



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

Departamento de Genética y Biología Molecular

**Caracterización de la interacción del β -dístroglicano con
emerina y su implicación funcional**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Wendy Lilián Gómez Monsiváis

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

Director de Tesis

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

El presente trabajo fué realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. bajo la tutoría del Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Este trabajo fue apoyado por el CONACyT a través del proyecto con número de referencia 237123 y el proyecto bilateral CNR(Italia)/CINVESTAV, con número de registro CNR2018/4

Durante la realización del mismo, el estudiante Wendy Lilián Gómez Monsiváis fué apoyada como becaria del CONACyT con el número de registro 262498

DEDICATORIA

A mi hija Sofía Lilián Velázquez Gómez, mi mayor inspiración, a mi madre Ma. Juana Monsiváis Cruz y a mis hermanos Sergio Gómez Monsiváis, Angélica Celeste Gómez Monsiváis y Fabián Monsiváis Cruz

AGRADECIMIENTOS

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

A mi hija Sofía Lilián Velázquez Gómez. por ser mi mayor inspiración, te amo.

A mis hermanos: Angélica, Sergio y Fabián por compartir muchos momentos y por su apoyo y cariño.

A mi madre: Juanita por todo su amor, cariño y ejemplo, principalmente por su apoyo en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida.

A mi director de tesis: Dr. Bulmaro Cisneros por su apoyo, consejos y enseñanzas.

A mis amigos del laboratorio 12: Areli, Alejandra, Gris, Viridiana, José, Marco, Roció, Ricardo, Ruth, Ian, Iván, Mauricio, Elianeth, Elizabeth, Ariana y Paulina por su ayuda, sus consejos y orientación durante los experimentos.

A mis amigos: Fátima, Elim, Laura, Rosario, Ada, Rember, Isaac, Ángel, Alejandro González, Esteban, Rogelio, Chema, Givisay, Karen, Yelitza y Sonia.

Y un agradecimiento muy especial a Elías Vera, por su apoyo y comprensión en momentos difíciles.

Y por su apoyo técnico a: Biol. Pablo Gómez Islas, MC Ma. Guadalupe Aguilar, al C. José Arturo Rojas R. y a la M. En C. Jazmín Huerta Cantillo (del depto. de Biología Celular)

A la secretaria Gabriela Mora, por todo su apoyo en tramites académicos.

ÍNDICE

ABSTRACT	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	6
COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA (DAPC)	8
EL DISTROGLICANO	9
EL B-DISTROGLICANO EN EL NÚCLEO	10
LA EMERINA	13
INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA	17
ANTECEDENTES	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
GENERAL	23
ESPECÍFICOS	23
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
OBJETIVO 1: IDENTIFICAR LA REGIÓN DE EMERINA QUE INTERACCIONA DIRECTAMENTE CON B-DISTROGLICANO	24
OBJETIVO 2: DEMOSTRAR EN UN SISTEMA <i>IN VIVO</i> QUE LA ASOCIACIÓN B-DISTROGLICANO-EMERINA OCURRE A TRAVÉS DE LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANALES DE AMBAS PROTEÍNAS.	24
OBJETIVO 3: DETERMINAR LAS CONSTANTES DE ASOCIACIÓN Y DISOCIACIÓN DEL B-DISTROGLICANO CON EMERINA MEDIANTE SPR (<i>SURFACE PLASMON RESONANCE</i>)	25
OBJETIVOS 4 Y 5: ANALIZAR EL EFECTO DE LA AUSENCIA DEL B-DISTROGLICANO SOBRE LA ESTABILIDAD Y FUNCIONAMIENTO DE LA EMERINA. ANALIZAR LOS NIVELES Y LA LOCALIZACIÓN DEL B-DISTROGLICANO EN LINFOCITOS DE UN PACIENTE CON B-DISTROGLICANO.	25
OBJETIVO 6: ANALIZAR EL EFECTO DE DIFERENTES MUTACIONES DE LA EMERINA QUE CAUSAN LA Distrofia muscular de Emery-Dreifuss SOBRE LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR DEL B-DISTROGLICANO.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS	55

Abstract

β -Dystroglycan (β -DG) is a key component of the nuclear envelope (NE) protein assembly, composed of lamins A/C and B1 and emerin, which maintains nuclear architecture and function. To provide insight into the nuclear function of β -DG, we characterized the interaction between β -DG and emerin at the molecular level. Emerin is a major NE protein that regulates multiple nuclear processes and whose deficiency results in Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD). We determined that β -DG-emerin binding is mediated by their respective transmembrane domains (TM), using truncated variants of the two proteins, *in vitro* and *in vivo* binding experiments and *in silico* analysis. We demonstrated using Surface Plasmon Resonance assays that emerin binds to β -DG with high affinity (K_D value in the nanomolar range). Remarkably, the analysis of DG knockout cells demonstrated that loss of β -DG resulted in decreased emerin stability and impaired emerin-mediated processes. β -DG and emerin are reciprocally required for their optimal targeting within the NE, as shown by immunofluorescence and immunoprecipitation assays using emerin variants with mutations in the TM domain; furthermore, altered distribution and protein levels of β -DG were found in B-lymphocytes of a patient with EDMD. In summary, we demonstrated that β -DG can play a role as an interacting partner modulator of emerin stability and function and might be involved in the pathophysiology of EDMD.

Resumen

El β -dístroglicano (β -DG) es un componente clave de un complejo de proteínas de la envoltura nuclear (NE) compuesto por las láminas A/C y B1, y la emerina. Este grupo de proteínas mantiene de una manera aún no definida, la arquitectura y función del núcleo. Con la finalidad de determinar de forma precisa la función nuclear del β -DG, en este estudio caracterizamos la interacción entre el β -DG y la emerina a nivel molecular. La emerina es una proteína importante de la NE que regula múltiples procesos celulares y cuya deficiencia provoca la distrofia muscular Emery-Dreifuss (EDMD). Determinamos que la unión β -DG-emerina está mediada por la interacción entre sus respectivos dominios transmembrana (TM), para lo cual utilizamos variantes truncadas de las dos proteínas, experimentos de unión *in vitro* e *in vivo* y análisis *in silico*. Así mismo, mediante ensayos de resonancia superficial de plasmones demostramos que la emerina se une al β -DG con alta afinidad (valor KD en el rango nanomolar). Interesantemente, mediante el análisis de una línea celular derivada de las células C2C12 que carece del DG (KO-DG), demostramos que la ausencia del β -DG provoca una disminución del 35% aproximadamente en los niveles de emerina, debido a que acelera su degradación mediante el proteosoma. Consecuentemente, dos procesos celulares mediados por la emerina (morfología nuclear y la unión de los centrosomas al núcleo) están alterados en las células KO-DG. El β -DG requiere de manera recíproca del dominio TM de la emerina para localizarse en la NE, como lo demuestran los ensayos de inmunofluorescencia e inmunoprecipitación donde usamos variantes de emerina que portan mutaciones en el dominio TM. Finalmente, observamos que los niveles y la señal de inmunofluorescencia del β -DG están disminuidos en cultivos de linfocitos B de un paciente con EDMD. En resumen, demostramos que el β -DG se asocia a la emerina para conferirle estabilidad y modular su función, y podría estar involucrado en la fisiopatología de la EDMD.

Introducción

Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC)

Las proteínas que se asocian a la distrofina (DAPs por sus singlas en inglés *dystrophin associated proteins*) forman un complejo denominado DAPC (*Dystrophin Associated Protein Complex*) el cual incluye a los distroglicanos (α y β), los sarcoglicanos (α , β , γ y δ), el sarcospan, sintrofinas ($\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$) y las distrobrevinas (α y β) (Fig. 1). Este complejo es crítico para la integridad de las fibras musculares debido a que conecta la matriz extracelular con el citoesqueleto, dando estabilidad al sarcolema (Michele and Campbell, 2003; Haenggi and Fritschy, 2006; Gonzalez-Ramirez et al., 2008; Bozzi et al., 2009; Fairclough, 2013; Fairclough et al., 2013; RJ, 2013).

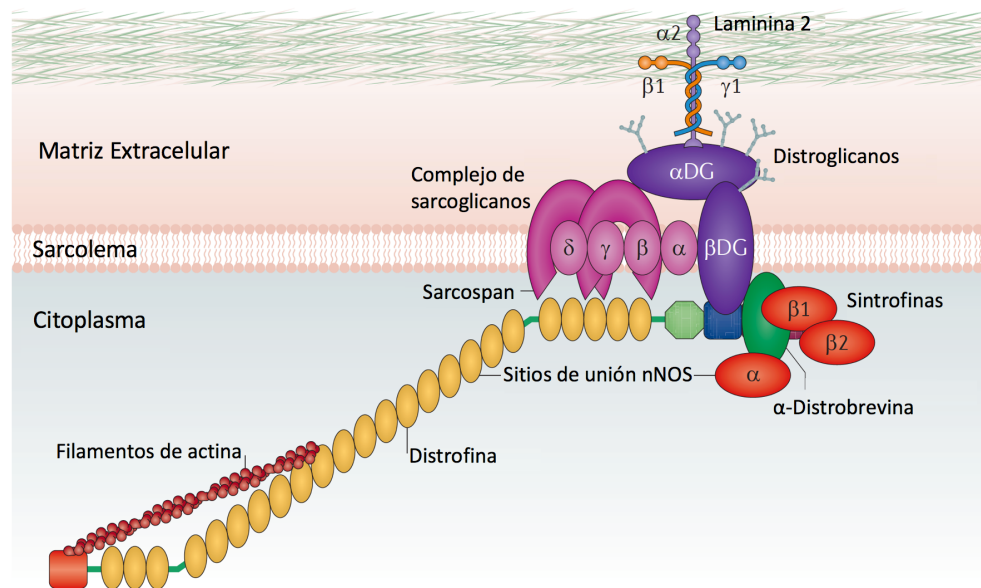


Fig. 1. Organización del Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC) (modificado de Fairclough, Wood et al. 2013, RJ 2013)

La distrofina es una proteína codificada por el gen *DMD*, que al sufrir mutaciones causa la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). La pérdida de la función de la distrofina provoca la desestabilización del DAPC, lo que a su vez daña el sarcolema durante la contracción muscular (Darras et al., 1988;

Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Gonzalez-Ramirez et al., 2008). La distrofina conecta el citoesqueleto con la matriz extracelular mediante su unión a actina y el complejo de los distroglicanos; el α -distroglicano interacciona con las proteínas de matriz extracelular agrina y laminina, proporcionando así estabilidad al sarcolema (Fig. 1).

El distroglicano

El Distroglicano (DG) es una proteína codificada por el gen *dag1*, que se traduce como un polipéptido precursor de 895 aminoácidos, el cual sufre un corte proteolítico postraducciona, que da lugar a dos subunidades: el α -distroglicano, una proteína periférica extracelular y el β -distroglicano, una proteína integral de membrana. Ambas subunidades interactúan no covalentemente en el sarcolema (Bozzi et al., 2009).

Los distroglicanos son componentes centrales del DAPC y el gen que las codifica fue el primero de los genes que codifican para las DAPs en ser clonado y caracterizado (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). El α -Distroglicano se glicosila extensivamente debido a que posee un dominio parecido a mucina, rico en prolinas, serinas y treoninas; esta subunidad interactúa con proteínas de la matriz extracelular como lamininas, agrina, perlecano, neurexina y biglicano. Además, su dominio C-terminal interacciona de manera no covalente con el ectodominio de β -distroglicano (Fig. 3) (Bozzi et al., 2009).

El β -distroglicano (β -DG) es una proteína de membrana plasmática de 43 KDa que consta de un dominio N-terminal extracelular (del aminoácido 654 al 751), un dominio transmembranal (del aminoácido 752 al 777) y un dominio C-terminal citoplásmico que comprende del aminoácido 778 al 895 (Fig. 2).

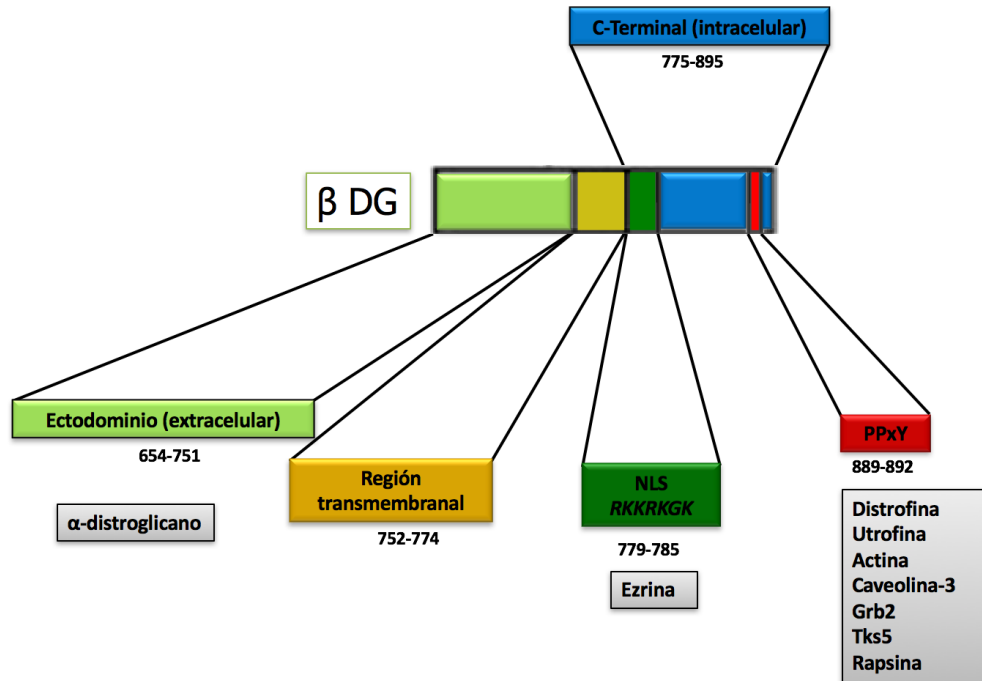


Fig. 2. Dominios de β -distroglicano y sus interacciones proteicas (Modificado de Hernández José, tesis de maestría)

El β -distroglicano se encuentra anclado al sarcolema y tiene la capacidad de interactuar mediante su dominio PPxY, localizado en su extremo C-terminal (Fig. 2), con proteínas que contienen el dominio WW, como la distrofina, la utrofina (Sotgia et al., 2001) y la caveolina 3 (Sotgia et al., 2000), así como con proteínas que tienen el dominio SH3, como Grb2 (Russo et al., 2000). Al ser fosforilado en la tirosina 892 por la proteína cinasa Src, el β -distroglicano deja de unirse a distrofina e interacciona ahora con proteínas que tienen el dominio SH2, como la misma Src, Fynn y CSK, entre otras (Sotgia et al., 2001; Bozzi et al., 2009)

El β -Distroglicano en el núcleo

El β -distroglicano posee una Señal de Localización Nuclear (NLS) en su extremo carboxilo terminal, que media su ingreso al núcleo de manera dependiente de importinas (Lara-Chacon et al., 2010). La secuencia de amino ácidos de la NLS del β -distroglicano es capaz de interactuar en el citoplasma con ezrina, proteína

que participa en el remodelamiento del citoesqueleto durante la formación de microvellocidades y filopodias (Spence et al., 2004).

Nuestro grupo de trabajo reportó la presencia del β -dístroglicano en el núcleo de diferentes líneas celulares, incluyendo las células HeLa (Fuentes-Mera et al., 2006), PC12 (Villarreal-Silva et al., 2010) y C2C12 (Gonzalez-Ramirez et al., 2008). Así mismo, reportamos que el β -dístroglicano forma un complejo DAPC en el núcleo de las células HeLa, en conjunto con la distrofina, el β -sarcoglicano, las sintrofinas α y β , las distrobrevinas $\alpha 1$ y β , y nNOS (Fuentes-Mera et al., 2006).

Mediante ensayos de inmunofluorescencia en células C2C12 se demostró que el β -dístroglicano colocaliza con proteínas de la envoltura nuclear, como la lámina A/C, la lámina B1 y la emerina. Además, por medio de ensayos de inmunoprecipitación con extractos de proteínas nucleares se confirmó la asociación del β -dístroglicano con estas tres proteínas. Adicionalmente, se reveló que la disminución de la expresión del β -dístroglicano, mediante el uso de un siRNA (*small interference RNA* por sus siglas en inglés) dirigido contra su RNAm, afecta los niveles proteicos de la emerina y la lámina B1 (Martinez-Vieyra et al., 2013), lo que indica que la interacción del β -dístroglicano con las proteínas de la envoltura nuclear es funcionalmente relevante. La Figura 3 (A y B) muestran que el tratamiento antisentido disminuyó los niveles proteicos de β -dístroglicano, no así el RNA interferente irrelevante; y de manera interesante, las células deficientes en β -dístroglicano mostraron una deslocalización de la emerina de la envoltura nuclear hacia el citoplasma, así como una baja señal de fluorescencia correspondiente a esta proteína (Fig. 3C) (Martinez-Vieyra et al., 2013). Estos resultados indican que el β -dístroglicano se requiere para la correcta localización de la emerina en la membrana nuclear.

