (Swift y col., 2013; Burke y col., 2014), sino que en conjunto con la expresión de la proteína lamina A en la diferenciación y su abundancia tejido específica ejercen su relevancia funcional.

En particular, los análisis del evento p652653 en el precursor prelamina A estudiado en este trabajo no indican relevancia funcional en términos de localización y en los primeros pasos del procesamiento postraduccional. Sin embargo, resultados preliminares sugieren que las fosforilaciones pp652653 podrían estar implicadas en la regulación del corte por la metaloproteinasas ZMPSTE24-/- o bien interrumpiendo las interacciones con proteínas de

unión e incluso con cromatina, como se ha reportado para la mutante del HGPS, progerina (Maraldi y col., 2005; Kuben y col., 2012; Dittmer y col., 2014; Solovei y col., 2013). Futuros estudios son necesarios para evaluar estas posibilidades.

Además en este trabajo se definieron más de 50 fosforilaciones a lo largo del cuerpo de la proteína lamina A en las células musculares (C2C12), muchas de ellas han sido reportadas en otros fosfoproteomas o estudios específicos como es el caso de la Ser12, Ser22, Ser394 y la Ser404, mientras que el papel de muchas otras sigue sin elucidarse (Swift y col., 2013; Kochin y col., 2014; Thovarlson y col., 2015).

Así como nuestro modelo de estudio, la proteína lamina A, cada fosfoproteína identificada en la EN constituye una amplia gama de candidatos de estudio, cuya relevancia regulatoria puede ser evaluada a nivel bioquímico y estructural así como su participación en procesos celulares específicos.

5.3 Desarrollo del anticuerpo monoclonal anti-Prelamina A PL-1C7.

Dentro de los cerca de 859 anticuerpos existentes para la lamina A/C, menos del 25% se han dirigido específicamente contra el precursor prelamina A (Base de datos de anticuerpos, Antibodypedia http://www.antibodypedia.com/text/about_us). Además, la mayor parte de estos anticuerpo anti-prelamina A no ha sido caracterizado en términos del epítipo de reconocimiento. De aquellos anticuerpos que reconocen la prelamina A, se han reportado específicos para intermediarios del precursor, o bien, incapaces de reconocer a la proteína endógena (Sinensky y col., 1994; Lee y col., 2010; Davies y col., 2010, Wang y col., 2013)

La dificultad de detección de la prelamina A endógena en tejidos y sistemas celulares por los anticuerpo existentes se puede deber a la secuencia antigénica utilizada, la afinidad de estos anticuerpos y principalmente a los bajos niveles del precursor. Sin embargo, en este trabajo se demostró que el anticuerpo PL-1C7 reconoce a la proteína endógena.

Por otro lado, la mayor parte de los estudios de inmunodetección de la prelamina A se han hecho con anticuerpos presuntamente específicos, sin embargo, muchos de ellos reconocen a la proteína madura o bien al fragmento liberado después del corte. Entonces, estudios utilizando una combinatoria de herramientas de inmunodetección como el anticuerpo PL-1C7 y otros reportados será necesaria para esclarecer la relevancia funcional del precursor.

La distribución específica de la prelamina A en la EN podría ser un descubrimiento clave para el entendimiento de su proceso de integración en el núcleo, presuntamente lenta y en bajas cantidades mientras su procesamiento es bastante rápido así como su vida media, de manera que la lamina es altamente detectable en células diferenciadas pero no en células no diferenciadas.

La proteína lamina A ha sido implicada en una amplia variedad de procesos celulares incluyendo el mantenimiento de los telómeros y el control de senescencia por su actividad con el factor transcripcional Retinoblastoma (Rb), sin embargo, el hecho de que células carentes de lamina A (*Lmna*^{-/-}) puedan subsistir dada la redundancia funcional de otras proteínas (p.e. LBR, Lamina B), o bien, dicha ausencia de la lamina A no parece desestabilizar las interacciones con regiones genómicas dramáticamente (Kim y col., 2013; Shimi y col., 2015; Amendola y col., 2015), lleva a preguntarnos su relevancia biológica. En

términos evolutivos, la aparición de la proteína lamina A es reciente relativamente con la lamina B (Peter y col., 2012), por lo que es posible pensar que tanto sus funciones, así como la presión selectiva a la que esta proteína ha sido sujeta, se han restringido a tipos celulares específicos. Esta idea es apoyada por la relevancia de la lamina A en el establecimiento de las propiedades físicas del núcleo en células diferenciadas, en contraste con células pluripotentes (Pajeroski y col., 2006; Kaminski y col., 2014, Makhija y col., 2015). Asimismo, es posible pensar que la versión madura y la proteína precursora ejercen diferentes funciones, las cuales se regulan también a través de su procesamiento. Entonces es viable preguntarse si el precursor prelamina A tendrá otras funciones. Estas y otras preguntas constituyen un campo fascinante por explorar en estudios futuros.

5.4 Estudios de detección de Prelamina A en síndromes progeriodes atípicos.

Las mutaciones en el gen lamina A han sido un campo de estudio de alto interés en las últimas décadas. La amplia funcionalidad de la lamina A coincide con el desarrollo de una amplia gama de síndromes humanos sin embargo, su reciente aparición evolutiva se correlaciona con la frecuencia baja de la misma en la población mundial. Sin embargo, la diversidad tanto en mutaciones puntuales como en síndromes del tipo progeroide crece constantemente, en paralelo con el acceso, las herramientas tecnológicas y los avances en las estrategias de diagnóstico.

Esta diversidad se ve reflejada a nivel tanto genético como estructural en la proteína lamina A. Por ejemplo, mutaciones en el mismo aminoácido de la lamina A causan diferentes laminopatías ante la conversión a diversos aminoácidos como el R527C que se puede mutar también por R527H causando diferentes presentaciones clínicas (Di-Qing Luo

y col., 2014; Albazani y col., 2014) .Esta diferencia sugiere alteración de los dominios de unión a otras proteínas (p.e. en R527H), la ganancia o pérdida de función en diferentes procesos (Dittmer y col., 2014; Albazani y col., 2014; Davison y Lammerding, 2014). Sin embargo, todas estas mutaciones en la lamina A afectan con mayor impacto los tejidos de origen mesenquimal, como el músculo, los cuales presentan propiedades físicas específicas y además implican alteraciones en la diferenciación, así como, su habilidad para responder al medio (Pajerowski y col, 2006; Makhija y col., 2015; Swift y col., 2013; Ho y col., 2013; Malashicheva y col., 2015)

Estudios de diferenciación por estímulos mecánicos conectan el papel primordial de la envoltura nuclear en la especificación de linajes celulares, tal es el caso de la participación del complejo LINC en la inhibición del linaje adipogénico en MSC y su papel potencial en la especificación al linaje óseo (Rubin y col., 2004; Judex y col., 2004; Uzer y col., 2014; Uzer y col., 2015). En conjunto, estos descubrimientos podrían develar los mecanismos moleculares de las mutaciones en la prelamina A en lipodistrofias.

En este trabajo se detectó una diferencia significativa en el recambio de la prelamina A/Lamina A en las mutantes M540Ty K542N comparadas con la proteína WT. Estos resultados sugieren que existen defectos posibles en el procesamiento de la prelamina A, en el recambio entre la versión madura y el precursor. Estas mutantes se estudiaron en las células transfectadas con los vectores que codifican las proteínas de fusión LMNA_M540Ty LMNA_K542N independientemente, mientras que la aparición de ambas mutaciones (M540T y K542N) se han reportado concomitante en pacientes (Verstraeten y col., 2006).

Finalmente, en este trabajo se encontró que la mutación G608S en la prelamina A causa la acumulación de la misma, en contraste con la existencia de una versión truncada

como fue propuesta previamente (Erickson y col., 2003). Debido a que la validación de la versión truncada G608S a nivel proteico no ha sido demostrada y las evidencias de la especificidad del anticuerpo anti-prelamina A generado en este estudio (PL-1C7), es posible pensar que la acumulación detectada está implicada en el desarrollo del síndrome progeroide laminopatía causado por la mutación G608S. En este sentido, es de esperarse que la mutante G608S presente los defectos de la progeria clásica (G608G, HGPS). Sin embargo, el hecho de que exista un sitio de procesamiento alternativo originando una versión truncada no se descarta (Erickson y col., 2003), ya que ambos mecanismos no son biológicamente excluyentes.

Los análisis de la participación de las mutaciones asociadas a los SPA, se llevaron a cabo por proteínas de fusión y en un contexto nulo en lamina A en línea celulares de ratón (Leung y col., 2001; Fong, y col, 2006; Young y col., 2006; Ibrahim y col., 2013). Si bien, el programa genético en ratón es altamente conservado con el de humano, y su uso extensivo como modelo de progeria ha sido crucial para este campo, estudios en líneas celulares derivadas de pacientes con SPA, o bien, en cultivos primarios derivados de los mismos, serán indispensables para proseguir estas investigaciones a nivel clínico, en términos de laminopatías.

En resumen, la generación, validación y caracterización del anticuerpo PL-1C7 constituye una herramienta fundamental para el estudio de la prelamina A, tanto en estudios de laminopatías como para estudios funcionales de la proteína en los procesos celulares que contribuirá a la definición de nuevas preguntas y rutas de acción en términos de la dinámica nuclear.

6. CONCLUSIONES

La envoltura nuclear es una subestructura celular altamente compleja que constituye un campo de investigación relativamente reciente, poco explorado y fascinante en el estudio de la biología celular. El presente trabajo refleja la amplia diversidad de la membrana nuclear en términos de la composición proteica, así como el alto número de eventos de fosforilación que potencialmente regulan dichos componentes. El fosfoproteoma presenta una dinámica de recambio durante la diferenciación eritroide y muscular en líneas celulares de ratón. Nuestros resultados delimitan un marco de estudio en la dinámica nuclear a nivel global y abren un amplio espectro de preguntas por explorar, por ejemplo nos hace preguntarnos si los eventos de fosforilación en células diferenciadas son consecuencia de los procesos de diferenciación, o bien participan en la señalización que la desencadena o mantiene, posibilidades que no son excluyentes. Por tanto, la validación de las fosforilaciones identificadas en este proyecto, así como el estudio de su relevancia funcional en estudios futuros es necesaria para el descubrimiento de nuevos mecanismos de control en el transporte citoplasma-núcleo, motilidad, división celular y migración celular, entre otros.

La generación de herramientas moleculares de detección de componentes de la envoltura nuclear constituye un parteaguas para su estudio, como es el caso del anticuerpo PL-1C7. Si bien la proteína lamina A ha sido foco de investigación en las últimas décadas poco se sabe acerca de su precursor prelamina A. El anticuerpo PL-1C7 permitió determinar la localización intermitente de la prelamina A en la envoltura nuclear, su

comportamiento ante bloqueadores de farnesilación en contexto endógeno, el cual difiere de lo observado con proteínas de fusión (p.e. GFP), así como los efectos tanto positivos como negativos en la tasa de recambio y maduración hacia su contraparte madura (lamina A) cuando se presentan mutaciones asociadas con síndromes progeroides. En este sentido, estudios futuros evaluarán el comportamiento del precursor en células derivadas de pacientes así como el descubrimiento de los mecanismos moleculares que conforman la base del papel de la prelamina A.

7. REFERENCIAS

- Alber F, Dokidovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, Suprpto A, Karnit-Schmit O, Williams R, Chait B, Sali A, Rout M. (2007). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature*, 450:695-701.
- Alvarez-Fernandez, M, Malumbres, M. (2014). Preparing a cell for nuclear envelope breakdown: Spatio-temporal control of phosphorylation during mitotic entry. *Bioessays*, 36:757-65.
- Apel ED, Lewis RM, Grady RM, Sanes JR. (2000). Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the 6 neuromuscular junctions. *J Biol Chem*, 275: 31986-31995.
- Araújo-Vilar D, Lattanzi G, González-Méndez B, Costa-Freitas AT, Prieto D, Columbaro M, Mattioli E, Victoria B, Martínez-Sánchez N, Ramazanov A. (2009). Site-dependent differences in both prelamin A and adipogenic genes in subcutaneous adipose tissue of patients with type 2 familial partial lipodystrophy. *J. Med. Genet*, 46:40–8.
- Arnone JT, Walters AD, Cohen-Fix O. (2013). The dynamic nature of the nuclear envelope: Lessons from closed mitosis. *Nucleus*, 4:261-266.
- Azibani f, Muchir A, Vignier N, Bonne G, Bertrand AT. (2014). Striated muscle laminopathies *Semin. Cell Dev Biol*, 29: 107-115.
- Bahmanyar, S, Biggs, R, Schuh, AL, Desai, A, Muller-Reichert T, Audhya A, Dixon JE, Oegema, K. (2014). Spatial control of phospholipid flux restricts endoplasmic reticulum sheet formation to allow nuclear envelope breakdown. *Genes Dev*, 28:121-126.
- Bahmanyar, S. (2015). Regulation of phospholipid synthesis within the nuclear envelope domain of the endoplasmic reticulum. *Nucleus*, 6:102–106.
- Balciunas D, Wangensteen KJ, Wilber A, Bell J, Geurts A, Sivasubbu S, Wang X, Hackett PB, Largaespada DA, McIvor RS. (2006). Harnessing a High Cargo-Capacity Transposon for Genetic Applications in Vertebrates. *PLoS Genet*, 2:1724-1715.
- Barbosa AD, Sembongi H, Su WM, Abreu S, Reggiori F, Carman GM, Siniosoglou S. (2015). Lipid partitioning at the nuclear envelope controls

- membrane biogenesis. *Mol Biol Cell*, 26:3641-3657.
- Barrowman J, Hamblet C, George CM, Michaelis S. (2008). Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CaaX processing compartment. *Mol Biol Cell*, 19:5398–408.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Cgepelev I, Zhao K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129:823-837.
 - Barthelemy F, Navarro C, Fayek R, Da Silva N, Roll P, Sigaudy S, Oshima J, le Bonne GE, Papadopoulou-Legbelou K, Evangeliou AE, Spilioti M, Lemerrer M, Wevers RA Morava E, Robaglia-Shlupp A, Levy N, Bartoli M, De Sandre Giovannoli A. (2015). Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: a transcriptional study. *Euro J Hum Genet*, 23:1051–1061.
 - Beck LA, Hosick TJ, Sinensky M. (1990). Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *J. Cell Biol*, 110:1489–1499.
 - Beck M, Forster F, Ecke M, Plitzko JM, Melchior F, Gerisch G, Baumeister W, Medalia O. (2004). Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science*, 306: 1387–1390.
 - Beck M, Lucic V, Forster F, Baumeister W, Medalia O. (2007). Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography. *Nature*, 449: 611–615.
 - Berger SL, Felsenfeld G. (2001). Chromatin goes global. *Mol Cell*, 8:263-8.
 - Berk J, Simon DN, Jenkins-Houk CR, Westerbeck JW, Grønning-Wang LM, Carlson CR, Wilson KL. (2014). The molecular basis of emerin–emerin and emerin–BAF interactions. *J Cell Sci*, 127:3956-3969.
 - Bandman, E. (1992). Contractile protein isoforms in muscle development. *Develop Biol*, 154: 273–283.
 - Biamonti G, Giacca M, Perini G, Contreas G, Zentilin L, Weighardt F, Guerra M, Valle Della G, Saccone S, Riva S. (1992). The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol*, 12:3499–3506.
 - Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Bécane HM, Hammouda EH, Merlini L,

- Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, 21:285–8.
- Boros J, Arnoult N, Stroobant V, Collet JF, Decottignies A. (2014). Polycomb repressive complex 2 and H3K27me3 cooperate with H3K9 methylation to maintain heterochromatin protein 1 α at chromatin. *Mol Cell Biol*, 34:3662-3674
 - Bronshtein I, Kepten E, Kanter I, Berezin S, Lindner M, Redwood AB, Mai S, Gonzalo S, Foisner R, Shav-Tal Y, et al. (2015). Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior. *Nature Comm*, 6:8044.
 - Brown CR, Kennedy CJ, Delmar VA, Forbes DJ, Silver PA. (2008). Global histone acetylation induces functional genomic re-organization at mammalian nuclear pore complexes. *Genes Dev*, 22: 627–639.
 - Buendia B, Courvalin JC, Collas P. (2001). Dynamics of the nuclear envelope at mitosis and during apoptosis. *Cell Mol Life Sci*; 58:1781–1789.
 - Burke B, Stewart CL. *Functional Architecture of the Cell's Nucleus in Development, Aging, and Disease*. (2001). *Curr Top Dev Biol*;109: 1-52.
 - Bushey AM, Dorman ER, Corces VG. (2008). Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Rvw Mol Cell*, 32:1-9.
 - Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet. (1999). Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci*, 112:761-72.
 - Mori S, Bernardi R, Laurent A, Resnati M, Crippa A, Gabrieli A, et al. (2012) Myb-Binding Protein 1A (MYBBP1A) Is Essential for Early Embryonic Development, Controls Cell Cycle and Mitosis, and Acts as a Tumor Suppressor. *PLoS ONE*, 7: 1-14
 - Cain JA, Solis N, Cordwell J. (2014). Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria, *J Proteomics*. 97:265-86.
 - Callan HG, Tomlin SG. (1950). Experimental studies on amphibian oocyte nuclei. I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 137:367-78.

- Camps, J, Wangsa, D, Falke, M, Brown, M, Case, CM, Erdos, MR, and Ried, T. (2014). Loss of lamin B1 results in prolongation of S phase and decondensation of chromosome territories. *FASEB J*, 28: 3423–3434
- Capanni C, Mattioli E, Columbaro M, Lucarelli E, Parnaik VK, Novelli G, Wehnert M, Cenni V, Maraldi NM, Squarzone S. (2005). Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet*, 14:1489–502.
- Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, Gordon LB, Der CJ, Cox AD, Collins FS. (2003). Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:12879–84.
- Capell BC, Olive M, Erdos MR, Cao K, Faddah DA, Tavares UL, Conneely KN, Qu X, San H, Ganesh SK. (2008). A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:15902–1507.
- Caron M, Auclair M, Donadille B, Béréziat V, Guerci B, Laville M, Narbonne H, Bodemer C, Lascols O, Capeau J, (2007). Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ*, 14:1759–67.
- Chambliss AB, Khatau SB, Erdenberger N, Robinson DK, Hodzic D, Longmore GD, Wirtz D. (2013). The LINC-anchored actin cap connects the extracellular milieu to the nucleus for ultrafast mechanotransduction. *Sci Rep*, 3:1087
- Chan, JN, Poon, BP, Salvi J., Olsen, J.B, Emili, A, Mekhail, K, (2011). Perinuclear cohibin complexes maintain replicative life span via roles at distinct silent chromatin domains. *Dev Cell*. 20:867-879
- Chen K, Liu J, Heck S, Chasis JA, An X, Mohandas N. (2009). Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:17413–17418.
- Clements L, Manilal S, Love DR. and Morris GE. (2000). Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem Biophys Res Commun*, 267:709-714.

- Collas P, Courvalin JC, Poccia DL. (1996). Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein. *J Cell Biol*, 135:1715–1725.
- Columbaro M, Capanni C, Mattioli E, Novelli G, Parnaik VK, Squarzoni S, Maraldi NM, Lattanzi G. (2005). Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. *Cell Mol Life Sci*; 62:2669–2678 .
- Corces VG, Bortle V. (2012). Nuclear organization and genome function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28:163-87.
- Crabbe L, Cesare AJ, Kasuboski JM, Fitzpatrick JA, Karlseder J, (2012). Human telomeres are tethered to the nuclear envelope during postmitotic nuclear assembly. *Cell Rep*. 2:1521-1529.
- Cremer T, Cremer C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev Gen*, 2:292-301.
- Cremer T, Cremer T. (2010). Chromosome territories. *Cold. Spring Harbor*. 2:-003889
- Crisp M, Liu Q, Roux K. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm role of the LINC complex. *J Cell Biol*, 172:41-53.
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore W. (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the Human Nucleus *JCB*. 146: 1119-1131
- Luger K, Mäder AW, Richmond, RK, Sargent DF, Richmond T. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389:251-260.
- Csoka AB. (2004). Novel lamin A/C gene (LMNA) mutations in atypical progeroid syndromes. *J Med Genet*, 41:304–8.
- Cusanelli and Chartrand P. (2014). Telomeric noncoding RNA: telomeric repeat-containing RNA in telomere biology. *Wiley Inter Rvw. RNA.*, 5: 407-419
- D’Angelo M, Raices M. (2012). Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 13:687

- D'Angelo M, Raices M, Panowski, Hetzer M. (2009). Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in post-mitotic cells. *Cell*, 136: 284–295.
- D'Angelo MA, Anderson DJ, Richard E, Hetzer MW. (2006). Nuclear pores form de novo from both sides of the nuclear envelope. *Science*, 312: 440–443.
- Daneholt B. (2011). Packing and delivery of a genetic message. *Chrom*, 110:173-85.
- Dimitrova DS, Gilbert D. (1999). The Spatial Position and Replication Timing of Chromosomal Domains Are Both Established in Early G1 Phase. *Mol Cell*, 4:983–993.
- Das A, Slaughter BD, Unruh JR, Bradford WD, Alexander R, Rubinstein B, Li R. (2012). Flippase-mediated phospholipid asymmetry promotes fast Cdc42 recycling in dynamic maintenance of cell polarity. *Nat Cell Biol*, 14: 304–310.
- Schneider R, Hitomi M, Ivessa AS, Fasch EV, Kohlwein SD, Tartakoff AM. (1996). A yeast acetyl coenzyme a carboxylase mutant links very-long-chain fatty acid synthesis to the structure and function of the nuclear membrane-pore complex. *Mol Cell Biol*, 16:7161–7172.
- Dauer WT, Worman HJ. (2009). The nuclear envelope as a signaling node in development and disease. *Dev Cell*, 17:626–638.
- Davidson PM, Lammerding J. (2004). Broken nuclei – lamins, nuclear mechanics, and disease. *Trends Cell Biol*, 24:247–56.
- De Souza CP, Osmani AH, Hashmi SB, Osmani SA. (2004). Partial nuclear pore complex disassembly during closed mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol*, 14:1973-84.
- Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev*, 22:832-53.
- Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD. (2008). Nuclear lamins: Major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev*, 22: 832–853.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:4955–60.
- Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N, (2002). Capturing chromosome conformation. *Science*, 295:1306-1311
 - Demmerle J, Koch AJ, Holaska JM. (2012). The nuclear envelope protein emerin binds directly to histone deacetylase 3 (HDAC3) and activates HDAC3 activity. *J Biol Chem*, 22:22080-22088.
 - Dilworth DJ, Tackett AJ, Rogers RS, Yi EC, Christmas RH, Smith JJ, Siegel AF, Chait BT, Wozniak RW, Aitchison JD. (2005). The mobile nucleoporin Nup2p and chromatin-bound Prp20p function in endogenous NPC-mediated transcriptional control. *J Cell Biol*, 171: 955:965.
 - Dimotrova D, Gilbert DM, (1999). The Spatial Position and Replication Timing of Chromosomal Domains Are Both Established in Early G1 Phase. *Mol Cell*, 4:983-993.
 - Ding D, Muthuswamy S, Meier I. (2012). Functional interaction between the Arabidopsis orthologs of spindle assembly checkpoint proteins MAD1 and MAD2 and the nucleoporin NUA. *Plant Mol Biol*, 79:203-216.
 - Discher DE, Janmey P, Wang YL. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310:1139–1143.
 - Discroll, Cosgrove BD, Heo SJ, SHurden ZE, Mauack RL. Cytoskeletal to Nuclear Strain Transfer Regulates YAP Signaling in Mesenchymal Stem. *Cells Bio J*.108: 2783–2793
 - Dittmer TA, Misteli T. (2011). The lamin protein family. *Genome Biol*, 12:222.
 - Dixon, JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485: 376–380.
 - Zullo JM, Demarco, IA, Pique-Regi R, Gaffney DJ, Epstein CB, Spooner CJ, Luperchio TR. (2012). DNA sequence-dependent compartmentalization and silencing of chromatin at the Nuclear lamina. *Cell*. 149, 1474-1487.

- Domart, MC, Hobday, TM, Peddie, CJ, Chung, GH, Wang, A, Yeh, K., Jethwa, N, Zhang, Q, Wakelam, MJ, Woscholski, R, Byrne, RD, Collinson, LM, Poccia, DL, Larijani, B. (2012). Acute manipulation of diacylglycerol reveals roles in nuclear envelope assembly & endoplasmic reticulum morphology. *PLoS One*, 7:51150.
- Dominici S, Fiori V, Magnani M, Schena E, Capanni C, Camozzi D, D'Apice MR, Le Dour C, Auclair M, Caron M. (2009). Different prelamin A forms accumulate in human fibroblasts: a study in experimental models and progeria. *Eur J Histochem*, 53:43–52.
- Dorner D, Gotzmann J, Foisner R. (2007). Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2a, Rb, and BAF, in transcriptional regulation. *FEBS J*, 274 1362–1373.
- DuFort CC, Paszek MJ, Weaver VM. (2011). Balancing forces: Architectural control of. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12:308-319.
- Dultz E, Zanin E, Wurzenberger C, Braun M, Rabut G, Sironi L, Ellenberg J. (2008). Systematic kinetic analysis of mitotic dis- and reassembly of the nuclear pore in living cells. *J Cell Biol*, 180: 857–865.
- Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo EM. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474:179-483.
- Dwyer N, Blobel G. (1976). A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J Cell Biol*, 70:581–91.
- Nuclear envelope from extended ER cisternae precedes nuclear pore assembly. *J Cell Biol*, 194:425-440.
- Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 423:293–8.
- Federico C, Scavo C, Cantarella CD, Motta S, Saccone S, Bernardi G. (2006). Gene-rich and gene-poor chromosomal regions have different locations in the interphase nuclei of cold-blooded vertebrates. *Chrom*, 115:123–128.
- Fedorova, E, Zink D. (2008). Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta* 1783:2174–2184.

- Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, White FM. (2002). Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 20:301–305.
- Filesi I, Gullotta F, Lattanzi G, D'Apice MR, Capanni C, Nardone AM, Columbaro M, Scarano G, Mattioli E, Sabatelli P. (2005). Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol Genomics*, 23:150–158.
- Finlan LE, Sproul, Thomson D, Boyle ES, Kerr P, Perry B, Ylstra, JR. Chubb, Bickmore WB. (2008). Recruitment to the nuclear can alter expression of genes in human cells. *Plos Genetics*, 4: 1-13
- Flemming, D, Sarges P, Stelter P, Hellwig A, Böttcher B, Hurt E (2009). Two structurally distinct domains of the nucleoporin Nup170 cooperate to tether a subset of nucleoporins to nuclear pores. *J. Cell Biol*, 185:387–395.
- Florens L, Korfali N, Schirmer. (2008). Subcellular fractionation and proteomics of nuclear envelopes. *Methods Mol Biol*, 432:117-37.
- Fong LG, Frost D, Meta M, Qiao X, Yang SH, Coffinier C, Young SG. (2006) A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science*, 311:1621–1623.
- Frey S, Richter RP, Gorlich D. (2006). FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science*, 314: 815–817.
- Fridkin A, Penkner A, Jantsch V, Gruenbaum Y. (2009). SUN-domain and KASH-domain proteins during development meiosis and disease. *Cell Mol Life Sci*, 67, 781–796.
- Furukawa K, Hotta Y. (1993). cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *Embo J.*, 12: 97–106.
- Garcia-Gonzalez E, Escamilla-Del-Arenal M, Arzate-Mejia R, Recillas Targa F. (2016). Chromatin remodeling effects of enhancing activity. *Cell Mol Life Sci*. 1-14
- Garg A, Subramanyam L, Agarwal AK, Simha V, Levine B, D'Apice MR, Novelli G, Crow Y. (2009) Atypical Progeroid Syndrome due to heterozygous missense

- LMNA mutations. *J Clin Endocrinol & Metab*, 94:4971–83.
- Gaspar-Maia A, Alajem A, Polesso A, Sridharan R, Mason MJ, Heidersbach A, Ramalho-Santos J, McManus MT, Plath, K, Meshorer E, Ramalho-Santos M, (2009). Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 460:863-868.
 - Gasser, SM. (2002). Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science*. 296:1412-6.
 - Gavet O, Pines J, (2010). Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol*, 189:247-259.
 - Gay S, Foiani M. (2015). Nuclear Envelope and Lock and Key of Genome Integrity. *Int Rev Cell & Mol Bio*, 315:267-329.
 - Gay O, Gilquin B, Nakamura F, Jenkins ZA, McCartney R, Krakow D, Deshiere A, Assard N, Hartwig JH, Robertson SP. (2011) RefilinB (FAM101B) targets filamin A to organize perinuclear actin networks and regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:11464-11469.
 - Gendrel AV, Heard E. (2014). Noncoding RNAs and epigenetic mechanisms during X-chromosome inactivation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 34:3662-74.
 - Geyer PK, Vitalini MW, Wallrath LL. (2011). Nuclear organization: Taking a position on gene expression. *Curr Opin Cell Biol*, 23: 354–359.
 - Ghelis Y, (2011) Signal processing by protein tyrosine phosphorylation in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6:942-951.
 - Gibellini F, Smith TK. (2010). The Kennedy Pathway—De Novo Synthesis of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine. *IUBMB Life*, 62: 414–428.
 - Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. (2006). Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127:635-48.
 - Glynn MW, Glover, TW. (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.
 - Goetze S, Mateos-Langerak J, Gierman HJ, de Leeuw W, Giromus O, Indemans MH, Koster J, Ondrej V, Versteeg R, van Driel R. (2007). The three-dimensional

- structure of human interphase chromosomes is related to the transcriptome map. *Mol Cell Biol*, 27:4475–4487.
- Goldfarb DS, Garipey J, Schoolnik G, Kornberg RD. (1986). Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature*, 322: 641–644.
 - Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:8963–8.
 - Gong D, Pomerening JR, Myers JW, Gustavsson C, Jones JT, Hahn AT, Meyer T, Ferrell JE. (2007). Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. *Curr Biol*. 17:85–9.
 - Gonzalez-Aguilera C, Ikegami K, Ayuso C, de Luis A, Iniguez M, Cabello J, D Lieb J, Askjaer P. (2014). Genome-wide analysis links emerin to neuromuscular junction activity in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol*, 15:R21.
 - Gonzalez-Suarez I, Gonzalo S. (2008). Crosstalk between chromatin structure, nuclear compartmentalization and telomere biology. *Cytogenet Genome Res*. 122:202-210.
 - Gonzalez-Suarez I, Redwood AB, Gonzalo S. (2009). Loss of A-type lamins and genomic instability. *Cell Cycle* 8:23, 3860-3865.
 - Gonzalez-Suarez, I., Redwood AB, Gonzalo, S. (2009) Loss of A-type lamins and genomic instability. *Cell Cycle* 8:3860-3865.
 - Gorello P, Nofrini V, Brandimarte L, Pierini V, Crescenzi B, Nozza F, Daniele G, Storlazzi CT, Di Giacomo D, Matteucci C, La Starza R, Mecucci C. (2013). Inv(11)(p15q22)/NUP98- DDX10 fusion and isoforms in a new case of de novo acute myeloid leukemia. *Cancer Genet*, 206:92–96.
 - Grasser F, Neusser M, Fiegler H, Thormeyer T, Cremer M, Carter NP, Cremer T, Muller S. (2008). Replication-timing-correlated spatial chromatin arrangements in cancer and in primate interphase nuclei. *J Cell Sci*, 121:1876–1886.
 - Grotenbreg, G., Ploegh, H. (2007). Chemical biology: dressed-up proteins. *Nature*, 446:993–995.
 - Gruenbaum Y, Foisner R. (2005). Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins

- with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. *Annu Rev Biochem*, 84:131–64.
- Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL. (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 21–31.
 - Grunwald D, Singer RH, Rout M. (2011). Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes. *Nature*, 475(7356):333-41.
 - Guelen L, Pagie L, Brasset E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, B.H. Eussen A, de Klein, Wessels L, de Laat W, Van B. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453:948-51.
 - Guttinger S, Laurell E, Kutay U. (2009). Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10: 178–191.
 - Hammond, S.L., Byrum, S.D., Namjoshi, S., Graves, H.K., Dennehey, B.K., Tackett, A.J.,
 - Harr JC, Lupechio TR, Wong X, Cohen E. Wheelan SJ, Reddy KL. (2015) Directed targeting of chromatin to the nuclear lamina is mediated by
 - Harr, J.C., Luperchio, T.R., Wong, X., Cohen, E., Wheelan, S.J., and Reddy, K.L. (2015). Directed targeting of chromatin to the nuclear lamina is mediated by chromatin state and A-type lamins. *J. Cell Biol*. 208: 33–52. Doi
 - Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Gala siniski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., and Workman, J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*111, 369-379
 - Heintzman, N.D., Hon, G.C., Hawkins, R.D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L.F., Ye, Z., Lee, L.K., Stuart, R.K., Ching, C.W., et al. (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459, 108-112.
 - Heitzman ND; Stuart, RK, Hon G., Fu Y., Ching CW; Howkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*. 39:311-8.

- Henikoff, S., and Ahmad, K. (2005). Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 133-153.
- Hennekes H, Nigg EA. The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. A single point mutation prevents proteolytic cleavage of the lamin A precursor and confers membrane binding properties. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 4):1019–29.
- Hepperger C, Mannes A, Merz J, Peters J, Dietzel S. (2008), Three-dimensional positioning of genes in mouse cell nuclei. *Chromosoma*, 117:535–551.
- Hetzer M, Walther TC, Mattaj IW. (2005). Pushing the envelope: Structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 367–380.
- Hetzer MW, Hatch E. (2012). RNP Export by Nuclear Envelope Budding Cell. 733-734.
- Hetzer MW, Wenthe SR. (2009). Border control at the nucleus: biogenesis and organization of the nuclear membrane and pore complexes. *Dev Cell*, 17:606-616.
- Hetzer MW. (2010) The Nuclear Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a000539.
- Ho YC, Jaalouk DE, Vairtianene M, Lammerding J. (2013). Lamin A/C and emerin regulate MKL1–SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature*, 497:5007-5011.
- Holaska JM, Kowalski AK, Wilson KL. (2004). Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *Plos Biol*. 2:E231.
- Holtz D, Tanaka RA, Hartwig J, McKeon F. (1989) The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell*, 59:969–77.
- Hou C, Zhao H, Tanimoto K, Dean A. (2008). CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 20398–20403.
- Hubbard MJ, Cohen P. (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci*, 18: 172-177.

- Hudson G, Jaisson P, Fairall, L, Jameison A, Schwave J. (2015). Insights into the Recruitment of Class IIa Histone Deacetylases (HDACs) to the SMRT/NCOR Transcriptional Repression Complex. *J Biol Chem*, 290: 18237–18244.
- Humphrey S, Azimifar B, Mann, M. (2015). High-throughput phosphoproteomics reveals in vivo insulin signaling dynamics. *Nature Biotech*. 9:33 990-996.
- Humphrey, SJ, Yang G, Pengyi Y, Fazakerley GJ, Sto, J, Yang J, James D. (2013). Dynamic Adipocyte Phosphoproteome Reveals that that Akt directly regulates mTORC2. *Cell Metabol*, 17:1009–1020.
- Hunter, T. (2000). Signaling - 2000 and beyond. *Cell*,100:113-127.
- Huttlin E, Jedrychowski M, Elias J, Goswami TA. (2010). A Tissue-Specific Atlas of Mouse Protein Phosphorylation and Expression. *Cell*,143(7): 1174–1189.
- Ono T, Fang Y, Spector DL, Irano T. (2004). Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol Biol Cell*, 15:3296-3308.
- ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.
- Moir RD, Yoon M, Khuon S, Goldman RD. (2000). Nuclear lamins A and B1: Different pathways of assembly during nuclear envelope formation in Living Cells. *J Cell Biol*, 151:1155–1168.
- Irvine RF. (2003). Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:349-60.
- Ishii K, Arib G, Lin C, Van Houwe G, Laemmli UK. (2002). Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell*, 109: 551–562.
- Iyer KV, Pulford S, Mogilner A, Shivashankar GV. (2012). Mechanical activation of cells induces chromatin remodeling preceding MKL nuclear transport. *Biophys J*, 103:1416-28.
- Judex S, Zhong N, Squire ME, Ye K, Donahue LR, Hadjiargyrou M, Rubin CT. (2005). *J Cell Biochem*, 94:982–994.
- Kabachinski G, Schwartz T. (2015). The nuclear pore complex – structure and function at a glance. *J Cell Sci*,128: 423-429.
- Kaminski A, Fedorchak G, Lammerding J. (2014). The cellular mastermind(?) – Mechanotransduction and the nucleus. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 126:157-203.

- Kasper LH, Brindle PK, Schnabel CA, Pritchard CE, Cleary ML, van Deursen JM. (1999). CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98–HOXA9 oncogenicity. *Mol Cell Biol*, 19:764–776.
- Kaneko S, Li G, Son J, Xu CF, Margueron R, Neubert TA, Reinberg D (2010). Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev*. 24:2615-20
- Kuvardina ON, Herglotz J, Kolodziej S, Kphnrs N, Herkt, S (2006). RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood*, 525: 3570-3579.
- Butko M; Distel C. (2015) Gata2b is a restricted early regulator of hemogenic endothelium in the zebrafish embryo. *Development*, 142:1050-61.
- Kavanagh DM, Powell WE, Malik P, Lazou V, Schirmer EC. (2007). Organelle proteome variation among different cell types: lessons from key regulators of nuclear structure and activities. *J Cell Mol Med*, 6:1059-1085
- Khatau SB, Kusuma S, Hanjaya-Putra D, Mali P, Cheng L, Lee JS, Gerecht S, Wirtz D. (2012). The differential formation of the LINC-mediated perinuclear actin cap in pluripotent and somatic cells. *PloS one*, 7:e36689.
- Kilic F, Dalton MB, Burrell SK, Mayer JP, Patterson SD, Sinensky M. (1997). In vitro assay and characterization of the farnesylation-dependent prelamin A endoprotease. *J Biol Chem*, 272:5298–304.
- Kim DH, Khatau SB, Feng Y, Walcott S, Sun SX, Longmore GD, Wirtz D. (2012) Actin cap associated focal adhesions and their distinct role in cellular mechanosensing. *Sci Rep*, 2:555.
- Kim Y, Zheng X, Zheng Y. (2013). Proliferation and differentiation of mouse embryonic stem cells lacking all lamins. *Cell Res*, 23:1420–1423.
- Kim DH, Chambliss AB, Khatau SB. (2013). The multi-faceted role of the actin cap in cellular mechanosensation and mechanotransduction. *Soft Matter*. 9:5516-5523.
- Kitamura, E, Tanaka K., Kitamura Y., Tanaka TU, (2007) Kinetochore microtubule interaction during S phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*,

- 21, 3319-3330.
- Kitten GT, Nigg EA. (1991). The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *J Cell Biol*, 113:13–23.
 - Korfali N, Fairley EA, Swanson SK, Florens L y Schirmer EC. (2009). Use of sequential chemical extractions to purify nuclear membrane proteins for proteomics identification. *Methods Mol Biol*, **528:201-25**.
 - Korfali N, Wilkie GS, Swanson SK, Srsen V, de las Heras J, Batrakou DG, Malik P, Zuleger N, Kerr AR, Florens L, Schirmer EC. (2012). The nuclear envelope proteome differs notably between tissues. *Nucleus*, 3:552-64.
 - Korfali, N, Wilkie GS, Swanson S, Srsen V, Batrakou DS, Fairley E, Malik, P, Zuleger M, Goncharevich E, Heras J, Kelly D, Kerr A, Florens L, Schirmer EC. (2010). The Leukocyte Nuclear Envelope Proteome Varies with Cell Activation and Contains Novel Transmembrane Proteins That Affect Genome Architecture. *Mol & Cel Prot*, 9: 2571–2585.
 - Korfali N, Wilkie, GS., Florens, L., , Schirmer. (2010) Transmembrane Proteins That Affect Genome Architecture. *Mol & Cel Prot*. 9: 2571–2585.
 - Kosako H, Yamaguchi N, Aranami C, Ushiyama M, Kose S, Imamoto N, Tanaguchi H, Nishida E, Hattori S. (2009). Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nat Struct Mol Biol*, 16:1026-35.
 - Krull S, Dorries J, Boysen B, Reidenbach S, Magnusius L, Norder H, Thyberg J, Cordes VC. (2010). Protein Tpr is required for establishing nuclear pore-associated zones of heterochromatin exclusion. *EMBO J*, 29:1659–1673.
 - Kubben N, Voncken JW, Konings G, Weeghel M, Hoogenhof MM, Gijbels M, Erk A, Schoonderwoerd K, Bosch B, Dahlmans V, Calis C, Houten SM, Misteli T, Pinto YM. (2011). Post-natal myogenic and adipogenic developmental defects and metabolic impairment upon loss of A-type lamins. *Nucleus*, 2:195–207.
 - Kuga T, Nozakic T, Matsushita K, Nomura F, Tomonaga T. (2010) Phosphorylation statuses at different residues of lamin B2, B1, and A/C dynamically and independently change throughout the cell cycle. *Exp Cell*

- Research, 316:2301–2312.
- Kutay U, Hetzer MW. (2008). Reorganization of the Nuclear Envelope during Open Mitosis. *Curr Opin Cell Biol*, 20: 669-677.
 - Lanctot C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet*. 8:104-15.
 - Lattanzi G, Cenni V, Marmooli S, Campanni C, Mattioli E, Merlini L, Squarzoni S, Maraldi M. (2003). Association of emerin with nuclear and cytoplasmic actin is regulated in differentiating myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 303:764-70.
 - Lee JM, Jung HJ, Fong L, Youn S. (2014) Do lamin B1 and lamin B2 have redundant functions? *Nucleus*, 5: 287–292.
 - Lejeune, E., Allshire, R.C., (2011). Common ground: small RNA programming and chromatin modifications. *Curr Opin Cell Biol*, 23, 258-265.
 - Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Tellun A, Amir I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, Bender MA, Groudine M, Gnirke A, Stamatoyannopoulos J, Mirny LA, Lander ES, Dekker J. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 326:289-93.
 - Lin F, Blake DL, Callebaut I, Skerjanc IS, Holmer L, McBurney MW. (2000). MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem*, 275:4840-7.
 - Lin F, Worman HJ. (1995). Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics*, 27:230–6.
 - Lin, F, Morrison J M, Wu, W, Worman, HJ. (2005). MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Hum Mol Genet*, 14, 437-445.
 - Liu Q, Kim DI, Syme J, LuValle P, Burke B. (2010). Dynamics of Lamin-A Processing Following Precursor Accumulation. *PLoS ONE*, 5: e10874.
 - Lombardi ML, Jaalouk DE, Shanahan CM, Burke B, Roux KJ, Lammerding J. (2011). The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear

- envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *J Biol Chem*, 286:26743–26753.
- Lombardi ML, Lammerding J.(2010) Mechanical properties of the nucleus in disease. *Methods in Cell Biology*. 98:121-41.
 - Lu L, Ladinsky MS, Kirchhausen T. (2011). **Formation of the postmitotic nuclear** envelope from extended ER cisternae precedes **nuclear** pore assembly. *J Cell Biol*.194:425-440.
 - Lucki NC, Sewer, MB. (2012). Nuclear sphingolipid metabolism. *Annu Rev Physiol*, 74:131-51.
 - Maraldi NM, Capanni C, Cenni V, Fini M, Lattanzi G. (2011). Laminopathies and Lamin-Associated Signaling Pathways. *J Cell Biochem*, 112:979–992.
 - MacDonald MA, Sachani SS, White CR, Mann MR. (2016). A role for chromatin topology in imprinted domain regulation1 *Biochem. Cell Biol*, 94:1–13.
 - Maeshima K, Lino H, Hihara S, Funakoshi T, Watanabe A, Nishimura M, Nakatomi R, Yahata K, Imamoto F, Hashikawa T, Yokota H, Imamoto N. (2010). Nuclear pore formation but not nuclear growth is governed by cyclin-dependent kinases (Cdk) during interphase. *Nat Struct Mol Biol*, 17:1065-71.
 - Makhija E, Jokhun DS, Shivashankar GM. (2015). Nuclear deformability and telomere dynamics are regulated by cell geometric constraints *PNAS* E32–E40.
 - Makio, T, Stanton LH, Lin C. (2009). The nucleoporins Nup170p and Nup157p are essential for nuclear pore complex assembly. *J Cell Biol*, 185:459–473.
 - Mall M, Walter T, Gorjánác M, Davidson IF, Nga Ly-Hartig TB, Ellenberg J, Mattaj IW. (2012). Mitotic lamin disassembly is triggered by lipid-mediated signaling. *J Cell Biol*,198:981–990.
 - Mansharamani M, Wilson KL. (2005). Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin *in vitro* and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *J Biol Chem*, 280: 13863–13870.
 - Manta P, Terzis G, Papadimitriou C, Kontou C, Vassilopoulos D. (2004) Emerin expression in tubular aggregates. *Acta Neuropathol*, 106:546-52.
 - Maraldi NM, Lattanzi G. (2007). Involvement of prelamin A in laminopathies. *Crit*

- Rev Eukaryot Gene Expr, 17:317–34.
- Marino-Ramirez, L., Kann, M.G., Shoemaker BA., and Landsman, D. (2005). Histone structure and nucleosome stability. *Expert review of proteomics*, 2:719-729.
 - Martins R.P., Finan J.D., Guilak F., Lee D.A. Mechanical regulation of nuclear structure and function. *Annu Rev Biomed. Eng.* 2012;14:431–455.
 - Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000;403:501-
 - McKeon FD, Kirschner MW, Caput D. (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature*, 319: 463–468.
 - Meinke P, Schirmer EC. (2015). LINC'ing from and function at the nuclear envelope *FEBS let.* 698:2514-2521.
 - Mekhail K, Moazed D. (2010). The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 11:317-28
 - Melcer S, Meshorer E. (2010). The Silence of the LADs: Dynamic Genome-Lamina Interactions during ESC Differentiation. *Cell Stem Cell*, 6:495-7.
 - Mellad JA, Warren DT, Shanahan CM. (2011). Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Current Opinion Cell Biol*, 23:47–54.
 - Meuleman, W, Peric-Hupkes, D, Kind J., Beaudry JB, Pagie L, Kellis M. (2013). Constitutive nuclear lamina-genome interactions are highly conserved and associated with A/T-rich sequence. *Genome Res.* 23: 270–280.
 - Mislow JM, Holaska JM, Kim MS, Lee K, Segura-totten M, Wilson KL, McNally EM. (2002). Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS letter*, 525:135-40.
 - Misteli T, Dekker J. (2015). Long-Range Chromatin Interactions. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 7:a019356.
 - Misteli, T. 2005. Concepts in nuclear architecture. *BioEssays*, 27:477–487.
 - Mitsuhashi H, Hayashi Y, Matsuda C, Noguchi S, Wakatsuki S, Araki T, Ichizo T. (2010). Specific phosphorylation of Ser458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. *J Cell Sci*, 123:3893-3900.

