



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

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“TRÁFICO INTRACELULAR DEL  $\beta$ -DISTROGLICANO NUCLEAR”**

**Tesis que presenta**

**M. EN C. VIRIDIANA GRACIDA JIMÉNEZ**

**para obtener el Grado de**

**Doctora en Ciencias**

**en la Especialidad de**

**Genética y Biología Molecular**

**Director de la Tesis: Dr. Bulmaro Cisneros Vega**

**Ciudad de México, México**

**Octubre 2017**

Este trabajo se realizó en el laboratorio 12 de Genética humana, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Bulmaro Cisneros Vega y la asesoría de los Doctores José Efraín Garrido Guerrero, Oscar Hernández Hernández, Enrique Soria Jasso y Jaime García Mena. Contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 300765

### AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme acompañado a lo largo del doctorado, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme tantos aprendizajes y experiencias.

Le doy gracias a mis padres por apoyarme en todo momento, aún cuando me decidí para sorpresa suya realizar el doctorado, por los valores que me han inculcado, y la oportunidad de tener una excelente educación a lo largo de mi vida. Pero sobre todo por ser un ejemplo a seguir.

A mis hermanas por ser parte importante de mi vida, porque siempre estuvieron ahí para llenar mis días de alegría y amor incondicional.

A Héctor por ser una parte importante de mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas. Más aún por aterrizar mis metas, aminorar mis problemas y ayudarme a encontrarles solución. Te amo Chamoso.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mis asesores: Dr Efraín Garrido Guerrero, Dr. Jaime García Mena, Dr. Oscar Hernández Hernández y Dr. Enrique Soria Jasso. Por haber compartido conmigo sus conocimientos y consejos. Incluyo al Dr. Arturo Ortega Soto, quien ya no pudo continuar como mi asesor pero estuvo ahí los primeros años del proyecto. Agradezco la amistad que me llevo de cada uno de ellos y se que puedo contar con su apoyo mas adelante.

Gracias al Dr Bulmaro Cisneros Vega por creer en mí, por su paciencia, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar la tesis en su laboratorio y por todo su apoyo y facilidades. Por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y aprender a hacer cosas nuevas. Gracias por escuchar tantos ensayos y enseñarme a no tirar la toalla.

A José por haber sido un gran compañero de laboratorio y amigo, por darme ánimos a seguir adelante en los momentos de desesperación. Por escuchar todas mis locas teorías acerca del beta-Distroglicano.

Gracias a Rosa Martínez, Martín Patricio, Carolina, Arturo, Iris, Laura, Eloisa y Silvia por su amistad incondicional durante mis años en el D.F. por reír juntos y aligerar el estrés de la vida citadina.

No puedo olvidar a mis compañeros con los cuales he compartido despacho e incontables horas de trabajo: Rocío Rodríguez, Wendy, Ricardo, Elizabeth, Areli, Marco, Gris, Ivette, Alejandra, Juan de Dios, Leah, Ariana, Paulina, Pablo y Ruth. Gracias por los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme. Especialmente a Wendy y Elizabeth, a quienes además de compañeras considero

amigas, por hacer menos estresantes mis viajes a la Ciudad de México, por facilitarme y compartir desinteresadamente su espacio de trabajo en el laboratorio en la etapa final del proyecto.

Gracias también al Dr. Steve Winder, Ricardo, Alejandra, Marco, Gris y Juan de Dios por su gran apoyo con algunos experimentos en la publicación del trabajo.

Gracias a Jesús y Juan, compañeros del laboratorio de enfrente por prestarme sin reparo algunos equipos de trabajo, siempre que los necesité.

Gracias a Gaby, la secretaria del Departamento de Genética y Biología Molecular, por todas las facilidades burocráticas y resolver todas mis dudas sobre papeleo.

Gracias al CINVESTAV y al CONACYT por permitirme realizar mis estudios de Doctorado con apoyo económico.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
Breve historia del descubrimiento del Distroglicano.....	9
Genética del Distroglicano.....	9
Estructura proteica del DAG.....	10
Interacciones del DG en el citoplasma.....	14
Funciones del $\beta$ -DG en el citoplasma.....	17
Fosforilación del $\beta$ -DG.....	18
Tráfico de proteínas a MP.....	20
El $\beta$ -DG en el núcleo.....	22
Transporte nuclear del $\beta$ -DG.....	25
Tráfico nuclear del EGFR.....	30
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
<b>HIPÓTESIS</b> .....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	35
<b>MODELO DE ESTUDIO</b> .....	37
<b>METODOLOGÍA</b> .....	38
<b>RESULTADOS</b> .....	51
CAPITULO 1. ORIGEN DEL BDG NUCLEAR	
1.1 El $\beta$ -DG requiere transitar del Retículo Endoplásmico hacia el Golgi antes de localizarse en el núcleo	
1.2 El $\beta$ -DG nuclear proviene de la membrana plasmática	
CAPÍTULO 2 RUTA DE TRÁFICO DEL $\beta$ -DG NUCLEAR	
2.1 Efecto de la inhibición de endocitosis sobre la localización nuclear del $\beta$ -DG	
2.2 El $\beta$ -DG transita de la MP hacia el RE previo su importe nuclear	
2.3 El $\beta$ -DG interactúa con la subunidad Sec61 $\beta$ del translocón	

### CAPÍTULO 3 PARTICIPACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN Y892 DEL $\beta$ -DG EN SU TRÁFICO NUCLEAR

3.1 Distribución subcelular del  $\beta$ -DG fosforilado en la tirosina 892

3.2 La fosforilación del  $\beta$ -DG por la cinasa Src es necesaria para su localización nuclear

3.3 Mutantes de fosforilación de  $\beta$ -DG

3.4 El  $\beta$ -DG fosforilado se desprende de la MP para ser transportado al interior del núcleo

<b>CONCLUSIONES</b> .....	74
<b>DISCUSIÓN</b> .....	75
<b>MODELO</b> .....	78
<b>REFERENCIAS</b> .....	79
<b>ANEXOS</b> .....	87

**RESUMEN**

El Distroglicano (DG) es una proteína que forma parte del Complejo de Glicoproteínas acopladas a Distrofina (DGC), que confiere integridad a la Membrana Plasmática (MP) y participa en la transducción de señales. En los vertebrados, DG es traducido de una única molécula de RNAm para generar un precursor polipeptídico (propéptido) que después es procesado para originar dos subunidades  $\alpha$ - y  $\beta$ -DG. Nosotros describimos la presencia de  $\beta$ -DG en el núcleo de diferentes líneas celulares y caracterizamos su mecanismo de importe nuclear, el cual es mediado por las importinas  $\alpha/\beta$ . El objetivo principal del presente estudio es definir el tráfico intracelular llevado por  $\beta$ -DG para llegar al núcleo. El bloqueo del transporte anterógrado desde el RE al Aparato de Golgi (BFA) demostró que el paso a través del Aparato de Golgi es un pre requisito para que  $\beta$ -DG se localice en el núcleo, mientras que la biotínulación de proteínas de membrana reveló que  $\beta$ -DG es translocado desde la MP al núcleo, pasando por el RE donde interactúa con Sec61 $\beta$ , la subunidad del translocón involucrada en el transporte nuclear del Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR). Como el uso de Dynasore, un inhibidor de la vía de endocitosis, resultó en la disminución de la localización nuclear de  $\beta$ -DG, parece indicar que el transporte retrógrado dependiente de vesículas endocíticas está implicado en la translocación nuclear de  $\beta$ -DG. Utilizando un anticuerpo policlonal específico que reconoce  $\beta$ -DG únicamente cuando está fosforilado en su Y892, nosotros expusimos que fosfo- $\beta$ -DG se distribuye ampliamente en la célula, incluyendo el núcleo. La inhibición de Src, generó la disminución de la presencia de  $\beta$ -DG en el núcleo, lo que sugiere que la fosforilación en la Y892 modula positivamente la localización nuclear de  $\beta$ -DG. La utilización de mutantes de fosforilación de  $\beta$ -DG que llevan mutaciones puntuales que simulan una proteína constitutivamente fosforilada en Y892 (-Y892E) o una proteína no fosforilable en el mismo residuo (Y892F), confirmó nuestra hipótesis. En conclusión, nuestros resultados indican que el  $\beta$ -DG nuclear viaja desde Golgi a la MP, es translocado al núcleo por transporte retrógrado vía endosomas, pasando a través del RE, donde interactúa con Sec61 $\beta$ . Además, la localización nuclear de  $\beta$ -DG está evidentemente regulada por la fosforilación en la Y892, la cual es mediada por Src.

**ABSTRACT**

DG is an integral component of the Dystrophin Glycoprotein Complex (DGC), which confers integrity to the plasma membrane (PM) and participates in signal transduction. In vertebrates DG is translated from a single mRNA molecule to generate a propeptide precursor that is further processed to originate two subunits  $\alpha$ - and  $\beta$ -DG. Recently we described the presence of  $\beta$ -DG in the nucleus of different cell lines and characterized its nuclear import mechanism, which is mediated by an importin  $\alpha/\beta$ -recognized NLS localized in the juxtamembrane region of  $\beta$ -DG. The aim of the present study is to define the intracellular traffic undergoes by  $\beta$ -DG to reach the nucleus. Blockage of ER to Golgi anterograde transport with brefeldin (BFA) showed that passing throughout Golgi is a prerequisite for  $\beta$ -DG to localize to the nucleus, while biotinylation of membranal proteins revealed that  $\beta$ -DG is indeed translocated from PM passing by the Endoplasmic Reticulum to the nucleus, where  $\beta$ -DG interacts with Sec61b, the translocon subunit involved in Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR) nuclear transport. As the use of dynasore, an inhibitor of endocytosis pathway resulted in decreased nuclear localization of  $\beta$ -DG, it appears that the endocytosis vesicle-dependent retrograde transport is implicated in the nuclear translocation of  $\beta$ -DG. Using a polyclonal phospho-specific antibody that recognizes  $\beta$ -DG only when phosphorylated on Tyr892, we exposed that phospho- $\beta$ -DG distributes widely in the cell, including plasma membrane, cytoplasm and nucleus. Inhibition of Src, showed a decreased presence of  $\beta$ -DG in the nucleus, suggesting that phosphorylation on Y892 modulate positively the nuclear localization of  $\beta$ -DG. The subcellular localization of  $\beta$ -DG phosphorylation mutants bearing point mutations that simulate a constitutive phosphorylated protein in the Y892 residue (-Y892E) or unphosphorylatable protein in the same residue (Y892F), confirmed latter this hypothesis. Overall our results indicate that nuclear  $\beta$ -DG transits from Golgi to PM, is subsequently translocated to the nucleus by retrograde transport pathway via endosomes, passing by ER, where interacts with Sec61 $\beta$ . Furthermore, we demonstrated that  $\beta$ -DG nuclear localization is evidently regulated by phosphorylation on Y892, by Src.



## INTRODUCCIÓN

### Breve historia del descubrimiento del Distroglicano

En el año 1987, por medio del estudio del cerebro de embriones de pollo se descubrió una proteína de membrana plasmática (MP) con capacidad de unión a la laminina, componente de la matriz extracelular, a esta proteína se le denominó “cranina” (Smalheiser and Schwartz 1987). Posteriormente se reveló que la cranina se asocia con la distrofina, proteína de citoesqueleto que en su estado mutante es la causante de la distrofia muscular de Duchenne. Debido a que se demostró que la cranina es un miembro del complejo de glicoproteínas (DGC) que se asocian con la distrofina (Ervasti, Ohlendieck *et al.* 1990), el grupo de investigación del Dr. Kevin P. Campbell la renombró como Distroglicano (DG). Su nuevo nombre se debe a su unión con la distrofina y su alto grado de glicosilación (Ibraghimov-Beskrovnaya, Ervasti *et al.* 1992). Cuando se secuenciaron los genes de las proteínas del DGC se comprobó que la secuencia de la cranina era idéntica a la del DG (Gee, Blacher *et al.* 1993).

### Genética del Distroglicano

En el año 1992 se clonó y caracterizó al gen *DAG1* que da origen al DG humano (Ibraghimov-Beskrovnaya, Ervasti *et al.* 1992). Este gen se localiza en la banda p21 del cromosoma 3 del genoma humano, su marco de lectura abierta (ORF) tiene una longitud de 65484 pb y está organizada en dos exones separados por un intrón largo (Figura 1; Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1993). El gen *DAG1* se ha clonado en una gran variedad de especies, entre las que se incluyen el hombre (*Homo sapiens*), el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), el ratón (*Mus musculus*), el pez torpedo (*Torpedo sp*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el pez cebra (*Danio rerio*) y el gusano (*Caenorhabditis elegans*) (Barresi y Campbell 2006).

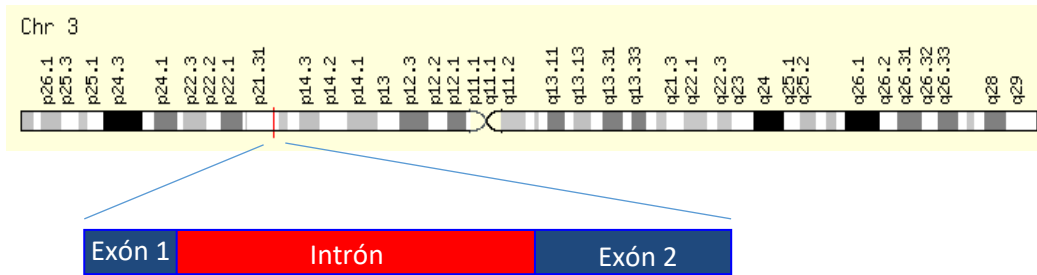


FIGURA 1. Localización cromosómica y estructura del gen DAG1.

El gen *DAG* presenta un alto grado de conservación entre especies, sin embargo se han identificado algunos polimorfismos (Gottlieb *et al.* 2005, Bozzi *et al.* 2009). El gen *DAG1* genera un transcrito de 5537 pb, el cual codifica para un polipéptido precursor de 895 aminoácidos (pre-DG), cuyo peso está calculado en 97.5 kDa, con base a su estructura primaria (Figura 2; Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.* 1992, Holt *et al.* 2000). En la *Drosophila* los niveles de expresión del  $\beta$ -DG son modulados de manera homeostática a través de un mecanismo mediado por el complejo miR-310s (miRNAs), el cual actúa directamente sobre la región 3' no traducida del mRNA del  $\beta$ -DG (3'UTR) (A.S. Yatsenko *et al.*, 2014).

### Estructura proteica del DAG

El DG se distribuye ubicuamente, se ha detectado en músculo, en sistema nervioso periférico y central, epitelio y endotelio (Durbeej y Campbell 1999). El análisis de la secuencia proteica reveló que el DG es una molécula estructuralmente distinta que no pertenece a alguna de las familias de moléculas de adhesión celular identificadas previamente. Solamente tiene cierta similitud con las inmunoglobulinas y con proteínas con dominios parecidos a la cadherina (De Rosa *et al.*, 2011)

En los vertebrados el pre-DG da origen a las subunidades  $\alpha$  ( $\alpha$ -DG) y  $\beta$  ( $\beta$ -DG) a través de un corte proteolítico en la Ser654 (Figura 2; Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.* 1992, Holt *et al.* 2000). Se ha sugerido que el DG presenta un mecanismo auto-catalítico, en analogía con la proteína MUC1, miembro de la familia de mucinas. Sin embargo, la secuencia aminoacídica que rodea este sitio de corte no está conservada entre vertebrados e invertebrados, por lo que aún falta más

investigaciones para disecar este proceso (Barresi y Campbell 2006, Akhavan *et al.* 2008, Oppizzi *et al.* 2008, Bozzi *et al.* 2009).

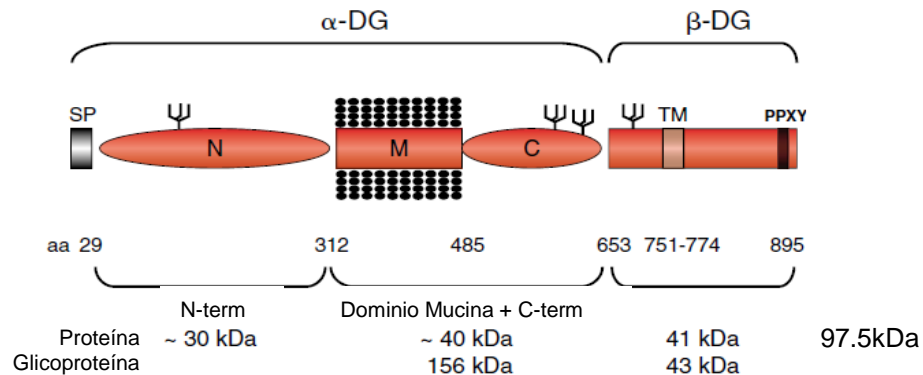


FIGURA 2.- Dominios del Distroglicano y ubicación de las glicosilaciones. Modificado de Barresi y Campbell, 2006.

La estructura primaria del DG está conservada entre los mamíferos que se han analizado y mantiene un alto grado de homología entre especies de vertebrados inferiores, lo cual sugiere que la organización de los dominios y la función del complejo DG se ha conservado durante la evolución (Bozzi *et al.* 2009). En la *Drosophila* se ha identificado un ortólogo del DG que no presenta el mecanismo de proteólisis que genera las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Dekkers *et al.* 2004, Bozzi *et al.* 2009).

La subunidad  $\alpha$  es una proteína de membrana periférica de 653 aminoácidos que sufre glicosilación (Watanabe, Sasaoka *et al.* 2007), está constituida por dos dominios (N- y C-terminal) que contienen 3 sitios potenciales para *N*-glicosilación. Los dominios se encuentran separados por una región tipo mucina (M) que posee un número alto de residuos prolina, serina y treonina, además de sitios potenciales de *O*-glicosilación. Su peso molecular varía entre 120 kDa en el cerebro y 156 kDa en el músculo esquelético, lo que depende del nivel de glicosilación de la proteína (Figura 2 y 3; Michele y Campbell 2003).

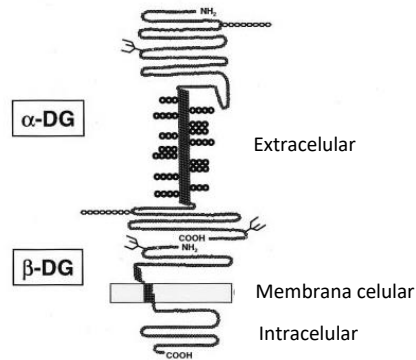


FIGURA 3.- Interacción de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del DG. Modificado de Holt *et al.*, 2000.

Por otro lado, la subunidad  $\beta$  contiene 242 aminoácidos (Ervasti and Campbell 1991, Watanabe, Sasaoka *et al.* 2007) y está compuesta por un dominio N-terminal, un único dominio transmembranal (TM) y un dominio C-terminal citoplásmico rico en prolinas (Bozzi, Morlacchi *et al.* 2009). Posee un sitio de *N*-glicosilación en el dominio N-terminal, además de una secuencia de localización nuclear clásica (NLS) (Lara-Chacón *et al.*, 2009) en la región yuxtamembranal, una secuencia de exporte nuclear en el dominio TM (datos no publicados de nuestro grupo de trabajo) y un motivo PPxY de unión a dominios tipo WW en la región C-terminal (Winder 2001). El  $\beta$ -DG tiene un peso molecular que varía entre 41 y 43 kDa, lo que es determinado por su nivel de glicosilación (Figura 2 y 4; Michele y Campbell 2003). El dominio extracelular del  $\beta$ -DG se une al  $\alpha$ -DG (Figura 3; Bozzi *et al.* 2003). A través de un modelo computacional el grupo del Dr. Muschler sugiere que existe una estructura secundaria en el ectodominio del  $\beta$ -DG (Akhavan, Crivelli *et al.* 2008). No hay información disponible acerca de la estructura del dominio citoplásmico del  $\beta$ -DG, pero su alto contenido en prolinas apunta a una conformación desordenada (Bozzi, *et al.* 2003). No se ha logrado obtener la estructura cristalográfica de  $\beta$ -DG, sin embargo, sí se conoce la estructura de la interacción del  $\beta$ -DG con el dominio WW de la distrofina (Huang X. *et al.*, 2000). Dentro de los 120 aminoácidos de la región citoplásmica de  $\beta$ -DG, se encontraron más de 40 sitios de interacción predichos, comprendidos en 19 motivos funcionales diferentes (Figura 5; Moore, *et al.*, 2010).

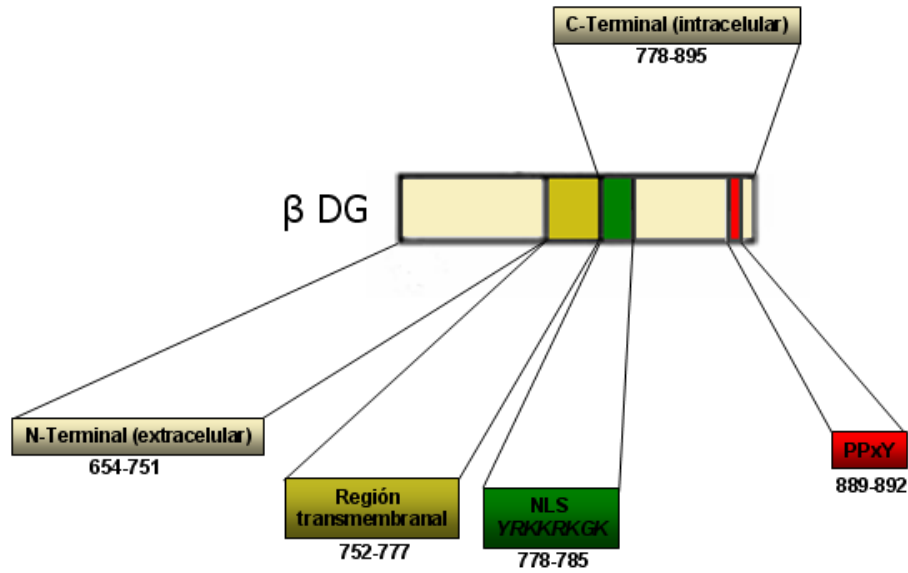


FIGURA 4.- Dominios y regiones del  $\beta$ -DG.

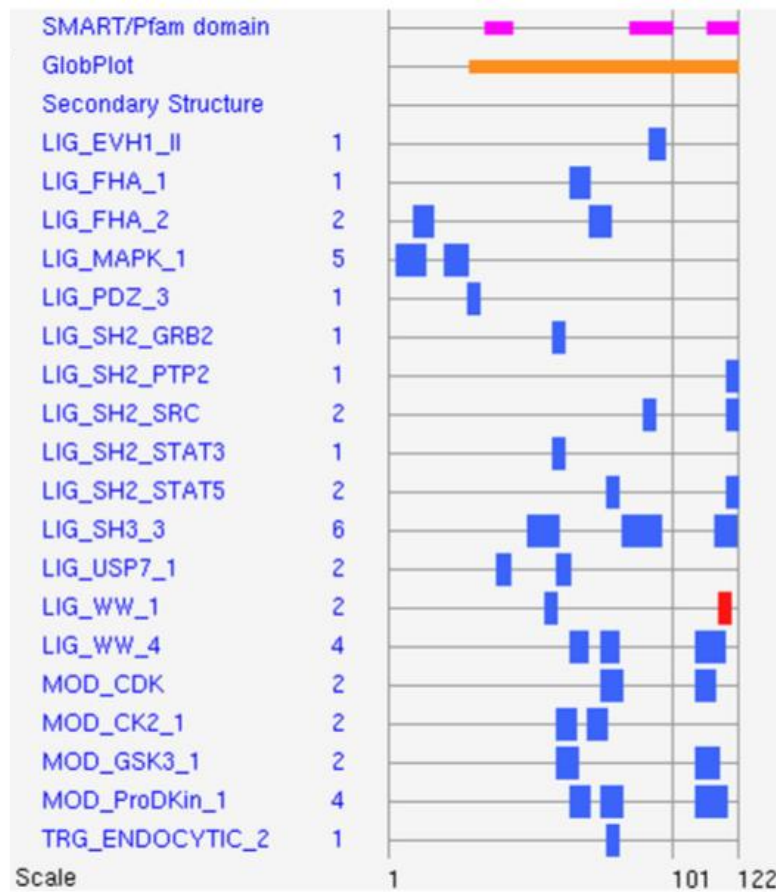


FIGURA 5.- Motivos funcionales predichos del  $\beta$ -DG (ELM). Las líneas grises horizontales representan la secuencia primaria del dominio citoplásmico de  $\beta$ -DG, las barras rosas son regiones de baja complejidad y las naranjas son regiones desordenadas. Las barras azules y rojas representan las posiciones de los motivos

lineales específicos descritos del lado izquierdo. Los números representan el número de ocurrencias de cada motivo en la secuencia. <http://www.elm.eu.org> (Para más detalles ver Moore *et al.*, 2010).

### Interacciones del DG en el citoplasma

Como ya se mencionó, el DG forma parte integral del complejo de glicoproteínas asociadas a Distrofina. La estructura principal de ese complejo, está conformada además del DG, por los sarcoglicanos ( $\alpha$ -SG,  $\beta$ -SG,  $\gamma$ -SG y  $\delta$ -SG), las distrobrevinas, el sarcospan y las sintrofinas (Ervasti y Sonnemann 2008). Hay proteínas asociadas al complejo extra o intracelularmente, como la óxido nítrico sintetasa [nNOS (Brenman *et al.* 1995), caveolina-3 (Sotgia *et al.* 2000) y laminina 2 (Figura 6; Barresi y Campbell 2006). Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentran interactuando mediante enlaces no covalentes, formando así un complejo en la MP (Figura 3 y 6; Bozzi *et al.* 2009; Yoshida *et al.* 1994)).

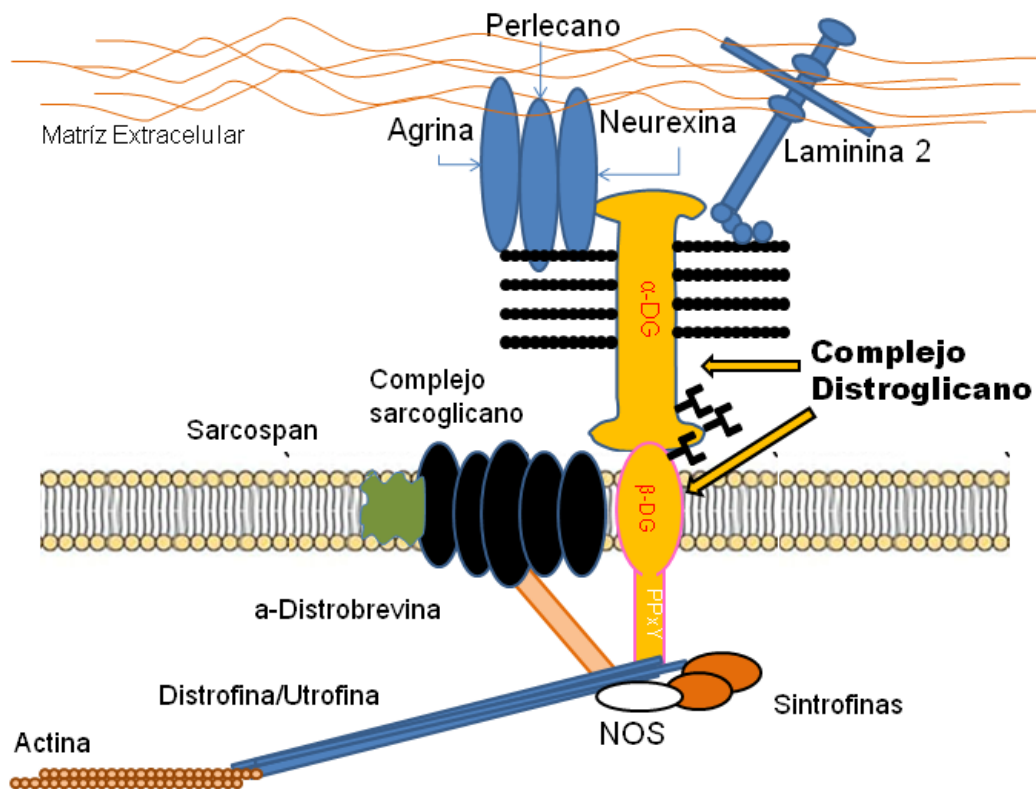


FIGURA 6.- Esquema del complejo de glicoproteínas asociadas a Distrofina. Modificado de Barresi y Campbell, 2006.

