

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Asociación de la alfa-distrobrevina con proteínas marcadoras
de cuerpos de Cajal y nucléolo”**

TESIS

Que presenta

M. en C. José Anselmo Hernández Ibarra

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de la Tesis:

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Asesores:

Dr. Jaime García Mena

Dr. Dr. Efraín Garrido Guerrero

Dr. Oscar Hernández Hernández

Dr. Doris Atenea Cerecedo Mercado

Agradecimientos: CONACyT México. Número de concesión 54858

CONTENIDO

Índice

Introducción	1
El complejo de proteínas asociadas a distrofina	1
Las distrobrevinas	2
Estructura, interacciones y función de la alfa-distrobrevina	4
El núcleo	5
La envoltura nuclear	7
Los cuerpos de Cajal	8
El nucléolo	8
Antecedentes	9
La alfa-distrobrevina se localiza en el núcleo de las células HeLa	9
Justificación	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Metodología	13
Cultivo celular	13
Obtención de extractos totales	13
Transfección celular	13
Inmunofluorescencia indirecta	14
Obtención de extractos de proteínas nucleolares de células N1E115	15
Anticuerpos	16
Resultados	16
Las células N1E115 expresan exclusivamente la isoforma α -DB2	16
La alfa-distrobrevina se localiza en los nucléolos y cuerpos de Cajal de las células neuronales N1E115	17
La desorganización de los cuerpos de Cajal con UV provoca la redistribución conjunta de la α -DB2 y la coilina	21
La desorganización de los nucléolos inducida por la actinomicina D altera la localización subnuclear de la α -DB2	23
La disminución de la expresión de la α -DB2 altera la estructura de los nucléolos y la expresión de varias proteínas nucleolares	24
La proteína α -DB2 interactúa con B23 y esta asociación favorece la localización nucleolar de α -DB2	27
Discusión	29
Conclusión	32
Bibliografía	32

Resumen en español

La proteína alfa-distrobrevina perteneciente al complejo proteínas asociadas a distrofina y que además está involucrada en señalización. Sin embargo, su reciente localización nuclear implica que debe tener una función en este compartimiento. Además de esto, se ha demostrado en nuestro grupo de trabajo que la alfa-distrobrevina se asocia con las láminas nucleares y que esta interacción es importante para el mantenimiento de la morfología nuclear. En este trabajo demostramos la distribución de la alfa-distrobrevina isoforma 2 en diferentes compartimentos subnucleares de la línea celular N1E115, incluyendo al nucléolo y los cuerpos de Cajal, en donde se observó colocalización con proteínas como B23/nucleofosmina y Nopp140 y coilina respectivamente. Se logró detectar la presencia de la alfa-distrobrevina en extractos nucleolares de células N1E115 confirmando de manera contundente la presencia de esta proteína en el nucléolo. La proteína alfa-distrobrevina 2 presenta una redistribución similar a la de las proteínas fibrilarina y Nopp140 posterior a la inducción de la desorganización de los nucléolos mediante el tratamiento con actinomicina D y la desorganización de los cuerpos de Cajal mediante la irradiación con luz UV, observando una relocalización de las proteínas posterior al cese de los tratamientos; con lo que se infiere una probable función de alfa-distrobrevina en la plasticidad de estos cuerpos nucleares. Mediante la utilización de ARN de interferencia se logró disminuir la expresión de alfa-distrobrevina con lo que se observó una alteración en la expresión y la localización de las proteínas fibrilarina, B23/nucleofosmina y Nopp140, con esto se demuestra una relevancia fisiológica de la proteína alfa-distrobrevina 2. Ya que mediante inmunoprecipitación se observó la interacción de alfa-distrobrevina con la proteína de nucléolo B23/nucleofosmina, la sobreexpresión de B23 aumenta la localización de alfa-distrobrevina en el nucléolo celular. En conclusión, se demostró por primera vez la presencia alfa-distrobrevina 2 en el nucléolo y los cuerpos de Cajal y se aportó evidencia de que esta proteína está involucrada en la estructura del nucléolo y podría modular la funciones en esta estructura subnuclear.

