



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

**“Impacto de la ausencia de β -dístroglicano sobre las
funciones de emerina”**

Tesis que presenta:

Q.F.B. Jesús Mauricio Ernesto Hernández Méndez

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

En la especialidad de:

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. Jaime García Mena

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Durante la realización del mismo, el estudiante Jesús Mauricio Ernesto Hernández Méndez fue apoyado como becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de registro de CVU 701467.

DEDICATORIA

A mis padres, Jesús Guadalupe Hernández Gutiérrez (Q.E.P.D.) y Arcenia Méndez Camacho, por brindarme su apoyo que fue sumamente importante para mi desarrollo personal y profesional, los quiero infinitamente.

A mi abuelita, Delfina Camacho Camacho, por darme todo su amor y cariño, te quiero muchísimo.

A mis tíos, Miguel Zavala, Elia Méndez, Urbanita Méndez, Olga Méndez, Rene Ortíz, María Elisa Hernández y Genaro Méndez, por apoyarnos a mi mamá y a mí en todo, sé que podremos contar con ustedes y sin lugar a duda, ustedes podrán contar con nosotros en todo. Los quiero mucho.

A mis primos, Paty, Luis Javier, Alejandra, Lucy, Marcela, René, Alonso, Luis Antonio y Genaro, por brindarme todo su cariño y apoyo, darme consejos y escucharme en todo lo que necesité, los quiero mucho, siempre estaré para ustedes.

A mis sobrinos, Ana Patricia, Aylin, Abril, Manuel, Mercedes y Mateo, porque a pesar de que los moleste siempre saben que los quiero mucho, no olviden esforzarse para cumplir sus metas y poder salir adelante.

Al resto de mi familia, por apoyarme en todo lo que me propuse y por ayudarme a cumplir mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jaime García Mena, por elegirme como su alumno, por sus consejos, y por guiarme a lo largo de la maestría.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega, por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo, por todos los consejos, y sobre todo por lo más importante, los regaños, que son vitales para mejorar en todos los aspectos.

Al Dr. José Efraín Garrido Guerrero, por sus asesorías, sugerencias y comentarios para el desarrollo de este trabajo.

A la M.C. Wendy Lilián Gómez Monsiváis, por ser mi mentora en el laboratorio, por ayudarme y por ser paciente conmigo, sin tu apoyo nada hubiera sido posible.

Al biólogo Jesús Pablo Gómez Islas, a Víctor Tapia y a Verónica Tapia, por su valioso apoyo técnico, que fueron sumamente importantes para el desarrollo del presente trabajo.

A mis compañeros de generación: Carlos, Alex Ramírez, Fabi, Esteban, Rubén, Pech, Kar, Evelyn, Sergio, Pablo, Mateo, Honorio, Cuervo, María Elena, etc., porque sin su compañía los cursos hubieran sido de lo más tediosos y aburridos, los aprecio mucho.

A mis compañeros de laboratorio: Elianeth, Ari, JDD, Pau, Gris, Ian, Nely, Iván, Chano, Adriana, Elizabeth y Ricardo, por su apoyo, dado que ayudaron directa e indirectamente al desarrollo de este trabajo.

A mis amigos del CINVESTAV: Alex González, Mayram, Sandy, César, Lalo, Rodrigo, Pablo, Salma, Isis, Ulises, Rosario, Karen, Marilyn, Cristi, por su apoyo, consejos y sin lugar a dudas por todas las fiestas que disminuían el estrés que produce el trabajo en el laboratorio, los quiero mucho.

CONTENIDO

Resumen.....	7
Abstract.....	8
1. Introducción.....	9
1.1 El Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC).....	9
1.2 Los Distroglicanos.....	10
1.3 El β -distroglicano nuclear	12
1.4 La envoltura nuclear.....	13
1.5 La emerina.....	14
2. Antecedentes.....	17
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	24
5. Objetivos.....	25
5.1 General.....	25
5.2 Específicos.....	25
6. Modelo de estudio.....	26
7. Estrategia experimental.....	27
Objetivo 1.....	27
Objetivo 2.....	28
Objetivo 3.....	29
8. Materiales y métodos.....	30
8.1 Cultivo celular.....	30
8.2 Extracción de proteínas totales.....	30
8.3 Cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford.....	30
8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE).....	31
8.5 Inmunodetección en fase sólida.....	31
8.6 Inmunofluorescencia indirecta.....	32
8.7 Doble inmunofluorescencia indirecta.....	33
8.8 Bacterias competentes.....	34
8.9 Extracción de DNA plasmídico a gran escala (midiprep).....	34
8.10 Transfección de células C2C12.....	35
9. Resultados.....	36

9.1 Caracterización de las células nulas para Distroglicano (KO-DG1).....	36
9.2 Distribución subcelular y expresión de emerina en células KO-DG1.....	36
9.3 Análisis de las funciones de emerina en las células KO-DG1.....	38
10. Discusión.....	43
11. Conclusiones.....	45
12. Perspectivas.....	45
13. Referencias bibliográficas.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo del complejo DAPC.....	9
Figura 2. Dominios del β -dystroglicano (β -DG).....	12
Figura 3. Esquema de la envoltura nuclear.....	14
Figura 4. Interacción de emerina con la cromatina.....	15
Figura 5. Co-localización del β -DG con emerina.....	17
Figura 6. Interacción <i>in vivo</i> del β -DG con proteínas de envoltura nuclear.....	18
Figura 7. Interacción directa del β -DG con la emerina.....	18
Figura 8. La disminución del β -DG altera la distribución de la emerina.....	19
Figura 9. Interacción del dominio transmembranal de β -DG (TM β DG) con la emerina.....	20
Figura 10. Interacción del TM del β DG con la emerina en células vivas.....	21
Figura 11. La deficiencia de β -DG afecta funciones asociadas a la envoltura nuclear.....	22
Figura 12. Componentes del sistema CRISPR-Cas9.....	23
Figura 13. Las células KO-DG1 no expresan al β -DG.....	36
Figura 14. Las células KO-DG1 exhiben disminución en la señal de fluorescencia correspondiente a emerina.....	37
Figura 15. Disminución significativa en los niveles de emerina en las células KO-DG1.....	38
Figura 16. Las células KO-DG1 presentan núcleos deformes.....	39
Figura 17. Las células KO-DG1 presentan valores de morfometría nuclear significativamente diferente a las células silvestres.....	40
Figura 18. Los centrosomas de las células KO-DG1 están anormalmente separados de la membrana nuclear.....	41
Figura 19. Las células KO-DG1 contienen un número anormal de centrosomas.....	42

RESUMEN

El β -dístroglicano (β -DG) es una proteína de membrana plasmática que pertenece al Complejo de Proteínas Asociadas a Dístrofina (DAPC, por sus siglas en inglés). Previamente nuestro grupo de trabajo demostró que el β -DG se trasporta al núcleo mediante el reconocimiento de su Señal de Localización Nuclear (NLS, por sus siglas en inglés), por el sistema de importinas $\alpha 2/\beta 1$. El β -DG nuclear está involucrado en el mantenimiento de la estructura del núcleo mediante su interacción con la emerina y las láminas A/C y B1. La emerina es una proteína de membrana nuclear interna involucrada en la morfología nuclear, la miogénesis y la proliferación celular. En este estudio, analizamos el impacto de la deficiencia del β -DG sobre las funciones de emerina, utilizando una clona de la línea muscular de ratón C2C12 nula para la expresión del β -DG, la cual se obtuvo mediante el sistema CRISPR-Cas9. En este estudio demostramos mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta y western blot que la ausencia del β -DG provoca la deslocalización de la emerina de la membrana nuclear interna hacia el nucleoplasma y la disminución de sus niveles proteicos, respectivamente. Así mismo observamos que las células nulas para el β -DG contienen núcleos con morfología aberrante y centrosomas separados de la envoltura nuclear y en un número anormalmente alto. En su conjunto nuestros resultados sugieren que el β -DG ayuda a mantener la localización de la emerina en la envoltura nuclear y de esta manera mantiene la estabilidad de esta proteína y su correcto funcionamiento.

ABSTRACT

β -dystroglycan (β -DG) is a plasma membrane protein that belongs to the Dystrophin-Associated Protein Complex (DAPC). Previously, our working group demonstrated that the β -DG is transported to the nucleus through the recognition of its nuclear localization signal (NLS), by the importins system $\alpha 2/\beta 1$. Nuclear β -DG is involved in the maintenance of nuclear envelope structure through its interaction with emerin and lamins A/C and B1. Emerin is an inner nuclear membrane protein involved in nuclear morphology, myogenesis and cell proliferation. In this study, we analyzed the impact of the deficiency of the DG-system on emerin function, using a CRISPR-Cas9 system. We demonstrated by indirect immunofluorescence and western blot assays that the absence of β -DG caused de delocalization of emerin of the inner nuclear membrane towards the nucleus and the decrease of its protein levels, respectively. We also observe that the cells are for the nucleus β DG-contains nuclei with aberrant morphology and centrosomes separated from the nuclear envelope and in an abnormally high number. As a whole, our results suggest that β -DG helps to maintain the localization of the emerin in the nuclear envelope and, in this way, maintains stability and proper functioning.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC)

Las proteínas que se asocian a la Distrofina forman un complejo denominado DAPC (*Dystrophin Associated Protein Complex*, por sus siglas en inglés), compuesto por proteínas citoplasmáticas (α -distrobrevina, α 1- y β 1-sintrofinas y nNOS), proteínas transmembranales (β -dístroglicano, α -, β -, γ -, y δ -sarcoglicanos, caveloína 3 y sarcospan) y proteínas extracelulares (α -dístroglicano y laminina). El complejo DAPC es crítico para la integridad de las fibras musculares, dado que permite la comunicación entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, dando así estabilidad al sarcolema (Michele & Campbell, 2003; Davies & Nowak, 2006; Haenggi & Fritschy, 2006; Sciandra, *et al*, 2007; González-Ramírez, *et al*, 2008, Bozzi, *et al*, 2009). (Fig. 1)

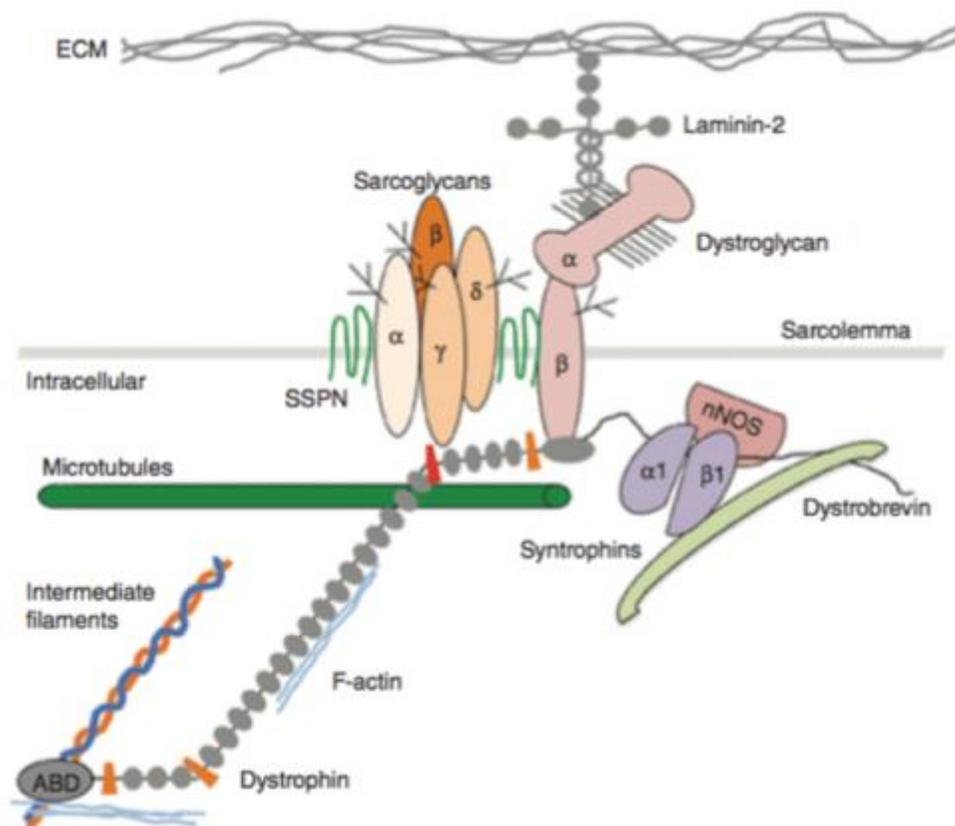


Figura 1. Modelo del complejo DAPC (modificado de Gao & MacNally, 2015).

La integridad de los componentes del DAPC es fundamental para la estabilidad estructural de las fibras musculares, ya que les confiere protección durante la contracción y relajación muscular (Sciandra, *et al*, 2007). Se cree que el DAPC puede participar en la señalización transmembranal debido a que algunos mecanismos de muerte celular se deben a mutaciones en los genes que codifican para las proteínas del DAPC, lo cual está relacionado con la interrupción de algunas vías de sobrevivencia celular y mecanismos de defensa (Langenbach & Rando, 2002). Se ha encontrado que algunos miembros del DAPC se asocian con moléculas con dominios SH3, como Grb2 (Russo, *et al*, 2000; Oak, *et al*, 2001) y moléculas con dominios PDZ, como la sintetasa del óxido nítrico neural, nNOS, (Brenman, *et al*, 1995).

La distrofina está codificada por el gen *DMD*, el cual al sufrir mutaciones causa Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). La pérdida de la función de la distrofina provoca desestabilización del DAPC, lo que a su vez daña la integridad del sarcolema durante la contracción muscular. La distrofina comunica el citoesqueleto con la matriz extracelular mediante su unión con la actina y los distroglicanos; el α -distroglicano interacciona con las proteínas de matriz extracelular agrina y laminina, proporcionando así estabilidad al sarcolema (Darras, *et al*, 1988; Ibraghimov-Beskrovnaya, *et al*, 1992; González-Ramírez, *et al*, 2008).

1.2 Los distroglicanos

El distroglicano es el componente principal del DAPC, es un receptor de membrana que une la matriz extracelular con el citoesqueleto, es codificado por el gen *DAG1* localizado en el cromosoma 3p21. Este gen da lugar a un transcrito de 5.8 kb, que genera un pro-péptido de 97 kDa constituido por 895 residuos aminoácidos (Sciandra, *et al*, 2007). Dicho pro-péptido sufre un corte proteolítico en la serina 654 para originar dos subunidades: el α -distroglicano, una glicoproteína periférica extracelular y el β -distroglicano, una glicoproteína integral de membrana; ambas proteínas permanecen unidas entre sí de forma no covalente en el sarcolema (Henry

& Campbell, 1996; Di Stasio, *et al*, 1999; Winder, 2001; Barresi & Campbell, 2006; Bozzi, *et al*, 2009).

