



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

***“Expresión y distribución subcelular del β -dístroglicano y las
proteínas de la envoltura nuclear en líneas celulares de cáncer de
próstata“***

Tesis que presenta

Q.F.B. ARIANA MARIA SANDOVAL DUARTE

Para obtener el grado de

Maestra en ciencias

En la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directores de Tesis:

DR. BULMARO CISNEROS VEGA

DR. JOSÉ EFRAIN GARRIDO GUERRERO

México, Distrito Federal.

Agosto del 2015.

Este trabajo fué realizado en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N bajo la tutoría del Dr. Bulmaro Cisneros Vega y el Dr. José Efraín Garrido Gerrero del departamento de Genética y Biología Molecular y bajo la asesoría del Dr. Jaime García Mena del mismo departamento así como del Dr. Francisco Camacho Arroyo del departamento de Farmacología.

El presente trabajo fue apoyado por el CONACyT a través del proyecto 237123.

Durante la realización del mismo, la estudiante Ariana María Sandoval Duarte fue apoyada como becaria del CONACyT con el número de registro 485071.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A dios, por guiarme por este camino y permitirme lograr un reto mas en mi vida.
- ❖ A mis padres y mi hermana por todo su amor, apoyo incondicional y ejemplo de trabajo, sin ellos no hubiera sido nada posible.
- ❖ A mi novio Hazael, que ha sido mi pilar mas grande después de mi familia, mi compañero durante mucho tiempo y sobre todo mi mejor amigo.
- ❖ Al Dr. Bulmaro Cisneros, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y por el apoyo, consejos y asesoramiento otorgados durante estos casi dos años.
- ❖ A los Doctores José Efraín Garrido Guerrero, Jaime García Mena y Francisco Camacho Arroyo por los consejos y el tiempo otorgado durante la realización de este proyecto.
- ❖ A Juan de Dios, por ser un gran amigo y maestro durante el desarrollo de este proyecto, gracias por todos tus consejos tanto personales como laborales.
- ❖ A mis amigos y compañeros del laboratorio Ruth, Naty, Ricardo, Juan de Dios, Pau, Nely, Eli, José, Gris, Wendy Viri y Marco por todos sus consejos y apoyo al presentarse cualquier tipo de problema y por los gratos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio.
- ❖ A mis amigas de la maestría Ruth, Naty, Bety, por estar siempre en los momentos mas difíciles, por su apoyo incondicional tanto personal como laboral.
- ❖ A mis amigos Melissa, Ramsés, Vale, por su compañía y cariño durante ya muchos años y por hacerme sentir como en casa a pesar de estar fuera de ella.
- ❖ A Pablo Gómez, auxiliar del laboratorio, por su apoyo y paciencia durante este tiempo.

CONTENIDO

1. ABSTRACT	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCION.....	3
3.1 Complejo de proteínas asociadas a distrofina, DAPC.....	3
3.2 El Complejo de los Distroglicanos	4
3.2.1 El α -distroglicano	4
3.2.2 El β -distroglicano	5
3.2.2.1 Fosforilación de β -distroglicano.....	7
3.2.2.2 Procesamiento de β -distroglicano.....	7
3.2.2.3 Localización nuclear del β -distroglicano.....	8
4. ANTECEDENTES.....	10
4.1 β -distroglicano y su relación con la estructura nuclear.....	10
4.2 β -distroglicano y su implicación en el cáncer.....	10
4.2.1 Cáncer.....	10
4.2.2 Alteraciones en la envoltura nuclear de células cancerosas.....	12
4.2.3 Alteraciones en el transporte núcleo-citoplasma de células cancerosas.....	14
5. β -distroglicano en Cáncer de Próstata.....	15
6. JUSTIFICACION.....	20
7. HIPOTESIS.....	20
8. OBJETIVOS.....	21
8.1 Objetivo General.....	21
8.2 Objetivos particulares.....	21
9. MODELO DE ESTUDIO.....	22
10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....	24
11. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25

11.1 Cultivo Celular.....	25
11.1.1 Tratamiento con Leptomicina B.....	25
11.2 Inmunofluorescencia indirecta.....	25
11.3 Inmunofluorescencia de doble marca.....	26
11.4 Transformación de bacterias.....	27
11.5 Obtención de DNA plasmídico a baja escala (Mini Prep).....	27
11.6 Transfección celular.....	28
11.7 Extracción de Proteínas Totales.....	29
11.8 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	29
11.9 Análisis de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida.....	29
11.10 Inmunodetección en Fase Sólida.....	30
12. RESULTADOS.....	32
12.1 Análisis morfológico de las líneas celulares de cáncer de próstata con grado de invasividad creciente.....	32
12.2 Distribución y Expresión del β -dístroglicano en las diferentes líneas celulares de cáncer de próstata.....	33
12.2.1 El β -Dístroglicano tiene una localización predominantemente peri nuclear en la línea celular metastásica DU145.....	36
12.3 Distribución y Expresión de las proteínas de envoltura nuclear lámina B1, lámina A/C y emerina en las diferentes líneas celulares de cáncer de próstata.....	37
12.4 El sistema general de importe nuclear no se encuentra alterado en la línea celular de cáncer de próstata metastásico DU145.....	40
12.5 Análisis del Exporte Nuclear del β -DG en la línea celular de cáncer metastásico DU145.....	42
13. DISCUSIÓN.....	45
14. CONCLUSIONES.....	48
15. PERSPECTIVAS.....	48
16. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	49

ABSTRACT. β -dystroglycan (β -DG) is imported into the nucleus via recognition of its nuclear localization signal (NLS) by importins; in the nucleus β -DG interacts in a functional manner with the nuclear envelope proteins emerin and lamins A/C and B1. Interestingly β -DG as well as the aforementioned nuclear envelope proteins have recently been related to certain types of cancers, including prostate cancer. In the present study we analyzed the subcellular distribution of β -DG and the nuclear envelope proteins in different prostate cancer cell lines with varying degrees of invasiveness, using immunofluorescence and western blot assays. We noted that β -DG localizes in the nucleus and nucleolus of the control cell line RWPE1, and that such distribution remains the same in the different cancer cell lines. In an opposite way, nuclear localization of β -DG decreases in the metastatic cell line DU145, which correlates with gross alterations in the expression and localization of the three nuclear proteins emerin and lamins A/C and B1. We also noted that decreased nuclear localization of β -DG is accompanied by polarized cytoplasmic accumulation of the protein, implying a perturbation of its nucleo-cytoplasmic traffic. Nevertheless, diagnostic tests using GFP reporter proteins fused to canonical NLS and NES sequences as well as Leptomycin B, an specific inhibitor of the exportin CRM1, revealed that the general mechanisms of nuclear import and export of proteins is not perturbed in the DU145 cancer cells. However, the specific transport of β -DG appears to be deficient. Overall, our results suggest that nuclear deficiency of β -DG might be associated with the abnormal localization and expression of the nuclear envelope proteins emerin and lamins A/C and B1 in the metastatic cancer cell line DU145.

RESUMEN. El β -dístroglicano (β -DG) es importado al núcleo mediante su señal de localización nuclear (NLS) la cual es reconocida por importinas y donde interactúa con las proteínas de envoltura nuclear emerina y láminas A/C y B1. De manera concurrente, alteraciones en la expresión y localización del β -DG y de las láminas nucleares se han descrito en el cáncer de próstata. En el presente estudio analizamos la expresión y distribución subcelular del β -DG y de las proteínas de envoltura nuclear emerina y láminas A/C y B1 en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata que presentan diferente grado de invasividad, mediante ensayos de inmunofluorescencia y western blot. El β -DG se localiza en el citoplasma, núcleo y nucléolo de la línea celular control RWPE1, y esta distribución permanece inalterada en las diferentes líneas de células cancerosas. Coincidentemente, la distribución y expresión de las proteínas de envoltura nuclear tampoco está dañada en ninguna de las líneas celulares de cáncer de próstata analizada. En contraste, la localización nuclear del β -DG disminuye de manera significativa en la línea celular de cáncer de próstata metastásico DU145, lo que correlaciona con grandes alteraciones en la localización y los niveles de las tres proteínas de envoltura nuclear analizadas, emerina y láminas A/C y B1. Estos hallazgos implican que la deficiencia nuclear del β -DG pudiera conllevar a las alteraciones que presentan las proteínas de envoltura nuclear. Así mismo, debido a una acumulación citoplasmática polarizada de la proteína, hipotetizamos que los bajos niveles del β -DG nuclear son debidos a la alteración en su tráfico hacia y desde el núcleo. Así pues, observamos que el mecanismo de importe nuclear de proteínas al núcleo no se encuentra alterado de manera general, sin embargo; el transporte específico del β -DG hacia el núcleo parece ser deficiente mientras que el exporte nuclear específico para esta proteína no se encuentra dañado.

3. INTRODUCCION

3. El complejo de proteínas asociadas a la distrofina.

La membrana plasmática del tejido muscular, también llamada sarcolema, le da estabilidad a las células musculares durante los ciclos de contracción-relajación. El Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC por sus siglas en inglés, *Dystrophin Associated Protein Complex*) se localiza en el sarcolema y es esencial para conectar la matriz extracelular y el citoesqueleto, lo que provee de integridad y funcionalidad al tejido muscular[1].

El DAPC se encuentra organizado en 3 subcomplejos, los sarcoglicanos, α , β , γ y δ que son proteínas transmembranales, el subcomplejo de proteínas citoplasmáticas que incluye la sintrofina, la nNOS, la α -distrobrevina y la distrofina y por último, el subcomplejo del distroglicano conformado por la subunidad extracelular α y la subunidad transmembranal β [2] los cuales permiten la interconexión de la matriz extracelular con el citoesqueleto (FIG 1). Mutaciones en algunos de los genes que codifican para los sarcoglicanos o en el gen de la distrofina causan la disrupción del complejo DAPC y por ende el origen de una gran variedad de formas de distrofia muscular y otras enfermedades asociadas [3].

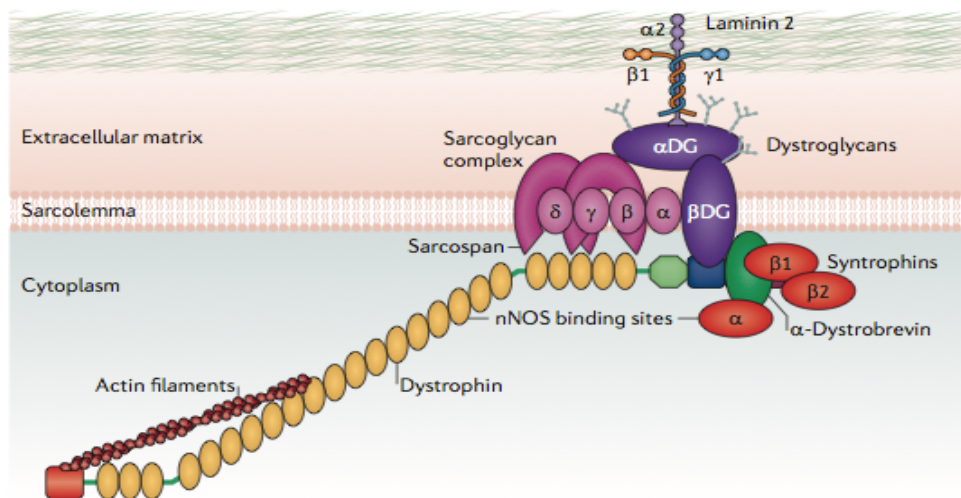


FIG.1 Esquema del complejo de proteínas asociadas a distrofina, DAPC. [4]

3.2 El complejo de los Distroglicanos

Los distroglicanos son codificados por el gen *DAG1*, localizado en el cromosoma 3p21 humano y el cromosoma 9 en ratón [5]. La secuencia codificante está organizada en dos exones separados por un intrón de gran tamaño [6]. El RNAm de 5.7 kb codifica para un polipéptido precursor de 895 aminoácidos [6] (FIG 2) y 160 kDa de peso [7]. Este propéptido, sufre un corte proteolítico en el retículo endoplásmico [8], entre la glicina 653 y la serina 654 [9], dentro del dominio SEA, un motivo proteico distintivo de proteínas transmembranales, para originar las subunidades α y β [8]. (FIG.2). Las subunidades interaccionan entre si de una forma no covalente en la membrana plasmática de la mayoría de los tejidos. Los primeros 29 aminoácidos del propéptido son predominantemente hidrofóbicos y representan el péptido señal que direccionará al receptor completo hacia la membrana plasmática [10].

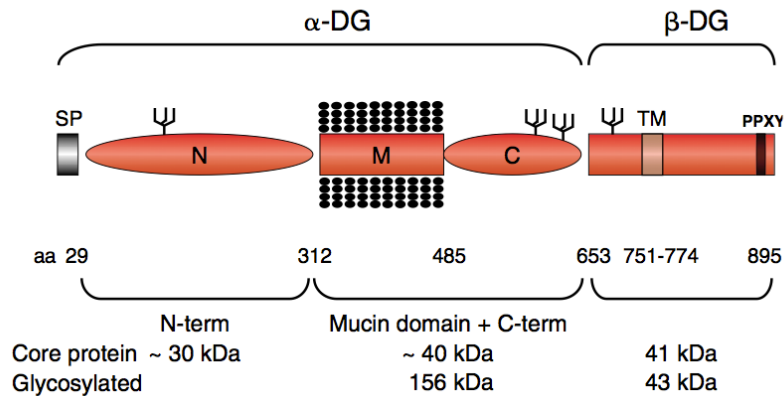


FIG 2. Dominios estructurales del propéptido del distroglicano.[11].

3.2.1 El α -distroglicano

La subunidad α del distroglicano proviene de la porción N-terminal del polipéptido precursor y tiene un peso molecular que varía entre los diferentes tejidos desde 120 kDa (en cerebro) hasta 156 kDa (en musculo esquelético) [6]. En cuanto a su estructura, el α -distroglicano contiene un dominio parecido a mucina, el cual posee una gran cantidad de sitios posibles de O-glicosilación y

conecta los dominios globulares C-terminal y N-terminal de la proteína [12]. Este último residuo contiene 3 sitios de N-glicosilación [6] (FIG.3).