La subunidad  $\alpha$ -DG interactúa con el dominio N- terminal del  $\beta$ -DG a través de su región C-terminal (entre los residuos 550-565) (Bozzi *et al.* 2003), así como con otras proteínas de la matriz extracelular (ECM), como laminina 2 (Ervasti y Campbell 1993; Gee *et al.* 1993), agrina, perlecano (Sugiyama *et al.* 1994), neurexina (Barresi y Campbell 2006) y pikachurina (Sato *et al.* 2008, Bozzi *et al.* 2009) y biglicano (Figura 6 y 8; revisión Aumailley, 2013 y Sciandra *et al.*, 2013). Estudios recientes han demostrado que las glicosilaciones del  $\alpha$ -DG son importantes para que se lleven a cabo estas interacciones. (Michele *et al.* 2002; Muntoni *et al.* 2008; Bozzi *et al.* 2009).

Por otra parte, el dominio PPXY del  $\beta$ -DG se une al dominio WW de la distrofina (Jung, *et al.* 1995) y los dominios EF-hand y ZZ de la distrofina estabilizan esta unión (Figura 6; Hnia *et al.* 2007). La utrofina, un homólogo autosómico de la distrofina, se une también al  $\beta$ -DG de la misma manera (Figura 7; James, *et al.* 2000). La distrofina y la utrofina se unen directamente al citoesqueleto de actina (Winder *et al.* 1995; Winder *et al.* 1995').

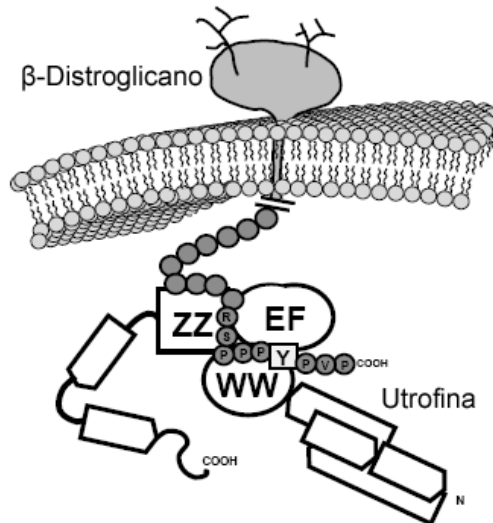


FIGURA 7.- Dominios de interacción entre la Utofina y el  $\beta$ -DG. Modificado de James *et al.*, 2000.

La caveolina-3 (Cav-3), proteína que participa en la formación de caveolas (pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática que funcionan como andamiaje para complejos de señalización) (Gazzerro, Sotgia *et al.* 2009) compite con la distrofina por la unión con el  $\beta$ -DG (Sotgia, Lee *et al.* 2000). Entre otras

moléculas que se unen a la región C-terminal del  $\beta$ -DG se incluyen Grb2 (Yang, Jung *et al.* 1995); MEK y ERK, componentes de la cascada ERK-MAP cinasas, (Spence, Dhillon *et al.* 2004), rapsina, proteína de la membrana post-sináptica de las uniones neuromusculares (Bartoli, Ramarao *et al.* 2001), la cinasa Src, Fyn, FAK (Batchelor, Higginson *et al.* 2007), ezrina, proteína adaptadora del citoesqueleto que interactúa con F-actina, (Spence, Chen *et al.* 2004) y Tks5, proteína involucrada en la formación de podosomas) (Figura 8; Thompson, Kleino *et al.* 2008).

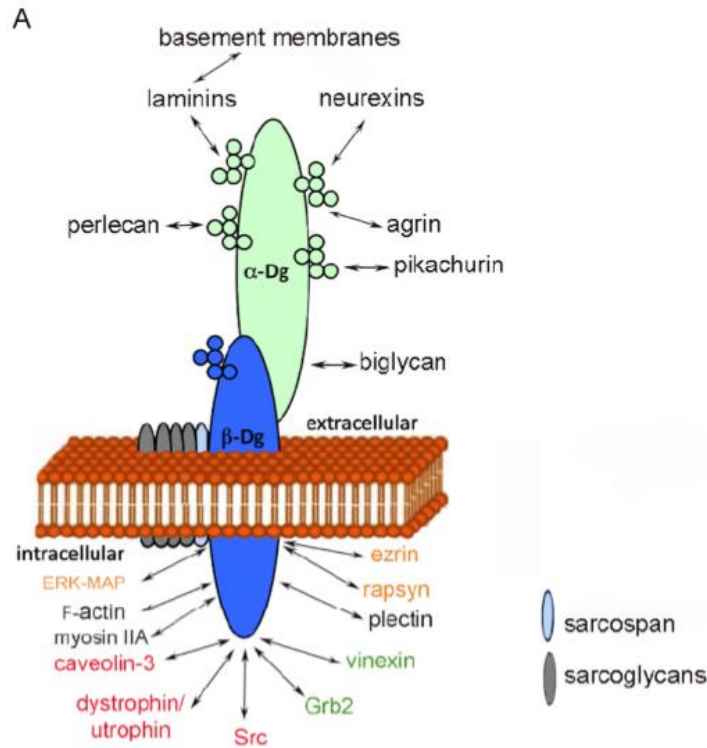


FIGURA 8.- Esquema de las interacciones extra e intracelulares del DG en la MP. En rojo se demuestran proteínas que interactúan con la secuencia PPXY de  $\beta$ -DG. Las proteínas que interactúan con el  $\beta$ -DG a través de su dominio SH2/SH3 se muestran en verde. Las proteínas que interactúan con la secuencia RKKRK del  $\beta$ -DG se muestran en naranja. (V. Bello *et al.* 2015)



$\beta$ -DG 771RKKRKGKLTLEDQATFIKKGVPPIIF795  
 NLS RKKRKxKxxxxxxxxxxxxxKK  
 ERK RKKRKxxLxL KKxxxIxF  
 ERM RKKRK  
 Rapsyn RKKRK

$\beta$ -DG 869KNMTPYRSPPPYVPP893  
 SH3 RxxxPxxP  
 WW PPxY  
 SH2 YxPP<sub>p</sub>

FIGURA 9. Secuencias de  $\beta$ -DG que sirven para su unión con distintas proteínas. (Para más detalles ver Moore S.A., y Winder S.J., 2010)

### Funciones del $\beta$ -DG en el citoplasma

Al complejo DG se le han adjudicado funciones diversas, entre las que se incluyen la conexión del citoesqueleto de actina con la matriz extracelular (Ervasti y Campbell 1993), lo que brinda estabilidad a la membrana sarcoplásmica durante la contracción muscular (Williamson, Henry *et al.* 1997). Además, el DG está involucrado en diversos procesos como el desarrollo embrionario, la estructura y función del sistema nervioso central (Moore, Saito *et al.* 2002), la mielinización y arquitectura de los nódulos de Ranvier de los nervios periféricos (Saito, Moore *et al.* 2003), la morfogénesis epitelial (Durbeej, Talts *et al.* 2001), la adhesión celular y la formación de podosomas, (Matsumura, Chiba *et al.* 1997), la sinaptogénesis (Jacobson, Cote *et al.* 2001, Sato, Omori *et al.* 2008) y la señalización (Spence, Dhillon *et al.* 2004, Barresi y Campbell 2006)

De manera interesante, ratones homocigotos nulos para el gen *DAG1* exhiben letalidad embrionaria a los 6.5 días de gestación (Williamson, Henry *et al.* 1997), debido a la desorganización de la membrana de Reichert, lo que pone de manifiesto la importancia de este gen. Se ha generado una enorme cantidad de trabajo de ingeniería genética para estudiar el gen *DAG1* (para su revisión Sciandra *et al.*, 2015) En especies inferiores, como el pez zebra, la eliminación de la expresión del DG no afecta el desarrollo embrionario, pero los animales adultos muestran una forma severa de distrofia muscular (Parsons, Campos *et al.* 2002).

De manera interesante, se han descrito diferentes distrofias musculares que se originan por defectos en la glicosilación del  $\alpha$ -DG; a este grupo de enfermedades se les conoce como distroglicanopatías secundarias. El origen genético de estas patologías es la mutación en genes que codifican para las glicosiltransferasas que se encargan de glicosilar al  $\alpha$ -DG (Barresi y Campbell 2006). Hasta el momento se han reportado 12 mutaciones diferentes involucradas en estas distrofias (revisión Sciandra *et al.*, 2015). Recientemente se reportaron mutaciones en el gen *DAG1* en 3 pacientes; estas alteraciones afectan la función del DG debido a que interrumpen su glicosilación o bloquean la unión entre el  $\alpha$ - y  $\beta$ -DG. (Hara Y. *et al.*, 2011; Dong M. *et al.*, 2015; Geis T. *et al.*, 2013). Además, alteraciones en los niveles del distroglicano o en los niveles de glicosilación, se han asociado a la progresión del cáncer (Sgambato y Brancaccio 2005, Alonso-Rangel *et al.*, 2017) y a las distrofias musculares congénitas (CMDs) (Moore, Saito *et al.* 2002, Muntoni, Torelli *et al.* 2008).

### Fosforilación del $\beta$ -DG

Se ha descrito que la fosforilación del  $\beta$ -DG en la tirosina 892 (Tyr892), presente en el dominio PPxY modula su interacción con otras proteínas (Figura 10; Ilsley, Sudol *et al.* 2002). Esta fosforilación regula de manera negativa la interacción del  $\beta$ -DG con la distrofina y utrofina (Ilsley, Sudol *et al.* 2001) (James *et al.*, 2000), pero no afecta su interacción con caveolina-3 (Figura 11; Sotgia, Lee *et al.* 2000).

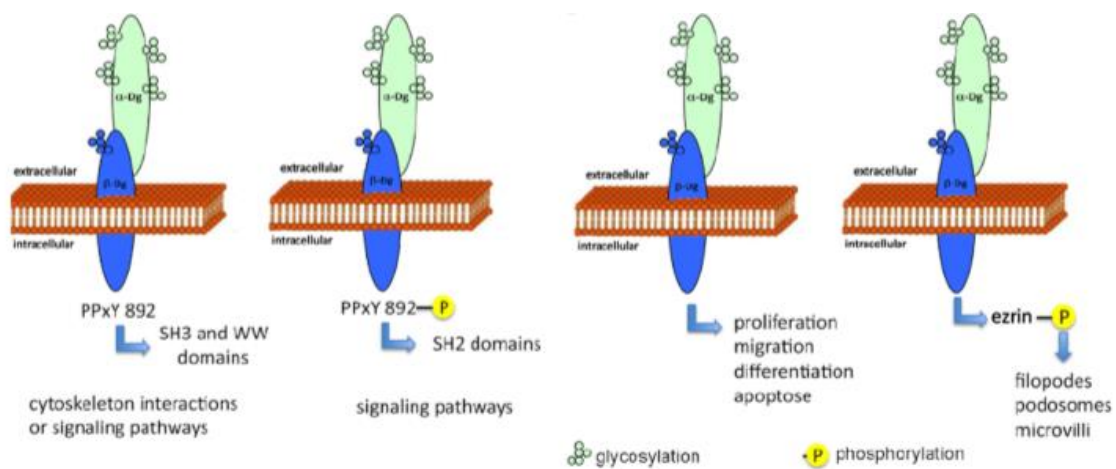


FIGURA 10.- Regulación de las interacciones del  $\beta$ -DG en la MP por la fosforilación de la tirosina 892 (V. Bello *et al.* 2015)

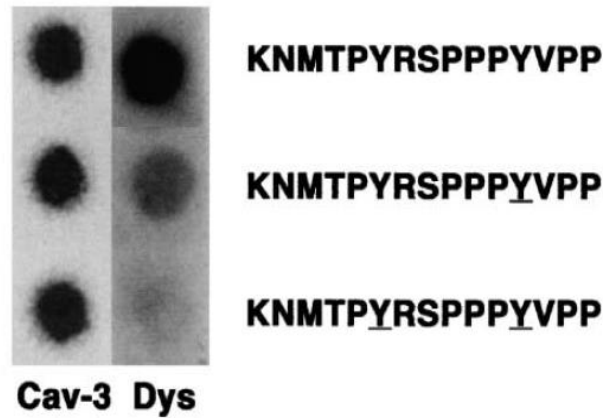


FIGURA 11.- Análisis por microarreglos de péptidos que revelan la importancia de la fosforilación del  $\beta$ -DG para su interacción con la distrofina y la caveolina-3. El arreglo de péptidos contiene los 15 últimos amino ácidos del  $\beta$ -DG sin fosforilar y con sustituciones fosfo-aminoacídicas en tirosinas. (Ilsley, Sudol et al. 2002)

La fosforilación del  $\beta$ -distroglicano es importante no solo para regular las interacciones con las proteínas mencionadas previamente sino también para regular su localización subcelular. En un estudio realizado por Sotgia y colaboradores se observó que la forma fosforilada del  $\beta$ -distroglicano cambia su localización de la membrana plasmática hacia vesículas endosómicas, en donde colocaliza con la cinasa Src (Sotgia, Bonuccelli *et al.* 2003) (Figura 12). Estos datos sugieren que el  $\beta$ -DG tiene la capacidad de responder a estímulos extra o intracelulares para cambiar su localización transmembranal y probablemente realizar funciones diferentes en compartimentos intracelulares.

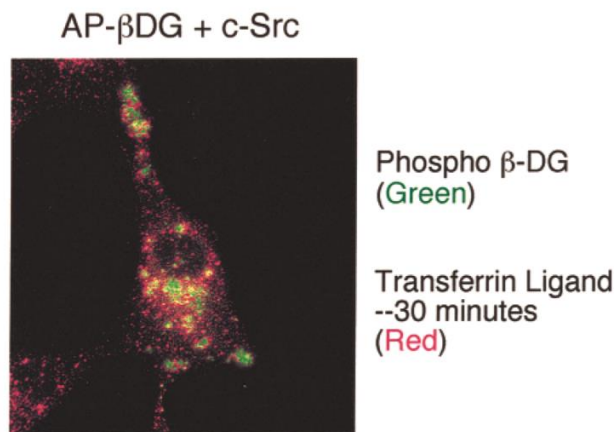


FIGURA 12.- La fosforilación de la Y892 del  $\beta$ -DG regula su localización en vesículas. Sotgia *et al.* 2003

El grupo del Dr. Winder demostró que la salida del  $\beta$ -DG de la MP, a través de su fosforilación, afecta la fuerza muscular. Trabajos previos de su laboratorio, demostraron que la expresión de una mutante del  $\beta$ -DG incapaz de ser fosforiladas (Y892F) aminora la distrofia muscular del ratón *mdx* (Miller et al., 2012). Recientemente se describió que el  $\beta$ -DG fosforilado en la Y892 por la cinasa Src, se endocita y ubiquitina para ser posteriormente degradado por el proteosoma (Figura 13). Estos autores proponen que la inhibición de la fosforilación del  $\beta$ -DG, utilizando un inhibidor selectivo de la cinasa Src, podría funcionar como terapia para la distrofia muscular de Dúchenne, ya que evitaría la ubiquitinación y posterior degradación proteosómica del  $\beta$ -DG (Lipscomb et al., 2016).

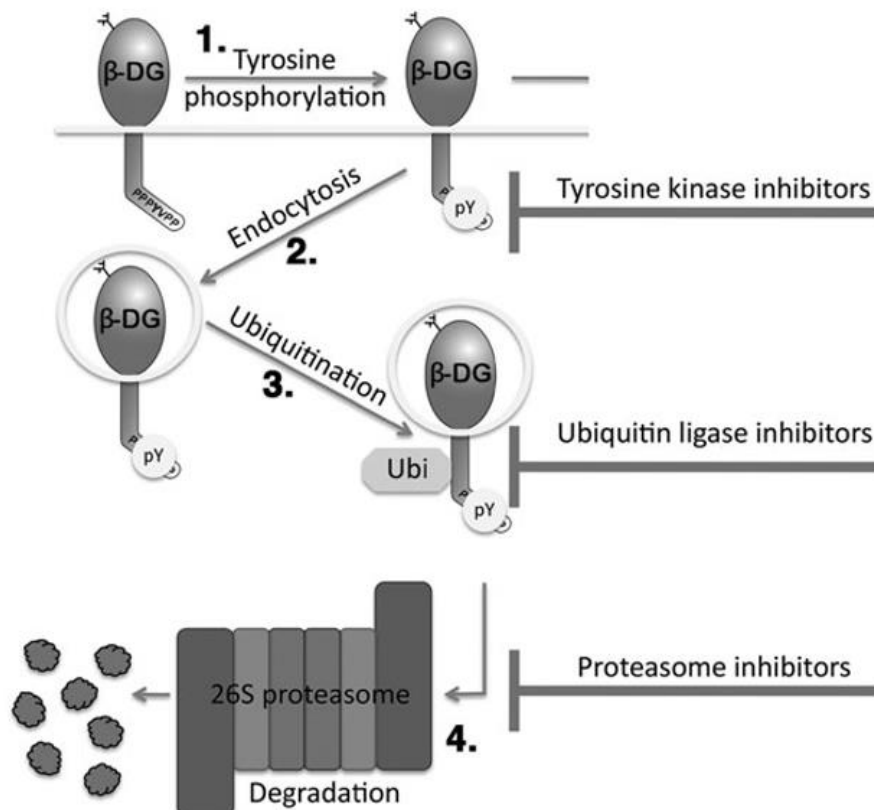


Figura 13. Esquema del tráfico intracelular y degradación del  $\beta$ -DG. 1. Fosforilación de la tirosina. 2. Endocitosis. 3. Ubiquitinación. 4. Degradación. Se muestran también los inhibidores de cada proceso. Lipscomb et al., 2016.

### Tráfico de proteínas de MP

Como ya se ha descrito, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del complejo del Distroglucano, son proteínas yuxtamembranales, por tanto es probable que su transporte hacia la

MP sea a través de la ruta secretoria. Las proteínas de membrana presentan un péptido señal generalmente formado por los primeros aminoácidos que son traducidos. Esta señal dirige a las proteínas hacia el retículo endoplásmico y una vez ahí, el péptido señal es reconocido por la partícula reconocedora del péptido señal (PRPS). El PRPS se asocia con el péptido señal y se une a su receptor en el retículo endoplásmico (RE). Una vez unido el PRPS a su receptor y habiendo acercado el ribosoma al retículo endoplásmico, este se desacopla del péptido señal y permite a la proteína naciente entrar al retículo endoplásmico a través de una estructura denominada translocón, este proceso denominado translocación se realiza a la par de la traducción (Shan y Walter 2005, Berndt, Oellerer et al. 2009, Grudnik, Bange et al. 2009). Una vez que la región transmembranal alcanza la membrana del retículo endoplásmico, esta se desacopla del translocón y se integra en la membrana lipídica (Figura 14). Una vez que las proteínas transmembranales son integradas en la membrana lipídica del retículo endoplásmico, estas son ayudadas tanto por chaperonas residentes del retículo endoplásmico o por chaperonas citosólicas para obtener su plegamiento correcto (Ellgaard y Helenius 2003). En el RE se lleva a cabo la N-glicosilación de las proteínas (Yamamoto 2009).

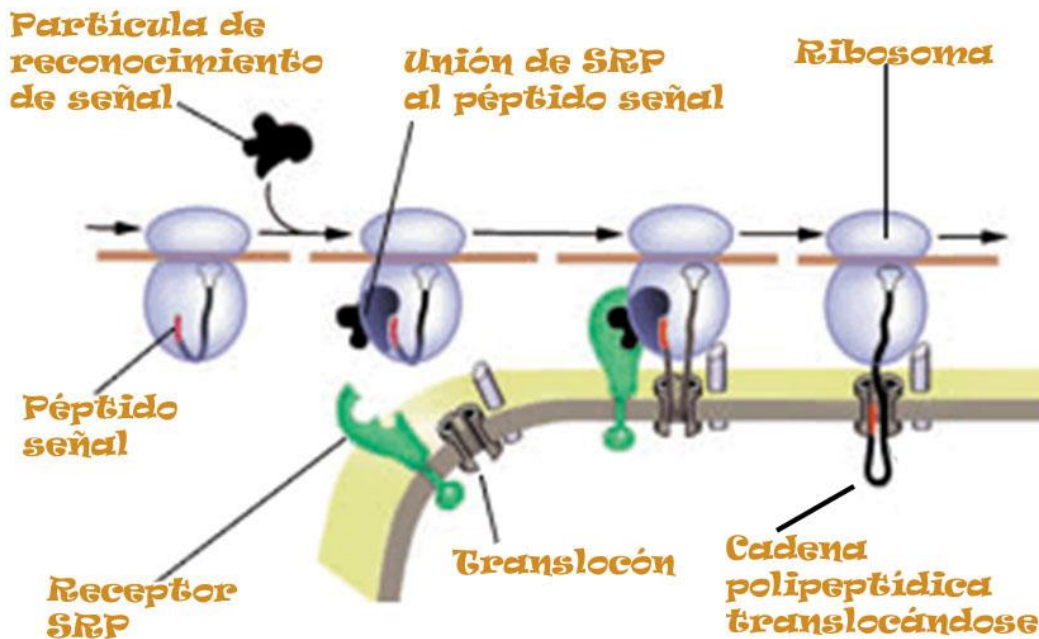


FIGURA 14. Proceso de translocación de proteínas en el RE.

Las proteínas integradas a la membrana del retículo endoplásmico continúan a través de la ruta secretoria mediante vesículas especializadas que se fusionan una con otra para dar origen a un compartimiento mayor llamado elemento *cis*-Golgi. El elemento *cis*-Golgi, en conjunto con las proteínas provenientes del retículo endoplásmico, se transfiere a un nivel más externo para formar el elemento *medial*-Golgi. Sucesivamente, este elemento se transloca a otro nivel más cercano a la membrana plasmática para formar el elemento *trans*-Golgi.

Una vez localizadas en el elemento *trans*-Golgi y después de haber sido procesadas por las diferentes glicosiltransferasas residentes del aparato de Golgi, las proteínas destinadas a la membrana celular son transportadas a través de vesículas (Jackson 2009). Estas vesículas son conducidas por proteínas especializadas que utilizan como vía de transporte al citoesqueleto. Durante su paso a través del aparato de Golgi las proteínas sufren cambios importantes, tales como la *O*-glicosilación (Endo 2009, Yamamoto 2009), a través de la acción de glicosiltransferasas específicas del aparato de Golgi. Una vez que han sido procesadas en el aparato de Golgi, las proteínas están listas para ser transportadas al lugar en donde van a realizar su función (Jackson 2009).

### El B-DG en el núcleo

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado la presencia del  $\beta$ -distroglicano en el núcleo de diferentes líneas celulares: A549 (células pulmonares de humano), Hepa-1 (células hepáticas de ratón), COS7 (células de riñón de mono), HeLa (células epiteliales humanas) (Fuentes-Mera, *et al.* 2006), PC12 (Villarreal-Silva *et al.* 2010) y C2C12 (Figura 15; Gonzalez-Ramirez, Morales-Lazaro *et al.* 2008)

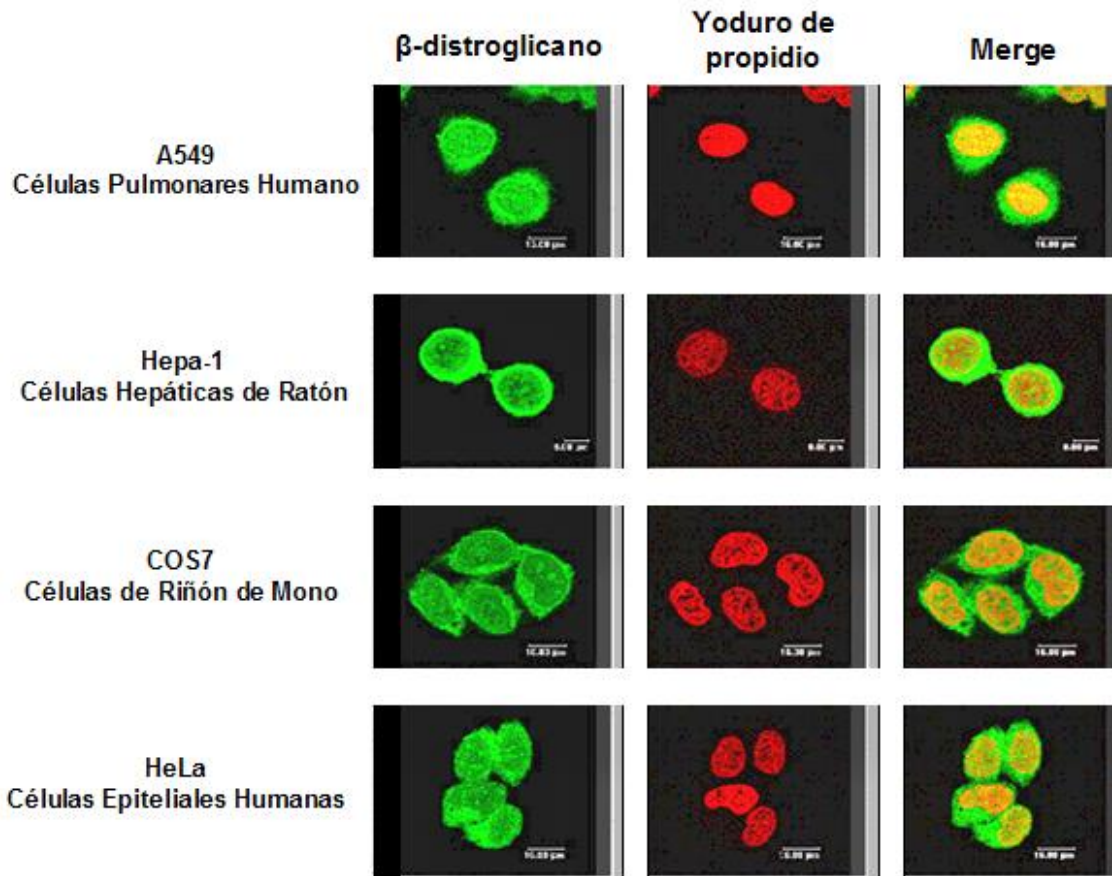


FIGURA 15. Localización nuclear de  $\beta$ -dístroglicano en diferentes líneas celulares. (Fuentes-Mera, *et al.* 2006)

Hemos observado mediante un análisis por microscopía electrónica que el  $\beta$ -DG nuclear se distribuye en la envoltura nuclear, los nucléolos y el nucleoplasma (Fuentes-Mera *et al.*, 2006; Gonzales-Ramírez *et al.*, 2008; Martínez-Vieyra *et al.*, 2013) (Figura 16).