El β -dístroglicano (β -DG) es una proteína de 43 kDa, que interacciona extracelularmente con el α -DG e intracelularmente con la distrofina, la cual a su vez interacciona con el citoesqueleto de actina (Barresi & Campbell, 2006; Bozzi, *et al*, 2009). El β -DG está constituido por un dominio amino-terminal extracelular que comprende los aminoácidos 654-751, un dominio transmembranal que comprende los aminoácidos 752-777 y un dominio carboxilo-terminal citoplasmático que comprende los aminoácidos 778-895. En el dominio C-terminal se localiza la secuencia de localización nuclear (NLS), que permite su importación al núcleo a través de las importinas (Lara-Chacón, *et al*, 2010) y que además interacciona con ezrina para mediar la remodelación del citoesqueleto e inducir la formación de filopodias y microvellosidades (Spence, *et al*, 2004; Batchelor, *et al*, 2007); y el motivo PPxY, mediante el cual se asocia directamente con proteínas que contienen el dominio WW, como la distrofina y la utrofina (Chung & Campbell, 1999) (**Fig. 2**). La participación de β -DG en la adhesión depende de su fosforilación en la tirosina 492 por medio de cinasas de la familia Src (James, *et al*, 2000; Ilesley, *et al*, 2001; Sotgia, *et al*, 2001). Además, mediante su interacción con las integrinas, el β -DG está implicado en la dinámica de las adhesiones celulares en mioblastos: modulando su anclaje, motilidad y migración (Moore & Winder, 2010; Thompson *et al*, 2010).

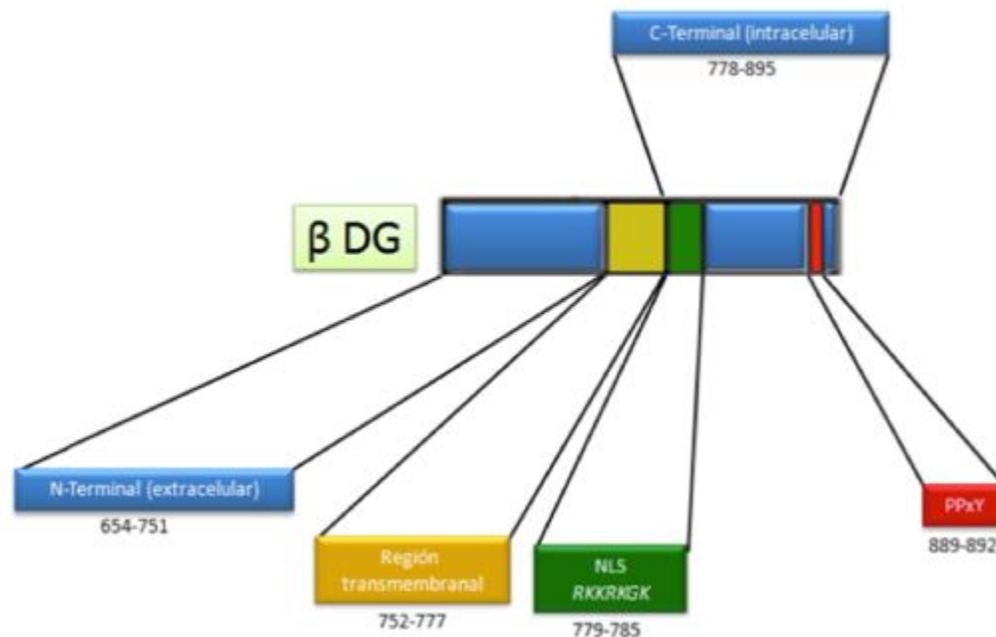


Figura 2. Dominios del β -distroglicano (Hernández José, tesis de maestría, 2008).

1.3 El β -distroglicano nuclear

Como se mencionó en el apartado anterior, el β -DG posee una señal de localización nuclear (NLS) en su extremo C-terminal, que medía su ingreso al núcleo dependiente de importinas (Lara-Chacón, *et al*, 2010). Hace algunos años nuestro grupo de investigación reportó la presencia de β -distroglicano en el núcleo de diferentes líneas celulares, incluyendo las células HeLa (Fuentes-Mera, *et al*, 2006), C2C12 (González-Ramírez, *et al*, 2008) y PC12 (Villarreal-Silva, *et al*, 2010). Además, se reportó que el β -distroglicano forma un complejo DAPC en el núcleo de células HeLa, con la distrofina, el β -sarcoglicano, las sintrofinas α y β , las distrobrevinas $\alpha 1$ y β , y nNOS (Fuentes-Mera, *et al*, 2006).

Mediante ensayos de inmunofluorescencia acoplada a microscopía confocal en células C2C12 se demostró que el β -distroglicano co-localiza con proteínas de la envoltura nuclear, como la lámina A/C, la lámina B1 y la emerina, así como con proteínas marcadoras de cuerpos de Cajal (p80-coilina), cuerpos de *splicing* (SC35) y nucléolos (Nopp140). Además, mediante ensayos de inmunoprecipitación con

extractos de proteínas nucleares se confirmó la asociación de β -DG con las proteínas mencionadas arriba, lo que confirma que el β -DG también reside en la envoltura nuclear y los nucléolos. Asimismo, la disminución de la expresión de β -DG, mediante el uso de un siRNA (*small interference RNA*, por sus siglas en inglés) dirigido contra su mRNA afecta los niveles proteicos de emerina, lámina B1 y Nopp140 (Martínez-Vieyra, *et al*, 2013), lo que indica que la interacción del β -DG con estas proteínas es funcionalmente relevante para estos compartimentos nucleares.

1.4 La envoltura nuclear

La envoltura nuclear es un compartimento localizado en la periferia nuclear que permite la comunicación entre el núcleo y el citoplasma. Se compone de las membranas nucleares externa e interna, los complejos de poros nucleares (NPCs) y la lámina nuclear. La comunicación molecular entre los dos compartimentos se lleva a cabo exclusivamente por los NPCs. La membrana nuclear externa es una continuación del retículo endoplásmico y la membrana nuclear interna está separada de la externa por un espacio perinuclear (Gerace & Huber, 2012). La lámina nuclear es una red filamentosa compuesta por las láminas de tipo A y B, y se localiza en la parte interna de la membrana nuclear interna (Aebi, *et al*, 1986; Goldman, *et al*, 1986; McKeon, *et al*, 1986; Dechat, *et al*, 2008). La lámina nuclear se une con proteínas de la membrana interna, las que a su vez se asocian con la cromatina; el conjunto de estas interacciones da estabilidad a la envoltura nuclear (Fiserova & Goldberg, 2010) (**Fig. 3**).

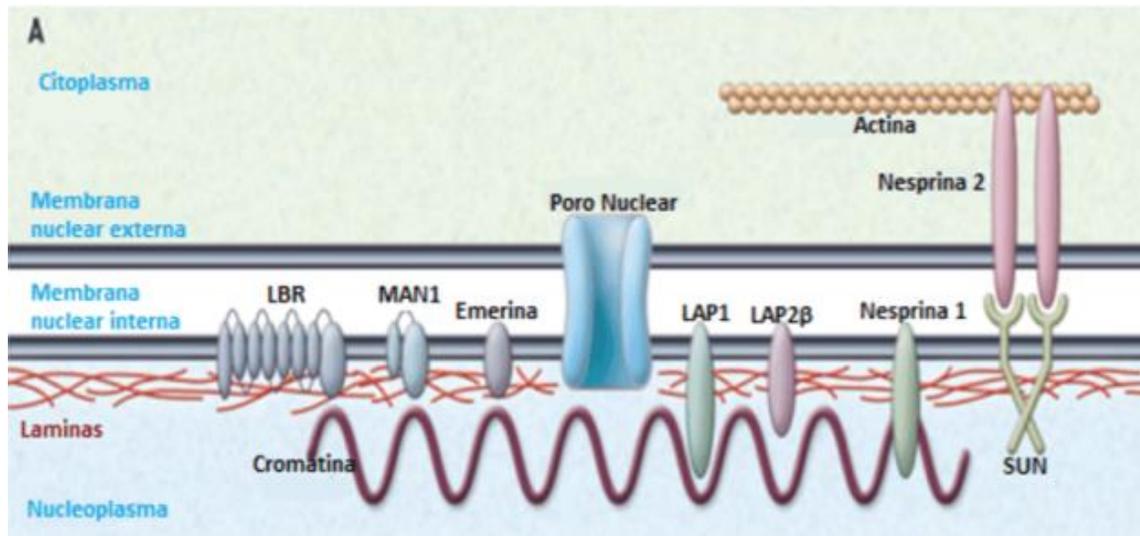


Figura 3. Esquema de la envoltura nuclear (modificado de Howard, J. *et al*, 2009).

1.5 La emerina

La emerina es una proteína integral de membrana nuclear interna codificada por el gen *EMD*, que consiste de 6 exones y 5 intrones y se localiza en el cromosoma X. La emerina pesa 34 kDa (Manilal, *et al*, 1996; Bengtsson & Wilson, 2004), y está compuesta por 254 aminoácidos, de los cuales los primeros 220 forman el dominio amino terminal, enseguida se localizan 23 aminoácidos que forman el dominio transmembranal y 11 aminoácidos que forman el dominio carboxilo terminal (Ellis, *et al*, 1998; Ostlund, *et al*, 1999). Esta proteína pertenece a la familia de las proteínas nucleares con dominio LEM (llamado así por la letra inicial de las tres proteínas que contienen este dominio: LAP-Emerina-MAN), dicho dominio que consta de aproximadamente 40 residuos aminoacídicos se une a BAF (*Barrier-to-autointegration factor*), la que a su vez interactúa con la cromatina para formar una unión física entre la envoltura nuclear y la cromatina (**Fig. 4**) (Bengtsson & Wilson, 2004; Holaska & Wilson, 2006; Wagner & Krohne, 2007). La emerina se une con una serie de reguladores transcripcionales, incluyendo GCL (Holaska, 2002), Btf (Haraguchi, 2004), Lmo7 (Holaska, *et al*, 2006), β -catenina (Markiewicz, *et al*, 2006) y BAF (Lee, *et al*, 2001), para modular la expresión de sus genes blanco. La emerina también se une al factor de empalme YT521-B (Wilkinson, *et al*, 2003). Dentro de su papel de apoyo en la regulación de la expresión génica, se ha demostrado que la

emerina regula genes de músculo esquelético y cardíaco (Bakay, *et al*, 2006; Melcon, *et al*, 2006; Koch & Holaska, 2012).

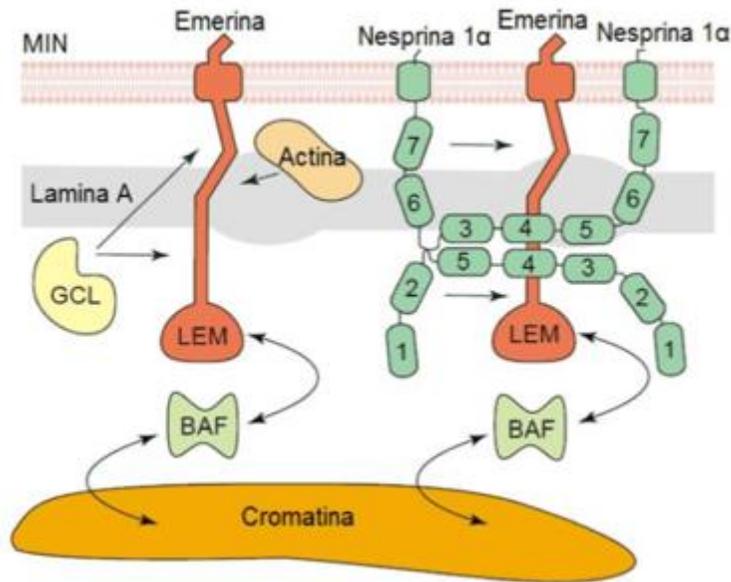


Figura 4. Interacción de la emerina con la cromatina. La emerina interactúa con la cromatina mediante la unión de su dominio LEM con el factor BAF (modificado de Bengtsson & Wilson, 2004).

Se ha demostrado que la emerina se une con las láminas de tipo A y B, las cuales están ancladas a la membrana nuclear interna (Manilal, 1998; Clements, 2000); además, se ha observado que la ausencia de la lámina A deslocaliza la emerina, cambiando su ubicación de la membrana nuclear interna al citoplasma y retículo endoplásmico (Sullivan, *et al*, 1999). La emerina tiene la capacidad de interactuar con la actina nuclear, la cual es importante para la arquitectura nuclear. Se ha observado que una mutación puntual en la emerina (Q133H) es suficiente para que se pierda su interacción con actina y causar EDMD (Holaska, *et al*, 2004), por lo que se considera que la pérdida de asociación es parte del mecanismo molecular que conlleva al desarrollo de EDMD (Holaska & Wilson, 2006). Otra proteína del núcleo-esqueleto con la que posiblemente interactúa emerina, es la espectrina, lo que indica que la emerina podría estar anclando a la red de actina-espectrina en la membrana nuclear interna (Holaska, *et al*, 2004).

La distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD, por sus siglas en inglés *Emery-Dreifuss Muscular Muscular Dystrophy*) es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X que se origina por mutaciones del gen *EMD*; mientras que la variante de la EDMD que se hereda de forma autosómica dominante se presenta debido a mutaciones en el gen *LMNA*, el cual codifica para las láminas A/C (Bione, *et al*, 1994; Bonne, *et al*, 1999). La EDMD se caracteriza por contracturas tempranas en codos, tendón de Aquiles y músculos poscervicales, atrofia y debilidad muscular progresiva y fallas cardíacas, que conllevan a una muerte temprana (Emery & Dreifuss, 1966; Emery, 1989; Bione, *et al*, 1994).

La proteína de membrana nuclear interna MAN1 presenta regiones homólogas a las de emerina, incluyendo el dominio LEM, por lo que al igual que emerina puede unirse con BAF y a reguladores transcripcionales como Btf y GCL. Además, se ha comprobado que MAN1 y emerina interaccionan (Mansharamani & Wilson, 2005), lo que sugiere que podrían formar un complejo funcional *in vivo*.

Interesantemente se ha encontrado que la proteína 4.1 que pesa ~80 kDa, es crucial para estabilizar las interacciones espectrina-actina y permitir así la unión del citoesqueleto con la membrana plasmática en los eritrocitos. Defectos en esta proteína alteran la forma de los eritrocitos. Mediante co-inmunoprecipitación se comprobó que 4.1R co-localiza parcialmente con emerina en fibroblastos humanos y murinos y que células deficientes en la expresión de 4.1R presentan una morfología nuclear alterada. Con lo cual se concluye que la interacción emerina-4.1R es de vital importancia para la morfología nuclear (Meyer, *et al*, 2011).

2. ANTECEDENTES

El β -dístroglicano (β -DG) es una proteína de membrana plasmática; sin embargo, en nuestro grupo de trabajo se encontró en el núcleo de diferentes líneas celulares, entre ellas las células HeLa (Fuentes-Mera, *et al*, 2006), C2C12 (González-Ramírez, *et al*, 2008) y PC12 (Villareal-Silva, *et al*, 2010). Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta que el β -dístroglicano co-localiza con la emerina en la envoltura nuclear de las células C2C12 (Martínez-Vieyra, *et al*, 2013) (**Fig. 5**).

