



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“MECANISMOS MOLECULARES QUE DETERMINAN LA LOCALIZACIÓN  
SUBCELULAR DIFERENCIAL DE LAS DISTROFINAS Dp17d y Dp71f”**

**Tesis que presenta**

**IBQ. ALMA NELY ALAMILLO INIESTA**

**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 2016**

**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**

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

**Durante la realización del mismo, la estudiante Alma Nely  
Alamillo Iniesta fue apoyada como becaria del CONACyT con  
el número de registro 299182**

Dedico este trabajo a una mujer fuerte, aguerrida, intensa, admirable, bondadosa y sensible; a mi madre. A ti mujer hermosa por amarme tanto incondicionalmente; cada una de tus cualidades y defectos que se traducen en consejos, abrazos, sonrisas y miradas, han sido el pilar que me ha sostenido e impulsado a seguir mis sueños.

Dicen que los hijos son el espejo de los padres, mas yo sé que me falta mucho para poder alcanzar lo maravillosa que eres. Te amo.

## AGRADECIMIENTOS

---

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su laboratorio a pesar de la situación en la que me encontraba cuando llegue. Gracias por haber puesto en mis manos este proyecto y confiar en mí, por compartirme parte de su sabiduría, y por cada consejo que ayudo a desarrollarme tanto profesional como personalmente. Gracias por haberse convertido no sólo en mi asesor, sino también en mi amigo, gracias por el apoyo y comprensión incondicional. Lo quiero mucho Doctor.

A la Dra. María del Rocío Suárez Sánchez y al Dr. José Efraín Garrido Guerrero, gracias por todas las pláticas y consejos tanto de trabajo como personales que me regalaron, además de por su ejemplo como investigadores. Gracias por todos sus comentarios, críticas y consejos que ayudaron a enriquecer este proyecto.

A mis padres Juana Iniesta Bastida y Oscar Alamillo Bernal, por darme el privilegio de tenerlos a mi lado aunque no sea físicamente, gracias por creer en mí, por darme un excelente ejemplo de vida y convertirme en la mujer que soy, por enseñarme a amarme, respetarme y a comprobar que con esfuerzo siempre alcanzaré todos mis sueños. Los admiro y los amo.

A mis hermanos Hilda y Oscar por crecer y compartir cada etapa de mi vida, por estar a mi lado a pesar de la distancia y tener siempre para mí un consejo, por dejarme disfrutarlos y también a sus pequeños hijos, por convertirse en una de mis razones de seguir. Gracias por esas miradas de amor y momentos de complicidad. Los amo.

Al Dr. Everardo Curiel por haber sido la primera persona que me enseñó lo maravillosa que es la ciencia y por ser el ser humano más completo que he conocido. Lo quiero mucho.

A mis compañeros de laboratorio Jdd, Ari, Gris, Pau, Ricardito, Amigou, Wendy, Ruth y Eli, por adoptarme como una familia, gracias por cada conocimiento, consejo, plática, juego, risa, por cada momento que compartieron conmigo haciendo que esta etapa quede por siempre en mi corazón. Los quiero mucho. Gris, gracias por compartir todos tus conocimientos conmigo, eres una persona admirable. También, gracias a Ivan e Ian por ser llegar y convertirse en mis amigos.

A Pablo Gómez, auxiliar del laboratorio, por su ayuda técnica, y sus conocimientos que ayudaron al desarrollo mi proyecto. A Lupita de la unidad de secuenciación, Arturo de la cocina bacteriológica, Gabriela Mora de coordinación académica, Linda secretaria del Dr. Bulmaro, por todo lo que me ayudaron en el desarrollo de este proyecto. Gracias por haber sido siempre tan amables cuando los necesite.

A Sergio, “me has conocido en un momento extraño de mi vida”, mas le has dado un toque maravilloso, gracias por ser paciente y comprenderme con tantas cosas que hay en este momento en mi vida, gracias por regalarme y compartirme un poco de ti. Te quiero mucho.

A todos aquellos que no son parte de mi familia, pero se han convertido en personas entrañables en mi corazón, Grace, Paty, Salma, Vick, Dani, Erick, Jorgito, Ricardo, Raúl, gracias por hacer mi vida más agradable, por las risas, los consejos, gracias por compartir su esencia. Los quiero.

## CONTENIDO

---

AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 La distrofia muscular de Duchenne (DMD).....	10
1.2 El complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC) .....	11
1.3 El gen DMD.....	12
1.4 Estructura y función de la distrofina. ....	14
1.5 La Dp71.....	16
1.5.1 La Dp71 y sus variantes de procesamiento alternativo.....	16
1.5.2 Regulación de la expresión de Dp71.....	18
1.5.3 Localización nuclear de Dp71 y los componentes del DAPC.....	18
1.6 Envoltura nuclear.....	19
1.7 Transporte nucleoplásmico.....	20
1.7.1 Importe Nuclear.....	20
1.7.2 Exporte Nuclear.....	21
2. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS.....	29
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	29
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
6. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	30
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
7.1 Cultivo células HeLa.....	31
7.2 Obtención de extractos proteicos totales mediante lisis celular.....	31
7.3 Método de Bradford para la Cuantificación de Proteínas.....	31
7.4 Análisis de proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	32
7.5 A Ensayo de unión a GST (PULL-DOWN) .....	32
7.6 Inmunodetección en fase sólida.....	33
7.7 Extracción y purificación de plásmidos a baja y mediana escala.....	34
7.7.1 Obtención de DNA plasmídico a baja escala (MINIPREP) .....	34
7.7.2 Obtención de DNA plasmídico a mediana escala (MIDIPREP).....	35
7.8 Transfección.....	35
7.9 Tratamiento con Leptomicina B (LMB) .....	35

7.10 Cuantificación de la fracción nucleo/citoplasma (Fn/c) .....	36
7.11 Inmunofluorescencia indirecta.....	36
7.12 Restricción enzimática de DNA.....	37
7.13 Obtención de Clonas Mediante Reacción de Ligación.....	37
7.14 Transformación bacteriana.....	37
7.15 Amplificación por PCR.....	37
7.16 Secuenciación Automatizada de DNA.....	38
7.16.1 Obtención de productos de extensión marcados para secuenciar.....	38
7.16.2 Purificación de los productos por precipitación con EDTA.....	38
8. RESULTADOS.....	39
8.1 El Importe nuclear de la Dp71f es mediado por el sistema de importinas $\alpha$ 2 y $\beta$ 1.....	39
8.2 Interacción de la distrofina Dp71f con las proteínas de envoltura nuclear emerina y lámina B1.....	42
8.3 Expresión de las proteínas recombinantes Dp71d-GFP y Dp71f-GFP en un sistema bacteriano.....	43
8.3.1 Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes Dp71d-GFP y Dp71f-GFP en bacteria.....	46
9. DISCUSIÓN.....	48
10. CONCLUSIONES.....	51
11. PERSPECTIVAS.....	52
12. BIBLIOGRAFÍA.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

---

Figura 1	Proteínas del sarcolema.	12
Figura 2	Organización genómica del gen DMD, situado en Xp21	14
Figura 3	Interacciones de la proteína distrofina en el extremo COOH	16
Figura 4	Representación esquemática de la proteína Dp71 y sus variantes de procesamiento alternativo	17
Figura 5	Topología de la envoltura nuclear NE	20
Figura 6	Mecanismos de importe y exporte nuclear	22
Figura 7	Modelo propuesto para el mecanismo de transporte nucleo-citoplasmico de Dp71d	23
Figura 8	Secuencias de Exporte Nuclear de las distrofinas Dp71d y Dp71f	24
Figura 9	Acumulación nuclear de la proteína GFP-Dp71f en células tratadas con el inhibidor del exporte nuclear leptomicina B	24
Figura 10	Presencia nuclear de la Dp71f endógena en células HeLa tratadas con el inhibidor del exporte nuclear leptomicina B (LMB).	25
Figura 11	Funcionalidad de las Señales de Exporte Nuclear de la Dp71f en el contexto de una proteína heteróloga (GFP)	26
Figura 12	Localización subcelular de la GFP-Dp71f y de las variantes mutantes de la NES.	26
Figura 13	La proteína Dp71f se asocia in vitro con la exportina CRM1.	27
Figura 14	Silenciamiento de la importina $\beta$ 1	40
Figura 15	Localización subcelular de la proteína recombinante GFP-Dp71d en las células con deficiente expresión de la importina $\beta$ 1	41
Figura 16	Distribución de la proteína recombinante GFP-Dp71f en las células deficientes en la expresión de la importina $\beta$ 1.	42
Figura 17	La distrofina Dp71f interactúa con la emerina	43
Figura 18	La distrofina Dp71f interactúa con la lámina B1.	45
Figura 19	Clonación del cDNA de las isoformas Dp71d y Dp71f en un vector de tránsito.	45
Figura 20	Restricción y purificación del vector pRSET-GFP y de los fragmentos de cDNA de las isoformas Dp71d y Dp71f.	46
Figura 21	Construcción de los vectores de expresión bacteriana pRSET-DP71d y pRSET-Dp71f	47
Figura 22	Expresión de las proteínas recombinantes Dp71d-GFP y Dp71f-GFP	41
Tabla 1	Oligonucleotidos utilizados en el proyecto	31
Tabla 2	Anticuerpos utilizados y condiciones de uso (inmunodetección en fase sólida)	34

## RESUMEN

---

El gen DMD produce diferentes isoformas de la distrofina, una ellas, la Dp71, se ha implicado en el retraso mental y la patología de retina que presentan los pacientes con distrofia muscular de Duchenne. El estudio de la función de la Dp71 se ha complicado por la serie de eventos de *splicing* alternativo que sufre. Las dos isoformas de *splicing* más estudiadas son la Dp71d y la Dp71f; de manera interesante, estas isoformas presentan una distribución subcelular diferencial entre sí, mientras la Dp71d se localiza predominantemente en el núcleo, la Dp71f se distribuye exclusivamente en el citoplasma. La definición de los mecanismos que determinan la distribución de cada isoforma es un paso esencial para discernir la función que desempeñan en la célula. Previamente demostramos que la Dp71d tiene un mecanismo de importe nuclear mediado por el reconocimiento de una señal de importe nuclear, localizada en su dominio ZZ, por parte de las importinas  $\alpha 2/\beta 1$  y un mecanismo de exporte nuclear dependiente del reconocimiento de una señal de exporte nuclear (NES) localizada en su extremo carboxilo terminal, por la exportina CRM1. De manera intrigante, la señal de importe nuclear la contiene también la Dp71f, por lo que es probable que se trasporte al núcleo también sea dependientes de las importinas  $\alpha 2/\beta 1$ . Previamente evidenciamos la presencia nuclear de la Dp71f mediante la inhibición del exporte nuclear con leptomicina B (LMB), lo que implica que la Dp71f tiene un mecanismo de importe nuclear. De acuerdo con esta idea, en este estudio demostramos que el importe nuclear de la Dp71f depende de la importina  $\beta 1$ . Sin embargo, su paso por el núcleo es transitorio ya que si no se inhibe el exporte nuclear se localiza exclusivamente en el citoplasma. En este estudio demostramos que la Dp71f, así como la Dp71d, establecen interacciones con las proteínas de la envoltura nuclear lámina B1 y emerina; por lo tanto, una asociación diferencial con proteínas nucleares no es la causa principal de la localización nuclear de la Dp71d y citoplasmática de la Dp71f. Alternativamente, es probable que el exporte nuclear de la Dp71f sea más eficiente que el de la Dp71d. Consistente con esta idea, la Dp71f contiene en su extremo carboxilo terminal dos NES funcionales, mientras que la Dp71d contiene solo una. Para corroborar plenamente estos resultados es necesario llevar a cabo análisis comparativos de las cinéticas de importe y exporte nuclear de cada isoforma.



## ABSTRACT

---

The DMD gene produces different isoforms of dystrophin and the smallest ONE, Dp71, has been implicated in mental retardation and retinal pathology exhibited by patients with muscular dystrophy Duchenne. The study of Dp71 function has been complicated, due to the high number of alternative splicing events that suffers. The two most studied splicing isoforms of Dp71 are Dp71d and Dp71f. Interestingly, these isoforms has different subcellular distribution each other; while Dp71d localizes predominantly in the nucleus, Dp71f distributes exclusively in the cytoplasm. Definition of molecular mechanisms underlying the differential distribution of these isoforms is an essential step towards identification of their particular roles. Previously we demonstrated that Dp71d has a nuclear import pathway mediated by the recognition of a nuclear import signal, located in the ZZ domain ZZ, by importin  $\alpha 2 / \beta 1$ , as well as a CRM1-dependent nuclear export mechanism that requires an intact nuclear export nuclear (NES) located in the C-terminus. Intriguingly, *the* ZZ-containing NLS is shared between Dp71d and Dp71f; therefore, it is likely that Dp71f has the ability to enter the nucleus too. Previously we evidence the nuclear presence of Dp71f by inhibiting the CRM1-dependent nuclear export pathway with leptomycin B (LMB), which implies that Dp71f has indeed a nuclear import mechanism. Accordingly to this idea, we demonstrate in this study that nuclear import of Dp71f depends on importin  $\beta 1$ . However, the nuclear presence of Dp71f is transiently, because it is only evident when the nuclear export is blocked. In this study we demonstrate that Dp71f and the Dp71d establish interaction with the nuclear envelope proteins lamina emerin B1; therefore, a differential association with nuclear proteins is not the main cause of the nuclear localization of Dp71d and the cytoplasmic one of Dp71f. Alternatively, it is likely that Dp71f has a more efficient nuclear export mechanisms than DP71d. Consistently, we identified two functional NES in the carboxyl terminus of Dp71f, while in contrast, Dp71d has only a single NES. It is necessary to carry out a comparative analysis of the nuclear import and export kinetics of each isoform, to fully corroborate these results

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1 La distrofia muscular de Duchenne (DMD)

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un trastorno neuromuscular hereditario ligado al cromosoma X que se caracteriza por la degeneración muscular progresiva y deterioro cognitivo; presenta una incidencia de uno de cada 3.500 nacimientos de varones [Emery, 1993]. Esta enfermedad es causada por una mutación en el gen DMD, dicha mutación altera la producción o función de la distrofina, una proteína que se localiza en la unión neuromuscular. La ausencia de distrofina causa defectos estructurales y en la señalización celular, lo que origina daños en las fibras musculares. Con el tiempo, los niños y adolescentes con DMD presentan deterioro en la fuerza y función muscular. El resultado principal de esta mutación es la debilidad muscular progresiva y en última instancia causa la muerte por problemas cardio-respiratorios [Shana et al., 2007].

La distrofina es un elemento estructural clave de la fibra muscular y tiene la función primaria de estabilizar la membrana plasmática junto con un complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC). Daños en la membrana plasmática pueden conducir a la entrada masiva de calcio y con ello a la pérdida de homeostasis del calcio, por ende a la activación de proteasas y finalmente a la muerte celular [Dekoninkc and Dan, 2007].

Por otra parte, se presenta también isquemia muscular en niños con distrofia muscular de Duchenne que realizan ejercicio ya que se aumenta la necesidad de oxígeno. El óxido nítrico (NO) actúa como agente vasodilatador y es producido en las células musculares por la isoforma neuronal de la Óxido Nítrico Sintetasa (nNOS), dicha enzima se une a la distrobrevina y la sintrofina (componentes del DAPC). En los músculos con deficiencia de distrofina, la nNOS se deslocaliza del sarcolema y queda libre en el citoplasma, y por tanto se reduce su cantidad [Brenman et al., 1995; Crosbie et al., 2002; Sander et al., 2000].

Se sabe que durante el desarrollo neuronal, la distrofina se expresa en el tubo neural y en áreas selectas del eje neuro-posnatal y embriónico; de esta manera

regula distintos aspectos de la neurogénesis, migración neuronal y diferenciación celular. Por el contrario, en el cerebro maduro, la distrofina se expresa preferentemente en subpoblaciones de regiones específicas de neuronas, dentro de microdominios somadendríticos proximales asociados con las membranas de las terminales sinápticas. En el adulto, la distrofina modula la integridad de la terminal sináptica, la plasticidad sináptica y la señalización celular [Mehler, 2000].