La glicosilación de esta subunidad, le permite interactuar con distintos componentes de la matriz extracelular, como la laminina 2, la agrina y el perlecano [13] en músculo, mientras que en cerebro interacciona con la neurexina [14]. Estas interacciones están mediadas por la unión del α -dístroglicano a los dominios LG dependientes de calcio de estas proteínas [13]. La glicosilación del α -dístroglicano es esencial para el tejido muscular, como ha quedado de manifiesto por el hecho de que mutaciones en los genes que codifican para las enzimas encargadas de llevar a cabo estas modificaciones postraduccionales causan distintas enfermedades llamadas glicanopatías. La deficiente glicosilación del α -dístroglicano se ha involucrado recientemente en la generación de carcinomas invasivos, debido a que se interrumpe su conexión con la matriz extracelular [15]. Además, la glicosilación del α -dístroglicano le permite actuar como receptor celular para virus y bacterias, como *M.leprae*, *Lymphocytic choriomeningitis virus coriomeningitis linfocítico (LCMV)* [16] y el virus de la fiebre *Lassa (LFV)*[17], utilizando la proteína de la matriz extracelular laminina 2 como cofactor.

3.2.2 El β -Dístroglicano.

La porción C-terminal del propéptido es escindida para dar origen al β -Dístroglicano, el cual presenta un peso molecular de 43 kDa [7] y contiene como primer aminoácido del dominio N-terminal a la serina 654 [9]. El β -Dístroglicano contiene 1 sitio de N-glicosilación, un dominio transmembranal (aminoácidos 751-774) y una cola citoplasmática compuesta por 120 aminoácidos ricos en prolina [6], [11] (FIG.3).

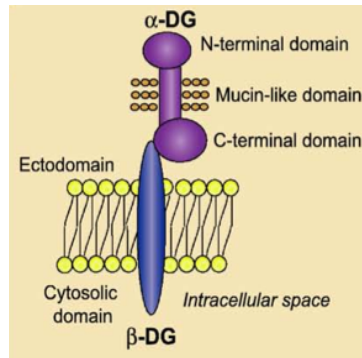


FIG.3. Organización estructural del distroglicano. Modificado de [18].

En la parte extracelular, el β -distroglicano interactúa mediante su dominio N-terminal con el α -distroglicano de forma no covalente [6], e intracelularmente con la distrofina en células musculares y con la utrofina en tejido no muscular [19]. Esta última interacción se establece a través del PPXY del β -Distroglicano localizado en su extremo C-terminal y el dominio WW de la distrofina/utrofina [3]. La distrofina y el mismo β -Distroglicano se unen a la actina para poder completar la conexión entre la matriz celular y el citoesqueleto [11]. Adicionalmente, la α -distrobrevina, se une a la región C-terminal del β -Distroglicano mediante su dominio *EF-hand* [20]. La caveolina-3, una proteína específica del músculo que se localiza en las caveolas (un tipo especial de balsa lipídica que aparece en la membrana como una diminuta invaginación en muchos tipos celulares de vertebrados, especialmente en células endoteliales y adipocitos [21]), compite con la distrofina por la unión con el motivo PPXY de β -distroglicano [22].

Otras moléculas que se unen con la región citoplasmática de β -distroglicano incluyen a la proteína de señalización Grb2, a través de su motivo SH2 que reconoce el aminoácido Tyr892 fosforilado presente en el motivo PPXY de β -distroglicano [23], diferentes componentes de la cascada de señalización de las MAP cinasas, como MEK y ERK [24] y rapsina, una proteína postsináptica involucrada en el agrupamiento del receptor a acetilcolina [25].

La región citoplasmática de β -distroglicano se ha implicado en la

reorganización del citoesqueleto, participando en la formación de filopodias, las cuales son esenciales para la motilidad celular en células mesenquimales, al unirse con el complejo Ezrina-Dbp-Cdc42 debido a que ezrina es capaz de unirse a actina [26], implicando a esta proteína en la morfogénesis celular [27].

3.2.2.1 Fosforilación del β -dístroglicano

Otro tipo de modificación postraduccional que sufre el β -dístroglicano es la fosforilación, la cual regula la interacción con diferentes complejos proteicos y de esta manera la activación de diferentes cascadas de señalización [28], [29]. La fosforilación ocurre en el aminoácido Tyr 892 presente en el dominio PPXY, siendo la cinasa Src la encargada de llevar a cabo este proceso [30]. La fosforilación del β -dístroglicano permite su interacción con proteínas con dominios SH2/3 como Grb2 [23], Fyn, Csk, NCK y SHC [31], y de forma opuesta, impide la unión del β -dístroglicano con proteínas con dominios WW, como la distrofina y utrofina [30].

Así mismo, se ha sugerido que la fosforilación del β -dístroglicano está implicada en el tráfico intracelular de la proteína debido a que se ha localizado la forma fosforilada en endosomas de reciclaje de células musculares, junto con la cinasa c-Src [32].

3.2.2.2 Procesamiento del β -dístroglicano

La disrupción de la unión entre el α y el β dístroglicano ha sido asociada con la aparición de diferentes enfermedades, como las sarcoglicanopatías [33]. Recientemente se ha identificado que la acción de metaloproteasas de la matriz extracelular, MMP-2 y MMP-9 [34] [35], procesan al β -dístroglicano llevando a cabo un corte entre los aminoácidos His-715 y Leu-716, lo cual remueve su ectodominio para originar una proteína truncada de 30 kDa [34]. La forma truncada del β -dístroglicano está presente en extractos proteicos de diferentes tejidos, incluyendo nervios periféricos, riñón, pulmón, y músculo liso, pero no de músculo esquelético, músculo cardíaco ni cerebro [35].

De manera interesante, la forma de 30 kDa del β -dístroglicano también ha sido encontrada en diferentes tejidos y líneas celulares de cáncer mama [36] y próstata [37], en procesos de metástasis en tejido vascular [38] y en un número importante de carcinomas [39]. En células que sufren metástasis se ha observado además de la proteína de 43 kDa la forma de 30 kDa antes mencionada [37], la cual se cree que se genera por la acción de las gelatinasas presentes en la membrana celular, ya que en este tipo de enfermedades estas enzimas se sobre-expresan para degradar la matriz extracelular y favorecer la invasividad de las células cancerosas [18].

3.2.2.3 Localización nuclear del β -dístroglicano

Estudios previos han revelado que diversas proteínas transmembranales, como los receptores Notch [40] y el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1) [41], son capaces de desprenderse de la membrana plasmática mediante proteólisis y liberación de su dominio citoplasmático, para ser transportados hacia el núcleo y llevar a cabo funciones nucleares específicas [42].

El proceso clásico de entrada de proteínas al núcleo es mediado por las importinas. La proteína a transportar, llamada “carga”, debe poseer en su secuencia una señal de localización nuclear (NLS) que es reconocida por la importina α , la cual necesita a su vez unirse a la importina β para que el complejo formado sea transportado al interior del núcleo a través del complejo del poro nuclear (NPC) [42].

En el núcleo, la proteína Ran-GTP se une a la importina β para disociar el complejo de importe y liberar la proteína carga. Al mismo tiempo que Ran-GTP e importina β son recicladas, la importina α se exporta en complejo con la carioferrina CAS y Ran-GTP. Finalmente, la proteína citoplasmática Ran-GAP, una proteína activadora de la GTPasa Ran, estimula a esta enzima para generar Ran-GDP, la cual se disocia de las importinas, para que estas estén listas para un nuevo ciclo de importe nuclear [42].

Recientemente nuestro grupo de investigación describió la localización nuclear de diferentes proteínas del DAPC en las células HeLa, en donde la Dp71, el β -dystroglicano y la β -dystrobrevina se asocian con la proteína de la envoltura nuclear lamina B1 y la proteína del citoesqueleto actina, sugiriendo que el DAPC funciona como andamiaje para mantener la estructura de la membrana nuclear [43]. En apoyo a estos resultados, se encontró al β -dystroglicano y al α -sarcoglicano enriquecidos en preparaciones de membrana nuclear de las células musculares de ratón C2C12 [44].

Particularmente, el β -dystroglicano es transportado hacia el núcleo por medio del reconocimiento de su NLS ($^{776}\text{RKKRKGK}^{782}$), localizada en la región yuxtamembranal, por medio de las importinas $\alpha 2/\beta 1$ [45].

Subsecuentemente, para llevar a cabo nuevamente una función en el citoplasma, o debido tal vez a que el β -dystroglicano no es requerido en el núcleo, este debe poseer un transporte retrogrado hacia el citoplasma, el cual, es mediado por la exportina CRM1 [Vélez Aguilera, 2014. Datos no publicados]. El proceso de exporte de proteínas desde el núcleo hacia el citoplasma no ha sido ampliamente descrito, sin embargo, se ha caracterizado predominantemente la actividad de la proteína perteneciente a la familia de carioferrinas β , CRM1, como la principal mediadora de este tipo de transporte. CRM1, reconoce dentro del núcleo a proteínas con secuencias NES ricas en Leucinas, para transportarlas hacia el citoplasma gracias a la energía que obtiene de su unión con Ran-GTP. La conversión de Ran-GTP a Ran-GDP en el citoplasma, permite la disociación de este complejo y la liberación de la proteína cargo, para a su vez, permitir el reciclaje de las moléculas de exporte para llevar a cabo un nuevo ciclo de transporte [46].

4. ANTECEDENTES

4.1 β -dístroglicano y su relación con la estructura del núcleo.

Con la finalidad de establecer la función que desempeña el β -dístroglicano en el núcleo, nuestro grupo de trabajo analizó su posible interacción con proteínas marcadoras de diferentes dominios nucleares mediante ensayos de inmunoprecipitación sobre extractos nucleares de las células C2C12. Se demostró que el β -dístroglicano interacciona con las proteínas de envoltura nuclear emerina y láminas B1 y A/C [47] (FIG.5). Así mismo, se disminuyó la expresión del β -dístroglicano en estas células mediante el uso de un RNA de interferencia dirigido contra el gen *DAG1* y se analizó su efecto sobre la organización de los dominios nucleares.

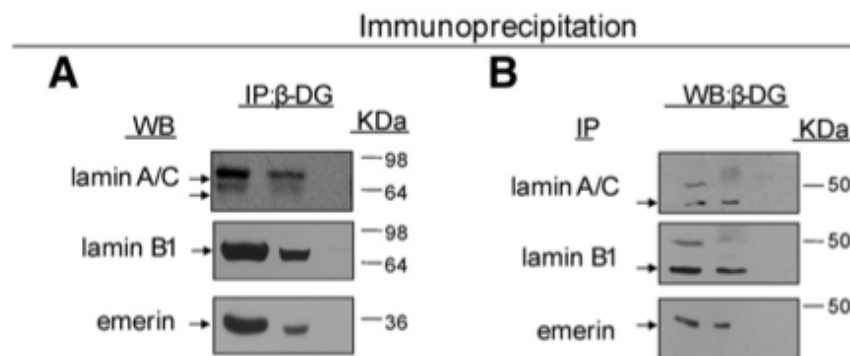


FIG.5 Ensayos de inmunoprecipitación que muestran la interacción del β -dístroglicano con emerina y las láminas A/C y B1. Modificado de [47].

De manera interesante se encontró que la disminución de los niveles del β -dístroglicano causa la deslocalización de la emerina (FIG.6) y de las láminas A/C y lamina B1, así como una disminución en sus niveles. Funcionalmente, la deficiencia del β -dístroglicano provocó alteraciones en la morfología nuclear y el desprendimiento de los centrosomas de la membrana nuclear. En su conjunto, estos datos sugieren que el β -dístroglicano se requiere para la correcta organización y función del núcleo [47].

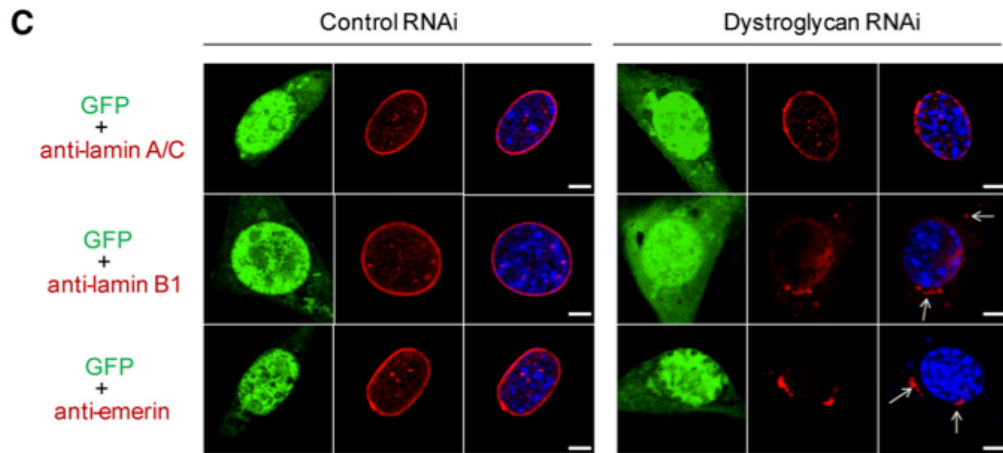


FIG.6 Efecto de la disminución de la expresión del β -dístroglicano sobre la localización de la emerina y laminas A/C y B1 en las células C2C12, modificado de [47].

4.2 El β -dístroglicano y su implicación en el cáncer

4.2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que surge a través de una serie de eventos que incluyen mutaciones somáticas y alteraciones epigenéticas que desembocan en la desregulación del crecimiento celular. El proceso de invasión tumoral y metástasis involucra cambios en la estructura de la membrana basal y la matriz extracelular, interrumpiendo la interacción de las células cancerosas con la matriz extracelular y dañando la adhesión celular, mecanismos que facilitan la migración de las células cancerosas hacia otros tejidos [48]. Por lo tanto, las alteraciones de las proteínas de la membrana plasmática y el citoesqueleto son centrales en este proceso. A diferencia del cáncer que es maligno, un tumor benigno crece sin invadir tejidos adyacentes y es solamente dañino si algún órgano vital es dañado o presionado [49].

El nivel de invasividad y la predicción de la progresión del cáncer se evalúan clínicamente mediante la escala Gleason, la cual mide el cambio de un cáncer primario a uno anaplásico, proceso conocido como transición de células epiteliales a células mesenquimales, EMT por sus siglas en inglés *epithelial to mesenchymal transition*. [50].

4.2.2 Alteraciones de envoltura nuclear en células cancerosas.

Los estudios sobre el diagnóstico del cáncer comienzan en el siglo XIX, donde citólogos como Bennet, comienzan a describir las características histológicas de distintos tejidos cancerosos las cuales comprenden un polimorfismo celular, la presencia de múltiples núcleos así como células con un número incrementado de nucléolos, lo cual, como se sabe ahora, es un reflejo del incremento en el nivel de ploidía característico de estas células [51]. Así mismo, un factor importante para el diagnóstico es la morfología aberrante de la envoltura nuclear. La envoltura nuclear, consiste en un sistema de doble membrana perforado por complejos del poro nuclear y una capa de filamentos intermedios conocido como lamina nuclear [51]. La envoltura nuclear se encuentra conectada con el citoesqueleto por un lado y con la cromatina por el otro y actúa como un poderoso nicho de señalización que incluye vías importantes para el cáncer como Wnt y MAPK. Además, se ha observado que la envoltura nuclear juega un papel en muchas otras funciones que son relevantes para el proceso cancerígeno como el control de la arquitectura nuclear, migración celular, reparo del DNA, envejecimiento, apoptosis, mitosis y regulación del ciclo celular así como organización del genoma y regulación de la expresión genética [51].