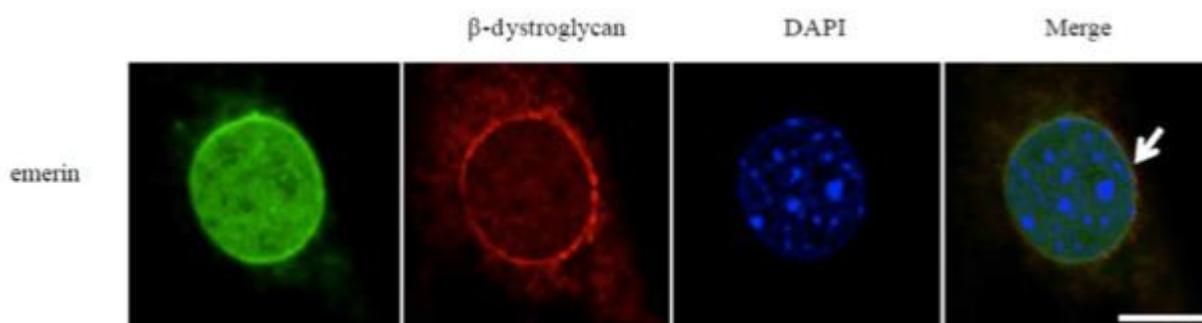


Figura 5. Co-localización de β -dístroglicano con emerina. Las células C2C12 fueron fijadas sobre cubreobjetos de vidrio y se sometieron a una doble tinción para visualizar el β -DG (rojo) y la emerina (verde). Las células se contra-tiñeron con DAPI (azul) para la observación de los núcleos y las preparaciones se analizaron por microscopía confocal. El β -dístroglicano se detectó en el citoplasma y en la envoltura nuclear, donde co-localiza con emerina (flechas). Escala 5 μ m.

Para demostrar si estas dos proteínas interaccionan en células vivas, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo dirigido contra el β -dístroglicano. Las proteínas de envoltura nuclear lámina A/C, lámina B1 y emerina co-inmunoprecipitan con β -dístroglicano (**Fig. 6A**), mientras que los inmunoprecipitados obtenidos con los anticuerpos dirigidos contra lámina B1, lámina A/C y emerina también contienen al β -dístroglicano (**Fig. 6B**) (Martínez-Vieyra, *et al*, 2013). En conclusión, estos resultados indican que el β -dístroglicano se asocia con diferentes proteínas de envoltura nuclear.

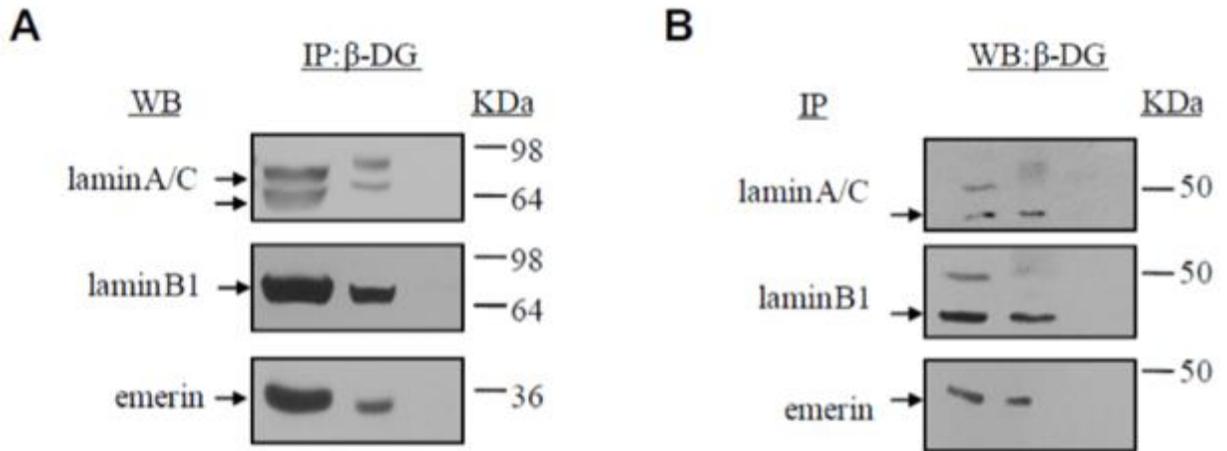
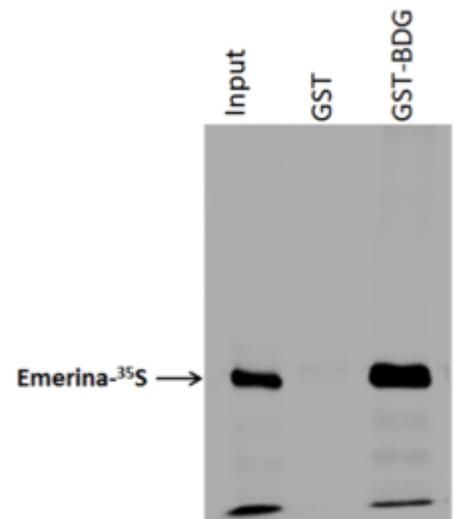


Figura 6. Interacción *in vivo* de β -dístroglicano con proteínas de envoltura nuclear. (A) Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación usando extractos nucleares de células C2C12 y anticuerpos dirigidos contra β -dístroglicano; las proteínas inmunoprecipitadas se revelaron mediante inmunodetección en fase sólida con anticuerpos dirigidos contra la lámina A/C, la lámina B1 o emerina. (B) De manera complementaria, se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos contra las proteínas de envoltura nuclear y se revelaron con un anticuerpo anti- β -dístroglicano.

Con la finalidad de comprobar si la interacción entre el β -dístroglicano y la emerina es directa se realizaron ensayos de interacción *in vitro*, utilizando un sistema bacteriano para producir el β -dístroglicano unido a la enzima glutatión S-transferasa (GST) y un sistema de transcripción-traducción libre de células para sintetizar emerina. Mediante ensayos *pull down* se evidenció que estas proteínas interactúan directamente (Azura-Medina, resultados no publicados) (**Fig. 7**).

Figura 7. Interacción directa del β -dístroglicano con la emerina. Se realizaron ensayos *pull down* empleando la proteína de fusión GST- β -DG y la emerina generada en un sistema de transcripción-traducción libre de células. Se utilizaron los vectores pGEX-4T1 y pSG5 para la generación de GST- β DG y emerina- S^{35} respectivamente. La autorradiografía muestra la interacción de emerina con GST- β DG, pero no con GST sola. El carril marcado como input corresponde al 10% de la emerina utilizada en los ensayos de *pull down*.



Con el propósito de evidenciar si la interacción del β -dístroglicano con la emerina es biológicamente relevante, se utilizó un RNA interferente (RNAi) dirigido contra el mRNA del β -DG y se analizó el efecto de la disminución de la expresión del β -DG sobre la localización y niveles de emerina en las células C2C12. Las figuras 8A y B muestran que el tratamiento con el RNAi disminuyó los niveles proteicos de β -DG, no así con el RNA interferente irrelevante. En la figura 8C se observa que las células deficientes en la expresión del β -DG mostraron deslocalización de emerina de la envoltura nuclear, así como una baja señal de fluorescencia correspondiente a esta proteína (Martínez-Vieyra, *et al*, 2013) (**Fig. 8**). Estos resultados indican que el β -DG se requiere para la correcta localización de emerina en la membrana nuclear.

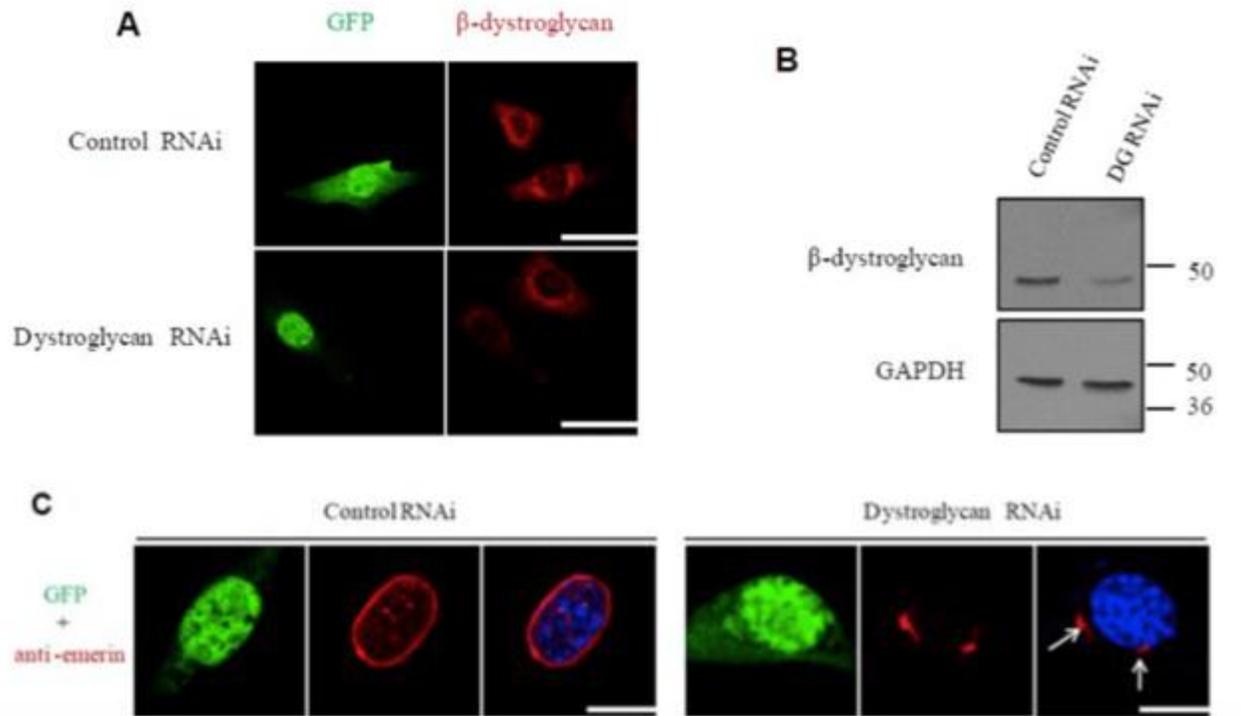


Figura 8. La disminución del β -DG altera la distribución de la emerina. Las células C2C12 fueron transfectadas con un vector que expresa un RNA interferente (RNAi) irrelevante o uno dirigido contra el mRNA del DG. (A) Después de 72 horas las células fueron inmunoteñidas con para observar el β -DG. Las células tratadas con el RNAi presentaron disminución en los niveles de fluorescencia del β -DG. (B) Por inmunodetección en fase sólida se observó la disminución de los niveles del β -DG en las células transfectadas con el RNAi contra DG. (C) Las células transfectadas fueron identificadas por la fluorescencia de GFP (verde); en las células control se observa la localización correcta de emerina, mientras que en las células knock-down para el β -DG se observa deslocalización de emerina hacia el citoplasma (flechas). Escala 5 μ m.

Con la finalidad de conocer que dominio del β -DG interacciona con emerina se realizaron ensayos tipo *pull down*, en donde se utilizaron construcciones que expresan los diferentes dominios del β -DG fusionados a GST, y posteriormente se pusieron a interactuar con emerina. De manera interesante se observó que tanto el β -DG completo como su dominio amino-terminal (NH β DG) interaccionan con la emerina, mientras que el dominio carboxilo-terminal (COO β DG) y GST sola no se le unen. Posteriormente, la región amino-terminal (NH β DG) se dividió en dos subdominios: el ectodominio y la región transmembranal, con la finalidad de delimitar la región específica del β -DG que media la interacción con la emerina. Se demostró que la interacción del β -DG con la emerina se da por medio de su dominio transmembranal (Gómez-Monsiváis, datos no publicados) (**Fig. 9**).

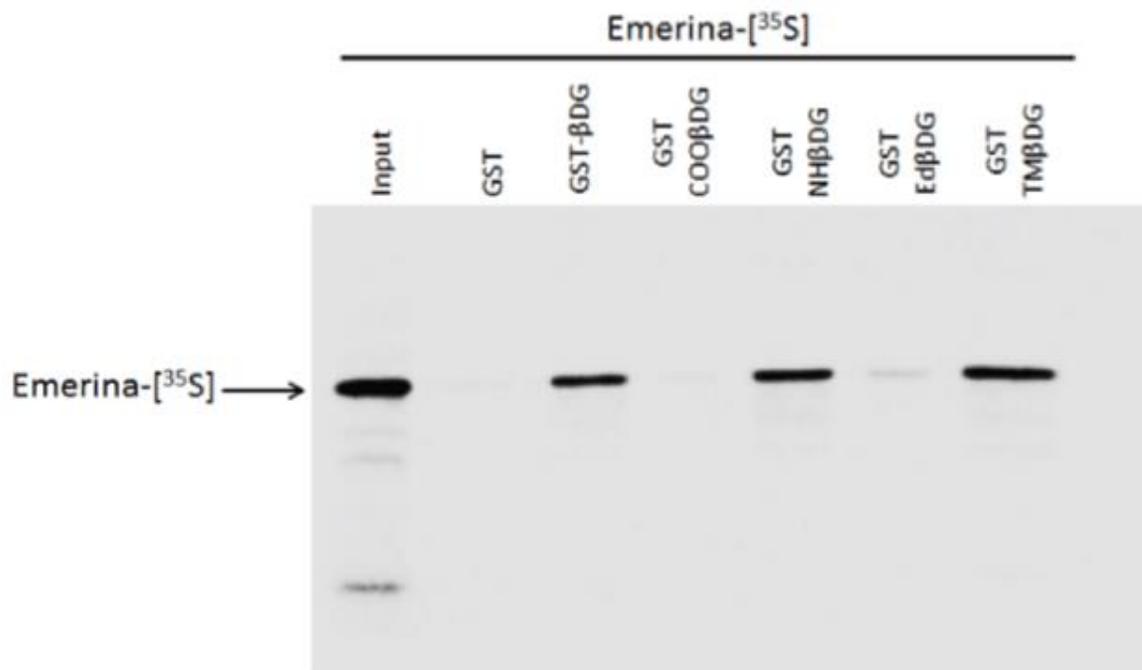


Figura 9. Interacción del dominio transmembranal de β -DG (TM β DG) con la emerina. En la autorradiografía se observa que la proteína recombinante TM β DG interacciona directamente con emerina. Como control negativo se utilizó GST, el input corresponde al 10% de la emerina utilizada para la interacción.

Posteriormente para corroborar si lo observado *in vitro* sucede también en células vivas, se realizaron ensayos de GFP-Trap. Los extractos de células C2C12 transfectadas con GFP, GFP-TMNLS o GFP-BDG se pusieron a interactuar con perlas de agarosa unidas a un anticuerpo que reconoce GFP; de esta manera se rescataron las proteínas celulares que se unen con las proteínas de fusión. Dada la ventaja de utilizar células intactas se mantiene el ambiente de membrana necesario para llevar a cabo esta interacción. Se observó que el GFP (control negativo) no se asocia con la emerina mientras que las proteínas de fusión GFP- β -DG (control positivo) y GFP-TMNLS β DG (dominio transmembranal del β -DG unido a GFP) si presentaron interacción (Gómez-Monsiváis, datos no publicados) (**Fig. 10**), indicando que dicho dominio es suficiente para la interacción con emerina.

