

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

Departamento de Genética y Biología Molecular

Los niveles nucleares del β -dístroglicano, son regulados por los mecanismos de exporte nuclear y degradación proteosomal para mantener la estructura y función del núcleo

Tesis que presenta

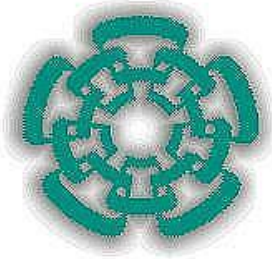
M. en C. Griselda Vélez Aguilera

**para obtener el Grado de
Doctora en Ciencias**

**en la Especialidad de
Genética y Biología Molecular**

Director de la Tesis:

Dr. Bulmaro Cisneros Vega



**CENTER FOR RESEARCH AND ADVANCED STUDIES
OF THE NATIONAL POLYTECHNIC INSTITUTE**

Unit Zacatenco

Department of Genetic and Molecular Biology

The nuclear levels of β -dystroglycan are regulated by nuclear export and proteosomal degradation mechanisms to maintain the structure and function of the nucleus

By:

M. in Sc. Griselda Vélez Aguilera

as the fulfillment of the requirement

for the degree of:

Doctor in Science

Specialization

Genetic and Molecular Biology

Advisor:

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Mexico City

December

2017

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), el cual se encargó del financiamiento económico a través del otorgamiento de la beca con número de registro 243153.

AGRADECIMIENTOS

Al CINVESTAV por ser una Institución de Excelencia y darme la oportunidad de realizar mis Estudios de Posgrado.

Al Departamento de Genética y Biología Molecular por aceptarme en su Programa de Doctorado y por todo el aprendizaje y enriquecimiento.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega, por darme la oportunidad de pertenecer a su excelente grupo de Laboratorio depositando toda su confianza, apoyo, paciencia, exigencia, motivación y vocación por la Ciencia, y principalmente, por su valiosa contribución a mi formación académica al fungir como el Tutor del presente Proyecto.

Al Dr. Steve Winder de la Universidad de Sheffield por su apreciable colaboración, comentarios, revisiones y sugerencias que sin duda contribuyeron a mejorar el presente Proyecto.

A mis Asesores de Tesis: el Dr. Efraín Garrido Guerrero, Dr. Jaime García Mena, Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado y al Dr. Oscar Hernández Hernández por su valiosa contribución y su compromiso a lo largo del Proyecto.

Al Auxiliar de Investigación del Laboratorio Biól. Pablo Gómez Islas por toda la disposición y apoyo para que se pudiera llevar el Proyecto exitosamente.

A los Técnicos de Investigación: Sr. Antonio q.e.p.d., al Sr. Víctor Tapia Ramírez y Verónica Tapia por toda su confianza, trabajo y su valioso apoyo con el material para poder llevar a cabo los experimentos.

A la Dra. Alejandra Vásquez Limeta por enseñarme la mayoría de las técnicas que utilicé en el presente Proyecto, y por transmitirme todo ese conocimiento y dedicación a la Ciencia.

Al M. en C. Juan de Dios Gómez López por su valiosa contribución al Proyecto enriqueciéndolo, por creer y comprometerse hasta el final.

A todos los alumnos y exalumnos del Laboratorio 12 que tuve el privilegio de conocer y de compartir día a día el trabajo en el laboratorio, gracias por su valiosa

amistad y compañerismo, por los momentos memorables, enseñanzas y contribuciones al Proyecto y a mi formación como estudiante: Pris, Ivette, Ale, Rocío Suarez, Areli, Rocío Rodriguez, José, Lea, Marco, Viri, Martha, Pau, Juan de Dios, Wendy, Ricardo, Ruth q.e.p.d., Naty, Ari, Nely, Eli, Iván, Ian, Mau, Elianeth y Chano.

A dos personas del Laboratorio que desafortunadamente ya no se encuentran con nosotros el Sr. Toño y Ruth q.e.p.d., sin duda dejaron huella en mí, gracias por transmitirme todas esas ganas de trabajar y esa alegría.

A mis compañeros y amigos de Generación por todos los momentos compartidos, ya que sin duda estudiar en el CINVESTAV no hubiera sido lo mismo sin ustedes. En especial a Salma, Diana, Víctor, Gloria y Jenny.

A la Secretaria del Departamento de Genética y Biología Molecular Gabriela Mora Macías por toda su infinita y eficiente labor en cada uno de los trámites, haciéndonos ver que no existen imposibles.

A las Secretarias Adela, Miriam, Linda y Viri por su excelente trabajo en la realización de pedidos de reactivos y material para la Investigación.

A la Dra. Leticia Ramírez Martínez Auxiliar de Investigación del Laboratorio 19 del Departamento de Toxicología por toda su ayuda, disposición y enseñanza en los ensayos de qRT-PCR.

Al encargado de la Unidad de Microscopía Confocal y Multifotónica el M. en C. José Iván Galván-Mendoza por toda su enseñanza y disposición para el uso de los Microscopios Confocales.

Al encargado de la Unidad de Citometría de Flujo M. en C. Víctor Hugo Rosales por su disposición, ayuda y enseñanza con el uso del Citómetro y el análisis de los perfiles de ciclo celular.

DEDICATORIA

A mis queridos y amados padres María del Consuelo Aguilera Herrera y Carlos Vélez Sánchez por ser el pilar en mi vida, por ser la razón de mi existencia, por ser las personas más nobles y consentidores, porque cada triunfo mío es gracias a todo el amor, cariño, alegría, paciencia, confianza, consuelo y apoyo que en todo momento me brindan. Por ser un ejemplo a seguir, por siempre involucrarse en cada paso que doy, por comprender que a veces el trabajo en el Laboratorio puede ser de lunes a domingo y por darme la oportunidad de estudiar un Doctorado.

A mis hermanos a quienes amo y admiro más cada día, por siempre estar al pendiente de mí, por enseñarme a ver la vida de maneras distintas, pero siempre con un toque muy especial, porque sin duda son parte del motor que me mueve día con día. Carmen gracias por guiarme con esa disciplina y pasión por lo que uno quiere lograr hasta alcanzarlo. Carlos gracias por ilustrarme a imaginar, crear y creer en uno mismo. Diana gracias por enseñarme a dar todo día con día, a observar el paisaje para saber hacia dónde voy.

A mi hermoso sobrino Mateo, a quien amo tanto, gracias por alegrar mi vida día con día, por recordarme que todo puede ser sorprendente, por bailar, cantar, aprender, jugar y reír conmigo a carcajadas y por entender que yo también voy a la escuela.

A mi abuelita Carmelita por ser puro amor y dulzura, y a quien extraño tanto.

A todos y cada uno de los miembros de mi familia por estar siempre al pendiente de cada paso que doy, por motivarme, por las alegrías y tristezas que hemos compartido a lo largo de la vida y porque en familia todo es mejor.

A María por todo su amor y cariño que siempre me ha dado consintiéndome en cada momento y apoyándome, por siempre estar en mi vida desde que nací.

A la Dra. María de Lourdes Pérez-Garrido, por creer en mí, por estar al pendiente, por todas las enseñanzas, por abrirme el panorama académico, pero sobre todo por ese cariño brindado.

A mi amigo fiel Elvis por siempre esperarme y recibirme con tanta emoción, por seguirme a todos lados y por quererme tanto.

A mis amigos a quienes quiero tanto por todos los momentos vividos, por todo su apoyo y porque sé que cada logro en mi vida lo disfrutan como si fuera suyo.

RESUMEN

El β -dístroglicano (β -DG) es una proteína transmembranal que participa en la adhesión celular, la remodelación del citoesqueleto y la arquitectura nuclear. Esta diversidad funcional se le atribuye a la capacidad de β -DG estar presente en diferentes compartimientos celulares como es la membrana plasmática y la envoltura nuclear. Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan la localización subcelular y la abundancia de β -DG en cada compartimiento, así como las consecuencias fisiológicas de afectaciones en su tráfico intracelular, se desconocen. En el presente estudio, se muestra por primera vez que β -DG es una proteína que presenta un transporte núcleo-citoplasmático, con un exporfe nuclear funcional que depende del reconocimiento de una señal de exporfe nuclear, localizada en el dominio transmembranal del β -DG (⁷⁶¹I LL I AG I IAM⁷⁷⁰), por la exportina 1/CRM1. Además, proporcionamos pruebas convincentes que demuestran que la vía de exporfe nuclear del β -DG es biológicamente significativa. Hemos demostrado que al forzar la acumulación nuclear del β -DG ocasiona tanto una deslocalización como una disminución en los niveles de las proteínas de la envoltura nuclear emerina y lámina B1, pero no de lámina A/C, y como consecuencia la interrupción de procesos importantes en los que las proteínas emerina (anclaje de los centrosomas en la envoltura nuclear y la actividad transcripcional de β -catenina) y lámina B1 (progresión del ciclo celular y estructura nucleolar) están involucradas.

ABSTRACT

β -Dystroglycan (β -DG) is a transmembrane protein with critical roles in cell adhesion, cytoskeleton remodeling and nuclear architecture. This functional diversity is attributed to the ability of β -DG to target to, and conform specific protein assemblies at the plasma membrane and nuclear envelope (NE). Nevertheless, molecular mechanisms controlling the subcellular fate and abundance of β -DG in each compartment, as well as the physiological consequences of a failure in its intracellular trafficking pathway are largely unknown. In this study, we show for the first time that β -DG is a nucleocytoplasmic shuttling protein with a functional nuclear export pathway that depends on the recognition of a nuclear export signal located in the transmembrane domain of β -DG (⁷⁶³I LL I AG I IAM⁷⁷² residues) by exportin 1/CRM1. In addition, we provide compelling evidence showing that the β -DG nuclear export pathway is biologically significant. We revealed that forced accumulation of β -DG in the nucleus results in both mislocalization and decreased levels of the NE proteins emerin and lamin B1, but not lamin A/C, and consequently, in the disruption of various important processes in which emerin (centrosome-nucleus linkage and β -catenin transcriptional activity) and lamin B1 (cell cycle progression and nucleoli structure) are critically involved. Collectively, our data show that nuclear dosage of β -DG is tightly regulated by the combination of importin-dependent nuclear import (previously described) and CRM1-dependent nuclear export pathways, with the latter mechanism preventing harmful nuclear accumulation of β -DG, to preserve proper targeting and activity of the lamin B1-emerin- β -DG NE network in myoblasts.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
El Distroglicano	1
El α -distroglicano	2
El β -distroglicano	2
Las Funciones del β -distroglicano	3
El Tráfico Intracelular del β -distroglicano	4
La Proteostasis	5
El Transporte Núcleo/Citoplasmático	5
El Mecanismo de Exporte Nuclear	6
El Sistema Ubiquitina-Proteosoma	8
2. ANTECEDENTES	9
3. JUSTIFICACION	10
4. HIPOTESIS	10
5. OBJETIVOS	10
Objetivo general	10
Objetivos particulares	10
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	11
7. METODOLOGIA	14
Cultivo celular y tratamientos	14
Transfección	14
Transfección estable	15
Ensayos de proliferación	15
Citometría de flujo	15

Sincronización del ciclo celular	16
Arresto de los mioblastos C2C12 en la fase G0/G1 por reducción del suero	16
Arresto de los mioblastos C2C12 en la fase S con exceso de timidina	16
Arresto de los mioblastos C2C12 en la fase G1 tardía y S temprana con doble bloqueo de timidina	16
Ensayo de actividad de la luciferasa	16
Obtención de extractos proteicos totales mediante lisis celular	17
Fraccionamiento celular (núcleo/citoplasma)	18
Fraccionamiento celular (envoltura nuclear)	18
Fraccionamiento celular (nucleoplasma)	19
Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford	19
Análisis de proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	19
Inmunodetección en fase sólida	20
Obtención de lisados bacterianos	20
Ensayos de interacción <i>in vitro</i> pull down	21
Inmunofluorescencia indirecta	22
Restricción enzimática de DNA	23
Ligación de DNA	24
Preparación de células competentes utilizando CaCl ₂	24
Transformación bacteriana	24

Extracción y purificación de plásmidos	24
Obtención de DNA plasmídico a baja escala (MINIPREP)	25
Obtención de DNA plasmídico a mediana escala (MIDIPREP)	25
Mutagénesis sitio dirigida	26
Fosforilación de los oligonucleótidos	26
Reacción en cadena de la DNA polimerasa	26
Digestión de la cadena molde con la enzima DpnI	26
Purificación del producto a través de corte de rebanada de gel	27
Obtención y análisis de los candidatos	27
Secuenciación de DNA automatizada	27
Obtención de productos de extensión marcados	27
Purificación de los productos por precipitación con EDTA	27
8. RESULTADOS	28
El β -DG puede translocarse entre el núcleo y el citoplasma	28
La exportina CRM1 media la exporte nuclear de β -DG al reconocer una NES presente en su dominio transmembranal	31
La alteración en la exporte nuclear de β -DG afecta los niveles proteicos y la localización en la envoltura nuclear de lámina B1 y emerina pero no de lámina A/C	36
La acumulación nuclear de β -DG afecta procesos mediados por emerina	40
La acumulación nuclear de β -DG afecta procesos mediados por lámina B1	41

La acumulación nuclear forzada de β -DG aumenta su degradación proteosomal en el núcleo	43
9. DISCUSION	45
10.CONCLUSIONES	51
11.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

No.	Figura	Página
1	Dominios de las subunidades α y β del distroglicano	3
2	Tráfico retrógrado de la membrana plasmática al núcleo del β -DG	4
3	Mecanismo de exporte nuclear	7
4	Sistema Ubiquitina Proteosoma	8
5	El transporte núcleocitoplasmático del β -DG en C2C12 es impedido por la LMB	29
6	El transporte núcleocitoplasmático del β -DG en cultivos primarios de mioblastos de ratón, es impedido por la LMB	30
7	Identificación y caracterización funcional de la señal de exporte nuclear en β -DG	32
8	La NES localizada en el dominio transmembranal de β -DG es funcional	33
9	El exporte nuclear de β -DG es mediado por la exportina CRM1	35
10	La acumulación nuclear de β -DG afecta la localización subcelular de las proteínas de envoltura nuclear.	38
11	La acumulación nuclear de β -DG afecta los niveles de las proteínas de envoltura nuclear emerina y lámina B1	39
12	La acumulación nuclear de β -DG afecta procesos dependientes de emerina	41
13	La acumulación nuclear de β -DG afecta procesos mediados por lámina B1	42
14	La acumulación nuclear de β -DG afecta procesos mediados por lámina B1, como la estructura nucleolar	43
15	Los niveles nucleares de β -DG son regulados por el proteosoma nuclear	44
16	El β -DG fosforilado se ubiquitina en el núcleo y en el citoplasma, y su degradación nuclear por la vía ubiquitina-proteosoma incrementa al acumularlo en el núcleo	45
17	Consecuencias funcionales en la alteración de los niveles nucleares de la proteína β -DG	50

INTRODUCCIÓN

El Distroglicano

El distroglicano es un componente central del Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC; por sus siglas en inglés). Este ensamblaje proteico conecta la matriz extracelular con el citoesqueleto, proporcionando estabilidad al sarcolema durante la contracción muscular [1]. El distroglicano (DG) es codificado por el gen *DAG1* que se localiza en el cromosoma 3p21 humano; el gen consta de dos exones separados por un intrón y genera un transcrito de 5.8Kb. La expresión del gen *DAG1* se extiende a una amplia variedad de órganos y tejidos, incluyendo cerebro, músculo esquelético, corazón, pulmón, placenta, hígado, riñón y páncreas, y se presenta también en diferentes etapas del desarrollo [2]. La traducción del gen *DAG1* produce un pro-péptido de 97 KDa, el cual es procesado mediante un corte proteolítico en la serina 653 para generar dos subunidades, el α -distroglicano (α -DG) y el β -distroglicano (β -DG). A pesar de esta separación, las subunidades α -DG y β -DG se unen de nuevo de manera no covalente en la membrana plasmática [3].

Hasta el momento se han reportado 3 mutaciones en el gen *DAG1*, que ocasionan enfermedades conocidas como distroglicanopatías primarias, las cuales son: 1) **c.575C>T → p.Treo192Met**, esta mutación ubicada dentro del dominio N-terminal del α -DG afecta su O-glicosilación y causa una variante de distrofia muscular de cinturas (LGMD, por sus siglas en inglés) asociada con deterioro cognitivo [4]; 2) **c.2006G>T → p.Cys669Phe**, ubicada en el dominio extracelular del β -DG, la mutación altera su interacción con el α -DG y desestabiliza la conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina, causando una distroglicanopatía con fenotipo parecido al desorden de músculo-ojos-cerebro (MEB, por sus siglas en inglés), que va acompañado por una leucodistrofia multicística [5]; 3) **c.743C>del**, esta mutación ocasiona un corrimiento en el marco de lectura y la introducción de un codón de paro, impidiendo la síntesis de ambas proteínas, α -DG y β -DG [6]. De manera interesante la ausencia del distroglicano no interrumpe el desarrollo embrionario, como se ha descrito en el ratón [7]. Estos pacientes presentan una distroglicanopatía severa denominada Síndrome de Walker-Warburg (WWS, por sus siglas en inglés),

la cual se caracteriza calcificaciones intracraneales y causa la muerte entre la edad de unas cuantas horas y los 3 meses y medio, debido a paro respiratorio. Es importante resaltar que los 8 pacientes que han presentado mutaciones en el gen *DAG1* son de sexo femenino, lo que sugiere que estas mutaciones son letales desde el desarrollo embrionario en los hombres.

El α -dístroglicano

El α -DG es una proteína extracelular que posee un dominio N-terminal globular, un dominio central parecido a la mucina que presenta una abundante glicosilación, y un dominio C-terminal globular (Figura 1). Los primeros 29 aminoácidos son en su mayoría hidrofóbicos y constituyen el péptido señal que dirige a la proteína a la membrana plasmática. El dominio N-terminal globular posee sitios para N-glicosilación, mientras que el dominio central sufre O-glicosilación. El grado de glicosilación del α -DG varía dependiendo del tejido, lo que provoca que aunque su masa molecular predicha es de ~75kDa, su migración en geles de poliacrilamida desnaturalizantes varié entre 120-180 kDa [2]. La glicosilación del α -DG le confiere la capacidad para asociarse con proteínas de la matriz extracelular, como la laminina, la agrina y el perlecano [8].

El β -dístroglicano

El β -DG es una proteína transmembranal de 43 kDa que está formada por un dominio amino terminal extracelular que contiene un sitio potencial de N-glicosilación, un segmento transmembranal, y un dominio C-terminal intracelular rico en prolinas que contiene la secuencia PPxY (Figura 1); esta serie de amino ácidos es importante para la interacción del β -DG con la distrofina [9] y la caveolina [10]. Además, el β -DG presenta una señal de localización nuclear (NLS) en el dominio intracelular que media su ingreso al núcleo a través del sistema de importación nuclear de las α/β -

importinas [11], y que le permite interactuar con la ezrina para modular la remodelación del citoesqueleto de actina[12].

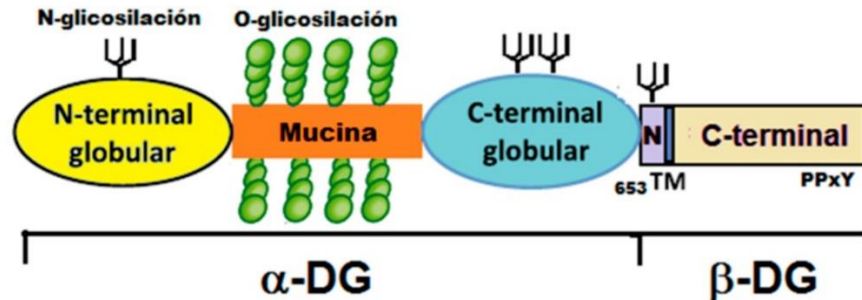


Figura 1. Dominios de las subunidades α y β del distroglicano [13].

Las Funciones del β -distroglicano

Debido a su localización subcelular en diferentes compartimentos celulares (como son membrana plasmática y envoltura nuclear) y a su interacción con múltiples proteínas, el β -DG se considera una proteína multifuncional. Algunas de las funciones son las siguientes:

Transducción de señales: El motivo PPxY es fosforilado por la cinasa Src en la tirosina 892 (Y892), dejando libre al tallo citoplásmico del β -DG para su interacción con proteínas con motivos SH2 como Grb2, MEK y ERK las cuáles están involucradas en vías de señalización [14-18]. Por lo anterior, se ha propuesto que el β -distroglicano actúa como proteína adaptadora que secuestra estas moléculas de señalización para su posterior activación.

Adhesión celular: el β -DG en su estado fosforilado regula, en conjunto con las integrinas la abundancia de las adhesiones focales; y la formación de podosomas, mediante su asociación con la molécula de adhesión Tks5 [19, 20].

Reorganización del citoesqueleto: el tallo citoplásmico del β -DG es capaz de unirse de manera directa con la actina sin requerir de la distrofina [21]. Por otra parte, se ha demostrado su unión a la proteína adaptadora de citoesqueleto ezrina a través de su región rica en aminoácidos básicos (NLS), formando un complejo β -

distroglicano-ezrina-RhoGEF (factor intercambiador de nucleótidos de guanina) para activar la vía de Cdc42, responsable de la polimerización de actina de esta manera el β -DG regula la organización del citoesqueleto formando micro-estructuras de adhesión celular como filopodias y microvellosidades [12].

Estructura y función de la envoltura nuclear: En células musculares con deficiente expresión del β -DG se observó alteración de la morfología nuclear, lo que sugiere que esta proteína es fundamental para la estabilidad y localización de las proteínas de envoltura nuclear emerina y lámina B1 [22].

El Tráfico Intracelular del β -DG

El mecanismo mediante el cual el β -DG se transporta hacia el núcleo se ha descrito recientemente; la proteína tiene una señal de localización nuclear (NLS) en la región yuxtamembranal, y es importada al núcleo siguiendo la ruta clásica de importe nuclear mediada por las importinas $\alpha 2$ y $\beta 1$ y por Ran [11]. Además, su importación nuclear es facilitada por la remodelación del citoesqueleto dependiente ezrina [23] (Figura 2).

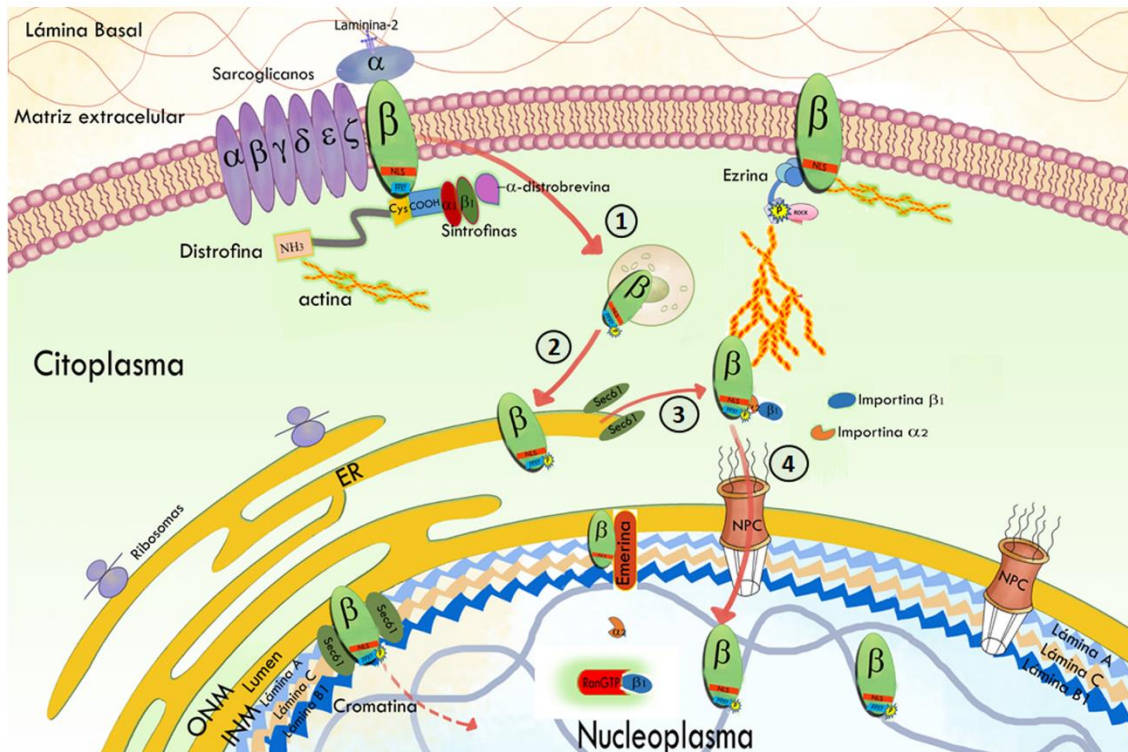


Figura 2. Tráfico retrógrado de la membrana plasmática al núcleo del β -DG (Ver texto).

Recientemente, se dilucidó el tráfico intracelular que sigue el β -DG desde la membrana plasmática al núcleo [24]. La proteína presenta un tráfico retrógrado en donde β -DG al ser fosforilado por la cinasa Src en la membrana plasmática es endocitado [25] (Figura 2, #1), llegando hasta el retículo endoplásmico (ER) (Figura 2, #2), en donde interacciona con Sec61 para evadir el ambiente membranoso (Figura 2, #3), y ser reconocida en su forma soluble por las importinas $\alpha 2$ y $\beta 1$ para ingresar finalmente al núcleo (Figura 2, #4). Esto indica que un eficiente tráfico anterógrado/retrógrado es fundamental para que la proteína β -DG tenga distribución nuclear.

La Proteostasis

La homeostasis proteica, o proteostasis, se mantiene gracias a la suma de varios procesos celulares que controlan la síntesis, el plegamiento, la modificación postraduccional, el ensamblaje/desensamblaje, la localización, el tráfico y la degradación de proteínas en la célula [26]. La proteostasis es esencial para mantener el funcionamiento normal de las células, los tejidos y los órganos y su interrupción provoca la acumulación de proteínas desplegadas, mal plegadas o dañadas, lo que a su vez altera el funcionamiento de los organelos y las células. Estos efectos adversos de las proteínas dañadas o mal plegadas en la célula se denominan proteotoxicidad [27]. La proteotoxicidad severa perturba una variedad de procesos celulares, dañando la fisiología de la célula y provocando incluso la muerte celular. De manera particular, en el presente estudio nos enfocamos en el estudio de dos procesos celulares importantes para el mantenimiento de la proteostasis, la exportación nuclear y la degradación de proteínas mediada por el proteosoma.

El Transporte Núcleo/Citoplasmático

En las células eucariontes, la replicación del DNA y la transcripción están separadas de la síntesis de proteínas por una doble membrana, la envoltura nuclear. Como consecuencia, miles de macromoléculas son transportadas desde el núcleo hacia el citoplasma y viceversa. El transporte de proteínas y RNAs hacia dentro y fuera del núcleo ocurre a través del complejo del poro nuclear (NPC), una estructura

macromolecular incrustada en la doble membrana de la envoltura nuclear [28, 29]. Dicho complejo permite la difusión pasiva de iones y pequeñas proteínas (<40kDa) pero restringe el paso de moléculas más grandes, las cuales solo pueden ingresar al núcleo si portan una señal apropiada [30].

El NPC está formado por aproximadamente 30 proteínas [31], conocidas como nucleoporinas (Nups). El movimiento de moléculas a través del NPC es bidireccional. El importe y exporte de la mayoría de las proteínas es mediado por la familia de factores solubles de transporte altamente conservada, la familia de la β -carioferina. Las carioferinas median el importe nuclear (importinas) o la exporte nuclear (exportinas) mediante su interacción con moléculas cargo [32]. La energía para el transporte nuclear la proporcionan las proteínas de la familia GTPasas Ras/Ran. Ran puede estar unido a GDP o a GTP. El estado nucleotídico de Ran es modulado por proteínas reguladoras: RanGEF (factor intercambiador de nucleótidos de guanina de Ran) en el núcleo y RanGAP (proteína activadora de la GTPasa Ran) en el citoplasma [33].

El Mecanismo de Exporte Nuclear

La exportina CRM1 (mantenimiento de la región cromosómica 1) es una proteína receptora de transporte ubicua que se une a su molécula cargo a través de una región conservada de 3 ó 4 residuos hidrofóbicos, teniendo como secuencia consenso $\phi X_{2-3}\phi X_{2-3}\phi X\phi$ (en donde ϕ =LFIMV y X= cualquier otro aminoácido), denominada señal de exporte nuclear (NES) [34, 35]. El mecanismo de exporte nuclear consiste en el reconocimiento de la(s) NES(s) presente en la proteína cargo por la exportina CRM1, la cual se une a la proteína cargo junto con RanGTP, formando el complejo ternario CRM1-proteína cargo-RanGTP. La exportina CRM1 interacciona con las nucleoporinas para poder atravesar el poro nuclear y llegar al citoplasma, en donde ocurre la hidrólisis de RanGTP a RanGDP mediada por RanGAP, lo que ocasiona la disociación del complejo (Figura 3). RanGDP se recicla regresando al núcleo a través del factor de transporte nuclear 2 (NTF2) [36].

El transporte nuclear dependiente de la exportina CRM1 es inhibido por la Leptomycin B (LMB). Esta droga se une de manera covalente al residuo conservado de cisteína (Cys 528) de la exportina CRM1, ubicado en la región de reconocimiento de la NES, lo que ocasiona que la molécula cargo no pueda unirse a CRM1 y por lo tanto, se quede secuestrada en el núcleo [37, 38].

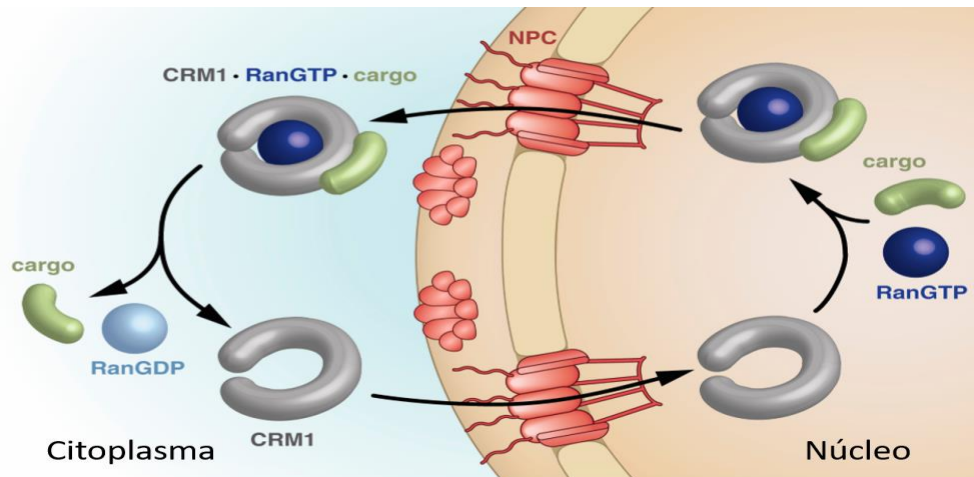


Figura 3. **Mecanismo de exportación nuclear.** Modificado de [39] (Ver texto).

Existen aproximadamente 300 proteínas cargo de CRM1, las cuales incluyen supresores de tumores, oncogenes, reguladores del ciclo celular, entre otros [40, 41]. Muchas de estas proteínas cargo están localizadas erróneamente en el citoplasma de las células cancerosas, debido a que la exportina CRM1 se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos de tumores. Lo que convierte a la exportina CRM1 en un blanco terapéutico, ya que la inhibición del mecanismo de exportación nuclear dependiente de CRM1 restaura la localización nuclear y las funciones nucleares de los supresores de tumores, lo que conduce a la apoptosis de las células cancerosas [39].