Resumen en inglés

α -Dystrobrevin (α -DB) is a cytoplasmic component of the dystrophin-associated complex involved in cell signaling; however, its recently revealed nuclear localization implies a role for this protein in the nucleus. Consistent with this, we demonstrated, in a previous work that α -DB1 isoform associates with the nuclear lamin to maintain nuclei morphology. In this study, we show the distribution of the α -DB2 isoform in different subnuclear compartments of N1E115 neuronal cells, including nucleoli and Cajal bodies, where it colocalizes with B23/nucleophosmin and Nopp140 and with coilin, respectively. Recovery in a pure nucleoli fraction undoubtedly confirms the presence of α -DB2 in the nucleolus. α -DB2 redistributes in a similar fashion to that of fibrillarin and Nopp140 upon actinomycin-mediated disruption of nucleoli and to that of coilin after disorganization of Cajal bodies through ultraviolet-irradiation, with relocalization of the proteins to the corresponding reassembled structures after cessation of the insults, which implies α -DB2 in the plasticity of these nuclear bodies. That localization of α -DB2 in the nucleolus is physiologically relevant is demonstrated by the fact that downregulation of α -DB2 resulted in both altered nucleoli structure and decreased levels of B23/nucleophosmin, fibrillarin, and Nopp140. Since α -DB2 interacts with B23/nucleophosmin and overexpression of the latter protein favors nucleolar accumulation of α -DB2, it appears that targeting of α -DB2 to the nucleolus is dependent on B23/nucleophosmin. In conclusion, we show for the first time localization of α -DB2 in nucleoli and Cajal bodies and provide evidence that α -DB2 is involved in the structure of nucleoli and might modulate nucleolar functions.

Introducción

1. El complejo de proteínas asociadas a la distrofina

El complejo de proteínas asociadas a la distrofina (CPAD) (Fig. 1) es un conjunto de proteínas que se identificaron asociadas al sarcolema de conejo (Campbell and Kahl 1989; Ervasti, Ohlendieck et al. 1990; Ervasti and Campbell 1991; Ohlendieck, Ervasti et al. 1991). El CPAD se encuentra constituido por proteínas extracelulares (el α -dístroglicano), integrales de membrana (el β -dístroglicano y los sarcoglicanos) y citoplasmáticas (las sintrofina y las distrobrevinas) (Yoshida and Ozawa 1990; Tadayoni, Rendon et al. 2011). La distrofina interactúa con la actina y el β dístroglicano, éste último interacciona a su vez con el α -dístroglicano, el cual se une a la laminina (Ervasti and Campbell 1993). Este complejo multi-proteico brinda estabilidad al sarcolema durante los ciclos de contracción y relajación muscular, y modula la señalización celular (Blake, Weir et al. 2002).

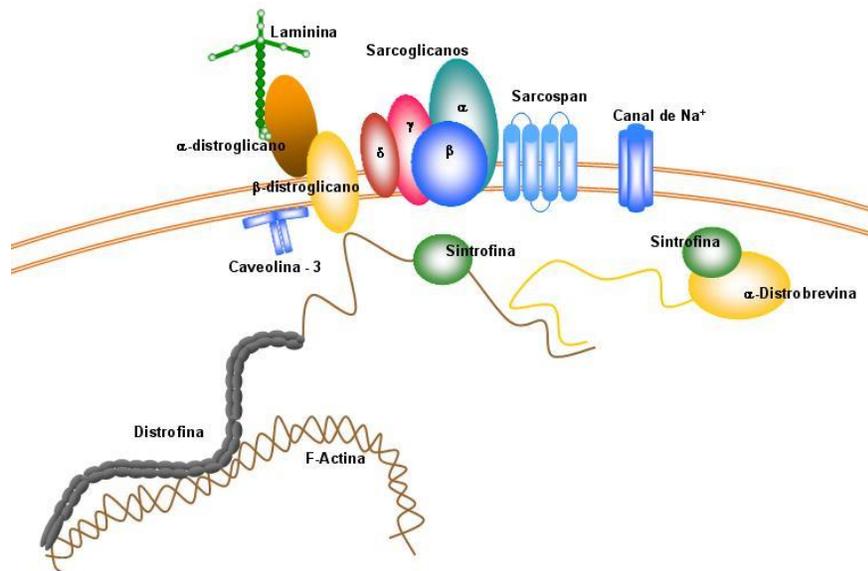


Figura 1. El complejo de proteínas asociadas a distrofina. Se muestra la distrofina (color gris) interactuando con la actina y con la proteína transmembranal β -dístroglicano. El α -dístroglicano es una proteína extracelular que se une con el β -dístroglicano y con la laminina, una proteína de matriz extracelular (Ervasti and Campbell 1993). Este complejo mantiene la estabilidad de la membrana plasmática (Blake and Martin-Rendon 2002). Se muestra además la interacción de la distrofina con la distrobrevina (Ehmsen, Poon et al. 2002).