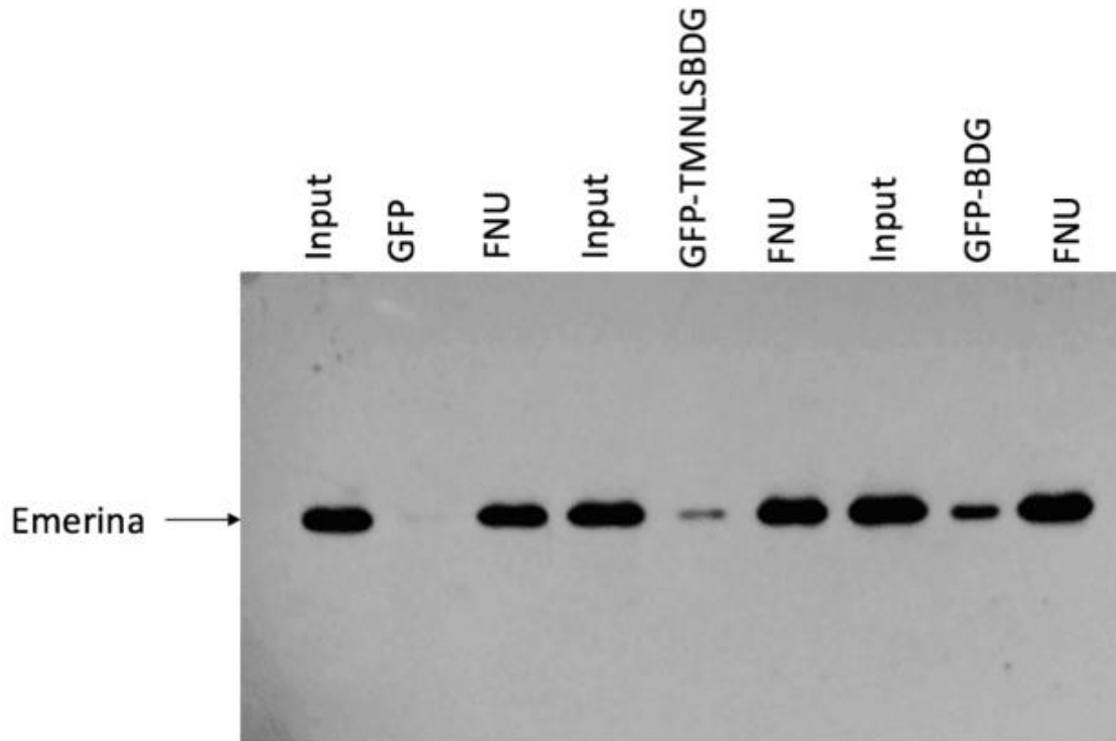


Figura 10. Interacción del dominio transmembranal del β -DG con la emerina en células vivas. Se llevaron a cabo ensayos tipo GFP-Trap utilizando extractos totales de células C2C12 transfectadas con GFP (control negativo), GFP-TMNLSBDG o GFP-BDG (control positivo). Los resultados indican que el dominio transmembranal del β -DG interacciona directamente con la emerina en células intactas. FNU (fracción no unida); input corresponde a un 10% del extracto total.

Una de las funciones que lleva a cabo emerina, es mantener la unión de los centrosomas a la membrana nuclear externa (Salpingidou, *et al*, 2007). Interesantemente, la disminución de los niveles de expresión del β -DG provoca un aumento en la distancia entre el centrosoma y la membrana nuclear externa (**Fig. 11**). Este resultado indica que existe una relación funcional entre la emerina y el β -DG y que esta última podría participar en diversos procesos realizados por la envoltura nuclear (Martínez-Vieyra, *et al*, 2013).

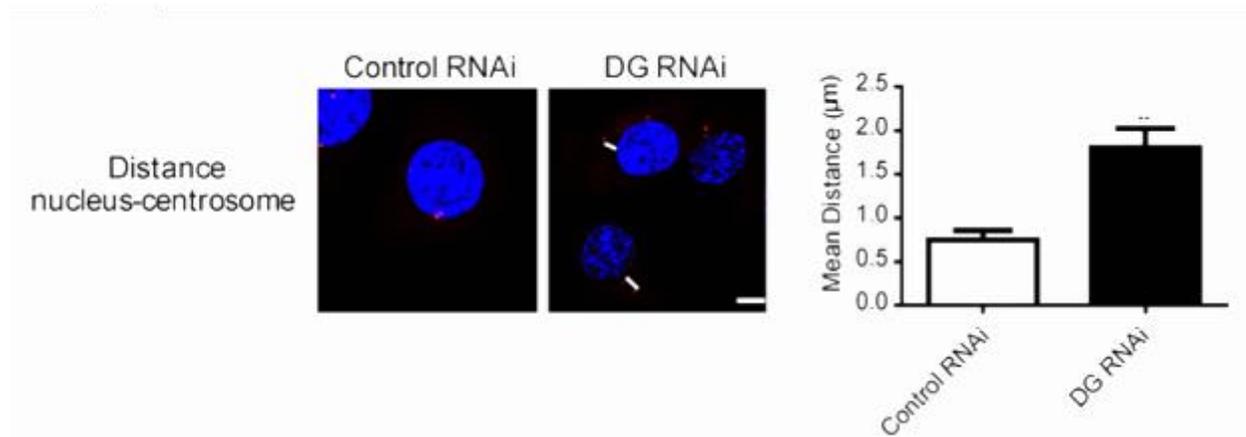


Figura 11. La deficiencia de β -DG afecta funciones asociadas a la envoltura nuclear. Las células se tiñeron con DAPI (azul) y con anti- γ -tubulina (rojo) para decorar los núcleos y los centrosomas respectivamente. Se muestra la posición del centrosoma en las células control y tratadas con el RNAi dirigido contra el DG. Las líneas blancas indican la distancia entre el núcleo y el centrosoma. La gráfica de la derecha muestra la media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes, en cada experimento se analizaron 200 células. La distancia entre el núcleo y el centrosoma aumenta en las células deficientes para el β -DG.

Con la finalidad de profundizar sobre las funciones del β -DG en el núcleo, nuestro laboratorio desarrollo una línea celular derivada de las células C2C12 que no expresa el gen *DAG1*. mediante el uso del sistema CRISPR-Cas (Mondragón-González, datos no publicados). Este sistema de edición genética consta de dos componentes: la nucleasa Cas9 y un RNA guía quimérico (sgRNA), que permite la introducción de rupturas específicas en el DNA de doble cadena (DSBs), lo que se aprovecha para la edición de genes específicos. La precisión de la nucleasa Cas9 se logra mediante la secuencia de 20 nucleótidos del protoespaciador del sgRNA, la cual reconoce el

sito blanco para el apareamiento posterior de las bases. La única restricción de este sistema es el requerimiento de un motivo (PAM) que debe estar adyacente al sitio de unión de la secuencia del protoespaciador guía con el sitio blanco (Nodvig, *et al*, 2015) (**Fig. 12**).

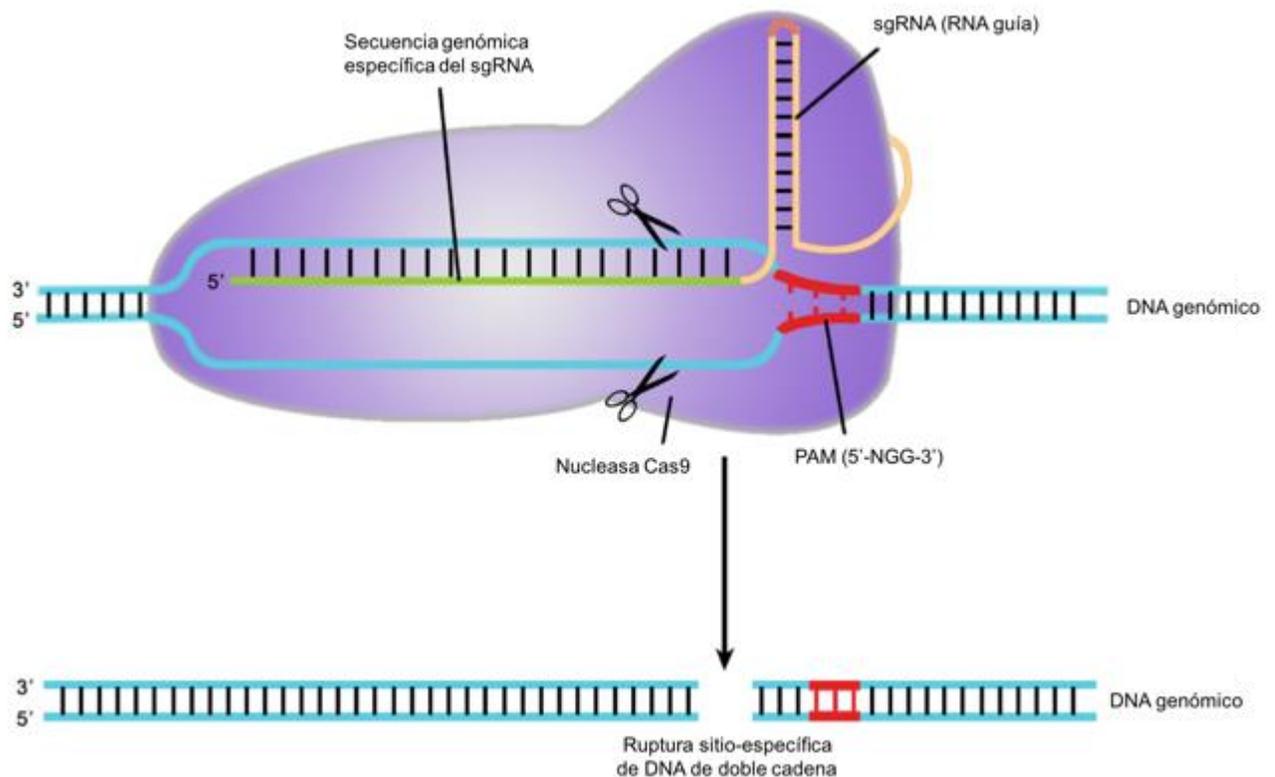


Figura 12. Componentes del sistema CRISPR-Cas9. La nucleasa Cas9 (representada en morado) guiada por el RNA guía quimérico (sgRNA) escinde específicamente una secuencia genómica blanco. Las secciones del protoespaciador y el andamio del sgRNA están representadas en verde y naranja, respectivamente. Las bases del protoespaciador se une a la cadena complementaria de la secuencia diana para formar un bucle (D-loop). La escisión eficiente depende de la presencia de la secuencia PAM de 3 pb en la secuencia blanco, la cual está situada río abajo de la región apareada al protoespaciador, representada en color rojo. La escisión de extremos romos ocurre entre las bases situadas entre 3 y 5 pb río arriba de la secuencia PAM, como se indica mediante las tijeras.

3. JUSTIFICACIÓN

Previamente se ha establecido que el β -DG interacciona con la emerina; por lo tanto, consideramos importante analizar la expresión, distribución subcelular y funciones de la emerina en células nulas para el Distroglicano.

4. HIPÓTESIS

La emerina requiere interactuar con β -distroglicano para ejercer sus funciones nucleares.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el impacto de la ausencia de β -dístroglicano sobre las funciones de emerina.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

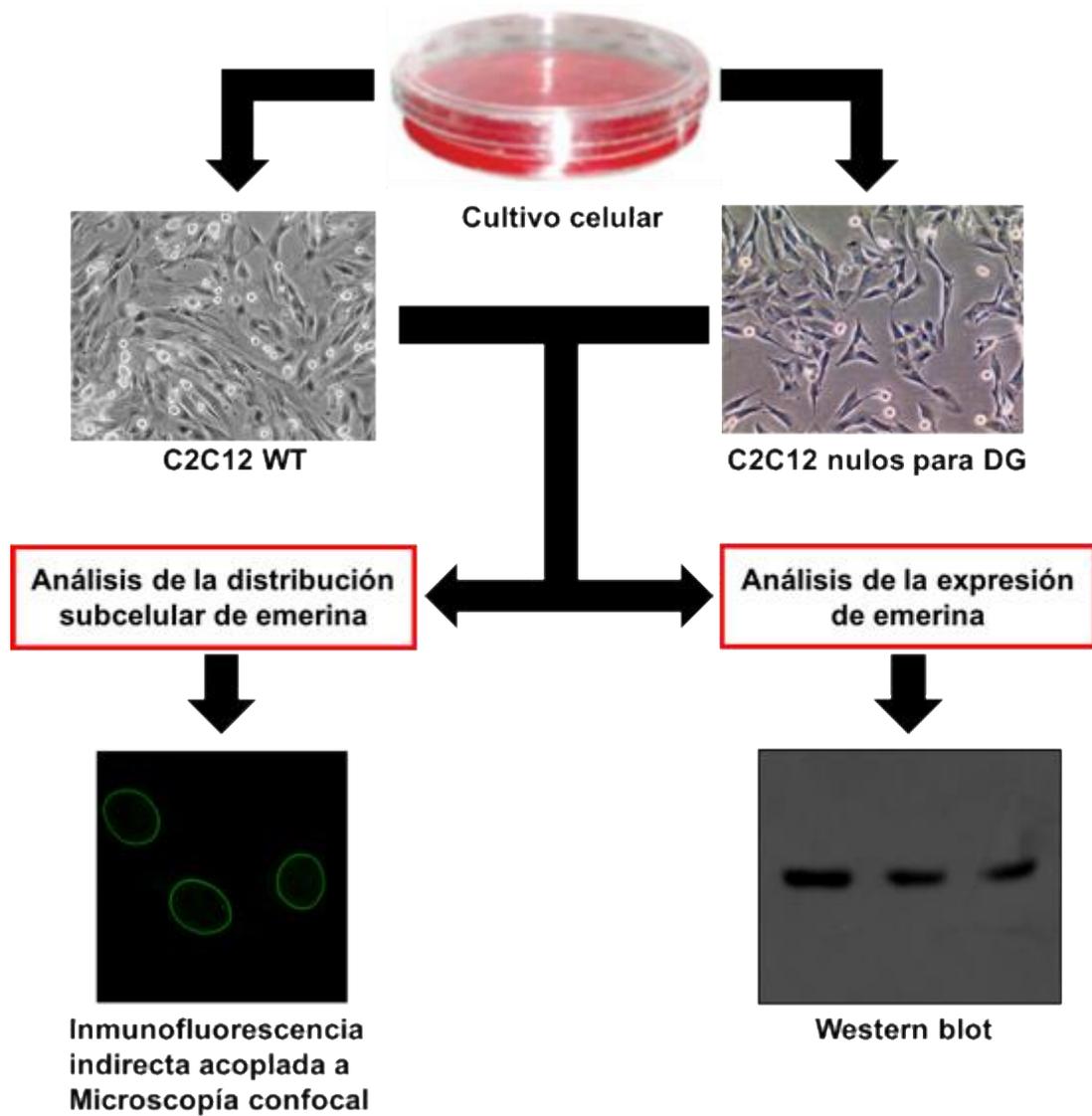
1. Analizar la expresión y distribución subcelular de la emerina en las células nulas para el dístroglicano.
2. Analizar las funciones de emerina en las células nulas para el dístroglicano.
3. Analizar si la expresión exógena del β -DG restablece las funciones de la emerina en las células nulas para el dístroglicano.