El Sistema Ubiquitina-Proteosoma

La proteólisis apropiada y específica es esencial para la función celular y la homeostasis. En las células eucariotas, el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS, por sus siglas en inglés) es la principal vía que media la degradación de proteínas intracelulares solubles en el citoplasma, núcleo y retículo endoplásmico [42, 43]. El

UPS desempeña un papel crítico en la regulación de una amplia variedad de vías celulares, incluido el crecimiento y proliferación celular [44], la apoptosis [45], el control de calidad de las proteínas, la reparación de ADN [46], la transcripción [47] y la respuesta inmune [48]. Defectos en estas vías se han relacionado con una serie de patologías humanas, especialmente el cáncer [49] y las enfermedades neurodegenerativas [50, 51].

La eliminación de proteínas por parte del UPS implica una serie de eventos: en primer lugar, una cadena de monómeros de ubiquitina activada (proteína globular pequeña y estable) se une covalentemente a residuos de lisina de la proteína blanco, de una manera dependiente de ATP [52]. Este proceso de mono o poliubiquitinación requiere la acción secuencial de las enzimas que activan la ubiquitina (E1), las enzimas que conjugan la ubiquitina (E2) y las enzimas que ligan la ubiquitina (E3) (Figura 4, #1) [52, 53]. La cadena de ubiquitina sirve como una señal para el reconocimiento por el proteasoma (Figura 4, #2). El proteasoma 26S está conformado por un centro llamado 20S y dos unidades regulatorias 19S. El centro 20S está compuesto por cuatro anillos típicamente heptaméricos compuestos a su vez de varias proteínas, las subunidades α que son estructurales y las subunidades β que son catalíticas. En conjunto, la estructura adopta una forma de barril, con los anillos conformados por subunidades α localizados en los extremos y los conformados por subunidades β ubicados en medio. Los complejos 19S localizados hacia los extremos del centro 20S son los encargados del reconocimiento y la regulación del sustrato ya etiquetado con ubiquitina (Figura 4, #3).

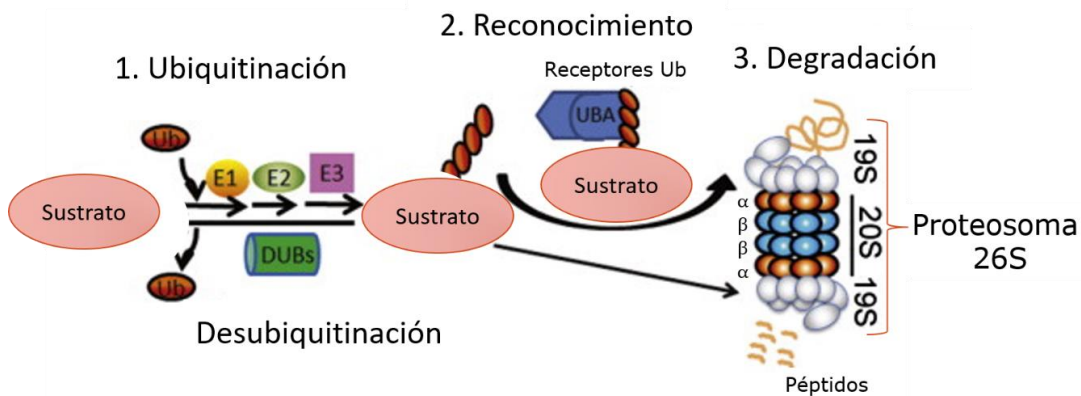


Figura 4. **Sistema Ubiquitina Proteasoma.** Modificado de [27] (Ver texto)

ANTECEDENTES DIRECTOS

La presencia del β -dístroglicano (β -DG) en el núcleo de diferentes líneas celulares se describió recientemente [11, 54]. Enseguida se demostró la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) en la región yuxtamembranal del β -DG, lo que le permite seguir la ruta clásica de importación nuclear mediada por las importinas $\alpha 2$ y $\beta 1$ y por Ran para su translocación al núcleo [11]. La importación nuclear de esta proteína se facilita por la remodelación del citoesqueleto dependiente que ejerce la ezrina [23]. En el núcleo, el β -DG colocaliza e interacciona con las proteínas de la envoltura nuclear lámina A/C, lámina B1 y emerina, y de manera importante la deficiencia de β -DG altera funciones celulares controladas por la envoltura nuclear, como son la morfología nuclear y el anclaje de los centrosomas a la envoltura nuclear. En su conjunto estos resultados sugieren que el β -DG está implicado en la estructura y función de la envoltura nuclear [22]. Recientemente se desentrañó la ruta que sigue el β -DG desde la membrana plasmática al núcleo. La proteína presenta un tráfico retrógrado viajando a través de endosomas y del retículo endoplásmico (ER), en donde interacciona con el translocón Sec61 para evadir el ambiente membranoso y ser reconocida en su forma soluble por las importinas $\alpha 2$ y $\beta 1$ para ingresar finalmente al núcleo [24].

La distribución subcelular del β -DG en diferentes compartimentos celulares (membrana plasmática y envoltura nuclear) y las funciones diversas en las que participa en cada región, implica que su tráfico debe ser regulado finamente para garantizar los niveles adecuados de la proteína en respuesta a las necesidades de la célula. Por lo tanto, pensamos que el β -DG debe poseer un mecanismo de exporte nuclear que en coordinación con su importación nuclear dependiente de $\alpha 2/\beta 1$ importinas, le permita alcanzar la concentración adecuada en cada compartimento celular. Además, decidimos evaluar si la estabilidad de la proteína β -DG depende de su distribución subcelular.

3. JUSTIFICACIÓN

El β -DG se localiza y regula funciones celulares en la membrana plasmática y envoltura nuclear, por lo tanto, es necesario estudiar los mecanismos celulares que controlan los niveles de la proteína en cada compartimento celular. Particularmente, el contenido nuclear del β -DG de estar regulados finamente para mantener la estructura y función del núcleo.

4. HIPÓTESIS

Los niveles nucleares de la proteína β -DG están regulados por el transporte nuclear y el recambio de la proteína.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

- Identificar los mecanismos que regulan los niveles nucleares del β -DG y su relevancia biológica.

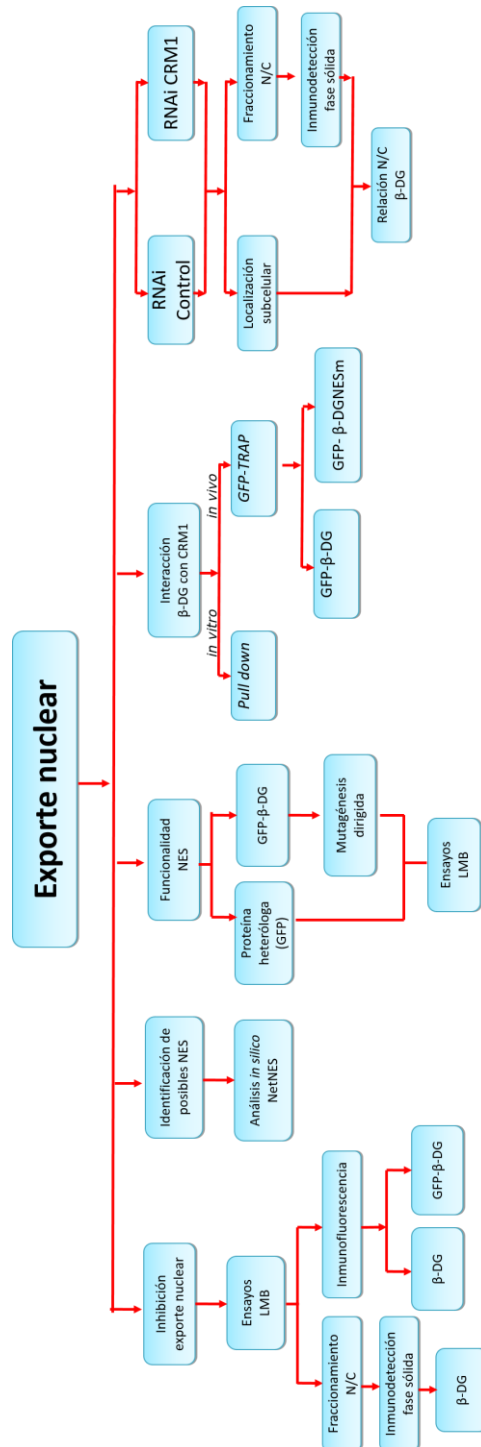
Objetivos particulares

- Analizar si el β -DG presenta transporte nuclear y si este fenómeno es mediado por la exportina CRM1.
- Demostrar la relevancia biológica del transporte nuclear del β -DG.
- Analizar si la estabilidad del β -DG está influenciada por su localización subcelular.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

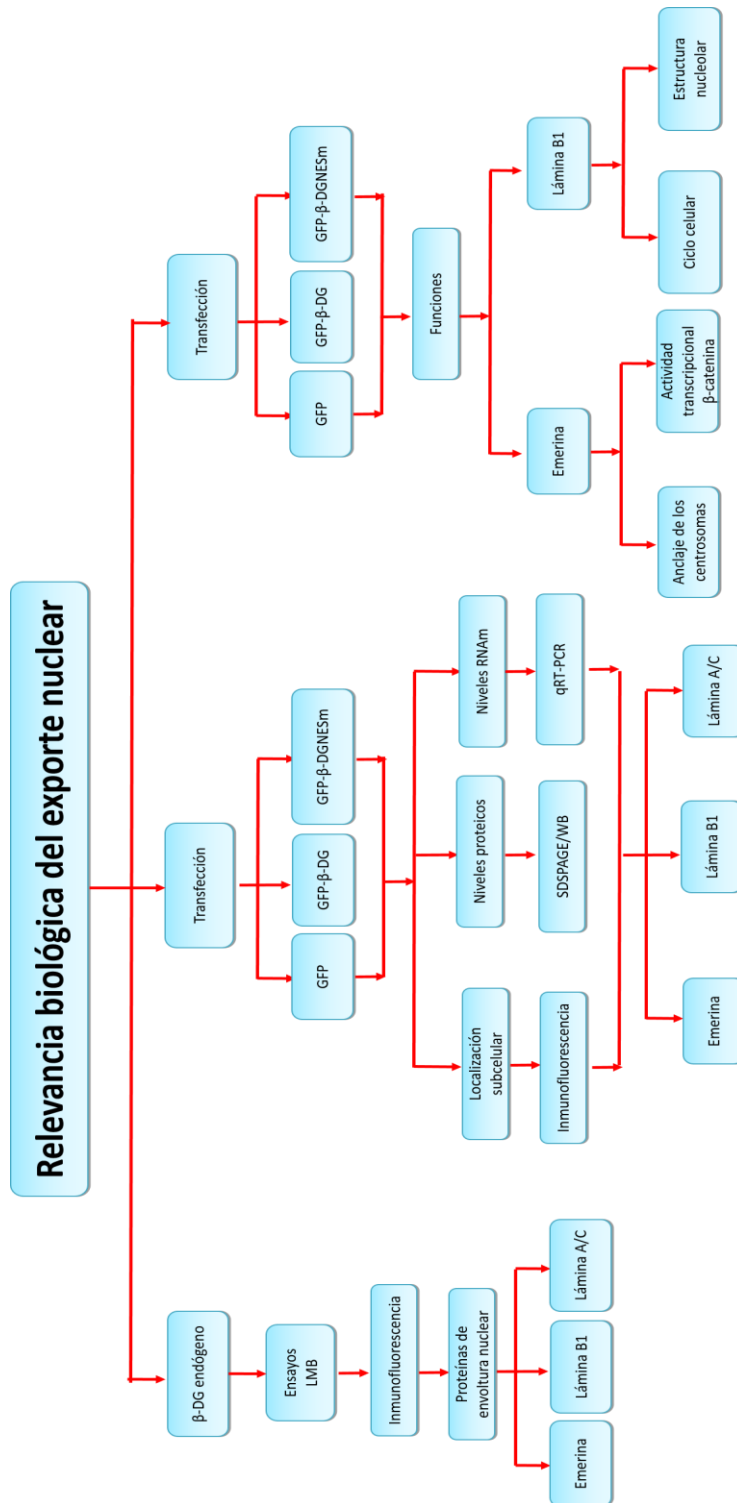
Objetivo 1.

- Analizar si el β -DG presenta exporte nuclear y si este fenómeno es mediado por la exportina CRM1.



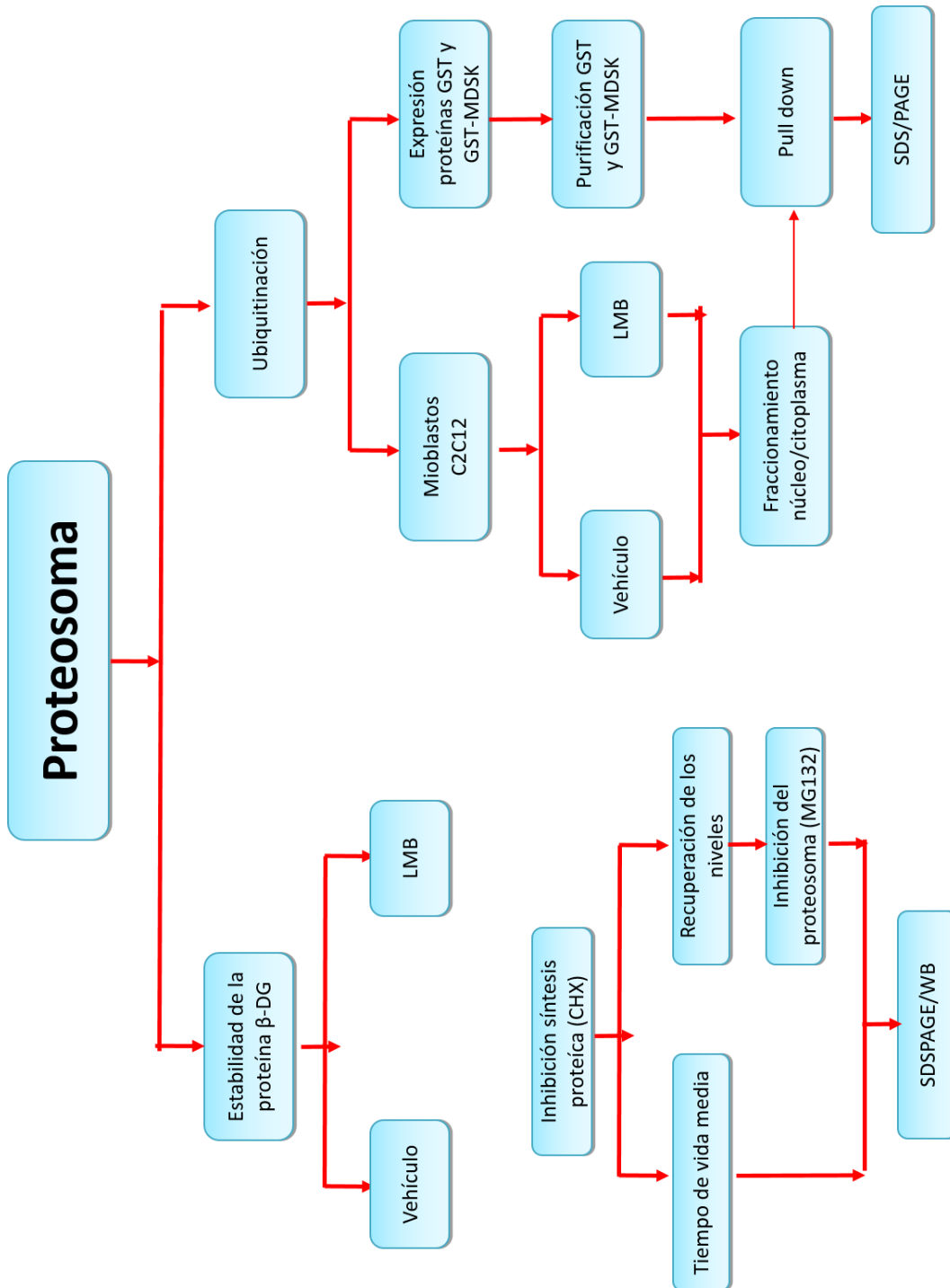
Objetivo 2.

- Demostrar la relevancia biológica del exporte nuclear del β -DG.



Objetivo 3.

- Analizar si la estabilidad del β -DG está influenciada por su localización subcelular.



7. METODOLOGÍA

Cultivo celular y tratamientos

Las células musculares C2C12 se cultivaron en el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 50U/ml de penicilina y 50µg/ml de estreptomina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para bloquear el exporte nuclear de proteínas mediada por CRM1, las células se cultivaron durante 48 horas, posteriormente se retiró el medio y se adicionó medio con Leptomycin B (LMB) a una concentración de 50 nM; enseguida se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. En el caso de las células transfectadas, se realizó el tratamiento 12 horas post-transfección a una concentración de 50 nM de LMB. Para inhibir la síntesis de proteínas, los mioblastos C2C12 se cultivaron durante 24 horas, posteriormente se retiró el medio y se adicionó fresco con cicloheximida (CHX) a una concentración de 30 µg/ml. Para la inhibición del proteosoma se utilizó el reactivo MG132 a una concentración de 10 µM.

Transfección

Las células C2C12 se transfectaron con el vector correspondiente, mediante la siguiente técnica: Se esterilizaron cubreobjetos de 20 mm x 20 mm, con alcohol y flama de mechero. Se cultivaron células C2C12 a una confluencia de 60% y se dejaron incubando durante 24 h a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. En un primer tubo se agregaron 4 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 100 µl de medio DMEM libre de suero y antibióticos, y se dejó incubando la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente. En un segundo tubo se diluyó 3 µg 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 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Transfección estable

Para generar células transfectadas de manera estable, los mioblastos C2C12 se crecieron a 60% de confluencia y se transfectaron con los vectores GFP, GFP-β-DG o GFP-β-DGNESm; a las 24 horas post-transfección se evaluó la eficiencia de transfección y se inició la selección con 800 µg/ml de neomicina (G418) durante 10 días. Para los vectores que expresan el RNA interferente (RNAi) dirigido contra el RNAm de CRM1 o el RNAi control que no bloquea la expresión de gen alguno, las células se seleccionaron con 2 µg/ml de puromicina durante 12 días.

Ensayos de proliferación

La proliferación celular se evaluó mediante el uso del reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) que al reducirse a través de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas, pasa de ser un compuesto hidrofílico de color amarillo a un compuesto azul, hidrofóbico denominado formazán. Las células se sembraron por triplicado en placas con 12 pozos a una densidad de 1x10² células por pozo. Las células cultivadas por diferentes lapsos de tiempo (0 a 13 días) se incubaron 4 h a 37°C con el reactivo MTT a una concentración final de 500 µg/ml. Posteriormente, se removió el medio de cultivo y se colocó durante 1 h a 37°C isopropanol acídico para solubilizar los cristales de formazán. Finalmente, se midió la absorbancia del colorante a 570 nm en el espectrofotómetro.

Citometría de flujo

Los mioblastos C2C12 se cultivaron en cajas p70 a una confluencia del 60%, se tripsinizaron y se lavaron 3 veces con PBS. Las células se fijaron con etanol al 80% durante 2 horas, el DNA se tiñó con 1 µg/mL de DAPI (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos y se transfirieron a tubos de citometría de flujo para su análisis de ciclo celular en el citómetro de flujo BD LSR-Fortessa (BD Biosciences , San José, CA). El

análisis del ciclo celular se llevó a cabo utilizando el software ModFit LT (Verity Software House, Topsham, ME).

Sincronización del Ciclo Celular

Arresto de los mioblastos C2C12 en la fase G0/G1 por reducción del suero

Se cultivaron 1×10^6 células C2C12 expresaban de manera estable la GFP, GFP- β -DG o GFP- β -DGNEsm por 24 horas, a continuación, se cambió el medio de cultivo por medio de cultivo con niveles disminuidos de suero (0.1% de suero fetal bovino) y se mantuvo el cultivo durante 48 horas (células arrestadas fase G0/G1). Finalmente, las células se liberaron al colocar el medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino, cosechando las células a diferentes tiempos 0, 12, 19, 21, y 24 horas.

Arresto de los mioblastos C2C12 en la fase S con exceso de timidina

Se cultivaron células que expresaban de manera estable la GFP, GFP- β -DG o GFP- β -DGNEsm en placas p70 hasta una confluencia al 60% y se incubaron con timidina 2 mM (Sigma-Aldrich) durante 18 h. Las células se liberaron de la detención de la fase S reemplazando el medio de cultivo. A continuación, se cosecharon las células a 0, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 h para su análisis.

Arresto de los mioblastos C2C12 en la fase G1 tardía y S temprana con doble bloqueo con timidina

Se cultivaron células que expresaban de manera estable la GFP, GFP- β -DG o GFP- β -DGNEsm en placas p70 hasta una confluencia al 60% y se incubaron con timidina 2 mM (Sigma-Aldrich) durante 18 h. Las células se liberaron de la detención de la fase S reemplazando el medio de cultivo durante 9 h. Y posteriormente, se realizó un segundo bloqueo, incubando con timidina 2 mM (Sigma-Aldrich) durante 18 h.

Ensayo de actividad de la luciferasa

Los mioblastos C2C12 se sembraron en placas de 24 pozos (3×10^4 células/pozo) y al día siguiente se transfectaron con 0.5 μ g de GFP, GFP- β -DG o GFP- β -DGNEsm. Las muestras se cotransfectaron con 0.01 μ g de luciferasa TK Renilla (para estimar

la eficacia de transfección), 0.5 µg de pβ-Catenina y 0.2 µg de pTOPFLASH o pFOPFLASH (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Después de 24 h, se determinaron los niveles de luciferasa y luciferasa de Renilla en un luminómetro usando el kit de *Dual Luciferase Reporter Assay* (Promega, Madison, WI). La actividad de la luciferasa fue normalizada con la actividad luciferasa de Renilla para ajustar la eficiencia de transfección.

Obtención de extractos proteicos totales mediante lisis celular

Los cultivos de células C2C12 sembrados en cajas de 100mm a una confluencia de 90% se lavaron con 3ml 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 1x de un coctel de proteasas [Complete-Roche]). La mezcla se incubó sobre una cama de hielo durante 20 minutos. A continuación, el lisado celular se recolectó con un gendarme y se colocó en un microtubo de 1.5ml, se centrifugó a 12,000rpm por 2 minutos a 4°C; enseguida, se recuperó el sobrenadante (extracto total de proteínas) en un microtubo nuevo para cuantificar la concentración de proteínas por el método de Bradford. Los extractos se analizaron posteriormente mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Fraccionamiento celular (núcleo/citoplasma)

Para realizar el fraccionamiento celular a los cultivos de células C2C12 se les retiró el medio por aspirado, se lavaron con PBS y se cosecharon en 1 ml de PBS recolectándolas en un tubo Falcon. Estas se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min, una vez centrifugado se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en la solución amortiguadora TM (Tris HCl pH 8, MgCl₂, PMSF) con inhibidores de proteasas (Complete 7x) e inhibidores de fosfatasas (NaF, Na₂MoO₄, Na₃VO₄) y se incubaron a 4°C durante 10 min. Posteriormente, se agregó Tritón al 2% en relación 1:1 para permeabilizar las membranas a 4°C durante 10 min. La suspensión se homogenizó utilizando un homogenizador de Dounce y se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 min. El sobrenadante corresponde a la fracción citoplasmática. La pastilla se resuspendió en una mezcla de solución de Sacarosa I (0.32 M) y solución

Sacarosa II (2.0 M), en volúmenes iguales. Posteriormente, se realizó el gradiente de sacarosa poniendo en el fondo la solución de sacarosa II, luego los extractos nucleares resuspendidos y por último la solución de sacarosa I cuidando conservar las tres fases. El gradiente se centrifugó a 16,000 rpm durante 48 min a 4°C. La fracción nuclear migra hacia el gradiente de mayor concentración, por lo que la pastilla se resuspendió en la solución de lisis (50mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1% Tritón) y se mezcló mediante agitación constante en Vortex durante 30 min a 4°C. La suspensión se sometió a sonicaciones de 15 s, con periodos de descanso de 10 s durante 1 minuto a 4°C. Finalmente, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 2 min para descartar los restos membranales y el sobrenadante correspondiente a extracto nuclear se recolectó.

Fraccionamiento celular (Envoltura nuclear)

Para la obtención de envoltura nuclear, primero se obtuvieron los núcleos de las células C2C12 y se resuspendieron en 1 ml de buffer A (Sacarosa 0.25M, 50mM de TrisHCl pH7.5, 25mM KCl, 5mM MgCl₂, 2mM DTT, Complete 1X, 0.5mM de PMSF): y se centrifugaron a 2,000 g (2,500 rpm) por 5 min a 4°C. Después, se resuspendieron en 1 ml de buffer C recién preparado (0.1 mM MgCl₂, 1mM DTT, Complete 1X, 5ug/ml de DNasa I, 5ug/ml RNasa A y 0.5mM PMSF) y se colocaron en un tubo de 15ml nuevo, se incubó a TA por 1 hora. Posteriormente, se adicionó por goteo, mientras se vortexeaba 1ml de buffer de extracción (buffer D1: 10% w/v sacarosa, 50mM Tris pH 7.5, 300mM de NaCl, 1mM DTT, Complete 1X, y 0.5mM PMSF). Se centrifugó a 4,000g por 15min a 4°C en un rotor de columpio, sobrenadante y pellet (envoltura nuclear). Se resuspendió el pellet en 4 ml de buffer de extracción (buffer D: 10% w/v sacarosa, 50mM Tris pH 8.5, 1mM DTT, Complete 1X, y 0.5mM PMSF). En un tubo se adicionó 4ml del colchón de sacarosa (30% sacarosa w/v, 50mM TrisHCl pH 7.5, 1mM DTT, Complete 1X, y 0.5mM PMSF) y sobre ella se añadió la solución anterior. Se centrifugaron a 4°C por 15 min a 4,000g en un rotor de columpio y se resuspendió la pastilla en 1 ml de buffer E frío (10% w/v sacarosa, 50mM Tris pH 7.5, 1mM DTT, Complete 1X, y 0.5mM PMSF). Se adicionaron 0.05ml de buffer E con 0.3mg/ml de heparina. Se incubó a 4°C por 1h.

En un tubo se adicionaron 4 ml de colchón de sacarosa (30% sacaros w/v, 50mM TrisHCl pH 7.5, 2mM DTT, Complete 1X, y 0.5mM PMSF y sobre ella la solución anterior. Se centrifugó a 4°C por 15 min a 4,000g en un rotor de columpio. Finalmente, la envoltura nuclear (pastilla) se resuspendió en buffer de lisis y se sonicó 4 veces a 5 micrones por 20s con intervalos de 1 min.

Fraccionamiento celular (Nucleoplasma)

La fracción nucleoplásmica, se obtuvo de acuerdo con [55], los núcleos purificados se resuspendieron en 1 ml de buffer frío 10% STM (10% w/v sacarosa, 50mM Tris pH 8.5, 5mM MgCl₂ 1mM DTT, Complete 1X, y 0.5mM PMSF) y se centrifugó a 2,000g por 15 min. El botón se resuspendió en 2ml de buffer hipotónico [20mM HEPES pH 7.9, 5mM KCl, 1.5mM DTT, 1X complete (Roche Applied Science) and 0.5 mM PMSF] y se homogenizó aplicando 20 golpes con el homogenizador de Dounce. Los homogenizados se centrifugaron a 6,300g por 15 min a 4°C. El botón se resuspendió en 2ml de buffer de extracción y se centrifugó a 100,000g por 45 min. Finalmente, se colectó el sobrenadante el cual corresponde al extracto nucleoplásmico.

Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford

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. Enseguida se adicionó el reactivo de Bradford (BIO-RAD) y se leyó 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.

Análisis de proteínas por electroforesis en geles desnaturizantes 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 H₂O, 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 H₂O, 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 la 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 por 1h con la solución desteñidora (45ml agua, 45ml metanol, 10ml ácido acético glacial). Para los ensayos de análisis de extractos totales de células eucariontes se cargaron de 50 µg de proteína por pozo, mientras que para el análisis de los extractos proteicos obtenidos de bacteria se usaron 5µg.

Inmunodetección en fase sólida

Una cantidad de 50 µg de extracto total de proteínas, correspondiente a cada una de las muestras se separó en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%. Posteriormente, las proteínas se sometieron a electrotransferencia durante 1 hora a 20V en una cámara semi-húmeda para transferirlas a membranas de nitrocelulosa, para lo cual se empleó 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 una solución de rojo 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 durante 1 noche a 4°C (Tabla 4). 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).

Obtención de lisados bacterianos

Los cultivos de bacterias competentes de la cepa *E. coli* BL21 se transformaron con los vectores pGEX-4T1 (expresa la proteína GST), pGEX-4T1- β -DG (expresa la proteína de fusión GST- β -DG) y pGEX4T1-MDsk (que expresa la proteína de fusión GST-MDsk). Posteriormente, se tomó una colonia aislada transformada con cada plásmido para inocular 4ml de medio LB con ampicilina, y el cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante durante 12 horas. Transcurridas las 12 horas, se realizó una dilución (1:40) del cultivo en 10ml de medio LB con ampicilina, se adicionó IPTG a una concentración de 1 mM y se incubó a 25°C con agitación constante hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.4. Los cultivos se centrifugaron a 10,000rpm por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió en 500 μ l de solución amortiguadora NETN con inhibidores [NaCl 100mM, Tris-HCl pH 7.5 20mM, EDTA 1mM, NP40 0.5%, PMSF 1mM, y la mezcla de proteasas Complete (Boehringer)]; en el caso de la proteína GST-MDsk se utilizó el buffer STE con sarcosyl [NaCl 100mM, Tris-HCl pH 7.5 20mM, EDTA 1mM, Sarcosyl 1.5%, PMSF 1mM, y la mezcla de proteasas Complete (Boehringer)]. La suspensión bacteriana se sometió a sonicación, dando 6 pulsos de 15 segundos a 3.5 micrones, y el lisado bacteriano que se obtuvo se clarificó mediante una centrifugación de 5 minutos a 13,000rpm.

Ensayos de interacción *in vitro* pulldown

Para realizar los ensayos de interacción de proteínas, cada lisado bacteriano se incubó durante toda la noche con perlas de glutatión sefarosa (Amersham Biosciences), con la finalidad de aislar a las proteínas recombinantes GST, y GST- β -DG. Después, las perlas se lavaron 3 veces utilizando 1000 μ l de la solución amortiguadora NETN sin inhibidores cada vez (cada lavado consistió en incubación de las perlas con 500 μ l de la solución amortiguadora NETN sin inhibidores durante

10 minutos con rotación y a 4°C, una centrifugación de 5 minutos a 3,000rpm y una aspiración del sobrenadante). A la pastilla resultante que contiene las perlas se le adicionó 50µl de la solución NETN. Para probar la interacción *in vitro* de la proteína β-DG con la exportina CRM1, se mezclaron 5µg de la proteína recombinante, capturada en las perlas, con 500µg de lisado total de las células C2C12, y se dejaron interaccionando durante toda la noche con rotación a 4°C. Finalmente, las perlas se lavaron tres veces con la solución RIPA que contiene Tritón al 0.2% como detergente único, y las proteínas que se mantuvieron unidas se analizaron mediante electroforesis e inmunodetección en fase sólida, utilizando los anticuerpos apropiados.

Inmunofluorescencia indirecta

Se esterilizaron cubreobjetos de 20mm x 20mm, con alcohol y flama de mechero. Las células crecidas a una confluencia de 80% se resuspendieron en 1ml de medio de cultivo y a cada cubreobjetos se les agregó 50µl de la suspensión celular y 200µl de medio de cultivo, y se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio el cultivo y se lavaron los cubreobjetos tres veces con PBS.