Con la finalidad de identificar la función del  $\beta$ -DG en el núcleo, se analizó su potencial interacción con proteínas residentes de diferentes dominios nucleares y se demostró que el  $\beta$ -DG interactúa con proteínas de envoltura nuclear (emerina y lamina A/C y B1), cuerpos de Cajal (p80 coilina) y nucléolo (Nopp140) (Figura 17). Posteriormente, nuestro laboratorio decidió evidenciar si la presencia nuclear del  $\beta$ -DG es fisiológicamente relevante, para lo cual se utilizó un RNA interferente dirigido contra el RNA mensajero del  $\beta$ -DG y se analizó posteriormente que ocurriría con la estructura nuclear en células con la expresión disminuida de esta proteína. Se observó que la deficiencia de  $\beta$ -DG deslocaliza y disminuye los niveles de la emerina

y la lámina B1, sin afectar los niveles de sus RNAs mensajeros respectivos. Así mismo, se encontró desorganización de los nucléolos, los cuerpos de Cajal y los cuerpos de *splicing* (Figura 18). Finalmente, nuestro laboratorio demostró que los bajos niveles del  $\beta$ -DG alteran el anclaje de los centrosomas al núcleo y provocan la aparición de centrosomas múltiples.

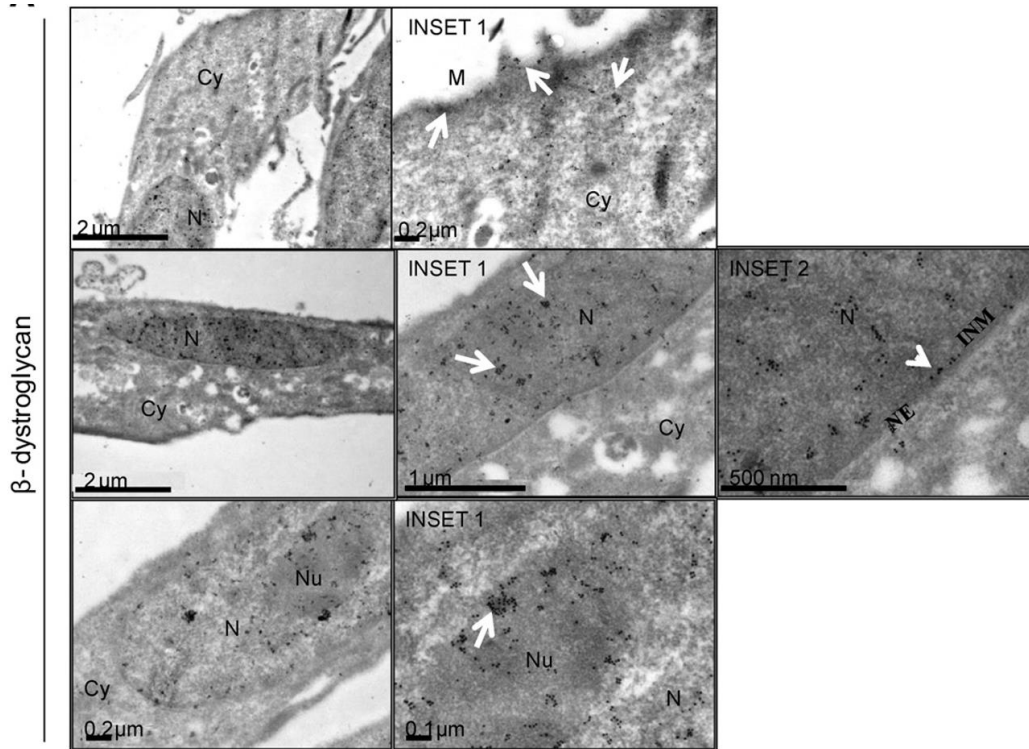


FIGURA 16.- Análisis de la localización nuclear del  $\beta$ -DG mediante microscopía electrónica. Se llevó a cabo un inmunomarcaje utilizando un anticuerpo anti- $\beta$ -DG conjugado con partículas de oro. MP (M), Citoplasma (C), Núcleo (N), membrana nuclear interna (INM). Martínez-Vieyra *et al.*, 2013.

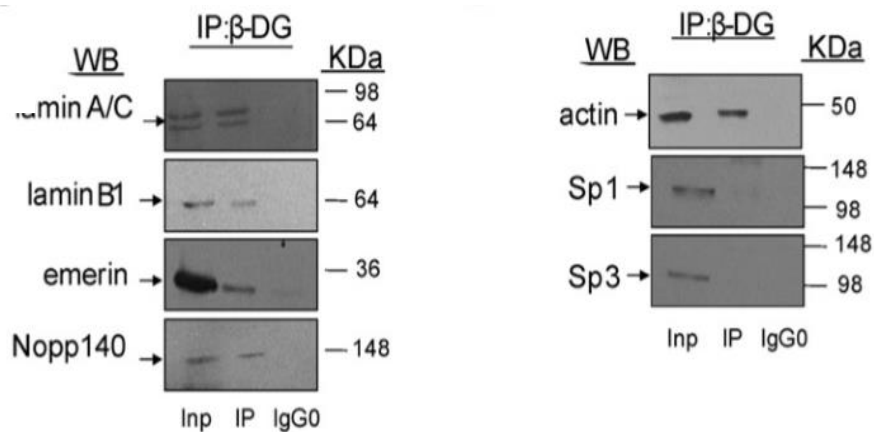


FIGURA 17.- El  $\beta$ -DG se asocia con proteínas de diferentes compartimentos nucleares. Martínez-Vieyra *et al.*, 2013.



En su conjunto, estos datos demuestran que el  $\beta$ -DG está involucrado en la organización nuclear y debido a su asociación con proteínas de la membrana nuclear interna podría contribuir a las patologías asociadas con defectos de la envoltura nuclear. (Martínez-Vieyra *et al.*, 2013)

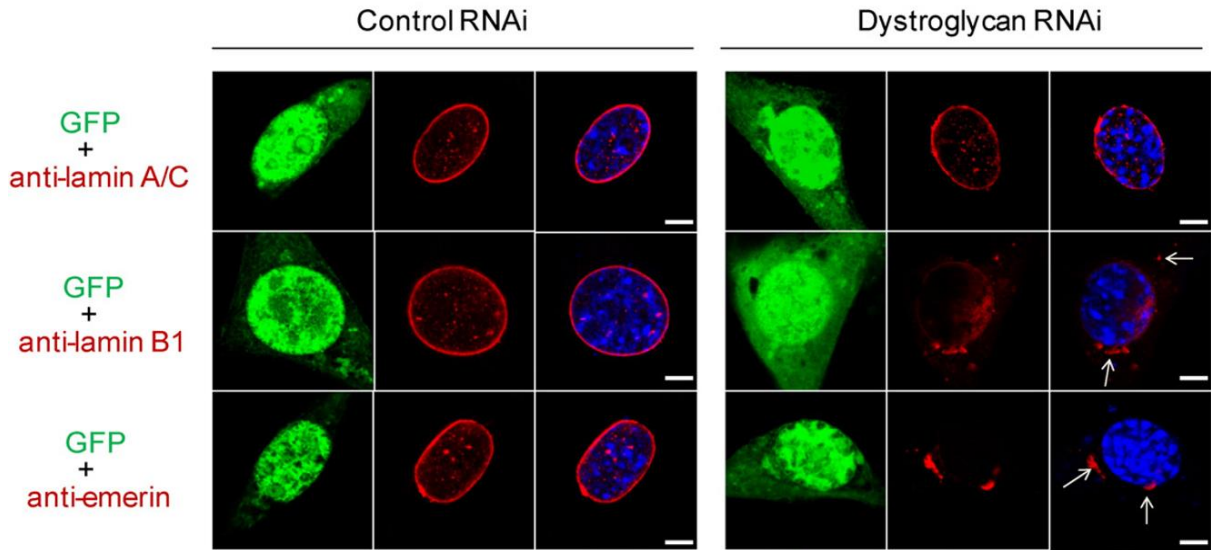


FIGURA 18.- Deslocalización de diferentes proteínas nucleares en células con deficiencia del  $\beta$ -DG. (Martínez-Vieyra *et al.*, 2013)

Por otro lado, en 2013 se reportó que el  $\beta$ -DG nuclear promueve la expresión de factores de transcripción regulados por andrógeno en el contexto del cáncer de próstata. (Mathew *et al.*, 2013)

### Transporte nuclear del $\beta$ -DG

La importación nuclear del  $\beta$ -DG se lleva a cabo mediante el reconocimiento de una secuencia de localización nuclear (NLS) por el sistema de importinas. En nuestro grupo se demostró la funcionalidad de la NLS mediante un ensayo de mutagénesis dirigida. Cuando se eliminó la NLS se bloqueó el transporte nuclear de la proteína de fusión GFP- $\beta$ -DG (Figura 19; Lara-Chacón *et al.*, 2010).

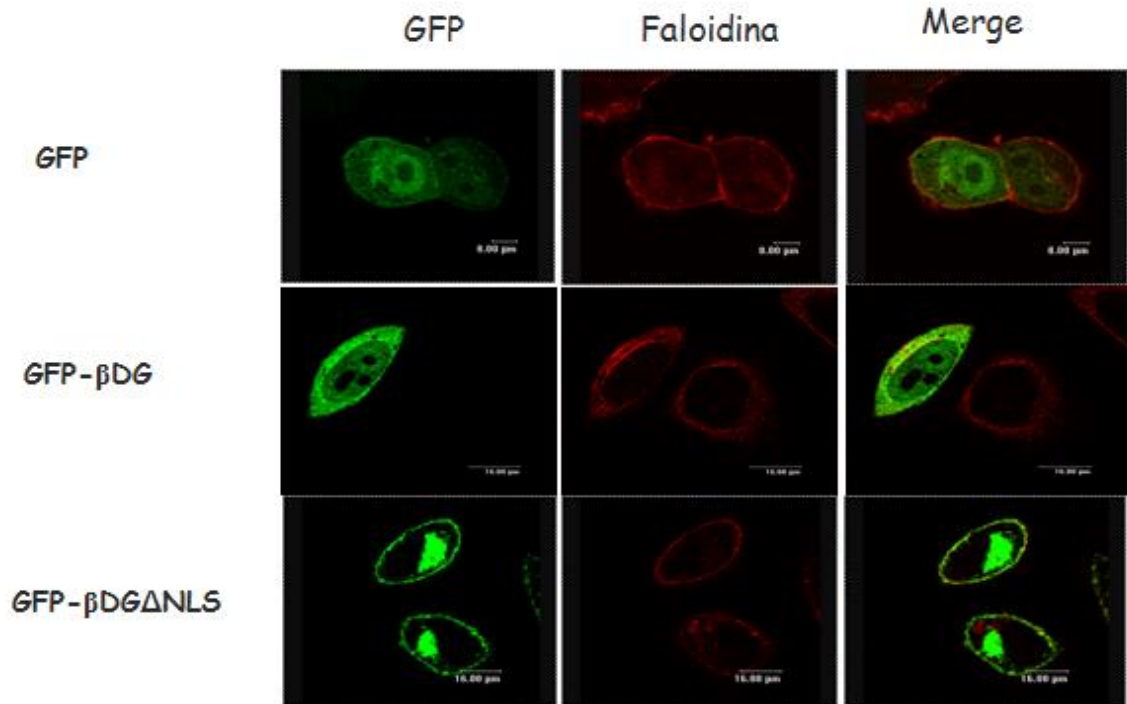


FIGURA 19. La entrada de  $\beta$ -DG al núcleo se bloquea al ser eliminada su NLS. (Lara-Chacón et al., 2010).

Así mismo, la ruta de transporte del  $\beta$ -DG hacia el núcleo requiere de las importinas  $\alpha$  y  $\beta$  (Lara-Chacón et al., 2010). Este mecanismo se inicia en el citoplasma, con el ensamble de un complejo formado por las importinas  $\alpha$  y  $\beta$  y la NLS de la proteína (Lange et al., 2007 y Cook et al., 2007). Éste complejo pasa a través del complejo de poro nuclear (CPN) y una vez dentro del núcleo la unión de RanGTP con la importina  $\beta$  disocia el complejo formado entre esta última y la importina  $\alpha$ . La importina  $\beta$  es transportada de regreso al citoplasma. De la misma manera sucede la disociación de la importina  $\alpha$  y la NLS de la proteína cargo, lo que libera la importina  $\alpha$  para que sea transportada de regreso al citoplasma, con la ayuda del factor de exporte nuclear CAS unido a RanGTP. En el citoplasma, RanGAP estimula la hidrólisis de GTP, liberando así a las importinas  $\alpha$  y  $\beta$  para que pueda iniciarse un nuevo ciclo de importe nuclear (Figura 20; Cook, Bono et al. 2007, Stewart 2007, Debler, Blobel et al. 2009)

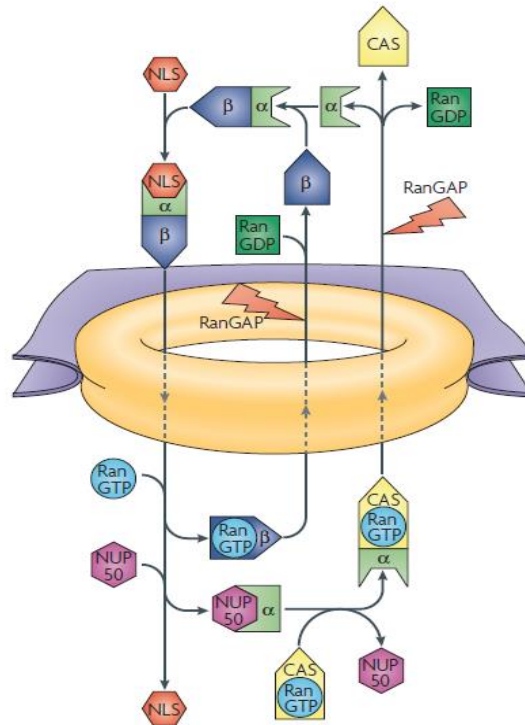


FIGURA 20.- Esquema general de importe nuclear de proteínas a través de importinas. Modificado de Murray et al., 2007.

Es importante mencionar que las proteínas de membrana nuclear interna (MNI) presentan un mecanismo de importación nuclear alternativo. Este mecanismo permite que las proteínas de MNI transiten desde el RE hacia el núcleo a través del poro nuclear, pero en vez de atravesar por el centro del poro nuclear lo hace de manera lateral (Figura 21). Existe controversia sobre la necesidad de una NLS para el transporte lateral ya que mientras las proteínas de la levadura si requieren de la NLS y del sistema de importinas, las proteínas de mamífero no la necesitan. (Kutay et al., 2006 y Braunagel et al., 2007).

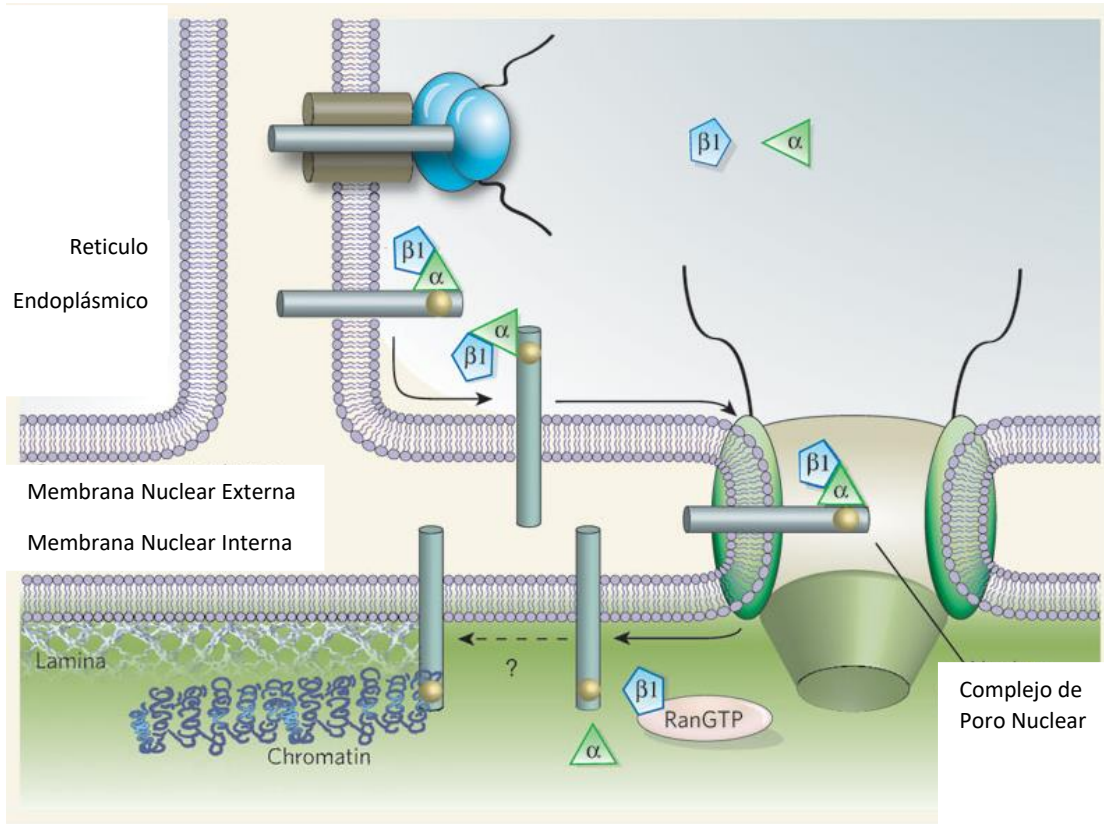


FIGURA 21. Transporte lateral de proteínas de levadura desde el RE hacia la membrana interna nuclear (Kutay et al., 2006)

Recientemente se demostró que el  $\beta$ -DG nuclear se encuentra glicosilado, lo cual indica que debe pasar a través del Retículo endoplásmico antes de llegar a núcleo. Sin embargo, la localización nuclear de una variante mutante del  $\beta$ -DG que es incapaz de sufrir N-glicosilación (T663A) revela que el transporte nuclear del  $\beta$ -DG es independiente de la glicosilación (Figura 22; Oppizzi, Akhavan et al. 2008).

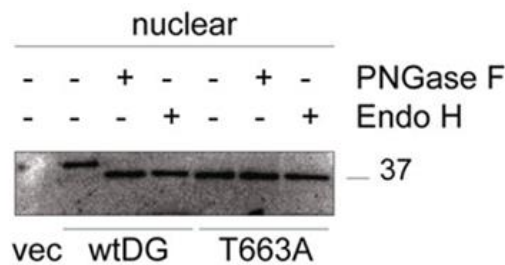


FIGURA 22.- Inmunodetección del  $\beta$ -DG y su variante mutante que no puede ser N-glicosilada (T663A) en fracciones nucleares y citoplásmicas tratadas con las enzimas PNGasa F o EndoH. (Oppizzi et al., 2008)

Así mismo, nuestro grupo de investigación demostró que la reorganización del citoesqueleto de actina mediada por la activación de Ezrina promueve el tráfico nuclear de  $\beta$ -DG (Figura 23). Es importante recalcar que la NLS presente en  $\beta$ -DG funciona también como sitio de unión para la Ezrina (Spence HJ., et al., 2004). Consistente con esta idea, nuestro grupo reveló que la translocación nuclear de  $\beta$ -DG inducida por Ezrina es dependiente de la integridad del citoesqueleto de actina (Figura 24; Vázquez-Limeta *et al.*, 2014).

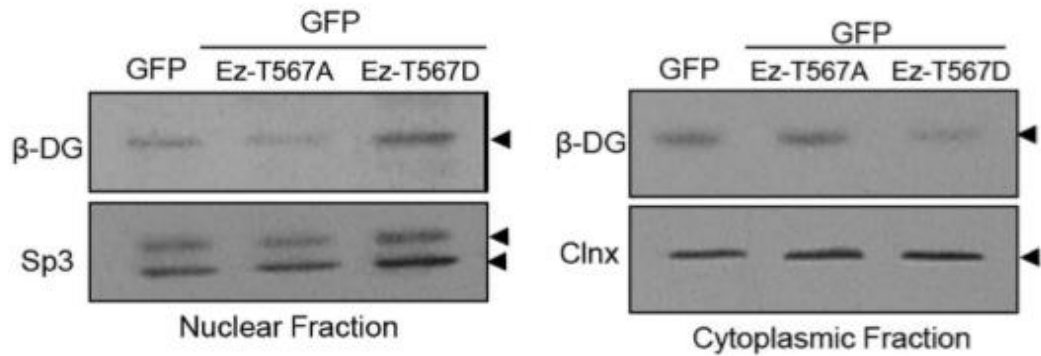


FIGURA 23.- La sobreexpresión de Ezrina activa facilita la translocación nuclear de  $\beta$ -DG. (Vázquez-Limeta *et al.*, 2014)

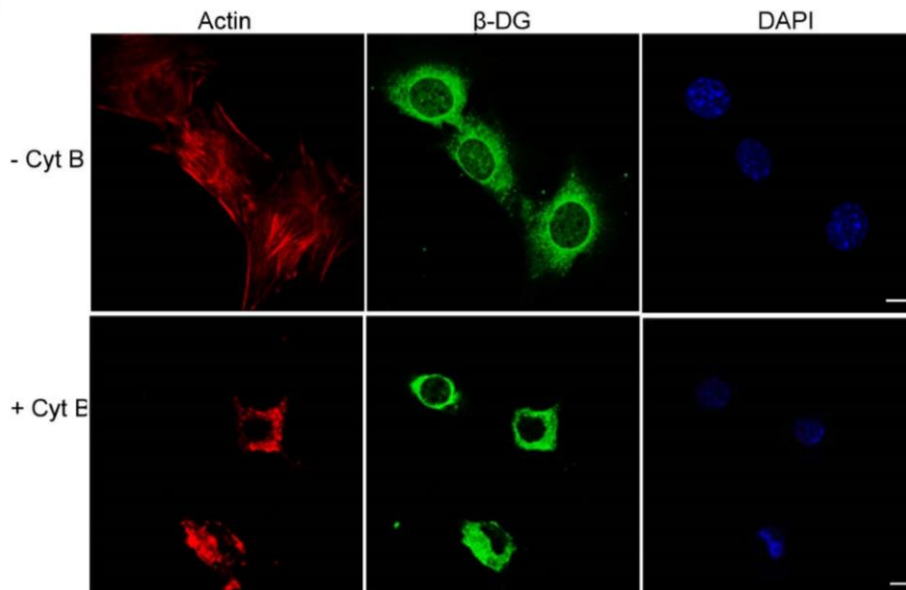


FIGURA 24.- La integridad del citoesqueleto de actina es indispensable para la translocación nuclear del  $\beta$ -DG. (Vázquez-Limeta *et al.*, 2014)

### Trafico nuclear del EGFR

El tráfico intracelular del  $\beta$ -DG es complejo ya que se localiza en diferentes regiones celulares, incluyendo la MP y el núcleo. El estudio de este tipo de proteínas con localización dual es escaso, pero una proteína que puede servir de guía para el análisis del  $\beta$ -DG es el Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial (EGFR por sus siglas en inglés; Carpenter y Liao, 2013). Recientemente se propuso que el EGFR se transporta desde la superficie celular hacia el núcleo a través de transporte retrógrado utilizando la ruta de endocitosis y pasando por Golgi y RE. Se han propuesto dos modelos para explicar el tráfico nuclear del EGFR; el primero modelo postula que el EGFR se libera del RE al citoplasma por medio del translocón Sec61 para después ser reconocido por las importinas y transportarse al núcleo: El modelo alternativo sugiere que el EGFR que proveniente de la MP llega al RE, en donde es reconocido por las importinas para dirigirse a la membrana nuclear por medio de transporte lateral. Finalmente es expulsado del ambiente membranoso para llegar al nucleoplasma por medio del translocón Sec61. Sin embargo, aún existe discrepancia sobre la presencia del translocón en la MNI (Lo et al., 2006; Liao y Carpenter., 2007; Wang et al., 2010). El viaje de EGFR hacia el aparato de Golgi es a través de los microtúbulos y por medio de su interacción con dyneina; la fusión con el Golgi ocurre a través de la acción de la proteína syntaxina-6. (Y. Du et al., 2014). El complejo COP-1 (Coat Protein Complex) que regula el transporte retrógrado hacia el RE, modula también el transporte nuclear de EGFR estimulado por EGF. Esto se demostró mediante el silenciamiento de la expresión de COP-1, lo que provocó la disminución de los niveles nucleares del EGFR (Wang et al., 2010) (Figura 25).

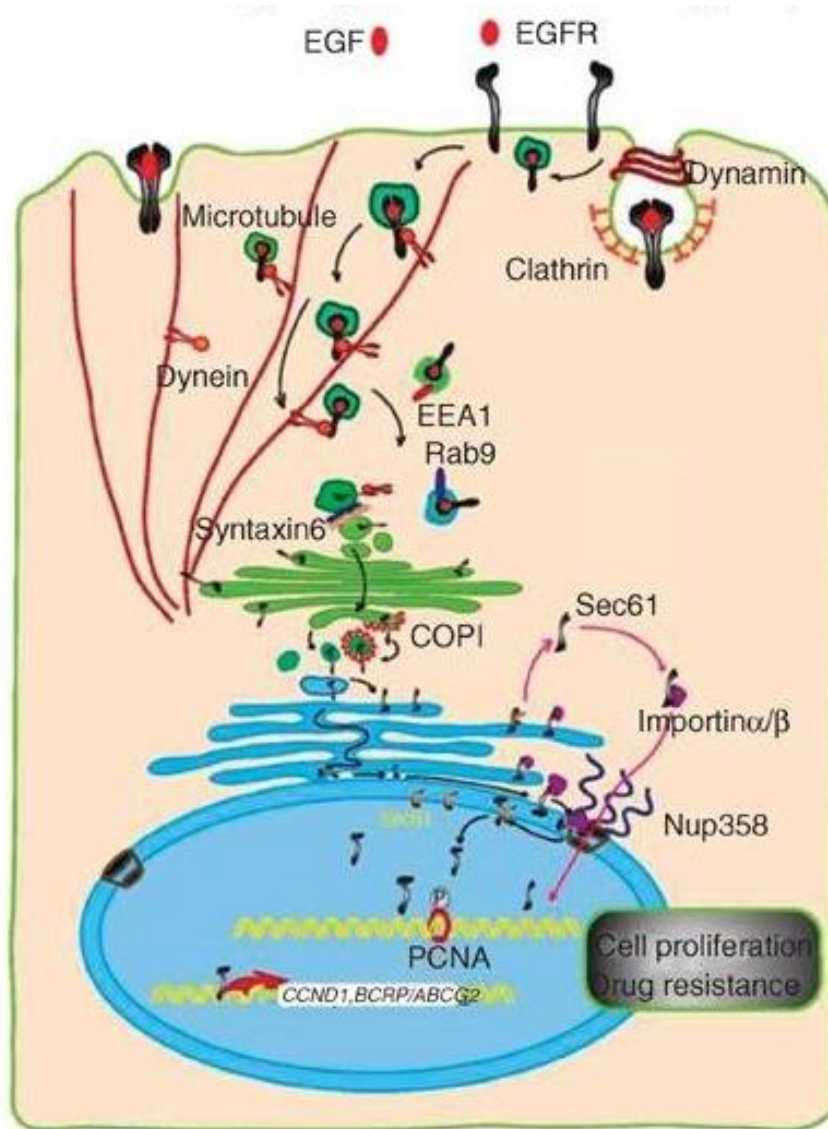


FIGURA 25.- Modelo esquemático del tráfico nuclear de EGFR. (Y. Du et al., 2014)

## JUSTIFICACIÓN

El  $\beta$ -DG es importado hacia el núcleo a través del reconocimiento de su NLS por las importinas  $\alpha 2/\beta 1$ . Sin embargo, el tráfico que sigue el  $\beta$ -DG hacia el núcleo se desconoce. La identificación de la ruta que permite que el  $\beta$ -DG se localice finalmente en el núcleo, nos permitirá conocer el mecanismo por medio de cual esta proteína conecta funciones de la MP con núcleo, así como los estímulos celulares que disparan su localización nuclear.