- Moir, RD, Montag-Lowy M, Goldman, RD. (1994). Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol.* 125:1201-1212.
- Morgan JT, Pfeiffer ER, Thirkill TL, Kumar P, Peng G, Fridolfsson HN, Douglas GC, Starr DA, Barakat AI. (2011). Nesprin-3 regulates endothelial cell morphology, perinuclear cytoskeletal architecture, and flow-induced polarization. *Mol Biol Cell*, 22:4324–4334.
- Mosammaparast N, Pemberton LF. (2014). Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol*, 14:547-56.
- 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. *Hum Mutat*, 28:882–9.
- Muchir A, Bonne G, van der Kooij AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, de Visser M, Schwartz K. (2000). Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet*, 9:1453–9.
- Munck, Peche VS, Noegel A. (2015). Nesprin-2 mediated nuclear trafficking and its clinical implications. *Nucleus*, 6:479-489.
- Murmann AE, Gao J, Encinosa M, Gautier M, Peter ME, Eils R, Lichter P, Rowley JD. (2005) Local gene density predicts the spatial position of genetic loci in the interphase nucleus. *Exp Cell Res* 311:14–26.
- Nagai S, Davoodi N, Gasser SM. (2011). Nuclear organization in genome stability: SUMO connections. *Cell Research*. 21:474-485.
- Navarro CL, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Boccaccio I, Boyer A, Geneviève D, Hadj-Rabia S, Gaudy-Marqueste C, Smitt HS, Vabres P. (2004). Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet*, 13:2493–503.

- Neusser M, Schubel V, Koch A, Cremer T, Muller S. (2007). Evolutionarily conserved, cell type and species-specific higher order chromatin arrangements in interphase nuclei of primates. *Chromosoma*, 116:307–320.
- Novelli G, Muchir A, Sangiuolo F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, Capon F, Sbraccia P, Federici M, Lauro R. (2002). Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet*, 71:426–31.
- Onishchenko, E, Stanton AS, Madrid, Kieselbach T, Weis K. (2009). Role of the Ndc1 interaction network in yeast nuclear pore complex assembly and maintenance. *J Cell Biol*, 185:475–491.
- Ono T, Fang Y., Spector DL, Hirano T. (2004). Spatial and temporal regulation of condensin orthologs of spindle assembly checkpoint proteins MAD1 and MAD2 and the nucleoporin NUA. *Plant Mol Biol*, 79: 203-216.
- Otsu N. (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Syst Man and Cybernetics*; 9:62–6.
- Padmakumar VC, T. Libotte W, Lu H Zaim, Abraham S, Noegel AA, Gotzmann J, Foisner R, and Karakesisoglou I. (2005) *J. Cell Sci* 118:3419-3430.
- Pajerowski DJ, Dahl KN, Zhong FL, Sammak PJ, Discher D. (2006). Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *PNAS*. 104: 15619-15624.
- Pemberton LF, Paschal BM. (2005). Mechanisms of receptor mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*, 6:187–198.
- Pendás AM, Zhou Z, Cadiñanos J, Freije JMP, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodríguez F, Tryggvason K,. (2002). Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in *Zmpste24* metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet*,, 31:94–9.
- Peric-Hupkes, D, Meuleman W, Pagie L, Bruggeman SW, Solovei I, Brugman W, Gräf S, Flicek P, Kerkhoven RM, van Lohuizen, M. Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Mol Cell*, 38:603-13
- Peter A, Stick R. (2012). Evolution of the lamin protein family: what introns can tell. *Nucleus*, 3:44-59.

- Phillips JE, Corces VG. (2009). CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137(7):1194-211.
- Phillips-Cremins JE, Corces VG. (2013). Chromatin insulators linking the genome organization with cellular function. *Rev Mol Cell*, 50:461-74.
- Picotti P. (2016). Phosphoproteomics takes it easy. *Nat. Bio.* 34, 441
- Plessner M, Melak, M Chinchilla P, Baarlink C, Grosse R. (2015). Nuclear F-actin Formation and Reorganization upon Cell Spreading. *J Biol Chem*, 290:11209-112016.
- Polychronidou, M, Großhans, B. (2011). Determining nuclear shape: The role of farnesylated nuclear membrane proteins. *Nucleus*, 2:17-23.
- Poon IK, Jans DA. (2005). Regulation of nuclear transport: Central role in development and transformation? *Traffic*, 6: 173–186.
- Pope BD, Ryba T, Dileep V, Yue F, Wu W, Denas O. (2014). Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature*, 515: 402–405.
- Portier N, Audhya A, Maddox PS, Green RA, Dammermann A, Desai A, Oegema K. (2007). A microtubule-independent role for centrosomes and aurora a in nuclear envelope breakdown. *Dev Cell*, 12:515–529.
- Pranav Kelkar, Anna Walter, Symeon Papadopoulos, Carmen Mroß, Martina
- Prokocimer M, Davidovich, M, Nissim-Rafinia M, Naama WN, Bar DZ, Barkan R, Meshorer E, Gruenbaum M. (2009). Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities. *J Cell Mol Med*, 13:1059-1085.
- Prudovsky I, Vary CP, Markaki Y, Olins AL, Olins DE. (2012). Phosphatidylserine colocalizes with epichromatin in interphase nuclei and mitotic chromosomes. *Nucleus*, 3:200-210.
- Pyrpasopoulou, A., Meier, J., Maison, C., Simos, G., and Georgatos, S. D. (1996). The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatindocking sites at the nuclear envelope. *Embo J*, 15:7108-7119.
- Rabut G, Doye V, Ellenberg J. (2004). Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat. Cell Biol*, 6:1114–1121.

- Ragoczy T, Bender MA, Telling A, Byron R, Groudine M. (2006). The locus control region is required for association of the murine beta-globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes Dev*, 220:1447–1457.
- Ragoczy, T, Telling A, Scalzo D, Kooperberg C, Groudine M. (2014). Functional redundancy in the nuclear compartmentalization of the late-replicating genome. *Nucleus*, 5:626-635.
- Rando OJ, Ahmad K. (2007). Rules and regulation in the primary structure of and regulation in the primary structure of chromatin. *Curr Opin Cell Biol*. 19:250-256.
- Rasala BA, Ramos C, Harel A, Forbes DJ. (2008). Capture of AT-rich chromatin by ELYS recruits POM121 and NDC1 to initiate nuclear pore assembly. *Mol Biol Cell* ,19:3982–3996.
- Rasala BA, Orjalo AV, Shen Z, Briggs S, Forbes DJ. (2006). ELYS is a dual nucleoporin/kinetochore protein required for nuclear pore assembly and proper cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 21;103:17801-17806
- Recillas-Targa y Escamilla del Arenal. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión genica. *Mensaje Bioquímico*, 28:173-201.
- Recillas-Targa F, Razin SV. (2001) Chromatin domains and regulation of gene expression: Familiar and enigmatic clusters of chicken globin genes. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 11:227-42.
- Reddy, KL, Zullo JM, Bertolino E, Singh H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina.
- Ribbeck K, Gorlich D. 2002. The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J*. 21:2664–2671.
- Ribin CT, Capilla E, Luu YK, Busa B. Crawford H., Nolans DJ, Mittal V, Rosen CJ, Pessin JE, Judex S. (2014). Adipogenesis is inhibited by brief, daily exposure to high-frequency, extremely low-magnitude mechanical signals. *PNAS* 104: 17879–17884.
- Rober RA, Sauter H, Weber K, Osborn M .(1990). Cells of the cellular immune and hemopoietic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells. *J Cell Sci*, 95: 587–598.

- Roberts AM.(2015). Integrated allelic, transcriptional and phenomic dissection of cardiac effects on titin truncations in health and disease. *Sci Transl Med*.
- Ródenas E, Klerkx, EPF, Ayuso C, Audhya, A, Askjaer, P. (2009). Early embryonic requirement for nucleoporin Nup35/NPP-19 in nuclear assembly. *Dev Biol*, 327, 399–409.
- Rodriguez-Bravo V, Maciejowski J, Corona J, Buch, HK, Collin P, Kanemaki, MT, Shah JV, Jallepalli PV. (2014). Nuclear pores protect genome integrity by assembling a premitotic and Mad1-dependent anaphase inhibitor. *Cell*,156:1017-1031.
- Rosa S, Shaw P. (2013). Insights into chromatin structure and dynamics in plants. *Biology*, 2:1378-410.
- Rowat AC, Lammerding J, Ipsen JH. (2006). Mechanical properties of the cell nucleus and the effect of emerin deficiency. *Biophys J*, 91:4649–4664.
- Ryan, KJ, Wentz, SR. (2002). Isolation and characterization of new *Saccharomyces cerevisiae* mutants perturbed in nuclear pore complex assembly. *BMC Genet*, 3:17.
- Saha, A, Wittmeyer J, and Cairns BR. (2002). Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes Dev*, 16:2120-2134.
- Sakaki M, Koike H, Takahashi N, Sasagawa N, Tomioka S, Arahata K, Ishiura S (2001). Interaction between emerin and nuclear lamins. *J Biochem*, 129: 321-327.
- Salina D, Bodoor K, Eckley DM, Schroer TA, Rattner JB, Burke, B. (2002). Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell*, 108, 97-107.
- Sanchez R, Zhou, MM. (2009). The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 12:659–665.
- Sasaki H and Matsui Y. (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat. Rev. Genet*, 9: 129–140.
- Schirmer EC, Florens L, Guan T, Yates JR, and Gerace L. (2003) Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science*, 301:1380–1382.
- Schirmer EC, and Gerace L. (2005) The nuclear membrane proteome: extending

- the envelope. *Trends Biochem, Sci*, 30: 551–558.
- Schneider M, Lu W, Neumann S, Brachner A, Gotzmann J, Noegel AA, Karakesisoglou I. (2010). Molecular mechanisms of centrosome and cytoskeleton anchorage at the nuclear envelope. *Cell Mol Life Sci*, 68:1593-610.
 - Schneider R, Grosschedl R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev*, 21:3027–3043.
 - Schreiber KH, Kennedy BK. (2013). When Lamins Go Bad: Nuclear Structure and Disease. *Cell*,152:1365–75.
 - Schreiner SM, Koo PK, Zhao Y, Mochrie SGJ, King MC. (2005). The tethering of chromatin to the nuclear envelope supports nuclear mechanics. *Nature Comm*, 6:7159.
 - Scirmer EC, Meinke P. (2015). LINCing form and function at the nuclear envelope. *FEBS Lett*, 589:2514-21.
 - Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, Schmidt H, Brabant G, Kumar S, Durrington PN. (2000). LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet*, 24:153–6.
 - Sharma K, Rochelle CJ, D’Souza, Tyanova S, Schaab C, Wisniewski JR, Cox, J, Mann M. (2014). Ultradeep Human Phosphoproteome Reveals a Distinct Regulatory Nature of Tyr and Ser/Thr-Based Signaling. *Cell Reports* 8, 1583–1594.
 - Shevelyov YY, Nurminsky DI. (2012). The nuclear lamina as a gene-silencing hub. *Curr Issues Mol Biol*. 14:27–38
 - Shibuya H, Ischiguro K, Watanabe Y. (2014). The TRF1-binding protein TERB1 promotes chromosome movement and telomere rigidity in meiosis. *Nature Cell Biol*, 16:145-56.
 - Shibuya H, Watanabe Y. (2014) The meiosis-specific modification of mammalian telomeres. *Cell Cycle* 13:2024-2028.
 - Shimi T, Kittisopikul M, Tran J, Goldman AE, Adam SA, Zheng Y, Jaqaman K, Goldman RD. (2015). Structural Organization of Nuclear lamins A, C, B1, and B2 revealed by superresolution microscopy. *Mol Biol Cell*. 26:4075-4086.

- Sinensky M, Fantle K, Dalton M. (1994). An antibody which specifically recognizes prelamins A but not mature lamin A: application to detection of blocks in farnesylation-dependent protein processing. *Cancer Res*, 54:3229–32.
- Sinensky M, Fantle K, Trujillo M, McLain T, Kupfer A, Dalton M. (1994). The processing pathway of prelamins A. *J Cell Sci*, 107:61–7.
- Siniosoglou S. (2009). Lipins, Lipids and Nuclear Envelope Structure. *Traffic* 10: 1181–1187.
- Smith JJ, Siegel AF, Chait BT, Wozniak RW, Aitchison JD. (2005). The mobile nucleoporin Nup2p and chromatin-bound Prp20p function in endogenous NPC-mediated transcriptional control. *J Cell Biol*, 171:955–965.
- Solovei I., Wang AS, Thanisch K, Schmidt CS, Krebs S, Zwerger M., Cohen TV, Devys D, Foisner F, Peichl L, (2013). LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell*. 152:584–598.
- Álvarez-Fernández M, Malumbres M. Preparing a cell for nuclear envelope breakdown: -temporal control of phosphorylation during mitotic entry. *Bioessays* 36, 757-765.
- Spector DL. (2003). The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem*, 72:573–608.
- Speese, SD, Ashley J, Jokhi V, Nunnari J, Barria R, Li Y, Ataman B, Koon A, Chang YT, Li Q (2012). Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling. *Cell*, 149,832–846.
- Starr, DA, Fridolfsson HN. (2010). Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26:421–444.
- Van Steensel. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453:948–951.
- Stewart-Hutchinson PJ, Hale CM, Wirtz D, Hodzic D. (2008) Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Exp Cell Res*. 314:1892-905.
- Strelkov SV, Schumacher J, Burkhard P, Aebi U, Herrmann H. Crystal Structure

- of the Human Lamin A Coil 2B Dimer: Implications for the Head-to-tail Association of Nuclear Lamins. *J Mol Biol*, 343:1067–80.
- Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, Burke B. (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol*, 147: 913–920.
 - Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, Pajeroski JD, Spinler KR, Shin J-W, Tewari M. (2013). Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science*, 341:1240104-15.
 - Taddei A, Hediger F, Neumann FR, Bauer C, Gasser, SM. (2004). Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *EMBO J*, 23:1301-1312.
 - Takizawa T., Gudla P.R., Guo L., Lockett S., Misteli T. (2008). Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP. *Genes Dev*. 22:489–498.
 - Talwar, S., Jain. M N., Shivashankar. G.V. (2014). The regulation of gene expression during onset of differentiation by nuclear mechanical heterogeneity. *Biomaterials* 35:2411–2419.
 - Tanabe H, Habermann FA, Solovei I, Cremer M, Cremer T. (2002). Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mut reserch*, 504:37-45.
 - Terry LJ, Shows EB, Wentz SR. (2007). Crossing the nuclear envelope: Hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science*, 318:1412–1416.
 - Torvaldson, E, Kochin V, Eriksson J. (2005). Phosphorylation of lamins determine their structural properties and signaling functions. *Nucleus*. 6: 166–171.
 - Toth JI, Yang SH, Qiao X, Beigneux AP, Gelb MH, Moulson CL, Miner JH, Young SG, Fong LG. (2005). Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:12873–8.
 - Tyler JK. (2014) Mitotic phosphorylation of histone H3 threonine 80. *Cell Cycle*, 13, 440-452.

- Uzer G, Pongkitwitoon S, Ian C, Thimpson WR, Rubin J, Chan ME, Judex S. (2014). Gap junctional communication in osteocytes is amplified by low intensity vibrations in vitro. *Plos One*. 9:90840.
- Rubin, J, Ackert-Bicknell, CL, Zhu L, Fan X, Murphy TC, Nanes, MS, Marcus R, Holloway L, Beamer WG, Rosen, CJJ. (2002). *Clin Endocrinol Metab*. 87:4273-9
- Uzer G, Thompson WR, Sen B, Xie Z, Yen SS, Miller S, Bas G, Styner M, Rubin CT, Judex S, Burrige K, Rubin J. (2015). Cell Mechanosensitivity to Extremely Low-Magnitude Signals Is Enabled by a LINCed Nucleus. *Stem Cells*, 33: 2063-76.
- Van Bortle K, and VG Corces. (2013). The role of chromatin insulators in nuclear architecture and genome function. *Curr Opin Genet Dev*, 23:212–218.
- Van de Vosse DW, Wan Y, Wozniak RW, Aitchison JD. (2011) Role of the nuclear envelope in genome organization and gene expression. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 3: 147– 166.
- van Holde KE. (1988). *Chromatin* Springer Verlag, New York
- Van Hoof D, Munoz J, Braam, SR, Pinkse MWH, Linding R, Heck A, Mummery CL. (2009). Phosphorylation Dynamics during Early Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 5:214–226.
- van Ingen H, van Schaik FM, Wienk H, Ballering J, Rehmann H, Dechesne AC, Kruijzer JA, Liskamp RM, Timmers HT, Boelens R. (2008). Structural insight into the recognition of the H3K4me3 mark by the TFIID subunit TAF3. *Structure. Nat Struc*,16:1245-56.
- Van Steensel B, Henikof S. (2000). Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase. *Nat Biotechnol*. 18:424-8.
- Vaquerizas JM, Suyama R, Kind J, Miura K, Luscombe NM, Akhtar A, (2010). Nuclear Pore Proteins Nup153 and Megator Define Transcriptionally Active Regions in the Drosophila Genome. *PLoS Genet*, 6: 1000846.
- Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suárez MF, Cau P, Cadiñanos J, Osorio FG, Foray N, Cobo J. (2008). Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature

- aging. *Nat Med*,14:767–72.
- Verstraeten VLRM, Peckham LA, Olive M, Capell BC, Collins FS, Nabel EG, Young SG, Fong LG, 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.
 - Verstraeten VLRM. (2006) Compound heterozygosity for mutations in LMNA causes a progeria syndrome without prelamin A accumulation. *Hum Mol Genet*, 15:2509–22.
 - Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA *methylation*. *Nature*. 4
 - Vlcek S, Dechat T, Foisner R. (2001). Nuclear envelope and nuclear matrix: interactions and dynamics. *CMLS, Cell Mol Life Sci*, 58:1758–1765.
 - Vogel V. (2006) Mechanotransduction Involving Multimodular Proteins: Converting Force into Biochemical Signals *Annu Rev Biophys Biomol. Struct*, 35:459–488.
 - Walther TC, A. Alves, Pickersgill H, Liodice I, Hetzer M, Galy V, Hulsmann BB, Kocher T, Wilm M, Allen T, (2003). The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell*, 113:195–206.
 - Wang Y, Östlund C, Choi JC, Swayne TC, Gundersen GG, Worman HJ. (2014). Blocking farnesylation of the prelamin A variant in Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters the distribution of A-type lamins. *Nucleus*, 3:452–462.
 - Weber K, Plessmann U, Traub P. (1990). Protein chemical analysis of purified murine lamin B identifies two distinct polypeptides B1 and B2. *FEBS Lett*, 261:361–4.
 - Wei MG, Tong XJ, Bin Chen, Zhang B, Liu ZF, Ding MX, Zhai ZH. (1996)..Assembly of lamins in vitro. *Cell Res*, 6:11–22.
 - Weiss MJ, Yu X, Orkin SH. (1997) Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol*. 17:1642-51.
 - Wheeler MA, Warley A, Roberts R., Ehler E, Ellis, (2010). Identification of an emerin-beta-catenin complex in the heart important for intercalated disc architecture and beta-catenin localisation. *Cell Mol Life Sci*, 66:1518–1533.

- Wilhelmsen K, Litjens SH, Kuikman I, Tshimbalanga N, Janssen H, van den Bout I, Raymond K, Sonnenberg A. (2005). Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol* 171:799–810.
- Wilkie GS, Korfali N, Swanson SK, Malik P, Srsen V, Batrakou DG. (2011). Several novel nuclear envelope transmembrane proteins identified in skeletal muscle have cytoskeletal associations. *Mol Cell Proteomics* 10:M110 003129.
- Wilson, KL, Foisner R. (2010). Lamin-binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000554
- Witt O, Albig W, Doenecke D. (1996). Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp Cell Res*, 229 301-306.
- Wolffe AP, Hayes JJ. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res*, 27 711–720.
- Wolinski H, Hofbauer H, Hellauer K, Cristobal-Sarramian A, Kohlwein SD. (2010). Seipin is involved in the regulation of phosphatidic acid metabolism at a subdomain of the nuclear envelope in yeast.
- Woodcock CL, Skoultchi AI, Fan Y. (2006). Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res*, 14:17–25.
- Worman HJ, Ostlund C, Wang Y. (2010). Diseases of the nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a000760.
- Wu F, Yao J. (2013). Spatial compartmentalization at the nuclear periphery characterized by genome-wide mapping. *BMC Genomics*, **14**:591.
- Wu, SC Zhang Y. (2011). Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)-mediated phosphorylation of enhancer of zeste 2 (Ezh2) regulates its stability. *J Biol Chem*, 286:28511-28519
- Xu C, Prince JL. (1998). Snakes, shapes, and gradient vector flow. *IEEE Trans Image Process*, 7:359–69.
- Yaffe D, Saxel O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic muscle. *Nature*, 270: 725–727.
- Yang SH, Bergo MO, Toth JI, Qiao X, Hu Y, Sandoval S, Meta M, Bendale P,

- Gelb MH, Young SG. (2005). Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:10291–6.
- Yoon, YS, Jeong S, Rong Q, Park, KY, Chung, JH, Pfeifer K. (2007). Analysis of the H19ICR insulator. *Mol Cell Biol*, 27: 3499–3510.
 - Young SG, Meta M, Yang SH, Fong LG. (2006). Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J Biol Chem*, 281:39741–5.
 - Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, Felsenfeld G. (2004). CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell*, 13: 291–29.
 - Zhang, B. Wolynes PG. (2015) Topology, structures, and energy landscapes of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112:6062-7.
 - Zheng R, Ghirlando R, Lee MS, Mizuuchi K, Krause, M. Craigie R. (2000). Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:8997-9002.
 - Zullo, JM, Demarco, IA, Pique-Regi R, Gaffney DJ, Epstein, CB, Spooner, CJ. (2012). DNA sequence-dependent compartmentalization and silencing of chromatin at the nuclear lamina. *Cell*, 149: 1474-1487
 - Zhang Y. Xie S, Zhou Y, Xie Y, Liu P, Sun M, Xiao H, Jin Y, Sun X, Chen Z, Huang Q, Chen S. (2014). H3K36 Histone Methyltransferase Setd2 Is Required for Murine Embryonic Stem Cell Differentiation toward Endoderm. *Cell Rep*, 9:1171.

8. ANEXOS

ANEXO A

Estudio de la organización del dominio α globina de pollo y la contribución de nuevos elementos estructurales y regulatorio.

La eritropoyesis representa uno de los sistemas de diferenciación celular más estudiados representando una fuente inagotable de información sobre nuevos mecanismos de regulación genética y epigenética (Guerrero y col., 2007). En particular en nuestro laboratorio hemos estado interesados en estudiar estos mecanismos los dominios multigénicos α - y β -globina de pollo. También

El dominio α -globina de pollo está contenido en una región genómica de más de 40 kb en un contexto transcripcionalmente activo (Figura 1). Este dominio está constituido por los genes: α , α^A y α^D , los cuales se expresan diferencialmente a lo largo del desarrollo del pollo (Guerrero y col., 2007). El gen α se expresa en la etapa embrionaria mientras que la expresión de α^A y α^D se restringe principalmente a la etapa adulta.

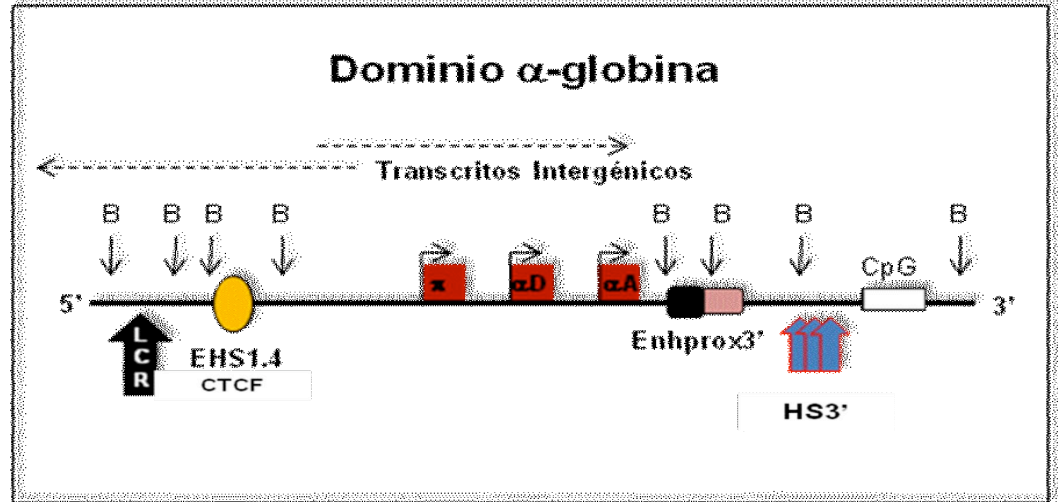


Figura 1. Esquema del dominio α -globina de pollo. Componentes g \acute{e} nicos globina (π , α^A y α^D). Elementos regulatorios cuya actividad ha sido demostrada *in vivo*: insulador EHS1.4 donde se une CTCF (amarillo) y el enhancer proximal 3' (Enhprox3'). Sitios de hipersensibilidad a la DNasa I que parecen corresponder a elementos regulatorios: Regi3n Controladora del Locus en la regi3n 5' (LCR) y el grupo de los sitios hipersensibles a la DNasa I eritroide-específicos en la zona 3' (HS3', flechas verticales azules). Sitios de corte para la enzima BamHI (B).

Las secuencias promotoras de los genes α -globina de pollo contienen los sitios de uni3n a factores de transcripci3n cl3sicos de la familia de las hemoglobinas como lo son: GATA1, GATA-2, EKLF, NF-E2 y PU.1 (Guerrero y col., 2007). Estas prote3nas regulan tanto positiva como negativamente el ensamblaje de la maquinaria de inicio de la transcripci3n. Sin embargo, resultados del laboratorio y de otros grupos han mostrado que estos factores transcripcionales eritroides tambi3n est3n implicados en el remodelamiento de la cromatina del dominio mediante su interacci3n con diferentes co-factores y su asociaci3n con elementos reguladores albergados en las regiones no-codificantes del dominio. En humano por ejemplo, la prote3na NL1/Lbd1 interactúa con GATA-1, Lmo2 y SCLT1 asociándose a regiones reguladoras r3o arriba de los genes α -globina, lo cual tiene un efecto sobre su transcripci3n (Anguita y col., 2004). Asimismo, Rinc3n-Arano en nuestro laboratorio report3 que la interacci3n del co-factor YY-1 con GATA-1 regula negativamente la actividad del *enhancer* en el costado 3' no-codificante del dominio α -globina (Rinc3n-Arano y col., 2005). En el caso del β -globina por ejemplo, se requiere de la asociaci3n EKLF, GATA-1 y FOG-1 en el LCR para la *transactivaci3n* de los genes (Drissen y col., 2004; Vakoc y col., 2005).

La regi3n codificante del dominio α -globina est3 enmarcada por las zonas 5' y 3' no-codificantes, las cuales contienen diferentes sitios de hipersensibilidad a la DNasa I eritroide-específicos que corresponden a elementos regulatorios que siguen revelando informaci3n importante sobre mecanismos de regulaci3n transcripcional de los genes α -globina (Figura 1). Tal es el caso del *insulador* EHS1.4 localizado en el costado 5' no-codificante del dominio a 11 kb r3o arriba con respecto del gen embrionario y cuya actividad de bloqueo de enhancer ha sido

reportada también por nuestro grupo (Valadez-Graham y col., 2004)

Recientemente, fue identificado un grupo de sitios de corte a la DNasa I eritroide-específicos en la zona 5' no-codificante (Figura 1), el cual coincide con el Elemento de Regulación Mayor (α -MRE) conservado en los vertebrados (Hughes y col., 2005) y cuya función en el dominio α -globina, tanto de humano como de ratón, ha sido reportada como del tipo LCR (Higgs y col., 1990; Higgs y col., 2008; Wood y col., 2009).

En nuestro laboratorio se ha propuesto que la actividad del LCR está regulada por dos condiciones: i) la estructura de la cromatina que: en estadio embrionario define la *trans-activación* sobre el gen π mientras que en etapas adultas la ejerce sobre los genes α^A y/o α^D , donde π está silenciado por metilación del ADN y desacetilación de histonas (Rincón-Arango y col., 2009; datos no publicados); y ii) por la unión diferencial de CTCF al elemento EHS1.4 (Figura 1). La asociación diferencial del factor CTCF en el *insulator* EHS1.4 a lo largo de la diferenciación eritroide contribuye posiblemente a la regulación expresión de los genes α -globina (Datos no publicados). Trabajos recientes han demostrado que el LCR del dominio α -globina de pollo participa en la formación de asas cromatínicas activas para la transcripción del gen adulto α^D (Garilov y col., 2008). En su conjunto, estas evidencias reflejan la existencia de distintos puntos de contacto entre el LCR, la CpG ubicada en el extremo 5' no-codificante y un elemento que une a CTCF dentro del promotor α^D , los cuales permiten la formación de las asas activas y por tanto la expresión del gen α^D (Garilov y col., 2008).

Por otro lado, en el extremo 3' no-codificante del dominio se encuentra un elemento *enhancer* (Enhprox3') que tiene la capacidad de estimular positivamente la expresión de los genes π y α^D . Este *enhancer* tiene una organización modular presentando también una actividad estrictamente regulada a lo largo de la diferenciación eritroide dependiente del factor GATA-1 (Escamilla del Arenal y Recillas-Targa, 2008). Estos aspectos continúan en estudio en el laboratorio, sin embargo, poco se sabe del papel estructural o regulatorio de las regiones no-codificantes aledañas.

En conjunto, las evidencias obtenidas por nuestro grupo sugieren que existen elementos tanto regulatorios como estructurales en los costados 3' y 5' no-codificantes del dominio implicados en la regulación de la expresión diferencial de los genes α -globina. Por lo tanto, en el presente trabajo resulta de nuestro particular interés estudiar la región 3' no-codificante del dominio α -globina de pollo desde una perspectiva integral.

III. ANTECEDENTES PARTICULARES

La región 3' no-codificante del dominio α -globina ha sido la menos estudiada (Figura 2), sin embargo, en nuestro grupo proponemos que esta región contribuye también a la organización del dominio y regulación de la expresión diferencial de los genes α -globina.

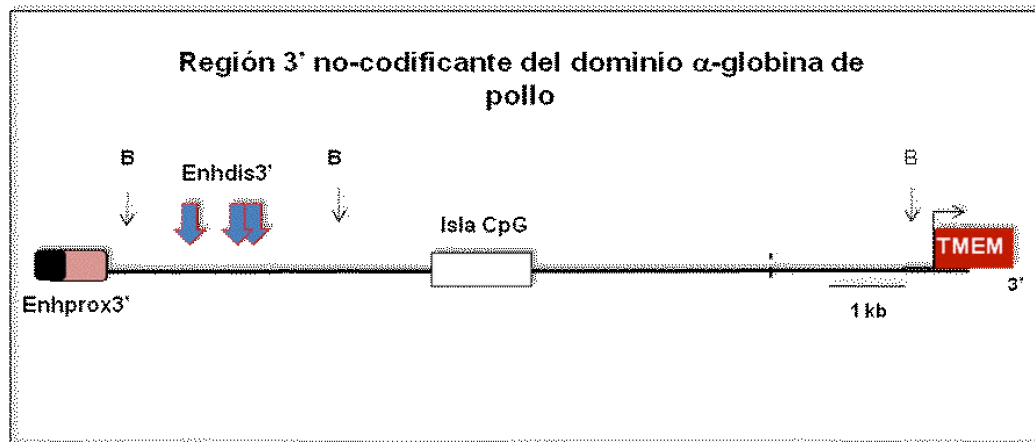


Figura 2. Esquema de la zona 3' no-codificante del dominio α -globina de pollo. Enhancer proximal 3' (Enhprox3'); el grupo de los sitios hipersensibles a la DNasa I eritroide-específicos en la zona 3' (Enhdis3'). Sitios de corte para la enzima BamHI (B).

En el laboratorio se identificó un conjunto de tres hipersensibilidades a la DNasa I eritroide-específicas ubicadas río abajo con respecto al *Enhprox 3'* previamente descrito (Figura 3; datos no publicados). Pensamos que estos sitios de corte a la DNasa I coinciden con una posible transición de cromatina abierta a cerrada que fue establecida por un análisis de marcas de histonas en esta región (Figura 3; datos no publicados). Basados en estos resultados planteamos la posibilidad de que esta zona de hipersensibilidad contiene elementos tanto estructurales como regulatorios que podrían definir el límite del dominio; por lo que en este proyecto proponemos evaluar la función de dichos elementos.

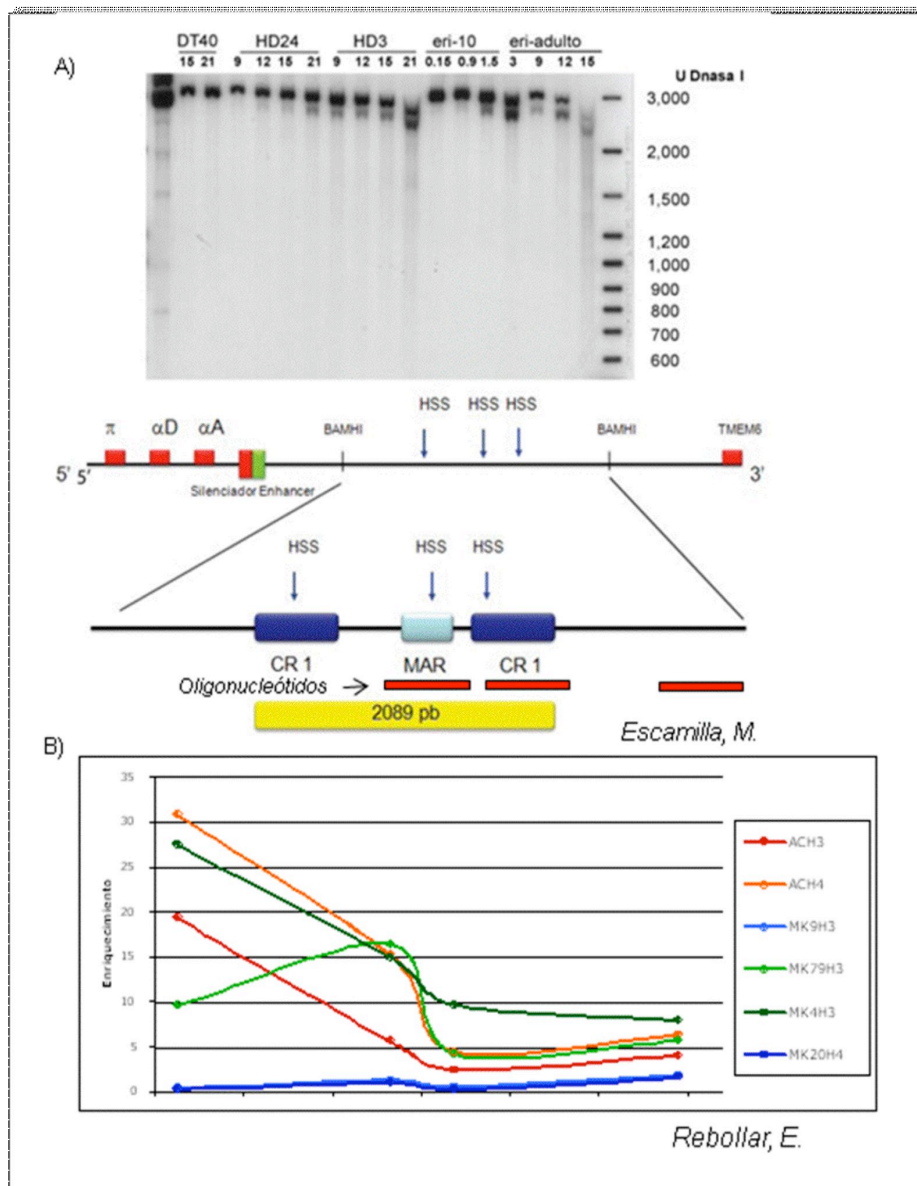


Figura 3. Identificación del grupo de sitios de hipersensibilidad a la DNasa I eritroide-específicos en la región 3' no-codificante y su co-localización con una posible transición de marcas de histonas. **A)** Ensayos de corte a la DNasa I en los diferentes estadios de diferenciación eritroide en donde se puede observar que en eritrocitos terminalmente diferenciados (10 días) los sitios de corte de la enzima son más evidentes en la región analizada. Además, es en este estadio en donde se requiere menor concentración de enzima que en el resto de los estadios (línea linfóide, DT40; pre-eritroblasto, HD24; eritroblasto, HD3 y eritrocitos, eri-10d y eri-adulto). **B)** Análisis de marcas de cromatina en la zona de los sitios hipersensibles a la DNasa I a través de ChIP, utilizando los anticuerpos contra marcas de apertura (Ach3, Ach4, H3K79me2) y de cromatina cerrada (H3K9me2, H4K20, H3K4me2). En este caso se utilizaron los oligonucleótidos (cajas rojas) que abarcan las repetidas: MAR y CR1 de parte fragmento que abarca el conjunto de sitios de corte eritroide-específicos. Los resultados reflejan un decaimiento en el enriquecimiento de las marcas de cromatina de apertura, sin embargo, las marcas de cromatina cerrada presentan enriquecimiento detectable (datos no publicados).

