

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Función del β -dístroglicano en el nucléolo”

T E S I S

Que presenta

M en C. PAULINA MARGARITA AZUARA MEDINA

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

MARZO, 2019

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 12 del departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) bajo la dirección del Dr. Bulmaro Cisneros Vega y la asesoría del Dr. Efraín Garrido Guerrero, Dra. Esther López Bayghen Patiño, Dr. José Manuel Hernández Hernández y Dr. Jaime García Mena, todos profesores investigadores del CINVESTAV y del Dr. Oscar Hernández Hernández investigador en Ciencias Médicas del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por proveer el financiamiento para la realización de este proyecto.

A mi esposo Luis Enrique Rodríguez por el amor incondicional, apoyo en todos los momentos de decepción y de alegría y por la paciencia durante el largo proceso que fue la realización de esta investigación. Por nunca soltarme de la mano en los momentos que más lo necesité.

A mi hijo Oliver por inspirarme a ser mejor científica y mejor madre cada día.

A mi familia Manuel, Paty, Thelma, Ana, Andrés, Emiliano, Marcos, Arturo por escucharme, aconsejarme, creer en mí, por llorar conmigo mis experimentos fallidos y por alegrarse por los pequeños y grandes logros.

A mi director de tesis el Dr. Bulmaro Cisneros Vega por la paciencia, por permitirme formarme como científica en su laboratorio y por el apoyo todos estos años y a mis asesores por sus consejos, enseñanzas y palabras de aliento.

A todos los autores que se sumaron en la experimentación: Ariana, Dr. Ricardo, Dra. Griselda, Dr. Juan De Dios, Elizabeth, Dr. Reynaldo, Dra. Sara Luz, Dra. Rocío, Dra. Ivette que, sin su compromiso, su profesionalismo y dedicación nunca se hubiera logrado la calidad de este trabajo.

Al equipo del Dr. Gernot Längst: Dr. Attila, Dra. Helen, Elisabeth, Dra. Ingrid, Dr. Rodrigo y todos mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Regensburg, Alemania por sus consejos, por su apoyo, por su amistad y por hacerme sentir parte de la comunidad científica de la Universidad.

A Carolin Apfel por su ayuda y por su cariño para mi esposo y para mí en toda nuestra estancia viviendo en Regensburg.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por todos los momentos vividos, por apoyarme siempre con una sonrisa y sobre todo por su amistad que ya ha perdurado a través de los años y que estoy segura de que seguirá por siempre.

A la familia Rodríguez Ruiz por su apoyo incondicional, por su cariño y por siempre creer en mí.

A mis amigos Liliana, Ernesto, Paty, Raúl, Ximena, Martha, Sandy, Salma, que siguieron de cerca el proceso y que siempre estuvieron ahí con su amistad apoyando codo a codo.

Por su apoyo técnico:

Al Biol. Pablo Gómez Islas

A la M en C. Ma. Guadalupe Aguilar González

Contenido

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Trafico intracelular del β-dístroglicano | 4 |
| Distribución del β-DG en los diferentes compartimentos nucleares | 6 |
| JUSTIFICACIÓN | 8 |
| OBJETIVOS | 8 |
| General..... | 8 |
| Particulares..... | 8 |
| MODELO CELULAR | 9 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 9 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| Cultivo celular | 11 |
| Tratamiento celular con DRB y actinomicina D e inducción del estrés nucleolar | 11 |
| Plásmidos y transfección | 11 |
| Anticuerpos | 12 |
| Inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal | 13 |
| Inmunodetección en fase sólida | 14 |
| Fraccionamiento celular | 14 |
| Inmunoprecipitación | 15 |
| PCR en tiempo real | 16 |
| Ensayos de actividad de promotor con el gen reportero Luciferasa | 17 |
| Ensayos de proliferación celular | 17 |
| Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) | 17 |
| Perfil ribosomal | 18 |
| RESULTADOS | 20 |
| Identificación del β-dístroglicano como una proteína perteneciente al nucléolo | 20 |
| El β-DG interacciona con proteínas nucleolares. | 25 |
| La expresión baja del β-dístroglicano altera la estructura del nucléolo | 27 |
| La producción del β-DG-ICD se incrementa bajo condiciones de estrés nucleolar | 31 |
| La sobreexpresión del β-DG ICD altera la biogénesis ribosomal y la función del factor de transcripción UBF | 35 |
| DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 41 |

CONCLUSIONES..... 45

PERSPECTIVAS 45

BIBLIOGRAFÍA..... 47

ANEXOS..... 53

ABSTRACT

β -dystroglycan (β -DG) is a key component of multiprotein complexes in the plasma membrane and nuclear envelope. In addition, β -DG undergoes two successive proteolytic cleavages that result in the liberation of its intracellular domain (ICD) into the cytosol and nucleus. However, stimuli inducing ICD cleavage and the physiological relevance of this proteolytic fragment is largely unknown. In this study we show for the first time that β -DG ICD is targeted to the nucleolus where it interacts with the nuclear proteins B23 and UBF (central factor of Pol I-mediated rRNA gene transcription) and binds to rDNA promoter regions. Interestingly DG silencing results in reduced B23 and UBF levels and aberrant nucleolar morphology. Furthermore, β -DG ICD cleavage is induced by different nucleolar stressors, including oxidative stress, acidosis and UV irradiation, which implies its participation in the response to nucleolar stress. Consistent with this idea, overexpression of β -DG elicited mislocalization and decreased levels of UBF and suppression of rRNA expression, which in turn provoked altered ribosome profiling and decreased cell growth. Collectively our data reveal that β -DG ICD acts as negative regulator of rDNA transcription by impeding the transcriptional activity of UBF, as a part of the protective mechanism activated in response to nucleolar stress.

RESUMEN

El β -dístroglicano (β -DG) es un componente clave de complejos multiproteicos de membrana plasmática y envoltura nuclear. Adicionalmente, el β -DG libera su dominio intracelular (ICD, por sus siglas en inglés *intracellular domain*) hacia el citosol y el núcleo a través de dos cortes proteolíticos que presenta. Sin embargo, los estímulos que inducen la escisión del ICD así como la función de este fragmento se desconocen. En este estudio, mostramos por primera vez que el ICD del β -DG se trasporta hacia el nucléolo donde interactúa con las proteínas nucleolares B23 y UBF; este último es un factor de transcripción central de la RNA polimerasa I que regula la expresión del rDNA. De manera interesante el silenciamiento de la expresión del dístroglicano (DG) mediante el uso de un RNA interferente provoca una disminución en los niveles de B23 y UBF y consecuentemente daño la morfología de los nucléolos. Demostramos que la generación del ICD del β -DG es inducida por estrés nucleolar inducido por estrés oxidativo, acidosis y radiación UV, lo que implica que este fragmento podría participar en la respuesta celular al estrés nucleolar. De acuerdo con esta idea, la sobreexpresión del β -DG provocó la deslocalización y bajos niveles de UBF y la inhibición de la expresión del rRNA precursor 45S, lo que a su vez alteró el perfil ribosomal y disminuyó la proliferación celular. En conjunto, nuestros resultados demuestran que el ICD del β -DG actúa como regulador negativo de la transcripción del rDNA al impedir la actividad transcripcional de UBF, como parte del mecanismo de protección de la célula que se activa en respuesta al estrés nucleolar.

INTRODUCCIÓN

La distrofina y sus proteínas asociadas forman un complejo en el sarcolema denominado DAPC (por sus siglas en inglés *dystrophin associated protein complex*). El DAPC provee estabilidad al sarcolema durante la contracción muscular (Rybakova *et al.*, 2000). El DAPC está formado por varios subcomplejos, uno de ellos es el complejo distroglicano, esta proteína transmembranal fue identificada y caracterizada inicialmente en el músculo esquelético de conejo (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992; Cohn, 2005) y se distribuye principalmente en los músculos cardíaco y esquelético y en el sistema nervioso central (Durbeej e Campbell, 1999; Cohn, 2005). El distroglicano sirve como puente para conectar la matriz extracelular con el citoesqueleto (**Fig 1**). La subunidad α -distroglicano interactúa con proteínas de la matriz extracelular, principalmente con la laminina, mientras que el β -distroglicano a través de su dominio N-terminal se une de manera no covalente al α -distroglicano y por medio de su extremo C-terminal se une al dominio WW de la distrofina. A su vez, la distrofina se asocia con los filamentos de actina por medio de su dominio homólogo a calpanina y de los repetidos similares a la espectrina que se localizan en su extremo amino terminal (Amann *et al.*, 1999; Norwood *et al.*, 2000). La unión entre la distrofina y el β -distroglicano se regula negativamente por la fosforilación del β -distroglicano en la tirosina presente en la secuencia PPxY (Ilsley *et al.*, 2001; 2002).

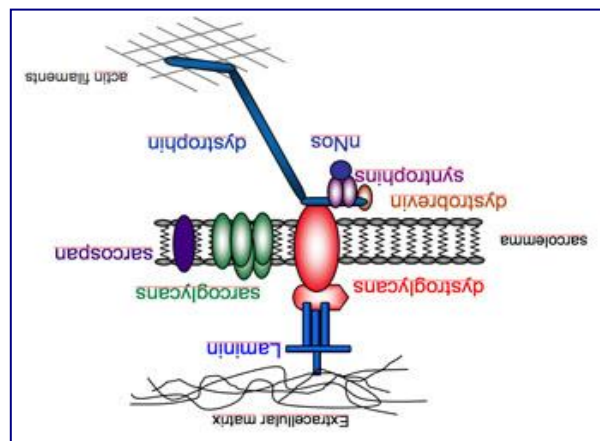


Figura 1. Esquema del complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC).

Como se mencionó anteriormente, las subunidades α y β interactúan de manera no covalente; específicamente, la región del aminoácido 550 al aminoácido 565 del extremo C-terminal del α -dístroglicano se une con la región de amino ácidos que abarca del residuo 691 al residuo 719 del dominio N-terminal del β -dístroglicano (Fig. 2) (Bozzi *et al.*, 2006; Sciandra *et al.*, 2009). Se ha observado que la sobreexpresión del polipéptido precursor del dístroglicano que es incapaz de ser cortado causa distrofia muscular en ratones, y reduce la proliferación y la diferenciación de las células neuroepiteliales (Batchelor *et al.*, 2007; Schröder *et al.*, 2007).

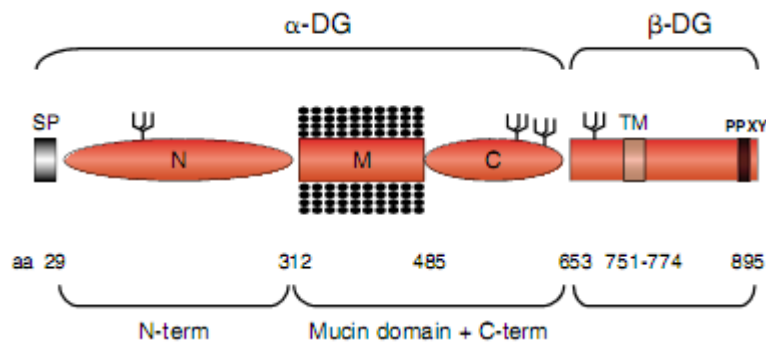


Figura 2. Representación del complejo dístroglicano. Se pueden observar las subunidades α y β que lo componen, así como el sitio donde se localizan la péptida señal (SP) y las distintas modificaciones post-traduccionales (glicosilaciones) que presenta.

El β -dístroglicano es una proteína de membrana que pesa 43 KDa. La proteína del ratón está constituida por un dominio N-terminal extracelular que comprende del aminoácido 652 al residuo 749, un dominio transmembranal que abarca del aminoácido 750 al 773, un dominio C-terminal citoplásmico que se extiende del aminoácido 774 al 890, y un sitio potencial para glicosilación (**Fig 2,3**).

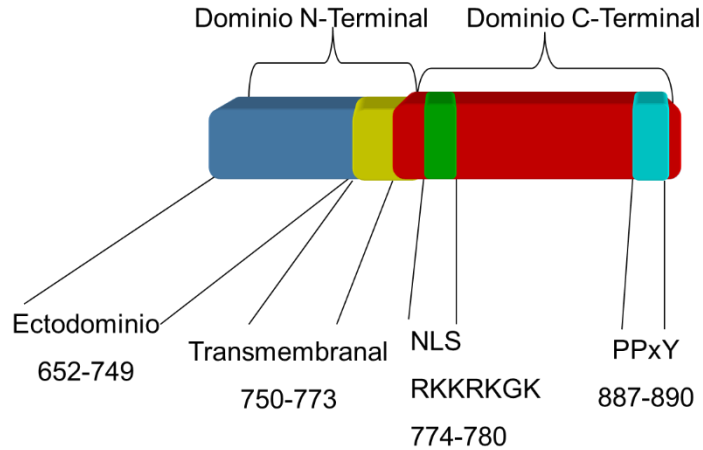


Figura 3. Dominios del β -distroglicano en la especie *Mus Musculus*.

En el dominio C-terminal se localizan dos regiones importantes de la proteína, una secuencia de importación nuclear (NLS) entre los aminoácidos 774 y 780 (RKKRKGK), la cual media el ingreso del β -distroglicano al núcleo, a través de la acción de las importinas (Lara-Chacón *et al.*, 2010b); esta misma secuencia sirve para que el β -distroglicano interactúe con la ezrina, para regular la remodelación del citoesqueleto de actina durante la formación de filopodias y microvellosidades (Spence *et al.*, 2004). La segunda región es el dominio PPxY, por medio del cual el β -distroglicano se asocia con proteínas que portan el dominio WW (distrofina y utrofina) y proteínas con dominio SH3 como Grb. Las interacciones con el dominio PPxY se regulan por la fosforilación del β -distroglicano que lleva a cabo la cinasa Src sobre la tirosina (Y) ubicada en esta secuencia. Cuando el β -distroglicano está fosforilado cambia su afinidad por proteínas con dominio SH2 como Src, Fynn y CSK, entre otras (Bozzi *et al.*, 2009). Se ha observado que la adhesión celular a la laminina y la fibronectina induce la fosforilación de esta tirosina, por lo que se piensa que este evento está involucrado en las interacciones célula-sustrato y/o en las conexiones célula-célula (James *et al.*, 2000) (**Fig. 4**).

Trafico intracelular del β -dístroglicano

El β -DG se encuentra en el núcleo de diferentes tipos celulares y es transportado hacia este organelo a través del sistema de importinas (Lara-Chacón *et al.*, 2010a; Gracida-Jiménez *et al.*, 2017) (**Fig. 5**). Recientemente se estableció que la fosforilación de β -DG en la posición Y890 desencadena su tráfico retrógrado desde la membrana plasmática hasta el núcleo, a través de los endosomas y el retículo endoplásmico, con la participación del translocon Sec61 que libera al β -DG del retículo endoplásmico para que lo reconozcan las importinas (Gracida-Jiménez *et al.*, 2017) **Fig.6**. La figura 6 describe el tráfico del β -DG desde su síntesis en el retículo endoplásmico hasta la membrana plasmática y propone 3 rutas que podrían llevar al β -DG en su forma fosforilada hacia la envoltura nuclear y al nucleoplasma.

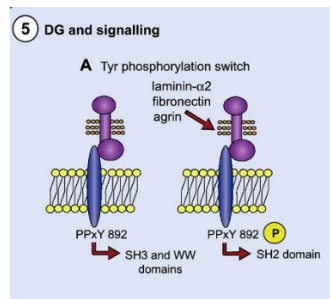


Figura 4. Interacciones del dístroglicano. Se muestra la regulación que ejerce la fosforilación de la región PPxY del β -DG sobre su interacción con proteínas portadoras de los dominios SH3, WW y SH2.