6. MODELO DE ESTUDIO

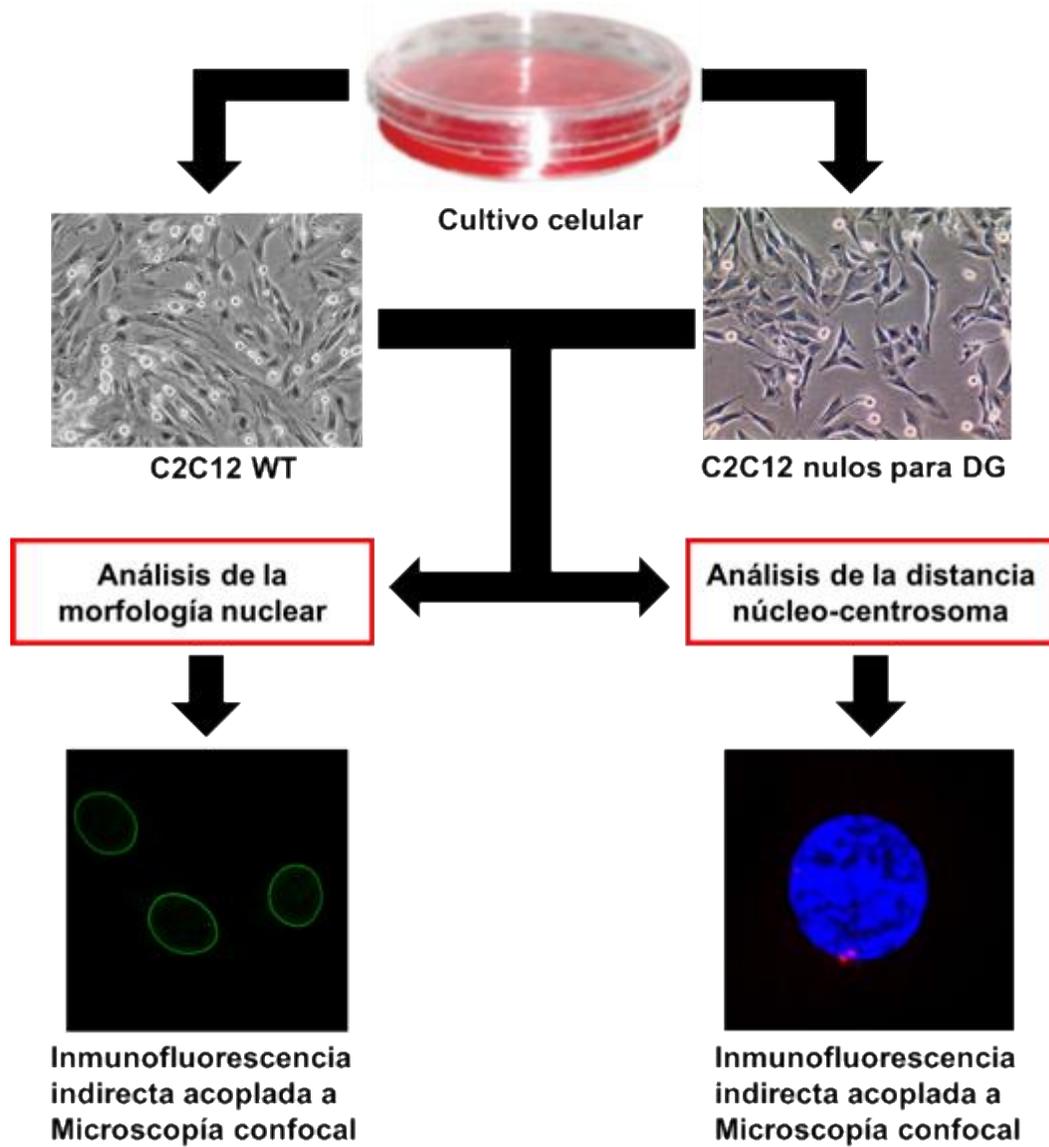
Se utilizó la línea de mioblastos de ratón C2C12, dado que las proteínas del Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina han sido ampliamente estudiadas en este modelo de estudio. Además, se utilizó una clona de la línea celular C2C12 que es nula para la expresión del distroglicano, la cual se generó mediante el sistema CRISPR-Cas9 (KO-DG1).

7. DIAGRAMA EXPERIMENTAL

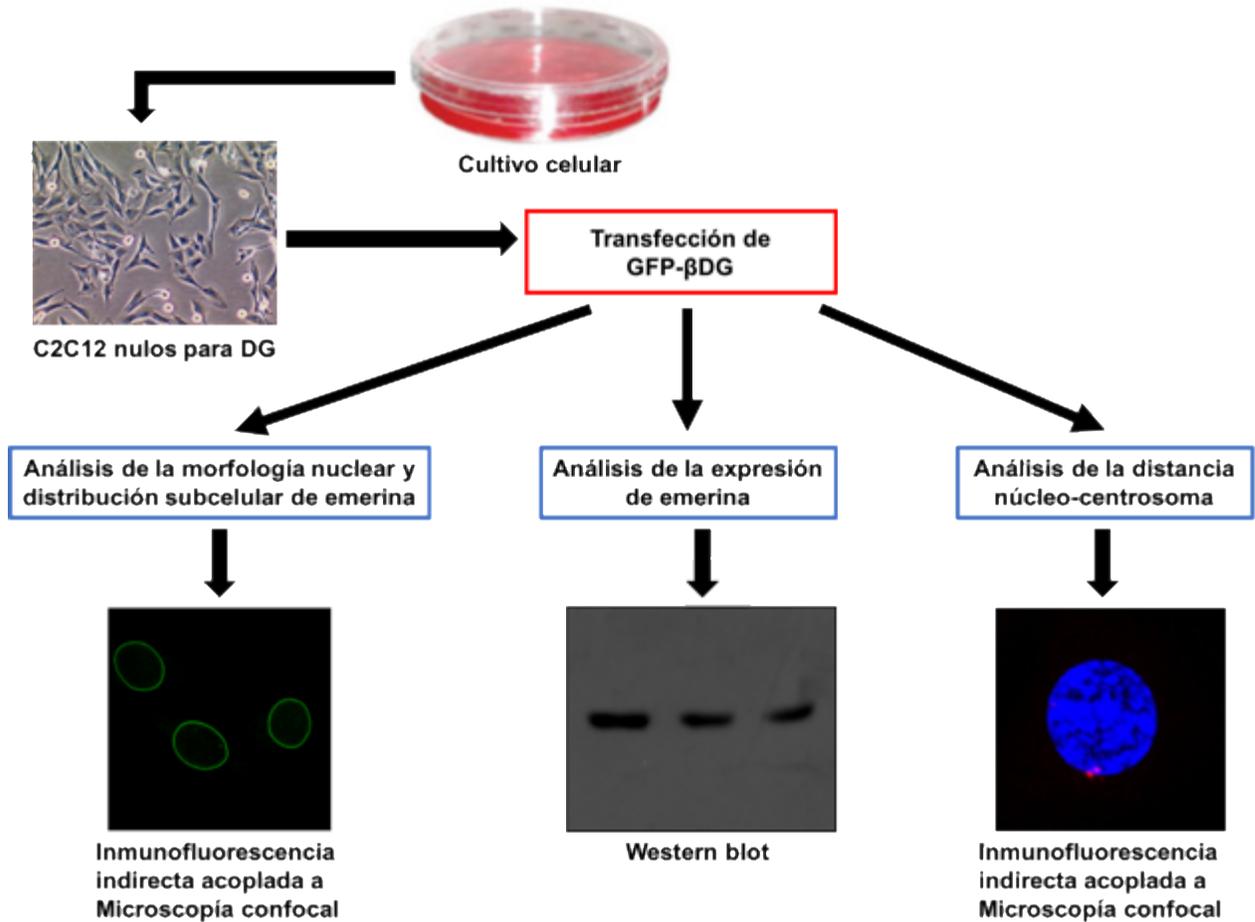
Objetivo 1. Analizar la expresión y distribución su celular de la emerina en las células nulas para el distroglicano.



Objetivo 2. Analizar las funciones de la emerina en las células nulas para el distroglicano.



Objetivo 3. Analizar si la expresión exógena del β -DG restablece las funciones de la emerina en las células nulas para el distroglicano.



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cultivo celular

Las células C2C12 se cultivaron en el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina; las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

8.2 Extracción de proteínas totales

Las células C2C12 sembradas en cajas de 60 mm a una confluencia de 80% se lavaron tres veces con 1 ml de PBS, se recolectaron con gendarme, se colocaron en un microtubo de 1.5 ml y la mezcla se centrifugó a 10'000 rpm por 5 minutos a 4°C; se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de la solución amortiguadora de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 0.38% de EGTA, 5 mM de EDTA, 1% de Tritón X-100, 0.1% de SDS, 2 mM de Na₃VO₄, 25 mM de NaF, 10 mM de Na₂MoO₄, 0.5% de C₂₄H₃₉NaO₄, 1 mM de PMSF y 1x del coctel de proteasas Complete-Roche®) y se dejó reposar 10 minutos en hielo. Para finalizar la lisis celular, se utilizó el sonicador Soniprep 150 (marca SANYO®) a 4 micrones durante 10 segundos 3 veces con descansos entre cada ciclo de 15 segundos. Para la eliminación de restos celulares, la suspensión se centrifugó a 10'000 rpm durante 3 minutos, se recuperó el sobrenadante (en donde se encuentran las proteínas totales) y se colocó en un microtubo de 1.5 ml limpio.

8.3 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford

A partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 1 µg/µl se elaboró una curva estándar (0-4 µg/µl) y se prepararon las diluciones de las muestras problema (1 µl de proteínas totales, 39 µl de agua miliQ y 160 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad®) y se leyó a una absorbancia de 595 nm con el equipo Multiskan EX (marca Thermo Scientific®).

8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE)

Se prepararon geles de poliacrilamida: gel separador al 10% (2.5 ml de acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%, 1.9 ml de Tris-HCl/SDS pH 8.8, 3.12 ml de agua miliQ, 50 µl de persulfato de amonio 10% y 10 µl de TEMED), y gel concentrador al 5% (650 µl de acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%, 1.25 ml de Tris-HCl/SDS pH 6.8, 3 ml de agua miliQ, 50 µl de persulfato de amonio 10% y 10 µl de TEMED). A los extractos de proteicos previamente cuantificados, se les agregó la solución amortiguadora de carga de proteínas 1x (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xylene cyanol FF y 30% de glicerol en agua), se calentaron a 100°C por 5 minutos, se dejaron en hielo por 5 minutos y se cargaron en el gel. Se llevó a cabo la electroforesis en la solución de corrida 1x (Tris base 3 g/l, glicina 14.4 g/l y SDS 1 g/l) con una corriente constante de 20 mA durante aproximadamente 1 hora y media.

8.5 Inmunodetección en fase sólida

Después de la electroforesis, las proteínas totales se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, con el equipo Trans-Blot SD semi-dry transfer cell (marca BioRad®) utilizando el buffer de transferencia (25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 192 mM de glicina y metanol 20%) durante 1 hora a 20 V. Posteriormente, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Sigma®) para visualizar la integridad de las proteínas y se destiñó con TBST (10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl y Tween-20 0.1%).

La membrana se bloqueó con leche Svelty® Figura 0% Nestle® baja en grasa al 15% en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación constante. Se realizó un lavado con TBST durante 5 minutos en agitación constante para quitar el exceso de leche. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario en TBST con leche 3% toda la noche a 4°C en agitación constante (anti-emerina FL-254, marca Santa Cruz Biotechnology®, policlonal de conejo, dilución 1:50000; anti-actina, proporcionado por el Dr. Manuel Hernández Hernández del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN, origen ratón, dilución 1:3000). Posteriormente se realizaron lavados de 5, 10 y 15 minutos con TBST en agitación constante; y después se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulina

específica acoplado a peroxidasa) en TBST con leche 3% por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante (anti-conejo, marca Millipore[®], dilución 1:30000 o anti-ratón, marca Millipore[®], dilución 1:10000), seguido de lavados de 5, 10 y 15 minutos con TBST en agitación constante. Finalmente, se reveló con el sistema de detección ECL (Amersham Biosciences[®]) con placas autorradiográficas en cuarto oscuro.

8.6 Inmunofluorescencia indirecta

Las células C2C12 cultivadas hasta en una confluencia de 80% se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM y 100 µl de esta suspensión se colocaron sobre cubreobjetos de 20 mm x 20 mm, previamente esterilizados con alcohol y flama de mechero. Enseguida se incubaron por 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Al día siguiente se retiró el medio de cultivo y los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y entonces se fijaron las células con 100 µl de paraformaldehído al 4% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con 100 µl de Tritón-X100 al 0.2% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron los cubreobjetos con PBS y agua milli-Q, y se incubaron durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda con un anticuerpo policlonal anti-emerina (FL-254, dilución 1:200; Santa Cruz Biotechnology[®]), utilizando una solución amortiguadora con BSA al 5% y suero bovino fetal al 10%. Posteriormente se aplicaron dos lavados con Tritón-X100 al 0.2% en PBS por 5 minutos en agitación constante, dos lavados con PBS y con agua milli-Q y a continuación, se agregó el anticuerpo secundario diluido en una solución amortiguadora con BSA 5% y SFB 10% (anti-conejo acoplado a FITC, dilución 1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories[®],) y las preparaciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se aplicó un lavado con Tritón-X100 al 0.2% en PBS por 5 minutos en agitación constante, y dos lavados con PBS y agua milli-Q. Para teñir los núcleos, las preparaciones se incubaron con 50 µl de DAPI (dilución 1:600; Sigma[®]) durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Nuevamente se lavaron los cubreobjetos con PBS y agua milli-Q y se secaron para montarse finalmente sobre portaobjetos con 6 µl de Vecta-Shield (Vecta Laboratories[®]), utilizando barniz de

uñas transparente para su sellado. Las preparaciones se analizaron mediante Microscopía Confocal.

