



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Los niveles nucleares de la α -distrobrevina1 son regulados mediante la exportación nuclear y la degradación por proteosoma

Tesis que presenta

M. en C. Juan de Dios Gómez López

Para obtener el grado de

Doctor en ciencias

en la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Ciudad de México

Enero, 2018

**Este trabajo fue realizado en el departamento de Genética y
Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios
Avanzados del I.P.N bajo la tutoría del
Dr. Bulmaro Cisneros Vega**

**El presente trabajo fue apoyado por el CONACyT a través del
proyecto CB-237123**

**Durante la realización del mismo, el estudiante Juan de Dios
Gómez López fue apoyado como becario del CONACyT con el
número de registro 263812**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Noé Gómez Calderón y Teresa de Jesús López Jiménez, por todo el amor y el apoyo que me dieron desde el día que decidí salir de casa para seguir preparando profesionalmente. Doy gracias a la vida porque puedo compartir con ustedes un logro más, que, sin duda, es fruto de todo su esfuerzo al educarme y prepararme para enfrentar cualquier reto, sus ejemplos de lucha forjaron en mí un carácter firme e inquebrantable.

A mis hermanos Mareni, Adriana, Lupita y Noé, porque siempre estuvieron apoyándome desde que esta aventura empezó. Pueden estar seguros que ustedes fueron mi motor y mi inspiración para levantarme todos los días y seguir conquistando mis sueños.

A mi sobrinos, Katherine, Fabiancito, Leslie, Ian y Sofía por todo su cariño. Siempre me esforcé por ser un ejemplo para ustedes. Los quiero en demasía.

A cada uno de ustedes, mi familia hermosa, porque siempre me recibían con los brazos abiertos al regresar a casa. Pasar tiempo con ustedes me hacía recargar pilas para regresar al laboratorio con todas las ganas de trabajar y seguir adelante. Por todo eso y más, les dedico este logro a cada uno de ustedes. ¡Los amo!

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega por darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio y compartir conmigo sus conocimientos, por su paciencia y apoyo durante la realización de este proyecto.

A los Dres. José Efraín, Javier Hernández, Oscar Hernández y Francisco Sierra por asesorarme durante todo el proyecto, por su apoyo, tiempo y comentarios importantes que enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Ana O. Cañas Urbina por contagiarme de su pasión por la ciencia y su espíritu de lucha constante. Su visión me inspiró a cumplir esta etapa importante en mi vida.

A mis compañeros y excompañeros de laboratorio Paulina, Wendy, Ariana, China Nely, Ian, Mauricio, Feliciano, Elianeth, Iván, José, Lea, Ale, Viri, Rocío y Ruth q.e.p.d, por todos los momentos tan agradables que pasamos juntos y que hicieron del doctorado una experiencia inolvidable. Especialmente a la M. en C. Gris Vélez por darme la oportunidad de trabajar con ella y contagiarme de su buena vibra e inspirarme con su ejemplo a seguir adelante cuando de experimentos se trata.

A Ruth y al señor Toño, que, aunque ya no están con nosotros, dejaron una huella en mi corazón con su alegría y su forma de trabajar.

A Pablo Gómez, auxiliar del laboratorio, por sus comentarios y observaciones tan valiosas. A Lupita (unidad de secuenciación), Arturo (cocina bacteriológica), Gaby mora (coordinación académica), Viridiana (secretaria) por su tiempo invertido al proporcionarme cosas necesarias para avanzar con mis experimentos.

A mis compañeros de generación de maestría y de doctorado. Sin duda, los momentos que pasamos juntos leyendo artículos, así como, divirtiéndonos, hicieron de esta etapa de mi vida una experiencia inolvidable. Especialmente a Lizbeth, Juan Carlos, Giovanni y Dianita.

Un agradecimiento especial a la Dra. Salma Elizabeth por sus consejos y por todos esos momentos que pasamos juntos. Gracias por tu hospitalidad desde el primer día que llegué a CINVESTAV, ya que, sin imaginarlo, te convertirías en mi hermanita postiza y cómplice de todas mis ocurrencias. ¡Gracias por todo!

A mi mejor amigo, Genaro Orlando, por todas esos días, tardes, noches y madrugadas, en la cuales, nunca dudaste en contestar el teléfono cuando más te necesitaba. Gracias por tus consejos tan valiosos.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

Contenido

RESUMEN.....	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	VIII
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El complejo de Proteínas Asociadas a la Distrofina (DAPC).....	1
1.2 Las distrobrevinas.....	1
1.2.1 El gen de la α -DB	3
1.2.2 el gen de la β -DB.....	3
1.3 Estructura proteica de la α -DB1	3
1.4 Interacciones proteicas y función de la α -DB1.....	5
1.4.1 Proteínas asociadas al complejo DAPC	5
1.4.2 Proteínas asociadas a la α -DB1 que no pertenecen al complejo DAPC.....	6
1.5 El núcleo.....	6
1.5.1 La envoltura nuclear.....	7
1.5.2 La lámina nuclear	8
1.6 Laminopatías	9
1.7 Transporte nuclear.....	10
1.7.1 Importación nuclear.....	10
1.7.2 Exportación nuclear.....	11
2.- ANTECEDENTES.....	13
2.1 Distribución subcelular de la α -DB1.....	13
2.2 Relación funcional de la interacción α -DB1/lámina B1.....	14
2.3 Transporte nuclear de la α -DB1	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. OBJETIVOS.....	17
6.1 Objetivo general.....	17
6.2 Objetivos específicos	17
5. MODELO DE ESTUDIO.....	18
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
7. METODOLOGÍA.....	20
7.1 Cultivo celular y tratamientos.....	20

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

7.2 Transfección	20
7.3 Obtención de extractos proteicos mediante lisis celular.....	20
7.4 Fraccionamiento celular (núcleo/citoplasma)	21
7.5 Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford.....	21
7.6 Análisis de proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	22
7.7 Inmunodetección en fase sólida.....	22
7.8 Obtención de lisados bacterianos	23
7.9 Ensayos in vitro de interacción entre proteínas	24
7.10 Inmunofluorescencia indirecta.....	24
7.11 Restricción enzimática de DNA.....	26
7.12 Ligación de DNA.....	26
7.13 Preparación de células competentes por el método de CaCl_2	26
7.15 Extracción y purificación de plásmidos	27
7.15.1 Obtención de DNA de plásmido a baja escala (MINIPREP)	27
7.15.2 Obtención de DNA de plásmido a mediana escala (MIDIPREP)	27
7.16 Secuenciación Automatizada de DNA	28
7.16.1 Obtención de productos de extensión marcados.....	28
7.16.2 Purificación de los productos por precipitación con EDTA.....	28
8. RESULTADOS	29
8.1 IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE EXPORTACIÓN NUCLEAR DE LA α -DB1	29
8.2 LA EXPORTACIÓN NUCLEAR DE LA α -DB1 ES MEDIADA POR LA EXPORTINA CRM1	33
8.3 EL PROTEOSOMA NUCLEAR LLEVA VA ACABO LA DEGRADACIÓN DE LA α -DB1	37
9. DISCUSIÓN	41
10. CONCLUSIONES	44
11. BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

La proteína α -DB1 es reconocida como un miembro del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC por sus siglas en inglés) [1]. El DAPC confiere estabilidad al sarcolema durante la contracción muscular y participa además en la señalización celular. Adicionalmente, la α -DB1 interacciona con las proteínas de filamentos intermedios β -sinemina y sincoilina, formando un enlace entre el DAPC y el citoesqueleto. Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró que la α -DB1 es importada al núcleo a través del sistema de importinas α 2/ β 1. Las importinas reconocen una secuencia de localización nuclear (NLS) localizada en el dominio ZZ de la α -DB1. En el interior del núcleo la α -DB1 está implicada en el mantenimiento de la morfología nuclear, a través de su interacción con la lámina B1. Debido a que la α -DB1 participa en procesos asociados tanto con el citoesqueleto como con el núcleo, su tráfico intracelular debe estar finamente regulado. Postulamos la hipótesis de que además de la importación nuclear, la α -DB1 presenta un mecanismo de exportación nuclear que permitirá limitar su contenido nuclear de acuerdo a los requerimientos de la célula. Consistente con esta idea, en este estudio demostramos que la α -DB1 es exportada del núcleo hacia el citoplasma a través de la vía de exportación nuclear mediada por la exportina CRM1. Además, recopilamos evidencias que indican que los niveles nucleares de la α -DB1 son regulados también por el proteosoma nuclear: 1) determinamos que el tiempo de vida media de la α -DB1 (30 horas), se acorta significativamente cuando la proteína se acumula en el núcleo por medio de tratamiento con LMB (inhibidor específico de la exportina CRM1); 2) los niveles bajos de la α -DB1 son restablecidos cuando se inhibe el proteosoma mediante tratamiento con MG132 y 3) demostramos la presencia de la α -DB1 ubiquitinada dentro del núcleo. En conclusión, el contenido nuclear de la α -DB1 es estrictamente regulado por la combinación de los mecanismos de exportación nuclear y degradación proteosomal.

ABSTRACT

α -DB1 protein is recognized as a member of the dystrophin-associated protein complex (DAPC) [1]. This protein assembly provides stability to the sarcolemma during muscular relaxation/contraction and modulates also cell signaling. Besides that, α -DB1 interacts with β -synemin and syncoilin to connect thereby the DAPC complex to the intermediate filament network. Recently our lab demonstrated that α -DB1 is import into the nucleus through the importin α 2 / β 1 system, via recognition of a nuclear localization sequence (NLS) located in the ZZ domain of α -DB1. Within the nucleus, α -DB1 is involved in the maintenance of the nuclear morphology, through its interaction with lamina B1. Owing the participation of α -DB1 in processes associated with both the cytoskeleton and the nucleus, its intracellular trafficking must be tightly regulated. Therefore, we presumed that besides the nuclear import pathway, α -DB1 possess a nuclear export mechanism that allows the cell to restrict the nuclear content of the protein. Consistent with this idea, we demonstrated herein that α -DB1 is export from the nucleus to the cytoplasm through the CRM1-mediated nuclear export pathway In addition, we provided evidence that nuclear levels of α -DB are also regulated by the nuclear proteasome: 1) forced nuclear accumulation of α -DB1 by treatment with LMB (specific inhibitor of CRM1) significantly shortened the lifespan of the protein; 2) such decreased levels of α -DB1 were recovered by using a proteasome inhibitor (MG132) and 3) ubiquitinated α -DB1 was found within the nucleus. Collectively these results demonstrated that the nuclear content of α -DB1 is tightly regulated by both nuclear export and nuclear proteosomal mechanisms.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

No.	Figura	Página
1	La α -DB1 como parte del complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC)	1
2	Organización filogenética de la superfamilia distrofina/utrofina/distrobrevina.	2
3	Estructura de las isoformas de la α -DB	3
4	Organización estructural de la envoltura nuclear (NE)	8
5	Mecanismo de importación nuclear	11
6	Mecanismo de exportación nuclear	12
7	Distribución subcelular de la α -DB1	13
8	La α -DB1 colocaliza e interactúa con la lámina B1	14
9	La disminución de los niveles de la α -DB1 altera la proliferación y el ciclo celular	15
10	La disminución de la α -DB1 induce malformaciones en los núcleos de las células C2C12	16
11	Identificación, clonación y expresión de las señales de exportación nuclear de la α -DB1 fusionadas a la proteína de fusión TetraGFP	30
12	Caracterización funcional de las señales de exportación nuclear de la α -DB1	31
13	Las señales de exportación NES2 y NES33 son funcionales en un sistema heterólogo	32
14	La exportación nuclear de la α -DB1 es mediada por la exportina CRM1	34
15	La α -DB1 interacciona con la exportina CRM1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	36
16	Los niveles nucleares de la α -DB1 son regulados por el proteosoma nuclear.	38
17	La ubiquitinación de la α -DB-1 ocurre exclusivamente en el núcleo de las células C2C12 y se acelera por el tratamiento con LMB	40
Tabla 1	Anticuerpos utilizados y condiciones de uso (Inmunofluorescencia y western blot)	25

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 El complejo de Proteínas Asociadas a la Distrofina (DAPC)

El DAPC está organizado en tres distintos subcomplejos: Proteínas de citoesqueleto pertenecientes a la familia de las distrofinas; las distrobrevinas (α y β) y las sintrofinas (α , β y γ), los distroglicanos (α y β), y los sarcoglicanos (α , β , γ , δ and ϵ) (Figura 1) [1-3].

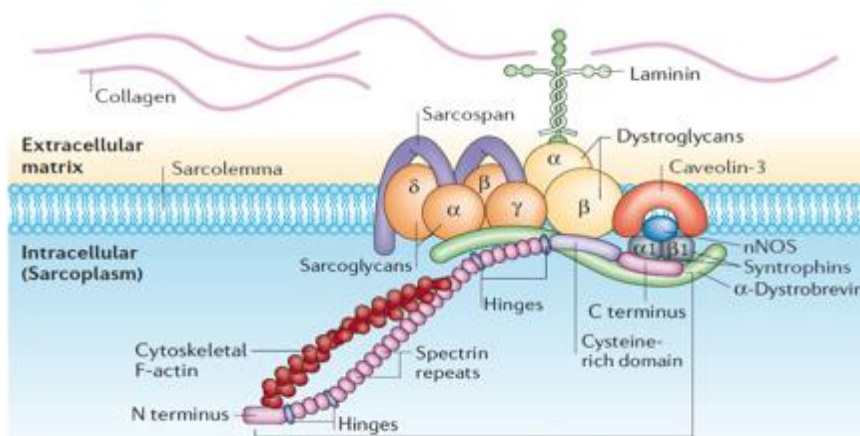


Figura 1. La α -DB1 como parte del complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC). Tomado de la referencia [1].

Aunque no se conoce la función exacta del DAPC, se sabe que le confiere estabilidad al sarcolema durante los procesos de relajación-contracción muscular, proporcionando una conexión física entre la matriz extracelular, el sarcolema y el citoesqueleto [4].

1.2 Las distrobrevinas

La distrobrevina es un miembro del DAPC que fue descubierta como un componente de la membrana posináptica del órgano eléctrico del *Torpedo californica*, con un peso molecular de 87 kDa [5]. Posteriormente se identificaron los ortólogos de la distrobrevina en humano [6] y ratón [7]. Las distrobrevinas pertenecen a la familia de proteínas que presentan homología con la distrofina, tanto en el dominio rico en cisteínas como en el dominio C-terminal (familia distrofina/utrofina/distrobrevina) [8]. Las distrobrevinas se encuentran tanto en

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DBI

organismos invertebrados (traducidas a partir de un gen único) como en vertebrados (traducidas a partir de dos genes diferentes, α - y β -DB; en peces existe además el gen γ -DB) [9]. A pesar de tener un alto grado de homología, la localización de las distrobrevinas difiere entre ellas; la α -DB se expresa predominantemente en cerebro y músculo [10-12], mientras que la β -DB se expresa en tejidos no musculares, tales como el riñón, hígado, cerebro y pulmón [13].

Tomando en cuenta la homología que presentan las distrobrevinas con la distrofina, la utrofina, DRP2 y la distrotelina, se ha sugerido la existencia de un ancestro común para todas ellas [9, 14, 15](Figura 2).

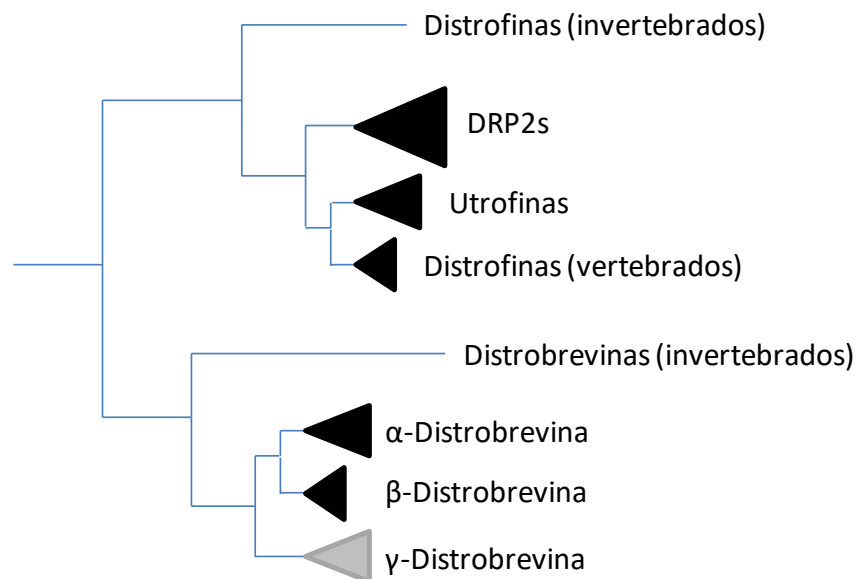


Figura 2. **Organización filogenética de la super familia distrofina/utrofina/ distrobrevina.** En el esquema se representa el posible origen de esta familia. Se piensa que existió una duplicación de un gen ancestral para dar origen a la familia de las distrofinas y las distrobrevinas. Los triángulos indican la semejanza de las secuencias de los diferentes parálogos en los vertebrados (el triángulo gris indica que los peces solo poseen este parólogo). Modificado de la referencia [14].