Todos estos procesos son realizados principalmente mediante las láminas nucleares las cuales son proteínas pertenecientes a la familia de filamentos intermedios clasificadas dentro de ésta como de tipo V y son conocidas por su importante papel en proveer soporte mecánico al núcleo. Las láminas nucleares, son codificadas por los genes LMNA, el cual mediante splicing alternativo da origen a 4 isoformas: lámina A y C principalmente y lámina A Δ 10 y C2, el gen LMNB1 que da origen a la lámina B1 y por último el gen LMNB2 que codifica para lámina B2. En cuanto a su estructura, poseen 3 dominios principales, el dominio N-terminal, el dominio varilla y central así como el dominio C-terminal el cual además posee una señal de localización nuclear (NLS), un dominio Ig (inmunoglobulina) y una caja CaaX [52].

En organismos que contienen tanto lamina A y B, como los mamíferos, las láminas de tipo B se encuentran expresadas constitutivamente en todas las células somáticas, mientras que las láminas de tipo A son reguladas durante el desarrollo y comienzan a expresarse al ir diferenciándose el tejido [53]. Así mismo, otras proteínas de la envoltura nuclear como emerina, la cual también es de expresión ubicua, se han asociado a procesos de señalización, regulación transcripcional y división celular [54].

Por lo tanto, estudios recientes han revelado que la expresión de las láminas nucleares A/C y B, se encuentra alterada en células cancerosas [49]. En particular, la expresión de lámina A/C disminuye en distintos tipos de cáncer, como el de pulmón [55], mama [56] y ovario [57], así como en los linfomas, la leucemia [58] y el cáncer del tracto gastrointestinal [59]. La baja o nula expresión de la lámina A/C en células cancerosas sugiere que las células madre que dieron origen al tumor nunca expresaron la lámina A/C en primer lugar debido a su característica indiferenciada [51]. De manera similar, los niveles de la lámina B1 están disminuidos en el cáncer de tracto gastrointestinal [59], el de colon y en los adenomas [59] y al igual que los niveles de expresión de lámina A/C, los niveles de lámina B varían en cáncer de piel [49]. No obstante, la expresión de las láminas A/C y B1 varía significativamente entre los diferentes tipos de cáncer de piel; incluso se ha observado que la expresión de las láminas depende de la progresión de la enfermedad [49].

Resultados contradictorios sobre la expresión de las láminas se han reportado en el cáncer de próstata, ya que se observó que los niveles de la lámina A/C aumentan en la región invasiva del tejido prostático [62]. Así mismo, se localizan microdominios en la membrana nuclear con baja inmunotinción para la lámina B1 y de manera interesante, la ocurrencia de estos microdominios se incrementa en tumores más avanzados por lo cual, se ha sugerido que la

deficiencia de la lámina B1 está relacionada con la sobre-expresión de la lámina A/C [60].

Por otro lado, el estudio de la proteína de la membrana nuclear interna emerina en el proceso cancerígeno ha sido reportada recientemente por Capo chi y colaboradores, donde se observó una disminución en la expresión de esta proteína en distintas líneas celulares y tejido de cáncer de ovario al realizar ensayos de western blot y ensayos inmunohistoquímicos [54].

4.2.3 Alteraciones en el transporte núcleo-citoplasma de células cancerosas.

La separación física del genoma del citoplasma, gracias a la envoltura nuclear, es una característica que presentan las células eucarióticas para proteger el material genético, debido a esta compartimentalización celular, es necesario el transporte de macromoléculas a través de la membrana nuclear para mediar las funciones normales de la célula. En cáncer, existe la desregulación del transporte de proteínas hacia y fuera del núcleo, lo cual es crucial para el desarrollo de este tipo de enfermedades ya que en estos procesos, proteínas supresoras de tumores son inactivadas al ser secuestradas de su localización normal para permitir la sobreactivación de proteínas con actividad oncogénica la cual, también puede llevarse a cabo por la deslocalización de estas principalmente hacia el núcleo. Esta sobreactivación por lo tanto, promueve la progresión del ciclo celular, la inestabilidad genómica, el fallo en la reparación del DNA así como la resistencia a la apoptosis, para por lo tanto, permitir la tumorigénesis. Esta deslocalización específica de proteínas es causada por diversos factores, entre ellos, mutaciones en la proteína cargo que agregan o modifican secuencias de transporte NLS/NES, modificaciones postraduccionales que permiten o impiden la interacción con los receptores de transporte, enmascaramiento de las señales de importe y exporte (NLS/NES) al interactuar con otras proteínas así como también la translocación en complejo con otra proteína, etc.

Una forma de restaurar la homeostasis del tráfico de proteínas entre el núcleo y el citoplasma es mediante el uso de agentes terapéuticos que pueden actuar a distintos niveles del proceso de transporte:

- Componentes reguladores río arriba de la proteína cargo. Un ejemplo de esto, es la inactivación directa o indirecta (a través de la inactivación de otra proteína) de cinasas que medían la translocación nuclear de sus proteínas blanco o en su caso, que medían su exporte hacia el citoplasma, debido a que esta modificación promueve o inhibe su interacción con importinas o con la exportina CRM1 permitiendo así la localización específica de la proteína.
- Interacción de proteínas cargo con componentes de transporte (importinas/exportinas). Estos agentes, actúan de manera específica para inhibir a las importinas o a la exportina CRM1 evitando su unión a la proteína cargo.
- Interacción entre los receptores de transporte y los reguladores Ran. Estos agentes, pueden actuar específicamente sobre las importinas/exportinas o sobre Ran-GTP.
- Inactivación del Complejo del Poro Nuclear (NPC). Esta inactivación recae específicamente sobre ciertos componentes del poro nuclear. Debido a que este se encuentra conformado por una amplia gama de proteínas, este tipo de terapia aún se encuentra en desarrollo.

Algunas de las proteínas clave para el desarrollo de la tumorigénesis que sufren una desregulación en su transporte núcleo-citoplasma, lo que a su vez, modula su localización subcelular y su función incluyen a p53, p27, p21, B23, los factores de transcripción FOXO1, NF κ B, Ciclina D, Retinoblastoma, β -catenina, BRCA1, APC, etc. [61] .

5. El β -dístroglicano y el Cáncer de Próstata

Recientemente se ha relacionado al α -dístroglicano con el desarrollo del cáncer. Se ha observado que en tumores primarios hay una pérdida progresiva de la función del α -dístroglicano debido a su glicosilación alterada además de una

disminución en sus niveles al analizar extractos celulares de células de cáncer de colon y mama [63].

Con respecto al β -dístroglicano, esta proteína se expresa de manera abundante en las uniones celulares y en la membrana basal de células epiteliales normales, en donde funciona como proteína de adhesión celular, mientras que en la mayoría de las células cancerosas estudiadas, con excepción de las células de carcinoma cutáneo, su expresión está disminuida ó incluso ausente [37] (FIG.8). De manera interesante, varios estudios han reportado la presencia de formas del β -dístroglicano con menor peso molecular (43 kDa y 30 kDa) en tejidos y líneas celulares cancerosas. Se piensa que la remoción del dominio extracelular del β -dístroglicano por las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP2-9) [15] está implicada en este proceso, ya que se sabe que este evento produce el fragmento de 30 kDa [34].

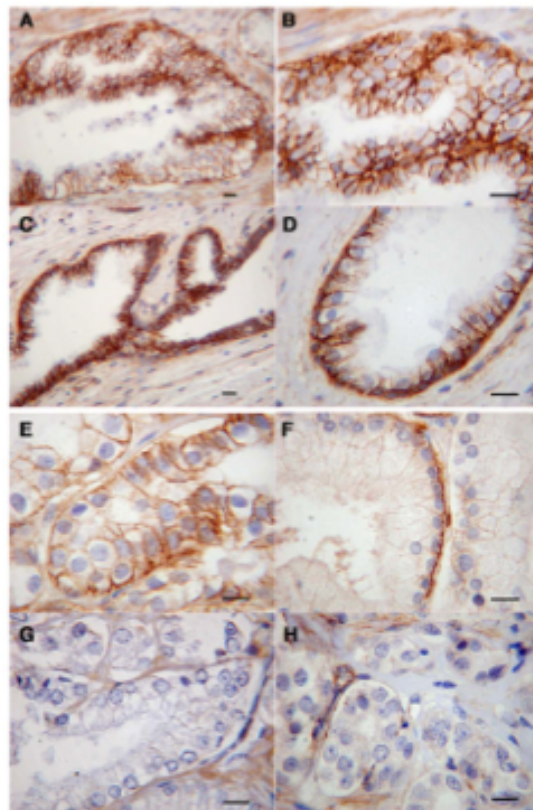


FIG.8 Histopatología de tejido prostático que muestra la expresión del β -dístroglicano en tejido de próstata normal (A-D) y su ausencia en cáncer de próstata (E-H), modificado de [37]

Uno de los tipos de cáncer en donde más se ha estudiado el β -dístroglicano es el de próstata. Este cáncer se caracteriza por una actividad anormal de distintas vías de señalización regulatorias dentro de las células prostáticas y el tejido que las rodea [62], incluyendo la proliferación, la apoptosis, la señalización del receptor a andrógenos (AR), la adhesión celular, la angiogénesis y la metástasis.

El análisis histológico de este tejido, ha mostrado alteraciones en la localización y expresión del β -dístroglicano durante la progresión del cáncer de próstata (FIG.9). En el tejido prostático normal el β -dístroglicano se localiza en la membrana basal y en las uniones intercelulares de las células luminales (1). Con la aparición de un tumor primario y un incremento en la escala de Gleason, la inmuno-tinción del β -dístroglicano disminuye en la región basolateral y en la membrana basal (2), observándose una pérdida total del β -dístroglicano en las células del tumor primario en crecimiento (3). De forma interesante, se observa la re-expresión del β -dístroglicano así como su localización nuclear en algunas células del tumor primario (4), lo que aparentemente conlleva al fenotipo invasivo del cáncer de próstata (5) y la metástasis hacia un nuevo tejido, en donde esta proteína incrementa aún más sus niveles (6) [63].

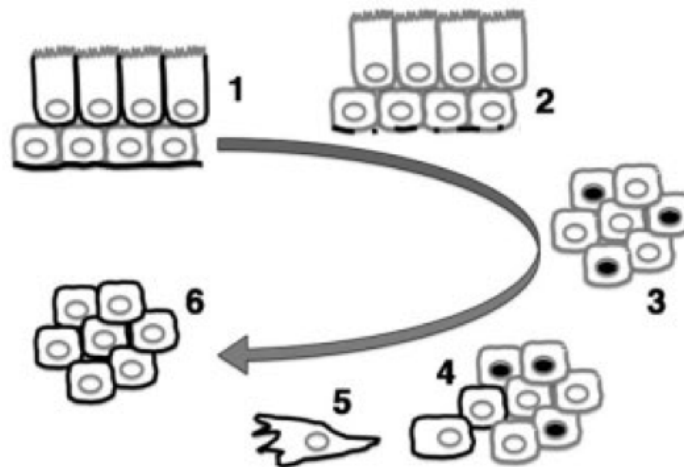


FIG.9 Esquema que muestra los cambios de expresión y localización del β -dístroglicano durante la progresión del cáncer de próstata, [63].

Mediante análisis de western blot se ha observado que las células de cáncer de próstata presentan las formas del β -dístroglicano de 43k y 30 kDa [48]. Cuando se analizó la forma fosforilada del β -dístroglicano con un anticuerpo dirigido contra el residuo Tyr892 [37], se encontraron los fragmentos de 43, 30 y 26 kDa en las fracciones nucleares tanto de células normales como tumorales (FIG 10). Estos autores sugieren que el mecanismo de translocación nuclear del β -dístroglicano requiere del estímulo de los andrógenos [37], lo que ocasiona que el β -dístroglicano sea fosforilado en la Tyr892 y subsecuentemente transportado hacia el núcleo como una proteína completa o fragmentada y que el fragmento de 26 kDa correspondiente al dominio citoplasmático se genera por un corte adicional del fragmento de 30 kDa. En conjunto, esta serie de resultados sugieren que el β -dístroglicano tiene un papel regulador en la progresión del cáncer de próstata a través de la alteración de funciones nucleares [37].

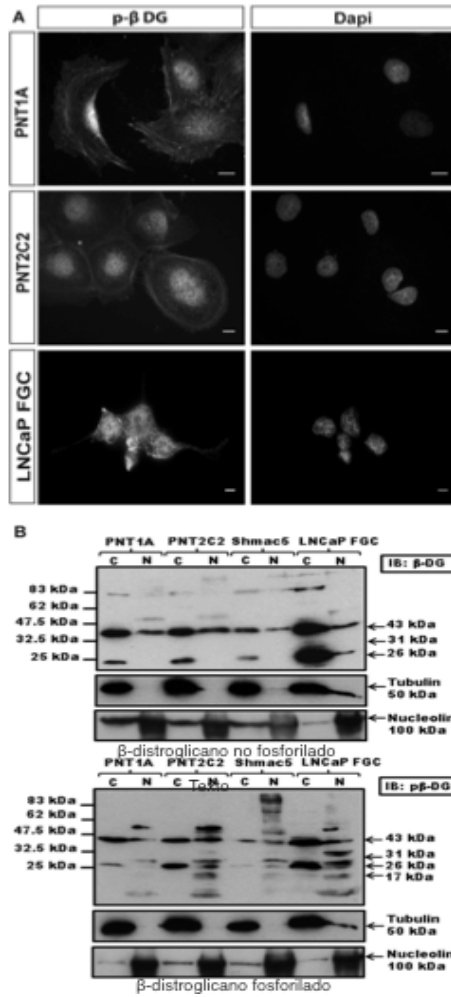


FIG.10 Presencia del β-distroglucano en el núcleo de diferentes líneas celulares de cáncer de próstata.

Modificado de [37].

6. JUSTIFICACION

Debido a que estudios previos han identificado que β -dístroglicano se encuentra alterado en células de cáncer de próstata y que además interactúa con proteínas de envoltura nuclear las cuales también se han visto afectadas en este tipo de cáncer, es de gran importancia analizar la posible implicación del β -dístroglicano en la progresión del cáncer de próstata al afectar la función normal de estas proteínas.

7. HIPÓTESIS

La alteración en los niveles o localización subcelular del β -dístroglicano se encuentra correlacionada con la alteración de las proteínas de la envoltura nuclear durante la progresión del cáncer de próstata.

8. OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar los niveles y distribución subcelular del β -dístroglicano y su relación con proteínas de envoltura nuclear en líneas celulares de cáncer de próstata con diferente grado de invasividad.

8.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la distribución subcelular del β -dístroglicano y de las proteínas de la envoltura nuclear emerina y láminas A/C y B1 en líneas celulares de cáncer de próstata con distinto grado de invasividad.
2. Determinar los niveles de las formas de 43 y 30 kDa del β -dístroglicano y de las proteínas de envoltura nuclear emerina y láminas A/C y B1 en líneas celulares de cáncer de próstata con distinto grado de invasividad.
3. Analizar el transporte núcleo – citoplasma del β -dístroglicano en la línea celular metastásica DU145.

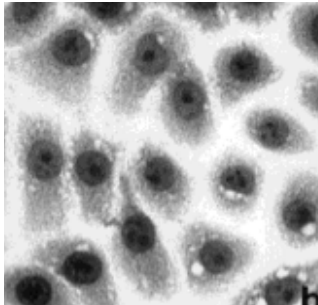
9. MODELO DE ESTUDIO

Las líneas celulares de cáncer de próstata utilizadas en este estudio, son derivadas de la línea celular RWPE-1, la cual proviene de tejido epitelial prostático no neoplásico tomado de la zona periférica de un tumor de cáncer de próstata de un hombre de 54 años que fue inmortalizada posteriormente mediante el uso del virus del papiloma humano (HPV-18).

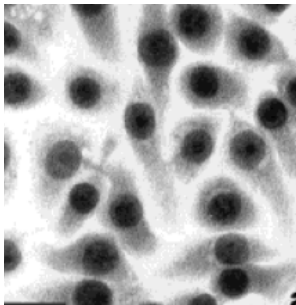
Las línea celular RWPE-1 se trató con diferentes concentraciones de N-metil-N-nitrosourea (MNU) para originar las siguientes líneas celulares que presentan diferente grado de invasividad [64]. Así mismo, para analizar un estadio más avanzado del cáncer de próstata, también se utilizó la línea celular DU145 la cual es derivada de carcinoma metastásico de cerebro de un hombre de 69 años caucásico.

Células Control WPE1

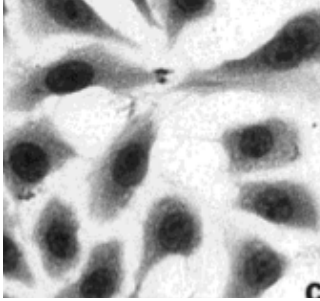
No neoplásica



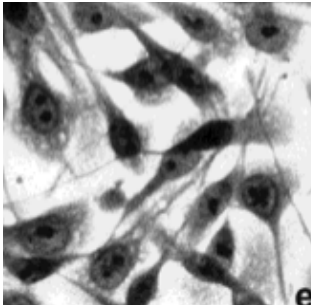
Células WPE1-NA22. 9% de invasividad.



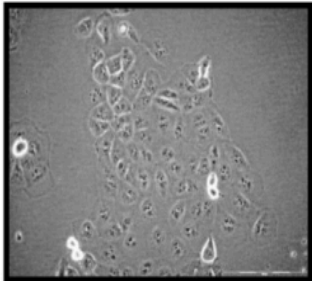
Células WPE1-NB14. 30% de invasividad



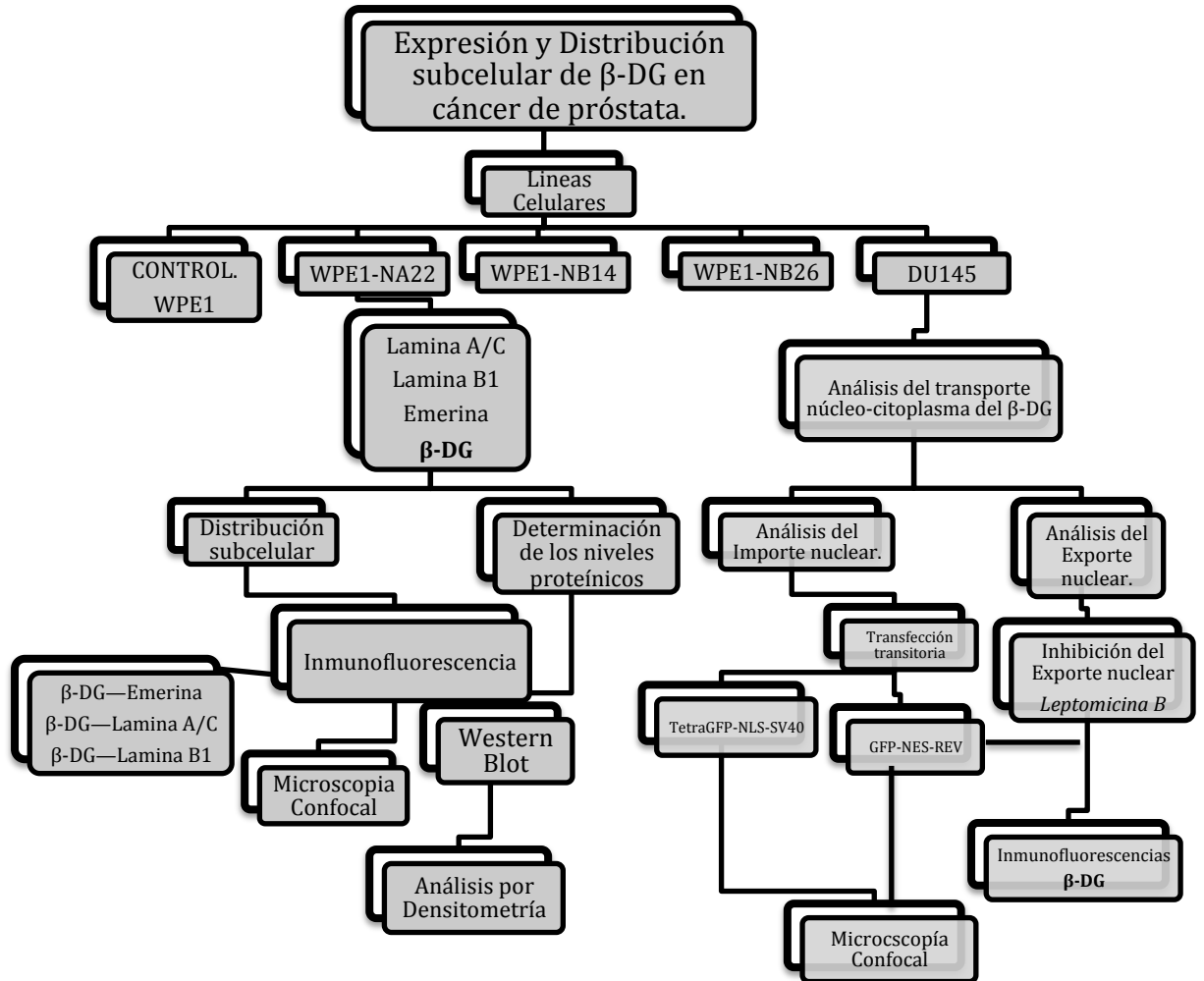
Células WPE1-NB26. 95% de invasividad



Células DU145. Metastásicas



10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



11. MATERIALES Y MÉTODOS

11.1 Cultivo Celular

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de próstata con distinto grado de invasividad WPE1, las cuales fueron originadas a partir de la línea celular RPWE1 de tejido prostático sano la cual además fue usada como línea celular control. Así mismo, también se utilizó la línea celular de cáncer de próstata metastásico DU145.

Los cultivos se mantuvieron en medio libre de suero para queratinocitos (K-SFM) conteniendo 50 μ g/ml de extracto de pituitaria bovina (BPE), 5ng/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF) y 1% antibiótico antimicótico (penicilina, estreptomina y fungizona). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmosfera humidificada con 5% CO₂.

11.1.1 Tratamiento con Leptomina B

Las células control RWPE1 así como las células de cáncer de próstata DU145 se sembraron a una confluencia de alrededor del 60% y fueron sometidas después del 48 horas en cultivo, al tratamiento con el inhibidor específico de la exportina CRM1: Leptomina B, a una concentración del 100 ng/ml diluida en el medio correspondiente para cada línea celular por 24 horas.

11.2 Inmunofluorescencia Indirecta

Se sembraron alrededor de 20,000 células de cada línea celular sobre cubreobjetos previamente esterilizados en cajas de Petri de 35mm para obtener una confluencia de alrededor del 60% y se incubaron por 48 horas a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5%. Posteriormente, los 2 ml de medio fueron removidos y las células fueron lavadas con 1 ml de PBS por 2 ocasiones. Enseguida se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 10 min y se permeabilizaron con Tritón X-100-PBS al 0.2% durante 10 min. Para bloquear la unión inespecífica del anticuerpo se adicionó gelatina al 0.5% y suero fetal bovino al 1% en PBS durante 20 minutos. Las células se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente. Al día siguiente, las células se lavaron con 1 ml de PBS por 2 ocasiones y se

incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. Transcurrido ese tiempo, las preparaciones se lavaron con PBS y los núcleos se contratiñeron con DAPI (1:1000) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron con PBS y agua MilliQ por 5 ocasiones, se dejaron secar y posteriormente se montaron en portaobjetos con 8µl de VectaShield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE.UU.) para su preservación. Las preparaciones fueron posteriormente analizadas mediante microscopia confocal.

Anticuerpo primario (toda la noche 4°C)	Origen	Dilución	Anticuerpo Secundario (1 hora a T.A.)	Dilución
MANDAG	Ratón	1:25	Anti-ratón verde	1:50
JAF	Conejo	1:50	Anti-conejo verde	1:50
Lámina B1 (ABCAM)	Conejo	1:300	Anti-conejo verde	1:50
Lámina A/C (ABCAM)	Ratón	1:250	Anti-ratón verde	1:50
Emerina (Sta. Cruz)	Conejo	1:100. 10% SFB	Anti-conejo verde	1:50

11.3 Inmunofluorescencia de doble marca

De igual forma que en la inmunofluorescencia sencilla, aproximadamente 20,000 células de cada línea fueron sembradas sobre cubreobjetos en cajas de 35 mm, se incubaron 48 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y fueron tratadas de la misma manera que en el procedimiento anterior. Sin embargo, para poder llevar a cabo la doble marca, antes de teñir con Dapi se adicionó el anticuerpo primario contra la segunda proteína de interés, dejándose este incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente se incubó con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo y por último se tiñeron los núcleos con Dapi y

se montaron las muestras con vecta shield. De igual forma las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal.

Anticuerpo primario (toda la noche 4°C)	Origen	Dilución	Anticuerpo Secundario (1 hora a T.A.)	Origen	Dilución
C20	Cabra	1:15	Anti-cabra verde	Burro	1:50
Nopp140	Conejo	1:50	Anti-conejo rojo	1:150, 5% SFB, 10% BSA	1:150

11.4 Transformación de bacterias

Se colocaron 50µl de la suspensión de bacterias competentes en tubos microfuga de 1.5ml, a los cuales se adicionaron 200ng de DNA plasmídico y se mantuvo la mezcla en hielo por 30 minutos. Posteriormente, se incubó el cultivo a 42°C durante 90 segundos y se colocó en hielo por 2 minutos. Se adicionaron 800 µl de medio LB y se incubo a 37°C por 1 hora con agitación constante. Se tomaron 100 µl del cultivo total y se transfirieron a placas de agar LB (1% peptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl) suplementado con el antibiótico de elección (100 µg/ml de ampicilina; 50 µg/ml de kanamicina). Finalmente, las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

11.5 Obtención de DNA plasmídico a baja escala (Mini prep)

Para la extracción del DNA plasmídico, fue utilizado el kit Plasmid Purification de PROMEGA, el cual permite obtener DNA mediante la lisis bacteriana y su posterior purificación por columna. Como primer paso, sometió a centrifugación el cultivo de bacterias (previamente incubadas a 37°C toda la noche) por 1 minuto, para obtener el pellet de bacterias y se resuspendió este en 600 µl de agua mili Q. Posteriormente, se agregaron 100 µl del buffer de lisis y se mezcló

por inversión 6 veces. Se agregaron entonces 350 μ l del buffer de neutralización y de igual forma se mezcló por inversión por 3 ocasiones. Se centrifugó la mezcla a máxima velocidad por alrededor de 3 minutos y se colocó el sobrenadante en una mini columna. Se centrifugó a máxima velocidad por 15 segundos. Se agregaron posteriormente 200 μ l de Endotoxin Removal Wash y se centrifugó nuevamente por 15 segundos a máxima velocidad. Posteriormente, se lavó el DNA agregando 400 μ l de solución de lavado a la columna y se centrifugó por 30 minutos para eliminar impurezas. Por último, se eluyó el DNA plasmídico agregando 30 μ l de buffer de elución y se centrifugó por última ocasión por 15 segundos para obtener en el filtrado el DNA.

11.6 Transfección celular

Para el análisis del importe nuclear, se realizó la transfección transitoria de las células RWPE1 y DU145 con el vector de expresión de interés PEGFP-N1 el cual contiene la señal de localización nuclear del SV40. Además de esto para el análisis del exporte nuclear, se realizó en estas mismas células, la transfección transitoria del vector de expresión PEGFP-C1 que contiene la secuencia de exporte nuclear del virus de inmunodeficiencia humana 1 GFP-NES-REV, usada de igual forma para este tipo de estudios debido a su alta eficiencia al ser reconocida por la exportina CRM1. Ambos vectores codifican para la proteína reportera (GFP) para permitir la identificación de las células transfectadas.

Un día previo a la transfección se sembraron las células en una caja Petri de 35 mm a una confluencia de 60-70%. Se mezclaron 3 μ g de DNA plasmídico diluido en 100 μ l de medio DMEM (sin suero y sin antibióticos) con 4 μ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 100 μ l de medio DMEM (sin suero y sin antibióticos), y la mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió la mezcla de transfección a las células y se incubó a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂. Después de 24h se fijaron las células con PFA al 4% y se tiñeron los núcleos con Dapi para su posterior análisis mediante microscopía confocal.

11.7 Extracción de proteínas totales

Los cultivos celulares se sembraron sobre cajas Petri de 70 mm a una confluencia de 90-100%, se sometieron a dos lavados con 2 ml de PBS, se cosecharon las células con PBS con la ayuda de un gendarme, se centrifugaron y se adicionó a la pastilla alrededor de 150 μ l de la solución amortiguadora de lisis (50 mM Tris-HCl pH=7.4, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1% Tritón, 1x complete) para incubar en agitación por 30 minutos a 4°C. Para terminar la lisis celular, la suspensión se sónico a 3.0 micrones durante 15 segundos en 3 repeticiones con descansos entre cada ciclo de 10 segundos. Para la eliminación de los restos celulares, la suspensión se centrifugó a 12000 g's durante 2 minutos y se recuperó el sobrenadante (extracto de proteínas totales).