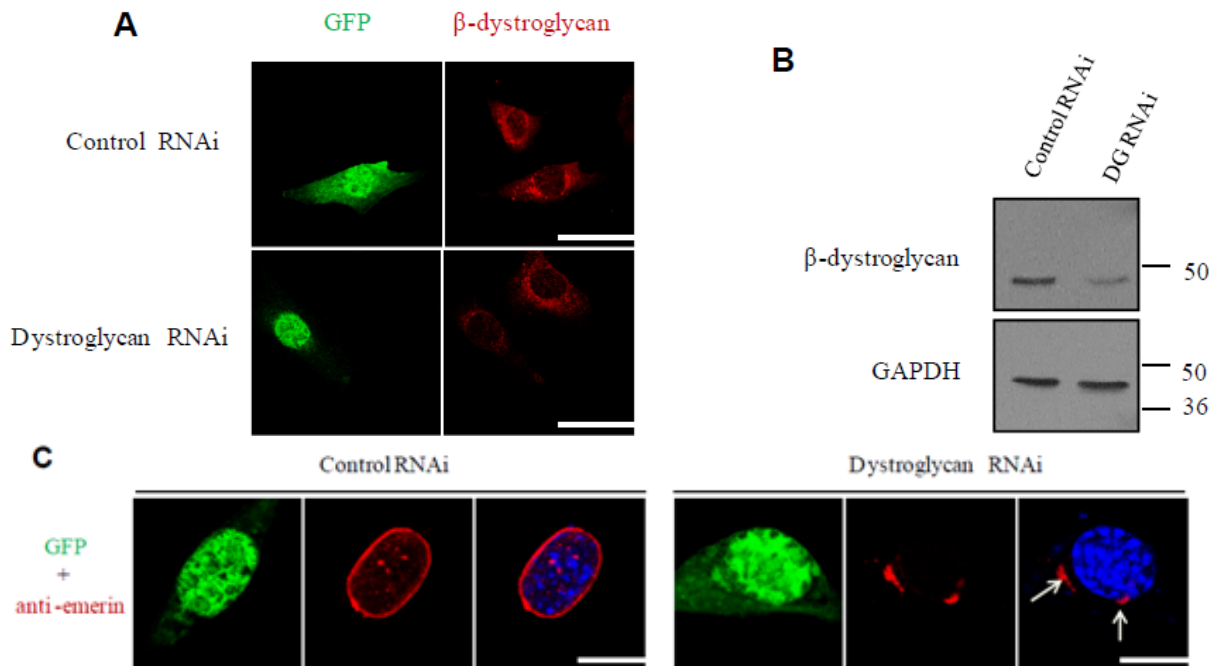


Fig. 3. El bloqueo de la expresión de β -dístroglicano altera la distribución de emerina. Los mioblastos C₂C₁₂ se transfectaron con un vector que expresa un RNA interferente (RNAi) irrelevante o un RNAi dirigido contra el mRNA del DG. (A) Después de 72 hrs las células se inmunotifieron para observar el β -DG (rojo). Las células tratadas con el RNAi presentaron disminución de la fluorescencia correspondiente al β -DG. (B) Por medio de una inmunodetección en fase sólida se observó una disminución en los niveles de β -DG en las células transfectadas con el RNAi específico para DG. (C) Los mioblastos transfectados con el RNAi control o el RNAi para el DG fueron inmunotifidos con anticuerpos para emerina (rojo) y contrateñidos con DAPI para observar el núcleo (azul). Las células transfectadas fueron identificadas por GFP (verde). En las células control se observa que emerina se encuentra alrededor del núcleo, mientras que en las células donde se disminuyó la expresión de β -DG (DG RNAi), la emerina se deslocaliza hacia el citoplasma (flechas). Escala 5 μ m (Martinez-Vieyra et al., 2013).

Una de las funciones que lleva a cabo emerina, es mantener la unión de los centrosomas a la membrana externa nuclear (Salpingidou et al., 2007). De manera interesante, la disminución de los niveles del, β -dístroglicano provoca un aumento en la distancia entre el centrosoma y la membrana externa nuclear (Fig. 4). Este resultado indica que existe una relación funcional entre la emerina y el β -dístroglicano, y que esta última proteína podría participar en los procesos diversos que lleva a cabo la envoltura nuclear (Martinez-Vieyra et al., 2013).

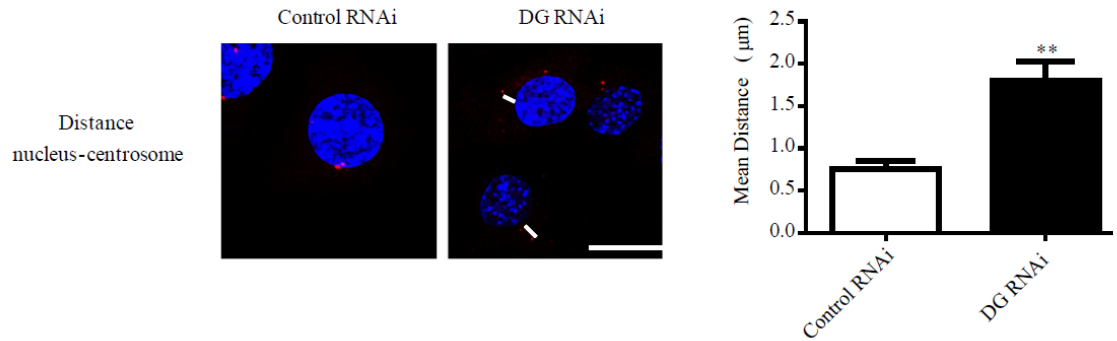


Fig. 4. La deficiencia de β -dystroglicano afecta funciones asociadas a la envoltura nuclear. Las células se tiñeron con DAPI para observar los núcleos (azul) y con el anticuerpo anti- γ -tubulina (rojo) para visualizar los centrosomas. Se muestra la posición del centrosoma en las células controles y las tratadas con el RNAi dirigido contra el DG. Las líneas blancas indican la distancia entre el núcleo y el centrosoma. La gráfica de la derecha muestra la media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes; en cada experimento se analizaron 200 células (Martinez-Vieyra et al., 2013).

La emerina

La emerina es una proteína presente en la mayoría de las células humanas que fue descrita por primera vez en 1994 por Silvia Bione y colaboradores. Estos autores encontraron mutaciones en el gen *STA* o *EMD*, que codifica para emerina (Bione et al., 1994), en 5 pacientes con distrofia muscular de Emery-Dreifuss.

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

La emerina es una proteína integral de la membrana nuclear interna con un peso molecular de 34 kDa (Manilal et al., 1996; Bengtsson and Wilson, 2004), contiene 254 aminoácidos, de los cuales, los primeros 219 forman el dominio amino terminal, seguidos de 21 aminoácidos que componen el dominio transmembranal y 11 residuos del carboxilo terminal (Ostlund et al., 1999). La emerina se encuentra en la mayoría de las células somáticas, sin embargo en los individuos que presentan EDMD esta proteína está ausente. Esta proteína pertenece a la familia de las proteínas nucleares con dominio LEM (denominado así por la letra inicial de las tres proteínas que contienen este dominio: LAP-Emerina-MAN1) (Fig. 5), dicho dominio que consta de aproximadamente 40 residuos se une a BAF (*Barrier-to-autointegration factor*), el cual a su vez interactúa con la cromatina para regular su estructura y formar una unión física entre la envoltura nuclear y la cromatina (Bengtsson and Wilson, 2004; Holaska and Wilson, 2006; Wagner and Krohne, 2007).

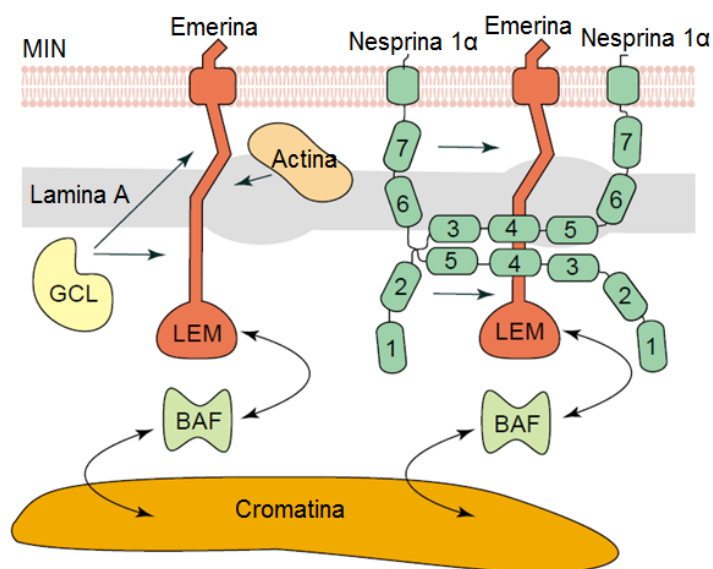


Fig. 5. Emerina se une a la cromatina mediante la interacción de su dominio LEM con el factor BAF
(modificado de Bengtsson and Wilson, 2004)

Se ha demostrado que la emerina se une *in vitro* a las láminas tipo A y B (Clements et al., 2000), las cuales la mantienen anclada a la membrana nuclear interna; además, se ha observado que la emerina co-localiza con las láminas

(Manilal et al., 1998). Otros estudios han demostrado que la ausencia de la lamina A deslocaliza a la emerina, cambiando su localización de la membrana nuclear interna al citoplasma y retículo endoplásmico (Sullivan et al., 1999), e interesadamente, se observó que en fibroblastos provenientes de pacientes con EDMD que carecen de emerina, las láminas A, C y B2 son más solubles (Markiewicz et al., 2002), lo que sugiere que la emerina contribuye a la estabilidad de la envoltura nuclear.

La emerina tiene la capacidad de interactuar también con la actina nuclear, para regular la arquitectura nuclear. Se ha observado que una mutación puntual en la emerina (Q133H) es suficiente para que se pierda la interacción con actina y causar EDMD (Holaska et al., 2004), por lo que se considera que la pérdida de esta interacción es parte del mecanismo molecular que conlleva al desarrollo de EDMD (Holaska and Wilson, 2006). Otra proteína del nucleoesqueleto con la que posiblemente este interactuando la emerina es la espectrina, lo que indica que la emerina podría conectar la membrana nuclear interna a la red del citoesqueleto formada por la actina y la espectrina (Holaska et al., 2004).

Las interacciones de emerina con otras proteínas podrían estar determinadas por la fosforilación que presenta en diversos sitios por la actividad de cinasas como Src y Abl, entre otras. Algunas de las interacciones descritas de emerina están resumidas en la Fig. 6 (Tiffet et al., 2009; Berk et al., 2013), en la cual se observa que emerina interacciona directamente con proteínas como la deacetilasa de histona 3 (HDAC3 por sus siglas en inglés), para promover su actividad (Demmerle et al., 2012).

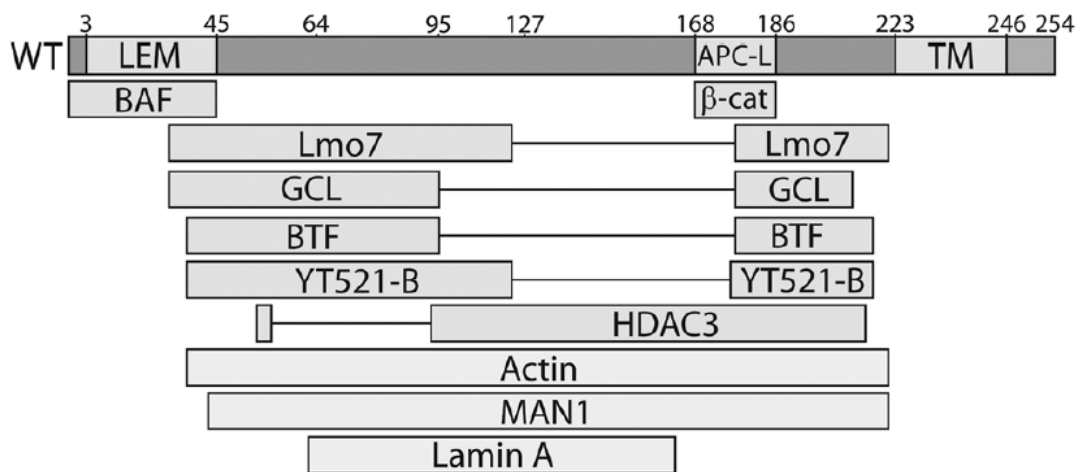


Fig. 6. Interacciones de la emerina con diferentes proteínas (Berk et al., 2013)

Además de las proteínas mencionadas anteriormente, se ha demostrado que la emerina interacciona con proteínas que conforman el complejo LINC, como las nesprinas 1 α y 2 β (Zhang et al., 2005; Wheeler et al., 2007). Las nesprinas están formadas por múltiples repetidos de espectrina, y son necesarias para que emerina se mantenga en la membrana nuclear. De manera interesante, la emerina interacciona directamente con Lmo7, un factor de transcripción que regula la expresión del gen de la emerina (Holaska et al., 2006). La emerina también posee un sitio de unión para el factor de *splicing* YT521-B (Fig. 6), por lo que es posible que este involucrada en la selección de sitios de *splicing* (Wilkinson et al., 2003). Otro factor de transcripción que interacciona con la emerina es Btf, un represor transcripcional pro-apoptótico (Fig. 7), lo que sugiere que la emerina podría modular la señalización de apoptosis (Haraguchi et al., 2004). En otro estudio se encontró mediante ensayos de co-inmunoprecipitación que la emerina se une a GCL (*Germ Cell-Less* por sus siglas en inglés) en células HeLa, sugiriendo que entre sus múltiples funciones la emerina podría participar en la regulación de la expresión de genes (Holaska et al., 2003). Además, la emerina modula la actividad transcripcional de β -catenina (Fig. 7), uniéndose a ella mediante su dominio parecido a APC (*Adenomatous Polipus Coli*), y restringiendo de esta manera la acumulación de β -catenina en el núcleo (Markiewicz et al., 2006).

Finalmente, es importante comentar que la proteína de membrana nuclear interna MAN1, la cual contiene regiones homologas a las de la emerina, incluyendo el dominio LEM, puede unirse también a BAF y a los reguladores transcripcionales Btf y GCL. De hecho, MAN1 y emerina interaccionan *in vitro* (Mansharamani and Wilson, 2005), lo que sugiere que podrían formar un complejo funcional *in vivo*.

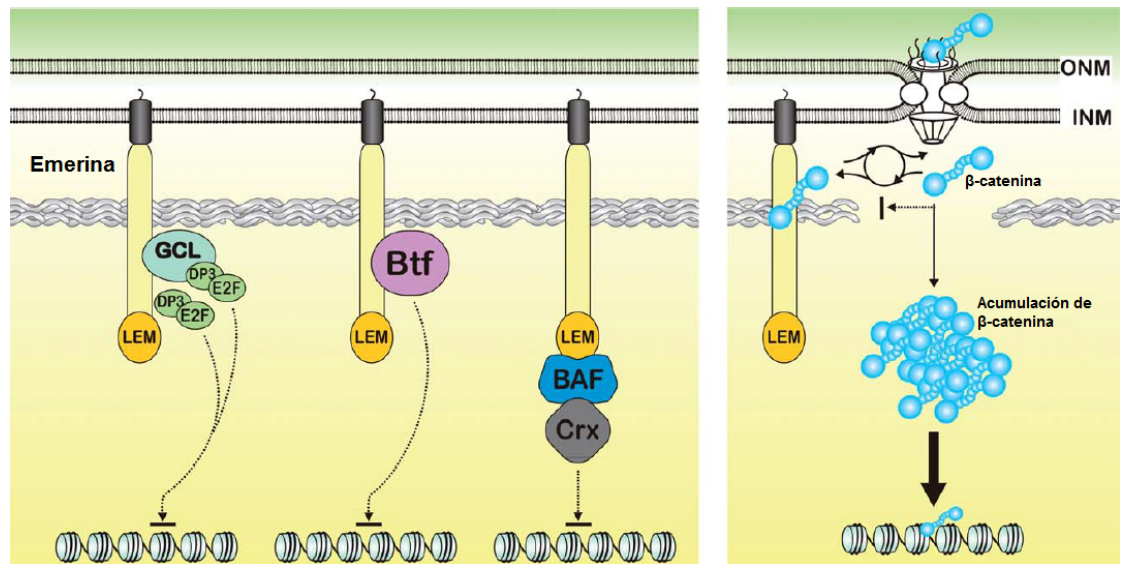


Fig. 7. Participación de emerina en la expresión de genes y en la regulación de β -catenina (Wagner and Krohne, 2007)

Interacciones proteína-proteína

Las interacciones proteína-proteína (IPP) tienen un papel rol esencial en la mayoría de los procesos biológicos, incluyendo interacciones célula-célula, control metabólico y de desarrollo. Uno de los parámetros importantes para describir estas interacciones es la constante de disociación K_d , la cual puede ser determinada por diversas técnicas, incluyendo la Resonancia de Superficie de Plasmones (*SPR*, *Surface Plasmon Resonance*, por sus siglas en ingles), entre otras (Rao et al., 2014). El contacto no covalente entre los residuos de las cadenas laterales es importante para el correcto plegamiento de las proteínas y su ensamble (Nooren and Thornton, 2003).

Estas interacciones pueden ser clasificadas de varias maneras:

- Con base a su superficie de interacción, pueden ser homo- o heterooligoméricas, es decir pueden ocurrir entre cadenas idénticas o no idénticas.
- Por su estabilidad, puede ser obligada o no obligada. En las IPP obligadas los protómeros no se encuentran como estructura estable por sí mismos *in vivo*, pero en complejo son estables y funcionales. Y en las no obligadas, los protómeros son estables y funcionan independientemente aislados del complejo.
- Por la persistencia de la interacción se clasifican como transitorias o permanentes, donde generalmente, las interacciones transitorias forman parte de vías de señalización, mientras que las permanentes forman complejos proteicos estables.

Es importante señalar que muchos IPPs pueden presentar más de un tipo y existir continuidad entre las interacciones obligadas y no obligadas. Además de que la estabilidad de los complejos depende de las condiciones fisiológicas y del medio ambiente. En la Figura 8 se ejemplifican los diferentes tipos de interacciones proteína-proteína (Nooren and Thornton, 2003).