2. Las distrobrevina

En 1989 se caracterizó por vez primera una proteína de 87 kDa asociada con los receptores de acetilcolina aislados de la electroplaca del pez torpedo (Carr, Fischbach et al. 1989). Cuatro años más tarde, se reveló la homología alta de esta proteína con el dominio C-terminal de la distrofina, así como su capacidad para ser fosforilada en residuos de treonina, serina y tirosina (Wagner, Cohen et al. 1993). No es hasta 1996 que es bautizada con el nombre de “distrobrevina” haciendo alusión a su elevada homología con la distrofina y al hecho de que es mucho más pequeña que esta (Blake, Nawrotzki et al. 1996). Ese mismo año, mediante un análisis bioinformático se localiza en el cromosoma 18 el gen que codifica para la distrobrevina humana. Posteriormente, el escrutinio de una biblioteca de cDNA reveló la existencia de diferentes transcritos que codifican para cada una de las isoformas de la distrobrevina, además de su expresión diferencial en el organismo humano (Sadoulet-Puccio, Khurana et al. 1996). Poco tiempo después Peters y colaboradores hallaron un gen ubicado en el cromosoma 2 que codifica para una proteína altamente homóloga a la distrobrevina (ahora llamada α -distrobrevina), y la nombran β -distrobrevina (Peters, O'Brien et al. 1997). La elevada homología de las distrobrevinas con el dominio C-terminal de la distrofina sugiere que el gen de la distrobrevina pudiera tener alguna relación evolutiva con el de la distrofina. Esta idea se apoya en el comparativo de la secuencia de ambas proteínas y sus características funcionales en diferentes especies (Roberts 2001). Así surgió la teoría de que el gen de la distrobrevina se originó hace millones de años a consecuencia de una duplicación del gen de la distrofina, generando proteínas con un nivel de especialización mayor (Jin, Tan et al. 2007) (Fig. 2).

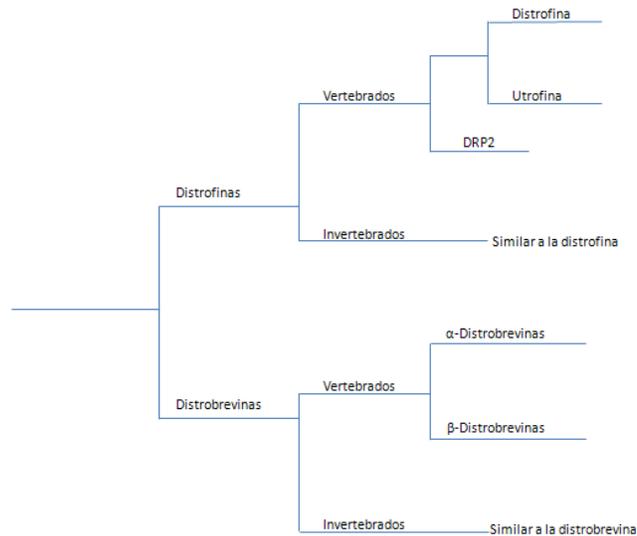


Figura 2. Árbol filogenético de la superfamilia de las distrofinas. El análisis comparativo de las secuencias de la distrobrevina y la distrofina sugiere que hace millones de años el gen de la distrobrevina surgió a partir de una duplicación del gen de la distrofina. La utrofina y la proteína DRP2 (proteína relacionada a la distrofina) también se originaron de la misma forma. Finalmente un gen ancestral de la distrobrevina se duplicó y dio origen a la α y β distrobrevinas (Roberts 2001).

Ahora se sabe que existen dos genes, DTNA y DTNB, que codifican para dos diferentes distrobrevinas en vertebrados, α y β distrobrevinas respectivamente (Blake, Nawrotzki et al. 1996; Peters, O'Brien et al. 1997; Roberts 2001). A la proteína β -distrobrevina se le son conocidas diferentes isoformas generadas por uso de diferentes promotores y *splicing* alternativo; se expresa principalmente en cerebro, riñón, pulmón, hígado y el resto de tejidos no musculares (Peters, O'Brien et al. 1997; Blake, Nawrotzki et al. 1998). El gen que codifica para la α -distrobrevina está compuesto por 23 exones (Sadoulet-Puccio, Feener et al. 1997). Las diversas isoformas de α -distrobrevina también son generadas por *splicing* y uso de promotores alternativo. Esta proteína se expresa diferencialmente entre tejidos, siendo mayoritaria su presencia en el músculo estriado y cerebro (Blake, Nawrotzki et al. 1996; Sadoulet-Puccio, Khurana et al. 1996; Holzfeind, Ambrose et al. 1999). El uso alternativo de los exones 21, 17B y 11B genera tres isoformas

que se expresan principalmente en músculo estriado humano: α -distrobrevina-1, α -distrobrevina-2 y α -distrobrevina-3 (Sadoulet-Puccio, Feener et al. 1997). El *splicing* alternativo permite la inclusión o exclusión de las regiones hipervariables 1, 2 y 3 (vr1, vr2, y vr3 respectivamente), y genera 3 isoformas más que se expresan mayoritariamente en cerebro, corazón y durante el desarrollo del músculo estriado (Blake, Nawrotzki et al. 1996; Sadoulet-Puccio, Feener et al. 1997; Enigk and Maimone 1999) (Fig. 3).