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

Las distrobrevinas son el producto de dos genes diferentes, el gen *DTNA* codifica para la proteína α -DB1 y el gen *DTNB* para la proteína β -DB. [7, 16].

1.2.1 El gen de la α -DB

El gen de α -DB1 tanto del humano como del ratón se localiza en el brazo largo del cromosoma 18. El gen de la α -DB humana está organizado en 23 exones que abarcan aproximadamente 180 kb en la posición 18q12.1-18q12.2 del cromosoma 18 [17].

Se ha demostrado la presencia de tres promotores dentro del gen de α -DB, localizado aproximadamente 270 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, en la región 5' no traducida, los cuales se activan de manera tejido-específico. El primero de ellos (dominado promotor A) permite la expresión de α -DB1 en el cerebro y el pulmón; el segundo (promotor B) solo está activo en el cerebro y el tercer promotor (C) controla la expresión de la α -DB1 durante la diferenciación muscular [18]. Así mismo se ha demostrado que mediante *splicing* alternativo se generan 5 isoformas de la proteína en músculo (α -DB 1-5); siendo las distrobrevinas α -DB1, α -DB2 y la α -DB3 las predominantes [19, 20].

1.2.2 El gen de la β -DB

El gen humano de la β -DB (*DNTB*) está localizado en el cromosoma 2, en la región 2p22-23, mientras que en el ratón se localiza en el cromosoma 12. Este gen abarca aproximadamente 130 kb y se encuentra organizado en 21 exones. La expresión de este gen está controlada por al menos 2 promotores. Al igual que la α -DB, el gen *DNTB* presenta *splicing* alternativo, lo cual genera diferentes isoformas de la proteína [13, 21].

1.3 Estructura proteica de la α -DB1

La α -DB1 está organizada en 4 dominios: el dominio formado por dos manos EF (EF hands), el dominio ZZ, el dominio helice-vuelta-hélice y el dominio *coiled-coil*, que consiste de dos hélices alfa (H1 y H2) separadas por una región corta rica en

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

prolina [22]. Los primeros dos dominios se encuentran en el extremo N-terminal y comprende los residuos 1-284); las manos EF forman estructuras de α -hélice que son capaces de unir iones calcio [6]. El dominio ZZ presenta estructuras de dedos de zinc que crean un sitio de unión a la calmodulina [23]. Por otro lado, el tercero y cuarto dominio están contenidos en el extremo C-terminal y comprenden los residuos 285-686. En este extremo de la proteína se localiza el dominio hélice-alfa-hélice que sirve para la unión de la sintrofina (SBS por sus siglas en inglés) [24]. Por último, el dominio *coiled-coil* (formado por la unión de dos heptámeros de leucinas, H1 y H2) permite la unión de la α -DB1 con la distrofina, mediante la región H1 [25, 26]. Para el caso de la α -DB1, existe un sitio potencial para fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina, denominado pY [8]. La organización de la familia distrofina/distrobrevina se muestra en la Figura 3.

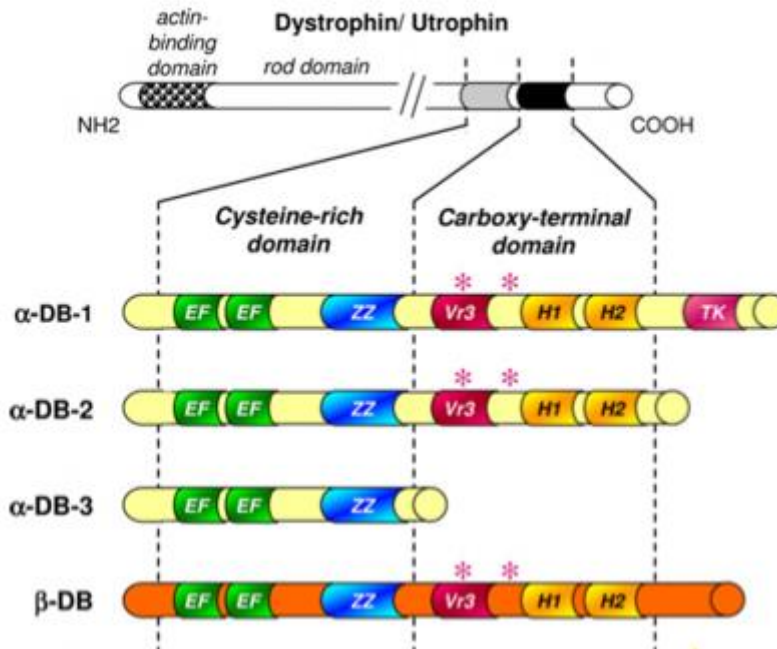


Figura 3. **Estructura de las isoformas de la α -DB.** Tanto la α -DB como la β -DB presentan homología con los dominios ricos en cisteína y carboxilo terminal de la distrofina y la utrofina (residuos 1-284 y 285-686 respectivamente). El dominio rico en cisteína comprende dos manos EF (verde) y el dominio ZZ (azul). El dominio carboxilo terminal puede variar dentro de cada isoforma, pero por lo general comprende una región a-helicoidal, que contiene sitios de unión para la sintrofina (asteriscos rosas) y dos heptámeros de leucinas (H1 y H2, amarillo). Por último, la α -DB1 posee un sitio potencial de fosforilación para serina, treonina o tirosina. Tomado de la referencia [22].

1.4 Interacciones proteicas y función de la α -DB1

1.4.1 Proteínas asociadas al complejo DAPC

En músculo esquelético, la α -DB1 y la distrofina interaccionan entre si y a la vez forman parte del DAPC; como se mencionó previamente, este complejo proteico protege la integridad de las fibras musculares y proporciona un andamiaje para diferentes moléculas de señalización [27]. La deficiencia en el funcionamiento del DAPC ocasiona diferentes formas de distrofia muscular [28].

La ausencia de la distrofina desintegra el DAPC y da lugar a la distrofia muscular de Duchenne (DMD): Por otro lado, aunque no se han detectado mutaciones en el gen de la α -DB1 en pacientes con distrofias musculares, estudio realizados en un ratón knockout para esta proteína mostraron que dichos ratones desarrollan cardiopatía [29], lo que sugiere la implicación de la α -DB en el funcionamiento del corazón.

La α -DB1 también interactúa con otras proteínas del complejo DAPC; mediante la región vr3 es capaz de unirse a la sintrofina [30]. La sintrofina coordina el ensamble de las proteínas nNOS (sintetasa de óxido nítrico) [31], PK3 (proteína cinasa 3) [32], Grb2 [33] y calmodulina [34, 35], al complejo DAPC. Ahora bien, si tomamos en cuenta que en pacientes con DMD la expresión de nNOS esta disminuida [36] y que el óxido nítrico protegen las fibras musculares de la degeneración en los ratones *mdx* [37], es plausible proponer que la α -DB1 al unirse a la sintrofina participaría de manera indirectamente en la función muscular. Además, la sintrofina se une a los TRPCs (receptores de canales transitorios que regulan la entrada de calcio a la célula) [38], y de esta manera se regula la contractibilidad muscular, el metabolismo celular y la expresión de genes [39]; por lo tanto, la α -DB1 jugaría también un papel en estas funciones celulares.

Uno de los resultados que demuestra la importancia de la α -DB1 como proteína estabilizadora del DAPC, se obtuvo mediante el análisis bioquímico de la interacción de la distrofina con el β -dístroglicano (componente principal del DAPC), ya que, en ratones knock down para α -DB1 esta interacción se pierde [40].

1.4.2 Proteínas asociadas a la α -DB1 que no pertenecen al complejo DAPC

La importancia de la α -DB1 radica en su capacidad de interactuar con diversas proteínas, alguna de ellas pertenecientes al DAPC, como se ha descrito anteriormente, y otras no relacionadas con dicho complejo, como son las proteínas fibrosas que componen los filamentos intermedios. Los filamentos intermedios forman parte del citoesqueleto y proporcionan estabilidad mecánica a las células [41,42]. Entre estos filamentos intermedios (IF por sus siglas en inglés) se encuentran la β -sinemina [43], la desmina [44] y la sincolina [12].

Ratones knockdown para la sincolina tienen menos fuerza muscular, lo que sugiere que la sincolina es importante para la transducción de fuerza en la contracción muscular [45]. Por otro parte, tanto en pacientes con DMD como en modelos de ratón para enfermedades musculares se ha observado una localización de la sincolina en el sarcolema de las fibras musculares inmaduras regeneradas [46], sugiriendo que la interacción α -DB/sinculina está involucrada en la regeneración del músculo. Otra de las funciones que se le ha atribuido a la α -DB1 es la de regular el agrupamiento y la maduración de los receptor colinérgicos (AChRs) en la uniones neuromusculares (NMJ por sus siglas en inglés [47], ya que ratones *knockdown* para la α -DB1 presentan AChRs inestables y una disminución del 50% en el número de NMJ [48, 49].

La función visual [50], la protección y formación de la barrera sangre-cerebro (BBB por sus siglas en inglés *Blood-Brain Barrier*) [51], así como la esquizofrenia [52, 53] y el retraso mental [54] son otras de las funciones y alteraciones médicas en las que se cree que participa la α -DB1.

1.5 El núcleo

El núcleo es el organelo más grande de las células eucariotas, su principal función es almacenar y procesar la información genética contenida dentro de la célula. La envoltura que rodea al núcleo, denominada envoltura nuclear, crea una barrera física entre el contenido nuclear y el citoplasmático [55].

1.5.1 La envoltura nuclear

La envoltura nuclear está organizada en tres dominios morfológicamente distintos pero que a su vez se encuentran interconectados: la membrana nuclear, la lámina nuclear y el complejo del poro nuclear [56, 57].

La membrana nuclear está formada por la membrana nuclear externa y la membrana nuclear interna (INM y ONM por sus siglas en inglés) [58]; ambas membranas están constituidas por una doble capa fosfolípídica. La ONM presenta características similares al retículo endoplásmico rugoso, se encuentra recubierta por ribosomas y lleva a cabo síntesis de proteínas ligada a ribosomas y modificaciones post-traduccionales de proteínas [59]. Dentro de las proteínas localizadas en la ONM se encuentran las nesprinas 1 y 2, las cuales se unen a proteínas del citoesqueleto mediante su N-terminal. Así mismo, mediante su C-terminal (dominio KASH) interactúan con el N-terminal (SUN) de las proteínas SUN 1 y 2, las cuales están embebidas en la INM; esta interacción se lleva a cabo dentro del espacio peri-nuclear (lumen) [60, 61].

La INM es una prolongación de la ONM, ambas membranas se conectan entre sí mediante el complejo del poro nuclear (espacios de la envoltura nuclear que permiten el transporte de macromoléculas entre el citoplasma y el núcleo [62, 63]). Un análisis proteómico reveló la presencia de al menos 80 proteínas transmembranales en la INM [64], dentro de las cuales se encuentran la emerina [65, 66], MAN1[67], polipeptidos asociados a la lámina A 1 y 2 (LAP1 y LAP2)[68-70], el receptor de la lámina B (LBR, de sus siglas en inglés)[71], SUN 1 y 2 [72]. Estas proteínas son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y transportadas de forma lateral para llegar a la INM, donde interactúan con la lámina nuclear y/o la cromatina [73]. En la figura 3 se representa gráficamente la arquitectura de la envoltura nuclear.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DBI

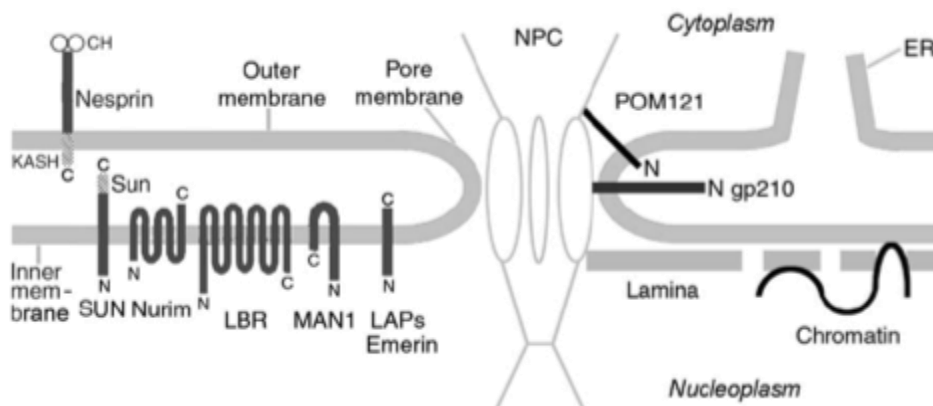


Figura 4. Organización estructural de la envoltura nuclear (NE). Diagrama de la envoltura nuclear. Se muestra la INM, la ONM y la continuidad de esta última con el retículo endoplásmico, el complejo del poro nuclear y la lámina nuclear. En la ONM se observan proteínas como las nesprinas, mientras que en la INM se encuentran insertadas las proteínas SUN, LBR, MAN1 y emerina. La interacción de la proteína SUN con las nesprinas forma un enlace entre la INM y la ONM. La lámina nuclear está localizada por debajo de la INM, interactuando con la heterocromatina y asociada al complejo del poro nuclear. La lámina nuclear crea un puente entre la INM y la cromatina. Tomado de la referencia [56].

1.5.2 La lámina nuclear

La lámina nuclear está situada justo por debajo de la INM (figura 3) ([74]). Las proteínas que forman este dominio nuclear son las láminas A, C y B [75, 76], las cuales pertenecen al grupo de proteínas de filamentos intermedios de tipo V [77]. El gen *LMNA* codifica para las láminas A y C, así como para su variante de splicing lamina A Δ 10 (carece del exón 10) y la lámina C2 [78], las láminas del tipo B son codificadas por 2 diferentes genes, el gen *LMNB1* que expresa a la lámina B1 y el gen *LMB2* que expresa la lámina B2 y a su variante de splicing la lámina B3 [79, 80].

Es importante mencionar que la lámina nuclear facilita la formación de una red de anclaje entre la envoltura nuclear y la cromatina [81] mediante la unión de las láminas con las proteínas asociadas a las láminas; por ejemplo, la Lámina A se une a la emerina y está a su vez interactúa con BAF (por sus siglas en inglés, barrier to autointegration factor; una proteína pequeña de unión a DNA) [82]. Por otro lado las láminas son importantes en el posicionamiento del complejo del poro nuclear, como lo muestran los experimentos de co-purificación de ambos componentes mediante la extracción de la fracción de la lamian nuclear mediante detergentes [83], así como

el agrupamiento de los poros nucleares en células que tienen el gen de la lámina mutado [84].

Se conoce que muchas de las actividades nucleares son mediadas por las láminas, incluyendo la organización de la cromatina, la replicación del DNA, la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la arquitectura y morfología del núcleo, así como los procesos de *splicing* y expresión de genes [85, 86]. La importancia de la lámina nuclear en diferentes procesos celulares queda de manifiesto por el hecho de que la alteración de alguna de las láminas ocasiona diferentes patologías llamadas "laminopatías" [87, 88].

1.6 Laminopatías

Las laminopatías son un conjunto de enfermedades originadas por mutaciones en los genes que codifican tanto para las láminas nucleares como para proteínas de la INM [89]. Dentro de las laminopatías generadas por mutaciones en el gen *LMNA* se encuentran la distrofia muscular de Emery-Dreifuss 2 y 3 (EDMD2 y 3), las cuales tienen un patrón de herencia dominante y recesiva respectivamente [90, 91], la cardiomiopatía dilatada [92] y el síndrome de progeria de Hutchinson Gilford [93]. Por otro lado, las mutaciones en el gen *LMNB* dan origen a leucodistrofia (duplicación del gen *LMNB*) [94] y lipodistrofia [95]. Por lo que respecta a las laminopatías generadas por mutaciones en los genes que codifican para las proteínas de la INM, se encuentran la EDMD (mutación en el gen de la emerina) [96], la anomalía de Pelger-Huet y la displasia muscular (mutación en el gen *LBR* que codifica para el receptor de la LB1).