8.7 Doble inmunofluorescencia indirecta

Se utilizaron cubreobjetos de 20 mm x 20 mm esterilizadas con alcohol y flama de mechero. Las células C2C12 cultivadas hasta una confluencia de 80% se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM y a cada cubreobjetos se le agregó 100 µl de la suspensión células y 1 ml de medio DMEM, enseguida se incubaron por 24 horas a 37°C en humedad con 5% de CO₂. Al día siguiente se retiró el medio de cultivo y los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y las células se fijaron con 100 µl de paraformaldehído al 4% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con 100 µl de Tritón-X100 al 0.2% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se bloquearon los cubreobjetos con gelatina al 0.5% y suero bovino fetal al 1.5% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente; se lavaron con PBS y agua milli-Q y se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-emerina (dilución 1:300, FL-254, Santa Cruz Biotechnology®) y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-γ-tubulina (dilución 1:300, T6557; Sigma-Aldrich®), utilizando una solución amortiguadora con BSA al 5% y suero bovino fetal al 10% durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Posteriormente se aplicó un lavado con Tritón-X100 al 0.2% en PBS por 5 minutos en agitación constante y dos lavados con PBS y con agua milli-Q. A continuación, se incubaron los cubreobjetos durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a FITC (dilución 1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories®) y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a TRITC (dilución 1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories®), empleando una solución amortiguadora con BSA al 5% y SFB al 10%. Enseguida se aplicó un lavado con Tritón-X100 al 0.2% en PBS por 5 minutos en agitación constante y dos lavados con PBS y con agua miliQ. Los núcleos se tiñeron con 50 µl de DAPI (dilución 1:600, Sigma®) mediante incubación de las preparaciones durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Enseguida se lavaron las preparaciones con PBS y agua milli-Q, y se secaron para posteriormente montarse sobre

portaobjetos con 6 μ l de Vecta-Shield (Vecta Laboratories[®]), utilizando barniz de uñas transparente para su sellado. Finalmente, las preparaciones se analizaron mediante Microscopía Confocal.

8.8 Bacterias competentes

Se preparó un cultivo de la cepa de *Escherichia coli* DH5 α en 5 mL de medio LB y se cultivó toda la noche a 37°C en agitación constante (200 rpm); posteriormente se agregó una alícuota de 100 μ l del cultivo bacteriano en 20 mL de medio LB y este nuevo cultivo se incubó hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4-0.6. El cultivo se centrifugó a 8'000 rpm por 5 minutos a 4°C, y la pastilla bacteriana se resuspendió en la solución amortiguadora TBF1 (RbCl, MnCl₂ • 4 H₂O, CH₃CO₂K, CaCl₂ • 2 H₂O y Glicerol). La mezcla se incubó en hielo por 20 minutos, y se centrifugó a 8'000 rpm por 5 minutos a 4°C; la pastilla se resuspendió en 2 mL de solución amortiguadora TBF2 (MOPS, RbCl, CaCl₂ • 2 H₂O y Glicerol), se incubó en hielo por 20 minutos y finalmente se prepararon alícuotas de 50 μ l para su almacenamiento a -70°C.

8.9 Extracción de DNA plasmídico a gran escala (midiprep)

Se utilizó el kit Plasmid Midi de QIAGEN[®]. Se tomó una colonia aislada de bacterias transformadas con el plásmido de interés para inocular 5 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente. El cultivo se incubó por 8 horas a 37°C con agitación (300 rpm) y posteriormente se preparó una dilución de 1:500 en medio LB fresco adicionado con el antibiótico correspondiente y el nuevo cultivo se incubó a 37°C por ~16 horas a 300 rpm. Transcurrido ese tiempo se recolectaron las bacterias mediante centrifugación a 6'000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se resuspendió la pastilla en 4 mL de la solución amortiguadora P1 fría, se agitó la mezcla en vórtex, se agregaron 4 mL de la solución amortiguadora P2 y se mezcló la suspensión por inversión para incubarse posteriormente durante 5 minutos a temperatura ambiente; enseguida se añadieron 4 mL de la solución amortiguadora P3 y la suspensión se mezcló por inversión 4-6 veces antes de incubarse en hielo por 15 minutos. Posteriormente la preparación se centrifugó a 10'000 rpm por 40 minutos a 4°C, resuspendió el sobrenadante y centrifugarlo a 10'000 por 20 minutos a 4°C y se recuperó el

sobrenadante. La columna QIAGEN-TIIP100 se equilibró con 4 mL de la solución amortiguadora QBT y se lavó dos veces con 10 mL de la solución amortiguadora QC. El DNA se eluyó con 5 mL de la solución amortiguadora QF y se colectó en un tubo estéril de 50 mL. Se colocaron 833 µl de la solución de DNA de plásmido en un microtubo y se agregaron 583 µl de isopropanol a temperatura ambiente; la mezcla se agitó con vórtex y se centrifugó a 11'000 rpm por 1 hora a 4°C, enseguida se añadieron 334 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente y la mezcla se centrifugó de nuevo a 11'000 rpm por 10 minutos a 4°C y la pastilla se secó durante 15 minutos al vacío y se resuspendió en 100 µl de agua milli-Q.

8.10 Transfección de células C2C12

Se cultivaron las células C2c12 a una confluencia del 60% y se dejaron incubando 24 horas a 37°C. Al día siguiente, se cambió el medio de cultivo y las células se colocaron en la incubadora por 20 minutos. En un tubo limpio se mezcló lipofectamina 2000 (8 µl para cajas de 60 mm y 4 µl para cajas de 35 mm) en 50 µl de medio DMEM libre de suero y antibióticos; en otro tubo limpio se mezcló el DNA (6 µl para cajas de 60 mm y 3 µl para cajas de 35 mm) en 50 µl de medio DMEM libre de suero y antibióticos. Las soluciones se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente, se mezclaron y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente para formar los liposomas. Enseguida se agregaron los complejos DNA-liposoma a las células previamente cultivadas y las preparaciones se incubaron por 24 horas a 37°C.

9. RESULTADOS

9.1 Caracterización de las células nulas para el distroglicano (KO-DG1)

Para corroborar que las células KO-DG1 no expresan al β -DG, se realizaron ensayos de inmunodetección en fase sólida utilizando un anticuerpo anti- β -DG denominado Mandag. Se observó una banda de 43 kDa que corresponde al β -DG en los lisados de las células C2C12 silvestres; sin embargo, las células KO-DG1 carecen de esta señal (**Fig. 13**).

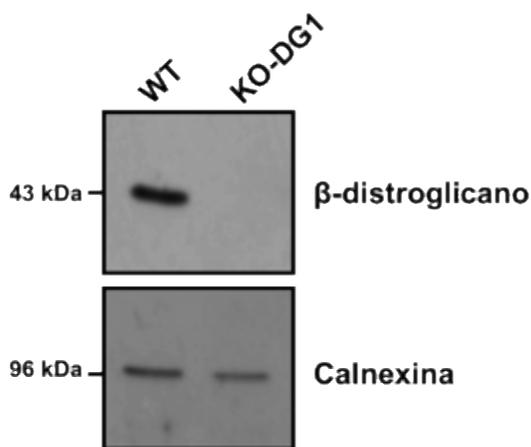


Figura 13. Las células KO-DG1 no expresan al β -DG. Inmunodetección en fase sólida utilizando extractos totales de células C2C12 silvestres (WT) y células C2C12 KO-DG1, utilizando un anticuerpo anti- β -DG. Como control de carga se utilizó calnexina. Se realizaron tres experimentos independientes.

9.2 Distribución subcelular y expresión de emerina en las células KO-DG1

Debido a que previamente nuestro laboratorio comprobó la interacción entre β -distroglicano y emerina, decidimos analizar la distribución subcelular de la emerina en las células KO-DG1 mediante inmunofluorescencia indirecta. Se observó que en células KO-DG1 presentan una disminución significativa en la intensidad de fluorescencia correspondiente a emerina, en comparación con las células silvestres (**Fig. 14**). Además, se apreciaron alteraciones de la morfología nuclear; pliegues y ampollas, lo que se analizó a fondo más adelante.

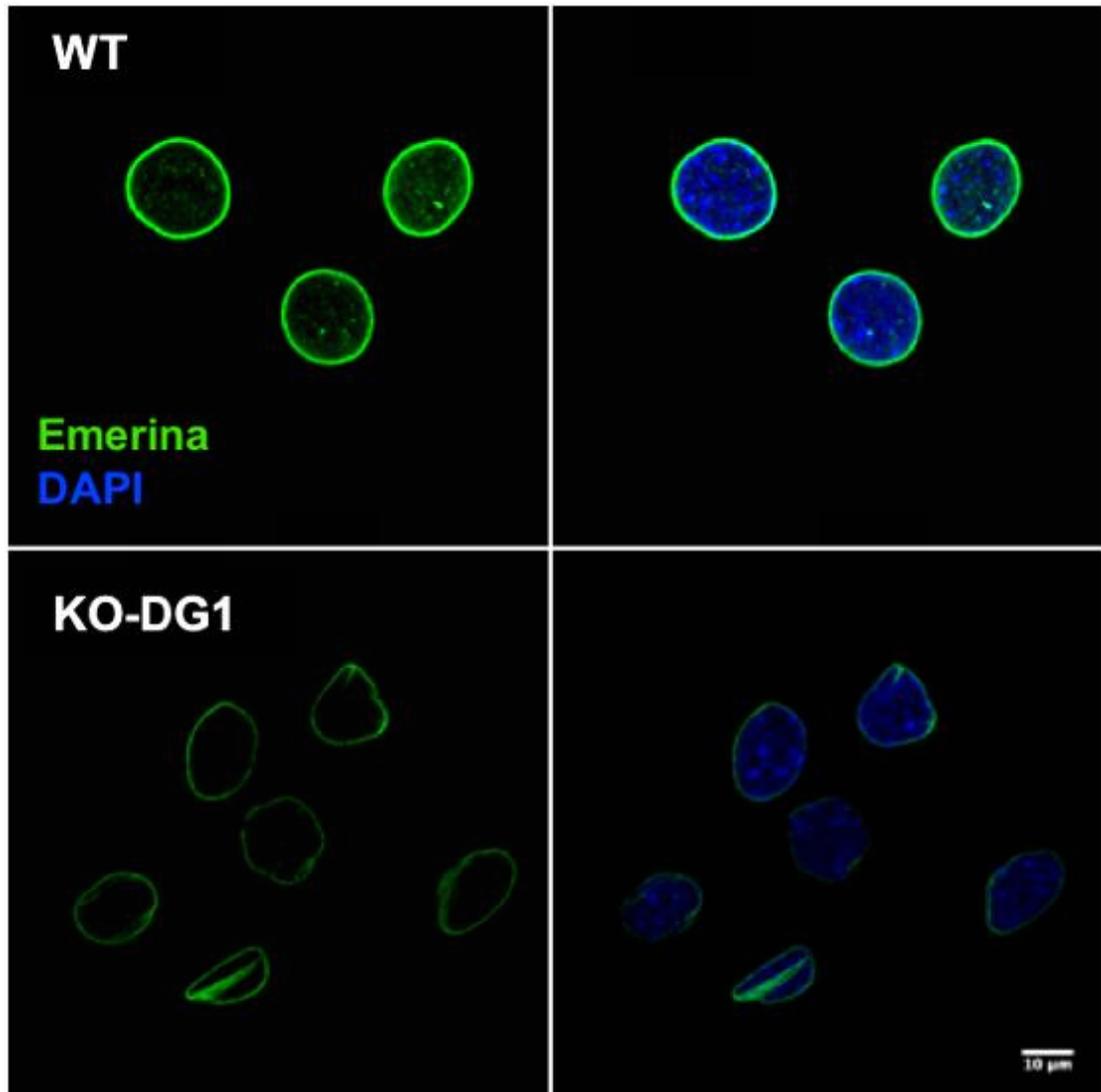


Figura 14. Las células KO-DG1 exhiben disminución en la señal de fluorescencia correspondiente a emerina. Las células C2C12 silvestres (panel superior) y las células KO-DG1 (panel inferior) se fijaron sobre cubreobjetos de vidrio y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-emerina (verde). Los núcleos se contrañeron con DAPI (azul) previo a su análisis mediante microscopía confocal. Escala 10 µm.

Tomando en consideración que las células KO-DG1 presentan disminución de la señal de emerina, procedimos a analizar la expresión de esta proteína mediante inmunodetección en fase sólida. Observamos que las células KO-DG1 presentan una disminución de ~50% en los niveles proteicos de emerina, en comparación con las células silvestres (**Fig. 15**), lo que sugiere que la presencia del β -DG es de importancia para la estabilidad de emerina.

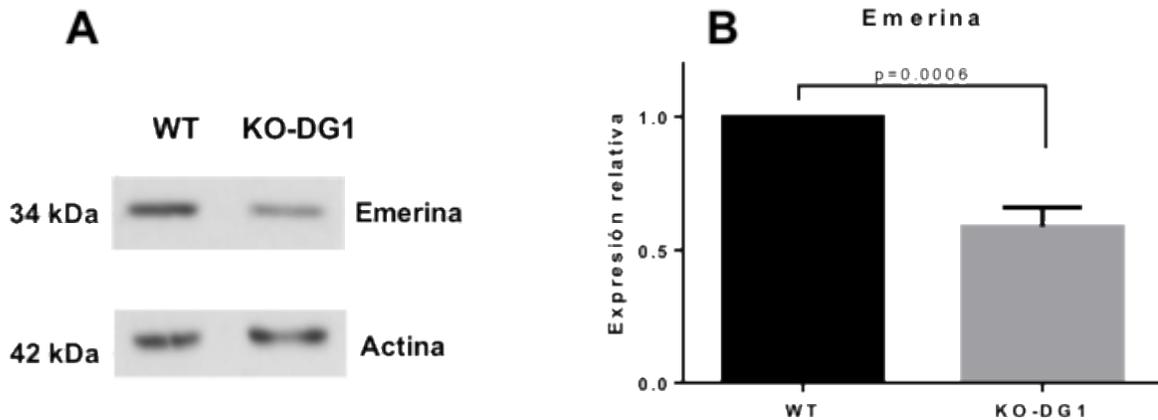


Figura 15. Disminución significativa en los niveles de emerina en las células KO-DG1. A) Los extractos totales de las células C2C2 silvestres y KO-DG1 se sometieron a inmunodetección en fase sólida, utilizando anticuerpos anti-emerina y anti-actina. (B) Se cuantificaron los niveles de emerina mediante normalización con actina. La expresión en las células silvestres se fijó arbitrariamente en 1. Los resultados corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

9.3 Análisis de las funciones de emerina en las células KO-DG1

Como se mencionó previamente una de las funciones de emerina es el mantenimiento de la morfología nuclear; por lo cual procedimos a evaluar la morfología nuclear de las células KO-DG1, mediante un análisis cualitativo y utilizando también parámetros morfométricos. Se graficó el porcentaje de núcleos con aberraciones en la morfología nuclear como son: pliegues, ampollas y micronúcleos; se encontró que un 67% de las células KO-DG1 tiene una morfología nuclear aberrante, en contraste con el 6% observado en las células silvestres (**Fig. 16**).

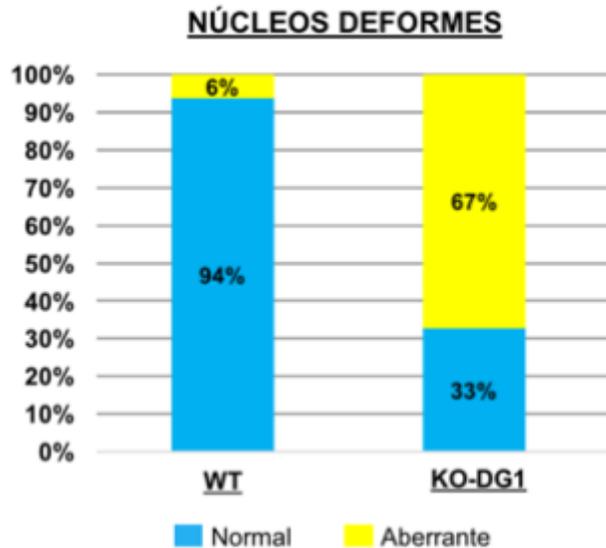


Figura 16. Las células KO-DG1 presentan núcleos deformes. Análisis cualitativo de la morfología nuclear, en color amarillo se observa el porcentaje de células con morfología nuclear aberrante (pliegues, ampollas, micronúcleos), mientras que en azul se observa el porcentaje de células con morfología nuclear normal. Se analizaron 100 núcleos de tres experimentos independientes.