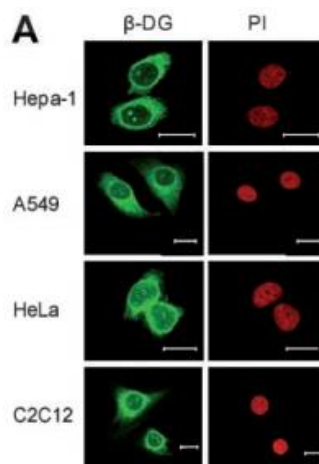


Figura 5. Localización subcelular del β -DG en diferentes tipos celulares

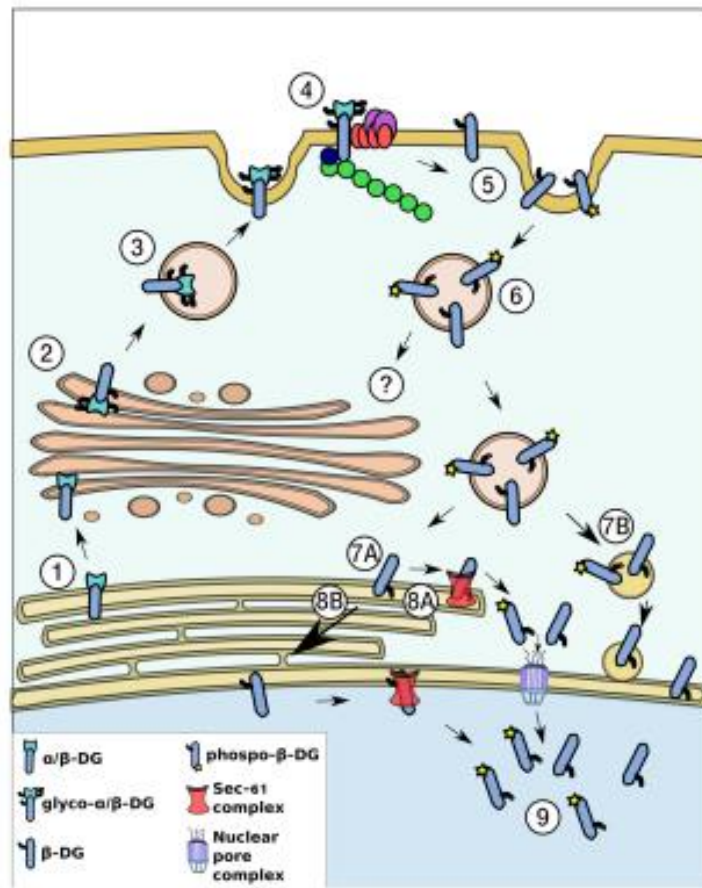


Figure 5. Esquema que representa el tráfico retrógrado del β-distroglicano desde la membrana plasmática (MP) hasta el núcleo. (1) El distroglicano (DG) es sintetizado en el retículo endoplásmico (RE) como un precursor que mediante un corte proteolítico genera las subunidades α y β. (2) El complejo DG mantiene una interacción no covalente entre sus subunidades y así es transportado al aparato de Golgi, donde ambas proteínas son glicosiladas (3) y después son transportadas a la MP para formar parte del complejo DAPC (4). (5,6) El β-DG es endocitado de la MP a la membrana del RE, un proceso modulado por la fosforilación de la tirosina 890 y ahí el traslocon Sec61β libera al β-DG de la membrana del RE (7) para permitir que la proteína sea reconocida por las importinas y sea transportada al núcleo vía el poro nuclear (8A-9). Debido a que el β-DG y el traslocon Sec 61β se han encontrado en la envoltura nuclear, una ruta alternativa considera que el β-DG podría moverse lateralmente a través del RE para alcanzar la envoltura nuclear y ahí interactuar con Sec61β para ser liberado al nucleoplasma (8B-9). Otra vía alternativa sería que el β-DG ingresa al núcleo mediante la fusión de endosomas a la membrana nuclear (7B) (Gracida-Jiménez et al., 2017).

Distribución del β -DG en los diferentes compartimentos nucleares

En el núcleo el β -DG se ensambla con componentes de envoltura nuclear, incluyendo a la emerina, y las láminas A / C y B1, para preservar la estructura y la función nuclear (Martínez-Vieyra *et al.*, 2013; Vélez-Aguilera *et al.*, 2018) y para regular posiblemente de manera indirecta la expresión génica (Mathew *et al.*, 2013). Aparte de su localización en la envoltura nuclear, estudios de microscopía electrónica revelaron la presencia del β -DG en el nucléolo de las células C2C12. Sin embargo la posible función del β -DG en este organelo no se ha abordado.

El núcleo de las células de mamífero contiene de 1-6 nucléolos de tamaño variable. El tamaño depende del tipo celular y está en el rango de 0.5 μ m a 9 μ m. Los nucléolos se organizan alrededor de las regiones cromosómicas que contienen múltiples copias de los genes de rDNA, las cuales se denominan NORs (por sus siglas en inglés Nucleolar Organizer Regions), y se localizan en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (Savino *et al.*, 2001). El nucléolo está compuesto por 3 componentes: el componente fibrilar (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC), en estas regiones se lleva a cabo la transcripción del DNA ribosomal (rDNA) para generar el rRNA precursor (pre-RNA), el procesamiento del pre-RNA y el ensamblaje de las ribonucleoproteínas (RNP) a las rRNA maduros para formar las subunidades ribosomales (**Fig 7**) (Boisvert *et al.*, 2007).

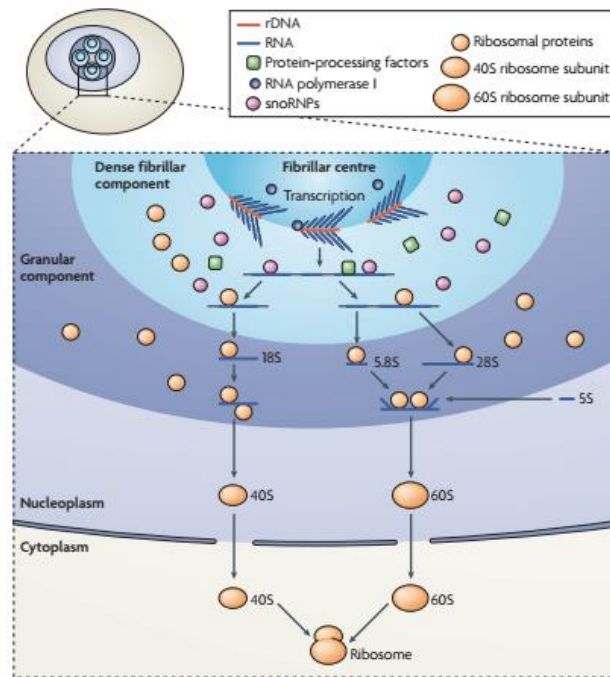


Figura 7. Esquema que representa la biogénesis ribosomal. Se muestran los 3 compartimentos que componen al nucléolo. El DNA ribosomal se transcribe en la frontera del componente fibrilar y el componente fibrilar denso. El pre-RNA naciente es modificado y procesado por ribonucleoproteínas en el componente fibrilar denso. En el componente granular se obtienen las rRNAs 18S, 5.8S y 28S y se ensamblan las ribonucleoproteínas que componen cada una de las subunidades ribosomales que posteriormente se transportan al citoplasma.

Aunque la función principal del nucléolo es la biogénesis ribosomal, también regulan otras funciones celulares, incluyendo el ciclo celular, el envejecimiento celular, la degradación de proteínas, el exporte y modificación de mRNAs. La mayoría de estas funciones son reguladas a través de la respuesta del nucléolo al estrés celular (Holmberg Olausson *et al.*, 2012) (**Fig. 8**). Numerosas proteínas cuyas funciones no se atribuyen generalmente a la biogénesis del ribosoma son llevadas al nucléolo como respuesta a estímulos ambientales (Németh e Grummt, 2018). Estudios de proteómica realizados sobre el nucléolo en condiciones de estrés celular como daño al DNA, inhibición de la transcripción mediante actinomicina D e , infección viral, demostraron que el proteoma del nucléolo se altera ante estos estímulos (Boulon *et al.*, 2010).

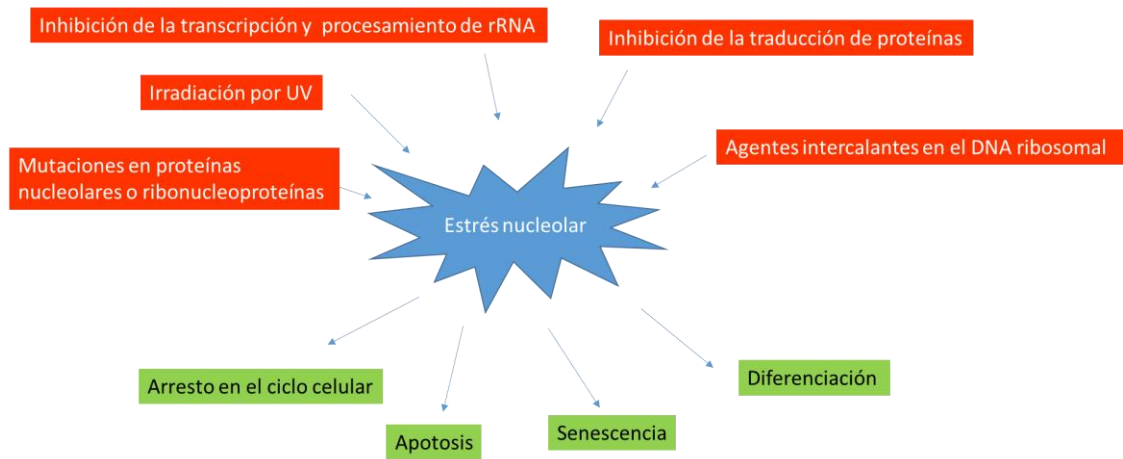


Figura 8. El nucléolo es un sensor de estrés celular. El estrés nucleolar es provocado por diferentes estímulos ambientales que desencadenan diferentes procesos celulares, con la finalidad de mantener la homeostasis celular.

JUSTIFICACIÓN

La presencia del β -dístroglicano en el nucléolo sugiere que participa en los procesos que lleva a cabo esta organelo nuclear, por lo que consideramos relevante identificar dicha función.

OBJETIVOS

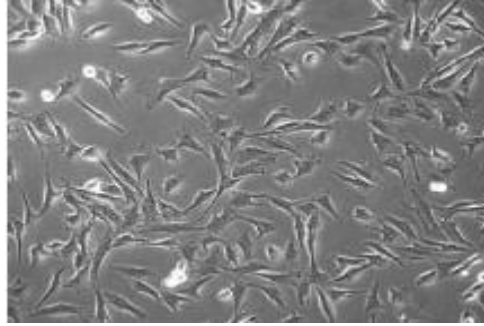
General

Identificar la función del β -dístroglicano en el nucléolo.

Particulares

1. Comprobar la presencia del β -dístroglicano en el nucléolo.
2. Determinar la interacción del β -dístroglicano con proteínas marcadoras de los componentes del nucléolo.
3. Evaluar el efecto de la desregulación de los niveles del β -dístroglicano sobre proteínas nucleolares.
4. Definir la relación funcional del β -DG con UBF.
5. Determinar la función del β -DG en los procesos llevados a cabo por el nucléolo.

MODELO CELULAR

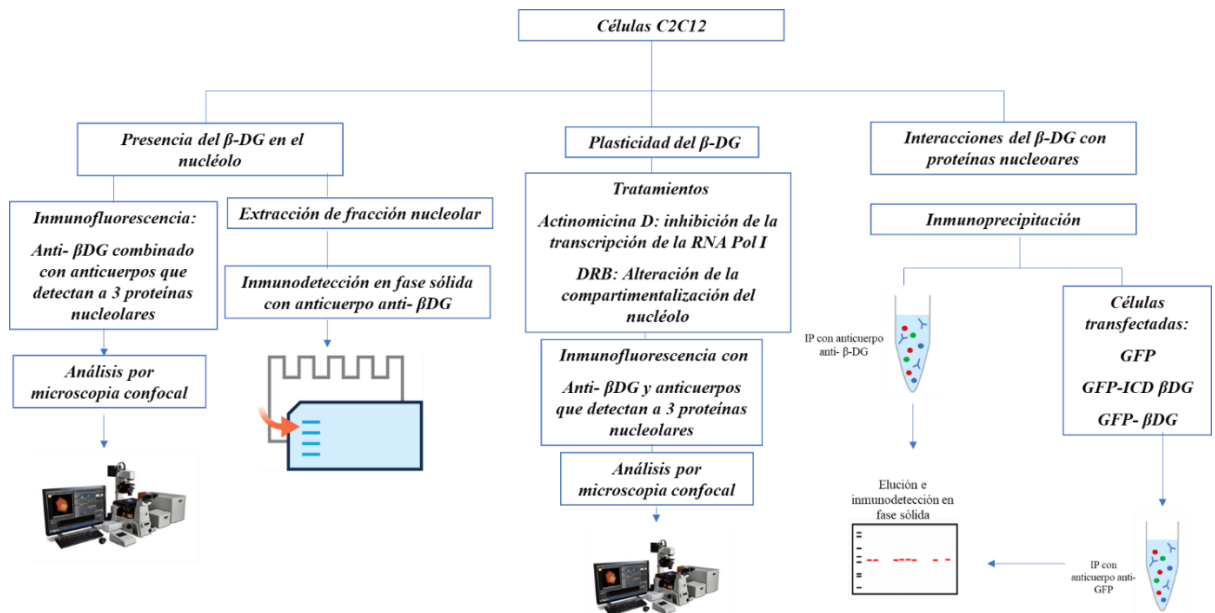


Mioblastos de ratón C2C12. Número de ATCC CRL-1772. Cultivo de células adherentes que son capaces de diferenciarse a miotubos.

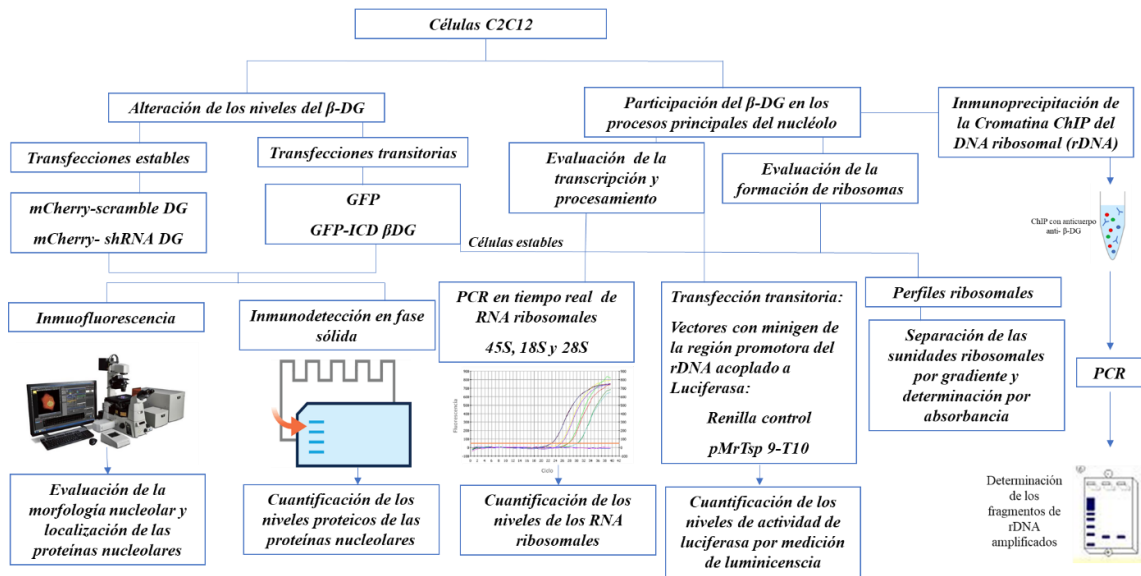
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se dividió en tres secciones:

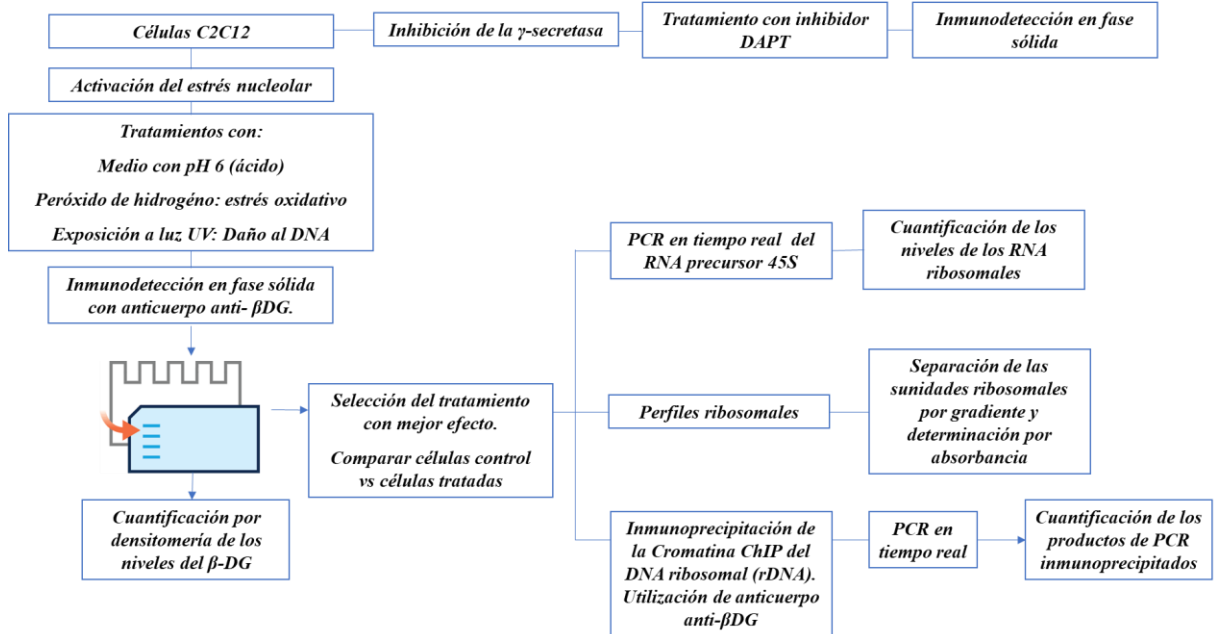
1. Caracterización de la presencia del β -DG en el nucléolo



Determinación de la función del β -DG en el nucléolo



2. Regulación de la presencia del β -DG en el nucléolo



MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

El cultivo y la propagación de los mioblastos de ratón C2C12 (ATCC- CRL-1772) se realizó en medio Eagle de Dulbecco modificado DMEM (Invitrogen), suplementado con suero fetal bovino 10% v/v, penicilina 50 U/ml, estreptomina 50 ug/ml y piruvato de sodio 1 mM, a 37°C con 5 % de CO₂.

