



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Relevancia del exporte nuclear del
 β -Distroglicano sobre la organización de la envoltura nuclear**

TESIS

que presenta:

Q.F.B Guadalupe Elizabeth Jiménez Gutiérrez

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias

En la especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis

Doctor Bulmaro Cisneros Vega

México, D.F.

Agosto, 2015

ÍNDICE

1. Resumen/Summary.....	5
2. Introducción.....	7
1.1 El Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPCs).....	7
1.2 El Distroglicano.....	9
1.2.1 El α - Distroglicano.....	9
1.2.2 El β -Distroglicano.....	9
1.3 Funciones del β -Distroglicano.....	9
1.4 La envoltura nuclear.....	11
1.5 El transporte nucleoplásmico.....	20
1.5.1 El importe Nuclear.....	20
1.5.2 El Exporte Nuclear.....	20
3. Antecedentes.....	23
4. Justificación.....	26
5. Hipótesis.....	26
6. Objetivo general.....	26
7. Objetivos particulares.....	26
8. Metodología.....	28
9. Resultados.....	36
10. Discusión	50
11. Conclusiones y perspectivas.....	53
12. Bibliografía.....	54

Agradecimientos:

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de CONACYT, el cual se encargó del financiamiento a través del otorgamiento de la beca con número 442402.

Agradecimientos:

Al Doctor Bulmaro Cisneros Vega, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por ser el mejor jefe del mundo y por siempre estar dispuesto a escuchar las inquietudes de sus alumnos.

A Gris Velez, por todo tu apoyo, paciencia, por enseñarme y por ayudarme tanto en este que es tu proyecto, gracias por todo mamá Grish.

Al doctor Efraín Garrido Guerrero, por sus valiosas observaciones a mi proyecto, por su tiempo y por sus atenciones para hacer de este una mejor tesis. También por ser un excelente profesor durante mis clases de maestría.

A la doctora Doris Atenea Cerecedo por brindarme parte de su tiempo y atención para mi proyecto y por ser una buena asesora.

A Pablo Gómez, gracias por tanto apoyo que me brindaste en el laboratorio y por todas tus observaciones durante los seminarios.

A Gaby Mora, porque ser secretaria del departamento de genética no es nada fácil, gracias por toda tu paciencia.

Agradecimientos:

A Dios, por haberme dado la dicha de la vida y de tener a la mejor familia del mundo que me apoya a donde quiera que vaya.

A mis padres, Ema Gutiérrez y José Alfredo Jiménez, gracias por siempre estar a mi lado, por sacrificarse por mis hermanos y por mi, por trabajar tan duro para darnos lo mejor de ustedes, son lo más importante para mi y estoy orgullosa de tener unos papás como ustedes.

A mi hermano Miguel, por el simple hecho de ser mi hermano, por su ayuda en las buenas y en las malas, por ser de mis mejores amigos.

A mi hermano Fredy, por enseñarme lo que es tener un carácter fuerte, por enseñarme el valor del trabajo y por ser mi hermano el pequeño, Chang.

A todos mis amigos de Guadalajara Xóchitl, iLits, Cristy, Leslii, Alets, los quiero por montones.

A mis amiguitos del departamento de química y a todo el grupo de los bebés <3 : Diego, Octavio, Aldo, Tania, Javier, Anita y Feri bb. :D 😊 😊

A Sandy Soto, mi gran y mejor amiga del DF.

A Marco Flores, alias Marquillii, por estar siempre presente para ayudarme 😊.

A mi roomie Tania, más que una roomie, una gran amiga.

A Joaquín, por todos los buenos momentos y por tu ayuda 😊

A mis compañeros del laboratorio: Arii, Riquii, Gris, Marco, Viri, Juan de Dios, Wendy, Nely, Ruth.

RESUMEN

El β -Distroglicano (β -DG) es una proteína transmembranal involucrada en diferentes procesos, incluyendo señalización celular, adhesión celular y remodelación del citoesqueleto. Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró que el β -DG es transportado al núcleo por medio de una señal de localización nuclear (NLS), localizada en el dominio yuxtamembranal de la proteína, que es reconocida por las importinas $\alpha 2/\beta 1$. En el núcleo el β -DG interacciona con las proteínas de envoltura nuclear emerina, lámina B1 y lámina A/C para regular la arquitectura nuclear y el funcionamiento de la envoltura nuclear. Recientemente demostramos que el β -DG se exporta del núcleo hacia el citoplasma mediante una señal de exporte nuclear (NES) localizada en los aminoácidos ⁷⁶³ILLIAGIIAM⁷⁷², la cual es reconocida por la exportina CRM1. Por lo tanto, los niveles nucleares del β -DG se regulan finamente mediante ciclos de importe/exporte nuclear de la proteína.

En este trabajo analizamos la relevancia del exporte nuclear del β -DG sobre la organización de la envoltura nuclear. Evidenciamos que la acumulación nuclear anormal del β -DG altera la distribución de la emerina y la lámina B1 pero no la de lámina A/C, lo que consecuentemente altera una de las funciones de la envoltura nuclear, el correcto posicionamiento de los centrosomas cercanos a la envoltura nuclear y disgregación de nucléolos.

En conclusión, nuestros resultados muestran que el exporte nuclear del β -DG es crucial para evitar la acumulación nuclear aberrante y definir de esta manera los niveles precisos de la proteína que se requieren para el correcto funcionamiento de la envoltura nuclear.

SUMMARY

β -Dystroglycan (β -DG) is a transmembrane protein involved in cell signaling, adhesion, and cytoskeleton remodeling. Recently our research group showed that β -DG is imported into the nucleus through recognition of a nuclear localization signal (NLS), located in the juxtamembranal region of the protein, by importins α 2/ β 1. Once in nucleus, β -DG associates with emerina, lamin b1 and lamin A/C to modulate nuclear architecture and function. Interestingly β -DG is a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, its nuclear export is mediated by a nuclear export signal (NES) NES located within ⁷⁶³ILLIAGIIAM⁷⁷², and the exportin CRM1. Then, nuclear levels of β -DG are tightly regulated by cycles of nuclear import/export.

In this study we analyzed the impact of β -DG nuclear export deregulation on the distribution of nuclear envelope proteins, using GFP- β -DG and the NES mutant variant, GFP- β -DG NESmut fusion proteins. We showed that abnormal accumulation of β -DG in the nucleus results in altered distribution of emerina and lamin B1 but not lamin A/C. Such perturbations cause in turn defective functioning of nuclear envelope, evidenced by incorrect centrosome positioning and nucleoli disaggregation.

Overall, our results reveal that nuclear export of β -DG prevents its aberrant nuclear accumulation, determining the precise levels of the protein required for proper nuclear envelope structure and function.

INTRODUCCIÓN:

Los Complejos de Proteínas Asociados a Distrofina (DAPCs)

El músculo esquelético es un tejido dinámico que rutinariamente se somete en cada contracción a una gran tensión mecánica y deformación celular. El sarcolema mantiene su integridad debido al Complejo de Proteínas Asociadas o Distrofina [DAPC, por sus siglas en inglés] el cual contiene dominios de membrana especializados que son claves para la unión de la matriz celular y el citoesqueleto, anclando a las células a la matriz extracelular y participando también en procesos de señalización (Gumerson and Michele 2011) (Deyst, Bowe et al. 1995).

El DAPC está compuesto por diferentes proteínas transmembranales (dístroglicanos y sarcoglicanos), y citoplásmicas (dístrobrevinas, sintrofinas y sarcospan), las cuales son abundantes en el sarcolema (**Figura 1**) (Gumerson and Michele 2011).

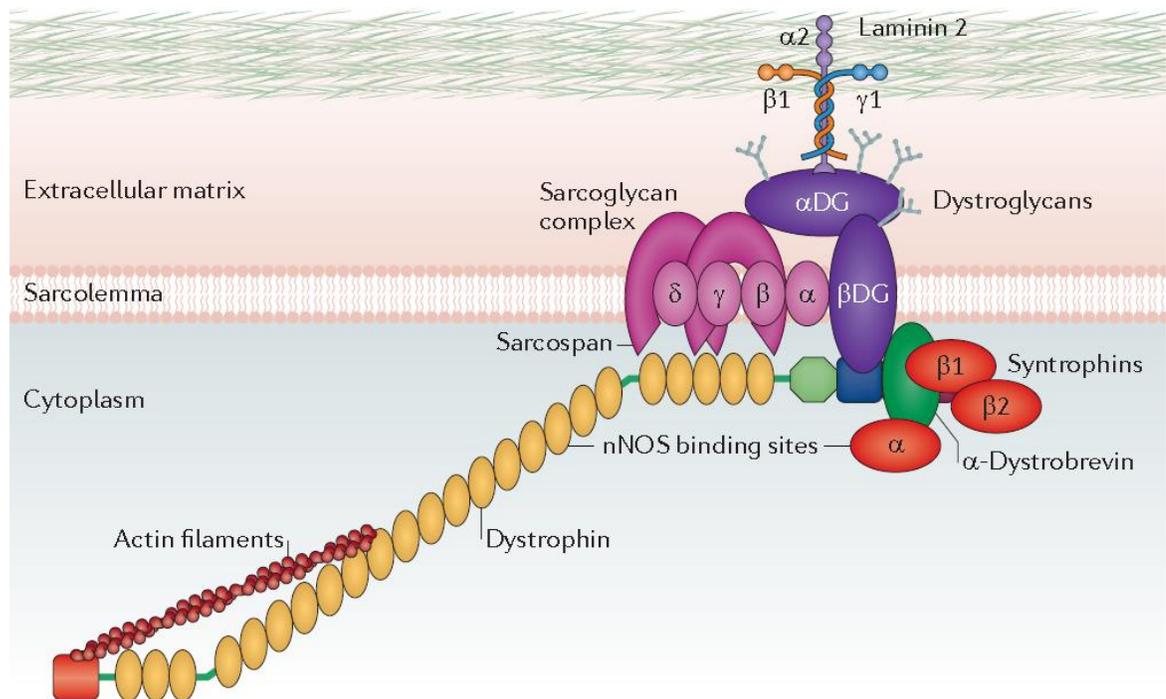


Figura 1. Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC) (Fairclough, Wood et al. 2013)

El Distroglicano

El Distroglicano (DG) es un propéptido de 97 KDa que se expresa en una gran diversidad de tipos celulares, es además un componente esencial del DAPC, el cual une al citoesqueleto con la matriz extracelular (Henry and Campbell 1996). El DG es también un receptor extracelular que sufre glicosilaciones cruciales para su función (Barresi and Campbell 2006). La pérdida de la funcionalidad del DG ocasiona diferentes distrofias musculares y se ha reportado que está implicada también en la etiología de diferentes tipos de cáncer (Batchelor, Higginson et al. 2007).

La estructura del DG esta conservada entre diferentes especies de mamíferos y especies inferiores de vertebrados, lo que sugiere que se ha mantenido a lo largo de eventos evolutivos (Bozzi, Morlacchi et al. 2009).

El gen DAG1 codifica para el DG, su secuencia codificante está organizada en dos exones separados por un intrón, se localiza en el cromosoma 3p21 del humano y genera un transcrito de 5.8 Kb que sintetiza una proteína precursora que posteriormente por medio de un corte post-traducciona en la serina 654, posiblemente por metaloproteasas, origina dos subunidades maduras, α y β , las cuales se asocian entre si de una manera no covalente (**Figura 2**) (Ibraghimov-Beskrovnaya, Ervasti et al. 1992), (Jayasinha, Nguyen et al. 2003).

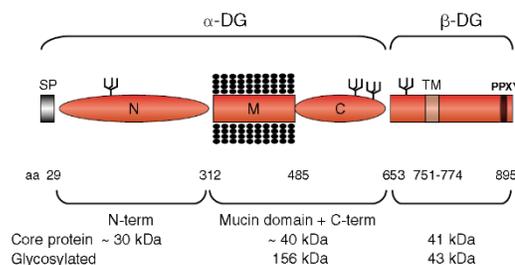


Figura 2. Estructura del Distroglicano (Barresi and Campbell 2006)

El α - Distroglicano

La subunidad α tiene un peso que oscila entre 100 a 200 KDa, se localiza en la membrana periférica y consta de un dominio central de mucina altamente glucosilado que conecta el dominio N-terminal de la subunidad α y el dominio C-terminal de la subunidad β del DG (Ibraghimov-Beskrovnaya, Ervasti et al. 1992).

La subunidad α se une con proteínas extracelulares, tales como la laminina, agrina y perlecano. Estudios recientes han demostrado que estas interacciones requieren las glicosilaciones del distroglicano α (Barresi and Campbell 2006). La variabilidad en el peso molecular de esta proteína depende del tipo de tejido y de las O-glicosilaciones presentes en el dominios de mucina (Barresi and Campbell 2006).

El β -Distroglicano

La subunidad β -distroglicano (β -DG) tiene un peso de 43 KDa y es una proteína transmembranal que por medio de su dominio citosólico se ancla a la actina a través de su interacción con la distrofina. (Ibraghimov-Beskrovnaya, Ervasti et al. 1992). Esta subunidad consta de un dominio N-terminal con potenciales sitios de N-glicosilación, un dominio transmembranal y un dominio C-terminal citoplásmico de 121 aminoácidos ricos en prolina; esta última región contiene la secuencia PPXY, por medio de la cual el β -DG se une al dominio WW de la distrofina (Ibraghimov-Beskrovnaya, Ervasti et al. 1992).

Las funciones del β -DG:

El β -DG presenta una amplia gama de funciones en los mamíferos, las cuales se mencionan a continuación:

- Señalización celular:

El DG es un receptor de adhesión, conecta a la matriz extracelular con el citoesqueleto. La fosforilación en la tirosina 892 del dominio citoplásmico del β -DG es fosforilado por cinasas de la familia Src, lo cual conlleva a la regulación de las diversas interacciones del β -DG con moléculas de señalización. Se ha revelado su interacción con moléculas de señalización, tales como la Proteína Cinasa Activada por Mitógenos 2 (MEK2) y la Cinasa Reguladora de Señales Extracelulares (ERK). Todo esto indica que el β -DG funciona como adaptador multifuncional o como un andamio molecular para la vía de señalización de las MAP cinasas, incluyendo a las proteínas MERK y ERK. La fosforilación de la tirosina 892 del β -DG regula también su interacción con la distrofina y la caveolina-3 (Spence, Dhillon et al. 2004).