## HIPÓTESIS

- El  $\beta$ -DG viaja al núcleo mediante endocitosis desde la membrana plasmática y su transporte es favorecido por la fosforilación de Src en la Y892.

## OBJETIVOS

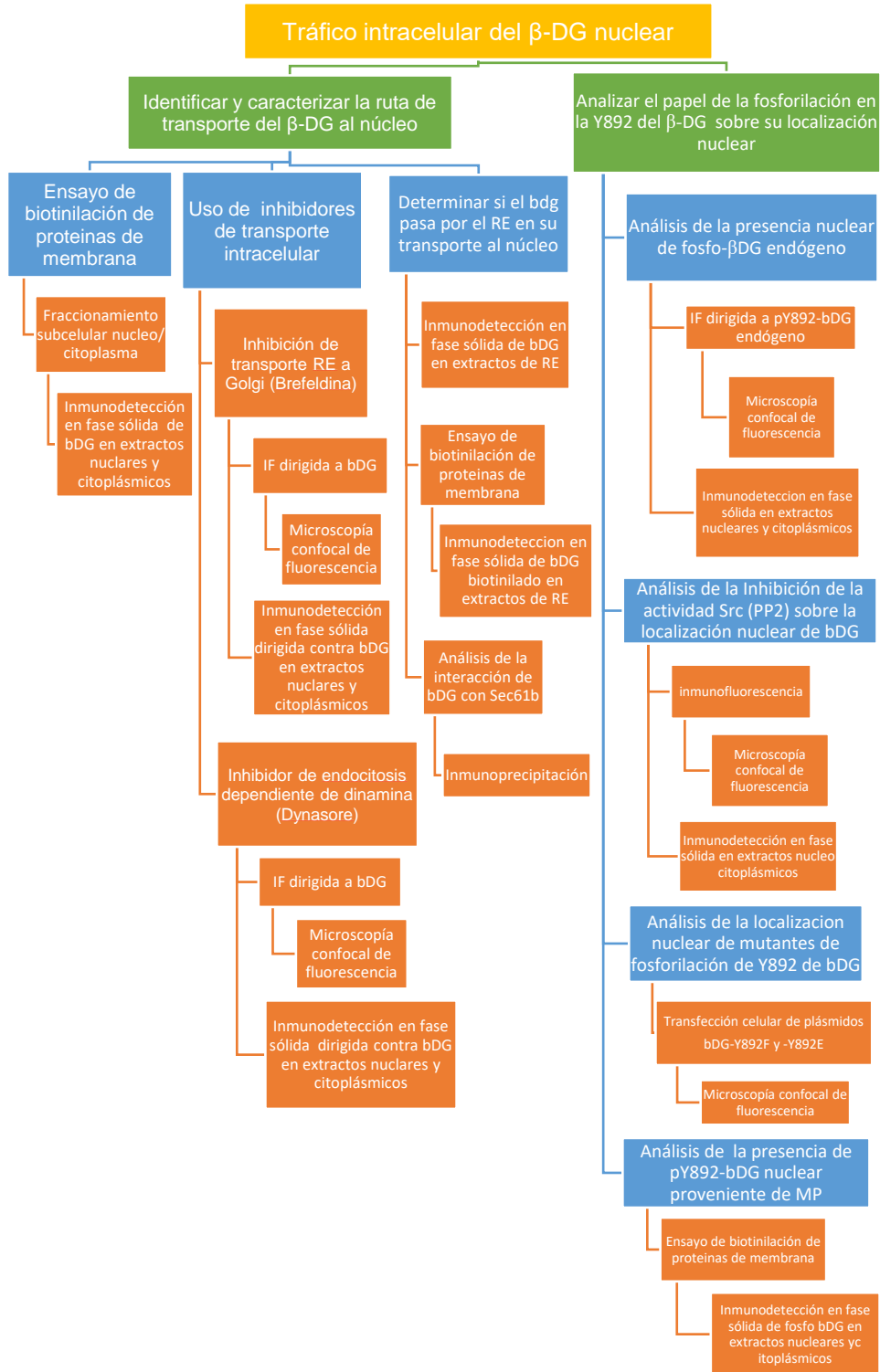
### *General*

- Establecer el tráfico intracelular que sigue el  $\beta$ -DG para llegar al núcleo.

### *Particulares*

- 1) Determinar el origen del  $\beta$ -DG nuclear.
  - a. Determinar si el tráfico del  $\beta$ -DG al aparato de Golgi es un requisito para llegar al núcleo.
  - b. Determinar si el  $\beta$ -DG nuclear proviene de la Membrana plasmática
- 2) Describir la ruta de transporte intracelular utilizado por el  $\beta$ -DG en su viaje al núcleo.
  - a. Determinar si el  $\beta$ -DG utiliza endocitosis para viajar al núcleo
  - b. Determinar si el  $\beta$ -DG pasa por el RE en su transporte al núcleo
  - c. Analizar la posible interacción del  $\beta$ -DG con la subunidad  $\text{sec61}\beta$  del translocón en su ruta de transporte al núcleo
- 3) Establecer la importancia de la fosforilación en Y892 del  $\beta$ -DG en su tráfico nuclear.
  - a. Analizar la presencia nuclear del  $\beta$ -DG endógeno fosforilado en Y892
  - b. Analizar la influencia de la inhibición de la actividad de la cinasa Src en la localización nuclear del  $\beta$ -DG
  - c. Analizar la localización subcelular de las proteínas mutantes de fosforilación de Y892 del  $\beta$ -DG, fusionadas a GFP.

**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**



Para identificar y caracterizar la ruta de transporte del  $\beta$ -DG nuclear se utilizaron varias estrategias. Primero se utilizó un inhibidor del paso de proteínas del Retículo endoplásmico (RE) al aparato de Golgi (Brefeldin A) para determinar si el  $\beta$ -DG llega directamente del RE al núcleo o viaja primero al aparato de Golgi. Posteriormente, para determinar si el  $\beta$ -DG nuclear proviene de la membrana plasmática (MP), se empleó un protocolo de biotinylación de proteínas de membrana para después realizar la búsqueda de  $\beta$ -DG biotinylado en la fracción nuclear. Para demostrar qué mecanismo utiliza en su viaje a núcleo, se inhibió la endocitosis dependiente de dinamina (Dynasore). Después, para determinar si el  $\beta$ -DG pasa por el RE en su transporte al núcleo, se biotinylaron las proteínas de membrana plasmática y se analizó la presencia de  $\beta$ -DG biotinylado en fracciones purificadas del retículo endoplásmico.

Para analizar la posible interacción de  $\beta$ -DG con Sec61 $\beta$ , se obtuvieron extractos totales de células C2C12 que expresaban Sec61 $\beta$ -GFP y se co-inmunoprecipitó a  $\beta$ -DG por medio del sistema GFP-TRAP.

Para analizar el papel de la fosforilación en la Y892 del  $\beta$ -DG sobre su localización nuclear, primero se caracterizó su localización subcelular en células con o sin vanadato, un inhibidor de fosfatasas de tirosina, utilizando un anticuerpo que detecta específicamente al  $\beta$ -DG fosforilado en Y892 (pY892- $\beta$ -DG). Posteriormente se inhibió la actividad de la cinasa Src (PP2) y se transfectaron vectores de expresión de  $\alpha\beta$ -DG mutantes de fosforilación (-Y892E y -Y892F).

Por último, para analizar el origen de la población de pY892- $\beta$ -DG nuclear, se biotinylaron proteínas de membrana plasmática y se precipitaron a partir de extractos proteicos nucleares usando el anticuerpo anti pY892- $\beta$ -DG.

## MODELO DE ESTUDIO

En este proyecto se utilizó la línea celular C2C12, correspondiente a mioblastos derivados de ratón, *Mus musculus*. Estas células fueron originalmente derivadas en los años 70's y son ampliamente usadas en muchos laboratorios de investigación. La línea celular fue establecida por el Dr. Yaffe y O. Saxel en 1977. Son células de crecimiento relativamente rápido, se adhieren a la superficie de cultivo por sí mismas y también son de rápida diferenciación a músculo cuando se cultivan con 10% suero de caballo. El medio de crecimiento de estos fibroblastos requiere de suero fetal bovino al 10%. Es la línea celular que más se ha utilizado en el estudio del  $\beta$ DG y el DGC.

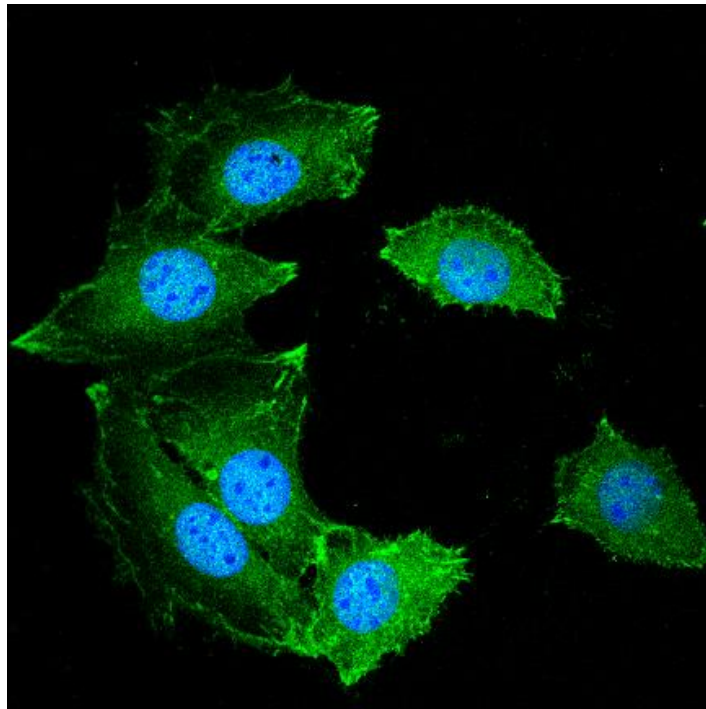


FIGURA 26. Inmunofluorescencia indirecta de células C2C12 con anticuerpo anti bDG (Y893) y contrateñidas con DAPI (azul) para señalar el núcleo. Anticuerpo secundario anti conejo acoplado a FITC (verde). Microscopía confocal. 60X

### **METODOLOGIA**

#### **Cultivo celular**

La línea celular C2C12, correspondiente a mioblastos de ratón, fueron utilizados en todos los experimentos de este trabajo. Las células fueron crecidas en Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), 50 U/ml de penicilina, 50  $\mu$ g/ml de estreptomycin y 1mM de Piruvato de Sodio a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. El medio fue renovado cada 2 o 3 días con medio fresco. Cuando fue necesario, las células se cultivaron en medio DMEM reducido de suero (5%) para aplicar los tratamientos. No se permitió el crecimiento en alta confluencia para evitar la pérdida de la población de mioblastos.

#### **Transformación de células DH5 $\alpha$ .**

Se mezclan 200ng de DNA en 50 $\mu$ l de células DH5 $\alpha$  y se incuban a 4°C por 30 minutos, se realiza choque térmico a 42°C por 90 segundos y se incuban a 4°C por 2 minutos. Se le agrega a la mezcla 800 $\mu$ l de medio LB sin antibiótico y se incuban en agitación constante (300 rpm) por 1hr. Se siembran 150 $\mu$ l del cultivo en una caja Petri con medio LB sólido con kanamicina y se incuban durante toda la noche a 37°C.

#### **Purificación a partir de gel de agarosa.**

Se preparó un gel de agarosa al 0.8%, se cargó el producto de la digestión. Posteriormente se cortó la rebanada del gel conteniendo la banda de interés y se purificó mediante el PureLink™ Quick Gel Extraction Kit de Invitrogen™ siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### **Purificación de plásmidos a partir de cultivos bacterianos.**

##### *Pequeña escala*

Se creció una colonia bacteriana DH5 $\alpha$  con el plásmido de interés en 5ml de medio LB (Luria-Bertoni) con antibiótico (el cual dependerá del plásmido de interés) durante 8hrs a 37°C con movimiento circular continuo (300 RPM). Posteriormente

se procedió a purificar el plásmido mediante el QIAGEN Plasmid Mini Kit y se siguieron las indicaciones del proveedor.

### *Mediana escala*

Se creció una colonia bacteriana DH5 $\alpha$  con el plásmido de interés en 3ml de medio LB (Luria-Bertoni) con antibiótico (dependerá del plásmido de interés) durante 8hrs a 37°C en agitación (300 RPM). Posteriormente se toman 100 $\mu$ l del medio y se diluyen en 50ml de LB con el mismo antibiótico, se dejan incubando a 37°C por 16hrs. Se procede a purificar el plásmido mediante el QIAGEN Plasmid Midi Kit y se siguieron las indicaciones del proveedor.

### **Transfección celular**

Las células fueron transfectadas usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), siguiendo el protocolo del proveedor y analizadas 24 hrs post-transfección. Para la transfección de células que se analizaron por microscopía, se cultivaron células C2C12 en cubreobjetos en cajas p35. 24 horas después de la siembra, cuando las células se encontraban al 70% de confluencia, se cambió el medio suplementado por medio fresco atemperado, suplementado de la misma manera. Se mezclaron 2 $\mu$ g de cada construcción purificada por midiPrep con 4 $\mu$ l de Lipofectamina en 200  $\mu$ l de medio libre de suero. Después de 30 minutos, la mezcla de transfección se agregó al cultivo celular por goteo y las células se incubaron nuevamente durante 24 horas. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% pH 7.5 por 10 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0.2% en PBS (phosphate-buffered saline por sus siglas en inglés) durante 10 minutos, se lavaron 3 veces con 1ml de PBS y se bloquearon con gelatina al 0.5% en suero bovino fetal al 1% en PBS durante 15 minutos. Se sacó el cubreobjetos de la caja de cultivo utilizando unas pinzas y una aguja y se incubó la cara que contiene las células sobre una gota de 50  $\mu$ L de DAPI 0.2 mg/ml, (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en una dilución 1:600 durante 5 minutos en cámara húmeda y oscura, se enjuagaron las células 2 veces 5 con PBS y posteriormente 5 veces con agua y se montaron en portaobjetos con VectaShield (Vector laboratories Inc.). Finalmente se analizaron al microscopio de fluorescencia.

Para la inmunodetección en fase sólida, se sembraron células en cajas p60. Para la mezcla de transfección se usaron 4  $\mu$ g de DNA plasmídico y 8  $\mu$ L de Lipofectamina 2000, de la misma manera que se describió anteriormente. Después de 24 horas, se cosecharon las células para su procesamiento.

### **Inmunofluorescencia indirecta**

Se colocó un cubreobjetos dentro de cada caja de Petri p35. Se sembraron células C2C12 a 37°C por 24hrs. Las células se fijaron con PFA al 4% pH 7.5 por 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con 1mL de PBS, se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0.2% en PBS durante 12 minutos, se bloquearon con gelatina al 0.5% en suero bovino fetal al 1% en PBS durante 15 minutos. Se sacó el cubreobjetos de la caja de cultivo utilizando unas pinzas y una aguja y se incubó la cara que contiene las células sobre una gota (50  $\mu$ L) de anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C con una dilución específica (ver tabla de condiciones de uso de anticuerpos) en PBS, en una cámara húmeda. Al siguiente día se enjuagó 2 veces 5 con PBS, se incuban con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda protegida de la luz. Para teñir los núcleos se lavan de nuevo con PBS y se incuban con DAPI 0.2 mg/ml, (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en una dilución 1:600 durante 5 minutos a temperatura ambiente, o con Ioduro de Propidio (IP, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) 500 $\mu$ g/ml en PBS por 10 min a temperatura ambiente en cámara húmeda oscura. Se enjuagaron las células 2 veces 5 con PBS y posteriormente 5 veces con agua y se montaron en portaobjetos con VectaShield (Vector laboratories Inc. Burlingame, CA, USA). Finalmente se analizaron al microscopio.

### **Extracción de proteínas totales**

Para obtener extractos totales, las células se lavaron 2 veces con 1mL de PBS frío y se colectaron por centrifugación a 6 000 rpm durante 15 minutos a cuatro grados centígrados. El botón se resuspendió en solución de lisis que contiene (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% (v/v) Tritón X-100), suplementado con coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se incubaron



durante 30 minutos a cuatro grados centígrados en agitación constante, se sonicaron a 4 micrones por 2 minutos en hielo y se pre-clarean a 13 000 rpm por 2 minutos a 4 grados centígrados.

### **Fraccionamiento núcleo citoplásmico**

Para obtener los extractos nucleares y citoplásmicos, las células se lavaron 2 veces con 1mL de PBS frío y se colectaron por centrifugación a 6 000 rpm durante 15 minutos a cuatro grados centígrados. El botón se resuspendió en bufer TM (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM PMSF) suplementado con 1X inhibidores de proteasas y fosfatasas (2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, y 25 mM NaF) e incubó en hielo durante 10 minutos. Los núcleos se separaron del citosol usando un homogeneizador de vidrio Dounce (30 golpes con el pistilo B) y centrifugando a 6 000 rpm por 15 minutos a 4 grados centígrados. El sobrenadante contiene la fracción citosólica. El botón nuclear se resuspendió en 1mL de bufer I (0.32 M Sacarosa, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM Mg(COO)<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.5% (v/v) NP40) y 1 ml de bufer II (2 M Sacarosa, 2 mM Mg(COO)<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) y se purificó por centrifugación a 16 000 rpm a través de un gradiente de sacarosa por 1h a cuatro grados centígrados. Los núcleos se recuperaron después en bufer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% (v/v) Triton X-100), suplementado con coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se mezclaron usando un agitador Vortex durante 30 minutos a cuatro grados centígrados, se sonicaron a 4 micrones por 2 minutos y se pre-clarean a 13 000 rpm por 2 minutos a 4 grados centígrados.

### **Obtención de fracciones de RE purificadas**

La purificación del Retículo Endoplásmico se realizó en base al protocolo ya descrito, (Liao, 2007). Las células C2C12 cultivadas en 15 cajas Petri p100 se cosecharon y lavaron con PBS frío. Después, las células se resuspendieron en 1mL de solución homogeneizadora (10mM Tris-HCl pH7.5, 250mM Sacarosa, 25mM NaF, 10mM Na<sub>3</sub>MO<sub>4</sub>, 2mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 1x de inhibidores de proteasas, 1mM PMSF) y sonicaron (3.5 micrones, 10 segundos, 3 veces). La suspensión se centrifugó a

12000 g, durante 20 minutos a 4 grados centígrados y el botón se colectó como la fracción nuclear para análisis posteriores. El sobrenadante, correspondiente a la fracción citoplásmica, se transfirió a un tubo de ultracentrífuga y se centrifugó a 100 000g durante 60 minutos, a 4 grados centígrados. El sobrenadante se colectó como la fracción citosólica para análisis posteriores. El botón, fracción microsomal, se resuspendió en solución homogeneizadora y se mezcló con Optiprep 60% a una concentración final de 20% de Optiprep. La fracción microsomal se centrifugó después para generar un gradiente de densidad Optiprep (200 000g durante toda la noche, a 4 grados centígrados). Se colectaron fracciones por goteo que después fueron analizadas por inmunodetección en fase sólida. Las fracciones enriquecidas en Calnexina se almacenaron como las fracciones de Retículo Endoplásmico puras.

### **Inmunodetección en fase sólida**

Se cuantifican las proteínas mediante método Bradford. A continuación, se cargan 50  $\mu$ g de extractos proteicos en gel SDS-poliacrilamida al 10% y se tiñe con azul de Coomasie (Coomassie Brilliant Blue R-250 #1610400, Bio-Rad) para ver la integridad del extracto. Se carga otro gel de acrilamida al 10% con 80 $\mu$ g de proteínas y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Membrane, 0.45  $\mu$ m, 1620115, Bio-Rad) utilizando una cámara de transferencia semihúmeda (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durante 50 minutos a 40 miliAmperes constantes. Se tiñe la membrana con Rojo Ponceau S (Bio-Rad) para observar que las proteínas se hayan transferido correctamente. Se realiza un lavado con agua destilada para retirar el colorante y comenzar la inmunodetección. Las membranas se bloquean por 1h en TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20) al 15% de leche ligera en grasa (Svelty en polvo, sin grasa). Posteriormente se incuban toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario adecuado. Se realizan 3 lavados con TBST para retirar el exceso, se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente, a TA, y se vuelven a lavar 3 veces con TBST. Para revelar la membrana se utiliza el sistema de análisis para Inmunodetección en Fase sólida ECLTM (Enhanced chemiluminescence)

(Amersham Pharmacia, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) sobre placas de revelado marca KODAK. El revelado se realiza en un cuarto oscuro con luz roja

Para la foto documentación y análisis de datos se utilizó el foto documentador GelDoc EZ (BioRad) y el software incluido en el equipo. Se cuantificaron las densidades de las bandas de 43kDa de  $\beta$ -DG, normalizadas previamente con la intensidad del control de carga correspondiente. Para la relación núcleo/citoplasma se utilizó la siguiente fórmula:  $(\text{Intensidad de la banda de } \beta\text{-DG} / \text{Intensidad de la banda de la proteína control de carga nuclear}) / (\text{Intensidad de la banda de } \beta\text{-DG} / \text{Intensidad de la banda de la proteína control de carga citoplásmica})$ .

### Anticuerpos utilizados

Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: anti  $\beta$ -DG (JAF) (Rivier F. et al., 1999), anti  $\beta$ -DG monoclonal (7D11) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA), anti  $\beta$ -DG monoclonal (MANDAG) (donación de Steve Winder, Universidad de Sheffield), anti pY892-bDG (Y893) (Novus Biologicals), anti Lámina A/C policlonal (sc-20681) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA), anti GAPDH (6c5) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA), SP3 (D-20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA), anti Lámina B1 (H90) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA) y anti EEA1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., USA)

<b>Anticuerpo PRIMARIO</b>	<b>Dilución Inmunofluorescencia</b>	<b>Dilución Inmunodetección en fase sólida</b>
Anti $\beta$ -DG (JAF)	1:50	1:500
Anti $\beta$ -DG (7D11)	1:100	1:750
Anti $\beta$ -DG (MANDAG)	1:100	1:1000
Anti fosfo- $\beta$ -DG (Y893)	1:100	1:500
Anti GFP (FL)	No aplica	1:1000

Anti Actina (H196) de ratón	No aplica	1:2000
Anti Calnexina (H70)	No aplica	1:500
Anti Lámina B1 (H90)	No aplica	1:2000
Anti Lámina A/C	No aplica	1:1500
Anti GAPDH (6c5)	No aplica	1:2000
Anti EEA1	No aplica	1:500
Anti SP3 (D-20)	No aplica	1:500

Anticuerpos SECUNDARIOS (IF)	Fluorocromo acoplado	Origen	Dilución	Marca
Anti IgG de conejo	FITC	cabra	1:50	Zymed Laboratories, Inc. San Francisco, CA, USA
Anti IgG de ratón	FITC	conejo	1:50	Invitrogen
<b>Anticuerpos secundarios (Inmunodetección en fase sólida)</b>				
Anti IgG de conejo			1:30 000	Millipore
Anti IgG de ratón			1:10 000	Millipore

### Biotinilación de proteínas de MP

Se siguió el protocolo descrito en (Wang YN, et al., 2010). Células crecidas al 90% de confluencia se incubaron con 0.25 mM de biotina sulfo-NHS-LC-biotin (Thermo-Fisher Scientific, Rockford, IL) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se hizo un lavado con 100mM de glicina en PBS para detener la reacción. Inmediatamente se realizaron extractos nucleares y citoplásmicos. Para precipitar las proteínas biotiniladas se cuantificaron e incubaron

250 mg de extracto proteico con 20 mL de perlas de agarosa acoplada a Streptavidina (Streptavidin-agarose beads, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), en tubos eppendorf de 1.5 mL, durante toda la noche a 4°C y en agitación suave. Se centrifugaron las perlas a 10, 000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se lavaron 3 veces con solución fría de Tritón X-100 al 0.1% en PBS. El precipitado se solubilizó en buffer de carga (6X SDS-PAGE simple loading buffer) y calentó por 10 minutos para la Inmunodetección en Fase sólida.

### **Inhibición de transporte del RE al Aparato de Golgi.**

Se cultivaron células C2C12 a una confluencia de 70% durante 24 horas. Al siguiente día, se lavaron las células con PBS y se incubaron con 2.5  $\mu$ g/mL de Brefeldin A (BFA) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en DMSO, durante 8 horas a 37°C en medio DMEM fresco reducido (al 5% de suero fetal bovino), pues el suero disminuye la eficiencia del inhibidor. Después del tiempo indicado, se lavaron las células 2 veces con PBS frío que contenía la misma concentración de inhibidor. Como controles negativos se trataron las células con DMSO al 0.08% (vehículo) en los mismos volúmenes usados de BFA. Las células se fijaron en frío por 20 minutos (PFA 4%) para la inmunofluorescencia o se lisaron en el caso de inmunodetección en fase sólida. Como control positivo de la inhibición se analizó la deslocalización de la proteína de fusión Golgin-GFP por inmunofluorescencia.

### **Ensayo de endocitosis**

Se siguió el protocolo ya descrito en (Macia E. et al., 2006). Para asegurar el funcionamiento del tratamiento inhibidor de endocitosis se cultivaron células en cubreobjetos a una confluencia de 50% durante 24 horas. Al siguiente día, al 75% de confluencia, se lavaron las células y se incubaron con 80 $\mu$ M de 3-Hydroxy-naphthalene-2-carboxylic acid (3,4-dihydroxy-benzylidene)-hydrazide hydrate #D7693 (Dynasore, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) durante 30 minutos a 37°C o 0.8% de DMSO (mismo volumen que dynasore) en medio DMEM fresco reducido (al 5% de suero fetal bovino), pues el suero puede disminuir la eficiencia del inhibidor. Después del tiempo indicado, se agrega al mismo medio, la transferrina marcada fluorescentemente con Alexa Fluor 594 #T13343 (Thermofisher, Molecular

Probes by life technologies) a una concentración final de 25ug/ml y se incuban durante 5 minutos a 20°C. Se lavaron 3 veces con 80µM de Dynasore o DMSO en PBS y se incubaron a 37°C (Para permitir la endocitosis) con medio DMEM fresco suplementado (10% de suero fetal bovino) sin transferrina durante 15 minutos. Las células se lavan con un buffer ácido (0.1M glicina, 150 mM NaCl a pH 3.0) sobre una cama de hielo para remover la transferrina unida a la superficie celular. Las células se fijan y se tiñen los núcleos con DAPI. Se montan los cubreobjetos en un portaobjeto con Vecta Shield y se analiza en el microscopio.

Para analizar el efecto de la inhibición de endocitosis sobre la localización subcelular de B-DG, se incuban las células durante 3 horas con Dynasore, pero sin transferrina. Posteriormente se lavaron las células con PBS frío que contiene la misma concentración del inhibidor. Se procede a la inmunofluorescencia o a la inmunodetección en fase sólida.