Tratamiento celular con DRB y actinomicina D e inducción del estrés nucleolar

Se cultivaron células C2C12 sobre cubreobjetos estériles de 20 mm x 20 mm hasta una confluencia del 60-70%. Las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 3 horas con 5, 6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) (Sigma-Aldrich) [25 µg/ml] o actinomicina D (Sigma-Aldrich) [0.01µg/ml] o Dimetil sulfoxido (DMSO) solamente. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia indirecta doble. Para la inducción de estrés nucleolar, las células se cultivaron en DMEM complementado con suero ajustado a pH 6, o se trataron con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 1.4 mM (Sigma-Aldrich) durante 4 horas o se sometieron a irradiación UV mediante pulsos de 20 J/cm², cada 24 h durante dos días. El inhibidor de la enzima γ -secretasa denominado N- (N- (3,5-difluorofenacetyl) -L-alanil) .S-fenilglicina t-butil éster (DAPT; Sigma- Aldrich, St Louis, Missouri) fue añadido al cultivo a una concentración de 5 y 10 µM, las células se cosecharon para extractos totales después de 24 horas de incubación con el inhibidor.

Plásmidos y transfección

Los vectores de expresión Flag- β -DG ICDWT, Flag- β -DG ICDY890E y Flag- β -DG ICDY890A se generaron mediante amplificación por PCR utilizando como molde los plásmidos DGWT-DG, DGY890E-GFP y DGY890A-GFP respectivamente (Gracida-Jiménez *et al.*, 2017). La secuencia de cDNA que codifica para el dominio intracelular del β -DG (ICD, aminoácidos 774-895) se amplificó por medio de transcriptasa reversa

con la enzima M-MLV, acoplada a una reacción de PCR empleando la DNA polimerasa de alta fidelidad (Pfu turbo; Strategene) y oligonucleótidos que contienen sitios de restricción para las enzimas HindIII y EcoRI. El oligonucleótido *forward* 5'-CCTAAGCTTTATCGCAAGAAGAGGAAGGGC-3' se utilizó para todas las construcciones y los respectivos oligonucleótidos *reverse* que se usaron para cada construcción fueron los siguientes: ICD WT 5'-CTGAATTCTTAAGGGGGAACATACGGAGGG-3', ICD E890A 5'-CTGGAATCCTTAAGGGGGAACCTCCGGAGGG-3' e ICD Y890A 5'-CTGAATTCTTAAGGGGGAAGCTGCCGGAGGG-3. Los productos de PCR se sometieron a doble digestión con las enzimas Hind III y EcoRI y se clonaron en el vector pFlag-CMV-10 digerido previamente con las mismas enzimas. La integridad de las construcciones se confirmó por secuenciación. Para la transfección, las células sembradas sobre cubreobjetos se incubaron durante la noche y posteriormente se transfectaron con 3 µg del vector correspondiente premezclado con 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA.). Para la obtención de las células transfectadas de manera estable, e utilizaron los vectores que expresan un RNA interferente específico para el gen DAG1 de ratón (shRNA DG) o un RNA interferente control (shRNA scramble; control negativo) (GeneCopoeia, Inc., Rockville, MD), el cultivo celular se incubó durante 12 días en presencia de 2 µg / ml de puromicina (Invitrogen), antes de utilizarlas para los experimentos siguientes.

Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios anti-β-DG: G5, anticuerpo policlonal de conejo (Royuela et al, 2001) Dystroglycan pTyr892 (Chen *et al.*, 2003); anticuerpo policlonal de cabra C20 (Santa Cruz Biotechnology, CA) y los anticuerpos monoclonales de ratón MANDAG2 29 y 7D11 (Santa Cruz). Se emplearon además anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra B23 (C19-R), Nup62 (H-122), calnexina (H70), fibrillarina (Ab5821) y GFP (sc8334) y anticuerpos monoclonales de ratón para UBF (F9), RNA polimerasa I (sc-46699), lamin B1 (Ab16048), RPA (sc-46699) y α-tubulina (sc-32293); todos ellos adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-Flag (2368) y anti-Notch1

(4147) se compararon a la compañía Cell Signaling, mientras que el anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina fue donado por el Dr. Manuel Hernández (CINVESTAV, Ciudad de México).

Inmunofluorescencia y análisis por microscopia confocal

Las células cultivadas sobre cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos en PBS, se permeabilizaron con Triton X-100-PBS al 0.2%, se bloquearon con suero bovino fetal al 0,5% y albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PBS y se incubaron durante la noche a 4 ° C con los anticuerpos primarios apropiados. Al día siguiente, las células se lavaron con 0.2% de Triton-X-100-PBS durante 5 minutos y luego con PBS tres veces; se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con el fluorocromo apropiado. Para las muestras que se sometieron a inmunofluorescencia doble, el segundo anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4°C con los correspondientes anticuerpos primarios y al día siguiente las células se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con el fluorocromo apropiado. Para visualizar el citoesqueleto de F-actina las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con faloidina conjugada con TRITC (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EE. UU.) diluida 1:500 en PBS. Para los ensayos de digestión con nucleasas, las células cultivadas sobre en cubreobjetos se trataron con 100 µg / ml de la enzima RNasa A sin proteasa en el buffer CSK (tubos 10 mM, pH 6,8, NaCl 100 mM, sacarosa 30 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 1 mM, 0,5%). (v / v) Triton X-100) durante 40 min a 37°C o con 200 µg / ml de DNasa I sin proteasa en PBS con MgCl₂ 5 mM durante 1 h a 37°C. Las células control se incubaron solamente con las soluciones amortiguadoras. Después se sometieron a ensayos de inmuno-fluorescencia. Finalmente, las preparaciones se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con 0,2 µg / ml de diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma Aldrich) para visualización de núcleos y se montaron sobre portaobjetos con VectaShield (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, EUA.). Las muestras se analizaron mediante microscopía confocal (TCP-SP5, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) utilizando un objetivo de inmersión en aceite

(Plan Neo Fluor 63x; NA = 1.4). El análisis y procesamiento de las imágenes digitalizadas se llevó a cabo con el software Image J 1.62. El área nucleolar (μm^2) se determinó por medio del izando el plugin 3D Counter y el análisis de la colocación se realizó con el plugin JACoP . Los datos recopilados se analizaron estadísticamente con el software Prism6.

Imunodetección en fase sólida

Los extractos de proteínas se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-Nb, Amersham Pharmacia, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Las membranas se bloquearon en TBST (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,5% (v / v) con leche baja en grasa y luego se incubaron durante toda la noche a 4 ° C con los anticuerpos primarios apropiados. La señal específica de la proteína de interés se reveló con los anticuerpos secundarios correspondientes y el sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL TM; Amersham Pharmacia, GE Healthcare), siguiendo con las instrucciones del fabricante.

Fraccionamiento celular

Los extractos celulares totales se obtuvieron utilizando las solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 30 mM, Triton-X-100 al 0,2%, $\text{Na}_3\text{O}_4\text{V}$ 4 mM, NaF 50 mM, Na_2MoO_4 20 mM, PMSF 1 mM, 1X inhibidor de proteasas, *Complete*), el lisado se sonicó 3 veces a 3,5 micrones durante 15 seg con intervalos de 10 seg. Para la purificación de las fracciones citosólica, nuclear y nucleolar, se usó una cantidad total de quince cajas de cultivo de 100 mm de diámetro, cultivadas hasta un 90% de confluencia; las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS frío y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 1 ml de la solución amortiguadora TM (Tris-HCl 10 mM, pH 8, MgCl_2 2 mM, NaF 25 mM, Na_2MoO_4 10 mM, Na_3VO_4 2 mM, PMSF 1 mM), complementado con mezcla de inhibidores de proteasas *Complete* 1X (Roche Applied Science, Indianapolis, EUA.), y se incubó en hielo durante 10 min. Enseguida se añadió Triton X-100-PBS al 2% y el homogenizado se incubó durante 10 minutos en hielo, se transfirió a un

homogeneizador Dounce de vidrio, para aplicarle 30 golpes con la mano de mortero del homogeneizador. Posteriormente las preparaciones se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos a 4 ° C y el sobrenadante que corresponde a la fracción citosólica se recuperó. Por otra parte el precipitado que corresponde a la fracción nuclear se resuspendió en 1 ml de la solución amortiguadora I (sacarosa 0,32 M, CaCl₂ 3 mM, 2 mM Mg (CH₃COO)₂, EDTA 0,1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, 1 DTT mM, PMSF 0,5 mM, 0,5% (v / v) NP40) y 1 ml de la solución amortiguadora de sacarosa II (sacarosa 2 M, Mg 5 mM (CH₃COO)₂, EDTA 0,1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, 1 mM DTT, PMSF 0,5 mM) y se purificó mediante una centrifugación a 16,000 rpm durante 1 hora a 4°C. El precipitado obtenido se diluyó en 600 µl de la solución amortiguadora III (sacarosa 0,34 M, MgCl₂ 1 mM, EDTA 0,1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM) y se tomaron 250 µl para la extracción de proteínas nucleares. Esta nueva mezcla se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min a 4 ° C , el precipitado se resuspendió en 200 µl de la solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, 1% (v / v) Triton X-100), complementado con inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa, se sonicó 3 veces a 4 micrones con 15 segundos en intervalos de 10 segundos, y luego se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min a 4 ° C. Para la purificación de los nucleolos, las 350 µl restantes se sonicaron 5 veces a 5 micrones durante 30 segundos con intervalos de 10 segundos y se analizaron con un microscopio óptico para asegurar la integridad de los nucléolos; enseguida se continuó su purificación por centrifugación a 3,000 g durante 20 minutos a 4 ° C a través de un gradiente de sacarosa utilizando el la solución amortiguadora III y 4 volúmenes de la solución amortiguadora de sacarosa IV (sacarosa 0,88 M, EDTA 0,1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM). Finalmente, el precipitado se lavó con 500 µl de la solución amortiguadora III y se centrifugó a 2,000 g durante 2 minutos a 4°C.

Inmunoprecipitación

Las perlas de proteína G-agarosa (10 µl por muestra; Invitrogen, Carlsbab, CA, EE. UU) se equilibraron 2 veces mediante agitación constante durante 10 minutos con la solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, Na₃VO₄ 2 mM , NaF 25 mM, Na₂MoO₄ 10 mM, PMSF 1 mM y 1x de la mezcla

de inhibidores de proteasas *Complete*). Se cuantificó la cantidad de proteína obtenida en el lisado y se tomaron 500 µg, los cuales fueron incubados con 10 µl de las perlas de proteína G-agarosa previamente equilibradas, con agitación constante durante 2 horas a 4°C, las perlas se retiraron por centrifugación a 3.500 rpm durante 5 minutos y los extractos se incubaron posteriormente durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo apropiado. Se llevó a cabo paralelamente una reacción control con un anticuerpo IgG irrelevante. Posteriormente, se añadieron las perlas de proteína G-agarosa equilibradas y bloqueadas previamente con BSA al 4% a los lisados celulares y se dejaron en incubación durante la noche a 4 °C. Los complejos proteína-anticuerpo se recuperaron por centrifugación a 3.500 rpm durante 5 minutos, se lavaron dos veces durante 10 minutos con 500 µl de la solución amortiguadora de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 1%, inhibidor de proteasa completo 1X , 1 mM PMSF). Las proteínas unidas se separaron de las perlas hirviendo la preparación en la solución amortiguadora de carga para someterse enseguida a ensayos de electroforesis SDS-PAGE (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS al 2% (p / v), glicerol al 10% (v / v), 2-mercaptoetanol al 0,1% (v / v), 0,001 % de azul de bromofenol). Los lisados de las células C2C12 que expresan las proteínas de fusión con GFP se sometieron a inmunoprecipitación utilizando el sistema GFP-Trap® (Chromotek, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

PCR en tiempo real

Para el análisis de la transcripción del rRNA se extrajo el RNA total de las células C23C12 utilizando el estuche Miniprep de ARN Direct-zol TM (Zymo Research, Irvine, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se analizaron posteriormente mediante qRT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos que amplifican el rRNA 45S (oligonucleótido *foward*, 5'-GTGTCCAAGTGTTTCATGCCA; oligonucleótido *reverse*, 5'-CGATCTAAGAGTGAGCAACGAC), 18S rRNA (oligonucleótido *foward*, 5'-TTCCGACCATAAACGATGCC; oligonucleótido *reverse*, 5'-GCTCCACCAACTAAGAACGG), 28S rRNA (oligonucleótido *forward* 5'-GATGGTGA ACTATGCTTGGG; oligonucleótido *reverse*, 5'-

GAATAGGTTGAGATCGTTTCGG) y GAPDH (oligonucleótido *forward* 5'-CTTGGGCTACACTGAGGACC; oligonucleótido *reverse* 5'-CTGTTGCTGTAGCCGTATTC). Las reacciones de RT-qPCR se ejecutaron en el equipo StepOne plus (Life Technologies), utilizando el estuche KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (2X), y se analizaron con el software StepOne. v2.3. Los resultados obtenidos se analizaron por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Ensayos de actividad de promotor con el gen reportero Luciferasa

Las células C2C12 que expresan establemente a las proteínas GFP-ICD-βDG o GFP se co-transfectaron con un vector que contiene el promotor que es reconocido por la RNA polimerasa II (promotor TK) y que dirige la expresión de la luciferasa de *Renilla reniformis* (control para normalizar la eficiencia de transfección) y con vector que contiene el promotor del rDNA de ratón, el cual dirige la expresión de la luciferasa de luciérnaga (pMrTsp-9-T10). Estos vectores fueron donados por el Dr. Gernot Längst de la Universidad de Regensburg, Alemania. Después de 48 horas se midió la actividad de la luciferasa utilizando el estuche dual (Promega). La bioluminiscencia de luciferasa de luciérnaga se dividió entre la bioluminiscencia de la luciferasa de Renilla y se compararon con las células transfectadas con GFP.

Ensayos de proliferación celular

Las células C2C12 que expresan establemente las proteínas GFP-ICD-βDG o GFP se recolectaron y se sembraron por triplicado en placas de 12 pozos a una confluencia de 1×10^3 células / ml por pozo. La proliferación se midió durante 13 días utilizando el estuche comercial para MTT (3-(4,5-dimetiltiazol) - 2,5-difenil tetrazolio bromuro) (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Las células C2C12 se incubaron con formaldehído al 1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción de entrecruzamiento se detuvo agregando glicina a una concentración final de 125 mM. Las células se lavaron y se recolectaron con PBS frío y se centrifugaron a 1,500 g. Después de la centrifugación el precipitado se resuspendió en la solución amortiguadora de sonicación (Hepes 50 mM, pH 7,9, NaCl

140 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,1%, SDS al 0,1% e inhibidores de proteasas). La cromatina se obtuvo aplicando cinco ciclos de sonicación en hielo al durante 20 segundos (sonicador Q55, Qsonica) y se recuperó por centrifugación. La cromatina se clarificó previamente con 50 μ l de perlas de agarosa de proteína G (Invitrogen rPGA) y se incubó con agitación durante 1 hora a 4 ° C. La mezcla se centrifugó a 3, 000 g durante 1 minuto para eliminar el rPGA. Se mezclaron 25 μ g de cromatina pre-clarificada diluida 1:10 en la solución amortiguadora de sonicación con 7,8 μ g del anticuerpos anti- β -dístroglicano (Mandag) o 7,8 μ g de IgG de ratón (control irrelevante). Finalmente, se agregaron 25 μ l de rPGA a cada muestra y se incubaron con agitación constante durante toda la noche a 4°C. Los complejos de proteína-DNA inmunoprecipitados se lavaron exhaustiva y secuencialmente con las siguientes soluciones: solución amortiguadora de sonicación, solución amortiguadora de lavado A (Hepes 50 mM, pH 7,9, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,1%, SDS al 0,1%) , solución amortiguadora de lavado B (Tris-Cl 20 mM pH 8, EDTA 1 mM, LiCl 250 mM, NP40 al 0,5%, desoxicolato al 0,5%) y la solución amortiguadora TE. Finalmente, el precipitado se incubó con agitación constante durante 10 minutos a 65°C en la solución amortiguadora de elución (Tris-Cl 50 mM, pH 8, EDTA 1 mM, SDS al 1%, NaHCO₃ 50 mM). El sobrenadante se recuperó por centrifugación y el entrecruzamiento se revirtió mediante la adición de RNAasa A y Proteinasa K, incubando las muestras con agitación constante durante 4 horas a 65 ° C. El DNA se recuperó mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol absoluto. Se utilizaron 20 ng de DNA para las reacciones de PCR y se utilizaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de diferentes regiones del rDNA (Hisaoka *et al.*, 2010; Todd *et al.*, 2016)

Perfil ribosomal

Las células cultivadas a 80-90% de confluencia se cosecharon, se lavaron con PBS conteniendo 100 μ g / ml de cicloheximida y se centrifugaron a 5, 000 rpm durante 5 min a 4 ° C, después se añadieron 200 μ l de la solución amortiguadora de lisis que contenía 100 μ g / ml de cicloheximida y una solución 1x de inhibidores de proteasas. Posteriormente, las células se centrifugaron durante 10 minutos a 10, 000 rpm y el

sobrenadante se colocó sobre un gradiente de sacarosa del 15% al 50% para posteriormente centrifugarse a 25,000 rpm durante 5 horas y durante 30 minutos a 4°C, utilizando el rotor de Beckman SW28Ti. Enseguida los gradientes se escanearon a una absorbancia de 260 nm, empezando por la parte del recolector de gradiente ISCO. Las fracciones obtenidas se precipitaron con etanol absoluto y se centrifugaron a 15,000 rpm durante 30 minutos para obtener las partículas ribosomales.