- Adhesión celular:

La fosforilación de la tirosina 892 del β DG media su interacción con integrinas, mediante cambios alostéricos a través de la membrana plasmática que conllevan a la formación de estructuras de adhesión focal y de podosomas, por medio también de su asociación con la proteína de adhesión Tks5 (Moore and Winder 2010).

- Remodelación del citoesqueleto:

La formación de estructuras ricas en actina, tales como las fibras de estrés y filopodias entre otros, es crucial para los procesos de adhesión, movimiento, morfología y polaridad celular. Se ha demostrado que la ezrina, una proteína que se une a la actina paara regular su función, interacciona también con el dominio citoplásmico del β -DG lo cual podría explicar el papel de está última en la remodelamiento del citoesqueleto (Batchelor, Higginson et al. 2007).

- El β -DG en el núcleo:

Recientemente se identificó la presencia del β -DG en el núcleo de diferentes células, sugiriendo nuevas funciones para esta proteína (Gonzalez-Ramirez, Morales-Lazaro et al. 2008).

Se ha demostrado que el β -DG interacciona con distintas proteínas de la envoltura nuclear, tales como la emerina y las láminas A/C y B1, así como con proteínas de los cuerpos de Cajal (p80-coilina) y los nucleolos (Nopp140). De manera interesante se demostró que una disminución de la expresión del β DG provoca la deslocalización y disminución de los niveles de las proteínas emerina y lámina B1, así como una desorganización de los nucleolos, cuerpos de Cajal y *speckles* (Martinez-Vieyra, Vasquez-Limeta et al. 2013). Todo esto indica que el β -DG está implicado en la organización del núcleo, así como en la estructura y función de la envoltura nuclear

La envoltura nuclear

Diversas funciones celulares, incluyendo la transcripción y la traducción requieren el intercambio de macromoléculas entre el citoplasma y el núcleo, este intercambio ocurre a través de canales de proteínas conocidos como Complejos del Poro Nuclear (NPC), presentes en la Envoltura Nuclear (NE) (Wagstaff and Jans 2009).

La NE es un área especializada del Retículo Endoplásmico (RE) que funciona como una barrera selectiva para el paso de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma, además de proporcionar un microambiente especializado para el núcleo; la envoltura nuclear es el sitio donde se llevan a cabo interacciones proteína-proteína que conectan el citoesqueleto con el núcleo celular. La NE está compuesta por dos membranas separadas por un espacio perinuclear; la membrana interna (INM) y la membrana nuclear externa (ONM) (**Figura 3**). La INM establece dominios funcionales en la periferia nuclear que están

compuestos por un conjunto de proteínas integrales que se asocian con las láminas nucleares, las cuales son determinantes estructurales de la envoltura nuclear.

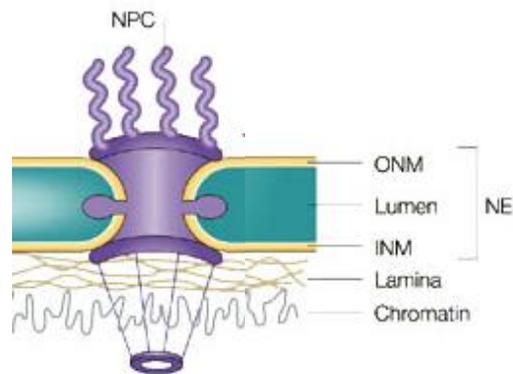


Figura 3. Estructura de la envoltura nuclear (Mattaj 2004)

Las láminas nucleares forman una red aplanada ortogonal de filamentos que yacen por debajo de la INM; son filamentos intermedios tipo V por lo que poseen un dominio central largo tipo α -hélice, flanqueado por un dominio globular en el N-terminal y un dominio de cola larga en el extremo C-terminal. La composición de las láminas varía de acuerdo al tipo de célula y estado de diferenciación; las láminas varían entre sí en estructura primaria, propiedades bioquímicas y patrones de expresión (Vaughan, 2001) .

Los mayores componentes de las láminas nucleares son las láminas de tipo A y B. Los vertebrados tienen 3 genes que codifican para las 7 isoformas de las láminas nucleares (*LMNA*, *LMNB1* y *LMNB2*) (**Figura 4**).

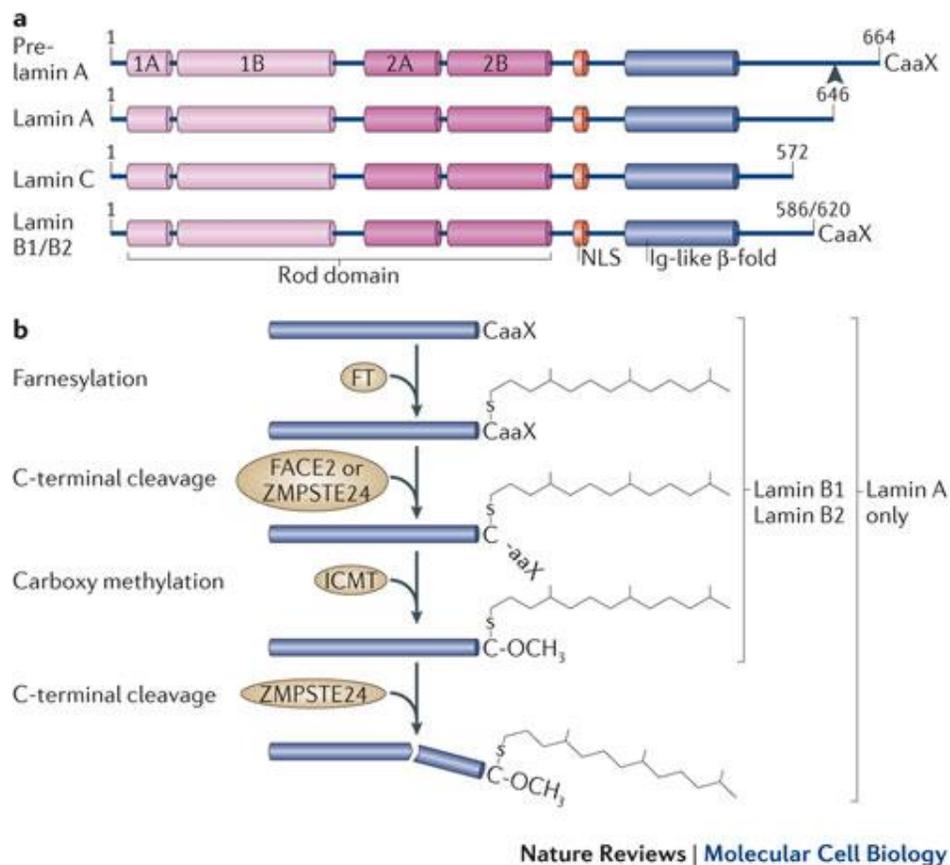


Figura 4. Estructura y procesamiento de las láminas tipo A y tipo B (Burke, 2013)

Las láminas de tipo A, codificadas por el gen *LMNA*, son el mayor componente de la lámina nuclear en células animales. Forman una red dinámica debajo de la envoltura nuclear interna, proporcionando soporte mecánico a la envoltura nuclear. Se ha sugerido que además de su función estructural, la lámina A juega un papel esencial en la organización de la cromatina, la transcripción y la apoptosis (Dechat, Vlcek et al. 2000).

La expresión de las láminas de tipo A se regulan a través del desarrollo, comenzando a la mitad del desarrollo embrionario, y se expresan en la mayoría de las células diferenciadas.

La lámina A contiene entre su dominio central y su dominio C-terminal una señal de localización nuclear (NLS) , la cual define su localización en núcleo. Además, presenta la secuencia CaaX (C, cisteína; a, aminoácido alifático; X, cualquier otro aminoácido) en su dominio C-terminal (cisteína-serina-isoleucina-metionina). Se ha demostrado que el procesamiento de la secuencia CaaX es esencial tanto para la asociación de la lamina A a la membrana como para su funcionalidad. Después de que se genera el precursor de lámina A (prelámina A), la cisteína del motivo CSIM es farnesilado por una farnesiltransferasa (FTasa), lo que es seguido por la remoción de la secuencia SIM por la enzima ZMPSTE24 y una carboximetilación por la cmt. En el último paso de maduración, los últimos 15 aminoácidos incluyendo la cisteína farnesilado son escindidos por la enzima ZMOSTE24, para permitir así la liberación de la lámina A madura de la membrana nuclear interna.

Una amplio rango de enfermedades conocidas como laminopatías se originan por mutaciones en el gen *LMNA*, de las cuales el síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS) ha sido extensivamente estudiada. La HGPS se caracteriza por envejecimiento prematuro y es causada por una variante mutante de la lámina A conocida como progerina. La mutación se produce debido a una sustitución *de novo* de una C por una T en la posición 1824 del gen *LMNA*. La mutación no causa cambios en los aminoácidos, pero induce un sitio de splicing criptico que genera la delección de 150 nucleótidos en la secuencia del mRNA. La proteína mutante (progerina) tiene una delección de 50 aminoácidos por lo que pierde el sitio de corte para la enzima o ZMPSTE24. De esta manera el grupo farnesilo del dominio C-terminal no se elimina y la progerina permanece farnesilada, lo que ocasiona que se mantenga asociada a la membrana nuclear, induciendo malformaciones de la

NE y la alteración de diversas funciones nucleares, la reparación de DNA y la expresión de genes (Lammerding, 2006).

Las láminas de tipo B son productos de dos genes distintos. La lámina B1 en humanos) es codificada por el gen *LMNB1*, localizado en el cromosoma 5q23.3, el cual genera una proteína de 64kDa; mientras que las láminas B2 y B3 son productos del gen *LMNB2*, localizado en el cromosoma 19p13.3. Las láminas de tipo B tienen un residuo de cisteína prenilada en su extremo C-terminal, el cual es importante para su anclaje a la membrana nuclear después de la mitosis. La deficiencia de la lámina B1 provoca un ensamblaje defectuoso del núcleo con complejos del poro nuclear funcionales pero que por carecer de la lámina B1 son incapaces de replicarse. Las láminas de tipo A y de tipo B forman redes por separado pero que interactúan entre sí; por ejemplo, la baja expresión de la LB1 por medio del uso de shRNA altera la cantidad de LB2 remanente y las redes de Lámina A/C (Adam, 2013) , (Hutchison 2014).

Las láminas de tipo B se expresan de manera constitutiva a través del desarrollo y cada célula expresa por lo menos un tipo de lámina B, sugiriendo que son esenciales para la supervivencia celular. Se ha demostrado también que la lámina B1 es necesaria para la correcta condensación de los cromosomas durante la interfase y que su presencia es crítica para la migración neuronal durante el desarrollo del cerebro (Camps, Erdos et al. 2015).

Recientemente se ha propuesto que la interacción de lámina B1 asociada al nucleoesqueleto con la nucleofosmina (principal proteína nucleolar) contribuye en la función y estructura del nucleolo, además de permitir su remodelamiento durante la mitosis (Martin, Chen et al. 2009).

En la capa interna de la envoltura nuclear se localiza predominantemente la emerina, proteína integral de la membrana nuclear involucrada en una amplia diversidad de procesos biológicos. El gen de emerina (*EMD*) consiste en seis

exones y cinco intrones que están localizados en el cromosoma X, codifica para una proteína de 254 aminoácidos, con un dominio N-terminal nucleoplásmico de 200 aminoácidos, un dominio C-terminal transmembranal de 23 aminoácidos y un dominio luminal de 11 aminoácidos. Una vez sintetizada, la emerina se inserta en el retículo endoplásmico (RE) y se difunde a través del RE hacia la envoltura nuclear. El tamaño de la emerina (29 kD) le permite difundirse libremente a través de los complejos del poro nuclear (NPC) para anclarse a la membrana interna del núcleo. Una vez dentro del núcleo la emerina se une a láminas de tipo A, unión necesaria para el correcto ensamblaje de la envoltura nuclear. La emerina está involucrada en diferentes procesos biológicos (Koch and Holaska 2013) , (Berk, Tiffet et al. 2013), tales como:

- Regulación directa e indirecta de la actividad y localización de factores de transcripción.
- Señalización intra e intercelular.
- Mecanotransducción de núcleo-citoesqueleto y arquitectura nuclear.
- Condensación y organización de la cromatina y modificaciones epigenéticas.

TF Regulation	Signaling Pathways	Nuclear Structure	Chromatin Architecture
<ul style="list-style-type: none"> • BAF • Btf • GCL • Lmo7 • β-catenin 	<ul style="list-style-type: none"> • IGF • Integrin • JNK • MAPK • MyoD/RB • NF-κB • Notch • TGFβ • Wnt 	<ul style="list-style-type: none"> • Actin • Lamin A/C • Lamin B • Nesprins • SUN proteins 	<ul style="list-style-type: none"> • BAF • HDAC3

Tabla 1. La emerina regula un gran número de procesos nucleares mediante su relación con las moléculas enlistadas (Berk, Tiffet et al. 2013).

De manera reciente se observó que la deficiencia de la emerina en fibroblastos de dermis humanos ocasiona la separación de los centrosomas del núcleo. Se ha demostrado que una fracción significativa de la emerina está localizada en la membrana nuclear externa y en el retículo endoplásmico periférico, en donde interactúa con la tubulina y de esta manera se relaciona funcionalmente con los centrosomas. Así mismo, se ha demostrado en células de mamífero la unión de los centrosomas con la membrana nuclear externa (**Figura 5**) (Salpingidou, Smertenko et al. 2007) .

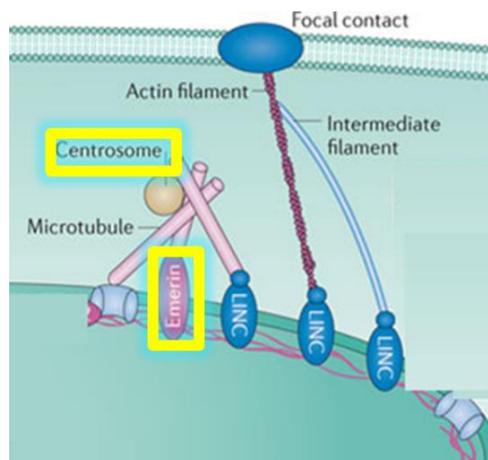


Figura 5. Modelo de la interacción de la emerina con los centrosomas (Chow, Factor et al. 2012)

Los centrosomas son la principal estructura del centro de organización de microtúbulos (MTOC) en células animales; además de regular la motilidad celular, adhesión y polaridad de la célula en interfase, organizan los polos del huso mitótico. Anormalidades en la organización de los polos del huso mitótico ocurren en varios tipos de cáncer y se asocian con inestabilidad genómica (Nigg and Stearns 2011). Cada centrosoma está compuesto por dos centriolos rodeados por una matriz densa de material pericentriolar (PCM). Los centriolos

están conformados por 9 tripletes de microtúbulos con una longitud de $\sim 0.5\mu$ de longitud y de $\sim 0.2\mu$ de diámetro.