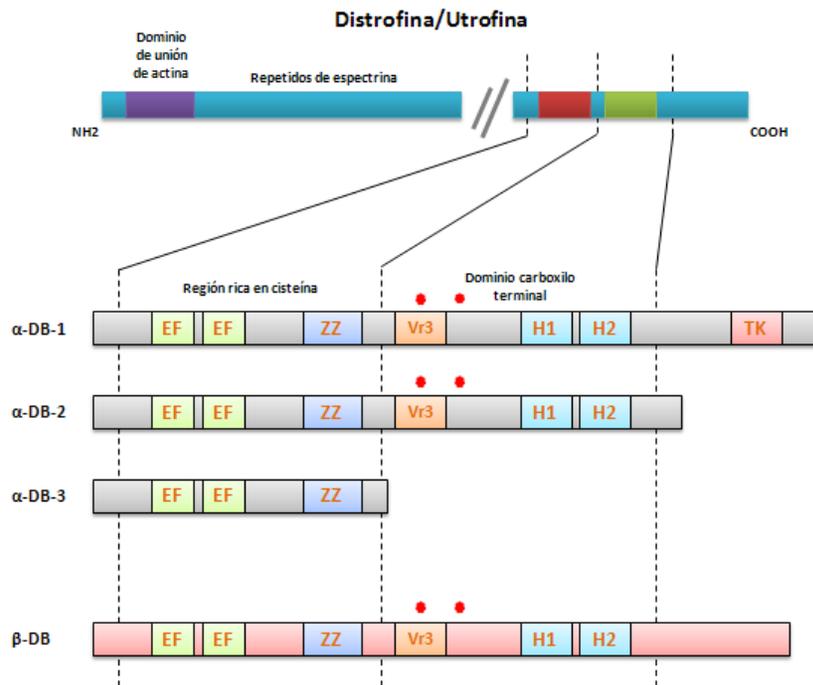


Figura 3. Las isoformas de α -distrobrevina. Se muestran las tres isoformas de α -distrobrevinas que se expresan en músculo esquelético. Los diferentes dominios de estas proteínas son de izquierda a derecha, dos manos EF (verde), un dominio de dedos de zinc o ZZ (azul), la región hipervariable 3 que regula su interacción con sintrofina (naranja), un dominio de hélice vuelta hélice para interacción con otras proteínas (azul claro) y un dominio susceptible de ser fosforilado en serina, treonina y tirosina (rojo). En la parte superior se muestra un esquema de la distrofina con cada uno de sus dominios; el dominio de unión a actina (morado), los repetidos de espectrina (azul), la región rica en cisteína (rojo) y su dominio carboxilo terminal (verde), los dos últimos dominios presentan una elevada homología con la secuencia de distrobrevina. Los puntos rojos indican las regiones de distrobrevina que son capaces de interactuar con la sintrofina. En la parte inferior se muestra en color rosa el esquema de la β -distrobrevina con cada uno de sus dominios (Rees, Lien et al. 2007).

2.1 Estructura, interacciones y función de α -distrobrevina

Se conocen cuatro dominios a la α -distrobrevina. Un dominio formado por un par de manos EF cuya función es unir moléculas de calcio; un dominio de dedos de zinc; un dominio formado por una estructura de hélice-vuelta-hélice cuya función es dimerizar con otra molécula de distrobrevina o interactuar con distrofina y en el caso de la isoforma α -distrobrevina-1, un dominio susceptible de ser fosforilado en residuos de serina, treonina y tirosina. La ausencia o presencia de la región hipervariable 3 (vr3) está regulada por *splicing* alternativo y funciona como dominio de unión a sintrofina (Sadoulet-Puccio, Rajala et al. 1997; Newey, Benson et al. 2000; Rees, Lien et al. 2007) (Fig. 3).

Se ha descrito la interacción de la α -distrobrevina con diferentes proteínas; incluyendo la disbindina, proteína involucrada en la esquizofrenia (Benson, Newey et al. 2001; Shao, Shuai et al. 2011); la desmuslina y la sincoilina, proteínas de filamentos intermedios (Mizuno, Thompson et al. 2001; Newey, Howman et al. 2001; Titeux, Brocheriou et al. 2001; Blake and Martin-Rendon 2002); DAMAGE, proteína que participa en señalización y está relacionada con retraso mental (Albrecht and Froehner 2004); las subunidades regulatorias RI α y RII β de la proteína cinasa A dependiente de AMPc (PKA) y la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Ceccarini, Grasso et al. 2007); además, la α -catulina, proteína que regula la vía de señalización desencadenada por receptores acoplados a proteínas G (Lyssand, Whiting et al. 2010); la sintrofina, encargada de mantener un vínculo entre el sistema de señalización intracelular y el CPAD (Butler, Douville et al. 1992; Kramarcy, Vidal et al. 1994; Newey, Benson et al. 2000; Albrecht and Froehner 2002). Por medio del conocimiento de estas interacciones se ha empezado a elucidar la función de la α -distrobrevina.