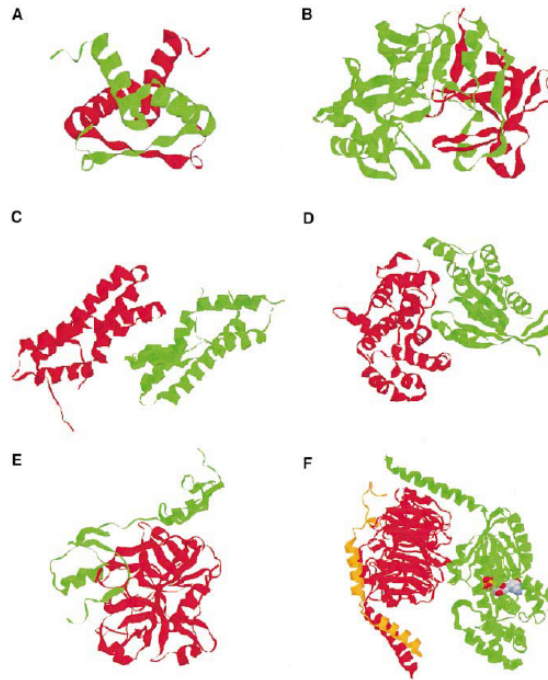


Fig. 8. Interacciones proteína-proteína con base en su superficie de interacción. A) Homodimero obligado, P22 represor Arc; B) heterodimero obligado, Catepsina D de humano que consiste de cadenas no homologas, la ligera (rojo) y la pesada (verde); C) Homodimero no obligado, lisina de esperma; D) heterodimero no obligado, RhoA (verde) y RhoGAP (rojo) en complejo de señalización; E) Heterodimero no obligado permanente, trombina (rojo) y el inhibidor rodniin (verde); F) Heterotrimer no obligado transitorio, proteína G bovina, la interacción entre $G\alpha$ (verde) y $G\beta\gamma$ (rojo, naranja) es transitoria.

La función de muchas proteínas puede ser regulada por la alteración de su estado de oligomerización, lo cual es importante para llevar a cabo una correcta transducción de señales. En los receptores, la oligomerización está dada por los dominios amino o carboxilo terminal, sin embargo, recientemente se ha demostrado que el dominio transmembrana TM también participa en este tipo de procesos. La única secuencia identificada de dimerización de los dominios transmembrana es GXXXG; no obstante, existen proteínas cuyos dominios TM no contienen esta secuencia y aún así interaccionan directamente (Mendrola et al., 2002; Sal-Man et al., 2005). Otra secuencia de interacción TM-TM descrita es la QXXS, la cual es crucial para la interacción de la región TM de la proteína Tar-1 del receptor de aspartato de *E. coli* (Sal-Man et al., 2004; 2005); recientemente se ha descrito que la presencia de una secuencia PXXS es suficiente para mantener una asociación TM-TM (Sal-Man et al., 2014).

Antecedentes

El β -dístroglicano (β -DG) es una proteína de membrana plasmática; sin embargo, nuestro grupo de trabajo la ha localizado en el núcleo de diferentes líneas celulares, incluyendo HeLa (Fuentes-Mera et al., 2006), C2C12 (Gonzalez-Ramirez et al., 2008) y PC12 (Villarreal-Silva et al., 2010). Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta que el β -dístroglicano co-localiza con la emerina en la envoltura nuclear de las células C2C12 (Fig. 9). Por lo tanto, para demostrar si estas dos proteínas interactúan *in vivo* se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo dirigido contra el β -dístroglicano. En la Figura 10 (A) se observa que las proteínas de envoltura nuclear lamina A/C, lamina B1 y emerina co-inmunoprecipitan con el β -dístroglicano. Así mismo los inmunoprecipitados obtenidos con los anticuerpos dirigidos contra lamina B1, lamina A/C y emerina contienen al β -dístroglicano (Fig. 10B) (Martinez-Vieyra et al., 2013). En su conjunto, estos resultados indican que el β -dístroglicano es una proteína de envoltura nuclear que se asocia con diferentes proteínas distintivas de este dominio sub-nuclear.

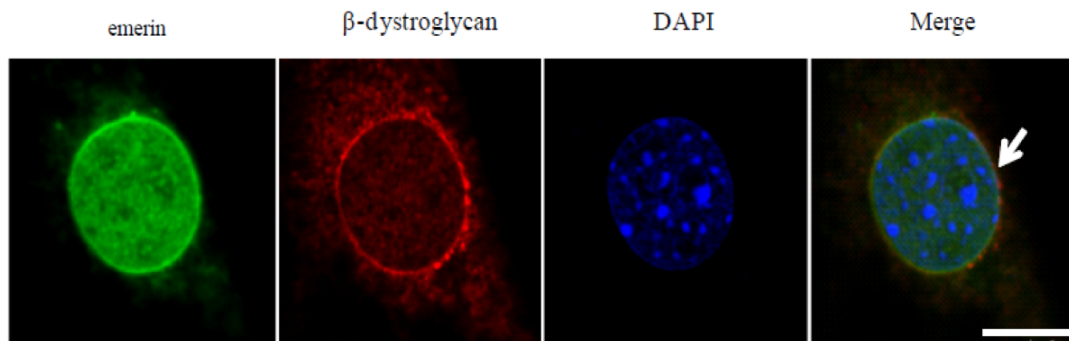


Fig. 9. Co-localización de β -dístroglicano con emerina. Las células C2C12 fijadas sobre cubreobjetos de vidrio se sometieron a una doble tinción para visualizar β -dístroglicano (rojo) y emerina (verde). Las células se contra-tiñeron con DAPI (azul) para la observación de los núcleos y las preparaciones se analizaron por microscopía confocal. El β -dístroglicano se detectó en el citoplasma, y en la envoltura nuclear, donde co-localiza con emerina (flechas). Escala 5 μ m.

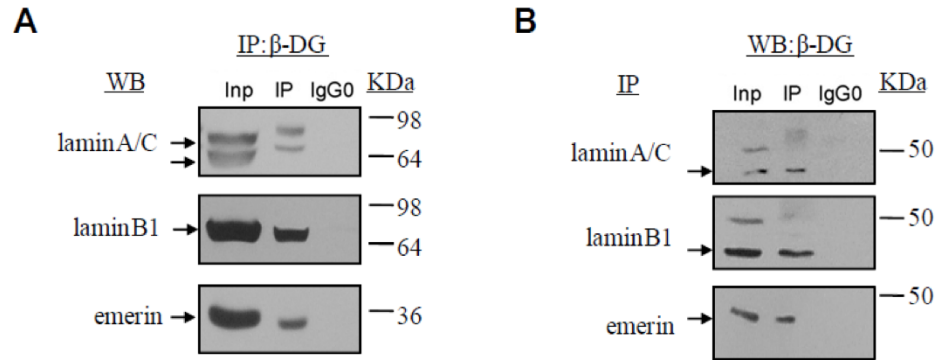


Fig. 10. Interacción *in vivo* de β -dístroglicano con proteínas de envoltura nuclear. (A) Se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación sobre extractos nucleares de células C2C12, empleando anticuerpos dirigidos contra β -dístroglicano, y las proteínas inmunoprecipitadas se revelaron mediante inmunodetección en fase sólida con anticuerpos dirigidos contra anti-lámina A/C, lámina B1, o emerina. (B) De manera recíproca, los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron con anticuerpos dirigidos contra cada una de las proteínas de la envoltura nuclear y el material precipitado se reveló con un anticuerpo anti- β -dístroglicano.

Justificación

Debido a que se ha determinado que el β -dístroglicano es una proteína de envoltura nuclear que interacciona con la emerina, cuya deficiencia o pérdida de la envoltura nuclear genera la Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss, consideramos relevante caracterizar molecularmente esta interacción y determinar la relación funcional entre estas proteínas.

Hipótesis

La interacción entre el β -dístroglicano y la emerina es necesaria para la correcta localización de estas proteínas en la envoltura nuclear y su asociación les confiere estabilidad y un funcionamiento correcto.

Objetivos

General

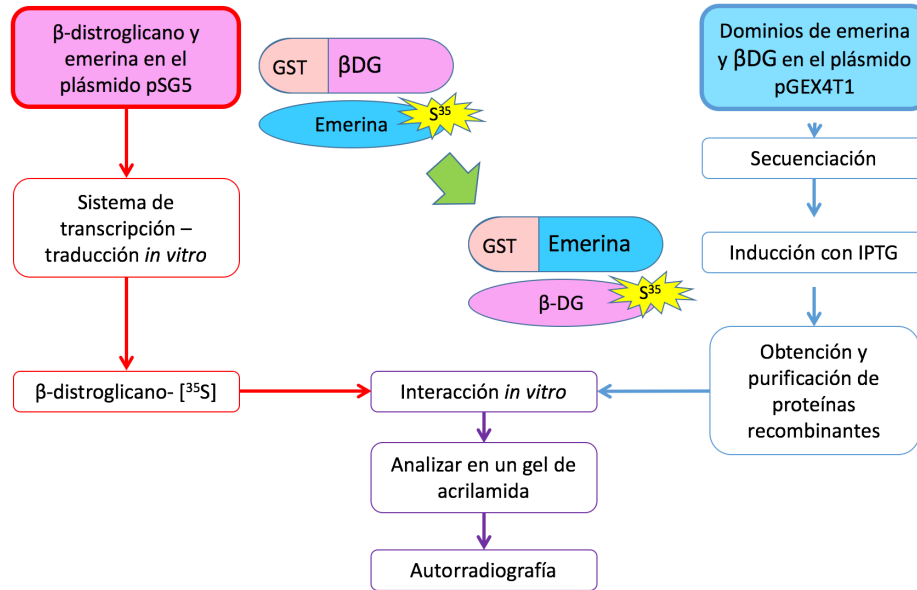
Determinar las bases moleculares de la interacción del β -dístroglicano con emerina.

Específicos

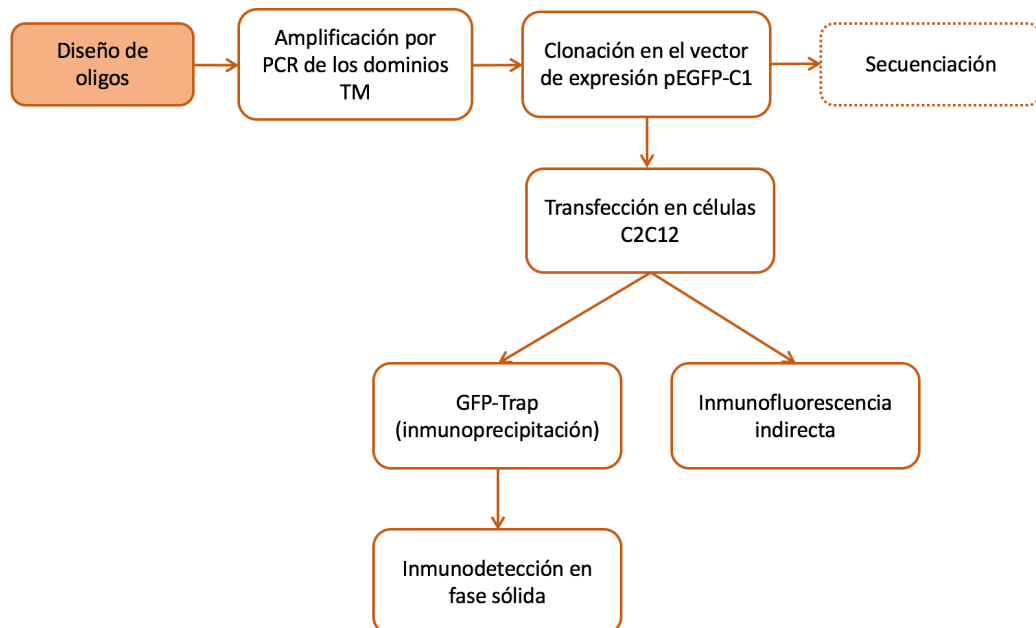
1. Identificar los dominios de la emerina y el β -dístroglicano que participan en su interacción.
2. Demostrar en un ambiente de membrana (células) que la asociación β -dístroglicano-emerina ocurre a través de los dominios transmembranales de ambas proteínas.
3. Determinar las constantes de asociación y disociación de la interacción β -dístroglicano-emerina mediante SPR.
4. Analizar el efecto de diferentes mutaciones de la emerina que causan la Distrofia muscular de Emery-Dreifuss sobre la localización nuclear del β -dístroglicano.
5. Analizar el efecto de la ausencia del β -dístroglicano sobre la estabilidad y funcionamiento de la emerina.
6. Analizar los niveles y la localización del β -dístroglicano en linfocitos de un paciente con Distrofia muscular de Emery-Dreifuss.

Estrategia experimental

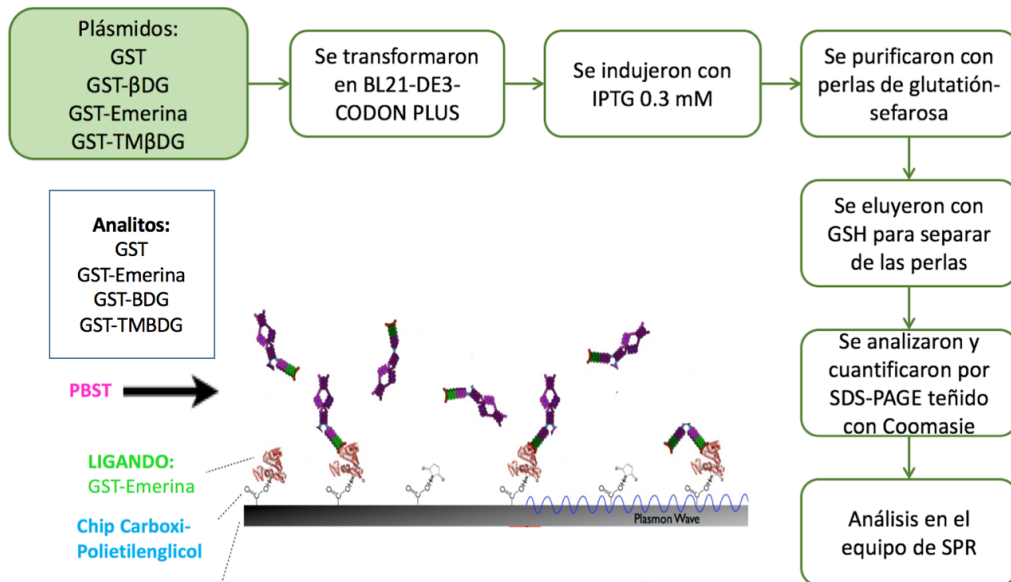
Objetivo 1: Identificar la región de emerina que interacciona directamente con β -distinglicano.



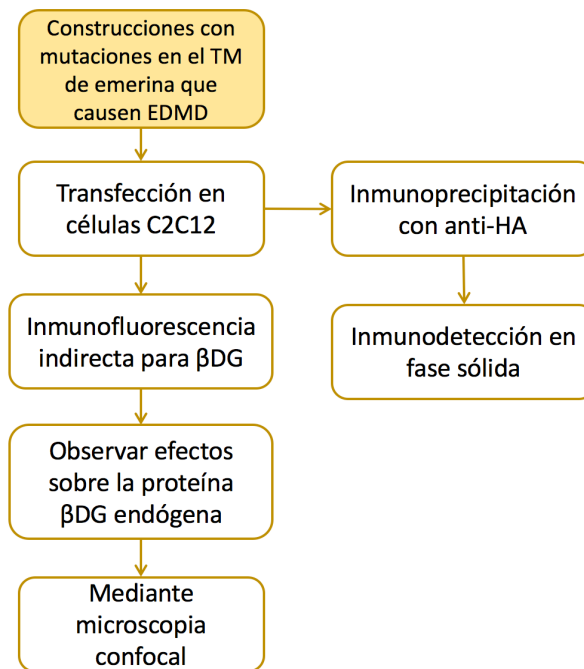
Objetivo 2: Demostrar en un ambiente de membrana (células) que la asociación β -distinglicano-emerina ocurre a través de los dominios transmembranales de ambas proteínas.



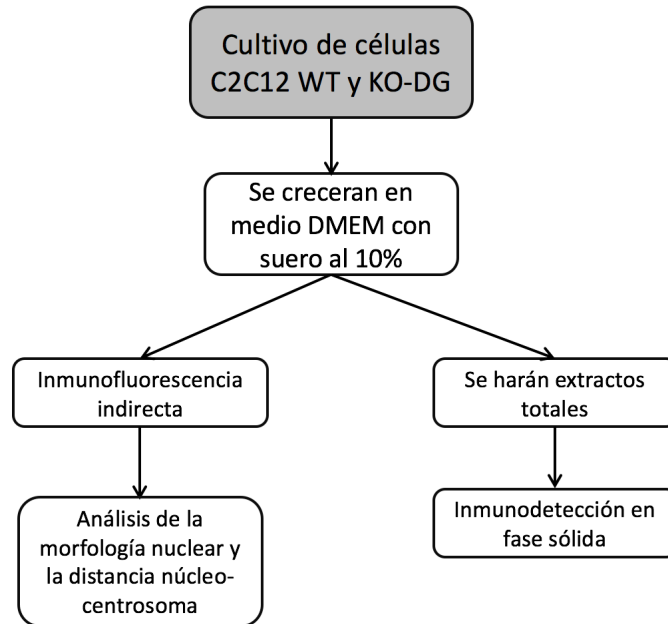
Objetivo 3: Determinar las constantes de asociación y disociación del β -dístroglicano con emerina mediante SPR (*Surface Plasmon Resonance*).



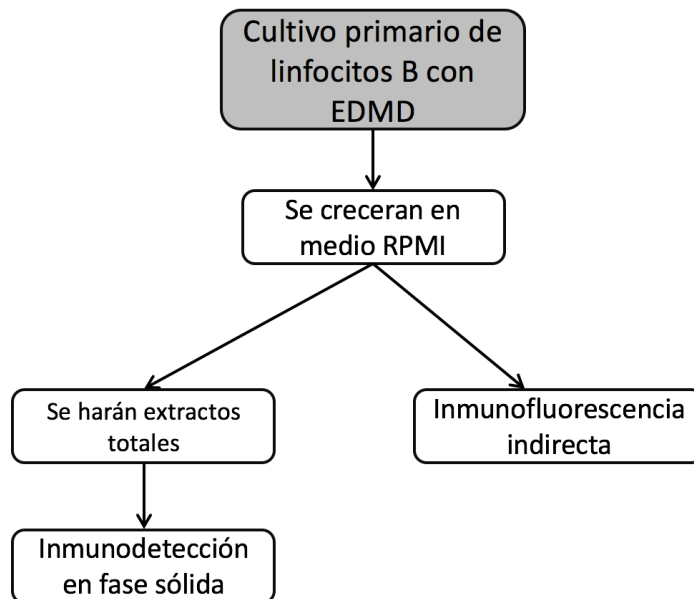
Objetivo 4: Analizar el efecto de diferentes mutaciones de la emerina que causan la Distrofia muscular de Emery-Dreifuss sobre la localización nuclear del β -dístroglicano.