### **Enriquecimiento de proteínas fosforiladas**

Para enriquecer la población de pY892-B-DG en las células, se utilizó un inhibidor de las fosfatasa de tirosina y serina, el vanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) #S6508 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Las células C2C12 se cultivaron por 24 horas al 70% de confluencia y se incubaron por 3 horas con 2mM de ortovanadato o DMSO (vehículo) en medio DMEM a 37°C. Como control positivo se analizó la inducción de la fosforilación de ERK por inmunodetección en fase sólida en extractos totales (datos no mostrados).

### **Ensayo de inhibición de fosforilación.**

Para inhibir la actividad de Src, se utilizó el inhibidor PP2 #P0042 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA,). Se cultivaron células C2C12 a una confluencia de 50% durante 24 horas. Al siguiente día, al 75% de confluencia, se lavaron las células y se incubaron con 10µM de PP2 en DMSO, durante 3 horas a 37°C en medio DMEM fresco reducido (al 5% de suero fetal bovino), pues el suero disminuye la eficiencia del inhibidor. Después del tiempo indicado, se lavaron las células 2 veces con PBS frío que contenía la misma concentración de inhibidor. Como controles negativos se

trataron las células con PP3 (inhibidor inactivo), o 0.08% de DMSO (vehículo) en los mismos volúmenes usados de PP2. Las células se analizaron por inmunofluorescencia o inmunodetección en fase sólida. Como control positivo se analizó la inhibición de la fosforilación p- $\beta$ -DG en extractos totales.

### **Inmunoprecipitación**

A partir de cultivos transfectados con los plásmidos pAcEGFP-N1 o pAcEGFP-Sec61, se obtuvieron extractos totales de proteínas y se alicuotaron en tubos de 500  $\mu$ g. Por otro lado, 20  $\mu$ l de perlas GFP-TRAP<sup>®</sup> (Cromotek, Alemania), se lavaron 3 veces con solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 1mM PMSF y 1x Complete<sup>™</sup> [Sigma-Aldrich]), mediante centrifugaciones de 2500xg por 3 minutos a 4 °C. Posteriormente, las perlas se equilibraron mediante su incubación con 500  $\mu$ l de la solución de lisis por 1 hora en agitación a 4 °C y pasado el tiempo, se eliminó el sobrenadante mediante centrifugación. Las perlas lavadas y equilibradas se dividieron en 2 volúmenes iguales y se agregaron a los tubos de extractos de proteínas de los cultivos que expresaban EGFP y EGFP-Sec61 y se incubaron durante 4 horas en agitación a 4 °C. Se centrifugaron los tubos y se recuperó el sobrenadante (fracción no unida). Las perlas se lavaron 2 veces con 500  $\mu$ l de solución de lisis mediante centrifugaciones y se descartó el sobrenadante. Finalmente, las perlas se resuspendieron en 20  $\mu$ l de buffer Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol y 0.125 M Tris-HCl pH 6.8) para posteriormente ser analizadas mediante inmunodetección en fase sólida (fracción unida).

### **Microscopía confocal**

Para adquirir las imágenes en confocal, se utilizó el microscopio confocal de laser TCP-SP5, Leica (Heidelberg Germany), utilizando un objetivo de inmersión en aceite Plan Neo Fluor 63X (NA=1.4). Se realizaron 12 cortes confocales por campo desde la parte basal a la apical. La colocalización del FITC y DAPI, se analizó en las mismas secciones ópticas para los dos canales a través del eje Z de la muestra. Las imágenes se digitalizaron y analizaron utilizando el programa Image J 1.62 para

determinar la relación de la intensidad de fluorescencia nuclear con respecto a la citoplásmica (Fn/c) (Bárbara Lara-Chacón *et al.*, J. Cell. Biochem.). Se determinó la significancia estadística usando la prueba T de Student.

### Plásmidos utilizados

El plásmido pEGFP-N1 fue obtenido de Clontech (#60851) (Figura 28). El plásmido pECFP-N1-Golgi fue donado por el laboratorio del Dr. Luis Vaca del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (Figura 27). Los plásmidos de expresión que codifican  $\alpha\beta$ -DG completo y las mutantes de fosforilación fusionadas a GFP ( $\alpha\beta$ -DG-EGFP-N1,  $\alpha\beta$ -DG-Y892F-EGFP-N1 y  $\alpha\beta$ -DG-Y892E-EGFP-N1) fueron donados por el laboratorio del Dr. Steve Winder, de Inglaterra y descritas previamente (Batchelor *et al.*, Cell Cycle, 2007) (Figura 30). El plásmido pAcGFP-C1-Sec61beta fue donado por el Dr Tom Rapoport (Addgene plasmid #15108) y descrito en Voeltz GK, *et al.*, Cell, 2006 (Figura 29).

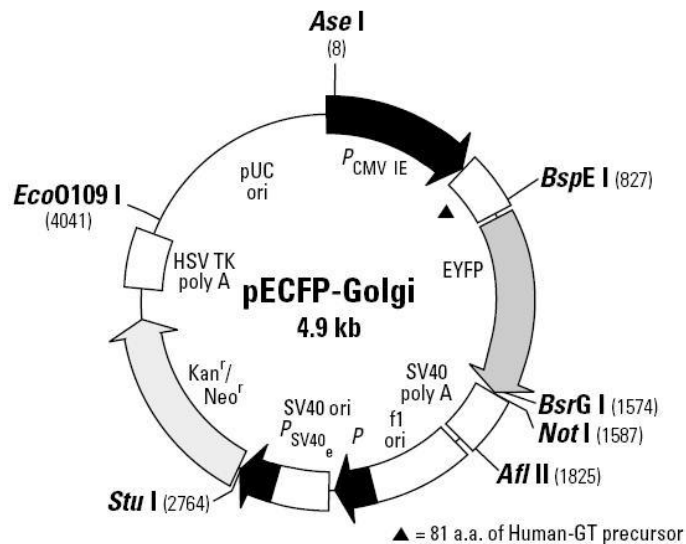


FIGURA 27 Mapa del vector pECFP-Golgi



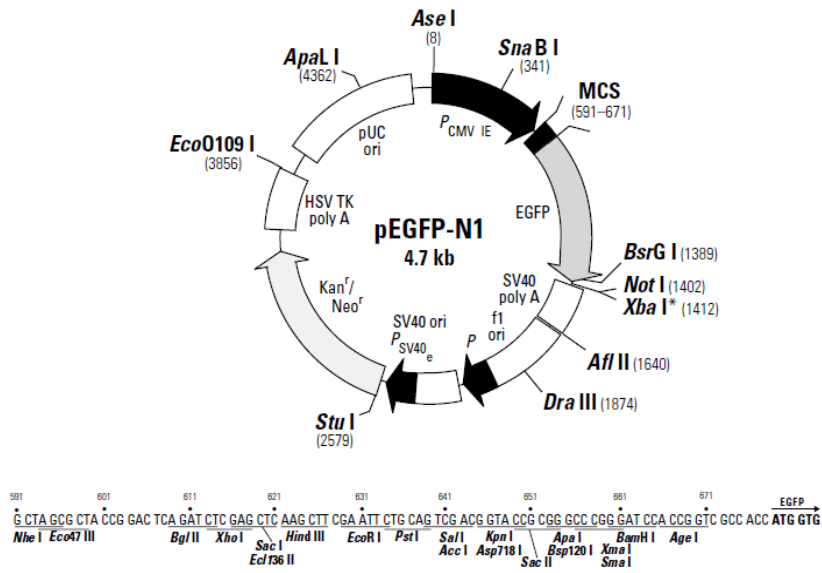


FIGURA28. Mapa del vector pEGFP-N1

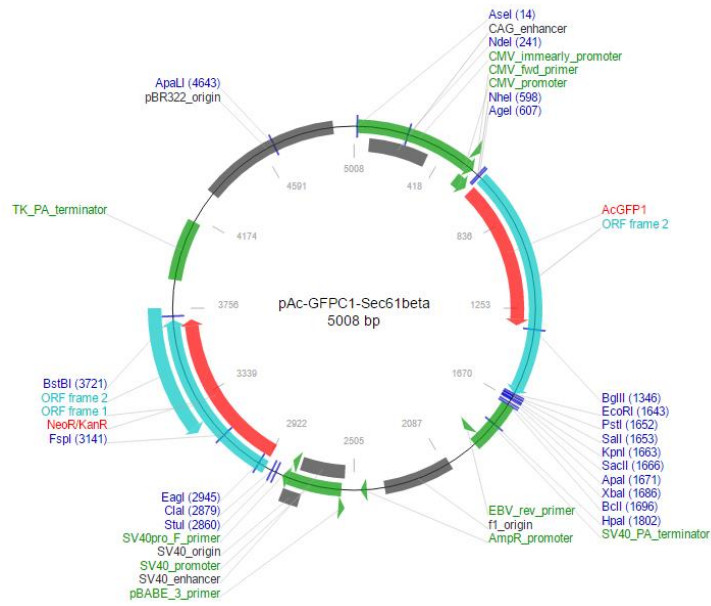


FIGURA29. Mapa del vector pAc-GFPC1-Sec61beta

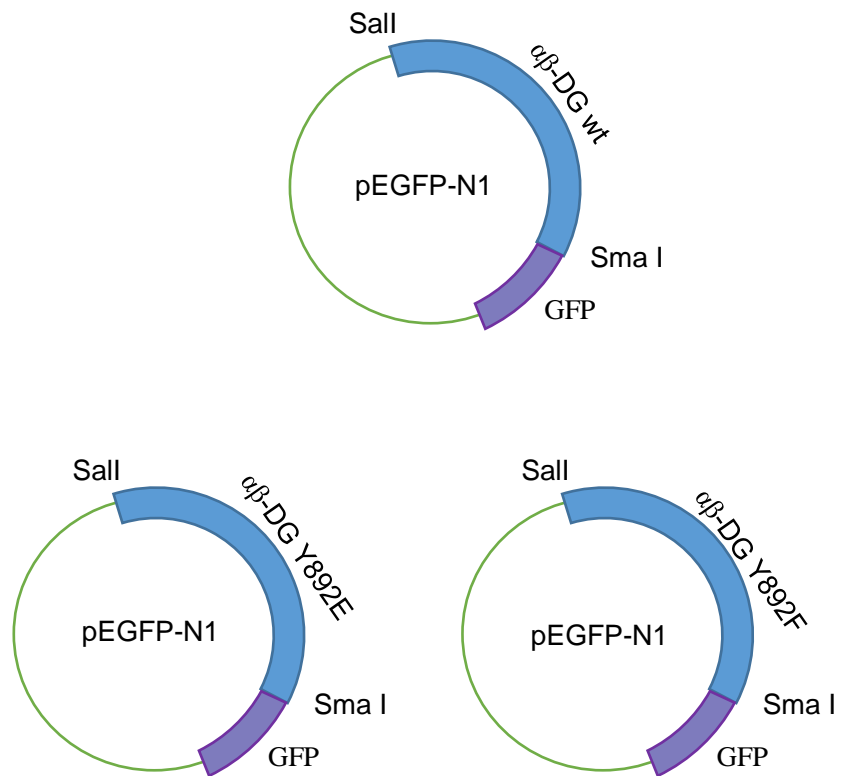
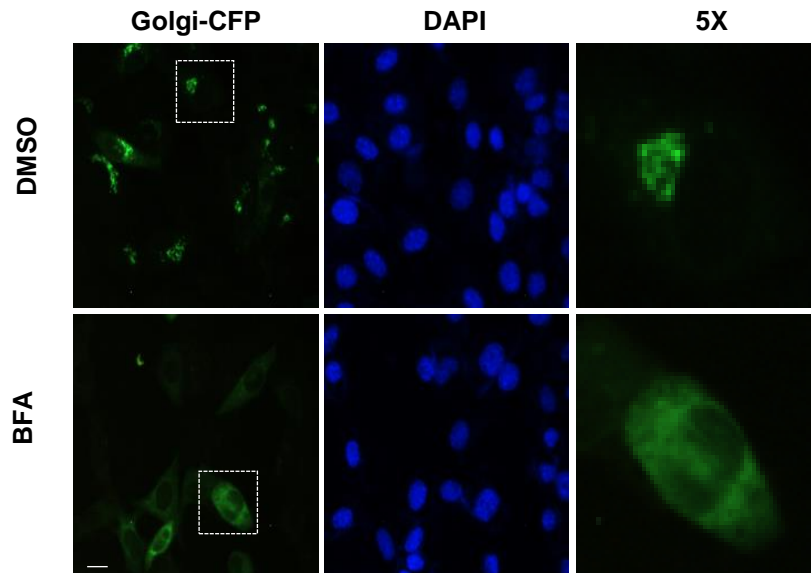


FIGURA30. Mapa resumido de los plásmidos de expresión de  $\alpha\beta$ -DG wt, -Y892F y -Y892E fusionadas a GFP

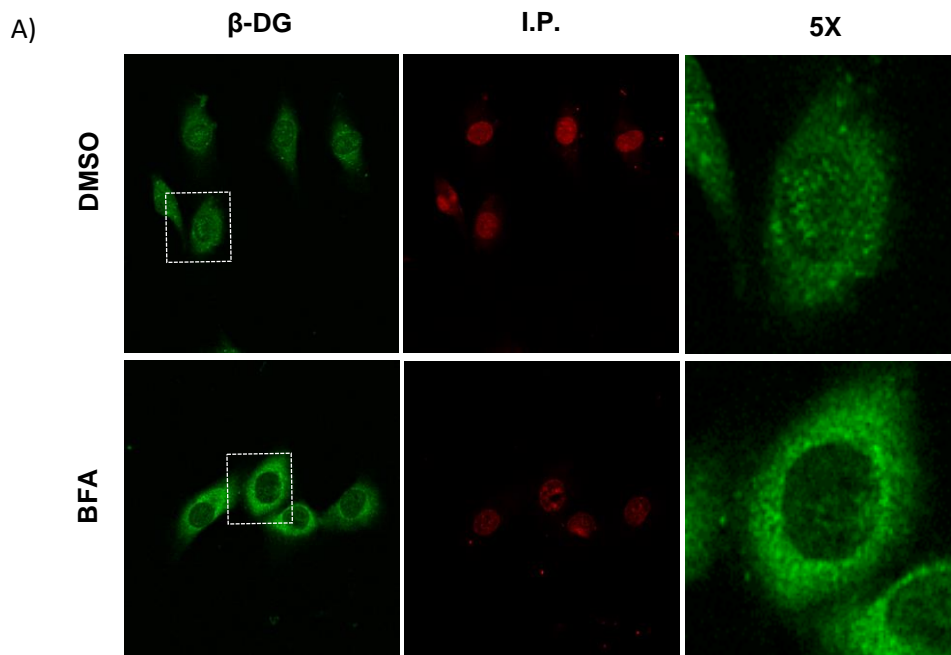
**RESULTADOS****CAPITULO 1. ORIGEN DEL BDG NUCLEAR****1.1 El  $\beta$ -DG requiere transitar del Retículo Endoplásmico hacia el Golgi antes de localizarse en el núcleo**

El  $\beta$ -DG sufre varias modificaciones post-traduccionales durante su tránsito entre el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi, entre ellas se encuentra la N-glicosilación (Medzirazki 2005). Con la finalidad de demostrar si el  $\beta$ -DG requiere transitar del RE hacia el Golgi antes de llegar al núcleo, tratamos a las células C2C12 con Brefeldin A (BFA), un inhibidor del transporte anterógrado de proteínas del RE al Aparato de Golgi y analizamos posteriormente la localización subcelular del  $\beta$ -DG. Para probar la eficacia del tratamiento se transfectaron las células C2C12 de manera transitoria con el vector pECFP-Golgi, el cual expresa la proteína ECFP fusionada a los primeros 81 residuos aminoácidos de la proteína marcadora de Golgi  $\beta$  1, 4-galactosiltransferasa humana (1, 4-GT; ECFP-Golgi). La proteína de fusión ECFP-Golgi se redistribuyó del Golgi hacia el RE lo que indica que se bloqueó su tráfico intracelular (Figura 31).

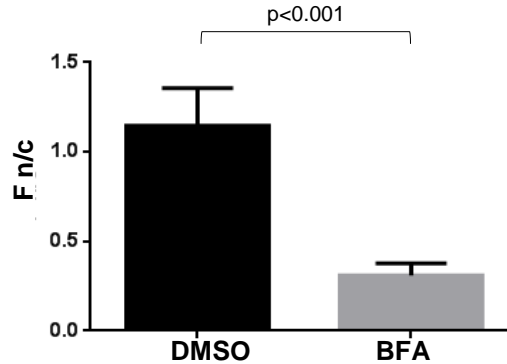


**FIGURA 31. El tratamiento con BFA bloquea el tránsito del RE al Golgi de la proteína de fusión ECFP-Golgi.** Las células C2C12 cultivadas sobre cubreobjetos y transfectadas con el vector pECFP-Golgi por 12 hrs se trataron con BFA a una concentración de 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o solo con DMSO (vehículo) durante 1hr. Enseguida se fijaron y se tiñeron los núcleos con DAPI previo a su análisis por microscopía confocal. Se muestra un campo representativo de cada condición experimental. La proteína de fusión ECFP-Golgi cambió su localización del Golgi (células tratadas con DMSO) hacia el RE después del tratamiento con BFA ( $n=150$  células). La barra micrométrica representa 10  $\mu\text{m}$ . Se indica con un recuadro la célula ampliificada (5X).

De manera interesante, las células tratadas con BFA exhibieron una disminución drástica de la tinción de  $\beta$ -DG en el núcleo, concomitante con un incremento de la señal de la proteína en el citoplasma, en comparación con las células control, tratadas solamente con DMSO (Figura 32A). El análisis cuantitativo confirmó estas observaciones, la relación de la intensidad de la fluorescencia núcleo/citoplasma (Fn/c) indicó una disminución significativa del 78% de la acumulación nuclear del  $\beta$ -DG después del tratamiento de las células con BFA, en comparación con las células control (Fn/c de 0.31 y 1.14, respectivamente; Figura 32B).

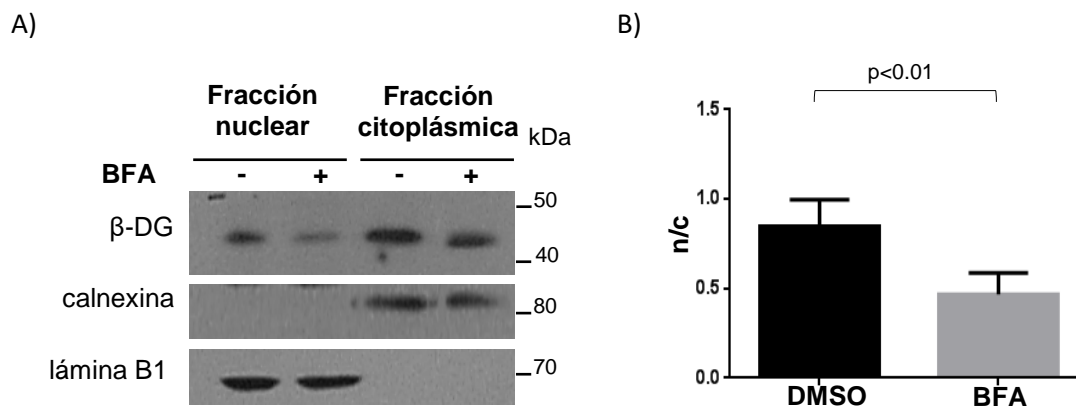


B)



**FIGURA 32. El  $\beta$ -DG transita del RE al Golgi antes de trastocarse hacia el núcleo.** (A) Las células C2C12 cultivadas sobre cubreobjetos se trataron con BFA (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) o solo con DMSO durante 8 hrs y posteriormente se fijaron y se inmuno-tiñeron con un anticuerpo anti- $\beta$ -DG (JAF) y los núcleos se contra-tiñeron con IP previo a su análisis por microscopía confocal. Se muestra un corte z a nivel nuclear de un campo representativo de cada condición experimental (n=150 células). La señal del  $\beta$ -DG disminuyó en el núcleo de las células tratadas con BFA. La barra micrométrica representa 10  $\mu\text{m}$ . Se indica con un recuadro la célula ampliada (5X). (B) Análisis cuantitativo de la relación núcleo/citoplásmica (n/c) del  $\beta$ -DG, usando el programa Image J (ver la Metodología). Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=50 células) de 3 experimentos. El valor de  $p$  indica una diferencia significativa entre las células con y sin tratamiento, determinada por la prueba t de Student.

Para confirmar el efecto de la BFA sobre la localización nuclear del  $\beta$ -DG se obtuvieron extractos de proteínas citosólicas y nucleares y se analizaron por inmunodetección en fase sólida, usando calnexina y lámina B1 como marcadores de pureza de los extractos de citoplasma y núcleo respectivamente. Consistentemente con los ensayos de microscopía confocal se observó la disminución de los niveles nucleares del  $\beta$ -DG después del tratamiento con BFA (Figura 33A). El análisis cuantitativo indicó que los niveles nucleares del  $\beta$ -DG disminuyeron 40%, en comparación con las células control (relación n/c de 0.46 y 0.82 respectivamente; Figura 33B). En conjunto estos resultados indican que el tránsito de  $\beta$ -DG de RE al Golgi es un paso necesario para su translocación sucesiva al interior del núcleo.

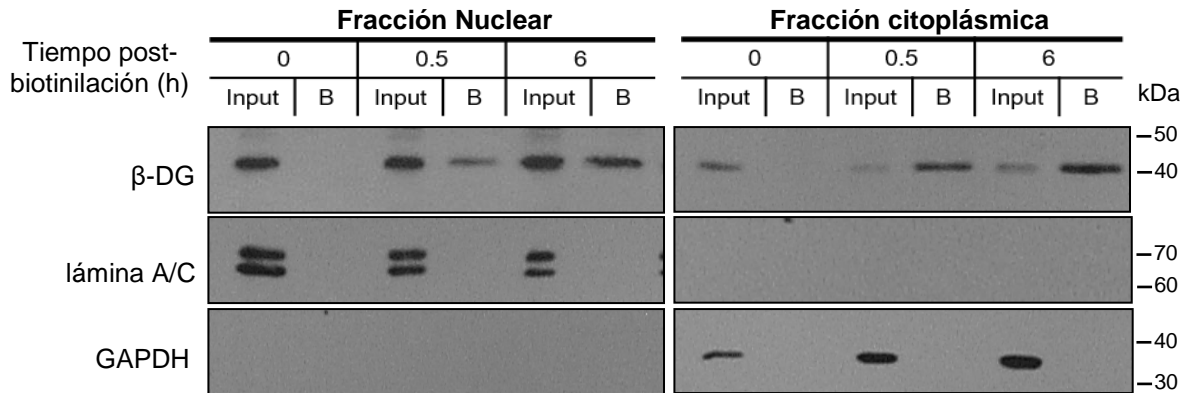


**FIGURA33. Los niveles nucleares del  $\beta$ -DG disminuyen por el tratamiento con BFA.** (A) Las células C2C12 cultivadas sobre cajas de Petri p100, se trataron con 2.5  $\mu$ g/mL de BFA o solamente con DMSO (control) durante 8 horas y posteriormente se sometieron a fraccionamiento celular para aislar proteínas de citoplasma o de núcleo. Una porción correspondiente a 50  $\mu$ g se analizó mediante inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos anti- $\beta$ -DG (JAF). La misma membrana se reveló con anticuerpos dirigidos contra calnexina y lámina B1, para demostrar la pureza de las fracciones celulares y como controles de carga. Se muestra un ensayo representativo de cuatro experimentos realizados independientemente. La cantidad del  $\beta$ -DG disminuyó en la fracción nuclear de las células tratadas con BFA, comparada con la cantidad presente en las células tratadas solamente con DMSO. (B) Análisis cuantitativo de la relación núcleo/citoplasma (n/c) del  $\beta$ -DG mediante el análisis de las placas de rayos X por densitometría. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 experimentos independientes, con diferencia significativa entre las células con o sin tratamiento con DMSO, determinada por la prueba t de Student.

## 1.2 El $\beta$ -DG nuclear proviene de la membrana plasmática

El transporte nuclear desde la membrana plasmática (MP) es un mecanismo utilizado por varios receptores de membrana, entre ellos el EGFR (Chen y Hung, 2015; A. Tomas *et al.*, 2014). Debido a que  $\beta$ -DG es una proteína con una localización tanto en la MP como en el núcleo, decidimos analizar si esta proteína llega primero a la MP y posteriormente se transporta hacia el núcleo. Con este fin, establecimos un protocolo de biotilación de proteínas de membrana plasmática. Las células C2C12 se incubaron con biotina por 0, 30 minutos y 6 horas para marcar las proteínas de la superficie celular y posteriormente se obtuvieron extractos nucleares y citoplásmicos. Las proteínas biotiladas de cada fracción celular se precipitaron con perlas de estreptavidina-agarosa y después se analizaron por inmunodetección en fase sólida con el anticuerpo anti- $\beta$ DG JAF. Las proteínas

lámina A/C y GAPDH se detectaron exclusivamente en los extractos nucleares y citoplásmicos respectivamente, lo que comprueba la pureza del fraccionamiento subcelular. Encontramos la señal correspondiente al  $\beta$ -DG biotinilado en la fracción citoplásmica y nuclear desde los 30 minutos, lo que sugiere que al menos una fracción del  $\beta$ -DG proviene de la MP (Figura 34). No se detectó señal para las proteínas lámina A/C ni GAPDH en las fracciones precipitadas, lo que valida la especificidad de la biotinilación de las proteínas de superficie celular.