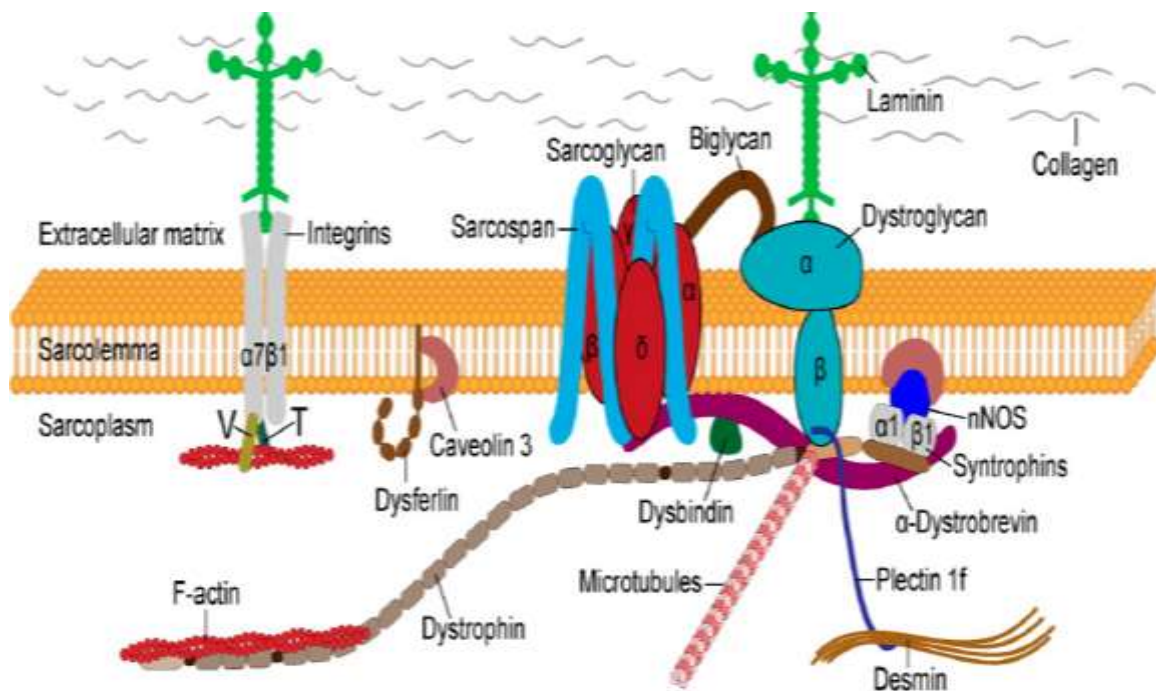
## **1.2 El complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC)**

El complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC) se ha implicado en la maduración estructural y el mantenimiento del sarcolema y de la unión neuromuscular [Grady et. al., 2000]. Este complejo de proteínas, sirve como un puente para conectar la matriz extracelular con el citoesqueleto; además de la distrofina que se une directamente con la F-actina, los miembros del DAPC incluyen proteínas intracelulares ( $\alpha$ 1- y  $\beta$ 1-sintrofina,  $\alpha$ -distrobrevina, y nNOS), transmembranales ( $\beta$ -dístroglicano,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -sarcoglicano, y sarcospan ) extracelulares ( $\alpha$ -dístroglicano y laminina-2) [Blake et. al., 2002; Ehmsen et. al., 2002; Rahimov and Kunkel, 2013; Rebeca et. al., 2013] (Figura 3).

El DAPC mantiene la estabilidad estructural del sarcolema durante la contracción muscular, mediante la vinculación del citoesqueleto con proteínas de la matriz extracelular como la laminina. La integridad del complejo es crucial para la contracción de miofibras, para soportar la tensión mecánica generada por sarcómeros y para evitar daño en el sarcolema durante de la contracción muscular. Por ende, cuando existe ausencia o daño de los componentes del DAPC se desacopla la matriz extracelular del citoesqueleto, lo que provoca en última instancia la ruptura de la membrana muscular y su necrosis posterior [Petrof et al., 1993; Carlson, 1998; Meier and Rugg, 2000; Ervasti 2007]. Además de su papel en el mantenimiento de la integridad muscular, el DAPC puede participar activamente en los eventos de transducción de señales, por medio de la asociación del DAPC con moléculas de señalización, tales como nNOS, la tirosina cinasa ErbB4, las proteínas SAPK, calmodulina, CaMKII, y la proteína cinasa A (PKA) [Blake et. al 2002; Ehmsen et. al., 2002; Pilgram et. al.,

2010]. La pérdida de la distrofina altera las propiedades del receptor de acetilcolina (AChR), provocando que las células sean más permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ . [Carlson, 1998; Kong and Anderson, 1999; Sancar et. al., 2011]. También se ha observado que el DAPC controla la localización de los canales de sodio/potasio, importantes en la señalización y en la activación de receptores [Hongkyun et. al., 2009; Sancar et. al., 2011].

La falta de distrofina o pérdida, debido a mutaciones del gen de DMD, promueve la desintegración DAPC y por consiguiente el desarrollo de la distrofia muscular [Koenig et. al., 1989]. Del mismo modo, las mutaciones en genes que codifican para otros componentes de la DAPC, como los sarcoglicanos, dan lugar a otras formas de distrofia muscular como las distrofias musculares congénitas [Kanagawa and Toda, 2006; Daniele et. al., 2007].



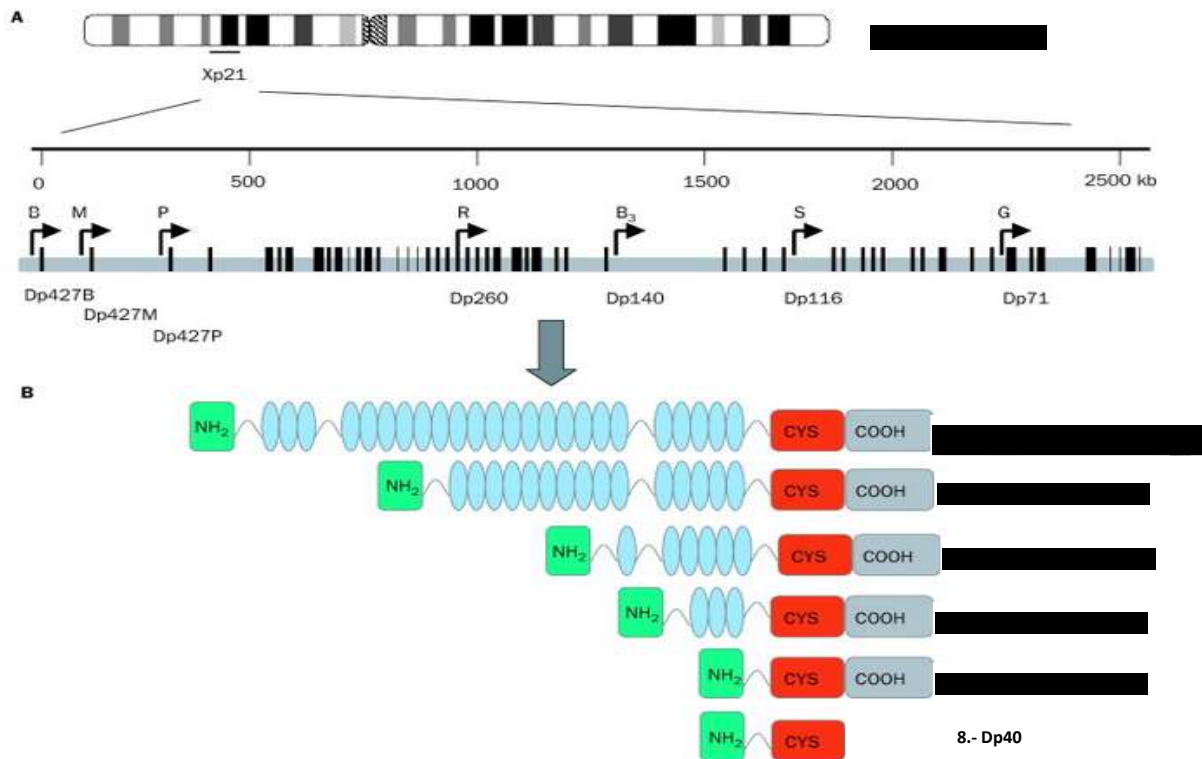
**Figura 1: Proteínas del sarcolema.** La subunidad  $\alpha 2$  de la laminina interactúa directamente con el  $\alpha$ -distroglicano glicosilado, que a su vez interactúa con el  $\beta$ -distroglicano en la parte transmembranal. El N-terminal y las repeticiones tipo espectrina de la distrofina, se unen a la F-actina del citoesqueleto. El dominio rico en cisteína de la distrofina se une al  $\beta$ -distroglicano y el dominio C-terminal adyacente se une a la  $\alpha$ -distrobrevina y sintrofina. La proteína plectina se une al  $\beta$ -distroglicano, y la distrofina y conecta la desmina FI con el DAPC. Los microtúbulos también interactúan con la distrofina. Las pequeñas repeticiones ricas en leucina de los proteoglicanos y biglicanos de la matriz extracelular se unen al  $\alpha$ - y  $\gamma$ -sarcoglicano y al  $\alpha$ -distroglicano. Las sintrofinas se unen a la distrofina, la  $\alpha$ -distrobrevina, la nNOS y la caveolina-3. El dímero de integrina  $\alpha 7 \beta 1$  se une a la laminina extracelular y a la F-actina intracelular, a través de las proteínas vinculina (V) y talina (T) (Tomado y modificado de Rahimov and Kunkel, 2013)

### 1.3 El gen DMD

El gen DMD, localizado en el locus Xp21, es el más grande identificado a la fecha (> 2,5 Mbp), corresponde al 1.5% del cromosoma X y el 0.1% de todo el genoma humano. Su secuencia comprende 79 exones, que codifican para una proteína del citoesqueleto de 427 kDa (3, 685 residuos) designada como distrofina [Koenig 1987].

El gen DMD exhibe una regulación transcripcional, contiene al menos siete promotores (Figura 2A), con una regulación tejido específica y durante el desarrollo. Hay tres transcritos provenientes de promotores separados que originan isoformas de longitud completa. El promotor Dp427M está activo en el músculo esquelético y liso, en las células gliales del SNC y las células endoteliales vasculares; el promotor Dp427B funciona en neuronas corticales, del hipocampo (región CA 1-3) y neuronas piramidales. Por su parte el promotor Dp427P tiene actividad en la corteza cerebral fetal y en células de Purkinje del cerebelo maduro. Además el gen DMD produce cuatro transcritos cortos codificados por promotores internos que conllevan a la traducción de isoformas truncadas. El promotor de la distrofina Dp260 es activo en la sinapsis que ocurre entre las células bipolares y el fotorreceptor de la retina, mientras que el promotor de la Dp140 funciona en el riñón, en los procesos astrogiales, a lo largo de los vasos sanguíneos, y en la neurohipófisis. El promotor que dirige la expresión de la distrofina Dp116 tiene actividad en las etapas finales de la maduración del cerebro fetal humano y en el diencéfalo postnatal (promotor). Finalmente, el promotor de la Dp71 actúa en las células madre embrionarias tempranas (en las zonas de las interacciones epitelio-mesenquimales), en el mesencéfalo embrionario y rombencéfalo, en el cerebro perinatal durante las etapas de diferenciación neural terminal y en el prosencéfalo embrionario. La actividad de este promotor continúa hasta la vida adulta, específicamente en la corteza cerebral, en las neuronas granulares de giro dentado del hipocampo, el bulbo olfatorio, la pituitaria y la retina; además, en las regiones neocorticales asociados con el mantenimiento de la neurogénesis y la plasticidad sináptica. A nivel subcelular, los transcritos originados a partir de este promotor se localizan en

asociación con las vesículas sinápticas, los microsomas y las mitocondrias, así como en la corteza cerebral y el cerebelo. [Schofield et al., 1994; Goreck et al., 1995; Cisneros et al., 1996; Holder et al., 1996; Sadoulet-Puccio y Kunkel, 1996; Ceccarini et al., 1997; Kimura et al., 1997; Lidov y Kunkel, 1997; Imamura y Ozawa, 1998; Lumeng et al., 1999; Sarig et al., 1999;]



**Figura 2 A: Organización genómica del gen DMD, situado en Xp21.** Las líneas verticales negras representan los 79 exones del gen, distribuidos en alrededor de 2,5 millones de bases. Las flechas indican los diferentes promotores de cerebro (B), músculo (M), y células de Purkinje (P). **B: Dominio de las isoformas de la distrofina.** (Tomado y modificado de Muntoni et al., 2003).

#### 1.4 Estructura y función de la distrofina

La distrofina es una proteína intracelular que se localiza en la superficie interior del sarcolema, y tiene cuatro dominios funcionales (Figura 2B):

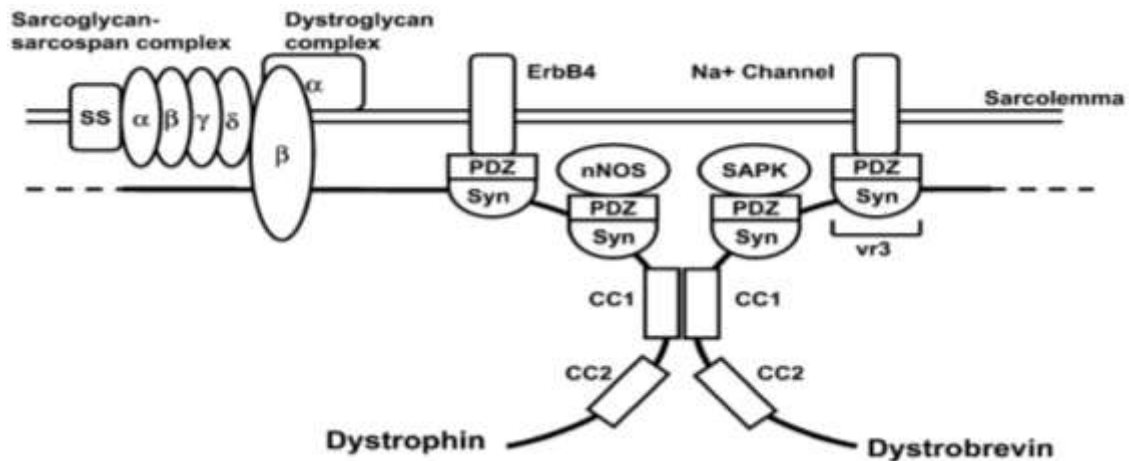
**Dominio de unión a actina:** los aminoácidos del extremo N-terminal de la distrofina, muestran una clara homología con secuencias de las familias de la

espectrina y la  $\alpha$ -actinina, las cuales se unen a la F-actina; de hecho se ha corroborado la unión de la distrofina con la F-actina.

**Dominio central:** Consiste en una región de 24 repetidos similares a las repeticiones de triple hélice de la espectrina; por lo tanto, este dominio también se llama "tipo espectrina". Estas repeticiones son interrumpidas por cuatro regiones de bisagra ricas en prolina que se cree que son para dar la molécula una estructura de varilla flexible similar a la espectrina [Blake et al., 2002].

**Dominio rico en cisteína:** La región comprende lo siguiente: un dominio WW; es un dominio globular de 38 a 40 aminoácidos con dos residuos de triptófano conservados, separados entre sí por 20-22 aminoácidos. Este dominio interacciona con la secuencia Pro-Pro-x-Tyr (donde x es cualquier aminoácido) del  $\beta$ -dístroglicano. El sub-dominio "EF-hand" consiste de un región estructural hélice-bucle-hélice presente en una gran familia de proteínas de unión a calcio, consiste de dos  $\alpha$ -hélices posicionadas más o menos perpendicularmente entre sí y unidas por una región de bucle corto, que une iones de calcio. Este sub-dominio aumenta la afinidad del dominio WW por el  $\beta$ -dístroglicano [Rentschler et al., 1999]. El sub-dominio ZZ de dedos de zinc está conservado, y se cree que estabiliza los dominios WW y EF-hand fortaleciendo la interacción global entre la distrofina y el  $\beta$ -dístroglicano [Ponting et al., 1996; Hnia et al., 2007]. El nombre "dominio rico en cisteínas", es inapropiado, ya que sólo cinco de los quince aminoácidos están conservados (cisteínas en la distrofina humana), cuatro de los cuales se ligan al metal del dominio ZZ [Roberts, 2001].

**Dominio carboxilo-terminal:** La primera mitad del dominio C-terminal interactúa con el dominio ZZ, fortaleciendo su unión con el  $\beta$ -dístroglicano. [Hnia et al., 2007]. El COOH terminal de la distrofina contiene dos regiones en forma de hélice superenrollada, estos dominios se denominan como regiones CC (Coil-coiled); en esta región, se encuentra el sitio de unión a la  $\alpha$ -dístrobrevina. Además, el carboxilo terminal tiene dos sitios de unión a la sintrofina, que por medio de sus dominios PDZ interactúa con otras proteínas pertenecientes al DAPC [Blake et al., 1995, 2002; Suzuki et. al., 1994] (Figura 3).



**Figura 3: Interacciones de la proteína distrofina en el extremo COOH.** Se observa la existencia de dos secuencias de unión a sintrofina tanto en la distrofina como en la  $\alpha$ -distrobrevina. Cuatro posibles proteínas de unión sintrofina se muestran; el receptor ErbB4 de la tirosina quinasa, canal de sodio dependiente de voltaje, la nNOS (sintasa neuronal de óxido nítrico) y SAPK (proteína de estrés que activa la quinasa-3), (Tomado y modificado de Blake et. al., 2002).

## 1.5 La Dp71

Recientemente, el estudio de la Dp71 ha adquirido relevancia debido a que el déficit de esta proteína se ha implicado con el retraso mental y la disfunción de la retina en pacientes con DMD, dos fenotipos principales no musculares de la DMD. También se ha observado experimentalmente la participación de Dp71 en diferentes procesos celulares, incluyendo la adhesión celular, la homeostasis del agua, la división celular y la arquitectura nuclear. Diferentes estudios han corroborado la funcionalidad de Dp71 en la formación del DAPC en numerosos tipos de células y diferentes compartimentos subcelulares, como la membrana plasmática y el núcleo.