RESULTADOS

Identificación del β -dístroglicano como una proteína perteneciente al nucléolo.

El β -dístroglicano (β -DG) es una proteína que se transporta al núcleo por medio del sistema de importinas (Lara-Chacón *et al.*, 2010b). En mioblastos de ratón C2C12 se describió como una proteína estructural de la envoltura nuclear que interacciona con las proteínas de la lámina nuclear (Martínez-Vieyra *et al.*, 2013). También se demostró en ese estudio que el β -DG se localiza en el nucléolo, donde interacciona con la proteína nucleolar Nopp140 (Martínez-Vieyra *et al.*, 2013). En este estudio decidimos analizar la posible función del β -DG en el nucléolo utilizando a las células C2C12 como modelo de estudio. En primer lugar decidimos confirmar la presencia del β -DG en este organelo nuclear por medio de su colocalización con diferentes proteínas nucleolares, empleando ensayos de inmunofluorescencia doble con anticuerpos que reconocen al β -DG y a las proteínas del nucléolo fibrilarina, UBF y nucleofosmina (B23) (Sanij *et al.*), las cuales son marcadoras de los centros fibrilares (CF), el componente fibrilar denso (CFD) y el componente granular respectivamente.

Los resultados obtenidos fueron analizados por microscopia confocal y mediante el cálculo del coeficiente Manders' se demostró que el β -DG colocaliza preferencialmente con la proteína nucleolar UBF (Fig. 1A). Adicionalmente se observó que, al trazar una línea transversal por el núcleo, las señales de fluorescencia del β -DG y las proteínas nucleolares se sobrelapan en ciertas secciones (Fig. 1A). El nucléolo es un organelo dinámico con plasticidad y responde a diferentes estímulos mediante la redistribución de sus componentes. Por lo tanto nos preguntamos si el β -DG se re-distribuye con las proteínas nucleolares cuando se aplican agentes desorganizadores del nucléolo, como son la actinomicina D, esta droga inhibe específicamente la actividad de la RNA polimerasa I a una concentración de 0.01 μ g/ml (Shav-Tal *et al.*, 2005), y DRB, el cual inhibe a la

cinasa CK2 afectando la compartimentalización del nucléolo (Louvet *et al.*, 2006) cuando se aplica a una concentración de 25 ug/ml. Posterior a los tratamientos se realizaron ensayos de inmunofluorescencias para determinar la colocación del β -DG con las proteínas marcadoras del nucléolo. Mediante el análisis de los coeficientes de Manders' se concluyó que el β -DG tiene la habilidad de redistribuirse en conjunto con las proteínas UBF y B23 cuando las células se trataron con actinomicina D, siendo la colocación con UBF mayor que con B23. Estos resultados sugieren que el β -DG podría estar involucrado en las funciones efectuadas por los centros fibrilares y por el componente fibrilar denso (Fig. 1B). La especificidad del anticuerpo C20 utilizado para estos ensayos se demostró utilizando células C2C12 knockout para el gen del y mediante la utilización de un péptido que bloquea el anticuerpo; en ambos casos se eliminó la señal nucleolar (Fig.1C y 1D)

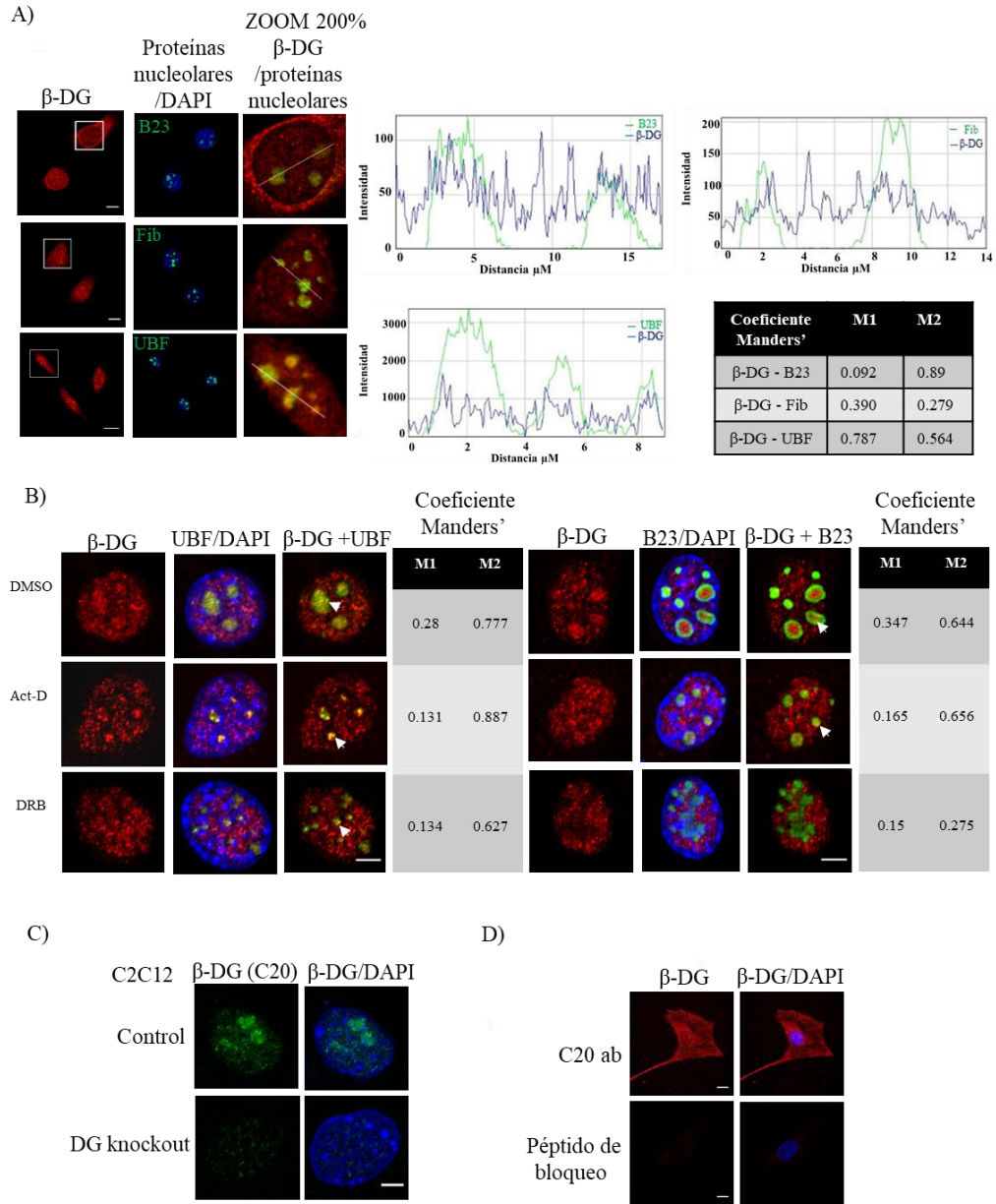


Figura 1. El β-DG se asocia con proteínas nucleolares antes y después inducir la desorganización nucleolar. (A) Colocalización del β-DG con las proteínas nucleolares B23, fibrilarina y UBF. La gráfica indica la intensidad de cada fluoróforo a lo largo de la línea transversal trazada por medio de la herramienta ROI manager Multiplot. (B) Colocalización del β-DG con proteínas nucleolares después del tratamiento con el inhibidor de la transcripción de rDNA actinomycin D (Act-D; 0.01 μg/μl) durante 3 horas (panel superior), y con 5,6 dichloro-1-- d-

ribofuranosylbenzimidazol DRB (inhibidor de la cinasa CK2). Las células se tiñeron con DAPI para la visualización de los núcleos antes de analizarlas mediante microscopía confocal (barra, 10 μ m). Las regiones de mayor colocación de β -DG con proteínas nucleolares se señalan con las flechas en las imágenes ampliadas. El coeficiente de superposición de Manders se calculó en las inmunofluorescencias dobles: M1 se refiere a la fracción del β -DG que coincide con la señal de las proteínas nucleolares, sobre su intensidad total, y M2 se refiere a la fracción de la señal de proteínas nucleolares que coincide con la señal de β -DG, sobre su intensidad total. (C) Para demostrar la especificidad del anticuerpo C20, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia utilizando células C2C12 silvestres y células C2C12 que carecen de la expresión del DG (knockout) para (D) Las células C2C12 se incubaron previamente con un péptido que bloquea la acción del anticuerpo C20 (C20 ab), previo a los ensayos de inmunofluorescencia.

Para determinar si el β -DG es una proteína que reside en el nucléolo se llevó a cabo un fraccionamiento celular por medio de centrifugaciones diferenciales en sacarosa. La presencia del β -DG en las diferentes fracciones celulares se observó por medio de inmunodetección en fase sólida con anticuerpos anti- β -DG (mandag o C20) o con un anticuerpo que detecta la tirosina 890 del β -DG fosforilada. La pureza del fraccionamiento celular se comprobó mediante la detección de calnexina, la nucleoporina 62 (Nup62) y fibrilarina proteínas marcadoras de la fracción citoplasmática, nuclear y nucleolar, respectivamente (Fig 2A). En la fracción nucleolar se observó la presencia de una proteína que migró alrededor de 30 kDa cuando se utilizaron los anticuerpos anti- β -DG e incluso con el anticuerpo que detecta su forma fosforilada, por lo que asumimos que este fragmento corresponde con el producto que se genera por la acción de la γ -secretasa (γ -Secretase Dependent Nuclear Targeting of Dystroglycan. Daniel Leocadio, Andrew Mitchell, and Steve J. Winder, 2016). Para corroborar esta hipótesis, se realizaron tratamientos con el fármaco DAPT que inhibe la actividad de la γ -secretasa. Las células fueron incubadas durante 24 horas con dos diferentes concentraciones del fármaco (5 μ M y 10 μ M) y posteriormente se realizó la inmunodetección en fase sólida para revelar el β -DG y el dominio intracelular de Notch

(control positivo) (Fig. 2B). La densitometría mostró una disminución de la banda de 26 kDa que fue proporcional a la concentración de inhibidor, por lo que se confirma que el fragmento de β -DG corresponde a su dominio intracelular, como se describió anteriormente (Leocadio Daniel, 2016). Este fragmento comprende del aminoácido 775 hasta el 890 de la secuencia del β -DG de ratón, que denominaremos de aquí en adelante como β -DG ICD, por sus siglas en inglés *intracellular domain*.

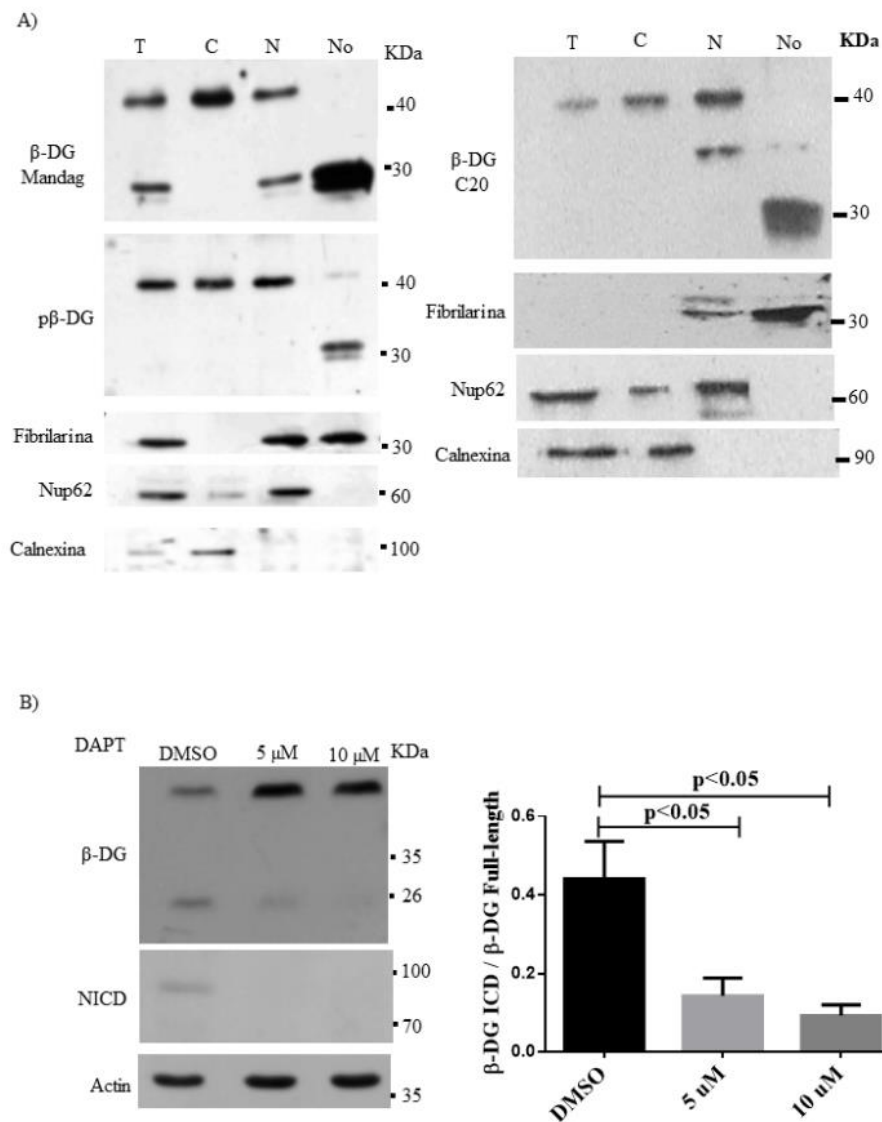


Figura 2. El β -DG es una proteína que reside en el nucléolo. (A) Fraccionamiento celular e inmunodetección en fase sólida para el β -DG y las proteínas calnexina,

Nup62 y fibrilarina, marcadoras de pureza de las fracciones del citoplasma (C), núcleo (N) y nucléolo (No) respectivamente. Se observó la presencia del dominio intracelular del β -DG ICD (26KDa) en la fracción nucleolar con dos diferentes anticuerpos Mandag y C20, así como con el anticuerpo que detecta la forma fosforilada del β -dístroglicano ($p\beta$ DG). (B) Inmunodetección en fase sólida con anticuerpos anti- β -dístroglicano, utilizando extractos de células tratadas durante 24 horas con el inhibidor de la enzima γ -secretasa (DAPT) a dos diferentes concentraciones (5 y 10 μ M). Como control de la inhibición se reveló para el dominio intracelular de Notch (NICD) y como control de carga se utilizó actina. De lado derecho se muestra la gráfica de la densitometría, los datos de tres experimentos independientes se analizaron mediante la prueba t-student; se muestra el error estándar de la media (\pm SEM) y los valores de p denotan diferencias significativas.

El β -DG interactúa con proteínas nucleolares.

Una vez caracterizado la presencia del β -DG en el nucléolo decidimos evaluar su interacción con proteínas pertenecientes a este compartimento del núcleo. Para determinar las interacciones se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos para el β -DG y extractos totales. Enseguida se analizó si existía interacción con las proteínas UBF, fibrilarina y B23 por medio de inmunodetección en fase sólida (Fig. 3A). Los resultados mostraron la interacción del β -DG con la proteína UBF y en menor grado con la proteína B23. La proteína UBF es un factor de transcripción que forma parte del complejo de inicio de la transcripción del RNA 45S (Bell *et al.*, 1988; Sanij *et al.*, 2008), por lo que el β -DG podría estar involucrado en la transcripción de la RNA pol I o en el procesamiento del rRNA 28S o el ensamblaje de las subunidades ribosomales (Herrera *et al.*, 1995; Savkur e Olson, 1998; Lindström, 2011), esto último con base a su interacción con la proteína B23.

Para discernir si la interacción con las proteínas nucleolares las lleva a cabo el β -DG de longitud completa o el dominio β -DG ICD, se transfectaron las células C2C12 para que expresarán las proteínas recombinantes GFP- β -DG ICD, GFP- β -DG o GFP sola

(control negativo). Enseguida se inmunoprecipitaron las proteínas recombinantes mediante el Kit GFP-trap y la fracción inmunoprecipitada se reveló por inmunodetección en fase sólida con anticuerpos dirigidos contra UBF, B23, GFP y lámina B1; esta última proteína se utilizó como un control postitivo de la interacción ya que se ha reportado previamente que se asocia con el β -DG (Fig. 3B). De acuerdo con nuestra hipótesis, se observaron las bandas correspondientes a UBF y B23 en los inmunoprecipitados de la proteína GFP- β DG ICD pero no en el inmunoprecipitado de GFP. De manera interesante también se encontró interacción de UBF con la proteína GFP- β DG, lo cual podría deberse a que la envoltura nuclear, en donde se encuentra el β -DG de 43 kDa (Martínez-Vieyra *et al.*, 2013), forma invaginaciones que conectan con el nucléolo (Hernandez-Verdun, 2006).