3. El núcleo

El núcleo es una estructura intracelular en la cual se almacena, se modifica y se organiza el material genético de la célula (Austin and Bellini 2009). Está constituido por una doble membrana lipídica, la membrana nuclear externa (MNE) que se interconecta con la membrana nuclear interna (MNI) mediante el complejo del poro nuclear (CPN) (Worman

and Courvalin 2005). El CPN es una estructura cilíndrica que interconecta al citoplasma con el interior del núcleo y a través de la cual se lleva a cabo el tránsito de moléculas necesarias para el funcionamiento de la célula (Strambio-De-Castilla, Niepel et al. 2010).

Anteriormente se creía que el material genético se almacenaba dentro del núcleo de una manera aleatoria, sin embargo estudios recientes han demostrado que los cromosomas mantienen una organización específica que repercute directamente sobre la expresión de genes (Jenuwein and Allis 2001; Takizawa, Meaburn et al. 2008). La localización de los cromosomas en el núcleo no solo no es aleatoria, sino que mantiene un patrón característico, es decir, cada cromosoma ocupaba una región específica o territorio de acuerdo a la etapa del ciclo celular (Rabl 1885; Boveri 1909). Así se han ido identificando diferentes regiones nucleares que presentan características peculiares de acuerdo a las proteínas que los componen y las funciones que desempeñaban (Spector 2003; Kumaran, Thakar et al. 2008)(Fig. 4).

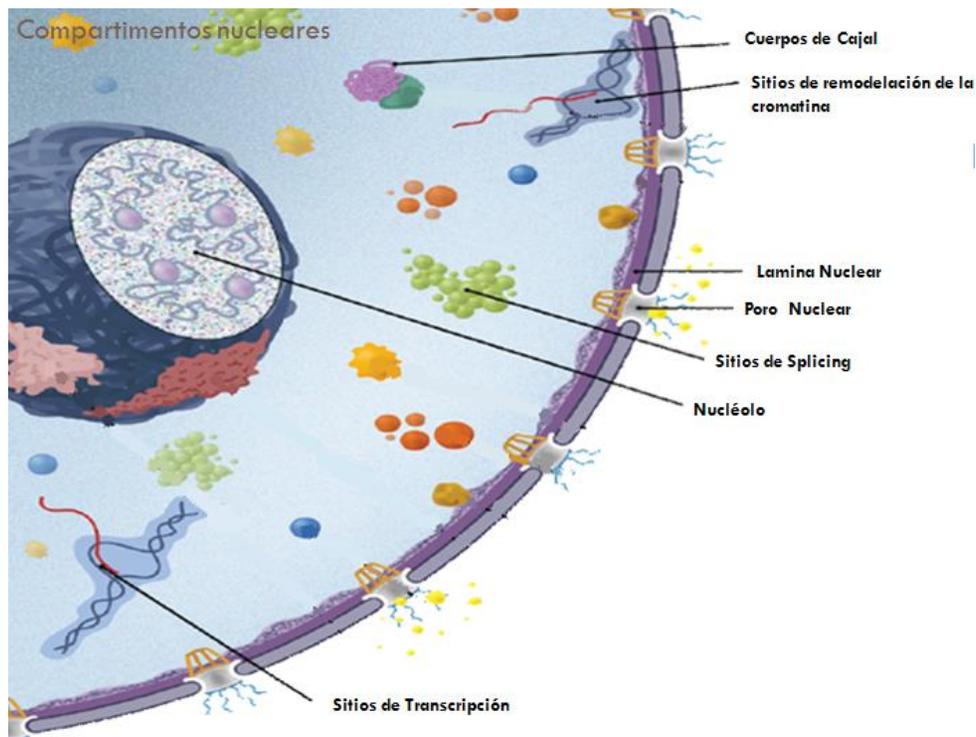


Figura 4. Las diferentes regiones nucleares. Se pueden observar cada uno de los dominios nucleares. Los cuerpos de Cajal; los sitios de remodelación de la cromatina; la envoltura nuclear con las láminas nucleares; el complejo del poro nuclear (CPN); los sitios en donde se lleva a cabo el *splicing*, el nucléolo y los sitios activos de transcripción (Kumaran, Thakar et al. 2008).

3.1 La envoltura nuclear

La envoltura nuclear es la barrera física que divide el citoplasma del interior del núcleo. Está formada por las membranas nucleares, el complejo del poro nuclear (CPN) y la lámina nuclear (Worman and Courvalin 2005). El CPN es la estructura que atraviesa la envoltura nuclear desde el citoplasma hasta el interior del núcleo y se encarga de mantener y regular el tránsito de partículas entre estos dos compartimentos (Stewart 2007; Terry, Shows et al. 2007).