Las características centriolares determinan la mayoría de sus propiedades, tales como estabilidad, capacidad de reproducirse, dinámica y polaridad del centrosoma. El PCM es una estructura clave que ancla y propicia la nucleación de los microtúbulos (MT) durante la interfase y la mitosis. Los principales componentes del PCM son miembros de la familia de la pericentrina y de AKAP450; se cree que estas moléculas con dominios *coiled-coil* forman estructuras de rejilla que se acoplan con componentes reguladores y moléculas que median la nucleación de MTs, tales como la γ -Tubulina.

El gen de la γ -Tubulina, fue identificado por primera vez en los polos del huso mitótico de *Aspergillus nidulans*, y posteriormente se encontró en los centrosomas de una amplia variedad de células animales (Moudjou, Bordes et al. 1996). La γ -Tubulina existe en pequeños complejos denominados γ -TuSC, que contienen un núcleo tetramérico formado por dos moléculas de γ -Tubulina y una molécula de GCP2 y GCP3 (gamma complex associated protein 2 and 3). El complejo TuSC se sostiene por otras proteínas que conforman el complejo de anillo de la γ -tubulina (γ -TuRC). A pesar de que la ausencia de cualquiera de las moléculas del complejo γ -TuRC en células de *D. melanogaster* provoca husos mitóticos anormales, la γ -Tubulina se mantiene en el centrosoma. En contraste, la falta de de las subunidades del anillo γ -TuSC impide la nucleación de microtúbulos. En la fisión de las levaduras el anillo γ -TuSC es también esencial para la nucleación de los microtúbulos. El γ -TuRC es importante también para la regulación de la dinámica de microtúbulos durante la interfase.

Los cambios en la capacidad de nucleación de los microtúbulos del centrosoma durante el ciclo celular parecen estar dirigidos por un equilibrio de factores que reguladores que restringen o promueven el reclutamiento de moléculas organizadoras de microtúbulos durante la interfase y mitosis.

Los centrosomas tienen un papel en la regulación del ciclo celular, se ha propuesto que regulan la citocinesis y la transición de G1 – S. El silenciamiento

de varias proteínas asociadas a los centrosomas, conlleva a un arresto de la célula en G1. Esto sugiere que la pérdida de los centrosomas es una señal de estrés que puede funcionar de manera aditiva con otros tipos de estrés para arrestar a las células en fase G1, este arresto es dependiente de p38 y p53.

Las principales fases del ciclo de centrosomas han sido definidas por medio de microscopía electrónica, y se han descrito cuatro pasos consecutivos:

1. Desacoplamiento de centriolos
2. Nucleación de los centriolos hijos (también llamados procentriolos)
3. Elongación de los procentriolos
4. Separación de centrosomas

La incorporación de tubulina marcada muestra que la formación de centriolos es conservativa (Bettencourt-Dias and Glover 2007).

La membrana nuclear externa (ONM) es una continuación del retículo endoplásmico, y se une directamente a la membrana interna: ambas membranas son atravesadas por los complejos del poro nuclear (NPC) (Chow, Factor et al. 2012) (Laba, Steen et al. 2014). Los NPC son ensamblamientos protéicos que funcionan como mediadores del intercambio de moléculas bidireccional entre los compartimentos citoplásmico y nuclear (Chow, Factor et al. 2012). Las nucleoporinas son las proteínas que componen el NPC, mientras que las importinas y exportinas son las moléculas que llevan a cabo el importe y exporte nuclear respectivamente. El paso de moléculas por el NPC es modulado por repetidos de fenilalanina-glicina (FG), los cuales interactúan con importinas y exportinas (Hutten and Kehlenbach 2007).

El transporte nucleoplásmico:

El transporte nuclear involucra el reconocimiento de secuencias particulares contenidas en las proteínas cargo por los miembros de la familia de las importinas/exportinas, y el proceso de translocación es dependiente de energía ya que va en contra de un gradiente de concentración (**Figura5**) (Wagstaff and Jans 2009).

- El Importe Nuclear:

Las proteínas de bajo peso molecular, entran al núcleo por difusión pasiva, mientras que aquellas mayores a 45 KDa son excluidas. El transporte de estas proteínas mayores de 45 KDa involucra el reconocimiento de Señales de Localización Nuclear (NLS). Las NLS mono-partitas son pequeños segmentos de aminoácidos básicos, por ejemplo la NLS la del antígeno T del virus SV40 ¹²⁶**PKKKRRV**¹³² (Kalderon, Richardson et al. 1984); mientras que las NLS bi-partitas contienen dos segmentos cortos de aminoácidos básicos separados por una región de 10 a 12 aminoácidos, por ejemplo la NLS de la nucleoplasmina ¹⁵⁵**KRPAATKKAGQAKKKK**¹⁷⁰ (Robbins, Dilworth et al. 1991). El reconocimiento de las NLS lo lleva a cabo la importina α , mientras que la importina β se encarga de llevar al complejo proteína cargo-importina α hacia el NPC y de ayudar en su translocación al nucleoplasma. La disociación del complejo ocurre en el núcleo debido a la unión de RanGTP a la importina β ; después de esta disociación las importinas regresan al citoplasma para otro ciclo de importe nuclear (Wagstaff and Jans 2009).

- El Exporte Nuclear:

En sentido análogo, las proteínas nucleares que contienen una Señal de Exporte Nuclear (NES) son reconocidas por las exportinas, homólogas a la importina β . Las NES son regiones ricas en aminoácidos hidrofóbicos, y la secuencia consenso es **Φ 1-X(2,3)- Φ 2-X(2,3)- Φ 3-X- Φ 4** (Φ n es Leu, Ile, Val, Phe or Met, y X puede ser cualquier otro aminoácido) (Chook and Fung 2014),

(Hutten and Kehlenbach 2007). La exportina CRM1 que es la exportina mejor caracterizada, interactúa con las NES y transporta del núcleo al citoplasma a las proteínas cargo. En el citoplasma, la hidrólisis de RanGTP a RanGDP disocia el complejo de exporte (Wagstaff and Jans 2009). La direccionalidad del transporte nuclear se mantiene por el gradiente de Ran, en el cual RanGDP se encuentra mayoritariamente en el citoplasma y RanGTP en el núcleo (Wagstaff and Jans 2009).

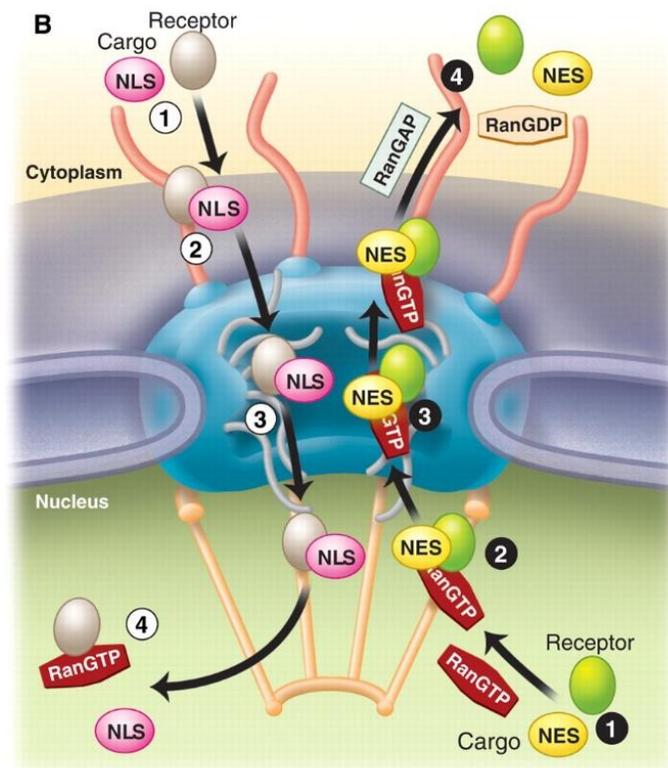


Figura 5. Las importinas reconocen la NLS en la proteína cargo, formando así un complejo (1). Éste complejo se acopla al NPC por medio de interacciones de baja afinidad para que ocurra la translocación hacia el núcleo (2). Una vez en el núcleo, el complejo se desensambla por la unión de RanGTP a la importina (3) y se libera la proteína cargo (4). El transporte nuclear ocurre a

través de la unión de la exportina a la NES presente en la molécula cargo (1). El complejo se une posteriormente a RanGTP (2) para atravesar el NPC (3). La unión de RanGDP en el citoplasma provoca el desensamble del complejo para liberar la proteína cargo (4) (Terry, Shows et al. 2007).

ANTECEDENTES

Recientemente se descubrió la presencia del β -DG en el núcleo de diferentes líneas celulares (Gonzalez-Ramirez, Morales-Lazaro et al. 2008). El mecanismo de importe nuclear del β -DG es dependiente de una Señal de Localización Nuclear (NLS) que se encuentra en el dominio citoplásmico, dentro de los aminoácidos 776 al 782; la NLS es reconocida por las importinas α/β y de Ran (Lara-Chacon, de Leon et al. 2010).

Interesantemente, se ha demostrado que la reorganización del citoesqueleto orquestada por la ezrina facilita la translocación del β -DG hacia el núcleo (Vasquez-Limeta, Wagstaff et al. 2014), esto hace notar la relevancia de proteínas citoplásmicas en el transporte núcleo citoplásmico del β -DG.

Dentro del núcleo, el β -DG interacciona con diferentes proteínas; incluyendo la emerina, la lámina A/C y B1 de la envoltura nuclear, la proteína SC35 de los cuerpos de splicing, p80-coilina de los cuerpos de Cajal y la proteína Nopp140 de los nucléolos (**Figura 6**). De manera notable, una disminución en la expresión del β -DG provoca deslocalización de las proteínas nucleares mencionadas arriba y defectos en la morfología nuclear, lo cual indica el una función crucial del β -DG en el núcleo (Martinez-Vieyra, Vasquez-Limeta et al. 2013).

El tráfico nuclear del β -DG es bidireccional ya que presenta también un expor-te nuclear; mediante tratamiento de las células C2C12 con LMB (inhibidor específico de la exportina CRM1) se observó una acumulación nuclear del β -DG (**Figura 7**). Un análisis *in silico* identificó una señal putativa de expor-te nuclear (NES) ubicada en los aminoácidos ⁷⁶³ILLIAGIIAM⁷⁷², la cual demostramos mediante ensayos de interacción de proteínas tipo *pull-down* es reconocida por la exportina CRM1 (**Figura 7**). Por medio de mutagénesis dirigida se demostró que el cambio de tres amino ácidos hidrofóbicos de la NES provoca la acumulación nuclear de β -DG (**Figura 8**), lo que comprueba su funcionalidad (Vélez Aguilera, 2014, resultados no publicados).

En su conjunto, estos estudios dejan claro que el β -DG presenta exporte nuclear; sin embargo, la relevancia fisiológica de este mecanismo molecular se desconoce.

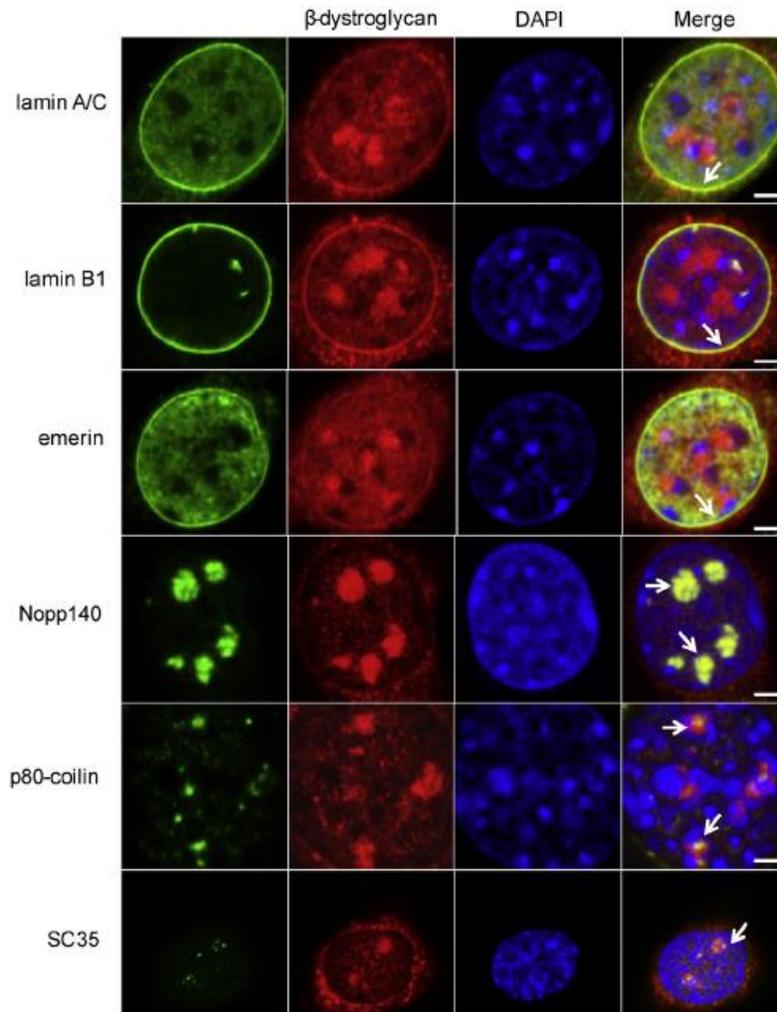


Figura 6. Co-localización de proteínas de diferentes compartimentos nucleares con el β -DG en células C2C12 (Martinez-Vieyra, Vasquez-Limeta et al. 2013).