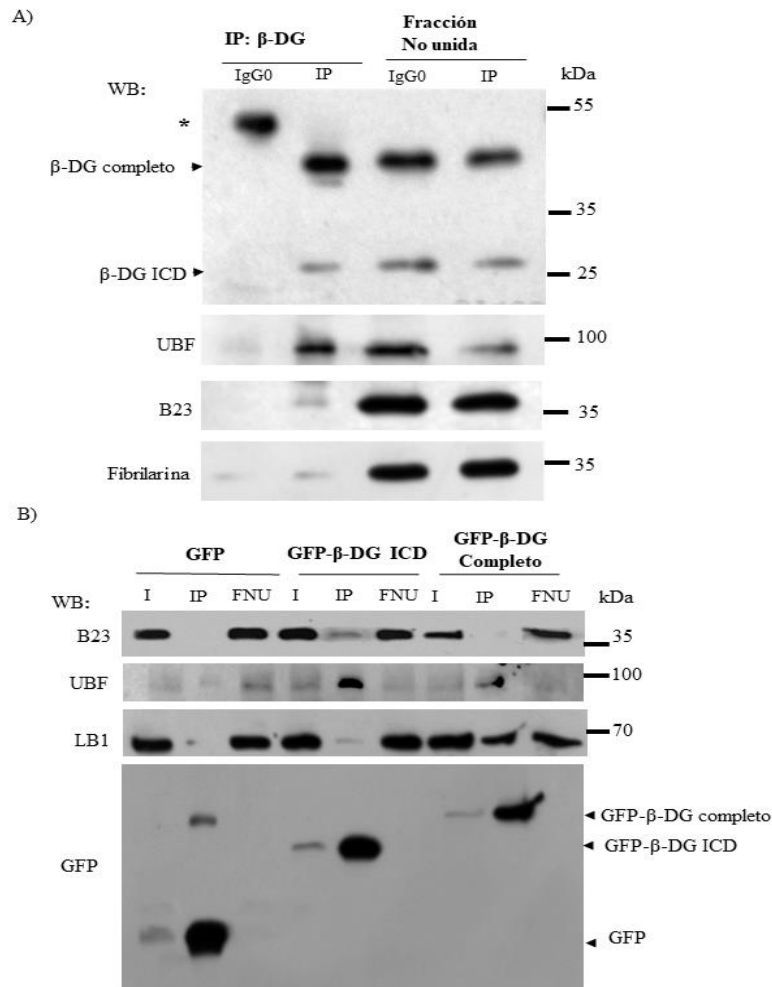


Figura 3. El β -dístroglicano interactúa con proteínas nucleolares. (A) Extractos totales de las células C2C12 se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti- β -DG y posteriormente se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección en fase sólida con anticuerpos dirigidos contra β -DG, UBF, B23 y fibrilarina. IP, fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo anti- β -DG. IP-IgG0, inmunoprecipitación con un anticuerpo irrelevante. (B) Ensayos de inmunoprecipitación para las proteínas recombinantes GFP- β DG ICD, GFP- β DG y GFP. La fracción inmunoprecipitada se analizó mediante inmunodetección en fase sólida con anticuerpos contra las proteínas GFP, UBF, B23 y lámina B1 (control positivo de interacción). Input (I); IP, inmunoprecipitados; FNU, fracción no unida.

La expresión baja del β -dístroglicano altera la estructura del nucléolo

Para determinar los efectos biológicos que causa la ausencia del β -DG en el nucléolo, se transfectaron las células C2C12 con vector que expresa un RNA interferente dirigido contra el gen *DAG1*, con la finalidad de disminuir la expresión del DG dístroglicano, utilizando como control un RNA interferente que no reconoce gen alguno. La figura 4A muestra la disminución del 60 % del RNA mensajero del DG en los cultivos celulares transfectados de manera estable; la cuantificación se realizó por medio de PCR en tiempo real utilizando el método comparativo $2^{-(\Delta\Delta CT)}$. Estos cultivos celulares se utilizaron para evaluar los niveles de las proteínas UBF y B23 por medio de inmunodetección en fase sólida. Los niveles de estas proteínas se encontraron disminuidos (Fig. 4B). Aunado a lo anterior se realizaron ensayos de inmunofluorescencias con anticuerpos que detectan las proteínas UBF y a B23 para determinar si la disminución del β -DG afecta la estructura del nucléolo. Se observó un aumento del área nucleolar en las células que expresan el RNA interferente para el DG mediante el software ImageJ (Fig. 4C y 4D); estos resultados indican que el β -DG participa en la plasticidad del nucléolo; por tanto, las funciones que son desempeñadas por el nucléolo podrían verse afectadas por la baja expresión del DG, incluyendo la transcripción del RNA ribosomal (Sanij *et al.*, 2008), el procesamiento del rRNA 28S

(Herrera *et al.*, 1995) y el remodelamiento de la cromatina (Sanij e Hannan, 2009; Lindström, 2011).

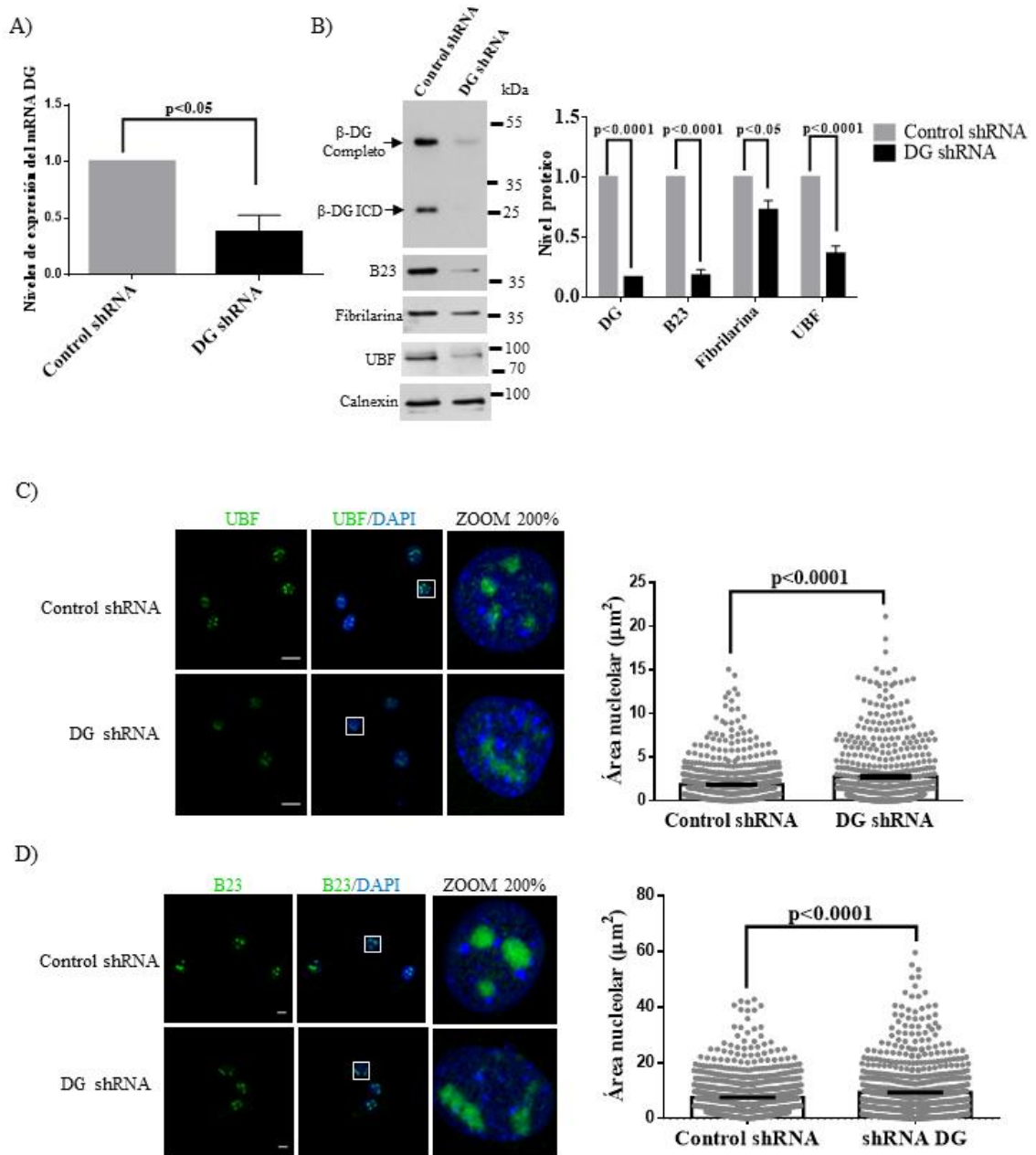


Figura 4. Los niveles bajos del DG alteran la morfología del nucléolo y reducen los niveles de las UBF y B23. (A) Cuantificación del RNA mensajero del DG por PCR en

tiempo en las células C2C12 que expresan un RNA interferente (shRNA) contra el DG o un RNA interferente control (control shRNA): Se empleó el gen GAPDH para la normalización de los datos. (B) Analisis de los niveles de las proteínas β -DG, UBF, B23 y fibrilarina por medio de inmunodetección en fase sólida en los cultivos transfectados de manera estable. Se utilizó calnexina como control de carga, De lado derecho se muestra los datos de la densitometría de tres experimentos independientes que se analizaron mediante la prueba t-student. (C-D) Localización de las proteínas nucleolares UBF y B23 mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Se cuantificó el área nucleolar de 600 nucleolos de tres ensayos independientes para cada condición experimental (gráficas de la derecha). Los datos se analizaron mediante la prueba t-student.

El aumento de área nucleolar se ha relacionado con un incremento en la transcripción del pre-rRNA en células senescentes y células cancerígenas (Derenzini *et al.*, 2000; Buchwalter e Hetzer, 2017); por tanto, es posible especular que la baja expresión del β -DG altera la transcripción del RNA ribosomal. Para comprobar lo anterior se realizó la cuantificación de los RNAs ribosomales (rRNAs) 18 S y 28S por medio de PCR en tiempo real. (Fig. 5A) De manera inesperada se observó un incremento del rRNA 28S y una disminución del del rRNA 18S. Con base en estos resultados se puede especular que el β -DG está involucrado en el procesamiento del pre-RNA, en los primeras etapas que es en donde se separan las dos rutas de procesamiento que generan a los diferentes RNA ribosomales (Aubert *et al.*, 2018; Burke *et al.*, 2018); No obstante, se requieren experimentos adicionales para probar esta hipótesis.

La siguiente pregunta de nuestro estudio fue si el β -DG se une a la región de control transcripcional del DNA ribosomal (rDNA), como lo hace el factor de transcripción UBF (Prieto e Mcstay, 2007; Sanij *et al.*, 2008; Sanij e Hannan, 2009). Para lo cual se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina sobre células C2C12 utilizando anticuerpos anti- β DG, y como control de especificidad de los experimentos se emplearon células C2C12 que no expresan el gen del DG (knockout). Por otra parte, se utilizó la inmunoprecipitación de la subunidad RPA de la RNA polimerasa I como

control positivo. Los sitios analizados fueron los siguientes: la región promotora, la región codificante correspondiente al 5.8S, a la cual se asocia B23 (Hisaoaka *et al.*, 2010) y una región que corresponde al espacio intergénico denominado IGS. Claramente se pudo observar la amplificación de los sitios 5.8S e IGS en los inmunoprecipitados del β -DG (Fig.5B). Las dos regiones participan en la regulación de la expresión del rRNA y del procesamiento del pre-RNA (Jacob *et al.*, 2013; Todd *et al.*, 2016), por lo que la presencia del β -DG en estas regiones podría explicar su efecto sobre el procesamiento de los RNA ribosomales y también se puede inferir que el β -DG modula la transcripción del pre-RNA ribosomal.

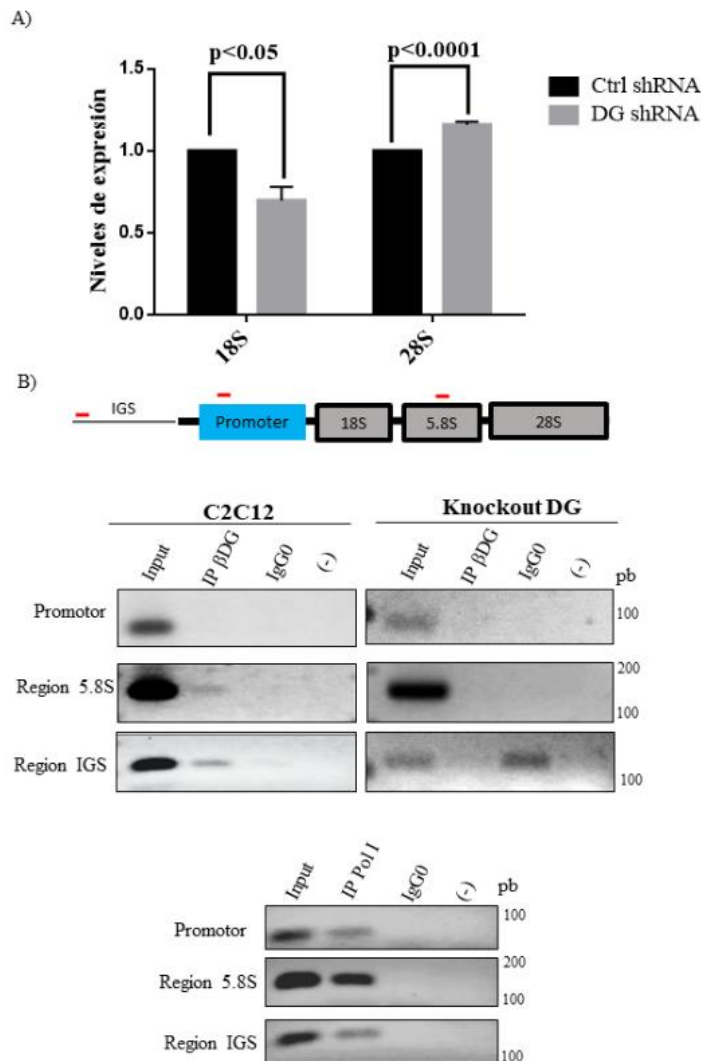


Figura 5. El β -DG se une al rDNA y sus niveles bajos desregulan la expresión de los rRNA 18S y 28S. (A) Cuantificación de los RNA ribosomales 18S y 28S mediante PCR en tiempo real. Los resultados de tres experimentos independientes se analizaron mediante la prueba t-student. (B) Las células C2C12 silvestres y knockout para el DG se sometieron a ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con anticuerpos anti- β -DG (MANDAG). Los precipitados se analizaron posteriormente por medio de PCR empelando oligos para la región promotora, la región 5.8S y la región IGS (secuencia intergénica) del rDNA. Los ensayos de ChIP con anticuerpos anti-PolII sirvieron como control positivo. El dibujo en la parte superior muestra la organización del gen rDNA y los sitios donde hibridan los oligonucleótidos utilizados (línea roja), IgG0, representa la inmunoprecipitación con un anticuerpo irrelevante; IP, inmunoprecipitación con anticuerpos específicos; (-), reacción sin anticuerpos.

La producción del β -DG-ICD se incrementa bajo condiciones de estrés nucleolar

El nucléolo es un organelo sensor de diferentes tipos de estrés. El estrés nucleolar puede ser inducido por fármacos como la actinomicina D o por condiciones ambientales como acidosis, estrés oxidativo o por radiaciones UV. Durante el estrés nucleolar, las proteínas involucradas en el ensamblaje de los ribosomas, así como otras proteínas nucleolares como B23 se deslocalizan del nucléolo hacia el nucleoplasma, mientras que otras proteínas como p53 viajan al nucléolo para arrestar la progresión del ciclo celular (Holmberg Olausson *et al.*, 2012; James *et al.*, 2014). Tomando en cuenta lo anterior nos preguntamos si los niveles del β -DG ICD cambian bajo condiciones de estrés nucleolar. Los tratamientos que se evaluaron fueron los siguientes: incubación durante 24 horas en medio ácido (pH 6), tratamiento con 1.4 mM de H₂O₂ durante 4 horas e irradiación con UV, empleando 2 pulsos de 20 J/m² por 15 seg cada 24 horas. Los efectos se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida con anticuerpos dirigidos contra las proteínas β DG, UBF, B23 y p53 (control positivo de estrés celular). De manera interesante observamos un aumento en la producción del β -DG ICD para todos los tratamientos que inducen estrés nucleolar, siendo el más efectivo la irradiación con luz UV. También observamos de manera una

disminución del 40 % en los niveles de la proteína UBF y un aparente aumento del 20% de la proteína B23 (Fig.6A y 6B).

El aumento del β -DG ICD sugiere que el estrés nucleolar induce la acción de la γ -secretasa sobre el β -DG y este mecanismo parece ser dependiente de p53 (Rubbi e Milner, 2003; Boulon *et al.*, 2010), debido a la evidente activación de p53 en respuesta a los tratamientos con UV y H₂O₂. El tratamiento con acidosis no tuvo efecto sobre p53 e indujo muy poco la producción del β -DG ICD, a pesar de que en células cancerosas si incrementa los niveles de p53 (Lamonte *et al.*, 2013).