Para complementar nuestro estudio se aplicó un análisis de morfometría nuclear utilizando el plugin NII del software ImageJ. Se emplearon dos parámetros: 1) Contorno nuclear, este valor permite conocer las irregularidades nucleares, donde valores altos indican núcleos irregulares y 2) Razón de radio, este valor permite conocer el tamaño nuclear, donde valores altos corresponde a núcleos con tamaño nuclear grande, mientras que, los valores bajos indican núcleos de tamaño pequeño. Se observó que los núcleos de las células KO-DG1 tienen valores de contorno nuclear (**Fig. 17A**) y razón de radio (**Fig. 17B**) significativamente mayores que los de las células silvestres, lo que implica que son núcleos irregularidades y de mayor tamaño.

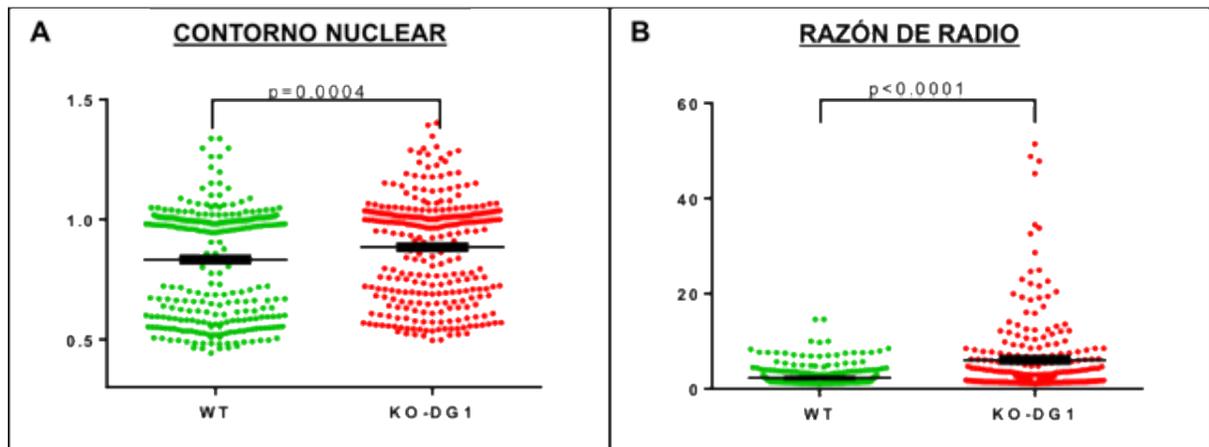


Figura 17. Las células KO-DG1 presentan valores de morfometría nuclear significativamente diferentes a las células silvestres. (A) Gráfica de los valores del contorno nuclear. (B) Gráfica de los valores de la razón de radio. Cada punto corresponde al núcleo de una célula analizada. Se muestra la media con el error estándar de la media de 100 células analizadas de tres experimentos independientes.

Otra de las funciones de la emerina es el mantenimiento de la unión núcleo-centrosoma. El centrosoma es el centro organizador de microtúbulos y su función principal es la organización del huso mitótico. El centrosoma está formado por un centriolo madre y un centriolo hijo, los cuales están unidos por fibras interconectantes y rodeados por la matriz pericentriolar formada por γ -tubulina y pericentrina. Evaluamos por lo tanto la distancia núcleo-centrosoma en las células KO-DG1 mediante inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo anti- γ -tubulina. Se observó que la distancia núcleo-centrosoma es significativamente mayor en las células KO-DG1 que en las células silvestres (**Fig. 18A**). Las células KO-DG1 presentan una la distancia promedio de 2.62 μm , mientras que en las células silvestres la distancia promedio es de 0.85 μm (**Fig. 18B**). Esta alteración puede tener consecuencias fisiológicas para estas células ya que la posición correcta de los centrosomas en la periferia nuclear es vital para la óptima segregación cromosómica; una mayor distancia núcleo-centrosoma podría ocasionar inestabilidad genómica.

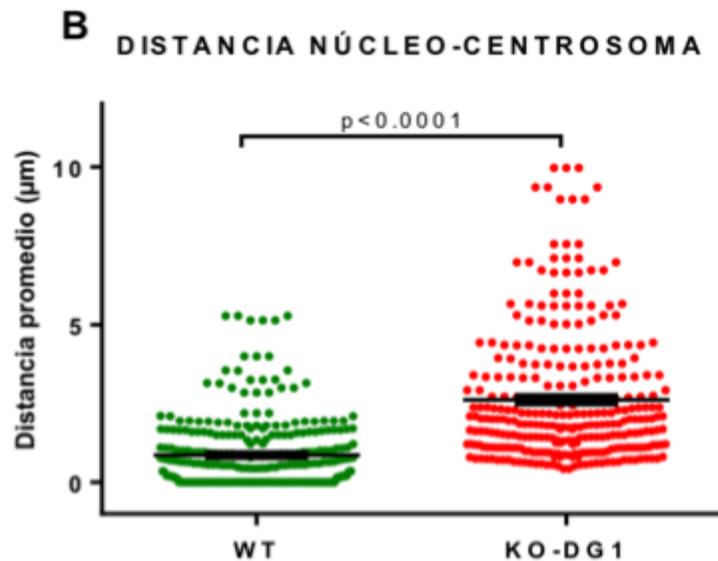
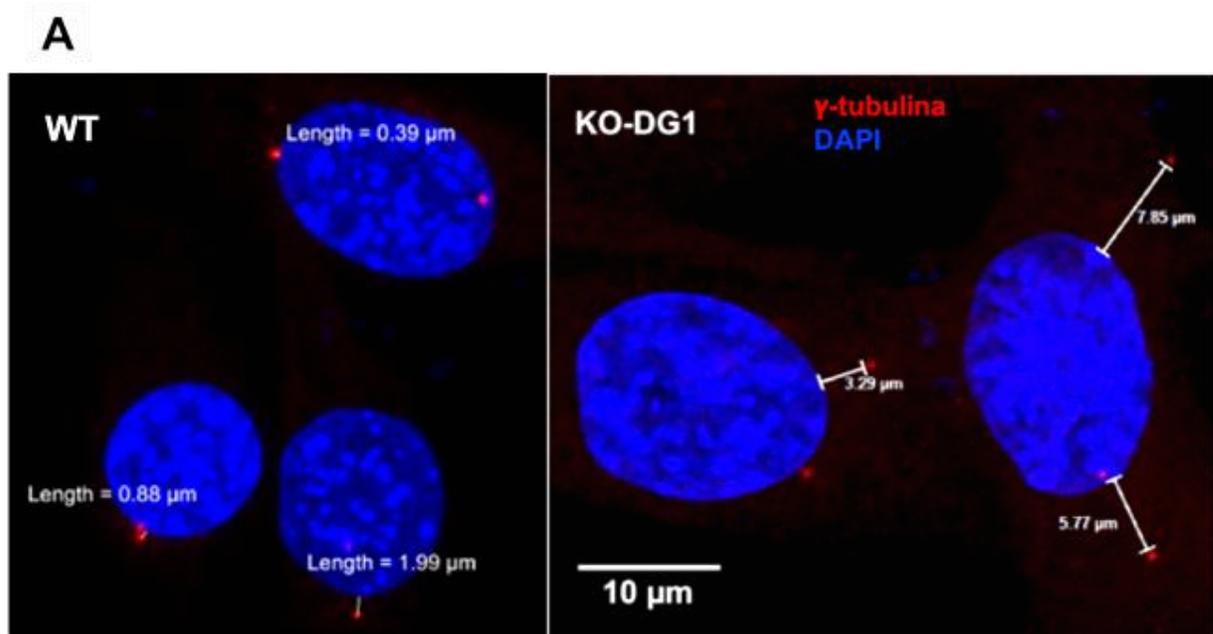


Figura 18. Los centrosomas de las células KO-DG1 están anormalmente separados de la membrana nuclear. (A) Las células C2C12 silvestres (lado izquierdo) y KO-DG1 (lado derecho) se fijaron sobre cubreobjetos de vidrio y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti- γ -tubulina (rojo). Previo al análisis por microscopía confocal los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala 10 μm . (B) La gráfica muestra el promedio de las distancias centrosoma-muelo observado en los cultivos celulares. En las células control la distancia promedio fue de 0.85 μm , mientras que en las células KO-DG1 fue de 2.62 μm . Cada punto corresponde a la distancia de un centrosoma analizado. Se muestra la media \pm el error estándar de la media de 100 células tomadas de tres experimentos independientes.

El ciclo de los centrosomas esta sincronizado con el ciclo celular, en la fase G1 existe un solo centrosoma y en dicha fase se lleva a cabo la desconexión de los centriolos. Posteriormente en la fase S se lleva a cabo la nucleación de procentriolos, el ensamble de microtúbulos centriolares y la elongación de centriolos, lo que permite que se lleve a cabo la duplicación centrosomal; a continuación, en la fase G2 se lleva a cabo la maduración y separación de los centrosomas, ya que cada centrosoma se posiciona en una célula hija durante la mitosis.

Cuando se analizó la distancia núcleo-centrosoma fue notoria la presencia de más de 2 centrosomas en un porcentaje alto de las células KO-DG1 (~40%), en comparación a células control (**Fig. 19**). Cuando existe un mayor número de cromosomas en la célula, se forman husos mitóticos aberrantes, lo que provoca una segregación cromosómica anormal y por consiguiente inestabilidad genómica.

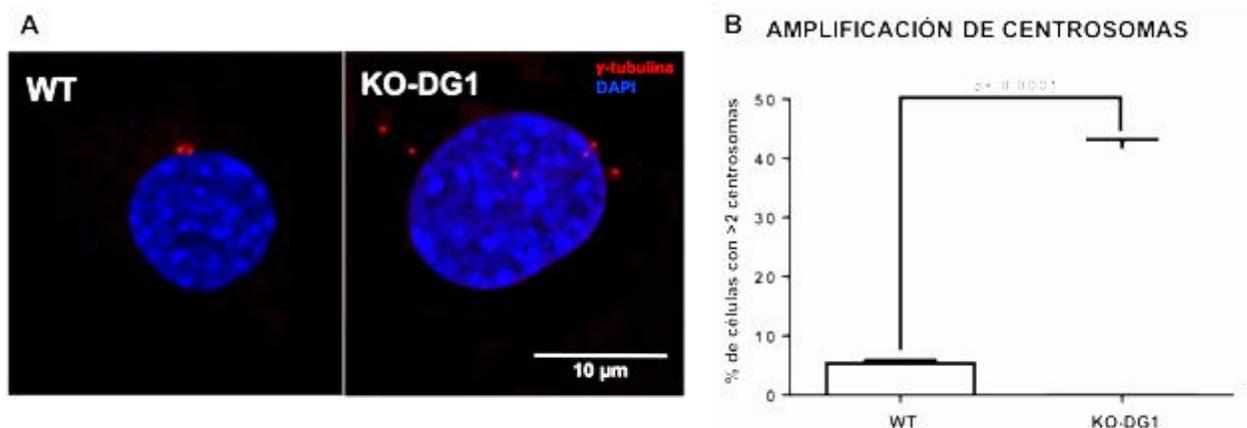


Figura 19. Las células KO-DG1 contienen un número anormal de centrosomas. (A) Las células C2C12 silvestres (lado izquierdo) y las KO-DG1 (lado derecho) se fijaron sobre cubreobjetos de vidrio y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo anti- γ -tubulina (rojo). Las células se contra-tiñeron con DAPI (azul) para observar los núcleos previo al análisis por microscopía confocal. Escala 10 μ m. (B) La gráfica muestra el porcentaje de células con más de 2 centrosomas presentes en cada cultivo celular. Los resultados corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

10. DISCUSIÓN

El β -dístroglicano (β -DG) es una proteína de membrana plasmática que forma parte del Complejo de Proteínas Asociadas a Dístrofina (DAPC) y es también de la envoltura nuclear, donde interactúa con proteínas como la emerina y las láminas A/C y B1. Se ha demostrado la relación funcional entre el β -DG y la envoltura nuclear, ya que la baja expresión de dicha proteína mediante un RNAi específico, provoca desorganización de la envoltura nuclear y deslocalización de la emerina y láminas A/C y B1 (Martínez-Vieyra, *et al*, 2013).

En el presente estudio analizamos la relación funcional entre el β -DG y la emerina, para lo cual utilizamos células C2C12 nulas para la expresión del dístroglicano (KO-DG1) obtenidas mediante el sistema CRISPR-Cas. Corroboramos mediante ensayos de inmunodetección en fase sólida que dichas células no expresan la proteína β -DG. Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta e inmunodetección en fase sólida mostraron que las células KO-DG1 presentan una disminución significativa en los niveles de emerina; esto posiblemente se deba a que la ausencia del β -DG provoca inestabilidad de la emerina, Previamente se ha reportado que la emerina se degrada por vía proteosomal (Chaturvedi & Parnaik, 2010). Por lo tanto, proponemos que la falta del β -DG acelera la ubiquitinación y posterior degradación de la emerina mediante el proteosoma. Ensayos posteriores utilizando inhibidores del proteosoma y midiendo la vida media de la emerina en las células silvestres y KO-DG1 son necesarios para confirmar esta hipótesis.

Una de las funciones de emerina analizadas en células KO-DG1 es la morfología nuclear. Por medio de ensayos de inmunofluorescencia y mediciones cualitativas demostramos que las células KO-DG1 presentan aberraciones de la morfología nuclear, incluyendo pliegues, ampollas y micronúcleos. El análisis de morfometría nuclear utilizando el plugin NII del software ImageJ reveló que los núcleos de las células KO-DG1 tienen valores más altos de contorno nuclear y de razón de radio que las células silvestres, lo que confirma que son núcleos irregulares y de mayor tamaño. Estos datos son consistentes con estudios previos en donde se observó que células carentes de emerina exhiben

anormalidades nucleares, debido a que la falta de esta proteína debilita la envoltura nuclear y la lámina nuclear y las predispone a su ruptura, lo que finalmente conduce a la degeneración muscular (Markiewicz, *et al*, 2002). Asimismo, estos autores reportaron que la redistribución de lámina C y LAP2 α en las células carentes de emerina afecta la expresión génica y por ende la función del músculo esquelético

Otra de las funciones de emerina analizada en las células KO-DG1 fue la unión núcleo-centrosoma. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti- γ -tubulina y se observó que las células KO-DG1 presentan un aumento significativo de la distancia núcleo-centrosoma. El anclaje correcto del centrosoma a la envoltura nuclear facilita su desplazamiento hacia los polos de la célula durante la mitosis. La dinámica de los centrosomas está regulada por una cadena de fosforilaciones: Plk1 fosforila a Nek9; y esta a su vez fosforila a Nek6/7, y con ayuda de Cdk1 fosforilan a Eg5. La cinasa Eg5 juega un papel central para que se acumulen los centrosomas y los microtúbulos astrales, generando una fuerza de “empuje” hacia el exterior. Además, los motores dineína-dinactina generan fuerza de tracción para ubicar los centrosomas cercanos a la envoltura nuclear (Nam, *et al*, 2015). Aunque es claro que la ausencia del β -DG aumenta la distancia núcleo-centrosoma, se requieren experimentos adicionales para elucidar el papel que juega el β -DG en este proceso.