A pesar de que existe un rango amplio de laminopatías, algunas de ellas tienen características clínicas comunes, incluyendo debilidad muscular, envejecimiento prematuro y cardiopatía [97]. A nivel celular, una característica importante es la presencia de núcleos deformes y la pérdida de heterocromatina [98, 99], lo que a su vez ocasiona alteraciones en algunos procesos como la transcripción y la replicación de DNA [100].

1.7 Transporte nuclear

El transporte de proteínas del citoplasma al núcleo o en sentido inverso, del núcleo hacia el citoplasma, se lleva a cabo a través del complejo del poro nuclear (NPC por sus siglas en inglés)[101, 102], El NPC es una estructura proteica, que permite la entrada libre de partículas cuyo peso es menor a los 40kDa [103], pero para aquellas moléculas con un peso molecular mayor es necesario que posean una secuencia de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés, “nuclear localization signal”)[104], El transporte activo de proteínas desde el citoplasma hacia el núcleo está mediado por una grupo de proteínas solubles acarreadoras conocidas con el nombre de Karioferinas, las cuales realizan la importación y exportación nuclear, conocidas como importinas y exportinas respectivamente [105].

1.7.1 Importación nuclear

El ciclo de importación nuclear inicia con la formación de un complejo formado en el citoplasma entre las importinas α , β y la proteína cargo (unión que ocurre a través de su NLS) [106]; éste complejo pasa a través del NPC mediante la interacción de la importina β con las nucleoporinas: Una vez dentro del núcleo, la unión de RanGTP con la importina β disocia el complejo. La importina β se une a RanGTP y es transportada de regreso al citoplasma [107]; por otro lado, ocurre la disociación de la importina α y la proteína cargo, dejando libre a esta última proteína para ser transportada de regreso al citoplasma con ayuda del factor de exportación nuclear CAS, el cual está unido a RanGTP. Una vez en el citoplasma, RanGAP estimula la hidrólisis de GTP, liberando así las importinas α y β para un nuevo ciclo de transporte nuclear [108]. Figura 5

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DBI

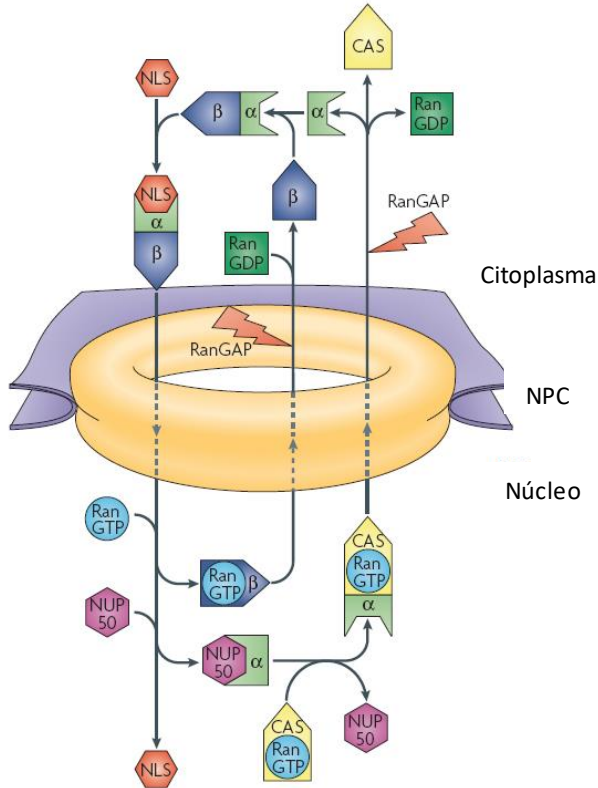


Figura 5. **Mecanismo de importación nuclear.** En el citoplasma las proteínas cargo que poseen una NLS se unen al receptor heterodimérico importina α /importina β para formar un complejo trimérico. Este complejo interactúa con el NPC para ingresar al interior del núcleo. Posteriormente, la unión de RanGTP causa un cambio conformacional en el complejo que permite la liberación de la importina β . La participación de Nup50 y CAS facilitan la de la proteína cargo en el núcleo. Finalmente, la importina α es reciclada y llevada de regreso al citoplasma por el receptor de exportación CAS en un complejo con RanGTP. Tomado de la referencia [107].

1.7.2 Exportación nuclear

El tráfico de proteínas del núcleo al citoplasma es mediado por una secuencia de exportación nuclear (NES, por sus siglas en inglés) presente en las proteínas cargo. La NES consenso consiste de 4 aminoácidos hidrofóbicos separados por cualquier otro aminoácido (LxxxLxxLxL), donde L corresponde a una leucina o un a.a hidrofóbico y X representa cualquier otro a.a [109]. En las células eucariotas la exportina CRM1 es la encargada de la exportación nuclear [110, 111]. Este proceso consiste en los siguientes pasos: 1) la exportina CRM1 reconoce la NES presente en la proteína cargo y forma un complejo ternario en conjunto con RanGTP. 2) La exportina CRM1 interacciona con las nucleoporinas y de esta forma atraviesa el NPC para llegar al citoplasma. 3) Una vez en el citoplasma, ocurre la hidrólisis de RanGTP mediada por RanGAP, lo que ocasiona la disociación del complejo (Figura 3). 4) Finalmente, RanGDP se recicla regresando al núcleo a través de la ayuda del

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DBI

factor de transporte nuclear 2 (NTF2). Es importante mencionar que el transporte nuclear mediado por CRM1 es inhibido por Leptomicina B (LMB por sus siglas en inglés), una droga que se une de manera covalente al residuo conservado de cisteína (Cys 528) de la exportina CRM1, localizado en la región que reconoce y se une a la NES de la proteína cargo. De esta manera se bloquea la unión de la molécula cargo con la exportina CRM1, quedando la primera proteína secuestrada dentro del núcleo [112, 113].

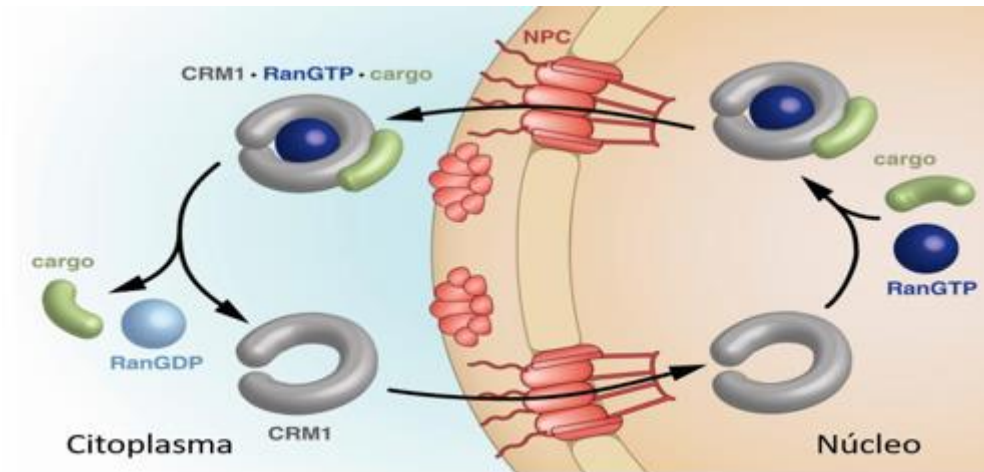


Figura 6. **Mecanismo de exportación nuclear.** Modificado de 119 (Ver texto).

2.- ANTECEDENTES

2.1 Distribución subcelular de la α -DB1

La α -DB1 es reconocida como una proteína citoplásmica del complejo DAPC; sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado la presencia de esta proteína en el núcleo de las células HeLa (células epiteliales derivadas de cáncer cérvico uterino) y C2C12 (mioblastos de ratón) (figura 5) [114, 115]. Una vez localizada en el núcleo, la α -DB1 es capaz de interactuar con la lámina B1 [116], lo que sugiere que la α -DB1 tiene una función estructural en el núcleo (figura 6).

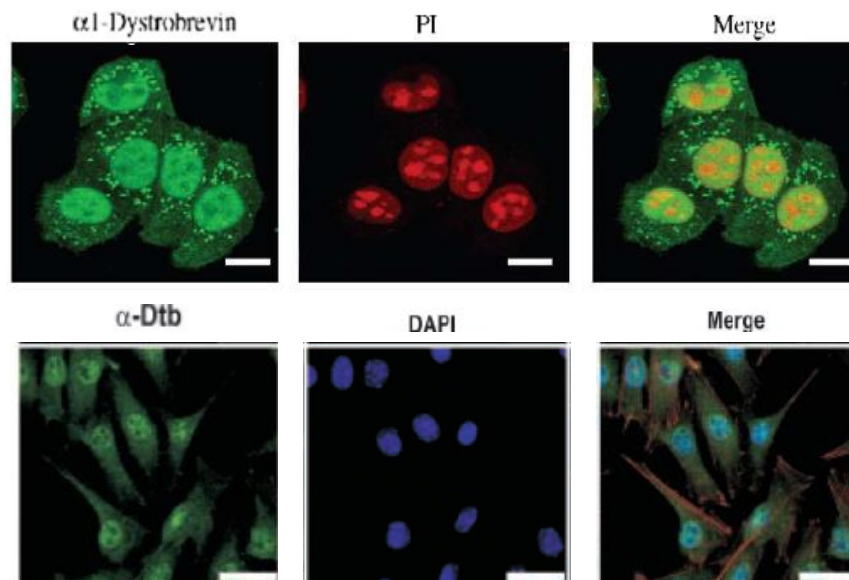


Figura 7. Distribución subcelular de la α -DB1. Se observa la distribución subcelular de la α -DB1 en las células HeLa (panel superior) y las células C2C12 (panel inferior). El análisis se logró mediante la técnica de inmunofluorescencia. α -DB, en verde; el núcleo se tiñó con yoduro de propidio (IP) o DAPI; merge, sobreposición de los canales) Modificado de las referencias [114] y [115].

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

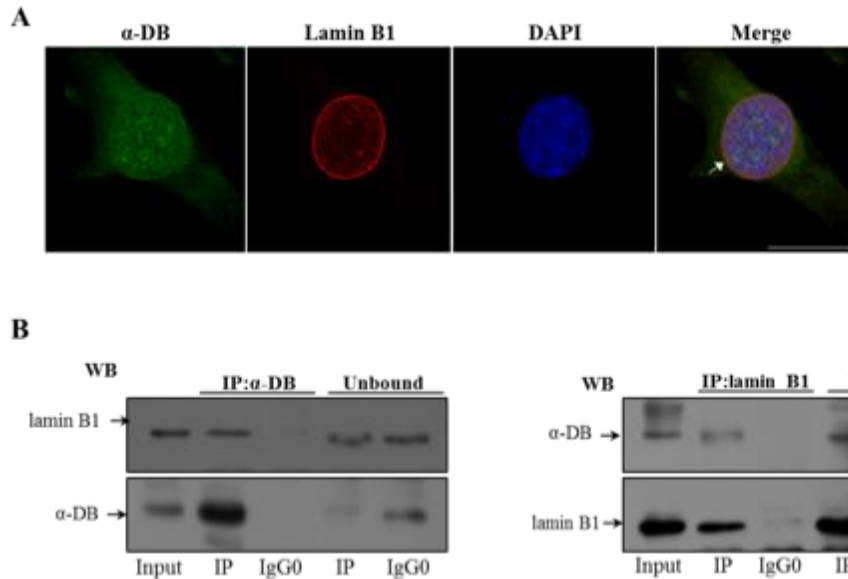


Figura 8. **La α -DB1 colocaliza e interactúa con la lámina B1.** A. Se muestra la co-localización de las proteínas α -DB1 y lamina B1 en las células C2C12 mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. La α -DB1 está teñida en color verde; la lámina B1 en rojo y los núcleos en azul (DAPI); merge, sobreposición de canales. B. Los extractos totales de las células C2C12 se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti- α -DB1 o con un anticuerpo irrelevante (IgG0). Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos anti-lamina B1 o anti- α -DB1. El experimento recíproco se llevó a cabo usando un anticuerpo inmunoprecipitante anti-lamina B1 (panel derecho).

2.2 Relación funcional de la interacción α -DB1/lámina B1.

Para demostrar si la interacción α -DB1/lámina B1 tiene una relevancia biológica, se evaluó la proliferación celular y la morfología nuclear (procesos en los cuales la lámina B1 está involucrada) en las células C2C12 deficientes en la expresión de la α -DB1, lo que se logró mediante la transfección de un plásmido que expresa una RNA interferente (siRNA por sus siglas en inglés) dirigido contra el gen de la α -DB1. En comparación con el cultivo control (células transfectadas con un siRNA irrelevante) las células que expresan el siRNA contra la α -DB1 mostraron un retraso notable en la proliferación celular (figura 6A). Con la finalidad de averiguar si este retraso en el crecimiento celular está relacionado con algún defecto en el ciclo celular, se analizó el perfil del ciclo celular de las células deficientes de α -DB1 mediante citometría de flujo. De manera interesante, observamos un aumento del

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

24% en el número de células en la fase G0/G1 y una subsecuente disminución del 22% de las células en fase S, en comparación con las células control (Figura 6B).

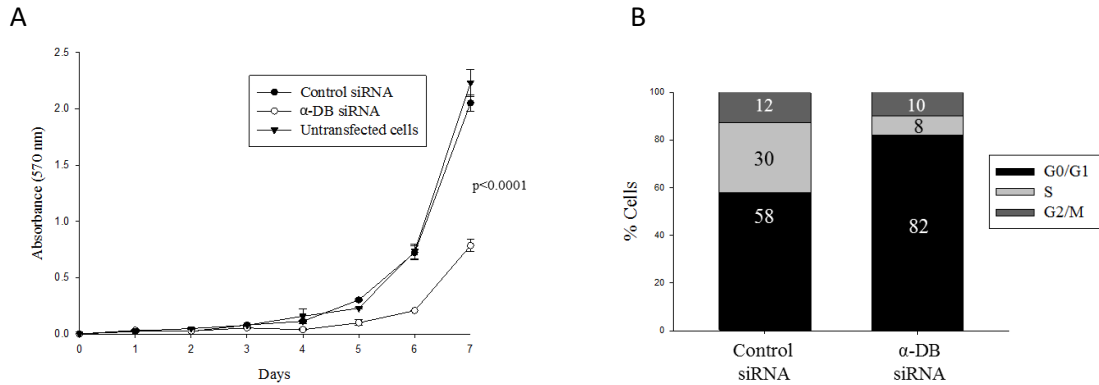


Figura 9. **La disminución de los niveles de la α -DB1 altera la proliferación y el ciclo celular.** A. La proliferación de las células C2C12 que expresan de manera estable un siRNA dirigido contra el α -DB1 o un siRNA control (control siRNA) se analizó durante un lapso de 7 días mediante el ensayo de MTT. B. Los cultivos de las células deficientes en α -DB1 o de las células control se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

En cuanto a la participación de la α -DB1 en el mantenimiento de la morfología nuclear, se decoró la envoltura nuclear utilizando un anticuerpo dirigido contra la lámina B1 y se analizó mediante microscopia confocal si las células deficientes en α -DB1 presentaban alguna alteración. Se demostró que las células con deficiente expresión de la α -DB1 contienen núcleos deformes con forma de riñón ó multi-lobulados, así como núcleos con pliegues de la envoltura nuclear, en comparación con las células control (Figura 7), lo que demuestra que la interacción α -DB1/LMB1 es crucial para el mantenimiento de la morfología nuclear.