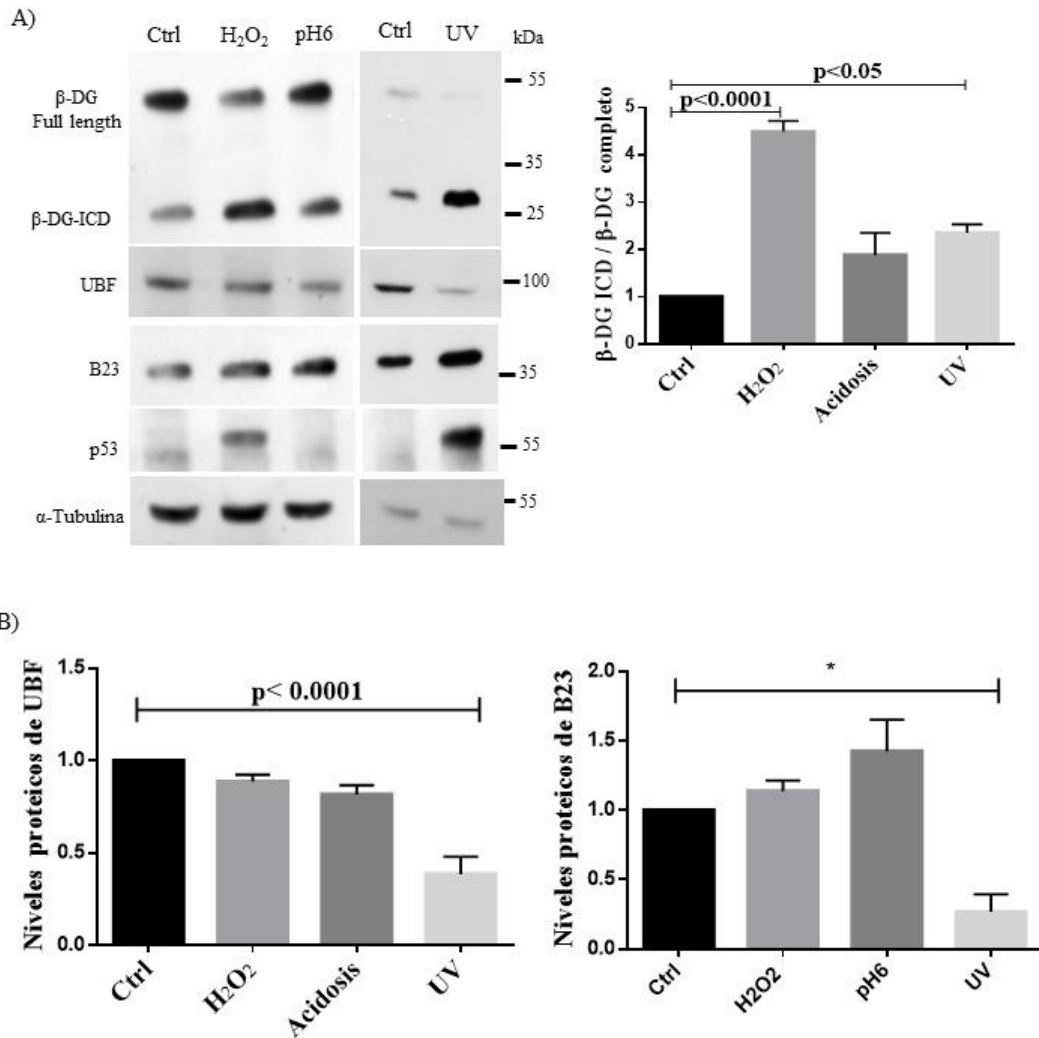


Figura 6. El estrés nucleolar induce la producción del β -DG ICD. (A) Las células C2C12 se trataron con H_2O_2 , se irradiaron con UV o se cultivaron en condiciones de acidosis (pH 6). Los lisados de las células tratadas se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida con anticuerpos específicos contra β -DG, UBF, B23, p53 y α -tubulina (control de carga). La cuantificación de los niveles proteicos del β -DG ICD se calcularon sobre los niveles proteicos del β -DG completo (43 kDa) (panel derecho). (B) Los datos de densitometría de tres experimentos independientes se analizaron mediante ANOVA de una sola vía. Se muestra el error estándar de la media \pm SEM y los valores de p que denotan diferencias significativas.

La desorganización nucleolar se comprobó por medio de la inmunotinción para la proteína UBF. Se observó la acumulación de la proteína UBF en la periferia del componente granular, representado por la distribución de la proteína B23 (Fig 7A).

En condiciones de estrés oxidativo, la transcripción del pre-rRNA 45S se inhibe por efecto de la cinasa JNK que fosforila al factor de transcripción TIF-IA, evitando así su interacción con la RNA polimerasa I (Mayer *et al.*, 2005). Por lo que procedimos a cuantificar los niveles del pre-RNA 45S por medio de PCR en tiempo real en los cultivos sometidos a estrés oxidativo. Se encontró que los niveles de la transcripción del rRNA disminuyó un 90 % (Fig. 7B). Debido a la inhibición tan drástica de la transcripción decidimos analizar el perfil ribosomal y encontramos que la formación de las subunidades 40S y 60S, así como la presencia de los polisomas disminuyen en las células tratadas; por el contrario la formación del ribosoma 80S no se ve afectada (Kiel *et al.*, 2007; Pisarev *et al.*, 2007) (Fig. 7C). Debido al aumento evidente en la producción del β -DG ICD en las células sometidas a estrés oxidativo, nos preguntamos si su unión al rDNA cambia ante este estímulo. Para lo cual se realizaron inmunoprecipitaciones de la cromatina en las células inducidas al estrés oxidativo. Los resultados de PCR cuantitativa mostraron un aumento en la actividad de unión del β -DG ICD a las tres regiones del rDNA analizadas, en comparación con las células control (Fig 7D).

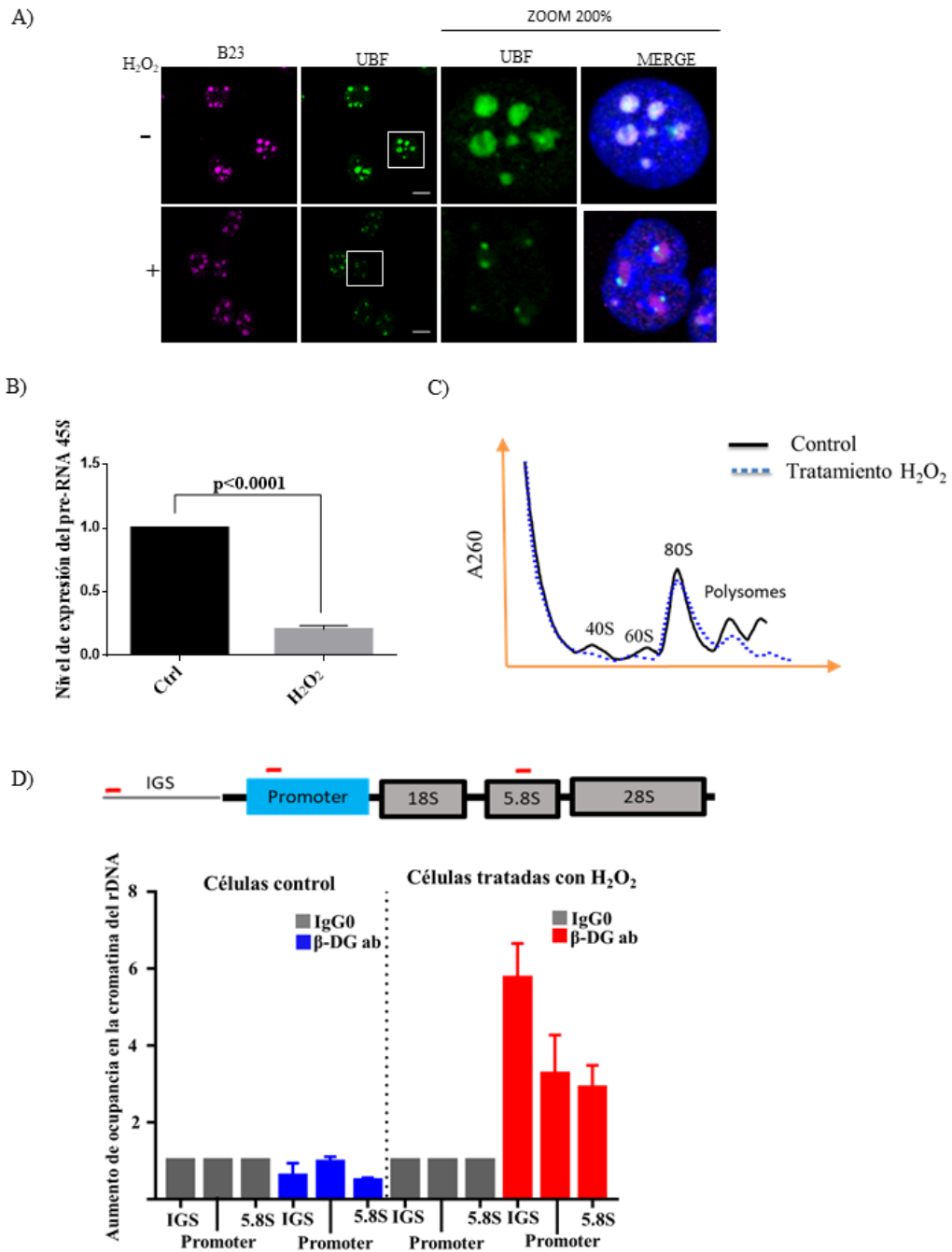


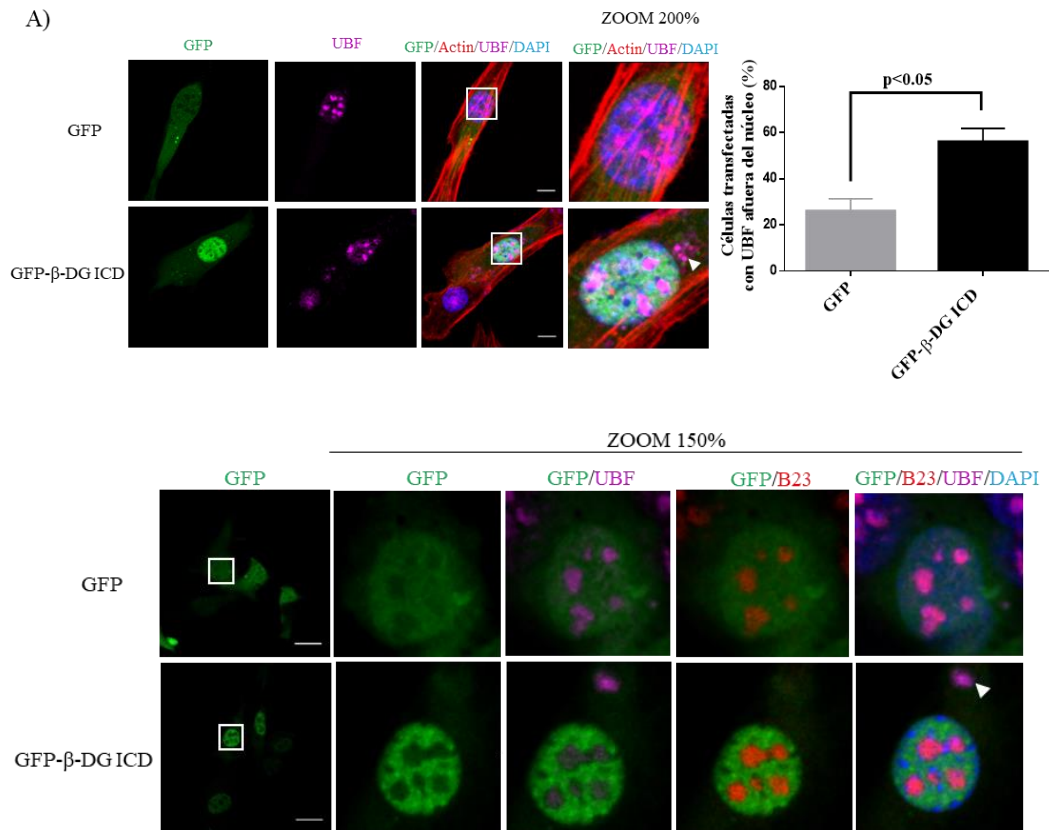
Figura 7. El estrés oxidativo aumenta la unión del β -DG ICD a la región regulatoria del rDNA, disminuye la expresión del rRNA y altera el perfil ribosomal. (A) Las células C2C12 se trataron con H₂O₂, antes de ser sometidas a ensayos dobles de inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos contra el β DG, B23 o UBF. Las células

se tiñeron con DAPI para visualizar los núcleos antes de ser analizados por microscopía confocal. Barra, 10 μ M. (B) La expresión del pre-rRNA 45S se evaluó mediante qRT-PCR utilizando el gen GAPDH como control endógeno. Los niveles de expresión obtenidos en las células de control se fijaron arbitrariamente con el valor de 1 para comparación. Los datos de tres experimentos independientes con sus respectivos duplicados se analizaron mediante la prueba t-student; se muestra el error estándar de la media \pm SEM. Los valores de p denotaron diferencias significativas. (C) Se muestran los perfiles de los ribosomas de las células tratadas con H₂O₂ y de las células control y. D) Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina utilizando células control y células tratadas con H₂O₂ Se utilizaron anticuerpos contra el β -DG (Mandag). Para los experimentos de qPCR se emplearon oligonucleótidos para amplificar las regiones del promotor, 5.8S e IGS (secuencia intergénica) del gen rDNA. El esquema del gen rDNA se muestra en la parte superior, así como las zonas donde hibridan los oligonucleótidos (líneas rojas).

La sobreexpresión del β -DG ICD altera la biogénesis ribosomal y la función del factor de transcripción UBF

Para analizar directamente la implicación del β -DG ICD en la biogénesis de los ribosomas, transfectamos de manera estable las células C2C12 con un vector que expresa el GFP- β -DG ICD y de esta manera imitar los altos niveles de este fragmento que se inducen con el estrés nucleolar. La localización del GFP- β -DG ICD se restringió al área del núcleo; se observó una distribución homogénea en el nucleoplasma, con una tinción menos intensa en el nucléolo (Fig. 8A). De manera inesperada, un número significativo de células transfectadas que expresan el GFP- β -DG ICD mostraron una deslocalización de UBF hacia el citoplasma, en comparación con las células que expresan a la GFP sola (50% y 20% respectivamente), mientras que la distribución nucleolar de B23 permaneció inalterada (Fig. 8A, panel derecho y panel inferior). La deslocalización de UBF debido a la expresión exógena del β -DG ICD se confirmó mediante la transfección del β -DG ICD fusionado FLAG, una bandera pequeña (Fig. 8B).

La fosforilación del β -DG en la tirosina 890 dispara su internalización en vesículas (Mitchell *et al.*, 2013; Leocadio Daniel, 2016; Lipscomb *et al.*, 2016) y nuestro grupo de trabajo demostró previamente que también es una señal para dirigir a la proteína al interior del núcleo (Gracida-Jiménez *et al.*, 2017). Por lo tanto, nos preguntamos si la fosforilación de β -DG ICD regula también su localización el nucléolo y si tiene un efecto sobre la distribución de UBF. Con este fin se transflectaron transitoriamente las variantes de la construcción FLAG- β -DG ICD que imitan un estado fosforilado (Y890E) o bloquean su fosforilación (Y890A). Observamos con las dos construcciones un porcentaje similar de células transfectadas con la localización de UBF fuera del núcleo; por lo tanto, la sobreexpresión de β -DG ICD origina la deslocalización de UBF independientemente de su fosforilación (Fig 8B). Así mismo observamos que la sobreexpresión del GFP- β -DG ICD produjo una disminución de los niveles de UBF pero no de B23, en comparación con las células contorles que expresan solamente a la GFP (Fig. 8C y panel derecho).