Con el fin de elucidar la posible actividad regulatoria de los tres sitios de hipersensibilidad a la DNasa I sobre los genes α -globina realicé análisis funcionales durante la realización de mi proyecto de Maestría en el laboratorio. La evaluación funcional del fragmento

reportada también por nuestro grupo (Valadez-Graham y col., 2004)

Recientemente, fue identificado un grupo de sitios de corte a la DNasa I eritroide-específicos en la zona 5' no-codificante (Figura 1), el cual coincide con el Elemento de Regulación Mayor (α -MRE) conservado en los vertebrados (Hughes y col., 2005) y cuya función en el dominio α -globina, tanto de humano como de ratón, ha sido reportada como del tipo LCR (Higgs y col., 1990; Higgs y col., 2008; Wood y col., 2009).

En nuestro laboratorio se ha propuesto que la actividad del LCR está regulada por dos condiciones: i) la estructura de la cromatina que: en estadio embrionario define la *trans-activación* sobre el gen π mientras que en etapas adultas la ejerce sobre los genes α^A y/o α^D , donde π está silenciado por metilación del ADN y desacetilación de histonas (Rincón-Arango y col., 2009; datos no publicados); y ii) por la unión diferencial de CTCF al elemento EHS1.4 (Figura 1). La asociación diferencial del factor CTCF en el *insulator* EHS1.4 a lo largo de la diferenciación eritroide contribuye posiblemente a la regulación expresión de los genes α -globina (Datos no publicados). Trabajos recientes han demostrado que el LCR del dominio α -globina de pollo participa en la formación de asas cromatínicas activas para la transcripción del gen adulto α^D (Garilov y col., 2008). En su conjunto, estas evidencias reflejan la existencia de distintos puntos de contacto entre el LCR, la CpG ubicada en el extremo 5' no-codificante y un elemento que une a CTCF dentro del promotor α^D , los cuales permiten la formación de las asas activas y por tanto la expresión del gen α^D (Garilov y col., 2008).

Por otro lado, en el extremo 3' no-codificante del dominio se encuentra un elemento *enhancer* (Enhprox3') que tiene la capacidad de estimular positivamente la expresión de los genes π y α^D . Este *enhancer* tiene una organización modular presentando también una actividad estrictamente regulada a lo largo de la diferenciación eritroide dependiente del factor GATA-1 (Escamilla del Arenal y Recillas-Targa, 2008). Estos aspectos continúan en estudio en el laboratorio, sin embargo, poco se sabe del papel estructural o regulatorio de las regiones no-codificantes aledañas.

En conjunto, las evidencias obtenidas por nuestro grupo sugieren que existen elementos tanto regulatorios como estructurales en los costados 3' y 5' no-codificantes del dominio implicados en la regulación de la expresión diferencial de los genes α -globina. Por lo tanto, en el presente trabajo resulta de nuestro particular interés estudiar la región 3' no-codificante del dominio α -globina de pollo desde una perspectiva integral.

que contiene a las hipersensibilidades eritroide-específicas se hizo a través de transfecciones transitorias de contrucciones en eritrocitos terminalmente diferenciados que incluían a un gen reportero bajo el control de cada promotor y la región que incluye a los tres sitios de corte a la DNasa I así como sus subfragmentos (Figura 4).

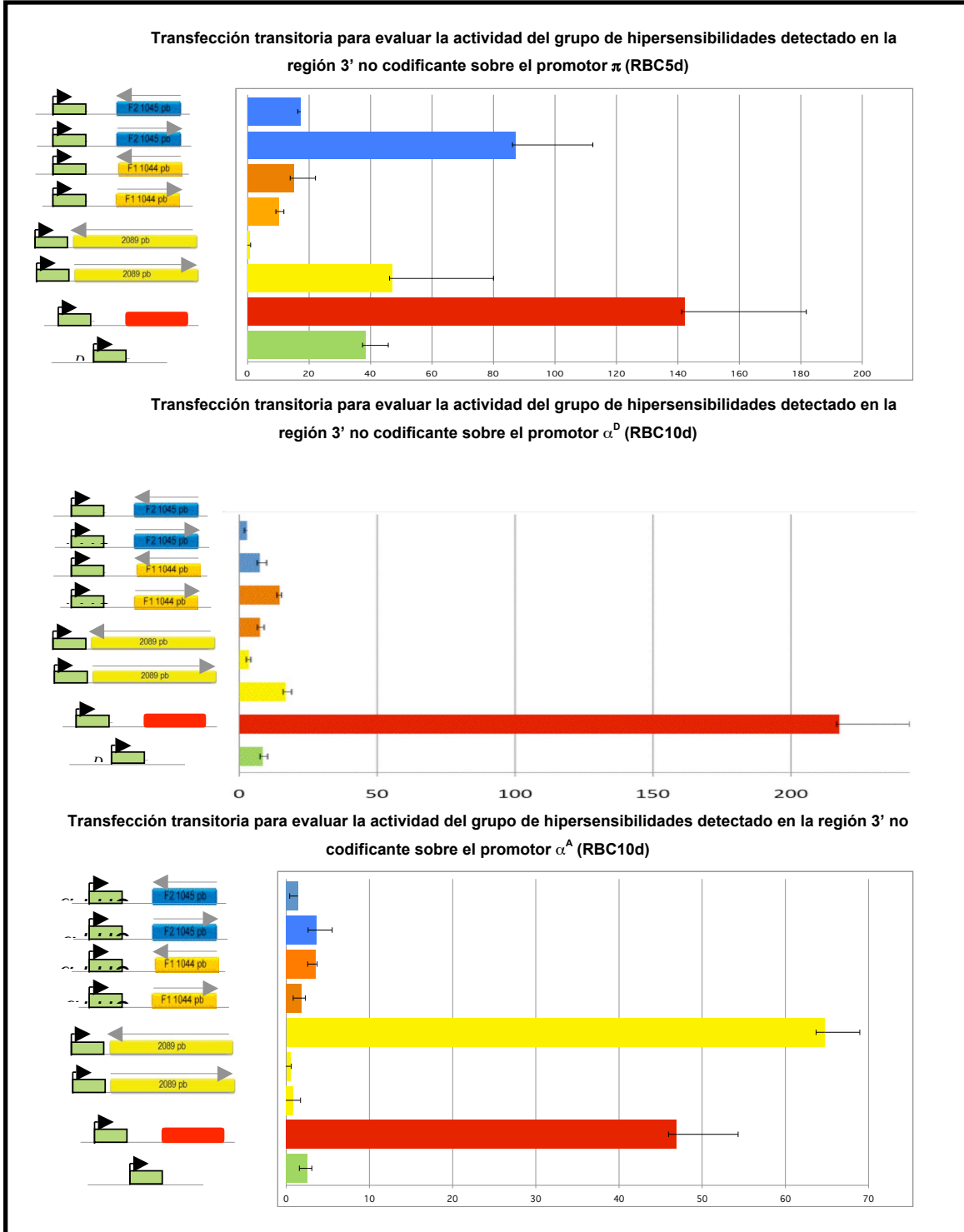


Figura 4. Análisis funcional de los tres sitios de corte a la DNasa I eritroide-específicos identificados en el extremo 3'-no codificante. Para evaluar el efecto regulatorio de los sitios hipersensibles a la DNasa I sobre cada promotor se utilizó el vector pGLBasic que tiene como gen reportero a la luciferasa (cajas verdes) dirigido por cada promotor en donde se clonaron: el fragmento completo que contiene a los tres sitios en ambas direcciones (cajas naranjas); el subfragmento F1 que incluye la primera repetida CR1 de la misma región en dirección 5'→3' y 3'→5' (cajas amarillas); y el subfragmento F2 que consta de la secuencia MAR y la repetida CR1 (cajas azules). En todos los ensayos se utilizó como control la señal del reportero dada por el promotor así como la construcción de cada promotor con el Enhancer proximal 3' clonado (caja roja), esperando en esta última la *trans-activación* significativa de los tres genes para comparar con los experimentales. Los resultados revelan que el fragmento analizado no presenta ningún efecto significativo sobre el gen embrionario π y el gen adulto α^D . En cambio, se observa una *trans-activación* sobre el gen α^A con el fragmento que incluye a los tres sitios de hipersensibilidad, la cual es comparable con la que ejerce el enhancer proximal 3' previamente descrito. Es importante notar que la actividad registrada sobre α^A únicamente se observa cuando el fragmento de 2089 pb está en dirección 3'→5'. Lo anterior nos llevó a corroborar la integridad de las construcciones con la región clonada en ambas direcciones, en donde encontramos que la construcción con el fragmento de 2089 pb en orientación 5'→3' no tenía el promotor de interés, lo cual explicaría la diferencia de actividad; por lo tanto se está trabajando en esta última construcción con el fin de confirmar el papel de *enhancer* de los tres sitios hipersensibles a la DNasa I 3'.

Los resultados revelaron que los sitios de hipersensibilidad a la DNasa I no ejercen ningún efecto significativo sobre los promotores π y α^D (Figura 4). Se observó en cambio que esta región parece tener un efecto *trans-activador* específico sobre el gen α^A (Figura 4). Interesantemente esto coincide con evidencias que demuestran que tanto el gen π como el α^D son regulados positivamente por el *enhancer* proximal 3' mientras α^A parece ser *trans-activado* por otro elemento que pudiera ser este nuevo *enhancer*. Por lo tanto, proponemos que los sitios de hipersensibilidad constituyen un *enhancer* distal (Enhdis3') cuya actividad es aparentemente promotor-específica.

Estos datos son congruentes con las evidencias experimentales obtenidas mediante la transferencia de cromosomas de células de pollo del linaje linfóide (DT40) a células humanas eritroleucémicas (K562) a través del protocolo de fusión de micronúcleos establecido en el laboratorio por Georgina Guerrero. Los resultados obtenidos sugieren que la expresión del gen embrionario y del gen adulto α^D dependen del Enhprox3' mientras que el gen α^A requiere la influencia *trans-activadora* de un elemento regulatorio adicional a los caracterizados previamente (Guerrero y col., en preparación).

Por otra parte, los límites del dominio α -globina permanecen sin elucidar, sin embargo, tomando en cuenta los resultados del análisis funcional del elemento Enhdis3' así como la posible transición de marcas de cromatina que se identificó sobre este elemento, planteamos la posibilidad de que el límite del dominio en el costado 3' no-codificante se encuentre río abajo con respecto a esta zona de 3 hipersensibilidades a la DNasa I.

Recientemente, se llevaron a cabo experimentos ChIP-seq para determinar la distribución *in vivo* de CTCF a lo largo de todo el genoma del pollo, en el contexto de una colaboración entre nuestro grupo de investigación y un Consorcio Español avocado al estudio del factor CTCF, donde se analizó la unión del factor en células eritroides (eritrocitos terminalmente diferenciados) y en células no-eritroides (fibroblastos). Esta técnica nos permitió determinar los sitios de unión a nivel de secuencia nucleotídica dentro del dominio α -globina (Figura 5). Los resultados de ChIP-seq evidenciaron la asociación *in vivo* del factor CTCF en la

isla CpG localizada 2 kb río abajo del elemento Enhdis3' en eritrocitos terminalmente diferenciados (Figura 5). Río abajo con respecto a esta isla se encuentra el locus del gen *TMEM8*, cuya función ha sido relacionada con la determinación de células linfoides T_{helper}, sin embargo, poco se sabe acerca de sus patrones de expresión. Análisis bioinformáticos realizados en el laboratorio revelaron que la posición del dominio α -globina en el clado de las aves es resultado de una inversión, la cual se ubica entre la isla CpG y el gen *TMEM* (Datos no publicados). Estos antecedentes nos hacen pensar que esta isla podría constituir el elemento frontera real del dominio.

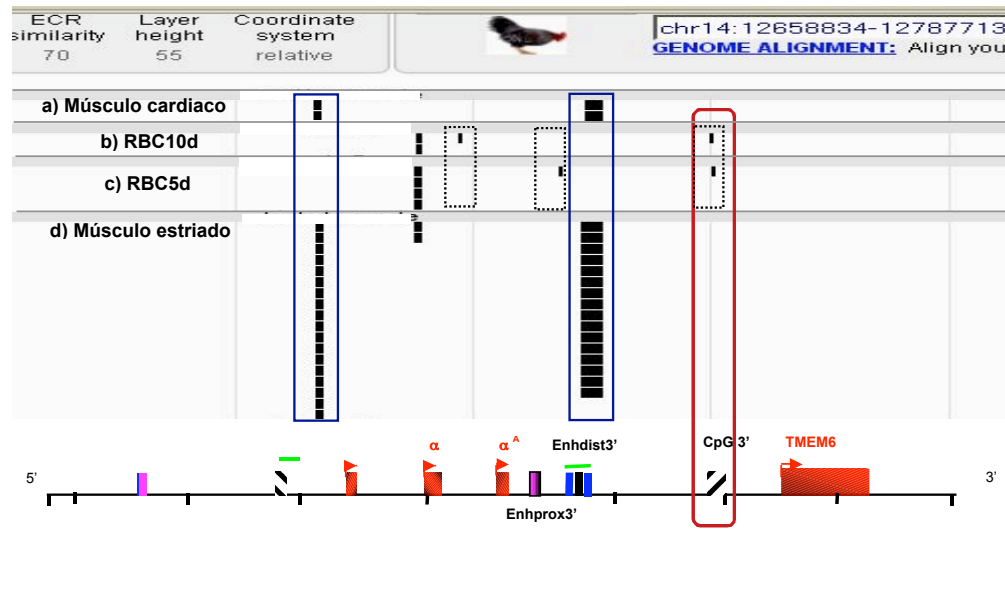


Figura 5. Análisis por ChIP-seq mostrando la unión de la asociación *in vivo* del factor CTCF a lo largo del dominio α -globina de pollo. El estudio de ChIP-seq para CTCF en el genoma del pollo se llevo a cabo en cuatro tipos celulares: a) músculo cardiaco, eritrocitos terminalmente diferenciados de b) 5 y c) 10 días, y d) músculo estriado (filas). El análisis de los resultados nos permitió identificar la asociación dentro de la isla CpG 3' en estudio (recuadro rojo). Asimismo se encontró que existen diferentes sitios de unión de CTCF en el dominio que constituyen patrones diferenciales en células eritroides (recuadros en líneas negras punteadas) y no eritroides (fibroblastos; recuadros azules). Interesantemente la asociación de <CTCF en células no-eritroides coincide con la región de los sitios

Por otro lado, los datos del ChIP-seq reflejaron que en el dominio α -globina existen patrones de asociación de CTCF en diferentes sitios de unión dependiendo del tipo celular (analizado en eritrocitos terminalmente diferenciados y en fibroblastos; Figura 5). Estas observaciones podrían sugerir la existencia de sub-dominios que se regulan de manera tejido-específica, los cuales estarían delimitados por secuencias tipo *insulator* o no, pero sobre todo, que tengan un efecto directo en el control de la transcripción de los genes α -globina, aspecto que consideramos muy relevante y que nos interesa estudiar en el contexto de este proyecto.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En nuestro grupo de investigación consideramos como clave el poder entender la contribución del grupo de los tres sitios de hipersensibilidad a la DNAsa I sobre la expresión diferencial de los genes α -globina de pollo así como el papel estructural de la isla CpG como posible límite del dominio en la región 3' no-codificante. Asimismo, nos interesa entender el impacto de estos elementos sobre la organización de este dominio multigenico y su efecto sobre la transcripción de los genes que lo componen. Por otro lado, basados en los resultados de los análisis de asociación *in vivo* de CTCF por ChIP-seq nos proponemos estudiar el mecanismo que determina la asociación diferencial de este factor en células eritroides y células no eritroides a lo largo del dominio.

V. HIPÓTESIS

Los elementos de la región 3' no-codificante contribuyen en la organización cromatínica del dominio α -globina de pollo y participan en la regulación de la expresión diferencial de los genes contenidos en el mismo a lo largo del desarrollo.

VI. OBJETIVO GENERAL.

Entender la contribución de la región 3' no-codificante del dominio α -globina de pollo tanto a nivel funcional como estructural.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Analizar funcionalmente *in vivo* el elemento regulatorio Enhdist3' (Enhancer distal).
 - 1.1 Evaluación del papel regulatorio del Enhdist3' sobre el gen α^A en líneas estables arrestadas en etapa adulta que: a) no expresan los genes globina (HD3) y b) cuya inducción promueve la expresión de los genes adultos (HD3i).
 - 1.2 Análisis a nivel funcional del dominio mediante la eliminación en el sistema heterólogo de células eritroleucémicas humanas (K562) a través de la microfusión de núcleos (protocolo estandarizado en el laboratorio).
 - 1.3 Caracterizar la estructura de la cromatina en la región que contiene al Enhdist3' por medio de inmunoprecipitaciones de la cromatina (ChIP) buscando en particular elementos propios de *enhancers* como la marca H3K4me2 y la variante de histonas H2AZ .
 - 1.4 Analizar los posibles cambios en la estructura de la cromatina de la región contenedora del Enhdist3' a lo largo de la diferenciación eritroide y del desarrollo del pollo.

2. Determinar el límite estructural del dominio α -globina de pollo.

2.1 Caracterización de la isla CpG ubicada en el extremo 3' no-codificante del dominio como posible límite estructural del mismo (ver Figura 2).

2.2 Estudio de la unión *in vivo* del factor CTCF a la isla CpG así como la evaluación de su posible actividad como *insulator*.

3. Entender la función, unión y distribución diferencial del factor CTCF a lo largo del dominio α -globina en células eritroides y no-eritroides (fibroblastos).

3.1 Con base a los datos de ChIP-Seq deseamos corroborar la presencia de CTCF enmarcando a los genes globina en fibroblastos.

3.2 Analizar la expresión de los genes α -globina en fibroblastos.

3.3 Caracterizar la estructura de la cromatina en las regiones 3' y 5' no-codificantes del dominio en fibroblastos en términos de marcas de histonas a través de inmunoprecipitaciones de cromatina usando anticuerpos específicos contra las modificaciones postraduccionales de cromatina cerrada y abierta.

VIII. Relevancia y Perspectivas

El dominio α -globina ha permitido el entendimiento de múltiples procesos de regulación transcripcional tanto a nivel genético como epigenético, sin embargo, quedan por entender numerosos mecanismos que controlan la expresión diferencial de los genes globina a lo largo del desarrollo. La elucidación de nuevos elementos regulatorios inmersos en las regiones no-codificante en el dominio α -globina contribuirá al entendimiento de estos mecanismos.

Interesantemente, las evidencias que hasta la fecha hemos obtenido en el laboratorio sugieren la existencia de componentes regulatorios inéditos, concretamente del tipo *enhancer* (Enhancer distal 3'), cuya actividad parece ser promotor específico. Este hallazgo permitiría definir nuevos mecanismos de regulación que definen la expresión diferencial de los genes α -globina, aspectos que deberían ser considerados en el estudio funcional de elementos tipo *enhancer* dentro de diferentes dominios.

Por otro lado, es posible que el estudio de los patrones diferenciales de la asociación del factor CTCF a lo largo del dominio en eritrocitos diferenciados y fibroblastos nos permita dilucidar mecanismos implicados en la organización del dominio que rigen las diferencias en la expresión de los genes en células del linaje eritroide y no-eritroide.

En nuestro laboratorio consideramos que el estudio de los procesos anteriormente descritos abordados desde un panorama integral abrirán una nueva faceta en el estudio de los elementos regulatorios así como en las implicaciones de la organización del dominio a distintos niveles de regulación.

ANEXO B

IX. REFERENCIAS

- Anguita E, Hughes J, Heyworth C, Blobel GA, Wood WG, Higgs DR. (2004) Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *EMBO J.* 23, 2841–2852.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G. (2001) Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science.* 291, 447-450.
- Berger SL, Felsenfeld G. (2001) Chromatin goes global. *Mol. Cell.* 8, 263-268.
- Bushey AM, Dorman ER, Corces VG. (2008) Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol. Cell.* 32, 1–9.
- Drissen, R Palstra RJ, Gillemans N, Splinter E, Grosveld F, Philipsen S, de Laat W. (2004) The active spatial organization of the β -globin locus requires the transcription factor EKLF. *Genes Dev.* 18, 2485–2490.
- Escamilla-Del-Arenal M, Recillas-Targa F. (2008) GATA-1 modulates the chromatin structure and activity of the chicken α -globin 3'-enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 28, 575–586.
- Fraser P, and Bickmore W. (2007) Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447, 413–417.
- Gavrilov AA, Razin SV. (2008) Spatial configuration of the chicken α -globin gene domain: immature and active chromatin hubs. *Nucleic Acids Res.* 36, 4629-4634.
- Guerrero G, Delgado-Olguín P, Escamilla-Del-Arenal M., Furlan-Magaril FM, Rebollar E, De La Rosa-Velázquez IA, Soto-Reyes ES, Rincón-Arano H, Valdes-Quezada C, Valadez-Graham V, Recillas-Targa F. Globin genes transcriptional switching, chromatin structure and linked lessons to epigenetics in cancer: A comparative overview. *Comparative Biochemistry and Physiology* (2007) *Mol. & Int. Physiology.* 147, 750-760.
- Higgs DR, Vernimmen D, Wood B. (2008) Long-range regulation of α -globin gene expression. *Adv Genet.* 61,143-173.
- Higgs DR, Wood WG, Jarman AP, Sharpe J, Lida J, Pretorius IM, Ayyub H. A major positive regulatory region located far upstream of the human α -globin gene locus. *Genes & Dev.* 4, 1588-1601.
- Hughes JR, Cheng JF, Ventress N, Prabhakar S, Clark K, Anguita E, De Gobbi M, Jong P, Rubin E, Higgs R. (2005) Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification, and functional assessment of multispecies conserved sequences. *PNAS.* 102, 9830 –9835.
- Hou C, Zhao H, Tanimoto K, Dean A. (2008). CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation. *PNAS.* 105, 20398–20403.
- Lanctot C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat. Rev. Genet.* 8, 104–115.
- Phillips J, Corces VG. (2009) CTCF: Master Weaver of the Genome. *Leading Edge J. Cell.* 137.
- Recillas-Targa F, Escamilla Del Arenal M. (2004) Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVIII, 173-201.

Recillas-Targa F, Razin SV. (2001) Chromatin domains and regulation of gene expression: familiar and enigmatic clusters of chicken globin genes. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 11:227-242.

Rincón-Arano H, Guerrero G, Valdes-Quezada C, Recillas-Targa, F. (2009) Chicken α -Globin Switching Depends on Autonomous Silencing of the Embryonic Globin Gene by Epigenetics Mechanisms. *J. Cell. Biochem.* 108, 675–687.

Rincón-Arano H, Valadez-Graham V, Guerrero G, Escamilla-Del-Arenal M, Recillas-Targa F. (2005) YY1 and GATA-1 interaction modulate the chicken 3'-side α -globin enhancer Activity. *J. Mol Biol.* 349, 961-975.

Sasaki H, Matsui Y.(2008) Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat. Rev.*, 9: 129-138.

Vakoc CR, Letting DL, Gheldof N, Sawado T, Bender MA, Groudine M, Weiss MJ, Dekker J, Blobel GA. (2005) Proximity among distant regulatory elements at the β -globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol. Cell.*17:453–462.

Valadez-Graham V, Razin SV, Recillas-Targa F. (2004) CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken α -globin gene domain. 1354- 1362.

Wood WG, Wallace HA, Smith AJH, Higgs DR. Vernimmen D, Marques-Kranc F, Sharpe JA, Sloane-Stanley JA. (2009) Chromosome looping at the human α -globin locus is mediated via the major upstream regulatory element (HS -40). *Blood.*

Yoon YS, Jeong S, Rong Q, Park KY, Chung JH, and Pfeifer K. (2007) Analysis of the H19ICR insulator. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3499–3510.

Yusufzai, T.M., Tagami, H., Nakatani, Y., and Felsenfeld, G. (2004). CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol. Cell.* 13, 291–298.

RESEARCH PAPER

 OPEN ACCESS

Prelamin A processing, accumulation and distribution in normal cells and laminopathy disorders

Andrea Casasola^{a,c}, David Scalzo^a, Vivek Nandakumar^a, Jessica Halow^a, Félix Recillas-Targa^c, Mark Groudine^{a,b}, and Héctor Rincón-Arano^a

^aBasic Science Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA; ^bDepartment of Radiation Oncology, University Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA; ^cInstituto Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

ABSTRACT

Lamin A is part of a complex structural meshwork located beneath the nuclear envelope and is involved in both structural support and the regulation of gene expression. Lamin A is initially expressed as prelamin A, which contains an extended carboxyl terminus that undergoes a series of post-translational modifications and subsequent cleavage by the endopeptidase ZMPSTE24 to generate lamin A. To facilitate investigations of the role of this cleavage in normal and disease states, we developed a monoclonal antibody (PL-1C7) that specifically recognizes prelamin A at the intact ZMPSTE24 cleavage site, ensuring prelamin A detection exclusively. Importantly, PL-1C7 can be used to determine prelamin A localization and accumulation in cells where lamin A is highly expressed without the use of exogenous fusion proteins. Our results show that unlike mature lamin A, prelamin A accumulates as discrete and localized foci at the nuclear periphery. Furthermore, whereas treatment with farnesylation inhibitors of cells overexpressing a GFP-prelamin A fusion protein results in the formation of large nucleoplasmic clumps, these aggregates are not observed upon similar treatment of cells expressing endogenous prelamin A or in cells lacking ZMPSTE24 expression and/or activity. Finally, we show that specific laminopathy-associated mutations exhibit both positive and negative effects on prelamin A accumulation, indicating that these mutations affect prelamin A processing efficiency in different manners.

ARTICLE HISTORY

Received 9 October 2015
Revised 28 January 2016
Accepted 31 January 2016

KEYWORDS

intracellular flow cytometry (IFC); lamin A; monoclonal antibody; nuclear envelope; prelamin A; post-translational processing; progeroid syndromes; ZMPSTE24

Introduction


The nuclear lamina, which lies beneath the inner nuclear membrane, is a relatively insoluble fibrous structure resistant to extraction by detergents.¹ This lamina is a complex protein meshwork composed of class V intermediate filaments called lamins. Lamins play diverse roles in nuclear organization and in various essential cellular functions such as DNA replication, transcription, and RNA processing.^{2–5} Lamins are divided into 2 subgroups: A- and B-type lamins. In mammals, A-type lamins (lamins A, C, AΔ10 and C2) are generated by alternative splicing of a single *LMNA* gene. B-type lamins, on the other hand, are encoded by the *LMNB1* and *LMNB2* genes.^{6–8} In general, lamins exhibit 3 distinct structural domains: 1) a conserved central rod domain consisting of 4 helical coils (1A, 1B, 2A, 2B), 2) a conserved immunoglobulin-like domain

and 3) a conserved CAAX motif in the carboxyl-terminal end that is isoprenylated and crucial for the attachment to the nuclear envelope, except for lamin C, which lacks the CAAX motif.^{9–13}

Lamin A has been intensely studied during the past 4 decades, as it plays a key role in a wide variety of cellular processes, including telomere maintenance, nuclear compartmentalization and DNA repair.^{3–5} Mutations in this structural protein are associated with rare diseases known as laminopathies and in some cases have been proven to affect lamin A post-translational processing. Lamin A is initially synthesized as a precursor known as prelamin A, which undergoes a complex set of modifications in the carboxyl terminus. These modifications, which are required for incorporation of prelamin A into the nuclear envelope and its subsequent

CONTACT Hector Rincon  hrrincon@fredhutch.org; Mark Groudine  markg@fredhutch.org  1100 Fairview Ave N. Mail stop: A3-025 Seattle, WA, USA, 98109

Color versions of one or more of the figures in this article can be found online at www.tandfonline.com/kncl.

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2016 Andrea Casasola, David Scalzo, Vivek Nandakumar, Jessica Halow, Felix Recillas-Targa, Mark Groudine, and Hector Rincon-Arano. Published with license by Taylor & Francis Group, LLC. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

processing into the mature lamin A include: 1) addition of a farnesyl isoprenoid group to C662 of the CAAX motif; 2) endoproteolysis of the last 3 amino acids, S663, I664 and M665, resulting in a 662-residue peptide; 3) carboxymethylation of the last residue (C662) by the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase enzyme, and, lastly, 4) cleavage of the 15 C-terminal residues (Y647-C662) by ZMPSTE24, which generates a final protein product containing 646 residues¹⁴⁻¹⁶ (Fig. 1A). While the first 3 modifications render the carboxyl terminus more hydrophobic, facilitating interactions with the nuclear membrane,¹⁷ the proteolytic cleavage by ZMPSTE24 produces mature lamin A, which is then incorporated into the nuclear lamina.^{9,15,18,19} However, lamin C is not farnesylated and yet is still located at the nuclear periphery, therefore the role of the farnesyl anchor in nuclear envelope targeting of the lamins remains unclear.²⁰

To date, there are over 460 known mutations in the human *LMNA* gene that are associated with laminopathies (The UMD-lamin A mutations database <http://www.umd.be/LMNA/>). These include Emery-Dreifuss muscular dystrophy, Limb-girdle muscular dystrophy and Mandibuloacral dysplasia, as well as the premature aging disorder Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS).²¹⁻²⁵ Importantly, current data demonstrate that HGPS phenotypes are the result of alterations in the prelamin A processing pathway. For example, the most common HGPS mutation, G608G, activates a cryptic splice site in exon 11 of the *LMNA* gene (*LMNA*Δ50). This leads to the synthesis of an alternatively spliced lamin A variant (progerin) that lacks the recognition site for ZMPSTE24.²⁵ While Progerin can be farnesylated, it cannot be cleaved and remains permanently attached to the nuclear envelope.²⁵⁻²⁷ Progerin nuclei exhibit morphological defects such as changes in size and shape, as well as

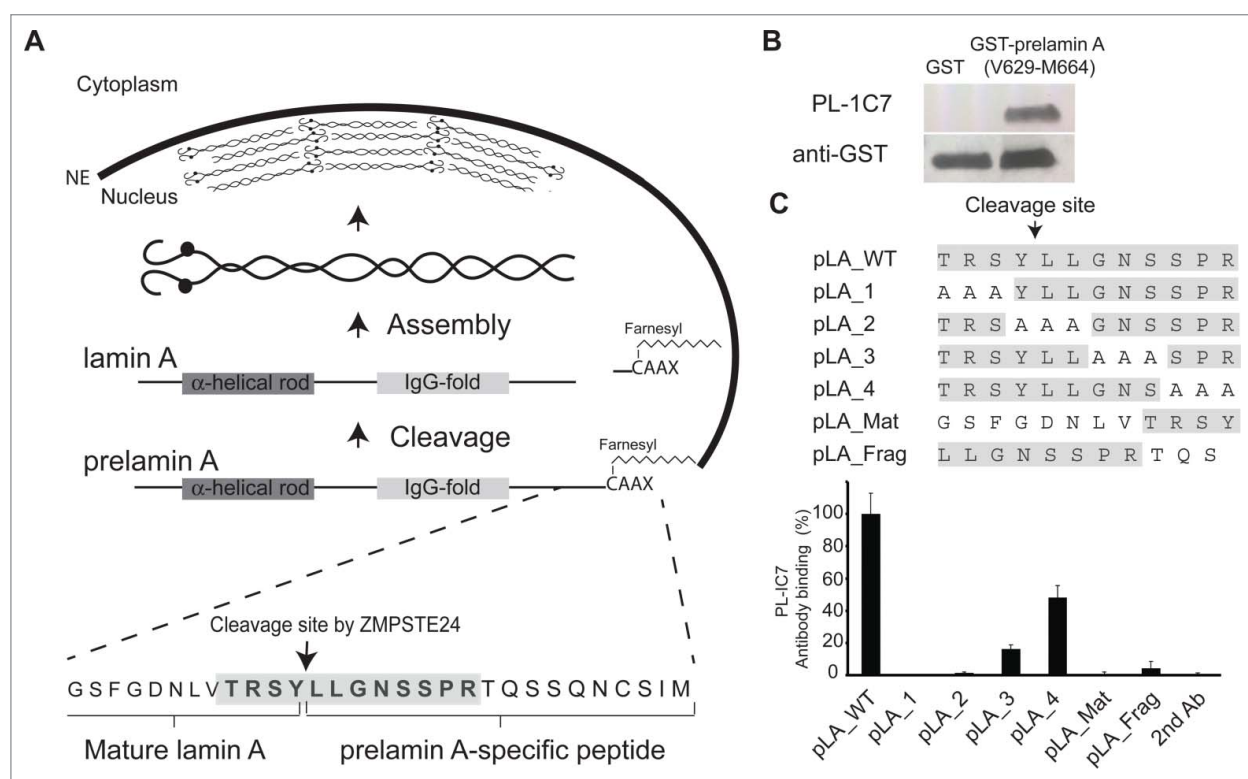


Figure 1. PL-1C7 monoclonal antibody specifically recognizes the lamin A precursor, prelamin A. (A). Diagram of prelamin A structure and processing. The PL-1C7 monoclonal antibody was raised using as an antigen a synthetic peptide composed of the 12 amino acids spanning the ZMPSTE24 cleavage site in prelamin A (T643-R654), and includes 4 amino acids from the mature lamin A as well as 8 specific prelamin A residues (gray shading). (B). PL-1C7 antibody binding to the carboxyl terminus of prelamin A was confirmed by western blot using a GST-prelamin A V629-M664 fusion protein, right lane; non-fusion protein GST control, left lane. (C). PL-1C7 epitope mapping was done by ELISA immunassays using a panel of 7 synthetic peptides where wild type amino acids triplets were sequentially replaced by alanine triplets, as well as 2 peptide mimics of ZMPSTE24-generated lamin A fragments: pLA_Mat (G635-Y646) and pLA_Frag (L647-S657). Antibody binding was plotted as percentage of binding in relation to the wild type lamin A peptide (pLA_WT). $p < 0.005$. See also Fig. S1.

alterations in cell division and proliferation rates,²⁷⁻³⁰ suggesting that the abnormal accumulation of the far-nesylated prelamin A affects cell homeostasis. Using GFP protein fusions, it has been shown that farnesylation inhibitors (FTinh) can block prelamin A association with the nuclear envelope causing the nucleoplasmic aggregation of prelamin A but rescuing the misshapen nuclear phenotype in HGPS cells.^{26,31-34} Similar precursor accumulation was observed with untagged prelamin A upon FTinh treatment, but without the formation of aggregates, suggesting that prenylation is required for targeting prelamin A to the nuclear envelope.^{35,36} Currently, farnesylation inhibitors are being used as a treatment option in HGPS patients.³⁷⁻³⁹ Nevertheless, another study found that the expression of a non-farnesylated prelamin A in *Lmna*^{nPLAO} mice did not exhibit progeria-associated phenotypes, but instead caused cardiomyopathy. Importantly, using a rat monoclonal antibody generated against the last 15 residues of prelamin A (clone 7G11)⁴⁰ Davies *et al.* showed that this non-farnesylated prelamin A version can still localize at the nuclear rim.⁴¹ Similar results were obtained upon knockout of both farnesyl transferase and generalyl transferase proteins (the 2 major prenylating proteins) in keratinocytes resulting in prelamin A accumulation, in particular at the nuclear rim.^{40,41} Together, these genetic results support the notion that addition of the farnesylation anchor is not the determinant step in prelamin A accumulation at the nuclear periphery, but nevertheless, its accumulation at the periphery, whether farnesylated or not, can be toxic.

Although LMNA Δ 50-based HGPS is one of the most studied laminopathies, several missense point mutations along the *LMNA* gene have also been found to be associated with the development of Progeroid phenotypes. Collectively, these are known as Atypical Progeroid Syndromes (APS) and are also characterized by nuclear shape abnormalities and cellular toxicity.⁴²⁻⁴⁶ Phenotypes of APS are more tissue-restricted, observed in particular in skeletal muscle, cardiac muscle, epithelial and vascular tissue.^{43,46-49} In contrast to HGPS, however, APS *LMNA* mutations are not exclusively localized in the carboxyl-terminal end of the protein and the mechanisms by which these mutations lead to their associated defects remains unclear. Additionally, FTinh treatment has not proven to be a successful therapy for APS.⁴³

While several studies have revealed morphological differences in nuclei due to the expression of GFP-tagged prelamin A, endogenous prelamin A detection has not been addressed in a quantitative manner. However, the latter has been difficult to measure due to the low prelamin A concentration, as well as its transient state, its low tissue specific expression and the minimal difference in mass with the mature molecule. Here, we report the development and characterization of the monoclonal antibody PL-1C7, which specifically recognizes prelamin A at the region targeted by ZMPSTE24, thus detecting all prelamin A intermediates but not the mature form. We show that PL-1C7 can be effectively used to monitor prelamin A levels by intracellular flow cytometry (IFC) and can also potentially be used as a sensor of ZMPSTE24 activity. We find that prelamin A is incorporated into localized regions of the nuclear periphery in murine cells, and that inhibition of prelamin A farnesylation results in a diffuse distribution of prelamin A within the intranuclear space but not in the formation of prelamin A aggregates (which do form when overexpressing GFP-prelamin A fusion proteins) in both murine and human cells. Interestingly, analysis of laminopathy-associated *LMNA* mutations with the PL-1C7 antibody suggests that while specific mutants cause prelamin A accumulation, others make prelamin A processing more efficient when expressed in lamin A null cells. These results also demonstrate that the PL-1C7 antibody is a useful tool to study prelamin A biology.

Results

The monoclonal PL-1C7 antibody recognizes prelamin A at the ZMPSTE24 cleavage site

Several polyclonal anti-lamin A antibodies are commercially available, but all target at least some epitopes within the mature lamin A protein. In contrast, a rat prelamin A monoclonal antibody (7G11) distinguishes between the precursor and mature lamin A forms (Fig. 1A). However, 7G11 also detects the fragment released after ZMPSTE24 cleavage from prelamin A. Thus we were interested in producing an antibody that recognizes only the full length prelamin A. Using the synthetic peptide TRSYLLGNSSPR, which corresponds to the conserved carboxyl terminal region of prelamin A (T643-R654 residues) that spans the ZMPSTE24 cleavage site (Fig. 1A, S1A), we produced

the mouse monoclonal IgG2b κ antibody PL-1C7 against prelamin A (Fig. S1B). The specificity of this antibody for the lamin A carboxyl domain was confirmed by the recognition of a GST-prelamin A V629-M664 fusion protein (Fig. 1B).

Since the antigenic sequence used to develop the PL-1C7 antibody also possesses 4 amino acids that remain in the mature product (TRSYLLGNSSPRS QSSQNCSIM), we sought to identify the minimal region of recognition by PL-1C7. To accomplish this, we performed epitope mapping analyses evaluating PL-1C7 binding to a set of 5 synthetic peptides: a prelamin A peptide covering the first 12 amino acids of the original antigenic sequence (T643-R654, pLA_WT) and 4 peptides with sequential triplet alanine substitutions along the twelve-amino acid sequence (pLA_1, pLA_2, pLA_3, pLA_4) (Fig. 1C). These experiments reveal that, while PL-1C7 binds to the wild type prelamin A peptide, alanine substitutions in peptides pLA_1 and pLA_2 abolished PL-1C7 binding (Fig. 1C). In addition, when alanine triplets were substituted at sites downstream of the ZMPSTE24 cleavage site, in the pLA_3 or pLA_4 peptide, recognition by PL-1C7 was disrupted 80% and 50%, respectively. These results reveal that the primary PL-1C7 epitope overlaps with the 5 amino acids located at the core of ZMPSTE24 cleavage site (TRSYLL). To determine if PL-1C7 recognizes the 2 fragments generated by this endopeptidase, we tested 2 peptides corresponding to the sequences flanking the ZMPSTE24 cleavage site. One of these peptides represents the carboxyl terminus of the mature lamin A product (pLA_Mat, G635-Y646) and the other represents the fragment released after cleavage by ZMPSTE24 (pLA_frag, L647-S657) (Fig. 1A, C). Our results indicate that PL-1C7 does not recognize ZMPSTE24 generated fragments, as binding to pLA_Mat and pLA_Frag peptides was reduced by 100% and 95%, respectively, as compared to binding to the complete original antigenic sequence. Consistent with its preferential binding to the intact ZMPSTE24 cleavage site (TRSYLL), pLA_Mat and pLA_Frag peptides did not compete for PL-1C7 binding to the intact sequence in competition binding assays (Fig. S1C). Importantly, increased PL-1C7 concentrations did not impact its specificity for the epitope, suggesting high specificity for its target sequence (Fig. S1D). In contrast, the previously reported rat prelamin A antibody, 7G11, binds only the fragment released after cleavage

by ZMPSTE24 close to the farnesylation sequence (Fig. S1E-F). As the 7G11 antibody recognizes both human and mouse, this antibody must target the Q657S658 sequence, as T656 is not conserved in the mouse epitope used to produce this antibody (Fig. S1A). In summary these findings reveal that the PL-1C7 antibody selectively identifies the carboxyl terminus of prelamin A by recognizing the sequence TRSYLL and, unlike the 7G11 antibody, PL-1C7 does not detect any of the lamin A processing fragments generated from the cleavage by ZMPSTE24.