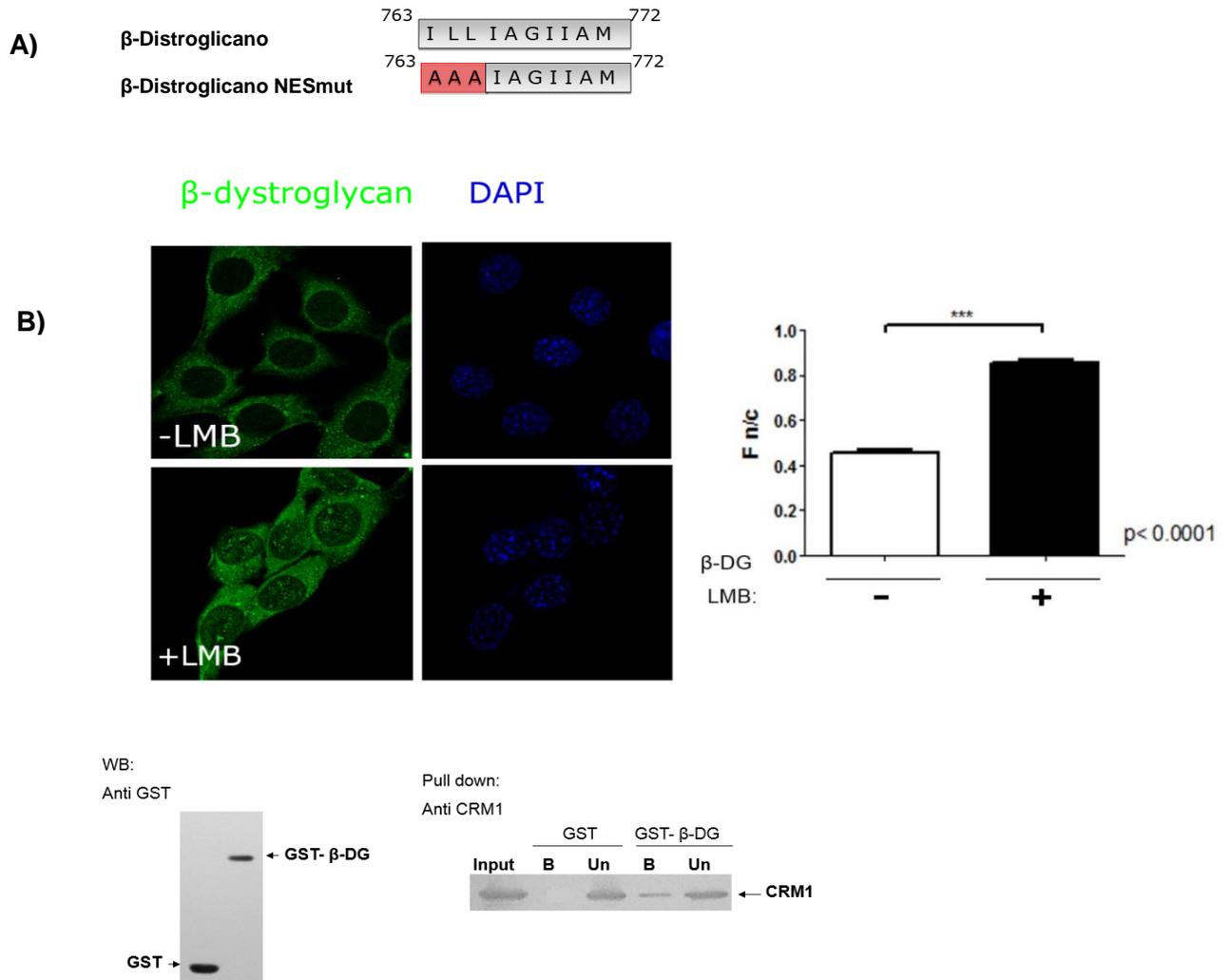


Figura 7. A) Inhibición del exporte nuclear del β -Distroglicano mediante tratamiento con Leptomycin B (LMB) en la células C2C12 B) Interacción específica *in vitro* de la exportina CRM1 con el β -DG (Vélez Aguilera, 2014, resultados no publicados).

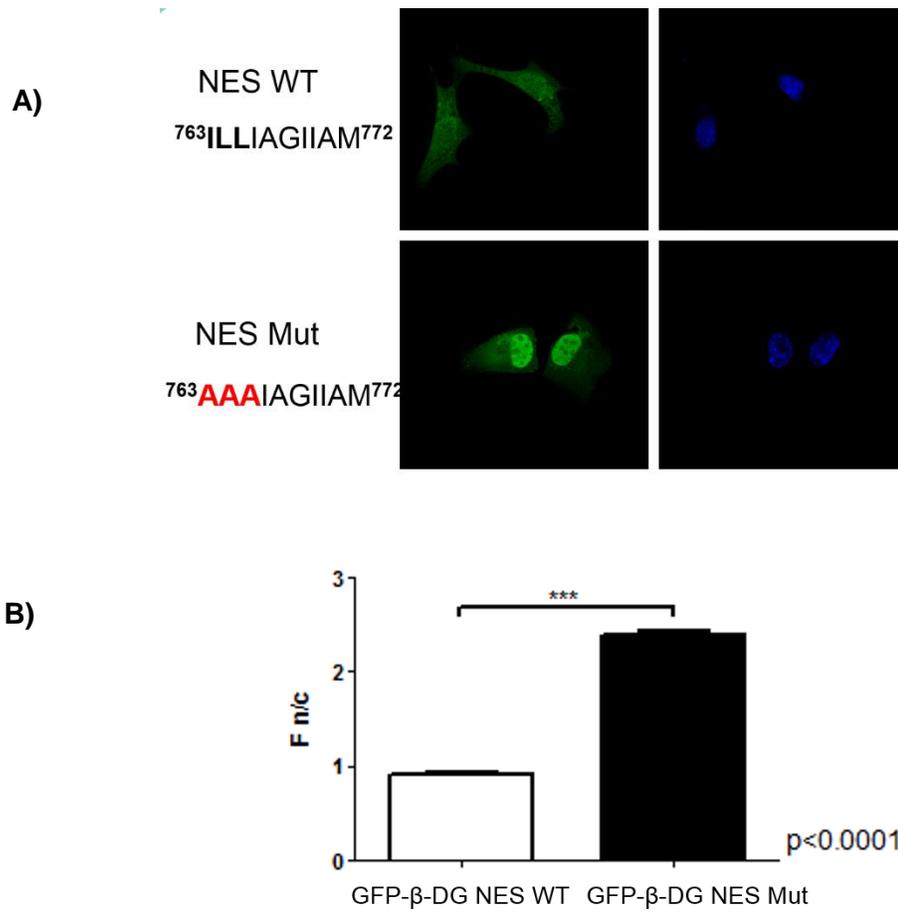


Figura 8. LA NES del β -DG es funcional. A) Mutaciones sobre la Señal de Exporte Nuclear (NES) causan la acumulación de la proteína reportera GFP- β -DG. B) Cuantificación de la fracción Núcleo/Citoplasm de la proteína GFP- β -DG y su variante mutante de la NES en células C2C12. (Vélez Aguilera, 2014, resultados no publicados).

JUSTIFICACIÓN:

Si el tráfico nuclear controla los niveles del β -Distroglicano (β -DG) requeridos en cada compartimento celular de acuerdo a las necesidades fisiológicas de la célula, una desregulación de su exporte nuclear alterará su distribución y consecuentemente las funciones que realiza en este organelo.

HIPÓTESIS:

La acumulación nuclear anormal del β -DG alterará la organización de la envoltura nuclear.

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la importancia del exporte nuclear del β -DG sobre la organización de las proteínas de la envoltura nuclear.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ✓ Evaluar el efecto de la sobre-expresión de la proteína reportera GFP- β -DG y su variante mutante GFP- β -DG-NESmut sobre la localización de las proteínas de la envoltura nuclear.
- ✓ Evaluar el efecto de la sobre-expresión de la proteína reportera GFP- β -DG y su variante mutante GFP- β -DG-NESmut sobre la función de la envoltura nuclear.
- ✓ Evaluar el efecto de la sobre-expresión de la proteína reportera GFP- β -DG y su variante mutante GFP- β -DG-NESmut sobre los niveles de las proteínas de la envoltura nuclear.

METODOLOGÍA

Cultivo de células C2C12

La línea celular C2C12, proveniente de mioblastos de ratón (Yaffe and Saxel 1977) fue cultivada en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 25U/mL de penicilina y 25µg/mL de estreptomicina y su incubación fue a 37°C y con una concentración de CO₂ al 5%.

Transformación de bacterias

En este proceso en el cual se introduce DNA foráneo a una célula bacteriana (Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. 2000), el protocolo a seguir fue el siguiente: se añadió 1 µL del plásmido de interés en 50 µL de cultivo de bacterias competentes de *E. coli* TOP 10 y posterior a esto, se incubó a 4°C durante 30 minutos. Enseguida, se incubó de nuevo por 90 segundos a 42°C y a 4°C por 2 minutos. Se añadieron 800 µL de medio LB (Luria Bertani) y se incubó la mezcla durante una hora a 37°C para posteriormente distribuir 100 µL en una placa p100 de medio LB con kanamicina, utilizando una espátula de vidrio. Las cajas de cultivo se incubaron toda la noche a 37°C para su crecimiento.

Extracción y purificación de DNA plasmídico a mediana escala

Se siguió el protocolo establecido por el proveedor del kit (QIAGEN® Plasmid Purification). Se inoculó una colonia bacteriana aislada en 5 mL de medio LB con el antibiótico de selección y se incubó el cultivo aproximadamente 8 horas en agitación a 37°C; posteriormente se diluyó el cultivo 1/500 en medio LB selectivo y se dejó en incubación a 37°C durante 12-16 horas en agitación constante a 37°C. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 6,000g durante 15

minutos a 4°C y se resuspendió el botón bacteriano con 4 mL de la solución amortiguadora P1; enseguida se adicionó 4 mL de la solución amortiguadora P2 y se mezcló de manera vigorosa. Se añadió 4 mL de la solución amortiguadora P3 y se mezcló de manera vigorosa para después incubar a 4°C durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 20,000g por 40 minutos a 4°C, para recuperar el sobrenadante en otro tubo y se volvió a centrifugar a 20,000g por 20 minutos, se removió el sobrenadante para pasarlo a una columna previamente equilibrada con la solución amortiguadora QBT. Después se lavó la columna con la solución amortiguadora QC. Se procedió a eluir el DNA bacteriano con la solución amortiguadora QF y se adicionó 3.5 mL de isopropanol, se centrifugó por 30 minutos a 15,000g a 4°C y se decantó el sobrenadante. Para eliminar el isopropanol se lavaron las muestras con etanol al 70% y se centrifugaron a 15,000g por 10 minutos para después decantar el sobrenadante sin afectar la pastilla formada. Para finalizar la obtención del DNA plasmídico, se dejó secar la pastilla de DNA para resuspenderla en la solución amortiguadora TE.

Preparación de geles de agarosa

Para verificar la integridad del DNA plasmídico se resolvió en geles de agarosa al 0.8%, cuya resolución oscila entre 500 bp a 12 Kbp. Para la preparación de los geles se disolvieron 0.40g de agarosa en 50 mL de la solución amortiguadora TE al 0.5X utilizando. Posteriormente se adicionó 1 µL de bromuro de etidio y se vació la mezcla en una cámara para geles; se colocó un peine para formar los pozos donde se cargaron las muestras y se esperaron aproximadamente 20 minutos para que gelificara antes de cargar las muestras.

Extracción y caracterización de plásmidos GFP, β -DG y β -DG NESmut.

En un tubo Eppendorf de 600 μ L se puso el volumen de DNA plasmídico suficiente para tener una concentración 1 μ g/1 μ L y se agregó la solución amortiguadora para cada enzima y agua mili Q para llevar la reacción a 10 μ L de volumen total. La reacción se incubó durante 3 horas y posteriormente se analizaron las reacciones en geles de agarosa al 0.8%.

Contando con los plásmidos GFP, β -DG y β -DG NESmut en el laboratorio, se procedió a comenzar con la extracción de DNA plasmídico mediante el uso del kit de QIAGEN® Plasmid Purification y se procedió a observar tanto la integridad del DNA obtenido así como la caracterización enzimática de los plásmidos extraídos en geles de agarosa, en el gel se puede observar la liberación del fragmento correspondiente al β -DG.

Reactivos	Plásmidos		
	GFP	GFP-βDG	GFP-βDG NESmut
H₂O miliQ	7 μ L	6 μ L	6 μ L
Buffer (específico para cada enzima)	1 μ L	1 μ L	1 μ L
DNA plasmídico	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Enzima	EcoRI 1 μ L	EcoRI / Bgl II 1 μ L / 1 μ L	EcoRI / Bgl II 1 μ L / 1 μ L
Volumen total	10 μ L	10 μ L	10 μ L

Tabla 6. Especificaciones para la caracterización de cada plásmido utilizado, la concentración de éstos es de 1 μ g/ μ L.

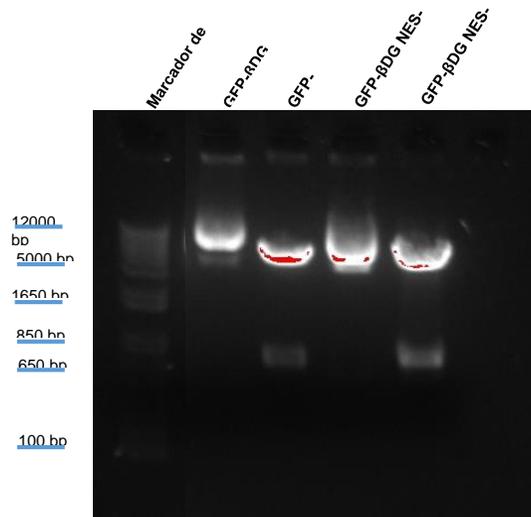


Figura 10. Caracterización enzimática de los plásmidos extraídos.

Transfección transitoria

Las células C2C12 se cultivaron hasta alcanzar una confluencia de ~80% sobre cubreobjetos de 20 mm x 20 mm, previamente irradiados con luz UV durante 15 minutos, enjuagados con alcohol absoluto y flameados. Se transfecaron las células agregando 6 μ L de lipofectamina por cada 6.5 μ g de DNA del plásmido de interés. En un tubo se mezcló la lipofectamina con medio DMEM sin suero (por cada 4 μ L de lipofectamina, se adicionaron 100 μ L de medio DMEM sin suero) y la mezcla se dejó incubando durante 5 minutos. En un segundo tubo se mezcló 150 μ L de medio DMEM con 6.5 μ g de DNA. Enseguida, al tubo que contenía la mezcla de lipofectamina con medio DMEM se le adicionó los 150 μ L de DNA de plásmido mezclado con el medio DMEM. El complejo se incubó durante 30 minutos y se agregó a las células previamente cultivadas.