11.8 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

A partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) de 1 μ g/ μ l se realizó una curva estándar (0-10 μ g/ μ l), y se prepararon diluciones de las muestras problema, se adicionó el reactivo de Bradford (BIO-RAD) y se determinó la absorbancia a 595nm. Finalmente, se registraron los valores para graficar la curva estándar, a la cual se le realizó una regresión lineal y los datos obtenidos de las muestras problema se interpolaron en la curva estándar para determinar la concentración de las proteínas. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

11.9 Análisis de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida

Se preparó un gel de poliacrilamida-SDS (Gel separador al 10%: 2.5 ml de acrilamida 30% /bisacrilamida 0.8%, 1.88 ml de Tris-base/SDS ph=8.8, 3.125 ml de agua miliQ, 50 μ l de persulfato de amonio al 10% w/v y 10 μ l de TEMED; Gel concentrador al 4%: 0.650 μ l de acrilamida 30% / bisacrilamida 0.8%, 1.250 ml de Tris-base/SDS ph=6.8, 3.05 ml de agua miliQ, 25 μ l de persulfato de amonio al 10% w/v y 10 μ l de TEMED). Posteriormente, las muestras de proteínas fueron preparadas para ser cargadas adicionándoseles solución

amortiguadora de carga y llevándose a volúmenes iguales, por último las muestras fueron calentadas a 95 °C por 4 minutos para desnaturalizar a las proteínas y se colocaron en los pozos del gel. El gel fue sometido a electroforesis en solución amortiguadora de corrida (Tris-base 3 g/l, glicina 14.4 g/l y SDS 1g/l) a una corriente constante de 20 miliamperes durante 2 horas aproximadamente. El gel se tiñó con una solución de azul de coomassie (45ml agua, 45ml metanol, 10ml ácido acético glacial y 0.25g de azul de Coomassie) durante 20 minutos y se destiñó con la solución desteñidora (45ml agua, 45ml metanol, 10ml ácido acético glacial) por 1h para comprobar que las cargas fueran iguales.

11.10 Inmunodetección en fase sólida

50 µg de proteína total fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como se indicó previamente y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara semi-húmeda a 20V durante 1h. Utilizando solución amortiguadora de transferencia (Tris-Glicina 1X-Metanol 20%). La membrana se bloqueó durante 1 h con 15% de leche en polvo baja en grasa diluida en la solución amortiguadora Tris-Buffered- Salino-Tween-20 (TBS-T) 1X para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Posteriormente, se incubó en agitación constante durante toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario de interés diluido en TBS-T 1X. Se lavó el anticuerpo primario 3 veces durante 15, 10 y 5 minutos con el mismo buffer y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima horse radish peroxidasa por 1hr a temperatura ambiente y con agitación constante. Antes de revelar a las proteínas específicas, la membrana fue lavada nuevamente por 15, 10 y 5 minutos con TBS-T 1X. El revelado se realizó utilizando el reactivo de quimioluminiscencia (ECL) utilizándose placas fotográficas sobre la membrana para captar la presencia de las proteínas.

Anticuerpo primario (toda la noche 4° C)	Origen	Dilución	Anticuerpo secundario acoplado a HRP (1 hr. Temp. ambiente)	Dilución
MANDAG	Ratón	1:500, 5% leche	Anti-ratón (Millipore)	1:10,000, 3% leche
Lámina B1 (ABCAM)	Conejo	1:1000	Anti-conejo	1:20,000
Lámina A/C (Sta. Cruz)	Conejo	1:4000	Anti-conejo	1:20,000
Emerina (Sta. Cruz)	Conejo	1:8000	Anti-conejo	1:20,000
Actina	Ratón	1:2000	Anti-ratón (Millipore)	1:10,000

12. RESULTADOS

12.1 Análisis morfológico de las líneas celulares de cáncer de próstata con grado de invasividad creciente

Se analizó la morfología de la línea celular control y en las diferentes líneas celulares de cáncer de próstata, mediante inmunofluorescencia, utilizando la tinción con faloidina para decorar el citoesqueleto de actina y la contratinción con DAPI para visualizar los núcleos. Observamos que las líneas celulares de cáncer de próstata con mayor grado de invasividad presentaron una forma más alargada, con mayor área del citoplasmática y núcleos más grandes, con respecto a la línea celular control, RWPE-1; lo que concuerda con lo reportado en la literatura [64].

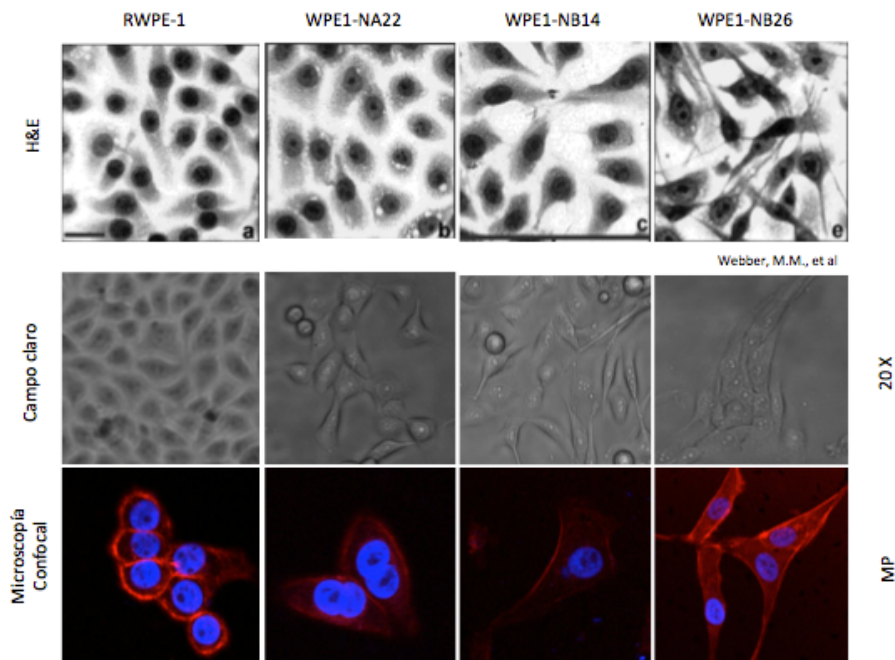
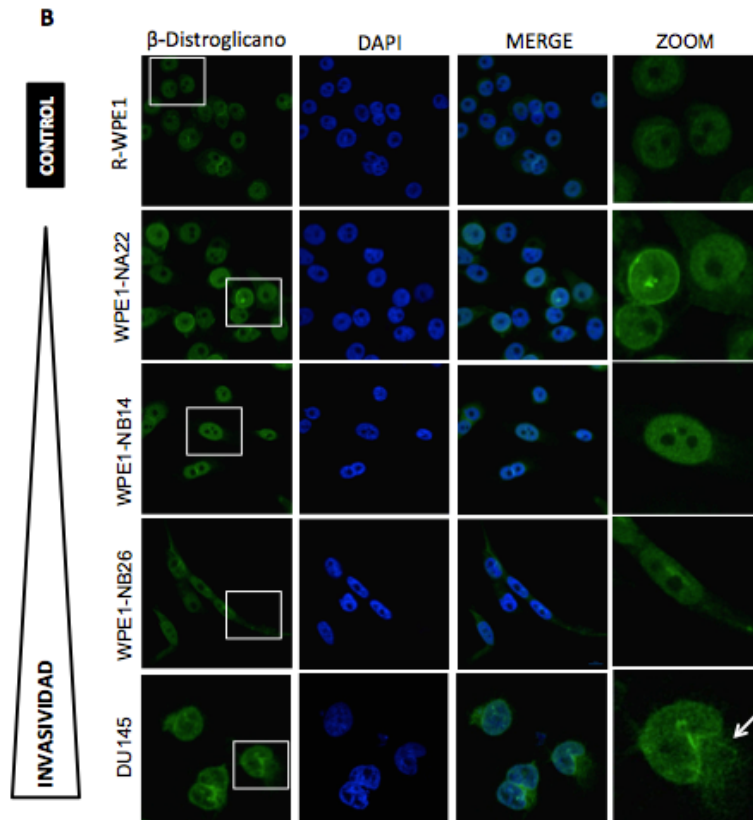
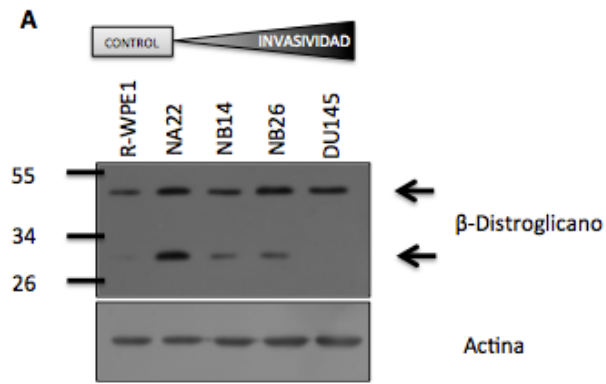


Figura 1. Morfología de las líneas celulares de cáncer de próstata RWPE1, WPE1-NA22, WPE1-NB14 y WPE1-NB26. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para observar el citoesqueleto de actina mediante tinción con faloidina (rojo) y los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul).

12.2 Distribución y Expresión del β -dístroglicano en las diferentes líneas celulares de cáncer de próstata

Para determinar si el β -dístroglicano (β -DG) se expresa en las líneas celulares de cáncer de próstata se realizaron ensayos de inmunodetección en fase sólida (W.B.), empleando extractos totales y anticuerpos dirigidos contra el β -DG y actina (control de carga). La figura 2.A muestra la presencia de una banda de 43 kDa que corresponde al β -DG de longitud completa y una banda adicional de 30 kDa que podría corresponder al β -DG procesado por las metaloproteasas 2 y/o 9. Así mismo, la figura 2B muestra un ensayo representativo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con el anticuerpo monoclonal anti- β -DG denominado MANDAG, el cual está dirigido contra los últimos 12 aminoácidos del dominio C-terminal del β -DG. Observamos que el β -DG se localiza predominantemente en el núcleo de todas las líneas celulares analizadas, con excepción de la línea celular DU145, en donde comparativamente se aprecia una disminución en la tinción nuclear de la proteína. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia presente en el citoplasma y núcleo de las células confirmó que las células DU145 presentan un cociente Fn/c significativamente menor que el resto de las líneas celulares (Fig. 2C). Con la finalidad de comparar la distribución del β -DG con dos anticuerpos anti- β -DG diferentes, utilizamos el anticuerpo policlonal C-20. Encontramos una inmunotinción del β -DG en el núcleo y de manera aún más intensa en los nucléolos de la línea celular control y de las de cáncer de próstata; en este organelo nuclear el β -DG colocalizó con la proteína nucleolar Nopp140 (Fig. 2D).



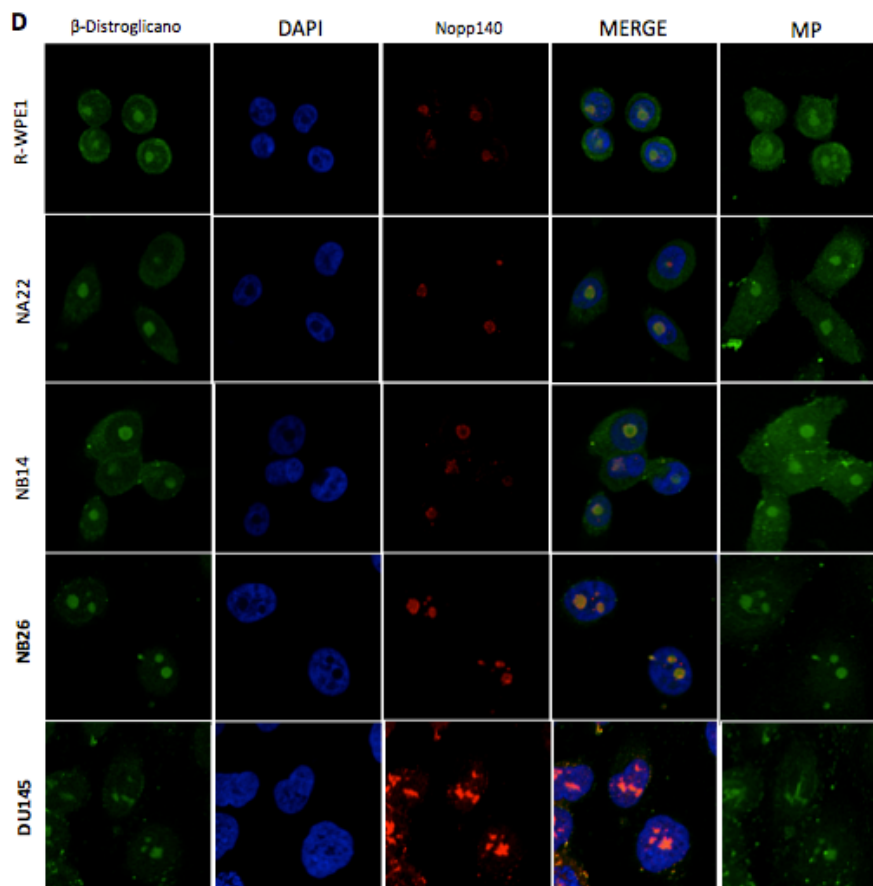
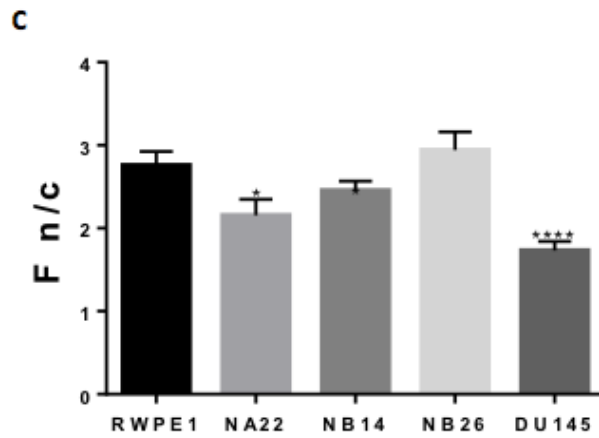


Figura 2. **Expresión y distribución del β -DG en las diferentes líneas celulares de cáncer de próstata.** (A). Se realizaron ensayos de inmunodetección en fase sólida utilizando extractos totales de las diferentes líneas celulares y anticuerpos dirigidos contra el β -DG y la actina (control de carga). (B). Distribución subcelular del β -Distroglicano en las líneas celulares de cáncer de próstata. Se llevaron a cabo ensayos

de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo dirigido contra el β -DG (verde) y los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). El β -DG se localizó predominantemente en el núcleo de todas las líneas celulares de cáncer, con la excepción de la línea celular DU145, en donde se observó una disminución en su tinción nuclear (flecha). (C). Cuantificación de la relación núcleo/citoplasma de la intensidad de la fluorescencia (Fn/c) del β -DG en las líneas celulares de cáncer de próstata. La cuantificación se llevo a cabo a partir de 3 experimentos independientes usando el programa Image J. (D). Localización nucleolar del β -DG (verde) en líneas celulares de cáncer de próstata utilizando el anticuerpo policlonal anti- β -DG C-20. Se muestra la colocalización del β -DG con la proteína nucleolar Nopp140 (rojo). Los núcleos se decoraron con DAPI (azul).