Quantitative detection of prelamin A using the PL-1C7 antibody

To further examine PL-1C7 specificity and to determine whether this antibody can be used for quantitative detection of prelamin A levels in cells, we performed intracellular flow cytometry (IFC) in *Lmna*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEF) stably transfected with a Doxycycline (Dox)-inducible GFP-*Lmna* transgene (GFP-*Lmna* MEF).⁵⁰ After 24 h in Dox, GFP-lamin A can be detected by flow cytometry, both by GFP fluorescence (Fig. 2A-B, S2A) or by using commercial antibodies to lamin A/C (99.8% positive cells) and confirmed by western blot (Fig. 2C-D). IFC validation was also accomplished by staining non-Dox treated GFP-*Lmna* MEFs with an antibody against lamin B, which is constitutively expressed in these cells (Fig. S2B-D). Importantly, staining of Dox-treated cells with PL-1C7 revealed that prelamin A was present in >90% of GFP positive cells, suggesting that both the precursor and lamin A are actively produced in these cells (Fig. 2C-E, S2A). As farnesyltransferase inhibitors (FTinh) can increase prelamin A accumulation, we treated GFP-*Lmna* MEFs with Dox and the FTinh, Lonafarnib, and then determined whether the PL-1C7 antibody could detect variations in prelamin A abundance. IFC showed that, upon FTinh treatment, PL-1C7 detected a 2-fold increase in fluorescence intensity (Geometric mean: 430 (Control) vs 789 (FTinh)) (Fig. 2F-G, S2E). The percentage of positive cells remained unaffected, indicating that PL-1C7 detected the FTinh-induced prelamin A accumulation previously reported by others.^{26,31,33} To validate and extend these results, protein gel blots were performed with nuclear proteins from C2C12 cells transfected with the same GFP-*Lmna* fusion-encoding plasmids used in MEFs. After

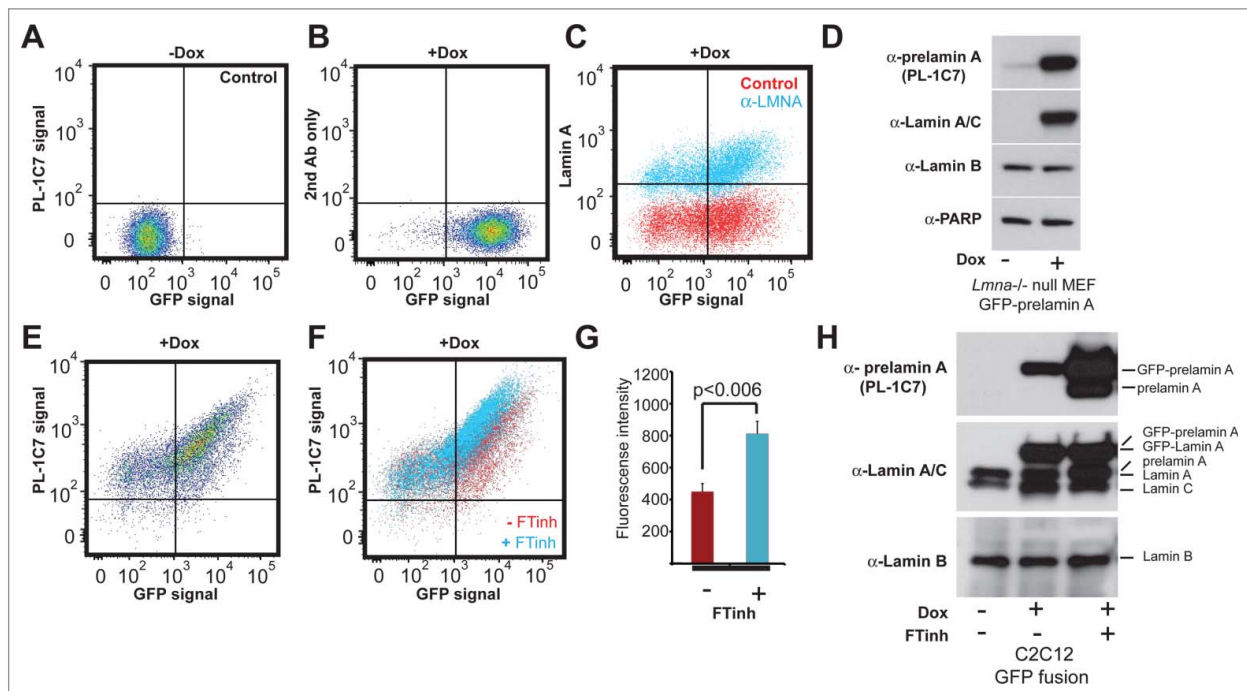


Figure 2. Quantitative detection of prelamin A by intracellular flow cytometry (IFC). Prelamin A is detected by PL-1C7 antibody in *Lmna*^{-/-} MEFs stably transfected with Doxycycline (Dox)-inducible *GFP-Lmna* transgene using IFC. (A). Control, non-induced *GFP-Lmna* MEFs (“x” axis, GFP-fusion; “y” axis, prelamin A signal detected using PL-1C7 antibody). (B). Control *GFP-Lmna* MEFs after 24 hr Dox treatment stained with secondary antibody only (No PL-1C7). (C). Detection of both precursor and processed *Lmna* gene products (lamin A) with anti-lamin A/C antibody in *GFP-Lmna* MEFs after 24 hr Dox treatment. (D). Western blot analysis of *GFP-Lmna* MEF cells treated with Dox for 24h. GFP signal is present on mature lamin A as well as prelamin A. Prelamin A accumulation was detected using the PL-1C7 antibody. Antibodies against lamin A/C, lamin B and PARP1 were used as controls. (E). Dox-treated *GFP-Lmna* MEF stained with PL-1C7 antibody (prelamin A). (F). Farnesyl transferase inhibitor (FTinh) induced prelamin A accumulation in *GFP-Lmna* MEFs detected by IFC using the PL-1C7 antibody (G). Fluorescence geometric median of prelamin A detection using PL-1C7 by IFC after FTinh treatment of *GFP-Lmna* MEFs. (H). Western blot analysis to detect prelamin A accumulation in Dox induced *GFP-Lmna* C2C12 myoblasts upon FTinh treatment. Antibodies against lamin A/C and lamin B were used as controls. See also Fig. S2.

treating control and transfected cells with Dox and FTinhs, similar increases in GFP-prelamin A and prelamin A were observed (Fig. 2H). Together, these results show that PL-1C7 antibody is a useful tool to detect and measure prelamin A.

Localized distribution of prelamin A along the nuclear envelope

Several studies have demonstrated the continuous distribution of lamin A at the nuclear periphery under normal conditions,^{51,52} but it is unclear whether prelamin A is also homogeneously incorporated around the nuclear periphery. To determine prelamin A distribution at the nuclear envelope, we performed indirect immunofluorescence staining using the PL-1C7 antibody in Dox-induced *GFP-Lmna* MEFs. Interestingly, while GFP-lamin A localizes homogeneously along the nuclear periphery, the GFP-prelamin A fraction is

detected as a well-localized punctate pattern at the periphery, suggesting a more localized incorporation of the lamin A precursor (Fig. 3A-B). To exclude the possibility of this observation arising from the overexpression of *GFP-Lmna* transgene, we performed similar analyses in the myoblast cell line C2C12, as muscle cells tend to be under higher physical stress and exhibit higher lamin A levels.⁵³ Consistently, the endogenous lamin A-type proteins (lamin A/C and prelamin A) were detected in the nuclear periphery in these cells. However, prelamin A staining again revealed a more punctate localization pattern relative to lamin A, which is distributed homogeneously around the nuclear periphery (Fig. 3C-D). To validate our observation, we developed a quantitative image analysis that generates a fluctuation index metric of endogenous lamin A/C and prelamin A signals around the nuclear envelope. Our custom/novel ‘fluctuation index’ metric compared the localization patterns of

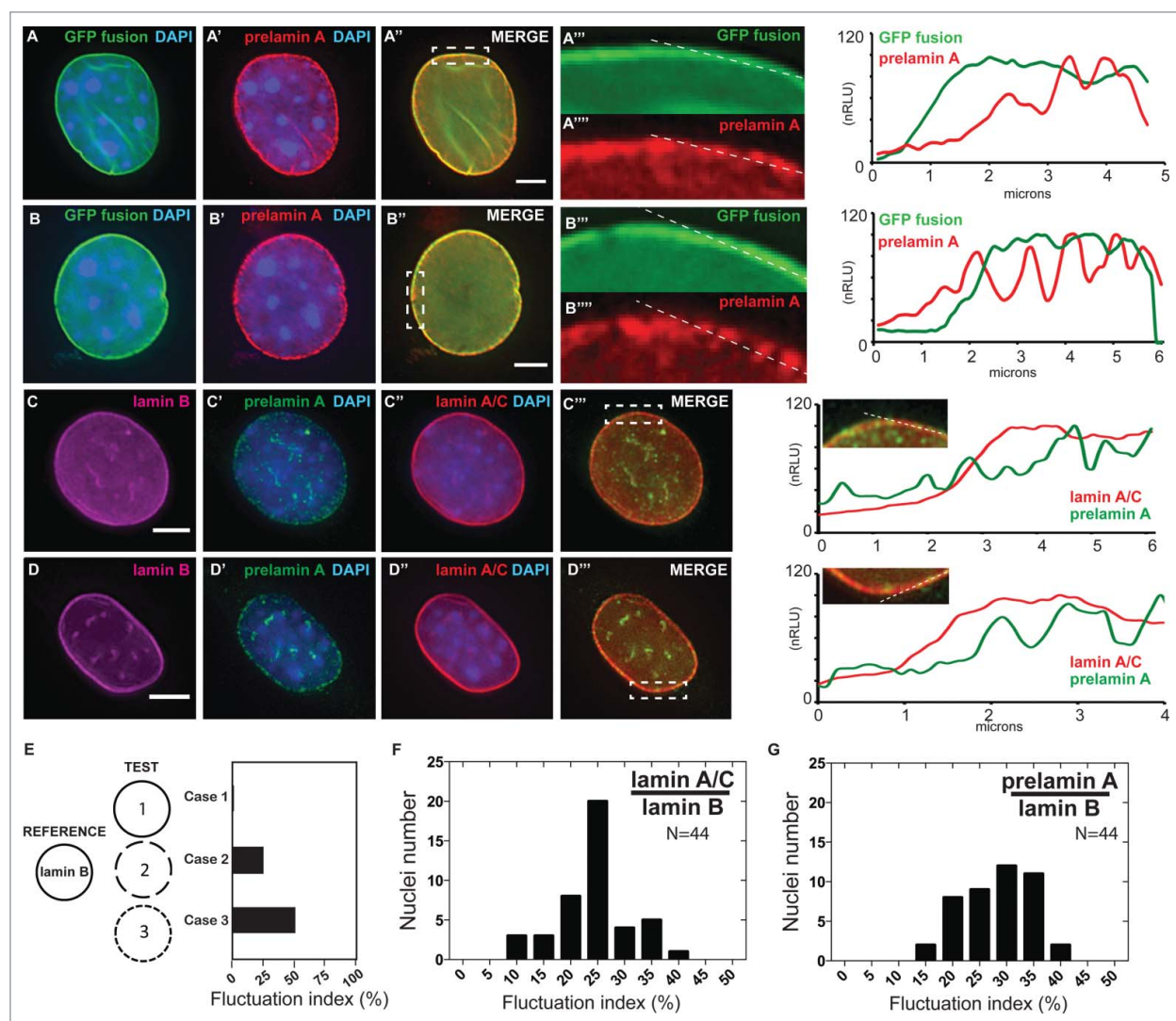


Figure 3. Localized prelamin A detection around the nuclear periphery via immunohistochemical analysis using the PL-1C7 antibody. (A) and (B). Two examples of Dox-treated *GFP-Lmna* MEF cells stained with prelamin A antibody PL-1C7 (red) and counter-stained with DAPI. GFP signal represents preferentially the mature lamin A, but also the prelamin A fraction due to the GFP tag in the N-terminus (Fig. 2). Dotted boxes show regions where correlation analyses between GFP-lamin A and GFP-prelamin A were performed (dotted line). Signal intensities were normalized to the highest value (100). The signal distribution pattern of the GFP-fusion proteins (GFP signal) representing primarily mature lamin A/C (green line; GFP fusion) is significantly different from the prelamin A distribution pattern detected by the PL-1C7 antibody (red line; prelamin A). (C) and (D). Immunostaining for lamin B, lamin A/C and prelamin A (PL-1C7) in wild-type C2C12 cells. Lamin A/C and prelamin A distribution around the nuclear periphery was analyzed as described in (A) and (B). Scale bar: 5 μ m. (E). Simulated measurements to show the utility of the ‘fluctuation index’ metric to assess differences in spatial localization of a target protein relative to a reference protein. The fluctuation index increases as the TEST localization pattern becomes increasingly punctate (Case 1, 2 and 3) relative to a reference pattern. (F). Lamin A/C /lamin B fluctuation index in immunostained C2C12 nucleus (n = 44). (G). Prelamin A/lamin B fluctuation index in immunostained C2C12 nucleus (n = 44).

lamin A/C or prelamin A by measuring the extent of their signal fluctuation relative to lamin B at the nuclear envelope in microscopy images (see Materials and Methods). For example, a protein (either lamin A or prelamin A) that has a spatial distribution around the nuclear envelope identical to a reference protein (such as lamin B; LMNB) will have a fluctuation index of 0 (Fig. 3E, Case 1). In contrast, when the relative

overlap is less, the fluctuation index will increase accordingly (Fig. 3E, Case 2, 3). Our analyses confirm that prelamin A staining exhibits higher fluctuation index values than lamin A/C staining in C2C12 cells, suggesting a more punctate distribution for prelamin A than its mature form (Fig. 3F-G). Together, these results support the idea that, upon synthesis and nuclear translocation, prelamin A is recruited to

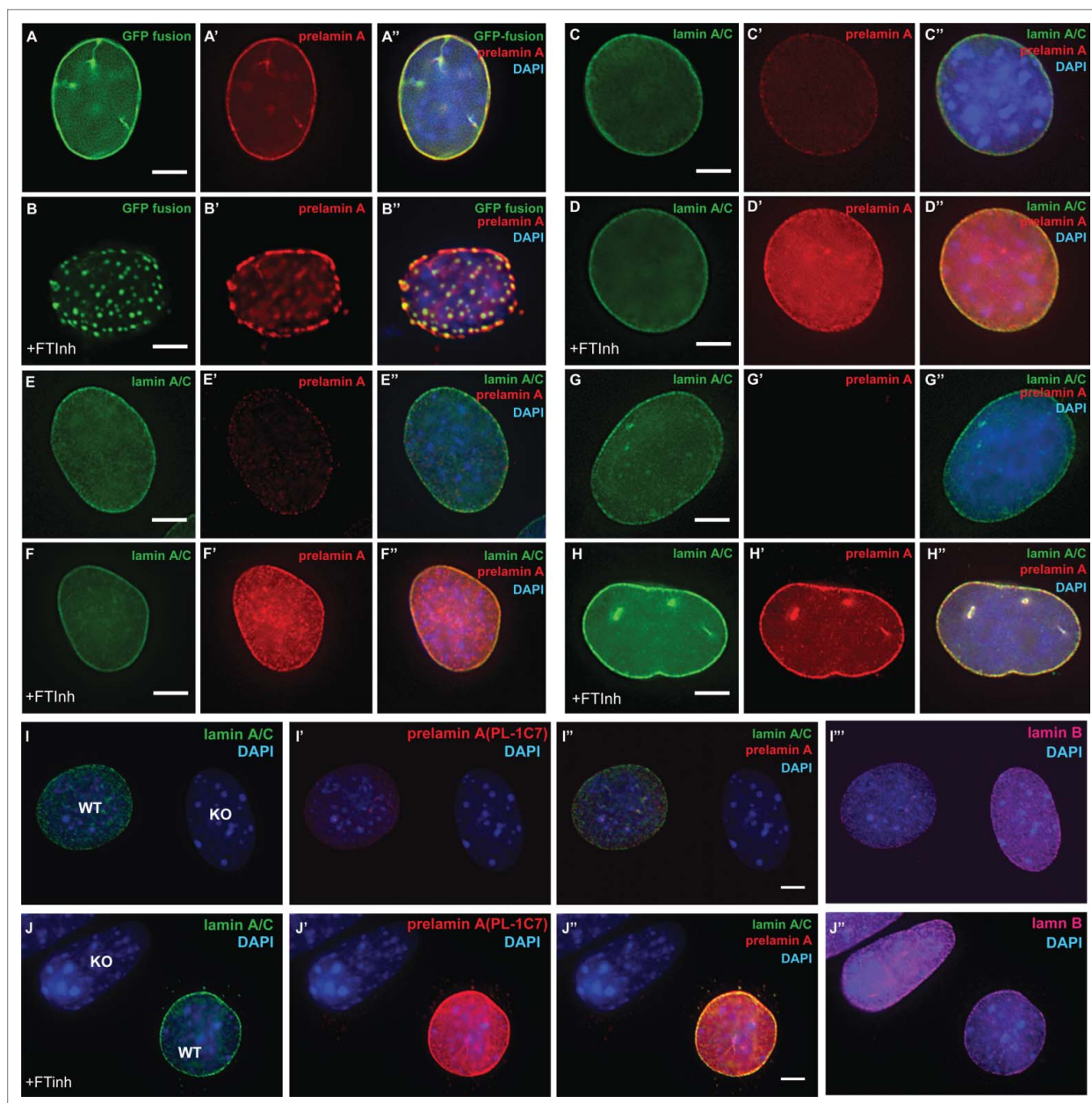


Figure 4. Farnesylation inhibition of endogenous prelamin A causes prelamin A accumulation but not large nucleoplasmic aggregates are not observed. (A) and (B). Dox-induced *GFP-Lmna* MEFs with and without FTInh (Lonafarnib) treatment were stained with PL-1C7 antibody. (C) and (D). Wild-type MEFs plus and minus FTInh treatment were stained with anti-lamin A/C (green) and anti-prelamin A PL-1C7 (red) antibodies. (E) and (F). Prelamin A and lamin A/C detection in C2C12 myoblasts with and without FTInh treatment stained as in D. (G) and (H). Rhabdomyosarcoma (A-204) cells processed as in E and F. (I) and (J). Co-cultured *Lmna*^{-/-} (KO) and wild type (WT) MEFs with or without FTInh treatment stained with PL-1C7, anti-lamin A/C and anti-lamin B antibodies. Anti-lamin A/C antibody was used to distinguish KO from WT cells. See also Fig. S3.

specific areas of the nuclear periphery to promote its processing and assembly into the nuclear lamina.

Farnesylation inhibition promotes endogenous prelamin A diffusion over the nucleoplasm but not large aggregates

Farnesyltransferase Inhibitors (FTInh) block prelamin A isoprenylation causing its accumulation in the

nucleoplasm and, based on analysis of GFP-fusion constructs, the formation of large clumps.^{31,33,54} To determine whether prelamin A is the major component in these clumps, we treated *GFP-Lmna* MEFs with Dox and Lonafarnib for 24 h. GFP-prelamin A staining with the PL-1C7 antibody confirmed that Lonafarnib causes the formation of large aggregates of GFP-prelamin A (Fig. 4A-B). To determine whether

this phenotype is observed with the endogenous prelamin A, wild type MEFs and myoblast C2C12 cells were treated with Lonafarnib for 24 h and co-stained with PL-1C7 antibody and lamin A/C specific antibodies. While FTinh caused a global increase in the amount of prelamin A as previously reported (Fig. 2C-F, S3A),^{26,33} our results revealed that the FTinh treatment result in a global diffusion of prelamin A throughout the nucleus but not the formation of large aggregates observed with the GFP-prelamin A fusion proteins (Fig. 4C-F).²⁶ These results are consistent with results from the Sinensky lab,^{35,36} but by using our anti-prelamin A specific antibody, we found that FTinh does not seem to collapse or rearrange the prelamin A or lamin A already localized at the periphery, as it is possible to detect its presence at the nuclear rim. To determine whether the observed FTinh-dependent prelamin A diffuse distribution is independent of a fixation protocol, we also performed an immunodetection of prelamin A in C2C12 cells fixed with methanol and observed no differences between the 2 staining protocols (Fig. S3B-E). Importantly, similar results were obtained upon FTinh treatment of several human cell lines from different transformed tissues including Rhabdomyosarcoma (A-204), bone osteosarcoma (U-2 OS), cervix adenocarcinoma (HeLa) and human foreskin fibroblasts (HFF) (Fig. 4G-H, S3A, F-K). Our findings suggest that inhibition of farnesylation causes a diffuse nucleoplasmic accumulation of endogenous prelamin A, but not its aggregation. The observed FTinh-dependent prelamin A aggregation in *GFP-Lmna* expressing MEFs may be a consequence of 2 factors: 1) the GFP tag enhances/promotes prelamin A aggregation^{26,31,33} and/or 2) the higher level expression of the transfected lamin A/prelamin A compared to the low level expression of the endogenous protein.

In addition, while we could detect prelamin A in MEF and C2C12 cells without FTinh treatment, low or no prelamin A detection was observed in the human cells tested (Fig. 4C-H, S3A-F). To make certain that the staining observed in mouse cells is specific for prelamin A, we co-cultured wildtype and *Lmna*^{-/-} MEF with and without FTinh. These cells were stained with an anti-Lamin A/C antibody to distinguish the 2 genetic backgrounds and co-stained with anti-prelamin A PL-1C7 antibody. Our results show that PL-1C7 detects prelamin A in wildtype cells but not in

knockout cells, and that FTinh treatment increases PL-1C7 signal only in wildtype cells (Fig. 4I-J). Additional experiments were performed in parallel with the anti-prelamin A antibody 7G11, but detection of prelamin A was observed only upon FTinh treatment as previously reported (Fig. S3L-M).⁴⁰ Interestingly, similar results were obtained by western blot, as we can detect low levels of prelamin A from total C2C12 extracts with the PL-1C7 but not with the rat monoclonal antibody 7G11 (Fig. S3L). These results suggest that the PL-1C7 antibody has higher sensitivity in detecting the transient low levels of prelamin A.

PL-1C7 antibody identifies different effects on prelamin A accumulation based on the type of mutation

Progeroid syndromes are complex genetic/metabolic disorders that can directly or indirectly affect lamins. For example, restrictive dermopathy, a more severe progeroid syndrome, is caused by a deficiency in ZMPSTE24, which impairs lamin A maturation resulting in an accumulation of a farnesylated and methylated prelamin A.^{18,55-57} To determine whether PL-1C7 can be used as a sensor of ZMPSTE24 activity, we co-stained *Zmpste24*^{-/-} MEFs with anti-prelamin A antibody PL-1C7 and anti-lamin A/C antibody. Western blotting revealed increased levels of prelamin A, and immunostaining experiments showed extensive prelamin A accumulation at the nuclear periphery in these fibroblasts (Fig. 5A-B, S4A). To confirm that PL-1C7 is an efficient tool to detect ZMPSTE24 activity, we treated C2C12 cells with the HIV protease inhibitor Indinavir, which blocks ZMPSTE24,^{58,59} and immunostained with PL-1C7. Consistent with our previous results, indinavir caused the accumulation of prelamin A in myoblast cells (Fig. 5C-D). These microscopy results along with PL-1C7 epitope characterization demonstrate that PL-1C7 can be used as a tool to study ZMPSTE24 activity and confirm that ZMPSTE24 is required for prelamin A processing.

The most studied progeria-associated mutations involve the removal of ZMPSTE24 recognition sites, causing the accumulation around the nuclear periphery of the constitutively farnesylated protein progerin. However, it is unknown whether *LMNA* missense point mutations found in atypical progeria syndromes or other laminopathies exhibit a similar prelamin A

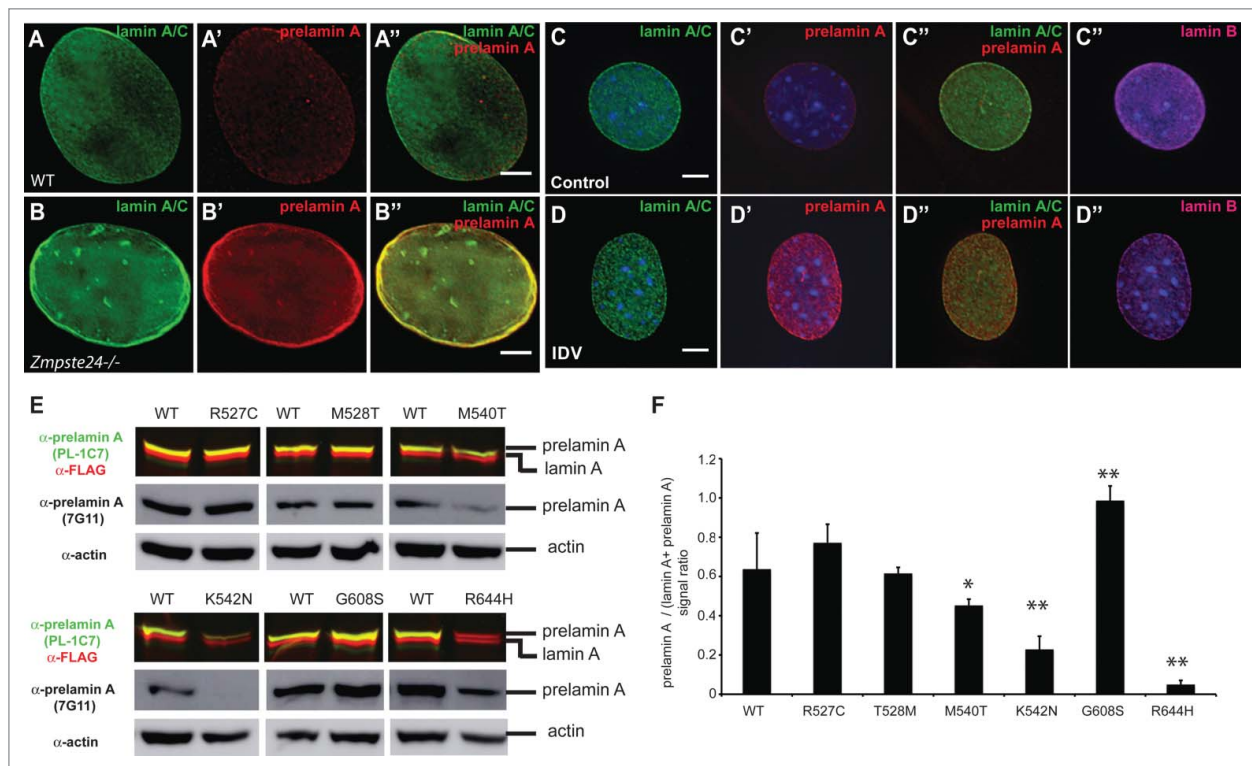


Figure 5. Lack of ZMPSTE24 expression or activity increases prelamin A levels, but laminopathy-associated missense lamin A mutations exert different effects on prelamin A accumulation. (A) and (B). *Zmpste24*^{-/-} and wild type MEFs were co-stained with anti-lamin A/C (green) and anti-prelamin A (Red) antibodies. Increased prelamin A levels can be observed in the absence of the sequence specific protease. (C) and (D). C2C12 cells were treated with the HIV protease inhibitor indinavir (IDV), which inhibits ZMPSTE24 activity. Cells were co-stained as described in A and including an anti-lamin B antibody as control. (E). Analysis of prelamin A accumulation in laminopathy-associated missense lamin A mutations. Dual infrared immunoblots of total proteins from cells transfected with 3XFLAG-tagged human *LMNA* constructs containing different laminopathy-associated mutations including: R527C, T528M, M540T, K542N, G608S and R644H. Blot shows the anti-prelamin A PL-1C7 antibody in green (800 nm channel) and a rabbit anti-FLAG antibody in red (700 nm channel). Membranes were re-blotted with anti-prelamin A 7G11 and β -actin antibodies (loading control) and evaluated by chemiluminescence. (F). Quantification of prelamin A levels in laminopathy-associated mutations. Ratio of prelamin A (800 nm channel)/ Total lamin A/prelamin A (700 nm channel) is shown. Values represent the mean \pm SD, * $p < 0.005$, ** $p < 0.001$. See also Fig. S4.

accumulation. Therefore, we generated plasmids containing 3XFLAG-tagged human *LMNA* cDNA with a subset of point mutations found in progeria and congenital muscular dystrophy (Table S1). In particular, we focused on the missense point mutations R527C, T528M, M540T, K542N, G608S and R644H localized in the tail region of the human lamin A (Fig. S3D, Table S1). These transgenes, under the control of low expressing promoters in MEFs (Fig. S4B-C),⁶⁰ were transiently expressed in *Lmna*^{-/-} MEFs and the prelamin A:lamin A ratio was assessed. Immunofluorescence analysis of the transiently expressed proteins showed that all lamin A variants localized at the nuclear envelope similarly to the wild type protein (Fig. S4D-I). Semi-quantitative immunoblotting revealed that the G608S mutation alone was capable of causing a consistent prelamin A accumulation (Fig. 5E-F). Interestingly, M540T and K542N mutants

instead exhibited reduced prelamin A levels compared to the mature version. These results suggest that the latter mutants could affect processing efficiency or protein turnover. Additionally, while R527C and T528M mutants do not show any alteration in prelamin A:lamin A ratio compared to wild type, the R644H substitution completely abolished PL-1C7 recognition of prelamin A. Prelamin A R644 is part of the PL-1C7 recognition sequence TRSYLL and thus is necessary for PL-1C7 binding. Thus, to determine whether R644H substitution affects prelamin A levels, we used the antibody 7G11 and found no alterations on the prelamin A accumulation in this mutant (Fig. 5E). These results suggest that prelamin A accumulation is not the only means by which mutations in the *LMNA* gene affect the biology of this structural protein. Given the differences in target epitopes and sensitivities, the combined side-by-side use of both

PL-1C7 and 7G11 antibodies appears to be optimal for studying prelamins A expression and processing.

Discussion

Lamin A is synthesized as a precursor, prelamins A, which has 98 unique C-terminal amino acids. The last 20 amino acids of lamin A undergo a series of post-translational modifications including isoprenylation followed by removal of the last 18 amino acids via the metalloproteinase ZMPSTE24.^{15,18,56} Here we have generated the PL-1C7 antibody and shown that it specifically recognizes the intact prelamins A sequence by targeting the ZMPSTE24-recognition sequence. The antibody allows prelamins A quantification via intracellular flow cytometry or immunoblotting, as well as immunostaining to determine its cellular localization. Using this novel antibody along with fluorescent microscopy, we observed that prelamins A accumulate in discrete, punctate regions around the nuclear periphery, while the mature lamin A is more homogeneously distributed. Importantly, PL-1C7 detects the diffuse nucleoplasmic accumulation of endogenous prelamins A induced by FTInh, but does not detect large clumps of prelamins A upon FTInh treatment, unless the cell line is expressing a GFP-prelamins A fusion. Finally, using a selected battery of laminopathy-associated lamin A mutants, *Zmpste24*^{-/-} null cells and ZMPSTE24 inhibitors, we found that PL-1C7 can distinguish among different mutant effects on the protein levels of prelamins A.

In the last several years, the study of the multistep processing of prenylated proteins has revealed how cells fine-tune protein localization, accumulation and maturation in normal cells and how these processes are disrupted in mutant cells, including laminopathies.^{15,19,25,27,30,31,61,62} However, the study of basic aspects of lamin biology has been limited to a degree by the availability of specific tools. As monoclonal antibodies are generally the desired immunochemical standard for cell biology, we produced a monoclonal antibody that recognizes prelamins A specifically at the sequence cleaved by ZMPSTE24 to produce the mature lamin A. Previously, rabbit polyclonal serum against prelamins A had been generated using the peptide LLGNSSPRTQSPQN, which is located downstream of ZMPSTE24 cleavage sequence. In addition to the potential variability usually generated by different animals, this polyclonal antibody cannot

distinguish between the prelamins A and the farnesylated peptide generated by ZMPSTE24 upon lamin A cleavage.¹⁷ In a similar approach to generate a polyclonal serum against prelamins A and its farnesylated form, the synthetic peptides LLGNSSPRTQSPQNCSIM and LLGNSSPRTQSPQNC-Farnesyl were used as antigens; however, again, these polyclonal antibodies failed to distinguish prelamins A from the peptide generated by ZMPSTE24 in immunofluorescence experiments.⁶³ Additionally, rat monoclonal antibody 7G11 was produced against the same region from the mouse prelamins A sequence (LLGNSSPRSQSSQNCSIM) and was shown to detect both mouse and human prelamins A, but not mature lamin A, when prelamins A accumulation was triggered via chemical or genetic approaches.^{40,41} However, we show here that this antibody also binds to the carboxy fragment generated by ZMPSTE24 cleavage. Unlike these antibodies, the PL-1C7 monoclonal antibody described here binds preferentially to the unmodified and conserved ZMPSTE24 cleavage TRSYLL sequence, but not to either of the products generated by ZMPSTE24 cleavage of prelamins A. Biochemical and microscopy approaches reveal that PL-1C7 antibody has a higher sensitivity than the 7G11 antibody in detecting low levels of prelamins A in murine cells, in particular. This difference in sensitivity could potentially be due to differing affinities, the monoclonal origin (rat vs mouse) or a specific physical constraint caused by the close proximity of the 7G11 epitope to the farnesylation site. Importantly, PL-1C7 also provides an unlimited supply with which to study not only prelamins A biology, but also ZMPSTE24 activity and function, which is difficult to evaluate with current immunological tools. Nonetheless, the 7G11 antibody may still be the tool of choice in cases where the ZMPSTE24 cleavage site is removed or mutated. Therefore, as different mutations could impact epitope recognition by these antibodies, the use of these antibodies in parallel seems optimal in studying prelamins A biology.

Lamin A plays key roles in nuclear homeostasis, thus its expression and assembly must be coordinated during cellular division and differentiation. Recently, a more complex and dynamic picture of lamin A biology has emerged, suggesting that lamins are key players in coordinating diverse nuclear functions in response to extracellular cues via the cytoskeleton.^{53,64} It has been reported that *D. melanogaster* lamin Dm0

can interact with the actin nucleator factor WASH suggesting a physical link between the machinery that regulates the cytoskeleton and the nuclear lamina.⁶⁵ Additionally, lamin A levels are higher in tissues that possess physical elasticity (i.e. muscle), where the extracellular environment determines tissue stiffness, lamin A levels affect the physical properties of the nuclear envelope in order to compensate for the stress projected onto the nucleus.⁵³ Therefore, coordinated lamin A assembly and disassembly must occur in those tissues upon extension and contraction. Our results suggest that prelamin A is localized in discrete areas of the nuclear envelope both in mouse myoblasts and fibroblasts, and its detection was possible due to the high sensitivity of the PL-1C7 antibody. Future work will determine whether these prelamin A foci respond to the polarization of the cells, ZMPSTE24 localization, nuclear pore distribution, random lamin A turnover and/or physical stress. Genome-related functions of lamins are being evaluated in this context, as it was recently suggested that chromatin tethering to the nuclear periphery is required to impart stiffness to nuclei and for attenuating the flow of chromatin inside the nucleus.⁶⁴ Consistent with this, lack of lamin A increases chromatin dynamics within the nucleus, suggesting that lamin A is essential for the maintenance of genome organization and chromatin dynamics.⁶⁶ Thus, as lamin A-enriched domains must maintain specific interactions with chromatin, lamin A turnover must be tightly regulated. Moreover, these results suggest that prelamin A processing and maturation must also be coordinated, given the dynamic changes in chromatin organization upon physical stress. Therefore, we believe PL-1C7 will be an important tool in investigating how prelamin A targeting and processing are coordinated in tissues with different stiffness, as well as in studies of the influence of specific *LMNA* mutations on these cellular processes.

The antibody described here is also a particularly useful tool for the study of prelamin A in progeroid laminopathies, metabolic laminopathies and lipodystrophies.^{33,54,57,58,67} Several reports support the involvement of farnesylated prelamin A in these disorders.⁶⁸ For example, restrictive dermopathy, a more severe progeroid syndrome, is caused by a deficiency in ZMPSTE24 that results in a dramatic accumulation of prelamin A at the nuclear rim.^{57,69,70} Our results support this, as PL-1C7 antibody showed that cells lacking ZMPSTE24 expression and activity exhibit a

more dramatic accumulation of prelamin A at the nuclear envelope. Thus, PL-1C7 antibody can potentially be used as a sensor for ZMPSTE24 expression or activity in order to characterize mutations or alterations in the prelamin A processing pathway. An exception would be the HGPS mutation, G608G, which results in a 50 amino acid deletion removing the ZMPSTE24 cleavage site, and producing a mutant protein (progerin) that remains farnesylated. The study of this mutant led to the suggestion that abnormal processing and accumulation of prelamin A interferes with normal lamin A functions, resulting in nuclear abnormalities.²⁵ Several missense mutations in the *LMNA* gene have also been associated with atypical progeria syndromes, metabolic laminopathies and lipodystrophies, but it has been unclear whether their associated phenotypes are due to prelamin A accumulation. Here, using the PL-1C7 antibody, we provided evidence that, when the missense mutation G608S is expressed in the context of the full-length protein, prelamin A accumulation increases in comparison to the other tested lamin A variants. Interestingly, the G608S mutation, in addition to an amino acid substitution, also introduces a cryptic splicing site in exon 11 of the *LMNA* gene causing the removal of 50 amino acids, including the ZMPSTE24 site. However, the variation in the penetrance of these cryptic splice sites within the exon 11 of the lamin A gene causes the mixed production of the lamin A G608S and progerin in the same cells. While progerin accumulation has been shown to be toxic, it has been unclear whether the G608S mutation alone affects prelamin A accumulation. Our results show that indeed, a transgene expressing the lamin A G608S variant in a *Lmna*^{-/-} background also causes the accumulation of the mutant prelamin A. Therefore, specific alterations to the primary sequence of prelamin A in domains distal to the carboxyl end can potentially affect prelamin A processing, leading to accumulation of the precursor. However, the consequences of the accumulation of both prelamin A G608S and progerin in the same cells remain undetermined.

In contrast, no prelamin A accumulation was observed in mouse fibroblasts expressing a subset of human lamin A mutants associated with APS (R527C, T528M, M540T and K542N) and congenital muscular dystrophy (R644H). In fact, while no effects were observed with the mutants R527C and T528M, our

data shows that mutants M540T and K542N exhibit a more efficient processing from prelamin A to lamin A. In this context, the identification of progeria-like disease phenotypes in patients with missense point mutations far away from the prelamin A farnesylation site is intriguing and suggests that the primary structure of lamin A itself, and not its farnesyl lipid anchor, is key to the pathogenesis of HGPS. Consistent with this, progeria phenotypes are observed in mice expressing a non-farnesylated progerin, suggesting that the presence of this protein and not the farnesylation anchor alter the physiology of the cells.⁷¹ These results thus contrast with studies where prelamin A accumulation has been suggested as the cause of the toxicity in some of these laminopathies.^{63,72} For example, increased levels of prelamin A were reported in the human mutant lamin A R482W, which is associated with Type 2 familial partial lipodystrophy, but the antibody used for the cytological characterization was a commercial polyclonal antibody generated against the lamin A carboxyl terminus, which recognizes both immature and mature lamin A.^{63,72} Therefore, the use of prelamin A specific tools will allow a better understanding these missense point mutations and their role in diverse laminopathies.

In summary, as our prelamin A-specific PL-1C7 antibody relies on the integrity of the ZMPSTE24 cleavage site, it can be used to specifically analyze prelamin A accumulation via qualitative (i.e., microscopy) or quantitative (i.e. intracellular flow cytometry) approaches. Thus, this antibody will be a particularly useful tool in investigating basic lamin A biology, as well as the role of the prelamin A in various disease states.^{63,73,74} Moreover, given the differences in target epitopes and sensitivities, the parallel use of both PL-1C7 and 7G11 antibodies provides a useful tool kit for studying prelamin A expression and processing.

Materials and methods

Cell lines

Both mouse (C2C12 mouse myoblasts, *Zmpste24*^{-/-} and *Lmna*^{-/-} null mouse embryonic fibroblasts) and human (rhabdomyosarcoma (A-204), osteosarcoma (U-2 OS), foreskin fibroblast (HFF) and cervix adenocarcinoma (HeLa)) cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Thermo fisher scientific, Cat No. 12491-015)

containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Thermo fisher scientific, Cat No. 10437-077) and L-Glutamine at 37°C and 5% CO₂.

Development of GFP-Lmna inducible cell lines

To generate the *GFP-Lmna* fusion, the cDNA coding for the 665 amino acids of the full-length murine prelamin A (including the ZMPSTE24 cleavage and CAAX motif) was cloned into the pEGFP-C1 vector (Clontech) using the *XhoI* and *BamHI* sites. The *GFP-Lmna* fusion cDNA was then transferred to an inducible-expression system based on the transposition system Tol2/TRE plasmid and Tol2 transposase.⁷⁵ This vector was modified from its original version by introducing a Tet-On system, which is optimized for mammalian codon usage and supplemented with a TRE-Tight system allowing gene expression induction using Doxycycline (Amin and Groudine, in preparation). The plasmid containing the inducible *GFP-Lmna* transposon was co-transfected with a plasmid encoding Tol2 transposase at a 1:5 (Transposase:Transposon) ratio into *Lmna*^{-/-} MEFs or C2C12 cells with Fugene HD according to the manufacturer protocol (Promega, Cat. No. E2311). The cells were selected with puromycin (2 µg/ml; Invitrogen, Cat. no. A1113802) for 2 weeks and maintained in media supplemented with 1 µg/ml of puromycin. Doxycycline (Sigma, Cat. no. D9871) was titrated and used at the lowest effective concentration (0.1 µg/ml) to achieve consistent *GFP-Lmna* fusion expression (as detected by immunofluorescence microscopy) after incubation for 24 h at 37°C.

PL-1C7 monoclonal antibody development

Murine PL-1C7 monoclonal antibody was generated at the Fred Hutchinson Antibody Technology Core Facility. Briefly, BALB/c, CD1, and Swiss Webster mice were immunized with the TRSYLLGNSSPR peptide (CHIScientific) maleimide coupled to KLH carrier protein. Following a 12-week boosting protocol, splenocytes were isolated from high titer mice, electrofused to FoxNY myelomas (BTX, Harvard Apparatus), and hybridomas secreting peptide specific antibody were identified and isolated using a ClonePixII colony picker. Antibodies from the picked clones were validated by flow cytometry using a peptide coupled cytometric bead array. The validated clone was put through 2 rounds of subcloning using

the ClonePixII followed by another round of cytometric bead binding validation. The antibody PL-1C7 was further characterized and epitope-mapped to the TRSYLLGNSSPR peptide using standard enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assays.