Objetivo 5: Analizar el efecto de la ausencia del β -dístroglicano sobre la estabilidad y funcionamiento de la emerina.



Objetivo 6: Analizar los niveles y la localización del β -dístroglicano en linfocitos de un paciente con Distrofia muscular de Emery-Dreifuss.



Materiales y métodos

Reacción de PCR. Se amplificó por PCR la secuencia codificadora completa de emerina y de β -dístroglicano mediante la utilización de oligos específicos y utilizando el vector pGEX-4T1 como molde. Este vector permite la expresión de las proteínas de interés fusionadas a GST. Para la expresión de proteínas en el sistema de transcripción-traducción *in vitro* se utilizó el vector pSG5 y para expresión de proteínas de fusión con GFP el vector pEGFP-C1. Las condiciones de la reacción de PCR se estandarizaron y se utilizó una enzima Taq polimerasa de alta fidelidad (Platinum, Invitrogen), en una solución de reacción con 2 mM de magnesio, 0.2 mM de oligonucleótidos, 50 ng de DNA molde, un potenciador para la reacción de PCR (Invitrogen) y 0.4 mM DE dNTP's (Sigma). La amplificación de DNA se observó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Clonación en vector de tránsito. Los productos de la PCR se clonaron en el vector de tránsito denominado pCR2.1, utilizando el kit TA cloning (Invitrogen). El producto de PCR se purificó por columna utilizando el *kit* PureLink (Invitrogen) y después se realizó la reacción de ligación, como indican las especificaciones del proveedor: brevemente, se agregó 1 μ l de vector de tránsito pCR2.1 (25 ng/ μ l), 4 unidades Weiss de la ligasa de DNA T4 (New England Biolabs), solución amortiguadora para la actividad de la enzima DNA ligasa (New England Biolabs) y DNA purificado. Se utilizó una relación vector-inserto de 1:3.

Ligación de DNA. Para la ligación de insertos de DNA en los vectores de expresión se utilizó 1 μ l de la enzima T4 DNA Ligasa equivalente a 0.4 unidades Weiss (New England Biolabs), 20 μ l de solución de ligación, 100 ng de DNA de vector, previamente digerido y desfosforilado con 1 unidad de la enzima CIP (New England Biolabs) durante 1.5 hr a 37°C. El DNA del vector y del inserto previamente digerido con la enzima de restricción adecuada, se purificaron por columna utilizando el *kit* PureLink (Invitrogen). La relación vector-inserto fue de 1:3 y la reacción de ligación se llevó a cabo a 14°C durante toda la noche.

Transformación bacteriana. Se aplicó la técnica de choque térmico. Se utilizaron células competentes DH5 α , BL21-DE3 o BL21-DE3-CODON PLUS, a las cuales se añadieron 50 ng de DNA plasmídico en un volumen de 20 μ l de reacción de ligación, y la mezcla se dejó incubar en hielo por 20 minutos. Inmediatamente después se aplicó un choque térmico a 42°C por 1.5 min, y la mezcla se regresó al hielo. Enseguida se agregó 1 ml de medio LB con ampicilina y se dejó incubar a 37°C durante una hora. Finalmente, se plaquearon 50 μ l de bacterias en suspensión en cajas Petri con LB y 100 μ g/ml del antibiótico correspondiente. Para los experimentos de transformación bacteriana, se centrifugaron los tubos de reacción a 6000 rpm por 5 min para obtener la pastilla bacteriana y esta se resuspendió en 200 μ l de LB con antibiótico y se espació el volumen total de la reacción en cajas Petri de LB con antibiótico.

Extracción de DNA plasmídico. La extracción de DNA plasmídico se realizó a pequeña (miniprep) y mediana escala (midiprep).

❖ Miniprep

Se inoculó una colonia de células transformadas en 2 ml de medio LB con el antibiótico adecuado y se dejó incubar toda la noche a 37°C, después se centrifugó a 12,000 rpm por 30 seg a 4°C, la pastilla se resuspendió en 100 μ l de la solución I previamente enfriada en hielo agua (Glucosa 50 mM, TrisHCl 25 mM, EDTA 10 mM), enseguida se agregaron 200 μ l de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), e inmediatamente después 150 μ l de la solución III (Acetato de potasio 5 M 60%, ácido acético glacial 12 %). La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 5 min en hielo con agua y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4°C. Posteriormente se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto al sobrenadante y se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 2 min; nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 70 % frío, y se secó en una centrifuga de vacío durante 3 min. El DNA obtenido se

diluyó en 30 μ l de H₂O MilliQ, se agregó 1 μ l de RNAsa (1 μ g/ μ l) y se incubó a temperatura ambiente por una hora.

❖ Midiprep

Se utilizó el *kit* de extracción de DNA que se basa en la utilización de columnas *QIAGEN*, siguiendo las especificaciones del proveedor. El DNA obtenido se diluyó en 30 μ l de H₂O MilliQ y se observó mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Obtención de bacterias competentes. Se sembró una colonia bacteriana de las cepas *E.coli* DH5 α , BL21 DE3 o BL21 DE3-CODON PLUS en 5 ml de medio LB y los cultivos se dejaron crecer toda la noche a 37°C en agitación constante (200 rpm); posteriormente se agregó una alícuota del cultivo en 20 ml de medio LB y la mezcla se incubó hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4-0.6. El cultivo se centrifugó a 8,000 rpm por 5 minutos a 4 °C y la pastilla bacteriana se resuspendió en la solución amortiguadora TBF1 (RbCl, MnCl₂ x 4 H₂O, Acetato de potasio (CH₃CO₂K), CaCl₂ x 2H₂O, Glicerol). Posteriormente la mezcla se incubó en hielo con agua por 20 min y se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm por 5 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 2 ml de la solución amortiguadora TBF2 (MOPS, -RbCl, CaCl₂ x 2 H₂O, Glicerol) y se incubó en hielo por 20 min, y finalmente se prepararon alícuotas de 50 μ l para su almacenamiento a -70°C.

Restricción de DNA de plásmido. Aproximadamente 100 ng de DNA de plásmido se digirieron con 10 unidades de la enzima EcoRI o BamHI (New England Biolabs) a una temperatura de 37°C durante toda la noche. Los cortes enzimáticos se verificaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, utilizando la solución amortiguadora Tris-acetato-EDTA (TAE) a una concentración final de 1X.

Secuenciación de DNA. Para la secuenciación de cada una de las construcciones generadas se utilizó el *kit Big Dye terminator V3.1 Cycle*

Sequencing (Applied Biosystems), siguiendo las especificaciones del proveedor. El DNA se precipitó con etanol/EDTA y la reacción de secuenciación se llevó a cabo en el equipo ABI PRISM 310 de Applied Biosystems.

Síntesis y purificación de proteínas de fusión con GST. Cultivos de células competentes de las cepas de *E.coli*, BL21 DE3 ó BL21-DE3-CODON PLUS, se transformaron con los vectores pGEX-4TI, pGEX-4T1-Emerina, pGEX-4T1-βDG así como con los vectores de expresión que codifican para los diferentes dominios de emerina o del β-distroglicano. Una colonia transformada con cada vector se suspendió en 2 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C durante toda la noche. Se realizó una dilución 1/40 del precultivo en 20 ml de LB-ampicilina y se propagó a 16°C hasta alcanzar una OD de 0.4-0.6. Enseguida se realizó la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes agregando 0.3 mM de IPTG y manteniendo el crecimiento del cultivo por una hora adicional. Se obtuvo una pastilla celular y se resuspendió en la solución amortiguadora NETN (NaCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH 8, NP40 0.5 %, PMSF 1 mM), en presencia de inhibidores de proteasas (Complete 1x, Roche). La suspensión se sonó 4 veces a 4 micrones por 15 seg, se centrifugó a 3,000 rpm para recuperar los sobrenadantes, y finalmente, estos se incubaron con 30 µl de perlas de glutatión-sefarosa previamente equilibrados con la solución amortiguadora NETN. Se realizaron 3 lavados de 5 min con la solución NETN sin inhibidores de proteasas, centrifugando en cada lavado a 3,000 rpm durante 5 min. Las proteínas unidas a las perlas se observaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% teñido con azul de Coomassie.

Interacción de proteínas mediante ensayos tipo pull down y Transcripción/traducción in vitro. Se utilizó el sistema TNT® *Quick-coupled transcription/translation T7 system* (Promega) que provee una mezcla de reacción que contiene un lisado de reticulocitos de conejo, la enzima RNA polimerasa T7, inhibidor de RNAsas, nucleótidos, aminoácidos y sales. A esta mezcla se

agregarán 2 µg de DNA de plásmido (pSG5-βDG o pSG5-Emerina) y 30 µCi de metionina marcada con S³⁵ (10 µCi/µl METRIX) y se incubó por 90 min a 30°C. Las proteínas de fusión con GST se expresaron y purificaron de cultivos bacterianos, posteriormente se acoplaron a perlas de glutatión-sefarosa y 2.5 µg de cada proteína sintetizada se mezcló con 10 µl de la proteína obtenida en el sistema de transcripción/traducción *in vitro*, en presencia de la solución amortiguadora de interacción (acetato potasio 140 mM, Hepes 15 mM pH 7.1, EDTA 1.5 mM pH 8, MgSO₄ 5 mM). La incubación se dejó durante toda la noche a 4°C con agitación suave y constante. Posteriormente, se realizarán 3 lavados con la solución de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 8, PMSF 1 mM, Tritón X-100 1%), y la interacción se observó mediante la exposición de una placa de auto-radiografía a una pantalla de fósforo, utilizando el equipo Typhoon (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

Cultivo celular y transfección. Los mioblastos de ratón C2C12 (ATCC® CRL-1772™) se cultivaron como se reportó previamente [14]. La obtención de la línea celular derivada de las células C2C12 *knockout* para Distroglicano (DG), la cual se generó mediante CRISPR/Cas9, se publicará posteriormente. Las células se transfectaron usando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.), de acuerdo al protocolo del fabricante, y se analizaron a las 24 horas post-transfección. Para analizar la vida media de emerina, las células se incubaron con 30 µg/ml de cicloheximida (CHX; Sigma-Aldrich, St Louis) y se cosecharon a las 0, 6, 12 y 24 horas después de la exposición para su análisis. El inhibidor de proteasoma MG132 (Sigma-Aldrich, St Louis), se usó a una concentración de 10 µM, y las células se expusieron a este químico durante 24 h. Las líneas celulares de linfocitos B de un paciente con Distrofía Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD) (GM16864) o de un individuo sano (AG10097) se compraron al Instituto Coriell (*Coriell Cells Repositories* (CCR) (Camden, NJ) y se cultivaron en medio RPMI.

Ensayos de interacción tipo GFP-trap. Se sembraron células C2C12 en 3 cajas p70 o 4 cajas p60 y se dejó que los cultivos llegaran a una confluencia de 70-80% para obtener posteriormente extractos totales de proteínas. Las perlas de

glutination-sefarosa (8 μ l por reacción) se equilibraron previamente con 500 μ l de la solución amortiguadora de equilibrio (Tris/Cl 10mM pH 7.5; NaCl 150 mM; EDTA 0.5 mM; PMSF 1 mM) y después de 2 h a 4°C se sometieron a centrifugación (3500 rpm por 2 minutos) y se eliminó el sobrenadante. Se repitió dos veces el lavado cada uno por 10 min y posteriormente se mezclaron las perlas con los lisados celulares. Para obtener los extractos de proteínas totales se agregó 100 μ l de buffer de lisis (Tris-HCl 10mM pH 7.5; NaCl 150 mM; EDTA 0.5 mM; NP-40 0.5%; PMSF 1mM) manteniendo la mezcla a 4°C. Se transfirieron los lisados a tubos de 1.5 ml y se sometieron a tres ciclos de sonicación (3.5 micrones por 15 segundos con descansos de 30 segundos). Los lisados se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se agregaron las perlas de glutación-sefarosa. La mezcla se mantuvo toda la noche en agitación constante a 4°C y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 5 min a 4°C y se recuperó la fracción no unida a las perlas. Las perlas se sometieron a lavados con la solución amortiguadora de equilibrio y se adicionó posteriormente la solución amortiguadora de carga. Las mezclas se hirvieron a una temperatura de 100°C por 5 min y las proteínas obtenidas se analizaron posteriormente por medio de inmunodetección en fase sólida.

Inmunodetección en fase sólida. Se obtuvieron extractos totales de proteínas como se describió anteriormente. Enseguida se procedió con la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, empleando una curva estándar con BSA (Bovine serum albumin). Para la electroforesis se prepararon geles de poliacrilamida al 10% usando un gel concentrador al 10%. Las muestras se mezclaron con la solución amortiguadora de carga, se hirvieron durante 3-5 minutos a 100°C y se colocaron sobre los pozos del gel. Los geles se sometieron a corriente eléctrica (20 mA durante 2 horas) y posteriormente se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa, usando una cámara de transferencia seca y aplicando una corriente de 20 Volts durante 2 horas. Para verificar la transferencia exitosa de las proteínas se tiñó la membrana con Rojo de Ponceau. Para revelar la señal de las proteínas de interés se lavó la membrana y se bloqueó en una solución de leche descremada al 6% en TBS-T (Tris-Buffered

Saline Tween 20) durante dos horas, posteriormente se enjuagó la membrana y se le agregó el anticuerpo primario correspondiente, dejándose en incubación toda la noche. Posteriormente, se enjuaga la membrana y se expuso al anticuerpo secundario durante 1 hora. Se lavaron las membranas previo al revela con ECL. Finalmente la membrana se expuso en la obscuridad a una placa de rayos X y se procedió al revelado de la reacción.

Inmunofluorescencia indirecta. Las células C2C12 se sembraron sobre cubreobjetos, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizan con Tritón X-100 al 0.1%. enseguida se bloquearon con gelatina al 0.5% en PBS y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante un día a 4°C. Posteriormente, las preparaciones se incuban durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios: anti-conejo acoplados a fluorocromos FITC (Fluorescein Iso-Thiocyanate) ó TRITC (Tetramethyl-Rodamine Isothiocyanate) y se llevó a cabo una contra-tinción con DAPI o Ioduro de Propidio para la visualización de los núcleos. Las preparaciones se montaron con 9 μ l de VectaShield y se observan en un microscopio confocal.

Resonancia Superficial de Plasmones (SPR). El análisis de la cinética de la interacción entre el β -dístroglicano y emerina se llevó a cabo con la técnica SPR, utilizando el equipo de doble canal SR7500DC (Reichert, Depew, NY) y los sensores utilizados fueron láminas planas de polietilenglicol/carboxilo. La velocidad de flujo para todos los pasos se determinó con solución salina de fosfatos con Tween 20 (PBST) a 40 μ l/ min. La proteína recombinante GST-emerin se acopló al sensor pasando N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida-N-hidroxi-succinamida (EDC-NHS) durante 5 min; la proteína GST-emerin se inmovilizó en el canal izquierdo durante 8 min, utilizando una solución amortiguadora de acetato de sodio 20 mM (pH 4.0) a 12.5 μ g/ml, y se bloqueó con etanolamina 1 M (ETN) durante 10 min. Para determinar la fase de asociación, se inyectaron durante 150 segundos cinco diferentes concentraciones de cada ligando disuelto en PBST; GST- β DG, GST-TM- β DG, GST-emerina (control positivo y GST (control negativo), y se realizaron triplicados de cada experimento.

Enseguida se cargó PBST durante 150 segundos para analizar la fase de disociación. Los datos se obtuvieron con el software Integrated SPRAutolink, y el ajuste de las curvas y análisis de datos se llevó a cabo con el software BioLogic scrubber 2 (Campbell, Australia). Se utilizó la prueba estadística ANOVA unidireccional de Tukey y el programa GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, EE. UU.) para las comparaciones múltiples. Los datos de 30 inyecciones diferentes se expresaron como la media \pm error estándar de las medias, y los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Inmunoprecipitación. Los extractos de células C2C12 (1 mg) se incubaron durante 2 h a 4°C con perlas de agarosa acopladas con proteína G recombinante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.); las perlas se equilibraron previamente con solución amortiguadora de lisis, incubándose durante 4 horas con agitación suave. Enseguida los extractos se incubaron durante una noche a 4°C con 5 μ g de anticuerpos inmunoprecipitantes anti-hemaglutinina (HA). Como control negativo, se corrieron incubaciones paralelas con un anticuerpo IgG irrelevante. Después de eso, se añadieron las perlas de proteína G-agarosa bloqueadas previamente con BSA al 4% a los extractos de proteínas y se incubaron durante una noche a 4°C. Los complejos se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con solución RIPA [Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM, 0.1% (v/v)], una pastilla de inhibidores de proteasa Complete, 0.5 % (v/v) de Triton X-100 y 0.5 mM de PMSF. Las proteínas precipitadas se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron por medio de inmunodetección en fase sólida.

Análisis in silico de la interacción de emerina con β -dystroglicano. Los modelos de la estructura protéica para la interacción entre emerina (259 aminoácidos) y β -DG (893 aminoácidos) fueron llevados a cabo utilizando la plataforma I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Roy et al., 2010) y su calidad estereoquímica fue evaluada por las gráficas Ramachandran. Para determinar las formas de interacción entre los dominios Transmembrana (TM) de emerina (aminoácidos del 225-247) y β -DG (551-773) las regiones TM son ricas en estructuras α -hélice, las cuales fueron analizadas mediante el

programa UCSF Chimera v10.1.1. Las estructuras resultantes se sometieron a interacción de proteína-proteína en el servidor ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu/signup.php>) (Kozakov et al., 2017), que produce un conjunto de grupos según su equilibrio: balanceado, electrostático, hidrofóbico y de fuerzas de Van der Waals+electrostático de los cuales solo se consideraron las principales predicciones. Los modelos de interacción de emerinaTM- β -DGTM se visualizaron utilizando el software UCSF Chimera v10.1.1.