Se fijaron las células con 200µl de paraformaldehído al 4% en PBS por 10 minutos. Enseguida, se lavaron tres veces con PBS. Posteriormente, las células se permeabilizaron con 200µl 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 cubreobjetos bloqueados se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario (ver tabla 1) 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 (dilución 1:50 en PBS) durante una hora en cámara húmeda. Para teñir los núcleos celulares se adicionaron 50µl de una solución de DAPI a cada cubreobjetos (dilución de 1:600 en PBS a partir de un stock de 0.1µg/µl, SIGMA), y se dejaron incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, los cubreobjetos se enjuagaron tres veces con PBS y se dejaron escurrir. En

portaobjetos limpios se añadieron 8µl de Vectashield (Vector Laboratorios) y se colocaron los cubreobjetos para proceder con el sellado. Finalmente, las preparaciones se observaron mediante Microscopía Confocal.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo primario	Origen	Naturaleza	Proteína detectada	Dilución IF	Dilución WB	Referencia
Anti-β-catenina	Conejo	Policlonal	β-catenina	1:200	-	Transduction
Anti- β-DG (7D11)	Ratón	Monoclonal	β-DG	1:50	1:500	Santa cruz Biotechnology
Anti- β-DG (MANDAG)	Ratón	Monoclonal	β-DG	-	1:250	[56]
Anti- β-DG (C20)	Cabra	Policlonal	β-DG	1:15	-	Santa cruz Biotechnology
Anti- β-DG (JAF)	Conejo	Policlonal	β-DG	1:40	-	[57]
Anti- fosfo-β-DG (pTyr893)	Ratón	Monoclonal	β-DG fosforilado	1:50	1:500	Novus Biologicals
Anti-γ-tubulina (GTU-88)	Ratón	Monoclonal	γ-tubulina	1:150	-	Sigma aldrich
Anti-Actina	Ratón	Monoclonal	Actina	-	1:500	Dr. Manuel Hernández
Anti-Calnexina	Conejo	Policlonal	Calnexina	-	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-CRM1 (NB100-79802)	Conejo	Policlonal	CRM1	1:250	1:4000	Novus Biologicals
Anti-Emerina	Conejo	Policlonal	Emerina	1:150	1:4000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Fibrilarina (ab5821)	Conejo	Policlonal	Fibrilarina	1.50	-	Abcam
Anti-GAPDH	Ratón	Monoclonal	GAPDH	-	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GFP (FL)	Conejo	Policlonal	GFP	-	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GST (B-14)	Ratón	Monoclonal	GST	-	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Lámina A/C (H-110)	Conejo	Policlonal	Lámina A/C	-	1:4000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Lámina A/C (ab8984)	Ratón	Monoclonal	Lámina A/C	1:250	-	Abcam
Anti-Lámina B1 (ab16048)	Conejo	Policlonal	Lámina B1	1:200	1:2000	Abcam

Restricción enzimática de DNA

En un microtubo de 0.6ml se colocaron 500ng de plásmido, 0.5µl de la enzima de restricción correspondiente, 1µl de la solución amortiguadora recomendada para cada enzima y se agregó agua desionizada para alcanzar un volumen final de 10µl

con. La reacción se dejó toda la noche a la temperatura apropiada para cada enzima. Los productos se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Ligación de DNA

En un microtubo de 0.6ml se agregaron 100ng de DNA plasmídico restringido, y una cantidad del fragmento de DNA por ligar equivalente a una relación molar de 1:3, solución amortiguadora de ligación al 1X, 1.5U de ligasa T4 (Invitrogen), y se aforó 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 un cultivo de células competentes de la cepa de *E. coli* DH5α.

Preparación de células competentes utilizando CaCl₂

Se sembró en una caja de agar LB la cepa *E. coli* TOP-10 durante 16 horas a 37°C, en seguida se tomó una colonia y se transfirió a 100ml de LB incubando a 37°C por 4 horas con agitación a una velocidad de 300 ciclos/minuto. Se cuidó que el cultivo no excediera la relación de 10⁸células/ml, mediante su monitoreo a OD₆₀₀ cada 30 minutos. Posteriormente, se transfirió en condiciones de esterilidad el cultivo a dos tubos falcon de 50ml estériles y se colocaron durante 10 minutos en hielo. En seguida, se centrifugó a 4,000rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón bacteriano con 5ml de 0.1mM de CaCl₂. Se dejó incubando 5 minutos en hielo y se centrifugó a 4,000rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón bacteriano con 1ml de CaCl₂. Finalmente, se colocaron alícuotas de 200µl en microtubos de 1.5ml.

Transformación bacteriana

En microtubos de 1.5ml se colocaron 50µl de la suspensión de bacterias competentes, se adicionó 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 regresó al hielo por 2 minutos. Se adicionaron 800 µl de medio LB y se incubó la mezcla a 37°C por 1 hora con agitación constante. Se tomaron 70µl del cultivo total y

se transfirieron a placas de agar LB (1% peptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl) suplementado con el antibiótico de elección (100 µg/ml de ampicilina; 50 µg/ml de kanamicina). Finalmente, las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

Extracción y purificación de plásmidos

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 microtubo de 1.5 ml 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 microtubo nuevo 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 buffer 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%.

Obtención de DNA plasmídico a mediana escala (MIDIPREP)

Para realizar la purificación del plásmido a mediana escala, se siguió el protocolo establecido por 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).

Mutagénesis sitio dirigida

Se llevó a cabo el ensayo de mutagénesis sitio dirigida con la finalidad de cambiar algunos aminoácidos de carácter hidrofóbico presente en la señal de exporte nuclear de la proteína β -DG.

Fosforilación de los Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se resuspendieron en agua para obtener una concentración de 100pmoles/ μ l. En un microtubo de 0.6ml se colocó 1 μ l de oligonucleótido desfosforilado, solución amortiguadora 1X, 10U de la enzima T4 polinucleótido cinasa, 1mM de ATP y se aforó a 25 μ l con agua desionizada. La mezcla se incubó por 30 minutos a 37°C y posteriormente por 10 minutos a 65°C para inactivar la cinasa.

Reacción en cadena de la DNA Polimerasa

Para cada uno de los oligonucleótidos (sentido-antisentido) se preparó la siguiente reacción: en un tubo de microfuga de 100 μ l se colocó la solución amortiguadora de la polimerasa Herculasa 1X, 0.2mM dNTP's, 1.5mM MgCl₂, 250ng de la cadena molde de DNA, 10pmoles del oligonucleótido fosforilado, 1.25U de la DNA polimerasa Herculasa. Se mezclaron los componentes y las reacciones se colocaron en el termociclador con el siguiente programa: un calentamiento a 95°C por 5 minutos, seguido de 5 ciclos de 95°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto y 72°C por 15 minutos, finalizando con un ciclo de 72°C por 10 minutos. Enseguida, se juntaron ambas reacciones (sentido-antisentido) y se dejaron en el termociclador 25 ciclos más bajo el mismo programa.

Digestión de la cadena molde con la enzima DpnI

La enzima DpnI (endonucleasa 5'-Gm⁶ATC-3' guaninas metiladas) es específica para digerir el DNA metilado y hemimetilado (DNA molde), dejando el DNA generado en la reacción de PCR que contiene la mutación deseada.

Para la digestión de la cadena molde se agregó directamente a la reacción de PCR 1.5µl de la enzima DpnI y se incubó a 37°C durante 2 horas.

Purificación del producto a través de corte de rebanada de gel.

Se preparó un gel de agarosa al 1%, en el cual se colocó toda la reacción de digestión, se dejó correr el gel a un voltaje constante de 90V durante 40 minutos. Posteriormente, se cortó la rebanada del gel que contiene al fragmento de DNA de interés, y se purificó mediante el kit PureLink (Invitrogen).

Obtención y análisis de los candidatos

El producto purificado se sometió a una reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa durante toda la noche a 14°C. Posteriormente, se utilizó toda la reacción de ligación para transformar bacterias supercompetentes *E. coli* TOP-10 preparadas por el método de CaCl₂. Los candidatos se analizaron a través de restricción enzimática con las enzimas *EcoRI* y *SaII* y posteriormente mediante secuenciación automatizada.

Secuenciación Automatizada de DNA

Obtención de productos de extensión marcados

En un volumen final de 20µl se mezclaron 1µg de DNA plasmídico, 20 picomoles de oligonucleótido específico, 2µl de la reacción de secuenciación y 2 µl 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 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60°C por 4 minutos, finalizando con un ciclo de extensión de 10 minutos a 60°C.

Purificación de los productos por precipitación con EDTA

Al producto final de la reacción de PCR se le agregó 5µl de EDTA 125mM y 60µl 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°C. Se retiró el

sobrenadante y se adicionó 60 μ l de etanol al 70%. Se centrifugó a 10,000rpm por 10 minutos a 4°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

El β -DG puede translocarse entre el núcleo y el citoplasma

Dado que el β -DG se localiza tanto en la membrana plasmática y en el núcleo, es probable que sea una proteína que presente transporte nucleocitoplasmático con una vía de exporte funcional. Para evaluar si β -DG posee un mecanismo de exporte nuclear dependiente de la exportina1/CRM1, se evaluó el efecto de un inhibidor específico de la exportina CRM1, la leptomicina (LMB), sobre la localización subcelular de β -DG en mioblastos C2C12 a través de microscopía confocal, utilizando tres distintos anticuerpos dirigidos contra el dominio C-terminal de β -DG que reconocen: β -DG no fosforilado (7D11), β -DG total (C20), y al β -DG fosforilado en el residuo Tyr892 (pTyr⁸⁹²). La efectividad del tratamiento se evaluó utilizando una NES clásica presente en la proteína Rev, del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1, fusionada a GFP (GFP-Rev-NES) como control positivo. Como se esperaba, GFP-Rev-NES se relocalizó del citoplasma al núcleo en respuesta al tratamiento con LMB (Figura 5A), confirmando que el exporte nuclear mediado por CRM1 fue bloqueado de manera eficiente. Observamos una notable acumulación de β -DG en el núcleo ante el tratamiento con LMB, usando cualquiera de los tres anticuerpos anti- β -DG, lo que indica que β -DG presenta exporte nuclear independientemente de su fosforilación (Figura 5B).

Para sustentar estas observaciones con evidencia bioquímica, los mioblastos C2C12 fueron fraccionados en extractos citoplasmáticos y nucleares, y las fracciones celulares se sometieron al análisis por SDS-PAGE/WB utilizando anticuerpos anti- β -DG. Consistente con los datos observados en la microscopía confocal, en las células

tratadas con LMB se encontraron incrementos significativos en los niveles nucleares de β -DG, en comparación con las células tratadas únicamente con el vehículo. (Figura 5C), con análisis cuantitativos del cociente núcleo/citoplasma (n/c) de 0.9 y 2.3 para el control y las células tratadas con LMB respectivamente. Para demostrar la pureza de las fracciones núcleo y citoplasma se utilizaron como controles las proteínas lámina A/C y calnexina respectivamente.

En el mismo contexto, se expresó de manera ectópica la proteína de fusión GFP- β -DG observando una acumulación nuclear significativa en células tratadas con LMB en comparación con las células control (Figura 5D), con una relación de fluorescencia núcleo/citoplasma (Fn/c) de 2.5 y 1.0 respectivamente.

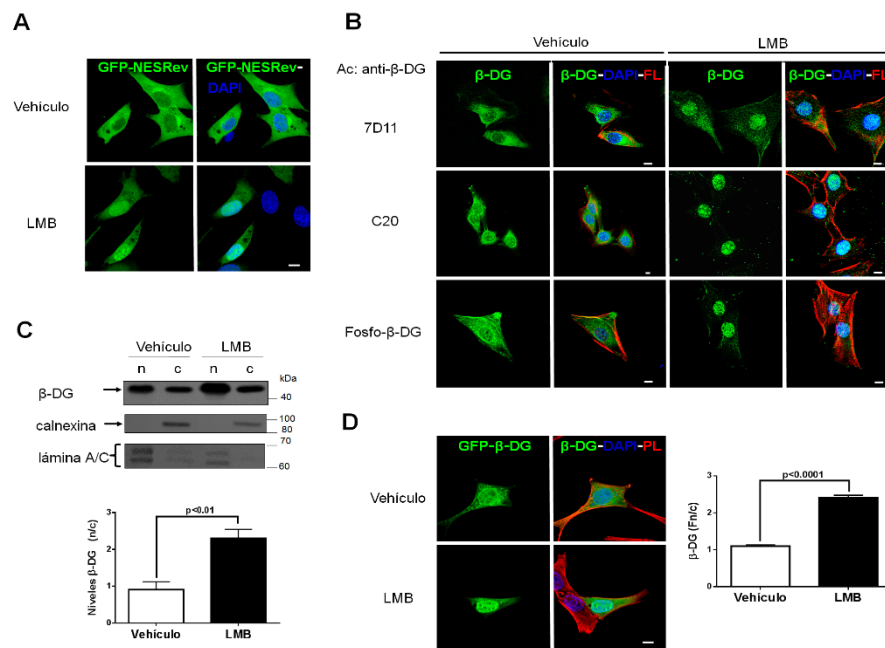


Figura 5. El transporte núcleocitoplasmático del β -DG en C2C12 es impedido por la LMB. (A) Los mioblastos C2C12, se transfectaron transitoriamente para expresar a las proteínas de fusión GFP o GFP-NESRev y después de 12 h se trataron con 50 nM de LMB, diluida en etanol al 70% o únicamente etanol al 70% (vehículo) durante 24h. Las células se tiñeron con DAPI (azul) para visualizar los núcleos y se analizaron mediante microscopía confocal. (B) Los mioblastos C2C12 se cultivaron y se trataron con LMB como se describió arriba, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta con tres diferentes anticuerpos primarios dirigidos contra β -DG (verde). Las células se contratiñeron con faloidina (PL) y DAPI para visualizar el citoesqueleto de actina y los núcleos respectivamente, y se analizaron mediante microscopía confocal. (C) Las células C2C12 se trataron con LMB o con el vehículo previo a la obtención de extractos nucleares (n) y citoplásmicos (c), las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se realizó la inmunodetección usando el anticuerpo 7D11

anti- β -DG. Los valores del β -DG se normalizaron con los obtenidos para las proteínas calnexina y lámina A/C marcadores de citoplasma y núcleo respectivamente y se determinó la relación n/c del β -DG. Los resultados representan el promedio \pm -SEM de tres experimentos independientes, la diferencia significativa se indica con el valor de p . (D) Los mioblastos C2C12, se transfectaron transitoriamente para expresar sa las proteínas de fusión GFP o GFP- β -DG y después de 12 h se trataron con LMB, diluida en etanol al 70% o únicamente etanol al 70% (vehículo), descrito arriba. Las células se tiñeron el citoesqueleto de actina (rojo) y el núcleo (azul), descrito arriba y se analizaron mediante microscopía confocal y se cuantificó la relación de intensidad de fluorescencia entre el núcleo y el citoplasma (Fn/c) mediante el software Fiji. Escala 10 μ m. Los tratamientos con LMB ocasionan la acumulación nuclear de la proteína β -DG endógena y ectópicamente expresada tanto en mioblastos de ratón C2C12

Para determinar si el transporte nuclear es un mecanismo natural regulatorio de β -DG, en lugar de un proceso específico relacionado con la inmortalización de los mioblastos C2C12; se analizó la distribución subcelular en cultivos primarios de mioblastos de ratón antes y después del tratamiento con LMB, utilizando un anticuerpo que reconoce al β -DG total (JAF). Como era esperado, la proteína β -DG claramente se acumuló en el núcleo de los mioblastos primarios en respuesta al tratamiento con LMB (Figura 6), con valores de Fn/c de 1.3 y 2.4 para células control y tratadas con LMB correspondientemente. En general estos resultados son consistentes con la idea de que la proteína β -DG y su forma fosforilada experimenta un transporte nuclear dependiente de la exportina CRM1 en mioblastos.

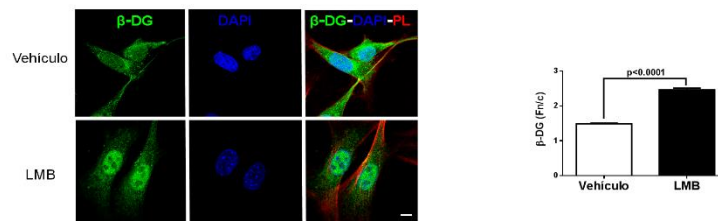


Figura 6. **El transporte núcleocitoplasmático del β -DG en cultivos primarios de mioblastos de ratón, es impedido por la LMB.** Los mioblastos primarios de ratón fueron sembrados sobre cubreobjetos inmunotiñeron para β -DG (verde) y se contratiñeron para el citoesqueleto de actina (rojo) y el núcleo (azul), descrito arriba y se analizaron mediante microscopía confocal y se cuantificó la relación de intensidad de fluorescencia entre el núcleo y el citoplasma (Fn/c). Las imágenes representan cortes en Z de microscopía confocal, y los resultados representan el promedio \pm -SEM ($n > 50$) de tres experimentos independientes, las diferencias significativas se indican con los valores de p . Escala = 10 μ m.

La exportina CRM1 media el transporte nuclear de β -DG al reconocer una NES presente en su dominio transmembranal

La exportina CRM1 reconoce señales de transporte nuclear (NES), las cuales incluyen generalmente 4 o más aminoácidos hidrofóbicos, generalmente leucinas, espaciados entre sí [34, 35]; por lo tanto, se analizó la secuencia aminoacídica de β -DG para identificar la señal responsable del transporte nuclear de β -DG, a través del programa NetNES 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>). Este análisis mostró una NES putativa, localizada en el dominio transmembranal de β -DG, dentro de los aminoácidos ⁷⁶³I LL I AG I IAM⁷⁷². Esta secuencia exhibe cierta conservación entre las proteínas ortólogas de diferentes especies (Figura 7A), sugiriendo que el transporte nuclear de β -DG ha sido preservado a través de la evolución. Para evaluar la funcionalidad de la NES, fusionamos la NES de β -DG a la proteína heteróloga GFP, para determinar si la NES por sí sola es capaz de mediar el transporte nuclear de la GFP. Los mioblastos C2C12 fueron transfectados transitoriamente para expresar las proteínas GFP-NES β -DG o GFP como control (Figura 7B), y se examinó la distribución subcelular de las proteínas de fusión mediante microscopía confocal. La proteína GFP se localizó tanto en citoplasma como en el núcleo, presentando una señal más alta en el núcleo, y mantuvo la misma localización después del tratamiento con LMB (Figura 7C), con Fn/c de 1.5 y 1.48 para el control y las células tratadas con LMB respectivamente. Por el contrario, la proteína GFP-NES β -DG se localizó tanto en núcleo como en citoplasma, pero se relocalizó en el núcleo con el tratamiento de LMB (Figura 7C), con cocientes Fn/c de 1.0 y 1.5 correspondientemente. Estos resultados indican que la NES putativa de β -DG fue suficiente para exportar del núcleo a la GFP, y esta vía de transporte es sensible a LMB.

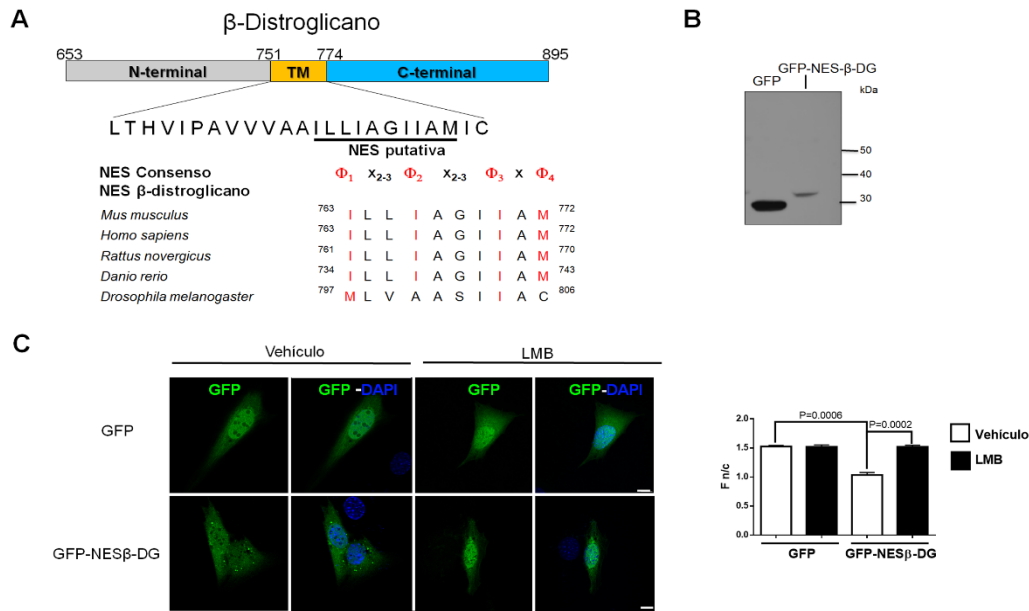


Figura 7. Identificación y caracterización funcional de la señal de exporte nuclear en β-DG. (A) Representación esquemática del β-DG en donde se muestra la NES en el dominio TM. Comparación de la NES de β-DG con la NES consenso y su alineamiento con las secuencias ortólogas de β-DG de diferentes especies. En la secuencia consenso de la NES, la X indica cualquier aminoácido y Φ indica un residuo hidrofóbico, como leucina, isoleucina, valina o metionina. La NES putativa de β-DG está altamente conservada entre las especies. (B) Los mioblastos C2C12 expresando de manera transitoria las proteínas GFP o GFP fusionada a la NES de β-DG (GFP-NES-β-DG) fueron analizadas por WB utilizando el anticuerpo anti-GFP. (C) Los mioblastos C2C12 que expresan GFP o GFP-NES-β-DG sembrados sobre cubreobjetos y 12 post-transfección se incubaron por 24h con 50nM de LMB o el vehículo como se describe en la Figura 1. Las células se fijaron, se tiñeron con DAPI (azul) para visualizar los núcleos y se analizaron por microscopía confocal. Escala = 10 μ m. Se cuantificó la relación de intensidad de fluorescencia entre el núcleo y el citoplasma (Fn/c) de GFP y de GFP-NES-β-DG mediante el software Fiji. Las imágenes representan cortes en Z de microscopía confocal, y los resultados representan el promedio \pm SEM (n>50) de tres experimentos independientes, las diferencias significativas se indican con los valores de *p*. Escala = 10 μ m.

Se conoce que los aminoácidos hidrofóbicos presentes dentro de las NES son un requisito para el exporte de las proteínas [34, 35]; por lo tanto, para identificar los aminoácidos claves en la NES de β-DG, generamos tres mutaciones puntuales (I763A/L764A/L765A) en el contexto de la proteína completa de β-DG fusionada a GFP. Posteriormente, los mioblastos C2C12 fueron transfectados de manera transitoria para expresar a las proteínas GFP-β-DG o la variante mutante GFP-β-DG-NESm (Figura 8A), y se analizó a través de microscopía confocal la distribución celular de las proteínas de fusión. De manera sorprendente, en contraste con la

distribución de la proteína GFP- β -DG entre el citoplasma y el núcleo, la variante mutante de la NES presentó una superior acumulación nuclear (Figura 9B), con cocientes de Fn/c de 1.0 y 2.5 respectivamente. La clara implicación de este resultado, es que la triple mutación en los aminoácidos hidrofóbicos ocasiona que la NES no pueda ser reconocida por la exportina CRM1. Por otro lado, el tratamiento con LMB no produce incremento en la localización nuclear de la proteína GFP- β -DG-NESm (Figura 8B), lo que indica que la NES localizada en el dominio transmembranal es la principal secuencia para el exporte nuclear de β -DG.

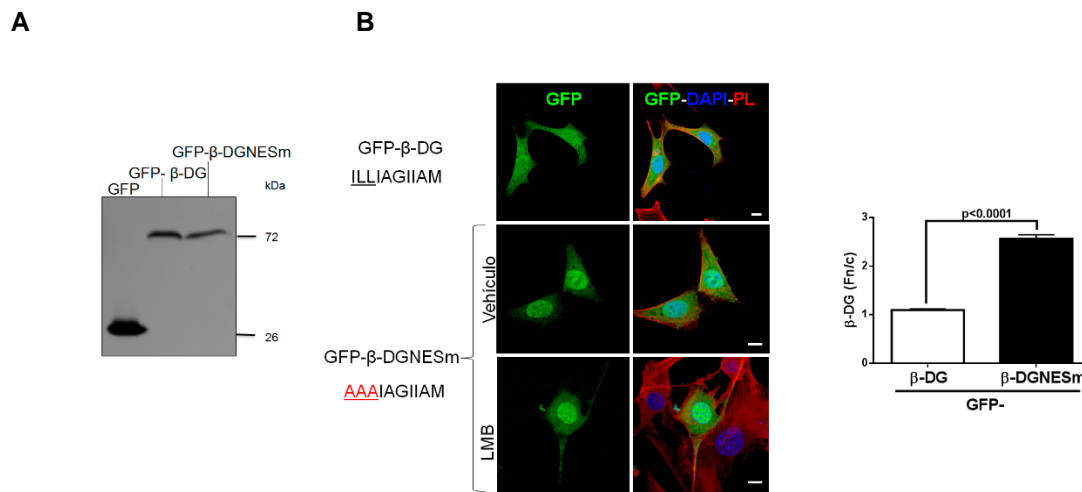


Figura 8. **La NES localizada en el dominio transmembranal de β -DG es funcional.** (A) Los mioblastos C2C12 expresando de manera transitoria las proteínas GFP- β -DG o GFP- β -DG NESm fueron analizadas por WB utilizando el anticuerpo anti-GFP. (B) Los mioblastos C2C12 que expresan GFP- β -DG o GFP- β -DG NESm sembrados sobre cubreobjetos y 12 post-transfección se incubaron por 24h con 100nM de LMB o el vehículo como se describe en la Figura 1. Las células se fijaron, se tiñeron con DAPI (azul) para visualizar los núcleos y se analizaron por microscopía confocal. Escala = 10 μ m. Se cuantificó la relación de intensidad de fluorescencia entre el núcleo y el citoplasma (Fn/c) de GFP- β -DG o GFP- β -DG NESm mediante el software Fiji. Las imágenes representan cortes en Z de microscopía confocal, y los resultados representan el promedio \pm SEM (n>50) de tres experimentos independientes, las diferencias significativas se indican con los valores de p . Escala = 10 μ m.

Para demostrar de manera directa la interacción *in vitro* de β -DG con la exportina CRM1, se realizaron ensayos tipo pull-down, en donde se expresaron en bacteria las proteínas recombinantes GST y GST- β -DG (Figura 9A), se purificaron y se inmovilizaron en perlas de Sefarosa antes de la incubación con los lisados celulares C2C12 y el subsecuente análisis por WB. Consistente con los resultados de

microscopía confocal, se encontró que la exportina CRM1 se une a GST- β -DG pero no a GST sola, señalando la especificidad de la interacción. Para confirmar que β -DG se une a la exportina CRM1 en un contexto fisiológico y que dicha interacción ocurre a través de la NES, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación en células intactas utilizando la técnica de GFP-Trap. GFP- β -DG, pero no la GFP sola, inmunoprecipitó a la exportina CRM1 endógena de los lisados de las células C2C12 transfectadas transitoriamente, y de manera notable, la proteína GFP- β -DG-NESm, que es deficiente en el transporte nuclear, fue incapaz de interactuar con la exportina CRM1 (Figura 9B). Todos estos resultados indican que CRM1 es el transportador del transporte nuclear de β -DG en células vivas y que la NES localizada en el dominio transmembranal es reconocida por CRM1.

Para finalizar de demostrar la dependencia del transporte nuclear de β -DG sobre la exportina CRM1, analizamos el impacto de la disminución de los niveles proteicos de la exportina CRM1, sobre la localización subcelular de β -DG. Para este fin, los mioblastos C2C12 se transfectaron establemente con un vector que expresa un pequeño RNA interferente (RNAi) diseñado contra el RNAm de CRM1 o un control negativo de RNAi que se sabe que no bloquea la expresión de ningún gen en específico. Se realizó un análisis por WB de los lisados obtenidos de células transfectadas con cada uno de los RNAi (Figura 9C), y el análisis cuantitativo mostró que el RNAi dirigido contra CRM1 disminuyó los niveles proteicos alrededor de un 60%. Por otro lado, encontramos una acumulación nuclear de la proteína β -DG en células deficientes de la exportina CRM1 en comparación con las células con el RNAi control (Figura 9D), con el análisis cuantitativo se corroboraron estas observaciones (Fn/c of 1.0 y 4.5 para las células que expresan el RNAi control y el RNAi de la exportina CRM1 correspondientemente). En conclusión, β -DG es translocado del núcleo al citoplasma a través de la exportina CRM1. Para nuestro conocimiento, β -DG representa un único ejemplo de proteína de membrana nuclear interna con una vía de transporte funcional. Encontramos que la fracción nucleoplásmica de β -DG es la que presenta transporte nuclear, mientras que la fracción de β -DG unida a la envoltura nuclear permanece inaccesible para la exportina CRM1 (Figura 9E). Estos resultados

indican la existencia de un mecanismo molecular que permita al β -DG llegar al nucleoplasma para que la exportina CRM1 pueda reconocerlo y exportarlo del núcleo. Elucidar dichos mecanismos requieren de mayor investigación [58].

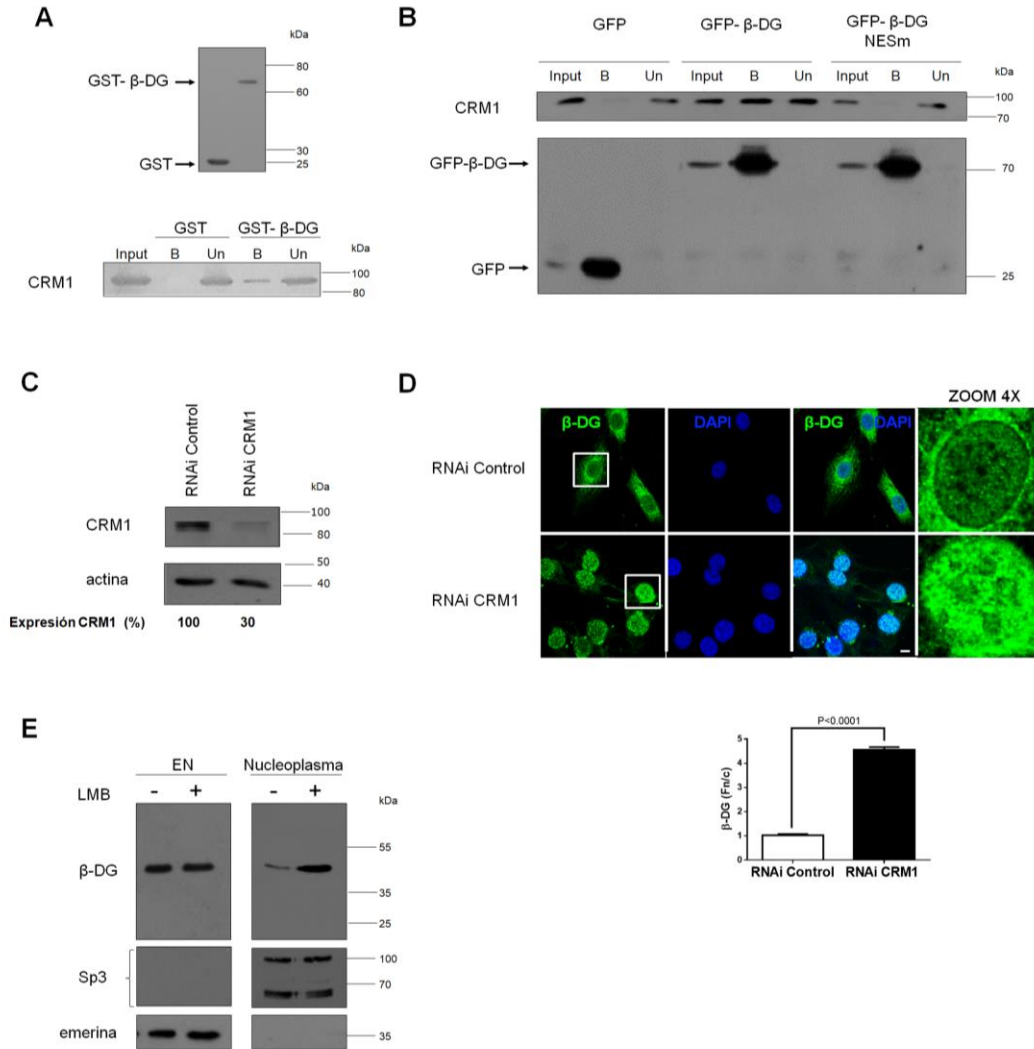


Figura 9. El exporte nuclear de β -DG es dependiente de la exportina CRM1. (A) Las proteínas GST y GST- β -DG expresadas en bacteria se visualizaron mediante SDS-PAGE/WB (panel superior). La interacción entre β -DG y la exportina CRM1 se determinó por pull down y análisis SDS-PAGE/WB utilizando lisados totales de mioblastos C2C12 y el anticuerpo dirigido contra la exportina CRM1 (panel inferior). Los inputs corresponden al 5% de los extractos antes del pull-down. B, fracción unida; Un, fracción no unida. (B) Interacción de la exportina CRM1 con β -DG en células vivas. Los lisados de los mioblastos C2C12 que expresan GFP- β -DG o GFP- β -DG NESm se inmunoprecitaron utilizando el sistema GFP-trap y las proteínas precipitadas se analizaron a través de SDS-PAGE/WB utilizando los anticuerpos dirigidos contra las proteínas CRM1 y GFP. Los inputs corresponden al 5% de los lisados antes de la inmunoprecipitación. IP, fracción inmunoprecipitada; Un, fracción no unida. (C) Los mioblastos C2C12 se transfectaron establemente con los vectores que expresan un RNAi irrelevante (RNAi control) o un RNAi diseñado contra el RNAm de la exportina CRM1 (RNAi). La expresión de la

exportina CRM1 se analizó mediante SDS-PAGE / WB usando anticuerpos contra CRM1 o actina (control de carga). Los niveles proteicos de la exportina CRM1 se determinaron por análisis densitométrico (panel inferior). Los datos representan la media \pm SEM de cuatro experimentos separados, con el valor de p que denota la diferencia significativa (prueba de t Student no pareada) (D) La disminución de los niveles proteicos de la exportina CRM1 afecta el exporte nuclear de β -DG. Los mioblastos C2C12 que expresan de forma estable los RNAi control o RNAi CRM1 fueron inmunoteñidos para el β -DG y contrateñidos con DAPI para la visualización de núcleos. Se realizó el análisis con CLSM, se muestran imágenes representativas con las secciones ópticas en Z; escala 10 μ m. La relación de Fn/c de β -DG (panel inferior) se midió como se describe en la Figura 1D. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes ($n > 50$ células), el valor p que denota la diferencia significativa (prueba t de Student no pareada). El exporte nuclear de β -DG es mediado por la exportina CRM1. (E) Células C2C12 tratadas con LMB o vehículo solo (etanol) como en la Figura 1, se fraccionaron para obtener extractos de nucleoplasma o de envoltura nuclear (EN). Los extractos proteicos fueron analizados por SDS-PAGE/WB utilizando anticuerpos anti- β -DG. Las membranas fueron reprobadas con Sp3 y emerina, como control de pureza de nucleoplasma y envoltura nuclear respectivamente.