	GFP	GFP- β DG	GFP- β DG NESmut
<i>Cantidad de DNA</i>	6.5 μ g/ μ L	6.5 μ g/ μ L	6.5 μ g/ μ L
<i>Cantidad de Lipofectamina 2000</i>	6 μ L	6 μ L	6 μ L
<i>Cantidad total de medio DMEM</i>	300 μ L	300 μ L	300 μ L

Tabla 2. Cantidades de reactivos utilizadas para transfecciones en células C2C12.

Inmunofluorescencia indirecta

Las células C2C12 se sembraron sobre cubreobjetos preparados como se describió anteriormente hasta alcanzar una confluencia de 80%. Enseguida se les retiró el medio y se lavaron con PBS 1X: Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 10 minutos y después de dos lavados con PBS 1X se permeabilizan con tritón al 0.2% diluidos en PBS 1X. Nuevamente se lavaron dos veces las células proceder con un bloqueo con gelatina al 1% diluida en suero fetal bovino al 0.5% y PBS 1X; las preparaciones se incubaron durante 20 minutos y se lavaron dos veces con PBS 1X. Enseguida los cubreobjetos se incubaron con el anticuerpo primario respectivo durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Se lavaron los cubreobjetos con PBS 1X durante 5 minutos y se incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario respectivo en una cámara húmeda y protegida de la luz. Las preparaciones se lavaron una vez con PBS 1X durante 5 minutos y se procedió con la tinción de núcleos agregando una solución 1:500 de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) durante 10 minutos. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS 1X, se les agregó 7 μ L de Vecta-Shield y se sellaron con barniz transparente.

	Anti-emerina	Anti-lámina B1	Lámina A/C	Anti-γ- Tubulina
Anti-cuerpo primario	Dilución 1:150 *Bloqueo con 10% de BSA 1µg/µL y 5% de SFB en volumen total *SantaCruz	Dilución 1:300 *Ab-Cam	Dilución 1:200 *Ab-Cam	Dilución 1:500 *Bloqueo con 10% de BSA 1µg/µL y 5% de SFB en volumen total
Anti-cuerpo secundario	Dilución 1:50 Anti-conejo rojo *Bloqueo con 10% de BSA 1µg/µL y 5% de SFB en volumen total	Dilución 1:50 Anti-ratón rojo	Dilución 1:50 Anti-conejo rojo	Dilución 1:50 Anti-ratón rojo *Bloqueo con 10% de BSA 1µg/µL y 5% de SFB en volumen total

Tabla 3. Especificaciones para el uso de los anticuerpos.

Obtención de extractos proteicos totales

Las células C2C12 cultivadas sobre cajas P70 a una confluencia aproximada del 80% se lavaron con 1 mL de PBS 1X antes de añadirles 80 µL de la solución amortiguadora de lisis. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 4°C con movimiento constante. Posteriormente, se procedió a la recolección del lisado mediante raspado de las cajas P70 con un gendarme y se colocó en un tubo de 1.5 mL para centrifugarse durante 2 minutos a 4°C a 12,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteínas por el método de Bradford.

Cuantificación de proteínas

Se realizó una curva estándar utilizando de 0 a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de albúmina de suero bovino (BSA); se prepararon diferentes diluciones de las muestras de extractos de proteínas en 1 μL de volumen analizar. Posteriormente se adicionó el reactivo de Bradford (BIO-RAD) y se leyeron las muestras a una absorbancia de 595nm. Los valores obtenidos se utilizaron para hacer una regresión lineal y obtener la concentración de proteínas presentes en los extractos proteicos.

Solución amortiguadora de lisis	
Reactivos	Cantidad
Solución de lisis 5X	200 μL
PMSF	10 μL
Na_3VO_4	20 μL
NaF	50 μL
NaMo_3O_4	10 μL
Complete	143 μL
H_2O	567 μL
Volumen total	1 mL

Tabla 4. Reactivos utilizados para la preparación de la solución amortiguadora de lisis.

Preparación de geles desnaturalizantes de poliacrilamida

El análisis de proteínas se llevó a cabo en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS al 10%. Una vez preparado el gel se les adicionó a los extractos proteicos la solución amortiguadora de carga y se llevó a un volumen final de 40 μL con agua mili-Q. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 100°C y se cargaron al gel. Se procedió con la electroforesis utilizando la solución amortiguadora de corrida (Tris base 3 g/L, glicina 14.4 g/L, SDS 1g/L) y una corriente de 20 mA durante aproximadamente 2 horas. El gel se tiñó con el colorante azul de Coomasie (45 mL de agua, 45 mL de metanol, 10 mL de

ácido acético glacial y 0.25g de azul de Coomasie) durante 30 minutos en agitación constante y después se destiñó con la misma solución omitiendo el azul de Coomasie.

Gel separador	
Reactivos	Cantidad
Agua mili-Q	3.1 mL
Acrilamida / Bisacrilamida al 30%	2.5 mL
Tris- HCl , 4X, pH 8.8	1.88 mL
APS, 10%	50 μ L
TEMED	10 μ L
Gel concentrador	
Reactivos	Cantidad
Agua mili-Q	2.143 mL
Acrilamida / Bisacrilamida al 30%	0.457 mL
Tris- HCl , 4X, pH 6.8	0.879 μ L
APS, 10%	17.8 μ L
TEMED	5 μ L

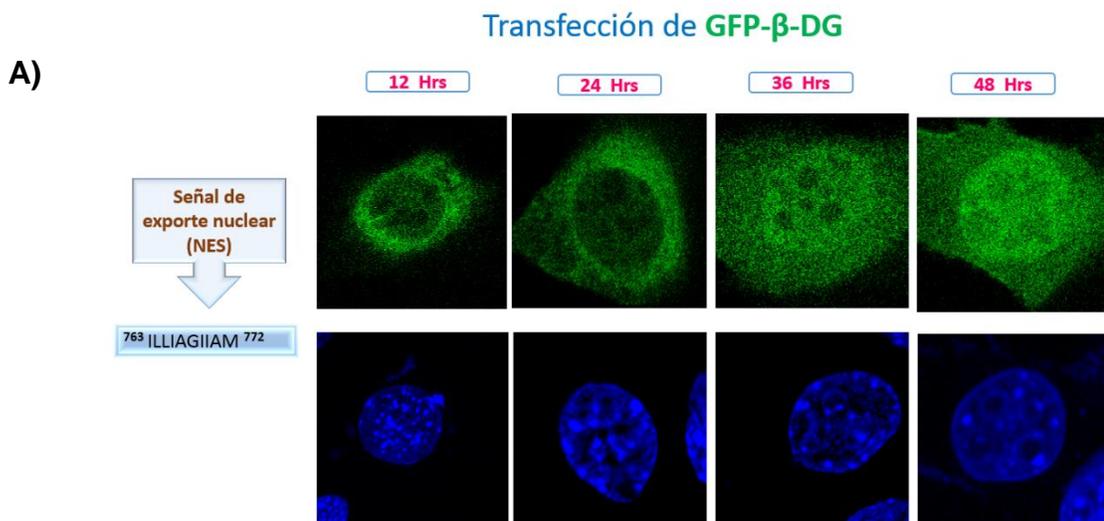
Tabla 4. Reactivos utilizados para la preparación de los geles desnaturantes de proliacrilamida-SDS al 10%.

RESULTADOS

Análisis de la distribución subcelular de las proteínas recombinantes GFP- β -DG y la variante mutante GFP- β -DG NESmut en las células C2C12

Con el fin de analizar si el transporte nuclear del β -DG tiene como función evitar la acumulación nuclear anormal de la proteína, se construyeron previamente dos plásmidos que expresan las proteínas recombinantes GFP- β -DG y la variante mutante de la NES, GFP- β -DG NESmut. Como primer paso, se analizó la distribución subcelular de las proteínas reporteras a diferentes tiempos post-transfección (Figura 9). La distribución de la proteína GFP- β -DG es mayoritariamente citoplásmica a las 12 y 24 h; sin embargo, a tiempos más prolongados, 36 y 48 h, se empieza a acumular en el núcleo (Fig. 9A). Por el contrario, la proteína GFP- β -DG NESmut se acumula en el núcleo desde las 12 h y no varía su patrón de fluorescencia en los tiempos más largos, 24, 36 y 48 h (Fig. 9B); la acumulación nuclear de la proteína mutante nos indica que su transporte nuclear está bloqueado por la mutación que porta en la NES.

Para fines de este trabajo, se optó por trabajar con el tiempo de post-transfección de 24 horas, ya que la distribución de la proteína silvestre GFP- β -DG es similar a la del β -DG endógeno. Se procedió enseguida con el análisis de la sobreexpresión de las proteínas reporteras sobre la organización de las proteínas de la envoltura nuclear.



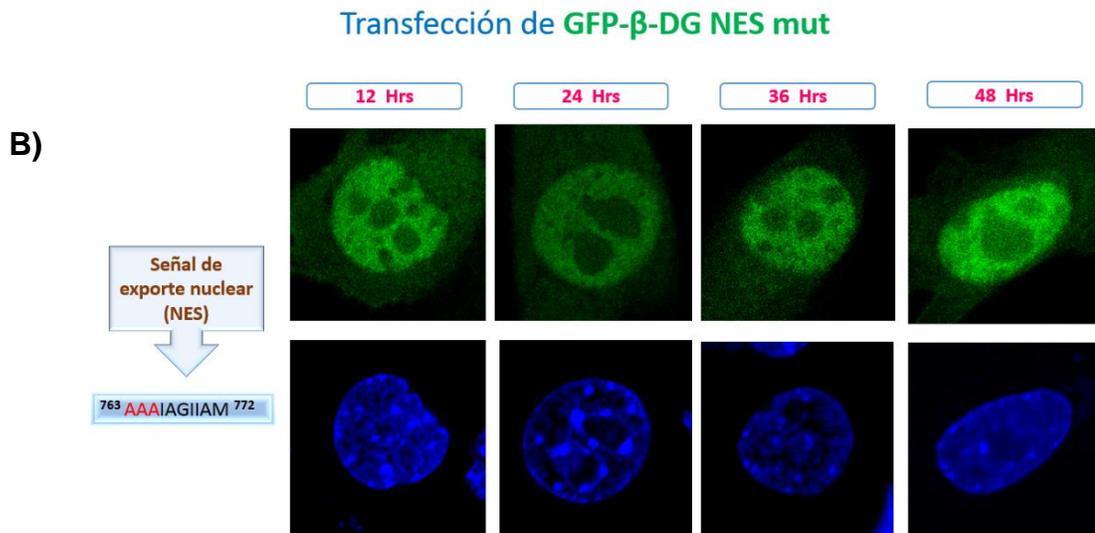


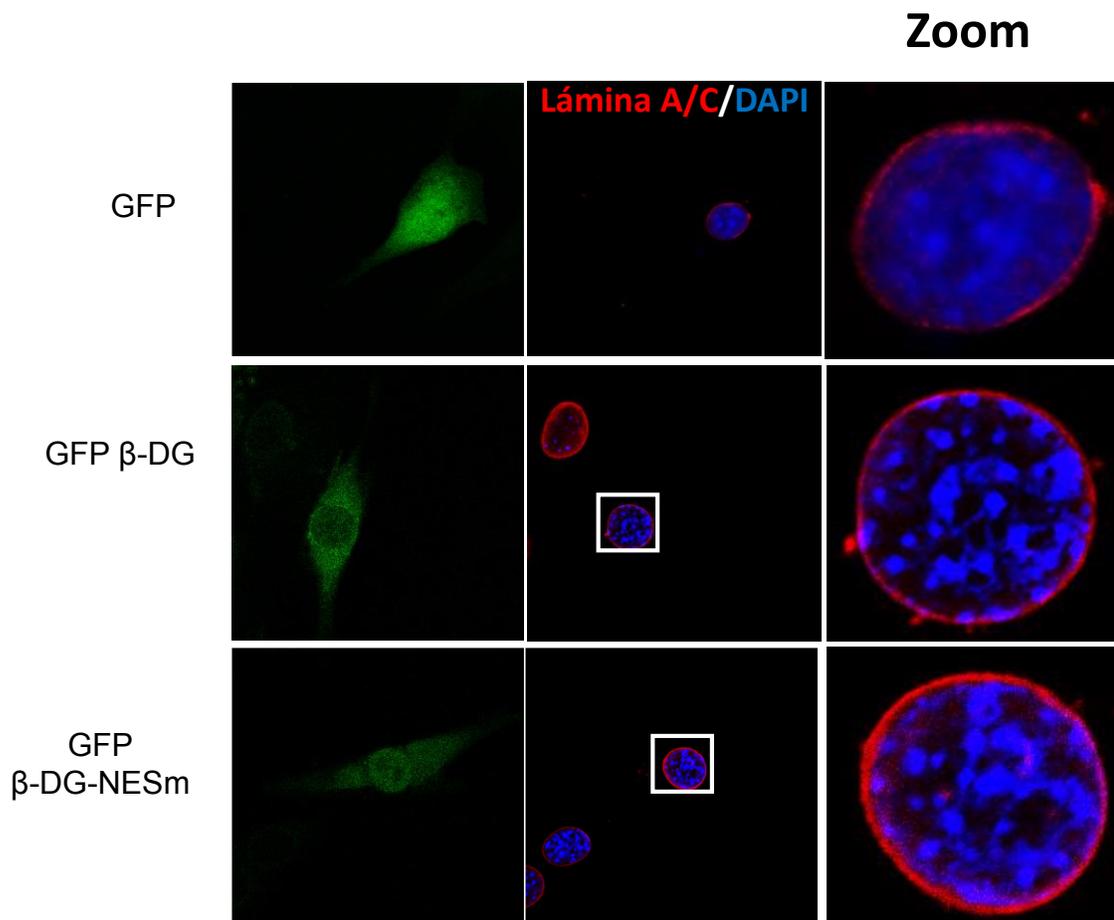
Figura 9. Distribución subcelular de las proteínas recombinantes GFP- β-DG (A) y GFP- β-DG NESmut (B). Se transfectaron transitoriamente las células C2C12 con los vectores que expresan las proteínas reporteras indicadas en la parte superior de la figura. A los diferentes tiempos post-transfección indicados se fijaron las células, los núcleos se contratiñeron con DAPI y se procedió con el análisis de las preparaciones mediante microscopia confocal.