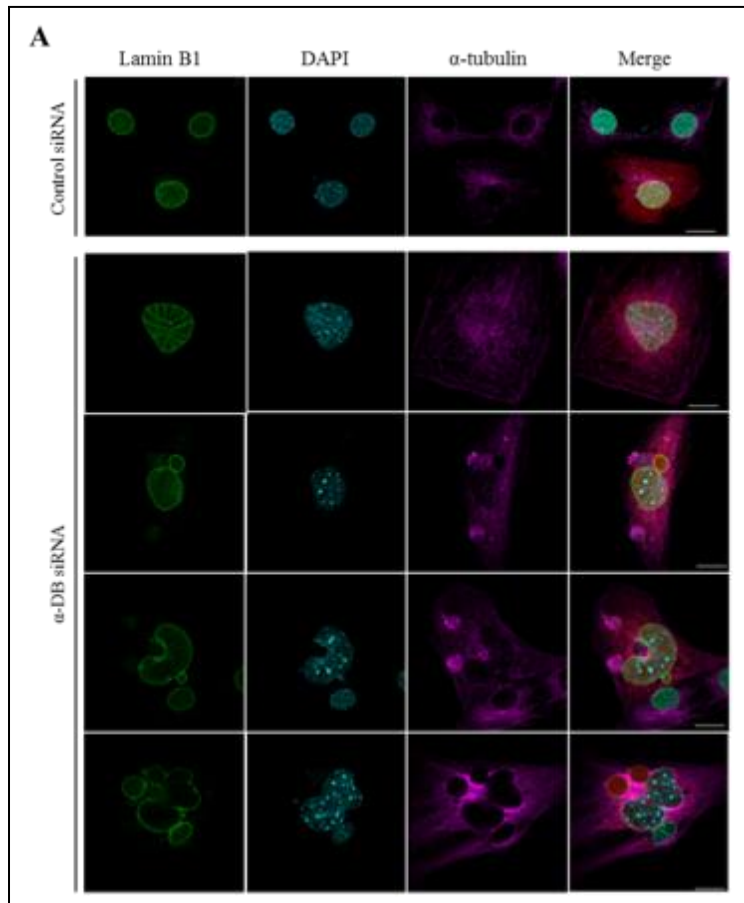


Figura 10. **La disminución de la α -DB1 induce malformaciones en los núcleos de las células C2C12.** A. Las células C2C12 que expresan establemente un siRNA contra la α -DB (siRNA vs α -DB1) o un siRNA control (scramble) se cultivaron sobre cubreobjetos, se fijaron y se sometieron a doble inmuno-marcaje con anticuerpos contra la lámina B1 (verde) y la α -tubulina (magenta). Los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI (cian) previo al análisis por microscopia confocal. Las imágenes representativas muestran que las células control tienen núcleos con morfología ovalada, mientras que las células deficientes en la α -DB1 presentan núcleos amorfos.

2.3 Transporte nuclear de la α -DB1

Recientemente nuestro laboratorio demostró que la α -DB1 presenta un mecanismo de importación nuclear mediado por las importinas α 2/ β 1. La secuencia de localización nuclear (NLS, de sus siglas en ingles) que contiene la α -DB1 se encuentra dentro del dominio ZZ, el cual está formado por dos dedos de zinc. Aunque la vía de importación nuclear de la α -DB1 está caracterizada no existen reportes de que esta proteína presente exportación nuclear.

3. JUSTIFICACIÓN

La α -DB1 se localiza en diferentes compartimentos celulares, incluyendo el citoplasma, la envoltura nuclear y el nucleoplasma, La identificación de los mecanismos que regulan los niveles de la α -DB1 en los diferentes compartimentos celulares, nos permitirá entender la diversidad funcional de esta proteína.

4. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar los mecanismos que regulan los niveles nucleares de la α -DB1.

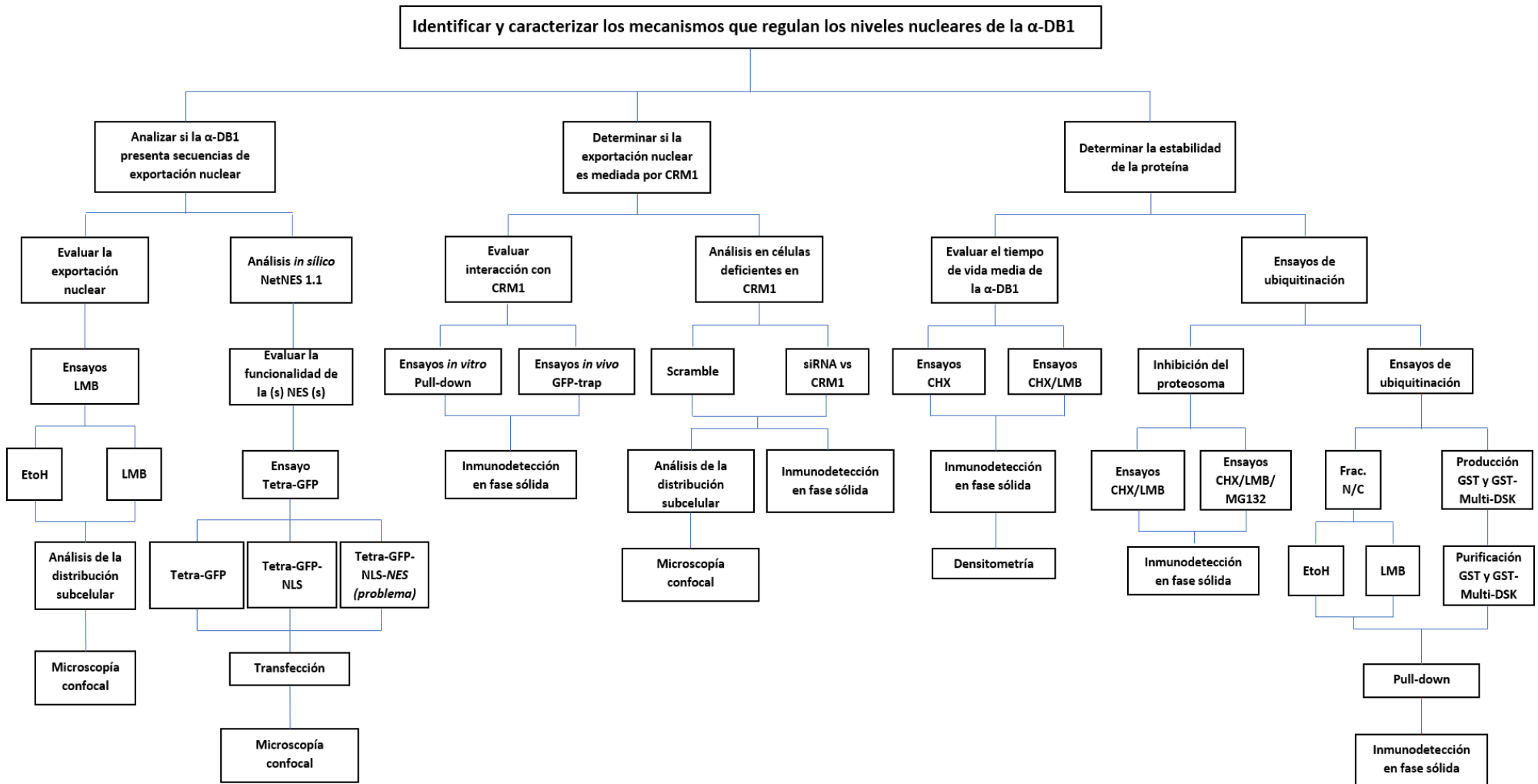
6.2 Objetivos específicos

- Analizar si la α -DB1 presenta un mecanismo de exportación nuclear mediado por la exportina CRM1.
- Determinar si la distribución subcelular de la α -DB1 influye sobre su estabilidad.

5. MODELO DE ESTUDIO

En este proyecto se utilizó la línea celular C2C12 (mioblastos de ratón). Estudios previos sobre la importación nuclear de la α -DB1 y su interacción con la lámina B1 se llevaron a cabo en este modelo de estudio.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. METODOLOGÍA.

7.1 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, 50 U/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomicina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para bloquear la exportación nuclear de proteínas mediada por CRM1, se adicionó medio con Leptomycin B (LMB) a una concentración de 50 nM durante 24 horas. En el caso de células transfectadas, el tratamiento se realizó 12 horas post-transfección. Para inhibir la síntesis de proteínas, las células se trataron con cicloheximida (CHX) a una concentración de 30 μ g/ml. Para la inhibición del proteosoma se utilizó el compuesto MG132 a una concentración de 10 μ M.

7.2 Transfección

Para llevar a cabo la transfección de las células C2C12 se aplicó la siguiente metodología. 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. En un primer tubo se agregaron 4 μ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 100 μ l 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 4 μ g de DNA en 100 μ l de medio DMEM libre de suero y antibióticos. Posteriormente se mezcló el contenido de los dos tubos y se dejó incubando la mezcla 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 en seguida los complejos DNA-liposomas por goteo. La preparación se dejó incubando durante 24 horas en la incubadora de CO₂.

7.3 Obtención de extractos proteicos mediante lisis celular

Las células C2C12 sembradas en cajas de 100 mm a una confluencia de 90% se lavaron con 3 ml de PBS y se les añadió 250 μ l 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, se colocó en un microtubo de 1.5 ml y 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.

7.4 Fraccionamiento celular (núcleo/citoplasma)

Para realizar el fraccionamiento celular de las células C2C12, se retiró el medio de cultivo por aspiración, se lavaron las células con PBS y se cosecharon en 1 ml de PBS recolectándolas en un tubo Falcon. Posteriormente se sometieron a centrifugación durante 15 min a 5,000 rpm y se recuperó la pastilla para resuspenderse en la solución amortiguadora TM (Tris HCl pH 8, MgCl₂, PMSF), adicionada con inhibidores de proteasas (Complete 7x) y fosfatasas (NaF, Na₂MoO₄, Na₃VO₄) y se incubaron a 4°C durante 10 min. Posteriormente, se agregó Tritón al 2% en una relación 1:1 para permeabilizar las membranas y la mezcla se incubó durante 10 min a 4°C. La suspensión se homogenizó con un homogenizador Dounce y se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min. El sobrenadante que corresponde a la fracción citoplasmática se separó y la pastilla se resuspendió en una mezcla de soluciones de Sacarosa I (0.32 M) y II (2.0 M), en volúmenes iguales. Posteriormente, se preparó 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, con el cuidado de conservar las tres fases. El gradiente se centrifugó a 16,000 rpm durante 48 min a 4°C. La fracción nuclear que migra en la parte de mayor concentración del gradiente se recuperó y se resuspendió en la solución de lisis (50mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1% Tritón) y se mezcló mediante agitación constante durante 30 min a 4°C, utilizando el vortex. La suspensión se sometió a diferentes ciclos de sonicación de 1 minuto a 4°C, con periodos de descanso de 10 s. Finalmente, la preparación se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min para descartar los restos membranales y el sobrenadante que corresponde al extracto nuclear se recolectó.

7.5 Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford

A partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de

1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se elaboró una curva estándar (0-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y se prepararon diluciones de las muestras problema. Enseguida se adicionó el reactivo de Bradford (BIO-RAD) y se leyó la absorbancia a 595 nm. Finalmente se registraron los valores para graficar la curva estándar y mediante regresión lineal de los datos obtenidos de las muestras problema se determinó la concentración de las proteínas, interpolándose en la curva estándar.

7.6 Análisis de proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Se prepararon geles 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, 25 μl de persulfato de amonio 10% (w/v) y 10 μl de TEMED; gel concentrador al 4%: 0.479 ml de acrilamida al 30% /0.8% bisacrilamida, 0.879 de Tris-Cl/SDS (pH 6.8), 2.143 ml de H₂O, 17.8 μl de persulfato de amonio 10% (w/v) y 5 μl de TEMED]. A las muestras de proteínas previamente cuantificadas, se les agregó la solución amortiguadora de carga, se llevaron a un volumen final de 30 μl , se calentaron a 100°C por 5 minutos y se colocaron en los pozos del gel. El gel se sometió a electroforesis en la solución amortiguadora de corrida (Tris base 3g/l, glicina 14.4 g/l, SDS 1g/l) con una corriente constante de 20 mA durante 2 h. El gel se tiñó en una solución de azul Coomassie (45 ml agua, 45ml metanol, 10 ml ácido acético glacial y 0.25 g de azul de Coomassie) durante 30 minutos y se destiñó por 1 h con la solución desteñidora (45 ml agua, 45 ml metanol y 10 ml ácido acético glacial). Para el análisis de los extractos totales se cargaron en el gel 50 μg de proteína por pozo, mientras que para el análisis de los extractos proteicos de bacteria se usaron 5 μg .

7.7 Inmunodetección en fase sólida

Una cantidad de 60 μg de los extractos totales de proteínas, se separó en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS- PAGE) al 10%. Posteriormente, las proteínas se sometieron a electrotransferencia durante 1 hora a 20 V en una cámara semi-húmeda para transferirlas a membranas de nitrocelulosa, utilizándose 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) para visualizar las proteínas y se destiñó con TBST (10 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM

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 incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con leche descremada al 15% en TBS-T. 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 enseguida 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, la señal específica se reveló con el sistema de detección ECL (Amersham Biosciences).

7.8 Obtención de lisados bacterianos

Los cultivos de bacterias competentes de la cepa *E. coli* BL21 se transformaron con los vectores pGEX-4T1 (que expresa la proteína GST), pGEX-4T1- α -DB1 (que expresa la proteína de fusión α -DB1) y pGEX4T1-MDsk (que expresa la proteína de fusión GST-MDsk). Del paqueo de bacterias transformadas se tomó una colonia aislada tpara inocular 4 ml de medio LB con ampicilina, y el cultivo se incubó durante 12 horas a 37 °C con agitación constante. Transcurridas las 12 horas se realizó una dilución (1:40) del cultivo en 10 ml 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 10,000 rpm por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió en 500 μ l de la 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)]. Para la obtención de lisados de las bacterias que expresan la proteína GST-MDsk se utilizó la solución amortiguadora STE [NaCl 100mM, Tris-HCl pH 7.5 20mM, EDTA 1mM, Sarcosyl 1.5%, PMSF 1mM, y la mezcla de proteasas Complete (Boehringer)] con sarcosyl. La suspensión bacteriana se sometió a sonicación, aplicando seis pulsos de 15 segundos a 3.5 micrones; el lisado bacteriano obtenido se clarificó mediante una centrifugación de 5 minutos a 13,000rpm.

7.9 Ensayos *in vitro* de interacción entre proteínas

Para realizar los ensayos de interacción de proteínas, se incubaron los diferentes lisados bacterianos durante toda la noche con perlas de glutatión sefarosa (Amersham Biosciences), con la finalidad de purificar las proteínas recombinantes GST, y GST- α -DB1. Después, las perlas se lavaron 3 veces utilizando 1000 μ l de la solución amortiguadora NETN sin inhibidores de proteasas y fosfatasas; cada lavado consistió en la incubación de las perlas con 500 μ l de la solución amortiguadora NETN sin inhibidores de proteasas y fosfatasas, durante 10 minutos con rotación y a 4°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras por 5 minutos a 3,000 rpm y se retiró una el sobrenadante por aspiración. A la pastilla resultante se le adicionaron 50 μ l de la solución NETN. Para probar la interacción *in vitro* de la proteína α -DB1 con la exportina CRM1 se mezclaron 5 μ g de la proteína recombinante, capturada por las perlas, con 500 μ g de un 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% y las proteínas que se mantuvieron unidas se analizaron mediante electroforesis e inmunodetección en fase sólida, utilizando los anticuerpos apropiados.