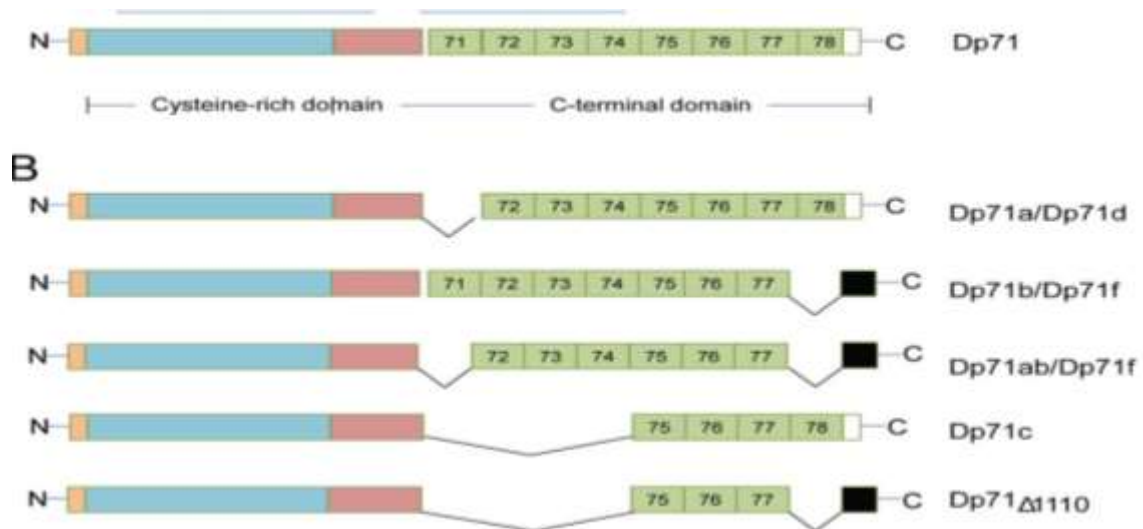
### 1.5.1 La Dp71 y sus variantes de procesamiento alternativo

El gen Dp71 se genera a partir de un mRNA de 4.8- a 6,5 kb se encuentra en distintos tejidos como el cerebro, riñón, hígado, testículos, pulmón y estómago, con excepción músculo esquelético [Bar et. al., 1990; Blake et. al., 1992; Hugnot et. al., 1992]. Este transcrito es generado a partir de un promotor situado a la parte distal del gen de la DMD, entre los exones 62 y 63, que da lugar a una proteína de 70-75 kDa [Lederfein et. al., 1991].



La Dp71 contiene el dominio rico en cisteínas y el dominio C-terminal flanqueados por un motivo de unión a actina de siete aminoácidos únicos en el N-terminal [Howard et. al., 1998].

Diferentes estudios establecen que se llevan a cabo procesamientos alternativos en el mRNA de la Dp71 en los exones 71-74, 71 y 78, dando lugar a diversas isoformas de la proteína. La pérdida de los exones 71-74 (330 pb) no afecta al marco de lectura, pero elimina el sitio de unión a la sintrofina y genera una proteína con un peso molecular predicho de 58-60 kDa. El cambio en el dominio C-terminal, surge de la escisión del exón 78, dando como resultado un cambio del marco de lectura que reemplaza los últimos 17 aminoácidos hidrofílicos, por 31 aminoácidos hidrofóbicos, formándose así un extremo C-terminal hidrofóbico [Feener et. al., 1989; Bies et. al., 1992; Kramarcy et. al., 1994 Ceccarini et. al., 1997; Austin et. al., 2000]. Según la nomenclatura de GenBank las isoformas de la Dp71 se denominan de esta manera: Dp71a (con los exones 71 y 78); Dp71b (sin el exón 71); Dp71ab (sin los exones 71 y 78); y Dp71c (sin exones 71- 74) (Figura 4). La Dp71a también es conocida Dp71d, y las Dp71b y Dp71ab, como Dp71f.



**Figura 4: Representación esquemática de la proteína Dp71 y sus variantes de procesamiento alternativo.** Se muestran los siete aminoácidos únicos del N-terminal, el dominio rico en cisteína y el dominio C-terminal, así como los sitios de unión al distroglicano y la sintrofina. Los exones empalmados se indican en cada isoforma. La pérdida del exón 78 provoca un cambio en el marco de lectura, en donde los últimos 13 aminoácidos de Dp71 son sustituidos por 31 aminoácidos hidrofóbicos. La pérdida de los exones 71-74 provoca una eliminación de 330pb en el marco, que codifica para 110 aminoácidos correspondientes al dominio de unión a la sintrofina (Tomado y modificado de Tadayoni et. al., 2012).

### **1.5.2 Regulación de la expresión de Dp71**

La expresión de la Dp71 se modula principalmente a nivel transcripcional. Se sabe que el promotor de la Dp71 se encuentra en el intrón que está entre los exones 62 y 63 del gen DMD, que se encuentra a más de 2.000 kb del extremo 3' y a sólo 150 Kb del extremo 3' del gen [Lederfein et. al., 1991]. El promotor carente de caja TATA, tiene una región rica en GC, en donde se localiza un sitio de unión específico para la proteína Sp1, la cual al unirse estabiliza la maquinaria transcripcional y define el sitio de inicio de transcripción.[ Austin et. al., 1995; Pemberton et. al, 2005]. Una región promotora proximal (224pb) contiene cuatro sitios de unión para Sp1 y uno para la proteína de activación 2 (AP2), los cuales son necesarios para la expresión basal de la Dp71, tanto en las células musculares como en las neuronas [Baliga et. al., 2003]. En mioblastos, Sp1, junto con la proteína de especificidad 3 (Sp3), transactiva el promotor de la Dp71; sin embargo, los niveles de las proteína Sp1 y 3 disminuyen durante la diferenciación de células de músculo, en última instancia, causando regulación a la baja del promotor en las células musculares maduras [de León, et. al., 2005; Morales-Lazaro, et. al., 2010].

En la miogénesis temprana, la Dp71 se expresa para participar en la remodelación del citoesqueleto [Heilman et. al., 2003], mientras que en las fibras musculares maduras su expresión disminuye para permitir la expresión de la distrofina de 427Kd, que es el producto del gen DMD predominante, evitando así la competencia entre estos sitios de unión disponibles para el DAPC. [Garcia-Tovar et. al., 2001]. Por otro lado, la expresión basal de DpP71 en las neuronas diferenciadas es controlado por la acción combinada de Sp1 y la proteína de activación 2 $\alpha$  (AP2 $\alpha$ ), reguladores positivos y negativos, respectivamente.

### **1.5.3 Localización nuclear de Dp71 y los componentes del DAPC**

Como ya se ha mencionado, la distrofina Dp71 se asocia con la membrana citoplasmática, sin embargo, se ha observado que las isoformas Dp71d y Dp71f están presentes en los extractos nucleares obtenidos de las neuronas del hipocampo [Tomizawa et. al., 2008]. Curiosamente, se ha demostrado que el splicing alternativo determina la localización subcelular de las isoformas de Dp71

[Gonzalez E., et. al., 2000] Mediante un análisis por microscopía confocal en las líneas celulares HeLa, C2C12, y N1E-115, utilizando plásmidos que expresan las diferentes variantes de splicing de la Dp71 fusionadas a GFP, se reveló que la isoforma Dp71 que carece del exon 78 (Dp71f) se localiza exclusivamente en el citoplasma, mientras que las variantes que contienen el exón 78 (Dp71d) mostraron una localización nuclear predominante. Consistente con esto, los ensayos de inmunofluorescencia, en células PC12 demostraron que la Dp71d exhibe una localización nuclear predominante, mientras que Dp71f se localiza exclusivamente en el citoplasma [Jans et. al., 2000].

Se encontró por fraccionamiento celular y la inmunoprecipitación de extractos nucleares que la Dp71 se encuentra en el núcleo en conjunto con los sarcoglicanos, el  $\beta$ -dístroglicano, la sintrofina, y la distrobrevina, y que todos estos componentes se ensamblan en un DAPC nuclear en diferentes líneas celulares; HeLa, C2C12 y PC12 [Roth et. al., 2007].

## **1.6 Envoltura nuclear**

La envoltura nuclear (NE), característica de las células eucariotas, es una membrana doble bien organizada que envuelve el genoma nuclear [Kite, 1913]. La NE no solo cumple un papel crítico en la protección del genoma, sino que también representa una membrana altamente especializada que proporciona sitios de anclaje para la cromatina y el citoesqueleto (D'Angelo y Hetzer 2006). La membrana nuclear interna (INM) y externa (ONM) son continuas con el retículo endoplásmico (ER) [Watson, 1955], pero a pesar de la continuidad de lípidos entre el NE y el ER, la ONM y la INM se componen de diversos grupos de proteínas que normalmente no se encuentran en el ER [Hetzer et al., 2005]. La conformación de la NE esta dada por diferentes grupos de proteínas (figura 5); el primero esta formado por 30 polipéptidos diferentes, llamados nucleoporinas o Nups, que forman los complejos de 40-70MD del poro nuclear (NPCs) [Tran y Wentz, 2006; D'Angelo y Hetzer, 2008]. Los NPCs son canales acuosos que muestran simetría rotacional de ocho veces con un diámetro exterior de 100 nm y un canal de transporte central de 40 nm de diámetro, a través del cual se lleva

a cabo un intercambio bidireccional de proteínas, RNA y complejos de ribonucleoproteínas entre el nucleoplasma y citoplasma [Beck et al., 2004;. Beck et al., 2007]. Un segundo grupo de proteínas de la NE se localiza específicamente en la INM, aunque la mayoría de estas proteínas integrales de membrana no se han caracterizado, la interacción con las laminas y la cromatina se ha demostrado para algunas de ellos y cada vez es más claro que las proteínas del INM desempeñan papeles vitales y diversas en el núcleo, como la organización de la cromatina, la expresión génica, y el metabolismo del DNA. Entre las proteínas más estudiadas se incluye el receptor de la lamin B (LBR), el polipéptido asociado lámina (LAP) 1, LAP2, la emerina, y Man1 [Bengtsson y Wilson, 2004; Akhtar y Gasser 2007; Reddy et al., 2008]. En la capa interna de la envoltura nuclear se localiza predominantemente la emerina, la cual es una proteína integral de membrana que esta involucrada en una amplia diversidad de procesos biológicos tales como la actividad de factores de transcripción, la señalización celular y la estructura nuclear.

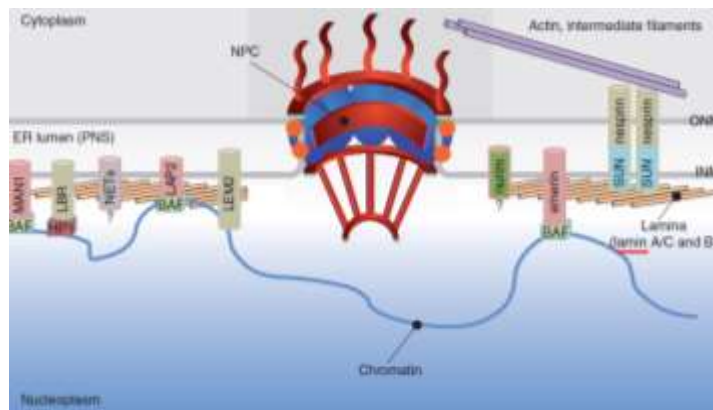


Figura 5: Topología de la envoltura nuclear NE. Las membranas nucleares interna y externa (INM y ONM, respectivamente) están separadas por el lumen del RE o espacio perinuclear (PNS). La lámina nuclear interactúa con proteínas de la NE y de la cromatina. Las proteínas de la INM unen la NE con la cromatina y la lámina. Las proteínas de la ONM proporcionan una conexión desde el núcleo al citoesqueleto. El receptor de lamina B (LBR) interactúa con las laminas de tipo B y la proteína de heterocromatina 1 asociada a la cromatina (HP1), en conjunto con las histonas centrales. Los miembros de la familia del dominio LEM (Proteína asociada a la lamina 2 [LAP2], Emerina, Man1) (rosa) se unen a las laminas e interactúan con la cromatina a través de BAF. Las proteínas Sun (dom 1 y 2) interactúan con nesprinas en la ONM, formando así los llamados complejos LIN que establecen conexiones a actina y filamentos intermedios en el citoplasma. Mediante enfoques proteómicos se han identificado 60 proteínas transmembrana putativas (TNE), la mayoría de los cuales permanecen sin caracterizar. (Martin W. Hetzer, 2012)

Una tercera clase de proteínas de la NE se encuentra específicamente en la ONM. Estas proteínas interactúan con proteínas de la membrana nuclear interna

dentro del espacio periplásmico de la NE [Starr y Han 2003;. Wilhelmsen et al 2006]. También se ha demostrado que interactúan indirectamente con el citoesqueleto de actina. Este último grupo de proteínas de la NE lo constituyen las láminas, una malla de filamentos intermedios que se compone de láminas de tipo A, B y C [Gruenbaum et al., 2000]. Aunque se ha demostrado que la lámina es crítica para la estabilidad nuclear, en particular en tejidos que están expuestos a fuerzas mecánicas tales como las fibras musculares, ha quedado claro que las láminas juegan también papeles importantes en función de la cromatina y la expresión génica [Dechat et al., 2008; Reddy et al., 2008].

Los mayores componentes de las láminas nucleares son las láminas de tipo A y B, las cuales son miembros de la familia de proteínas de filamentos intermedios de tipo V. Las láminas de tipo B se expresan de manera constitutiva a través del desarrollo y cada tipo celular expresa por lo menos un tipo de lámina B, estas proteínas contienen una modificación estable de su extremo C-terminal, el cual es importante para su anclaje a membrana nuclear.

## **1.7 Transporte nucleoplásmico**

El transporte nuclear generalmente involucra el reconocimiento de secuencias presentes en las proteínas cargo por factores solubles (miembros de la familia de las importinas en un proceso de translocación que es dependiente de energía en contra de un gradiente de concentración) [Wagstaff and Jans, 2009].

### **1.7.1 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) por miembros de la familia de las importinas. Las NLSs son pequeños segmentos de aminoácidos básicos, llamadas señales mono-partitas por ejemplo, la NLS del antígeno T del virus SV40 <sup>126</sup>**PKKKRRV**<sup>132</sup> [Kalderon et al., 1984], o señales bi-partitas, compuestas por dos regiones de aminoácidos básicos separadas por una región de 10 a 12 aminoácidos, por ejemplo la NLS de la nucleoplasmina <sup>155</sup>**KRPAATKKAGQAKKKK**<sup>170</sup> [Robbins et

al., 1991]. El reconocimiento de las NLSs lo lleva a cabo la subunidad  $\alpha$  del heterodímero  $\alpha/\beta$ . La subunidad  $\beta$  es quien se ancla al NPC seguido de una translocación al nucleoplasma. La disociación del complejo ocurre en el núcleo mediante la unión de nucleótidos de guanina unidos a la proteína Ran, en su forma de GTP (RanGTP), a la subunidad  $\beta$ , lo que desplaza a la importina  $\alpha$ . Después de esta disociación, las importinas regresan al citoplasma para otro ciclo de importe [Wagstaff and Jans, 2009].

### 1.7.2 Exporte Nuclear

En sentido análogo, proteínas dentro del núcleo que contienen una Señal de Exporte Nuclear (NES) son reconocidas por las exportinas, homólogas a la importina  $\beta$ , la exportina CRM1 es la mejor caracterizada, forma un complejo trimérico con RanGTP e interactúa con las NES, secuencias ricas en aminoácidos hidrofóbicos tales como leucina [Hutten and Kehlenbach, 2007]. La secuencia consenso de la NES es la siguiente:  $\Phi 1-X(2,3)-\Phi 2-X(2,3)-\Phi 3-X-\Phi 4$  ( $\Phi$  n es Leu, Ile, Val, Phe or Met, y X puede ser cualquier otro aminoácido) (Chook and Fung, 2014). En el citoplasma, la hidrólisis de RanGTP a RanGDP disocia el complejo [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].

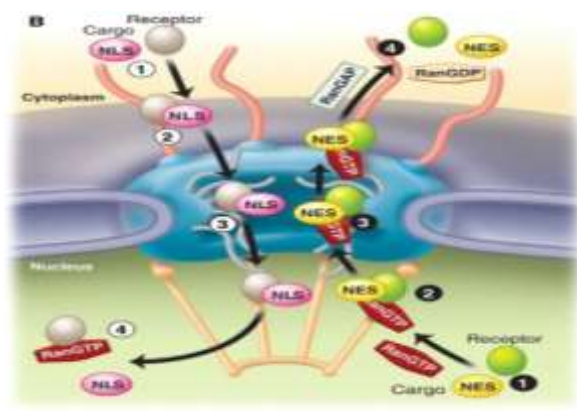
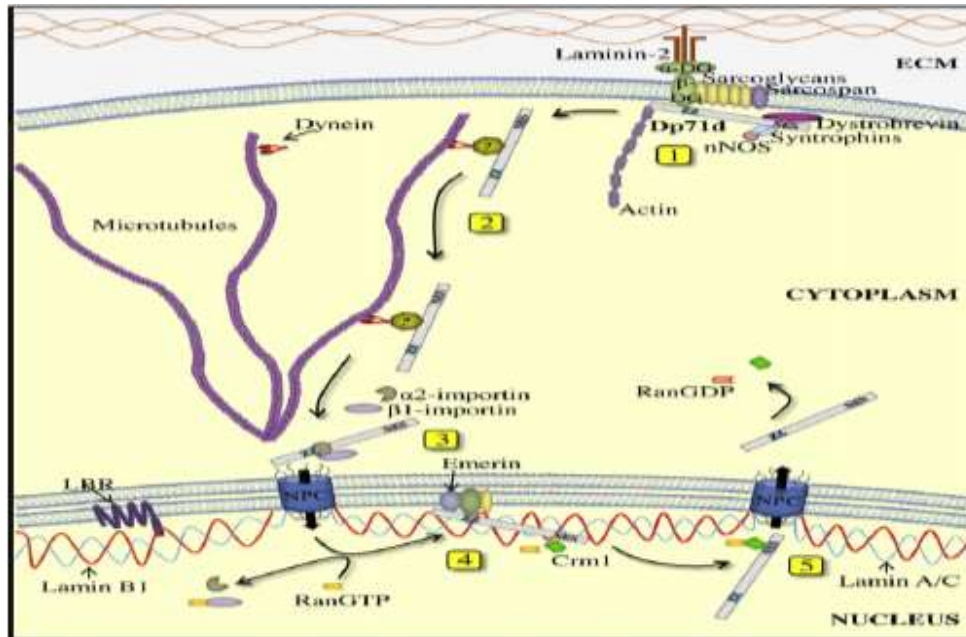


Figura 6. El receptor de transporte nuclear reconoce una señal de importe nuclear (NLS) en la proteína cargo, formando así un complejo (1). Éste complejo se acopla al NPC por medio de interacciones de baja afinidad para que ocurra la translocación hacia el núcleo (2). Se desensambla el complejo una vez en el núcleo (3) y se libera la proteína cargo (4). El desensamblado del complejo de importinas se inicia por la unión de RanGTP al receptor, para el transporte nuclear de las importinas, RanGTP se hidroliza a RanGDP por la proteína activadora de RanGTPasa (RanGAP). El factor intercambiador de nucleótidos de guaninas (RanGEF) se encuentra en el núcleo y genera altas concentraciones de RanGTP, y RanGDP es importada al núcleo por Ntf2 (Terry et al., 2007).