El exporte nuclear evita la acumulación anormal del β-DG y determina los niveles nucleares que se requieren de la proteína para la correcta distribución y función de las proteínas de envoltura nuclear emerina y lámina B1

Tomando en cuenta la función crítica que lleva a cabo el β-DG para mantener la arquitectura y función de la envoltura nuclear (Martinez-Vieyra, Vasquez-Limeta et al. 2013) decidimos analizar si la acumulación nuclear anormal de la proteína altera la distribución de las proteínas emerina, lámina B1 y lámina A/C. Con este fin, transfectamos transitoriamente células C2C12 para expresar las proteínas GFP, GFP-β-DG y GFP-β-DG NESmut. No se observaron

cambios considerables en la distribución de lámina A/C en la envoltura nuclear en células transfectadas con la proteína reportera GFP, la proteína silvestre β -DG y con la variante mutante β -DG NESmut.

El patrón de inmunotinción de la lámina A/C no se alteró por la sobreexpresión de ninguna de las proteínas reporteras, lo que sugiere que la acumulación nuclear anormal del β -DG no altera la distribución ni la estabilidad de esta proteína de la lámina nuclear (Figura 10 A).



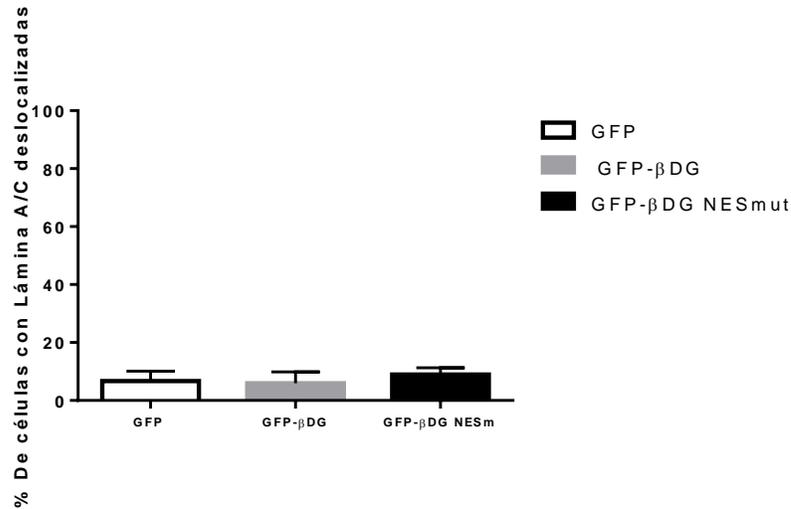
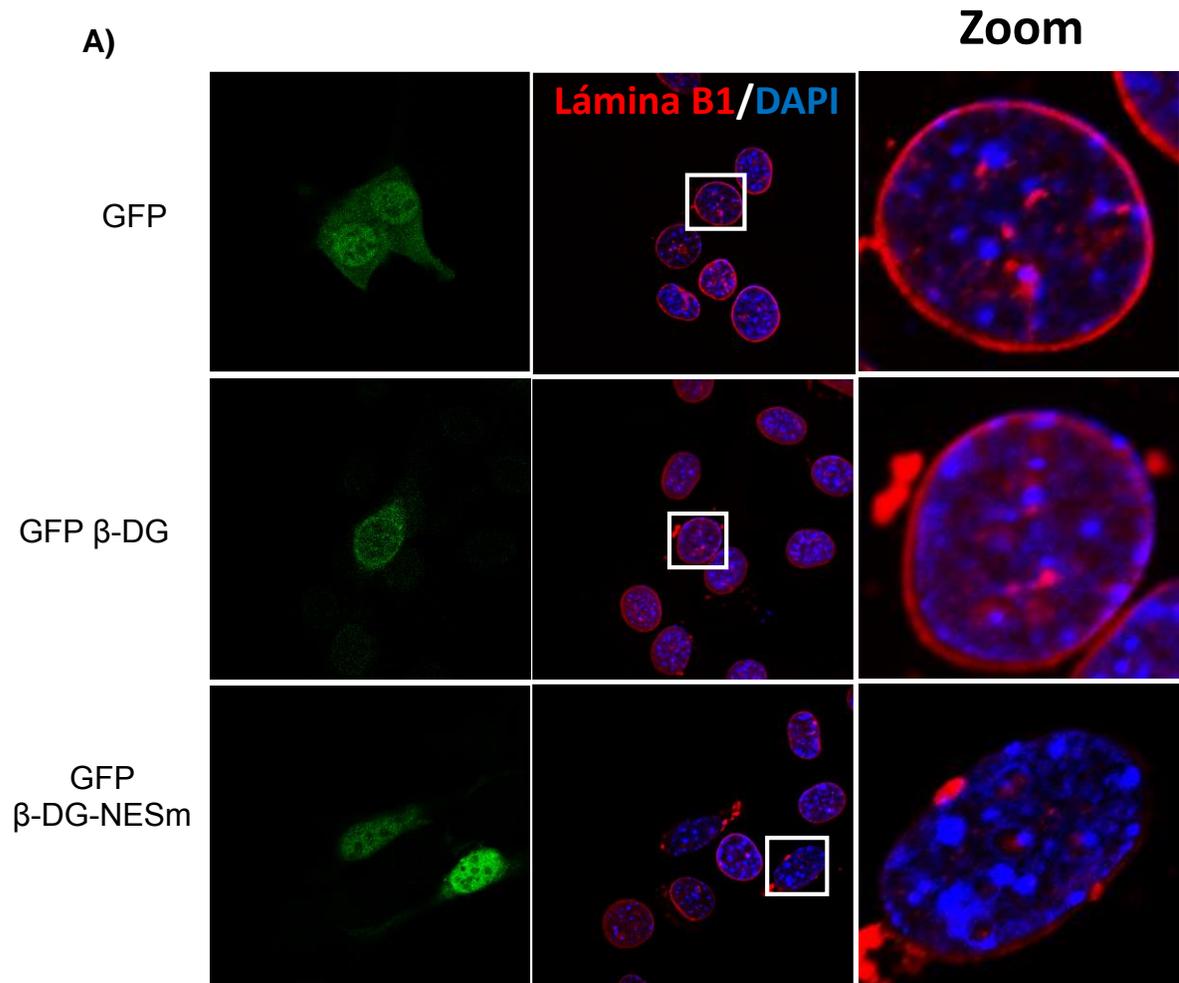


Figura 10. A) Distribución de la lámina A/C en las células C2C12 que sobreexpresan las proteínas de fusión GFP, GFP-β-DG y β-DG NESmut. Las células C2C12 se transfectaron transitoriamente y trascurridas 24 h post-transfección se fijaron y se contratiñeron con DAPI para visualizar los núcleos. Se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopia confocal, con cortes ópticos a nivel del núcleo. B) Se contaron las células con distribución anormal de la lámina A/CB1 y los datos se sometieron a análisis estadístico utilizando la prueba t de Student.

En claro contraste, la acumulación nuclear de la proteína GFP-β-DG NESmut indujo la deslocalización hacia el citoplasma y disminución de la inmunotinción de la lámina B1, en comparación con el patrón de distribución que se obtuvo para esta proteína con la sobreexpresión de GFP y GFP-β-DG (Figura 11A). Se contó el número de células con inmunotinción anormal de la lámina B1 en cada cultivo y se demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los cultivos que expresan GFP o GFP-β-DG y el que expresa la proteína mutante GFP-β-DG NESmut (Figura 11B).



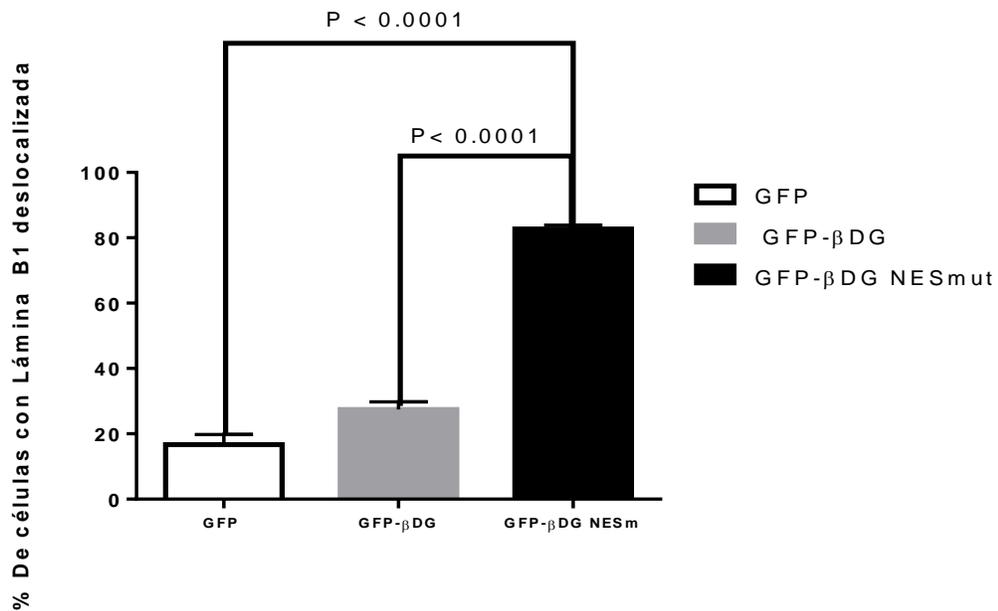
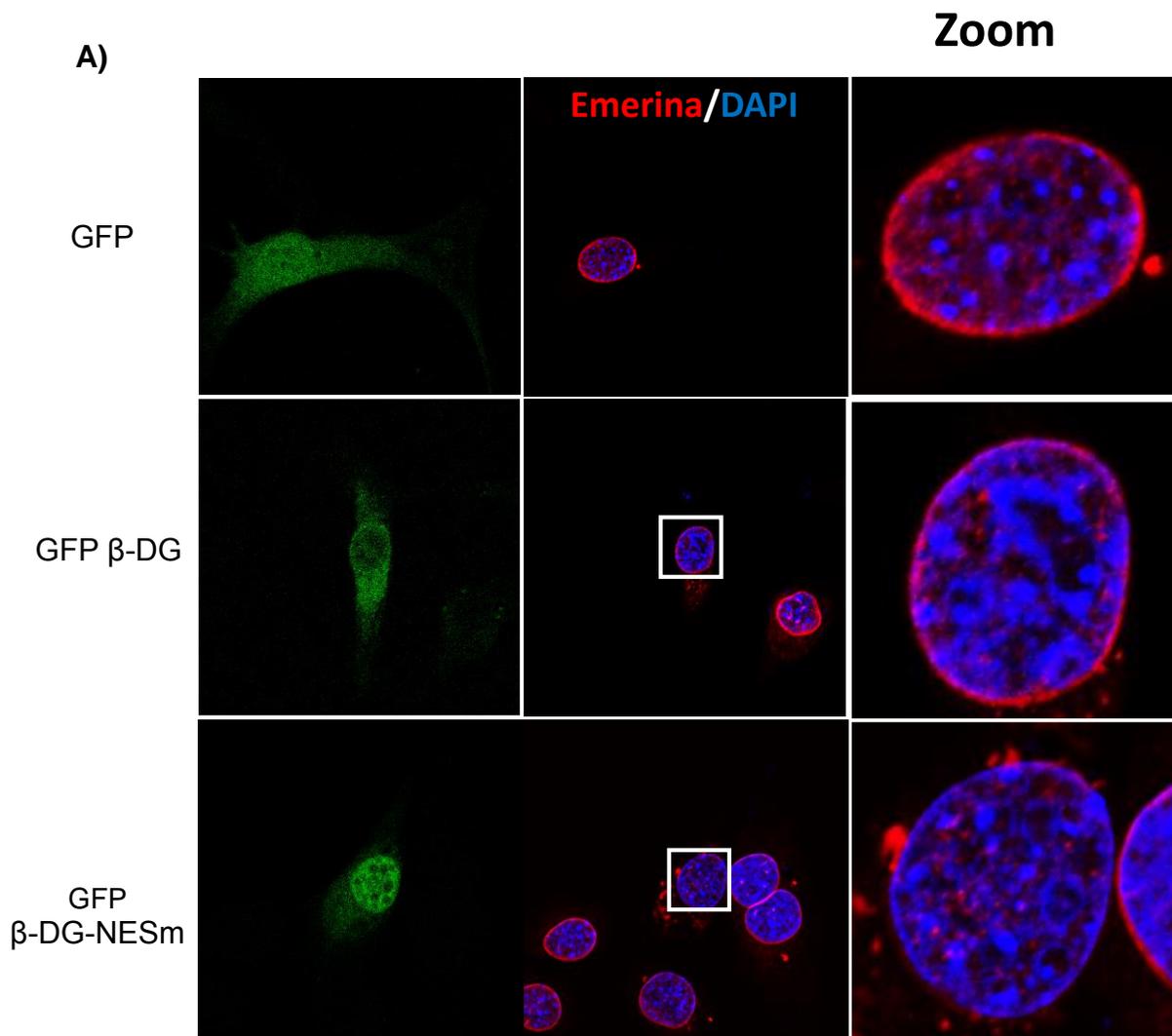


Figura 11. A) Distribución de la lámina B1 en las células C2C12 que expresan las proteínas de fusión GFP, GFP- β-DG y β-DG NESmut. Las células se transfectaron transitoriamente para expresar las proteínas indicadas en la Figura, y 24 h post-transfección las células se fijaron, los núcleos se tiñeron con DAPI y las muestras se analizaron mediante microscopia confocal. Se muestran imágenes representativas con cortes ópticos a nivel del núcleo. B) Se contaron las células con distribución anormal de la lámina B1 y los datos se sometieron a análisis estadístico utilizando la prueba t de Student.

Finalmente analizamos la localización subcelular de la emerina en las células que expresan GFP, GFP- β -DG y la variante mutante GFP- β -DG NESmut.

Las células que expresan GFP y GFP- β -DG exhiben distribución continua de la emerina en la envoltura nuclear; mientras que las células transfectadas con la variante mutante GFP- β -DG NESmut exhiben una localización alterada de la emerina; la señal de la proteína esta disminuida y se pierde por completo de la envoltura nuclear (Figura 12A). El número de células con distribución aberrante de la emerina es significativamente mayor en el cultivo que expresa la proteína GFP- β -DG NESmut, que en los cultivos que producen las proteínas GFP o GFP- β -DG (Figura 12B).