Plásmidos y anticuerpos. Para la construcción de los vectores utilizados en este estudio se empleó la técnica de PCR y oligonucleótidos específicos (ver la Tabla 1). De la misma manera, las referencias de los vectores previamente reportados en la literatura se encuentran en la Tabla 1. Los anticuerpos de ratón monoclonales primarios que se utilizaron son los siguientes: anti- β -DG (MANDAG2) (Pereboev et al., 2002), anti- γ -tubulina (T6557) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-hemagglutinina del virus de la influenza (HA; sc-7392) y anti-GST (B-14) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Los anticuerpos policlonales de conejo utilizados fueron: anti-GFP (sc-8334), anti-emerina (sc-15338) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-HA (71-5500) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y anti-actina (donación del Dr. Manuel Hernández, CINVESTAV-IPN, México).

Tabla 1. Plásmidos.

	Plásmido	Secuencia de los oligonucleotidos	Referencia
Plásmidos para la expresión de β -DG y sus dominios, fusionados con GST (pGEX-4T1)	GST- β -DG		(Cerecedo et al., 2008)
	GST-CT	sentido 5'-GCATGAATTCTACCGCAAGAAGCGGAAGG-3'	En este estudio
		antisentido 5'-GCATGAATTCTTAAGGTGGGACATAGGGAG-3'	En este estudio
	GST-NT+TM	sentido 5'-GCATGAATTCTCCATCGTGGTGAATGGAC-3'	En este estudio
		antisentido 5'-GCATGAATTCTTAGCAGATCATGGCAATGATGC-3'	En este estudio
	GST-NT	sentido 5'-CTGAATTCTCCATCGTGGTGGAA-3'	En este estudio
		antisentido 5'-CTGAATTCTTACAGGTAGACATCAT-3'	En este estudio
	GST-TM	sentido 5'-CTGAATTCCACACAGTCATTCC-3'	En este estudio
		antisentido 5'-CTGAATTCTTAGCAGATCATGGCA-3'	En este estudio
Plásmidos para la expresión de emerina y sus dominios, fusionados con GST (pGEX-4T1)	GST-Emerina		(Wheeler et al., 2007)
	GST-NT	sentido 5'-ACTGGATCCATGGACAACACTACGCAGATCT-3'	En este estudio
		antisentido 5'-CTGGATCCCTAATCCTGGCCCA-3'	En este estudio
	GST-TM	sentido 5'-CTGGATCCCGCCAGGTCCCG-3'	En este estudio
		antisentido 5'-CTGGATCCCTAGTGGTAAATGAA-3'	En este estudio
	GST-CT		(Wheeler et al., 2007)
Plásmidos para la expresión de los dominios TM fusionados con GFP (pEGFP-C1)	pGFP- β -DG		(Bárbara Lara-Chacon, et. al. 2010)
	GFP-Eme		(Justin Demmerle, et. al. 2012)
	GFP-TM β -DG	sentido 5'-CTAGGATCCCACACAGTCATTCCG-3'	En este estudio
		antisentido 5'-CTCGGATCCTTAAGGGTAAGCTTGC-3'	En este estudio
	GFP-TMEme	sentido 5'-ATGGATCCCGTGCTCCTGGGGCT-3'	En este estudio
		antisentido 5'-ATGGATCCCTAGTGGTAAATGAAGAAG-3'	En este estudio
Plásmidos para los ensayos de transcripción-traducción (pSG5)	pSG5-Emerina	sentido 5'-ACTGGATCCATGGACAACACTACGCAGATCT-3'	En este estudio
		antisentido 5'-ACTGGATCCCTAGAAGGGGTTGCCTT-3'	En este estudio
	pSG5- β -DG	sentido 5'-CCGAATTCATGTCCATCGTGGT-3'	En este estudio
		antisentido 5'-CCGAATTCGATTAAGGTGGGACATA-3'	En este estudio
Plásmidos de expresión que portan la etiqueta HA	pHA-Eme		(Pfaff et al., 2016)
	pTrp226		(Pfaff et al., 2016)
	p Δ Val236-Phe241		(Pfaff et al., 2016)
	pPhe240His-FS		(Pfaff et al., 2016)

Resultados

La interacción entre β -DG y emerina está mediada por sus respectivos dominios transmembranales. Previamente se observó la asociación entre el β -DG y la emerina en los mioblastos C2C12 (Martinez-Vieyra et al., 2013); por lo tanto, nos propusimos identificar los dominios de cada proteína involucrados en esta interacción. En primer lugar, se examinó la capacidad de los diferentes dominios del β -DG para interactuar *in vitro* con la emerina, utilizando ensayos tipo *pull down*. El β -DG completo, así como sus dominios por separado, N-terminal (NT), transmembranal (TM), C-terminal (CT) y NT más TM (NT + TM), se expresaron y purificaron como proteínas de fusión con GST a partir de cultivos bacterianos de *E. coli* K12 (Fig. 11A). Por otra parte, la emerina se sintetizó *in vitro* y se marcó con metionina [^{35}S], usando un sistema de transcripción/traducción de lisados de reticulocitos de conejo y el vector pSG5-emerina (Tabla 1). Se incubaron cantidades iguales de las proteínas de fusión, unidas a perlas de glutatión-sefarosa con emerina marcada con [^{35}S], y se sometieron a un análisis de interacción tipo *pull down*. La emerina interactuó con GST- β -DG, GST-TM y GST-NT + TM, pero no con GST-NT, GST-CT o GST sola, como se observa en las autorradiografías (Fig. 11B). Estos resultados indican que el dominio TM de β -DG es necesario y suficiente para establecer su unión con emerina, mientras que los dominios NT y CT son prescindibles. Para identificar el dominio de emerina que permite su interacción con el β -DG se llevaron a cabo ensayos recíprocos. Se expresaron y purificaron a partir de cultivos bacterianos las proteínas GST, GST-emerina y GST fusionada a los diferentes dominios de emerina por separado (GST-NT, GST-TM y GST-CT) (Fig. 11C). Estas proteínas se incubaron con β -DG marcado con [^{35}S] (Fig. S1, panel derecho). El β -DG se sintetizó y se marcó usando el vector pSG5- β -DG (Tabla 1), empleando el sistema de transcripción/traducción *in vitro* de reticulocitos de conejo. Solamente las proteínas de fusión GST-emerina y GST-TM tuvieron la capacidad de interactuar con el β -DG (Fig. 11D). Colectivamente, estos datos demuestran que la interacción *in vitro*

entre β -DG y la emerina ocurre a través de la unión de sus respectivos dominios transmembranales.

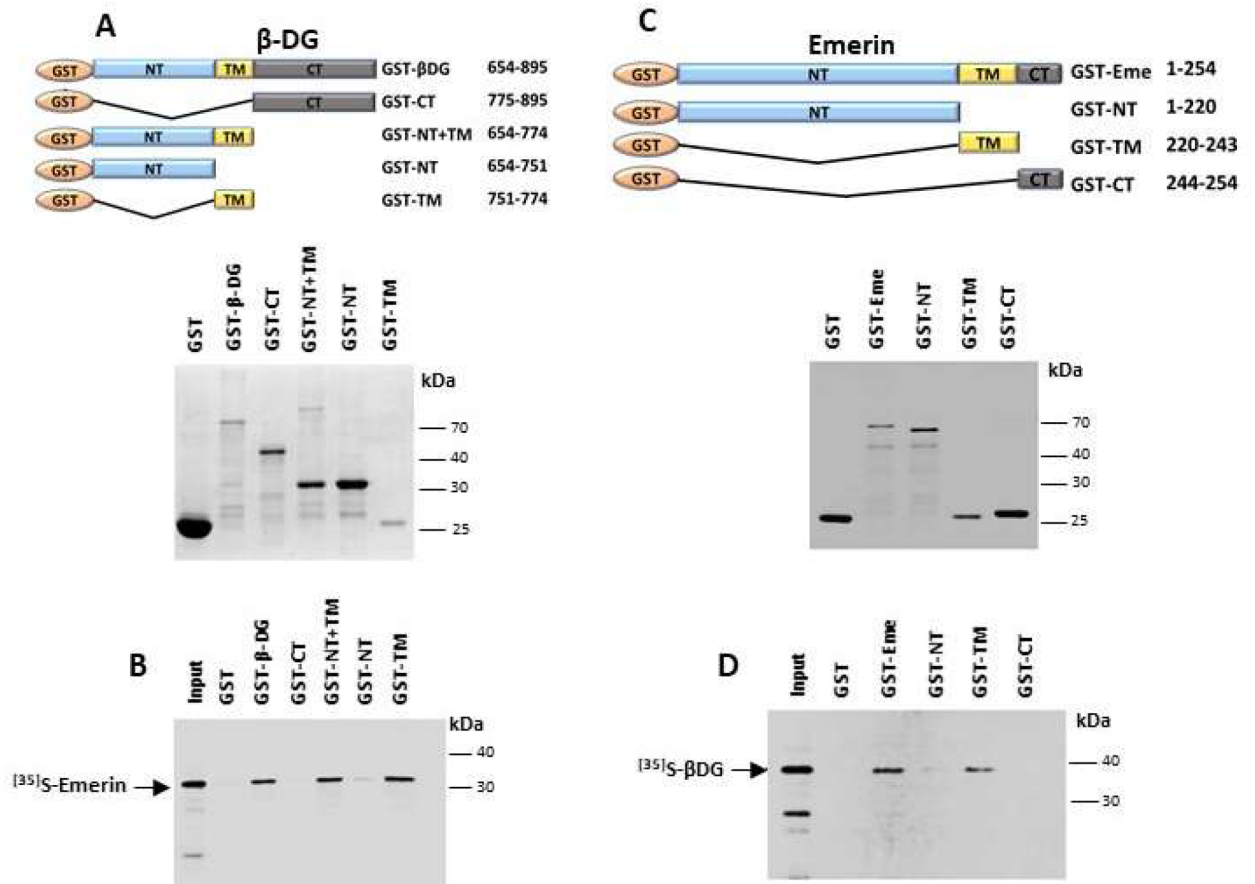


Fig. 11. Identificación de los dominios implicados en la interacción β -DG-emerina. (A) Panel superior, representación esquemática de las proteínas de fusión con GST que contienen el β -DG completo o sus dominios por separado (N-terminal (NT); C-terminal (CT), transmembranal (TM) y NT + CT). Los números a la derecha indican los residuos de aminoácidos de β -DG contenidos en cada construcción. Panel inferior, las proteínas β -DG fusionadas con GST se expresaron en cultivos de *E. coli*, se purificaron usando perlas de glutatión-sefarosa y se visualizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. (B) El β -DG y sus diferentes dominios fusionados con GST se inmovilizaron sobre perlas de glutatión-sepharose y se incubaron con [³⁵S]-emerina. Se observó la interacción de [³⁵S]-emerina con GST- β -DG, GST-NT-TM y GST-TM, pero no con GST-NT, GST-CT o GST sola. (C) Esquema que muestra las proteínas de fusión con GST que contienen a la emerina completa o sus diferentes dominios por separado: N-terminal (NT); C-terminal (CT) y transmembranal (TM). Los aminoácidos contenidos en cada construcción se

indican a la derecha. Panel inferior. En el gel teñido con azul de Coomassie se observa la expresión de las proteínas de fusión con GST obtenidas a partir de cultivos bacterianos y purificadas empleando perlas de glutatión-Sefarosa. (D) La emerina y sus diferentes dominios por separado, previamente inmovilizadas en perlas de glutatión-sefarosa, se incubaron con ^{35}S - β -DG para llevar a cabo ensayos de *pull down*. La interacción con ^{35}S - β -DG fue positiva para GST-emerina y GST-TM, pero no para GST-NT, GST-CT o GST sola. (B y D) Los carriles señalados como Input corresponden al 10% del volumen utilizada en los ensayos de unión.

Para demostrar que la interacción entre los dominios TM del β -DG ocurre en células intactas en el ambiente de la membrana nuclear interna, los dominios TM de cada proteína se fusionaron con GFP para su expresión como proteínas recombinantes en las células C2C12 (GFP-TM β -DG y GFP-TMEme), con la finalidad de llevar a cabo ensayos de co-localización e inmuno-precipitación utilizando el sistema GFP-Trap. De manera interesante, una cierta cantidad de las proteínas GFP-TM- β -DG y GFP-TMEme se distribuyó en la envoltura nuclear (NE), en donde co-localizaron con la emerina y el β -DG endógenos, respectivamente, (Fig. 12A). La GFP sola se distribuyó por toda la célula y no co-localizó específicamente ni con emerina ni con el β -dístroglicano (Fig. 12B y E). Los ensayos de GFP-Trap demostraron que la emerina endógena interacciona con el β -DG completo (GFP- β -DG) y en menor medida con GFP-TM β -DG, lo que implica que el dominio TM del β -DG mantiene la capacidad de interaccionar con emerina en células intactas. Por otra parte, los ensayos de GFP-Trap demostraron que solamente una cantidad pequeña del β -DG endógeno se asoció con GFP-emerina, mientras que no se observó interacción alguna entre GFP-TMEme y el β -DG endógeno (Fig. 12C y F). Es posible que la fusión con GFP afecte estéricamente la interacción entre el dominio TM de emerina y el β -DG endógeno.

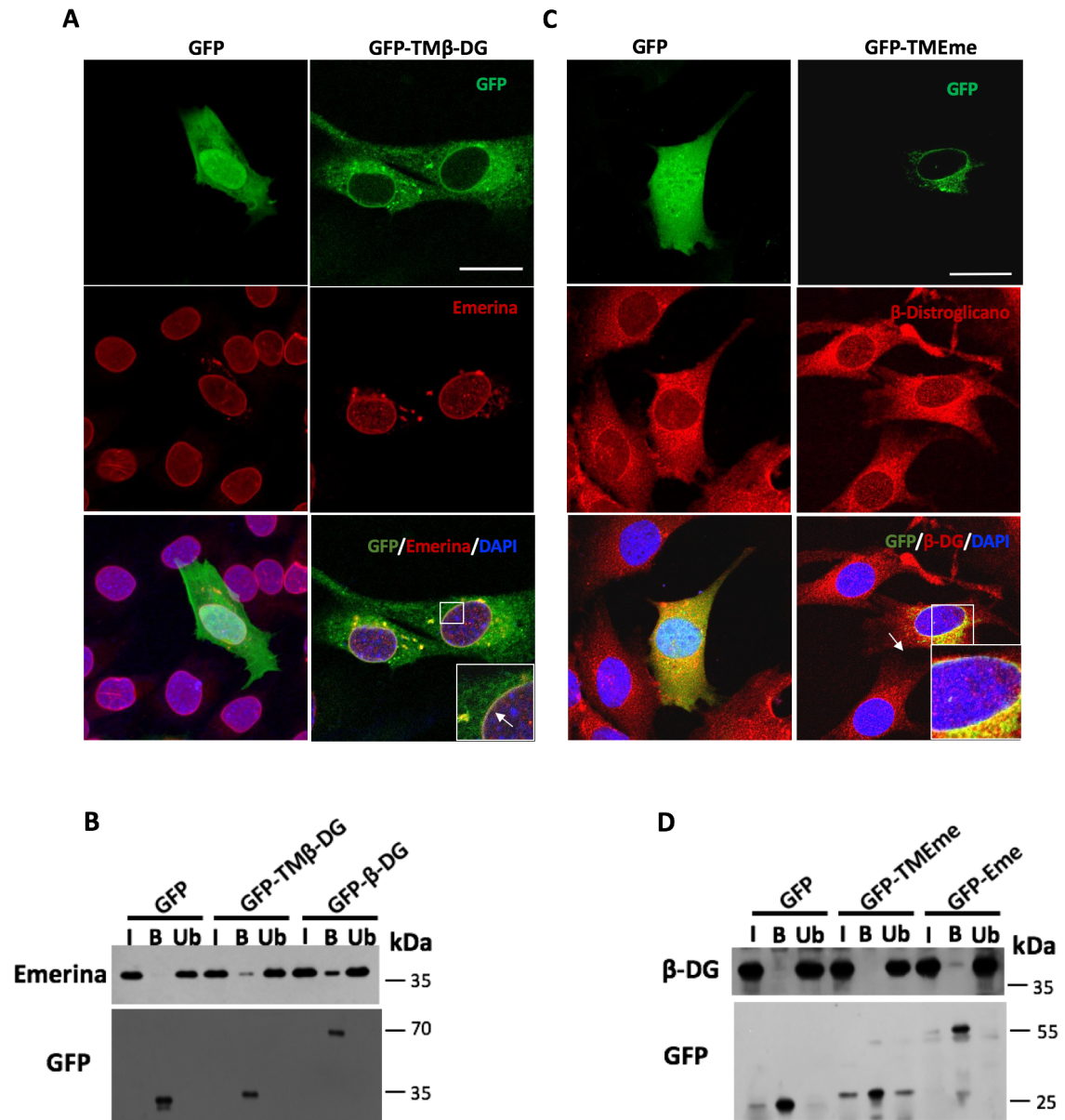
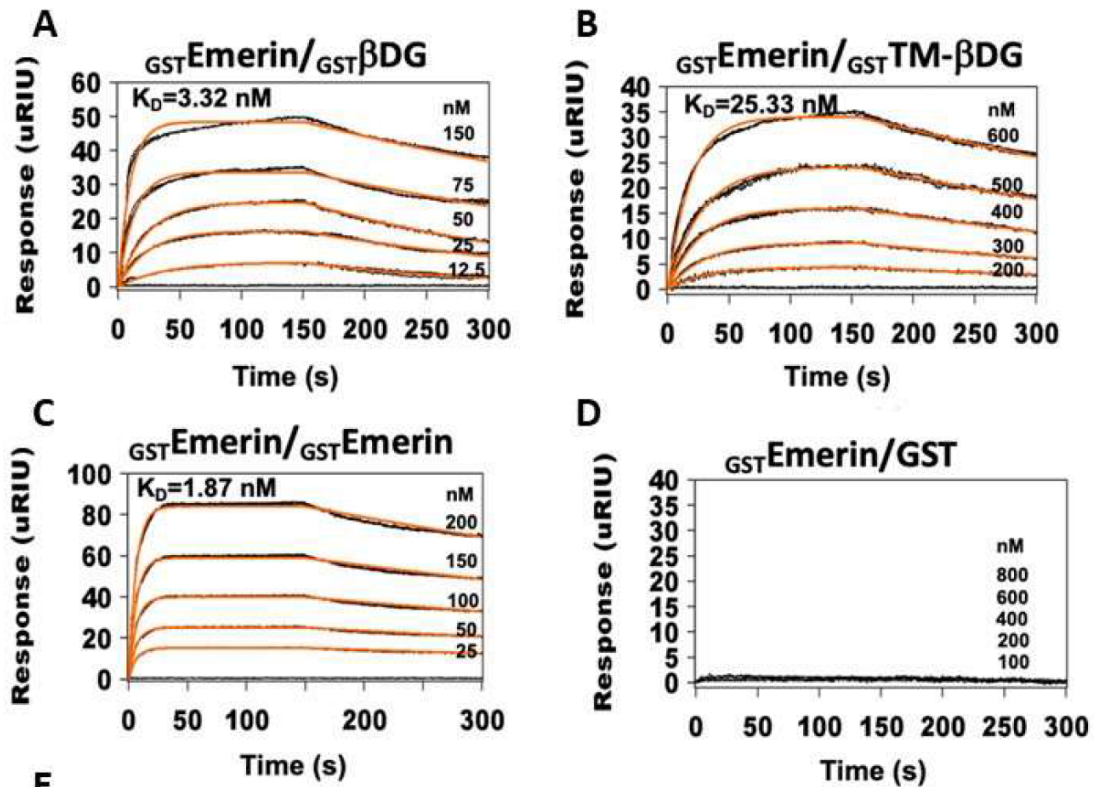