Peptides and ELISA

The following synthetic peptides (purchased from Thermo Scientific) were used for ELISA immunoassays: pLA_WT: TRSYLLGNSSPR; pLA_1: AAAAYLLGNSSPR; pLA_2: TRSAAAGNSSPR; pLA_3: TRSYLLAAASPR; pLA_4: TRSYLLGNSAAA; pLA_Mat: GSFGDNLVTRSY; pLA_Frag: LLGNSSPRTQS. Peptides were incubated on 96-well EIA plates at 4°C for 16h. Unbound peptide was washed off with PBS and plates were blocked. ELISA was performed using an anti-mouse IgG HRP ELISA kit (KPL, Cat. no. 54-62-18) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was read at 405 nm in an Envision ELISA reader (PerkinElmer).

Intracellular flow cytometry

1×10^6 cells were plated in 10-cm dishes and grown 12 h before Dox-induction. After 24 h of Dox-induction the cells were rinsed with PBS, detached with trypsin (Thermo fisher scientific, Cat no. R-001-100) and then spun at 400 g for 5 min. Cells were fixed in 3% formaldehyde, 2% sucrose in PBS at room temperature for 10 min. Fixed cells were washed with PBS 3 times and permeabilized with 0.2% Triton/PBS. Cells were again washed 3 times with PBS for 5 min each, and then resuspended in blocking buffer (2% BSA, 4% FBS in PBS) for 3 h at 4°C. These cells were incubated with the primary antibodies in blocking buffer for 12 h at 4°C. Cells were washed 3 times with 0.2% Tween in PBS and incubated with secondary antibodies for 30 min at 4°C. Cells were again washed 3 times with PBS, resuspended in blocking buffer and analyzed by flow cytometry using a BD Canto cytometer (BD Biosciences). 1×10^4 events were analyzed for each population of interest. Primary antibodies included: monoclonal anti-prelamin A clone PL-1C7 (antibody concentration: 1:5 dilution for supernatant or 1 μ g/sample for purified antibody; FHCRC); goat polyclonal Lamin B antibody (1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnologies, sc-6217); rabbit Lamin A/C antibody (1:10 dilution; Abcam, ab133256). Secondary antibodies included: donkey

anti-mouse IgG Alexa Fluor-488 (1:500 dilution; Invitrogen Life Technologies, Cat no. A21202), donkey anti-rabbit IgG Alexa fluor-594 (1:500 dilution; Invitrogen Life Technologies, Cat no. A21203), or donkey anti-goat IgG Alexa fluor-647 (1:500 dilution, Cat. no. A31571).

Inhibitor treatment

Farnesyl transferase inhibitor Lonafarnib was used at 3.2 μ M. The inhibitor was added to cells 4 h after Dox induction. Cells were prepared for microscopy analysis as described below. For inhibition of ZMPSTE24 activity, C2C12 myoblasts were cultured on gelatinized slides and treated with the HIV protease inhibitor Indinavir for 24 h (IDV, diluted in H₂O, 20 μ M) kindly provided by the McElrath Lab (Fred Hutchinson Cancer Research Center). Cells were washed, fixed with paraformaldehyde and processed as described above.

Western blot

Nuclear protein fractions were purified as described.⁷⁶ Briefly, pelleted cells were resuspended in NP-40/sucrose buffer (0.32 M Sucrose, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA and 1.5% NP-40, protease inhibitors) and allowed to lyse on ice for 5 min. Nuclei were pelleted at 1500 g and washed once with the sucrose buffer without NP-40 and pelleted. For protein extraction, nuclei were resuspended in Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) buffer and sonicated with 5 pulses for 5 sec each (40% power, Fisher scientific sonic dismembrator, Model 505). Sonicated lysate was incubated on ice for 10 min and protein concentrations were measured using a BCA assay kit (Pierce, Cat. No. 23238). 50 μ g of protein were resuspended in SDS loading buffer (Novex life technologies, Cat. no. N00007) and resolved on a 4–20% acrylamide gel (BIORAD, Cat. no. 456–1094) at 100 Volts for 1 h. The proteins were transferred to a PVDF membrane (Life technologies, Cat no. 88518) in 20% Methanol TRIS-Glycine-SDS buffer at 100 Volts for 2 h. After transfer, the membranes were blocked in LI-COR blocking buffer (LI-COR Odyssey, Cat. no. 927–40000) or BSA blocking solution (5% BSA, 0.1 % Tween 20 in TBS) overnight at 4°C and then blotted with the primary antibodies for 2 h at RT. The membranes were washed 3 times with TBST (0.1 % Tween 20, Tris-buffered saline -TBS-) and

incubated with the secondary antibodies in blocking buffer for 1 h at RT. Membranes were then washed and the signal was detected by chemiluminescence or by using a LI-COR Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences). For immunoblotting of transiently transfected cells, total extracts were prepared by resuspending the cells in RIPA buffer with protease inhibitors. Extracts were incubated on ice for 10 min and sonicated with 30 sec pulses 5 times. 50 mg of total protein were resolved in 4–12% acrylamide gel (Invitrogen Life technology, Cat no. NP0321BOX), transferred to a nitrocellulose membrane and blocked overnight with Odyssey blocking buffer-TBS. Antibody incubation was performed as described before. An infrared imaging system was used to quantify prelamin A levels as the ratios: prelamin A/(lamin A + prelamin A). Transfection normalization was performed by adjusting the signals to the highest value in each channel. Three normalized ratios of 2 biological replicates were averaged and p values were obtained with a 2-tailed Student's t-Test (heteroscedastic). Membranes were stripped and re-blotted with anti-prelamin A 7G11 and anti- β -actin antibodies and analyzed by chemiluminescence. Primary antibodies used: rabbit IgG anti-GFP (1:1000 dilution; Invitrogen Life technologies); goat polyclonal anti-PARP (1:1000 dilution; Santa Cruz, sc-9935), monoclonal anti-prelamin A PL-1C7 (1 μ g/ml -purified antibody-; FHCRC), rat monoclonal anti-prelamin A 7G11 (1 μ g/ml; Millipore; Cat no. MABT345), mouse anti- β -actin (1:1000; Cell Signaling technology; cat no. 3700S), rabbit anti-lamin A/C (1:200 dilution; Abcam, ab108595), rabbit anti-FLAG antibody (1:1000; Thermo Fisher Scientific PA1-984B). Secondary antibodies used: donkey anti-rabbit IRDYE 680CW and anti-mouse IRDYE 800CW (1:15000 dilution; LI-COR Biosciences, Cat. No. 926–68073 and 926–32212) antibodies, or HRP-conjugated anti rabbit, goat and mouse (1:15000 dilution, Jackson ImmunoResearch, 711-036-1552, 705-036-147, 715-036-150).

Immunostaining

Cultured C2C12 myoblasts or MEF cells were cultured in chambered slides (Nunc Lab-Tek, Cat. No. 177399). The slides were washed with PBS and the cells fixed in 4% paraformaldehyde/PBS at RT for 10 min. GFP-*Lmna* MEFs were fixed after 24 h of Dox induction (0.1 μ M). After fixation the cells were washed with

PBS 3 times, followed by permeabilization with 0.2% Triton/PBS for 10 min, then washed again 3 times with PBS and then blocked with PAT buffer (1% BSA, 0.1% Tween 20 in PBS) for 30 min. The slides were incubated with the primary antibody for 2 h at RT, washed again and then incubated with secondary antibodies in PAT buffer at RT for 1 h. The primary antibodies used include: mouse monoclonal anti-prelamin A PL-1C7 antibody (1:100 dilution for supernatant or 1 μ g/ml for purified antibody; FHCRC); rat monoclonal anti-prelamin A 7G11 (1 μ g/ml; Millipore), goat polyclonal anti-Lamin B antibody (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnologies, sc-6217); rabbit anti-lamin A/C antibody (1:200 dilution; Abcam, ab108595). The secondary antibodies include: donkey anti-mouse IgG Alexa Fluor-488 (1:200 dilution; Invitrogen Life Technologies, Cat no. A21202), donkey anti-rabbit IgG Alexa fluor-594 (1:200 dilution; Invitrogen Life Technologies, Cat no. A21207), donkey anti-mouse IgG Alexa fluor-594 (1:200 dilution; Invitrogen Life Technologies, Cat no. A21203), donkey anti-rat IgG Alexa fluor 595 (1:200 dilution; Invitrogen Life Technologies, Cat no A21209) or donkey anti-goat IgG Alexa fluor-647 (1:200 dilution, Cat. no. A31571.) The slides were mounted in Slow Fade Gold with DAPI (Invitrogen Life technologies, Cat No. S36940).

For methanol fixation, C2C12 wild type myoblasts were grown, fixed and permeabilized as described.⁷⁷ Briefly, 50,000 cells were grown on chambered slides as above, the slides were washed with PBS and incubated in cold methanol for 10 min at -20°C . Cells were then washed with PBS 3 times before blocking with PAT buffer (1% BSA, 0.1% Tween 20 in PBS) for 30 min and subsequently incubated with the primary and secondary antibody as described above.

To validate endogenous prelamin A detection with PL-1C7 antibody in MEF, *Lmna*^{-/-} null and wild type MEFs were trypsinized, counted and equal numbers of each genotype were mixed together and co-culture on gelatinized slides. The slides were fixed and immunostained against prelamin A, lamin A and lamin B as described above.

To analyze lamin A mutants, 3XFLAG-tagged wild-type human *LMNA* cDNA containing the ZMPSTE24 cleavage and CAAX motif was obtained from GeneCopoeia (ORF expression vector, EX-Z3407-M12). Six previously reported lamin A mutants (Table S1) were generated by replacing the carboxyl terminus with

synthesized mutation-containing fragments using the Gibson assembly cloning kit (NEB, Cat. #E5510S). The plasmids were independently transfected in *Lmna*^{-/-} MEFs (1×10^5 cells/transfection) using a Lipofectamine 3000 kit according to the manufacturer's protocol (ThermoFisher Scientific, Cat. No. L3000008). For western blotting, 10 μ g of plasmid were transfected in 5×10^6 *Lmna*^{-/-} null MEFs growing in 10-cm petri dish. The cells were detached with trypsin 48 h post-transfection and harvested to prepare total protein extracts for protein gel blot or transferred to chambered slides and prepared for immunodetection.

Microscopy and image analysis

Image acquisition was performed on a DeltaVision Elite image restoration system (Applied Precision Inc.). Using a 60X objective, 38–60 optical sections were obtained using a step size of 0.2 μ m in the z-axis. 1 μ m projections were generated by averaging the signal of each channel. Images were deconvolved using SoftWoRx (Applied Precision Inc.) and processed with ImageJ (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2014). To generate publication quality pictures only contrast and brightness were adjusted. The quantification of signal continuity across the nuclear envelope for prelamin A and lamin A/C was performed using fluorescence intensity linescan profiles and a newly written 'relative Fluctuation index' algorithm. Fluorescence intensity linescan plots across a line drawn over a segment of the nuclear envelope of representative cells were created for prelamin A and lamin A/C signal channels using the ImageJ tool, Plot Profile (Image J, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). To compute the 'fluctuation index', the deconvolved 3D images were exported as 16 bit tiff stacks. From each 3D image stack, a 2D maximum intensity projection (MIP) images for the DAPI and lamin-stained channels was derived. Nuclei boundaries and their corresponding lamin-labeled contours were derived from the respective 2D images using a 2-step procedure. First, an initial boundary was estimated using the Otsu intensity-based thresholding method.⁷⁸ The boundary contour for each nucleus was subsequently refined using the gradient vector field (GVF) based parametric active contour segmentation method.⁷⁹ Parameters for the active

contour were empirically estimated from the image data, and 75 iterations were performed to obtain the final nucleus boundary. The 'fluctuation index' for each nucleus was then computed from the 2 channels (channel 1: reference Lamin B and channel 2: experimental, either lamin A/C or prelamin A) of the MIP image as follows: 1) The first derivative of the pixel intensities along the nuclear envelope contour in both channels was computed and normalized. 2) The ratio between the corresponding derivative values in both channels (Ichannel1/Ichannel2, Ichannel2/Ichannel1) was computed at every pixel along the Lamin contour and normalized again for a final value range of 0 to 1. Potential errors such as 'divide by zero' were corrected at this stage. 3) The fraction of pixels with ratios above 0.15 were computed for both cases, expressed as a percentage, and added.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank to the Fong (UCLA), Taniguchi (FHCRC) and Tapscott (FHCRC) lab for cell lines and reagents. We also thank Stephen Young (UCLA) and members of the Groudine lab for discussion. Specially, Joan Ritland for her critical feedback on the preparation of this manuscript. We also thank Benjamin Hoffstrom and Norman Boiani for helping to develop the PL-1C7 antibody as well as the scientific image facility at the FHCRC for the help provided.

Funding

This work was supported by NIH grants R01 HL65440 and R37 DK44746 (to MG). This work was also supported by the DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN209403, IN203811 and IN201114), and CONACyT (42653-Q, 128464 and 220503) to AC and FR-T. Ph.D. fellowship from CONACyT (CVU254079) and Dirección General de Estudios de Posgrado-Universidad Nacional Autónoma de México to AC, and the Fred Hutchinson Interdisciplinary Dual Mentor Fellowship to VN.

References

- [1] Dwyer N, Blobel G. A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J Cell Biol* 1976; 70:581-91; PMID:986398; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.70.3.581>
- [2] Schreiber KH, Kennedy BK. When lamins go bad: nuclear structure and disease. *Cell* 2013; 152:1365-75; PMID: 23498943; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.015>

- [3] Gruenbaum Y, Foisner R. Lamins: nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annu Rev Biochem* 2015; 84:131-64; PMID:25747401; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034115>
- [4] Burke B, Stewart CL. Functional architecture of the cell's nucleus in development, aging, and disease. *Curr Top Dev Biol* 2014; 109:1-52; PMID:24947235; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397920-9.00006-8>
- [5] Davidson PM, Lammerding J. Broken nuclei – lamins, nuclear mechanics, and disease. *Trends Cell Biol* 2014; 24:247-56; PMID:24309562; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2013.11.004>
- [6] Lin F, Worman HJ. Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics* 1995; 27:230-6; PMID:7557986; <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1995.1036>
- [7] Biamonti G, Giacca M, Perini G, Contreas G, Zentilin L, Weighardt F, Guerra M, Valle Della G, Saccone S, Riva S. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol* 1992; 12:3499-506; PMID:1630457; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.12.8.3499>
- [8] Weber K, Plessmann U, Traub P. Protein chemical analysis of purified murine lamin B identifies two distinct polypeptides B1 and B2. *FEBS Lett* 1990; 261:361-4; PMID:2311764; [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80592-7](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)80592-7)
- [9] Holtz D, Tanaka RA, Hartwig J, McKeon F. The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* 1989; 59:969-77; PMID:2557160; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90753-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(89)90753-8)
- [10] Kitten GT, Nigg EA. The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *J Cell Biol* 1991; 113:13-23; PMID:2007618; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.113.1.13>
- [11] Strelkov SV, Schumacher J, Burkhard P, Aebi U, Herrmann H. Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear Lamins. *J Mol Biol* 2004; 343:1067-80; PMID:15476822; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.093>
- [12] Wei MG, Tong XJ, Bin Chen, Zhang B, Liu ZF, Ding MX, Zhai ZH. Assembly of lamins in vitro. *Cell Res* 1996; 6:11-22; <http://dx.doi.org/10.1038/cr.1996.2>
- [13] Weber K, Plessmann U, Traub P. Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett* 1989; 257:411-4; PMID:2583287; [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81584-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(89)81584-4)
- [14] Beck LA, Hosick TJ, Sinensky M. Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *J Cell Bio* 1990; 119:1489-99. PMID: 2335559.
- [15] Kilic F, Dalton MB, Burrell SK, Mayer JP, Patterson SD, Sinensky M. In vitro assay and characterization of the farnesylation-dependent prelamin A endoprotease. *J Biol Chem* 1997; 272:5298-304; PMID:9030603; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.8.5298>
- [16] Hennekes H, Nigg EA. The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. A single point mutation prevents proteolytic cleavage of the lamin A precursor and confers membrane binding properties. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 4):1019-29; PMID:8056827
- [17] Sinensky M, Fantle K, Dalton M. An antibody which specifically recognizes prelamin A but not mature lamin A: application to detection of blocks in farnesylation-dependent protein processing. *Cancer Res* 1994; 54:3229-32; PMID:8205544
- [18] Pendás AM, Zhou Z, Cadiñanos J, Freije JMP, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodríguez F, Tryggvason K, et al. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* 2002; 31:94-9
- [19] Sinensky M, Fantle K, Trujillo M, McLain T, Kupfer A, Dalton M. The processing pathway of prelamin A. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 1):61-7; PMID:8175923
- [20] Fong LG, Ng JK, Lammerding J, Vickers TA, Meta M, Coté N, Gavino B, Qiao X, Chang SY, Young SR, et al. Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *J Clin Invest* 2006; 116:743-52; PMID:16511604; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI27125>
- [21] Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Bécane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1999; 21:285-8; PMID:10080180; <http://dx.doi.org/10.1038/6799>
- [22] Muchir A. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 2000; 9:1453-9; PMID:10814726; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/9.9.1453>
- [23] Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, Schmidt H, Brabant G, Kumar S, Durrington PN, et al. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* 2000; 24:153-6; PMID:10655060; <http://dx.doi.org/10.1038/72807>
- [24] Novelli G, Muchir A, Sangiuolo F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, Capon F, Sbraccia P, Federici M, Lauro R, et al. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet* 2002; 71:426-31; PMID:12075506; <http://dx.doi.org/10.1086/341908>
- [25] Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003; 423:293-8; PMID:12714972; <http://dx.doi.org/10.1038/nature01629>

- [26] Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, Gordon LB, Der CJ, Cox AD, Collins FS. Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:12879-84; PMID:16129833; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506001102>
- [27] Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, et al. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:8963-8; PMID:15184648; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0402943101>
- [28] Barthelemy F, Navarro C, Fayek R, Da Silva N, Roll P, Sigaudy S, Oshima J, le Bonne GE, Papadopoulou-Legbelou K, Evangelioi AE, et al. Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: a transcriptional study. *Euro J Hum Genet* 2015; 23(8):1051-61; PMID:25649378; <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2014.239>
- [29] Dechat T, Shimi T, Adam SA, Rusinol AE, Andres DA, Spielmann HP, Sinensky MS, Goldman RD. Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:4955-60; PMID:17360326; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0700854104>
- [30] Young SG, Meta M, Yang SH, Fong LG. Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J Biol Chem* 2006; 281:39741-5; PMID:17090536; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R600033200>
- [31] Cao K, Capell BC, Erdos MR, Djabali K, Collins FS. A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson-Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:4949-54; PMID:17360355; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0611640104>
- [32] Fong LG, Frost D, Meta M, Qiao X, Yang SH, Coffinier C, Young SG. A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science* 2006; 311:1621-3; PMID:16484451; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1124875>
- [33] Glynn MW. Incomplete processing of mutant lamin A in Hutchinson-Gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition. *Hum Mol Genet* 2005; 14:2959-69; PMID:16126733; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi326>
- [34] Verstraeten VLRM, Verstraeten VLRM, Peckham LA, Peckham LA, Olive M, Olive M, Capell BC, Capell BC, Collins FS, Collins FS, et al. Protein farnesylation inhibitors cause donut-shaped cell nuclei attributable to a centrosome separation defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:4997-5002; PMID:21383178; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1019532108>
- [35] Lutz RJ, Trujillo MA, Denham KS, Wenger L, Sinensky M. Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3000-4; PMID:1557405; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.7.3000>
- [36] Dalton MB, Fantle KS, Bechtold HA, DeMaio L, Evans RM, Krystosek A, Sinensky M. The farnesyl protein transferase inhibitor BZA-5B blocks farnesylation of nuclear lamins and p21ras but does not affect their function or localization. *Cancer Res* 1995; 55:3295-304; PMID:7614464
- [37] Kieran MW, Gordon L, Kleinman M. New approaches to progeria. *Pediatrics* 2007; 120:834-41; PMID:17908771; <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2007-1356>
- [38] Gordon LB, Massaro J, D'Agostino RB, Campbell SE, Brazier J, Brown WT, Kleinman ME, Kieran MW, Progeria clinical trials collaborative. Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Circulation* 2014; 130:27-34; PMID:24795390; <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008285>
- [39] Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberger DS, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M, Smoot LB, Gordon CM, Cleveland R, Snyder BD, et al. Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:16666-71; PMID:23012407; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1202529109>
- [40] Lee R, Chang SY, Trinh H, Tu Y, White AC, Davies BSJ, Bergo MO, Fong LG, Lowry WE, Young SG. Genetic studies on the functional relevance of the protein prenyltransferases in skin keratinocytes. *Hum Mol Genet* 2010; 19:1603-17; PMID:20106865; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq036>
- [41] Davies BSJ, Barnes RH, Tu Y, Ren S, Andres DA, Spielmann HP, Lammerding J, Wang Y, Young SG, Fong LG. An accumulation of non-farnesylated prelamin A causes cardiomyopathy but not progeria. *Hum Mol Genet* 2010; 19:2682-94; PMID:20421363; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq158>
- [42] Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suárez MF, Cau P, Cadiñanos J, Osorio FG, Foray N, Cobo J, et al. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nature Medicine* 2008; 14:767-72; PMID:18587406; <http://dx.doi.org/10.1038/nm1786>
- [43] Garg A, Subramanyam L, Agarwal AK, Simha V, Levine B, D'Apice MR, Novelli G, Crow Y. Atypical progeroid syndrome due to heterozygous missense LMNA mutations. *J Clin Endocrinol & Metab* 2009; 94:4971-83; PMID:19875478; <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2009-0472>
- [44] Chen L, Lee L, Kudlow BA, Santos Dos HG, Sletvold O, Shafeghati Y, Botha EG, Garg A, Hanson NB, Martin GM, et al. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* 2003; 362:440-5; PMID:12927431; [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14069-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14069-X)
- [45] Doh YJ, Kim HK, Jung ED, Choi SH, Kim JG, Kim BW, Lee IK. Novel LMNA gene mutation in a patient with Atypical Werner's Syndrome. *Korean J Intern Med* 2009; 24:68-72; PMID:19270485; <http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2009.24.1.68>

- [46] Moulson CL, Fong LG, Gardner JM, Farber EA, Go G, Passariello A, Grange DK, Young SG, Miner JH. Increased progerin expression associated with unusual LMNA mutations causes severe progeroid syndromes. *Human Mutation* 2007; 28:882-9; PMID:17469202; <http://dx.doi.org/10.1002/humu.20536>
- [47] Csoka AB. Novel lamin A/C gene (LMNA) mutations in atypical progeroid syndromes. *J Med Genet* 2004; 41:304-8; PMID:15060110; <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2003.015651>
- [48] Verstraeten VLRM, Broers JLV, van Steensel MAM, Zinn-Justin S, Ramaekers FCS, Steijlen PM, Kamps M, Kuijpers HJH, Merckx D, Smeets HJM, et al. Compound heterozygosity for mutations in LMNA causes a progeria syndrome without prelamin A accumulation. *Hum Mol Genet* 2006; 15:2509-22; PMID:16825282; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddl172>
- [49] Olive M, Harten I, Mitchell R, Beers JK, Djabali K, Cao K, Erdos MR, Blair C, Funke B, Smoot L, et al. Cardiovascular pathology in Hutchinson-Gilford progeria: correlation with the vascular pathology of aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:2301-9; PMID:20798379; <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.209460>
- [50] Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, Burke B. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* 1999; 147:913-20; PMID:10579712; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.147.5.913>
- [51] Toth JJ, Yang SH, Qiao X, Beigneux AP, Gelb MH, Moulson CL, Miner JH, Young SG, Fong LG. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:12873-8; PMID:16129834; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0505767102>
- [52] Dittmer TA, Misteli T. The lamin protein family. *Genome Biol* 2011; 12:222; PMID:21639948; <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-222>
- [53] Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, Pajerowski JD, Spinler KR, Shin J-W, Tewari M, et al. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* 2013; 341:1240104-15; PMID:23990565; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1240104>
- [54] Capanni C, Mattioli E, Columbaro M, Lucarelli E, Parnaik VK, Novelli G, Wehnert M, Cenni V, Maraldi NM, Squarzoni S, et al. Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2005; 14:1489-502; PMID:15843404; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi158>
- [55] Leung GK, Schmidt WK, Bergo MO, Gavino B, Wong DH, Tam A, Ashby MN, Michaelis S, Young SG. Biochemical studies of Zmpste24-deficient mice. *J Biol Chem* 2001; 276:29051-8; PMID:11399759; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M102908200>
- [56] Bergo MO, Gavino B, Ross J, Schmidt WK, Hong C, Kendall LV, Mohr A, Meta M, Genant H, Jiang Y, et al. Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13049-54; PMID:12235369; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.192460799>
- [57] Navarro CL, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Boccaccio I, Boyer A, Geneviève D, Hadj-Rabia S, Gaudy-Marqueste C, Smitt HS, Vabres P, et al. Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet* 2004; 13:2493-503; PMID:15317753; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddh265>
- [58] Caron M, Auclair M, Donadille B, Béréziat V, Guerci B, Laville M, Narbonne H, Bodemer C, Lascols O, Capeau J, et al. Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death and Differ* 2007; 14:1759-67; PMID:17612587; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4402197>
- [59] Coffinier C, Hudon SE, Farber EA, Chang SY, Hrycyna CA, Young SG, Fong LG. HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:13432-7; PMID:17652517; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0704212104>
- [60] Qin JY, Zhang L, Clift KL, Huler I, Xiang AP, Ren B-Z, Lahn BT. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One* 2010; 5:10611-4; PMID:20485554; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010611>
- [61] Barrowman J, Hamblet C, George CM, Michaelis S. Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CaaX processing compartment. *Mol Bio Cell* 2008; 19:5398-408; PMID:18923140; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E08-07-0704>
- [62] Wang Y, Östlund C, Choi JC, Swayne TC, Gundersen GG, Worman HJ. Blocking farnesylation of the prelamin A variant in Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters the distribution of A-type lamins. *Nucleus* 2014; 3:452-62; PMID:22895092; <http://dx.doi.org/10.4161/nucl.21675>
- [63] Dominici S, Fiori V, Magnani M, Schena E, Capanni C, Camozzi D, D'Apice MR, Le Dour C, Auclair M, Caron M, et al. Different prelamin A forms accumulate in human fibroblasts: a study in experimental models and progeria. *Current Biology* 2015; 25:804-10; PMID:25754639; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.052>
- [64] Schreiner SM, Koo PK, Zhao Y, Mochrie SGJ, King MC. The tethering of chromatin to the nuclear envelope supports nuclear mechanics. *Nat Comm* 2015; 6:7159-7172; PMID:26074052; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms8159>
- [65] Verboon JM, Rincon-Arango H, Werwie TR, Delrow JJ, Scalzo D, Nandakumar V, Groudine M, Parkhurst SM. Wash interacts with lamin and affects global

- nuclear organization. *Current Biology* 2015; 25:804-10; PMID:25754639; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.052>
- [66] Bronshtein I, Kepten E, Kanter I, Berezin S, Lindner M, Redwood AB, Mai S, Gonzalo S, Foisner R, Shav-Tal Y, et al. Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior. *Nat Comms* 2015; 6:1-9; PMID:26299252; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9044>
- [67] Filesi I, Gullotta F, Lattanzi G, D'Apice MR, Capanni C, Nardone AM, Columbaro M, Scarano G, Mattioli E, Sabatelli P, et al. Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol Genomics* 2005; 23:150-8; PMID:16046620; <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00060.2005>
- [68] Maraldi NM, Lattanzi G. Involvement of prelamin A in laminopathies. *Critical reviews in eukaryotic gene expression. Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2007; 17:317-34; PMID:17725496; <http://dx.doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v17.i4.50>
- [69] Navarro CL, Cadiñanos J, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Courrier S, Boccaccio I, Boyer A, Kleijer WJ, Wagner A, Giuliano F, et al. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors. *Hum Mol Genet* 2005; 14:1503-13; PMID:15843403; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi159>
- [70] Navarro CL, Esteves-Vieira V, Courrier S, Boyer A, Duong Nguyen T, Huong LTT, Meinke P, Schröder W, Cormier-Daire V, Sznajder Y, et al. New ZMPSTE24 (FACE1) mutations in patients affected with restrictive dermopathy or related progeroid syndromes and mutation update. *Eur J Hum Genet* 2014; 22:1002-11; PMID:24169522; <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2013.258>
- [71] Yang SH, Andres DA, Spielmann HP, Young SG, Fong LG. Progerin elicits disease phenotypes of progeria in mice whether or not it is farnesylated. *J Clin Invest* 2008; 118:3291-300; PMID:18769635; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI35876>
- [72] Araújo-Vilar D, Lattanzi G, González-Méndez B, Costa-Freitas AT, Prieto D, Columbaro M, Mattioli E, Victoria B, Martínez-Sánchez N, Ramazanov A, et al. Site-dependent differences in both prelamin A and adipogenic genes in subcutaneous adipose tissue of patients with type 2 familial partial lipodystrophy. *J Med Genet* 2009; 46:40-8; PMID:18805829; <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2008.059485>
- [73] Columbaro M, Capanni C, Mattioli E, Novelli G, Parnaik VK, Squarzoni S, Maraldi NM, Lattanzi G. Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:2669-78; PMID:16261260; <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-005-5318-6>
- [74] Yang SH, Bergo MO, Toth JJ, Qiao X, Hu Y, Sandoval S, Meta M, Bendale P, Gelb MH, Young SG, et al. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:10291-6; PMID:16014412; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504641102>
- [75] Balciunas D, Wangenstein KJ, Wilber A, Bell J, Geurts A, Sivasubbu S, Wang X, Hackett PB, Largaespada DA, McIvor RS, et al. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. *PLoS Genet* 2006; 2:169-10; PMID:17096595; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0020169>
- [76] Rincon-Arango H, Halow J, Delrow JJ, Parkhurst SM, Groudine M. UpSET recruits HDAC complexes and restricts chromatin accessibility and acetylation at promoter regions. *Cell* 2012; 151:1214-28; PMID:23177352; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.009>
- [77] Caron M, Auclair M, Sterlingot H, Kornprobst M, Capeau J. Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation. *AIDS* 2003; 17:2437-44; PMID:14600514; <http://dx.doi.org/10.1097/00002030-200311210-00005>
- [78] Otsu NA. Threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans Syst, Man, Cybern* 1979; 9:62-6; <http://dx.doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076>
- [79] Xu C, Chenyang Xu, Prince JL. Snakes, shapes, and gradient vector flow. *IEEE Trans on Image Process* 1998; 7:359-69; PMID:18276256; <http://dx.doi.org/10.1109/83.661186>

From the extracellular matrix to the nuclear envelope: a functional connection between
mechanotransduction and differentiation

Andrea Casasola^{1,3}, John LaMacchia², Rodrigo Arzate¹, Felix Recillas-Targa¹

¹Instituto Fisiologia Celular, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico City, Mexico ²Medical Scientist Training Program, University of Washington; Seattle, WA, 98195; USA ³Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, 98109; USA.

Conflict-of-interest: The authors declare no potential conflict of interest

Key words: Mechanotransduction, differentiation, nuclear envelope (NE), integrins, focal adhesions (FA), actin stress fibers, linker of *nucleoskeleton* and *cytoskeleton* complex (LINC), lamin A, nuclear deformability, chromatin.

FROM THE EXTRACELLULAR MATRIX TO THE NUCLEAR ENVELOPE: A FUNCTIONAL CONNECTION BETWEEN MECHANOTRANSDUCTION AND DIFFERENTIATION

Abstract

Cells are constantly exposed to mechanical cues at the physiological level, developing therefore adaptive responses that range from molecular events to tissue adaptations, which are involved in the regulation of primordial cellular processes such as cellular differentiation. In recent years, increasing evidence uncovers highlighting molecular mechanisms that are involved in the mechano-induced differentiation in several cellular systems, and the signaling pathways involved are currently under active research. The ability of cells to detect the mechanical inputs and convert them in intracellular biochemical signals is referred as mechanotransduction. Mechanotransduction molecular players can be understood in two major classes: mechanosensors and mechanoresponders, both of which act together in a bidirectional constant regulation from the non-cellular component to the cellular counterpart. Therefore, there is a large amount of mechanoregulators in the extracellular and intracellular compartments, which are essential for the force-transmission. Importantly, there are three main physical interphases essential for mechano-induced differentiation in this force-driven path: the extracellular matrix, the plasma membrane and the nuclear envelope. Thus, the mechanoregulators include extracellular matrix (ECM) components, plasma membrane receptors, cytoskeletal elements, and nuclear constituents. Therefore, the structural properties as well as the functional role of the three main physical interphases depends on the interplay between the mechanosensing apparatus modulation, cytoskeletal reorganization and nuclear dynamics, which includes chromatin organization and changes in the transcriptional programs. Therefore, this review has sought to emphasize the relevant molecular mechanisms that demonstrate the stretch linkage ECM-Nucleus in response to mechanical cues that lead to differentiation.

I. INTRODUCTION

In spite of the reductionist approach to understanding biology at the cellular level, a metazoan cell is not an isolated entity *in vivo*. Individual cells are immersed in multicellular systems known as tissues, which include a non-cellular network known as the extracellular matrix (ECM) [1,2]. The ECM is a heterogeneous network that provides physical support and scaffolding for tissues. [1,2,3] ECM properties vary between tissues due to differential composition and topology [1]. The ECM components are synthesized and secreted by cells in a finely regulated manner. Once these constituents are incorporated into the ECM, they are each recognized by a cellular counterpart, prompting cell-ECM adhesion. This in turn alters both cell localization and functional cellular properties [4,5]. Constant remodeling of the ECM by enzymatic and non-enzymatic activities results in a dynamic equilibrium of deposition and degradation that is responsive to extracellular and intracellular signals [1,6,7]. This physical and biochemical interplay between the ECM and the cellular component dictates overall mechanophysical properties of tissues during development and cell differentiation.

Signaling from the ECM influences genetic programs both directly or indirectly, and therefore constitutes a crucial cue in the regulation of many fundamental cellular processes, such as differentiation. [8,9,10,11,12,13]. Additionally, cells are constantly exposed to mechanical stresses that range from specific mechanophysical properties of the media or substrate that holds them to different types of external forces, such as the fluidic pressure in vascular systems and the contractility in muscular tissues. Therefore, in recent years biochemical signaling arising from mechanical inputs, known as *mechanotransduction* has garnered much research interest.

Sensing of and response to external mechanical stimuli acts at multiple levels, ranging from molecular events to cellular adaptations [14]. The first interface in the force transmission path is constituted by the plasma membrane, which 'senses' the external biomechanical signals by cellular receptors and adhesion molecules [5,15,16,17,18,19,20]. This in turn, triggers signal transduction pathways that regulate intracellular responses such as the cytoskeletal reorganization. [21,22,23,24,25,26,27,30,31,32,33,34,35]. This path is followed by mechanotransduction towards the nucleus, influencing its structural and physicochemical properties and ultimately influencing transcription programs. Therefore, the second physical interface in this force-driven path is the nuclear envelope (NE).

The NE constitutes the bridge of communication between the cytoplasm and the nucleus [30,31,32,33,34]. On the cytoplasmic side, NE components associate functionally and, in some cases, physically with cytoskeletal proteins (i.e. nesprin-dynein interactions) [35,36]. On the nuclear side, specific NE proteins interact with DNA and chromatin related factors [i.e. Lamin-associated domains and Emerin/HP1 associations] [37,38,39,40]. Because specific chromatin domains attached to the NE are known to be mobile and their movements are regulated during cellular differentiation and development processes [39, 41], and chromatin dynamics responds to mechanical stimuli [28,42,43], it is reasonable to hypothesize that mechanical inputs can regulate the spatial arrangement of NE-associated chromatin domains in coordination with transcription [43b]. In particular, the role of nuclear mechanosensitivity in the regulation of cellular differentiation is starting to be uncovered [43,44,45,46,47]. For example, mechanical loads influence the osteogenic program in Mesenchymal stem cells (MSC) [44,45,46,47,48]. However, the mechanistic linkage underlying these discoveries as well as the downstream effect on chromatin organization and DNA remains largely unknown.

Similar to the structural role that the ECM plays in tissues and organs, the NE constitutes the physical framework that sustains the nucleoplasm in eukaryotic cells. Just as the ECM has been found to possess tissue-specific composition, tissue-specific NE components have also been identified [49, 50]. In addition, as the ECM is constantly remodeled, events of NE remodeling are involved in essential cellular processes such as in cell division [51,52]. In line of this idea, nuclear mechanophysical properties change also dramatically upon differentiation signals [43, 53, 54]. Therefore, it is possible that NE associated remodeling processes may contribute to cellular differentiation triggered by mechanical signals, similar to the ECM. However, there is still a wide gap in our knowledge regarding specific mechanisms that mediate the force-transmission from the ECM to the NE. What are the mainstream mechanotransduction pathways in this link? How do they impact the nucleus structurally and functionally, and how do they regulate differentiation at the chromatin level? Although it is beyond the scope of this review to cover the extensive work done on mechanotransduction, it aims to illustrate the stretch linkage ECM-cytoplasm-NE in response to mechanical stimuli and how this ultimately regulates differentiation in the mammalian cell program. We will specifically focus on the ECM components, plasma membrane receptors, cytoskeletal elements and NE constituents as mechanoregulators, as well as the specific signaling pathways involved.

II. CELLULAR MECHANOTRANSDUCTION: SENSORS AND RESPONDERS.

The field of mechanobiology studies the signaling pathways and effectors derived from mechanical inputs known as mechanotransduction. Mechanotransduction can be understood in two stages: *mechanosensing* as the ability of cells to detect changes in the compliance of their microenvironment, and *mechanoresponsiveness* as the ability to respond to applied mechanical cues through changes in gene expression or other outputs. [19, 20, 55] Both phases are coupled to ultimately trigger adaptive events at molecular, cellular and tissue levels [14] These events consist of the mechanical-induced reordering of biomolecules and its propagation molecule to molecule in the cell, starting from ECM recognition by the plasma membrane receptors, leading to mechanoresponse at the nuclear level. Thus, this force-mediated chain trigger highly regulated global rearrangements in the cellular component [55].

Mechanical inputs known to be detectable by cellular systems can be divided in three major categories: 1) ECM mechanophysical properties (i.e. elasticity); 2) geometric constraints of the ECM or substrate where the cells are grown (i.e. size area); and 3) applied mechanical loads by experimental and physiological conditions (i.e. microvibrations) (Figure 1A-C) [4, 6, 7, 8, 11, 13, 15, 16, 21, 22, 23, 43, 48, 56]. There is a large number of cellular mechanosensors, including transmembrane-receptor proteins (i.e. integrins), adhesion molecules (i.e. focal adhesions), cytoskeletal proteins (i.e. actin) and stretch-sensitive cell channels (i.e. divalent cation-regulated channels) [5, 17, 16, 20, 29, 57, 58].

The mechanoresponse outputs include a wide variety of mechanisms comprising: a) molecular rearrangements at the plasma membrane (i.e. the reorganization of cellular receptors); b) ion influx across the plasma membrane or NE (i.e. Calcium (Ca^{2+})-propagation) c) the activation of intracellular signal pathways by membrane sensitive-modules (i.e. cytoskeletal reorganization mediated by focal adhesions and Rho GTPase pathways); d) structural regulation by post-translational modifications of adaptor cytoskeletal proteins as well as NE components (i.e. paxilin and lamin A phosphorylation, respectively); and e) the translocation of mechanoresponsive complexes towards the nucleus in order to activate specific transcriptional programs (i.e. MTRF-A/SRF) [14, 22, 24, 48, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64]. Therefore, the function of the mechanosensor molecules is coupled with the intracellular events generated by mechanoresponders, enabling the cell to actively probe the microenvironment and the internal mechanophysical properties in a bidirectional manner. Thus, any cellular entity constitutes a constant mechanosensor system, triggering a wide spectrum of

mechanoresponses, which effects ultimately can lead to cellular differentiation, as described in the following section.

III. MECHANICAL CUES THAT INFLUENCE CELLULAR DIFFERENTIATION

The ECM properties include elasticity, stiffness or rigidity [5, 6, 48, 65]. Elasticity is defined as the intrinsic resistance of a tissue against a stress force. High elasticity tissues resist greater external forces in contrast with low elasticity tissues [65]. Elasticity defines the stiffness property; therefore, lower elasticity tissues are soft such, as the brain (500 Pa), while a high elasticity defines stiffer tissues such as the skin (10^4 - 10^5 Pa) [66]. Stiffness mechanosensing triggers cellular responses such as mechanosensors accumulation (i.e. focal adhesions); cytoskeletal rearrangements (i.e. actin polymerization) and the control at the gene expression level (i.e. LMNA gene) [22, 48, 56, 67, 68, 69]. Furthermore, the cellular ability to sense rigidity (extracellular and intracellular) ultimately plays regulatory roles in cell differentiation [8, 70, 71]. For example, myoblastic differentiation only occurs when the cell culture substrate has mechanophysical properties closer to the natural environment. In contrast, cells are not able to fuse as myocytes in soft substrates cultures. Supporting these findings, adherent cells cultured in stiff and soft substrates, differentiate in muscle and neuronal cells, respectively [8,72]. Moreover, stem cells also respond to substrates with different stiffness *in vitro*, determining their cell fate [73]. For example, adult neural stem cells differentiate towards neurons or glia in response to different stiffness (100-500 Pa and 1000-10,000 Pa, respectively) [66].