De manera interesante, las células KO-DG1 presentan un aumento significativo en el número de centrosomas. Se conoce que la proteína estructural de los centrosomas SAS-6 regula la duplicación de los centrosomas ya que su sobreexpresión aumento el número de centrosomas. Es probablemente que la ausencia del β -DG afecta la expresión de SAS-6 y por consiguiente el número de centrosomas. Previamente nuestro grupo de investigación observó que el β -DG co-localiza e interacciona con la proteína nucleolar B23 (Martínez-Vieyra, *et al*, 2013). Dado que la cinasa Plk2 interacciona y fosforila a B23, para que esta última regule la maduración de los centriolos hacia centrosomas (Krause and Hoffmann, 2010), es factible proponer que la ausencia del β -DG altera dicho fenómeno, dando como resultado un aumento en el número de centrosomas.

11. CONCLUSIONES

- Las células nulas para distroglicano (KO-DG1) presentan una disminución del ~50% en los niveles de la emerina.
- Las células KO-DG1 exhiben deslocalización de la emerina de la envoltura nuclear hacia el nucleoplasma.
- Las células KO-DG1 presentan morfología nuclear aberrante.
- Las células KO-DG1 exhiben centrosomas separados del núcleo y duplicación anormal de centrosomas.

12. PERSPECTIVAS

- Transfectar una construcción de β -DG con una etiqueta diferente a GFP, por ejemplo, FLAG.
- Realizar una construcción de β -DG con un promotor diferente a CMV, por ejemplo, un promotor muscular.
- Analizar las proteínas del complejo LINC en las células KO-DG1.
- Estudiar el mecanismo molecular que lleva a la duplicación centrosomal.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bakay, M., Wang, Z., Melcon, G., Schiltz, L., Xuan, J., Zhao, P., Sartorelli, V., Seo, J., Pegoraro, E., Angelini, C., Shneiderman, B., Escolar, D., Chen, Y.W., Winokur, S.T., Pachman, L.M., Fan, C., Mandler, R., Nevo, Y., Gordon, E., Zhu, Y., Dong, Y., Wang, Y. and Hoffman, E.P. (2006). Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration. *Brain* 129, 996-1013.
2. Barresi, R., and Campbell, K.P. (2006). Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci* 119, 199-207.
3. Batchelor, C.L., Higginson, J.R., Chen, Y.J., Vanni, C., Eva, A., and Winder, S.J. (2007). Recruitment of Dbl by ezrin and dystroglycan drives membrane proximal Cdc43 activation and filopodia formation. *Cell Cycle* 6, 353-363.
4. Bengtsoon, L., and Wilson, K.L. (2004). Multiple and surprising new functions for emerin, a nuclear membrane protein. *Current opinion in cell biology* 16 (1), 73-79.
5. Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G. and Toniolo, D. (1994). Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature genetics* 8 (4), 323-327.
6. Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Bécane, H.M., Hammouda, E.H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizberea, J.A., Duboc, D., Fardeau, M., Toniolo, D. and Schwartz, K. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature genetics* 21 (3). 285-288.
7. Bozzi, M., Morlacchi, S., Bigotti, M.G., Sciandra, F. and Brancaccio, A. (2009). Functional diversity of dystroglycan. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 28 (4), 179-187.
8. Clements, L., Manilal, S., Love, D.R. and Morris, G.E. (2000). Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochemical and biophysical research communications* 267 (3), 709-714.
9. Chaturvedi, P. and Parnaik, V.K. (2010). Lamin A rod domain mutants target heterochromatin protein 1 α and β for proteasomal degradation by activation of F-Box protein, FBXW10. *PLoS ONE*. 5:5. e10620.
10. Chung, W., and Campanelli, J.T. (1999). WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Mol Cell Biol Res Commun* 2, 162-171.
11. Darras, B.T., Blattner, P., Harper, J.F., Spiro, A.J., Alter, S. and Francke, U. (1988). Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular dystrophy (DMD)/Becker muscular dystrophy (BMD) families studied with the dystrophin cDNA: location of breakpoints on HIndIII and BglIII exon-containing fragments maps, meiotic and mitotic origin of the mutations. *American journal of human genetics* 43 (5), 620-629.
12. Davies, K.E., and Nowak, K.J. (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 762-773.
13. Dedeic, Z., Cetera, M., Cohen, T.V. and Holaska, J.M. (2011). Emerin inhibits Lmo7 binding to the *Pax3* and *MyoD* promoters and expression of myoblast

- proliferation genes. *Journal of Cell Science* 124 (10), 1691-1702.
14. Di Stasio, E., Sciandra, F., Maras, B., Di Tommaso, F., Petrucci, T.C., Giardina, B., and Brancaccio, A. (1999). Structural and functional analysis of the N-terminal extracellular region of beta-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 274-278.
 15. Ellis, J.A., Craxton, M., Yates, J.R., and Kendrick-Jones, J. (1998). Aberrant intracellular targeting and cell cycle-dependent phosphorylation of emerin contribute to the Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype. *J Cell Sci* 111 (6), 781-792.
 16. Emery, A.E. (1989). Emery-Dreifuss syndrome. *Journal of medical genetics* 26 (10), 637-641.
 17. Emery, A.E. and Dreifuss, F.E. (1966). Unusual type of benign X-linked muscular dystrophy. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry* 29 (4), 338-342.
 18. Fuentes-Mera, L., Rodriguez-Muñoz, R., González-Ramírez, R., García-Sierra, F., González, E., Mornet, D. and Cisneros B. (2006). 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. *Experimental Cell Research* 312, 3023-3035.
 19. Gao, Q.Q. and McNally, E.M. (2015). The dystrophin complex: structure, function, and implications for therapy. *Comprehensive Physiology* 5, 1223-1239.
 20. Gerace, L., and Huber, M.D. (2012). Nuclear lamina at the crossroads of the cytoplasm and nucleus. *J Struct Biol* 177, 24-31.
 21. Gonzalez-Ramirez, R., Morales-Lazaro, S.L., Tapia-Ramírez, V., Mornet, D. and Cisneros, B. (2008). Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp31 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 105 (3), 735-745.
 22. Gracida-Jimenez, V., Mondragón-González, R., Vélez-Aguilera, G., Vásquez-Limeta, A., Laredo-Cisneros, M.S., Gómez-López, J.D., Vaca, L., Gourlay, S.C., Jacobs, L.A., Winder, S.J. and Cisneros, B. (2017). Retrograde trafficking of β -dystroglycan from the plasma membrane to the nucleus. *Scientific Reports*. 7:9906.
 23. Haenggi, T. and Fritschy, J.M. (2006). Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cellular and molecular life sciences* 63 (14), 1614-1631.
 24. Haraguchi, T., Holaska, J.M., Yamane, M., Koujin, T., Hashiguchi, N., Mori, C., Wilson, K.L., and Hiraoka, Y. (2004). Emerin binding to Btf, a death-promoting transcriptional repressor, is disrupted by a missense mutation that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Biochem* 271, 1035-1045.
 25. Henry, M.D., and Campbell, K.P. (1996). Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 8, 625-631.
 26. Holaska, J.M. (2002). Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *J Biol Chem* 278, 6969-6975.
 27. Holaska, J.M., and Wilson, K.L. (2006). Multiple roles for emerin: implications

- for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular and evolutionary biology 288 (7), 676-680.
28. Holaska, J.M., Kowalski, A.K. and Wilson, K.L. (2004). Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS biology* 2 (9), e231.
 29. Holaska, J.M., Rais-Bahrami, S., and Wilson, K.L. (2006). Lmo7 is an emerin-binding protein that regulates the transcription of emerin and many other muscle-relevant genes. *Hum Mol Genet* 132, 3459-3472.
 30. Ibraghimov-Beskrovnyaya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W. and Campbell, K.P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355 (6362), 696-702.
 31. Ilsley, J.L., Sudol, M., and Winder, S.J. (2001). The interaction of dystrophin with beta-dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal* 13, 625-632.
 32. James, M., Nuttall, A., Ilsley, J.L., Ottersbach, K., Tinsley, J.M., Sudol, M., and Winder S.J. (2000). Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of (beta)-dystroglycan regulates its interaction with utrophin. *J Cell Sci* 113 (10). 1717-1726.
 33. Koch, A.J., and Holaska, J.M. (2012) Loss of emerin alters myogenic signaling and miRNA expression in mouse myogenic progenitors. *PLoS ONE* 7, e37262.
 34. Krause, A. and Hoffmann, I. (2010). Polo-like kinase 2-dependent phosphorylation of NPM/B23 on serine 4 triggers centriole duplication. *PLoS ONE*. 5:3. e9849.
 35. Langerbach, K.J. and Rando, T.A. (2002). Inhibition of dystroglycan binding to laminin disrupts the PI3K/AKT pathway and survival signaling in muscle cells. *Muscle Nerve* 26, 644-653.
 36. Lara-Chacon, B., de Leon, M.B., Leocadio, D., Gomez, P., Fuentes-Mera, L. Martinez-Vieyra, I., Ortega, A., Jans, D.A., and Cisneros B. (2010). Characterization of an importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan. *J Cell Biochem* 110, 706-717.
 37. Lee, K.K., Haraguchi, T., Lee, R.S., Koujin, T., Hiraoka, Y., and Wilson, K.L. (2001). Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J Cell Sci* 114, 4567-4573.
 38. Manilal, S., Nguyen, T.M. and Morris, G.E. (1998). Colocalization of emerin and lamins in interphase nuclei and changes during mitosis. *Biochemical and biophysical research communications* 249, 643-647.
 39. Manilal, S., Nguyen, T.M., Sewry, C.A. and Morris, G.E. (1996). The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Human molecular genetics* 5 (6), 801-808.
 40. Mansharamani, M., and Wilson, K.L. (2005). Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *Journal of biological chemistry* 280 (14). 13863-13870.
 41. Markiewicz, E., Tilgner, K., Barker, N., van de Wetering, M., Clevers, H., Dorobek, M., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Ramaekers, F.C., Broers, J.L., Blankesteyn, W.M., Salpingidou, G., Wilson, R.G., Ellis, J.A. and Hutchison,

- C.J. (2006). The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *EMBO J* 25, 3275-3285.
42. Markiewicz, E., Venables, R., Álvarez-Reyes, M., Quinlan R., Dorobek, M., Hausmanowa-Petruciewicz, I. and Hutchison, C. (2002). Increased solubility of lamins and redistribution of lamin C in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy fibroblasts. *Journal of Structural Biology*. 140(1-3): 241-253.
 43. Martínez-Vieyra, I.A., Vásquez-Limeta, A., González-Ramírez, R., Morales-Lázaro, S.L., Mondragón, M., Mondragón, R., Ortega, A., Winder, S.J., and Cisneros, B. (2013). A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1833, 698-711.
 44. Melcon, G., Kozlov, S., Cutler, D.A., Sullivan, T., Hernandez, L., Zhao, P., Mitchell, S., Nader, G., Bakay, M., Rottman, J.N., Hoffman, E.P. and Stewart, C.L. (2006). Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Hum Mol Genet* 15, 637-651.
 45. Meyer, A.J., Almendrala, D.K., Go, M.M., and Krauss, S.W. (2011). Structural protein 4.1R is integrally involved in nuclear envelope protein localization, centrosome-nucleus association and transcriptional signaling. *Journal of Cell Science* 124 (9), 1433-1444.
 46. Michele, D.E. and Campbell, K.P. (2003). Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *The journal of biological chemistry* 278 (18), 15457-15460.
 47. Moore, C.J., and Winder, S.J. (2010). Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs. *Cell Commun Signal* 8, 3.
 48. Nam, H.J., Naylor, R.M. and van Deursen, J.M. (2015). Centrosome dynamics as a source of chromosomal instability. *Trends Cell Biol.* 25(2): 65-73.
 49. Nodvig, C.S., Nielsen, J.B., Kogle, M.E., and Mortensen, U.H. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLOS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0133085
 50. Oak, S.A., Russo, K., Petrucci, T.C. and Jarrett, H.W. (2001). Mouse alpha1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling. *Biochemistry* 40, 11270-11278.
 51. Ostlund, C., Ellenberg, J., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J. and Worman, H.J. (1999). Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein. *Journal of cell science* 112 (11), 1709-1719.
 52. Russo, K., Di Stasio, E., Macchia, G., Rosa, G., Brancaccio, A. and Petrucci, T.C. (2000). Characterization of the beta-dystroglycan-growth factor receptor 2 (Grb2) interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 274, 93-98.
 53. Salpingidou, G., Smertenko, A., Hausmanowa-Petruciewicz, I., Hussey, P.J. and Hutchison, C.J. (2007). A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. *The Journal of Cell Biology*. 178 (6), 897-904.
 54. Sciandra, F., Gawlik, K.I., Brancaccio, A., and Durbeej, M. (2007). Dystroglycan: a possible mediator for reducing congenital muscular dystrophy? *Trends Biotechnol* 25, 262-268.
 55. Sotgia, F., Lee, H., Bedford, M.T., Petrucci, T., Sudol, M., and Lisanti, M.P. (2001). Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain

- binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry* 40, 14585-14592.
56. Spence, H.J., Chen, Y.J., Batchelor, C.L., Higginson, J.R., Suila, H., Carpen, O., and Winder, S.J. (2004). Ezrin-dependent regulation of the actin cytoskeleton by beta-dystroglycan. *Hum Mol Genet* 13, 1657-1668.
 57. Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C.L. and Burke, B. (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *Journal of Cell Biology* 147 (5), 913-919.
 58. Thompson, O., Moore, C.J., Hussain, S.A., Kleino, I., Peckham, M., Hohonester, E., Ayscough, K.R., Saksela, K., and Winder S.J. (2010). Modulation of cell spreading and cell-substrate adhesion dynamics by dystroglycan. *J Cell Sci* 123, 118-127.
 59. Villarreal-Silva, M., Suárez-Sánchez, R., Rodríguez-Muñoz, R., Mornet, D. and Cisneros, B. (2010). Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochemical Research* 35, 366-373.
 60. Wagner, N., and Krohne, G. (2007). LEM-domain proteins: new insights into lamin-interacting proteins. *International review of cytology* 261, 1-46.
 61. Wilkinson, F.L., Holaska, J.M., Zhang, Z., Sharma, A., Manilal, S., Holt, I., Stamm, S., Wilson, K.L. and Morris, G.E. (2003). Emerin interacts in vitro with the splicing-associated factor, YT521-B. *Eur J Biochem* 270, 2459-2466.
 62. Winder, S.J. (2001). The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci* 26, 118-124.