12.2.1 El β -DG tiene una localización predominantemente peri nuclear en la línea celular metastásica DU145

Con el propósito de analizar con más detalle la disminución nuclear del β -DG observada previamente en la línea celular DU145, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con un segundo anticuerpo dirigido contra esta proteína, el anticuerpo policlonal denominado JAF. Con el uso de este anticuerpo observamos una disminución aún más drástica del β -DG en el núcleo; la inmunotinción citoplásmica de la proteína se polarizó hacia una región perinuclear, lo que sugiere, que el trafico nuclear de la proteína se encuentre alterado en estas células debido al proceso canceroso (FIG.3).

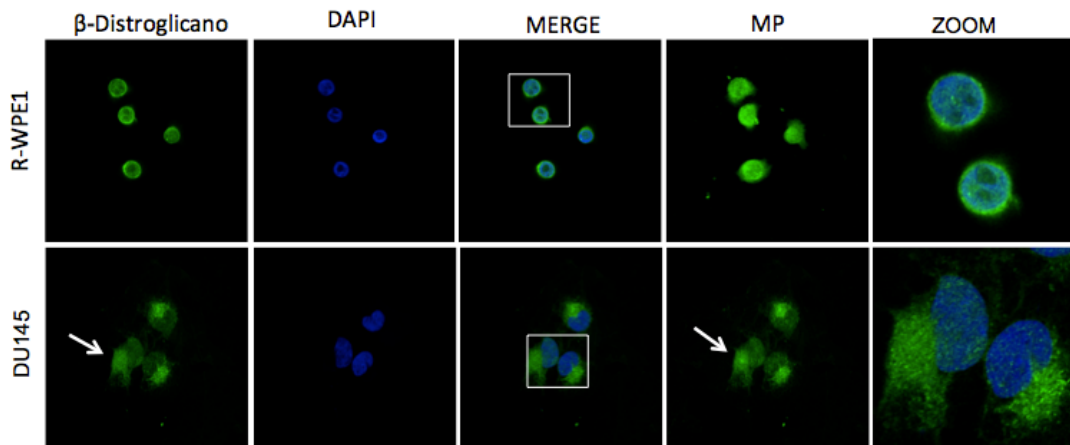
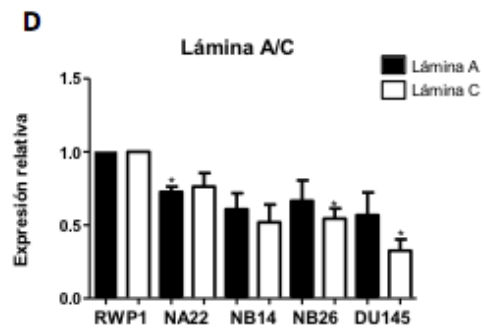
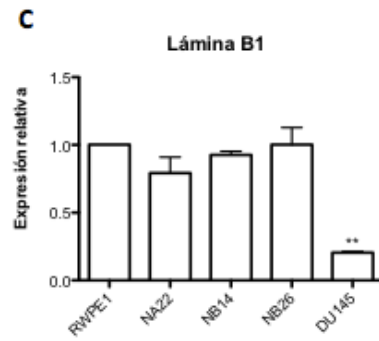
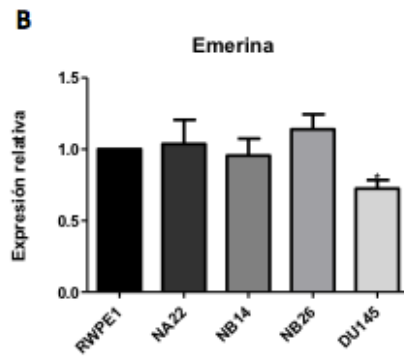
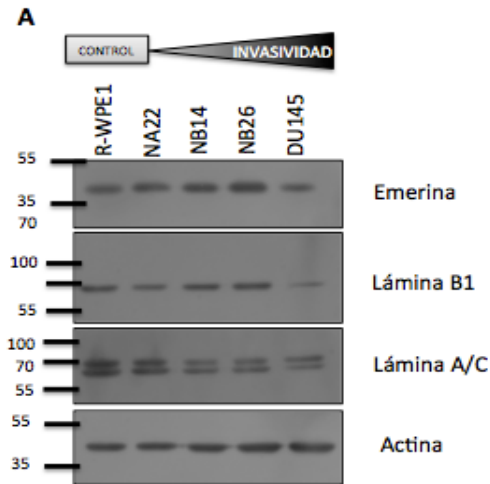
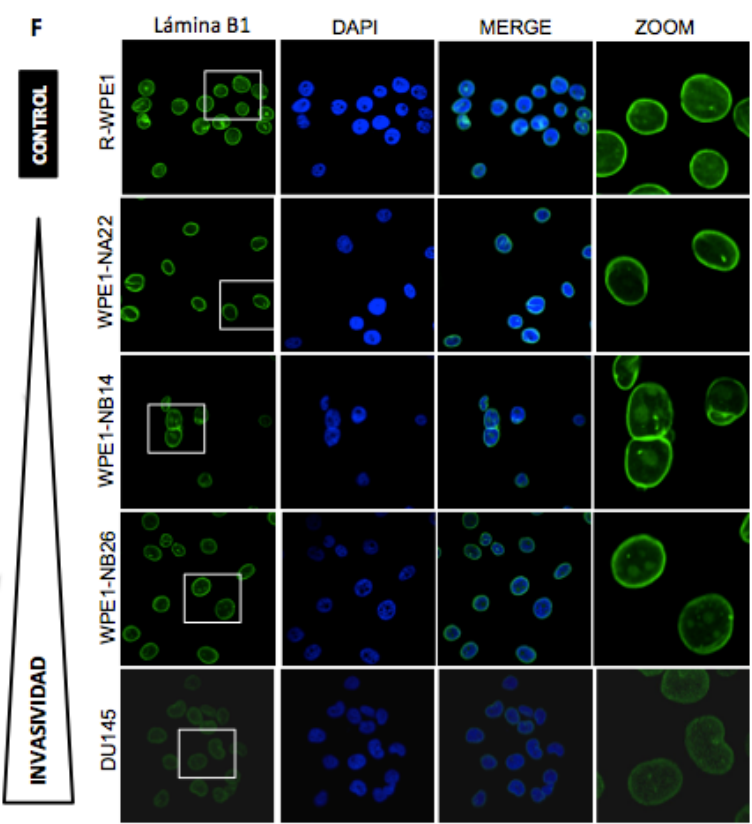
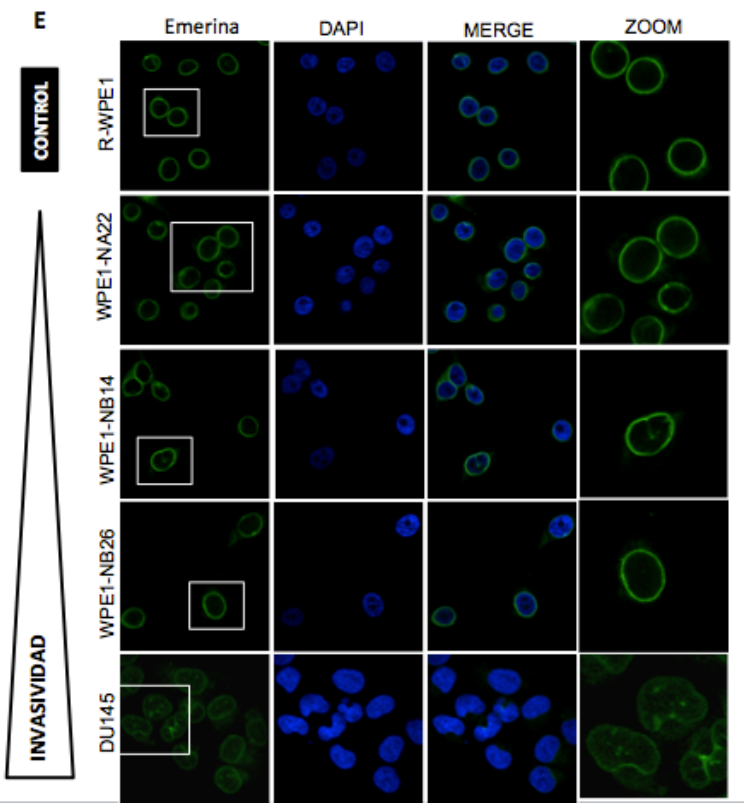


Figura 3. **Localización perinuclear polarizada del β -DG en la línea celular DU145.** Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en las líneas celulares RWPE1 y DU145 con el anticuerpo policlonal anti- β -DG JAF (verde), dirigido contra el C-terminal de esta proteína y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

12.3 Distribución y Expresión de las proteínas de envoltura nuclear lámina B1, lámina A/C y emerina en las diferentes líneas celulares de cáncer de próstata

Se analizaron los niveles de diferentes proteínas de la envoltura nuclear en las líneas celulares control y de cáncer de próstata; se obtuvieron extractos totales de proteínas y se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección en fase sólida (W.B.), utilizando anticuerpos específicos contra cada proteína (ver Materiales y Métodos). La figura 3A muestra la presencia de las proteínas emerina lamina B1 y lamina A/C tanto en la línea celular control como en todas las líneas celulares de cáncer de próstata analizadas; de manera interesante, se observó la disminución significativa de las tres proteínas en la línea celular metastásica DU145, lo que se corroboró mediante el análisis densitométrico de las placas de rayos X (paneles B-D). Así mismo, se examinó la distribución de las proteínas de envoltura nuclear por ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (ver Materiales y Métodos). Las tres proteínas, emerina lamina B1 y lamina A/C, se localizaron en la envoltura nuclear; sin embargo la inmunotinción de las tres disminuyó notoriamente en la línea celular DU145. Así mismo, la decoración de la envoltura nuclear con estos anticuerpos evidenció la presencia de núcleos con morfología aberrante exclusivamente en esta última línea celular (paneles E-G).





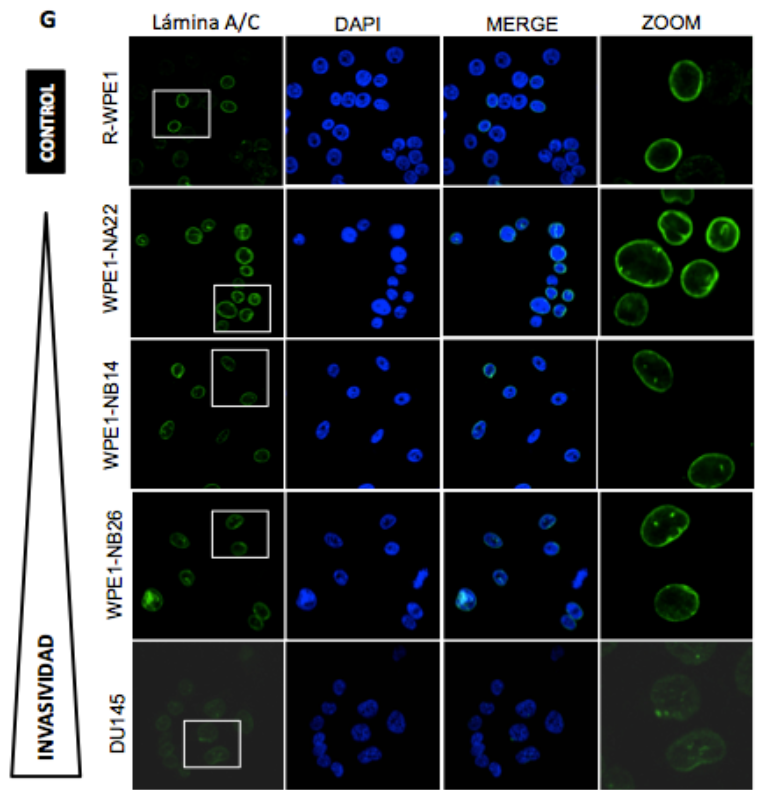


Figura 4. **Expresión y distribución subcelular de las proteínas de envoltura nuclear emerina, lámina B1 y lámina A/C en líneas celulares de cáncer de próstata.** (A). Se realizaron ensayos de inmunodetección en fase sólida utilizando extractos totales de cada línea celular cáncer de próstata y anticuerpos dirigidos contra emerina, lámina B1, lámina A/C y actina (control de carga). (B-D). Cuantificación de los niveles de expresión de las proteínas de envoltura nuclear por medio de análisis densitométrico. (E-G). Análisis de la distribución de la emerina, lámina B1 y lámina A/C mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando anticuerpos específicos para cada proteína (verde) y contratiñendo los núcleos con DAPI (azul). Se observó la alteración de las proteínas de envoltura nuclear en la línea celular metastásica DU145.

12.4 El sistema general de importe nuclear no se encuentra alterado en la línea celular de cáncer de próstata metastásico DU145

Para determinar si la disminución en la localización nuclear del β -DG se debe a una alteración global del importe nuclear presente en la línea de cáncer de próstata metastásico, se transfectaron transitoriamente las células DU145 con un vector que expresa un tetrámero de la proteína verde fluorescente (TetráGFP) fusionado a la secuencia de localización nuclear (NLS) del virus del

simio 40 (SV40); el peso molecular de la Tetra GFP evita su difusión pasiva a través del complejo del poro nuclear (NPC) y garantiza el diagnóstico del transporte activo de la proteína reportera. Se puede observar la localización predominantemente citoplasmática del tetrámero de GFP que no porta la NLS en las dos líneas celulares analizadas RWPE1 y DU145; en contraste, la proteína reportera GFP-NLS-SV40 se acumuló en el núcleo de ambas líneas celulares (Fig. 5), lo que indica que la maquinaria de importe nuclear (importinas $\alpha 2\beta 1$) de las células metastásicas DU145 funciona de manera correcta.