## 2. ANTECEDENTES DIRECTOS

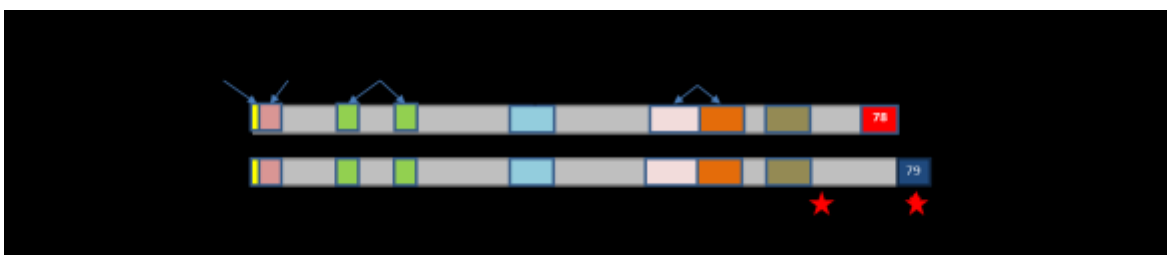
En nuestro grupo de trabajo nos interesa conocer la función de las isoformas Dp71d (isoforma nuclear) y Dp71f (isoforma citoplasmática), y como un primer paso para lograr este objetivo necesitamos conocer los mecanismos moleculares que definen su distribución subcelular diferencial.

En estudios previos, se observó que Dp71d es transportada al núcleo en forma retrógrada con ayuda de la proteína motora dineína; además, se demostró que cuenta con un dominio de importe nuclear en el subdominio ZZ, el cual es dependiente de la vía de importinas IMP $\alpha$ 2/ $\beta$ , y que el exporte nuclear es mediado por la exportina CRM1. También se observó que esta isoforma interacciona en el núcleo con las proteínas de envoltura nuclear, emerina y lámina B1 [Suárez et. al., 2014] (figura 7). Nos intriga el hecho de que el dominio ZZ, está presente en la Dp71f, lo que implica que también esta proteína podría potencialmente entrar al núcleo.

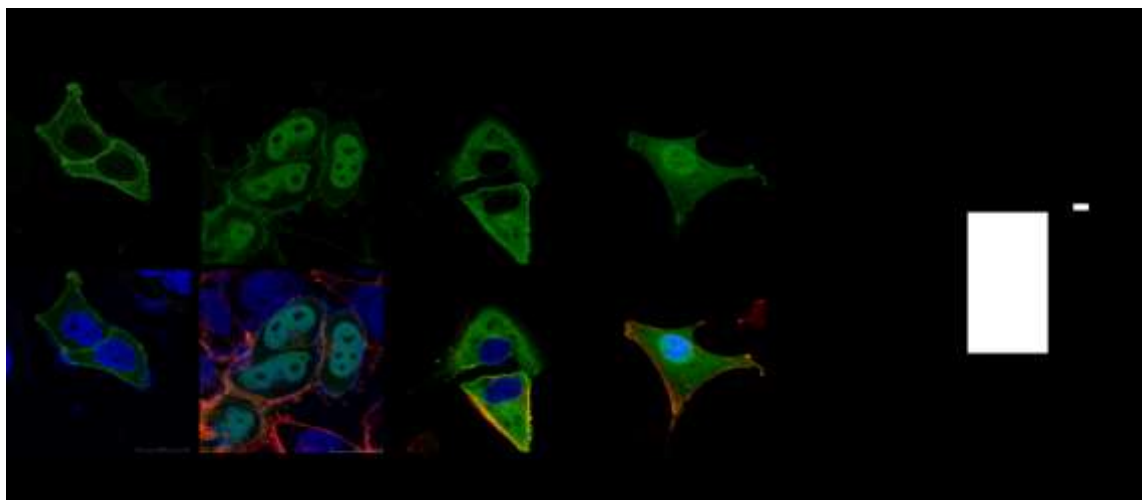


**Figura 7: Modelo propuesto para el mecanismo de transporte nucleo-citoplasmático de Dp71d.** La Dp71d se localiza en la membrana plasmática, dentro del complejo de proteínas asociado a la distrofina (DAPC) (1). En respuesta a señales celulares específicas, tales como la fosforilación, la Dp71d es liberada del DAPC para ser transportada retrógradamente hacia el núcleo a través de la asociación con microtubulos y la proteína motora dineína (2). El heterodímero IMP $\alpha$ 2/  $\beta$ 1 reconoce la NLS en el dominio ZZ de la Dp71d, cerca de la periferia nuclear para mediar su entrada nuclear a través del complejo de poro nuclear (3). La Dp71d se libera en el núcleo por la acción de RanGTP. Enseguida, la Dp71d se ensambla con las proteínas nucleares emerina y lamina B1 (4). Una parte de Dp71d posteriormente se exporta desde el núcleo al citoplasma a través de la unión de una secuencia NES con la exportina CRM1 y RanGTP (5). (Suárez et. al., 2014)

Respecto a esto, identificamos previamente dos señales de exporte nuclear (NES) en el extremo carboxilo de la Dp71f, una de ellas se comparte con la Dp71d mientras que la segunda es exclusiva de la Dp71f (<sup>600</sup>MADDLGRAMESLVSV<sup>614</sup>). (Fig.8). Mediante la utilización del inhibidor de la exportina CRM1 llamado Leptomicina B (LMB), se observó la acumulación nuclear tanto de las proteínas de fusión GFP-DP71d y GFP-Dp71f (Fig.9 ) como de la Dp71f endógena (Fig. 10), lo que indica que la distrofina Dp71f tiene un paso transitorio por el núcleo, además que las NES son reconocidas por la exportina CRM1.

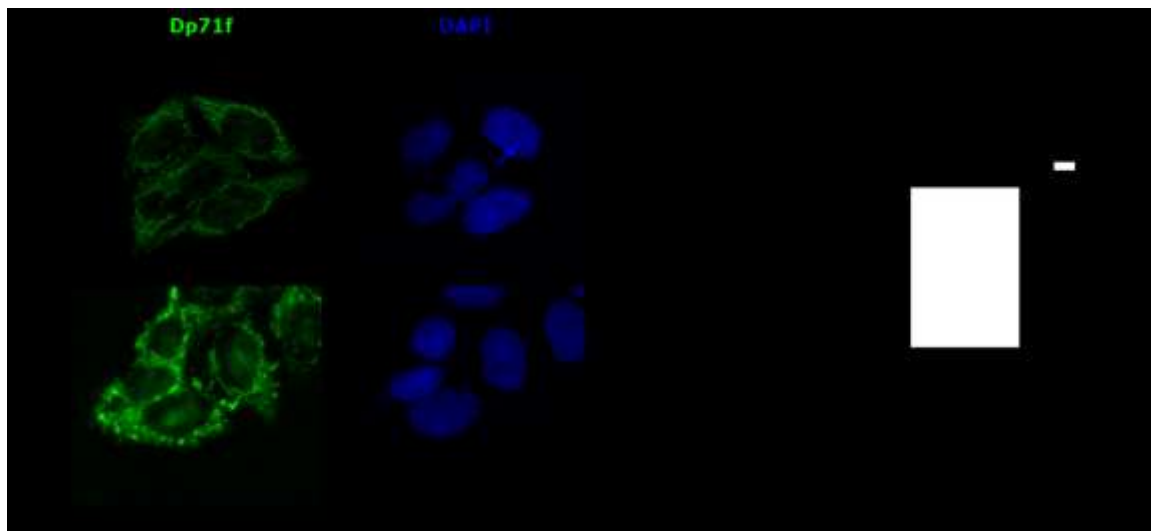


**Fig 8.- Secuencias de exporte nuclear de las distrofinas Dp71d y Dp71f.** Por medio de análisis *in silico* se predijo las posibles secuencias de exporte nuclear (NES), de ambas distrofinas. La Dp71f tiene en el exón 79 una secuencia de exporte nuclear exclusiva.



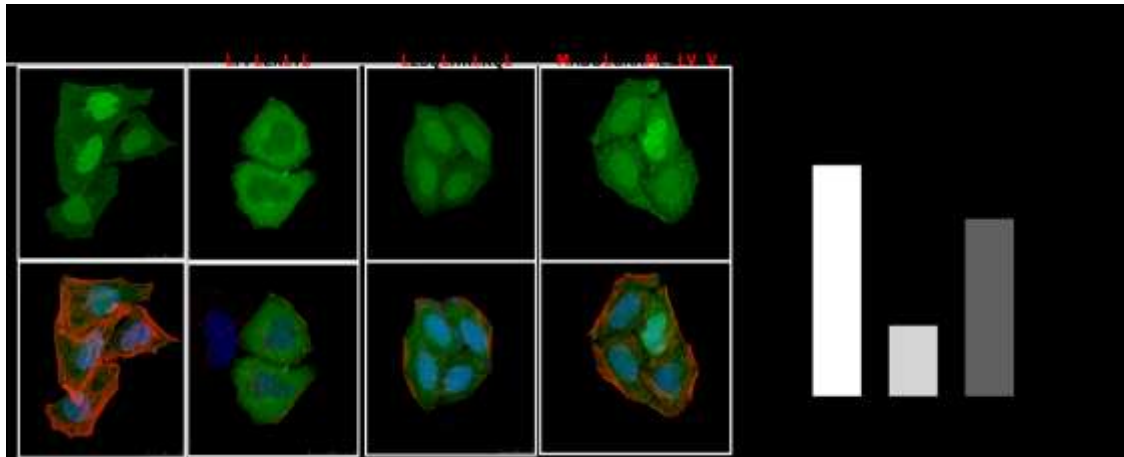
**Fig 9.-Acumulación nuclear de la proteína GFP-Dp71f en células tratadas con el inhibidor del exporte nuclear leptomicina B.** Localización subcelular de las proteína fusión GFP-Dp71f en las células HeLa y C2C12, en presencia ó ausencia de LMB (50nM durante 8 horas). El tratamiento con LMB se aplicó a las 12 horas post transfección. Se observa que en ausencia de LMB la proteína Dp71f se distribuye únicamente en el citoplasma (control) mientras que en las células tratadas con LMB se acumula mayoritariamente en el núcleo. A la derecha se observa la cuantificación de la fluorescencia núcleo/citoplasma (F N/C) de la transfección de la proteína GFP-Dp71f sin y con LMB en células HeLa.



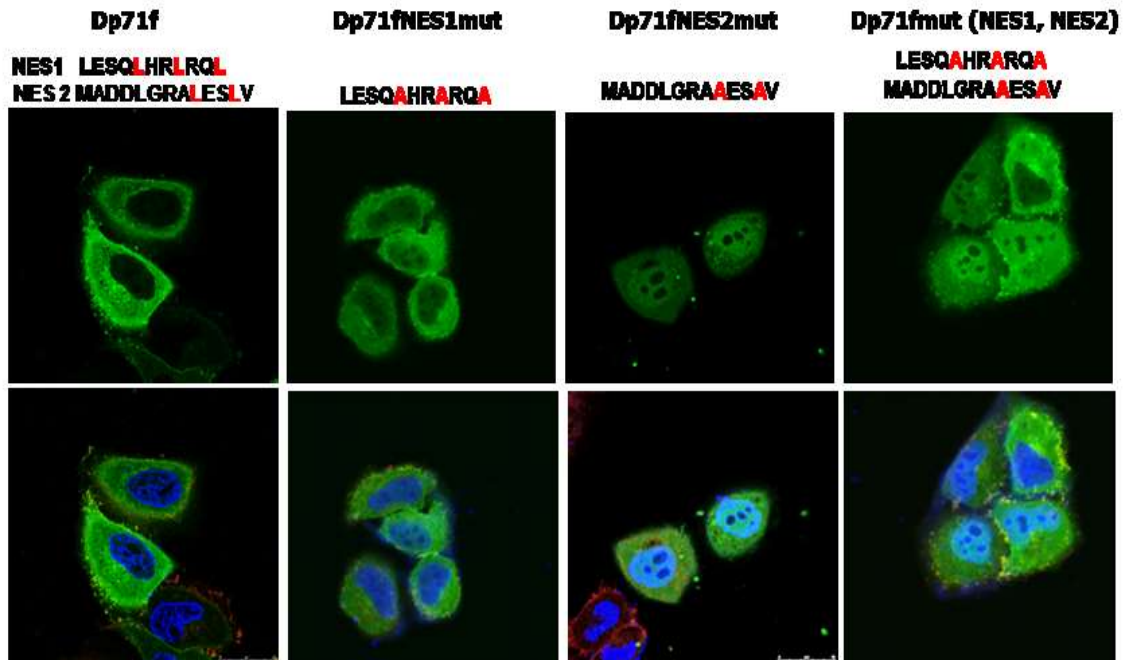


**Fig 10 .- Presencia nuclear de la Dp71f endógena en células HeLa tratadas con el inhibidor del transporte nuclear leptomicina B (LMB).** Localización subcelular de la proteína endógena Dp71f en las células HeLa, en presencia ó ausencia de LMB (150nM durante 24 horas). Se observa que en ausencia de leptomicina la proteína Dp71f se distribuye exclusivamente en el citoplasma (paneles superiores), mientras que en células tratadas con LMB una fracción de la Dp71f se localiza en el núcleo (paneles inferiores). A la derecha se observa la cuantificación de la fluorescencia núcleo/citoplasma (F N/C) de la proteína Dp71f sin y con LMB en células HeLa.

Posteriormente decidimos probar si las NESs de la Dp71f funcionan fuera del contexto de la Dp71f; para lo cual se fusionaron independientemente con la GFP. Observamos que ambas NES promueven el transporte nuclear de la GFP, aunque con menor eficiencia que la NES de la proteína REV (Fig. 11), como lo indica la cuantificación de la fluorescencia (Fn/c). Aparentemente la NES2 es más eficiente que la NES1. Para probar inequívocamente la funcionalidad de cada NES, las mutamos de manera independiente en el contexto de la Dp71f completa. Se observó la acumulación nuclear de las proteínas de fusión y se confirmó que la NES2 es la que funciona preferencialmente para exportar la Dp71f. La acumulación mayor se obtuvo con la doble mutación NES1-NES2, lo que sugiere que ambas NES son funcionales y actúan de manera sinérgica para mediar el transporte nuclear de la Dp71f.

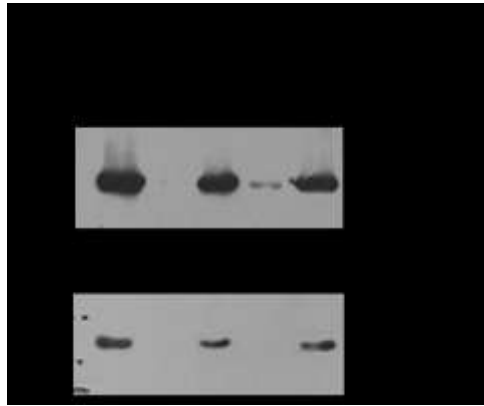


**Fig 11.- Funcionalidad de las Señales de Exporte Nuclear de la Dp71f en el contexto de una proteína heteróloga (GFP).** En la parte superior se observa la secuencia de las NES analizadas. Se utilizó la GFP como control negativo y la NES de la proteína Rev (NES Rev) como control positivo. En rojo se muestran los aminoácidos de carácter hidrofóbico. En la inmunofluorescencia, pueden observarse las células transfectadas con los vectores GFP, NESRev, NES1 y NES2. Se observó la localización subcelular de las proteínas reporteras a través de Microscopía Confocal. A la derecha se observa la cuantificación de la fluorescencia núcleo/citoplasma (F N/C) de cada proteína reportera (GFP, NESRev, NES1 y NES2).



**Fig 12.-Localización subcelular de la GFP-Dp71f y de las variantes mutantes de la NES.** La mutación de las señales de exporte nuclear (en rojo) de la Dp71f ocasiona la acumulación nuclear de la proteína de fusión, lo que indica que las NES son funcionales en el contexto de la proteína completa.

Para demostrar fehacientemente que la exportina CRM1 media el transporte nuclear de la Dp71f, llevamos a cabo ensayos de interacción tipo *pull-down*, utilizando las proteínas de fusión GST y GST-Dp71f. De acuerdo a lo esperado, se encontró que CRM1 reconoce la Dp71f.