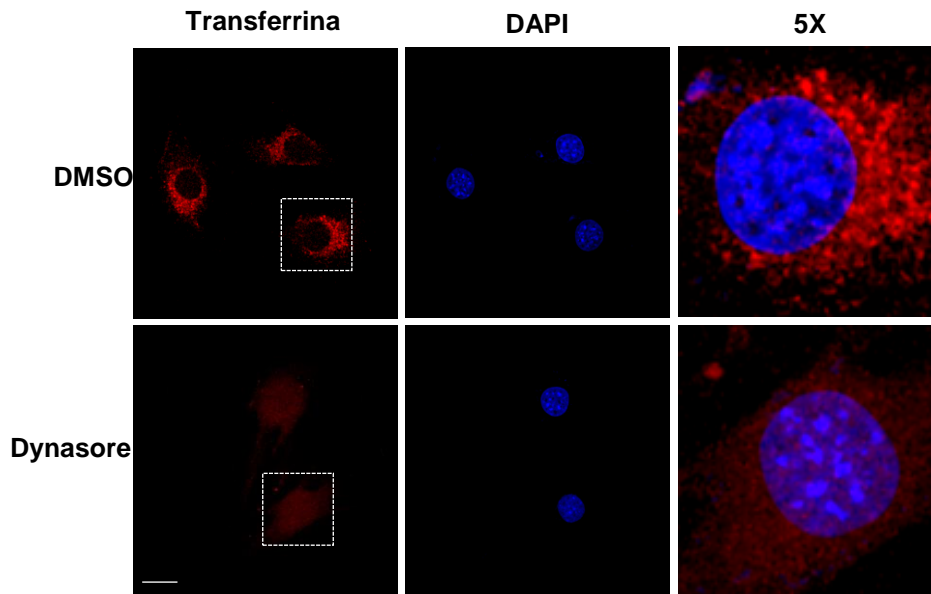
**FIGURA34 .El  $\beta$ -DG nuclear proviene de la membrana plasmática.** Las células C2C12 cultivadas sobre cajas de Petri p100 se incubaron con biotina durante 0, 30 minutos y 6 horas y posteriormente se sometieron a fraccionamiento celular para obtener extractos de núcleo y citoplasma. Los extractos se precipitaron con perlas de estreptavidina-agarosa y se revelaron mediante inmunodetección en fase sólida, utilizando el anticuerpo anti- $\beta$ -DG JAF. La misma membrana se desnudó y se reveló con anticuerpos contra lámina A/C y GAPDH como controles de pureza y carga de los extractos. Input, Fracción de los extractos nucleares y citoplásmicos previos a la precipitación con estreptavidina. La señal del  $\beta$ -DG biotinilado se encontró en los extractos de núcleo y citoplasma desde los 30 minutos post-biotinilación. U=Unida

## CAPÍTULO 2 RUTA DE TRÁFICO DEL $\beta$ -DG NUCLEAR

### 2.1 Efecto de la inhibición de endocitosis sobre la localización nuclear del $\beta$ -DG

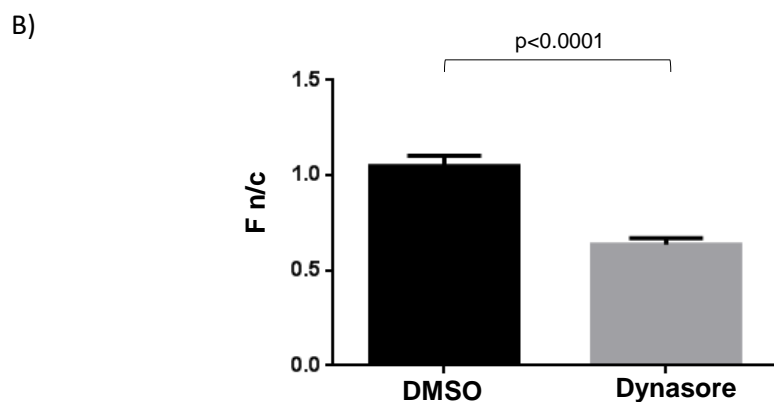
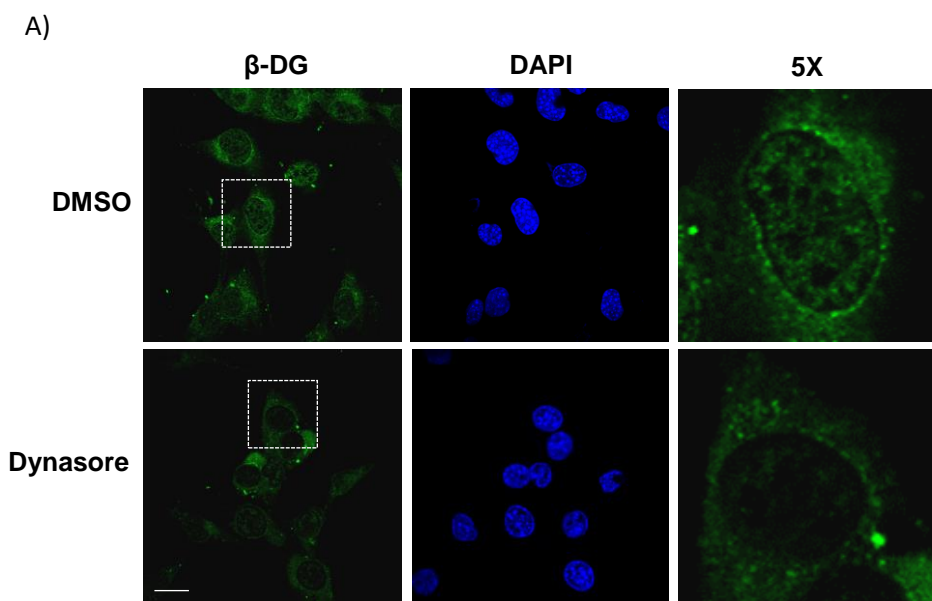
Tomando en consideración que el  $\beta$ -DG tiene un tránsito intracelular desde la MP hacia el núcleo, pensamos que esta ruta debe utilizar un sistema de internalización de la proteína por medio de membranas. A este respecto, se ha demostrado previamente que el  $\beta$ -DG requiere ser fosforilado en su dominio PPXY para ser internalizado por medio de endosomas de reciclaje, los cuales colocalizan con el receptor de transferrina (Sotgia *et al.* 2003). Por lo tanto, decidimos bloquear el sistema endosomal para determinar si este mecanismo está involucrado en el tráfico nuclear del  $\beta$ -DG. Para ello utilizamos el inhibidor denominado dinasore, el cual interfiere específicamente con la endocitosis dependiente de dinamina mediante el bloqueo reversible de la actividad de GTPasa de la dinamina (Kirchhausen *et al.*, 2008). La dinamina a su vez es crucial para la fisión vesicular que ocurre previamente a la liberación de vesículas desde la MP (Ferguson y Camilli, 2012; Antony *et al.*, 2016). Utilizamos transferrina marcada fluorescentemente para monitorear la endocitosis dependiente de clatrina, ruta utilizada por el receptor de transferrina (M. van Damme *et al.*, 2002). Con este fin, las células se preincubaron con dinasore diluido en DMSO a una concentración de 80  $\mu$ m o solamente con DMSO (control), durante 30 minutos a 37°C. Enseguida se agregó Alexa594-transferrina a una temperatura de 20°C, se cambiaron las células a medio fresco sin transferrina y se incubaron enseguida a 37°C por 15 minutos adicionales. Observamos una tinción granular intensa en el citoplasma de las células control a partir de los 15 minutos, lo que indicó la internalización de trasferina. En contraste, la señal fluorescente fue muy tenue en las células tratadas con dinasore, lo que sugiere que la endocitosis se inhibió eficientemente (Figura 35)





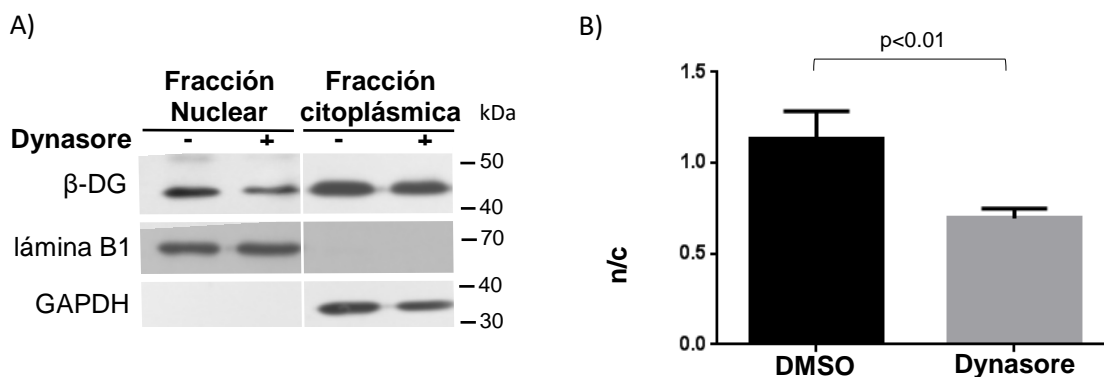
**FIGURA35. Inhibición de endocitosis de transferrina mediante tratamiento celular con dinasore.** Las células C2C12 cultivadas sobre cubreobjetos se incubaron con Dinasure (80  $\mu$ M) o DMSO solamente, durante 30 min. Enseguida se agregó Alexa594-transferrina y se incubaron las células por 5 minutos a 20°C. Posteriormente se agregó medio fresco con la misma concentración de DMSO o dinasure pero sin transferrina y las células se incubaron nuevamente a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente las células se fijaron y tiñeron con DAPI (núcleo) para su análisis por microscopía confocal. Se muestra un campo representativo de cada condición experimental. La señal de la transferrina en vesículas citoplásmicas fue abatida con el tratamiento con dinasure. La barra micrométrica corresponde a 10  $\mu$ m. 5X; acercamiento digital del recuadro marcado con línea punteada.

Una vez establecidas las condiciones experimentales para inhibir la endocitosis, analizamos el efecto del dinasure sobre la translocación nuclear del  $\beta$ -DG. Observamos que la localización nuclear del  $\beta$ -DG, tanto en el nucleoplasma como la envoltura nuclear, disminuyó notoriamente después de la adición del dinasure (Figura 36A).



**FIGURA 36. El importe nuclear del  $\beta$ -DG utiliza la vía de la endocitosis.** (A) Las células C2C12 cultivadas sobre cubreobjetos se trataron con dynasore (80  $\mu$ M) o solamente con DMSO, durante 5 horas; enseguida las células se fijaron, se tiñeron con un anticuerpo anti- $\beta$ -DG (JAF) y se contrañeron con DAPI (núcleo) previo a su análisis posterior por microscopía confocal. Se muestra un corte a nivel nuclear de un campo representativo de cada condición experimental. Se realizaron tres experimentos independientemente. La señal del  $\beta$ -DG disminuyó en el núcleo de las células tratadas con dynasore. La barra micrométrica corresponde a 10  $\mu$ m. 5X= acercamiento digital de la célula mostrada en el recuadro de línea punteada. (B) Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia del  $\beta$ -DG presente en el núcleo y el citoplasma (Fn/c), usando el programa Image J (ver Metodología). Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=50 células); la diferencia estadísticamente significativa se determinó por la prueba t de Student, y se indica con un asterisco.

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia citoplásmica y nuclear demostró una disminución del 39% en los niveles nucleares del  $\beta$ -DG en las células tratadas con dynasore (Figura 36B). Para confirmar estos resultados bioquímicamente, se llevaron a cabo experimentos de fraccionamiento celular sobre los cultivos tratados con dynasore o solamente con DMSO. Las fracciones nucleares y citoplasmáticas se sometieron a inmunodetección en fase sólida con el anticuerpo anti- $\beta$ -DG JAF. Los niveles del  $\beta$ -DG se redujeron significativamente (38.5%) en el núcleo en las células tratadas con dynasore, con respecto a las células tratadas solamente con DMSO (Figura 37). La pureza de las fracciones celulares se estableció mediante la inmuno-detección de las proteínas lámina B1 y GAPDH (proteínas marcadoras de núcleo y citoplasma respectivamente). Por lo tanto, la inhibición de la endocitosis dependiente de dinamina afecta la translocación nuclear del  $\beta$ -DG.

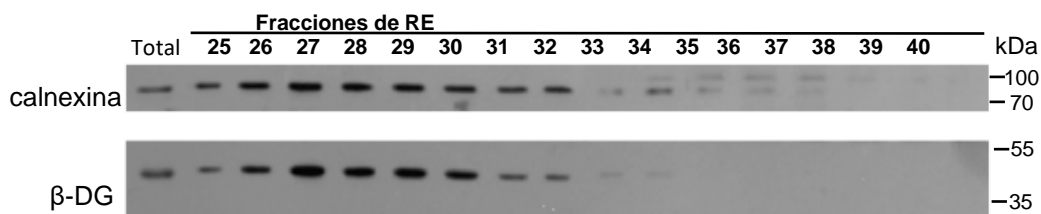


**FIGURA 37. Los niveles nucleares del  $\beta$ -DG disminuyeron en las células tratadas con dynasore.** (A) Las células C2C12 cultivadas sobre cajas de Petri p100 se trataron con 80  $\mu$ M de dynasore o solamente con DMSO durante 5 horas y posteriormente se sometieron a fraccionamiento celular para obtener extractos de núcleo y citoplasma, Una cantidad de 50  $\mu$ g de cada extracto celular se sometió a inmunodetección en fase sólida utilizando el anticuerpo anti- $\beta$ -DG denominado JAF. La membrana se desnudó y se incubó y reveló con anticuerpos anti-GAPDH y anti lámina B1, como controles de pureza de los extractos de citoplasma y núcleo respectivamente. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos realizados independientemente. Los niveles del  $\beta$ -Dg disminuyeron en el núcleo de las células tratadas con dynasore, en comparación con las células tratadas solamente con DMSO. (B) Análisis cuantitativo de los niveles nucleares del  $\beta$ -DG. Se cuantificó los niveles del  $\beta$ -DG mediante el análisis de las placas de rayos X por densitometría y se obtuvo la relación núcleo/citoplasma (n/c). Los niveles del  $\beta$ -DG en el citoplasma y núcleo se normalizaron con los de GAPDH y lámina B1 respectivamente, Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. La diferencia significativa entre las diferentes condiciones experimentales se determinó por la prueba t de Student.

## 2.2 El $\beta$ -DG transita de la MP hacia el RE previo su importe nuclear

Como se demostró previamente, el  $\beta$ -DG nuclear proviene de la MP y utiliza la ruta de endocitosis en su tráfico intracelular. Existen pocos ejemplos descritos en la literatura de proteínas de MP que se internalizan para llegar al núcleo, un ejemplo es el EGFR; de manera interesante, se ha descrito que esta proteína pasa por el RE antes de entrar al núcleo (Liao y Carpenter 2007; Wang et al., 2010). Por lo tanto, tomando en consideración la similitud del tráfico intracelular entre el EGFR y el  $\beta$ -DG decidimos analizar si esta última proteína pasa por el RE antes de llegar a su destino final, el núcleo. Con este fin, acoplamos el protocolo de biotilación de proteínas de superficie celular con la purificación de la fracción del RE. Nuestra hipótesis fue que las vesículas de endocitosis que portan el  $\beta$ -DG se fusionan con el RE.

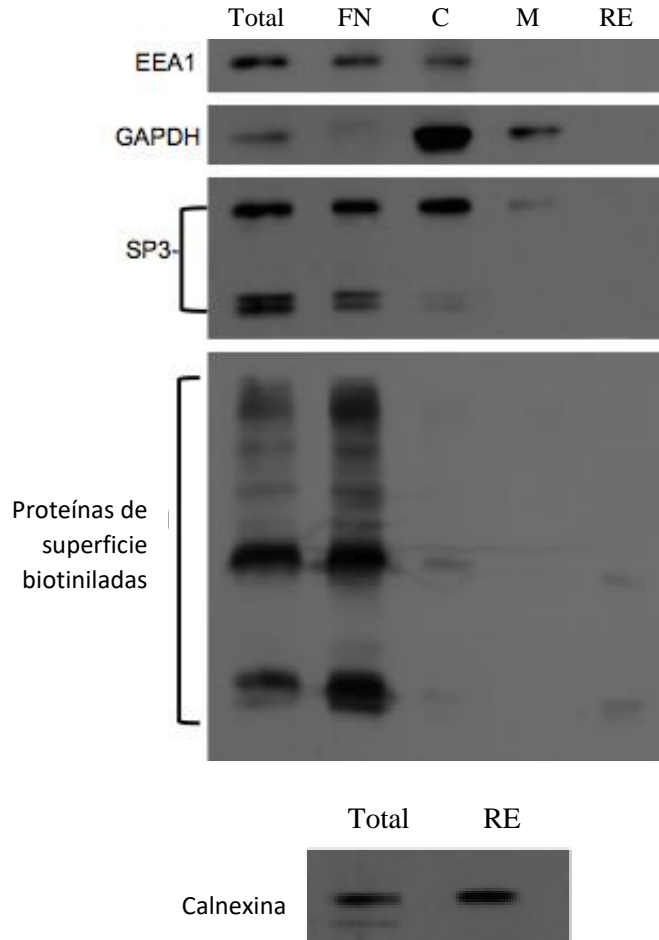
Procedimos a biotilinar las proteínas de superficie de las células C2C12 y después de 15 minutos de incubación con biotina las células se sometieron a fraccionamiento celular. Los extractos de RE, citoplasma y núcleo se sometieron a precipitación con estreptavidina y el material recuperado se analizó por inmunodetección en fase sólida. En la [figura 38](#) se observa que las fracciones 25 a 32 del RE están enriquecidas con una proteína marcadora de RE, calnexina. De acuerdo con nuestra predicción, en estas mismas fracciones se recuperó el  $\beta$ -DG. Para los siguientes experimentos se juntaron las fracciones 25 a 32 del RE.



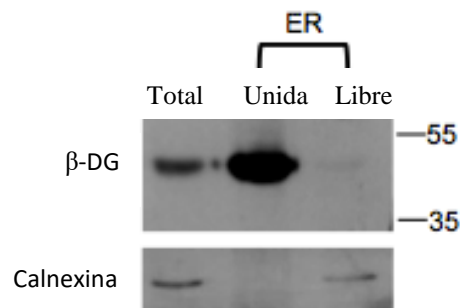
**FIGURA 38. El  $\beta$ -DG está presente en las fracciones del RE que están enriquecidas con calnexina.** Las células C2C12 cultivadas sobre cajas de Petri p100 se sometieron a fraccionamiento celular para obtener un extracto de RE (ver metodología). Se muestran las fracciones 25 a 40 obtenidas a partir de un gradiente de densidad. Las fracciones se sometieron a inmunodetección en fase sólida utilizando un anticuerpo anti- $\beta$ -DG (MANDAG). La misma membrana se reveló con un anticuerpo anti-calnexina, marcador de RE.

Para corroborar que la fracción correspondiente al RE está libre de contaminantes de otras regiones subcelulares utilizamos anticuerpos dirigidos contra proteínas marcadoras de endosomas (EEA1), citoplasma (GAPDH) y núcleo (Sp3). No se detectaron trazas de estas proteínas en la fracción del RE, lo que confirma la pureza de la preparación. Para confirmar que la fracción de RE utilizada en el análisis de pureza, sí contenía proteínas, se analizaron los extractos de proteínas totales y del RE con un anticuerpo anti-calnexina, y obtuvimos la señal correspondiente a calnexina en las dos fracciones. Las proteínas de superficie celular biotiniladas se recuperaron mediante precipitación con perlas de estreptavidina. Se observaron proteínas biotiniladas principalmente en el extracto total y la fracción nuclear (NF) (Figura 39).

Cuando analizamos las proteínas biotiniladas del extracto del RE con anticuerpos anti- $\beta$ -DG recuperamos la banda de 43 kDa que corresponde a esta proteína (Figura 40). Esta fracción no contiene calnexina biotinilada porque no es una proteína de superficie celular. De manera consistente, la señal de calnexina si está presente en la fracción de RE no unida a estreptavidina. En su conjunto, estos experimentos apoyan la idea de que el  $\beta$ -DG que se internaliza desde la MP llega al RE en su tránsito hacia el núcleo.



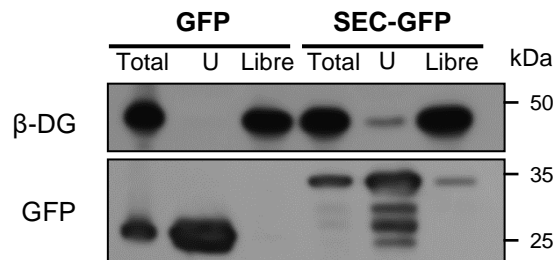
**FIGURA 39. Análisis de la pureza de la fracción de RE.** Las del RE se sometieron a electroforesis e inmunodetección en fase sólida. Se utilizaron anticuerpos dirigidos contra las proteínas EEA1 GAPDH, Sp3 y calnexina para establecer la pureza del extracto de RE. Input extracto total antes del fraccionamiento celular. FN, fracción nuclear; C; fracción citosólica; M, fracción microsomal; RE, fracción de RE. La membrana se desnudó y se reprobó con los diferentes anticuerpos. La membrana se reprobó también contra estreptavidina para analizar el perfil de proteínas de superficie biotiniladas.



**FIGURA 40. Identificación del  $\beta$ -DG en la fracción del RE recuperada en el precipitado de proteínas biotiniladas.** Las proteínas de superficie celular de las células C2C12 se sometieron a la reacción de biotinilación. Posteriormente se obtuvieron extractos de RE y finalmente se precipitaron las proteínas biotiniladas con perlas de estreptavidina unida a agarosa. Se utilizó el anticuerpo 7D11 para revelar la señal del  $\beta$ -DG. La misma membrana se reveló con un anticuerpo anti-calnexina como control negativo de la precipitación de proteínas biotiniladas de superficie y al mismo tiempo como marcador de retículo endoplásmico. Fracción previa de proteínas (Total); fracción unida a las perlas de estreptavidina (Unida) y fracción no unida (Libre).

### 2.3 El $\beta$ -DG interactúa con la subunidad Sec61 $\beta$ del translocón

El translocón Sec61 media la retrotranslocación de proteínas mal plegadas del RE hacia el citosol para ser degradadas (Denks *et al.*, 2014, Scott *et al.*, 2008). Recientemente se ha demostrado la participación de Sec61 en el importe nuclear de EGFR (Liao and Carpenter, 2007; Myers *et al.*, 2003). No obstante, existe cierta controversia sobre la región subcelular (RE o membrana nuclear externa) donde se lleva a cabo la interacción entre estas dos proteínas (Mills, 2012; Wang *et al.*, 2010). Por lo tanto, decidimos analizar la participación potencial de Sec61 en la modulación del importe nuclear del  $\beta$ -DG. Como primer paso analizamos si el  $\beta$ -DG interactúa con Sec61 $\beta$ , para lo cual transfectamos las células C2C12 con un vector que expresa SEC61 $\beta$  fusionada a GFP y utilizando ensayos de inmunoprecipitación (GFP-Trap) para establecer la asociación entre ambas proteínas.



**FIGURA 41. El  $\beta$ -DG interacciona con Sec61  $\beta$ .** Los extractos totales obtenidos de las células C2C12 transfectadas con un vector que expresa Sec61  $\beta$  fusionada GFP (SEC-GFP) o que expresa la proteína reportera GFP solamente. Se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación (GFP-Trap) y las fracciones inmunoprecipitada y libre se sometieron a ensayos de inmunodetección en fase sólida con anticuerpos anti- $\beta$ -DG o anti-GFP. El  $\beta$ -DG se recuperó en conjunto con Sec61-GFP en la fracción inmunoprecipitada de las células transfectadas con Sec61  $\beta$ -GFP, pero no en la fracción inmunoprecipitada a partir de las células transfectadas con GFP. U, Unida.

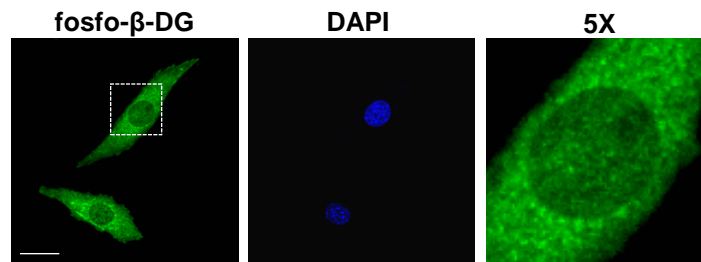
Los extractos totales y las fracciones unidas y libres se sometieron a inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos contra  $\beta$ -DG o GFP. De manera interesante, la banda correspondiente al  $\beta$ -DG (43 kDa) se recuperó en la fracción unida a Sec61 $\beta$ -GFP pero no en la fracción unida a GFP (Figura 41, panel superior). Mediante la inmunodetección con anticuerpos anti-GFP establecimos la expresión de GFP y la proteína de fusión Sec61 $\beta$ -GFP en las células transfectadas (Figura 41, panel inferior).



## CAPÍTULO 3 PARTICIPACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN Y892 DEL $\beta$ -DG EN SU TRÁFICO NUCLEAR

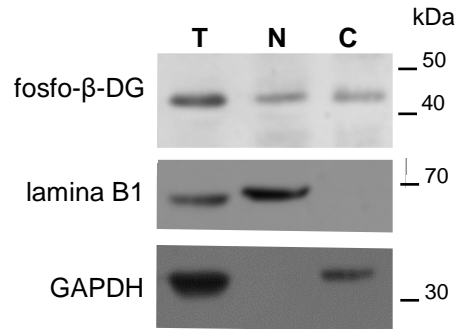
### 3.1 Distribución subcelular del $\beta$ -DG fosforilado en la tirosina 892

Se estableció previamente que la fosforilación del  $\beta$ -DG en la tirosina Y892 induce su desensamble de la MP para iniciar su internalización en vesículas endocíticas (Sotgia *et al.*, 2003). Por lo tanto, nos propusimos analizar si la fosforilación del  $\beta$ -DG modula su trasportación nuclear. Nuestra primera aproximación fue el análisis de la localización subcelular del  $\beta$ -DG fosforilado (fosfo- $\beta$ -DG). Con este fin tratamos a las células C2C12 con peroxivanadato (PV), un inhibidor de fosfatasas, y utilizamos un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente el  $\beta$ -DG fosforilado en la tirosina 892. Las imágenes de IF analizadas por microscopía confocal revelan que el  $\beta$ -DG fosforilado se localiza en diferentes regiones celulares, incluyendo la MP el citoplasma y el núcleo (Figura 42).



**FIGURA 42. Distribución subcelular del  $\beta$ -DG fosforilado.** Las células C2C12 se inmunotñeron con anticuerpos que reconocen exclusivamente el  $\beta$ -DG fosforilado (fosfo $\beta$ -DG) en la tirosina 892; los núcleos se contratiñeron con DAPI. Se muestra un campo representativo del patrón de inmunotñición del fosfo- $\beta$ -DG en las células C2C12. Las imágenes de IF se capturaron por microscopio confocal y se muestra un corte óptico a nivel nuclear. El fosfo- $\beta$ -DG se distribuyó en el citoplasma y núcleo. La barra micrométrica representa 10  $\mu$ m. 5X, acercamiento digital de la zona delineada.

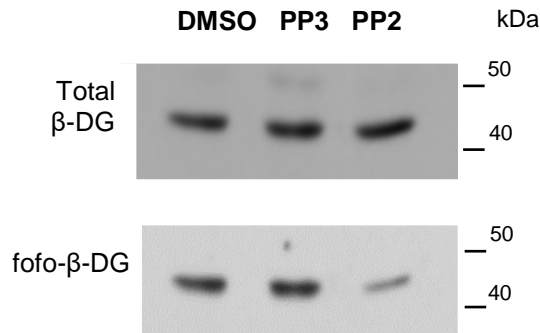
De manera consistente, el análisis de la distribución del fosfo- $\beta$ -DG por inmunodetección en fase sólida confirmó su presencia tanto en el citoplasma como el núcleo (Figura 43). La pureza de las fracciones celulares se estableció por la presencia exclusiva de GAPDH en el citoplasma y de la lámina B1 en el núcleo. (Figura 43).



**FIGURA 43. El fosfo- $\beta$ -DG está presente en la fracción nuclear de las células C2C12.** Las células C2C12 cultivadas sobre cajas Petri p100 se trataron con PV durante 3 horas y posteriormente se sometieron a fraccionamiento celular para obtener extractos de núcleo y citoplasma. Se cargaron 50  $\mu$ g de cada extracto celular en los geles de acrilamida y se se sometieron a electroforesis e inmunodetección en fase sólida, utilizando un anticuerpo anti-fosfo- $\beta$ -DG (Y893). La membrana se desnudó y se reprobió con anticuerpos anti-GAPDH y anti-lámina B1, marcadores de citoplasma y núcleo respectivamente. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos realizados independientemente. Se observa la señal del fosfo- $\beta$ -DG en las fracciones de núcleo y citoplasma.