La envoltura nuclear está dividida en tres dominios morfológicamente distintos pero interconectados entre sí, la membrana nuclear externa (MNE), la membrana nuclear interna (MNI) y el complejo de poro nuclear (CPN) (Worman and Courvalin 2005). La membrana nuclear externa tiene contacto con el retículo endoplasmático y de hecho, es una continuación de este; está constituida por ribosomas y proteínas involucradas en el posicionamiento del núcleo dentro de la célula (Starr and Han 2003). La MNI se encuentra en contacto con las láminas y el interior del núcleo, a través de una serie de proteínas transmembranales, la mayoría de ellas ya bien descritas (Schirmer, Florens et al. 2003). Algunas de las funciones que desempeñan son las de mantener la organización de los cromosomas en territorios, mediante su interacción con la cromatina, modular la expresión de genes y mantener la morfología del núcleo mediante la interacción con proteínas estructurales como lo son las láminas (Worman and Courvalin 2005; Schneider and Grosschedl 2007). Finalmente, el CPN interactúa directamente con la lámina nuclear.

La lámina nuclear fue descrita en 1966 como una estructura fibrosa localizada por debajo de la MNI (Fawcett 1966). Poco después se describió que ésta estructura se encuentra formada por tres proteínas que fueron bautizadas con el nombre de lamina A, lamina B y lamina C, de las cuales se descubrieron posteriormente varias isoformas (Aaronson and Blobel 1975; Dwyer and Blobel 1976; Gerace, Blum et al. 1978). Se les han atribuido diversas funciones a las laminas, incluyendo el mantenimiento de la estructura del núcleo, el anclaje de la cromatina a la envoltura nuclear mediante proteínas residentes de la MNI; la modulación de la transcripción dependiente de la ARN polimerasa II, el control sobre la replicación de ADN; el *splicing*, y la expresión génica (Worman and Courvalin 2005)

3.2 Los cuerpos de Cajal

En 1903 Santiago Ramón y Cajal descubrió mediante una técnica de tinción a base de plata lo que llamó el “cuerpo accesorio” del nucléolo, que más tarde se le dio el nombre de “Cuerpos de Cajal” (CC) en su honor (Cajal 1903; Gall, Bellini et al. 1999) (Fig. 4). Diferentes estudios han demostrado la participación de los Cuerpos de Cajal en procesos nucleares como la biogénesis de las ribonucleoproteínas (RNPs), procesamiento de los ARN mensajero de histonas y el ensamblaje de los telómeros (Gall 2003; Cioce and Lamond 2005; Morris 2008; Matera, Izaguire-Sierra et al. 2009; Nizami, Deryusheva et al. 2010). Existen varios marcadores para el estudio de los Cuerpos de Cajal, sin embargo el marcador más utilizado es la proteína de 80 kDa llamada coilina, cuya función es principalmente estructural, ya que mantiene la integridad y morfología del Cuerpo Accesorio (Andrade, Chan et al. 1991; Raska, Andrade et al. 1991; Cioce, Boulon et al. 2006). Los Cuerpos de Cajal mantienen una comunicación constante con el nucléolo, lo que determina una relación funcional entre estas dos estructuras (Boudonck, Dolan et al. 1999; Platani, Goldberg et al. 2000; Platani, Goldberg et al. 2002).

3.3 El Nucléolo

El nucléolo fue descubierto en 1898 por Felice Fontana, quién lo visualizó como una estructura ovoide del núcleo (Fig. 4). Ha sido relacionado con diversas funciones entre las cuales las más importantes es el procesamiento del ARN ribosomal (rRNA) y el ensamblaje de ribosomas (Montgomery 1898; Boisvert, van Koningsbruggen et al. 2007; Sirri, Urcuqui-Inchima et al. 2008). La biogénesis de los ribosomas se lleva a cabo en los diferentes compartimentos nucleolares; los centros fibrilares (CF), los componentes fibrilares densos (CFD) y los componentes granulares (CG). La transcripción de DNA ribosomal se lleva a cabo principalmente entre los centros fibrilares y los componentes fibrilares densos. El procesamiento del RNA ribosomal se lleva a cabo en los componentes fibrilares densos. Finalmente, el ensamblaje total de los ribosomas se lleva a cabo en los componentes granulares (Fig. 5) (Tschochner and Hurt 2003; Boisvert, van Koningsbruggen et al. 2007; Sirri, Urcuqui-Inchima et al. 2008).