**Fig 13.- La proteína Dp71f se asocia *in vitro* con la exportina CRM1.** Las proteínas GST y GST-Dp71f, previamente unidas a perlas de glutatión sefarosa, se pusieron a interactuar con lisados de células HeLa. Se analizó si la exportina CRM1 interacciona con la GST-Dp71f mediante inmunodetección en fase sólida. Como control negativo se utilizó la proteína GAPDH.

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

La distrofina Dp71f tiene una estructura similar a la distrofina Dp71d, difiere únicamente por una región de 31 aminoácidos hidrofóbicos en su región carboxilo que no presenta la Dp71d. Por lo que es intrigante que tengan localizaciones subcelulares opuestas; mientras que la Dp71f es una proteína citoplasmática la Dp71d es una proteína nuclear. Aún es más interesante que la región proteica que determina el importe nuclear de la Dp71d, el dominio ZZ, este compartido por ambas isoformas. Recientemente nuestro laboratorio identificó dos señales de exporte nuclear (NES) en la Dp71f, las cuales exportan eficientemente a la proteína del núcleo hacia el citoplasma. Con base en lo anterior, es importante determinar por completo los mecanismos moleculares que definen la localización citoplasmática de la distrofina Dp71f, lo que nos permitirá conocer si su paso transitorio por el núcleo tiene un significado biológico, no identificado hasta el momento.

### 4. HIPÓTESIS

---

La distrofina Dp71f comparte el mismo mecanismo de importe nuclear con la Dp71d, sin embargo no puede interactuar con las mismas proteínas de envoltura nuclear, lo que determina su localización citoplasmática.

## 5. OBJETIVO GENERAL

---

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

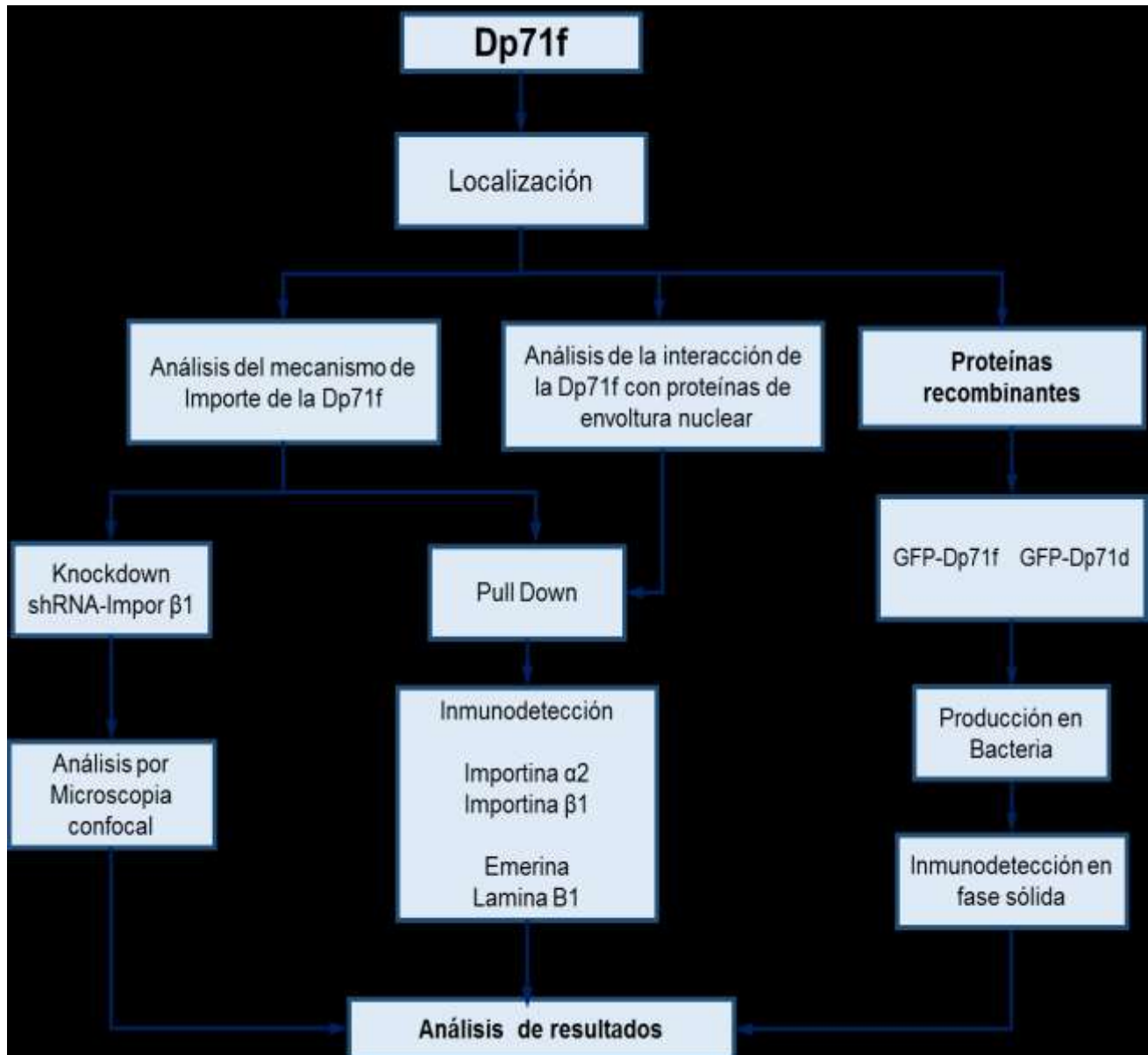
Identificar los mecanismos moleculares que determinan la localización subcelular de la distrofina Dp71f

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Evaluar si el importe nuclear de la Dp71f es mediado por las importinas  $\alpha 2$  y  $\beta 1$ .
- ▶ Analizar la interacción de la Dp71f con las proteínas de la envoltura nuclear emerina, y lámina B1.
- ▶ Construcción de vectores de expresión bacteriana para producir las proteínas recombinantes Dp71d-GFP y Dp71f-GFP

## 6. DIAGRAMA EXPERIMENTAL

---



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el proyecto

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)
Amplificación de Dp71 d Rv	AGTGG AATTCCATTGTGTCCTCTCTCATTG	30	56
Amplificación de Dp71 f Rv	AGTGG AATTCTTCTGCTCCTTCTTCATCTG	30	56
Amplificación de Dp71 d y Dp71f Fw	ATTGATCGATTAATGAGGGAACACCTCAAA	30	56

### 7.1 Cultivo de células HeLa

Las células HeLa (células de cáncer cérvico-uterino) se propagaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 25U/ml de penicilina y 25µg/ml de estreptomina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5%.

### 7.2 Obtención de extractos proteicos totales mediante lisis celular

Los cultivos de células HeLa sembrados a una confluencia de 90% en cajas de 100mm se lavaron con 2ml de PBS y se les añadió 250µl de la solución amortiguadora de lisis (50mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1% de Tritón X-100 y un coctel de proteasas [Complete-Roche]). La mezcla se incubó a 4°C en agitación suave durante 30 minutos. A continuación, el lisado celular se recolectó con un gendarme y se colocó en un tubo de microfuga de 1.5ml, y se sónico para su posterior centrifugación a 12,000rpm por 2 minutos a 4°C; se recuperó el sobrenadante (extracto total de proteínas) en un tubo de microfuga nuevo para su cuantificación a través del método de Bradford y su posterior análisis mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

### 7.3 Método de Bradford para la cuantificación de proteínas

A partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) de 1µg/µl se realizó una curva estándar (0-10µg/µl), 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.

#### **7.4 Análisis de proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida**

Se preparó un gel de poliacrilamida-SDS [Gel Separador al 10%: 2.5ml de 30% acrilamida / 0.8% bisacrilamida, 1.88 de Tris-Cl/SDS (pH 8.8), 3.100ml de H<sub>2</sub>O, 25µl de persulfato de amonio 10% (w/v) y 10µl de TEMED; Gel Concentrador al 4%: 0.479ml de 30% acrilamida / 0.8% bisacrilamida, 0.879 de Tris-Cl/SDS (pH 6.8), 2.143ml de H<sub>2</sub>O, 17.8µl de persulfato de amonio 10% (w/v) y 5µl de TEMED]. A las muestras de proteínas previamente cuantificadas por el método de Bradford, se les agregó solución amortiguadora de carga, se llevaron a un volumen final de 30µl, se calentaron a 100°C por 5 minutos y se colocaron en los pozos del gel. El gel se sometió a electroforesis en solución amortiguadora de corrida (Tris base 3g/l, glicina 14.4g/l, SDS 1g/l) con una corriente constante de 20mA durante 2h. El gel se tiñó con una solución de azul Coomassie (45ml agua, 45ml metanol, 10ml ácido acético glacial y 0.25g de azul de Coomassie) durante 30 minutos y se destiñó con la solución desteñidora (45ml agua, 45ml metanol, 10ml ácido acético glacial) por 1h.

#### **7.5 Ensayo de unión a GST (PULL-DOWN)**

5 µg de GST, de las proteínas de fusión GST–Dp71d, como control positivo y GST-Dp71f unidas a las perlas de Glutation-sefarosa fueron incubadas toda la noche con 500 µg de extractos totales de proteína de células HeLa a 4 °C en un buffer de interacción [50 mM Tris–HCl pH 8'0, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% (v/v) Triton X-100, 0.05% (w/v) SDS, complete1x, cocktail inhibidor de proteasas



(Roche Applied Science, Indianapolis, USA)]. Las perlas fueron recuperadas por centrifugación a 3500rpm a 4 °C y lavadas 3 veces con 500 µL de RIPA1X [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM MPMSF, 1% (v/v) Triton X-100]. Finalmente las proteínas fueron desacopladas de las perlas mediante el buffer Laemmli y calentadas a 95°C por 5min. La interacción de las proteínas fue analizada mediante SDS-PAGE e análisis de inmunodetección en fase sólida con la detección de los anticuerpos correspondientes.

## **7.6 Inmunodetección en fase sólida**

Para la detectar la proteína, se utilizaron 50µg de extracto total de proteínas correspondiente a cada una de las muestras, mientras que para los ensayos de “pull-down” se utilizaron 15µg. Se separaron en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%. Posteriormente, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 1 hora a 20V en una cámara semi-húmeda, empleando la solución amortiguadora de transferencia (25mM Tris-HCl pH 8.0, 192mM Glicina y 20% v/v de metanol). Enseguida, la membrana se tiñó con solución de Ponceau (SIGMA) y se destiñó con TBST (10mM de Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) de Tween-20, pH 7.4). Los sitios de unión no específicos presentes en las membranas de nitrocelulosa se bloquearon mediante su incubación con leche descremada al 15% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario disuelto en TBST-T durante 1 noche a 4°C (Tabla 2). Posteriormente, se realizaron lavados de 5, 10 y 15 minutos con la solución TBST y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-inmounoglobulinas específicas acopladas a peroxidasa) durante una hora a temperatura ambiente, y se realizaron nuevamente lavados de 5, 10 y 15 minutos con la solución TBS-T. Finalmente, las señales se revelaron con el sistema de detección ECL (Amersham Biosciences).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados y condiciones de uso (inmunodetección).

Anticuerpo primario ( toda la noche a 4°C)	Origen	Bloqueo	Dilución	Anticuerpo secundario (1 hora T.A)
<b>Anti-Emerina</b>	Conejo	Leche 15% 1 hora	1:4000	1:30,000
<b>Anti-Lamina B1</b>	Conejo	Leche 15% 1 hora	1:1000	1:30,000
<b>Anti-Imp B1</b>	Ráton	Leche 15% 1 hora	1:500	1:10,000
<b>Anti-GFP</b>	Conejo	Leche 15% 1 hora	1:1000	1:30,000

## 7.7 Extracción y purificación de plásmidos a baja y mediana escala

### 7.7.1 Obtención de DNA plasmídico a baja escala (MINIPREP)

En tubos de ensayo de 15ml se añadieron 3ml de medio Luria Bertani suplementado con el antibiótico de elección (100 µg/ml de ampicilina; 50 µg/ml de kanamicina) y se sembró una colonia bacteriana. El cultivo se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se transfirió 1.5ml del cultivo a un tubo de microfuga y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto. Se retiró el sobrenadante y se agregó 100µl de la solución de lisis (50mM glucosa, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0) al botón bacteriano, agitando la mezcla vigorosamente por inversión. Se agregaron 200µl de la solución II (0.2N de NaOH y 1% SDS) y se mezcló diez veces por inversión. El tubo se colocó en hielo y se adicionó 150µl de la solución III (60ml acetato de potasio 5M, 11.5ml de ácido acético glacial, y 28.5ml de agua desionizada), mezclando diez veces por inversión y dejando reposar la mezcla 5 minutos en hielo. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de microfuga y el DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto, dejando la mezcla reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente a 12,000rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se retiró por aspiración y al botón de DNA plasmídico se le añadió 1ml de etanol al 70%, se agitó con vortex y se centrifugó a 12,000 por 5 minutos. Enseguida, se removió el sobrenadante y el botón de DNA se disolvió con 30µl de solución amortiguadora TE pH 8.0 y se le adicionó 20µg/ml de RNasa. Finalmente, se observó el DNA plasmídico en un gel de agarosa al 1%.

### **7.7.2 Obtención de DNA plasmídico a mediana escala (MIDIPREP)**

Para realizar la purificación del plásmido a mediana escala, se siguió el protocolo establecido por el fabricante QIAGEN® plasmid Purification. El DNA obtenido se disolvió en solución amortiguadora TE pH 8.0, se cuantificó en el Nanodrop y se analizó su pureza mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución TBE (45mM Tris-Borato, 1mM EDTA).

### **7.8 Transfección**

Las células C2C12 se transfectaron con el vector correspondiente (ver Tabla 3), mediante la siguiente técnica: Se esterilizaron cubreobjetos de 20mm x 20mm, con alcohol y flama de mechero. Se cultivaron células HeLa a una confluencia de 60% y se dejaron incubando durante 24horas a 37°C en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%. En un primer tubo 1 se agregaron 4µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 100µl de medio DMEM libre de suero y antibióticos, y se dejaron incubando la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente. En un segundo tubo se diluyó 3.5µg de DNA en 100µl de medio DMEM libre de suero y antibióticos. Posteriormente, se mezcló el contenido del primer tubo con el del segundo tubo y se dejaron incubando por 30 minutos para permitir la formación de los complejos DNA-liposomas. A los cultivos celulares, se les cambió el medio de cultivo por medio fresco adicionado con suero y con antibióticos; y se les agregó los complejos DNA-liposomas por goteo; la preparación se dejó incubando durante 24horas a 37°C en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%.

### **7.9 Tratamiento con leptomicina B (LMB)**

Después de 12 horas de haber realizado la transfección de las células C2C12 (previamente descrita), se retira el medio y se adicionaron 250µl de medio DMEM con LMB (100nM) a cada cubreobjeto para dejarse incubando 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se fijaron y se tiñeron los núcleos con DAPI para su análisis en microscopía confocal. Para la proteína endógena se utilizó LMB 50 nM durante 24 horas.

### **7.10 Cuantificación de la fracción núcleo/citoplasma ( $F_{n/c}$ )**

El análisis de las imágenes digitalizadas por microscopía confocal se realizó utilizando el software Image j habilitado para determinar la fracción núcleo-citoplasma. La  $f_{n/c}$  fué calculada usando la ecuación  $f_{n/c}=(f_n-f_b)/(f_c-f_b)$  , en donde  $f_n$ ,  $f_b$  y  $f_c$  representan los valores de la fluorescencia nuclear, fondo y citoplasmáticos, respectivamente. Los resultados fueron analizados con la prueba estadística T-student (no pareada) y graficados utilizando el programa Graph Pad Prism 5.

### **7.11 Inmunofluorescencia indirecta**

Se esterilizaron cubreobjetos de 20mm x 20mm, con alcohol y flama de mechero. Las células a una confluencia de 80% se resuspendieron en 1ml de medio de cultivo y a cada cubreobjetos se les agregó 50 $\mu$ l de la suspensión celular y 200 $\mu$ l de medio de cultivo, y se incubaron por 24 horas a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se lavaron los cubreobjetos tres veces con PBS. Se fijaron las células con 200 $\mu$ l de paraformaldehído al 4% en PBS por 10 minutos. Enseguida, se lavaron tres veces con PBS. Posteriormente, las células se permeabilizaron con 200 $\mu$ l de Tritón-X100 AL 0.2% en PBS por 10 minutos, y se lavaron tres veces con PBS. Se realizó el bloqueo con gelatina al 0.5% y 1.5% de suero fetal bovino (SFB) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los cubre objetos bloqueados se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario (anti Importina  $\beta$ 1 1:50 en PBS) a 4°C durante toda la noche en cámara húmeda. Los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-ratón verde dilución 1:50 en PBS) durante una hora en cámara húmeda. Para teñir los núcleos celulares se adicionaron 50 $\mu$ l de una solución de DAPI a cada cubreobjetos (dilución de 1:500 en PBS a partir de un stock de 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l, SIGMA), y se dejaron incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, los cubreobjetos se enjuagaron cinco veces con PBS y 5 veces en agua respectivamente y se dejaron secar. En portaobjetos limpios se colocaron 8 $\mu$ l de Vectashield (Vector Laboratorios) y se les colocaron los cubreobjetos para

proceder con el sellado. Finalmente, las preparaciones se observaron mediante microscopía confocal.