7.10 Inmunofluorescencia indirecta

Se esterilizaron con alcohol y flama de mechero cubreobjetos de 20 mm x 20mm. Las células crecidas a una confluencia de 80% se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo y a cada cubreobjetos se le agregó 50 μ l de la suspensión celular y 200 μ l de medio de cultivo y las preparaciones se incubaron por 24 horas en una incubadora de CO₂. Transcurrido este tiempo se retiró el medio el cultivo y los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS. Se fijaron las células con 200 μ l de paraformaldehído al 4% en PBS por 10 minutos. Enseguida, se lavaron las preparaciones tres veces con PBS y posteriormente se permeabilizaron las células por 10 minutos con 200 μ l de tritón-X100 al 0.2% en PBS, y se lavaron tres veces con PBS. Enseguida se realizó el bloqueo de los cubreobjetos durante 20 minutos a temperatura ambiente, utilizando gelatina al 0.5% y 1.5% de suero fetal bovino (SFB) en PBS. Los cubreobjetos se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario (ver tabla 1) durante toda la noche a

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

4°C en cámara húmeda. Posteriormente 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 se adicionó a cada cubreobjetos 50 μ l de DAPI (diluido 1:600 en PBS, a partir de un stock de 0.1 μ g/ μ l; SIGMA), incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Enseguida se enjuagaron los cubreobjetos tres veces con PBS y se escurrió el exceso de líquido. Se añadieron 8 μ l de Vectashield (Vector Laboratorios) sobre portaobjetos limpios y se colocaron los cubreobjetos para proceder con el sellado. Finalmente, las preparaciones se analizaron por Microscopía Confocal.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo primario	Origen	Naturaleza	Proteína detectada	Dilución IF	Dilución WB	Referencia
Anti- α -Distrobrevina	Ratón	Policlonal	α -Distrobrevina	1:20	1:1000	DB Transduction
Anti-CRM1 (NB100-79802)	Conejo	Policlonal	CRM1	1:250	1:4000	Novus Biologicals
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 B1 (ab16048)	Conejo	Policlonal	Lámina B1	1:200	1:2000	Abcam
Anti-Calnexina	Conejo	Policlonal	Calnexina	-	1:500	Santa Cruz Biotechnology

7.11 Restricción enzimática de DNA

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

7.12 Ligación de DNA

En un microtubo de 0.6 ml se agregaron 100 ng del DNA de plásmido molde (previamente restringido), 2 μ l de la solución amortiguadora de ligación 10X, 1.5 U de la ligasa T4 (Invitrogen) y la cantidad del fragmento de DNA por ligar equivalente a una relación molar de 1:3; la reacción a 20 μ l con agua desionizada. La reacción de ligación se incubó toda la noche a 14°C y se utilizó posteriormente para transformar un cultivo de células competentes de la cepa de *E. coli* DH5 α .

7.13 Preparación de células competentes por el método de CaCl₂

Se sembró la cepa *E. coli* TOP-10 sobre cajas de agar LB y estas se incubaron durante 16 horas a 37°C. Enseguida se transfirió una colonia aislada a un matraz que contenía 100 ml de LB para su posterior incubación a 37°C por 4 horas con agitación (300 ciclos/minuto). Se monitoreo el cultivo cada 30 minutos para que no excediera la densidad de 10⁸ células/ml. Posteriormente se dividió el cultivo bacteriano en dos tubos falcon de 50 ml estériles y estos se colocaron en hielo durante 10 minutos. Enseguida, se centrifugaron los cultivos a 4,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió en 5 ml de CaCl₂ a una concentración de 0.1mM. La suspensión se incubó por 5 minutos en hielo y se centrifugó a 4,000 rpm por 10 minutos a 4°C; se decantó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió en 1 ml de CaCl₂ (1mM). Finalmente se prepararon alícuotas de 200 μ l de las células competentes en microtubos de 1.5ml.

7.14 Transformación bacteriana

Se colocaron alícuotas de 50 μ l de bacterias competentes en microtubos de 1.5ml y se les adicionó 200 ng de DNA de plásmido. La mezcla se mantuvo en hielo por 30 minutos

y posteriormente se incubó a 42°C durante 90 segundos para regresarse al hielo por 2 minutos adicionales. Enseguida se adicionaron 800 μ l de medio LB y la suspensión se incubó a 37°C por 1 hora con agitación constante. Se tomaron 70 μ l 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 μ g/ml de ampicilina o 50 μ g/ml de kanamicina). Finalmente, las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

7.15 Extracción y purificación de plásmidos

7.15.1 Obtención de DNA de plásmido a baja escala (MINIPREP)

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

7.15.2 Obtención de DNA de plásmido a mediana escala (MIDIPREP)

Para realizar la purificación de DNA de plásmido a mediana escala se siguió el protocolo

establecido por QIAGEN®, plasmid Purification. El DNA obtenido se disolvió en la solución amortiguadora TE. pH 8.0, se cuantificó en el Nanodrop y se analizó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1, en la solución TBE (45 mM Tris-Borato, 1mM EDTA).

7.16 Secuenciación Automatizada de DNA

7.16.1 Obtención de productos de extensión marcados

Se mezclaron en un volumen final de 20 μ l, 1 μ g de DNA de plásmido, 20 picomoles del oligonucleótido específico correspondiente, 2 μ l de la reacción de secuenciación y 2 μ l de la solución amortiguadora de ABI PRISM BigDye Terminador Cycle Sequencing 3.1 (Applied Biosystem). Enseguida, 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; finalizándose la reacción con un ciclo de extensión de 10 minutos a 60°C.

7.16.2 Purificación de los productos por precipitación con EDTA

A los productos de reacción de PCR se le agregó 5 μ l de EDTA 125 mM y 60 μ l de etanol absoluto, se mezcló la reacción y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, se adicionó 60 μ l de etanol al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante de las preparaciones y se completó su secado utilizando por 5 minutos un dispositivo que genera vacío. El producto de PCR purificado se cubrió de la luz y se envió a la Unidad de Ácidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular para su secuenciación posterior.

8. RESULTADOS

8.1 IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE EXPORTACIÓN NUCLEAR DE LA α -DB1

Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo demostraron que la importación nuclear de la α -DB1 está mediada por las importinas $\alpha 2/\beta 1$ [25]. Tomando en consideración que la α -DB1 se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo, es probable que la proteína posea un mecanismo de exportación nuclear que, al complementarse con la importación nuclear, le permita a la célula regular la distribución de la α -DB1 en ambos compartimentos. Para responder esta pregunta, realizamos un análisis *in silico* con el programa NetNES [109] para analizar si la α -DB1 presenta secuencias putativas de exportación nuclear (NES, por sus siglas en inglés, *nuclear export signal*). El programa predijo tres secuencias de exportación nuclear: dos localizadas en el dominio de manos EF, denominadas NES1 y NES2 y otra dentro del dominio carboxilo terminal, denominada NES3 (Figura 3A). Para determinar la funcionalidad de las tres NES, cada una se clonó de manera independiente en el vector Tetra-EGFP. Este vector codifica para 4 unidades de la proteína GFP alineadas en tándem, además posee una secuencia de localización nuclear que permite que la proteína de fusión se internalice en el núcleo; en el sitio múltiple de clonación, localizado entre la tercera y cuarta GFP[117]. Se clonaron cada una de las secuencias NESs, para generar los vectores de expresión: Tetra-EGFP-NES1, Tetra-EGFP-NES2 y Tetra-EGFP-NES3 (Figura 3B). Las células C2C12 se transfectaron con los diferentes vectores de expresión y se evaluó la expresión de las proteínas de fusión 24 horas post-transfección mediante inmunodetección en fase sólida, utilizando anticuerpos anti-GFP (Figura 3C).

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

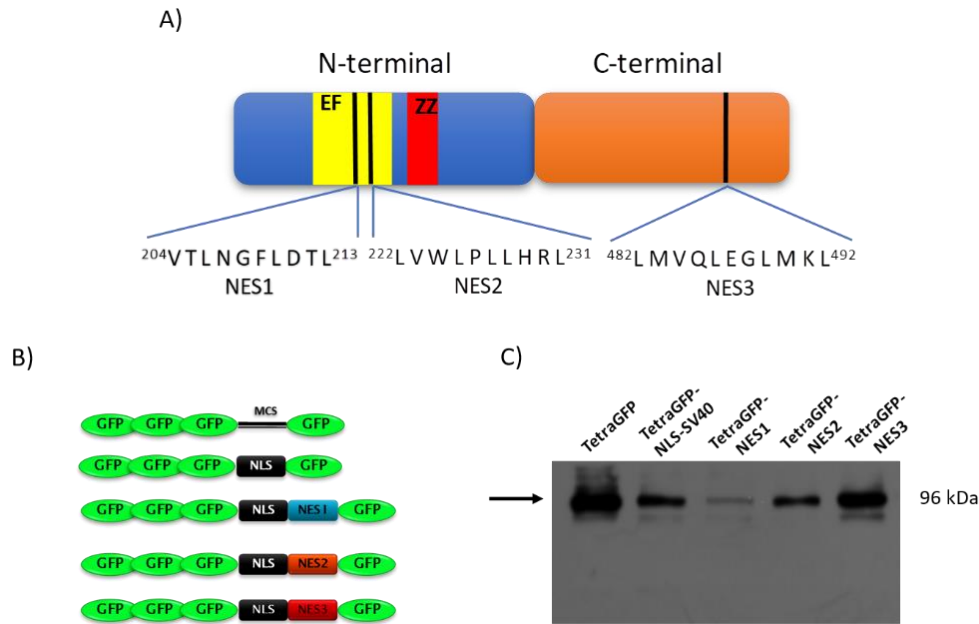


Figura 11. Identificación, clonación y expresión de las señales de exportación nuclear de la α -DB1 fusionadas a la proteína de fusión TetraGFP. A) Representación gráfica de las tres secuencias de exportación nuclear identificadas en la α -DB1. La NES1 y NES2 se localizan dentro del dominio de las manos EF y la NES3 en el dominio carboxilo terminal. B) Representación esquemática de las proteínas de fusión. C) Los extractos totales de las células C2C12 que expresan cada uno de las proteínas de fusión se resolvieron mediante SDS-PAGE y se revelaron mediante inmunodetección en fase sólida, utilizando anticuerpos contra GFP.

Posteriormente se analizó la distribución subcelular de las proteínas de fusión mediante microscopia confocal. La proteína Tetra-GFP se distribuyó exclusivamente en el citoplasma, debido a que su peso molecular de 96 kDa le impide ingresar por difusión pasiva al núcleo y a que no posee una secuencia de localización nuclear, mientras que la proteína Tetra-GFP fusionada con una NLS se localizó preferentemente en el núcleo. Por lo que respecta a las proteínas de fusión que contiene las secuencias NESs; observamos que la proteína Tetra-GFP-NES1 tiene una distribución nuclear similar a la proteína Tetra-GFP-NLS, mientras que las proteínas Tetra-GFP-NES2 y Tetra-GFP-NES3 presentaron una disminución en la tinción nuclear, lo que indica que estas dos NESs son funcionales. Sin embargo, la tinción en el citoplasma de la proteína Tetra-GFP-NES3 es más intensa, lo que sugiere que funciona más eficientemente que la NES2 (Figura 4A). La cuantificación de la intensidad de la fluorescencia (F n/c) de cada una de las proteínas de fusión se muestra en la Figura 4B.

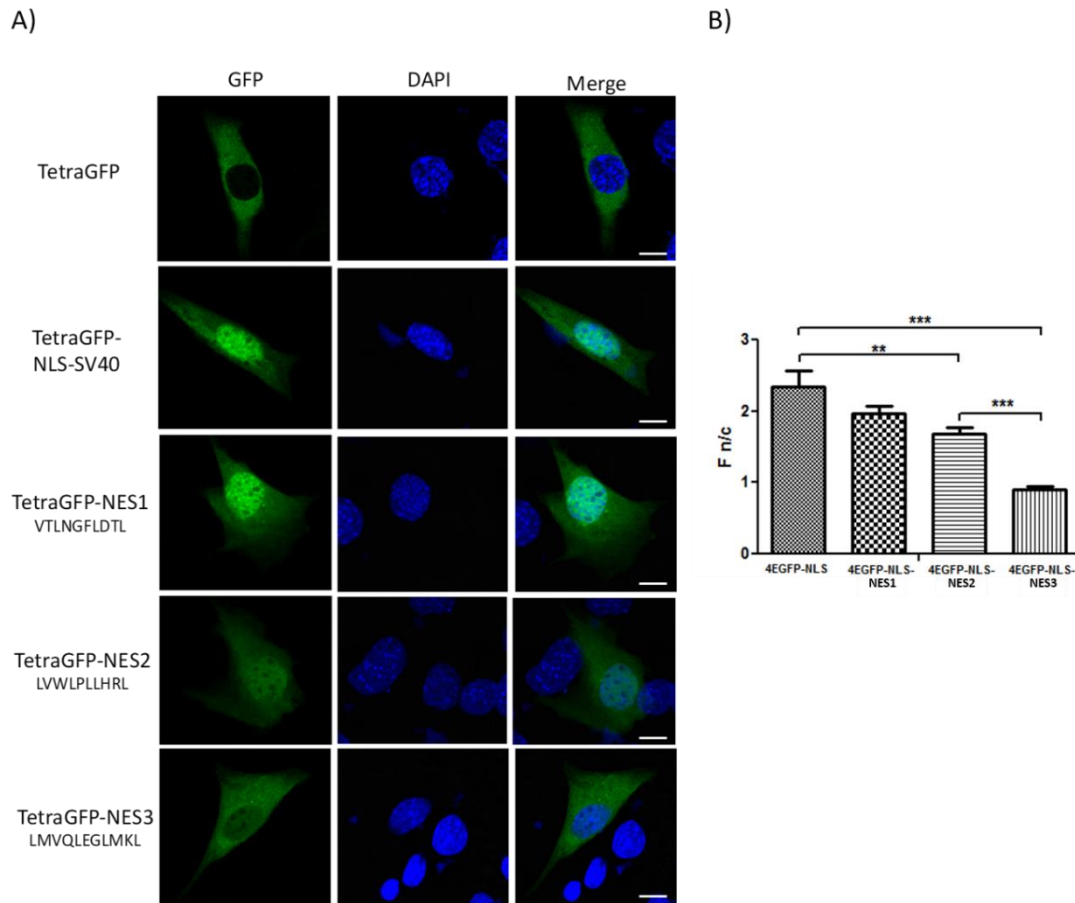


Figura 12. Caracterización funcional de las señales de exportación nuclear de la α -DB1. A) Las células C2C12 que expresan las diferentes proteínas de fusión se fijaron sobre cubreobjetos, se tiñeron los núcleos con DAPI (azul) y posteriormente se analizaron mediante microscopía confocal; barra= 10 μ m. Las imágenes de microscopía confocal corresponden a cortes en Z, B) Las imágenes se analizaron con el software *ImageJ* para obtener el cociente F n/c. Los datos mostrados en la gráfica representan el promedio \pm S.D. de una serie de tres experimentos independientes (n>50 células).

Para corroborar que la distribución citoplasmática de las proteínas de fusión GFP-NES 2 y 3 se debe a que presentan exportación nuclear y no a un defecto en su importación nuclear, tratamos las células con LMB, inhibidor de la exportina CRM1. Después del tratamiento, las proteínas Tetra-GFP-NES2 y Tetra-GFP-NES3 presentaron una distribución principalmente nuclear, (Figura 5A), lo que demuestra que confirma que ambas proteínas son exportadas por CRM1 y que este mecanismo se bloquea con LMB. El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia (F n/c) de cada proteína de fusión se muestra en la Figura 5B. En su conjunto estos resultados demuestran que, las secuencias de exportación nuclear 2 y 3 son funcionales en un sistema heterólogo.