La alteración en el exporte nuclear de β -DG afecta los niveles proteicos y la localización en la envoltura nuclear de lámina B1 y emerina pero no de lámina A/C

Debido a los resultados previos, parece ser que los niveles nucleares de β -DG están estrictamente regulados por el equilibrio de los mecanismos de importe/exporte nuclear. Por lo tanto, anticipamos que la acumulación anormal de β -DG en el núcleo podría alterar la organización de la envoltura nuclear [22]. Para probar esta hipótesis, analizamos el impacto de la acumulación nuclear de β -DG endógeno, a través del uso de LMB, sobre la distribución de las proteínas de envoltura nuclear (Figura 10A). Las células tratadas con el vehículo presentaron la inmunotinción típica para las tres proteínas de envoltura nuclear analizadas (emerina, láminas A, C y B1), las cuales se encuentran principalmente en la periferia nuclear con tinción discreta en el nucleoplasma. Como se esperaba, la acumulación nuclear de β -DG resultó en la alteración de la localización de las tres proteínas de envoltura nuclear analizadas, las células tratadas presentaron una disminución (lámina A/C y emerina) o ausencia (lámina B1) en la tinción de la periferia nuclear y se observó un incremento en la tinción intranuclear (nucleoplasma), como se muestra en el perfil de intensidad.

Para probar directamente que la localización aberrante de las proteínas de envoltura nuclear se debe a la acumulación nuclear de β -DG en lugar de cualquier otra(s)

proteína(s) exportada(s) por CRM1, se transfectaron transitoriamente los mioblastos C2C12 para sobreexpresar GFP- β -DG o variante mutante deficiente en el transporte nuclear GFP- β -DG NESm (Figura 10B).

Se observó el marcaje característico de las tres proteínas de envoltura nuclear en la mayoría de las células que expresaron tanto GFP sola como GFP- β -DG, con localización subcelular principalmente en la periferia nuclear con una homogénea señal en nucleoplasma y sin señal en citoplasma (Figura 10B). Un pequeño número de células transfectadas con GFP- β -DG presentaron una disminución en la tinción de la envoltura nuclear con agregados fuera del núcleo. Por otro lado, la mayoría de las células que expresaron GFP- β -DG NESm presentaron alteración en el marcaje de lámina B1 y emerina, con una disminución en la señal de la envoltura nuclear y nucleoplasma, y una señal residual localizada como agregados fuera del núcleo (Figura 11B). El conteo de las células reveló que el 78% de las células que expresaron GFP- β -DG NESm presentaron localización subcelular aberrante de emerina, comparado con 5% y 10% encontradas en las células que expresaron GFP y GFP- β -DG respectivamente; de manera similar, se encontró que el 82% de las células transfectadas con GFP- β -DG NESm presentan una distribución anormal de lámina B1, en comparación con 16% y 27% observadas en las células que expresan GFP y GFP- β -DG respectivamente (Figura 10B). Con respecto a lámina A/C no presentó alteración en su distribución subcelular, en las células que expresan GFP- β -DG NESm, lo cual sugiere que la acumulación nuclear de β -DG afecta específicamente a las proteínas de envoltura nuclear emerina y lámina B1, como se ha observado en las células deficientes en β -DG [22].

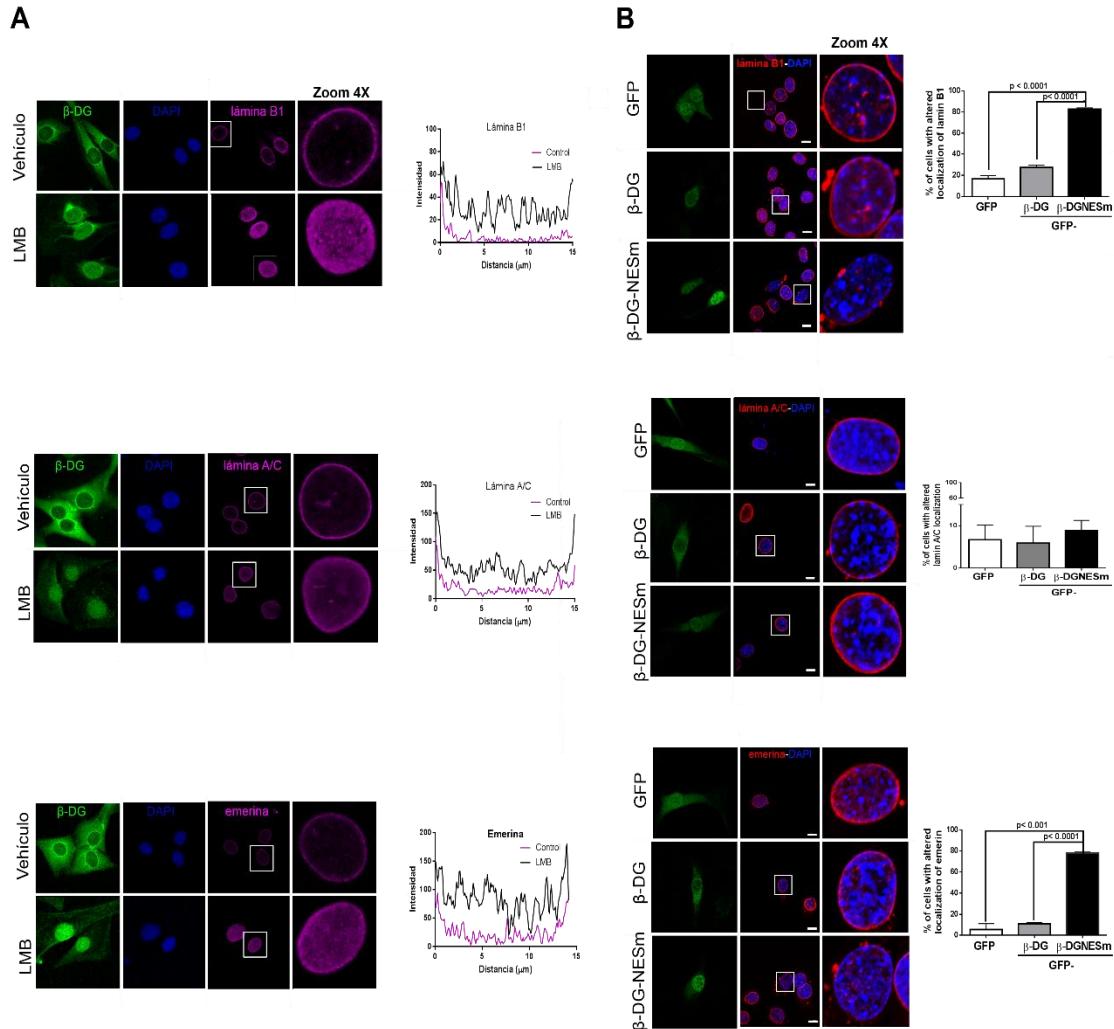


Figura 10. **La acumulación nuclear de β -DG afecta la localización subcelular de las proteínas de envoltura nuclear.** (A) Inmunofluorescencia indirecta dirigida a β -DG (verde) y las proteínas de envoltura nuclear (magenta) en células C2C12 tratadas con LMB. (B) Mioblastos C2C12 transfectados previamente con GFP, GFP- β -DG y GFP- β -DG NESm, se realizó inmunofluorescencia dirigida a las proteínas de envoltura nuclear. Las imágenes representan cortes en Z de microscopía confocal, y los resultados representan el promedio \pm SEM ($n > 50$) de tres experimentos independientes, las diferencias significativas se indican con los valores de p . Escala = 10 μ m.

Para evaluar si la deslocalización de las proteínas de envoltura nuclear impacta en sus niveles proteicos, se realizaron lisados de células C2C12 con transfección estable para expresar GFP, GFP- β -DG o GFP- β -DG NESm, los cuales fueron analizados por WB con anticuerpos específicos para cada proteína de envoltura nuclear. El análisis cuantitativo del inmunoblot se realizó empleando como control de carga a la proteína calnexina, revelando que la acumulación nuclear de β -DG resulta en una disminución de los niveles de lámina B1 (~45%),

emerina (~55%) y lámina A (~33%), pero no para lámina C (Figura 11A). Debido a que la expresión del RNAm de cada una de las proteínas de envoltura nuclear no se encuentran alteradas por la variante mutante (Figura 11B), parece ser que el mecanismo por el cual disminuyen los niveles de emerina, lámina B1 y lámina A es post-traduccional.

El β -DG nuclear se une a emerina, láminas A/C y B1 para formar parte del complejo en la envoltura nuclear [22]. Por lo tanto, examinamos si la variante mutante de β -DG con el exporte nuclear deficiente mantiene la capacidad de interactuar con estas proteínas de envoltura nuclear. Los ensayos de inmunoprecipitación basados en GFP muestra que ambas proteínas GFP- β -DG y GFP- β -DGNESm pero no GFP, inmunoprecipitan a las proteínas emerina, láminas A/C y B1 con una eficiencia similar (Figura 11C).

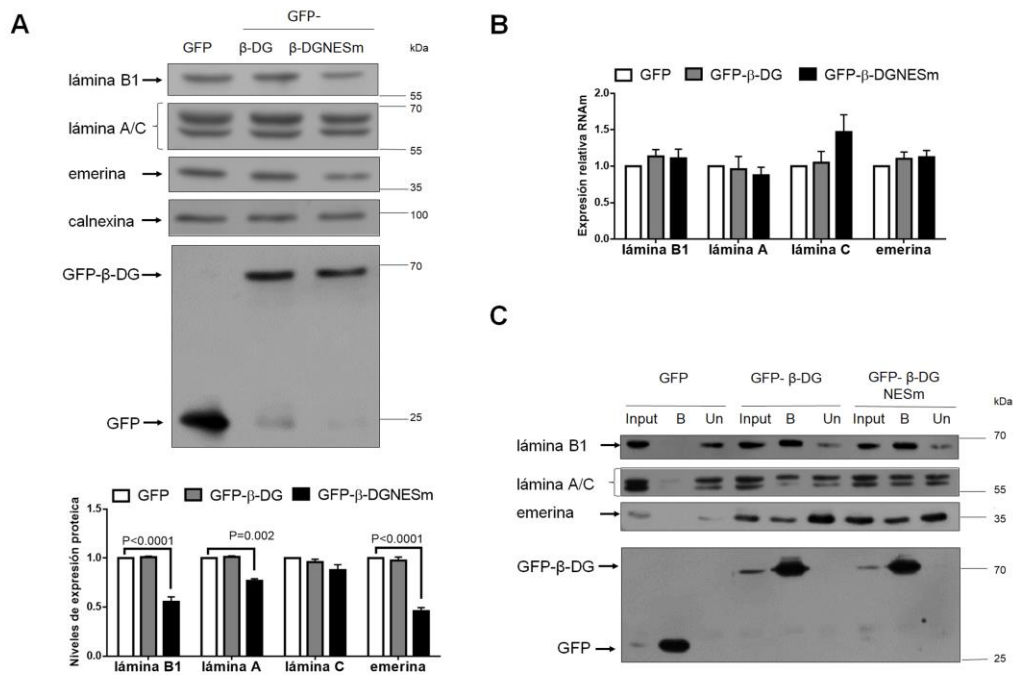


Figura 11. La sobre-expresión de β -DG nuclear afecta los niveles proteicos de las proteínas de envoltura nuclear. (A) Extractos totales de mioblastos C2C12 transfectados de manera estable con las proteínas GFP, GFP- β -DG y GFP- β -DGNESm y se analizaron los niveles proteicos de las proteínas de envoltura nuclear mediante SDS-PAGE/WB. (B) qRT-PCR para analizar los niveles de RNAm de las proteínas de envoltura nuclear. (C) GFP-Trap para evaluar la interacción de las proteínas GFP, GFP- β -DG y GFP- β -DGNESm con las proteínas de envoltura nuclear.

La acumulación nuclear de β -DG afecta procesos mediados por emerina

Para probar la hipótesis de que la acumulación nuclear anormal de β -DG, que ocasiona deslocalización y disminución de los niveles de emerina, afecta las funciones de ésta. Se ha demostrado que el anclaje de los centrosomas a la membrana nuclear externa depende, en una parte, en la vía de conexión entre los microtúbulos y emerina [59] por lo tanto, analizamos si la expresión de la mutante de la NES de β -DG afecta el anclaje de los centrosomas a la envoltura nuclear. De manera interesante, las células que expresaron la proteína GFP- β -DG NESm mostraron un aumento significativo en la separación del centrosoma al núcleo, comparadas con aquellas que expresaron tanto GFP como GFP- β -DG (Figura 12A).

Además, se sabe que emerina promueve el transporte nuclear de β -catenina regulando de manera negativa la actividad transcripcional de β -catenina [60], por lo cual evaluamos la distribución subcelular y la actividad transcripcional de β -catenina en células C2C12 que expresan GFP- β -DG NESm. En las células que expresan las proteínas GFP o GFP- β -DG, β -catenina presentó una localización en membrana plasmática, en uniones célula-célula y una pequeña tinción nuclear; en el caso de GFP- β -DG NESm la cual produce una deslocalización en emerina, se observó un incremento en la localización nuclear de β -catenina (Figura 12B). Para demostrar el papel que juega β -DG en la estabilidad de emerina, se evaluó la actividad transcripcional de β -catenina al transfectar un vector reportero, en el cual la expresión de luciferasa es controlada por un promotor que contiene los elementos de unión a β -catenina-TCF (TOPGLOW), y además como control negativo, se utilizó un vector que contiene el promotor mutante. De manera consistente con la disminución de los niveles de emerina, observamos un incremento en la actividad transcripcional de β -catenina en células que expresan GFP- β -DG NESm, comparado con las células control (Figure 12C). Todos estos resultados, indican que el desplazamiento de emerina de la envoltura nuclear, debido a la alteración del transporte nuclear de β -DG, eventualmente afectó funciones secundarias de emerina incluyendo el posicionamiento de los centrosomas y la actividad transcripcional de β -catenina.

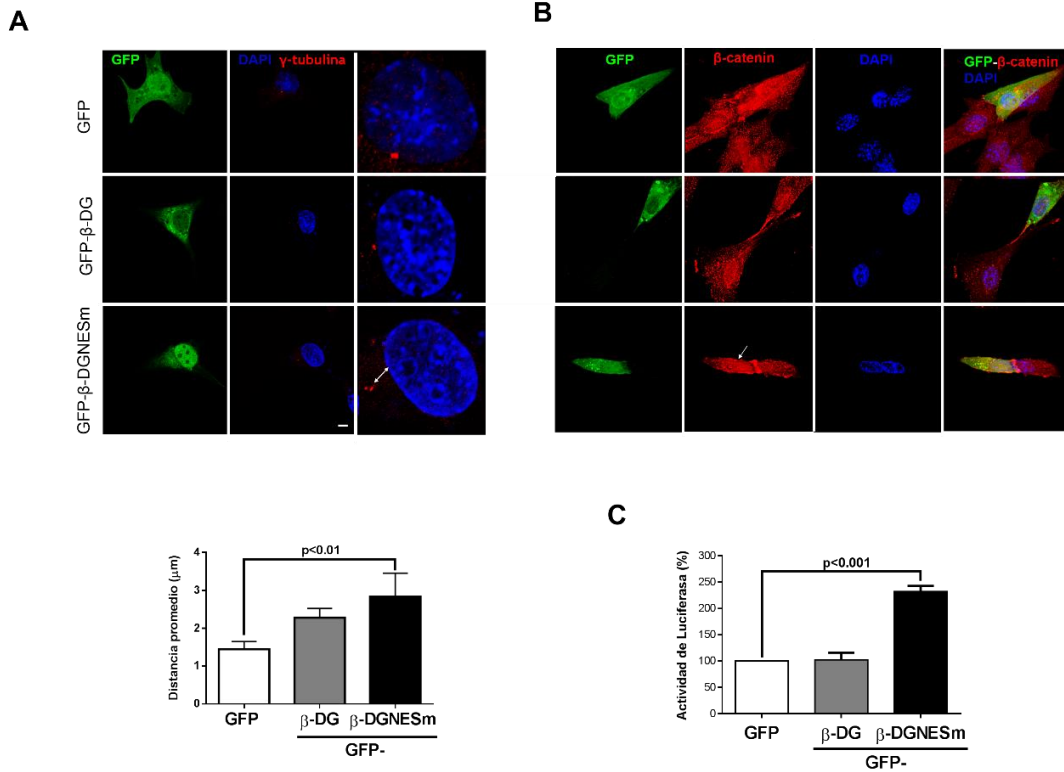


Figura 12. **La acumulación nuclear de β -DG afecta procesos dependientes de emerina.** (A) los mioblastos C2C12 transfectados de forma estable para expresar GFP, GFP- β -DG o GFP- β -DGNESm fueron teñidos doblemente con anticuerpo anti- γ -tubulina y DAPI para los centrosomas y núcleos respectivamente. Se muestran imágenes representativas del posicionamiento del centrosoma; Barra de escala, 10 μ m. Se midió la separación de los centrosomas de la periferia nuclear (línea blanca) usando el software NIS elements Nikon (panel inferior). Los resultados representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes ($n = 200$ células), con un valor p que indica la diferencia significativa (prueba t de Student no pareada). (B) Los mioblastos C2C12 transfectados con GFP, GFP- β -DG o GFP- β -DGNESm se inmunotiñeron para β -catenina y con DAPI para visualizar núcleos. (C) Las células C2C12 transitoriamente transfectadas con GFP, GFP- β -DG o GFP- β -DGNESm, junto con TOPFLASH o su mutante promotor variante FLOPFLASH y TK Renilla. Después de la incubación durante 24 h se midió la actividad luciferasa. La condición de control (100% de la actividad luciferasa) corresponde a la relación TOPFLASH/FLOPFLASH obtenida en células transfectadas con GFP sola. Los datos representan a media + SEM de tres experimentos independientes; los valores de p denotan una diferencia significativa (prueba t de Student no pareada).

La acumulación nuclear de β -DG afecta procesos mediados por lámina B1

Desde que se conoce que la proteína lámina B1 está involucrada en la progresión del ciclo celular [61] y en el mantenimiento de la estructura nucleolar [62], investigamos si la expresión de la mutante deficiente en el transporte nuclear de β -DG, afecta estos dos procesos. De acuerdo con nuestra hipótesis, se observó un retraso en el rango de crecimiento de GFP- β -DGNESm comparadas con las células que expresan GFP- β -DG o GFP (Figura 13A). El retraso en el rango de crecimiento de las células que

expresan GFP- β -DGNEsm parece ser que está ligado al retraso durante el ciclo celular en la fase G0/G1 más que en la fase S, debido a que las células que expresan GFP- β -DGNEsm presentan un incremento significativo en la fase G0/G1 al ser liberadas del arresto celular (Figura 13B), mientras que cuando se liberó del arresto con timidina no hubo diferencia en la progresión en la fase S entre las células que expresan GFP- β -DGNEsm y GFP- β -DG o GFP (Figura 13C).

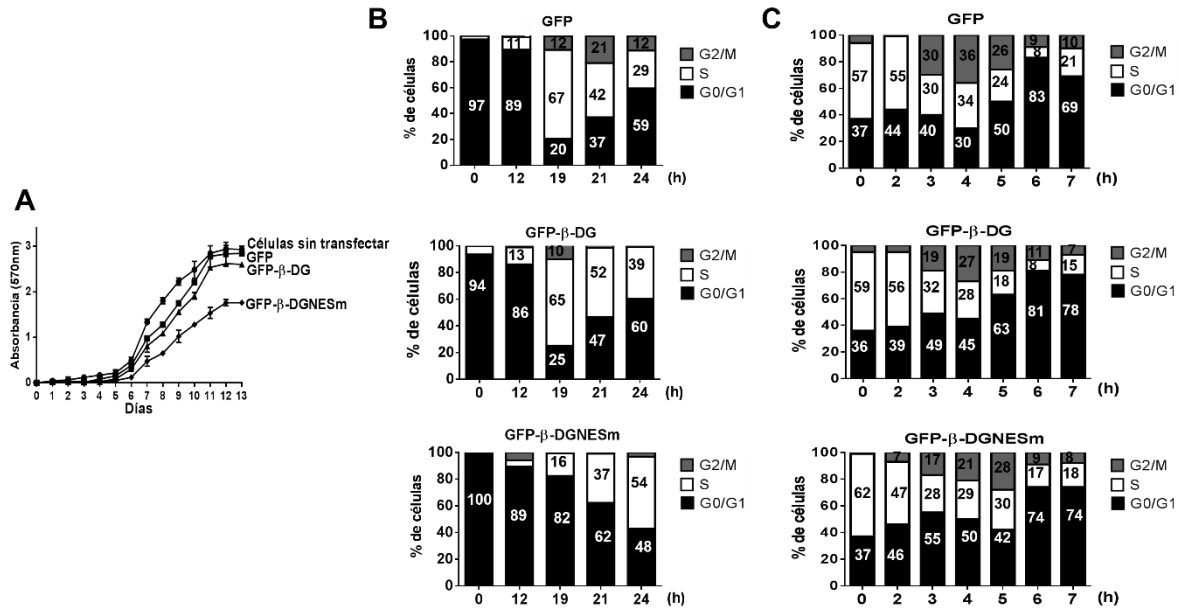


Figura 13. **La acumulación nuclear de β -DG afecta procesos mediados por lámina B1.** Se obtuvieron mioblastos C2C12 que expresaron de forma estable GFP, GFP- β -DG o GFP- β -DGNEsm para los siguientes ensayos. (A) La proliferación celular se monitoreó durante un periodo de 13 días usando el método de MTT. Las células transfectadas de manera estable se sincronizaron en la fase G0 / G1 por inactivación de suero durante 48 h (B) o en fase S por tratamiento con timidina (C) y luego se liberaron en el ciclo celular. Las células se fijaron y se tiñeron con DAPI para determinar el contenido de DNA en los tiempos indicados. Los perfiles de ciclo celular se analizaron por citometría de flujo y su representación gráfica corresponde al porcentaje promedio de células en cada fase de tres experimentos independientes.

Lámina B1 también está implicada en mantener la arquitectura nucleolar [62] por lo tanto, las células C2C12 fueron arrestadas en la fases G1 tardía y fase S temprana por doble bloqueo con timidina (Figura 14A), antes de analizar la estructura nucleolar. De manera consistente, con la habilidad del β -dístroglicano de afectar la localización de lámina B1, al incrementar la acumulación nuclear de GFP- β -DG NEsm ocasiona una disgregación nucleolar, aumentando el número de nucléolos

observados al inmunotear con la proteina nucleolar fibrilarina (Figura 14B). Confirmandolo a traves de la reconstruccion 3D de la estructura del nucleolo y el calculo del volumen nucleolar. (Figura 14C). Estos resultados, demuestran que al alterar el exporte nuclear de β -DG, acompaado de una alteracion en la localizacion y expresion de lamina B1, da como resultado una alteracion en la progresion del ciclo celular y alteracion en la estructura nucleolar.

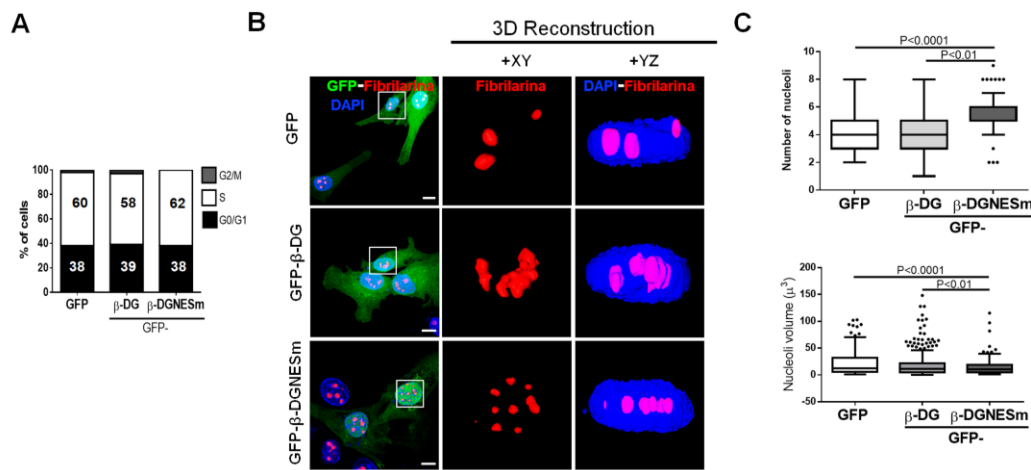


Figura 14. **La acumulaci3n nuclear de β -DG afecta procesos mediados por lamina B1, como es la estructura nucleolar.** Se obtuvieron c3lulas C2C12 que expresaron de forma estable GFP, GFP- β -DG o GFP- β -DGNESm para los siguientes ensayos: (A) Sincronizaci3n en fase G1 tardia y fase S temprana por doble bloqueo con timidina. Los perfiles de ciclo celular se analizaron por citometria de flujo a las 2 horas de ser liberadas del bloqueo, su representaci3n grafica corresponde al porcentaje promedio de c3lulas en cada fase de tres experimentos independientes. (B) A estas mismas c3lulas sincronizadas, se inmunotearon para la proteina nucleolar fibrilarina y a traves de CLSM se examin3 la morfologia nucleolar; escala 10 μ m. La reconstruccion 3D de los nucleolos se obtuvo a partir de cortes 3pticos en Z (0.4 μ m tamao del corte) utilizando el software Fiji. (C) Se determin3 el n3mero de nucleolos por c3lula (panel superior) y el volumen de nucleolos (panel inferior) en cada cultivo celular (n = 200 c3lulas) mediante el software Fiji.

La acumulaci3n nuclear forzada de β -DG aumenta su degradaci3n proteasomal en el n3cleo

El tiempo de vida de β -DG est3 modulada por degradaci3n proteasomal [59]. Por lo tanto, se analiz3 si la estabilidad de β -DG depende de su localizaci3n subcelular. Las c3lulas C2C12 se pre-trataron con leptomicina B (LMB) antes de inhibir la s3ntesis de proteinas con cicloheximida (CHX), para analizar si la acumulaci3n nuclear de β -DG

afecta recambio. De manera interesante, se observó una disminución drástica del 50% en el tiempo de vida media de β -DG, durante el tratamiento con LMB (Figura 15A) y esta disminución en los niveles de proteína se revirtió después del tratamiento con MG132 (Figura 15B), lo que sugiere que β -DG es más propenso a la degradación proteosomal dentro del núcleo.

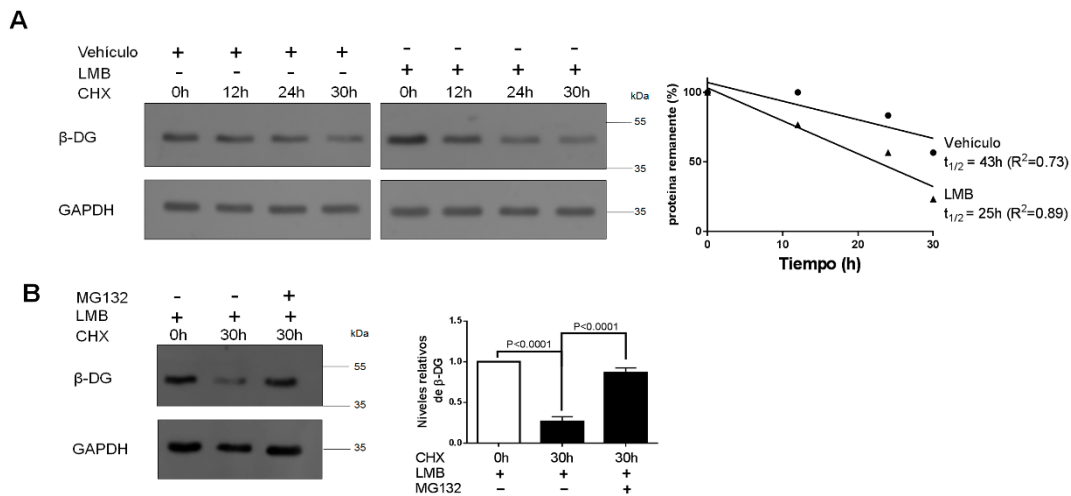


Figura 15. **Los niveles nucleares de β -DG son regulados por el proteosoma nuclear.** (A) Los mioblastos C2C12 se trataron con LMB o etanol (vehículo) durante 12 h y luego con CHX durante los intervalos de tiempo indicados. Los lisados celulares se sometieron a análisis SDS-PAGE / WB usando anticuerpos específicos para β -DG y GAPDH (control de carga). El tiempo de vida media del β -DG ($t_{1/2}$) se calculó por análisis densitométrico ($t_0 = 100\%$). Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes y se realizó la regresión lineal con el software Graphpad Prism 6. El tiempo de vida media del β -DG disminuyó en las células tratadas con LMB. (B) Los mioblastos C2C12 tratados con LMB y CHX como en (A) se incubaron adicionalmente durante 30 h con MG132 (inhibidor de proteasoma) o el vehículo solo. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos separados, con el valor p que indica diferencias de significación (prueba t de Student no pareada). La inhibición del proteasoma recuperó los niveles de proteína β -DG.