Cells are able to sense molecular differences at the nanoscale level in the substrates, including area sized and geometrical constraints in the substrates, which, in turn, are important mechanical cues for differentiation signals [4, 13, 42, 43, 74, 75, 76, 77]. For example, MSC grown in shaped-micropatterned substrates, showed geometry-dependence to differentiate into adipocytes or osteoblast by the regulation of mechanosensors modules and cytoskeletal organization, which is accompanied by changes in the transcriptional program [13].

Cells receive low and high magnitude mechanical inputs continuously at the physiological level. For instance, hydrostatic pressure is a significant stress in chondrogenic progenitor cells, fluid shear stress is a constant force in smooth muscle vascular cells, and cellular compression at different magnitude is a common load in muscle and endothelial cells. Importantly, mechanoresponsive genetic programs are established under these

stimuli, particularly those that regulate differentiation [78, 79]. For example, cyclic strain in cell cultures impacts the differentiation potential of MSC [27]. In particular, low and high-magnitude mechanical signals (LMMS and HMMS) induce osteogenic and anti-adipogenic programs in MSC [44, 45, 46, 47, 80]. In addition, a wide spectrum of mechanoresponsive genes has been identified, which include: ECM components and remodelers (i.e. collagen I and Tenascin-C), cytoskeletal adaptor proteins (i.e. talin), actin remodelers (i.e. WAS), RhoGTPase regulators (i.e. ROCK), NE components (i.e. LMNA) and TF (i.e. Egr-1) [43, 46, 48, 81]. Specific gene expression of differentiated cells in response to mechanical forces has been also reported. For instance, the application of low-intensity vibrations to osteoblasts induces the upregulation of osteogenic mRNA markers [46]. Thus, cellular ability of detect substrate compliance and topology, as well as the applied mechanical loads (physiologically and experimentally), implicates numerous molecular players to trigger transduction pathways in a tightly regulated manner that can result in differentiation signals such is the case of the osteogenic program (Figure 1A-C). Furthermore, this large number of molecular players (mechanosensors and mechanoresponders) defines the impact at the cellular level, including in first place the ECM components, which are, in many cases, the primary point of contact to mechanical inputs. This review has therefore concentrated in summarize the role of the major canonical ECM components in differentiation and its potential role as mechanoregulators.

IV. ECM COMPONENTS AS MECHANOREGULATORS IN DIFFERENTIATION

The ECM meshwork is assembled into a complex three-dimensional microenvironment that holds tissues, providing specific mechanophysical properties and constituting, in many cases, the interface of mechanical load transmission. Three major types of molecules compose the ECM: fibrous proteins, proteoglycans and matricellular proteins. The potential roles of these ECM components in differentiation and mechanoregulation will be discussed.

Fibrous proteins in mechanotransduction and differentiation program

The fibrous proteins include fibronectin, elastins, collagen and laminins. The relative abundance of these molecules within the ECM confers specific scaffold properties that vary across tissues and development stages.

i) Fibronectin is a multimeric glycoprotein that binds to cellular receptors (i.e. $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ integrins and syndecans), leading to cell attachment to the ECM and to the formation of a stable insoluble fibril supramolecular structure (fibrillogenesis) Fibronectin also interacts with other ECM components, such as fibrin, collagen and matricellular proteins [5, 82, 83, 84, 85, 86]. Fibronectin is a key regulator of early development and organogenesis. For instance, fibronectin constitutes the migratory substrate for the mesoderm layers during gastrulation, participating in the mesenchymal cell condensation and is essential for the differentiation of chondrogenic precursors as well as for megakaryocytic differentiation [83, 87]. Fibronectin is also essential, cleft formation during epithelial branching morphogenesis and cardiovascular tissue formation [88, 89, 90]. Moreover, this protein is crucial for stem cell fate specification, providing anchorage and homing within stem cell niche. [12, 73, 91]. At the nuclear level, fibronectin-mediated adipogenic suppression is an excellent example of direct regulation of transcription by the ECM. This is the case for the fibronectin-epidermal growth factor (Pref-1) interaction, which triggers the activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK), ultimately leading to increased Sox9 gene expression (a master regulator for osteoblastic differentiation (91). Fibronectin acts as a mechanoregulator in several cell types. For example, at the ultra-structural level, the fibronectin molecule responds to mechanical forces by exposing differentially its binding sites to receptors and self-association motifs, which also regulates fibrillogenesis [92, 93]. Moreover, recent studies have demonstrated the linkage fibronectin-nucleus (mediated by NE components), which is involved in mechanotransduction as will be discussed [60].

ii) Elastin is initially synthesized and secreted as a soluble protein known as tropoelastin, which is further polymerized to form an insoluble protein. This protein interacts with other fibrillar proteins (i.e. fibrillin glycoproteins) to give rise to elastin fibers. These structures are responsible for generating tissue elasticity and recoil. Elastogenesis mainly occurs in the late and early neonatal stages and it is completely absent after puberty [94], suggesting that it may play a role in cellular differentiation during early stage development. Supporting this, human engineered elastin-like peptides have demonstrated effects on cellular differentiation as therapeutic biomaterials. These include differentiation of adult adipocyte derived stem cells (hADAS) into keratinocytes and neurons, as well as the regulation of differentiation level in myogenesis [95, 96, 97].

Elastin gene expression is restricted to cell types that constantly contend with mechanical stresses, such as chondrocytes, endothelial and smooth muscle cells [94]. The abundance of elastin has increased in parallel with the elasticity requirements of animal tissues during evolution. For instance, blood vessels have increased in thickness with the appearance of systemic blood circulation, particularly in vertebrate high-pressure arterial systems, where elastin is highly abundant (50% of ECM) [98, 99]. Elastin provides the resilience necessary for vessel walls to contend with the pulsatile mechanics of cardiovascular circulation [94]. Consistently, genetic defects resulting in abnormal elastin production and processing are known contributors to vascular disorders such as hypertension [100, 101]. Interestingly, low-frequency mechanical forces in fibroblasts trigger down-regulation of elastin expression gene [102, 103]. However, effects of these expression changes on mechanotransduction and differentiation are largely unknown.

iii) Collagens are synthesized and secreted as triple-helix proteins that assemble into multimeric fibrils, which participate in cellular adhesions through interactions with cellular receptors (i.e. $\alpha1\beta1$ and $\alpha2\beta1$ integrins) [5, 104]. Collagen forms the supramolecular structures: fibrils, beaded filaments and anchoring networks, which provide the ECM, with strength and stiffness [48]. This family is highly diverse (to date, 28 collagen-types), being I, II, IV and X –collagen types the most abundant in the ECM, all of which are expressed in a developmentally regulated manner [104]. Collagen deposition and turnover in the ECM are regulated by specific proteases (i.e. metalloproteinases MMP-2), which are in turn also differentially regulated during differentiation [105, 106, 107, 108, 109]. Collagen crosslinking is implicated in chondrogenesis and preosteoblasts differentiation. [110, 111]. Interestingly, collagen tissue-specific expression and function correlate with the degree of exposure to mechanical stress (i.e. cartilage, skin and bone) [112] For instance, the collagen fiber network in the vascular system is adapted to be efficient at the maximal physiological blood pressure per species [99].

iv) *Laminins* are heterotrimeric glycoproteins that constitute a family highly diverse in size and biochemical properties. They bind to surface membrane proteins (i.e. $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$ and $\alpha7\beta1$ integrins), as well as other ECM components (i.e. collagen, heparin sulfate and glycosaminoglycans)[113, 114]. Laminins have also the ability to polymerize into supramolecular structures such as the basal membrane. Laminin-integrin interactions influence cellular processes important in development and differentiation. In development, for example, deletion of laminins results in defects in basal membrane assembly in embryonic stages. Laminin

expression is differential over development as well. For example, laminin α 1 chain is present at the 2-cell embryonic stage in embryogenesis and, depending on its association with the other laminin-chains, it either decreases or gets restricted to certain tissues as development progresses towards the adulthood. Some laminins expression varies across tissues such as laminin 211, which is found exclusively in skeletal tissue [113]. Laminins and its derivatives regulate differentiation processes in stem cells for epithelial branching and towards osteogenic differentiation [115, 116, 117, 118, 119]. Interestingly, certain chains of laminins are overrepresented in connective tissues subject to high mechanical stresses (i.e. α 2, β 3 and γ 2) [120]. Furthermore, laminins establish a bridge between the ECM and cytoskeleton through interaction with specific cellular proteins for mechanotransduction such as actin [121, 122]. For example, laminins interact with the dystrophin-glycoprotein complex in the sarcolemmal membranes (skeletal muscle) [122], which is essential for preserving plasma membrane integrity in myocytes during and after contraction.

In summary, the high diversity of fibrous proteins as well as their ability to form higher-order structures by self-association and the interaction with other ECM components and a large number of cellular receptors, constitute essential mechanoregulators in differentiation, providing elasticity, strength, stiffness, anchoring and attachment properties to the ECM.

Proteoglycans as mechanoregulators and its role in cellular differentiation

Proteoglycans are the main components of the extracellular interstitial space [1]. These macromolecules are synthesized and further secreted to the extracellular surroundings as glycosaminoglycan chains covalently bound to core proteins, with the exception of hyaluronan. Proteoglycans can be sulfated (i.e. heparin sulfate and chondroitin sulfate), or non-sulfated (i.e. hyaluronic acid). Proteoglycans are divided in three main families according to the core protein component, localization, size and modular composition: small-leucine rich proteoglycans (i.e. decorin); modular proteoglycans (i.e. hyalactans); and cell-surface proteoglycans (i.e. syndecans). Several proteoglycans are expressed ubiquitously, that is the case of the hyalactan versican; others seem to be tissue-specific such as neurocan and neuroglycan C (chondroitin sulfates), which are only expressed in the central nervous system [123].

There is evidence that may suggest a role for proteoglycans in differentiation processes. For example, decorin seems to be essential for angiogenesis [124, 125, 126], while different programs in lymphoid cells [inactive monocytes-active macrophages) synthesize specific proteoglycans [127]. As mechanoregulators,

proteoglycans provide to the ECM with hydration, buffering and force-resistance properties due the hydrophobicity and biochemical signatures [1], as some of them will be summarized as follows.

Hyaluronan (HA) is the only member of the proteoglycans that is composed only by glycosaminoglycan, lacking of protein core. This macromolecule is synthesized and secreted by the transmembranal-proteins HA synthases (HAS1-3), while its processing is mediated by hyaluronases [129]. HA is a signaling molecule involved in the regulation of diverse cellular processes such as adhesion and differentiation [123, 130]. This signaling function depends, in part, on the co-regulation of and interaction with cellular receptors such as CD44, the HA receptor for endocytosis stabilin-2 (HARE), and Toll-like receptors 4 and 2 (TLR4-2) [131]. CD44 for example, mediate the internalization of HA and also triggers RhoA signaling cascades to direct cytoskeleton reorganization. In addition, BMP-7 and SMADS1-4 are activated for translocation towards the nucleus in response to HA [132]. HA exhibits different domains that enable it to interact with a wide spectrum of ECM proteins as well (i.e. TNF- β and other proteoglycans) [131]. These interactions are also regulated by the size of the HA-polysaccharide chains, which have further effects. For example, low- and high-molecular weight HA has differential effects in inflammatory responses and angiogenesis. Specifically, high molecular weight HA triggers the production of cytokine IL-10 *in vivo* and *in vitro*, triggering a differentiation program under inflammatory response in T-cells [133, 134]. Interestingly, lower weight HA is overrepresented in ESC, in contrast with the HA in cardiomyocytes derived from the same pluripotent cells [135]. This pattern of expression and dynamics of HA and the HA synthetases, which have a developmentally regulated expression, leads to the hypothesis that HA may impact differentiation processes. For example, the HA synthetase HAS2 has been found to be upregulated at the mRNA level upon the activation process from monocytes to macrophages [127], suggesting an increase in HA production. This upregulation was detected in cardiomyocytic differentiation where HAS2 and HAS1 is upregulated in comparison with ESC [135].

The high abundance and the hydrophobicity properties of HA provide high hydration potential to the ECM, serving as an ideal substrate for migratory and proliferative cells [131]. which is essential for mesenchymal cells in embryonic limb development and in the formation of heart valves. These remodeling processes ultimate regulates the endothelial-to-mesenchymal transformation and is dependent on HA [130], which also requires the binding of other proteins known as hyalactantes.

Hyalactantes are probably one of the best-studied proteoglycans in differentiation processes. These proteins include versican, which binds to cellular surface receptors (i.e. CD44, EGFR, integrin β 1 and TLR2); and ECM components (i.e. HA, collagen I, and fibronectin) [123]. Furthermore, versican isoforms V0/V1 are upregulated in the first stages of condensation of mesenchymal progenitors and its downregulation affects chondrogenesis differentiation[136]. Versican participates actively in inflammatory responses [137]. Additionally, determinant versican isoforms (i.e. V0, V1, V2) have an upregulated expression in cardiomyocytes derived of ESC, and its depletion *in vivo* causes failure in heart formation, being lethal in mice [135, 136]. Can mechanical cues influence these outcomes? Supporting this hypothesis, versican gene transcription has been reported as mechanoresponsive in tendon stem progenitors cells [TSPC] [138].

In summary, the functional and structural diversity of proteoglycans confers specific properties in terms of chemical and mechanophysical characteristics to specific tissues during development, which participate indirectly and directly in differentiation. Specifically in tissues subjected a high mechanical stresses such is the case of the cardiovascular tissue, which is highly regulated for hyaluronan and versican as described . However, much more work is needed to evaluate the molecular mechanisms that underlie proteoglycans role from the mechanobiology perspective.

Matricellular proteins: a recent ECM family with potential mechanoregulation role

Matricellular proteins are soluble and insoluble non-structural ECM components, including trombospondin 1-2 (TSP1-2), osteoponin (OPN), tenascin-C, periostin, and osteonectin (SPARC). This family is mainly defined by functionality rather than by structural properties. This group of constituents has the following properties in common: high expression during development and in response to injury; mediation of ECM-cell interactions; recognition by several cell-receptors, ECM components and diffusion molecules (i.e. growth factor TGF- β 1 and proteases); and negative regulation of cellular adhesion [81,139,140].

In terms of differentiation, TPS1 for example, have been correlated with angiogenesis, while SPARC protein has been suggested to play an important role in osteoblastic differentiation. Both cardiovascular and bone tissues, are highly exposed to different mechanical stresses, which may support the role of matricellular proteins as potential mechanoregulators. Consistently, SPARC triggers signal transduction towards the cellular interior through the formation of actin stress fibers and feedback regulation of fibronectin

polymerization, regulating the intra- and extracellular mechanical properties [81]. Another typical matricellular protein is tenascin-C, which is upregulated in response to mechanical inputs in the vascular system, mechanical force-induced bone remodeling or muscle overload; while immobilized tendons have low levels. Tenascin-C is crucial in the development of the heart, specifically, in the differentiation of pre-cardiomyocytes [81]. The discovery of matricellular proteins is relatively recent; therefore future work will uncover its implications in mechanotransduction systems as well as in differentiation.

Therefore, the ECM components reviewed, including the ones that are not discussed in this work for restrictions of space, interact with each other in a tightly regulated manner during developmental processes, constituting a essential regulators for the external mechanical cues as well as further receptors form the internal signals generated as mechanoresponses. In parallel, their mechanoregulatory responses are transmitted to the cellular compartments by cellular receptors, which will be reviewed in the following section.

V. MECHANOSOME: FROM CELLULAR RECEPTORS TO CYTOSKELETON DYNAMICS

The interface that mediates the signal transduction from ECM to the cellular component is composed of cellular receptors, such as syndecans, glycoproteins, and integrins, as well as other types of membrane proteins such as stretch-sensitive ion channels. However, this review focuses on integrin receptors since they are perhaps one of the best-studied classes of mechanosensor proteins.

Integrins: An Overview

Integrins comprise a family of transmembrane $\alpha\beta$ -heterodimers, which exist mostly in the extracellular domain (1600 amino acids) and in the cytoplasmic space with two small domains (20–50 amino acids). Integrin activation involves binding to ECM ligands, as well as cytokines, growth factors and G-protein coupled receptors [5]. Activation induces conformational changes in both the extracellular and cytoplasmic domains, leading to the interaction with intracellular signaling molecules (i.e. kinases). Signal transduction pathways triggered by integrins activate downstream effectors including phosphoinositide 3-kinase (PI3K), focal adhesion kinase (FAK), mitogen-activated protein kinases (MAP kinases), Ca^{2+} influx and Rho A GTPases [141]. For example, fibronectin-integrin interaction activates FAK, Src, PI-3-kinase, and protein kinase C [142]. This mechanism allows bidirectional ECM-cell signaling known as “outside-in signaling” [5, 141]. In fact, integrin

activation *per se* represents one of the best examples of outside-in signaling, since it facilitates interaction of integrin with other ECM ligands (i.e. fibronectin) as response [141].

ECM-integrin activation-derived pathways induce short-term effects (i.e. cytoskeleton rearrangement) and it can also trigger long-term effects, including differentiation [12,144]. Consistently, Integrin-gene deletions cause perinatal lethality, pre-implantation defects, morphogenesis defects, cartilaginous skeletal abnormalities, as well as defects in angiogenesis and leukocyte function [5, 12, 144, 145]. Therefore, the differential assembly, ligand-specificity, activation/inactivation dynamics and cell type-specific expression of integrins provide a high functional diversity that allows them to regulate a wide spectrum of cellular processes, which include differentiation as will be discussed as follows.

Integrins as the major mechanosensors in differentiation

Integrins first arose in metazoans, suggesting the possibility that development of multicellular organisms depends strongly on the detection of extracellular signals by these proteins [5]. Integrins exhibit cell-specific expression: subunits $\beta 3$ and $\beta 7$ are uniquely expressed in white blood cells, while $\alpha 2\beta 2$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins are characteristic of basal keratinocytes [145]. In addition, the substrate specificity of each integrin may vary from one cell to another. For instance, integrin $\alpha 2\beta 1$ has different ligands in epithelial cells and platelets. These findings may suggest that the integrin-ligand interactions are also regulated for other mechanisms such as co-factors-binding, ECM deposition and degradation, and mechanical forces.

Early experiments of calibrated applied loads to fibroblasts revealed a fibronectin- $\alpha 1\beta 5$ integrin-cytoskeleton linkage [15]. These findings have been recapitulated in fluid shear stress, cyclic stretch, rigidity-sensing and other mechanical cues, which lead an integrin clustering and intracellular-proteins recruitment, allowing the formation of specialized mechanosensitive complexes [15,59]

From integrins to focal adhesions: the mechanosensing apparatus

Once integrin activation occurs, extracellular domain interactions can dictate the aggregation of more integrins to increase the avidity towards the ECM substrates in response to mechanophysical cues. Initially, these integrin clusters are unstable and transient (nascent focal adhesions), but in some cases they become stable and larger (mature focal adhesions) [20,145]. Mechanical inputs are detected by focal adhesions (FA) and transduced to the cytoskeleton network [22,23,146]. More than one hundred intracellular proteins are recruited as FA components, including integrin-linking proteins (i.e. talin), enzymes (i.e FAK kinase),

scaffolding proteins (i.e. paxilin), adaptor proteins (i.e. zinxyn), structural proteins (i.e. kindlin) and actin crosslinking proteins (i.e. α -actinin) [26, 147, 148, 149, 150]. FAK kinase is one of the most represented early-activated proteins in nascent FA and its recruitment can be mediated by the adaptor protein paxilin. Paxilin serves as a scaffold protein for multiple adaptor proteins, such as talin, which bind the cytoskeleton upon ECM ligand-integrin interaction.

Talins are essential for cell adhesion and their depletion causes defects in embryonic development, particularly during gastrulation. Talins interact with the cytoplasmic domains of integrins, such as α IIb and β 3 in platelets, as well as actin, FAK and phosphatidylinositol-4 phosphate 5-kinase type protein, both of which are crucial for FA assembly and turnover [151, 152]. Talin also interacts with Rap1-GTP interactor adaptor molecule (RIAM) and vinculin, which stabilizes actin-interactions and is key for integrin activation [147, 148, 152, 153]. Vinculin recruitment by talin is a key event in FA maturation, in that its absence results in only unstable and transitory adhesions. Vinculin, in turn, interacts with paxilin, actin, acidic phospholipids and α -actinin [151]. The crosslinker α -actinin is another key FA-protein that is crucial for the linkage between talin-actin and vinculin-actin, since it interacts with all three proteins [148].

Other FA adaptor proteins include the kindlin family, composed of kindlin-1, -2 and -3. Kindlins bind to integrins β 2 and β 3, mediating the connection with actin. In contrast with talins, kindlins act as co-activators of integrins and they also colocalize with vinculin [155]. Kindlin-1 and -3 expression is restricted to epithelial and hematopoietic cells, while kindlin-2 is ubiquitously expressed. In general, kindlin-loss triggers defects in hair development, epithelial tissues, bone formation, blood hemostasis, angiogenesis and leukocyte activation [155, 156, 157, 158, 159, 160]. At the cellular level these defects are caused by impairment of integrin activation and actin-polymerization, leading to cytoskeletal organization defects (i.e. actin stress fibers formation) [159, 160]. Therefore, these defects in cytoskeletal organization influence nuclear genetic programs. For example, kindlin-1 ablation results in differential expression of integrins at the mRNA and protein level, providing evidence for bidirectional signaling as well [158, 160]. In addition, the hair cycle de-adjustment under the kindlin-1 ablation is accompanied by expression changes in transcript markers (i.e. CCAAT displacement protein) [159].

Moreover, Kindlin-1 depletion results in impaired differentiation of myoblasts, affecting elongation and adhesion properties of myocytes. [152] In terms of cellular localization, kindlin-1 and -2 proteins are enriched

in the cytoplasmic compartment in human keratinocytes and myoblastic mouse cells, respectively, specifically overlapping with FA and integrins. Both proteins, kindlin-1 and -2, were also observed in the perinuclear compartment [152,155]. Further studies are necessary to determine if kindlin-perinuclear localization plays a functional role in differentiation and the molecular linkage with nuclear components.

High levels of clustered integrins, FAK mediated-interactions and stable associations with actin characterize mature FAs. Vinculin and α -actinin are also present during maturation [159]. At this stage, the adaptor protein tensin enables interaction between integrin-actin, establishing actin stress fiber formation [141]. Altogether, these specialized macromolecular complexes (nascent and mature FAs) localized constitute therefore an essential mechanosensor apparatus at the plasma membrane, which trigger the intracellular signaling to regulate short- and long-term effects (i.e. cytoskeletal organization and transcription changes, respectively).

Focal adhesions as force-transmitting machinery

FA assembly is sensitive to a wide variety of mechanical stresses and ECM mechanical properties, including ligand spacing, elasticity, geometry constraints, rigidity and stiffness. For example, paxilin localizes in sites of adhesion in the ECM during rigidity sensing. This signaling is regulated in feed-forward manner by myosin II and actin-mediated contraction [56]. Furthermore, the application of calibrated mechanical forces over integrin β 1 induces FA by the recruitment of talin, vinculin and α -actinin [148]. Actin binds talin and this force-transmitting machinery is reinforced by vinculin [26], which recruits other adaptor proteins such as Ezrin-radyxin-moesin and nexilin [147, 152,160] When high pulsatile force is applied α -actinin binds with actin, triggering FA maturation [152].

At the molecular level, vinculin binding sites (VBS) in talin are essential for vinculin recruitment to the FA. *In silico* modeling and *in vitro* experiments have demonstrated that VBS undergo conformational changes that increase vinculin binding upon applied forces [149,160,161]. Vinculin binding at specific VBS strengthens talin-actin interactions also results in increased vinculin binding affinity for actin, α -actinin and paxilin. Mechanical forces also influence vinculin-actin interaction, as cyclic stretch. In addition, actin-talin binding generates molecular forces to trigger actin binding in other talin sites. In summary, the integrin-talin-vinculin-actin linkage constitutes the strongest mechanosensor module reported to date, which controls force transmission and leads to the reorganization of the cytoskeleton [147,152,160,161,162].

There are substantial differences in the types of mechanosensory complexes that are stabilized under different mechanical stimuli (force frequency, magnitude, type) and in different cell types [22,23,146]. For instance, specific FAs containing vinculin, paxilin and t-Akt, specific protein activity (i.e. FAK phosphorylation) are developed in MSC upon mechanical loads of diverse magnitude [46, 47]. On other side, the accumulation of the zyxin protein, actin stress fibers displacements and local deformations are triggered in response to applied nanoscale forces [163] {Guolla:2012fc}, In contrast, specialized FAs connected to perinuclear-actin fibers are formed in response to substrate compliance sensing and to shear forces. These FAs are referred to as Actin Cap Associated Focal Adhesions (ACAFAs) and they differ from canonical FAs in their composition, shape, size, location and turnover, as well as the association of particular type of actin stress fibers that are directly connected with the NE components [22,23]. Therefore, the wide variety of mechanosensors and their subsequent effects are influenced by mechanical stimuli from the ultra-structural level until the macromolecular level, resulting in a regulated chain of molecular events that ultimately can lead to differentiation signals.

FA-mechanosor in differentiation

Specific FAs proteins such as α -actinin, filamin, talin and paxilin have been found responsive to mechanical cues in MSC cultured in stiffer matrices, which differentiate towards muscle and osteogenic cells [56]. Furthermore, ECM substrate geometricity mediates the formation of FA enriched in vinculin, involved in the differentiation of MSC towards adipogenic or osteogenic lineages [13,165]. In MSC, HMMS and LMMS trigger FA formation or activation of FA-proteins (i.e. FAK), respectively. This, in turn, triggers anti-adipogenic signals [46, 47]. Since ACAFAs assemble upon stiff substrates in adherent cells, and are characterized by high activity of FAK and dependent on myosin tension, as the MSC subjected to LMMS [47], further work will elucidate if these or other specialized FAs are assembled upon mechanical signals in this system. Furthermore, ES differentiation upon geometrical patterns has demonstrated a heterogeneity response in the distribution and dynamics in specific FA proteins (i.e. zyxin and vinculin) [43]. Together, these observations strongly suggest that different pathways of mechanotransduction and molecular rearrangements in the cells may regulate the responses upon distinct stimuli.

Cytoskeletal components as mechanosensor modules

Mechanosensing modules (FAs or Focal Adhesions) are interconnected with actin filaments, intermediate filaments and microtubules. Mechanical loads sensed by integrins trigger the accumulation of bundled actin filaments in FA. These filaments are connected with the rest of cytoskeletal actin. Actin filaments are originated by the polymerization of G-actin that produces F-actin, which crosslinks with myosin II to form the contractile fibers (actinomyosin machinery). Actin polymerization occurs in two phases: nucleation and elongation, mediated, in some cases, by Arp 2/3 and diaphanous factor (mDia1), respectively. In non-mechanoinduced systems the proteins Ena/Vasp is recruited to FA by zyxin, accompanied by the recruitment of filamin A [68]. Ena/Vasp proteins prevent the capping of the actin filaments *in situ* [160], while filamin A promotes their progression, enhancing more strong and stable actin bundles [166]. However, it is unclear if any of the former nucleation-elongation complexes are the major regulators in response to mechanical loads. In parallel with ACAFAs, specialized perinuclear actin cap stress fibers are formed upon detection of the mechanical cues such as rigidity sensing and shear stress. These fibers are associated with ACAFAs and differ from canonical actin fibers in localization and properties. For instance, canonical stress fibers lie flat and dispersed in the cellular basal surface, and form either dorsal or radial stress fibers [166]. In contrast, perinuclear actin cap stress fibers ACAFAs-associated are characterized by an elongated conformation that extends from the ACAFAs to NE components [22,23]. Interestingly, the perinuclear actin cap fibers are completely absent in pluripotent cells (i.e. ES cells). In contrast, they are highly organized in differentiated cells (i.e. endothelial cells) [167]. Since the role of these perinuclear actin cap stress fibers and their association with ACAFAs has been confirmed as crucial for nuclear shape and mechanotransduction [22, 23, 166, 167], further work will elucidate their role in differentiation. For example, it is unknown if the perinuclear actin cap structures have a role in MSC differentiation in response to LMMS [47].

On other hand, geometrical micropatterned cultured cells exhibit high diversity on the cytoskeletal actin organization [74]. Particularly, long polarized cells develop long and apical stress fibers, in contrast to constrained isotropic shaped cells, where actin is organized in short filaments and patches. Both types of these stress fibers affect nuclear mechanophysical properties as well as subnuclear organization. Therefore the actinomyosin machinery is essential for mediate the mechanical nuclear characteristics upon integrin activation by geometrical constraints in MSC cells [13].

In addition, nuclear actin polymerization has been suggested in adherent cells upon cell spreading or ECM fibronectin-integrin activation. This nuclear actin polymerization is dependent on mDia1 factor [60]. It is possible that tension forces generated by F-actin in the nucleus are part of the bidirectional feedback towards the cytoplasm to maintain the mechanical homeostasis in the whole cell. Moreover, this F-actin is linked to NE components and it regulates the translocation of transcriptional nuclear co-activators (i.e. MTRFA) [60], which will be discussed in the following sections.

Other molecular players in the formation of stress fibers are the mTorC factor and the Akt protein, both playing a role in MSC differentiation upon mechanical signals. mTorC2 and its activator Rictor are relocalized in the plasma membrane upon mechanical stresses, in particular at the FA, interacting directly with vinculin and leading the remodeling of cytoskeleton [27]. Inhibition of the actin network blocks the response to the mechanical signals [27], including differentiation signals such as adipogenesis and osteogenesis [13]. These findings were confirmed upon tensile stretch as well, where actin polymerization is essential to convert the extracellular-loads in nuclear physical properties [64].

Myosin also regulates the MSC differentiation towards neuronal, muscular and osteogenic differentiation at the transcriptional and protein level in response to geometric constraints. This mechanism also constitutes a regulatory feedback loop by the regulation of myosin II mRNA, which confirms the active interplay with the nuclear programs [8, 13].

The intermediate filament-proteins crosslink in bundles, such as vimentin, and also provide structural integrity to the cytoskeleton and microtubules. Microtubules are essential for FAs dynamics as well, specifically in the disassembly in the turnover regulated by FAK, and stress fiber contractility [163,169]. This is likely to be implicated in the mechanosensing in the commitment to osteogenic lineage in MSC by rigidity sensing and geometric constrains-substrate detection. Therefore, the next level of mechanoregulation in the force-transmission path is constituted by cytoskeletal dynamics, comprising mainly those molecular players that participate in the structural support to the cell and cytoskeletal reorganization.

Rho GTPase pathways as the major intracellular regulators for cytoskeletal organization in response to mechanical loads

In terms of signaling pathways, the force-driven path from ECM to integrins, integrins to FA, and FA to the actinomyosin machinery is largely regulated through Rho GTPases. Rho GTPase pathways regulate the communication and cytoskeleton dynamics in response to the ECM remodeling processes [68, 70, 169, 170]. Rho GTPase molecules are switches that cycle from inactive GDP-bound to active GTP bound enzymes. The binding/unbinding of GTP induces changes in the effector-binding regions at the conformational level, which impact integrin clustering, specific ligand binding and FA maturation [171]. For instance, Rac1 and RhoA proteins are both primarily regulators of the ECM-Integrins-FA-Actin linkage. Rac1 promotes the assembly of actin filaments in nascent adhesions, which promotes the formation of α -actinin-crosslinking and further incorporation of myosin. Rac1 suppresses RhoA at this stage, which is subsequently activated by Rac1 inhibition upon the strength of integrin clusters by the FA maturation. RhoA on the other hand promotes actin stress fiber formation by binding with its effectors mDia1 and Rho kinase (ROCK)[68]. ROCK is essential in the certain types of actin stress fiber formation, which further have impact in nuclear properties [163,172]. Therefore, this switch-on of the actinomyosin machinery triggers prolonged responses of contractility. Ultimately, ROCK also controls FA such as ACAFAs [146]. In addition, Rho GTPase activation in MSC has been directly linked with Akt activation, which in turn triggers formation of stress fibers and FA upon mechanical forces [169]. The signal regulation from the external forces and intracellular forces by RhoGTPase is again a tightly regulated bidirectional mechanism. For example, Rho GTPases also promote ECM fibrillogenesis in response to the contractility and actin stress fibers formation by ROCK.

The balance between Rho GTPase pathways is known to affect actin-mediated cellular mechanical properties and mechanosensing in differentiation [69]. For example, the MSC differentiation to the cellular lineages that arise in connective tissues (adipogenic, chondrogenic and osteogenic) is highly influenced by multiple external signals in the bone marrow, constituting one of the best examples of differentiation processes regulated by Rho GTPases. In this process, the extracellular factor IGF-1 has been proposed as an extracellular signal that regulates myogenesis and anti-adipogenic effects through the ROCK pathway. Specifically, the regulation by the IGF-1/Insulin receptor occurs via phosphorylation by ROCK, which triggers the reduction of the Akt and p38a proteins, leading to the activation of RhoA. RhoA triggers a signal cascade that ultimately inactivates CREB nuclear factor, downregulating the transcription of adipogenic genes and upregulating myogenic genes such as myoD, MEF2 and myogenin [9].

HMMS also trigger anti-adipogenic programs by the β -catenin pathway in MSC, leading to the amplification of Akt signaling in conjunction with mTOR2-riCTOR, which in turn causes the remodelling of FA and stress fibers via the Rho GTPases activity (more cellular stiffness) [27]. In the same system, MSC osteogenic differentiation in response to geometrical constrains in the substrate is regulated positively by ROCK and myosin II activity, and its blocking reduces contractility, directing the cells towards adipogenic lineage. [Kilian:2010du] Interestingly, ROCK and myosin II are also upregulated in response to mechanical stimuli in TSC [173]; thus further studies will elucidate the signaling pathway involved in TSC differentiation. It is still intriguing how the mechanical signals ultimately develop nuclear responses; however recent evidence has provided crucial cues in this transmission path. For instance, the specific adipogenic gene repression in MSC in response to LMMS is led by RhoA activation and actin arrangements as well, which in turn, is physically linked with NE proteins [47]. Therefore, this cytoskeleton-NE interaction is essential; constituting the bridge in the mechanotransduction pathway that regulates differentiation.

VI. THE NUCLEUS: A CENTRAL SENSOR FOR MECHANOINDUCED- DIFFERENTIATION

The nucleus holds the genome and the transcriptional machinery, constituting the central processing system of incoming intracellular signaling to orchestrate cellular differentiation. In general, the nucleus is the most prominent organelle and is characterized by specific mechanophysical properties (i.e. stiffness and viscoelasticity). Interestingly, these nuclear properties vary between undifferentiated cells and differentiated cells [43, 53, 167]. In line of these findings, a progressive differentiation model suggests a progressive reduction in nuclear size accompanied by a progressive loss of pluripotency in cellular differentiation. This in turn is caused by a progressive loss of chromatin mobility, which is dependent on cytoskeletal organization, NE components, and genetic as well as epigenetic programs [167, 174, 175, 176, 177, 178].

In addition to cellular differentiation, mechanical forces at the physiological level and experimentally applied such as fluid shear stress, strain and traction also affect nuclear mechanophysical properties (i.e. stiffness), resulting, in some cases, in physical displacement of the nucleus and changes in subnuclear configuration (i.e. CB, speckles, PML arrangements) [17, 23, 42, 43, 48, 74]. These physical changes can also result in nuclear deformations [74]. Nuclear deformability is correlated with cellular plasticity, which is defined as the cell's ability to modulate gene expression and often correlates with chromatin organization [174,181]. For

instance, ES and HSC (high plasticity) possess highly deformable nuclei relative to differentiated cells [53]. Therefore, according to the progressive model, the progressive loss of susceptibility to nuclear deformability as well as plasticity is essential for cellular differentiation. Consistently, this plasticity mainly relies on interplay of the nucleus exterior with cytoskeletal components (actinomyosin machinery) and on chromatin dynamics driven through chromatin-NE interactions [42,43,179,167].

Changes in plasticity and nuclear deformation during cellular differentiation can be modulated by mechanical stresses. For example, sustained stresses have been shown to increase nuclear stiffness to levels similar to those found in differentiated cells [43]. This is likely to impact subnuclear structures such as Cajal Bodies [CB], which in turn interact with specific chromatin domains. For instance, CB physical association with SMN and coilin proteins becomes irreversible in response to mechanical loads [181], likely altering regulators of transcription and chromatin interactions. In summary, nuclear deformability linked to plasticity is highly dependent on the cytoskeletal organization and its physical link with the NE (**Figure 2**). Therefore, the nuclear compartment can be considered a mechanosensitive and mechanoresponsive element [182].

The nuclear envelope as a force-transmission interface cytoplasm-nucleus

The physical framework that sustains nuclear mechanical properties and mechanoresponsiveness is constituted by the nuclear envelope (NE). Because nuclear shape is stabilized by the interaction of cytoskeletal network with NE proteins [74, 54, 149,], NE protein composition is crucial for nuclear mechanics and a growing list of other processes. The NE lipidic bilayer is composed by the outer nuclear membrane (ONM), which is continuous with the endoplasmic reticulum, and by the inner nuclear membrane (INM). Transmembrane and integral proteins enrich both membranes. The main ONM components are the Klarsicht, ANC-1 and Syne type (KASH) proteins referred as nesprins, while the INM is enriched for LEM-3 domain proteins (LEM), LRR-PDZ proteins (LAP) and Sad1p/UNC-84 domain-proteins (SUN). An intraluminal space separates both membranes (30-100 nm) [166] constituting a site of interaction between INM and ONM components. For example, the nucleo-cytoskeleton linker complex and the nuclear pore complex (NPC) constitute two physical bridges of communication cytoskeleton-nucleoskeleton (**Figure 3**) [31, 32].

Proteomic studies of NE composition in different tissues (skeletal muscle, liver and leukocytes) have facilitated the discovery of tissue-specific NE proteins [50]. NE of naïve- versus phytohemagglutinin-activated lymphocytes for example, exhibit a major percentage of NE proteins (76%) in common between

both populations, while a smaller portion (14%) was present only in one of both states [184]. These results suggest that the differential NE components between naïve and active leukocytes maybe crucial for the activation program. However, little is known about the NE composition in cellular differentiation systems. Furthermore, the NE undergoes dramatic changes during several cellular processes such as cell division and senescence [184, 185], suggesting that NE-remodeling may play a role in cellular differentiation programs as well. Whether external mechanical forces influence differentiation through alterations in NE structure and composition is less well understood. However, we have observed that specific proteins such as lamin A and its precursor prelamin A, have different levels of expression across cell types, being more dominant in muscle cells, which is attributed, in part, to the mehcanophysical properties of the tissue. In addition, we recently reported that prelamin A is distributed at the NE in myoblast in a specific-fashion (discontinuous around the NE)[185b], which may be remodeled in response to differentiation signals, regulating the force-transmission path as well.

The NE is a highly adaptive structure and its deformability in response to mechanical cues has been confirmed. [43, 48, 74]. For example, MSC cultured in controlled stiffness substrates reflected that the NE is wrinkled and relaxed in soft substrate, while the nuclei are flattened on stiff substrate [164]. This adaptability is dependent on the mechanophysical properties of the NE lipid bilayer and nuclear lamina, which provide the NE with fluid and solid-viscoelastic properties, respectively [186]. Thus, the nucleus is a compressible structure, which deformability varies according to degree of cellular differentiation (**Figure 2**).

Nuclear lamina as an essential NE mechanoreceptor.

There is a third underlying proteinaceous layer, which is referred as nuclear lamina. This meshwork is composed of intermediate filaments type IV (lamin A, C, B1 and B2), which play a essential role in the structural integrity of the nucleus, chromosomal stability and chromatin organization [30, 187, 188, 189]. Type-A lamins in particular are functionally correlated with nuclear mechanophysical characteristics. Lamin A for instance, is overrepresented in tissues with high rigidity and elasticity (i.e. muscle and bone), providing stiffness to the nucleus as well [48, 74]. This also correlates with the abundance of ECM proteins such as Collagen I [48].

Lamin A is absent in progenitor cell nuclei as well as in nuclei of specific cell types that physiologically require a liquid state such as neutrophils, which have to migrate through tissues [53, 175, 190]. This implies that

nuclear deformability is may be extended to the whole cell, and provides functional advantage to specific cellular types. In contrast, lamin A protein increases nuclear stiffness in differentiated cells. This restriction of nuclear deformability is essential for cytoskeletal linkage, NE integrity, nuclear translocation of mechanoresponsive complexes and chromatin organization [53, 62]. Consistently, lamin A mutations increase deformability, raise susceptibility for nuclear membrane rupture and produce defects in nuclear-cytoskeletal link as well as mechanoresponsiveness [62].

Lamin A phosphorylation is also regulated differentially in response to mechanical cues such as stiffness of the substrates [48, 61]. For example, specific-phosphorylated lamin A events (i.e. S392p) are only detected in cells grown in soft substrates, where allow the lamin mobility and dynamic turnover. In contrast, the same site is not phosphorylated in stiff matrices, decreasing lamin A-solubility and strengthening the lamina [48]. Together, these evidences demonstrate the essential role of lamin A as a main mechanoregulator at the NE, which regulates nuclear mechanophysical properties mainly in differentiated cells through its ultra-structural modulation and subsequent major rearrangements.

In addition to lamin A, a large number of other proteins are linked to mechanotransduction at the NE as well. Proteins may localize to the nucleus in response to a mechanical cue, such as in the case of ATR, a checkpoint PI3-Kinase that localizes to the NE not only during prophase but also in response to compression loads [191]. Therefore it is reasonable to suggest that other NE proteins play a role in the force-transmission machinery cytoplasm-nucleus in differentiation processes. For example, other nuclear lamin components show differential distribution in the nucleus of non-differentiated and differentiated cells such as lamin B. Lamin B is localized mainly in the nucleoplasm in differentiated cells, in contrast with the undifferentiated counterparts, where it is purely localized at the NE. In contrast with lamin A, Lamin B is expressed ubiquitously and does not regulate nuclear plasticity [53, 175]. However, lamin B interacts with specific DNA domains, other NE partners and chromatin regulators (i.e. lamin A and LBR) [37, 40, 192, 193]. Therefore it is reasonable to suggest that the changes in lamin B distribution in differentiated cells may represent a spatiotemporal modulator of its interactions with repercussions at both the chromatin and transcriptional level. Furthermore, as a main structural component of the nuclear lamina, lamin B may also be a mechanoresponsive element. Together, these evidences strongly demonstrate the potential regulatory role of nuclear lamina constituents in response to mechanical cues, which are variable between the differentiation

states and dependent on gene expression, protein abundance, posttranslational modifications, localization at the NE and availability to interact directly or indirectly with cytoskeletal components for signal transduction pathways.