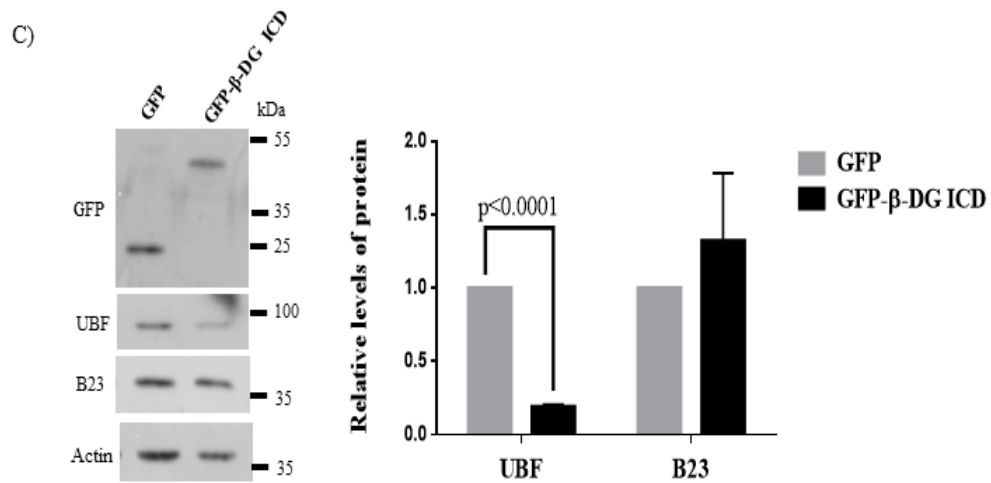
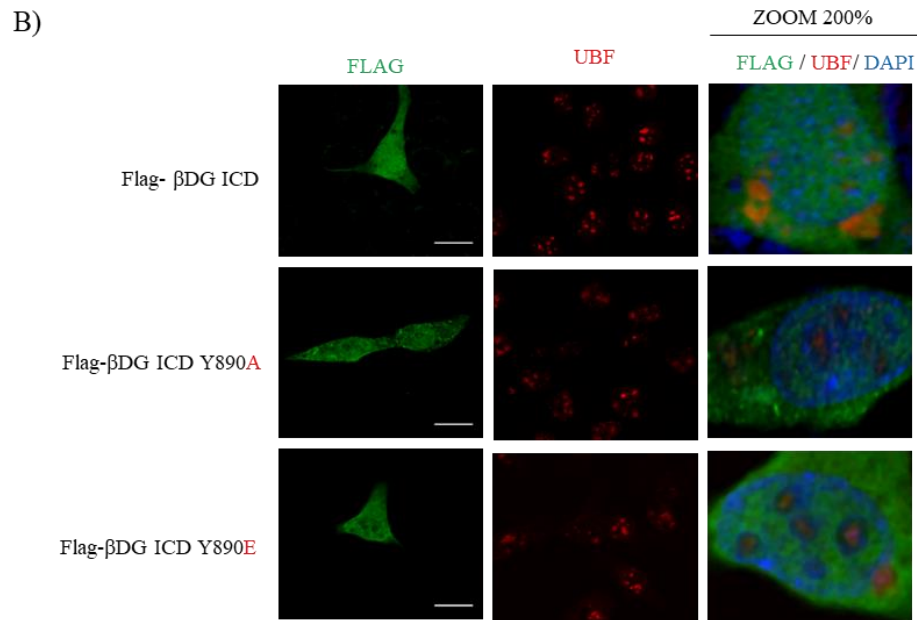


Figura 8. La sobreexpresión del β-DG ICD induce la deslocalización y baja expresión de UBF. (A) Las células C2C12 que expresan GFP o GFP-β-DG ICD se inmuno-tiñeron con anticuerpos anti-UBF 24 h después de la transfección. Enseguida se fijaron y se tiñeron con faloidina y DAPI para visualizar la actina y los núcleos respectivamente y se analizaron mediante microscopia confocal. En experimentos paralelos, las células transfectadas se sometieron a una doble inmunofluorescencia con anticuerpos anti-UBF y anti-B23 (paneles inferiores). Barra, 10 μm. La

localización de UBF fuera del núcleo se señala mediante puntas de flecha. La gráfica del lado derecho muestra el porcentaje de células transfectadas con GFP o GFP- β -DG ICD que tienen a UBF localizado fuera del núcleo. Los datos de tres experimentos independientes se analizaron mediante la prueba estadística t-student y se graficó el error estándar de la media \pm SEM. Los valores de p muestran diferencias significativas ($n = 50$ células por cada condición experimental) (B) Las células C2C12 que expresan FLAG- β -DG ICD o sus variantes mutantes FLAG- β -DG ICD Y890A y FLAG- β -DG ICD Y890E se inmuno-tiñeron 24 h después de la transfección con anticuerpos anti-FLAG y anti-UBF. Los núcleos se tiñeron con DAPI previo al análisis por microscopia confocal. Barra, 10 μ M. (C) Lisados de las células transfectadas con GFP o GFP- β -DG-ICD se analizaron mediante ensayos de inmuno-detección en fase sólida usando anticuerpos específicos contra GFP, UBF, B23 y actina (control de carga). La gráfica de la derecha muestra los datos de densitometría de tres experimentos independientes después de su análisis mediante la prueba estadística t-student; se graficó el error estándar de la media \pm SEM y los valores de p se refieren a diferencias significativas.

Posteriormente nos preguntamos si los efectos de la sobreexpresión del β -DG sobre la localización de UBF tienen un impacto sobre la transcripción del pre-rRNA 45S, debido a que UBF es un factor de transcripción importante para la RNA polimerasa I (Panov *et al.*, 2006; Prieto e Mcstay, 2007; Sanij *et al.*, 2008). Analizamos la expresión del precursor 45S por medio de PCR en tiempo real en células que que expresan de manera estable GFP o GFP- β ICD; encontramos una disminución en los niveles del 45S (~50%) y 28S pero un aumento en los del 18S (Fig. 9A). Debido a la disminución de la expresión del RNA precursor decidimos determinar si la sobreexpresión del β -DG ICD influye directamente en la función transcripcional de UBF; con este propósito llevamos a cabo ensayos de actividad promotora utilizando el gen reportero de la luciferasa. Las células C2C12 que expresan de manera estable GFP- β -DG ICD o GFP se co-transfectaron con las construcciones que contienen el promotor del rDNA que es reconocida por la RNA polimerasa I (promotor MrDNA) y UBF (Németh *et al.*, 2008), y el promotor TK que es reconocido por la RNA polimerasa II (vector control que se utilizó para normalizar la eficiencia de la transfección). Después de 48 horas de la

transfección se cuantificó la actividad de la luciferasa y se normalizaron los datos. Se encontró que la actividad del promotor de la RNA polimerasas I disminuyó un 40% en las células transfectadas con GFP- β -DG ICD, en comparación con aquellas expresando solo GFP (Fig. 9B).

Tomando en consideración el efecto negativo de la sobreexpresión del GFP- β -DG ICD sobre la transcripción del rRNA, se decidió evaluar el perfil ribosomal en las células que sobre-expresan esta proteína recombinante. Los resultados de este análisis mostraron una disminución drástica de los picos correspondientes a los monosomas libres, pero no hubo un efecto sobre la formación de la subunidad 80 S (Fig. 9C). La alteración en el perfil de los ribosomas finalmente condujo a un daño en la proliferación de los cultivos que sobreexpresan al fragmento β -DG ICD, como lo demostraron los ensayos de proliferación con MTT (Fig. 9D). En su conjunto, estos datos indican que el β -DG ICD actúa como un regulador negativo inhibiendo la transcripción del pre-rRNA, a través de su efecto sobre el factor de transcripción UBF, lo que en última instancia afecta la biogénesis ribosomal.

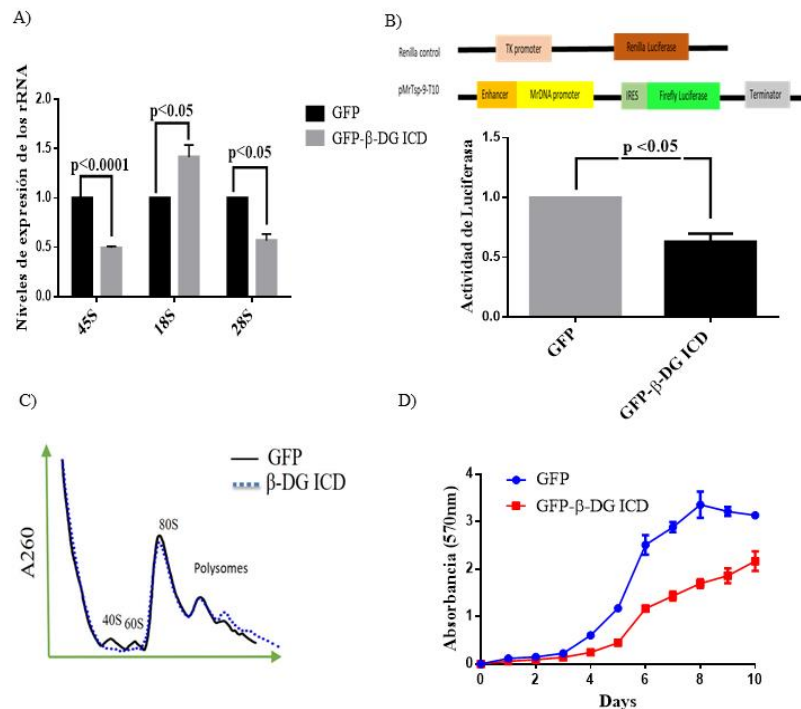


Figura 9. La expresión exógena del β -DG ICD altera la biogénesis ribosomal y a la actividad transcripcional de UBF. Las células C2C12 que expresan de manera estable

a GFP- β -DG ICD o a GFP solamente (vector vacío) se utilizaron en los siguientes experimentos. (A) La expresión del pre-rRNA 45S y de los rRNAs 28S y 18S se analizó en los cultivos transfectados, utilizando GAPDH como control endógeno. (B) En la parte superior de la Figura se muestra el esquema del vector que contiene el promotor del rDNA de ratón (pMrTsp-9-T10) y el vector control que expresa la luciferasa de Renilla. Los cultivos celulares que expresan de manera estable GFP- β -DG ICD o GFP se co-transfectaron con las construcciones que expresan el gen reportero de luciferasa bajo el control del promotor del rDNA o la luciferasa de Renilla bajo un promotor dependiente de la RNA polimerasa II y se estimaron las actividades de los promotores pasadas 48 h, como se describe en los Métodos. Los datos de tres experimentos independientes se analizaron estadísticamente y se graficó el error estándar de la media \pm SEM; los valores de p se refieren a diferencias significativas. (C) Se muestran los perfiles ribosomales obtenidos de los cultivos transfectados de manera estable que se indican. (D) La proliferación celular de los cultivos celulares transfectados establemente se monitorizó durante un período de 10 días, utilizando el ensayo de MTT. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El β -DG es un componente clave de la membrana plasmática (MP) y de la envoltura nuclear (EN); esta proteína actúa como una plataforma para el anclaje adecuado de proteínas específicas de cada compartimento celular. En la MP el β -DG modula la adhesión y la señalización celular conectando la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina por medio de la interacción que establece con el α -dístroglicano en la MP y con la actina en el citoplasma (Bozzi *et al.*, 2009; Moore e Winder, 2010). En el núcleo el β -DG interactúa con diferentes proteínas de la EN, incluyendo emerina y las láminas A/C y B1, para regular la estructura y función del núcleo (Martínez-Vieyra *et al.*, 2013; Vélez-Aguilera *et al.*, 2018). La diversidad funcional del β -DG podría ser más amplia de lo que se pensaba anteriormente ya que los fragmentos proteolíticos que genera el β -DG podrían tener funciones en la célula que no se han identificado. Se ha demostrado mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* que el β -DG sufre dos escisiones proteolíticas sucesivas que posiblemente están coordinadas para liberar su dominio intracelular (ICD, por sus siglas en inglés intracellular domain) hacia el citosol. En primer lugar, las metaloproteasas de la matriz extracelular MMP-2 y -9 escinden el dominio extracelular del β -DG (Sbardella *et al.*, 2012) y generan una molécula intermediaria que permanece unida a la MP, enseguida se produce una escisión en el aminoácido 774 por parte de la γ -secretasa (complejo de proteasas que está embebido en la MP) que genera un fragmento que contiene el dominio C-terminal del β -DG (β -DG ICD) (Mitchell *et al.*, 2013; Leocadio Daniel, 2016). Aparte de la densidad celular, no se conocen otros estímulos celulares que estimulen la liberación de ICD del β -DG, ni tampoco se sabe cuáles son las consecuencias de este procesamiento sobre la fisiología de la célula. En este estudio demostramos que el ICD del β -DG se localiza en los nucléolos y que diferentes tipos de estrés nucleolar estimulan su escisión. También establecimos la función que lleva a cabo el β -DG ICD para regular negativamente la transcripción del RNA ribosomal, a través de la interferencia que realiza sobre la expresión y actividad transcripcional de UBF. Mediante ensayos de inmunofluorescencia acoplados a microscopia confocal y experimentos de inmunoprecipitación demostramos que el β -DG colocaliza e

interactúa con las proteínas nucleolares UBF y B23, las cuales son distintivas del componente fibrilar y del componente granular respectivamente. Así mismo, observamos que el β -DG se redistribuye en coordinación con B23, fibrillarina y UBF en respuesta a la desorganización nucleolar inducida por las drogas actinomicina D y DRB, lo que sugiere que el β -DG participa en la plasticidad del nucléolo. La presencia en el nucléolo del ICD de β -DG pero no de la proteína completa se confirmó mediante experimentos de fraccionamiento celular, mientras que los experimentos de inmunoprecipitación de proteínas fusionadas a GFP corroboraron que el ICD tiene la habilidad de unirse a UBF y B23.

En el momento actual de este estudio no conocemos la vía que sigue el ICD de β -DG para transportarse hasta el nucléolo. Sin embargo, tomando en consideración que la importación nuclear del β -DG se lleva a cabo mediante el reconocimiento de su NLS por parte de importinas $\alpha 2 / \beta 1$ 9 (Lara-Chacón *et al.*, 2010a) y debido a que el ICD de β -DG mantiene la NLS, es posible que utilice esta vía para ingresar al núcleo a través del complejo de poro nuclear (NPC). Alternativamente, el ICD podría transportarse al núcleo por difusión pasiva, debido a que su masa molecular (<30 kDa) está por debajo del tamaño permisivo del NPC (Christie *et al.*, 2016). Debido a que la secuencia del ICD no contiene una de localización nucleolar (NoLS) obvia, su acumulación nucleolar podría estar mediada por un mecanismo de retención a través de su interacción con B23, ya que esta proteína transporta proteínas del citoplasma hacia el nucléolo y media la retención nucleolar de otras proteínas (Lindström, 2011). Adicionalmente, la unión del ICD a la región promotora de los genes rDNA podría servir para anclarlo a los nucléolos.

Tomando en consideración que la función principal del nucléolo es la biogénesis ribosomal (Sleeman e Trinkle-Mulcahy, 2014), nos preguntamos si el β -DG está involucrado en este importante proceso celular. Obtuvimos una serie de resultados que respaldan esta hipótesis: en primer lugar, demostramos que el β -DG interactúa con UBF, un factor de transcripción que contiene una caja HMG y que recluta a SL1 (factor de selectividad 1) y a la RNA Pol I a la región promotora de los genes ribosomales para constituir el complejo de pre-iniciación de la RNA Pol I (Panov *et*

al., 2006); en segundo lugar, los ensayos de ChIP con anticuerpos anti- β -DG demostraron que el β -DG se une a las regiones reguladoras de la transcripción y procesamiento del RNA ribosomal denominadas 5.8S e IGS (Jacob *et al.*, 2013; Todd *et al.*, 2016); y en tercer lugar, el silenciamiento del DG produjo una reducción de los niveles de UBF, una morfología nucleolar aberrante y una regulación alterada del procesamiento de los RNA ribosomales 18 S y 28S.

El nucléolo es un sensor de estrés celular y responde modulando la síntesis del rRNA y por ende la biogénesis de ribosomas (Yang Kai, 2018). Existen numerosas proteínas que no residen en el nucléolo pero que se trasladan a este organelo como respuesta a estímulos ambientales (Németh e Grummt, 2018). Por lo tanto, nos planteamos la hipótesis de que el transporte del ICD hacia nucléolo está regulado por la respuesta al estrés nucleolar. De manera interesante, observamos que la escisión de ICD dirigida por la γ -secretasa (Leocadio Daniel, 2016) se induce en respuesta a diferentes tratamientos que provocan un estrés nucleolar como son: el estrés oxidativo, la acidosis y la radiación UV. Adicionalmente, encontramos que la unión del ICD a la región promotora del DNA ribosomal se incrementa cuando la célula se somete a estrés oxidativo. Se sabe que diferentes ribonucleoproteínas que intervienen en la regulación de la transcripción y del procesamiento del preRNA también responden al estrés oxidativo (Hisaoka *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2013; Todd *et al.*, 2016). Por lo tanto, es plausible concluir que el ICD de β -DG es escindido de la membrana plasmática, transportado al núcleo y reclutado al nucléolo para actuar como un regulador negativo de la transcripción y/o procesamiento del pre-RNA en condiciones de estrés celular.

Con la finalidad de fortalecer la hipótesis de trabajo decidimos analizar el efecto de sobre-expresar el ICD del β -DG ICD sobre la fisiología celular. De manera consistente con la función represora que proponemos para el ICD, su sobreexpresión ocasionó la deslocalización y disminución de los niveles de UBF, la inhibición de la transcripción del RNA precursor 45S, alteración del perfil ribosomal y como consecuencia final una disminución en la proliferación celular. El β -DG carece de secuencias de unión al DNA o actividad enzimática y es considerado como una proteína de andamiaje debido a la presencia de regiones que interactúan con diversas proteínas (por ejemplo, dominios

SH3, SH2 y WW5). Por consiguiente, la función que lleva a cabo el ICD en el nucléolo la realiza a través de su interacción con UBF o de manera indirecta podría también afectar la localización y estabilidad de este factor de transcripción, interfiriendo de esta manera con el ensamblaje del complejo de iniciación de la RNA polimerasa I y por consiguiente con la transcripción del DNA ribosoma. Cabe aclarar que se requieren experimentos adicionales para identificar la secuencia del ICD involucrada en su interacción con UBF y definir con detalle el mecanismo por medio del cual el ICD inhibe la transcripción del DNA ribosomal. Esta función puede considerarse como una extensión del papel homeostático del β -DG, donde la escisión del ICD y su posterior tráfico hacia el nucléolo para inhibir la transcripción de rDNA y detener la proliferación de células dañadas, sería parte de una acción de protección ante el estrés celular.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio son compatibles con el paradigma de que la β -DG ICD funciona como un regulador negativo de la transcripción de rRNA al impedir la actividad transcripcional de UBF, como parte del mecanismo de estrés nucleolar que se activa cuando la fisiología de la célula está comprometida. Por lo tanto, además de sus funciones como proteína de andamiaje de señalización en la membrana plasmática y en la envoltura nuclear, el ICD del β -DG tiene la capacidad de regular la transcripción de la RNA Pol I en el nucléolo.