Fig. 12. El dominio transmembrana del β -DG interacciona con emerina en células intactas. Las células C2C12 se transfectaron transitoriamente para expresar las proteínas GFP, GFP-TM β -DG, o GFP-TMEme. (A y C) Trascurridas 24 h después de la transfección las células se inmunotñieron para β -DG o emerina (rojo) y se contratiñeron con DAPI para observar los núcleos (azul), previo a su análisis por microscopía confocal. Se muestran cortes ópticos a nivel del núcleo representativos Escala 10 μ m. (B y D). Los lisados de las células transfectadas se sometieron a inmunoprecipitación usando el sistema GFP-Trap, y las proteínas precipitadas se visualizaron mediante SDS-PAGE e inmunodetección en fase sólida, usando anticuerpos anti-emerina, anti- β -

DG o anti-GFP. I, corresponde al 5% del volumen de los lisados utilizado en los ensayos de inmunoprecipitación. B, fracción unida; Ub, fracción no unida.

Para caracterizar la cinética de la interacción β -DG-emerina se utilizó la técnica de resonancia superficial de plasmones (SPR por sus siglas en inglés). En la condición experimental adoptada, se inmovilizó GST-emerina sobre laminillas de polietilenglicol/carboxilo, y posteriormente, se hicieron pasar en diferentes concentraciones de los analitos GST- β -DG o GST-TM- β -DG. La interacción emerina-emerina, previamente reportada (Berk et al., 2014), se utilizó como control positivo, mientras que GST sirvió como control negativo. De manera interesante, emerina se unió con alta afinidad al β -DG completo (3.32 nM) y a su dominio TM (25.3 nM) (Fig. 13A-B); la ligera diferencia entre ellos se correlacionó bien con los ensayos GFP-Trap, en donde se observó una interacción menor de emerina con GFP-TM β -DG que con GFP- β -DG. (Fig. 12B). Por otra parte, emerina se unió con alta afinidad a la emerina misma (1.87 nM) (Fig. 13C), lo que es consistente con lo reportado en *C. elegans* (14 nM) (Bar et al., 2014). Estos datos sugieren que la interacción entre los dominios TM de emerina y β -DG se podría estabilizar más con la participación de otros segmentos del β -DG. En apoyo a esta hipótesis, las constantes de disociación para GFP-TM β -DG-emerina y GFP- β -DG-emerina fueron muy similares (Fig. 3E).



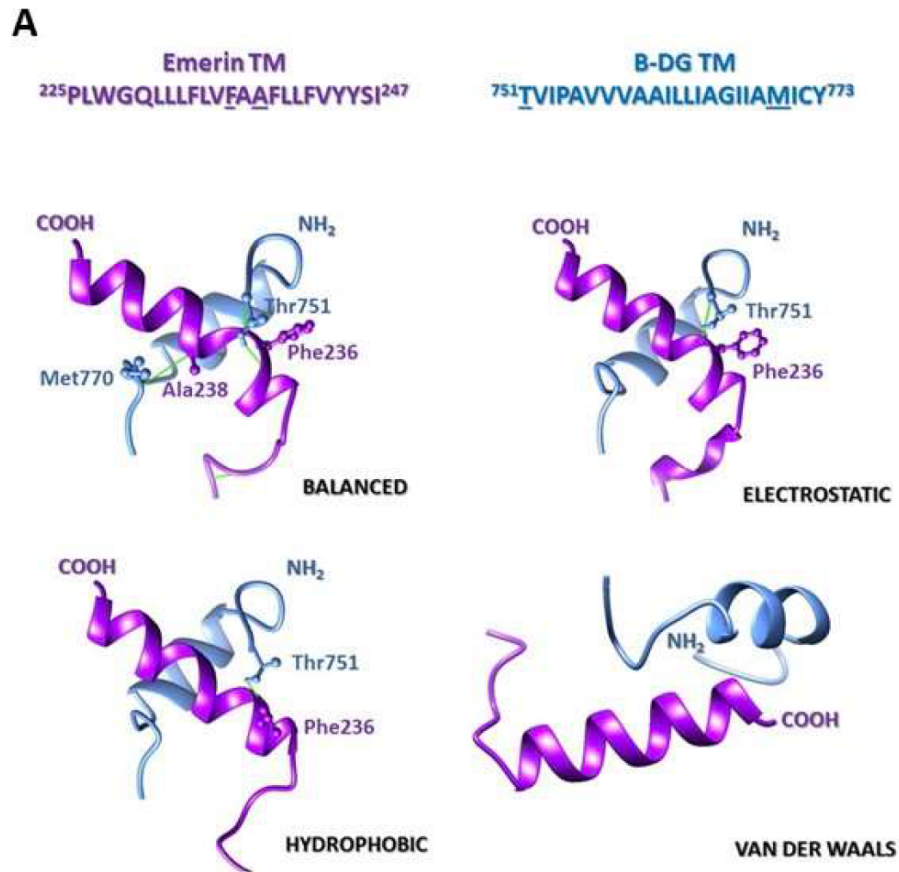
E Kinetic parameters of interaction between GST-Emerin and GST-βDG, GST-TMB or GST-Emerin

Ligand	GST-Analyte	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
GST-Emerin	βDG	$(8.33 \pm 0.8) \times 10^5$	$(2.05 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	3.32 ± 0.3
	TM-βDG	$(8.37 \pm 0.7) \times 10^4$	$(2.15 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	25.33 ± 1.5
	Emerin	$(1.18 \pm 0.2) \times 10^6$	$(1.54 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	1.87 ± 0.3

Mean of kinetic values from 30 injections \pm SEM. $K_D = k_d/k_a$

Fig. 13. Afinidad de emerina por β-DG y por el dominio TM del β-DG. Se realizaron ensayos de resonancia superficial de plasmones (SPR), para determinar la cinética de la interacción de emerina con el β-DG completo o con el dominio TM de β-DG. Las proteínas disueltas GST-β-DG (A), GST-TMβ-DG (B), GST-emerina (C) o GST solo (D) se colocaron sobre un sensor previamente recubierto con GST-emerina. Se muestran las respuestas (μRIU) de cada concentración de proteína utilizada, a través de los diferentes tiempos de incubación. El análisis de la interacción emerina-emerina sirvió como control positivo, mientras que la interacción con GST se empleó como control negativo. (E) Se muestran los parámetros cinéticos de la interacción de emerina con β-DG, TM-β-DG o emerina.

Para predecir el acoplamiento molecular entre los dominios TM del β -DG y la emerina se utilizó el programa ClusPro 2.0. Este análisis mostró que los dominios TM interaccionan de manera cruzada, de acuerdo al modelo balanceado (suma de las energías de atracción y repulsión), electrostático e hidrofóbico (Fig. 14A). El análisis que considera las fuerzas de Van der Waals no arrojó interacción posible (-63 kCal/mol, Fig. 14B). En el modelo balanceado se evidenció el contacto entre los dominios TM de ambas proteínas que involucra los residuos Thr751 y Met770 de β -DG y los aminoácidos Phe236 y Ala238 de emerina. En el modelo electrostático y en el hidrofóbico predomina la interacción Thr751-Phe236. Considerando el ambiente hidrofóbico de la membrana nuclear interna, el complejo con la energía más baja (es decir, con la estabilidad más alta) corresponde al hidrofóbico (-1617 kCal/mol, Figura 14B). Por lo tanto, es probable que un número limitado de aminoácidos mantiene la interacción entre los dominios TM del β -D y emerina, a través de una interacción hidrofóbica.



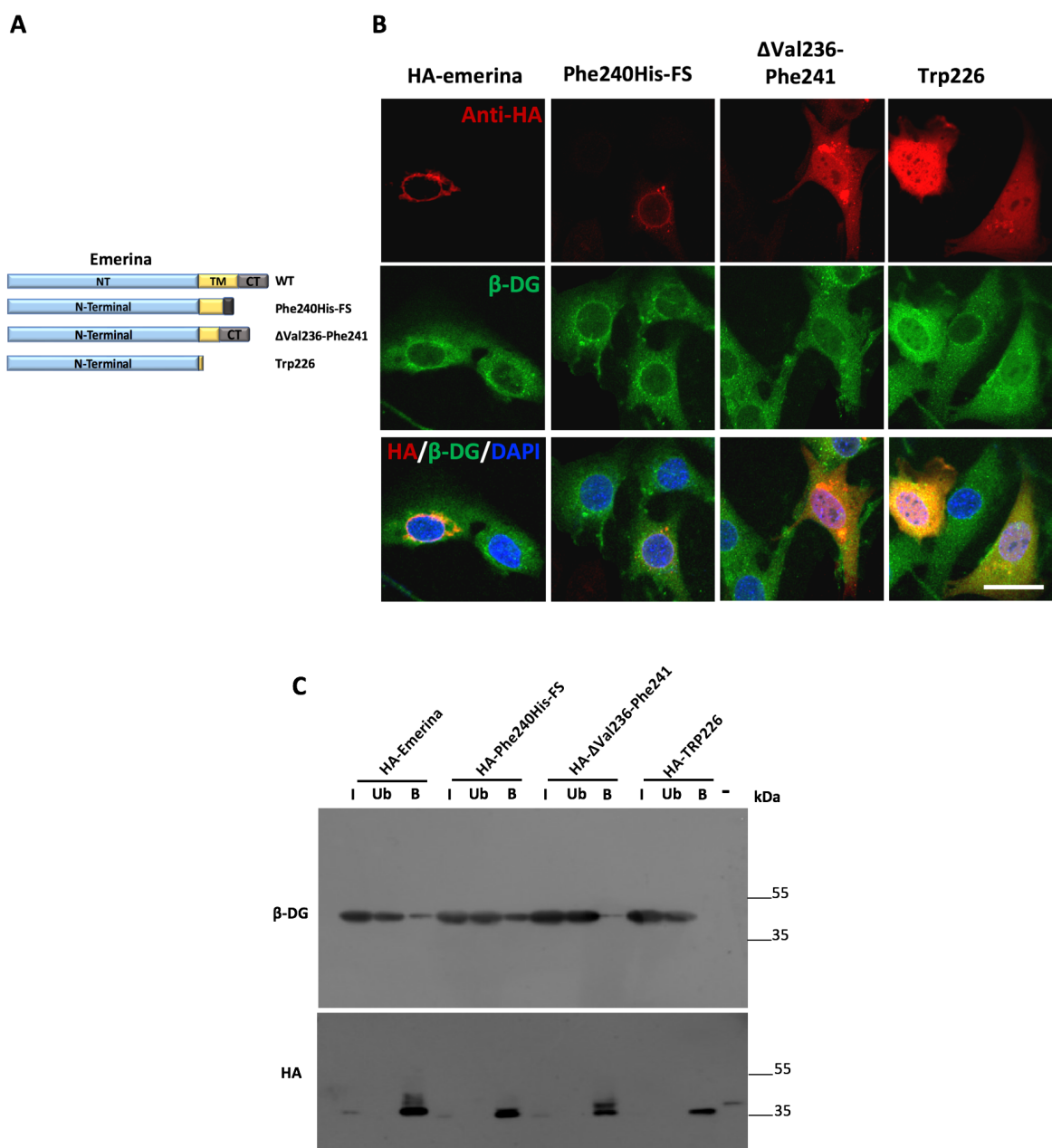
B

CLUSTER	MEMBERS	CENTER ENERGY	LOWEST ENERGY
Balanced	373	-785.5	-909.4
Electrostatic	367	-784.6	-912.6
Hydrophobic	402	-1393.7	-1617.4
Van der Waals	118	-57.8	-63.1

Fig. 14. Análisis *in silico* de la interacción de los dominios TM de la emerina y el β -DG. (A) De muestra el modelado de los dominios TM de emerina (morado) y β -DG (azul) y su manera de interactuar. Se indican la región C-terminal de emerina y la región N-terminal de β -DG, localizadas en la parte exterior de la membrana nuclear interna. Los residuos que interactúan se muestran con la simbología bastón-círculo y se colorearon de acuerdo con su estructura principal, los contactos mostrados se muestran con líneas verdes. (B) Se enlistan los modelos de interacción, con los valores de energía (kCal/mol) que corresponden con acoplamiento más estable entre los dominios TM.

La localización del β -DG en la envoltura nuclear (NE) depende de su interacción con el dominio TM de la emerina. Los datos descritos anteriormente sugieren que el posicionamiento del β -DG en la NE requiere su interacción con el dominio transmembrana de emerina. Por lo tanto, evaluamos el efecto de diferentes mutaciones localizadas en el TM de emerina, que se presentan en pacientes con distrofia muscular Emery-Dreifuss (EDMD), sobre la distribución nuclear del β -DG (Fig. 15A). La mutación puntual Phe240His-FS y la eliminación Δ Val236-Phe241 originan dominios transmembrana más cortos de emerina, mientras que la mutación Trp226 da lugar a un codón de paro que elimina prácticamente todo el dominio TM (Pfaff et al., 2016). Las células C2C12 con la sobreexpresión de la emerina WT (HA-emerina) presentan una distribución predominantemente citoplasmática del β -DG, con una localización visible en la NE y sin señal en el nucleoplasma (Fig. 15B). Este patrón de distribución del β -DG permaneció sustancialmente sin cambios en las células que sobre-expresan las mutantes Phe240His-FS y Δ Val236-Phe241. En cambio, la sobre-expresión de la mutante Trp226 provocó una deslocalización del β -DG de la NE al nucleoplasma (Fig. 15B). Posteriormente investigamos si estas mutaciones impiden la interacción de emerina con el β -DG, mediante ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA. Ambas mutantes Phe240His-FS y Δ Val236-Phe241 mantuvieron la capacidad de interactuar con el β -DG, como lo hace la emerina WT. En contraste, la mutante Trp226 no tuvo la capacidad de asociarse con el β -DG endógeno (Fig. 15C). Finalmente examinamos la distribución del β -DG en un cultivo de linfocitos B derivado de un paciente con Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD). Los linfocitos EDMD portan una inserción de cinco pares de bases en el exón 6 del gen de la emerina, lo que ocasiona un codón de paro en el aminoácido 238. Por lo tanto, la emerina mutante carece de 6 aminoácidos del dominio TM y del dominio C-terminal completo. La inmunotinción de la emerina en la periferia nuclear disminuyó significativamente en los linfocitos B del paciente con EDMD y prácticamente no se detectó la emerina por inmunodetección en fase

sólida, en comparación con los linfocitos B derivados de un individuo sano (Fig. 15D). De manera interesante, la pérdida de emerina provocó una disminución de la inmunotinción y niveles del β -DG, en comparación con los linfocitos B control (Fig. 15D). Colectivamente estos datos demuestran que la localización de β -DG en la NE depende de su interacción con el TM de emerina. El dominio TM de la emerina debe tener la longitud e hidrofobicidad adecuadas para soportar la interacción entre las dos proteínas.