Debido a que la ubiquitinación es un paso esencial para la degradación proteosomal, se evaluó la ubiquitinación de β -DG tanto en el citoplasma como en el núcleo. Los lisados de C2C12 fueron sometidos a un ensayo tipo pull-down con GST-MultiDsk una proteína GST fusionada a 5 dominios de unión a ubiquitina [63]. Las bandas de mayor peso molecular, que corresponden a β -DG ubiquitinado, fueron captadas por la proteína MultiDsk tanto en el citoplasma como en el núcleo, pero sólo fueron reconocidas por el anticuerpo que reconoce a la forma fosforilada de β -DG y no para el β -DG no fosforilado (Figura 16), descrito previamente [64]. Cabe señalar que, todo

el β -DG nuclear se encontró ubiquitinado en las células tratadas con LMB (comparando las fracciones S con P), lo que sugiere que existe una ubiquitinación más activa de β -DG está en dichas células. En general, estos datos implican que β -DG se degrada por el proteasoma nuclear y que la acumulación nuclear forzada de β -DG aumenta su degradación.

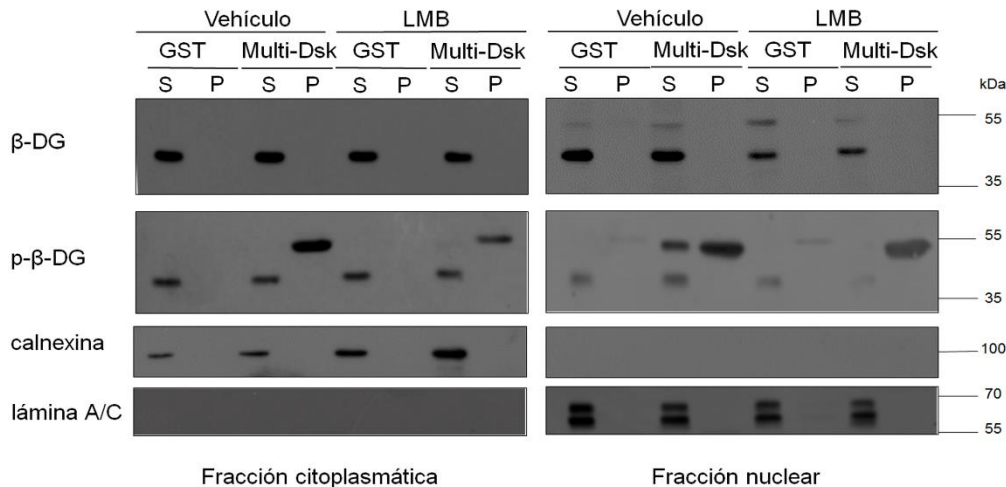


Figura 16. **El β -DG fosforilado se ubiquitina en el núcleo y en el citoplasma, y su degradación nuclear por la vía ubiquitina-proteosoma incrementa al acumularlo en el núcleo.** (A) Las células C2C12 tratadas con LMB o el vehículo solo durante 30 h se fraccionaron en extractos citoplásmicos y nucleares y se sometieron adicionalmente a ensayo de pulldown. Las muestras del sobrenadante (S) y del precipitado (P) de la proteína GST (control) y de la proteína de unión a la ubiquitina GST-MultiDsk se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron por WB utilizando anticuerpos específicos para el β -DG fosforilado en el residuo Y892 (p- β DG) o la forma no fosforilada (β -DG). Calnexina y lámina A/C sirvieron como controles de pureza del fraccionamiento celular para citoplasma y núcleo, respectivamente.

9. DISCUSION

El β -DG forma parte del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC); el DAPC se localiza en el sarcolema y participa en funciones importantes como son la adhesión celular, la señalización y la remodelación del citoesqueleto [12, 19, 21]. Recientemente se reportó que el β -DG es transportado al núcleo a través del sistema dependiente de importinas α 2/ β 1 [11]. En el núcleo, el β -DG interacciona con las proteínas de envoltura nuclear emerina y láminas A/C y B1 para regular la arquitectura nuclear [22]. Tomando en consideración la localización dual del β -DG, nos planteamos la hipótesis de que esta proteína debe tener una vía de exporte

nuclear que en conjunto con el mecanismo de importación nuclear le permita viajar en ambas direcciones, de la membrana plasmática al núcleo y viceversa, de acuerdo a las necesidades de la célula. En este estudio demostramos por primera vez que el β -DG si presenta una ruta de exporte nuclear que es dependiente de la exportina CRM1. Además, demostramos que la regulación de los niveles nucleares de β -DG es a través de las vías de exporte nuclear y degradación proteosomal en el núcleo y más importante aún, que el contenido del β -DG en el núcleo se modula finamente para mantener la organización y función de la envoltura nuclear.

Identificamos una señal de exporte nuclear (NES) clásica en la región transmembranal de β -DG y al realizar mutagénesis sitio dirigida sobre esta secuencia determinamos que es funcional. Se demostró que el exporte nuclear del β -DG es dependiente de la exportina CRM1 mediante: i) El uso de un inhibidor específico de CRM1, la leptomicina B (LMB), ya que el tratamiento con esta droga bloqueó el exporte nuclear del β -DG tanto en mioblastos C2C12 como mioblastos primarios; ii) la disminución de los niveles de expresión de la exportina CRM1 resultó en la acumulación nuclear del β -DG y iii) se demostró la interacción específica del β -DG con la exportina CRM1 a través de ensayos pull-down *in vitro* y mediante inmunoprecipitación en células intactas. En su conjunto, estos resultados indican que el exporte nuclear del β -DG se basa en el reconocimiento de su NES por la exportina CRM1. Es importante mencionar que, el β -DG representa un ejemplo único de una proteína de membrana nuclear interna con exporte nuclear. No obstante, es necesario elucidar los mecanismos que permiten al β -DG llegar al nucleoplasma en forma soluble para ser reconocido por CRM1 y ser finamente exportado del núcleo.

El distroglicano participa en diversas funciones celulares como la adhesión, señalización y organización del citoesqueleto [20]. La segregación espacio temporal de estas funciones se encuentran estrictamente controladas por mecanismos como la fosforilación, ubiquitinación y proteólisis [14, 65-67]. Alteraciones en la homeostasis del distroglicano dan lugar a enfermedades como las distrofias musculares [6] y el cáncer [68]. Además, la manipulación experimental de los niveles celulares de distroglicano mediante la disminución mediada por RNAi o su

sobreexpresión, ocasiona tanto la pérdida como la ganancia de función con consecuencias para la adhesión celular, migración celular, invasión celular, proliferación celular y remodelación del citoesqueleto [66, 69, 70]. La presencia del distroglicano en diferentes compartimentos celulares también está regulada estrictamente. La fosforilación del distroglicano ocasiona la internalización del β -DG a través de endosomas para viajar de la membrana plasmática al citoplasma [25, 65], o al núcleo [11, 22].

De acuerdo con este paradigma, en el presente trabajo mostramos que la acumulación nuclear aberrante del β -DG, a través de la sobreexpresión de una variante defectuosa en el transporte nuclear, tiene un efecto negativo dominante que ocasiona la deslocalización de las proteínas de envoltura nuclear emerina y lámina B1. Ambas proteínas pierden su inmunotinción característica de anillo en la envoltura nuclear y se acumulan formando agregados fuera del núcleo. Esta deslocalización de lámina B1 y emerina va acompañada por alteraciones en su estabilidad, como se demostró por la caída en sus niveles proteicos, pero no en los niveles de sus respectivos RNAs mensajeros. La bajada en la estabilidad de estas proteínas podría ser debida a la exposición de señales de degradación que normalmente están ocultas cuando los niveles del β -DG son los adecuados. Así mismo, la alteración del complejo lamina B1-emerina debido a los niveles elevados del β -DG llevaría a la agregación citoplasmática de estas dos primeras proteínas [71, 72].

La estricta regulación de la función del distroglicano se extiende al compartimento nuclear, ya que la acumulación nuclear (bloqueando el transporte nuclear) o la disminución nuclear del β -DG [22] conduce a una arquitectura nuclear aberrante. Es probable que un exceso de β -DG nuclear da lugar a una competencia entre lámina B1 y emerina, lo que posiblemente conduce a interacciones no funcionales de estas con el β -DG en lugar de interacciones funcionales entre las tres moléculas. Pensamos que los niveles no estequiométricos del β -DG no permiten que se formen correctamente las interacciones proteicas, lo que origina la deslocalización de emerina y lámina B1 y finalmente la pérdida de la arquitectura de la envoltura nuclear (Figura 10). La acumulación nuclear del β -DG perturba también las funciones de la

emerina y la lámina B1. Un porcentaje significativo de mioblastos C2C12 con acumulación nuclear del β -DG en el núcleo presentaron centrosomas separados de la envoltura nuclear, lo que implica que la interacción de los microtúbulos con emerina que controla el anclaje de los centrosomas a la membrana nuclear externa esta alterada [59]. Consecuentemente, la actividad transcripcional de β -catenina que está regulada por emerina [60] (la emerina regula el transporte nuclear de β -catenina) aumentó significativamente en células que contenían exceso del β -DG en el núcleo (Figura 12).

De la misma manera, encontramos afectaciones en las funciones de la lámina B1 como respuesta a los altos del β -DG en el núcleo, como son la progresión del ciclo celular y la estructura nucleolar. Las células con acumulación nuclear del β -DG quedan arrestadas en la fase G0/G1 y exhiben un retraso en la transición hacia la fase S (Figura 13), lo que concuerda con un estudio previo en donde se observó una prolongación de la fase S en células de cáncer de colon con niveles disminuidos de lámina B1 [61]. Curiosamente, el mismo efecto en el ciclo celular se observa en las células Swiss 3T3 deficientes en distroglicano [73]. Con respecto al compartimento nucleolar, se observó la aparición de nucléolos dispersos y disgregados debido a la acumulación nuclear de β -DG. Tomando en consideración el papel primordial de la lámina B1 en la organización y plasticidad nucleolar [62], es evidente que la sobreexpresión nuclear de β -DG impacta la estructura nucleolar debido al efecto primario sobre la expresión y localización de la lámina B1 (Figura 14). En conjunto, estos resultados indican que la desregulación del tráfico nuclear del β -DG tiene consecuencias fisiológicas en la organización y actividad de la envoltura nuclear. Consistente con esta idea, las células tratadas con LMB, presentaron una disminución en la vida media del β -DG, debido a su degradación por el proteosoma nuclear, lo que sugiere la activación de un mecanismo alternativo para regular los niveles nucleares del β -DG e impedir así su acumulación que es perjudicial (Figura 16).

Se ha observado previamente que alteraciones en los niveles de componentes de la envoltura nuclear, ya sea por disminución o sobreexpresión, tienen efectos desfavorables sobre los otros componentes de la envoltura nuclear con los que

interactúa, lo que conlleva a daños funcionales y la aparición de patológicas. La sobreexpresión de lámina B1 en oligodendrocitos resultó en una alteración tanto en la localización como en los niveles de la proteína LAP2 (Lamin-Associated Polypeptide 2, por sus siglas en inglés) y en la disminución de la importación nuclear de la nucleoporina Nup153 [74]. La alta sensibilidad de la envoltura nuclear ante una descompensación de los niveles de la lámina B1 queda de manifiesto con la enfermedad llamada leucodistrofia autosómica dominante (trastorno caracterizado por desmielinización del sistema nervioso central), la cual se origina por la sobreexpresión de lámina B1 debido a una duplicación del gen *LMNB1* [75, 76]. Adicionalmente se ha observado que tanto la sobreexpresión como la disminución de la proteína LUMA (proteína transmembranal 43) alteran la envoltura nuclear, debido a la deslocalización de la emerina [77]. Finalmente, la acumulación nuclear anormal de RAC1 (una Rho GTPasas, que se localiza en la envoltura nuclear) daña la organización de la envoltura nuclear y ocasiona la aparición de un fenotipo celular invasivo, a través de alteraciones en la polimerización de actina y la localización aberrante de la lámina A/C y emerina [78].

Se conoce que varios receptores presentes en la membrana plasmática se transportan al núcleo, ya sea una subunidad o la proteína completa. El corte del dominio intracelular (ICD, por sus siglas en inglés) y la posterior translocación al núcleo de varios receptores de adhesión, tales como Notch y CD44, es fundamental para su mecanismo de señalización. Al igual que el β -DG, el ICD de Notch y de CD44 tienen funciones en la regulación de la expresión de genes [79-81]. Los receptores tirosina-cinasa tales como EGFR, FGFR y el receptor de bradicinina B2 se transportan al núcleo [82-86]. El papel del FGFR en el núcleo sigue siendo poco claro, mientras que la translocación de los receptores EGFR y bradicinina B2 al núcleo se cree que tiene que ver con la regulación transcripcional [87, 88]. El β -DG se transporta al núcleo para actuar como un andamio para la unión de otras proteínas que conforman complejos proteicos nucleares, de manera similar a como funciona en la membrana plasmática [20]. Debido a la función dual que realiza el β -DG en la membrana plasmática y en la envoltura nuclear y al hecho de que se

transporta de la membrana plasmática al núcleo, la proteína ha adquirido mecanismos de control para alcanzar los niveles nucleares óptimos que le permiten funcionar adecuadamente en este organelo, evitando los efectos adversos que causa su acumulación nuclear.

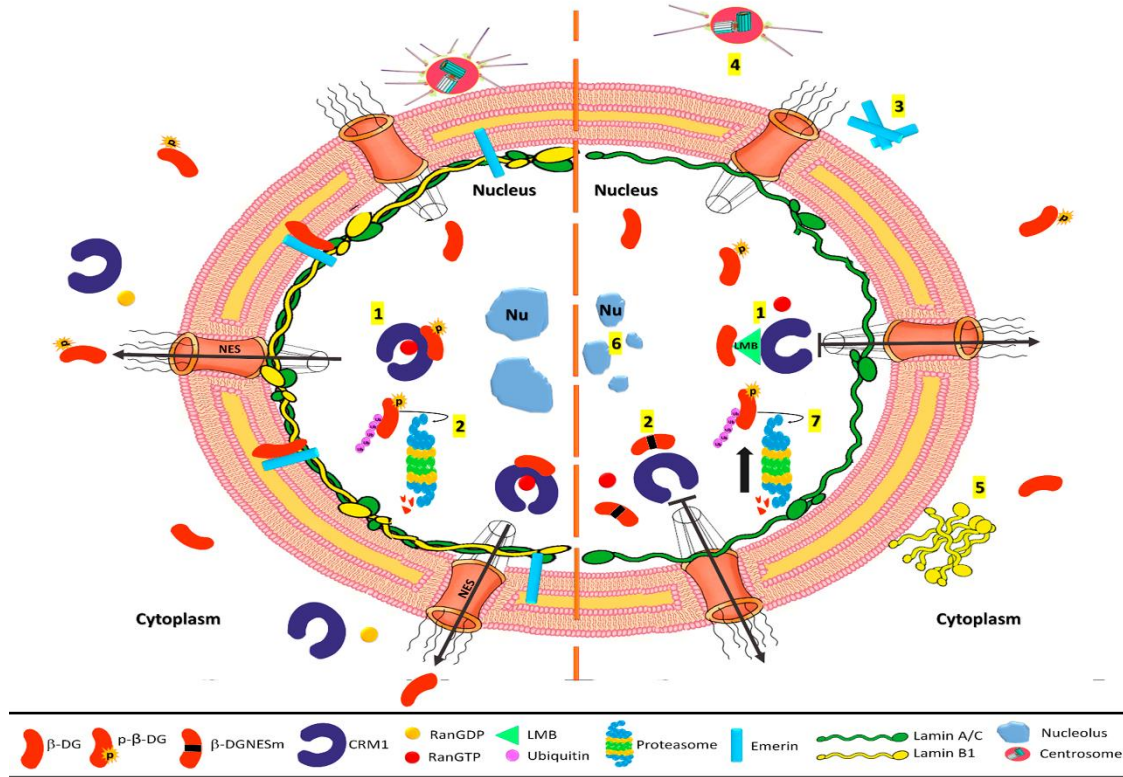


Figura 17. **Consecuencias funcionales en la alteración de los niveles nucleares de la proteína β -DG.** (A) El contenido nuclear del β -DG nuclear está regulado por el transporte nuclear mediado por la exportina CRM1 (1) y la vía de degradación ubiquitin-proteasoma nuclear del β -DG fosforilado (2). (B) La acumulación nuclear del β -DG debido al tratamiento con LMB (1) o la expresión de la variante mutante del β -DG, deficiente en el transporte nuclear (2) ocasiona alteraciones en la organización y función de la envoltura nuclear (NE). La deslocalización y la disminución de los niveles de emerina (3) y lámina B1 (5) alteraciones en las funciones dependientes de emerina y lámina B1, incluyendo el anclaje de los centrosomas en la ONM (4) y el mantenimiento de la estructura de nucleolar (6), respectivamente. Además, la acumulación nuclear de β -DG aceleró la degradación de la forma fosforilada del β -DG por el proteasoma nuclear (7).

La presencia de una NES en el dominio transmembranal de una proteína carece de precedentes. Solamente encontramos en la literatura que los experimentos llevados a cabo por Myers y colaboradores [89] sugieren que la región transmembranal del

FGFR está involucrada en su transporte nucleo-citoplásmico, ya que la acumulación nuclear de una variante de FGFR se debe aparentemente a que alteraron una NES putativa presente en su región transmembranal [89].

10. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que el β -DG tiene una vía de exporte nuclear que depende del reconocimiento de una NES localizada en su dominio transmembranal por la exportina CRM1. Las vías de exporte nuclear y degradación proteasomal contribuyen a la regulación de los niveles nucleares del β -DG, con el fin de preservar la estructura y el funcionamiento de la envoltura nuclear (Figura 17). Además, nuestros resultados evidencian que el β -DG tiene una función dual, ya que actúa como una proteína de anclaje en la membrana plasmática y en la membrana nuclear interna. La función del β -DG en ambos compartimientos se mantiene por la estricta regulación de su tráfico núcleo/citoplasmático, lo que le permite mantener interacciones funcionales con proteínas de unión en las dos membranas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ervasti, J.M. and K.P. Campbell, *Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex*. Cell, 1991. **66**(6): p. 1121-31.
2. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., et al., *Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(10): p. 1651-7.
3. Holt, K.H., et al., *Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide*. FEBS Lett, 2000. **468**(1): p. 79-83.
4. Hara, Y., et al., *A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy*. N Engl J Med, 2011. **364**(10): p. 939-46.
5. Geis, T., et al., *Homozygous dystroglycan mutation associated with a novel muscle-eye-brain disease-like phenotype with multicystic leucodystrophy*. Neurogenetics, 2013. **14**(3-4): p. 205-13.
6. Riemersma, M., et al., *Absence of alpha- and beta-dystroglycan is associated with Walker-Warburg syndrome*. Neurology, 2015. **84**(21): p. 2177-82.
7. Williamson, R.A., et al., *Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(6): p. 831-41.

8. Talts, J.F., et al., *Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins*. *Embo j*, 1999. **18**(4): p. 863-70.
9. Chung, W. and J.T. Campanelli, *WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding*. *Mol Cell Biol Res Commun*, 1999. **2**(3): p. 162-71.
10. Sotgia, F., et al., *Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(48): p. 38048-58.
11. Lara-Chacon, B., et al., *Characterization of an Importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan*. *J Cell Biochem*, 2010. **110**(3): p. 706-17.
12. Spence, H.J., et al., *Ezrin-dependent regulation of the actin cytoskeleton by beta-dystroglycan*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(15): p. 1657-68.
13. Endo, T., *Glycobiology of alpha-dystroglycan and muscular dystrophy*. *J Biochem*, 2015. **157**(1): p. 1-12.
14. James, M., et al., *Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of (beta)-dystroglycan regulates its interaction with utrophin*. *J Cell Sci*, 2000. **113** (Pt **10**): p. 1717-26.
15. Yang, B., et al., *SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(20): p. 11711-4.
16. Russo, K., et al., *Characterization of the beta-dystroglycan-growth factor receptor 2 (Grb2) interaction*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **274**(1): p. 93-8.
17. Sotgia, F., et al., *Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins*. *Biochemistry*, 2001. **40**(48): p. 14585-92.
18. Spence, H.J., et al., *Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade*. *EMBO Rep*, 2004. **5**(5): p. 484-9.
19. Thompson, O., et al., *Dystroglycan, Tks5 and Src mediated assembly of podosomes in myoblasts*. *PLoS One*, 2008. **3**(11): p. e3638.
20. Moore, C.J. and S.J. Winder, *Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs*. *Cell Commun Signal*, 2010. **8**: p. 3.
21. Chen, Y.J., et al., *Direct interaction of beta-dystroglycan with F-actin*. *Biochem J*, 2003. **375**(Pt 2): p. 329-37.
22. Martinez-Vieyra, I.A., et al., *A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(3): p. 698-711.
23. Vasquez-Limeta, A., et al., *Nuclear import of beta-dystroglycan is facilitated by ezrin-mediated cytoskeleton reorganization*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90629.
24. Gracida-Jiménez, V., et al., *Retrograde trafficking of β -dystroglycan from the plasma membrane to the nucleus*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 9906.
25. Sotgia, F., et al., *Localization of phospho-beta-dystroglycan (pY892) to an intracellular vesicular compartment in cultured cells and skeletal muscle fibers in vivo*. *Biochemistry*, 2003. **42**(23): p. 7110-23.

26. Klaips, C.L., G.G. Jayaraj, and F.U. Hartl, *Pathways of cellular proteostasis in aging and disease*. J Cell Biol, 2017.
27. Douglas, P.M. and D.M. Cyr, *Interplay between protein homeostasis networks in protein aggregation and proteotoxicity*. Biopolymers, 2010. **93**(3): p. 229-36.
28. Fahrenkrog, B. and U. Aebi, *The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(10): p. 757-66.
29. Strambio-De-Castillia, C., M. Niepel, and M.P. Rout, *The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(7): p. 490-501.
30. Fried, H. and U. Kutay, *Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(8): p. 1659-88.
31. Cronshaw, J.M., et al., *Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex*. J Cell Biol, 2002. **158**(5): p. 915-27.
32. Cook, A., et al., *Structural biology of nucleocytoplasmic transport*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 647-71.
33. Lange, A., et al., *Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5101-5.
34. Fornerod, M., et al., *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1051-60.
35. la Cour, T., et al., *NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(1): p. 393-6.
36. Pemberton, L.F. and B.M. Paschal, *Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export*. Traffic, 2005. **6**(3): p. 187-98.
37. Wolff, B., J.J. Sanglier, and Y. Wang, *Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA*. Chem Biol, 1997. **4**(2): p. 139-47.
38. Kudo, N., et al., *Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9112-7.
39. Dickmanns, A., T. Monecke, and R. Ficner, *Structural Basis of Targeting the Exportin CRM1 in Cancer*. Cells, 2015. **4**(3): p. 538-68.
40. Fu, S.C., et al., *ValidNESs: a database of validated leucine-rich nuclear export signals*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D338-43.
41. Xu, D., et al., *Sequence and structural analyses of nuclear export signals in the NESdb database*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(18): p. 3677-93.
42. Nandi, D., et al., *The ubiquitin-proteasome system*. J Biosci, 2006. **31**(1): p. 137-55.
43. Vembar, S.S. and J.L. Brodsky, *One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(12): p. 944-57.
44. Reed, S.I., *The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control*. Results Probl Cell Differ, 2006. **42**: p. 147-81.
45. Chen, Z.J., *Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 758-65.
46. Huen, M.S. and J. Chen, *The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 8-16.

47. Kodadek, T., D. Sikder, and K. Nalley, *Keeping transcriptional activators under control*. Cell, 2006. **127**(2): p. 261-4.
48. Wang, J. and M.A. Maldonado, *The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases*. Cell Mol Immunol, 2006. **3**(4): p. 255-61.
49. Hoeller, D., C.M. Hecker, and I. Dikic, *Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(10): p. 776-88.
50. Eldridge, A.G. and T. O'Brien, *Therapeutic strategies within the ubiquitin proteasome system*. Cell Death Differ, 2010. **17**(1): p. 4-13.
51. Layfield, R., J. Lowe, and L. Bedford, *The ubiquitin-proteasome system and neurodegenerative disorders*. Essays Biochem, 2005. **41**: p. 157-71.
52. Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 55-72.
53. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.
54. Gonzalez-Ramirez, R., et al., *Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis*. J Cell Biochem, 2008. **105**(3): p. 735-45.
55. Qi, M.L., et al., *Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(4): p. 402-14.
56. Pereboev, A.V., et al., *Epitopes in the interacting regions of beta-dystroglycan (PPxY motif) and dystrophin (WW domain)*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1527**(1-2): p. 54-60.
57. Rivier, F., et al., *Utrophin and dystrophin-associated glycoproteins in normal and dystrophin deficient cardiac muscle*. J Muscle Res Cell Motil, 1999. **20**(3): p. 305-14.
58. Gracida-Jiménez V, M.-G.R., Vélez-Aguilera G, Vásquez-Limeta A, Laredo-Cisneros MS, Gómez-López J, Vaca L, Gourlay SC, Jacobs LA, Winder SJ and Cisneros B, *Retrograde trafficking of β -dystroglycan from the plasma membrane to the nucleus* in Scientific Reports 2017.
59. Salpingidou, G., et al., *A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane*. J Cell Biol, 2007. **178**(6): p. 897-904.
60. Markiewicz, E., et al., *The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus*. EMBO J, 2006. **25**(14): p. 3275-85.
61. Camps, J., et al., *Loss of lamin B1 results in prolongation of S phase and decondensation of chromosome territories*. FASEB J, 2014. **28**(8): p. 3423-34.
62. Martin, C., et al., *Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 10): p. 1551-62.
63. Wilson, M.D., et al., *MultiDsk: a ubiquitin-specific affinity resin*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46398.
64. Lipscomb, L., et al., *Dasatinib as a treatment for Duchenne muscular dystrophy*. Hum Mol Genet, 2016. **25**(2): p. 266-74.

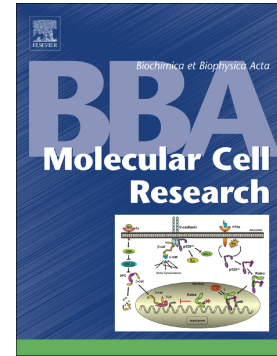
65. Miller, G., et al., *Preventing phosphorylation of dystroglycan ameliorates the dystrophic phenotype in mdx mouse*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(20): p. 4508-20.
66. Mitchell, A., et al., *Dystroglycan function is a novel determinant of tumor growth and behavior in prostate cancer*. Prostate, 2013. **73**(4): p. 398-408.
67. Leocadio, D., A. Mitchell, and S.J. Winder, *gamma-Secretase Dependent Nuclear Targeting of Dystroglycan*. J Cell Biochem, 2016. **117**(9): p. 2149-57.
68. Mathew, G., et al., *Nuclear targeting of dystroglycan promotes the expression of androgen regulated transcription factors in prostate cancer*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2792.
69. Thompson, O., et al., *Modulation of cell spreading and cell-substrate adhesion dynamics by dystroglycan*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 1): p. 118-27.
70. Batchelor, C.L., et al., *Recruitment of Dbl by ezrin and dystroglycan drives membrane proximal Cdc42 activation and filopodia formation*. Cell Cycle, 2007. **6**(3): p. 353-63.
71. Buchler, N.E., U. Gerland, and T. Hwa, *Nonlinear protein degradation and the function of genetic circuits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9559-64.
72. Tompa, P., et al., *Structural disorder serves as a weak signal for intracellular protein degradation*. Proteins, 2008. **71**(2): p. 903-9.
73. Higginson, J.R., O. Thompson, and S.J. Winder, *Targeting of dystroglycan to the cleavage furrow and midbody in cytokinesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(5): p. 892-900.
74. Lin, S.T. and Y.H. Fu, *miR-23 regulation of lamin B1 is crucial for oligodendrocyte development and myelination*. Dis Model Mech, 2009. **2**(3-4): p. 178-88.
75. Padiath, Q.S., et al., *Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy*. Nat Genet, 2006. **38**(10): p. 1114-23.
76. Dos Santos, M.M., et al., *Adult-onset autosomal dominant leukodystrophy due to LMNB1 gene duplication*. J Neurol, 2012. **259**(3): p. 579-81.
77. Bengtsson, L. and H. Otto, *LUMA interacts with emerin and influences its distribution at the inner nuclear membrane*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 4): p. 536-48.
78. Navarro-Lerida, I., et al., *Rac1 nucleocytoplasmic shuttling drives nuclear shape changes and tumor invasion*. Dev Cell, 2015. **32**(3): p. 318-34.
79. Kidd, S., T. Lieber, and M.W. Young, *Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in Drosophila melanogaster embryos*. Genes Dev. , 1998. **12**(23): p. 3728-3740.
80. Schroeter, E.H., J.A. Kisslinger, and R. Kopan, *Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 382-6.
81. Okamoto, I., et al., *Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway*. J. Cell Biol., 2001. **155**: p. 755-762.
82. Lin, S.Y., et al., *Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(9): p. 802-8.

83. Maher, P.A., *Nuclear Translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptors in response to FGF-2*. J Cell Biol, 1996. **134**(2): p. 529-36.
84. Prudovsky, I.A., et al., *The nuclear trafficking of extracellular fibroblast growth factor (FGF)-1 correlates with the perinuclear association of the FGF receptor-1alpha isoforms but not the FGF receptor-1beta isoforms*. J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 14198-205.
85. Stachowiak, M.K., et al., *Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors is regulated by multiple signals in adrenal medullary cells*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(8): p. 1299-317.
86. Lee, D.K., et al., *Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7901-8.
87. Savard, M., et al., *Expression of endogenous nuclear bradykinin B2 receptors mediating signaling in immediate early gene activation*. J Cell Physiol, 2008. **216**(1): p. 234-44.
88. Wang, Y.N., et al., *Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins*. Oncogene, 2010. **29**(28): p. 3997-4006.
89. Myers, J.M., et al., *Nuclear trafficking of FGFR1: a role for the transmembrane domain*. J Cell Biochem, 2003. **88**(6): p. 1273-91.

Accepted Manuscript

Control of nuclear β -dystroglycan content is crucial for the maintenance of nuclear envelope integrity and function

Griselda Vélez-Aguilera, Juan de Dios Gómez-López, Guadalupe E. Jiménez-Gutiérrez, Alejandra Vásquez-Limeta, Marco S. Laredo-Cisneros, Pablo Gómez, Steve J. Winder, Bulmaro Cisneros



PII: S0167-4889(17)30312-9
DOI: doi:[10.1016/j.bbamcr.2017.11.013](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.11.013)
Reference: BBAMCR 18216

To appear in:

Received date: 4 August 2017
Revised date: 7 November 2017
Accepted date: 20 November 2017

Please cite this article as: Griselda Vélez-Aguilera, Juan de Dios Gómez-López, Guadalupe E. Jiménez-Gutiérrez, Alejandra Vásquez-Limeta, Marco S. Laredo-Cisneros, Pablo Gómez, Steve J. Winder, Bulmaro Cisneros, Control of nuclear β -dystroglycan content is crucial for the maintenance of nuclear envelope integrity and function. The address for the corresponding author was captured as affiliation for all authors. Please check if appropriate. *Bbamcr*(2017), doi:[10.1016/j.bbamcr.2017.11.013](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.11.013)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Control of nuclear β -dystroglycan content is crucial for the maintenance of nuclear envelope integrity and function

Griselda Vélez-Aguilera¹; Juan de Dios Gómez-López¹; Guadalupe E. Jiménez-Gutiérrez¹; Alejandra Vásquez-Limeta^{1,2}; Marco S. Laredo-Cisneros¹; Pablo Gómez¹; Steve J. Winder³ and Bulmaro Cisneros*¹

¹Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico.

²Laboratory of Protein Dynamics and Signaling, Center for Cancer Research-Frederick, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, MD 21702.

³Department of Biomedical Science, University of Sheffield, Western Bank, Sheffield S10 2TN, United Kingdom.

* Correspondence to: B. Cisneros, CINVESTAV-IPN, Departamento de Genética y Biología Molecular. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, 07360 Mexico City, Mexico. Tel.: +52 55 5061 3339; fax: +52 55 5061 3931.