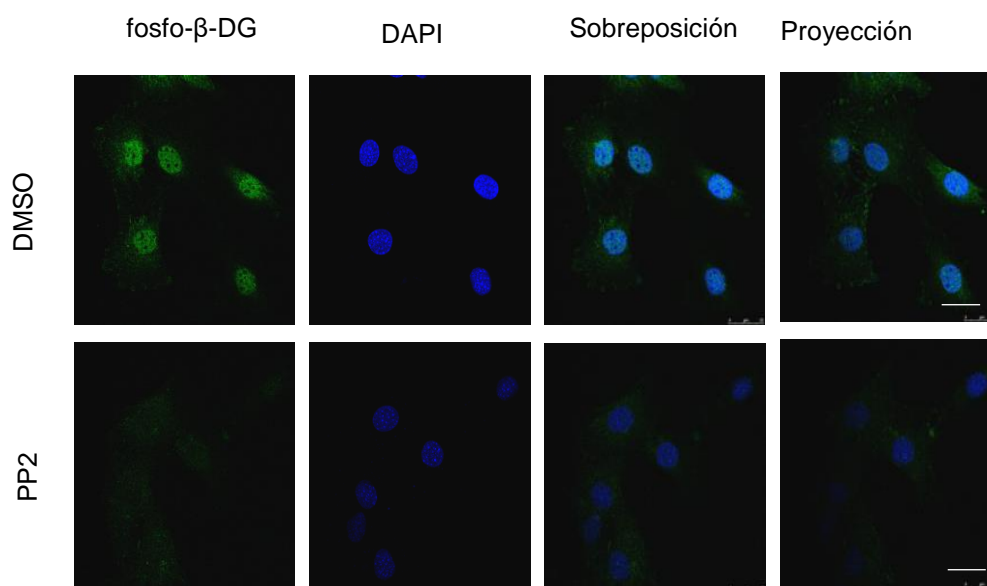
### 3.2 La fosforilación del $\beta$ -DG por la cinasa Src es necesaria para su localización nuclear

Si la fosforilación es necesaria para la translocación nuclear del  $\beta$ -DG es de esperarse que la inhibición de la cinasa c-Src, la cual fosforila al  $\beta$ -DG en la tirosina 892 (Sotgia *et al.*, 2003), impida la acumulación nuclear de la proteína. Para probar esta hipótesis tratamos a las células C2C12 con el inhibidor específico de c-Src, PP2, con su análogo inactivo, PP3. Los niveles del fosfo- $\beta$ -DG disminuyeron considerablemente en los lisados de células tratadas con PP2, en comparación con las células tratadas con PP3 o con DMSO solamente (vehículo). De acuerdo con lo esperado, los niveles totales del  $\beta$ -DG permanecieron inalterables con los diferentes tratamientos (Figura 44)



**FIGURA 44. La inhibición de la cinasa c-Src disminuye los niveles del fosfo- $\beta$ -DG.** Las células C2C12 cultivadas sobre cajas Petri p100 se trataron durante 3 horas con 10  $\mu$ M de PP2, PP3 o DMSO. Posteriormente se obtuvieron extractos totales y una alícuota de 50  $\mu$ g de cada condición experimental se sometió a electroforesis e inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos anti fosfo- $\beta$ -DG (Y893). La membrana se desnudó y se reprobló con un anticuerpo anti- $\beta$ -DG total (7D11). Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos realizados independientemente.

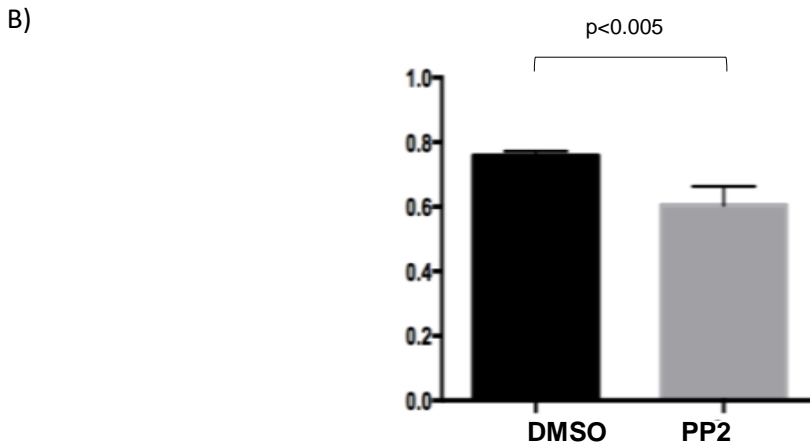
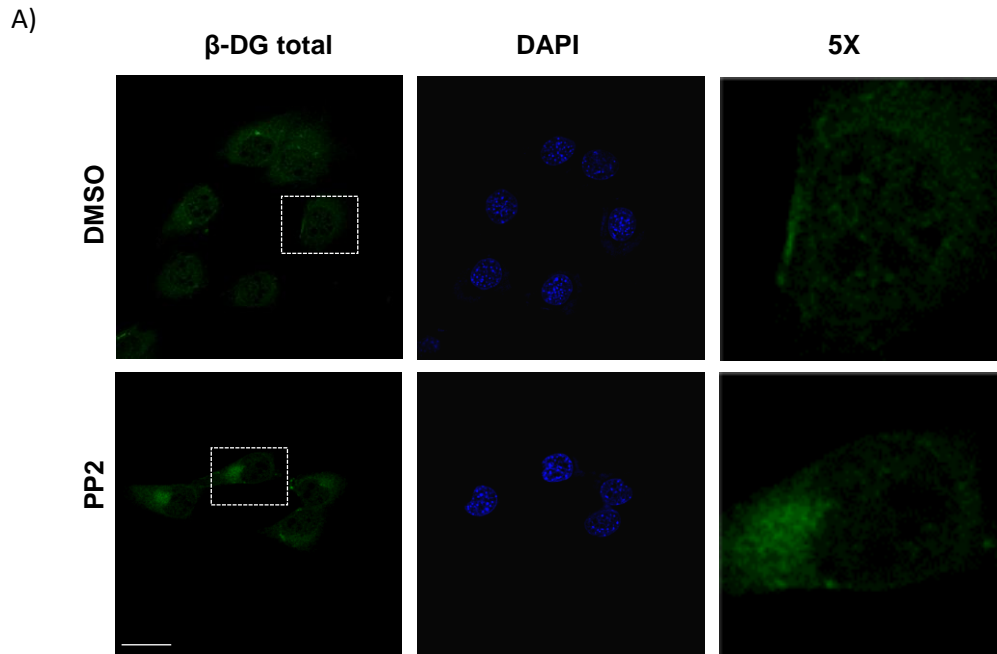
De manera consistente, la intensidad de la inmunotinción del fosfo- $\beta$ -DG disminuyó notablemente en las células tratadas con PP2, en comparación con las células tratadas con el vehículo solamente (DMSO) (Figura 45).



**FIGURA45. La intensidad de la inmunofluorescencia del fosfo  $\beta$ -DG decayó en las células tratadas con un inhibidor de la cinasa c-Src.** Las células C2C12 cultivadas sobre cajas Petri p100 se trataron durante 3 horas con 10  $\mu$ M de PP2 o con DMSO (vehículo) solamente. Posteriormente se fijaron y sometieron a inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti fosfo- $\beta$ -DG (Y893). El núcleo se contratiñó con DAPI. Se muestra una imagen de microscopia confocal representativa de tres experimentos realizados independientemente, con un corte Z a nivel nuclear. Se observa la disminución de la señal correspondiente al fosfo- $\beta$ -DG después del tratamiento con PP2. La barra corresponde a 10  $\mu$ m

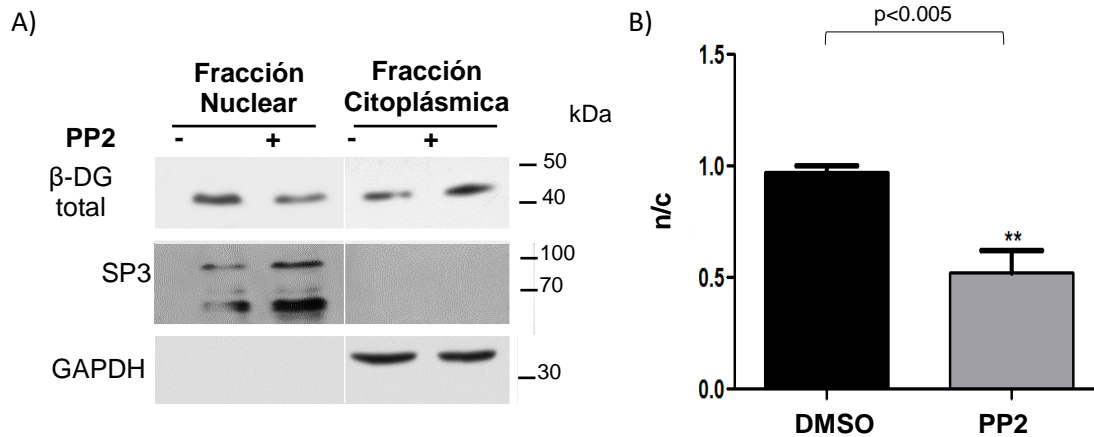
Inclusive, la inmunotinción nuclear correspondiente al  $\beta$ -DG total disminuyó ligeramente después del tratamiento con PP2, en comparación con las células tratadas con el vehículo (DMSO) (Figura 46A). La cuantificación del cociente de la inmunofluorescencia presente en el núcleo y citoplasma (Fn/c) indicó un

decremento del ~20.3% de la localización nuclear del  $\beta$ -DG (Figura 46B; Fn/c de 0.758 y 0.6041 para las células control y tratadas con PP2 respectivamente).



**FIGURA 46. La inmunofluorescencia del  $\beta$ -DG total disminuyó debido al tratamiento con PP2.** A) Las células C2C12 cultivadas sobre cajas Petri p100, se trataron durante 3 horas con 10  $\mu$ m de PP2 o DMSO solamente. Posteriormente se fijaron y sometieron a inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti- $\beta$ -DG 7D11. Los núcleos se contratiñeron con DAPI. Se muestra un corte z a nivel nuclear de una imagen representativa de microscopía confocal de tres experimentos realizados independientemente. Se observa la disminución de la señal nuclear correspondiente al  $\beta$ -DG total después del tratamiento con PP2. Barra micrométrica representa 10  $\mu$ m. 5X= Acercamiento digital del recuadro. B) Se obtuvo la relación nuclear/citoplásmica de la inmunofluorescencia (Fn/c) del  $\beta$ -DG en las células tratadas con PP2 o solamente con el vehículo (DMSO), usando el programa Image J. Los resultados representan el promedio +/- desviación estándar (n=50) de 3 experimentos independientes; la diferencia significativa se determinó mediante la prueba t de Student.

De manera consistente, el análisis de los extractos nucleares y citoplasmáticos obtenidos por fraccionamiento celular reveló una bajada significativa de los niveles nucleares del  $\beta$ -DG después del tratamiento con PP2 (Figura 47A). Se empleó la inmunodetección de las proteínas Sp3 y GAPDH para establecer la pureza de las fracciones nucleares y citoplásmicas respectivamente.

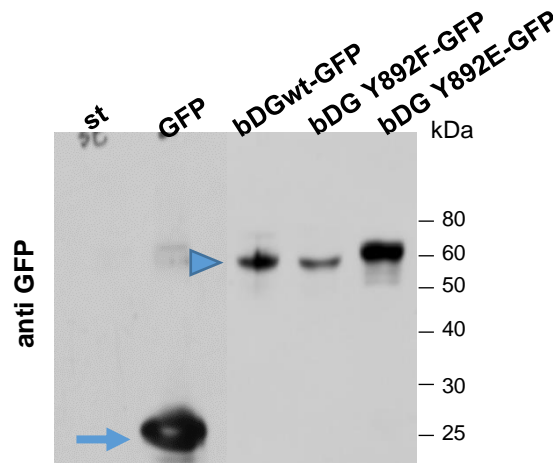


**FIGURA 47. La inhibición de la cinasa c-Src con PP2 disminuye los niveles nucleares del  $\beta$ -DG.** Las células C2C12 cultivadas sobre cajas Petri p100 se trataron durante 3 horas con 10  $\mu$ m de PP2 o DMSO solamente. Enseguida se sometieron a fraccionamiento celular para obtener extractos nucleares y citoplasmáticos (A). Una alícuota de 50  $\mu$ g de cada extracto celular se sometió a inmunodetección en fase sólida utilizando el anticuerpo anti- $\beta$ -DG (JAF). La membrana se desnudó y se reprobó con anticuerpos anti-GAPDH y anti-lámina B1, marcadores de citoplasma y núcleo respectivamente. Se muestra un ensayo representativo de cuatro experimentos realizados independientemente. (B). Análisis cuantitativo de los niveles nucleares del  $\beta$ -DG (relación núcleo/citoplasma; n/c). Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes; la diferencia significativa se determinó por la prueba *t* de Student.

El análisis densitométrico de las placas de rayos X reveló una disminución significativa en los niveles nucleares del  $\beta$ -DG como resultado del tratamiento con el inhibidor de la cinasa c-Src, (el cociente núcleo/citoplasma cambió de 1.4 a 0.7 con PP2; Figura 47B). En conclusión, estos experimentos demuestran que la fosforilación del  $\beta$ -DG en la tirosina Y892 por la cinasa c-Src modula positivamente su localización nuclear.

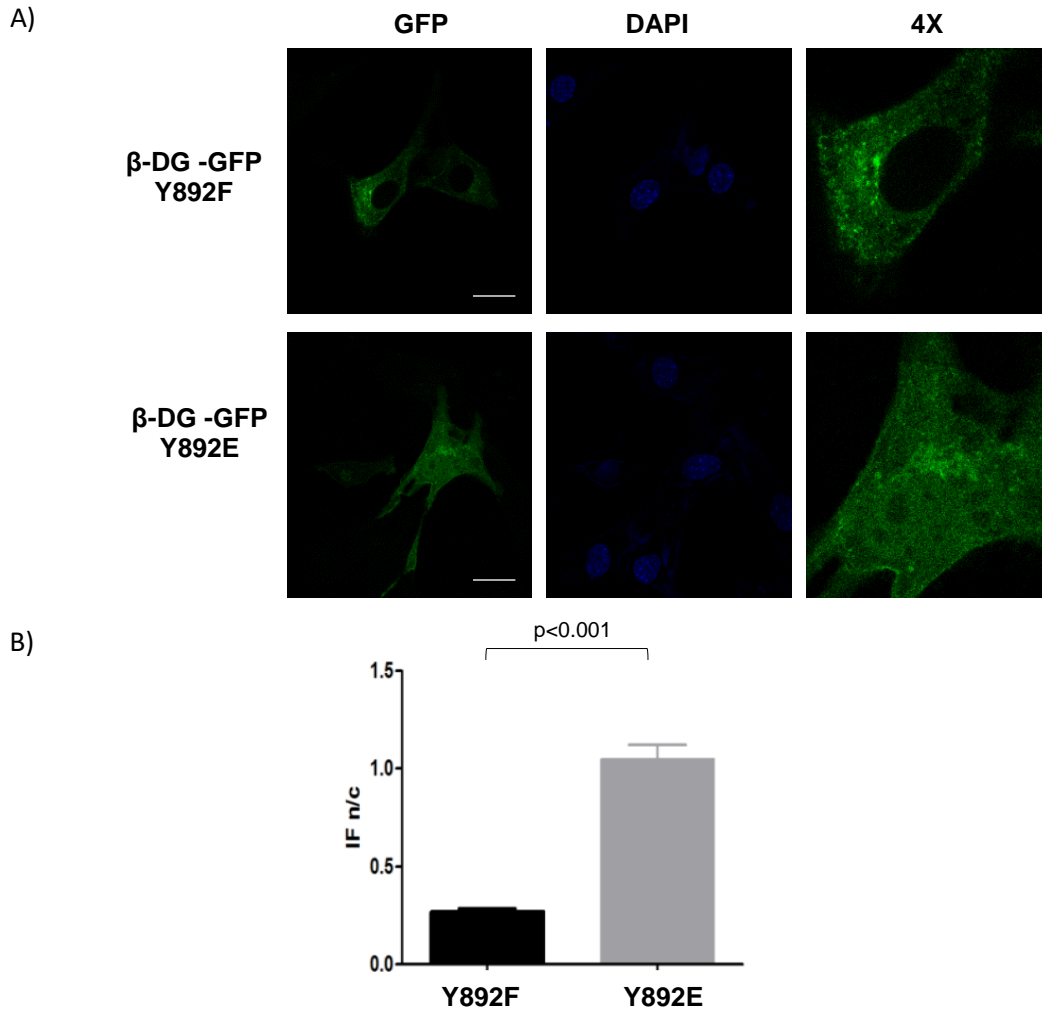
### 3.3 Mutantes de fosforilación de

Con la finalidad de demostrar de manera directa la participación si la fosforilación de la tirosina Y892 regula la localización nuclear del  $\beta$ -DG, decidimos analizar la distribución subcelular de diferentes variantes del  $\beta$ -DG fusionadas a GFP. Una variante presenta el cambio de la tirosina por ácido glutámico (Y892E); la negativa del ácido glutámico simula la fosforilación del  $\beta$ -DG. La segunda variante porta el cambio de la tirosina por un residuo de fenilalanina, lo que da como resultado que el  $\beta$ -DG sea incapaz de ser fosforilado por la cinasa c-Src. Las células C2C12 se transfectaron transitoriamente con los respectivos vectores de expresión y la producción de las proteínas de fusión en las células C1C12 se demostró por medio de inmunodetección en fase sólida, utilizando extractos totales de las células transfectadas y anticuerpos anti-GFP. En la Figura XX se observa una a señal de  $\sim 60$  kDa correspondiente a las proteínas de fusión  $\beta$ -DGwt-GFP,  $\beta$ -DGY892E y  $\beta$ -DGY892F, y una banda de 25 kDa correspondiente a la expresión de la GFP sola. No obtuvimos señal en el carril de cargado con extractos de células no transfectadas, lo que demuestra que las bandas inmunodetectadas son específicas (Figura 48).



**FIGURA 48. Expresión de las proteínas de fusión GFP,  $\beta$ -DGwt-GFP,  $\beta$ -DGY892E y  $\beta$ -DGY892F.** Alícuotas de 50  $\mu$ g de los extractos de proteínas de las células C2C12 sin transfectar o transfectadas con los plásmidos de expresión correspondientes se sometieron a inmunodetección en fase sólida utilizando un anticuerpo anti-GFP. Se observan las bandas esperada para las diferentes proteínas reporteras. Flecha: GFP monomérica; Cabeza de flecha: Proteínas fusionadas a GFP.

Posteriormente se analizó la distribución subcelular por medio de microscopía de fluorescencia confocal. La variante mutante  $\beta$ -DG<sub>Y892F</sub> se localizó exclusivamente en el citoplasma mientras que la mutante que mimetiza el  $\beta$ -DG fosforilado permanentemente se distribuyó en ambos compartimentos, núcleo y citoplasma (Figura 49A).



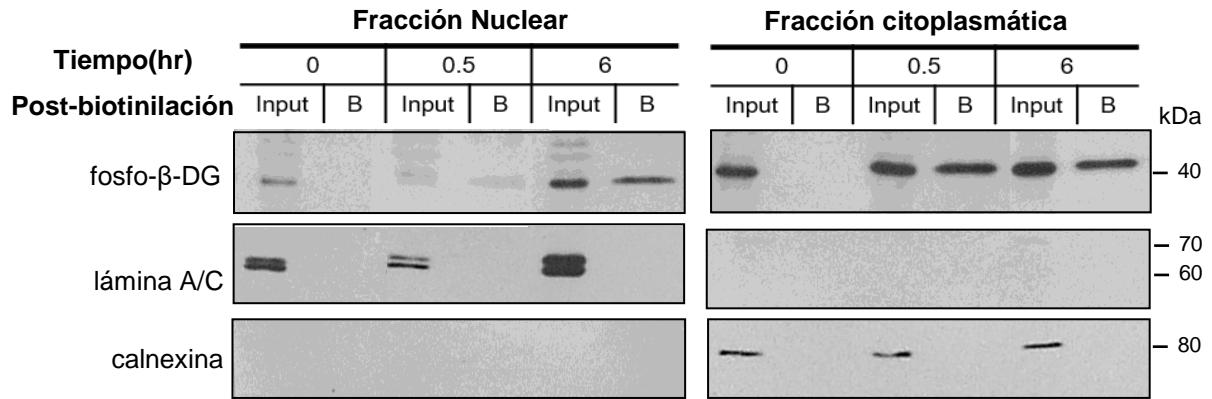
**FIGURA 49. Localización subcelular de las mutantes  $\beta$ -DG<sub>892E</sub>-GFP y  $\beta$ -DG<sub>892F</sub>-GFP.** Las células C2C12 cultivadas sobre cubreobjetos se transfectaron transitoriamente para que expresarán las diferentes proteínas de fusión  $\beta$ -DG-GFP. Las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con DAPI (núcleo) para su análisis posterior por microscopía confocal. (A) Se muestra un campo representativo de cada condición experimental que corresponde a un corte z a nivel nuclear. La mutante  $\beta$ -DG<sub>892E</sub>-GFP se localizó en el núcleo y citoplasma, mientras que la mutante  $\beta$ -DG<sub>892F</sub>-GFP se distribuyó exclusivamente en el citoplasma. La barra micrométrica representa 10  $\mu$ m. 4X, magnificación de la célula. n línea punteada. e un campo representativo en tres experimentos realizados independientemente (n=50). (B) Se llevó a cabo la cuantificación de la fluorescencia presente en el núcleo y citoplasma (Fn/c) usando el programa Image J, como se describe en la Metodología. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=50 células) de 3 experimentos independientes, con la diferencia significativa determinada por la prueba t de Student.

La cuantificación de la fluorescencia presente en el núcleo y citoplasma (Fn/c) reveló un incremento de 85% en la localización nuclear de la variante mutante que simula el estado fosforilado del  $\beta$ -DG, en comparación con la variante no fosforilada (Figura 49B). Estos resultados confirman la relevancia de la fosforilación en la tirosina 892 para la localización nuclear del  $\beta$ -DG.

### **3.4 El $\beta$ -DG fosforilado se desprende de la MP para ser transportado al interior del núcleo**

La hipótesis sobre la participación de la fosforilación en la importación nuclear del  $\beta$ -DG plantea que la fosforilación permite que la proteína se desprenda de la membrana nuclear para empezar su tráfico intracelular hacia el núcleo. Por lo tanto, decidimos probar esta idea mediante el ensayo de biotinilación de proteínas de superficie celular, utilizando un anticuerpo anti- $\beta$ -DG fosforilado. Sometimos a las células a un tratamiento con biotina durante 30 min y 6 horas, y posteriormente obtuvimos extractos de citoplasma y núcleo y rescatamos de cada una de ellas la fracción de proteínas biotiniladas mediante un ensayo de trampa, empleando perlas de agarosa unidas a estreptavidina. De acuerdo con nuestra hipótesis, rescatamos al  $\beta$ -DG fosforilado en la fracción nuclear, lo que implica que el origen del  $\beta$ -DG fosforilado nuclear es la MP (Figura 50). La inmunodetección de la lámina A/C y calnexina se utilizó para establecer la pureza de los extractos nucleares y citoplasmáticos, y la ausencia de estas moléculas en la fracción de proteínas biotiniladas demostró que la biotinilación fue específica para proteínas de superficie celular.





**FIGURA 50. Origen del  $\beta$ -DG nuclear.** Las células C2C12 cultivadas sobre cajas Petri p100 se incubaron con biotina durante 0, 30 minutos y 6 horas y posteriormente se sometieron a fraccionamiento núcleo/citoplásmico. Cada tipo de extracto se sometió a precipitación con perlas de estreptavidina-agarosa y las preparaciones resultantes se revelaron mediante inmunodetección en fase sólida, utilizando un anticuerpo anti-fosfo- $\beta$ -DG (Y893). La membrana se desnudó y se reprobó con los anticuerpos anti- lámina A/C y anti-calnexina, como controles de pureza de los diferentes extractos. Input, extractos nucleares y citoplásmicos previos a la precipitación con perlas de agarosa unidas a estreptavidina. La señal de  $\beta$ -DG fosforilado y biotinilado está presente en el núcleo y citoplasma desde los 30 minutos post-biotinilación. B= fracción unida a las perlas de agarosa-estreptavidina.

## CONCLUSIONES

- ❖ El tránsito de  $\beta$ -DG a través del Aparato de Golgi es un paso necesario para su translocación posterior al núcleo.
- ❖ El  $\beta$ -DG viaja de la Membrana Plasmática al núcleo.
- ❖ La translocación nuclear de  $\beta$ -DG es mediada por endocitosis dependiente de dinamina.
- ❖ El  $\beta$ -DG pasa por el retículo endoplásmico en su viaje desde la membrana plasmática hacia el núcleo
- ❖ El  $\beta$ -DG interactúa con la subunidad Sec61 $\beta$  del translocón.
- ❖ La fosforilación de  $\beta$ -DG en la Tyr<sup>892</sup> por la cinasa Src, regula de manera positiva su presencia nuclear.

## DISCUSIÓN

El  $\beta$ -DG es importado hacia el núcleo a través del reconocimiento de su NLS, localizada en el dominio yuxtamembranal, por las importinas  $\alpha 2/\beta 1$ . Sin embargo, el tráfico intracelular que sigue el  $\beta$ -DG desde la MP hacia el núcleo se desconoce. Durante la realización de este trabajo, investigamos el tráfico intracelular del  $\beta$ -DG desde su síntesis hasta su ingreso al núcleo. Además, identificamos que la fosforilación del  $\beta$ -DG en la Tirosina 892 (Y892) es clave para su tráfico nuclear y que el translocón Sec61 media el paso final del  $\beta$ -DG del retículo endoplásmico (RE) al interior del núcleo.

Uno de los primeros objetivos de nuestro trabajo fue analizar si el  $\beta$ -DG recién sintetizado viaja directo hacia el núcleo o se dirige primero hacia la membrana plasmática. Observamos que el uso de brefeldina, inhibidor de transporte de proteínas del (RE) al Golgi, disminuyó los niveles nucleares del  $\beta$ -DG, indicando que requiere pasar a través de Golgi para posteriormente transportarse al núcleo. Oppizzi y colaboradores demostraron en el año 2008 que el transporte nuclear de  $\beta$ -DG es independiente de la glicosilación, sin embargo, aquí demostramos que sí requiere pasar por Golgi. Se ha descrito que algunas proteínas transmembranales cuya localización final es la membrana nuclear interna (MNI), tal es el caso de la proteína SUN2, viajan al Golgi para adquirir modificaciones post traduccionales y posteriormente regresa al RE y finalmente ingresa al núcleo. Este proceso es mediado por una región rica en argininas que permite que SUN2 interaccione con el complejo COP en el Golgi, quien la transloca al interior del núcleo (Turgay *et al.*, 2010). Es posible que el  $\beta$ -DG posea una señal similar a SUN2 que la haga regresar de Golgi al RE y una vez ahí sea reconocida por las importinas para ser ingresado al núcleo o alternativamente, que el  $\beta$ -DG se dirija e inserte en la membrana plasmática y posteriormente mediante un mecanismo de endocitosis viaje de forma retrograda hacia el núcleo.