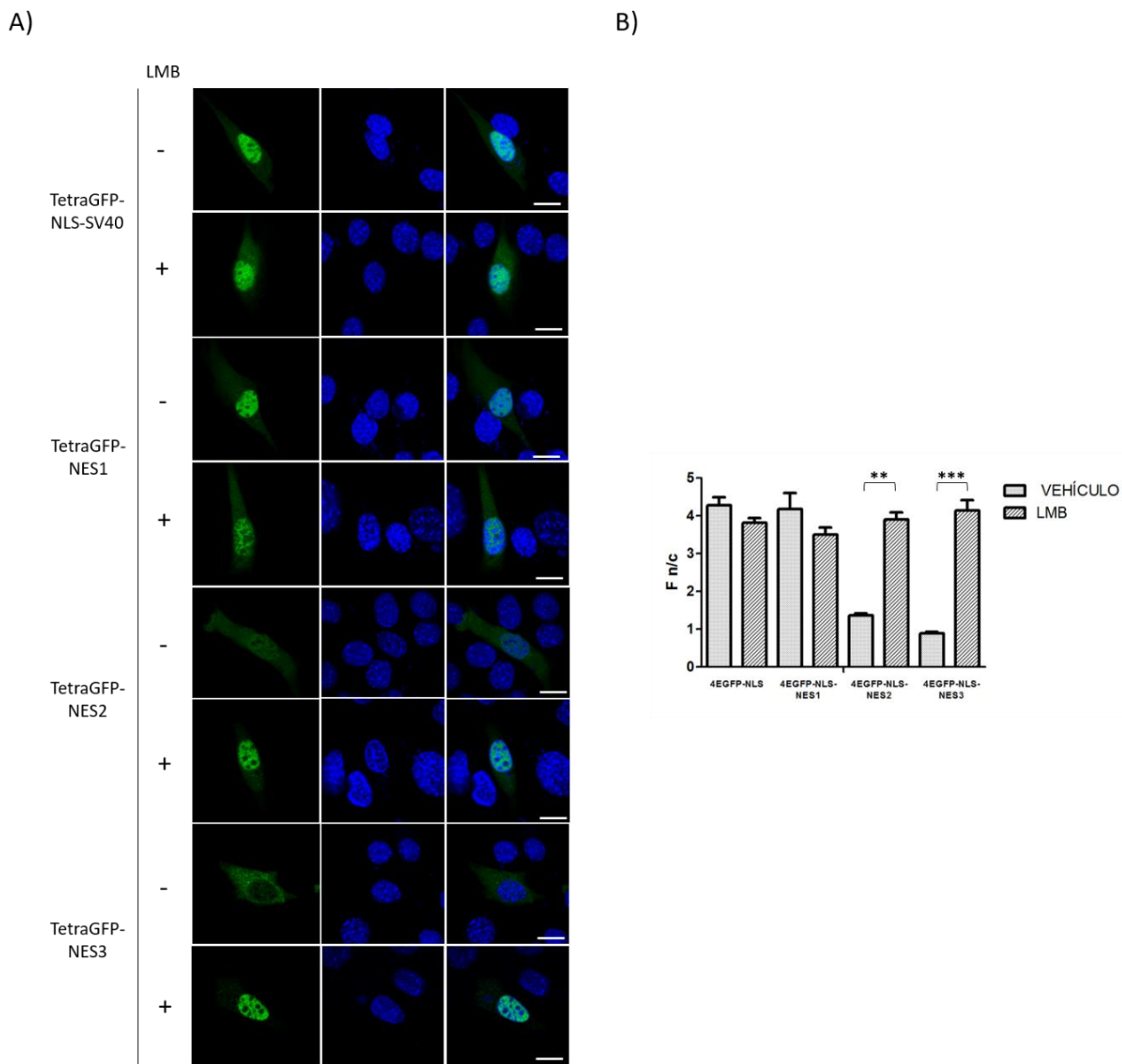


Figura 13. Las señales de exportación NES2 y NES33 son funcionales en un sistema heterólogo. A) Las células C2C12 que expresan las diferentes proteínas de fusión se sembraron sobre cubreobjetos y 12 post-transfección se incubaron por 24 h con 5 0nM de LMB. Se tiñeron los núcleos con DAPI (azul) y posteriormente las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal; barra = 10 μ m. Las imágenes de microscopía confocal corresponden a cortes en Z, B) Las imágenes se analizaron con el software *ImageJ* para obtener el cociente Fn/c. Los datos mostrados en la gráfica representan el promedio \pm S.D. de una serie de tres experimentos independientes (n>50 células).

8.2 LA EXPORTACIÓN NUCLEAR DE LA α -DB1 ES MEDIADA POR LA EXPORTINA CRM1

Con la finalidad de comprobar que la exportación nuclear de la α -DB1 es mediada por la exportina CRM1 se plantearon diferentes estrategias experimentales. Como primer acercamiento se trataron las células C2C12 con LMB y se analizó la distribución subcelular de la α -DB1 endógena. En las células tratadas con LMB se observó una mayor acumulación nuclear de la proteína, en comparación con el cultivo celular tratado solamente con el vehículo (6A). El análisis de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia (F n/c) confirmó que la acumulación nuclear de la α -DB1 en las células tratadas con LMB fue estadísticamente significativa (Figura 6B).

Como segundo paso decidimos obtener células transfectadas establemente con un vector que expresa un RNA interferente (RNAi) contra el RNA mensajero de CRM1 y analizar si la deficiente expresión de la exportina altera la localización nuclear de la α -DB1. Se corroboró mediante WB que las células que expresan el RNAi contra CRM1 tienen bajos niveles de la exportina, en comparación con las células que expresan un RNAi irrelevante. (Figura 6C). La cuantificación de las bandas mediante densitometría mostró una disminución del 70% en los niveles proteicos de CRM1 (Figura 6D). Por otro lado, en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos dirigidos contra α -DB1 evidenció que las células deficientes en la expresión de CRM1 presentan una mayor acumulación nuclear de la α -DB1 (Figura 6E). El análisis de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia F(n/c) se muestra en la Figura 6F.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

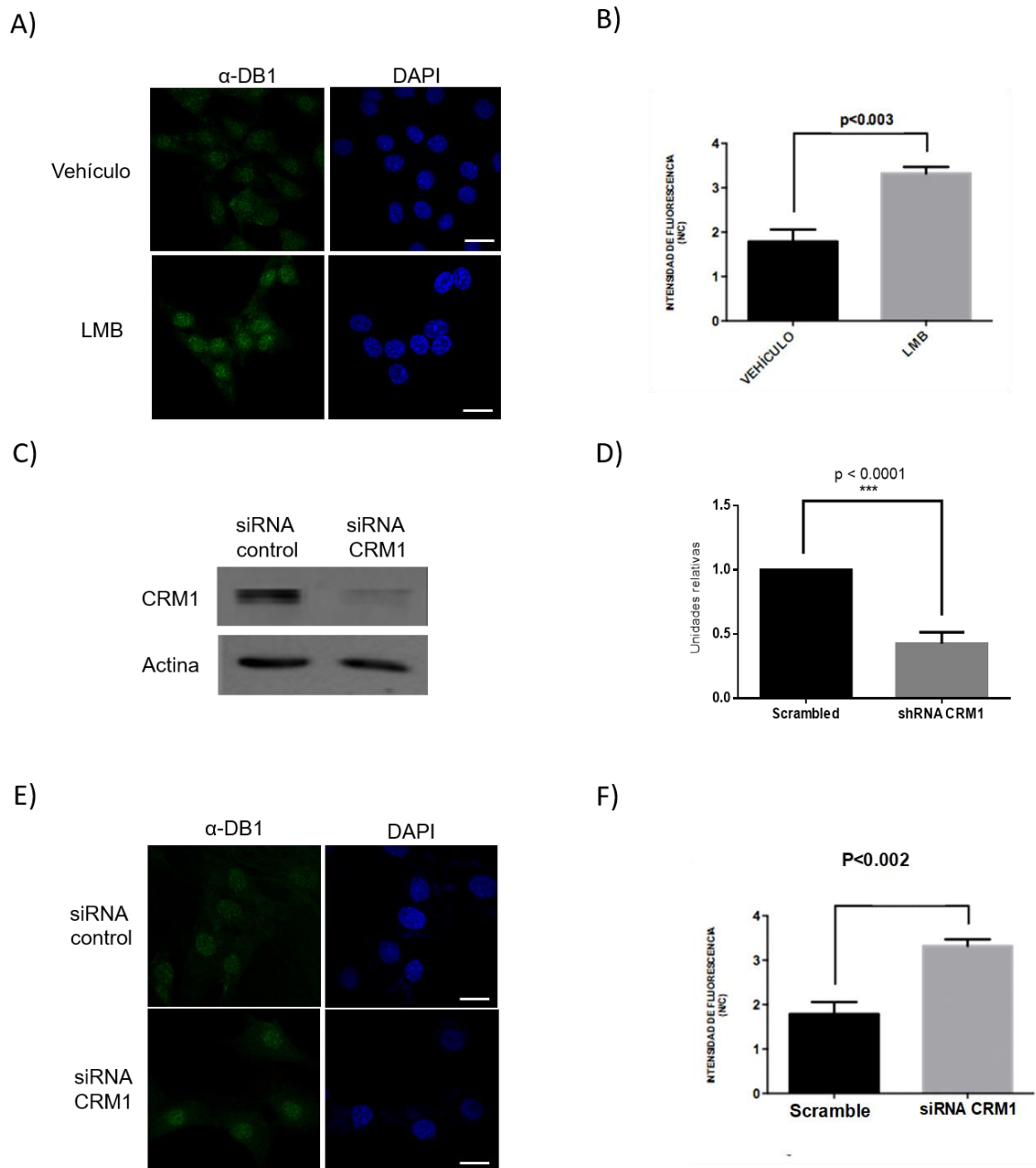


Figura 14. La exportación nuclear de la α -DB1 es mediada por la exportina CRM1. A) Las células C2C12 se sembraron sobre cubreobjetos y se incubaron por 24 h con 50 nM de LMB, posteriormente se fijaron y analizaron mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti- α -DB1 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) previo al análisis por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas con cortes ópticos en Z, barra=10 μ m. B) Las imágenes se analizaron con el software *ImageJ* para obtener el cociente FI/c y los datos mostrados en la gráfica representan el promedio \pm S.D. de una serie de tres experimentos independientes ($n > 50$). C) Los extractos totales de las células C2C12 establemente transfectadas con los plásmidos que expresan un siRNA dirigido contra la α -DB1 o un siRNA control se resolvieron mediante SDS/PAGE y se analizaron por inmunodetección en fase sólida, utilizando anticuerpos contra CRM1 y actina (control de carga) D) El Análisis por densitometría determinó que los

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

niveles proteicos de la exportina CRM1, normalizados con el control de carga, disminuyeron un 70%. Los datos corresponden al promedio \pm la S.D. de una serie de tres experimentos independientes. E) Las células C2C12 establemente transfectadas con el siRNA dirigido contra la α -DB1 o con el siRNA control se fijaron y analizaron mediante inmunofluorescencia, usando un anticuerpo anti- α -DB1 (verde). Posteriormente los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) previo al análisis por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas con secciones ópticas en Z, barra=10 μ m. E) Las imágenes obtenidas se analizaron con el software *ImageJ* para obtener el cociente Fn/c y los datos mostrados en la gráfica representan el promedio \pm S.D. de una serie de tres experimentos independientes (n>50 células).

Finalmente, para determinar si la α -DB1 interacciona con la exportina CRM1 se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo*. Para los ensayos *in vitro*, las proteínas de fusión GST- α -DB1, GST (control negativo) y GST- β -DG (control positivo) se expresaron en un sistema bacteriano, se purificaron y se inmovilizaron sobre perlas de glutatión-sefarosa. La purificación e integridad de las proteínas de fusión se evaluó mediante tinción con azul de coomasie (Figura 7A). Enseguida se pusieron a interactuar las proteínas de fusión con extractos totales de las células C2C12 y los complejos formados se recuperaron por centrifugación y se revelaron por medio de inmunodetección en (IP) fase sólida, empleando anticuerpos contra CRM1. La exportina CRM1 se recuperó en la fracción precipitada de GST- α -DB1 y GST- β -DG (control positivo) pero no en la de GST sola (Figura 7B), lo que demuestra que en verdad existe una interacción entre CRM1 y la α -DB1. El revelado de las proteínas de fusión utilizando un anticuerpo dirigido contra la proteína GST se muestra en la parte inferior del panel B de la Figura 7.

Con la finalidad de demostrar que esta interacción se lleva a cabo en un ambiente fisiológico, se decidió realizar ensayos *in vivo* mediante la técnica de GFP-trap, inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo dirigido contra GFP. Las células C2C12 fueron transfectadas con los plásmidos que codifican para las proteínas de fusión GFP- α -DB1 y GFP sola (control negativo), 24 horas pos-tranfección se realizaron extractos totales y se pusieron a interactuar con las proteínas GFP- α -DB1 y GFP sola, previamente purificadas. En comparación con la fracción precipitante (IP) de las células transfectadas con GFP sola donde no se observa ninguna interacción, en la fracción precipitante de las células transfectadas con GFP- α -DB1, se puede observar claramente la señal específica de la proteína CRM1 (Figura 7C). La expresión de las proteínas de fusión se muestra en la parte inferior del panel B de la Figura 7. Estos resultados en su conjunto confirman que la exportina CRM1 media la exportación nuclear de la α -DB1.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

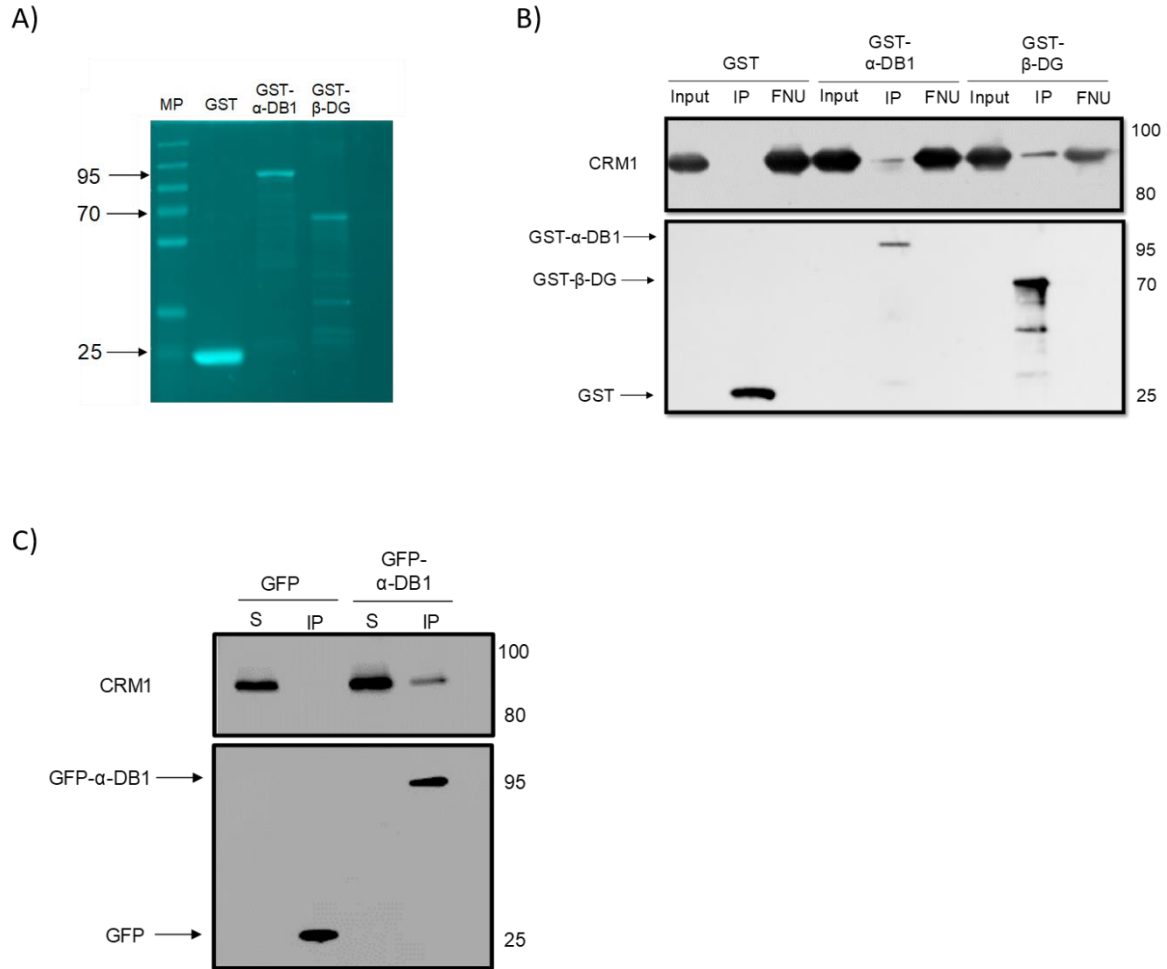


Figura 15. La α -DB1 interacta con la exportina CRM1 *in vitro* e *in vivo*. A) Las proteínas GST, GST- α -DB1 y GST- β -DG (control positivo) se expresaron y purificaron a partir de cultivos de *E. coli*, y se visualizaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie. B) Las proteínas de fusión inmovilizadas sobre perlas de glutation-Sefarosa se incubaron con extractos totales de las células C2C12 para llevar a cabo ensayos de interacción tipo *pull-down*. Los complejos se resolvieron por SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo anti-CRM1. El carril marcado como *Input* corresponde al 5% de la cantidad del extracto de proteínas utilizado para el ensayo de interacción. IP, fracción inmunoprecipitada; FNU, fracción no unida. En el panel inferior se observa el revelado de las proteínas de fusión utilizando un anticuerpo anti-GST. C) Los lisados de las células C2C12 que expresan GFP o GFP- α -DB1 se inmunoprecipitaron utilizando el sistema GFP-trap (GFP-Trap®, Chromotek, Germany) y las proteínas precipitadas se resolvieron a geles de acrilamida con SDS y se revelaron mediante inmunodetección en fase sólida utilizando un anticuerpo dirigido contra la CRM1. El carril marcado como *S=sobrenadante* corresponde al 5% de la cantidad de proteínas que se utilizó para la interacción. IP, fracción inmunoprecipitada. En el panel inferior se observa el revelado de las proteínas de fusión utilizando un anticuerpo anti-GFP.