E-mail: bcisnero@cinvestav.mx

Author Contributions

BC and GVA: Conceived and designed the experiments. GVA, JDDGL, GEJG, AVL, MSLC and PG: Performed the experiments. BC, GVA, JDDGL, GEJG, AVL and MSLC: Analysed data. BC and SJW: Contributed reagents/material/analysis tools. BC, GVA and SJW: Wrote the paper.

Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a grant to BC (237123).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

ABSTRACT

β -dystroglycan (β -DG) is a plasma membrane protein that has ability to target to the nuclear envelope (NE) to maintain nuclear architecture. Nevertheless, mechanisms controlling β -DG nuclear localization and the physiological consequences of a failure of trafficking are largely unknown. We show that β -DG has a nuclear export pathway in myoblasts that depends on the recognition of a nuclear export signal located in its transmembrane domain, by CRM1. Remarkably, NES mutations forced β -DG nuclear accumulation resulting in mislocalization and decreased levels of emerin and lamin B1 and disruption of various nuclear processes in which emerin (centrosome-nucleus linkage and β -catenin transcriptional activity) and lamin B1 (cell cycle progression and nucleoli structure) are critically involved. In addition to nuclear export, the lifespan of nuclear β -DG is restricted by its nuclear proteasomal degradation. Collectively our data show that control of nuclear β -DG content by the combination of CRM1 nuclear export and nuclear proteasome pathways is physiologically relevant to preserve proper NE structure and activity.

Keywords: β -dystroglycan, exportin CRM1, nuclear export, nuclear envelope, proteasome degradation.

Abbreviations

β -DG	Beta-dystroglycan
CRM1	Chromosomal Maintenance 1
NES	Nuclear Export Signal
LMB	Leptomycin B
NE	Nuclear Envelope

1. INTRODUCTION

Dystroglycan (DG) is a central component of the dystrophin associated protein complex (DAPC), a multimeric protein assembly that functionally connects the extracellular matrix to the actin-based cytoskeleton [1]. DG is post-translationally cleaved into the extracellular α -DG subunit and the transmembrane β -DG subunit (reviewed in [2]). α -DG acts as a receptor for several extracellular matrix proteins, including laminin and other lamin G (LG) module-containing proteins, while β -DG functions as a platform for different adhesion-related processes, including cytoskeleton remodeling [3, 4], extracellular signal-related kinase mitogen-activated protein kinase (ERK-MAPK) signaling [5], and controlling the dynamics of cellular adhesions in myoblasts [6].

The recently unveiled nuclear localization of β -DG expands the diversity of recognized functions of this protein; β -DG is translocated to the nucleus in an importin (IMP) $\alpha 2/\beta 1$ -dependent fashion, through recognition of a nuclear localization signal (NLS) located in its juxtamembrane region [7, 8]. Nuclear β -DG in turn interacts with the nuclear envelope (NE) proteins emerin and lamins A/C and B1, which enables it to modulate NE structure and function in myoblasts [9]. Thus, the broad range of localizations and mechanisms in which β -DG is involved implies that trafficking of the protein may be tightly regulated to attain proper subcellular distribution in response to specific stimuli. Since β -DG localizes to both plasma membrane and NE, we envisaged that β -DG might have a functional nuclear export pathway that acts in coordination with the IMP $\alpha 2/\beta 1$ -mediated nuclear import to control cellular destination and regulate the concentration of the protein in each cell compartment.

In this study we show for the first time that there is an exportin1/Chromosome Region Maintenance 1 (CRM1)-mediated nuclear export pathway that regulates the ability of β -DG to exit the nucleus via the recognition of a nuclear export signal (NES) located in the transmembrane domain of β -DG. Remarkably, we demonstrated that abnormal nuclear accumulation of β -DG alters both targeting at the NE and the protein levels of lamin B1 and emerin, which in turn impairs various crucial cellular processes regulated by these two proteins. In summary, our data show that the combination of CRM1-dependent nuclear export and nuclear proteasome pathways prevent harmful nuclear accumulation of β -DG, and consequently these mechanisms are physiologically relevant for proper NE organization and activity.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Cell culturing, treatments, and transfection

Mouse C2C12 myoblasts were acquired from ATCC, and grown as previously [9]. Mouse primary myoblasts were isolated and cultured as previously described [10]. For inhibition of nuclear protein export, myoblasts were treated for 5 h with 50 nM of Leptomycin B (LMB; Sigma-Aldrich, St Louis), diluted in ethanol 70% or with ethanol alone. For analysis of β -DG stability, cells treated with ethanol (vehicle) or LMB as above were incubated with 30 μ g/ml cycloheximide (CHX) (Sigma-Aldrich, St Louis) to inhibit protein synthesis. Cells were harvested at 0, 12, 24 and 30 h of CHX treatment for further analysis. The proteasome inhibitor MG132 (Sigma-Aldrich, St Louis), was used at 10 μ M for 30 h. For transfection, C2C12 myoblasts seeded onto glass coverslips were incubated overnight prior to being transfected with 3 μ g of the appropriate vector premixed with 3 μ l of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the supplier's protocol, and were analyzed 24 h post-transfection. For knockdown experiments, C2C12 cells were stably expressing with psi-mH1 vector expressing a small interfering RNA (RNAi) specific for mouse CRM1, with a scrambled RNAi as a control (GeneCopoeia, Inc., Rockville, MD). Stably-transfected C2C12 myoblasts were obtained by culturing them for 12 days in the presence of 2 μ g/ml Puromycin (Invitrogen), prior to being used for further experiments.

2.2. Immunofluorescence and confocal microscopy analysis

Immunofluorescence assays were carried out as previously [11], and cell preparations were analyzed on a confocal laser scanning microscope (TCS-SP2, Leica, Heidelberg, Germany), using a Plan Neo Fluor 63x (NA = 1.4) oil-immersion objective. Single optical sections were visualized to analyze colocalization between fluorescent markers. Analysis of digitized images were carried out using Fiji software [12] to determine the nuclear to cytoplasmic ratio (Fn/c), and nucleoli volume and 3D reconstruction.

2.3. Plasmids and antibodies

The eukaryotic expression vectors encoding GFP and GFP- β -DG were previously described [7]. The mutant derivative GFP- β -DGNESm, which contains three-point mutations in the NES motif of β -DG at I763A/L764A/L765A positions, was generated by standard site-directed mutagenesis techniques, using GFP- β -DG vector as the template, the high fidelity Herculase II Fusion DNA polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), and the following oligonucleotides: forward 5'-GGTCGCGGCCCCCGCGGCCCAT TGCTGGAATC-3' and reverse 5'-GATTCCAGC-

AATGGCCGCGGCGGCCGCGACC-3'. Vectors expressing GFP in frame with the NES motif of β -DG and the retroviral protein REV were engineered using the following oligonucleotides: for GFP-NES β -DG forward 5'-GATCCAATCCTGCTCATTGC-TGGCATCATTGCCATG-3' and reverse 5'-GATCCATGGCAATGATGCCAGCAATGAG-CAG-GATTG-3' flanked by *EcoRI* and *BglII* sites respectively; for GFP-NESREV forward 5'-AATTCGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTTAAG-3' and reverse 5'-TCGACTT-AAAGAGTAAGTCTCTCAAGCGGTGGTAGCG-3', flanked by *Sall* and *EcoRI* sites respectively. Annealed oligonucleotides for NES- β -DG and NESREV were cloned in frame into pQBI and pEGFP-C1 respectively, via standard restriction/ligation techniques. Vectors encoding Glutathione S-transferase (GST) alone or fused to β -DG were previously described [9]. For knockdown experiments, psi-mH1 vector expressing either a small interfering RNA (RNAi) specific for mouse exportin1/CRM1 CRM1 or a scrambled RNAi control was acquired from GeneCopoeia, Inc. (Rockville, MD). All constructs were confirmed by DNA sequencing.

The following primary antibodies were used: rabbit polyclonal (JAF) [13], rabbit polyclonal (Dystroglycan [p Tyr892]) [14], goat polyclonal (C20), and mouse monoclonal (MANDAG2) [15] or (7D11) [Santa Cruz Biotechnology, CA] anti- β -DG antibodies. Rabbit polyclonal antibodies directed against GFP (FL), calnexin (H70), emerin (FL-254), lamin A/C (H-110), Sp3 (D-20), [Santa Cruz Biotechnology, CA, USA]; fibrillarin (ab5821), lamin B1 (ab16048) [Abcam, Cambridge, UK]; CRM1 (NB100-79802) [Novus Biologicals, Littleton, CO]. Mouse monoclonal antibodies directed against GST (B-14), GAPDH (6C5) [Santa Cruz Biotechnology, CA, USA]; lamin A/C (ab8984) [Abcam, Cambridge, UK]; γ -tubulin (GTU-88) [Sigma-Aldrich] and actin (a gift from Dr. Manuel Hernández, CINVESTAV-IPN, Mexico).

2.4. Cell fractionation

To obtain cytosolic and nuclear lysates, cells were collected by centrifugation at 3,500g for 15 min at 4°C, and resuspended in 1 ml TM buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF), containing 1X complete protease and phosphatase inhibitors (2 mM Na₃VO₄, 10 mM Na₂MoO₄, and 25 mM NaF), and further incubated for 10 min on ice. To solubilize the homogenates, 2% Triton X-100/PBS was added to obtain 1% Triton X-100 final concentration, prior to incubation for 10 min on ice. Nuclei were separated from the cytosolic membranes using a glass Dounce homogenizer (30 strokes using the B pestle) and centrifuged at 3,500g for 15 min at 4°C. The integrity of the nuclei without debris or cytoplasmic membranes was verified by observation under the light microscope. The supernatant containing the cytosolic fraction was separated, and the nuclear pellet was resuspended in 1 ml of buffer I (0.32 M Sucrose, 3 mM CaCl₂,

2 mM Mg(COO)₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.5% (v/v) NP40) and 1 ml of buffer II (2 M Sucrose, 2 mM Mg(COO)₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF), and further purified by centrifugation at 45,000g through a sucrose gradient for 1 h at 4°C. Nuclei were recovered using lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% (v/v) Triton X-100), supplemented with protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitors, vortexed for 30 min at 4°C, sonicated at 4 microns for 2 min and pre-cleared at 18,000g for 2 min at 4°C. The nuclear envelope (NE) fraction was obtained as previously [11, 16, 17]. Briefly, purified nuclei were resuspended in 1 ml of ice-cold 10% STM buffer [10% sucrose (w/v), 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1X complete (Roche Applied Science) and 0.5 mM PMSF]. Then chromatin was digested with 50 U/ml DNase I (Sigma-Aldrich) and 5 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich) for 1h on ice. Next, 4 ml of extraction buffer [10% sucrose (w/v), 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1X complete (Roche Applied Science) and 0.5 mM PMSF] were added drop-wise. The suspension was underlayed with 4 ml of ice-cold sucrose cushion [30% sucrose (w/v), 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM MgCl₂, 1mMDTT, 1X Complete (Roche Applied Science) and 0.5mM PMSF] and centrifuged at 4,000g for 15 min in a swinging bucket rotor. The pellet was resuspended in 1 ml of ice-cold extraction buffer including 0.3 mg/ml of heparin, and incubated at 4°C for 1 h. The suspension was underlayed again with 4 ml of ice-cold sucrose cushion and centrifuged as above. The resulting pellet that correspond to the NE was resuspended in RIPA 1X buffer. The nucleoplasmic fraction, was obtained as previously [18], purified nuclei were resuspended in 1 ml of ice cold 10% STM buffer and spun 2,000g for 15 min. The pellet was then resuspended in 2ml of hypotonic buffer [20mM HEPES pH 7.9, 5mM KCl, 1.5Mm DTT, 1X complete (Roche Applied Science) and 0.5 mM PMSF] and homogenization was performed by applying 20 strokes with a Dounce homogenizer. Nuclear homogenates were centrifuged at 6,300g for 15 min at 4°C. The resulting pellet was resuspended in 2 ml of ice-cold extraction buffer and centrifuged at 100,000g for 45 min. The supernatant that correspond to the nucleoplasm (soluble nuclear protein) extract was collected.

2.5. Immunoprecipitation and GST binding assay

GFP-based immunoprecipitation was performed using 500 µg of C2C12 cell lysates and the GFP-Trap® bead system (Chromotek, Planegg, Germany), and following the manufacturer's instructions. GST-based pull-down assays were performed as previously described [19]. Briefly, an aliquot (20 ml) of transformed bacterial cells (strain BL21), induced with 0.1 mM IPTG for 2 h at room temperature, then were centrifuged at 2,000g for 10 min, resuspended in 1 ml of NETN buffer

[100 mM (w/v) NaCl, 20 mM (w/v) Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM (w/v) EDTA, 0.5% (v/v) NP40, 1 mM (w/v) PMSF, 0.5% (w/v), complete protease inhibitor cocktail] and sonicated on ice (4 x 30 s, Branson sonifier). GST, GST- β -DG and GST-Multi-MDSK [20] recombinant proteins were affinity purified using glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences Co., Piscataway, NJ). To perform pull-down assays, similar amounts of the recombinant proteins immobilized onto 20 μ l of glutathione-Sepharose beads, were incubated for 2h at 4°C on a rotator with 0.5 mg of C2C12 cell extract. Beads were recovered by centrifugation at 2,000g for 5 min and washed 4 times with 0.5 ml ice-cold NETN buffer. Eluted proteins were subjected to SDS-PAGE and the interacting proteins were identified by western blotting analysis, using the appropriate primary antibodies.

2.6. Western blotting

Cell lysates were subjected to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond-N μ , Amersham Pharmacia, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Membranes were blocked in TBST [100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Tween-20] with 5% low-fat dried milk and then incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibodies. Specific proteins were visualized using enhanced chemiluminescence (ECLTM) western blotting detection system (Amersham Pharmacia, GE Healthcare), following manufacturer's instructions.

2.7. Total RNA extraction and Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

Total RNA was isolated from C2C12 myoblasts stably-expressing GFP, GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm recombinant protein, using the Direct-zolTMRNA MiniPrep kit according to the manufacturer's instructions (Zymo Research, Irvine CA). Real time quantitative reverse transcription-PCR was carried on the Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster CA), using 100 ng of total RNA and the KAPA SYBR Fast One Step qRT-PCR system (KAPABIOSYSTEMS; Wilmington MA) and its standard protocol for qPCR cycling. The expression levels of emerin, lamin B1, lamin A and lamin C mRNA were quantified by the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method, normalized to GAPDH. Primer sequences were as follow: *lamin B1* forward 5'-CTTGAGAATGCCAGACTCTC-3' and reverse 5'-AAACACGCTCTAGACTCTTT-3'; *emerin* forward 5'-CAACTCGTCATCTTCT-TCATTCTC-3' and reverse 5'-GTCATCATTATAGTCCTTGCTCTG-3'; *lamin A* forward 5'-TCCACTGGAGAAGAAGTGGC-3' and reverse 5'-GTGAGCGCAGGTTGTACTCAG-3'; *lamin C* forward (the same lamin A

forward primer) and reverse 5'-CTGCCACTCACACGGTGGTG-3'; and *GAPDH* forward 5'-CTTGGGCTACACTGAGGACC-3' and reverse 5'-CTGTTGCTGTAGCCGTATTC-3'.

2.8. Proliferation assay

Cells stably expressing GFP, GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm were harvested and plated in triplicate onto 12 wells microplates at 1×10^2 cells/mL confluence. Cell proliferation was assessed for 13 days using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazole)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide] commercial kit (Sigma-Aldrich) and following the manufacturer's instructions.

2.9. Flow cytometry

Cells were released from the culture dish using trypsin, followed by pelleting and washing twice with PBS. Cells were then fixed with 80% ethanol for 2 hours, stained for DNA with 1 μ g/mL DAPI (Sigma-Aldrich) for 20 minutes and transferred to flow cytometry tubes for cell cycle analysis in a BD LSR-Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Cell cycle analysis was carried out using the ModFit LT software (Verity Software House, Topsham, ME).

To synchronize cells in G0/G1 phase, cells stably expressing GFP, GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm were cultured in p70 dishes until 80% confluency, then the culture medium was replaced with DMEM medium with a low dose of serum (0.1% FBS) for 48 h. Cells were released from G0/G1 by reconstituting the culture medium with normal sera concentrations. Then, cells were harvested at 0, 12, 19, 21 and 24 h for analysis. To synchronize cells in G1/S-phase. Cells stably expressing GFP, GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm were grown in p70 dishes until 60% confluency and incubated with 2 mM thymidine (Sigma-Aldrich) for 18 h. Cells were released from S phase arrest by replacing the culture medium. Then, cells were harvested at 0, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 h for analysis. To synchronize cells in late G1/early S a double thymidine block was used. Cells were grown in p70 dishes until 60% confluency and incubated with 2 mM thymidine (Sigma-Aldrich) for 18 h, followed by washing and releasing cells into fresh medium for 9 h and were transfected with GFP, GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm 4 h post-released then were incubated with 2 mM thymidine for another 18 h and released by replacing the culture medium. Then cells were harvested at 4 h for nucleoli analysis.

2.10. *β-Catenin activity measurements*

C2C12 myoblasts were seeded onto 24 well plates (3×10^4 cells/well) and the next day transfected with 0.5 μg of either pEGFP, pEGFP- β -DG or pEGFP- β -DGNESm. Samples were cotransfected with 0.01 μg of TK *Renilla* luciferase (to estimate transfection efficiency), 0.5 μg of p β -Catenin and 0.2 μg of either pTOPFLASH or pFOPFLASH (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). After 24 h, the levels of luciferase and *Renilla* luciferase were determined in a luminometer using the Dual Luciferase Reporter Assay kit (Promega, Madison, WI). Luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity to adjust for transfection efficiency.

2.11. *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed by the two tailed unpaired Student's t test with Welch's correction, using GraphPad Prism 6 software (La Jolla California USA, www.graphpad.com). Data represent the mean \pm SEM from a series of three or four separate independent experiments and P values < 0.05 are indicative of statistical significance.

3. RESULTS

3.1. *β-DG can shuttle between the nucleus and cytoplasm*

Since β -DG is distributed in both nuclear and non-nuclear fractions, it seems likely that it may be a nucleocytoplasmic shuttling protein with a functional nuclear export pathway. To assess whether β -DG possess an exportin 1/CRM1-dependent nuclear export mechanism, the effect of the exportin CRM1-specific inhibitor leptomycin B (LMB) [21] on the subcellular distribution of β -DG was evaluated in C2C12 myoblasts by confocal laser scanning microscopy (CLSM), using two different antibodies directed against the C-terminal domain of β -DG: 7D11 (mouse monoclonal antibody) and pTyr892 (rabbit polyclonal antibody that specifically recognizes β -DG phosphorylated at Tyr⁸⁹²). The effectiveness of LMB treatment was tested using the classical NES of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Rev protein fused to GFP (GFP-Rev-NES) as positive control. As expected, GFP-Rev-NES was shifted from the cytoplasm to the nucleus in response to LMB treatment (Figure 1A), confirming that CRM1-mediated nuclear export was effectively blocked. We observed striking accumulation of β -DG in the nucleus upon LMB treatment, using either of the two anti- β -DG antibodies (Figure 1B). When cells were incubated with anti-rabbit or

anti-mouse secondary antibody alone no signal was detected (Supplemental Figure 1), confirming the specificity of anti- β -DG antibodies. Similarly, ectopically expressed GFP- β -DG fusion protein accumulated in the nucleus to a significantly greater extent in LMB-treated cells than in control cells (Figure 1C), with nuclear/cytoplasmic fluorescence ratios (Fn/c) of 2.5 and 1.0 respectively (lower panel). Fluorescence labeling to ascertain whether nuclear export is a natural regulatory mechanism of β -DG rather than a specific process related to immortalization of C2C12 myoblasts, the subcellular distribution of β -DG was also analyzed in mouse primary myoblasts before and after LMB treatment. As expected, β -DG clearly accumulated in the nucleus of primary myoblasts in response to LMB (Figure 1D), with Fn/c values of 1.3 and 2.4 for control and LMB-treated cells respectively (lower panel). Overall these results are consistent with the idea that both β -DG and its Y892 phosphorylated form undergo a CRM1-mediated nuclear export in myoblasts.

3.2. Nuclear export of β -DG is mediated by a CRM1-recognized NES located in its transmembrane domain

CRM1-recognised nuclear export signals (NES) generally include 4 or more closely spaced hydrophobic residues, often leucines [22, 23]; the primary amino acid sequence of β -DG was analyzed in an attempt to identify a molecular signal responsible for nuclear export of β -DG, using the NetNES 1.1 Server [24]. This analysis revealed a putative NES located in the transmembrane domain of β -DG [25], within residues ⁷⁶³I LL I AG I IAM⁷⁷² (Figure 2A). The motif exhibits certain conservation among the orthologous proteins from different species (Figure 2A), implying that the nuclear export property of β -DG might be preserved through evolution. To assess NES functionality, we fused the NES of β -DG to the heterologous protein GFP (see Methods), and ascertained whether the NES motif alone is able to mediate nuclear export of GFP. C2C12 myoblasts were transiently transfected to express GFP-NES β -DG or GFP alone as control (Figure 2B), and the distribution of the fluorescent reporter proteins was examined by CLSM. GFP alone distributed between the cytoplasm and the nucleus, with a comparatively higher signal in the nucleus, and this localization was unchanged after LMB treatment (Figure 2C), with Fn/c of 1.5 and 1.48 for control and LMB-treated cells respectively (right panel). By contrast, GFP-NES β -DG distributed evenly between the cytoplasm and the nucleus, but was more concentrated in the nucleus upon LMB treatment (Figure 2C), with Fn/c ratios of 1.0 and 1.5 respectively (right panel). These results imply that inclusion of the putative β -DG NES motif was sufficient to confer upon GFP the ability to undergo nuclear export, and that this trafficking pathway is sensitive to LMB.

Hydrophobic residues within the NES are required for protein export. Therefore, in order to identify key hydrophobic amino acids in the NES of β -DG, we generated a three-residue mutant (I763A/L764A/L765A) in the context of full-length β -DG fused to GFP. Afterwards, C2C12 myoblasts were transiently transfected to express GFP- β -DG or the mutant variant GFP- β -DGNESm (Figure 2D), and the distribution of fluorescent recombinant proteins was analyzed by CLSM. Strikingly, and in strong contrast to the even distribution of GFP- β -DG between the cytoplasm and nucleus, the NES mutant variant displayed significantly greater nuclear accumulation (Figure 2E), with Fn/c ratios of 1.0 and 2.5 respectively (right panel): The clear implication of these data is that triple mutation on the hydrophobic residues makes the NES unable to be recognized by the exportin CRM1. As LMB treatment failed to further increase the nuclear localization of GFP- β -DGNESm (Figure 2E), it appears that NES located in the transmembrane domain is the sole or major motif for nuclear export of β -DG.

To directly demonstrate an interaction of β -DG with exportin1/CRM1, *in vitro* pull-down assays were carried out, whereby GST and GST- β -DG recombinant proteins were expressed in *E. coli* (Figure 3A, top panel), purified and immobilised on Sepharose prior to incubation with C2C12 total lysates and subsequent WB analysis. Consistent with CLSM data, CRM1 was found to bind GST- β -DG but not GST alone (bottom panel), implying the specificity of the interaction. To confirm that β -DG binds exportin1/CRM1 in a physiological context and that such interactions occurs through the NES, we performed immunoprecipitation assays in intact cells using a GFP-Trap approach. GFP- β -DG but not GFP alone immunoprecipitated endogenous CRM1 from lysates of transiently transfected C2C12 cells, and importantly, GFP- β -DGNESm, which is impaired in nuclear export (see Figure 2C), was unable to interact with CRM1 (Figure 3B). Overall these data imply that CRM1 is the nuclear export transporter for β -DG in living cells and that a NES located in the TM domain of β -DG, mutated in GFP- β -DGNESm, is the target of CRM1.

To further demonstrate the dependence of β -DG nuclear export on exportin-CRM1, we analyzed the impact of exportin 1/CRM1 knockdown on β -DG subcellular localization. To this end, C2C12 myoblasts were transfected with a vector expressing small interfering RNA (RNAi) designed to target CRM1 mRNA or a scrambled RNAi that is predicted not to block the expression of any specific gene, as negative control. WB analysis of lysates obtained from cells stably expressing each RNAi (Figure 3C), and the subsequent quantitative analysis (bottom panel) showed that the CRM1 RNAi was effective in depleting exportin CRM1 protein levels, resulting in a decrease of 70%. It is worth to note that knockdown of CRM1 may affect nuclear export of over 230 identified cargos [26], with unpredictable consequences to cell physiology. We found β -DG to accumulate in

the nucleus of CRM1-depleted cells to a greater extent than control RNAi cells (Figure 3D), with quantitative analysis corroborating these observations (bottom panel; Fn/c of 1.0 and 4.5 for cell expressing control RNAi and exportin 1 CRM1 RNAi respectively). Thus, β -DG traffics from the nucleus to cytoplasm in an exportin-1/CRM1-dependent fashion.

The localization of β -DG in the NE [9, 11] as well the presence of the NES in the TM region raised important questions about the mechanism that allows β -DG to be available to be exported by CRM1. Since β -DG localizes to both NE and nucleoplasm, we speculate that solely the nucleoplasmic fraction of β -DG is undergoing nuclear export, while the NE-bound fraction of β -DG is inaccessible to CRM1. To test this hypothesis, C2C12 cells were treated with LMB prior to being fractionated into NE and nucleoplasmic extracts. The cell fractions purity was validated by immunodetection of nucleoplasm (Sp3) and NE (emerin) protein markers. Consistent with our hypothesis, inhibition of nuclear export resulted in accumulation of β -DG in the nucleoplasm; in contrast, β -DG NE levels by contrast, remained unaltered after LMB treatment (Figure 3E).

3.3. Impaired nuclear export of β -DG affects the levels and NE targeting of lamin B1 and emerin but not lamin A/C

From the above data, it appears that nuclear levels of β -DG are tightly regulated by the balance of nuclear import/export mechanisms. Therefore, we anticipated that abnormal accumulation of β -DG in the nucleus might alter nuclear envelope organization [9]. To test this hypothesis, we analyzed the impact of β -DG nuclear accumulation on the distribution of NE proteins. To this end, cells were transiently transfected to overexpress GFP- β -DG or its shuttling-defective variant GFP- β -DGNESm. To validate the use of recombinant proteins, we first ascertained whether GFP- β -DG and GFP- β -DGNESm target to the NE and bind to emerin and lamins A/C and B1, as endogenous nuclear β -DG does [9]. CLSM analysis showed that GFP- β -DG and GFP- β -DGNESm localizes to the cytoplasm and nucleus and exhibited a nuclear ring-like staining that suggest their targeting to the NE (Figure 4A). To confirm this, cells were fractionated into NE lysates and further analyzed by SDS/western blotting. GFP- β -DG and GFP- β -DGNESm were recovered in the NE fraction of these cells, together with the nuclear envelope protein marker emerin. The nucleoplasmic marker Sp3 is absent in the NE extract, which confirmed purity of this fraction (Figure 4B). Consistently, GFP-based IP assays demonstrated that both GFP- β -DG and GFP- β -DGNESm but not GFP alone, pulled down emerin and lamins A/C and B1 with similar efficacy (Figure 4C). Next, we proceeded to analyze the distribution of NE proteins in cells stably expressing the recombinant proteins. Most of the cells expressing either GFP alone or GFP- β -DG displayed the typical ring-like perinuclear labeling for the three NE proteins (Figure 5A), with the exception of some GFP- β -DG-transfected

cells that exhibited a marginal decrease in NE labeling and discrete aggregates outside the nucleus, as we have seen before. Conversely, the majority of cells expressing GFP- β -DGNESm exhibited altered immunostaining for both lamin B1 and emerin, which consist of a marked decrease in the NE staining, with the residual signal localized in discrete aggregates outside the nucleus (Figure 5A). Quantification of cells with emerin/lamin B1 mislocalization confirming these observations (right panels). The distribution of lamin A/C remained largely unaltered in GFP- β -DG NESm-expressing cells suggesting that nuclear accumulation of β -DG affects specifically emerin and lamin B1, as has been seen for nuclear depletion of β -DG [9]. Expression of GFP- β -DGNESm in a transient fashion resulted in a less severe mislocalization and protein aggregation for emerin and lamin B1 (Supplemental Figure. 2). To evaluate whether mislocalization of NE proteins impacts their protein levels, lysates from C2C12 cells stably expressing GFP, GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm were analyzed by western blotting with antibodies specific to each NE protein (Figure 5B). Quantitative analysis of immunoblots employing calnexin as loading control, revealed that nuclear accumulation of β -DG resulted in a substantial decrease of lamin B1 (~45%), emerin (~55%) and lamin A (~20%) levels (*lower panel*). Since the mRNA levels of the NE proteins estimated by RT-qPCR were found to be unaltered in cells stably expressing the shuttling-defective mutant (Figure 5C), it appears that a post-transcriptional mechanism underlies the depletion of emerin, lamin B1 and lamin A levels. This suggests therefore that nuclear accumulated β -DG associates quite strongly with the NE proteins, sufficient to disrupt endogenous NE architecture.

3.4. Nuclear accumulation of β -DG compromises emerin-mediated processes

We tested the hypothesis that abnormal nuclear accumulation of β -DG, with concomitant mislocalisation and decreased levels of emerin, might compromise emerin function. Attachment of centrosomes to the outer nuclear membrane has been shown to depend, at least in part, on a microtubule-emerin pathway [27], we therefore analyzed whether expression of the β -DG shuttling-defective mutant affects centrosome linkage to the nucleus (Figure 6A). Interestingly, cells expressing GFP- β -DGNESm exhibited a significant increase in the centrosome-nucleus distance (mean value of 2.811 μ m), compared with cells expressing either GFP (mean value of 1.537 μ m) or GFP- β -DG (mean value of 1.999 μ m). In addition, since emerin promotes nuclear export of β -catenin and thereby down-regulates β -catenin transcriptional activity [28], we examined the distribution and activity of β -catenin in C2C12 cells stably expressing the β -DG shuttling-defective mutant. Levels of nuclear β -catenin were consistently low in control cells expressing either GFP or GFP- β -DG; whereas cells expressing GFP- β -DGNESm with accompanying mislocalization of

emerin, exhibited a more predominant nuclear staining of β -catenin (Figure 6B). To further demonstrate the effect of dystroglycan on stability of emerin, β -catenin transcriptional activity was measured by transfecting a reporter vector in which luciferase expression is controlled by a promoter containing multiple β -catenin-TCF DNA elements (TOPGLOW), with a mutant promoter-containing vector (FLOPGLOW) used as control. We saw a more than 2-fold increase in β -catenin activity in cells expressing GFP- β -DGNEsm, compared with control cells (Figure 6C). Overall these data suggest that displacement of emerin from the NE, due to altered nuclear export of β -DG, ultimately undermined secondary functions of emerin including centrosome positioning and control of the transcriptional activity of β -catenin.

3.5. Expression of the β -DG shuttling defective mutant impairs lamin B1-dependent processes

Since lamin B1 is crucially involved in cell cycle progression [29], we were prompted to ascertain whether expression of the nuclear export-defective mutant of β -DG leads to an impairment of this process. In keeping with our hypothesis, a marked delay in the growth rate of GFP- β -DGNEsm-expressing cells was noted compared to untransfected cells, or cells expressing GFP- β -DG or GFP alone (Figure 7A). The delayed growth rate of GFP- β -DGNEsm expressing cells appeared to be due to a delay in G0/G1 phase rather than S-phase, as GFP- β -DGNEsm expressing cells showed a significant increase in G0/G1 when released from serum starvation (Figure 7B) whereas when released from thymidine block there was no difference in S phase progression between GFP- β -DGNEsm and GFP- β -DG or GFP expressing cells (Figure 7C). Lamin B1 is also involved in the maintenance of nucleolar architecture [30] then, C2C12 cells were arrested in late G1/early S phase by double thymidine treatment (Figure 7D), prior to evaluate the nucleolar structure. Consistent with the ability of β -dystroglycan to affect lamin B1 localisation, increased nuclear accumulation of GFP- β -DG NEsm resulted in disaggregation of nucleoli into more numerous and smaller bodies as determined by immunostaining for the nucleolar protein fibrillarin. This was further confirmed by both 3-D reconstruction of nucleoli structure (Figure 7E) and estimation of nucleoli number and nucleolar volume (Figure 7F). These data demonstrate that hindering β -DG nuclear export, with concomitant alteration of lamin B1 localization and expression, results in altered cell cycle progression and distorted nucleolar organization.