De acuerdo con lo reportado por Carpenter y Liao (2013), los receptores tirosina-cinasa, como el del factor de crecimiento celular endotelial (EGFR; Lin *et al.*, 2001), el factor de crecimiento vascular (VEGFR; Lee *et al.*, 2007); ErbB1-4 (Anido *et al.* 2006) y el FGFR3 (Degnin *et al.*, 2011); son proteínas de la membrana plasmática que al ser estimulados por su ligando correspondiente se transportan al interior del núcleo para llevar a cabo su función como reguladores de la transcripción. Siguiendo esta posta decidimos probar si el  $\beta$ -DG nuclear proviene de la membrana plasmática. Mediante ensayos de biotilación de proteínas de superficie celular demostramos que el  $\beta$ -DG se localiza inicialmente en la membrana plasmática y posteriormente por algún mecanismo no conocido se desprende de esta estructura celular para viajar al núcleo. Tomando en cuenta estos resultados, es posible que el  $\beta$ -DG de forma análoga a los receptores tirosina-cinasa, esté involucrado en la regulación de la expresión de genes.

Los receptores tirosina-cinasa ingresan al núcleo completos o después de sufrir corte proteolítico, principalmente por la proteasa denominada gamma secretasa (Carpenter y Liao, 2013). El  $\beta$ -DG ingresa al núcleo en su forma completa, como lo demostramos en este trabajo; o después de sufrir un corte proteolítico por la gamma secretasa (Leocadio et al., 2016). Otra molécula de la superficie celular relacionadas con el crecimiento celular que se internalizan al núcleo cuando es cortada por la gamma secretasa es Notch (Fortini et al., 2009) y Frizzled (Mathew et al., 2005).

Por otra parte, demostramos que el  $\beta$ -DG se internaliza a través de endocitosis dependiente de dinamina, lo que coincide con hallazgos previos de Sotgia y colaboradores (2003) que mostraron que el  $\beta$ -DG co-localiza con el receptor de transferrina en vesículas endocíticas de clatrina dependientes de dinamina. De manera similar, el EGFR y otros receptores de superficie celular viajan de la membrana plasmática al núcleo por medio de su internalización en vesículas dependientes de dinamina (Lo et al., 2006) y recubiertas por clatrina (De Angelis Campos et al., 2011). Con la finalidad de identificar cada uno de los pasos del tráfico intracelular del  $\beta$ -DG, decidimos analizar si la proteína internalizada en endosomas se fusiona con él RE antes de ingresar al núcleo, por medio un ensayo de biotilación de proteínas de superficie acoplado con la purificación de RE. Rescatamos al  $\beta$ -DG biotilado en el RE, lo que confirma que la proteína trafica por la vía endosomas-RE previo a su importación nuclear. Es importante resaltar que esta ruta intracelular es similar a la que ocupa el EGFR para transportarse de la membrana plasmática al núcleo (Wang et al., 2011).

No obstante, esta ruta retrograda a través del sistema de membranas endosomas-RE plantea una interrogante importante, como puede ser reconocido el  $\beta$ -DG por el sistema de importinas para su ingreso al núcleo si se encuentra en este ambiente membranoso. Recientemente se reveló que el EGFR utiliza el translocón Sec61 para desensamblarse del RE y pasar al citoplasma, donde es reconocido por las importinas para ingresar al núcleo (Liao y Carpenter, 2007). Sin embargo, Wang y colaboradores sugieren que esta translocación se lleva a cabo cuando el EGFR ya se encuentra en la MNI, ya que demostraron que Sec61 también se localiza en este compartimento celular. El translocón Sec61 está compuesto por 3 subunidades transmembranales, alfa, beta y gamma; la función canónica de Sec61 en el RE es retrotranslocación de proteínas mal plegadas hacia el citosol para su posterior degradación (Tsai y Rapoport, 2002). De manera interesante, demostramos que mediante el sistema GFP-TRAP que el  $\beta$ -DG interactúa con Sec61 $\beta$ . En su conjunto estos resultados sugieren fuertemente que el  $\beta$ -DG utiliza a Sec61 para escapar del ambiente membranoso del RE y de esta manera ser reconocido posteriormente en su forma soluble por las importinas para ingresar al núcleo.

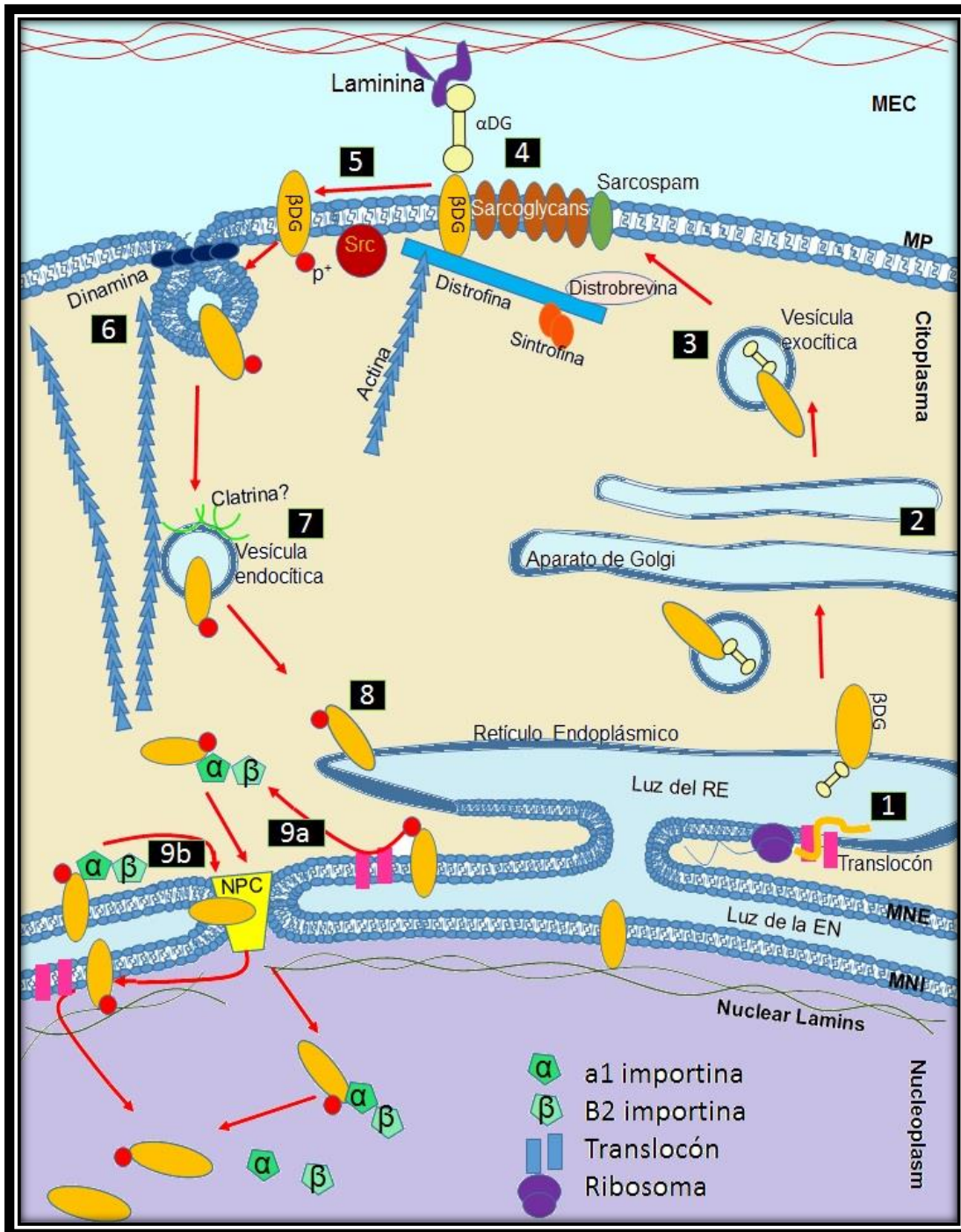
La dificultad principal para estudiar el tráfico nuclear de  $\beta$ -DG ha sido la ausencia de un ligando específico que se haya demostrado induzca al  $\beta$ -DG al

núcleo celular, a diferencia del EGFR cuyo transporte al núcleo es inducido por EGF (Liao y Carpenter, 2007).

La fosforilación es ampliamente utilizada para regular la localización nuclear de proteínas reguladoras del ciclo celular y factores de transcripción (Harreman MT; Jand y Hübner 1996). Por ejemplo, la fosforilación del receptor de estradiol regula de manera negativa su localización nuclear (Castoria et al., 2012). De manera importante, se ha demostrado que la internalización del  $\beta$ -DG en endosomas tempranos es inducida por la fosforilación en la tirosina 892 (Lipscomb et al., 2016; Sotgia et al., 2013). Además, esta fosforilación que lleva a cabo la cinasa Src inhibe la interacción del  $\beta$ -DG con distrofina (Ilsley et al., 2001), lo que ayudaría a que el  $\beta$ -DG se separe del complejo DGC y se favorezca su internalización. En este trabajo demostramos que la inhibición de la actividad de la cinasa Src disminuye consecuentemente los niveles nucleares del  $\beta$ -DG, lo que implica que la inhibición de la fosforilación previene su tráfico retrógrado hacia el núcleo. De manera consistente, una variante mutante del  $\beta$ -DG incapaz de ser fosforilada en la Y892 fue incapaz de ingresar al núcleo, mientras que la variante alternativa que simula una fosforilación constitutiva (Y892E) exhibió una localización nuclear. Existen otros sitios de fosforilación dentro del  $\beta$ -DG, así como otras posibles modificaciones post-traduccionales que podrían estar regulando también su localización nuclear (Moore y Winder et al., 2010). Recientemente, se demostró que la fosforilación de  $\beta$ -DG induce su internalización para su posterior degradación núcleo (Leocadio et al., 2016), por lo cual es importante determinar el mecanismo por el cual el  $\beta$ -DG escapa de degradación para dirigirse al núcleo (Leocadio et al., 2016), o si se degrada dentro del núcleo. En un estudio reciente se demostró que el transporte nuclear del  $\beta$ -DG es facilitado por la remodelación del citoesqueleto de actina dependiente de ezrina (Vásquez-Limeta et al., 2014). Por lo tanto, es precisamente esta ruta retrograda endosomas-RE la que necesita del citoesqueleto de actina.

Con base en los resultados de este estudio proponemos una ruta para el tráfico del  $\beta$ -DG nuclear (Figura 51). El  $\beta$ -DG después de su síntesis en el RE, viaja al Aparato de Golgi y posteriormente a la MP por medio de un transporte anterógrado. Una vez en la MP, el  $\beta$ -DG puede formar parte del complejo DGC, donde ayuda al mantenimiento de la estabilidad de la membrana. La fosforilación en la Y892 por Src inhibe su interacción con distrofina y favorece su internalización en vesículas dependientes de dinamina, probablemente recubiertas por clatrina. Posteriormente, por medio de transporte retrógrado el  $\beta$ -DG se dirige al núcleo, pasando por el RE. En este compartimento  $\beta$ -DG puede seguir dos vías, la primera involucra su translocación al citoplasma mediante el translocón Sec61, para ser reconocido por las importinas e ingresar al núcleo; la segunda vía implica el transporte lateral del  $\beta$ -DG desde el RE a la MNI, en donde Sec61 mediaría su transportación hacia el nucleoplasma. Los resultados presentados facilitarán un mejor entendimiento de los mecanismos de regulación y función nuclear del  $\beta$ -DG, así como su participación en patologías como distrofias musculares y cáncer.

MODELO



**FIGURA 51. Modelo del tráfico intracelular llevado por  $\beta$ -DG nuclear.** 1) Traducción e inserción de  $\beta$ -DG en la membrana del RE. 2) Transporte anterógrado al Aparato de Golgi. 3) Transporte anterógrado a la MP. 4) Unión a Distrofina en el DGC. 5) Fosforilación de  $\beta$ -DG en Y892 y disociación de interacciones con el DGC. 6) Endocitosis dependiente de Dinamina. 7) Transporte retrógrado de vesículas endocíticas dependiente del citoesqueleto de actina. 8) Fusión de la vesícula endocítica con el RE. 9a) Translocación de  $\beta$ -DG al citoplasma por medio del translocón (Sec61) e importe nuclear mediado por importinas a través del NPC. 9b) Transporte lateral a la MNI mediado por importinas a través del NPC y translocación el nucleoplasm por medio del translocón (Sec61).

## REFERENCIAS

- Akhavan, A., et al. (2008). "SEA domain proteolysis determines the functional composition of dystroglycan." FASEB J **22**(2): 612-621.
- Alonso-Rangel, L., et al. (2017). "A role for dystroglycan in the pathophysiology of acute leukemin cells." Life Sci **182**:1-9.
- Antonny, B., et al. (2016). "Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know." EMBO J **35**(21): 2270-2284.
- Aumailley M. (2013). "The laminin family." Cell Adh Migr **7**(1): 48-45.
- Barresi, R. and K. P. Campbell (2006). "Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease." J Cell Sci **119**(Pt 2): 199-207.
- Bartoli, M., et al. (2001). "Interactions of the rapsyn RING-H2 domain with dystroglycan." J Biol Chem **276**(27): 24911-24917.
- Batchelor, C. L., et al. (2007). "Recruitment of Dbl by ezrin and dystroglycan drives membrane proximal Cdc42 activation and filopodia formation." Cell Cycle **6**(3): 353-363.
- Bello, V., et al. (2015) "The dystroglycan:nestled in an adhesome during embryonic development." Dev Biol **401**(1): 132-42.
- Berndt, U., et al. (2009). "A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(5): 1398-1403.
- Bozzi, M., et al. (2003). "Structural characterization by NMR of the natively unfolded extracellular domain of  $\beta$ -dystroglycan: toward the identification of the binding epitope for alpha-dystroglycan." Biochemistry **42**(46): 13717-13724.
- Bozzi, M., et al. (2009). "Functional diversity of dystroglycan." Matrix Biol **28**(4): 179-187.
- Braunagel, S.C., et al. (2007) "Early sorting of inner nuclear membrane proteins is conserved." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(22): 9307-12.
- Brenman, J. E., et al. (1995). "Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy." Cell **82**(5): 743-752.
- Carpenter, G., Y Liao, H.J. (2013). " Receptor tyrosine kinases in the nucleus." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(10): a008979.

- Chen, M.K. and Hung, M.C. (2015). "Proteolytic cleavage, trafficking, and functions of nuclear receptor tyrosine kinases." FEBS J **282**(19): 3693-721.
- Cook, A., et al. (2007). "Structural biology of nucleocytoplasmic transport." Annu Rev Biochem **76**: 647-671.
- De Rosa, M., et al. (2011). "A second Ig-like domain identified in dystroglycan by molecular modelling and dynamics." J of Mol Graph and Modelling **29** (8): 1015-1024.
- Debler, E. W., et al. (2009). "Nuclear transport comes full circle." Nat Struct Mol Biol **16**(5): 457-459.
- Dekkers, L. C., et al. (2004). "Embryonic expression patterns of the Drosophila dystrophin-associated glycoprotein complex orthologs." Gene Expr Patterns **4**(2): 153-159.
- Denks, K., et al. (2014). "The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes." Mol Membr Biol **31**(2-3): 58-84.
- Dong, M., et al. (2015). "DAG1 mutations associated with asymptomatic hyperCKemia and hypoglycosylation of alpha-dystroglycan." Neurology **84**(3): 273-9.
- Du, Y., et al. (2014). "Syntaxin 6-mediated Golgi translocation plays an important role in nuclear functions of EGFR through microtubule-dependent trafficking." Oncogene **33**(6): 756-70.
- Durbeej, M. and K. P. Campbell (1999). "Biochemical characterization of the epithelial dystroglycan complex." J Biol Chem **274**(37): 26609-26616.
- Durbeej, M., et al. (2001). "Dystroglycan binding to laminin alpha1LG4 module influences epithelial morphogenesis of salivary gland and lung in vitro." Differentiation **69**(2-3): 121-134.
- Ellgaard, L. and A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 181-191.
- Endo, T. (2009). "New era of glycoscience: intrinsic and extrinsic functions performed by glycans. Foreword." Biol Pharm Bull **32**(5): 765-766.
- Ervasti, J. M. and K. P. Campbell (1991). "Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex." Cell **66**(6): 1121-1131.
- Ervasti, J. M. and K. P. Campbell (1993). "A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin." J Cell Biol **122**(4): 809-823.
- Ervasti, J. M., et al. (1990). "Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle." Nature **345**(6273): 315-319.



- Ervasti, J. M. and K. J. Sonnemann (2008). "Biology of the striated muscle dystrophin-glycoprotein complex." Int Rev Cytol **265**: 191-225.
- Ferguson, S. M., and De Camilli, P. (2012). "Dynamin, a membrane-remodelling GTPase." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(2): 75-88.
- Fuentes-Mera, L., et al. (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." Exp Cell Res **312**(16): 3023-3035.
- Gazzerro, E., et al. (2009). "Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases." Eur J Hum Genet.
- Gee, S. H., et al. (1993). "Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin." J Biol Chem **268**(20): 14972-14980.
- Geis, T., et al. (2013). "Homozygous dystroglycan mutation associated with a novel muscle-eye-brain disease-like phenotype with multicystic leucodystrophy." Neurogenetics **14**(3-4): 205-13.
- Gonzalez-Ramirez, R., et al. (2008). "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 **105**(3): 735-745.
- Gottlieb, E., et al. (2005). "Single nucleotide polymorphisms in the dystroglycan gene do not correlate with disease severity in hereditary inclusion body myopathy." Mol Genet Metab **86**(1-2): 244-249.
- Greener, M. J. and R. G. Roberts (2000). "Conservation of components of the dystrophin complex in Drosophila." FEBS Lett **482**(1-2): 13-18.
- Grudnik, P., et al. (2009). "Protein targeting by the signal recognition particle." Biol Chem **390**(8): 775-782.
- Hara, Y., et al. (2011). "A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy." N Engl J Med **364**(10):939-46.
- Hnia, K., et al. (2007). "ZZ domain of dystrophin and utrophin: topology and mapping of a  $\beta$ -dystroglycan interaction site." Biochem J **401**(3): 667-677.
- Holt, K. H., et al. (2000). "Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide." FEBS Lett **468**(1): 79-83.
- Huang, X., et al. (2000). "Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan." Nat Struct Biol **7**(8): 634-8.

- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., et al. (1992). "Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix." Nature **355**(6362): 696-702.
- Illesley, J. L., et al. (2001). "The interaction of dystrophin with  $\beta$ -dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation." Cell Signal **13**(9): 625-632.
- Illesley, J. L., et al. (2002). "The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton." Cell Signal **14**(3): 183-189.
- Jackson, C. L. (2009). "Mechanisms of transport through the Golgi complex." J Cell Sci **122**(Pt 4): 443-452.
- Jacobson, C., et al. (2001). "The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane." J Cell Biol **152**(3): 435-450.
- James, M., et al. (2000). "Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of ( $\beta$ )-dystroglycan regulates its interaction with utrophin." J Cell Sci **113** ( Pt 10): 1717-1726.
- Jung, D., et al. (1995). "Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on  $\beta$ -dystroglycan." J Biol Chem **270**(45): 27305-27310.
- Kirchhausen, T., et al. (2008). "Use of dynasore, the small inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis." Methods Enzymol **438**:77-93.
- Kutay, U. and Mühlhäusser, P. (2006). "Cell biology: Taking a turn into the nucleus." Nature **442**: 991-992.
- Lange, A., et al. (2007). "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha." J Biol Chem **282**(8): 5101-5105.
- Lara-Chacón, B., et al. (2009). "Characterization of an importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan." J Cell Biochem **110**(3): 706-17.
- Liao, H.J. and Carpenter, G. (2007). "Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression." Mol Biol Cell **18**(3): 1064-72.
- Lipscomb, L., et al. (2016). "Desatinib as a treatment for Duchenne muscular dystrophy." Hum Mol Genet **25**(2): 266-274.
- Lo, H.W., et al. (2006). "Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1." J Cell Biochem **98**(6): 1570-83.
- Macia, E., et al. (2006). "Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin." Dev Cell **10**(6): 839-50.

- Martinez-Vieyra, I., et al. (2013). "A role for  $\beta$ -dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts." Biochim Biophys Acta **1833**(3): 698-711.
- Mathew, G., et al. (2013). "Nuclear targeting of dystroglycan promotes the expression of androgen regulated transcription factors in prostate cancer." Sci Rep **3**: 2792.
- Matsumura, K., et al. (1997). "A role of dystroglycan in schwannoma cell adhesion to laminin." J Biol Chem **272**(21): 13904-13910.
- Michele, D. E., et al. (2002). "Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies." Nature **418**(6896): 417-422.
- Michele, D. E. and K. P. Campbell (2003). "Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function." J Biol Chem **278**(18): 15457-15460.
- Miller, G., et al. 2012. "Preventing phosphorylation of dystroglycan ameliorates the dystrophic phenotype in mdx mouse." Hum Mol Genet **21**(20): 4508-20.
- Moore, S. A., et al. (2002). "Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy." Nature **418**(6896): 422-425.
- Moore, S. A. and S. J. Winder (2010). "Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs." Cell Commun Signal **8**:3.
- Muntoni, F., et al. (2008). "Muscular dystrophies due to glycosylation defects." Neurotherapeutics **5**(4): 627-632.
- Oppizzi, M. L., et al. (2008). "Nuclear translocation of  $\beta$ -dystroglycan reveals a distinctive trafficking pattern of autoproteolyzed mucins." Traffic **9**(12): 2063-2072.
- Parsons, M. J., et al. (2002). "Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos." Development **129**(14): 3505-3512.
- Rivier, F., et al. (1999). "Utrophin and dystrophin-associated glycoproteins in normal and dystrophin deficient cardiac muscle." J Muscle Res Cell Motil **20**(3): 305-14.
- Saito, F., et al. (2003). "Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization." Neuron **38**(5): 747-758.
- Sato, S., et al. (2008). "Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation." Nat Neurosci **11**(8): 923-931.
- Sciandra, F., et al. (2013). "The multiples affinities of  $\alpha$ -dystroglycan." Curr Protein Pept Sci **14**(7): 626-34.
- Sciandra, F., et al. (2015). "Genetic engineering of dystroglycan in animal models of muscular dystrophy." Biomed Res Int **2015**:635792

- Scott, D.C. and Schekman, R. (2008). "Role of Sec61p in the ER-associated degradation of short-lived transmembrane proteins." J Cell Biol **181**(7):1095-105.
- Sgambato, A. and A. Brancaccio (2005). "The dystroglycan complex: from biology to cancer." J Cell Physiol **205**(2): 163-169.
- Shan, S. O. and P. Walter (2005). "Co-translational protein targeting by the signal recognition particle." FEBS Lett **579**(4): 921-926.
- Smalheiser, N. R. and N. B. Schwartz (1987). "Cranin: a laminin-binding protein of cell membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(18): 6457-6461.
- Sotgia, F., et al. (2003). "Localization of phospho- $\beta$ -dystroglycan (pY892) to an intracellular vesicular compartment in cultured cells and skeletal muscle fibers in vivo." Biochemistry **42**(23): 7110-7123.
- Sotgia, F., et al. (2000). "Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of  $\beta$  - dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members." J Biol Chem **275**(48): 38048-38058.
- Spence, H. J., et al. (2004). "Ezrin-dependent regulation of the actin cytoskeleton by  $\beta$ -dystroglycan." Hum Mol Genet **13**(15): 1657-1668.
- Spence, H. J., et al. (2004). "Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade." EMBO Rep **5**(5): 484-489.
- Stewart, M. (2007). "Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 195-208.
- Sugiyama, J., et al. (1994). "Dystroglycan binds nerve and muscle agrin." Neuron **13**(1): 103-115.
- Terry, L. J., et al. (2007). "Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport." Science **318**(5855): 1412-1416.
- Thompson, O., et al. (2008). "Dystroglycan, Tks5 and Src mediated assembly of podosomes in myoblasts." PLoS One **3**(11): e3638.
- Tomas, A., et al. (2014). "EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer." Trends Cell Biol **24**(1): 26-34.
- Van Dam, E.M., et al. (2002). "Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways." J Biol Chem **277**(50): 48876-83.

- Vásquez-Limeta, A., et al. (2014). "Nuclear import of b-dystroglycan is facilitated by ezrin-mediated cytoskeleton reorganization." PLoS One **9**(3): e90629.
- Villarreal-Silva, M., et al. (2010). " Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells." Neurochem Res **35**(3): 366-73.
- Villarreal-Silva, M., et al. (2011). " Knockdown of dystrophin Dp71 impairs PC12 cells cycle: localization in the spindle and cytokinesis structures implies a role for Dp71 in cell division." PLoS One **6**(8): e23504.
- Voeltz, G. K., et al., (2006). "A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum." Cell **124**(3): 573-86.
- Wang, Y.N., et al. (2010). " The translocon Sec61beta localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus." J Biol Chem **285**(49): 38720-9.
- Watanabe, N., et al. (2007). "Cys669-Cys713 disulfide bridge formation is a key to dystroglycan cleavage and subunit association." Genes Cells **12**(1): 75-88.
- Williamson, R. A., et al. (1997). "Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice." Hum Mol Genet **6**(6): 831-841.
- Winder, S. J. (2001). "The complexities of dystroglycan." Trends Biochem Sci **26**(2): 118-124.
- Winder, S. J., et al. (1995). "Dystrophin and utrophin: the missing links!" FEBS Lett **369**(1): 27-33.
- Winder, S. J., et al. (1995). "Utrophin actin binding domain: analysis of actin binding and cellular targeting." J Cell Sci **108 ( Pt 1)**: 63-71.
- Yamamoto, K. (2009). "Intracellular lectins involved in folding and transport in the endoplasmic reticulum." Biol Pharm Bull **32**(5): 767-773.
- Yang, B., et al. (1995). "SH3 Domain-mediated interaction of Dystroglycan and Grb2." J Biol Chem **270**(20): 11711-4.
- Yatsenko, A. (2014). "miRNA-based buffering of the cobblestone-lissencephaly-associated extracellular matrix receptor dystroglycan via its alternative 3'-UTR." Nat Commun **5**:4906-

## ANEXO

El trabajo obtenido en este proyecto fue aceptado para su publicación en Scientific Reports-Nature

The screenshot shows the 'About the journal' page for Scientific Reports. The page header includes 'nature.com > scientific reports > about the journal' and 'a natureresearch journal'. The main navigation bar contains 'MENU', 'SCIENTIFIC REPORTS', and icons for Search, E-alert, Submit, and Login. The 'About the journal' section has a sub-navigation bar with links: 'About the journal', 'Aims & scope', 'Editorial Advisory Panel and Editorial Board', 'Open access', 'Article processing charges', 'FAQs', and 'Article Alerts'. The main content area states: 'Scientific Reports is an online, open access journal from the publishers of Nature. We publish scientifically valid primary research from all areas of the natural and clinical sciences.' It then lists the 2016 journal metrics: 'The 2016 journal metrics for Scientific Reports are as follows:'. A bulleted list follows: '2-year impact factor: 4.259', '5-year impact factor: 4.847', 'Immediacy index: 0.647', 'Eigenfactor @ score: 0.38761', 'Article influence score: 1.482', and '2-year median: 3'. At the bottom, it says: 'Visit the Nature Research journals metrics page for a description of these metrics.'

## NUCLEAR TRAFFICKING OF $\beta$ -DYSTROGLYCAN

### Retrograde trafficking of b-DG from the plasma membrane to the nucleus

Viridiana Gracida-Jiménez<sup>1</sup>; Ricardo Mondragón-González<sup>1</sup>; Alejandra Vásquez-Limeta<sup>1,2</sup>; Juan de Dios Gómez-López<sup>1</sup>; Griselda Vélez-Aguilera; Steve J. Winder<sup>3</sup> and Bulmaro Cisneros<sup>1</sup>

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

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

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