The nucleo-cytoskeleton linker complex: *the physical bridge between cytoplasm-nucleus*

Increasing evidence confirms the regulatory role of LINC in transmission of mechanical signals from the cytoplasm towards the nuclear compartment, which is achieved physically by the protein bridge referred as the nucleo-cytoskeleton linker complex (LINC). LINC is composed of Sun-Nesprin interactions and constitutes the protein bridge between cytoplasm and nucleoplasm in force-transmission pathways [22, 23, 194, 195]. Sun proteins are transmembrane proteins in the INM, comprising five members (Sun1–5). On the nucleoplasmic side, Sun proteins interact with NE components, such as NPC and lamins, through the amino-terminal domain, while the NE intraluminal carboxyl-end domains interact with the nesprin proteins. There are four major types of nesprin proteins (Nesprin1-4) and about 16 isoforms. Nesprins reside in the ONM: on the cytoplasmic side, nesprins interact with cytoskeletal components through the amino-terminal domain such as actin, dynein and kinesin [31, 32, 35]. In line with these interactions, actin polymerization (cytoplasmic and nuclear) is regulated by LINC in cell adhesion and cell spreading processes. For example, Sun1 and Sun2 proteins are essential for signal-transduction from ECM to nucleus in response to integrin-activation by fibronectin [60] [Plessner:2015if], which triggers nuclear actin polymerization. Interestingly, lamin A and emerin are also implicated in this signaling towards the nucleus, because downregulation of these proteins abrogates actin polymerization [60]. These observations are also consistent with LINC-dependent perinuclear actin cap stress fiber formation in response to mechanical cues, which are not detected in cells depleted of lamin A/C [22, 54].

Nesprins are enriched at different levels in specific cell types. The pattern of differential expression of nesprin genes may implicate differences in the protein abundance at the NE and in transmission of signals, which is confirmed by the differential distribution and isoforms in specific cellular types. For instance, nesprin-1 is localized to the NE in neuromuscular junctions [34, 196]. In contrast, nesprin-1 is found in the nucleoplasm in mouse muscle differentiated cells [23]. Nucleoplasmic localization renders nesprin-1 unavailable to interact with actin on the cytoplasmic side of the NE, strongly suggesting that its role in the LINC bridge is not required once myoblasts fuse to become differentiated muscle cells. Supporting this view,

nesprin-1 is mainly localized at the NE in myoblasts [197]. Altogether, this supports the hypothesis that different nesprins (or isoforms) form differential LINC bridges at the NE [198].

Nesprin-1 at the NE in myoblasts seems to be replaced by nesprin-2 or smaller isoforms upon differentiation to myotubules [197, 199]. In addition, the nesprin-1 LINC bridge in differentiated ESC regulates the NE intraluminal spacing, which is narrower than the NE in undifferentiated cells [200]. Therefore, the LINC complex actively regulates mechanical properties of the nucleus as well. Consistently, LINC disruption affects the NE intraluminal spacing, causing loss of nuclear stiffness and increasing deformability [200], which is itself directly coupled with misregulation of the actinomyosin machinery and cellular plasticity. This resembles the impairment of nuclear properties in fibroblasts lacking of lamin A [54, 74]. Furthermore, as a key component in nuclear mechanoregulation, LINC is essential for the mechanoresponse (i.e. nuclear displacements and perinuclear cytoskeletal organization) upon the application of applied forces (i.e. cytoskeletal strain) [22, 201].

MSC differentiation in response to mechanical loads provides one of the best examples of the role of LINC in the force-transmission pathway relevant for cellular differentiation. In particular, nesprin and Sun1 downregulation disrupt the differentiation of MSC cells in response to LMMS, enhancing adipogenic differentiation [47]. This is in contrast with what is observed in wild-type cells, where applied LMMS enhances MSC differentiation towards the osteogenic lineage. LINC ablation also impairs Rho GTPases signaling and subsequently cytoskeletal organization [47]. Interestingly, the translocation of TF and co-activators (i.e. BRCA and MTRFA) across the NE (cytoplasm-nucleus) in response to external signals has been found to be dependent on LINC components (i.e. nesprin-2 and Sun1-2), Ca^{2+} gradients as well as integrin activation by mechanical inputs [194, 195, 202]. Therefore, highlighting studies are starting to determine if those or other LINC-dependent translocation mechanisms are implicated in differentiation signals in response to mechanical inputs. Altogether, these evidences confirm that the differential abundance and localization of LINC constituents (nesprins and sun proteins), which vary between cell types, has an impact in their role as a mechanoregulators, enabling the nuclei to establish differential molecular bridges at the NE in response to mechanical stresses.

Crossing the NE by biochemical signals: mechanoresponsive translocation complexes

In addition to the physical role of LINC in mechanotransduction signaling, actin perinuclear remodeling and nuclear programs in response to mechanical loads are also connected by biochemical signals. For instance, the NE regulates the translocation of mechanoresponsive co-activators such as the MRTFA and YAP proteins, which will be briefly, summarized.

MRTF/SRF protein complexes

At the nuclear level, the regulation of gene expression of cytoskeletal adaptation proteins and tissue-specific genes in response to mechanical stimuli is orchestrated by serum responsive factor (SRF) binding to myocardin-related transcription factor A (MTRFA) [63]. MTRFA co-activator is retained and inactive when bound to G-actin in the cytoplasm [63,203]. Thus, MTRFA translocation from the cytoplasm to the nucleus is required for SRF activity. Substrate rigidity sensing by the cell for example, can lead to the cytoskeletal remodeling, controlling actin polymerization, which directly modulates the availability of G-actin/F-actin. Therefore MRTFA/SRF activity is ultimately regulated as a nuclear mechanoresponse [62,63,203].

In terms of cell differentiation, SRF trans-activates α -actin fiber genes in smooth muscle differentiation, enhancing the contractile smooth muscle phenotype. Mechanical loads over these muscle cells modulate the transactivation of the hypertrophic myocardin-dependent program in cardiomyocytes [204]. Also, the MTRFA/SRF complex positively regulates the genes *myoD*, *MEF2* and *MYOG* during myogenesis [9]. In addition, studies of MTRFA translocation in response to substrate geometrical constraints demonstrate this complex role in differentiation and the dependency on cytoskeletal organization, actinomyosin machinery and lamin A/C [43]. Therefore, actin dynamics (cytoplasmic and nuclear) are impaired by lamin A ablation and specific mutations (i.e. N145K), resulting in misregulation of MTRFA translocation and SRF dependent-transcription. Lamin A depletion alters the localization of its NE partners, such as emerin, causing also the retention of MTRFA in the cytoplasm [63]. Additionally, MTRFA translocation is impaired also upon the misregulation of the nuclear actin polymerization factor mDia1 [62]. Altogether, this evidence strongly suggests that MTRFA—cytoskeleton interplay is essential for cellular differentiation in specific systems, coupling nuclear mechanophysical and transcriptional states.

YAP/TAZ mechanoresponsive complex

Sensing of intracellular tension, paired with stress fiber formation and RhoGTPase-dependent actinomyosin activity, is essential for YAP/TAZ nuclear localization and its transcriptional activity is therefore a response to

mechanical cues as well. YAP is translocated to the nucleus as mechanoreponse [48, 64, 201, 205]. For example, YAP/TAZ complex is enriched in the nuclear compartment of cells grown on stiff substrates, in contrast it localizes in the cytoplasmic compartment on soft matrices [64]. Consistently, the expression of genes dependent of YAP/TAZ is upregulated in cells grown on high-stiffness substrates. Moreover, the role of YAP/TAZ in differentiation has been confirmed in MSC grown on stiff substrates, favoring differentiation towards osteogenic lineage [48]. Therefore, YAP/TAZ complex represents a key reader of ECM elasticity, cell geometry and mechanoregulator of differentiation.

YAP/TAZ is downregulated in lamin A null cells, which favor adipogenic differentiation when grown on soft matrices, similar to YAP/TAZ depletion. In contrast, the overexpression of lamin A maximizes osteogenic differentiation, as YAP/TAZ does in cell grown in stiff matrices. These effects in differentiation are paired with the formation of stress fibers, which are reduced in adipogenic MSC cells (YAP/TAZ /lamin A depletion) [48]. Furthermore, confirming this link ECM stiffness-Actin-NE (lamin A)-YAP/TAZ, several lamin A mutants (i.e. DelK32-P1, R249W and L380S) have difficulty to sense substrate-stiffness and to modulate cytoskeletal tension by the impairment of stress fibers and activation of the YAP signaling [205]. Additionally, nesprin-1 depletion reduces YAP responses [201], suggesting an active interplay between LINC complexes and YAP/TAZ.

VII. CHROMATIN: THE ULTIMATE MECHANOSENSOR

Gene expression is controlled by genetic and epigenetic regulatory mechanisms, both of which are constrained by the nuclear properties, such as the available nuclear space for TF exploration, global and local concentrations of TF, chromosomal organization and chromatin higher-order structures [203]. As a space-restricted organelle, the nucleus and its components (i.e. NE and chromatin), as well as the subnuclear structures (i.e. CB) are subjected to mechanical inputs derived from the cytoskeleton, which in turn arise from the ECM. Thus, gene expression is ultimately influenced by mechanical cues.

There is extensive research that has studied chromatin regulation and nuclear organization at the molecular level, which are beyond the focus of this review, however there are four general aspects to point out regarding chromatin dynamics in cellular differentiation, which presumably are also influenced by mechanical cues: 1) Chromosomal organization in response to differentiation and development pathways (i.e. chromosomal

territories); 2) Deposition and conformation dynamics of functional units at the NE (i.e. telomeres); 3) The global dynamic of chromatin domains and specific DNA-sequences anchored to the NE (i.e. Lamin associated-domains); and 4) The differential chromatin structure at the molecular level between pluripotent and differentiated cells (i.e. bivalent histone marks) [37, 74 176, 207, 208].

Chromosomes occupy specific discrete spatial domains in the nucleus, which are relatively cell-specific [209]. These chromosomal territories exhibit highly dynamic states that are translated in transcriptional activity outcomes, ultimately impacting cellular processes such a differentiation [207]. Whether or not mechanotransduction pathways influence the global DNA-organization has not been addressed yet. However, current knowledge of mechanoregulation is suggestive of chromosome territory remodeling upon mechanical cues. For example, forces generated in the cytoskeleton can impact chromosomal organization at a three-dimensional level [6, 42, 181]. In particular, telomeres are crucial for genomic stability and they have been reported anchored to the NE [210, 211]. Telomere localization and dynamics are responsive to mechanical cues. Specifically, telomere dynamics is dependent on cytoskeleton reorganization (actinomyosin machinery) triggered by geometrical constraints in the substrate on which the cells are grown. For example, isotropic shaped cells demonstrate higher mobility (telomere trajectories) than elongated polarized cells. Telomere dynamics is also correlated with the presence of lamin A at the NE, which is itself also upregulated in elongated polarized cells [74].

In general, chromatin in mammalian cells is highly dynamic, which is in part due to the correlation between nuclear volume and the ability of chromatin movement [174]. Since nuclear mechanophysical properties and size change dramatically in response to differentiation processes, as discussed above [176], chromatin dynamics (mobility) is also affected (directly or indirectly). Consistently, nuclear size and heterochromatic dynamic rates are higher in undifferentiated cells with highly deformable nuclei than in differentiated counterparts with non-deformable nuclei (**Figura 2**) [43, 53, 212].

Additionally, because chromatin dynamics increases in deformable nuclei in response to mechanical cues [42, 43, 74], perhaps undifferentiated cells are more susceptible to these changes. For example, heterochromatin foci exhibit higher displacements in isotropic shaped cells, while heterochromatin is more static in elongated polarized cells [74]. The genome organization in pluripotent cells is characterized by the low abundance of large heterochromatin domains. In contrast, heterochromatin domains in differentiated

cells are present in higher abundance [212]. Thus, chromatin in undifferentiated cells is structurally plastic and hyper-dynamic. The high histone turnover and enrichment of specific histone variants such as the linker histone patterns and H3.3, in pluripotent cells supports this idea [176,212]. Consistently, specific histones and epigenetic factors are more mobile in undifferentiated cells (i.e. HB2 and HP1). In contrast, chromatin is less mobile in differentiated cells and it is mainly composed by core histone proteins (H2A, H2B, H3, and H4), as well as more associated with nuclear lamina proteins at the NE [175, 213]. Furthermore, cytoskeletal organization is responsible of this chromatin dynamic in response to geometrical constrains that impact nuclear deformability, which is also essential in differentiation **(Figure 2)** [28, 43].

Since, cytoskeletal dynamic and then, lamin A/C protein regulates susceptibility to nuclear deformability upon mechanical inputs in differentiated cells (stiffer and non-deformable nucleus) [74], chromatin hyper-dynamism may be inversely regulated by presence of lamin A/C. In line with this hypothesis, one possibility is that lamin A/C also anchors specific chromatin domains at the NE and in its absence this contacts are not present [224], in parallel with its appearance at the onset of differentiation. This idea is supported by lamin A interaction with core histones [enriched and less mobile in differentiated cells) and indirectly with chromatin by NE protein partners such as lamin B, lap2 α , emerin and man-1 [214, 215]. Moreover, irreversible realignments of the chromatin fiber bundle and subnuclear components have been detected in response to sustained mechanical stresses [53].

Specific DNA domains attached to the NE dependent on Lamin B interactions are characterized by low gene density in a repressive chromatin state (lamin-associated domains, LADs) [37, 40, 216]. These domains are highly enriched for specific posttranslational modifications, such as lysine methylation of H3 histone (H3K27me3), and in some cases are demarcated by the binding factor of CCCTC (CTCF) [37]. LADs are highly dynamic in response to developmental signals, relocalizing inside the nucleus and impacting transcriptional activity; such is the case of Ikzf1 and Bcl11a [41]. In addition, repetitive DNA sequences (i.e. LINEs and Alu sequences) seem to stabilize chromosome position in the nucleus during interphase, tethering the DNA to the NE [174, 217]. Thus, in general, the NE is presumably a hub for heterochromatin, which also correlates with late replication regions [218]. Because the nuclear lamina is highly influenced by mechanical cues as discussed, the NE-tethered sequences are likely to be influenced upon mechanotransduction signals. This hypothesis can also extend to other NE components that anchor chromatin in specific processes (i.e.

Sun-1), since not all NE-DNA interactions depend on lamins [219,220]. On the other hand, chromatin dynamics in turn generates intranuclear mechanical forces that can also be transmitted to the NE, suggesting a bidirectional reinforcement mechanism at this level.

Specific histone epigenetic signatures play an essential role in the modulation and stabilization of the 'plastic' chromatin state in undifferentiated cells, characterized by H3K4 methylation and H3 acetylation [H3ac], in contrast with the chromatin in differentiated cells [212]. Consistently, cells under geometrical constraints that prompt a stiff nucleus showed diminishment of H3Ac, which is also accompanied with the increased expression of lamin A (as occurs in differentiated cells). This dynamic is also dependent by actinomyosin machinery (as the nuclear shape) [43]. Furthermore, a bivalent state of chromatin characterizes ES and pluripotent cell [positive and repressive histone marks). Both activating marks (i.e. H3K4me3) and repressive marks (i.e. H3K27me3) are present simultaneously on transcriptional start sites of a large number of developmentally regulated genes in pluripotent cells, while this bivalent state is absent in differentiated cells [208]. Therefore, the bivalent state of chromatin in ES cells may have a role in their plasticity, and may be remodeled by mechanotransduction processes that lead to differentiation. Although more work needs to be done to evaluate these possibilities, it is clear that chromatin can be considered as the ultimate mechanosensor as well as the ultimate mechanorespondor through its impact on genetic regulation.

CONCLUDING REMARKS

Studying the effect of mechanical stimulation on cellular systems is relevant for the development of novel biomaterials and therapies. For example, *in vitro*-cultured human embryos treated with micro-vibration have higher implantation rates [221,222]. Micro-vibration is also currently under investigation as a potential therapy for osteoporosis [80,223]. Therefore, understanding the molecular mechanisms in the ECM to nucleus force path is a potential major breakthrough for medicine. As this review has sought to summarize, mechanisms of mechanotransduction are highly diverse (i.e. LMMS vs HMMS mechanosensors) and consist of finely regulated chains of molecular events triggered by mechanical inputs that can ultimately influence differentiation. This occurs by the remodeling, activation, or displacement of non-cellular (ECM) and cellular components, which range from plasma membrane receptors to chromatin itself. In line with this idea, it is reasonable to hypothesize that higher-order chromatin arrangements are also under the influence of

mechanochemical regulation (**Figure 4**). Advances in mechanobiology raise many additional fascinating questions. Do there exist other unidentified mechanosensor modules? Are there other NE proteins that function as a biochemical/mechanical bridge for force transmission? Specifically which chromatin domains are remodeled in response to mechanical stimuli and what are the genes contained within these domains? Which other cellular systems can be mechano-induced? Clearly, much additional research is necessary for a complete understanding of mechanotransduction. However, as this review has sought to summarize, extensive interdisciplinary work in both biophysics and molecular biology has demonstrated the biological importance of key cellular mechanoregulators.

REFERENCES

1. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Bio* 123(Pt 24), 4195–4200. <http://doi.org/10.1242/jcs.023820>
2. Piccinini MA, Midwood KS. (2014). Illustrating the interplay between the extracellular matrix and microRNAs. *J Exp. Pathol.*, 95(3), 158–180. <http://doi.org/10.1111/iep.12079>
3. Jarvelainen H, Sainio A, Koulu M, Wight T, and Penttinen Risto. (2009). Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 61(2),198–223. <http://doi.org/10.1124/pr.109.001289>
4. Discher DE, Janmey P, Wang YL. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751), 1139–1143. <http://doi.org/10.1126/science.1116995>
5. Hynes RO (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673–687.
6. Swift J, Discher, DE. (2014). The nuclear lamina is mechano-responsive to ECM elasticity in mature tissue. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 14), 3005–3015. <http://doi.org/10.1242/jcs.149203>
7. Vogel V, Sheetz MP. (2009). Cell fate regulation by coupling mechanical cycles to biochemical signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(1), 38–46. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.002>
8. Engler, AJ, Sen, S, Sweeney, HL, Discher, DE. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126(4), 677–689. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
9. Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. (2003). Modulation of Rho GTPase Signaling Regulates a Switch between Adipogenesis and Myogenesis. *Cell*, 113(2), 147–158. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00271-X](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00271-X)
10. Shackelford LC. (2004). Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss. *Journal of Applied Physiology*, 97(1), 119–129. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00741.2003>
11. Guilak F, Cohen, DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke, W, Chen CS. (2009). Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell*, 5 (1), 17–26. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.016>
12. Singh P, & Schwarzbauer, J. E. (2012). Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis. *J Cell Sci*, 125(16), 3703–3712. <http://doi.org/10.1242/jcs.095786>
13. Kilian KA, Bugarija B, Lahn, BT, Mrksich M. (2010). Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(11), 4872–4877. <http://doi.org/10.1073/pnas.0903269107>
14. Sen, B., Guilluy, C., Xie, Z., Case, N., Styner, M., Thomas, J., et al. (2011). Mechanically Induced Focal Adhesion Assembly Amplifies Anti-Adipogenic Pathways in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 29(11), 1829–1836. <http://doi.org/10.1002/stem.732>

15. Choquet D, Felsenfeld DP, Sheetz MP. (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin and cytoskeleton linkages. *Cell*, 88(1), 39–48. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81856-5](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81856-5)
16. Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 3(5), 466–472. <http://doi.org/10.1038/35074532>
17. Hu, S, Chen J, Butler J P, Wang N. (2005). Prestress mediates force propagation into the nucleus. *Bioch Biophys Res Commun* 329(2), 423–428. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.026>
18. Janmey PA, (2007). Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu Rev Biomed Eng*, 9, 1–34. <http://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151927>
19. Bordeleau F, Alcoser T A, Reinhart-King, CA. (2014). The rocky road of metastasis: the role of cytoskeletal mechanics in cell migratory response to 3D matrix topography. *AJP: Cell Physiology*, 306(2), C110–C120. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2013>
20. Hohenester E. (2014). ScienceDirect Signalling complexes at the cell-matrix interface. *Curr Opin Struc Biol*, 29, 10–16. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.08.009>
21. Wang N, Butler, JP, Ingber DE. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260(5111), 1124–1127.
22. Kim DH, Khatau SB, Feng Y, Walcott, S, Sun, SX, Longmore, GD, Wirtz, D. (2012). Actin cap associated focal adhesions and their distinct role in cellular mechanosensing. *Sci Rep*, 2, 1–13. <http://doi.org/10.1038/srep00555>
23. Chambliss, AB, Khatau, SB, Erdenberger N., Robinson D K, Hodzic D, Longmore GD, Wirtz D (2013). The LINC-anchored actin cap connects the extracellular milieu to the nucleus for ultrafast mechanotransduction. *Scie Rep*, 3, 1–9. <http://doi.org/10.1038/srep01087>
24. Huveneers S, Danen, EHJ (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*, 122(8), 1059–1069. <http://doi.org/10.1242/jcs.039446>
25. Giannone, G., & Sheetz, M. P. (2006). Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends in Cell Biology*, 16(4), 213–223. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.02.005>
26. Galbraith, C. G., Yamada, K. M., & Sheetz, M. P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *The Journal of Cell Biology*, 159(4), 695–705. <http://doi.org/10.1083/jcb.200204153>
27. Sen, B, Xie Z, Case N, Thompson WR, Uzer G, Styner, M. Rubin J. (2013). mTORC2 Regulates Mechanically Induced Cytoskeletal Reorganization and Lineage Selection in Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Bone Min Res*, 29(1), 78–89. <http://doi.org/10.1002/jbmr.2031>
28. Toh KC, Ramdas NM, Shivashankar GV. (2015). Actin cytoskeleton differentially alters the dynamics of lamin A, HP1 α and H2B core histone proteins to remodel chromatin condensation state in living cells. *Integrative Biology : Quantitative Biosciences From Nano to Macro*, 7(10), 1309–1317. <http://doi.org/10.1039/c5ib00027k>
29. Butcher DT, Allison T, Weaver VM. (2009). A tense situation: forcing tumour progression., 9(2), 108–122.

<http://doi.org/10.1038/nrc2544>

30. Wilson, KL, Foisner R. (2010). Lamin-binding Proteins. *Cold Spring Harbor Perspecin Biology*, 2(4), a000554–a000554. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a000554>
31. Crisp, M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm. *J of Cell Biol*172(1), 41–53. <http://doi.org/10.1083/jcb.200509124>
32. Padmakumar, VC. (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci*118(15), 3419–3430. <http://doi.org/10.1242/jcs.02471>
33. Zhang, Q., Skepper, J. N., Yang, F., Davies, J. D., Hegyi, L., Roberts, R. G., et al. (2001). Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 24), 4485–4498.
34. Apel, E. D., Lewis, R. M., Grady, R. M., & Sanes, J. R. (2000). Syne-1, A Dystrophin- and Klarsicht-related Protein Associated with Synaptic Nuclei at the Neuromuscular Junction. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 31986–31995. <http://doi.org/10.1074/jbc.M004775200>
35. Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., et al. (2009). SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 Complexes Connect Centrosome to the Nucleus during Neurogenesis and Neuronal Migration in Mice. *Neuron*, 64(2), 173–187. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.018>
36. Fridolfsson, H. N., Ly, N., Meyerzon, M., & Starr, D. A. (2010). UNC-83 coordinates kinesin-1 and dynein activities at the nuclear envelope during nuclear migration. *Developmental Biology*, 338(2), 237–250. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.12.004>
37. Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., et al. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453(7197), 948–951. <http://doi.org/10.1038/nature06947>
38. Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K. K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., et al. (2001). BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 24), 4575–4585.
39. Melcer, S., & Meshorer, E. (2010). The Silence of the LADs: Dynamic Genome-Lamina Interactions during ESC Differentiation. *Stem Cell*, 6(6), 495–497. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.05.006>
40. Kind, J., Pagie, L., de Vries, S. S., Nahidiazar, L., Dey, S. S., Bienko, M., et al. (2015). Genome-wide Maps of Nuclear Lamina Interactions in Single Human Cells. *Cell*, 163(1), 134–147. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.040>
41. Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S. W. M., Solovei, I., Brugman, W., et al. (2010). Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Molecular Cell*, 38(4), 603–613. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.016>
42. Iyer, K. V., Pulford, S., Mogilner, A., & Shivashankar, G. V. (2012). Mechanical Activation of Cells Induces Chromatin Remodeling Preceding MKL Nuclear Transport. *Biophysj*, 103(7), 1416–1428. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.08.041>
43. Talwar, S., Jain, N., & Shivashankar, G. V. (2014). The regulation of gene expression during onset of differentiation by nuclear mechanical heterogeneity. *Biomaterials*, 35(8), 2411–2419. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.010>

44. Judex, S., Zhong, N., Squire, M. E., Ye, K., Donahue, L.-R., Hadjiargyrou, M., & Rubin, C. T. (2005). Mechanical modulation of molecular signals which regulate anabolic and catabolic activity in bone tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, 94(5), 982–994. <http://doi.org/10.1002/jcb.20363>
45. Rubin, C. T., Capilla, E., Luu, Y. K., Busa, B., Crawford, H., Nolan, D. J., et al. (2007). Adipogenesis is inhibited by brief, daily exposure to high-frequency, extremely low-magnitude mechanical signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(45), 17879–17884. <http://doi.org/10.1073/pnas.0708467104>
46. Vibration induced osteogenic commitment of mesenchymal stem cells is enhanced by cytoskeletal remodeling but not fluid shear. (2013). Vibration induced osteogenic commitment of mesenchymal stem cells is enhanced by cytoskeletal remodeling but not fluid shear., 46(13), 2296–2302. <http://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.06.008>
47. Uzer G, Thompson WR, Sen B, Xie Z, Yen SS, Miller S, Bas G, Styner M, Rubin CT, Judex S, Burrige K, Rubin J. (2015). Cell Mechanosensitivity to Extremely Low-Magnitude Signals Is Enabled by a LINCed Nucleus. *Stem Cells*, 33(6), 2063–2076. <http://doi.org/10.1002/stem.2004>
48. Swift, J., Ivanovska, I. L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P. C. D. P., Pinter, J., (2013). Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science*, 341(6149), 1240104–1240104. <http://doi.org/10.1126/science.1240104>
49. de las Heras J, Meinke P, Dzmitry G Batrakou, Srsen V, Zuleger N, Rw KA, Schirmer EC. (2013). Tissue specificity in the nuclear envelope supports its functional complexity, *Nucleus*, 4(6), 460–477. <http://doi.org/10.4161/nucl.26872>
50. Korfali N, Wilkie GS, Swanson SK, Srsen V, de Las Heras J, Batrakou DG, Malik P, Zuleger N, Kerr AR, Florens L, Schirmer EC. (2012). The nuclear envelope proteome differs notably between tissues., 3(6), 552–564. <http://doi.org/10.4161/nucl.22257>
51. Hetzer, M. W., Walther, T. C., & Mattaj, I. W. (2005). PUSHING THE ENVELOPE: Structure, Function, and Dynamics of the Nuclear Periphery. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 347–380. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151152>
52. Guttinger S, Laurell E, Kutay U. (2009). Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(3), 178–191. <http://doi.org/10.1038/nrm2641>
53. Pajerowski, J. D., Dahl, K. N., Zhong, F. L., Sammak, P. J., & Discher, D. E. (2007). Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(40), 15619–15624. <http://doi.org/10.1073/pnas.0702576104>
54. Khatau, S. B., Hale, C. M., Stewart-Hutchinson, P. J., Patel, M. S., Stewart, C. L., Searson, P. C., et al. (2009). A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(45), 19017–19022. <http://doi.org/10.1073/pnas.0908686106>
55. DuFort CC, Paszek J, Weaver V (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(5), 308–319. <http://doi.org/10.1038/nrm3112>
56. Ghassemi S, Meacci G, Liu S, Gondarenko AA, Mathur A, et al. (2012). Cells test substrate rigidity by local contractions on submicrometer pillars. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5328–5333. <http://doi:10.1073/pnas.1119886109>

57. Sawada Y, Tamada M, Dubin-Thaler BJ, Cherniavskaya O, Sakai R, Tanaka S, Sheetz MP. 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127: 1015–1026 <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.044>
58. Shao X, Li Q, Mogilner A, Bershadsky AD, Shivashankar GV. (2015). Mechanical stimulation induces formin-dependent assembly of a perinuclear actin rim. *112(20)*, E2595–E2601. <http://doi.org/10.1073/pnas.1504837112>
59. Pelham, R. J., & Wang, Y. L. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13661–13665.
60. Plessner, M., Melak, M., Chinchilla, P., Baarlink, C., & Grosse, R. (2015). Nuclear F-actin formation and reorganization upon cell spreading. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11209–11216. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.627166>
61. Buxboim, A., Swift, J., Irianto, J., Spinler, K. R., Dingal, P. C. D. P., Athirasala, A., et al. (2014). Matrix Elasticity Regulates Lamin-A,C Phosphorylation and Turnover with Feedback to Actomyosin. *Curbio*, 24(16), 1909–1917. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.001>
62. Ho, C. Y., Jaalouk, D. E., Vartiainen, M. K., & Lammerding, J. (2013). Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature*, 497(7450), 507–511. <http://doi.org/10.1038/nature12105>
63. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., & Treisman, R. (2003). Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL. *Cell*, 113(3), 329–342. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00278-2](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00278-2)
64. Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), 179–183. <http://doi.org/10.1038/nature10137>
65. Charras, G., & Sahai, E. (2014). Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nature Publishing Group*, 15(12), 813–824. <http://doi.org/10.1038/nrm3897>
66. Saha, K.; Keung, A.; Irwin, E.; Li, Y.; Little, L.; Schaffer, D.; Healy, K. (2008). Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophysical journal*, 95(9), 4426–4438. <http://doi.org/10.1529/biophysj.108.132217>
67. M.J. Paszek, N. Zahir, K.R. Johnson, J.N. Lakins, G.I. Rozenberg, A. Gefen, C.A. Reinhart-King, S.S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8(3), 241–254. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.010>
68. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. (2012). Actin stress fibers - assembly, dynamics and biological roles, *125(8)*, 1855–1864. <http://doi.org/10.1242/jcs.098087>
69. Deroanne, C. (2001). In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. *Cardiovascular Research*, 49(3), 647–658. [http://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00233-9](http://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00233-9)
70. McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., & Chen, C. S. (2004). Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Developmental Cell*, 6(4), 483–495. [http://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00075-9](http://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00075-9)
71. Wei, S. C., Fattet, L., Tsai, J. H., Guo, Y., Pai, V. H., Majeski, H. E. (2015). Matrix stiffness drives epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1–G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat Cell Biol*, 17(5), 678–688. <http://doi.org/10.1038/ncb3157>

72. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness. (2004). Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness, 166(6), 877–887. <http://doi.org/10.1083/jcb.200405004>
73. Gattazzo, F., Urciuolo, A., & Bonaldo, P. (2014). Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *BBA - General Subjects*, 1840(8), 2506–2519. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.010>
74. Makhija (2016). Nuclear deformability and telomere dynamics are regulated by cell geometric constraints. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(1), E32–E40. <http://doi.org/10.1073/pnas.1513189113>
75. E. K. F., Pang, S. W., & Leong, K. W. (2007). Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage. *Exp Cell Res*, 313(9), 1820–1829. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.02.031>
76. Christopherson, G. T., Song, H., & Mao, H.-Q. (2009). The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials*, 30(4), 556–564. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.004>
77. Janna V Serbo and Sharon Gerech (2013). Vascular tissue engineering: biodegradable scaffold platforms to promote angiogenesis., 4(1), 8. <http://doi.org/10.1186/scrt156>
78. Angele, P., Yoo, J. U., Smith, C., Mansour, J., Jepsen, K. J., Nerlich, M., & Johnstone, B. (2003). Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 21(3), 451–457. [http://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00230-9](http://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00230-9)
79. Shi ZD, Tarbell JM, (2011). Fluid flow mechanotransduction in vascular smooth muscle cells and fibroblasts., 39(6), 1608–1619. <http://doi.org/10.1007/s10439-011-0309>
80. Rubin, C., Turner, A. S., Bain, S., Mallinckrodt, C., & McLeod, K. (2001). Anabolism: Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature*, 412(6847), 603–604. <http://doi.org/10.1038/35088122>
81. Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., & Miyagawa-Tomita, S. (2014). Tenascin-C in development and disease of blood vessels. *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 297(9), 1747–1757. <http://doi.org/10.1002/ar.22985>
82. Mao, Y., & Schwarzbauer, J. E. (2005). Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology*, 24(6), 389–399. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.06.008>
83. Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115(Pt 20), 3861–3863.
84. Yamada, H., Sekikawa, T., Agawa, M., Iwase, S., Suzuki, H., & Horiguchi-Yamada, J. (2008). Adhesion to fibronectin induces megakaryocytic differentiation of JAS-REN cells. *Anticancer Research*, 28(1A), 261–266.
85. Ingham KC, Brew SA, Erickson H. (2004). Localization of a cryptic binding site for tenascin on fibronectin. *J Biol Chem.*, 279(27), 28132–28135. <http://doi.org/10.1074/jbc.M312785200>
86. Schwarzbauer EJ, DeSimone DW. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. (2011). *Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(7). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a005041>
87. White, D. G., Hershey, H. P., Moss, J. J., Daniels, H., Tuan, R. S., & Bennett, V. D. (2003). Functional

analysis of fibronectin isoforms in chondrogenesis: Full-length recombinant mesenchymal fibronectin reduces spreading and promotes condensation and chondrogenesis of limb mesenchymal cells. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 71(4-5), 251–261. <http://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2003.7104502.x>

88. Sakai, T., Larsen, M., & Yamada, K. M. (2003). Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature*, 423(6942), 876–881. <http://doi.org/10.1038/nature01712>

89. Pimton, P., Sarkar, S., Sheth, N., Perets, A., Marcinkiewicz, C., Lazarovici, P., & Leikes, P. I. (2011). Fibronectin-mediated upregulation of $\alpha 5\beta 1$ integrin and cell adhesion during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cell Adhesion & Migration*, 5(1), 73–82. <http://doi.org/10.4161/cam.5.1.13704>

90. Georges-Labouesse EN, George EL, Rayburn H, Hynes RO. (1996). Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Dev Dyn*, 207(2), 145–156. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199610\)207:2<145::AID-AJA3>3.0.CO;2-H](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199610)207:2<145::AID-AJA3>3.0.CO;2-H)

91. Wang, Y., Zhao, L., Smas, C., & Sul, H. S. (2010). Pref-1 Interacts with Fibronectin To Inhibit Adipocyte Differentiation. *Mol Cell Biol*, 30(14), 3480–3492. <http://doi.org/10.1128/MCB.00057-10>

92. Zhong, C., Chrzanowska-Wodnicka, M., Brown, J., Shaub, A., Belkin, A. M., & Burridge, K. (1998). Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *The Journal of Cell Biology*, 141(2), 539–551.

93. Michael L. Smith, Delphine Gourdon, William C. Little, Kristopher E. Kubow, R. Andresen Eguiluz, Sheila Luna-Morris, Viola Vogel (2007). Force-Induced Unfolding of Fibronectin in the Extracellular Matrix of Living Cells, 5(10), e268–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050268>

94. Moore, J., & Thibeault, S. (2012). Insights Into the Role of Elastin in Vocal Fold Health and Disease. *Journal of Voice*, 26(3), 269–275. <http://doi.org/10.1016/j.jvoice.2011.05.003>

95. Ciofani, G., Genchi, G. G., Liakos, I., Athanassiou, A., Mattoli, V., & Bandiera, A. (2013). Human recombinant elastin-like protein coatings for muscle cell proliferation and differentiation. *Acta Biomaterialia*, 9(2), 5111–5121. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.016>

96. Fujimoto, N., Tajima, S., & Ishibashi, A. (2000). Elastin peptides induce migration and terminal differentiation of cultured keratinocytes via 67 kDa elastin receptor in vitro: 67 kDa elastin receptor is expressed in the keratinocytes eliminating elastic materials in elastosis perforans serpiginosa. *Journal of Investigative Dermatology*, 115(4), 633–639. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00117.x>

97. Betre, H., Ong, S. R., Guilak, F., Chilkoti, A., Fermor, B., & Setton, L. A. (2006). Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials*, 27(1), 91–99. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.071>

98. Faury, G. (2001). [Role of elastin in the development of vascular function. Knock-out study of the elastin gene in mice]. *Journal De La Société De Biologie*, 195(2), 151–156.

99. Faury, G. (2001). Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathologie-Biologie*, 49(4), 310–325.

100. Gupta V, Grande-Allen K. (2006). Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc Res.*, 72(3), 375–383. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.08.017>

101. Arribas, S. M., Hinek, A., & González, M. C. (2006). Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(3), 771–791.
<http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.003>
102. Titze, I. R., Hitchcock, R. W., Broadhead, K., Webb, K., Li, W., Gray, S. D., & Tresco, P. A. (2004). Design and validation of a bioreactor for engineering vocal fold tissues under combined tensile and vibrational stresses. *Journal of Biomechanics*, 37(10), 1521–1529.
<http://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.01.007>
103. Kuttly, J. K., & Webb, K. (2010). Vibration stimulates vocal mucosa-like matrix expression by hydrogel-encapsulated fibroblasts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 4(1), 62–72.
<http://doi.org/10.1002/term.219>
104. Ricard-Blum S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(1), a004978–a004978.
<http://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
105. Klein T, Bischoff, R (2011). Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases., 41(2), 271–290. <http://doi.org/10.1007/s00726-010-0689-x>
106. Hopkins, D. R., Keles, S., & Greenspan, D. S. (2007). The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biology*, 26(7), 508–523. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.05.004>
107. Mauney, J., Volloch, V. (2010). Adult human bone marrow stromal cells regulate expression of their MMPs and TIMPs in differentiation type-specific manner. *Matrix Biology*, 29(1), 3–8.
<http://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.09.003>
108. Ishii, T., Asuwa, N. (2000). Collagen and elastin degradation by matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in aortic dissection. *Human Pathol*, 31(6), 640–646.
<http://doi.org/10.1053/hupa.2000.7642>
109. Van Doren, S. R. (2015). Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biology : J Intern Soc Matrix Biol*, 44-46, 224–231. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.005>
110. Wilson, D. G., Phamluong, K., Li, L., Sun, M., Cao, T. C., Liu, P. S., et al. (2011). Global defects in collagen secretion in a Mia3/TANGO1 knockout mouse. *The Journal of Cell Biology*, 193(5), 935–951.
<http://doi.org/10.1083/jcb.201007162>
111. Fernandes, H., Dechering, K., Van Someren, E., Steeghs, I., Apotheker, M., Leusink, A., et al. (2009). The role of collagen crosslinking in differentiation of human mesenchymal stem cells and MC3T3-E1 cells. *Tissue Engineering. Part A*, 15(12), 3857–3867. <http://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0011>
112. The cartilage extracellular matrix as a transient developmental scaffold for growth plate maturation. (2016). The cartilage extracellular matrix as a transient developmental scaffold for growth plate maturation, 52-54, 1–40. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.01.008>
113. Aumailley, M. (2013). The laminin family. *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), 48–55.
<http://doi.org/10.4161/cam.22826>
114. Li, S., Harrison, D., Carbonetto, S., Fässler, R., Smyth, N., Edgar, D., & Yurchenco, P. D. (2002). Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 157(7), 1279–1290. <http://doi.org/10.1083/jcb.200203073>
115. Kadoya, Y., Mochizuki, M., Nomizu, M., Sorokin, L., & Yamashina, S. (2003). Role for laminin-alpha5

chain LG4 module in epithelial branching morphogenesis. *Developmental Biology*, 263(1), 153–164.