3.6. Forced nuclear accumulation of β -DG enhances its proteasomal degradation in the nucleus

The lifespan of β -DG has been shown to be modulated by phosphorylation-dependent proteasomal degradation [31]. Therefore we were prompted to analyze whether β -DG stability depends on its subcellular compartmentalization. C2C12 cells were pretreated with leptomycin B (LMB) prior to

inhibiting protein synthesis with cycloheximide, to analyze whether nuclear accumulation of β -DG affects its turnover. Interestingly, we observed a drastic reduction of 50% in the half-life of β -DG upon LMB treatment (Figure 8A) and this decrease in the protein levels was reversed after MG132 treatment (Figure 8B), suggesting that β -DG is more prone to proteasomal degradation within the nucleus. Because ubiquitination is an essential step for further degradation by the proteasome, we monitored the ubiquitination of β -DG in both the cytoplasm and the nucleus. C2C12 lysates were subjected to pulldown with GST-MultiDsk a GST protein fused to 3 repeated ubiquitin binding domains [20]. A higher molecular weight band that is likely to correspond to ubiquitinated β -DG was pulled down by the MultiDsk protein in both cytoplasm and the nucleus, but it was only recognised by the antibody raised against tyrosine phosphorylated β -dystroglycan and not by the antibody that detects unphosphorylated dystroglycan (Figure 8C). Thus, as has been described previously [31], it is only the tyrosine phosphorylated form of β -DG that is ubiquitinated. It is noteworthy that in this study, virtually all nuclear p β -DG was found to be ubiquitinated in the LMB-treated cells (compare S to P fractions), suggesting a more active ubiquitination of β -DG in these cells. Overall these data imply that β -DG is degraded by both the cytoplasmic and the nuclear proteasome and that forced nuclear accumulation of p β -DG enhances its nuclear degradation.

4. Discussion

β -dystroglycan (β -DG) is a well characterized component of the dystrophin associated protein complex (DAPC) of the sarcolemma with critical functions in cell adhesion/signaling and cytoskeleton remodeling [3, 5, 6, 32]. More recently, it has also been found to translocate to the nucleus in an importin α 2/ β 1-dependent fashion [7, 8]. In the nucleus, β -DG is thought to assemble with emerin and lamins A/C and B1 and plays a role in regulating nuclear architecture [9]. In this study, we investigated the nuclear export of β -DG and demonstrate for the first time that β -DG is subject to nucleocytoplasmic shuttling with an active exportin1/CRM1-mediated nuclear export pathway that together with its nuclear import serves to tightly regulate the nuclear levels of β -DG. In addition, we provide evidence that control of nuclear β -DG content by both nuclear export and nuclear proteasomal degradation pathways is physiologically relevant to maintain proper nuclear envelope organization and activity.

We identified a consensus hydrophobic nuclear export signal (NES) in the transmembrane region of β -DG. Using site-directed mutagenesis of GFP- β -DGNES fusion proteins we determined that the NES was functional. Nuclear export of β -DG was shown to be dependent on exportin1/CRM1, as demonstrated by: i) the CRM1-specific inhibitor Leptomycin B (LMB) blocked nuclear export of β -

DG in either C2C12 or primary myoblasts; ii) knockdown of exportin/CRM1 expression resulted in nuclear accumulation of both endogenous β -DG and GFP- β -DG fusion protein and iii) specific interaction of β -DG with exportin/CRM1 was revealed by either *in vitro* pull down assays and GFP-based immunoprecipitation assays in living cells. Overall these results support the notion that nuclear export of β -DG relies on NES motif recognition by exportin1/CRM1. To our knowledge, β -DG represents a unique example of an inner nuclear membrane protein with functional nuclear export pathway. We found that solely the nucleoplasmic fraction of β -DG is undergoing nuclear export, while the NE-bound fraction of β -DG remained inaccessible to CRM1. These results imply the existence of a molecular mechanism enabling β -DG to reach the nucleoplasm to be then accessible to the CRM1 nuclear export machinery. Elucidation of such mechanisms clearly requires further investigation [33].

Dystroglycan has multiple cellular roles involved in cell adhesion, cell signaling and organization of the cytoskeleton [2]. The spatial and temporal segregation of these multiple activities at the plasma membrane is under tight control, including by tyrosine phosphorylation, ubiquitination and regulated proteolysis [34-37] and through its association with a number of different cytolinker proteins depending on context [2]. Perturbations in dystroglycan homeostasis are evident in diseases such as muscular dystrophies [38] and cancer [39]. Moreover experimental manipulation of cellular dystroglycan levels by RNAi-mediated knockdown or overexpression can have both loss of function and gain of function consequences for cell adhesion, cell migration, cell invasion, anchorage independent growth and cytoskeletal organization [6, 36, 40]. The targeting of dystroglycan to different cellular compartments also impacts on function. Tyrosine phosphorylation of dystroglycan results in internalization of β -DG from the plasma membrane to the cytosol, where it can be targeted to endosomes [35, 41]. We recently demonstrated that β -DG undergoes retrograde trafficking from the PM to the nucleus, via the endosome-endoplasmic reticulum (ER) network. With the assistance of Sec61 β -DG is able to exit the ER membrane and becomes accessible for importin-mediated nuclear import through the nuclear pore [33]. Alternatively, we propose that β -DG transits by lateral movement from ER to the NE, where the Sec61 localized in the NE could mediate the translocation of a fraction of β -DG to the nucleoplasm. Consistent with this paradigm, we show here that aberrant nuclear accumulation of β -DG, through overexpression of a shuttling-defective mutant, has a dominant effect resulting in the mislocalization of the NE proteins emerin and lamin B1. Both proteins lose their characteristic ring-like immunostaining at the NE and accumulate in patches/aggregates localized outside the nucleus. Mistargeting of lamin B1 and emerin is accompanied by reduced protein stability as demonstrated by a decrease in their protein levels but with no change at the transcriptional level. Altered complex topology might impair lamin

B1 and emerin stability by exposing degradation signals that should normally be hidden, making these proteins more accessible to proteosomal attack. Likewise, altered complex structure might lead to lamin B1 and emerin cytoplasmic aggregation through unmasking of aggregation-prone regions. Consistent with this notion, there is growing evidence showing that proper engagement of a protein into a complex increases its stability [42, 43].

The tight regulation of dystroglycan function therefore extends to the nuclear compartment, as either nuclear accumulation (shown here by blocking nuclear export) or nuclear depletion of β -DG [9] leads to aberrant nuclear architecture. It is likely that an excess of nuclear β -DG results in competition between lamin B1 and emerin possibly leading to non-functional pairwise interactions with β -DG rather than functional three-way interactions, whereas sub-stoichiometric levels of β -DG don't allow enough three way interactions to form, the net result in either case being mislocalisation of emerin and lamin B1 and loss of NE architecture (Figure 4). A similar scenario is observed at the sarcolemma where mis-expression of sarcospan, caveolin-3 and plectin leads to competition for binding sites between these proteins and dystroglycan and dystrophin [44-46]. The nuclear accumulation of β -DG disturbs emerin- and lamin B1-dependent functions (Figure 6-7). A significant percentage of C2C12 myoblasts containing high concentration of nuclear β -DG exhibited centrosomes that were detached from the NE, implying that the microtubule-emerin pathway that controls anchorage of centrosomes to the ONM [27] was disrupted in these cells. Furthermore, transcriptional activity of β -catenin, which is partially dependent on emerin-mediated nuclear export of β -catenin [28], was increased in cells containing an excess of nuclear β -DG. In the same way, we found impairment in the lamin B1 activities that control cell cycle progression and nucleoli structure in response to high levels of nuclear β -DG. These cells accumulate at G0/G1 and exhibited delay transition through S phase, which is consistent with a previous study showing prolonged S phase in colon cancer cells with depleted levels of lamin B1 [29]. Interestingly the same effect on the cell cycle is seen in Swiss 3T3 cells depleted for dystroglycan [47]. With respect to the nucleolar compartment, we observed the appearance of dispersed and distorted nucleoli concomitant with the nuclear accumulation of β -DG. This is probably due to the role of lamin B1 in modulating nucleoli organization and plasticity [30], it is likely that nuclear overexpression of β -DG impacts nucleoli structure by a primary effect upon lamin B1 expression, localization, interactions and stability. Altogether, these data demonstrate that dysregulation of β -DG nuclear trafficking has physiological consequences on NE organization and activity. In keeping with this idea, cells treated with LMB exhibited accelerated turnover of nuclear β -DG, by nuclear proteosomal degradation, which suggests the activation of alternative protective mechanisms to restrict the lifespan of nuclear β -DG and prevent its harmful accumulation.

It has been observed previously that alterations in the protein levels of one NE component, either by knockdown or overexpression can have deleterious effects on other NE components with which it interacts, with functional and pathological consequences [48]. Lamin B1 overexpression in oligodendrocytes resulted in both altered localization and protein levels of LAP2 (Lamina-Associated Polypeptide 2) and decreased nuclear import of Nup153. [49]. Dosage-sensitivity of the lamin B1-containing NE network is highlighted by the fact that adult-onset autosomal dominant leukodystrophy (disorder characterized by central nervous system demyelination) is caused by lamin B1 overexpression, due to LMNB1 gene duplication [50, 51]. In opposite way, lamin B1 knockdown induced cell senescence in human fibroblasts [52]. Furthermore, either overexpression or downregulation of LUMA (transmembrane protein 43) has a drastic effect on NE structure via mislocalization of emerin [53]. Likewise, decreased emerin levels by antisense treatment resulted in altered centrosome-nucleus distance [27]. Finally, nuclear accumulation of RAC1 (member of the Rho family of small GTPases that localizes in the NE) due to an alteration in its nuclear export pathway, leads to actin polymerization-dependent alterations in NE organization, including aberrant nuclear shape and mislocalization of lamin A/C and emerin, and ultimately to acquisition of a cell invasive phenotype [54]. Therefore, by similar mechanisms, changes in dystroglycan through altered nuclear trafficking, lead to alterations in nuclear architecture.

Several transmembrane surface receptors are known to translocate to the nucleus, either in whole or in part. Cleavage of the intracellular domain (ICD) of several adhesion receptors, such as notch and CD44 and the translocation of the ICD to the nucleus is an integral part of their signalling mechanism. Like β -dystroglycan, the ICD of notch and CD44 have roles in regulating transcriptional activity in the nucleus [55-57]. Tyrosine kinase receptors such as EGFR and FGFR, and GPCRs like the bradykinin B2 receptor are translocated to the nucleus intact [58-62]. The role of the FGFR in the nucleus remains unclear, whereas translocation of the EGFR and bradykinin B2 receptors to the nucleus are believed to also have a role in transcriptional regulation [63, 64]. But unusually β -dystroglycan is also translocated to the nucleus intact, where it functions in the NE as a nuclear cytoskeletal anchor, in a manner similar to its role in the plasma membrane [2]. Possibly, because of the dual role that β -dystroglycan plays in the plasma membrane and the NE, and the fact that β -dystroglycan translocates from plasma membrane to nucleus where increased levels of dystroglycan can have deleterious effects, as we have shown here, β -dystroglycan is also actively degraded or exported from the nucleus. The mechanism of export involves the normal nuclear export pathway via CRM1, but somewhat unusually involves an NES that is part of the transmembrane region of dystroglycan. However, such a mechanism is not without precedent.

Experiments conducted by Myers and colleagues [65], demonstrated a role for the transmembrane region of FGFR in nucleo-cytoplasmic shuttling. Moreover, reviewing their data in the context of current understanding of NES [66], it seems clear that nuclear accumulation of FGFR mutants they generated is due to alteration of a putative NES in the transmembrane region of FGFR1 (³⁸⁵-L I S C M V C S V I V-³⁹⁶) [65]. Thus, our findings demonstrate for the first time a dual role for a cell adhesion receptor acting as a membrane-cytoskeletal anchor in both the plasma membrane and the inner nuclear membrane. The function of β -dystroglycan in both compartments is maintained by tight control of the nucleo-cytoplasmic shuttling of dystroglycan in order to maintain effective interactions with binding partners at the two membrane cytoskeleton interfaces. This presents a new paradigm for the dual function and regulation of an integral membrane protein in both plasma membrane and inner nuclear membrane. Therefore, dysregulation of the β -DG cellular trafficking might have pathological consequences. At this respect, we recently found that overexpression of CRM1 (a hallmark of a large variety of tumors) resulted in β -DG nuclear depletion in prostate cancer cells (unpublished data), which in turn might be related to the aberrant nuclear morphology exhibit by these cells.

In conclusion, we show that β -DG is a nucleus/cytoplasm shuttling protein with a functional nuclear export pathway that depends on the recognition of a NES localized in its transmembrane domain by exportin/CRM1. Remarkably, exportin 1/CRM1 nuclear export and nuclear proteasomal degradation pathways contribute both to control β -DG nuclear content, in order to preserve the structure and functioning of the NE (Figure 9).

5. References

1. Ervasti, J.M. and K.P. Campbell, *A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin*. J Cell Biol, 1993. **122**(4): p. 809-23.
2. Moore, C.J. and S.J. Winder, *Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs*. Cell Commun Signal, 2010. **8**: p. 3.
3. Spence, H.J., et al., *Ezrin-dependent regulation of the actin cytoskeleton by beta-dystroglycan*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(15): p. 1657-68.
4. Martinez-Zarate, A.D., et al., *Dystroglycan depletion inhibits the functions of differentiated HL-60 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **448**(3): p. 274-80.
5. Spence, H.J., et al., *Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade*. EMBO Rep, 2004. **5**(5): p. 484-9.
6. Thompson, O., et al., *Modulation of cell spreading and cell-substrate adhesion dynamics by dystroglycan*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 1): p. 118-27.
7. Lara-Chacon, B., et al., *Characterization of an Importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan*. J Cell Biochem, 2010. **110**(3): p. 706-17.

8. Oppizzi, M.L., et al., *Nuclear translocation of beta-dystroglycan reveals a distinctive trafficking pattern of autoproteolyzed mucins*. *Traffic*, 2008. **9**(12): p. 2063-72.
9. Martinez-Vieyra, I.A., et al., *A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(3): p. 698-711.
10. Das, M., et al., *Differentiation of skeletal muscle and integration of myotubes with silicon microstructures using serum-free medium and a synthetic silane substrate*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(7): p. 1795-801.
11. Gonzalez-Ramirez, R., et al., *Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis*. *J Cell Biochem*, 2008. **105**(3): p. 735-45.
12. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-82.
13. Rivier, F., et al., *Utrophin and dystrophin-associated glycoproteins in normal and dystrophin deficient cardiac muscle*. *J Muscle Res Cell Motil*, 1999. **20**(3): p. 305-14.
14. Ilsley, J.L., M. Sudol, and S.J. Winder, *The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton*. *Cell Signal*, 2002. **14**(3): p. 183-9.
15. Pereboev, A.V., et al., *Epitopes in the interacting regions of beta-dystroglycan (PPxY motif) and dystrophin (WW domain)*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1527**(1-2): p. 54-60.
16. Cronshaw, J.M., et al., *Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex*. *J Cell Biol*, 2002. **158**(5): p. 915-27.
17. Matunis, M.J., *Isolation and fractionation of rat liver nuclear envelopes and nuclear pore complexes*. *Methods*, 2006. **39**(4): p. 277-83.
18. Qi, M.L., et al., *Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(4): p. 402-14.
19. Aguilar, A., et al., *Nuclear localization of the dystrophin-associated protein alpha-dystrobrevin through importin alpha2/beta1 is critical for interaction with the nuclear lamina/maintenance of nuclear integrity*. *FASEB J*, 2015. **29**(5): p. 1842-58.
20. Wilson, M.D., et al., *MultiDsk: a ubiquitin-specific affinity resin*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46398.
21. Yashiroda, Y. and M. Yoshida, *Nucleo-cytoplasmic transport of proteins as a target for therapeutic drugs*. *Curr Med Chem*, 2003. **10**(9): p. 741-8.
22. Cook, A., et al., *Structural biology of nucleocytoplasmic transport*. *Annu Rev Biochem*, 2007. **76**: p. 647-71.
23. Hutten, S. and R.H. Kehlenbach, *CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond*. *Trends Cell Biol*, 2007. **17**(4): p. 193-201.
24. la Cour, T., et al., *NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(1): p. 393-6.
25. Henry, M.D. and K.P. Campbell, *Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton*. *Curr Opin Cell Biol*, 1996. **8**(5): p. 625-31.
26. Ishizawa, J., et al., *Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein*. *Pharmacol Ther*, 2015. **153**: p. 25-35.
27. Salpingidou, G., et al., *A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane*. *J Cell Biol*, 2007. **178**(6): p. 897-904.
28. Markiewicz, E., et al., *The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus*. *Embo j*, 2006. **25**(14): p. 3275-85.
29. Camps, J., et al., *Loss of lamin B1 results in prolongation of S phase and decondensation of chromosome territories*. *FASEB J*, 2014. **28**(8): p. 3423-34.

30. Martin, C., et al., *Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 10): p. 1551-62.
31. Lipscomb, L., et al., *Dasatinib as a treatment for Duchenne muscular dystrophy*. Hum Mol Genet, 2016. **25**(2): p. 266-74.
32. Chen, Y.J., et al., *Direct interaction of beta-dystroglycan with F-actin*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 2): p. 329-37.
33. Gracida-Jiménez V, M.-G.R., Vélez-Aguilera G, Vásquez-Limeta A, Laredo-Cisneros MS, Gómez-López J, Vaca L, Gourlay SC, Jacobs LA, Winder SJ and Cisneros B, *Retrograde trafficking of β -dystroglycan from the plasma membrane to the nucleus in Scientific Reports* 2017.
34. James, M., et al., *Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of (beta)-dystroglycan regulates its interaction with utrophin*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 10): p. 1717-26.
35. Miller, G., et al., *Preventing phosphorylation of dystroglycan ameliorates the dystrophic phenotype in mdx mouse*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(20): p. 4508-20.
36. Mitchell, A., et al., *Dystroglycan function is a novel determinant of tumor growth and behavior in prostate cancer*. Prostate, 2013. **73**(4): p. 398-408.
37. Leocadio, D., A. Mitchell, and S.J. Winder, *gamma-Secretase Dependent Nuclear Targeting of Dystroglycan*. J Cell Biochem, 2016. **117**(9): p. 2149-57.
38. Riemersma, M., et al., *Absence of alpha- and beta-dystroglycan is associated with Walker-Warburg syndrome*. Neurology, 2015. **84**(21): p. 2177-82.
39. Mathew, G., et al., *Nuclear targeting of dystroglycan promotes the expression of androgen regulated transcription factors in prostate cancer*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2792.
40. Batchelor, C.L., et al., *Recruitment of Dbl by ezrin and dystroglycan drives membrane proximal Cdc42 activation and filopodia formation*. Cell Cycle, 2007. **6**(3): p. 353-63.
41. Sotgia, F., et al., *Localization of phospho-beta-dystroglycan (pY892) to an intracellular vesicular compartment in cultured cells and skeletal muscle fibers in vivo*. Biochemistry, 2003. **42**(23): p. 7110-23.
42. Buchler, N.E., U. Gerland, and T. Hwa, *Nonlinear protein degradation and the function of genetic circuits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9559-64.
43. Tompa, P., et al., *Structural disorder serves as a weak signal for intracellular protein degradation*. Proteins, 2008. **71**(2): p. 903-9.
44. Miller, G., et al., *Structural and functional analysis of the sarcoglycan-sarcospan subcomplex*. Exp Cell Res, 2007. **313**(4): p. 639-51.
45. Galbiati, F., B. Razani, and M.P. Lisanti, *Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy*. Trends Mol Med, 2001. **7**(10): p. 435-41.
46. Rezniczek, G.A., et al., *Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (mdx) muscle fibers through multiple interactions with beta-dystroglycan*. J Cell Biol, 2007. **176**(7): p. 965-77.
47. Higginson, J.R., O. Thompson, and S.J. Winder, *Targeting of dystroglycan to the cleavage furrow and midbody in cytokinesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(5): p. 892-900.
48. Meinke, P. and E.C. Schirmer, *The increasing relevance of nuclear envelope myopathies*. Curr Opin Neurol, 2016. **29**(5): p. 651-61.
49. Lin, S.T. and Y.H. Fu, *miR-23 regulation of lamin B1 is crucial for oligodendrocyte development and myelination*. Dis Model Mech, 2009. **2**(3-4): p. 178-88.
50. Padiath, Q.S., et al., *Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy*. Nat Genet, 2006. **38**(10): p. 1114-23.
51. Dos Santos, M.M., et al., *Adult-onset autosomal dominant leukodystrophy due to LMNB1 gene duplication*. J Neurol, 2012. **259**(3): p. 579-81.

52. Shah, P.P., et al., *Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape*. *Genes Dev*, 2013. **27**(16): p. 1787-99.
53. Bengtsson, L. and H. Otto, *LUMA interacts with emerin and influences its distribution at the inner nuclear membrane*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 4): p. 536-48.
54. Navarro-Lerida, I., et al., *Rac1 nucleocytoplasmic shuttling drives nuclear shape changes and tumor invasion*. *Dev Cell*, 2015. **32**(3): p. 318-34.
55. Kidd, S., T. Lieber, and M.W. Young, *Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in Drosophila melanogaster embryos*. *Genes Dev.*, 1998. **12**(23): p. 3728-3740.
56. Schroeter, E.H., J.A. Kisslinger, and R. Kopan, *Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain*. *Nature*, 1998. **393**(6683): p. 382-6.
57. Okamoto, I., et al., *Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway*. *J. Cell Biol.*, 2001. **155**: p. 755-762.
58. Lin, S.Y., et al., *Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(9): p. 802-8.
59. Maher, P.A., *Nuclear Translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptors in response to FGF-2*. *J Cell Biol*, 1996. **134**(2): p. 529-36.
60. Prudovsky, I.A., et al., *The nuclear trafficking of extracellular fibroblast growth factor (FGF)-1 correlates with the perinuclear association of the FGF receptor-1alpha isoforms but not the FGF receptor-1beta isoforms*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(24): p. 14198-205.
61. Stachowiak, M.K., et al., *Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors is regulated by multiple signals in adrenal medullary cells*. *Mol Biol Cell*, 1996. **7**(8): p. 1299-317.
62. Lee, D.K., et al., *Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(9): p. 7901-8.
63. Savard, M., et al., *Expression of endogenous nuclear bradykinin B2 receptors mediating signaling in immediate early gene activation*. *J Cell Physiol*, 2008. **216**(1): p. 234-44.
64. Wang, Y.N., et al., *Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins*. *Oncogene*, 2010. **29**(28): p. 3997-4006.
65. Myers, J.M., et al., *Nuclear trafficking of FGFR1: a role for the transmembrane domain*. *J Cell Biochem*, 2003. **88**(6): p. 1273-91.
66. Kosugi, S., et al., *Nuclear export signal consensus sequences defined using a localization-based yeast selection system*. *Traffic*, 2008. **9**(12): p. 2053-62.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Nucleocytoplasmic shuttling of β -DG in C2C12 and primary mouse myoblasts is prevented by LMB. (A) LMB treatment effectively blocks the CRM1-mediated nuclear export of GFP-NESRev. C2C12 myoblasts transiently expressing GFP-NESRev protein were used to demonstrate the efficiency of LMB in blocking nuclear export. Cells treated with LMB (inhibitor of exportin CRM1) or vehicle alone (see Methods) were subjected to CLSM analysis. Cells were stained with DAPI for nuclei visualization. (B) C2C12 myoblasts were treated with LMB or ethanol 70% (vehicle) and then immunostained for β -DG using the indicated primary anti- β -DG antibodies. Cells were counterstained with DAPI to decorate nuclei, prior to analysis by CLSM. (C) C2C12 cells were transiently transfected to express GFP or GFP- β -DG and 8 h post-transfection and treated with LMB as above. Cells were then stained for actin-based cytoskeleton (Phalloidin; red) and nuclei (DAPI) visualization. Transfected cells were imaged by CLSM. *Bottom panel.* Quantitative analysis to determine the nuclear to cytoplasmic fluorescence ratio (Fn/c) of GFP and GFP- β -DG was performed using Fiji software. (D) Mouse primary myoblasts were treated with LMB or vehicle alone prior to immunostaining for β -DG and counterstained for F-actin and nuclei, and then subjected to CLSM analysis. *Bottom panel.* Fn/c ratios of vehicle- and LMB-treated cultures were calculated as above. Data represent means \pm SEM of three separate experiments ($n > 50$ cells), with significance denoted by P values (unpaired t test). Subcellular distribution of β -DG is sensitive to LMB. Typical single Z-sections of confocal CLSM images are shown. Scale bar is 10 μ m.

Figure 2. **Identification and functional characterization of a nuclear export signal (NES) in β -DG.** (A) Schematic representation of β -DG showing the localization of the NES motif in the context of the transmembrane (TM) domain. Comparison of the putative NES motif of β -DG with a consensus NES motif and its alignment with the corresponding sequences in β -DG orthologous from different species. (B) C2C12 myoblasts transiently expressing GFP or GFP fused to the NES of β -DG (GFP-NES- β -DG) were analyzed by WB using anti-GFP antibodies. (C) C2C12 myoblasts were transfected to express GFP or GFP-NES- β -DG and 12 h post-transfection incubated with LMB or vehicle alone (see Methods). Cells were stained with DAPI to visualize nuclei and imaged by CLSM. Scale bar, 10 μ m. *Right panel.* The nuclear to cytoplasmic fluorescence ratio (Fn/c) of GFP and GFP-NES- β -DG in the absence or presence of LMB was determined as described in Figure 1D. Data correspond to mean \pm SEM of three separate experiments (n > 50 cells), with a significant difference denoted by P value (unpaired *t* test). The NES of β -DG shifted the distribution of GFP from the nucleus to the cytoplasm but upon LMB treatment the fusion protein accumulated in the nucleus. (D) Expression of GFP- β -DG or its mutant variant GFP- β -DGNESm were analyzed by SDS-PAGE/WB using anti-GFP antibodies. (E) Cells transiently transfected to express GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm and 24 h post-transfection were incubated with LMB or vehicle alone as above. Cells were then fixed, stained with phalloidin and DAPI to decorate actin and nuclei respectively and subjected to CLSM analysis. The hydrophobic residues changed to alanines in the mutated NES are denoted in red. Typical single optical Z-sections of CLSM images are shown; scale bar, 10 μ m. *Right panel.* Fn/c ratios of recombinant proteins were determined as described in C. Data represent mean \pm SEM of four separate experiments (n > 50 cells), with significant difference denoted by P value (unpaired *t* test.).

Figure 3. **Nuclear export of β -DG is dependent on exportin 1/ CRM1.** (A) Bacterially expressed GST and GST- β -DG proteins were visualized by SDS-PAGE (top panel). The interaction between β -DG and exportin 1/CRM1 was determined by pull down and SDS-PAGE/WB analyses using C2C12 lysates and anti-exportin-1/CRM1 antibodies (bottom panel). Inputs correspond to 5% of extracts prior to pull-down. B, bound fraction; Un, unbound fraction. (B) Binding of β -DG to exportin1/CRM1 in living cells. Lysates from C2C12 myoblasts expressing GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm were immunoprecipitated using GFP-trap and precipitated proteins subjected to SDS-PAGE/WB analysis using anti-exportin 1/CRM1 or anti-GFP antibodies. Inputs correspond to 5% of lysates prior to immunoprecipitation. B, bound fraction; Un, unbound fraction. (C) C2C12 myoblasts were stably expressing with vector expressing either an irrelevant RNAi (control RNAi) or an RNAi designed against exportin 1/CRM1 mRNA (CRM1 RNAi). Exportin1/CRM1 expression was analyzed by SDS-PAGE/WB using antibodies against exportin 1/CRM1 or actin (loading control). (D) Knockdown of exportin 1/CRM1 expression impairs nuclear export of β -DG. C2C12 myoblasts stably expressing either control or exportin 1/CRM1 RNAi were immunostained for β -DG and counterstained with DAPI for nuclei visualization. CLSM analysis with typical single optical Z-sections shown; scale bar 10 μ m. The Fn/c ratio of β -DG (*bottom panel*) was measured as described in Figure 1D. Data represent mean \pm SEM of three independent experiments ($n > 50$ cells), with P value denoting significant difference (unpaired t test). β -DG nuclear export is mediated by exportin 1/CRM1. (E) Cells, treated with LMB or vehicle alone (ethanol) as in Figure 1, were subjected to cell fractionation to isolate nucleoplasmic and NE extracts. Protein extracts were then analyzed by SDS-PAGE/WB using anti- β -DG antibodies. Stripped membranes were reprobed for Sp3 and emerin, purity controls for nucleoplasm and NE respectively.

Figure 4. **GFP- β -DG and GFP- β -DGNESm are targeted to the NE and interact with NE proteins.** (A) Distribution of GFP- β -DG and GFP- β -DGNESm was analyzed by CLSM in C2C12 cells at 24 h post-transfection. Nuclei were decorated by staining with DAPI. Scale bar, 10 μ m. (B). C2C12 cell were subjected to cell fractionation to obtain nuclear envelope (NE) fractions respectively. Stripped membranes were reprobed for caveolin 3 (membrane protein), actin (cytoplasmic protein), Sp3 (nucleoplasmic protein) and emerin (NE marker), to demonstrate the cell fractions purity. (C) Interaction of GFP- β -DG and GFP- β -DGNESm with NE proteins was analyzed using the GFP-Trap system. Immunoprecipitated and unbound fractions were analyzed by SDS-PAGE/WB using specific antibodies against lamin B1, lamin A/C, emerin and GFP (control).

Input corresponds to 5% of total lysates prior to immunoprecipitation. B, bound fraction; Un, unbound fraction.

Figure 5. Overexpression of the β -DG shuttling defective mutant alters the localization and levels of emerin and lamin B1. (A) C2C12 myoblasts stably expressing GFP, GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm, were immunostained for the indicated NE proteins and counterstained with DAPI prior to analysis by CLSM. Typical single optical Z-sections are shown; scale bar 10 μ m. The percentage of cells showing altered localization of the indicated NE proteins was calculated (*right panels*). Results represent mean \pm SEM of three independent experiments (n= 100 cells), with P values showing significant differences (unpaired *t* test). C2C12 myoblasts stably expressing GFP, GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm, were subjected to SDS-PAGE/western blotting (B) and qRT-PCR (C) analyses. (B) Lysates were analyzed by SDS-PAGE/WB using specific antibodies against lamin B1, lamin A/C, emerin and calnexin (loading control) and their protein levels were measured by densitometry analysis. Results correspond to mean \pm SEM of three separate experiments, with P values showing significant differences (unpaired *t* test). (C) qRT-PCR assays were carried out to measure RNA levels of lamin B1, lamin A/C, emerin or GAPDH (control). The relative levels obtained in cells transfected with GFP alone were set at 1. Data represent mean \pm SEM of three separate experiments.

Figure 6. Defective nuclear-cytoplasmic shuttling of β -DG affects both centrosome positioning and β -catenin signaling. (A) C2C12 myoblasts stably expressing either GFP, GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm were double stained with anti- γ -tubulin antibody and DAPI to decorate centrosomes and nuclei respectively. Typical images showing centrosome positioning are shown; scale bar, 10 μ m. Nuclear-centrosome distance, indicated by white lines (lower image), were measured in overlaid images using Leica Application Suite, Advanced Fluorescence Lite imaging processing software. Data from three separate experiments (n=200 cells) are shown in a box-and-whisker plot (bottom panel), with P value indicating significance difference (unpaired *t* test). (B) Transfected cells were immunostained for β -catenin and counterstained with DAPI to visualize nuclei. (C) Cells were transiently transfected with either GFP, GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm, along with TOPFLASH or its mutant promoter variant FLOPFLASH and TK *Renilla*. After incubation for 24 h the luciferase activity was measured as described in Methods. Control condition (100% of luciferase activity) correspond to the TOPFLASH/FLOPFLASH ratio obtained in cells transfected with GFP alone. Data represent mean

\pm SEM of three independent experiments; P values denote significant difference (unpaired *t* test). β -DG nuclear accumulation impaired nuclear functions mediated by emerlin.