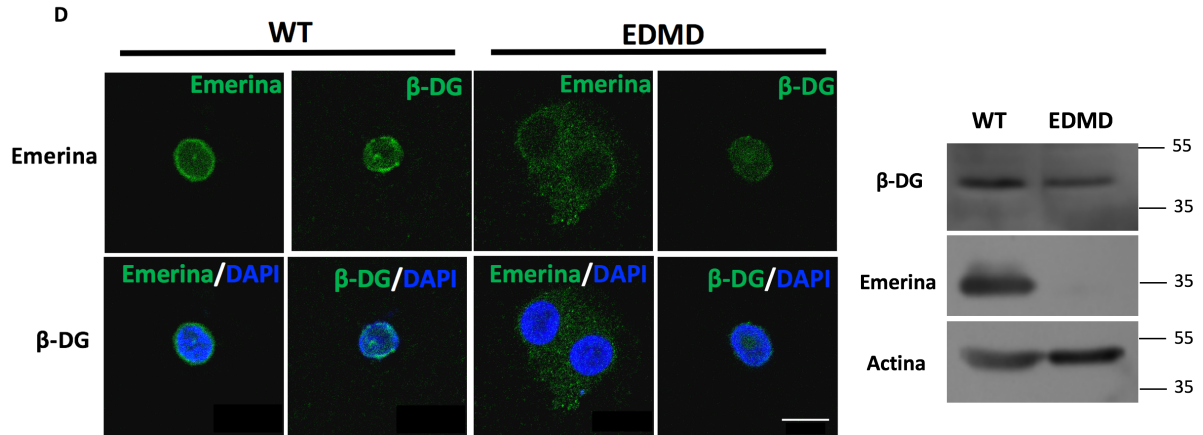


Fig. 15. Efecto de mutantes de emerina sobre la localización subcelular del β -DG. (A) Representación esquemática de las construcciones que expresan la emerina WT o sus variantes mutantes (Phe240His-FS, Δ Val236-Phe241 y Trp226). (B) Las células C2C12 cultivadas sobre cubreobjetos se transfectaron transitoriamente para expresar las mutantes de emerina fusionadas con la bandera HA. A las 24 post-transfección, las células se fijaron, se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia doble con anticuerpos anti-HA y anti- β -DG y se contra-tiñeron con DAPI para visualizar los núcleos. Se muestran cortes transversales obtenidos por microscopia confocal. Las flechas indican la localización nuclear del β -DG en las células transfectadas (escala, 10 μ m). (C) La interacción del β -DG con la emerina WT y sus variantes mutantes se analizó por inmunoprecipitación, usando anticuerpos anti-HA. Las fracciones unidas (B) y no unidas (Ub) se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida, usando anticuerpos específicos contra β -DG y HA. El input corresponde al 5% del volumen total emplaado en los ensayos de inmunoprecipitación. (D) Distribución del β -DG en los linfocitos B de un paciente con EDMD y de un individuo sano. Los linfocitos B se cultivaron sobre cubreobjetos, se inmunotiñeron para emerina o β -DG y se contratiñeron con DAPI para decorar los núcleos. Se muestran cortes transversales representativos, obtenidos por microscopia confocal, a partir de dos experimentos independientes (escala, 10 μ m). Panel inferior. Los lisados de linfocitos B del paciente con EDMD o de un individuo sano se analizaron con anticuerpos contra emerina, β -DG y actina (control de carga). Se muestra un gel representativo de dos experimentos independientes.

La ausencia de distroglicano afecta la estabilidad y función de emerina. Para determinar la relevancia fisiológica de la interacción de emerina- β -DG, se analizó el impacto de la ausencia de β -DG sobre los niveles y la función de emerina, utilizando para este fin células C2C12 knockout para DG (DG-KO) previamente

obtenidas mediante la técnica CRISPR/Cas9. Las células DG-KO exhibieron una disminución de un 40% en los niveles de emerina (Fig. 16A). Por lo tanto, el siguiente paso fue analizar si la función emerina está alterada por la carencia del β -DG. Evaluamos dos procesos celulares que dependen de la emerina, la morfología nuclear (Lammerding et al., 2005) y el anclaje de los centrosomas a la NE (Salpingidou et al., 2007). De manera notable, la inmunotinción para emerina reveló deformaciones del núcleo en un 35% de las células DG-KO (Fig. 16B), incluidas núcleos fisurados, núcleos con forma de riñón y núcleos con ampollas. Las aberraciones nucleares se observaron en diferentes pasajes de las células (p11-14), por lo que no son consecuencia del envejecimiento de los cultivos DG-KO. Para determinar la posición del centrosoma con relación al núcleo, las células controles y DG-KO, los centrosomas se inmunotintaron con anticuerpos contra γ -tubulina y se contra-tintaron con DAPI para observar los núcleos. Observamos que los centrosomas se localizaron yuxtapuestos al núcleo en las células WT, con una distancia centrosoma-núcleo promedio de 0.88 μ m, mientras que las células DG-KO exhibieron una mayor distancia entre los centrosomas y núcleo, con un valor promedio de 2,62 μ m (Fig. 16C).

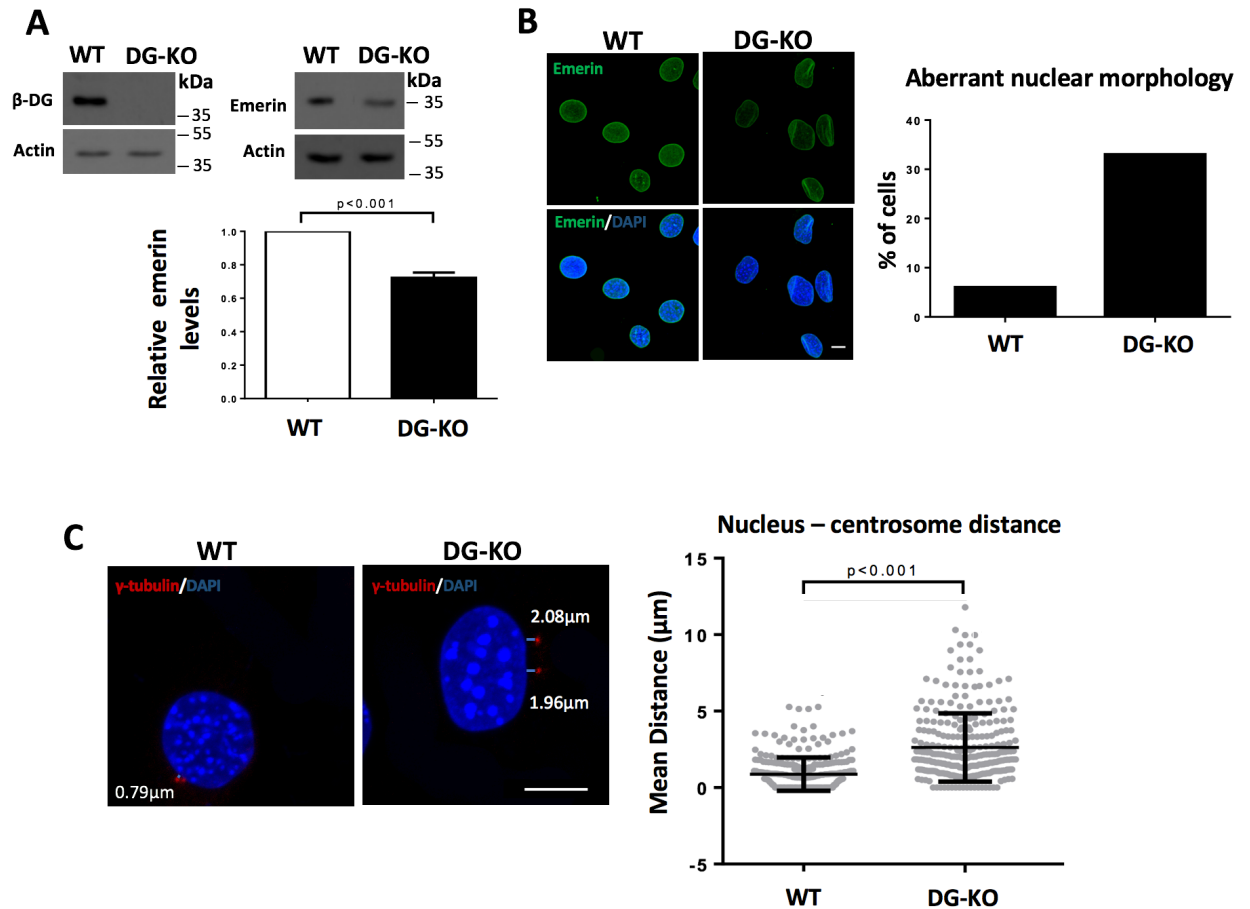


Fig. 16. Las células DG-KO presentan una disminución de los niveles de emerina, una morfología nuclear aberrante y un aumento de la distancia centrosoma-núcleo. (A) Los niveles de emerina se evaluaron en las células C2C12 WT y DG-KO mediante inmunodetección en fase sólida, usando anticuerpos contra β-DG, emerina y actina (control de carga). Los resultados corresponden a la media + SEM de tres experimentos independientes, con un valor de p que muestra diferencias significativas. (B) Las células C2C12 WT y DG-KO se inmunotñeron para emerina y se contratiñeron con DAPI para observar los núcleos. Se calculó el porcentaje de células con morfología nuclear aberrante (n = 300 células). Escala, 10 μm. (C) Las células WT y DG-KO se inmunotñeron con un anticuerpo anti-γ-tubulina y contratiñeron con DAPI para visualizar los centrosomas y los núcleos respectivamente. Se muestran imágenes representativas del posicionamiento del centrosoma con respecto al núcleo. Escala, 10 μm. La distancia del centrosoma al núcleo se midió utilizando el programa *Leica Application Suite*, y el procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con el empleo del programa *Advanced Fluorescence Lite*. Los datos del gráfico corresponden a la media ±SD de tres experimentos independientes (n = 300 núcleos), con un valor de p que indica una diferencia significativa (*t* de Student).

En la última parte de este trabajo nos prepusimos evaluar la hipótesis de que la disminución de los niveles de emerina que presentan las células DG-KO, se deba a la inestabilidad que le provoca la ausencia del β -DG. Con este fin, tratamos a las células WT y DG-KO con cicloheximida para inhibir la síntesis de proteínas y determinamos la vida media de emerina. Notablemente, la vida media de la emerina disminuyó de 17.7 h (WT) a 11.2 h en las células DG-KO (Figura 17A), y el hecho de que esta caída en su estabilidad se revirtió tratando las células con el inhibidor del proteasoma MG132 (Figura 17B), sugiere que la degradación proteosómica de la emerina aumenta en las células que carecen de DG.

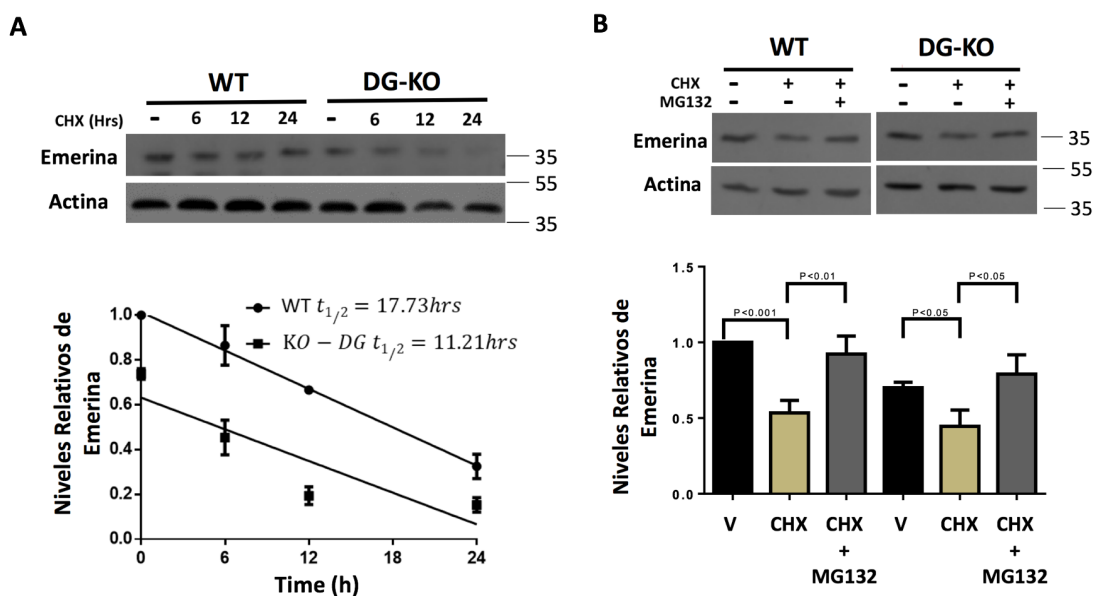


Fig. 7. La ausencia del β -DG acelera la degradación de emerina mediante el proteasoma. (A) Los mioblastos C2C12 WT y DG-KO se trataron con cicloheximida (CHX) durante los intervalos de tiempo indicados. Los lisados celulares se analizaron por inmunodetección en fase sólida, empleando anticuerpos específicos contra emerina y actina (control de carga). Panel inferior. La vida media emerina ($t_{1/2}$) se calculó mediante análisis de densitometría. Los datos corresponden a la media + SEM de tres experimentos independientes y la gráfica de regresión lineal se obtuvo usando el software Graphpad Prism 6. (B) Los mioblastos C2C12 WT y DG-KO tratados con CHX como en el panel (A) se incubaron durante 24 h con MG132 (inhibidor de proteasoma) o con el vehículo solamente (DMSO). Los datos corresponden a la media + SEM de tres experimentos independientes, y los valores de p que indican diferencias significativas.

Discusión

La envoltura nuclear (NE) es una membrana compleja que separa funcionalmente el núcleo del citoplasma y organiza una variedad de procesos nucleares, incluyendo la arquitectura nuclear, la replicación del ADN, la expresión génica y la organización de la cromatina. El papel esencial de la NE queda de manifiesto por la existencia de un número creciente de enfermedades humanas conocidas colectivamente como laminopatías, las cuales son causadas por mutaciones en genes que codifican para varios de sus componentes (Tatli and Medalia, 2018). Teniendo en cuenta la diversidad funcional de la NE es probable que aun falten por identificarse nuevas proteínas de esta estructura nuclear. Estudios recientes de nuestro laboratorio revelaron que el β -DG es un componente de la NE involucrado de alguna manera en el mantenimiento de la estructura y la función nuclear, probablemente sirviendo como un andamio para el ensamblaje de un complejo de proteínas de la NE compuesto por emerina y las láminas A/C y B1 (Martinez-Vieyra et al., 2013; Vélez-Aguilera et al., 2018). Por lo tanto, la caracterización de la interacción de β -DG con proteínas de la NE ayudará seguramente a descifrar su función en el núcleo. En este estudio describimos por primera vez las bases moleculares de la interacción entre el β -DG y la emerina, y proporcionamos evidencia de la importancia biológica de esta interacción. Nos enfocamos en esta interacción porque la emerina es una proteína importante de la NE, ya que modula diversos procesos celulares (Koch and Holaska, 2014; Heller et al., 2019) y su deficiencia debida a mutaciones en el gen que la codifica, ocasiona la Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD) tipo 1, un trastorno genético ligado al cromosoma X que se caracteriza por una degeneración progresiva del músculo esquelético y la presencia de fallas cardíacas (Bione et al., 1994).

Determinamos que estas dos proteínas se asocian *in vitro* mediante la interacción de sus respectivos dominios TM, empleando ensayos tipo *pull down* y variantes truncadas de ambas proteínas (β -DG y emerina). Demostramos que la

unión del β -DG con emerina ocurre en el interior de la célula, en el ambiente hidrofóbico de la membrana nuclear interna, ya que el TM de β -DG fusionado a GFP fue capaz de inmunoprecipitar a la emerina endógena en células intactas. Con base a estos resultados proponemos que el β -DG se asocia a la emerina mediante la interacción lateral de sus dominios TM respectivos (unión alfa-hélice-alfa hélice), como lo hacen varias proteínas transmembranales, incluyendo las integrinas y las tirosina-cinasas unidas a receptores. Las regiones alfa-hélice de los dominios transmembranales (TM) de las proteínas integrales de membrana permiten interacciones proteína-proteína no covalentes fuertes y específicas (Fink et al., 2012). Consistente con esta idea, demostramos mediante ensayos SPR que la emerina se une *in vitro* con una afinidad alta al TM del β -DG (KD de 25.3 nM). Esta afinidad es similar a la obtenida para la interacción de emerina con BAF-1 (57 nM), con emerina misma (14 nM) (Holaska et al., 2004) y con la lámina A (40 nM) (Holaska et al., 2003). Así mismo, una simulación *in silico* del acoplamiento de los dominios TM del β -DG y la emerina predijo una interacción cruzada entre estos dominios, con pocos residuos involucrados en los contactos laterales alfa-hélice-alfa-hélice. Es importante mencionar que no se conocen en la actualidad los factores que determinan la interacción entre los dominios TM de proteínas de la NE. Se requieren experimentos adicionales utilizando ensayos TOXCAT (un sistema, diseñado para analizar la asociación de dominios α -hélices transmembranales en un entorno membranar) (Russ and Engelman, 1999), así como experimentos de mutagénesis sitio-dirigida para definir las propiedades bioquímicas y los aminoácidos que están implicados en la interacción TM-TM del β -DG con la emerina.

La interacción con múltiples proteínas le confiere a emerina un carácter multifuncional: por ejemplo, emerina regula la expresión génica a través de su asociación con el factor de transcripción miogénico Lmo7 (*Lim-domain-only 7*) (Holaska et al., 2006; Dedeic et al., 2011) y con el represor de la transcripción GCL (*Germ Cell-Less*), involucrado en la proliferación celular (Holaska et al., 2003). La emerina participa también en la regulación de vías de señalización a través de su interacción con la β -catenina, componente de la vía Wnt (Markiewicz

et al., 2006; Jamieson et al., 2015; Stubenvoll et al., 2015). Por otro lado, la emerina está involucrada en el mantenimiento de la arquitectura nuclear a través de su asociación con la lámina A/C (Sakaki et al., 2001) y en el ensamblaje post-mitótico del núcleo y la arquitectura de la cromatina, en conjunto con el factor BAF/Banf1 (*barrier-to-autointegration*) y la histona desacetilasa 3 (HDAC3) respectivamente (Margalit et al., 2007; Demmerle et al., 2012). Por lo tanto, es plausible proponer que la unión del β -DG con la emerina podría modular la función de esta última proteína. Para abordar la importancia fisiológica de esta interacción, evaluamos si la ausencia del β -DG impacta a la emerina, utilizando las células DG-KO C2C12. La falta del β -DG ocasionó una disminución del 30% de los niveles de emerina, debido a una degradación proteosomal acelerada. La disminución de los niveles de emerina se revirtió mediante el tratamiento con MG132, (inhibidor específico del proteosoma), lo que implica que la falta de su pareja molecular (β -DG) afectó su estabilidad volviéndola blanco de degradación mediante el proteosoma. Consistente con esta idea, previamente se reportó que la emerina se degrada por el proteosoma (Kituyi and Edkins, 2018). Demostramos que los bajos niveles de emerina en las células DG-KO ocasionan alteraciones en los procesos celulares que controla esta proteína, incluyendo la morfología nuclear y el anclaje de los centrosomas a la NE. De manera recíproca, observamos que el anclaje del β -DG a la NE requiere la interacción con el TM de emerina, ya que la sobreexpresión de una variante mutante de emerina (Trp226) que carece prácticamente de todo el dominio TM (Trp226), resultó en una deslocalización del β -DG de la NE hacia el nucleoplasma, debido a que la mutante pierde la capacidad de interactuar con el β -DG endógeno.