B)

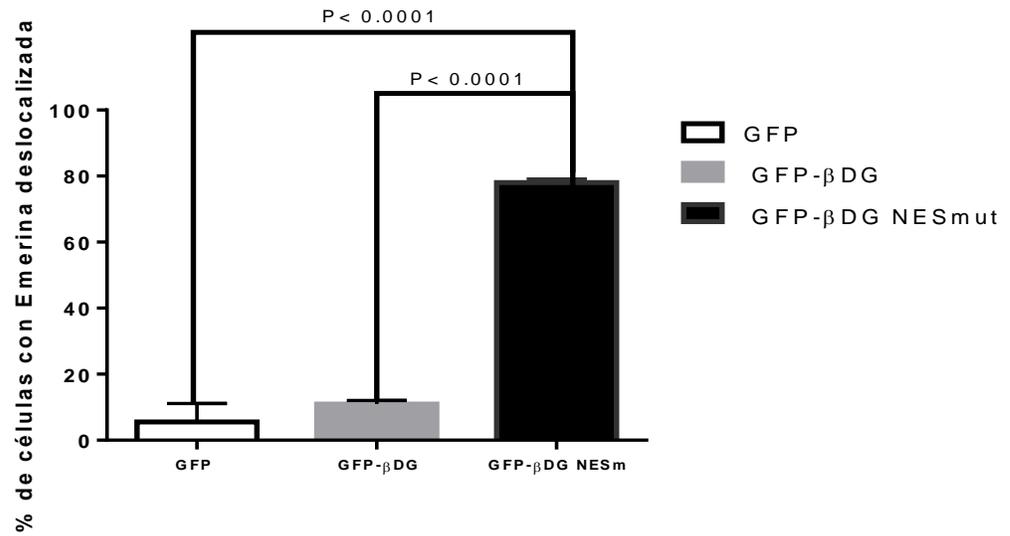


Figura 12. A) Localización subcelular de la emerina en las células que sobre-expresan las proteínas recombinantes GFP, GFP- β-DG y β-DG NESmut. Las células se transfectaron transitoriamente para expresar las proteínas indicadas en la Figura, y después de 24 h se permeabilizaron y fijaron. Los núcleos se tiñeron con DAPI previo al análisis por microscopia confocal. Se muestran imágenes representativas con cortes ópticos a nivel del núcleo. B) Se contaron las células con distribución anormal de la emerina y los datos se sometieron a análisis estadístico utilizando la prueba t de Student.

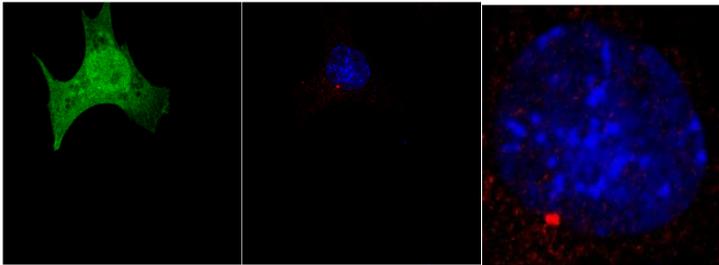
La deslocalización de la emerina causada por acumulación nuclear del β -DG altera la posición de los centrosomas

Decidimos analizar si la distribución alterada que presenta la emerina en las células que sobre-expresan la proteína mutante GFP- β -DG conlleva a alteraciones en sus funciones. Se ha reportado que la correcta localización de emerina en la envoltura nuclear es esencial para el posicionamiento de los centrosomas en la periferia nuclear. Por lo tanto, procedimos realizar ensayos de inmunofluorescencia para la γ -tubulina (proteína constitutiva de los centrosomas) en las C2C12 transfectadas con las proteínas reporteras GFP, GFP- β -DG y GFP- β -DG NESmut, con la finalidad de examinar la distribución de los centrosomas.

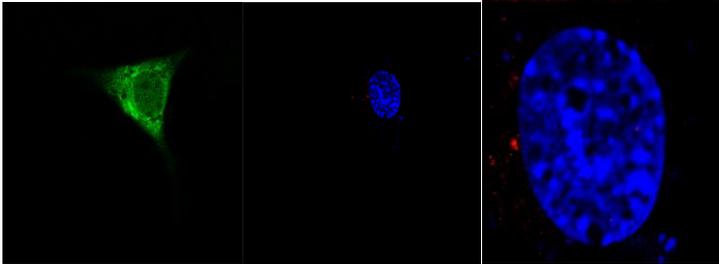
En las células que expresan GFP o GFP- β -DG se encontró que la distancia ente los centrosomas y la envoltura nuclear es de 1.44 y 2.2 μ m respectivamente, mientras que en las células que expresan la variante mutante GFP- β -DG NESmut la distancia fue de 2.83 μ m. Así mismo, se observó que en este último cultivo un 29% de las células presentan centrosomas en el interior del núcleo, en comparación con un 17% de las células que expresan la GFP sola.

A)

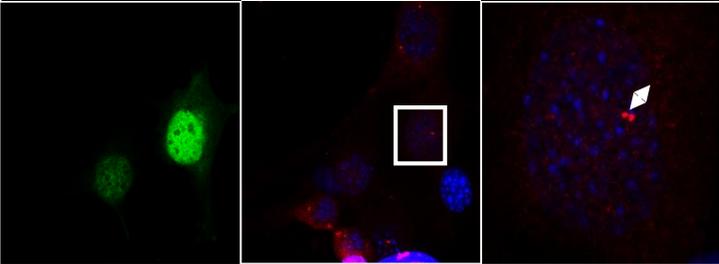
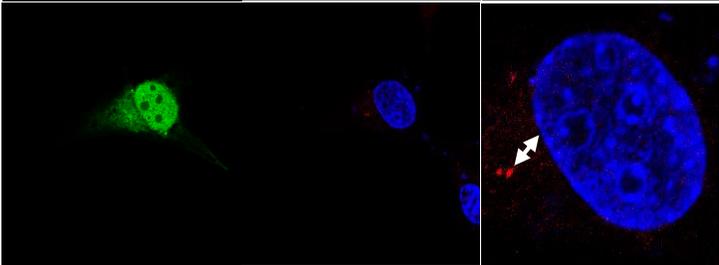
GFP



GFP β -DG



GFP β -DG
NESm



B)

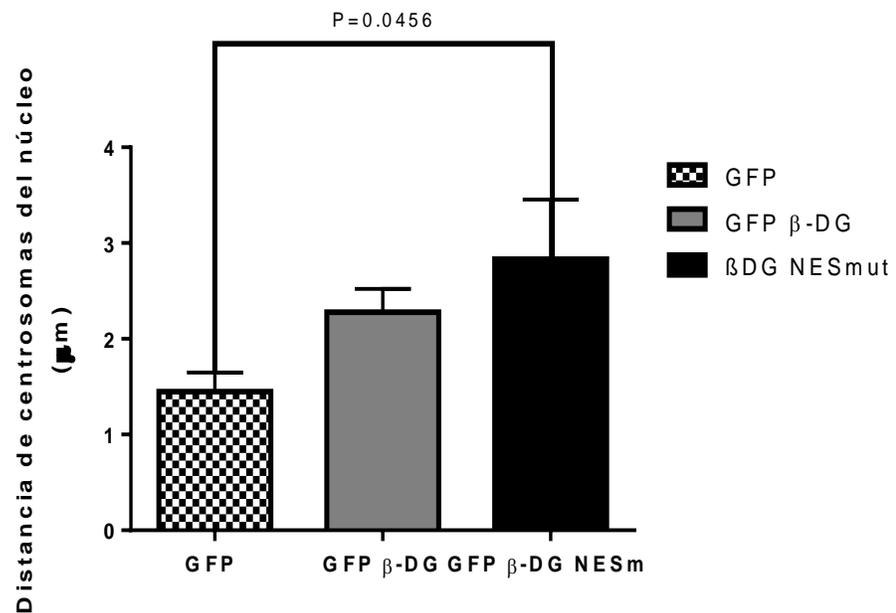
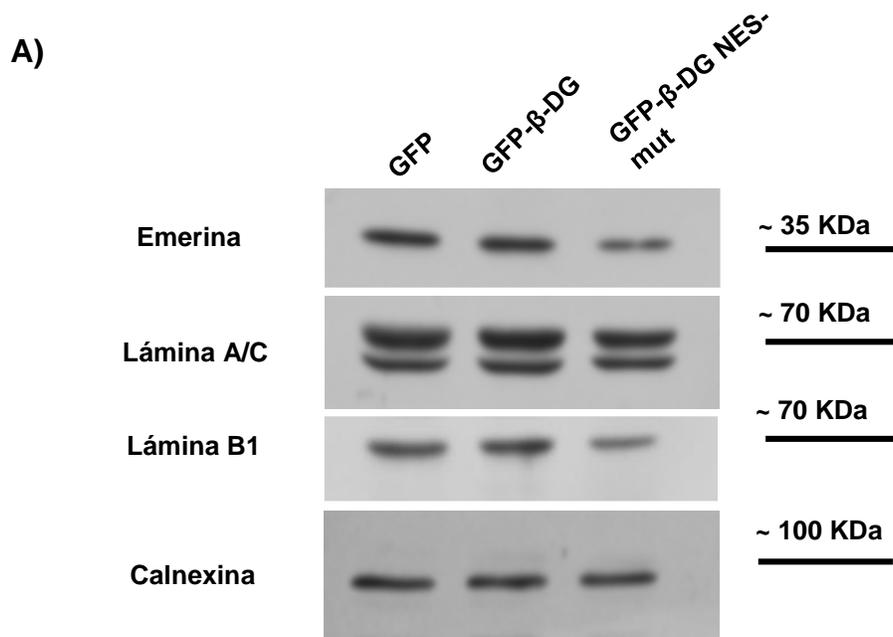


Figura 13. A) Análisis de la distancia entre los centrosomas y la envoltura nuclear en las células que expresan GFP, GFP- β-DG o β-DG NESmut. Las células transfectadas se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia indirecta para la proteína γ-tubulina y los núcleos se tiñeron con DAPI. Las preparaciones se analizaron mediante microscopia confocal y se muestran cortes ópticos representativos de 3 experimentos independientes. B) Se midió la distancia de los centrosomas a la envoltura nuclear en 100 células de cada cultivo y se lleva a cabo un análisis estadístico por el método t de Student.

Enseguida, llevamos a cabo ensayos de inmunodetección en fase sólida para analizar si la alterada localización y baja inmunotinción de la emerina y lámina B1, presente en las células que sobreexpresan la proteína mutante GFP- β -DG NESmut, correlaciona con bajos niveles de estas proteínas. De acuerdo a lo esperado, observamos que los niveles de emerina, lámina B1 y lámina A son significativamente menores (50%, 45% y 23% respectivamente) en los extractos de células que sobre-expresan la proteína GFP- β -DG NESmut, con respecto a los de células que sobre-expresan GFP o GFP- β -DG (Figura 14 A y B).



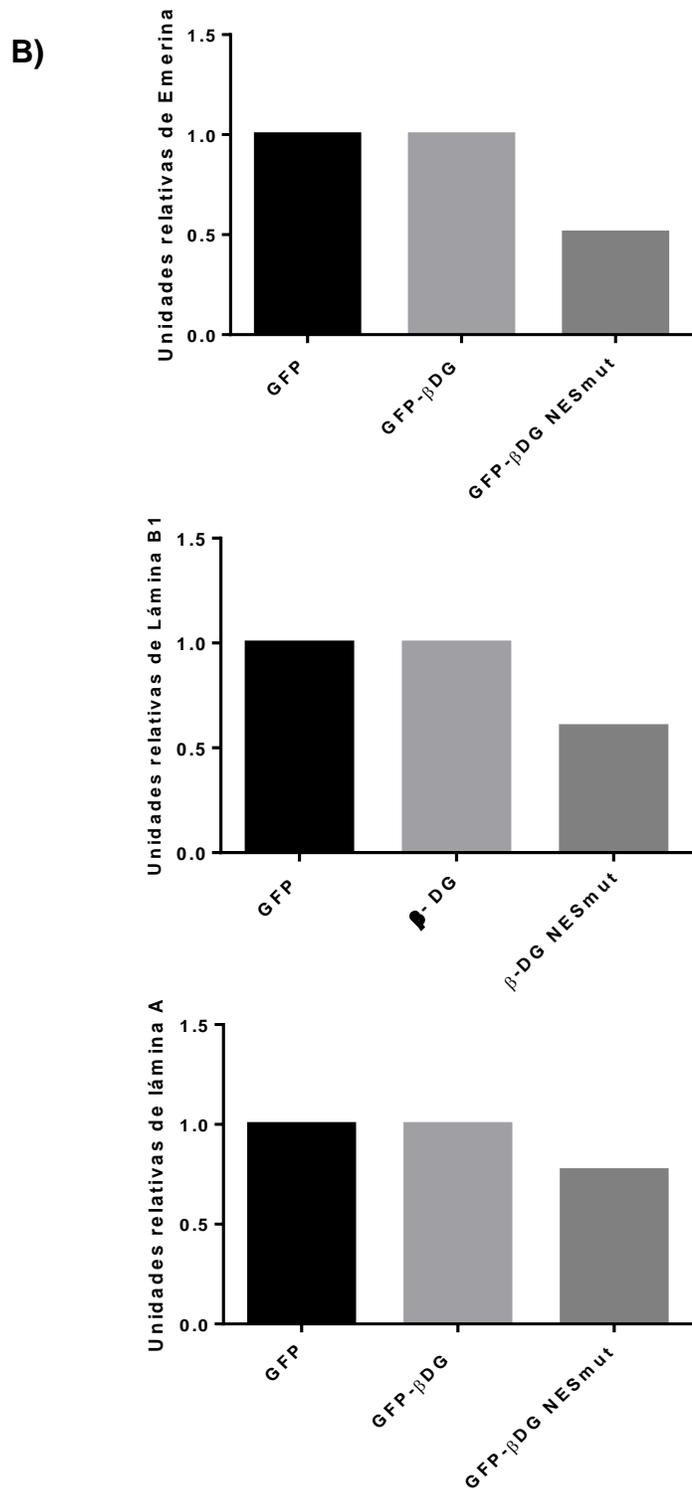


Figura 14. A) Se obtuvieron extractos totales de células C2C12 que expresan de manera estable GFP, GFP- β -DG o β -DG NESmut, y se sometieron a

inmunodetección en fase sólida, utilizando anticuerpos específicos para las proteínas de envoltura nuclear emerina, lámina B1, lamina A/C y calnexina (control de carga). B) Se cuantificaron los niveles de las proteínas mediante densitometría de las placas de rayos X y los valores se sometieron a un análisis estadístico utilizando una prueba no paramétrica.