8.3 EL PROTEOSOMA NUCLEAR LLEVA VA ACABO LA DEGRADACIÓN DE LA α -DB1

Tomando en consideración el tráfico intracelular que posee la α -DB1 para localizarse tanto, en citoplasma como en el núcleo, decidimos evaluar si su estabilidad está modulada por su localización subcelular. Como primer acercamiento tratamos a las células C2C12 con cicloheximida (CHX), para inhibir la síntesis de *novo* de proteínas y determinamos el tiempo de vida media de la α -DB1 mediante ensayos de inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos contra la α -DB1 y GAPDH (proteína control que tiene una vida media relativamente larga). Demostramos que la vida media de la α -DB1 es de 31.6 h (Figura 9A, panel izquierdo). Posteriormente forzamos la acumulación nuclear de la α -DB1 mediante tratamiento de las células con LMB previo a la inhibición de la síntesis de proteínas con CHX, y analizamos si existe un cambio en la estabilidad de la proteína. De manera interesante encontramos que la vida media de la α -DB1 se acorta significativamente cuando se concentra en el núcleo. (11.6 h; Figura 8A).

Para demostrar que la degradación nuclear de la α -DB1 estaba mediada por el proteosoma, las células C2C12 fueron tratadas con CHX y LMB, se incubaron adicionalmente por 30 horas con el inhibidor del proteosoma MG132. Los lisados celulares de las diferentes condiciones experimentales se resolvieron mediante SDS-PAGE y se revelaron por inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos anti- α -DB1 (Figura 9C). La disminución de los niveles de proteína se previno después del tratamiento con MG132 (Figura 9C), lo que sugiere que la α -DB1 es degradada por el proteosoma nuclear.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

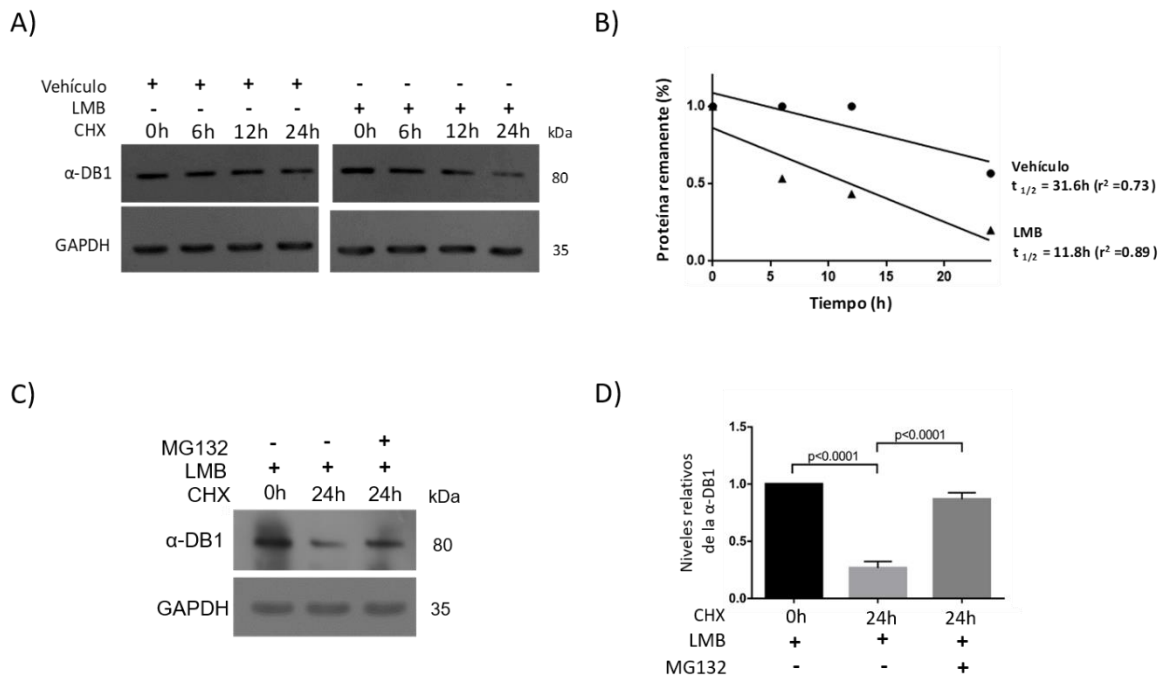


Figura 16. Los niveles nucleares de la α -DB1 son regulados por el proteosoma nuclear. (A) Las células C2C12 se trataron con LMB o etanol (vehículo) durante 12 h y enseguida con CHX durante los intervalos de tiempo indicados. Los lisados celulares se resolvieron mediante SDS-PAGE y se revelaron utilizando anticuerpos específicos para la α -DB1 y GAPDH (control de carga que posee una vida media relativamente larga). B) El tiempo de vida media de la α -DB1 ($t_{1/2}$) 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 de la α -DB1 disminuyó en las células tratadas con LMB (panel derecho). C) Las células C2C12 tratados con LMB y CHX como en (A), se incubaron adicionalmente con MG132 (inhibidor del proteosoma) o con el vehículo solamente durante 30 h. D) Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos separados, el valor de p indica diferencias de significación (prueba t de Student no pareada). La inhibición del proteosoma recuperó los niveles de proteína α -DB1.

Las proteínas que son blanco del proteosoma deben ser ubiquitinadas para ser reconocidas por este sistema de degradación [118]. Por lo tanto, decidimos evaluar si la α -DB1 se ubiquitina en el núcleo para ser posteriormente degradada. Para abordar esta pregunta, utilizamos un vector de expresión que codifica para 5 dominios proteicos de la proteína Dsk, los cuales tienen afinidad por proteínas ubiquitinadas [119] y están fusionados a GST. Las proteínas de fusión GST-MultiDsk y GST (control negativo) se expresaron en un sistema bacteriano, se purificaron y se inmovilizaron sobre perlas de glutatión-sefarosa. La purificación e integridad de las proteínas recombinantes se evaluó mediante tinción con azul de Coomassie (Figura 10A) y enseguida se llevaron a cabo ensayos de interacción de proteínas tipo *pull-down*, mediante la incubación de las

proteínas GST-MultiDSK y GST con lisados de las células C2C12 tratadas previamente con LMB o con el vehículo solamente. Las proteínas ubiquitinadas que se rescataron con el sistema GST-MultiDSK se resolvieron mediante SDS-PAGE y se revelaron por mediante inmunodetección en fase sólida, utilizando un anticuerpo anti- α -DB1. Se observó una banda con una migración retardada en el carril de las proteínas precipitadas por el GST-MultiDsk en la fracción nuclear y de manera interesante, la intensidad de la banda es claramente mayor en las células tratadas con LMB que en las incubadas con el vehículo solamente (Figura 10B). La interpretación de estos resultados sugiere que la banda retardada corresponde a la α -DB1 ubiquitinada y que el mecanismo de ubiquinación se acelera cuando acumulamos la proteína en el núcleo mediante tratamiento con LMB. Es importante mencionar que la banda que corresponde a la α -DB1 ubiquitinada no se encontró en la fracción citoplasmática, independientemente del tratamiento con LMB o con su vehiculo solamente, lo que indica que la ubiquitinación y posterior degradación de la proteína ocurre específicamente dentro del núcleo. La ausencia de calnexina en el extracto nuclear y de la lámina A/C en el extracto del citoplasma demuestra la pureza de las fracciones celulares.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

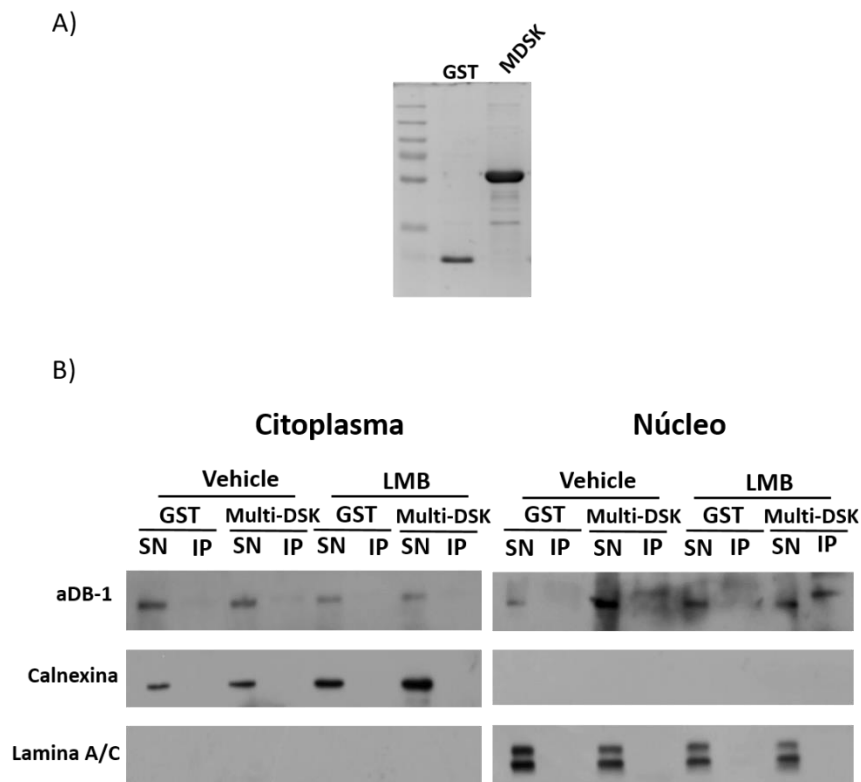


Figura 17. La ubiquitinación de la α -DB-1 ocurre exclusivamente en el núcleo de las células C2C12 y se acelera por el tratamiento con LMB. A) Las proteínas GST y GST-MultiDSK se expresaron y purificaron a partir de cultivos de *E. coli*, y se visualizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. B) Las proteínas GST y GST-MultiDSK inmovilizadas sobre perlas de glutation-Sefarosa se incubaron con extractos citoplásmicos y nucleares de células tratadas previamente con LMB o con el vehículo solamente. Las proteínas ubiquitinadas que se capturaron con las perlas de sefarosa se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunodetección en fase sólida con anticuerpos anti- α -DB1. SN, sobrenadante; IP precipitado. La inmunodetección de calnexina y lámina A/C se usó como control de la pureza de las fracciones de citoplasma y núcleo, respectivamente.

9. DISCUSIÓN

La α -DB1 es un miembro del complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC) [1]. Las funciones que se le han atribuido a la α -DB1 cuando forma parte de este complejo proteico incluyen la regeneración muscular y la estabilidad del citoesqueleto[46] . Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró por primera vez que la α -DB1 se localiza en el núcleo de diversas líneas celulares [110, 111]. Además, nuestro laboratorio diseccionó el mecanismo de importación nuclear de la α -DB1. Esta proteína contiene una señal de importación nuclear (NLS) atípica localizada en su dominio ZZ, la cual es reconocida por el sistema de importinas IMP α 2/IMP β , para mediar la translocación nuclear de la proteína a través del poro nuclear [116]. En el núcleo, la α -DB1 interacciona con la proteína de envoltura nuclear lámina B1 para regular la arquitectura nuclear. Tomando en consideración que la α -DB1 se distribuye tanto en la membrana plasmática como en el núcleo, nos planteamos la hipótesis de que la proteína posee un mecanismo de exportación nuclear que, en combinación con la importación nuclear, le permita transportarse bidireccionalmente entre ambos compartimentos.

Consistentemente con nuestra hipótesis, en el presente estudio demostramos que la exportación nuclear de la α -DB1, mediado por la exportina CRM1. Mediante análisis *in silico* encontramos 3 posibles señales de exportación nuclear dentro de la secuencia de la α -DB1 (Figura 3A). Debido a que existen proteínas que poseen más de una NES funcional [120], decidimos evaluar la eficiencia de cada NES de manera independiente, empleando el sistema reportero TetraGFP, y demostramos que al menos las NES2 y NES3 son funcionales. Así mismo, mediante ensayos de interacción *in vitro* y experimentos de inmunoprecipitación comprobamos que la exportina CRM1 interacciona con la α -DB1. Finalmente, mediante experimentos de *knockdown* sobre el gen de CRM1, confirmamos que esta exportina es la encargada de transportar desde el núcleo hacia el citoplasma a la α -DB1, ya que la disminución de los niveles de CRM1 resultó en la acumulación nuclear de la proteína.

La exportación nuclear de proteínas es en algunos casos el preámbulo para su posterior degradación en el citoplasma, a través del proteosoma[121, 122]. Por lo tanto, decidimos evaluar si la estabilidad de la α -DB1 depende de su distribución subcelular. De manera

inesperada, encontramos que el tiempo de vida media de la α -DB1 disminuye más de 50% cuando forzamos su acumulación en el núcleo mediante tratamiento de las células con LMB, y demostramos que la bajada en los niveles de la α -DB1 se revierte cuando se agrega al sistema un inhibidor del proteosoma (MG132). Estos resultados sugieren que el proteosoma nuclear degrada a la α -DB1, lo que es en cierta medida novedoso, ya que hasta hace algunos años se pensaba que la degradación de proteínas ocurría exclusivamente el citoplasma. Sin embargo, estudios recientes han demostrado la existencia de un proteosoma nuclear[123] que se encarga de degradar varias proteínas nucleares[124]. Para sustentar nuestra hipótesis decidimos buscar la presencia de la α -DB1 ubiquitinada dentro del núcleo; la ubiquitinación es una modificación postraduccional necesaria para que las proteínas sean reconocidas y degradadas por el proteosoma[125]. De manera consistente, observamos la señal de la α -DB1 ubiquitinada en la fracción nuclear, pero no en la fracción citoplasmática. Estos datos plantean dos escenarios: a) la proteína se degrada exclusivamente en el núcleo y b) la proteína se degrada también en el citoplasma, pero su decaimiento en este compartimento es demasiado rápido para logra detectar la forma ubiquitinada. Experimentos de fraccionamiento celular adicionales, empleando MG132 para bloquear el proteosoma y hacer más estable en el citoplasma la α -DB1 ubiquitinada son necesarios para resolver esta incógnita.

Es importante resaltar que la migración de la α -DB1 ubiquitinada corresponde a una proteína mono-ubiquitinada. Partiendo de la idea de que las proteínas que se degradan por el proteosoma presentan marcas de poli-ubiquitinación, este resultado parecer enigmático. No obstante, estudios recientes han establecido que la mono-ubiquitinación es suficiente para que las proteínas sean reconocidas por el proteosoma, como es el caso del precursor de NF- κ B, p105 [126]; el factor de transcripción Pax3 [127] y la α -Sinucleína[128].

Por último, la observación de que la α -DB1 monoubiquitinada se encuentre en la fracción nuclear de las células tratadas solamente con el vehículo de la LMB, sugiere que la degradación nuclear de la α -DB1 es un proceso natural que regula negativamente sus niveles y de manera interesante, cuando existe una acumulación nuclear anormal de la

proteína el proceso se acelera para evitar oportunamente un desbalance en su cantidad nuclear

Aunque no se ha demostrado que la acumulación anormal de la α -DB1 esté relacionada con alguna patología o afecte la fisiología de algún sistema celular, es plausible proponer que el exceso de la proteína en el núcleo podría alterar la organización de la envoltura nuclear, con base en estudios previos que han demostrado que las desregulaciones en los niveles de diferentes proteínas de la envoltura nuclear alteran la arquitectura nuclear. La sobreexpresión de la lámina B1 ocasiona la deslocalización y disminución en los niveles de LAP2 (lamin-Associated Polypeptide 2, por sus siglas en inglés) y altera la importación nuclear de la nucleoporina Nup153[129]. La sobreexpresión de la proteína LUMA afecta la localización de la emerina (proteína integral de la MNI) [130] y causa la acumulación anormal de RAC1 en el núcleo[131]. Finalmente, en nuestro grupo de trabajo demostramos que la acumulación nuclear anormal del β -DG altera la morfología y función de la envoltura nuclear, por medio de la deslocalización y disminución de los niveles de las proteínas de envoltura nuclear, lámina B1 y emerina [132].

De manera colectiva, nuestros resultados sugieren que los mecanismos de exportación nuclear y degradación nuclear mediada por el proteosoma funcionan en conjunto para mantener la homeostasis de la α -DB1 y de esta resguardar la fisiología de la célula.