Colectivamente, nuestros datos son consistentes con la idea de que el β -DG es un modulador de la función emerina. Por lo tanto, es atractivo sugerir que la interrupción de la interacción β -DG-emerina podría ser parte de la patogénesis de la EDMD. En apoyo a esta idea, hemos establecido que las células C2C12 DG-KO recrean características distintivas de las células EDMD, como la morfología nuclear aberrante (ver arriba) y una diferenciación muscular interrumpida (datos no publicados). Así mismo, los linfocitos B derivados de un paciente con EDMD

mostraron una disminución de los niveles del β -DG. Tomando en consideración que más del 60% de los pacientes con EDMD no están asociados con un defecto genético, es interesante proponer que la deficiencia del β -DG podría conducir por sí sola al fenotipo EDMD (Meinke et al., 2020).

Conclusiones

La interacción entre el β -DG y la emerina se establece a través de la interacción de los dominios transmembranales de ambas proteínas. Esta asociación es fisiológicamente relevante ya que el β -DG le confiere estabilidad a la emerina, modulando así su función. De manera recíproca, el β -DG requiere de la emerina para anclarse correctamente a la envoltura nuclear. Los resultados de este trabajo sugieren que el β -DG podría contribuir a la patogénesis de la Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), pero se requiere investigación adicional para evaluar esta hipótesis.

Referencias

- Bar, D.Z., Davidovich, M., Lamm, A.T., Zer, H., Wilson, K.L., and Gruenbaum, Y. (2014). BAF-1 mobility is regulated by environmental stresses. *Mol Biol Cell* 25(7), 1127-1136. doi: 10.1091/mbc.E13-08-0477.
- Bengtsson, L., and Wilson, K.L. (2004). Multiple and surprising new functions for emerin, a nuclear membrane protein. *Current opinion in cell biology* 16(1), 73-79. doi: 10.1016/j.ceb.2003.11.012.
- Berk, J.M., Simon, D.N., Jenkins-Houk, C.R., Westerbeck, J.W., Grønning-Wang, L.M., Carlson, C.R., et al. (2014). The molecular basis of emerin-emerin and emerin-BAF interactions. *J Cell Sci* 127(Pt 18), 3956-3969. doi: 10.1242/jcs.148247.
- Berk, J.M., Tiffit, K.E., and Wilson, K.L. (2013). The nuclear envelope LEM-domain protein emerin. *Nucleus* 4(4), 298-314. doi: 10.4161/nucl.2575125751 [pii].
- Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G., et al. (1994). Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature genetics* 8(4), 323-327. doi: 10.1038/ng1294-323.
- Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Becane, H.M., Hammouda, E.H., Merlini, L., et al. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature genetics* 21(3), 285-288. doi: 10.1038/6799.
- Bozzi, M., Morlacchi, S., Bigotti, M.G., Sciandra, F., and Brancaccio, A. (2009). Functional diversity of dystroglycan. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 28(4), 179-187. doi: 10.1016/j.matbio.2009.03.003.
- Cerecedo, D., Cisneros, B., Suárez-Sánchez, R., Hernández-González, E., and Galván, I. (2008). beta-Dystroglycan modulates the interplay between actin and microtubules in human-adhered platelets. *Br J Haematol* 141(4), 517-528. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07048.x.
- Clements, L., Manilal, S., Love, D.R., and Morris, G.E. (2000). Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochemical and biophysical research communications* 267(3), 709-714. doi: 10.1006/bbrc.1999.2023.
- Darras, B.T., Blattner, P., Harper, J.F., Spiro, A.J., Alter, S., and Francke, U. (1988). Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular dystrophy (DMD)/Becker muscular dystrophy (BMD) families studied with the dystrophin cDNA: location of breakpoints on HindIII and BglIII exon-containing fragment maps, meiotic and mitotic origin of the mutations. *American journal of human genetics* 43(5), 620-629.

- Dedeic, Z., Cetera, M., Cohen, T.V., and Holaska, J.M. (2011). Emerin inhibits Lmo7 binding to the Pax3 and MyoD promoters and expression of myoblast proliferation genes. *J Cell Sci* 124(Pt 10), 1691-1702. doi: 10.1242/jcs.080259.
- Demmerle, J., Koch, A.J., and Holaska, J.M. (2012). The nuclear envelope protein emerin binds directly to histone deacetylase 3 (HDAC3) and activates HDAC3 activity. *J Biol Chem* 287(26), 22080-22088. doi: 10.1074/jbc.M111.325308M111.325308 [pii].
- Emery, A.E. (1989). Emery-Dreifuss syndrome. *Journal of medical genetics* 26(10), 637-641.
- Emery, A.E., and Dreifuss, F.E. (1966). Unusual type of benign x-linked muscular dystrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 29(4), 338-342.
- Fairclough, R.J., Wood, M.J., and Davies, K.E. (2013). Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet* 14(6), 373-378. doi: 10.1038/nrg3460.
- Fink, A., Sal-Man, N., Gerber, D., and Shai, Y. (2012). Transmembrane domains interactions within the membrane milieu: principles, advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* 1818(4), 974-983. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.11.029.
- Fuentes-Mera, L., Rodriguez-Munoz, R., Gonzalez-Ramirez, R., Garcia-Sierra, F., Gonzalez, E., Mornet, D., et al. (2006). Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix. *Experimental cell research* 312(16), 3023-3035. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.06.002.
- Gonzalez-Ramirez, R., Morales-Lazaro, S.L., Tapia-Ramirez, V., Mornet, D., and Cisneros, B. (2008). Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 105(3), 735-745. doi: 10.1002/jcb.21870.
- Haenggi, T., and Fritschy, J.M. (2006). Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63(14), 1614-1631. doi: 10.1007/s00018-005-5461-0.
- Haraguchi, T., Holaska, J.M., Yamane, M., Koujin, T., Hashiguchi, N., Mori, C., et al. (2004). Emerin binding to Btf, a death-promoting transcriptional repressor, is disrupted by a missense mutation that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *European journal of biochemistry / FEBS* 271(5), 1035-1045.
- Heller, S.A., Shih, R., Kalra, R., and Kang, P.B. (2019). Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. doi: 10.1002/mus.26782.
- Holaska, J.M., Kowalski, A.K., and Wilson, K.L. (2004). Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS biology* 2(9), E231. doi: 10.1371/journal.pbio.0020231.

- Holaska, J.M., Lee, K.K., Kowalski, A.K., and Wilson, K.L. (2003). Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *The Journal of biological chemistry* 278(9), 6969-6975. doi: 10.1074/jbc.M208811200.
- Holaska, J.M., Rais-Bahrami, S., and Wilson, K.L. (2006). Lmo7 is an emerin-binding protein that regulates the transcription of emerin and many other muscle-relevant genes. *Human molecular genetics* 15(23), 3459-3472. doi: 10.1093/hmg/ddl423.
- Holaska, J.M., and Wilson, K.L. (2006). Multiple roles for emerin: implications for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 288(7), 676-680. doi: 10.1002/ar.a.20334.
- Ibraghimov-Beskrovnyaya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W., and Campbell, K.P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355(6362), 696-702. doi: 10.1038/355696a0.
- Jamieson, C., Lui, C., Brocardo, M.G., Martino-Echarri, E., and Henderson, B.R. (2015). Rac1 augments Wnt signaling by stimulating β -catenin-lymphoid enhancer factor-1 complex assembly independent of β -catenin nuclear import. *J Cell Sci* 128(21), 3933-3946. doi: 10.1242/jcs.167742.
- Kituyi, S.N., and Edkins, A.L. (2018). Hop/STIP1 depletion alters nuclear structure via depletion of nuclear structural protein emerin. *Biochem Biophys Res Commun* 507(1-4), 503-509. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.073.
- Koch, A.J., and Holaska, J.M. (2014). Emerin in health and disease. *Semin Cell Dev Biol* 29, 95-106. doi: 10.1016/j.semcdb.2013.12.008.
- Kozakov, D., Hall, D.R., Xia, B., Porter, K.A., Padhorny, D., Yueh, C., et al. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc* 12(2), 255-278. doi: 10.1038/nprot.2016.169.
- Lammerding, J., Hsiao, J., Schulze, P.C., Kozlov, S., Stewart, C.L., and Lee, R.T. (2005). Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. *J Cell Biol* 170(5), 781-791. doi: 10.1083/jcb.200502148.
- Lara-Chacon, B., de Leon, M.B., Leocadio, D., Gomez, P., Fuentes-Mera, L., Martinez-Vieyra, I., et al. (2010). Characterization of an Importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan. *Journal of cellular biochemistry* 110(3), 706-717. doi: 10.1002/jcb.22581.
- Manilal, S., Man, N.T., Sewry, C.A., and Morris, G.E. (1996). The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Human molecular genetics* 5(6), 801-808.
- Manilal, S., Nguyen, T.M., and Morris, G.E. (1998). Colocalization of emerin and lamins in interphase nuclei and changes during mitosis. *Biochemical and biophysical research communications* 249(3), 643-647.
- Mansharamani, M., and Wilson, K.L. (2005). Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *The Journal of biological chemistry* 280(14), 13863-13870. doi: 10.1074/jbc.M413020200.

- Margalit, A., Brachner, A., Gotzmann, J., Foisner, R., and Gruenbaum, Y. (2007). Barrier-to-autointegration factor--a BAFfling little protein. *Trends Cell Biol* 17(4), 202-208. doi: 10.1016/j.tcb.2007.02.004.
- Markiewicz, E., Tilgner, K., Barker, N., van de Wetering, M., Clevers, H., Dorobek, M., et al. (2006). The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *The EMBO journal* 25(14), 3275-3285. doi: 10.1038/sj.emboj.7601230.
- Markiewicz, E., Venables, R., Reyes, M.A., Quinlan, R., Dorobek, M., Hausmanowa-Petrucewicz, I., et al. (2002). Increased solubility of lamins and redistribution of lamin C in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy fibroblasts. *Journal of Structural Biology* 140(1-3), 241-253.
- Martinez-Vieyra, I.A., Vasquez-Limeta, A., Gonzalez-Ramirez, R., Morales-Lazaro, S.L., Mondragon, M., Mondragon, R., et al. (2013). A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1833(3), 698-711. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.11.019S0167-4889(12)00351-5 [pii].
- Meinke, P., Kerr, A.R.W., Czapiewski, R., de Las Heras, J.I., Dixon, C.R., Harris, E., et al. (2020). A multistage sequencing strategy pinpoints novel candidate alleles for Emery-Dreifuss muscular dystrophy and supports gene misregulation as its pathomechanism. *EBioMedicine* 51, 102587. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.11.048.
- Mendrola, J.M., Berger, M.B., King, M.C., and Lemmon, M.A. (2002). The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *J Biol Chem* 277(7), 4704-4712. doi: 10.1074/jbc.M108681200M108681200 [pii].
- Michele, D.E., and Campbell, K.P. (2003). Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *The Journal of biological chemistry* 278(18), 15457-15460. doi: 10.1074/jbc.R200031200.
- Nooren, I.M., and Thornton, J.M. (2003). Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J* 22(14), 3486-3492. doi: 10.1093/emboj/cdg359.
- Ostlund, C., Ellenberg, J., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., and Worman, H.J. (1999). Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein. *Journal of cell science* 112 (Pt 11), 1709-1719.
- Pereboev, A.V., Asiedu, C.K., Kawakami, Y., Dong, S.S., Blackwell, J.L., Kashentseva, E.A., et al. (2002). Coxsackievirus-adenovirus receptor genetically fused to anti-human CD40 scFv enhances adenoviral transduction of dendritic cells. *Gene Ther* 9(17), 1189-1193. doi: 10.1038/sj.gt.3301767.
- Pfaff, J., Rivera Monroy, J., Jamieson, C., Rajanala, K., Vilardi, F., Schwappach, B., et al. (2016). Emery-Dreifuss muscular dystrophy mutations impair TRC40-mediated targeting of emerin to the inner nuclear membrane. *J Cell Sci* 129(3), 502-516. doi: 10.1242/jcs.179333.
- Rao, V.S., Srinivas, K., Sujini, G.N., and Kumar, G.N. (2014). Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int J Proteomics* 2014, 147648. doi: 10.1155/2014/147648.

- RJ, F. (2013). Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5(4), 725-738. doi: 10.1038/nprot.2010.5.
- Russ, W.P., and Engelman, D.M. (1999). TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(3), 863-868. doi: 10.1073/pnas.96.3.863.
- Russo, K., Di Stasio, E., Macchia, G., Rosa, G., Brancaccio, A., and Petrucci, T.C. (2000). Characterization of the beta-dystroglycan-growth factor receptor 2 (Grb2) interaction. *Biochemical and biophysical research communications* 274(1), 93-98. doi: 10.1006/bbrc.2000.3103.
- Sakaki, M., Koike, H., Takahashi, N., Sasagawa, N., Tomioka, S., Arahata, K., et al. (2001). Interaction between emerin and nuclear lamins. *J Biochem* 129(2), 321-327. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002860.
- Sal-Man, N., Gerber, D., and Shai, Y. (2004). The composition rather than position of polar residues (QxxS) drives aspartate receptor transmembrane domain dimerization in vivo. *Biochemistry* 43(8), 2309-2313. doi: 10.1021/bi0356294.
- Sal-Man, N., Gerber, D., and Shai, Y. (2005). The identification of a minimal dimerization motif QXXS that enables homo- and hetero-association of transmembrane helices in vivo. *J Biol Chem* 280(29), 27449-27457. doi: M503095200 [pii]10.1074/jbc.M503095200.
- Sal-Man, N., Gerber, D., and Shai, Y. (2014). Proline localized to the interaction interface can mediate self-association of transmembrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1838(9), 2313-2318. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.05.006S0005-2736(14)00178-3 [pii].
- Salpingidou, G., Smertenko, A., Hausmanowa-Petruciewicz, I., Hussey, P.J., and Hutchison, C.J. (2007). A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. *The Journal of cell biology* 178(6), 897-904. doi: 10.1083/jcb.200702026.
- Sotgia, F., Lee, H., Bedford, M.T., Petrucci, T., Sudol, M., and Lisanti, M.P. (2001). Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry* 40(48), 14585-14592.
- Sotgia, F., Lee, J.K., Das, K., Bedford, M., Petrucci, T.C., Macioce, P., et al. (2000). Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta - dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *The Journal of biological chemistry* 275(48), 38048-38058. doi: 10.1074/jbc.M005321200.
- Spence, H.J., Chen, Y.J., Batchelor, C.L., Higginson, J.R., Suila, H., Carpen, O., et al. (2004). Ezrin-dependent regulation of the actin cytoskeleton by beta-dystroglycan. *Human molecular genetics* 13(15), 1657-1668. doi: 10.1093/hmg/ddh170.

- Stubenvoll, A., Rice, M., Wietelmann, A., Wheeler, M., and Braun, T. (2015). Attenuation of Wnt/ β -catenin activity reverses enhanced generation of cardiomyocytes and cardiac defects caused by the loss of emerin. *Hum Mol Genet* 24(3), 802-813. doi: 10.1093/hmg/ddu498.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., et al. (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *Journal of Cell Biology* 147(5), 913-919.
- Tatli, M., and Medalia, O. (2018). Insight into the functional organization of nuclear lamins in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 54, 72-79. doi: 10.1016/j.ceb.2018.05.001.
- Tifft, K.E., Bradbury, K.A., and Wilson, K.L. (2009). Tyrosine phosphorylation of nuclear-membrane protein emerin by Src, Abl and other kinases. *Journal of cell science* 122(Pt 20), 3780-3790. doi: 10.1242/jcs.048397.
- Vélez-Aguilera, G., de Dios Gómez-López, J., Jiménez-Gutiérrez, G.E., Vásquez-Limeta, A., Laredo-Cisneros, M.S., Gómez, P., et al. (2018). Control of nuclear β -dystroglycan content is crucial for the maintenance of nuclear envelope integrity and function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865(2), 406-420. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.11.013.
- Villarreal-Silva, M., Suarez-Sanchez, R., Rodriguez-Munoz, R., Mornet, D., and Cisneros, B. (2010). Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochemical research* 35(3), 366-373. doi: 10.1007/s11064-009-0064-z.
- Wagner, N., and Krohne, G. (2007). LEM-Domain proteins: new insights into lamin-interacting proteins. *International review of cytology* 261, 1-46. doi: 10.1016/S0074-7696(07)61001-8.
- Wheeler, M.A., Davies, J.D., Zhang, Q., Emerson, L.J., Hunt, J., Shanahan, C.M., et al. (2007). Distinct functional domains in nesprin-1alpha and nesprin-2beta bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Experimental cell research* 313(13), 2845-2857. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.03.025.
- Wilkinson, F.L., Holaska, J.M., Zhang, Z., Sharma, A., Manilal, S., Holt, I., et al. (2003). Emerin interacts in vitro with the splicing-associated factor, YT521-B. *European journal of biochemistry / FEBS* 270(11), 2459-2466.
- Zhang, Q., Ragnauth, C.D., Skepper, J.N., Worth, N.F., Warren, D.T., Roberts, R.G., et al. (2005). Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *Journal of cell science* 118(Pt 4), 673-687. doi: 10.1242/jcs.01642.