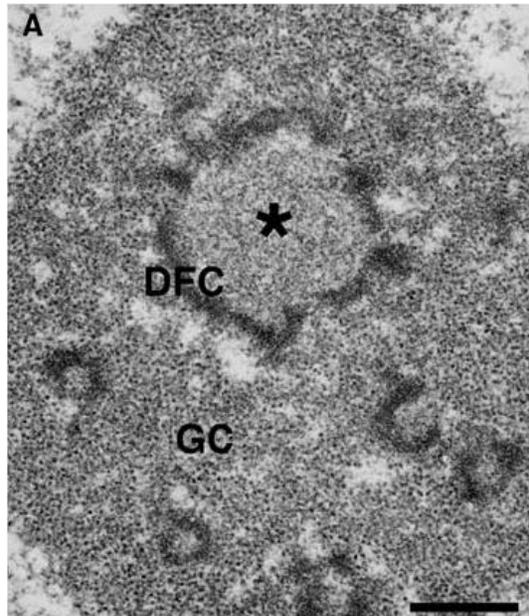


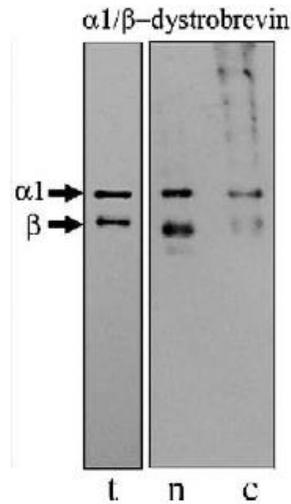
Figura 5. Los compartimentos del nucléolo. La foto de microscopía electrónica muestra los diferentes compartimentos del nucléolo. El componente granular (GC), el componente fibrilar denso (DFC) que se muestra rodeando por los centros fibrilares. El asterisco indica el centro fibrilar (Sirri, Urcuqui-Inchima et al. 2008).

Antecedentes

1. La α -distrobrevina se localiza en el núcleo de las células HeLa

Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo determinaron la presencia de la α -distrobrevina en el núcleo de las células HeLa. (Fig. 6) (Fuentes-Mera, Rodriguez-Munoz et al. 2006).

A



B

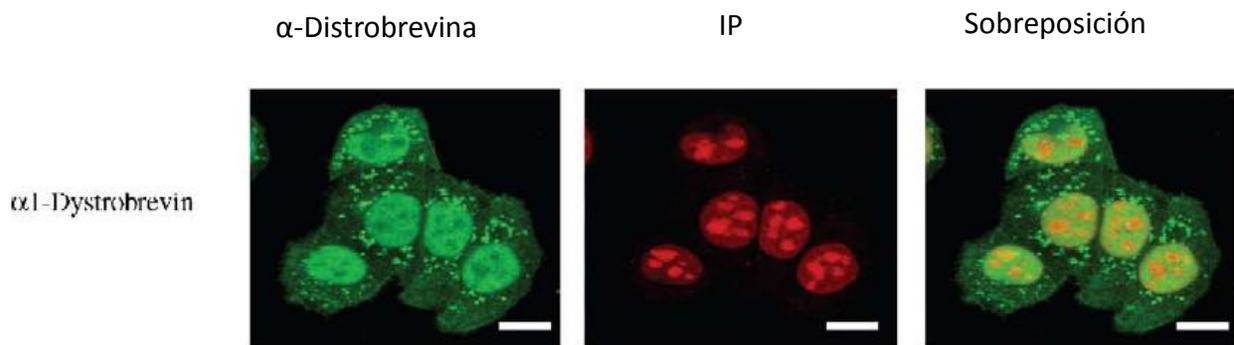


Figura 6. La α -dystrobrevina se localiza en el núcleo de células HeLa. (A) Se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos específicos contra α y β -dystrobrevinas y extractos totales *t*; nucleares *n* y citoplasmáticos de células HeLa. (B) Ensayos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti- α -dystrobrevina que muestra la presencia de α -dystrobrevina en el núcleo de células HeLa. Tinción de la α -dystrobrevina (verde); núcleos teñidos con Ioduro de propidio (rojo). (Fuentes-Mera, Rodriguez-Munoz et al. 2006)

Así mismo, la α -dystrobrevina se localizó también en el núcleo de células musculares C2C12 no diferenciadas y diferenciadas, donde se asocia con el complejo de proteínas asociadas a distrofina (Fig. 7) (Gonzalez-Ramirez, Morales-Lazaro et al. 2008)