DISCUSIÓN:

En el presente trabajo se analizó la relevancia del exporte nuclear del β -DG sobre la organización y función de la envoltura nuclear. Demostramos que la desregulación del exporte nuclear del β -DG con su subsecuente acumulación nuclear, provoca la deslocalización de la emerina y la lámina B1 pero no de la lámina A/C. Así mismo evidenciamos que la deslocalización de la emerina conlleva a la alteración de una de sus funciones, el mantenimiento de la distancia de los centrosomas a la envoltura nuclear.

Es de llamar la atención que la lámina A/C no se afectó por la acumulación nuclear del β -DG. Sin embargo es necesario mencionar que aunque las láminas B1 y A/C forman redes interconectadas en la envoltura nuclear, sus propiedades bioquímicas y las proteínas con las que se asocian cada una de ellas son diferentes. Es probable que en nuestro modelo de estudio existan otras proteínas que propicien la correcta distribución de lámina A/C que no se ven afectadas por la cantidad anormal del β -DG nuclear (Nigg 1992).

Visualizamos dos posibles mecanismos para explicar porque la acumulación nuclear de la variante mutante GFP- β -DG NESmut perturba la distribución de la lámina B1 y la emerina. La primera hipótesis se basa en el hecho de que las mutaciones que porta la proteína mutante en la NES se localizan en el dominio transmembranal, lo que podría ocasionar que la proteína de fusión no se inserte en la membrana nuclear pero si interaccione con la lámina B1 y la emerina y las desplace hacia el nucleoplasma, donde serían degradadas rápidamente. En contra de esta idea está el hecho de que la acumulación anormal de la proteína silvestre GFP- β -DG, observada en algunas células a las 36 horas post-transfección, también altera la localización de la emerina y la lámina B1, lo que indica que es la acumulación del β -DG y no la alteración del dominio transmembranal la principal causa del daño sobre la envoltura nuclear. La segunda presunción se basa en el hecho de que la interacción del β -DG con las proteínas de la envoltura nuclear emerina, lámina B1 y lámina A/C es crucial para regular la estructura y función de la envoltura nuclear (Martinez-Vieyra,

Vasquez-Limeta et al. 2013), por lo tanto, es posible que el exceso del β -DG en el núcleo altere la estequiometría de esta red de interacciones, ocasionando el desplazamiento de la lámina B1 y de la emerina de la envoltura nuclear. Una red de interacciones específica para la lámina B1 involucra las proteínas Dp71 (Villarreal-Silva, Centeno-Cruz et al. 2011) y α -distrobrevina (Aguilar, Wagstaff et al. 2015), dos moléculas íntimamente relacionadas a su vez con el β -DG (Ilarraza-Lomeli, Cisneros-Vega et al. 2007); proponemos que la acumulación nuclear anormal de β -DG perturba la distribución o niveles de la Dp71 y/o α -distrobrevina, lo que repercutiría de forma secundaria sobre el anclaje de la lámina B1 a la envoltura nuclear, ya que se ha visto que las primeras dos proteínas son necesarias para la correcta distribución de la lámina B1 (Villarreal-Silva, Centeno-Cruz et al. 2011) (Aguilar, Wagstaff et al. 2015),

Como se mencionó antes, la deslocalización de la emerina alteró la distancia que deben guardar los centrosomas con respecto a la envoltura nuclear. Se conoce que la emerina mantiene los centrosomas cercanos a la membrana nuclear por lo que creemos que su exclusión de la envoltura nuclear está directamente relacionado con la alteración de este proceso celular. El distanciamiento de los centrosomas conlleva a una segregación cromosomal aberrante, pérdida de la polaridad celular y defectos en la división celular (Bettencourt-Dias and Glover 2007) (Sato, Mizumoto et al. 2001); por lo tanto sería interesante analizar la fase de mitosis de las células que sobre-expresan GFP- β -DG NESmut. Además observamos un porcentaje de células con centrosomas en el interior del núcleo, lo que es presuntivo de un estancamiento en la fase G0/G1 del ciclo celular.

La emerina es una proteína multifuncional por lo que es de esperarse que su deslocalización de la envoltura nuclear ocasione la alteración de otros procesos nucleares. Por ejemplo, la potencial perturbación de la interacción de la emerina con el factor de transcripción Lmo7 (Lim-domain-only7) podría alterar la expresión de un grupo selectivo de genes; así mismo, la deficiencia de emerina podría causar la acumulación nuclear de β -catenina, y consecuentemente

alterar la vía de señalización Wnt, implicada en proliferación y diferenciación celular. Fallas en la asociación de emerina con BAF (Barrier to autointegration factor) potencialmente alterarían el ensamble post-mitótico, la viabilidad celular, la remodelación de cromatina y la progresión del ciclo celular. Finalmente, presumimos que cambios en la distribución de la emerina dañarían la función del complejo LINC (Complejo de Unión de Citoesqueleto y Nucleoesqueleto), el cual transmite fuerzas mecánicas del citoesqueleto a través de la envoltura nuclear hacia el nucleoesqueleto. Esta hipótesis está basada en el hecho de que la emerina se asocia directamente con las nesprinas y las proteínas SUN (Koch and Holaska 2013), componentes esenciales del complejo LINC.

Por lo que respecta a la lámina B1, su deslocalización de la envoltura nuclear podría alterar el mantenimiento de la morfología del núcleo, la condensación de los cromosomas en interfase, la formación de la matriz del huso mitótico durante la mitosis, la expresión génica y la plasticidad del nucléolo (Tsai, Wang et al. 2006), (Martin, Chen et al. 2009). Consistente con esta idea, Vélez Aguilera observó disgregación de los nucléolos en las células que sobreexpresan la proteína GFP- β -DG NESmut (Tesis Doctoral; resultados no publicados), lo que finalmente repercutiría en la biosíntesis de ribosomas (Tang, Maya-Mendoza et al. 2008).

En conclusión, La desregulación del transporte nuclear del β -DG con la consecuente acumulación nuclear anormal de la proteína ocasiona daños severos sobre la distribución y funcionalidad de la envoltura nuclear, lo que resalta sin lugar a dudas la importancia del transporte nuclear del β -DG para controlar los niveles precisos de la proteína que se requieren en los diferentes compartimentos celulares.

CONCLUSIONES

- La desregulación del exporte nuclear del β -DG acumula a la proteína en el núcleo, lo que consecuentemente altera la localización de las proteínas de envoltura nuclear emerina y lámina B1, pero no lámina A/C.
- La deslocalización de la emerina de la envoltura nuclear, causada por la acumulación nuclear anormal del β -DG, altera el posicionamiento de los centrosomas.

PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión a nivel de RNA mensajero de la emerina, lámina B1 y lámina A/C.
- Analizar el impacto de la acumulación nuclear del β -DG sobre otras funciones de la envoltura nuclear.

BIBLIOGRAFÍA

- "<Dystroglycan, an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton.pdf>."
- "<Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix.pdf>."
- Aguilar, A., K. M. Wagstaff, R. Suarez-Sanchez, S. Zinker, D. A. Jans and B. Cisneros (2015). "Nuclear localization of the dystrophin-associated protein alpha-dystrobrevin through importin alpha2/beta1 is critical for interaction with the nuclear lamina/maintenance of nuclear integrity." *Faseb j* **29**(5): 1842-1858.
- Barresi, R. and K. P. Campbell (2006). "Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease." *J Cell Sci* **119**(Pt 2): 199-207.
- Batchelor, C. L., J. R. Higginson, Y. J. Chen, C. Vanni, A. Eva and S. J. Winder (2007). "Recruitment of Dbl by ezrin and dystroglycan drives membrane proximal Cdc42 activation and filopodia formation." *Cell Cycle* **6**(3): 353-363.
- Berk, J. M., K. E. Tiff and K. L. Wilson (2013). "The nuclear envelope LEM-domain protein emerin." *Nucleus* **4**(4): 298-314.
- Bettencourt-Dias, M. and D. M. Glover (2007). "Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(6): 451-463.
- Bozzi, M., S. Morlacchi, M. G. Bigotti, F. Sciandra and A. Brancaccio (2009). "Functional diversity of dystroglycan." *Matrix Biol* **28**(4): 179-187.
- Camps, J., M. R. Erdos and T. Ried (2015). "The role of lamin B1 for the maintenance of nuclear structure and function." *Nucleus* **6**(1): 8-14.
- Chook, Y. M. and H. Y. Fung (2014). "Atomic basis of CRM1-cargo recognition, release and inhibition." *Semin Cancer Biol*.
- Chow, K. H., R. E. Factor and K. S. Ullman (2012). "The nuclear envelope environment and its cancer connections." *Nat Rev Cancer* **12**(3): 196-209.
- Dechat, T., S. Vlcek and R. Foisner (2000). "Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics." *J Struct Biol* **129**(2-3): 335-345.
- Deyst, K. A., M. A. Bowe, J. D. Leszyk and J. R. Fallon (1995). "The alpha-dystroglycan-beta-dystroglycan complex. Membrane organization and relationship to an agrin receptor." *J Biol Chem* **270**(43): 25956-25959.
- Gonzalez-Ramirez, R., S. L. Morales-Lazaro, V. Tapia-Ramirez, D. Mornet and B. Cisneros (2008). "Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis." *J Cell Biochem* **105**(3): 735-745.
- Gumerson, J. D. and D. E. Michele (2011). "The dystrophin-glycoprotein complex in the prevention of muscle damage." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 210797.
- Henry, M. D. and K. P. Campbell (1996). "Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton." *Curr Opin Cell Biol* **8**(5): 625-631.
- Hutchison, C. J. (2014). "B-type lamins in health and disease." *Semin Cell Dev Biol* **29**: 158-163.
- Hutten, S. and R. H. Kehlenbach (2007). "CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond." *Trends Cell Biol* **17**(4): 193-201.
- Ibraghimov-Beskrovnya, O., J. M. Ervasti, C. J. Leveille, C. A. Slaughter, S. W. Sernett and K. P. Campbell (1992). "Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix." *Nature* **355**(6362): 696-702.

Ilarraza-Lomeli, R., B. Cisneros-Vega, L. Cervantes-Gomez Mde, D. Mornet and C. Montanez (2007). "Dp71, utrophin and beta-dystroglycan expression and distribution in PC12/L6 cell cocultures." Neuroreport **18**(16): 1657-1661.

Jayasinha, V., H. H. Nguyen, B. Xia, A. Kammesheidt, K. Hoyte and P. T. Martin (2003). "Inhibition of dystroglycan cleavage causes muscular dystrophy in transgenic mice." Neuromuscul Disord **13**(5): 365-375.

Kalderon, D., W. D. Richardson, A. F. Markham and A. E. Smith (1984). "Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen." Nature **311**(5981): 33-38.

Koch, A. J. and J. M. Holaska (2013). "Emerin in health and disease." Semin Cell Dev Biol.

Laba, J. K., A. Steen and L. M. Veenhoff (2014). "Traffic to the inner membrane of the nuclear envelope." Curr Opin Cell Biol **28C**: 36-45.

Lara-Chacon, B., M. B. de Leon, D. Leocadio, P. Gomez, L. Fuentes-Mera, I. Martinez-Vieyra, A. Ortega, D. A. Jans and B. Cisneros (2010). "Characterization of an Importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan." J Cell Biochem **110**(3): 706-717.

Martin, C., S. Chen, A. Maya-Mendoza, J. Lovric, P. F. Sims and D. A. Jackson (2009). "Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli." J Cell Sci **122**(Pt 10): 1551-1562.

Martinez-Vieyra, I. A., A. Vasquez-Limeta, R. Gonzalez-Ramirez, S. L. Morales-Lazaro, M. Mondragon, R. Mondragon, A. Ortega, S. J. Winder and B. Cisneros (2013). "A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts." Biochim Biophys Acta **1833**(3): 698-711.

Mattaj, I. W. (2004). "Sorting out the nuclear envelope from the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(1): 65-69.

Moore, C. J. and S. J. Winder (2010). "Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs." Cell Commun Signal **8**: 3.

Moudjou, M., N. Bordes, M. Paintrand and M. Bornens (1996). "gamma-Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms." J Cell Sci **109** (Pt 4): 875-887.

Nigg, E. A. (1992). "Assembly-disassembly of the nuclear lamina." Curr Opin Cell Biol **4**(1): 105-109.

Nigg, E. A. and T. Stearns (2011). "The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries." Nat Cell Biol **13**(10): 1154-1160.

Robbins, J., S. M. Dilworth, R. A. Laskey and C. Dingwall (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." Cell **64**(3): 615-623.

Salpingidou, G., A. Smertenko, I. Hausmanowa-Petrucewicz, P. J. Hussey and C. J. Hutchison (2007). "A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane." J Cell Biol **178**(6): 897-904.

Sato, N., K. Mizumoto, M. Nakamura, N. Maehara, Y. A. Minamishima, S. Nishio, E. Nagai and M. Tanaka (2001). "Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells." Cancer Genet Cytogenet **126**(1): 13-19.

Spence, H. J., A. S. Dhillon, M. James and S. J. Winder (2004). "Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade." EMBO Rep **5**(5): 484-489.

Tang, C. W., A. Maya-Mendoza, C. Martin, K. Zeng, S. Chen, D. Feret, S. A. Wilson and D. A. Jackson (2008). "The integrity of a lamin-B1-dependent nucleoskeleton is a fundamental determinant of RNA synthesis in human cells." J Cell Sci **121**(Pt 7): 1014-1024.

Terry, L. J., E. B. Shows and S. R. Wenthe (2007). "Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport." Science **318**(5855): 1412-1416.

Tsai, M. Y., S. Wang, J. M. Heidinger, D. K. Shumaker, S. A. Adam, R. D. Goldman and Y. Zheng (2006). "A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly." Science **311**(5769): 1887-1893.

Vasquez-Limeta, A., K. M. Wagstaff, A. Ortega, D. H. Crouch, D. A. Jans and B. Cisneros (2014). "Nuclear import of beta-dystroglycan is facilitated by ezrin-mediated cytoskeleton reorganization." PLoS One **9**(3): e90629.

Villarreal-Silva, M., F. Centeno-Cruz, R. Suarez-Sanchez, E. Garrido and B. Cisneros (2011). "Knockdown of dystrophin Dp71 impairs PC12 cells cycle: localization in the spindle and cytokinesis structures implies a role for Dp71 in cell division." PLoS One **6**(8): e23504.

Wagstaff, K. M. and D. A. Jans (2009). "Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms." Traffic **10**(9): 1188-1198.

Yaffe, D. and O. Saxel (1977). "Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle." Nature **270**(5639): 725-727.

Foisner R. Dynamic Connections of Nuclear Envelope Proteins to Chromatin and the Nuclear Matrix. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6125/>

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Bacterial transformation. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21993/>