### **7.12 Restricción enzimática de DNA**

En un tubo de microfuga de 0.6ml se colocaron 500ng de plásmido, 0.5µl de la enzima de restricción correspondiente, 1µl de la solución amortiguadora y se llevó a un volumen final de 10µl con agua desionizada. La reacción se dejó toda la noche a la temperatura recomendada para cada enzima. Los productos se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

### **7.13 Obtención de clonas mediante reacción de ligación**

En un tubo de microfuga de 0.6ml se agregaron 100ng de DNA plasmídico restringido, el fragmento de DNA (en relación molar 1:3), solución amortiguadora de ligación al 1X, 1.5U de ligasa T4 (Invitrogen), aforando la reacción a 20µl con agua desionizada. La reacción de ligación se incubó a 14°C toda la noche y se utilizó posteriormente para transformar a la cepa competente de *E. coli* DH5α

### **7.14 Transformación bacteriana**

En tubos microfuga de 1.5ml se colocaron 50µl de la suspensión de bacterias competentes, se adicionaron 200ng de DNA plasmídico y la mezcla se mantuvo en hielo por 30 minutos. Posteriormente, el cultivo se incubó a 42°C durante 90 segundos y se colocó en hielo por 2 minutos. Se adicionaron 800 µl de medio LB y se incubó a 37°C por 1 hora con agitación constante. Se tomaron 50 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 Ampicilina). Finalmente, las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

### **7.15 Amplificación por PCR**

En un volumen total de 40 µl se mezclaron 200ng del vector, 10picomoles de oligonucleótidos, 5 µl de solución amortiguadora de alta fidelidad, 2 µl de sulfato

de magnesio ( $MgSO_4$ ), 1.5 de dNTP's, y 0.3  $\mu l$  de taq platinum. La reacción se colocó en el termociclador utilizando el siguiente programa: un paso inicial de calentamiento a  $95^\circ C$  por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de  $95^\circ C$  por 30 segundos,  $55^\circ C$  por 30 segundos y  $72^\circ C$  por 1 minuto, finalizando con un ciclo de extensión de 7 minutos a  $72^\circ C$ .

## **7.16 Secuenciación automatizada de DNA**

### **7.16.1 Obtención de productos de extensión marcados para secuenciar**

En un volumen final de  $20\mu l$  se mezclaron  $1\mu g$  de DNA plasmídico, 20 picomoles de oligonucleótido específico,  $2\mu l$  de la reacción de secuenciación y  $2\mu l$  de la solución amortiguadora de ABI PRISM BigDye Terminador Cycle Sequencing 3.1 (Applied Biosystem). La reacción se colocó en el termociclador utilizando el siguiente programa: un paso inicial de calentamiento a  $96^\circ C$  por 1 minutos, seguido de 25 ciclos de  $96^\circ C$  por 10 segundos,  $50^\circ C$  por 5 segundos y  $60^\circ C$  por 4 minutos, finalizando con un ciclo de extensión de 1 minuto a  $60^\circ C$ .

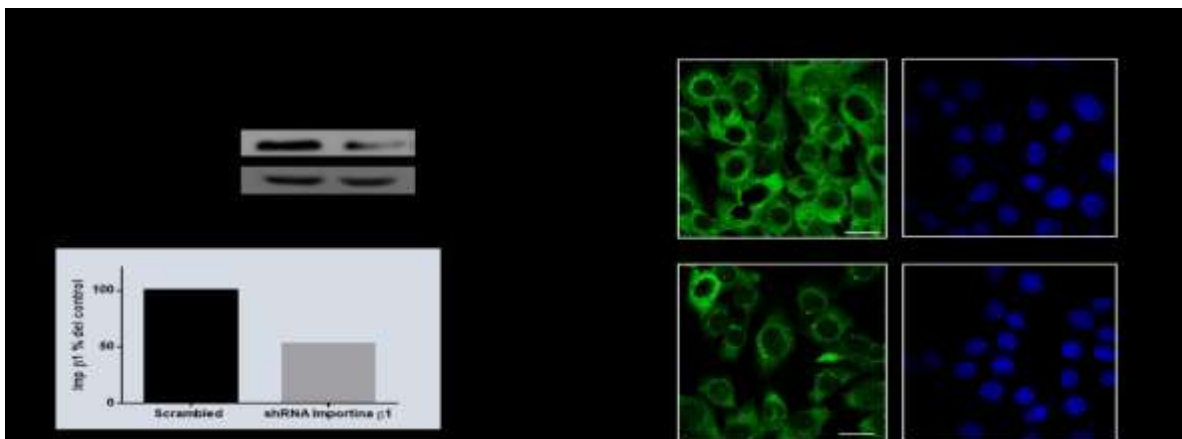
### **7.16.2 Purificación de los productos por precipitación con EDTA**

Al producto final de la reacción de PCR, se le agregaron  $5\mu l$  de EDTA 125mM y  $60\mu l$  de etanol absoluto, se mezcló la reacción y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Enseguida, se centrifugó a 10,000rpm durante 30 minutos a  $4^\circ C$ . Se retiró el sobrenadante y se adicionaron  $60\mu l$  de etanol al 70%. Se centrifugó a 10,000rpm por 10 minutos a  $4^\circ C$ . Se removió el sobrenadante y se secó en el generador de vacío por 5 minutos. El producto se cubrió de la luz y se envió a la Unidad de Ácidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular para su secuenciación.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 El Importe nuclear de la Dp71f es mediado por el sistema de importinas $\alpha 2$ y $\beta 1$

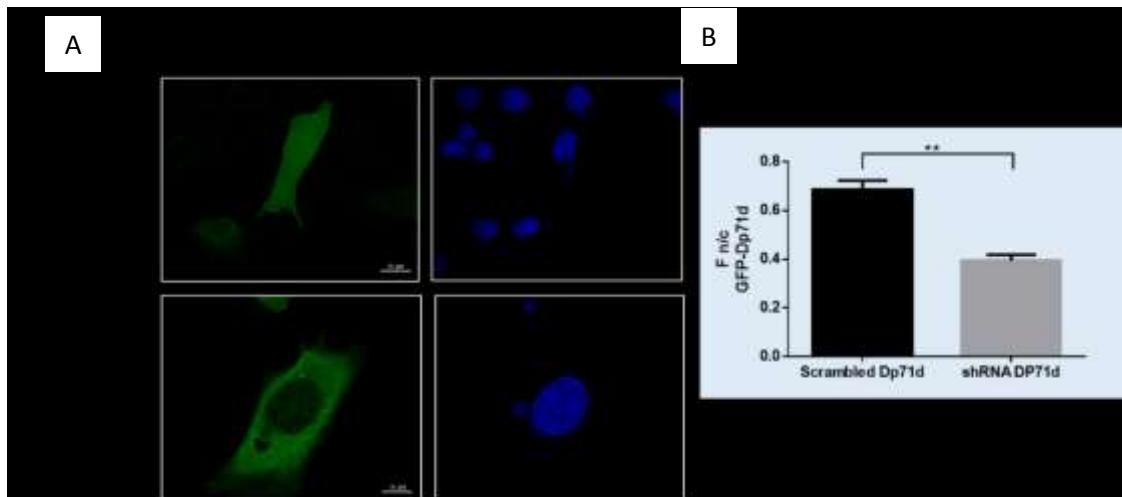
Decidimos analizar si el importe nuclear de la distrofina Dp71f es mediado por las importinas IMP $\alpha 2/\beta 1$ , ya que la isoforma Dp71d se transloca al núcleo a través del reconocimiento del dominio ZZ por parte de estas importinas, y la Dp71f también contiene este dominio en su secuencia. Se llevó a cabo un ensayo de silenciamiento de la Importina  $\beta 1$  mediante la transfección estable a las células C2C12 con el vector psi-mH1, el cual codifica para un shRNA que bloquea la traducción de la importina  $\beta 1$ , como control del experimento se transfectó un vector que codifica para un shRNA irrelevante. Después de 7 días de selección se realizaron ensayos de inmunodetección en fase sólida e inmunofluorescencia indirecta para analizar los niveles de la importina  $\beta 1$ , utilizando anticuerpos específicos para esta proteína y la detección de actina como control de carga. (Fig.14). Observamos una disminución de  $\sim 50\%$  en la cantidad de importina  $\beta 1$  (panel izquierdo) y una clara disminución de la intensidad de la fluorescencia, respecto a las células control.



**Fig 14 .- Silenciamiento de la importina  $\beta 1$ .** A) Se obtuvieron extractos totales de las células C2C12 transfectadas establemente con vectores que codifican para un shRNA contra la importina  $\beta 1$  o un shRNA irrelevante. Los extractos obtenidos después de 7 días de selección con puomicina se resolvieron mediante SDS-PAGE y se sometieron a un análisis por inmunodetección en fase sólida, utilizando un anticuerpos contra la importina  $\beta 1$  o actina (control) . Se observa la banda de 97 kDa que corresponde a la importina  $\beta 1$ . Se llevó a cabo la cuantificación correspondiente. B) Distribución subcelular de la importina  $\beta 1$  d en las C2C12 a través de inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal. Los niveles de la importina  $\beta 1$  se disminuyeron drásticamente por el tratamiento con un RNA interferente.

Posteriormente decidimos analizar si los bajos niveles de la importina  $\beta 1$  afectan el importe nuclear de la Dp71f, para lo cual transfectamos las células deficientes en la expresión de la importina  $\beta 1$  con un vector que expresa las proteínas recombinantes GFP-Dp71d (control positivo) y GFP-Dp71f.

La Dp71d depende del sistema de importinas para ser traslocada al núcleo (Suarez-Sánchez et al., 2014), por lo tanto, observamos de acuerdo a lo esperado que la GFP-Dp71d disminuye alrededor de un 40% sus niveles nucleares como consecuencia de la deficiencia de la importina  $\beta 1$  (Fig.15),



**Fig 15.- Localización subcelular de la proteína recombinante GFP-Dp71d en las células con deficiente expresión de la importina  $\beta 1$ .** A) Las células C2C12 deficientes en la expresión de la importina  $\beta 1$  se transfectaron con el vector que codifica para la proteína recombinante GFP-Dp71d y se analizaron posteriormente mediante microscopía confocal. Los núcleos se tiñeron con DAPI. B) Se cuantificó la fluorescencia presente en el núcleo y citoplasma (Fn/c) (n=200 células). La Dp71d pierde su localización nuclear debido a la deficiente expresión de la importina  $\beta 1$ .

Por lo que respecta al análisis de la Dp71f, fue necesario tratar a las células C2C12 deficientes en la expresión de la importina  $\beta 1$  con leptomicina B (LMB), un inhibidor específico de la exportina CRM1 [Girault and Matamales 2011], con la finalidad de acumular la Dp71f en el núcleo y poder discernir si su importe nuclear depende de la importina  $\beta 1$ . El tratamiento con la LMB acumuló a la GFP-Dp71f en el núcleo de las células que expresan un shRNA irrelevante; sin embargo, cuando se analizaron las células con expresión deficiente de la



importina  $\beta$ 1, la localización nuclear de la GFP-Dp71f disminuyó notoriamente a pesar del tratamiento con LMB (Fig.16), indicando que el importe nuclear de la distrofina Dp71f es mediado al igual que la Dp71d, por el sistema de importinas  $\alpha$ 2 y  $\beta$ 1.

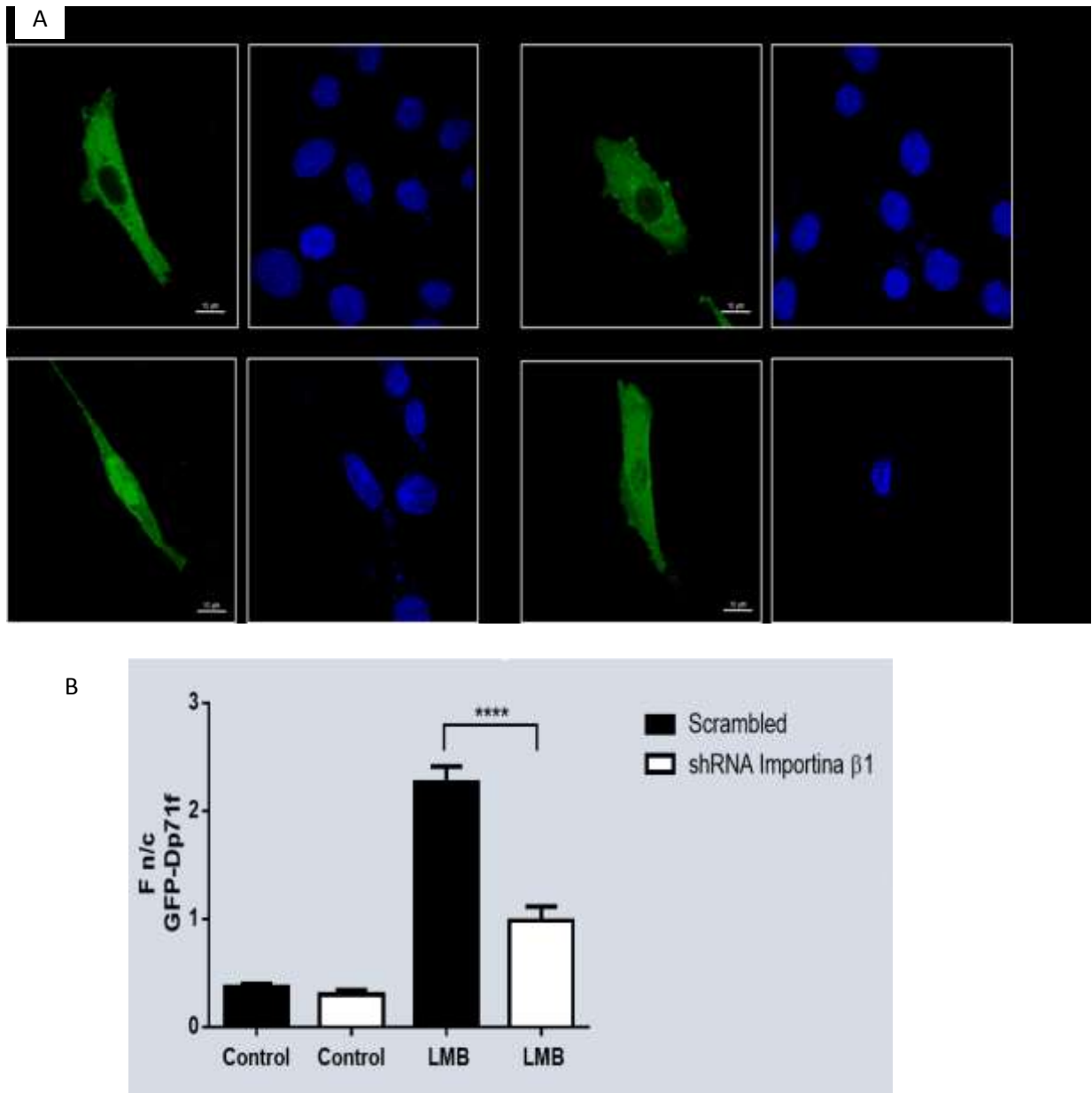
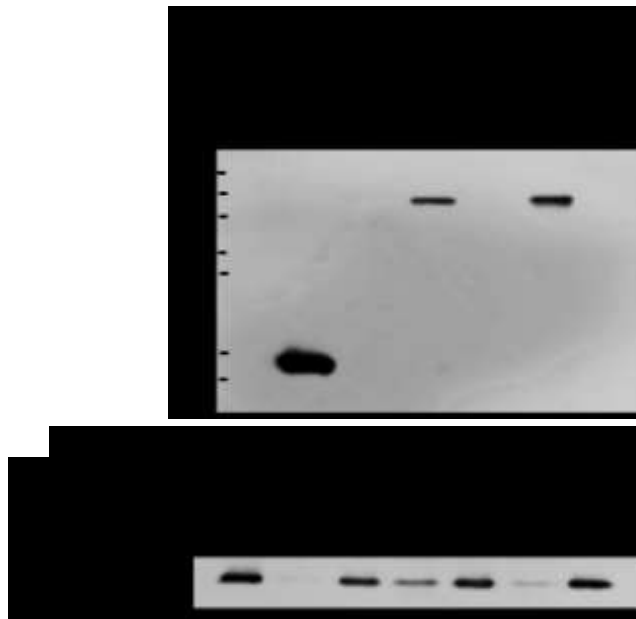


Fig 16.-**Distribución de la proteína recombinante GFP-Dp71f en las células deficientes en la expresión de la importina  $\beta$ 1** . A) Las células C2C12 deficientes en la expresión de la importina  $\beta$ 1 se transfectaron con el vector que codifica para la proteína recombinante GFP-Dp71f, se trataron con LMB durante 24 hrs y se analizaron posteriormente mediante microscopía confocal. Los núcleos se tiñeron con DAPI. B) Se cuantificó la fluorescencia presente en el núcleo y citoplasma (Fn/c) (n=200 células). La Dp71f disminuye su localización nuclear debido a la deficiente expresión de la importina  $\beta$ 1.

## 8.2 Interacción de la distrofina Dp71f con las proteínas de envoltura nuclear emerina y lámina B1

Con la finalidad de determinar si la distrofina Dp71f, al igual que la Dp71d, puede interactuar con proteínas de la envoltura nuclear, se realizaron ensayos de interacción tipo “pull-down”. Para lo cual expresamos y purificamos en un sistema bacteriano a las proteínas recombinantes GST, GST-Dp71d y GST-Dp71f (Fig. 17, panel superior); posteriormente las incubamos con perlas de glutation-sefarosa y enseguida con extractos totales de células HeLa. Las interacciones se analizaron posteriormente mediante inmunodetección en fase sólida. Como se puede observar, tanto la Dp71d como la Dp71f interactúan con la emerina (Fig.17 panel inferior); no obstante, la afinidad de la emerina por la Dp71d es aparentemente mayor que por la Dp71f.