CONCLUSIONES

Se logró establecer que el β -DG ICD generado por el corte proteolítico de la γ -secretasa es el fragmento que se transporta y localiza en el nucléolo, que el β -DG ICD interactúa con proteínas nucleolares como la proteína de componente granular B23 y el factor de transcripción UBF, que la disminución del β -DG reduce los niveles de las proteínas UBF y B23 y afecta la morfología de los nucléolos y que el fragmento ICD del β -DG se encuentra localizado en la cromatina del gen que codifica para los RNA ribosomales. Además, se determinó que el β -DG ICD funciona como un regulador negativo de la transcripción del RNA precursor, ya que su sobre producción en condiciones de estrés nucleolar podrían desplazar al factor de transcripción UBF hacia fuera del nucléolo, como se observó en la expresión exógena del fragmento ICD del β -DG, y así lograr inhibir el inicio de la transcripción del RNA precursor (Fig. 10). Por lo tanto, la función del β -DG ICD en los nucléolos forma parte de las vías de respuesta al estrés celular que tienen implicaciones en la inhibición de la proliferación celular.

PERSPECTIVAS

Durante el desarrollo del trabajo surgieron las siguientes interrogantes: ¿La interacción del β -DG con UBF es directa o existen otras proteínas intermediarias que favorecen su interacción?, ¿Cuál es el mecanismo por el cual β -DG ICD desplaza a UBF del nucléolo?, así como ¿Qué papel desempeña el fragmento en la regulación de las vías del procesamiento para la obtención de los RNA ribosomales 18S y 28S?, por lo que experimentos adicionales deben de ser realizados para contestar tales interrogantes y mejorar el entendimiento de la función del β -DG en el nucléolo.

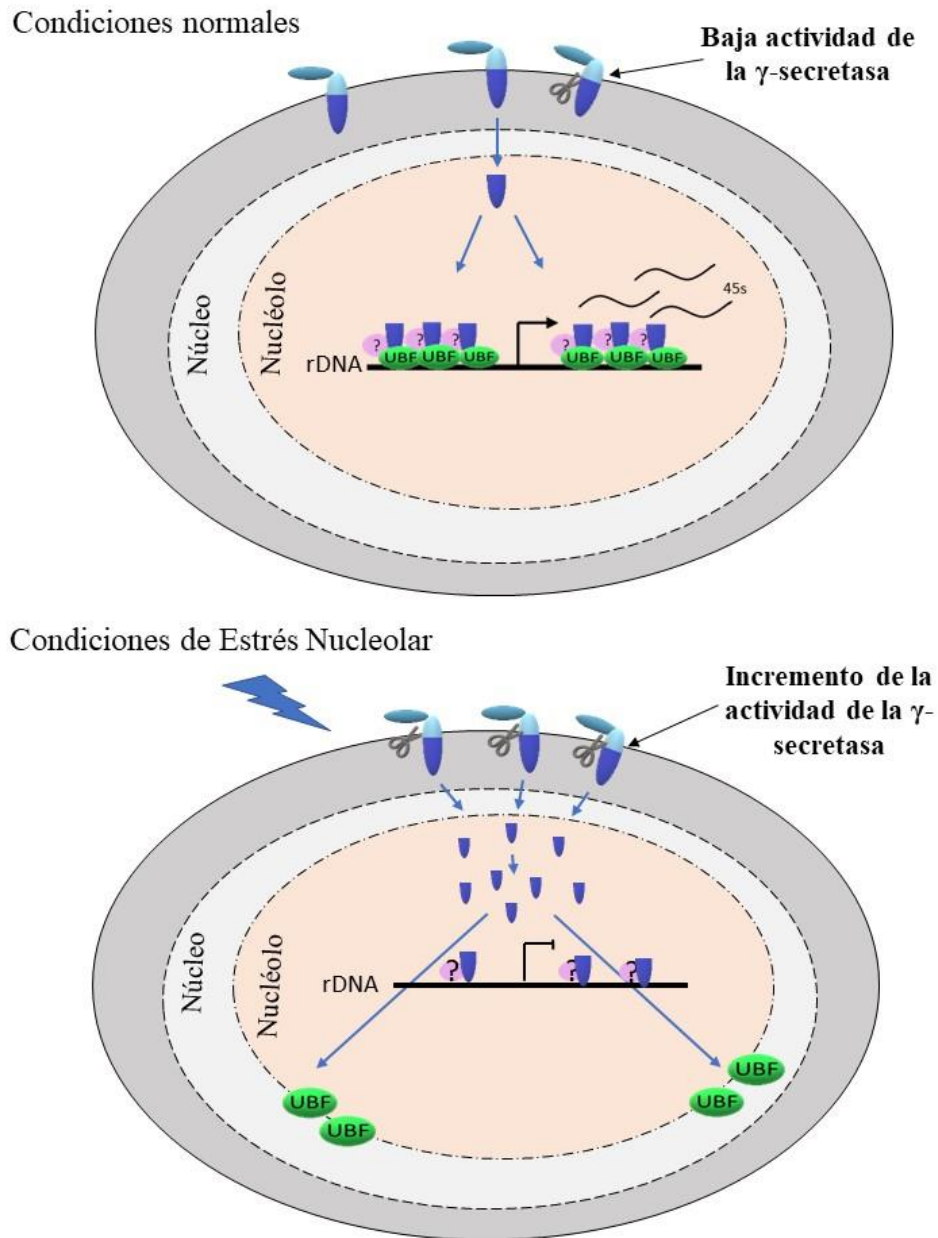


Figura 10. Modelo que propone la regulación y función del β DG ICD en el nucléolo. En el panel superior se muestra que en condiciones normales el β DG ICD se traslada al nucléolo para interactuar con las proteínas involucradas en la transcripción del RNA ribosomal 45S. En el panel inferior se muestra que en condiciones de estrés nucleolar la actividad de la γ -secretasa aumenta generando mayor cantidad del β -DG ICD desplazando a la proteína UBF e inhibiendo la transcripción del RNA precursor 45 S.

BIBLIOGRAFÍA

AMANN, K. J.; GUO, A. W.; ERVASTI, J. M. Utrophin lacks the rod domain actin binding activity of dystrophin. **J Biol Chem**, v. 274, n. 50, p. 35375-80, Dec 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585405> >.

AUBERT, M. et al. Pre-Ribosomal RNA Processing in Human Cells: From Mechanisms to Congenital Diseases. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, Oct 2018. ISSN 2218-273X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30356013> >.

BATCHELOR, C. L. et al. Recruitment of Dbl by ezrin and dystroglycan drives membrane proximal Cdc42 activation and filopodia formation. **Cell Cycle**, v. 6, n. 3, p. 353-63, Feb 2007. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17297291> >.

BELL, S. P. et al. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. **Science**, v. 241, n. 4870, p. 1192-7, Sep 1988. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3413483> >.

BOISVERT, F. M. et al. The multifunctional nucleolus. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 7, p. 574-85, Jul 2007. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17519961> >.

BOULON, S. et al. The nucleolus under stress. **Mol Cell**, v. 40, n. 2, p. 216-27, Oct 2010. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20965417> >.

BOZZI, M. et al. Functional diversity of dystroglycan. **Matrix Biol**, v. 28, n. 4, p. 179-87, May 2009. ISSN 1569-1802. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19303439> >.

_____. Concerted mutation of Phe residues belonging to the beta-dystroglycan ectodomain strongly inhibits the interaction with alpha-dystroglycan in vitro. **FEBS J**, v. 273, n. 21, p. 4929-43, Nov 2006. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17018058> >.

BUCHWALTER, A.; HETZER, M. W. Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging. **Nat Commun**, v. 8, n. 1, p. 328, 08 2017. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28855503> >.

BURKE, M. F.; LOGAN, M. K.; HEBERT, M. D. Identification of additional regulatory RNPs that impact rRNA and U6 snRNA methylation. **Biol Open**, v. 7, n. 8, Aug 2018. ISSN 2046-6390. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30037971> >.

CHEN, Y. J. et al. Direct interaction of beta-dystroglycan with F-actin. **Biochem J**, v. 375, n. Pt 2, p. 329-37, Oct 2003. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892561> >.

CHRISTIE, M. et al. Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. **J Mol Biol**, v. 428, n. 10 Pt A, p. 2060-90, 05 2016. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26523678> >.

COHN, R. D. Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. **Neuromuscul Disord**, v. 15, n. 3, p. 207-17, Mar 2005. ISSN 0960-8966. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725582> >.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. **J Pathol**, v. 191, n. 2, p. 181-6, Jun 2000. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861579> >.

DURBEEJ, M.; CAMPBELL, K. P. Biochemical characterization of the epithelial dystroglycan complex. **J Biol Chem**, v. 274, n. 37, p. 26609-16, Sep 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473626> >.

GRACIDA-JIMÉNEZ, V. et al. Retrograde trafficking of β -dystroglycan from the plasma membrane to the nucleus. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 9906, Aug 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28852008> >.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. **Histochem Cell Biol**, v. 126, n. 2, p. 135-48, Aug 2006. ISSN 0948-6143. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16835752> >.

HERRERA, J. E.; SAVKUR, R.; OLSON, M. O. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. **Nucleic Acids Res**, v. 23, n. 19, p. 3974-9, Oct 1995. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7479045> >.

HISAOKA, M. et al. Regulation of nucleolar chromatin by B23/nucleophosmin jointly depends upon its RNA binding activity and transcription factor UBF. **Mol Cell Biol**, v. 30, n. 20, p. 4952-64, Oct 2010. ISSN 1098-5549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713446> >.

HOLMBERG OLAUSSON, K.; NISTÉR, M.; LINDSTRÖM, M. S. p53 -Dependent and -Independent Nucleolar Stress Responses. **Cells**, v. 1, n. 4, p. 774-98, Oct 2012. ISSN 2073-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710530> >.

IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O. et al. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. **Nature**, v. 355, n. 6362, p. 696-702, Feb 1992. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1741056> >.

ILSLEY, J. L.; SUDOL, M.; WINDER, S. J. The interaction of dystrophin with beta-dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation. **Cell Signal**, v. 13, n. 9, p. 625-32, Sep 2001. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11495720> >.

_____. The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. **Cell Signal**, v. 14, n. 3, p. 183-9, Mar 2002. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812645> >.

JACOB, M. D. et al. Environmental cues induce a long noncoding RNA-dependent remodeling of the nucleolus. **Mol Biol Cell**, v. 24, n. 18, p. 2943-53, Sep 2013. ISSN 1939-4586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23904269> >.

JAMES, A. et al. Nucleolar stress with and without p53. **Nucleus**, v. 5, n. 5, p. 402-26, 2014 Sep-Oct 2014. ISSN 1949-1042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25482194> >.

JAMES, M. et al. Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of (beta)-dystroglycan regulates its interaction with utrophin. **J Cell Sci**, v. 113 (Pt 10), p. 1717-26, May 2000. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10769203> >.

KIEL, M. C.; KAJI, H.; KAJI, A. Ribosome recycling: An essential process of protein synthesis. **Biochem Mol Biol Educ**, v. 35, n. 1, p. 40-4, Jan 2007. ISSN 1470-8175. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21591054> >.

LAMONTE, G. et al. Acidosis induces reprogramming of cellular metabolism to mitigate oxidative stress. **Cancer Metab**, v. 1, n. 1, p. 23, Dec 2013. ISSN 2049-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24359630> >.

LARA-CHACÓN, B. et al. Characterization of an Importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan. **J Cell Biochem**, v. 110, n. 3, p. 706-17, Jun 2010a. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512930> >.

_____. Characterization of an Importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan. **J Cell Biochem**, v. 110, n. 3, p. 706-17, Jun 2010b. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512930> >.

LEOCADIO DANIEL, M. A., AND WINDER STEVE J. γ -Secretase Dependent Nuclear Targeting of Dystroglycan. **J Cell Biochem**, v. 117, n. 10, p. 2436, Oct 2016. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27479942> >.

LINDSTRÖM, M. S. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. **Biochem Res Int**, v. 2011, p. 195209, 2011. ISSN 2090-2255. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152184> >.

LIPSCOMB, L. et al. Dasatinib as a treatment for Duchenne muscular dystrophy. **Hum Mol Genet**, v. 25, n. 2, p. 266-74, Jan 2016. ISSN 1460-2083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26604135> >.

LOUVET, E. et al. Compartmentation of the nucleolar processing proteins in the granular component is a CK2-driven process. **Mol Biol Cell**, v. 17, n. 6, p. 2537-46, Jun 2006. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540521> >.

MARTÍNEZ-VIEYRA, I. A. et al. A role for β -dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 3, p. 698-711, Mar 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220011> >.

MATHEW, G. et al. Nuclear targeting of dystroglycan promotes the expression of androgen regulated transcription factors in prostate cancer. **Sci Rep**, v. 3, p. 2792, Sep 2013. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24077328> >.

MAYER, C.; BIERHOFF, H.; GRUMMT, I. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. **Genes Dev**, v. 19, n. 8, p. 933-41, Apr 2005. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805466> >.

MITCHELL, A. et al. Dystroglycan function is a novel determinant of tumor growth and behavior in prostate cancer. **Prostate**, v. 73, n. 4, p. 398-408, Mar 2013. ISSN 1097-0045. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996647> >.

MOORE, C. J.; WINDER, S. J. Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs. **Cell Commun Signal**, v. 8, p. 3, Feb 2010. ISSN 1478-811X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20163697> >.

NORWOOD, F. L. et al. The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. **Structure**, v. 8, n. 5, p. 481-91, May 2000. ISSN 0969-2126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801490> >.

NÉMETH, A.; GRUMMT, I. Dynamic regulation of nucleolar architecture. **Curr Opin Cell Biol**, v. 52, p. 105-111, Jun 2018. ISSN 1879-0410. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29529563> >.

NÉMETH, A. et al. Epigenetic regulation of TTF-I-mediated promoter-terminator interactions of rRNA genes. **EMBO J**, v. 27, n. 8, p. 1255-65, Apr 2008. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18354495> >.

PANOV, K. I. et al. UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. **EMBO J**, v. 25, n. 14, p. 3310-22, Jul 2006. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16858408> >.

PISAREV, A. V.; HELLEN, C. U.; PESTOVA, T. V. Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 286-99, Oct 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956730> >.

PRIETO, J. L.; MCSTAY, B. Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. **Genes Dev**, v. 21, n. 16, p. 2041-54, Aug 2007. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699751> >.

RUBBI, C. P.; MILNER, J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. **EMBO J**, v. 22, n. 22, p. 6068-77, Nov 2003. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609953> >.

RYBAKOVA, I. N.; PATEL, J. R.; ERVASTI, J. M. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. **J Cell Biol**, v. 150, n. 5, p. 1209-14, Sep 2000. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974007> >.

SANIJ, E.; HANNAN, R. D. The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. **Epigenetics**, v. 4, n. 6, p. 374-82, Aug 2009. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19717978> >.

SANIJ, E. et al. UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. **J Cell Biol**, v. 183, n. 7, p. 1259-74, Dec 2008. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19103806> >.

SAVINO, T. M. et al. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. **J Cell Biol**, v. 153, n. 5, p. 1097-110, May 2001. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381093> >.

SAVKUR, R. S.; OLSON, M. O. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. **Nucleic Acids Res**, v. 26, n. 19, p. 4508-15, Oct 1998. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742256> >.

SBARDELLA, D. et al. Enzymatic processing by MMP-2 and MMP-9 of wild-type and mutated mouse β -dystroglycan. **IUBMB Life**, v. 64, n. 12, p. 988-94, Dec 2012. ISSN 1521-6551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23129308> >.

SCHRÖDER, J. E. et al. Dystroglycan regulates structure, proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the developing vertebrate CNS. **Dev Biol**, v. 307, n. 1, p. 62-78, Jul 2007. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512925> >.

SCIANDRA, F. et al. Mutagenesis at the alpha-beta interface impairs the cleavage of the dystroglycan precursor. **FEBS J**, v. 276, n. 17, p. 4933-45, Sep 2009. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19694806> >.

SHAV-TAL, Y. et al. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 5, p. 2395-413, May 2005. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758027> >.

SLEEMAN, J. E.; TRINKLE-MULCAHY, L. Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance. **Curr Opin Cell Biol**, v. 28, p. 76-83, Jun 2014. ISSN 1879-0410. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704702> >.

SPENCE, H. J. et al. Ezrin-dependent regulation of the actin cytoskeleton by beta-dystroglycan. **Hum Mol Genet**, v. 13, n. 15, p. 1657-68, Aug 2004. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15175275> >.

TODD, M. A.; HUH, M. S.; PICKETTS, D. J. The sub-nucleolar localization of PHF6 defines its role in rDNA transcription and early processing events. **Eur J Hum Genet**, v. 24, n. 10, p. 1453-9, 10 2016. ISSN 1476-5438. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27165002> >.

VÉLEZ-AGUILERA, G. et al. Control of nuclear β -dystroglycan content is crucial for the maintenance of nuclear envelope integrity and function. **Biochim Biophys Acta**, v. 1865, n. 2, p. 406-420, Feb 2018. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29175376> >.

YANG KAI, Y. J., JING JI. Nucleolar Stress: hallmarks, sensing mechanism and diseases. **Cell Stress**, v. 2, n. 6, p. 125-140, 2018.

γ -Secretase Dependent Nuclear Targeting of Dystroglycan. Daniel Leocadio, Andrew Mitchell, and Steve J. Winder. **J Cell Biochem**, v. 117, n. 10, p. 2436, Oct 2016. ISSN 1097-4644. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27479942> >.

ANEXOS

Este trabajo fue publicado el 27 de febrero del 2019 en la revista *Cell Death & Disease, Nature*.