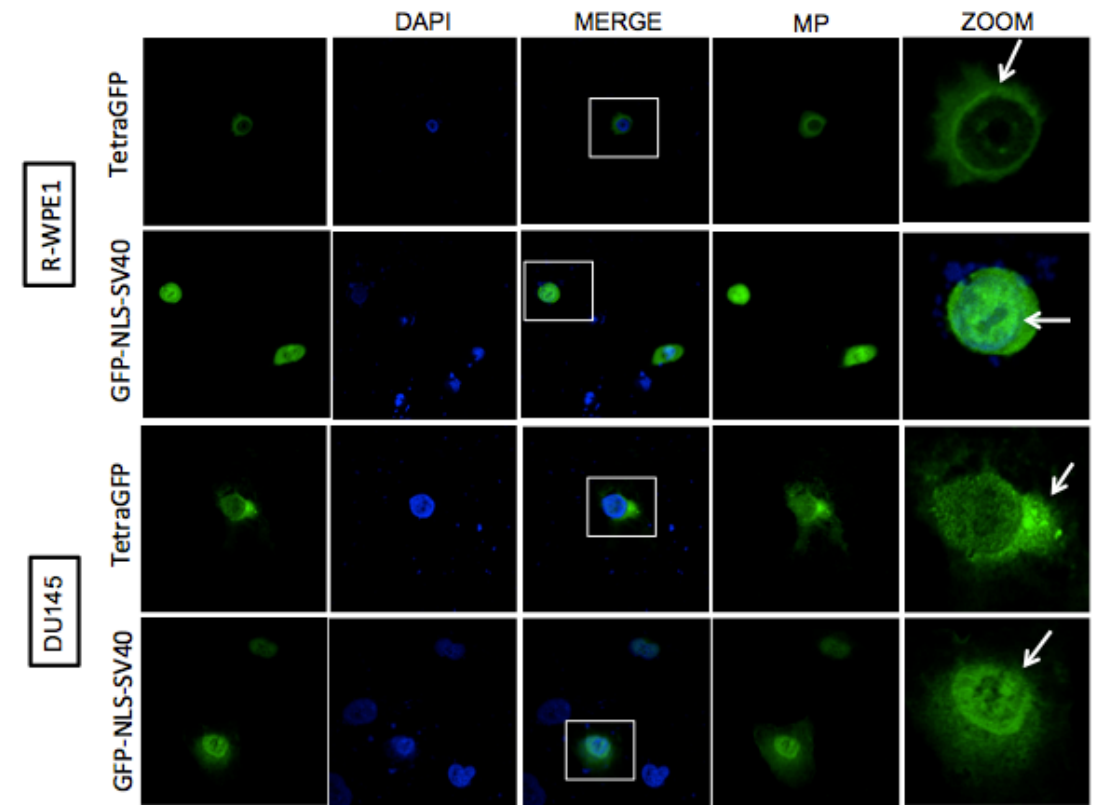


Figura.5 El mecanismo de importe nuclear de proteínas no está alterado en las células de cáncer de próstata metastásicas DU145. Se muestra la expresión transitoria de las proteínas reporteras TetraGFP y TetraGFP-NLS-SV40 (verde) en la líneas celulares RWPE1 y DU145. El análisis de las células se realizó 24 horas post-transfección y los núcleos de tiñeron con DAPI (azul) previo a estudio por microscopía confocal.

12.5 Análisis del Exporte Nuclear del β -DG en la línea celular de cáncer metastásico DU145

Para averiguar si el transporte nuclear del β -DG se encuentra afectado en la línea celular DU145, se inhibió este mecanismo mediante el uso de Leptomicina B y se analizó el efecto del tratamiento sobre la distribución subcelular del β -DG en las líneas celulares RWPE1 (control) y DU145 (cáncer de próstata metastásico), mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el uso del anticuerpo policlonal anti- β -DG JAF. La leptomicina B es un metabolito secundario producido por *Streptomyces spp* que se une de forma covalente a la Cisteína 528 del sitio activo de la exportina CRM1, evitando así que reconozca la señal de transporte nuclear (NES) de las proteínas cargo. Observamos una ligera acumulación nuclear del β -DG en la línea celular control como respuesta a la leptomicina B mientras que en la línea celular de cáncer DU145 esta acumulación no se observa. Sin embargo, la presencia citoplasmática polarizada del β -Distroglicano disminuye significativamente, lo que sugiere que tal vez el transporte, en lugar del transporte, no es eficiente de manera específica para esta proteína (Fig. 6A).

Así mismo, utilizamos la proteína reportera GFP fusionada a la secuencia NES de la proteína Rev del virus de inmunodeficiencia humana 1 para evaluar el funcionamiento del transporte nuclear en las células de cáncer metastásico DU145. Se realizó la transfección transitoria de la secuencia la cual permite visualizar su localización subcelular (GFP-NES-REV). Se observó que la proteína recombinante GFP-NES-REV se acumula de manera significativa en el núcleo de las dos líneas celulares, RWPE1 (control) y DU145 (línea celular de cáncer de próstata metastásico) tratadas con Leptomicina B, lo que corrobora que el transporte nuclear mediado por la exportina CRM1 es funcional en la línea celular DU145 (FIG. 6B), y por lo tanto, los bajos niveles nucleares del β -DG no se deben a una alteración de su transporte nuclear.

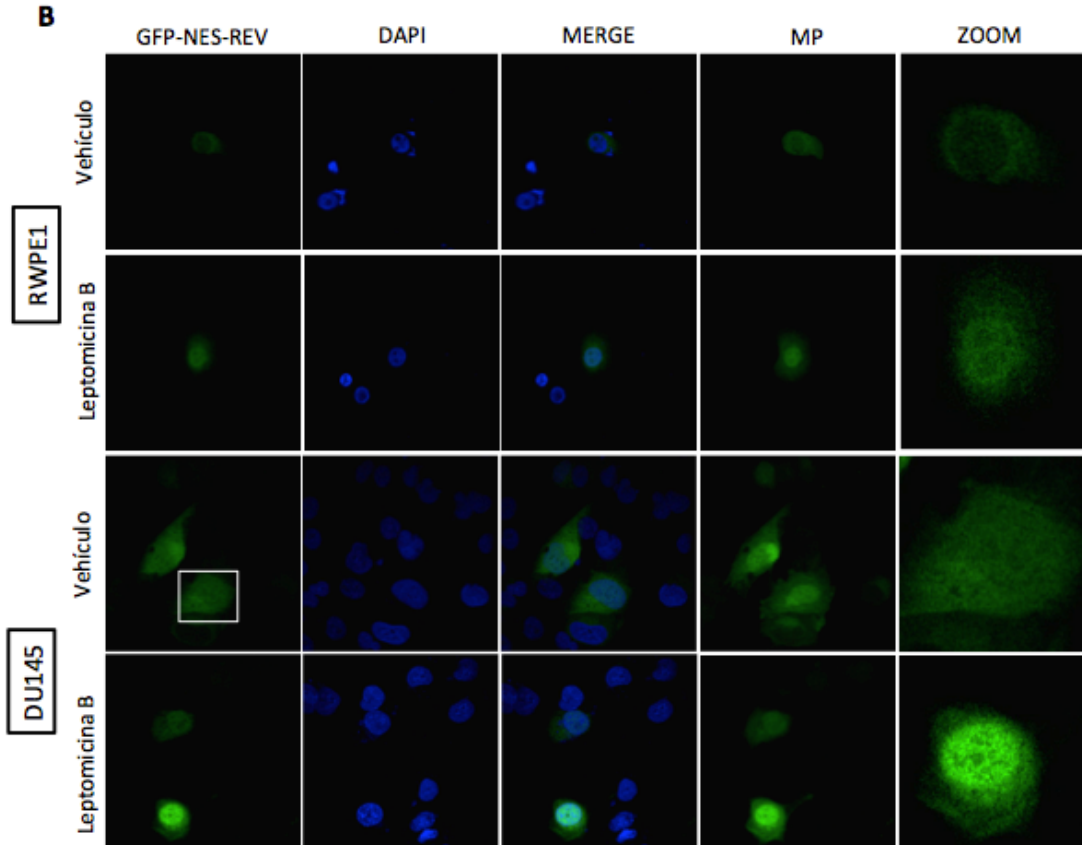
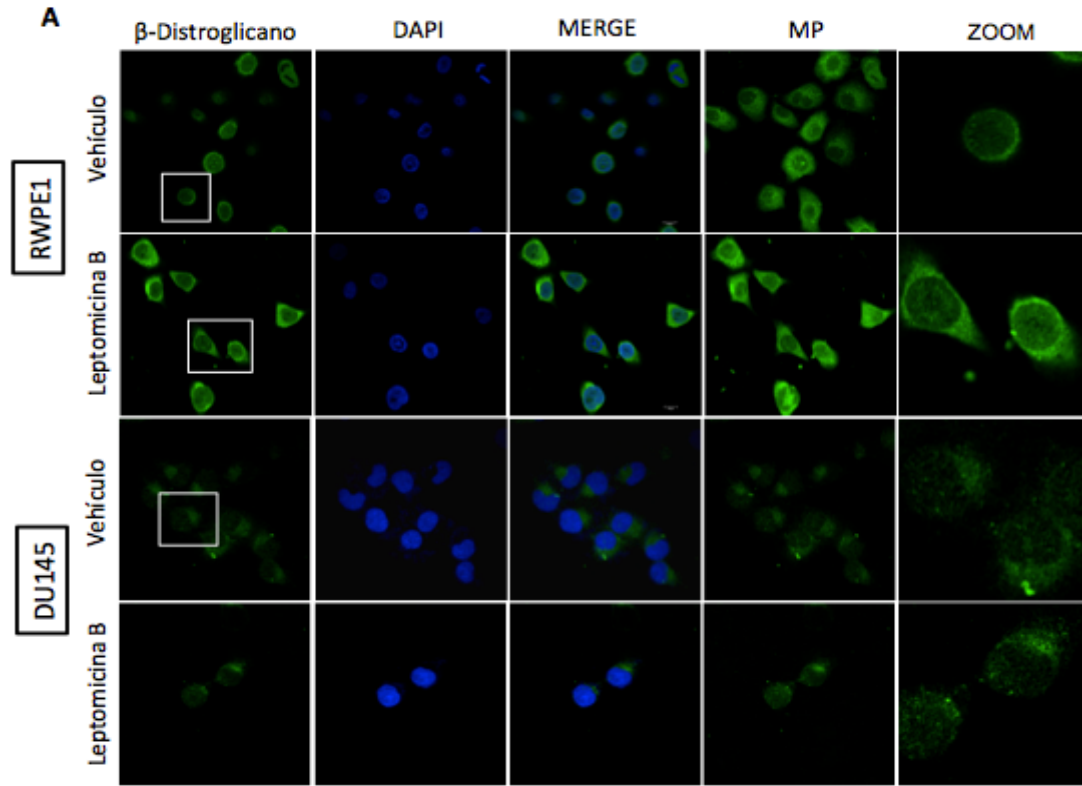


Figura 6. **Exporte nuclear mediado por CRM1 del β -DG en la línea celular de cáncer de próstata metastásico DU145.** (A). Se muestran ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando el anticuerpo policlonal JAF dirigido contra el β -DG (verde) en las líneas celulares RWPE1 y DU145, 24 horas posteriores al tratamiento con 100 nM de Leptomicina B o con vehículo (etanol al 70%) para inhibir el transporte nuclear. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). (B). Se realizaron transfecciones transitorias de la proteína recombinante GFP-NES-REV (verde) en las líneas celulares RWPE1 y DU145. Después de 24 horas posttransfección, las células se trataron con Leptomicina B como se describe arriba. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal.

13. DISCUSIÓN

El β -DG es una proteína multifuncional involucrada en la adhesión celular y remodelación del citoesqueleto [1], y recientemente se le ha implicado con la estructura y función de la envoltura nuclear mediante su asociación con las proteínas nucleares emerina y laminas A/C y B1 [47].

De manera interesante, tanto el β -DG como las proteínas de envoltura nuclear mencionadas arriba se han relacionado con la etiología de diferentes tipos de cáncer. Alteraciones en la expresión y/o distribución subcelular de las proteínas de envoltura nuclear que originan aberraciones en la morfología del núcleo se han reportado en cánceres de ovario, mama, hígado, pulmón, etc. [54] [49]. Por otro lado, los niveles y localización nuclear del β -DG se encuentran alterados en líneas celulares de cáncer de próstata [37, 39, 47]; así mismo se ha reportado que la interacción entre las subunidades α - y β -DG se altera en distintos tipos de cáncer, perturbando la comunicación de membrana plasmática con la matriz extracelular [11, 39]; lo que se piensa, es un paso necesario para la migración e invasión de las células cancerosas hacia otros tejidos.

Tomando en cuenta la relación funcional del β -DG con las proteínas de envoltura nuclear decidimos analizar si las alteraciones en la morfología del núcleo, típicas de las células cancerosas, se deben a un daño primario en la localización nuclear del β -DG que consecuentemente perturba la distribución y función de las proteínas de envoltura nuclear. Para esto, utilizamos las líneas celulares de cáncer de próstata con distintos grados de invasividad y analizamos la expresión y localización subcelular del β -DG y de las proteínas de envoltura nuclear lámina A/C, lámina B1 y emerina. Observamos que el β -DG se localiza predominantemente en el núcleo de las diferentes líneas celulares de cáncer de próstata, mientras que las proteínas de envoltura nuclear se distribuyeron en la periferia del núcleo, de acuerdo a lo reportado [52]. En contraste, la localización nuclear del β -DG disminuyó significativamente en la línea celular de cáncer metastásico DU145 acumulándose de manera característica en el citoplasma, en una región

contigua a la periferia nuclear. De manera concomitante, encontramos alteraciones en la distribución de las proteínas de envoltura nuclear emerina y láminas A/C y B1 en estas células; la inmunotinción de las tres proteínas reveló invaginaciones de la envoltura nuclear y señal anormal en el nucleoplasma con agregados de las proteínas. Es posible que la morfología nuclear aberrante ocasione daños en las funciones nucleares que controla la envoltura nuclear, incluyendo la regulación de la expresión genética, organización de la cromatina, reparación del DNA y ciclo celular [65]. Así mismo, se piensa que la pérdida de rigidez de la membrana nuclear le da la flexibilidad necesaria a las células metastásicas para poder migrar a través de los capilares sanguíneos e invadir otros tejidos [66].

Consistente con las alteraciones en la distribución subcelular, encontramos que los niveles de las proteínas de envoltura nuclear están disminuidos en las células metastásicas DU145. Por el contrario, a pesar de que la inmunotinción nuclear del β -DG esta disminuida en las células DU145, sus niveles totales están aumentados en estas células. Es necesario realizar fraccionamiento celular e inmunodetección en fase sólida para cuantificar de manera precisa los niveles del β -DG presentes en cada compartimento celular.