116. Cameron, K., Tan, R., Schmidt-Heck, W., Campos, G., Lyall, M. J., Wang, Y., et al. (2015). Recombinant Laminins Drive the Differentiation and Self-Organization of hESC-Derived Hepatocytes. *Stem Cell Reports*, 5(6), 1250–1262. <http://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.016>
117. Klees, R. F., Salaszyk, R. M., Kingsley, K., Williams, W. A., Boskey, A., & Plopper, G. E. (2005). Laminin-5 induces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 16(2), 881–890. <http://doi.org/10.1091/mbc.E04-08-0695>
118. Klees, R. F., Salaszyk, R. M., Vandenberg, S., Bennett, K., & Plopper, G. E. (2007). Laminin-5 activates extracellular matrix production and osteogenic gene focusing in human mesenchymal stem cells. *Matrix Biology*, 26(2), 106–114. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.10.001>
119. Mruthunjaya, S., Manchanda, R., Godbole, R., Pujari, R., Shiras, A., & Shastry, P. (2010). Laminin-1 induces neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells in serum/differentiation factors-free conditions through activation of FAK-MEK/ERK signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1), 43–48. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.158>
120. Filenius, S., Hormia, M., Rissanen, J., Burgeson, R. E., Yamada, Y., Araki-Sasaki, K., et al. (2001). Laminin synthesis and the adhesion characteristics of immortalized human corneal epithelial cells to laminin isoforms. *Experimental Eye Research*, 72(1), 93–103. <http://doi.org/10.1006/exer.2000.0933>
121. Laminin-332 coordinates mechanotransduction and growth cone bifurcation in sensory neurons. (2011). Laminin-332 coordinates mechanotransduction and growth cone bifurcation in sensory neurons, 14(8), 993–1000. <http://doi.org/10.1038/nn.2873>
122. Ervasti, J. M., Campbell, K. P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *The Journal of Cell Biology*, 122(4), 809–823.
123. Schaefer L, Schaefer RM. (2009). Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules, 339(1), 237–246. <http://doi.org/10.1007/s00441-009-0821-y>
124. Kishioka, Y., Thomas, M., Wakamatsu, J.-I., Hattori, A., Sharma, M., Kambadur, R., & Nishimura, T. (2008). Decorin enhances the proliferation and differentiation of myogenic cells through suppressing myostatin activity. *Journal of Cellular Physiology*, 215(3), 856–867. <http://doi.org/10.1002/jcp.21371>
125. Suzuki, K., Kishioka, Y., Wakamatsu, J.-I., & Nishimura, T. (2013). Decorin activates Akt downstream of IGF-IR and promotes myoblast differentiation. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, 84(9), 669–674. <http://doi.org/10.1111/asj.12055>
126. Holmes, D. (2014). Stem cells: Decorin has role in differentiation. *Nature Reviews. Nephrology*, 10(2), 65–65. <http://doi.org/10.1038/nmeph.2013.271>
127. Chang, M. Y., Chan, C. K., Braun, K. R., Green, P. S., O'Brien, K. D., Chait, A., et al. (2012). Monocyte-to-macrophage differentiation: synthesis and secretion of a complex extracellular matrix. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 14122–14135. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.324988>
128. Moretto, P., Karousou, E., Viola, M., Caon, I., D'Angelo, M. L., De Luca, G., et al. (2015). Regulation of hyaluronan synthesis in vascular diseases and diabetes. *Journal of Diabetes Research*, 2015(1), 167283–9. <http://doi.org/10.1155/2015/167283>
129. Stern, R., Asari, A. A., & Sugahara, K. N. (2006). Hyaluronan fragments: an information-rich system.

European Journal of Cell Biology, 85(8), 699–715. <http://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.05.009>

130. Itano, N. (2008). Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan. *Journal of Biochemistry*, 144(2), 131–137. <http://doi.org/10.1093/jb/mvn046>

131. Davide Vigetti, Eugenia Karousou, Manuela Viola, Sara Deleonibus, Giancarlo De Luca, Alberto Passi . (2014). Hyaluronan: biosynthesis and signaling., 1840(8), 2452–2459. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.001>

132. Peterson, R. S., Andhare, R. A., Rousche, K. T., Knudson, W., Wang, W., Grossfield, J. B., et al. (2004). CD44 modulates Smad1 activation in the BMP-7 signaling pathway. *The Journal of Cell Biology*, 166(7), 1081–1091. <http://doi.org/10.1083/jcb.200402138>

133. Grazia Roncarolo, M., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., & Levings, M. K. (2006). Interleukin- 10- secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological Reviews*, 212(1), 28–50. <http://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x>

134. Bollyky PL, Bogdani M, Bollyky JB, Hull RL, Wight TN. (2012). The Role of Hyaluronan and the Extracellular Matrix in Islet Inflammation and Immune Regulation. *Curr Diab Rep*, 12(5), 471–480. <http://doi.org/10.1007/s11892-012-0297-0>

135. Chan C, Rolle M, Potter-Perigo S, Braun KR, Van Biber BP, Laflamme MA, Murry, C, Wight TN. (2010). Differentiation of cardiomyocytes from human embryonic stem cells is accompanied by changes in the extracellular matrix production of versican and hyaluronan. *J Cell Biochem*, 111(3), 585–596. <http://doi.org/10.1002/jcb.22744>

136. Kamiya, N., Watanabe, H., Habuchi, H., Takagi, H., Shinomura, T., Shimizu, K., & Kimata, K. (2006). Versican/PDGF-M regulates chondrogenesis as an extracellular matrix molecule crucial for mesenchymal condensation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(4), 2390–2400. <http://doi.org/10.1074/jbc.M509341200>

137. Wight, T. N., Kang, I., & Merrilees, M. J. (2014). Versican and the control of inflammation. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, 35, 152–161. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.01.015>

138. Mechanical stimulation of human tendon stem/progenitor cells results in upregulation of matrix proteins, integrins and MMPs, and activation of p38 and ERK1/2 kinases. (2015). Mechanical stimulation of human tendon stem/progenitor cells results in upregulation of matrix proteins, integrins and MMPs, and activation of p38 and ERK1/2 kinases, 16(1). <http://doi.org/10.1186/s12867-015-0036-6>

139. Aaron H. Morris ^a, Themis R. Kyriakides. (2014). Matricellular proteins and biomaterials., 37, 183–191. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.03.002>

140 Bornstein, P., & Sage, E. H. (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(5), 608–616.

141. Legate K, Wickstrom SA, Fassler R (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling., 23(4), 397–418. <http://doi.org/10.1101/gad.1758709>

142. Wierzbicka-Patynowski, I., & Schwarzbauer, J. E. (2002). Regulatory role for SRC and phosphatidylinositol 3-kinase in initiation of fibronectin matrix assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19703–19708. <http://doi.org/10.1074/jbc.M200270200>

143. Chen, Q., Shou, P., Zhang, L., Xu, C., Zheng, C., Han, Y., et al. (2014). An Osteopontin-Integrin Interaction Plays a Critical Role in Directing Adipogenesis and Osteogenesis by Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 32(2), 327–337. <http://doi.org/10.1002/stem.1567>
144. Docheva D, Popov C, Alberton P, Aszodi A. Integrin signaling in skeletal development and function. *Birth defects Res C Embryo Today*, 102(1), 13–36. <http://doi.org/10.1002/bdrc.21059>
145. Wang, N., Tytell, J. D., & Ingber, D. E. (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature Publishing Group*, 10(1), 75–82. <http://doi.org/10.1038/nrm2594>
146. Dong-Hwee Kim, Allison B. Chambliss, and Denis Wirtz. (2013). The multi-faceted role of the actin cap in cellular mechanosensation and mechanotransduction. *Soft Matter*, 9(23), 5516–5523. <http://doi.org/10.1039/C3SM50798J>
147. Carisey A, Ballestrem, C. (2013). Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. *Eur. J. Cell Biol.*, 23(4), 271–281. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.009>
148. Roca-Cusachs, P., del Rio, A., Puklin-Faucher, E., Gauthier, N. C., Biais, N., & Sheetz, M. P. (2013). Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by α -actinin triggers adhesion maturation. *Proc Natl Aca of Sci USA*, 110(15), E1361–70. <http://doi.org/10.1073/pnas.1220723110>
- 149 Lee SE, Kamm R, Mofrad M. (2007). Force-induced activation of talin and its possible role in focal adhesion mechanotransduction. *J Niomech*, 40(9), 2096–2106. <http://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.04.006>
- 150 Jonathan D. Humphries, Pengbo Wang, Charles Streuli, Benny Geiger, Martin J. Humphries, and Christoph Ballestrem. (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin., 179(5), 1043–1057. <http://doi.org/10.1083/jcb.200703036>
151. Gingras, A. R., Ziegler, W. H., Frank, R., Barsukov, I. L., Roberts, G. C. K., Critchley, D. R., & Emsley, J. (2005). Mapping and consensus sequence identification for multiple vinculin binding sites within the talin rod. *J of Biol Chem*, 280(44), 37217–37224. <http://doi.org/10.1074/jbc.M508060200>
152. Atherton, P., Stutchbury, B., Wang, D.-Y., Jethwa, D., Tsang, R., Meiler-Rodriguez, E., et al. (2015). Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. *Nature Communications*, 6, 10038. <http://doi.org/10.1038/ncomms10038>
153. Chang, Y.-C., Zhang, H., Franco-Barraza, J., Brennan, M. L., Patel, T., Cukierman, E., & Wu, J. (2014). Structural and mechanistic insights into the recruitment of talin by RIAM in integrin signaling. *Structure* (London, England : 1993), 22(12), 1810–1820. <http://doi.org/10.1016/j.str.2014.09.020>
154. Lai-Cheong JE, Ussar S, Arita K, Hart IR, McGrath JA. (2008). Colocalization of Kindlin-1, Kindlin-2, and Migfilin at Keratinocyte Focal Adhesion and Relevance to the Pathophysiology of Kindler Syndrome, 128(9), 2156–2165. <http://doi.org/10.1038/jid.2008.58>
155. Dowling, J. J., Vreede, A. P., Kim, S., Golden, J., & Feldman, E. L. (2008). Kindlin-2 is required for myocyte elongation and is essential for myogenesis. *BMC Cell Biology*, 9(1), 36–16. <http://doi.org/10.1186/1471-2121-9-36>
156. Ussar, S., Moser, M., Widmaier, M., Rognoni, E., Harrer, C., Genzel-Boroviczeny, O., Fässler, R. (2008). Loss of Kindlin-1 Causes Skin Atrophy and Lethal Neonatal Intestinal Epithelial Dysfunction. *PLoS*

Genetics, 4(12), e1000289–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000289>

157. Wu C, Jiao H, Lai, Y Zheng W, Chen K, Qu H, Deng W, Song P, Zhu K, Cao, Galson D, Fan , Liu, Y Ju Chen, Di Chen Xiao G. (2015). Kindlin-2 controls TGF- β signalling and Sox9 expression to regulate chondrogenesis. *Nat Commun*, 6, 7531. <http://doi.org/10.1038/ncomms8531>

158. Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., & Fässler, R. (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nature Med*, 14(3), 325–330. <http://doi.org/10.1038/nm1722>

159. Rognoni E, Widmaier M, Jakobson M, Ruppert R, Ussar S, Fässler R et al. (2014). Kindlin-1 controls Wnt and TGF- β ; availability to regulate cutaneous stem cell proliferation. *Nat Med*, 20(4), 350–359. <http://doi.org/10.1038/nm.3490>

160 Hirata, H., Tatsumi, H., & Sokabe, M. (2008). Mechanical forces facilitate actin polymerization at focal adhesions in a zyxin-dependent manner. *J Cell Science*, 121(17), 2795–2804. <http://doi.org/10.1242/jcs.030320>

161. Critchley, D. R. (2005). Genetic, biochemical and structural approaches to talin function. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 6), 1308–1312. <http://doi.org/10.1042/BST20051308>

162. del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J. M., & Sheetz, M. P. (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*, 323(5914), 638–641. <http://doi.org/10.1126/science.1162912>

163. Guolla, L., Bertrand, M., Haase, K., & Pelling, A. E. (2012). Force transduction and strain dynamics in actin stress fibres in response to nanonewton forces. *Journal of Cell Science*, 125(3), 603–613. <http://doi.org/10.1242/jcs.088302>

164. Guvendiren, M., & Burdick, J. A. (2010). The control of stem cell morphology and differentiation by hydrogel surface wrinkles. *Biomaterials*, 31(25), 6511–6518. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.037>

165. Gay, O., Gilquin, B., Nakamura, F., Jenkins, Z. A., McCartney, R., Krakow, D., et al. (2011). RefilinB (FAM101B) targets filamin A to organize perinuclear actin networks and regulates nuclear shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11464–11469. <http://doi.org/10.1073/pnas.1104211108>

166. Hetzer, M. W. (2010). The Nuclear Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), a000539–a000539. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a000539>

167. Khatau, S. B., Kusuma, S., Hanjaya-Putra, D., Mali, P., Cheng, L., Lee, J. S. H., et al. (2012). The Differential Formation of the LINC-Mediated Perinuclear Actin Cap in Pluripotent and Somatic Cells. *PLoS ONE*, 7(5), e36689. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036689>

168. Haase K, Al-Rekabi Z, & Pelling, A. E. (2014). Mechanical Cues Direct Focal Adhesion Dynamics. In *Mechanotransduction* (Vol. 126, pp. 103–134). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394624-9.00005-1>

169. Sordella. (2008). Dialogue between RhoA/ROCK and members of the Par complex in cell polarity., *14*(2), 150–152. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.015>

170. Mulloy JC, Cancelas JA, Filippi MD, Kalfa TA, Guo F, Zheng Y. (2010). Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies., *115*(5), 936–947. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-09-198127>

171. Otsu K, Harada H. (2015). Rho GTPases in ameloblast differentiation, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.jdsr.2015.09.001>
172. Navarro-Lérida I, Pellinen T, Calvo E, Del Pozo MA. (2015). Rac1 nucleocytoplasmic shuttling drives nuclear shape changes and tumor invasion., 32(3), 318–334. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.019>
173. Popov, C., Burggraf, M., Kreja, L., Ignatius, A., Schieker, M., & Docheva, D. (2015). Mechanical stimulation of human tendon stem/progenitor cells results in upregulation of matrix proteins, integrins and MMPs, and activation of p38 and ERK1/2 kinases. *BMC Molecular Biology*, 16(1), 6. <http://doi.org/10.1186/s12867-015-0036-6>
174. Gasser, S. M. (2002). Visualizing Chromatin Dynamics in Interphase Nuclei. *Science*, 296(5572), 1412–1416. <http://doi.org/10.1126/science.1067703>
175. Bhattacharya D1, Talwar S, Mazumder A, Shivashankar GV. (2009). Spatio-Temporal Plasticity in Chromatin Organization in Mouse Cell Differentiation and during Drosophila Embryogenesis, 96(9), 3832–3839. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.075>
176. Meshorer (2012). Hyperdynamic Plasticity of Chromatin Proteins in Pluripotent Embryonic Stem Cells, 22(1), 233–234. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.005>
177. Shin, J. W., Spinler, K. R., Swift, J., Chasis, J. A., Mohandas, N., & Discher, D. E. (2013). Lamins regulate cell trafficking and lineage maturation of adult human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(47), 18892–18897. <http://doi.org/10.1073/pnas.1304996110>
178. Kim, D.-H., & Wirtz, D. (2015). Cytoskeletal tension induces the polarized architecture of the nucleus. *Biomaterials*, 48, 161–172. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.023>
179. Nisha M. Ramdas N, Shivashankar GV. (2015). Cytoskeletal Control of Nuclear Morphology and Chromatin Organization, *J Mol Biol.*, 427(3), 695–706. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.008>
180. Alam, S., Lovett, D. B., Dickinson, R. B., Roux, K. J., & Lele, T. P. (2014). Nuclear Forces and Cell Mechanosensing. In *Mechanotransduction* (Vol. 126, pp. 205–215). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394624-9.00008-7>
181. Poh, Y.-C., Shevtsov, S. P., Chowdhury, F., Wu, D. C., Na, S., Dundr, M., & Wang, N. (2012). Dynamic force-induced direct dissociation of protein complexes in a nuclear body in living cells. *Nature Communications*, 3, 866–22. <http://doi.org/10.1038/ncomms1873>
182. Kaminski A, Fedorchak GR, Lammerding J.(2014). The Cellular Mastermind(?)—Mechanotransduction and the Nucleus. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 126, pp. 157–203). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394624-9.00007-5>
183. Korfali, N., Wilkie, G. S., Swanson, S. K., Srsen, V., Batrakou, D. G., Fairley, E. A. L., et al. (2010). The leukocyte nuclear envelope proteome varies with cell activation and contains novel transmembrane proteins that affect genome architecture. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 9(12), 2571–2585. <http://doi.org/10.1074/mcp.M110.002915>
184. Beaudoin J, Geilich D, Daigle N, Elis R, Ellenberg Jan (2002). Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina., 108(1), 83–96.
185. Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular Biology of the Cell*, 23(11), 2066–2075. <http://doi.org/10.1091/mbc.E11-10->

[0884](#)

- 185b. Casasola, A., Scalzo, D., Nandakumar, V., Halow, J., Recillas-Targa F; Groudine, M., Rincon-Arano, H. (2016) Prelamin A processing, accumulation and distribution in normal cells and laminopathy disorders. *Nucleus*, *Nucleus*,;7(1):84-102. <http://doi:10.1080/19491034.2016.115039>
186. Rowat, A. C., Lammerding, J., & Ipsen, J. H. (2006). Mechanical Properties of the Cell Nucleus and the Effect of Emerin Deficiency. *Biophysical Journal*, 91(12), 4649–4664. <http://doi.org/10.1529/biophysj.106.086454>
187. Meinke, P., & Schirmer, E. C. (2015). LINC'ing form and function at the nuclear envelope. *FEBS Letters*, 589(19PartA), 2514–2521. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.011>
188. Reddy, K. L., Zullo, J. M., Bertolino, E., & Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature*, 452(7184), 243–247. <http://doi.org/10.1038/nature06727>
189. Van de Vosse, D. W., Wan, Y., Wozniak, R. W., & Aitchison, J. D. (2010). Role of the nuclear envelope in genome organization and gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 3(2), 147–166. <http://doi.org/10.1002/wsbm.101>
190. Rowat, A. C., Jaalouk, D. E., Zwerger, M., Ung, W. L., Eydelnant, I. A., Olins, D. E., et al. (2013). Nuclear envelope composition determines the ability of neutrophil-type cells to passage through micron-scale constrictions. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(12), 8610–8618. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.441535>
191. Kumar, A., Mazzanti, M., Mistrik, M., Kosar, M., Beznoussenko, G. V., Mironov, A. A., et al. (2014). ATR Mediates a Checkpoint at the Nuclear Envelope in Response to Mechanical Stress. *Cell*, 158(3), 633–646. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.046>
192. Liokatis, S., Edlich, C., Soupsana, K., Giannios, I., Panagiotidou, P., Tripsianes, K., et al. (2012). Solution Structure and Molecular Interactions of Lamin B Receptor Tudor Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 1032–1042. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.281303>
193. Meuleman, W., Peric-Hupkes, D., Kind, J., Beaudry, J.-B., Pagie, L., Kellis, M., et al. (2013). Constitutive nuclear lamina-genome interactions are highly conserved and associated with A/T-rich sequence. *Genome Research*, 23(2), 270–280. <http://doi.org/10.1101/gr.141028.112>
194. Stewart-Hutchinson, P. J., Hale, C. M., Wirtz, D., & Hodzic, D. (2008). Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Experimental Cell Research*, 314(8), 1892–1905. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.02.022>
195. Lombardi, M. L., Jaalouk, D. E., Shanahan, C. M., Burke, B., Roux, K. J., & Lammerding, J. (2011). The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(30), 26743–26753. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.233700>
196. Zhen, Y.-Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A. A., & Korenbaum, E. (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 15), 3207–3222.
197. Randles, K. N., Lam, L. T., Sewry, C. A., Puckelwartz, M., Furling, D., Wehnert, M., et al. (2010). Nesprins, but not sun proteins, switch isoforms at the nuclear envelope during muscle development. *Developmental Dynamics*, 239(3), 998–1009. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22229>

198. Rajgor, D., & Shanahan, C. M. (2013). Nesprins: from the nuclear envelope and beyond. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 15, e5. <http://doi.org/10.1017/erm.2013.6>
199. Duong, N. T., Morris, G. E., Lam, L. T., Zhang, Q., Sewry, C. A., Shanahan, C. M., & Holt, I. (2014). Nesprins: Tissue-Specific Expression of Epsilon and Other Short Isoforms. *PLoS ONE*, 9(4), e94380. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094380>
200. Smith, E. R., Zhang, X.-Y., Capo-Chichi, C. D., Chen, X., & Xu, X.-X. (2011). Increased expression of Syne1/nesprin-1 facilitates nuclear envelope structure changes in embryonic stem cell differentiation. *Developmental Dynamics*, 240(10), 2245–2255. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22717>
201. Driscoll, T. P., Cosgrove, B. D., Heo, S.-J., Shurden, Z. E., & Mauck, R. L. (2015). Cytoskeletal to Nuclear Strain Transfer Regulates YAP Signaling in Mesenchymal Stem Cells. *Biophysj*, 108(12), 2783–2793. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.05.010>
202. Kelkar, P., Walter, A., Papadopoulos, S., Mroß, C., Munck, M., Peche, V. S., & Noegel, A. A. (2015). Nesprin-2 mediated nuclear trafficking and its clinical implications. *Nucleus*, 6(6), 479–489. <http://doi.org/10.1080/19491034.2015.1128608>
203. Medjanke S, Perez Sanchez C, Gaglioli C, Sahai E, Treisman R. (2009). Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metástasis. *Nat Cell Bio*, 11(3), 257–268. <http://doi.org/10.1038/ncb1833>
204. Hellstrand, P., & Albinsson, S. (2005). Stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle: role of the actin cytoskeleton. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 83(10), 869–875. <http://doi.org/10.1139/y05-061>
205. Bertrand, A. T., Ziaei, S., Ehret, C., Duchemin, H., Mamchaoui, K., Bigot, A., et al. (2014). Cellular microenvironments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors. *Journal of Cell Science*, 127(13), 2873–2884. <http://doi.org/10.1242/jcs.144907>
206. Maxime Woringer, Xavier Darzacq and Ignacio Izeddin (2014). Geometry of the nucleus: a perspective on gene expression regulation., 20, 112–119. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.009>
207. Cremer, T., & Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), a003889–a003889. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a003889>
208. Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 315–326. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>
209. Cremer, T., & Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, 2(4), 292–301. <http://doi.org/10.1038/35066075>
210. Shibuya, H., Hernández-Hernández, A., Morimoto, A., Negishi, L., Höög, C., & Watanabe, Y. (2015). MAJIN Links Telomeric DNA to the Nuclear Membrane by Exchanging Telomere Cap. *Cell*, 163(5), 1252–1266. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.030>
211. Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106(6), 661–673.
212. Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler, Brown DT, Misteli, T. (2006). Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell*, 10(1), 105–116. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.10.017>

213. Kimura, H., & Cook, P. R. (2001). Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J Cell Biol.*153(7), 1341–1353.
214. Berk, J. M., Simon, D. N., Jenkins-Houk, C. R., Westerbeck, J. W., Grønning-Wang, L. M., Carlson, C. R., & Wilson, K. L. (2014). The molecular basis of emerin-emerin and emerin-BAF interactions. *J Cell Scie*, 127(Pt 18), 3956–3969. <http://doi.org/10.1242/jcs.148247>
215. Simon, D. N., & Wilson, K. L. (2011). The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic “network of networks.” *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(11), 695–708. <http://doi.org/10.1038/nrm3207>
216. Zullo, J. M., Demarco, I. A., Piqué-Regi, R., Gaffney, D. J., Epstein, C. B., Spooner, C. J., et al. (2012). DNA sequence-dependent compartmentalization and silencing of chromatin at the nuclear lamina. *Cell*, 149(7), 1474–1487. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.035>
217. Olins, A. L., Ishaque, N., Chotewutmontri, S., Langowski, J., & Olins, D. E. (2014). Retrotransposon Alu is enriched in the epichromatin of HL-60 cells. *Nucleus*, 5(3), 237–246. <http://doi.org/10.4161/nucl.29141>
218. Dekker, J., & Misteli, T. (2015). Long-Range Chromatin Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(10), a019356–24. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a019356>
219. Ding, X., Xu, R., Yu, J., Xu, T., Zhuang, Y., & Han, M. (2007). SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Develop Cell*, 12(6), 863–872. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.018>
220. Amendola, M., & van Steensel, B. (2015). Nuclear lamins are not required for lamina-associated domain organization in mouse embryonic stem cells. *EMBO Rep*, 16(5), 610–617. <http://doi.org/10.15252/embr.201439789>
221. Isachenko, V., Maettner, R., Sterzik, K., Strehler, E., Kreinberg, R., Hancke, K., et al. (2011). In-vitro culture of human embryos with mechanical micro-vibration increases implantation rates. *Reproductive Biomedicine Online*, 22(6), 536–544. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.02.006>
222. El-Danasouri, I., Sandi-Monroy, N. L., Winkle, T., Ott, K., Krebs, C., Maas, D. H. A., & Gagsteiger, F. (2014). Micro-vibration culture of human embryos improves pregnancy and implantation rates. *Fertility and Sterility*, 102(3), e217. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.732>
223. Gilsanz V, AL Wren T, Sanchez M, Dorey F, Judex S, Rubin C. (2006). Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *J Bone Miner Res.*, 21(9), 1464–1474. <http://doi.org/10.1359/jbmr.060612>
224. Bronshtein, I., Kepten, E., Kanter, I., Berezin, S., Lindner, M., Redwood, A. B., et al. (2015). Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior. *Nat Commun*, 6, 8044. <http://doi.org/10.1038/ncomms9044>

Figure 1. Mechanical cues known to be detectable by cellular systems and their role in differentiation.

A. Substrate compliance: Rigidity sensing in high stiffness tissues (ECM Collagen I-enriched) by cellular receptors (integrins) triggers assembly of mechanosensitive modules (FA-maturation), cytoskeletal reorganization and NE linkage. NE stiffness is also increased by lamin A expression in rigid tissues and ECM substrates. Altogether, these factors trigger cellular differentiation. **B. Substrate topology sensing:** MSC grown in fibronectin-micropatterned substrates differentiate according to the morphology that they are restricted to adopt. Specific FA complex sites and cytoskeletal reorganization accompany the resulting cellular differentiation. Top: Flower-like shape renders adipocyte differentiation. Bottom: stellate shape induces osteogenic differentiation. **C. Applied mechanical forces:** Low-magnitude-mechanical signals over MSC induce osteoblastic differentiation.

Figure 2. Nuclear mechanophysical properties change dramatically with the progressive loss of cellular plasticity and chromatin mobility upon both differentiation and mechanical loads.

Potential role of mechanical forces applied to undifferentiated cells (i.e. MSC), in which cellular plasticity is correlated with nuclear deformability and chromatin dynamics (**left**), in contrast with nuclei of differentiated cells (**right**). We propose that mechanical cues triggering cellular differentiation (i.e. LMMS and geometric constrains) are likely to induce progressive gain of nuclear stiffness by lamin A/C upregulation, which, in turn, may prompt the stability for new NE contacts, resulting in progressive loss of chromatin hyperdynamism. In addition, because the LINC physical bridge is essential for transmission of specific forces (i.e. LMMS), as well as for the regulation of biochemical mechanoresponsive signals (i.e. MTRF/SRF); LINC constitutes other potential candidate as a DNA-anchor that may be mechanoresponsive as well.

Figure 3. The nuclear envelope: an essential connection between cytoplasm and nucleus.

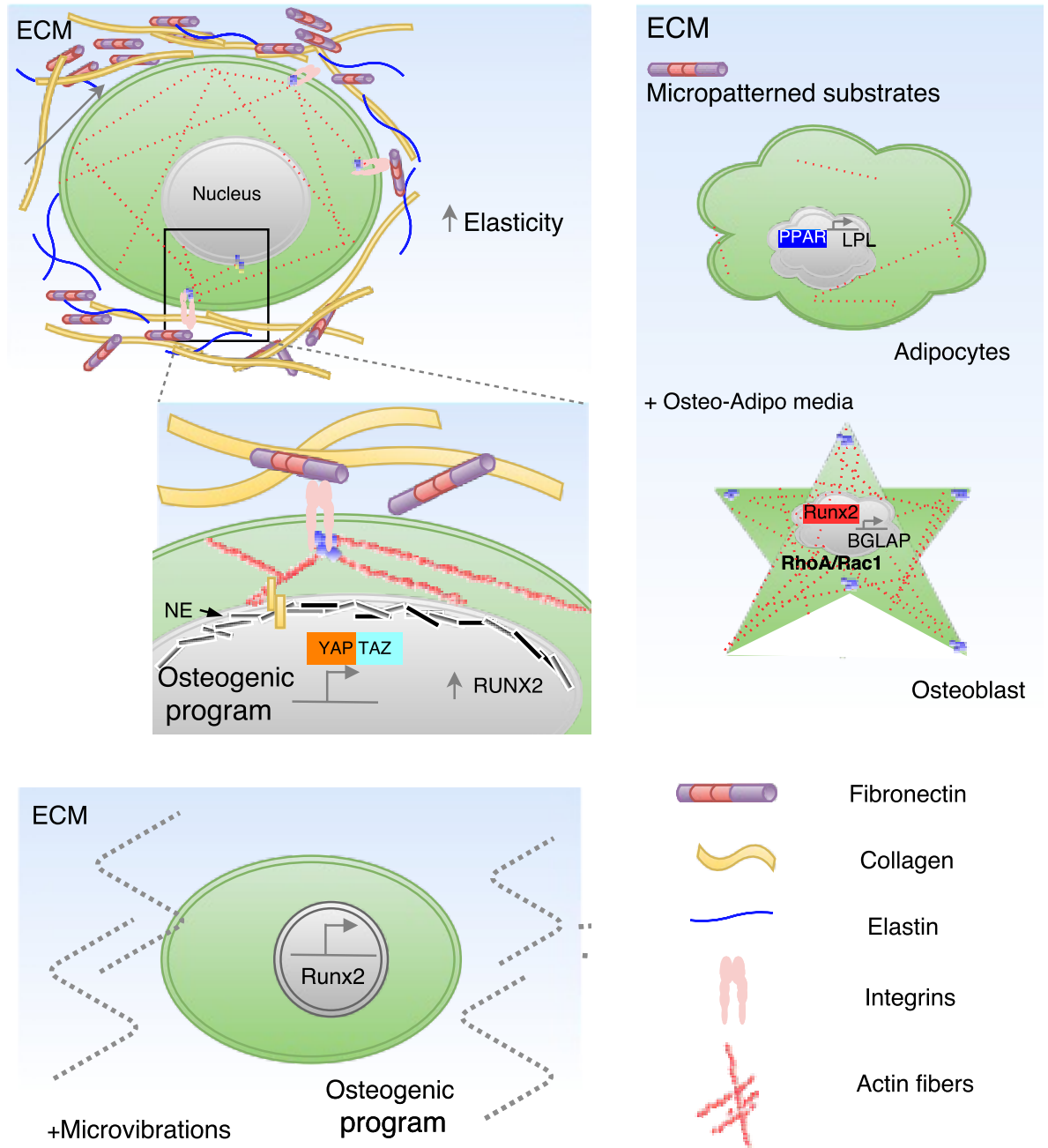
Physical molecular bridges that regulate force transmission from the cytoplasm to the nucleus: LINC and NPC. LINC is composed by the Sun proteins at the INM, which in turn interact with the ONM-attached nesprins in the intraluminal space (Amplified section 1). In contrast, the NPC is a macromolecular module of nucleoporins and other proteins, which regulate the transport to the NE (Amplified section 2). In addition, a large number of trans-membranal proteins of the NE may be essential for mechanotransduction and intranuclear signaling in a bidirectional-fashion.

Figure 4. Distinct mechanosensors are assembled in response to distinct mechanical loads.

LMMS induces the osteogenic program in MSC, which is dependent on the biochemical linkage constituted by Rho-GTPase pathways. This in turn regulates cytoskeletal organization, which is physically connected with the nucleus by the LINC complex. Because rigidity sensing and shear stress sensing in MSC forms specialized

focal adhesions and actin cap perinuclear fibers, which are also connected to the NE by LINC complex, we suggest that this network may be involved in LMMS transmission. In contrast, the cytoplasm-nucleus connection does not depend of LINC complex in response to HMMS. Finally, the three-dimensional organization of chromosomes may undergo relevant rearrangements at both the chromatin-domain and global level in response to distinct mechanical forces.

Figure 1. Casasola et al. 2016



Cytoplasm

Figure 2.

Casasola et al., 2016

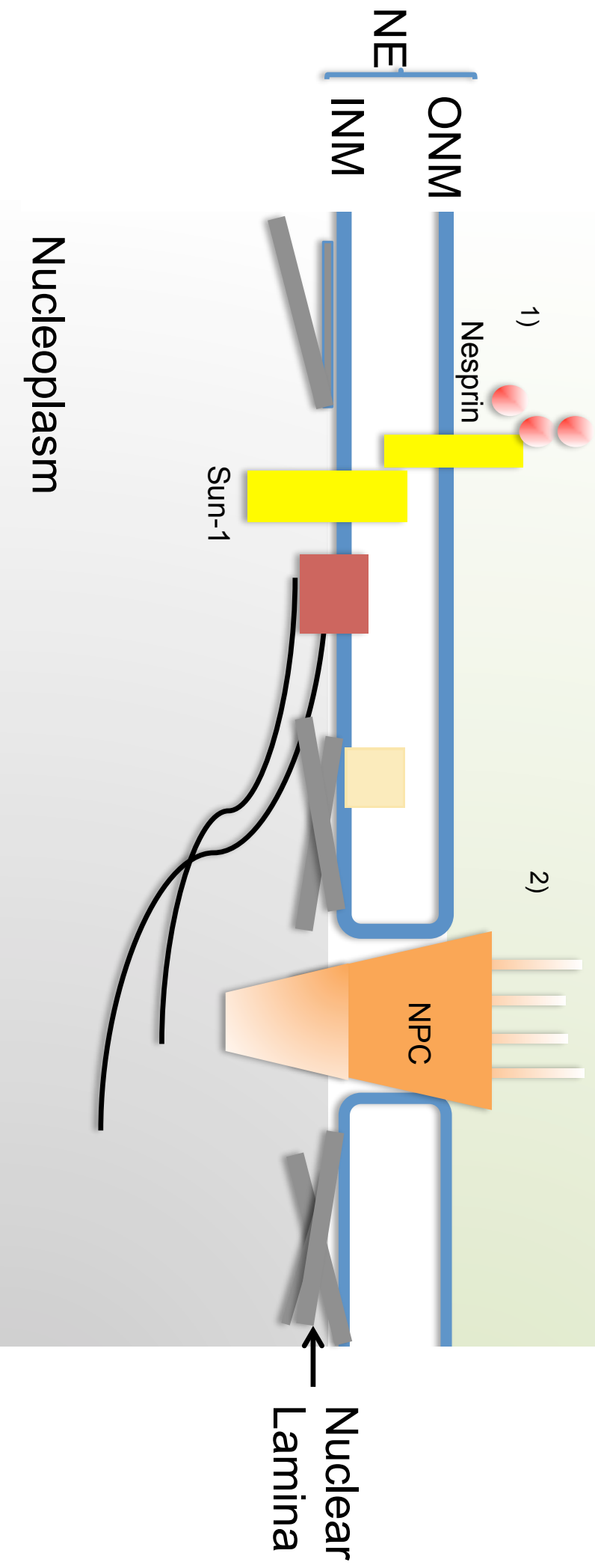


Figure 3. Casasola et al., 2016

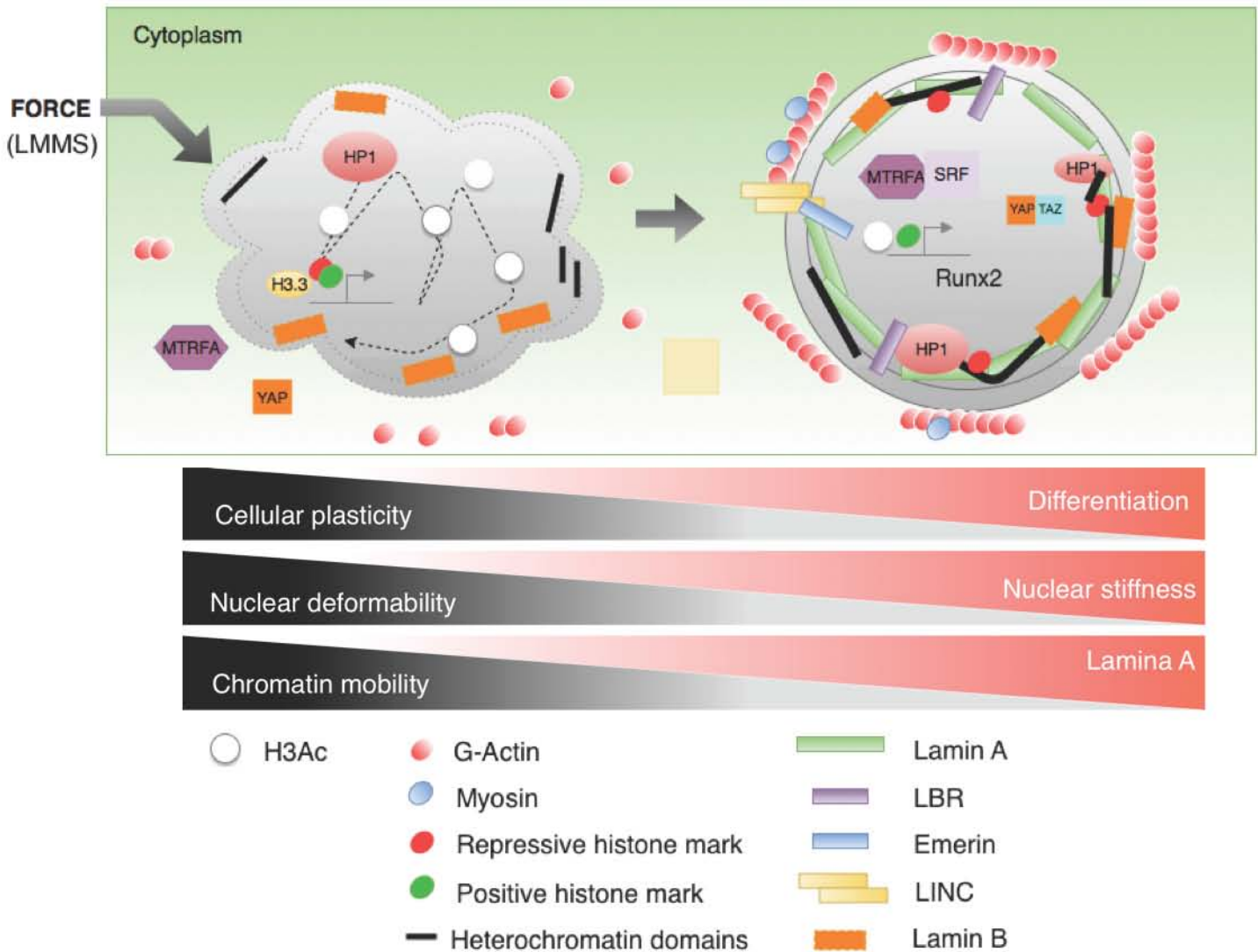
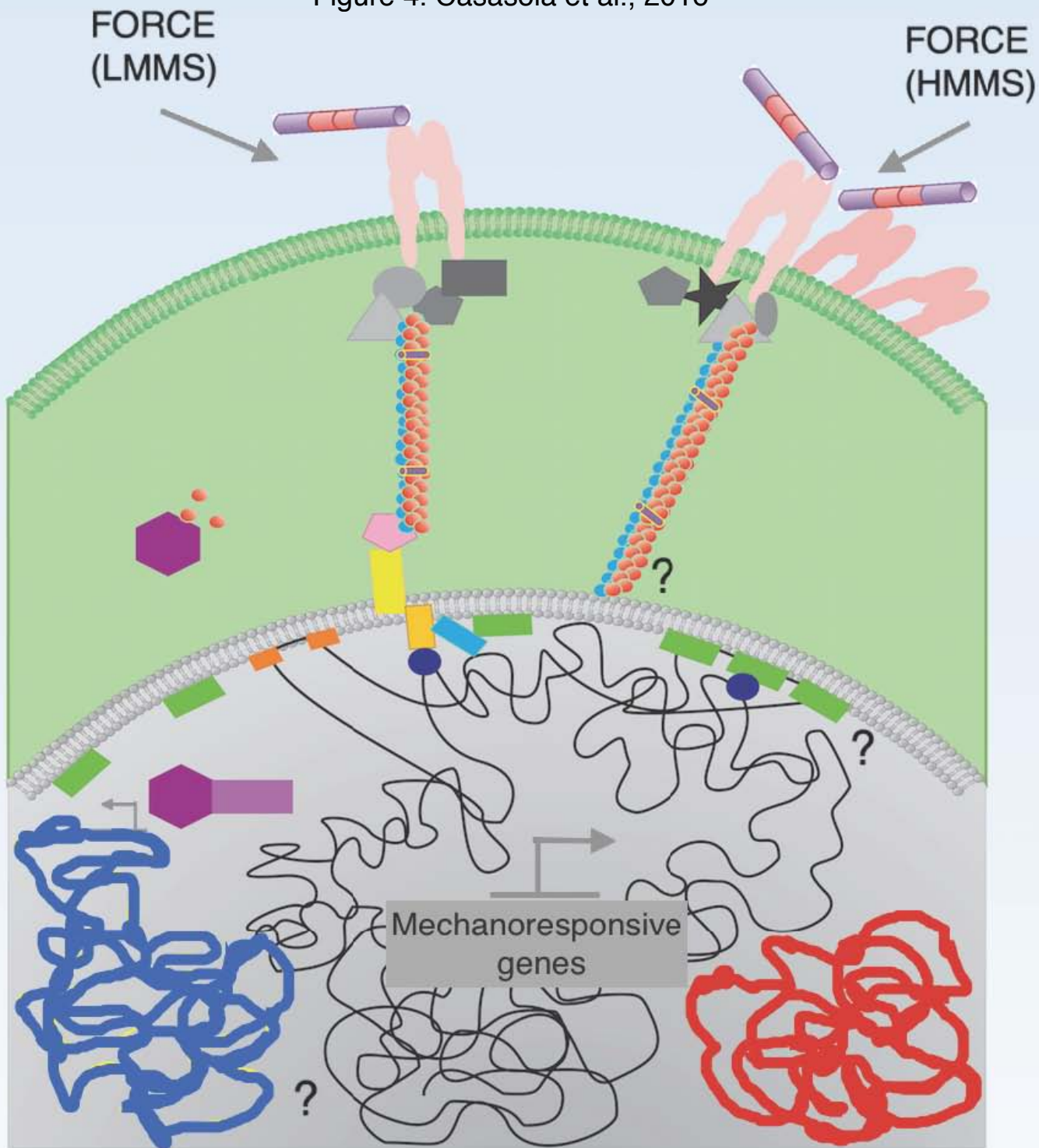


Figure 4. Casasola et al., 2016



- | | | |
|----------|-------------|-------------|
| Akt | MTRFA | SRF |
| Paxilin | Actin | Emerin |
| FAK | Alpha-actin | BAF |
| Vinculin | Kinesin-1 | Lamin A |
| Talin | Nesprin-1 | Fibronectin |
| Kindlin | Sun-1 | |