**Fig 17.-La distrofina Dp71f interactúa con la emerina.** Se llevaron a cabo ensayos de interacción proteína-proteína tipo pull down. Se incubaron las proteínas GST (control negativo), GST-Dp71d (control positivo) y GST-Dp71f con perlas glutation-sefarosa y enseguida con extractos totales de células HeLa. Las perlas se recuperaron por centrifugación y las proteínas acarreadas se analizaron por inmunodetección en fase sólida, usando los anticuerpos respectivos. Panel superior, las proteínas GST, GST-Dp71d y GST-Dp71f se observaron mediante inmunodetección en fase sólida, utilizando un anticuerpo anti-GST. Panel inferior, la utilización de un anticuerpo anti-emerina reveló la unión de ambas, Dp71d y la Dp71f, con la emerina. Experimentos realizados por triplicado.

Así mismo, utilizando un anticuerpo anti-lamina B1 se evidenció la interacción de ambas isoformas (Dp71d y Dp71f) con la lámina B1 (Fig. 18). La nula interacción de GST (control negativo) con la emerina y la lamina B1 demuestra la especificidad del ensayo.



**Fig 18.- La distrofina Dp71f interactúa con la lámina B1.** Se llevaron a cabo ensayos de interacción proteína-proteína tipo pull down. Se incubaron las proteínas GST (control negativo), GST-Dp71d (control positivo) y GST-Dp71f con perlas glutation-sefarosa y enseguida con extractos totales de células HeLa. Las perlas se recuperaron por centrifugación y las proteínas acarreadas se analizaron por inmunodetección en fase sólida, usando los anticuerpos respectivos. Panel superior, las proteínas GST, GST-Dp71d y GST-Dp71f se observaron mediante inmunodetección en fase sólida, utilizando un anticuerpo anti-GST. Panel inferior, la utilización de un anticuerpo anti-lamina B1 reveló la unión de ambas, Dp71d y la Dp71f, con la lámina B1. Experimentos realizados por triplicado.

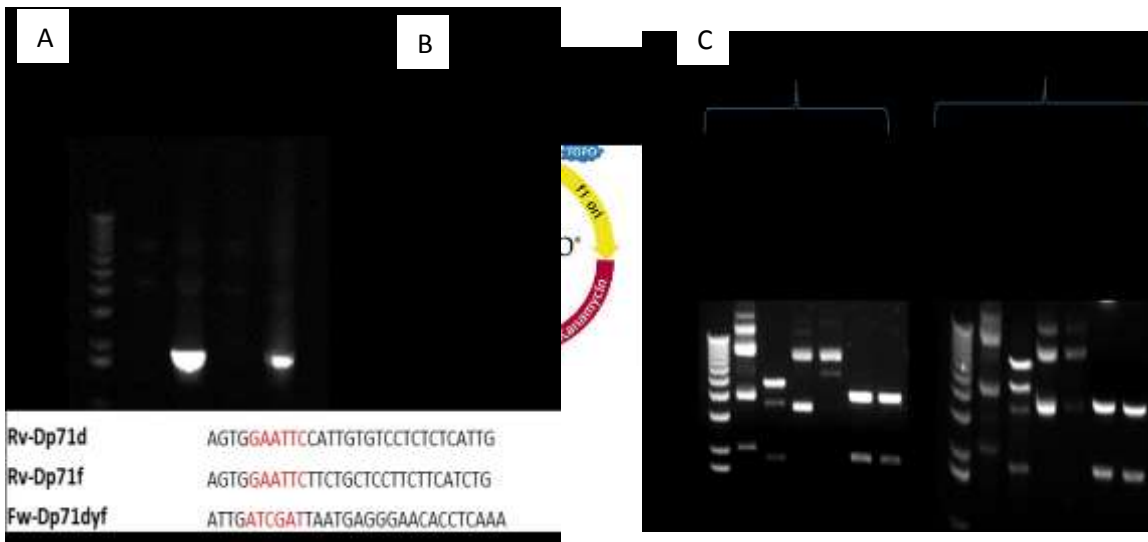
### 8.3 Expresión de las proteínas recombinantes Dp71d-GFP y Dp71f-GFP en un sistema bacteriano

Un objetivo importante del presente estudio es la identificación de los mecanismos moleculares que definen la distribución diferencial de las isoformas Dp71f y Dp71d. Tomando en consideración que ambas isoformas se transportan hacia el núcleo y tienen la capacidad de interactuar con proteínas de la envoltura nuclear, tenemos la hipótesis de que la Dp71f tiene un exporte nuclear más eficiente que la Dp71d, lo que finalmente creemos que determina que su

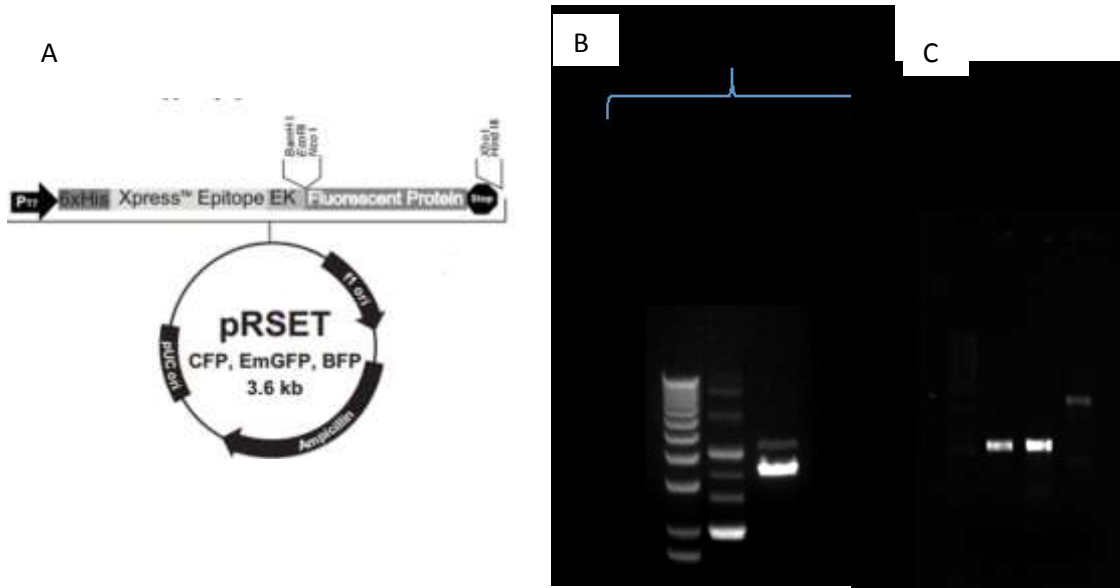
distribución final sea exclusivamente citoplasmática. Para probar esta hipótesis hemos diseñado una estrategia experimental para analizar comparativamente la cinética de importe y exporte nuclear de ambas isoformas. La estrategia consiste en expresar en bacteria las proteínas recombinantes Dp71d-GFP y Dp71f-GFP y posteriormente microinyectarlas en el núcleo o en el citoplasma de las células HeLa para seguir su tráfico intracelular mediante microscopia en tiempo real. Como primer paso nos avocamos a la construcción de los vectores de expresión bacteriana que generarán las proteínas recombinantes mencionadas anteriormente.

Se amplificó por PCR el fragmento de DNA que corresponde al cDNA de las distrofinas Dp71d y Dp71f (Fig.19, panel A; 1815 pb y 1869 pb respectivamente), utilizando como molde vectores que contienen cada una de las dos secuencias unidas a GST [Suárez et.al., 2014]. El producto de PCR se ligó al vector de tránsito pCR2.1-TOPO (Fig.19, panel B) y la mezcla de la ligación se transformó en la cepa bacteriana *E. coli* Dam- (debido a que el sitio de restricción ClaI se metila). De las bacterias transformantes se eligió una candidata para extracción de DNA plasmídico y corte doble con las enzimas de restricción EcoRI y ClaI; así demostramos la presencia de los fragmentos de interés correspondientes a la Dp71d (1815 pb) y la Dp71f (1869 pb) (Fig 19, panel C). Por otra parte, el vector receptor pRSET GFP (Fig. 20, panel A) se linearizó con las mismas enzimas, EcoRI y ClaI (Fig. 20, panel B) para proceder con la ligación de los fragmentos de cDNA amplificados previamente (Fig. 20, panel C). La mezcla de ligación se transformó en la cepa bacteriana *E. coli* Dam (-) y se examinaron 2 colonias candidatas de cada construcción mediante corte con la enzima EcoRI (Fig. 21, panel A) y posteriormente se tomó un solo candidato para someterlo a restricción con la enzima ClaI y corroborar el peso esperado de las fusiones genéticas, 5415 pb para Dp71d-GFP y 5460 pb para Dp71f-GFP (Fig. 21, panel B). Finalmente se

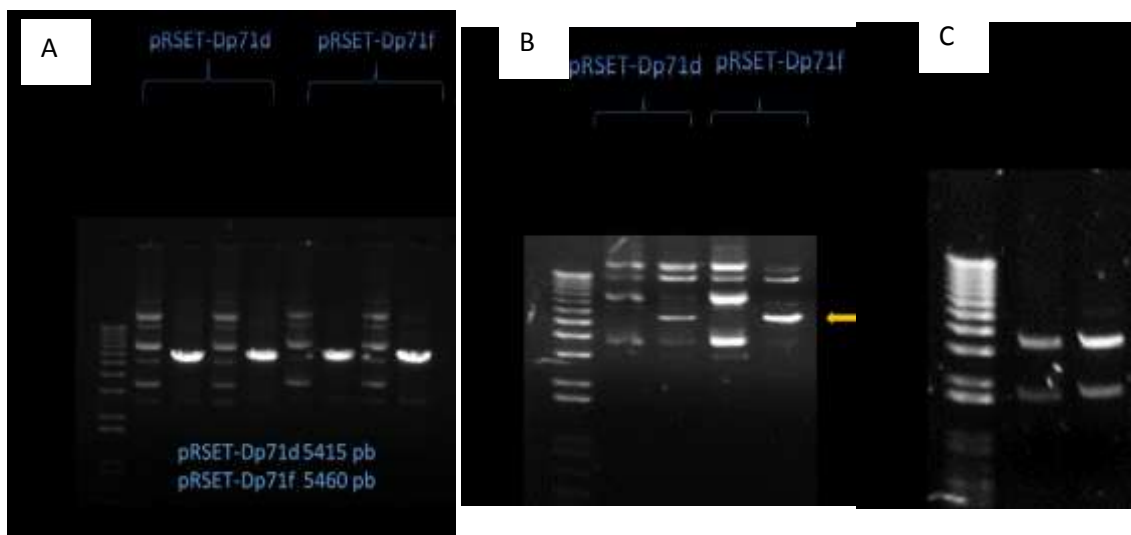
hizo una doble restricción para liberar los fragmento esperados para pRSET (3600pb), Dp71d-GFP (1815 pb) y Dp71f-GFP (1860 pb) (Fig. 21, panel C).



**Fig 19. Clonación del cDNA de las isoformas Dp71d y Dp71f en un vector de tránsito.** A) Amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA que corresponden a la Dp71d, 1815pb, y Dp71f, 1860pb (carril 3 y 4). MP, marcador de peso molecular. En la parte se muestran la secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de ambos cDNAs. B) Esquema del vector de tránsito pCR2.1-TOPO. C) Las colonias candidatas de ambas construcciones se analizaron mediante doble restricción con las enzimas EcoRI y ClaI (carriles con el número 7). Ctl (+), plásmidos conocidos que tienen clonadas las secuencias de la Dp71d y la Dp71f; s/c, sin digestión. Los fragmentos se visualizaron en geles de agarosa al 1%.



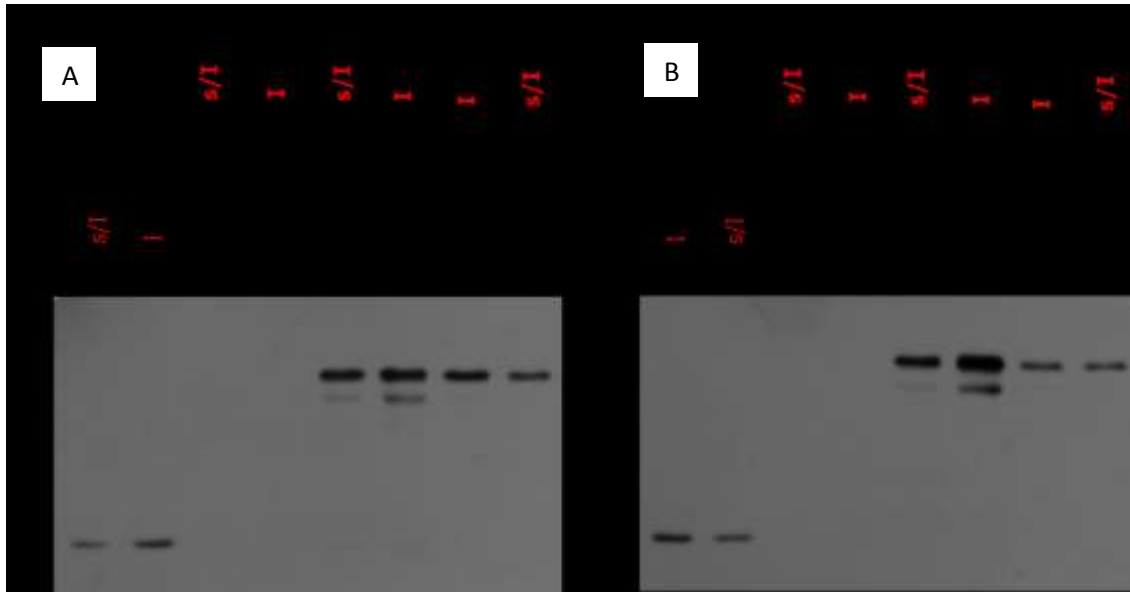
**Fig. 20. Restricción y purificación del vector pRSET-GFP y de los fragmentos de cDNA de las isoformas Dp71d y Dp71f.** A) Esquema del vector de expresión pRSET-GFP. B) Se muestra el vector pRSET-GFP restringido con EcoRI y ClaI(carril 3). C) Se muestran los fragmentos purificados del DNA de las isoformas Dp71d, Dp71f (carril 2 y 3 respectivamente) y del vector pRSET-GFP. MP, marcador de peso molecular, S/c, sin digestión. Los fragmentos se visualizaron en geles de agarosa al 1%.



**Fig 21. Construcción de los vectores de expresión bacteriana pRSET-DP71d y pRSET-Dp71f.** A) Dos colonias candidatas de cada construcción se analizaron mediante restricción con la enzima EcoRI. B) Se eligió la candidata 1 de cada construcción y se restringió con Clal (Se muestra con una flecha los pesos esperados). C) Confirmación de la identidad de las colonias por doble restricción con las enzimas EcoRI y Clal. Tamaños esperados: pRSET-GFP, 3600pb; Dp71d, 1815pb y Dp71f, 1860pb. MW, marcador de tamaño. Los fragmentos se visualizaron en geles de agarosa al 1%.

### 8.3.1 Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes Dp71d-GFP y Dp71f-GFP en bacteria.

Para comprobar la expresión en bacterias de las proteínas fusión de Dp71d-GFP y Dp71f-GFP, se realizaron experimentos de inducción con IPTG (0.3mM) en diferentes cepas de *E. coli*: BL21 C43 (deficiente en la expresión de las proteasas OmpT y Lon; BL21 codon plus, contiene copias adicionales de genes que codifican para tRNA's que limitan la traducción de proteínas y JM109, cepa que empíricamente se ha demostrado que expresa niveles altos de proteínas eucariontas. La inducción se realizó a 16°C por una hora para reducir la degradación de las proteínas de fusión. Observamos que la expresión de la GFP ocurre con y sin inducción con IPTG, lo que indica que la represión del operador lac es deficiente, quizá debido a que el vector pRSET solo tiene una copia del operador lac [Oehler S, et. al., 1990]. Encontramos que la cepa BL21 codon plus fue la más eficiente para la producción de las proteínas recombinantes Dp71d-GFP y la Dp71f-GFP (Fig. 22 , panel A y B).



**Fig 22.- Expresión de las proteínas recombinantes Dp71d-GFP y Dp71f-GFP.** Los extractos de proteínas obtenidos de las diferentes cepas de *E. coli* se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunodetección en fase sólida con el anticuerpo anti-GFP. A) carriles 1 y 2, control; carriles 3 y 4, cepa BL21 C43; carriles 4 y 5, cepa BL21 codon plus; carriles 6 y 7 cepa JM109. s/l, sin inducción; I, inducción con IPTG.

## 9. DISCUSIÓN

---

Las distrofinas Dp71d y Dp71f difieren únicamente en una fracción de su extremo carboxilo terminal, sin embargo se localizan en diferentes compartimentos celulares; la Dp71d se localiza principalmente en el núcleo mientras que la Dp71f es una proteína exclusivamente citoplásmica (Gonzalez et al 2000). Además, se ha demostrado que la diferenciación neuronal regula diferencialmente la expresión y localización subcelular de estas isoformas [Yu et. al., 1999; Jans et. al., 2000; Marquez et. al., 2003].