Es importante resaltar que la distribución subcelular que exhibe el β -DG varía de acuerdo con el anticuerpo utilizado; se cree que esto ocurre por la región que reconoce cada anticuerpo y por el estado de fosforilación de la proteína. Particularmente el anticuerpo anti- β -DG comercial C20 revela la localización nucleolar del β -DG [47]. Con la utilización de este anticuerpo observamos la localización nucleolar del β -DG en todas las líneas celulares de cáncer de próstata, y de manera interesante, la línea celular metastásica DU145 exhibe disgregación de los nucléolos. Recientemente se reportó que la lámina B1 controla la plasticidad nucleolar mediante su interacción con la proteína nucleolar nucleofosmina (B23) [67]; por lo tanto, es probable que los niveles disminuidos y deslocalización de la lamina B1 que presentan las células DU145 sean la causa de la desorganización de los nucléolos lo cual es un marcador de

progresión del cáncer y se correlaciona con un pronóstico bajo de supervivencia para los pacientes con esta enfermedad [68].

Por último, decidimos probar si la inmunotinción nuclear disminuida del β -DG que exhiben las células de cáncer metastásico DU145, se debe a una perturbación en su tráfico nuclear. El β -DG se importa al núcleo mediante el reconocimiento de una NLS localizada en su dominio yuxtamembranal por las importinas $\alpha 2/\beta 1$ [45] y sus niveles nucleares son regulados también mediante el transporte nuclear dependiente de una NES localizada en su dominio transmembranal mediante la exportina CRM1 (Vélez Aguilera. 2012. Datos no publicados). A este respecto, se han reportado diferentes perturbaciones en el transporte núcleo-citoplasma de proteínas en cáncer, incluyendo alteraciones en los niveles de expresión de las importinas y exportinas [69], enmascaramiento de la NLS/NES debido a modificaciones post-traduccionales de las proteínas cargo (ej. fosforilación) o a su unión con otras proteínas, y alteraciones en los niveles de Ran-GTP o de proteínas del poro nuclear (NPC) [61]. Sin embargo, el sistema de importe nuclear de la línea celular DU145 funciona de manera eficiente, ya que el transporte nuclear de la proteína reportera TetraGFP-NLS-SV40 (tetrámero de GFP fusionado a la señal de localización nuclear del virus del simio 40) fue similar al observado para la línea celular control RWPE1. Así mismo, el análisis del mecanismo de transporte nuclear mediante la utilización del antibiótico Leptomomicina B, inhibidor de la exportina CRM1, mostró que la proteína reportera GFP-NES-REV (GFP fusionada a la NES de la proteína viral REV) se exporta del núcleo hacia el citoplasma de forma normal en las células DU145 mientras que el β -DG sigue localizándose de manera predominante en el citoplasma, lo que sugiere que nunca entra al núcleo en primer lugar. Con base en estos resultados, la deficiencia nuclear del β -DG no se debe a una falla global en los sistemas de importe/exporte de proteínas. Sin embargo, no podemos descartar que el mecanismo de transporte nuclear particular del β -DG este alterado. Por ejemplo, es posible que su NLS este enmascarada por la proteína ezrina, ya que esta

proteína presenta gran afinidad por la NLS del β -DG [26] [70]. Claramente se requieren experimentos adicionales para probar esta hipótesis.

14. CONCLUSIONES

- La expresión y distribución del β -DG (43 kDa) y de las proteínas de envoltura nuclear emerina y láminas B1 y A/C están alteradas en la línea celular de cáncer de próstata metastásico DU145.
- Los mecanismos de importe y exporte nuclear de la línea celular de cáncer metastásico DU145 no están alterados, por lo que la deficiencia nuclear del β -DG se debe a otro mecanismo no elucidado.

15. PERSPECTIVAS

- Confirmar la disminución nuclear del β -DG en la línea celular DU145 mediante fraccionamiento celular y western blot.
- Analizar el efecto de la sobreexpresión del β -DG nuclear sobre las proteínas nucleares emerina y láminas A/C y B1.
- Identificar las alteraciones del mecanismo de importe nuclear del β -DG en la línea celular metastásica DU145.

16. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Allikian, M.J. and E.M. McNally, Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic*, 2007. 8(3): p. 177-83.
2. Cirak, S., et al., Restoration of the dystrophin-associated glycoprotein complex after exon skipping therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*, 2012. 20(2): p. 462-7.
3. Ervasti, J.M. and K.P. Campbell, Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 1991. 66(6): p. 1121-31.
4. Fairclough, R.J., M.J. Wood, and K.E. Davies, Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet*, 2013. 14(6): p. 373-8.
5. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., et al., Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet*, 1993. 2(10): p. 1651-7.
6. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., et al., Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 1992. 355(6362): p. 696-702.
7. Holt, K.H., et al., Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett*, 2000. 468(1): p. 79-83.
8. Akhavan, A., et al., SEA domain proteolysis determines the functional composition of dystroglycan. *FASEB J*, 2008. 22(2): p. 612-21.
9. Jayasinha, V., et al., Inhibition of dystroglycan cleavage causes muscular dystrophy in transgenic mice. *Neuromuscul Disord*, 2003. 13(5): p. 365-75.
10. Brancaccio, A., et al., The N-terminal region of alpha-dystroglycan is an autonomous globular domain. *Eur J Biochem*, 1997. 246(1): p. 166-72.
11. Barresi, R. and K.P. Campbell, Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 2): p. 199-207.
12. Brancaccio, A., M.A. Ruegg, and J. Engel, Cloning and sequencing of mouse skeletal muscle alpha-dystroglycan. *Matrix Biol*, 1995. 14(8): p. 681-5.
13. Hohenester, E., et al., The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of alpha-dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin. *Mol Cell*, 1999. 4(5): p. 783-92.

14. Sugita, S., et al., A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol*, 2001. 154(2): p. 435-45.
15. Singh, J., et al., Proteolytic enzymes and altered glycosylation modulate dystroglycan function in carcinoma cells. *Cancer Res*, 2004. 64(17): p. 6152-9.
16. Kunz, S., et al., Molecular analysis of the interaction of LCMV with its cellular receptor [alpha]-dystroglycan. *J Cell Biol*, 2001. 155(2): p. 301-10.
17. Cao, W., et al., Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science*, 1998. 282(5396): p. 2079-81.
18. Bozzi, M., et al., Functional diversity of dystroglycan. *Matrix Biol*, 2009. 28(4): p. 179-87.
19. James, M., et al., Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of (beta)-dystroglycan regulates its interaction with utrophin. *J Cell Sci*, 2000. 113 (Pt 10): p. 1717-26.
20. Chung, W. and J.T. Campanelli, WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Mol Cell Biol Res Commun*, 1999. 2(3): p. 162-71.
21. Rothberg, K.G., et al., Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 1992. 68(4): p. 673-82.
22. Sotgia, F., et al., Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta-dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem*, 2000. 275(48): p. 38048-58.
23. Yang, B., et al., SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem*, 1995. 270(20): p. 11711-4.
24. Spence, H.J., et al., Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade. *EMBO Rep*, 2004. 5(5): p. 484-9.
25. Cartaud, A., et al., Evidence for in situ and in vitro association between beta-dystroglycan and the subsynaptic 43K rapsyn protein. Consequence for acetylcholine receptor clustering at the synapse. *J Biol Chem*, 1998. 273(18): p. 11321-6.
26. Vasquez-Limeta, A., et al., Nuclear import of beta-dystroglycan is facilitated by ezrin-mediated cytoskeleton reorganization. *PLoS One*, 2014. 9(3): p. e90629.

27. Batchelor, C.L., et al., Recruitment of Dbl by ezrin and dystroglycan drives membrane proximal Cdc42 activation and filopodia formation. *Cell Cycle*, 2007. 6(3): p. 353-63.
28. Nardoizzi, J.D., K. Lott, and G. Cingolani, Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun Signal*, 2010. 8: p. 32.
29. Tomas, A., C.E. Futter, and E.R. Eden, EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol*, 2014. 24(1): p. 26-34.
30. Ilsley, J.L., M. Sudol, and S.J. Winder, The interaction of dystrophin with beta-dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal*, 2001. 13(9): p. 625-32.
31. Sotgia, F., et al., Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry*, 2001. 40(48): p. 14585-92.
32. Sotgia, F., et al., Localization of phospho-beta-dystroglycan (pY892) to an intracellular vesicular compartment in cultured cells and skeletal muscle fibers in vivo. *Biochemistry*, 2003. 42(23): p. 7110-23.
33. Cohn, R.D. and K.P. Campbell, Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, 2000. 23(10): p. 1456-71.
34. Bozzi, M., et al., Enzymatic processing of beta-dystroglycan recombinant ectodomain by MMP-9: identification of the main cleavage site. *IUBMB Life*, 2009. 61(12): p. 1143-52.
35. Yamada, H., et al., Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum Mol Genet*, 2001. 10(15): p. 1563-9.
36. Muschler, J., et al., A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells. *Cancer Res*, 2002. 62(23): p. 7102-9.
37. Mathew, G., et al., Nuclear targeting of dystroglycan promotes the expression of androgen regulated transcription factors in prostate cancer. *Sci Rep*, 2013. 3: p. 2792.
38. Hosokawa, H., et al., Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 7): p. 1487-96.

39. Cross, S.S., et al., Expression of beta-dystroglycan is reduced or absent in many human carcinomas. *Histopathology*, 2008. 53(5): p. 561-6.
40. Le Borgne, R., A. Bardin, and F. Schweisguth, The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development*, 2005. 132(8): p. 1751-62.
41. Myers, J.M., et al., Nuclear trafficking of FGFR1: a role for the transmembrane domain. *J Cell Biochem*, 2003. 88(6): p. 1273-91.
42. Stewart, M., Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(3): p. 195-208.
43. Fuentes-Mera, L., et al., Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix. *Exp Cell Res*, 2006. 312(16): p. 3023-35.
44. Gonzalez-Ramirez, R., et al., 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*, 2008. 105(3): p. 735-45.
45. Lara-Chacon, B., et al., Characterization of an Importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan. *J Cell Biochem*, 2010. 110(3): p. 706-17.
46. Kau, T.R., J.C. Way, and P.A. Silver, Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(2): p. 106-17.
47. Martinez-Vieyra, I.A., et al., A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1833(3): p. 698-711.
48. Sgambato, A., et al., Dystroglycan expression is reduced during prostate tumorigenesis and is regulated by androgens in prostate cancer cells. *J Cell Physiol*, 2007. 213(2): p. 528-39.
49. Hutchison, C.J., Do lamins influence disease progression in cancer? *Adv Exp Med Biol*, 2014. 773: p. 593-604.
50. Lawrence, M.G., et al., Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer and the potential role of kallikrein serine proteases. *Cells Tissues Organs*, 2007. 185(1-3): p. 111-5.

51. de Las Heras, J.I., D.G. Batrakou, and E.C. Schirmer, Cancer biology and the nuclear envelope: a convoluted relationship. *Semin Cancer Biol*, 2013. 23(2): p. 125-37.
52. Burke, B. and C.L. Stewart, The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. 14(1): p. 13-24.
53. Stewart, C. and B. Burke, Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell*, 1987. 51(3): p. 383-92.
54. Capo-chichi, C.D., et al., Loss of GATA6 leads to nuclear deformation and aneuploidy in ovarian cancer. *Mol Cell Biol*, 2009. 29(17): p. 4766-77.
55. Kaufmann, S.H., et al., Differential expression of nuclear envelope lamins A and C in human lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 1991. 51(2): p. 581-6.
56. Capo-chichi, C.D., et al., Nuclear envelope structural defects cause chromosomal numerical instability and aneuploidy in ovarian cancer. *BMC Med*, 2011. 9: p. 28.
57. Capo-chichi, C.D., et al., Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity in breast cancer. *Chin J Cancer*, 2011. 30(6): p. 415-25.
58. Agrelo, R., et al., Inactivation of the lamin A/C gene by CpG island promoter hypermethylation in hematologic malignancies, and its association with poor survival in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 2005. 23(17): p. 3940-7.
59. Moss, S.F., et al., Decreased and aberrant nuclear lamin expression in gastrointestinal tract neoplasms. *Gut*, 1999. 45(5): p. 723-9.
60. Helfand, B.T., et al., Chromosomal regions associated with prostate cancer risk localize to lamin B-deficient microdomains and exhibit reduced gene transcription. *J Pathol*, 2012. 226(5): p. 735-45.
61. Hill, R., et al., Targeting nucleocytoplasmic transport in cancer therapy. *Oncotarget*, 2014. 5(1): p. 11-28.
62. Quinn, D.I., S.M. Henshall, and R.L. Sutherland, Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer*, 2005. 41(6): p. 858-87.
63. Mitchell, A., et al., Dystroglycan function is a novel determinant of tumor growth and behavior in prostate cancer. *Prostate*, 2013. 73(4): p. 398-408.

64. Webber, M.M., et al., Human cell lines as an in vitro/in vivo model for prostate carcinogenesis and progression. *Prostate*, 2001. 47(1): p. 1-13.
65. Dittmer, T.A. and T. Misteli, The lamin protein family. *Genome Biol*, 2011. 12(5): p. 222.
66. Zink, D., A.H. Fischer, and J.A. Nickerson, Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(9): p. 677-87.
67. Martin, C., et al., Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 10): p. 1551-62.
68. Quin, J.E., et al., Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1842(6): p. 802-16.
69. Nguyen, K.T., M.P. Holloway, and R.A. Altura, The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *Int J Biochem Mol Biol*, 2012. 3(2): p. 137-51.
70. Khurana, S. and S.P. George, The role of actin bundling proteins in the assembly of filopodia in epithelial cells. *Cell Adh Migr*, 2011. 5(5): p. 409-20.
71. Kong L., Schäfer G, Bu H, Zhang Y, Clocker H, (2012). "Lamin A/C protein is overexpressed in tissue-invading prostate cancer and promotes prostate cancer cell growth, migration and invasion through the PI3K/AKT/PTEN pathway." *Carcinogenesis*, Apr.2014.
72. Sgambato A¹, Migaldi M, Montanari M, Camerini A, Brancaccio A, Rossi G, Cangiano R, Losasso C, Capelli G, Trentini GP, Cittadini A (2003). "Dystroglycan expression is frequently reduced in human breast and colon cancers and is associated with tumor progression." *Am J Pathol*. 2003 Mar;162(3):849-60.
73. Cai C¹, Hsieh CL, Omwanjha J, Zheng Z, Chen SY, Baert JL, Shemshedini L (2007). "ETV1 is a novel androgen receptor-regulated gene that mediates prostate cancer cell invasion." *Mol Endocrinol*. 2007 Aug;21