10. CONCLUSIONES

La exportación nuclear de la α -DB1 es mediada por la exportina CRM1, la cual reconoce al menos dos NES en la secuencia de la proteína. La exportación nuclear en combinación con el proteosoma nuclear restringe el contenido nuclear de la α -DG; no obstante, se requieren estudios futuros para definir la relevancia fisiológica de la regulación de los niveles nucleares de la α -DB1.

11. BIBLIOGRAFÍA

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. Campbell, K.P., *Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage*. Cell, 1995. **80**(5): p. 675-9.
3. Davies, K.E. and K.J. Nowak, *Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(10): p. 762-73.
4. Petrof, B.J., et al., *Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3710-4.
5. Carr, C., G.D. Fischbach, and J.B. Cohen, *A novel 87,000-Mr protein associated with acetylcholine receptors in Torpedo electric organ and vertebrate skeletal muscle*. J Cell Biol, 1989. **109**(4 Pt 1): p. 1753-64.
6. Sadoulet-Puccio, H.M., et al., *Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(4): p. 489-96.
7. Blake, D.J., et al., *Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7802-10.
8. Wagner, K.R., J.B. Cohen, and R.L. Haganir, *The 87K postsynaptic membrane protein from Torpedo is a protein-tyrosine kinase substrate homologous to dystrophin*. Neuron, 1993. **10**(3): p. 511-22.
9. Roberts, R.G., *Dystrophins and dystrobrevins*. Genome Biol, 2001. **2**(4): p. REVIEWS3006.
10. Blake, D.J., et al., *beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 241-6.
11. Nawrotzki, R., et al., *Characterisation of alpha-dystrobrevin in muscle*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 17): p. 2595-605.
12. Newey, S.E., et al., *Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6645-55.
13. Loh, N.Y., et al., *Role of beta-dystrobrevin in nonmuscle dystrophin-associated protein complex-like complexes in kidney and liver*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(21): p. 7442-8.
14. Bohm, S.V. and R.G. Roberts, *Expression of members of the dystrophin, dystrobrevin, and dystrotelin superfamily*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009. **19**(2): p. 89-108.
15. Puca, A.A., et al., *Identification and characterization of a novel member of the dystrobrevin gene family*. FEBS Lett, 1998. **425**(1): p. 7-13.
16. Peters, M.F., et al., *beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31561-9.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DBI

17. Sadoulet-Puccio, H.M., et al., *The genomic organization of human dystrobrevin*. Neurogenetics, 1997. **1**(1): p. 37-42.
18. Holzfeind, P.J., et al., *Tissue-selective expression of alpha-dystrobrevin is determined by multiple promoters*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6250-8.
19. Ambrose, H.J., et al., *Genomic organization of the mouse dystrobrevin gene: comparative analysis with the dystrophin gene*. Genomics, 1997. **39**(3): p. 359-69.
20. Peters, M.F., et al., *Differential membrane localization and intermolecular associations of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle*. J Cell Biol, 1998. **142**(5): p. 1269-78.
21. Loh, N.Y., et al., *Genomic organization and refined mapping of the mouse beta-dystrobrevin gene*. Mamm Genome, 1998. **9**(11): p. 857-62.
22. Rees, M.L., C.F. Lien, and D.C. Gorecki, *Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues*. Neuromuscul Disord, 2007. **17**(2): p. 123-34.
23. Ponting, C.P., et al., *ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(1): p. 11-13.
24. Newey, S.E., et al., *Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex*. Curr Biol, 2000. **10**(20): p. 1295-8.
25. Sadoulet-Puccio, H.M., M. Rajala, and L.M. Kunkel, *Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12413-8.
26. Blake, D.J., et al., *Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(4): p. 133-5.
27. Lapidos, K.A., R. Kakkar, and E.M. McNally, *The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma*. Circ Res, 2004. **94**(8): p. 1023-31.
28. Gillis, J.M., *Understanding dystrophinopathies: an inventory of the structural and functional consequences of the absence of dystrophin in muscles of the mdx mouse*. J Muscle Res Cell Motil, 1999. **20**(7): p. 605-25.
29. Grady, R.M., et al., *Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(4): p. 215-20.
30. Nakamori, M., et al., *Aberrantly spliced alpha-dystrobrevin alters alpha-syntrophin binding in myotonic dystrophy type 1*. Neurology, 2008. **70**(9): p. 677-85.
31. Brenman, J.E., et al., *Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains*. Cell, 1996. **84**(5): p. 757-67.
32. Hasegawa, M., et al., *Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12626-31.
33. Oak, S.A., et al., *Mouse alpha1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling*. Biochemistry, 2001. **40**(37): p. 11270-8.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

34. Iwata, Y., et al., *Alpha1-syntrophin has distinct binding sites for actin and calmodulin*. FEBS Lett, 1998. **423**(2): p. 173-7.
35. Madhavan, R., L.R. Massom, and H.W. Jarrett, *Calmodulin specifically binds three proteins of the dystrophin-glycoprotein complex*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **185**(2): p. 753-9.
36. Dalkilic, I. and L.M. Kunkel, *Muscular dystrophies: genes to pathogenesis*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(3): p. 231-8.
37. Wehling, M., M.J. Spencer, and J.G. Tidball, *A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice*. J Cell Biol, 2001. **155**(1): p. 123-31.
38. Vandebrouck, A., et al., *Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin*. FASEB J, 2007. **21**(2): p. 608-17.
39. Treves, S., et al., *Ryanodine receptor 1 mutations, dysregulation of calcium homeostasis and neuromuscular disorders*. Neuromuscul Disord, 2005. **15**(9-10): p. 577-87.
40. Bunnell, T.M., et al., *Destabilization of the dystrophin-glycoprotein complex without functional deficits in alpha-dystrobrevin null muscle*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2604.
41. Lazarides, E., *Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space*. Nature, 1980. **283**(5744): p. 249-256.
42. Robson, R.M., T.W. Huiatt, and R.M. Bellin, *Muscle intermediate filament proteins*. Methods Cell Biol, 2004. **78**: p. 519-53.
43. Mizuno, Y., et al., *Beta-synemin localizes to regions of high stress in human skeletal myofibers*. Muscle Nerve, 2004. **30**(3): p. 337-46.
44. Mizuno, Y., et al., *Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6156-61.
45. Zhang, J., et al., *Syncoilin is required for generating maximum isometric stress in skeletal muscle but dispensable for muscle cytoarchitecture*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(5): p. C1175-82.
46. Brown, S.C., et al., *Syncoilin upregulation in muscle of patients with neuromuscular disease*. Muscle Nerve, 2005. **32**(6): p. 715-25.
47. Schmidt, N., et al., *Neuregulin/ErbB regulate neuromuscular junction development by phosphorylation of alpha-dystrobrevin*. J Cell Biol. **195**(7): p. 1171-84.
48. Pawlikowski, B.T. and M.M. Maimone, *Formation of complex AChR aggregates in vitro requires alpha-dystrobrevin*. Dev Neurobiol, 2009. **69**(5): p. 326-38.
49. Grady, R.M., et al., *Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin--glycoprotein complex*. Neuron, 2000. **25**(2): p. 279-93.
50. Ueda, H., et al., *Dystrobrevin localization in photoreceptor axon terminals and at blood-ocular barrier sites*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(12): p. 3908-14.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

51. Lien, C.F., et al., *Absence of glial alpha-dystrobrevin causes abnormalities of the blood-brain barrier and progressive brain edema*. J Biol Chem. **287**(49): p. 41374-85.
52. Benson, M.A., et al., *Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 24232-41.
53. Shao, L., et al., *Schizophrenia susceptibility gene dysbindin regulates glutamatergic and dopaminergic functions via distinctive mechanisms in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A. **108**(46): p. 18831-6.
54. Albrecht, D.E. and S.C. Froehner, *DAMAGE, a novel alpha-dystrobrevin-associated MAGE protein in dystrophin complexes*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 7014-23.
55. Harvey Lodish, A.B., Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Lawrence Zipursky, James Darnell, *Biología celular y molecular*. 5ta ed. 2004. 1054.
56. Worman, H.J. and J.C. Courvalin, *Nuclear envelope, nuclear lamina, and inherited disease*. Int Rev Cytol, 2005. **246**: p. 231-79.
57. Dauer, W.T. and H.J. Worman, *The nuclear envelope as a signaling node in development and disease*. Dev Cell, 2009. **17**(5): p. 626-38.
58. Korfali, N., et al., *The nuclear envelope proteome differs notably between tissues*. Nucleus. **3**(6): p. 552-64.
59. Callan, H.G. and S.G. Tomlin, *Experimental studies on amphibian oocyte nuclei. I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1950. **137**(888): p. 367-78.
60. Young, K.G. and R. Kothary, *Spectrin repeat proteins in the nucleus*. Bioessays, 2005. **27**(2): p. 144-52.
61. Zhang, Q., et al., *Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 24): p. 4485-98.
62. Stoffler, D., B. Fahrenkrog, and U. Aebi, *The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(3): p. 391-401.
63. Grossman, E., O. Medalia, and M. Zwerger, *Functional architecture of the nuclear pore complex*. Annu Rev Biophys. **41**: p. 557-84.
64. Schirmer, E.C., et al., *Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics*. Science, 2003. **301**(5638): p. 1380-2.
65. Bione, S., et al., *Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy*. Nat Genet, 1994. **8**(4): p. 323-7.
66. Berk, J.M., K.E. Tifft, and K.L. Wilson, *The nuclear envelope LEM-domain protein emerin*. Nucleus. **4**(4): p. 298-314.
67. Lin, F., et al., *MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4840-7.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

68. Berger, R., et al., *The characterization and localization of the mouse thymopoietin/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products*. Genome Res, 1996. **6**(5): p. 361-70.
69. Harris, C.A., et al., *Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO beta to rat lamin-associated polypeptide 2*. Genomics, 1995. **28**(2): p. 198-205.
70. Martin, L., C. Crimando, and L. Gerace, *cDNA cloning and characterization of lamina-associated polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane*. J Biol Chem, 1995. **270**(15): p. 8822-8.
71. Worman, H.J., et al., *A lamin B receptor in the nuclear envelope*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(22): p. 8531-4.
72. Haque, F., et al., *Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes*. J Biol Chem. **285**(5): p. 3487-98.
73. Soullam, B. and H.J. Worman, *Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane*. J Cell Biol, 1995. **130**(1): p. 15-27.
74. Fawcett, D.W., *On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates*. Am J Anat, 1966. **119**(1): p. 129-45.
75. Aaronson, R.P. and G. Blobel, *Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(3): p. 1007-11.
76. Gerace, L., A. Blum, and G. Blobel, *Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution*. J Cell Biol, 1978. **79**(2 Pt 1): p. 546-66.
77. Aebi, U., et al., *The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments*. Nature, 1986. **323**(6088): p. 560-4.
78. Lin, F. and H.J. Worman, *Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C*. J Biol Chem, 1993. **268**(22): p. 16321-6.
79. Biamonti, G., et al., *The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(8): p. 3499-506.
80. Wydner, K.L., et al., *Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization*. Genomics, 1996. **32**(3): p. 474-8.
81. Wilson, K.L. and R. Foisner, *Lamin-binding Proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol. **2**(4): p. a000554.
82. Burke, B. and C.L. Stewart, *The nuclear lamins: flexibility in function*. Nat Rev Mol Cell Biol. **14**(1): p. 13-24.
83. Pante, N. and U. Aebi, *Toward the molecular dissection of protein import into nuclei*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(3): p. 397-406.
84. Lenz-Bohme, B., et al., *Insertional mutation of the Drosophila nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae*. J Cell Biol, 1997. **137**(5): p. 1001-16.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

85. Gruenbaum, Y., et al., *Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions*. J Struct Biol, 2000. **129**(2-3): p. 313-23.
86. Wilson, R.H. and D. Coverley, *Relationship between DNA replication and the nuclear matrix*. Genes Cells. **18**(1): p. 17-31.
87. Cau, P., et al., *Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective*. Semin Cell Dev Biol.
88. Azibani, F., et al., *Striated muscle laminopathies*. Semin Cell Dev Biol. **29**: p. 107-15.
89. Vlcek, S. and R. Foisner, *Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(3): p. 298-304.
90. Bonne, G., et al., *Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy*. Nat Genet, 1999. **21**(3): p. 285-8.
91. Raffaele Di Barletta, M., et al., *Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(4): p. 1407-12.
92. Fatkin, D., et al., *Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease*. N Engl J Med, 1999. **341**(23): p. 1715-24.
93. Eriksson, M., et al., *Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 293-8.
94. Padiath, Q.S., et al., *Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy*. Nat Genet, 2006. **38**(10): p. 1114-23.
95. Hegele, R.A., et al., *Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(2): p. 383-9.
96. Nagano, A., et al., *Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 254-9.
97. Worman, H.J. and G. Bonne, *"Laminopathies": a wide spectrum of human diseases*. Exp Cell Res, 2007. **313**(10): p. 2121-33.
98. Goldman, R.D., et al., *Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 8963-8.
99. Hoffmann, K., et al., *Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly)*. Nat Genet, 2002. **31**(4): p. 410-4.
100. Maraldi, N.M., et al., *Nuclear envelope proteins and chromatin arrangement: a pathogenic mechanism for laminopathies*. Eur J Histochem, 2006. **50**(1): p. 1-8.
101. Fahrenkrog, B. and U. Aebi, *The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(10): p. 757-66.
102. Terry, L.J., E.B. Shows, and S.R. Wentz, *Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport*. Science, 2007. **318**(5855): p. 1412-6.

EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1

103. Pante, N. and M. Kann, *Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(2): p. 425-34.
104. Paine, P.L., L.C. Moore, and S.B. Horowitz, *Nuclear envelope permeability*. Nature, 1975. **254**(5496): p. 109-14.
105. Radu, A., G. Blobel, and M.S. Moore, *Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1769-73.
106. Gorlich, D., et al., *Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope*. Curr Biol, 1995. **5**(4): p. 383-92.
107. Lee, S.J., et al., *Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 693-6.
108. Stewart, M., *Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 195-208.
109. la Cour, T., et al., *Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals*. Protein Eng Des Sel, 2004. **17**(6): p. 527-36.
110. Fornerod, M., et al., *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1051-60.
111. Hutten, S. and R.H. Kehlenbach, *CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(4): p. 193-201.
112. 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.
113. 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.
114. Fuentes-Mera, L., et al., *Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix*. Exp Cell Res, 2006. **312**(16): p. 3023-35.
115. 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.
116. 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.
117. Beetz, C., et al., *Identification of nuclear localisation sequences in spastin (SPG4) using a novel Tetra-GFP reporter system*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **318**(4): p. 1079-84.
118. Ciechanover, A. and A.L. Schwartz, *The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and*

- EXPORTACIÓN NUCLEAR Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL DE LA α -DB1**
involvement in the degradation of native cellular proteins. FASEB J, 1994. **8**(2): p. 182-91.
119. Wilson, M.D., et al., *MultiDsk: a ubiquitin-specific affinity resin.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46398.
 120. Liu, Q., et al., *Pericentrin contains five NESs and an NLS essential for its nucleocytoplasmic trafficking during the cell cycle.* Cell Res, 2010. **20**(8): p. 948-62.
 121. Kamura, T., et al., *Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase.* Nat Cell Biol, 2004. **6**(12): p. 1229-35.
 122. Freedman, D.A. and A.J. Levine, *Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 7288-93.
 123. von Mikecz, A., *The nuclear ubiquitin-proteasome system.* J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 10): p. 1977-84.
 124. Dino Rockel, T. and A. von Mikecz, *Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization.* J Struct Biol, 2002. **140**(1-3): p. 189-99.
 125. Thrower, J.S., et al., *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal.* EMBO J, 2000. **19**(1): p. 94-102.
 126. Kravtsova-Ivantsiv, Y., S. Cohen, and A. Ciechanover, *Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF-kappaB precursor.* Mol Cell, 2009. **33**(4): p. 496-504.
 127. Boutet, S.C., et al., *Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors.* Cell, 2007. **130**(2): p. 349-62.
 128. Rott, R., et al., *alpha-Synuclein fate is determined by USP9X-regulated monoubiquitination.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(46): p. 18666-71.
 129. 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.
 130. 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.
 131. Navarro-Lerida, I., et al., *Rac1 nucleocytoplasmic shuttling drives nuclear shape changes and tumor invasion.* Dev Cell, 2015. **32**(3): p. 318-34.
 132. Velez-Aguilera, G., et al., *Control of nuclear beta-dystroglycan content is crucial for the maintenance of nuclear envelope integrity and function.* Biochim Biophys Acta, 2018. **1865**(2): p. 406-420.