Figure 7. Expression of the β -DG shuttling defective mutant alters both cell cycle progression and nucleoli structure. C2C12 myoblasts that stably expressed GFP, GFP- β -DG or GFP- β -DGNESm were obtained for the following assays. (A) Cell proliferation was monitored over a 14-day period using the MTT assay. Stably expressing cells were synchronized at G0/G1 phase by serum starvation for 48 h (B) or at S phase by thymidine treatment (C) and then released into the cell cycle. Cells were fixed and stained with DAPI to determine DNA content at the indicated times. Cell cycle profiles were analyzed by flow cytometry and their graphical representation correspond to the average percentage of cells at each phase of three independent experiments. (D) Cells were synchronized at S phase by double thymidine treatment prior to the analysis of nucleolar structure (E) Cells were grown on coverslips, immunostained for fibrillarlin and further subjected to CLSM to examine nucleolar morphology; scale bar 10 μ m. 3D reconstruction of nucleoli was obtained from optical Z-sections (0.4 μ m step size) using Fiji software. (F) The number of nucleoli per cell (*top panel*) and the nucleoli volume (*bottom panel*) were determined in each cell culture (n = 200 cells) using Fiji software. Data from three separate experiments (n=200 cells) are shown in a box-and-whisker plot (*bottom panel*), with P value indicating significance difference (unpaired *t* test). β -DG nuclear accumulation altered lamin B1-dependent functions.

Figure 8. LMB-mediated nuclear accumulation of β -DG accelerates its degradation by the nuclear proteome. (A) C2C12 myoblasts were treated with LMB or vehicle alone (see methods) and then with CHX for the indicated time intervals. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE/WB analysis using specific antibodies for β -DG and GAPDH (loading control). *Right panel.* β -DG half-life ($t_{1/2}$) was calculated by densitometry analysis of autoradiograms ($t_0 = 100\%$). Data correspond to mean \pm SEM of three separate experiments and the linear regression plot was obtained using Graphpad Prism 6 software. β -DG turnover was accelerated in LMB-treated cells. (B) C2C12 myoblasts treated with LMB and CHX as in (A) were further incubated for 30 h with MG132 (proteasome inhibitor) or vehicle alone. Data correspond to mean \pm SEM of three separate experiments, with P value indicating significance differences (unpaired *t* test). Proteasome inhibition recovered β -DG protein levels. (C) C2C12 cells treated with LMB or vehicle alone for 12h were fractionated into cytoplasmic and nuclear extracts and further subjected to pulldown assay. Supernatant (S) and pellet (P) samples from control Glutathione-S-transferase (GST) and

GST-MultiDsk ubiquitin binding protein pulldown were separated by SDS-PAGE and western blotted for pY892 β -dystroglycan (p- β DG, lower panel) or the unphosphorylated counterpart (β -DG, upper panel). Calnexin and lamin A/C served as cell fractionation purity controls for cytoplasm and nucleus respectively. Nuclear degradation of p- β -DG by the ubiquitin-proteasome pathway was enhanced upon LMB treatment.

Figure 9. **Functional consequences of altered β -DG nuclear export.** (A) The nuclear β -DG content is controlled by CRM1-mediated nuclear export (1) and nuclear proteosomal degradation of phospho- β -DG [Tyr⁸⁹²] (2). (B) Nuclear accumulation of β -DG due to LMB treatment (1) or the expression of a β -DG shuttling-defective mutant (2) resulted in altered NE organization and function. Mislocalization and decreased levels of emerin (3) and lamin B1 (5) resulted in impaired emerin- and lamin B1-dependent functions, including anchorage of the centrosomes to the ONM (4) and maintenance of nucleoli structure (6) respectively. In addition, β -DG nuclear accumulation accelerated degradation of phospho- β -DG by the nuclear proteasome (7).

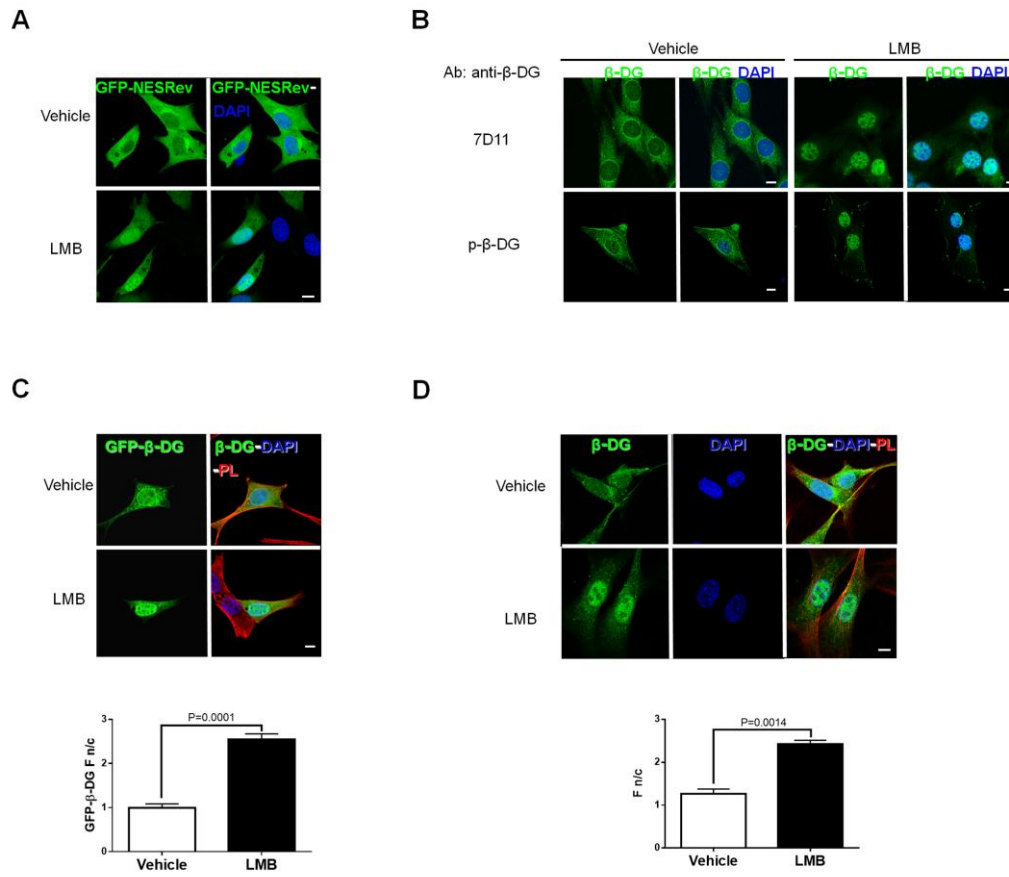


Figure 1

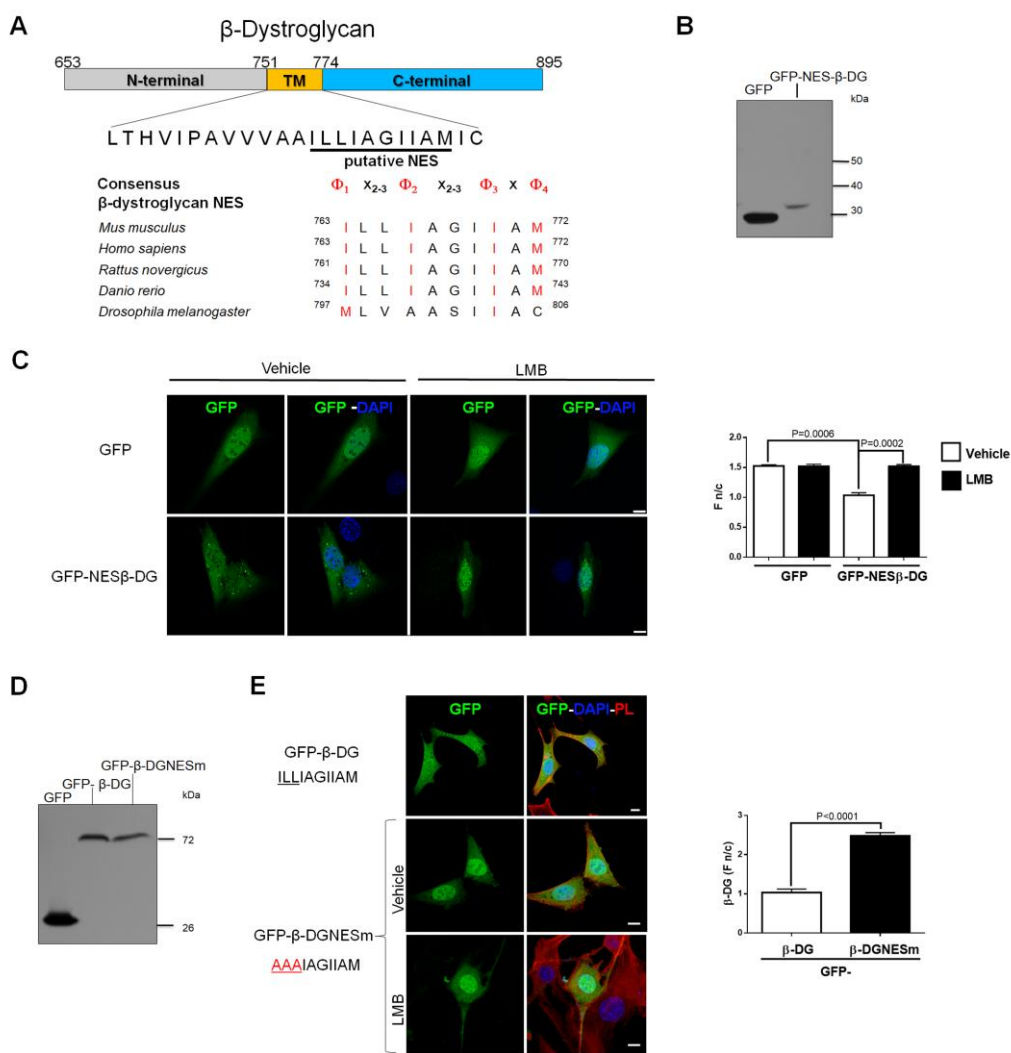


Figure 2

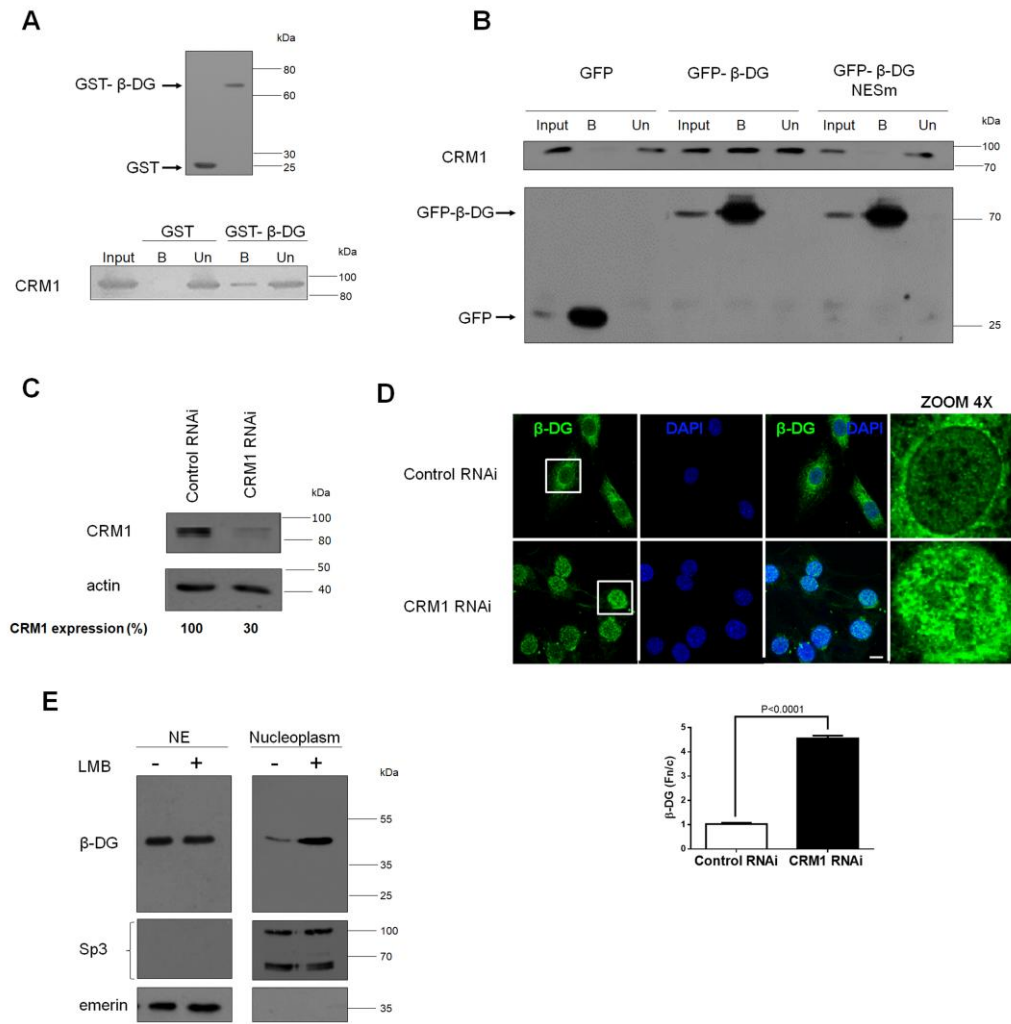


Figure 3

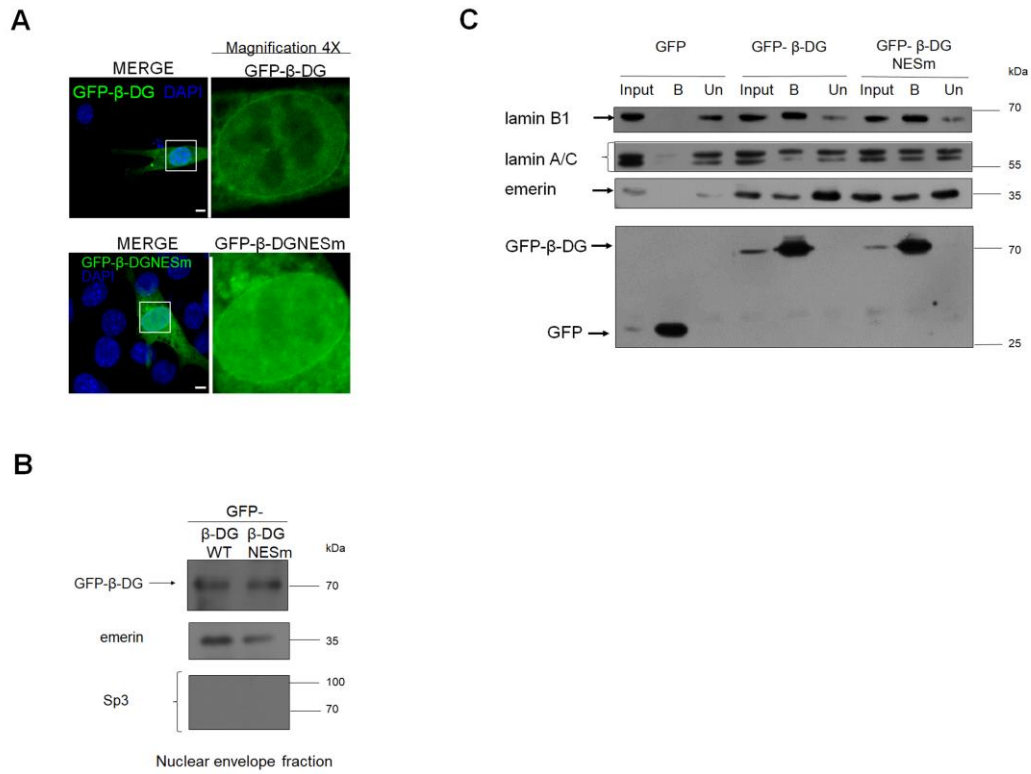
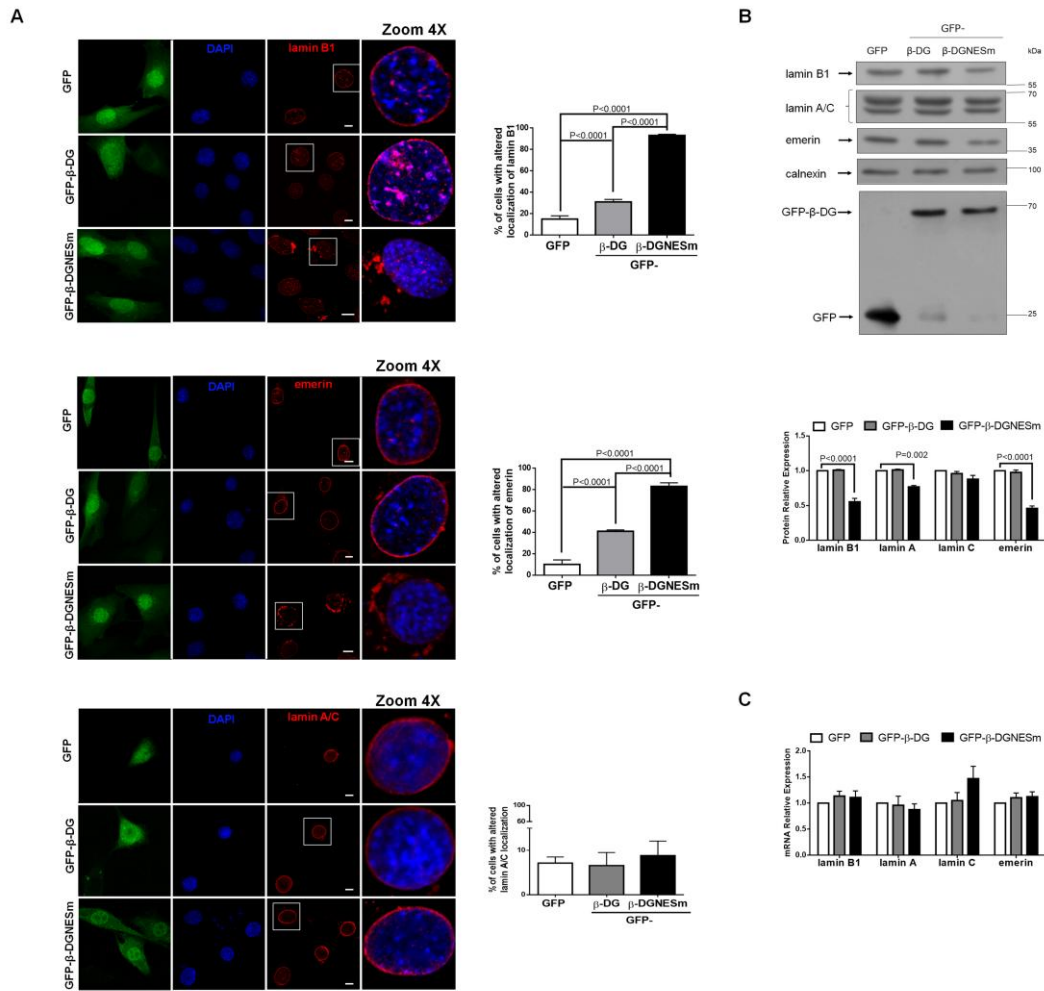


Figure 4



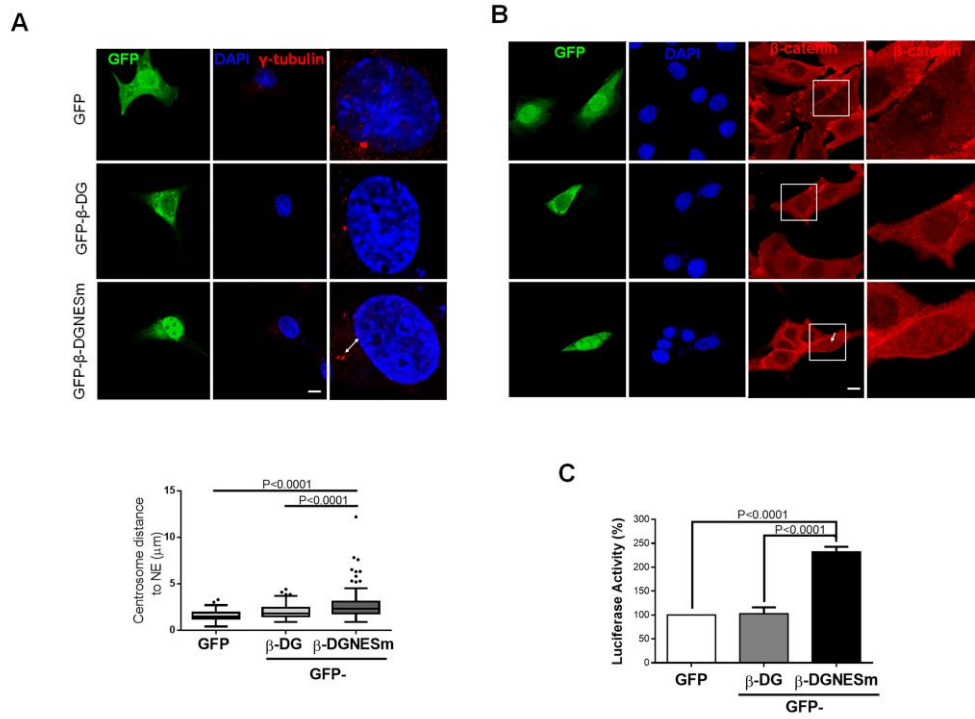
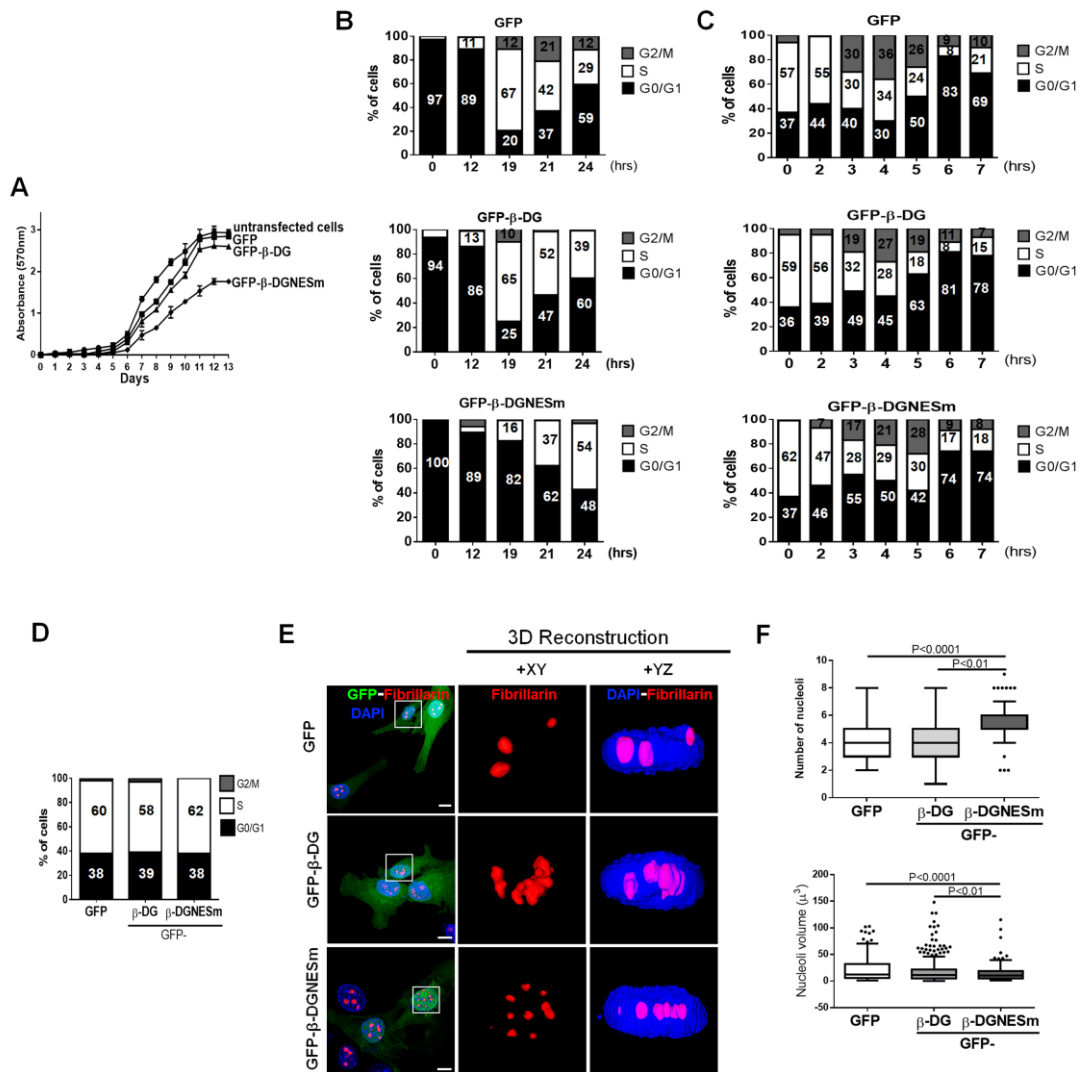


Figure 6

ACCEPTED



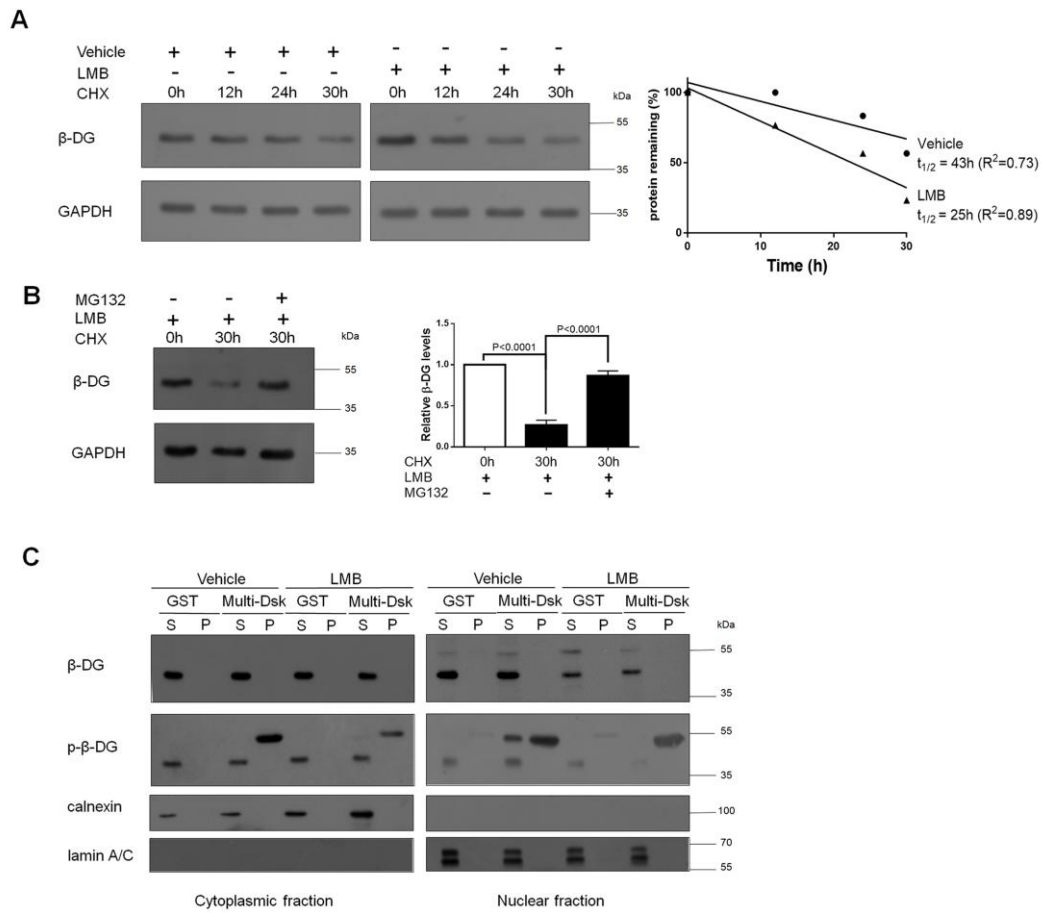


Figure 8

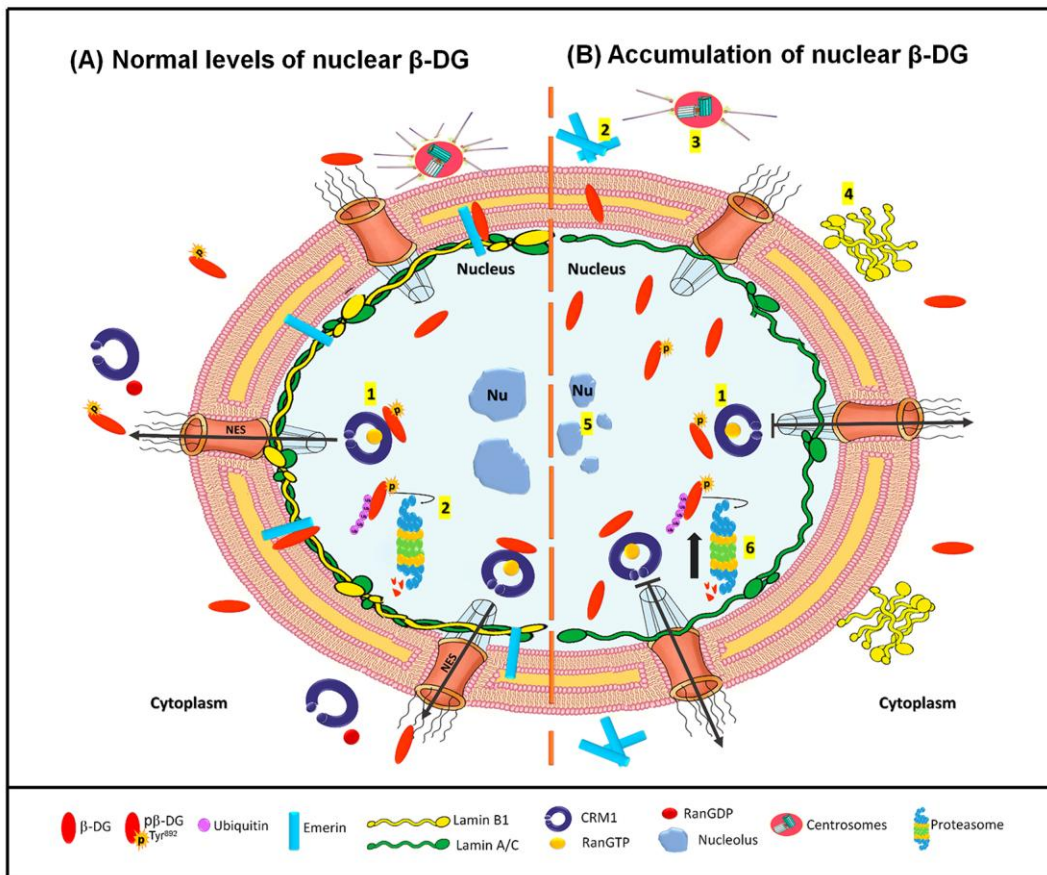


Figure 9

Highlights

- β -dystroglycan possess a functional nuclear export signal in the transmembrane domain.
- Nuclear export of β -dystroglycan is mediated by exportin CRM1.
- Forced nuclear accumulation of β -dystroglycan altered the localization and levels of emerin and lamin B1.
- Nuclear accumulation of β -dystroglycan disrupted nuclear processes in which emerin and lamin B1 are critically involved.
- The nuclear content of β -dystroglycan is regulated by the nuclear export and nuclear proteasome pathways.
- Control of β -dystroglycan nuclear content is crucial for nuclear envelope structure and function.