Estudios previos de nuestro equipo de trabajo demostraron que la isoforma Dp71d es transportada al núcleo mediante el reconocimiento de su secuencia de importe nuclear (NLS) localizado en el dominio ZZ, por el sistema de importinas IMP $\alpha$ 2/ $\beta$ 1; así mismo revelamos que esta proteína tiene la habilidad de ser exportada del núcleo hacia el citoplasma mediante la acción de la exportina CRM1, la cual reconoce una secuencia de exporte nuclear localizada en el extremo C-terminal de la proteína (Suarez-Sanchez et al., 2014). Tomando en consideración que la Dp71d y la Dp71f comparten el dominio ZZ, hipotetizamos que la Dp71f podría tener también un mecanismo de importe nuclear mediado por importinas, pero tendría que pasar por el núcleo de forma transitoria para regresar al citoplasma, donde se localiza finalmente. Para probar esta idea, nuestro laboratorio trató las células HeLa con un inhibidor del exporte nuclear mediado por la exportina CRM1, el fármaco LMB. De manera interesante, la Dp71f se acumula en el núcleo, lo que demuestra que en verdad esta proteína tiene un mecanismo de importe nuclear.

Por lo tanto, uno de los objetivos de este trabajo fue la caracterización del mecanismo de importe nuclear de la Dp71f. Para probar si el importe nuclear de la Dp71f depende del sistema de importinas IMP $\alpha$ 2/ $\beta$ 1, se disminuyó la expresión de la importina  $\beta$ 1 con un shRNA específico (la importina  $\beta$ 1 se une a la importina  $\alpha$ 2 para llevarse a cabo el importe activo de proteínas a través del poro nuclear [Wagstaff and Jans, 2009], y posteriormente se trataron las células con LMB, para inhibir el exporte nuclear y acumular a la Dp71f en el núcleo. Con esta



estrategia encontramos que la acumulación nuclear de la Dp71f es menor en las células con expresión deficiente de la importina  $\beta$ 1, en comparación con las células que expresan un shRNA irrelevante, lo que implica que la Dp71f requiere de la importina  $\beta$ 1 para su importe nuclear.

Si ambas isoformas se importan al núcleo deben existir mecanismos diferenciales que determinen el destino nuclear de la Dp71d y citoplásmico para la Dp71f. Estas isoformas difieren únicamente por los 31 aminoácidos extras de carácter hidrofóbico que contiene la Dp71f; por lo tanto, es probable que esta secuencia corta contenga la señal que define la localización citoplásmica de esta proteína. En apoyo a esta idea, nuestro grupo demostró previamente que la Dp71f tiene un exporte nuclear más eficiente que la Dp71d, debido a que posee dos NESs funcionales en su región del carboxilo terminal, mientras que la Dp71d contiene solo una NES. Para completar esta parte del estudio, tenemos planeado realizar un estudio comparativo de las cinéticas de importe y exporte nuclear de las isoformas Dp71d y Dp71f, mediante la microinyección de proteínas recombinantes Dp71f-GFP y Dp71d-GFP y el posterior análisis de su tráfico intracelular. En este trabajo construimos los vectores de expresión bacteriana para ambas proteínas recombinantes y demostramos que las podemos expresar eficientemente en la cepa de *E. coli* BL21 codon plus.

Alternativamente, es posible que la Dp71d pero no la Dp71f, se localice permanentemente en el núcleo mediante las interacciones que establece con proteínas de la envoltura nuclear (Fuentes-Mera, et. al., 2003; Suarez-Sanchez et al., 2014), lo que implica que la Dp71f no tiene la habilidad para establecer dichas asociaciones. Sin embargo, en este estudio demostramos que la Dp71f si es capaz de interactuar con la lámina B1 y la emerina; no obstante, la interacción de la emerina con la Dp71d tiene mayor afinidad que con la Dp71f. Es necesario realizar ensayos de interacción más precisos que permitan calcular la constante de afinidad que tiene la interacción de cada isoforma con las proteínas de la envoltura nuclear.

Una interrogante importante que persiste es el posible significado biológico del paso transitorio de la Dp71f por el núcleo. Es posible que la Dp71f actúe como accreadora de moléculas entre el núcleo y el citoplasma; sin embargo, se necesitan diseñar experimentos específicos para probar esta hipótesis.

## 10. CONCLUSIONES

---

- El importe nuclear de la distrofina Dp71f depende de la importina  $\beta$ 1.
- La distrofina Dp71f interacciona con las proteínas de envoltura nuclear, emerina y lamina B1.

## 11. PERSPECTIVAS

---

- Analizar la constante de afinidad de la interacción de las isoformas Dp71d y Dp71f con las proteínas de envoltura nuclear, emerina y lámina B1.
- Analizar la cinética de importe y exporte nuclear de las proteínas Dp71d y Dp71f.
- Identificar la función del paso transitorio de la Dp71f por el núcleo.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Akhtar A, Gasser SM. 2007. The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* 8: 507–517.
2. Austin RC, Morris GE, Howard PL, Klamut HJ, Ray PN (2000) Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscul Disord* 10(3):187–193
3. Austin, P.L. Howard, V.N. D'Souza, H.J. Klamut, P.N. Ray, Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71, *Hum. Mol. Genet.* 4 (1995) 1475–1483.
4. Baliga, P.A. Colussi, S.H. Read, M.M. Dias, D.A. Jans, S. Kumar, Role of prodomain in importin-mediated nuclear localization and activation of caspase-2, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4899–4905.
5. Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U (1990) A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J* 272(2):557–560
6. Beck M, Forster F, Ecke M, Plitzko JM, Melchior F, Gerisch G, BaumeisterW, Medalia O. 2004. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* 306: 1387–1390.
7. Beck M, Lucic V, Forster F, BaumeisterW, Medalia O. 2007. Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography. *Nature* 449: 611–615.
8. Bengtsson L, Wilson KL. 2004. Multiple and surprising new functions for emerin, a nuclear membrane protein. *Curr Opin Cell Biol* 16: 73–79.
9. Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS (1992) Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic Acids Res* 20(7):1725– 1731
10. Blake DJ, Love DR, Tinsley J, Morris GE, Turley H, Gatter K, Dickson G, Edwards YH, Davies KE (1992) Characterization of a 4.8 kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells. *Hum Mol Genet* 1(2):103–109
11. Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE, Winder SJ, Kendrick-Jones J (1995) Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* 20:133–135
12. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE (2002) Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82(2):291–329. doi:10.1152/physrev.00028.2001
13. Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1995;82:734-
14. Calderilla-Barbosa, A. Ortega, B. Cisneros, Phosphorylation of dystrophin Dp71d by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II modulates the Dp71d nuclear localization in PC12 cells, *J. Neurochem.* 98 (2006) 713–722.
15. Carlson CG. The dystrophinopathies: an alternative to the structural hypothesis. *Neurobiol Dis.* 1998 Jul;5(1):3-15.
16. Ceccarini M, Rizzo G, Rosa G, Chelucci C, Macioce P, Petrucci TC (1997) A splice variant of Dp71 lacking the syntrophin binding site is expressed in early stages of human neural development. *Brain Res Dev Brain Res* 103(1):77–82

17. Ceccarini, G. Rizzo, G. Rosa, C. Chelucci, P. Macioce, T.C. Petrucci, A splice variant of Dp71 lacking the syntrophin binding site is expressed in early stages of human neural development, *Dev. Brain Res.* 103 1997. 77–82.
18. Cisneros, A. Rendon, V. Genty, G. Aranda, F. Marquez, D. Mornet, C. Montanez, Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation, *Neurosci. Lett.* 213 1996. 107–110.
19. Crosbie RH, Barresi R, Campbell KP. Loss of sarcolemma n-NOS in sarcoglycan-deficient muscle. *FASEB* 2002;16:1786-91.
20. D'Angelo MA, Hetzer MW. 2008. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol* 18: 456–466.
21. Daniele N, Richard I, Bartoli M (2007) Ins and outs of therapy in limb girdle muscular dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol* 39 (9):1608–1624. doi:10.1016/j.biocel.2007.02.005
22. de León MB1, Montañez C, Gómez P, Morales-Lázaro SL, Tapia-Ramírez V, Valadez-Graham V, Recillas-Targa F, Yaffe D, Nudel U, Cisneros B.(2005) Dystrophin Dp71 expression is downregulated during myogenesis: role of Sp1 and Sp3 on the Dp71 promoter activity. *J Biol Chem* 280(7):5290–5299. doi:10.1074/jbc.M411571200
23. Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD. 2008. Nuclear lamins: Major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* 22: 832–853.
24. Feener CA, Koenig M, Kunkel LM (1989) Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338(6215):509–511. doi:10.1038/338509a0
25. Garcia-Tovar, A. Perez, J. Luna, R. Mena, B. Osorio, V. Aleman, R. Mondragon, D. Mornet, A. Rendon, J.M. Hernandez, Biochemical and histochemical analysis of 71 kDa dystrophin isoform (Dp71f) in rat brain, *Acta Histochem.* 103 (2001) 209–224.
26. Gonzalez E, Montanez C, Ray PN, Howard PL, Garcia-Sierra F, Mornet D, Cisneros B (2000) Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Lett* 482(3):209–214. doi:S0014579300020445
27. Grady RM1, Zhou H, Cunningham JM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin--glycoprotein complex. *Neuron.* 2000 Feb;25(2):279-93.
28. Gruenbaum Y, Wilson KL, Harel A, Goldberg M, Cohen M. 2000. Review: nuclear lamins—structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol* 129: 313–323.
29. Hatayama, T. Tomizawa, K. Sakai-Kato, P. Bouvagnet, S. Kose, N. Imamoto, S. Yokoyama, N. Utsunomiya-Tate, K. Mikoshiba, T. Kigawa, J. Aruga, Functional and structural basis of the nuclear localization signal in the ZIC3 zinc finger domain, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) 3459–3473.
30. Heilman, J.G. Teodoro, M.R. Green, Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies, *J. Virol.* 80 (2006) 7535–7545.
31. Hetzer M, Walther TC, Mattaj IW. 2005. Pushing the envelope: Structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 367–380.
32. Hnia K., Zouiten D., Cantel S., Chazalotte D., Hugon G., Fehrentz J. A., et al. (2007). ZZ domain of dystrophin and utrophin: topology and mapping of a - dystroglycan interaction site. *The Biochemical journal* , 401(3), 667-677.
33. Holder, M. Maeda, R.D. Bies, Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain, *Hum. Genet.* 97 1996. 232–239.

34. Howard PL, Dally GY, Wong MH, Ho A, Weleber RG, Pillers DA, Ray PN (1998) Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Hum Mol Genet* 7 (9):1385–1391. doi:ddb193
35. Hubner, C.Y. Xiao, D.A. Jans, The protein kinase CK2 site (Ser111/112) enhances recognition of the simian virus 40 large T-antigen nuclear localization sequence by importin, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17191–17195.
36. Hugnot JP, Gilgenkrantz H, Vincent N, Chafey P, Morris GE, Monaco AP, Berwald-Netter Y, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A et al (1992) Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(16):7506–7510
37. Imamura, E. Ozawa, Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 1998. 6139–6144.
38. Jans, C.Y. Xiao, M.H. Lam, Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* 22 (2000) 532–544.
39. Joel Cerna, Doris Cerecedo, Arturo Ortega, Francisco García-Sierra, Federico Centeno, Efrain Garrido, Dominique Mornet, Bulmaro Cisneros. Dystrophin Dp71f Associates with the  $\beta$ 1-Integrin Adhesion Complex to Modulate PC12 Cell Adhesion. *Journal of Molecular Biology*, 362, Oct 2006, 954–965
40. Kanagawa M1, Toda T.. Epub 2006 Sep 13. The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis; *J Hum Genet.* 2006;51(11):915-26
41. Kimura, K. Abe, M. Suzuki, M. Ogawa, K. Yoshioka, K. Yamamura, T. Miike, 2.1 kb 5X-flanking region of the brain type dystrophin gene directs the expression of lacZ in the cerebral cortex, but not in the hippocampus, *J. Neurol. Sci.* 147 1997. 13–20.
42. Kite GL. 1913. The relative permeability of the surface and interior portions of the cytoplasm of animal and plant cells. *Biol Bull* 25: 1–7.
43. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H et al (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45(4):498–506
44. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM (1987) Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50 (3):509–517.
45. Kong J1, Anderson JE. Dystrophin is required for organizing large acetylcholine receptor aggregates. *Brain Res.* 1999 Aug 28;839(2):298-304.
46. Kramarcy NR, Vidal A, Froehner SC, Sealock R (1994) Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M(r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin). *J Biol Chem* 269(4):2870–2876
47. Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U (1992) A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(12):5346– 5350
48. Lidov, L.M. Kunkel, Dp140: alternatively spliced isoforms in brain and kidney, *Genomics* 45 1997. 132–139.
49. Lizeth Fuentes-Mera, Rafael Rodríguez-Muñoz, Ricardo González-Ramírez, Francisco García-Sierrab, Everardo González, Dominique Mornet, Bulmaro Cisneros. 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. (2006). *Experimental Cell Research* 312, Oct 2006, 3023–3035
50. Lumeng, M. Hauser, V. Brown, J.S. Chamberlain, Expression of the 71 kDa dystrophin isoform Dp71. evaluated by gene targeting, *Brain Res.* 830 1999. 174–178.
  51. Marquez, B Cisneros, F Garcia, V Ceja, F Velázquez, F Depardón, L Cervantes, A Rendón, D Mornet, H Rosas-vargas, M Mustre, C Montañez. Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience*, 118, June 2003, 957–966.
  52. Meier T1, Ruegg MA. The Role of Dystroglycan and Its Ligands in Physiology and Disease. *News Physiol Sci.* 2000 Oct;15:255-259.
  53. Morales-Lazaro SL, Gonzalez-Ramirez R, Gomez P, Tapia-Ramirez V, de Leon MB, Cisneros B (2010) Induction of dystrophin Dp71 expression during neuronal differentiation: opposite roles of Sp1 and AP2alpha in Dp71 promoter activity. *J Neurochem* 112(2):474–485. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06467.x
  54. Oehler S, Eismann ER, Krämer H, Müller-Hill B. 1990. The three operators of the lac operon cooperate in repression
  55. Pemberton, B.M. Paschal, Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export, *Traffic* 6 (2005) 187–198.
  56. Pilgram GS1, Potikanond S, Baines RA, Fradkin LG, Noordermeer JN. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Mol Neurobiol.* 2010 Feb;41(1):1-21. doi: 10.1007/s12035-009-8089-5. Epub 2009 Nov 9.
  57. Ponting C. P., Blake D. J., Davies K. E., Kendrick-Jones J. & Winder S. J. (1996). ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends in Biochemical Sciences* , 21 (1), 11-13.
  58. Reddy KL, Zullo JM, Bertolino E, Singh H. 2008. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 452: 243–247.
  59. Reddy KL, Zullo JM, Bertolino E, Singh H. 2008. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 452: 243–247.
  60. Rentschler S., Linn H., Deininger K., Bedford M. T., Espanel X. & Sudol M. (1999). The WW Domain of Dystrophin Requires EF-Hands Region to Interact with -Dystroglycan. *Biological Chemistry* , 380 (4), 431-442.
  61. Roberts R. G. (2001). Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biology*, 2 (4), Epub.
  62. Rodríguez-Muñoz, Marcela Villarreal-Silva, Ricardo González-Ramírez, Francisco García-Sierra, Mónica Mondragón, Ricardo Mondragón, Joel Cerna, Bulmaro Cisneros. Neuronal differentiation modulates the dystrophin Dp71d binding to the nuclear matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375, Oct 2008, 303–307.
  63. Roth, G.W. Moseley, D. Glover, C.W. Pouton, D.A. Jans, Amicrotubule-facilitated nuclear import pathway for cancer regulatory proteins, *Traffic* 8 (2007) 673–686
  64. Sadoulet-Puccio, L.M. Kunkel, Dystrophin and its isoforms, *Brain Pathol.* 6 1996. 25–35.
  65. Sander M, Chavoshan B, Harris SA, et al. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13818-23.
  66. Sarig, V. Mezger-Lallemand, I. Gitelman, C. Davis, O. Fuchs, D. Yaffe, U. Nudel, Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development, *Hum. Mol. Genet.* 8 1999. 1–10.



67. Schofield, D.J. Blake, C. Simmons, G.E. Morris, J.M. Tinsley, K.E. Davies, Y.H. Edwards, Apo-dystrophin-1 and apo-dystrophin- 2, products of the Duchenne muscular dystrophy locus: expression during mouse embryogenesis and in cultured cell lines, *Hum. Mol. Genet.* 3 1994. 1309–1316.
68. Suzuki A, Yoshida M, Hayashi K, Mizuno Y, Hagiwara Y, Ozawa E (1994) Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin
69. Tran EJ, Wente SR. 2006. Dynamic nuclear pore complexes: Life on the edge. *Cell* 125: 1041–1053.
70. Vásquez-Limeta A, Wagstaff KM, Ortega A, Crouch DH, Jans DA, et al. (2014) Nuclear Import of  $\beta$ -Dystroglycan Is Facilitated by Ezrin-Mediated Cytoskeleton Reorganization. *PLoS ONE* 9(3): e90629. doi: 10.1371/journal.pone.0090629.
71. Vlcek S, Foisner R. 2007. Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease. *Curr Opin Cell Biol* 19: 298–304.
72. Watson ML. 1955. The nuclear envelope; its structure and relation to cytoplasmic membranes. *J Biophys Biochem Cytol* 1: 257–270.