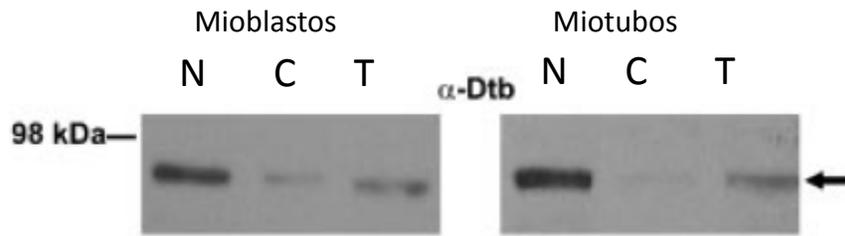
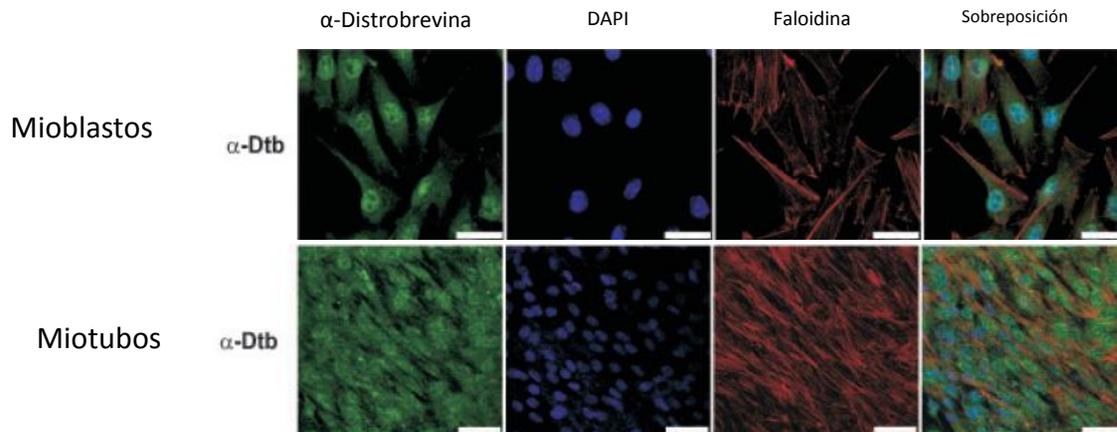
A**B**

Figura 7. La α -distrobrevina se localiza en el núcleo de células C2C12. (A) Ensayos de inmunodetección en fase sólida revelados con anticuerpos específicos contra la α -distrobrevina; extractos nucleares *N*; extractos citoplasmáticos *C* y extractos totales *T* de células C2C12. (B) Ensayos de inmunofluorescencia sobre mioblastos y miotubos. La localización de la α -distrobrevina se muestra en verde, los núcleos teñidos con DAPI en azul, y la actina teñida con faloidina en rojo. (Gonzalez-Ramirez, Morales-Lazaro et al. 2008)

Justificación

La presencia de la α -distrobrevina en el núcleo de diferentes líneas celulares sugiere que esta proteína participa en procesos nucleares. Por lo tanto, definir en qué compartimento nuclear se localiza la α -distrobrevina y con qué proteínas nucleares interacciona nos permitirá identificar su función nuclear.

Objetivo general

Determinar la localización subnuclear de la α -distrobrevina e identificar su función en el núcleo.

Objetivos específicos

- Identificar las isoformas de la α -distrobrevina que se expresan en las neuronas N1E115
- Determinar la localización subnuclear de la α -distrobrevina en las neuronas N1E115.
- N1E115.
- Analizar la colocalización de la α -distrobrevina con proteínas distintivas de los cuerpos de Cajal y el nucléolo.
- Confirmar la presencia de la α -distrobrevina en el nucléolo de células N1E115 mediante análisis bioquímico
- Analizar la co-localización de la α -distrobrevina con diferentes proteínas nucleolares en células tratadas con actinomicina D.
- Analizar la co-localización de la α -distrobrevina con la proteína de cuerpos de Caja coilina en células N1E115 irradiadas con luz UV.
- Analizar el impacto de la deficiencia de la α -distrobrevina sobre la estructura del nucléolo.

Metodología

1 Cultivo celular

En este trabajo se utilizó como modelo de estudio las células N1E115. Las células N1E115 son derivadas de un neuroblastoma de ratón que tienen la capacidad de diferenciarse a neuronas mediante tratamiento con DMSO o dibutil AMP cíclico. Las células N1E115 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 25U/ml de penicilina, 25µg/ml de estreptomina y 1mM de piruvato de sodio a 37°C, con 5% de CO₂. Las células se trataron con Actinomicina (0.01µg/ml) durante 3hrs ó se expusieron a radiación con luz UV (30J/m²) durante 3 segundos.

2 Obtención de extractos totales

Se cultivaron las células en monocapa en cajas p70 (CorningTM) hasta que alcanzaron el 80% de confluencia. Una vez transcurrido el tiempo se lisaron utilizando la solución amortiguadora de lisis (Tris HCl pH 8.0 1M, NaCl 1M, Complete 7X, Triton-X-100 1%, PMSF 100mM) y las proteínas se cuantificarán mediante el método de Bradford. Posteriormente, se cargaron 30 µg de proteína en geles de poliacrilamida al 10%: al terminar la corrida los geles se tiñeron con azul de Coomassie o bien se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa para realizar la inmunodetección en fase sólida de las proteínas de interés

3 Transfección celular

Las células se transfectaron con lipofectamina 2000 utilizando las construcciones que expresa la secuencia del ARN pequeño interferente dirigido contra α -distrobrevina y una secuencia control. Se preparó una mezcla para transfección utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen). Se incubaron 5 µl de lipofectamina 2000 por cada 50 µl de medio DMEM sin suplementar a temperatura ambiente durante 5 min. Por otro lado se incubaron

5 µg de DNA plasmídico, correspondientes a cada una de las construcciones analizadas, por cada 100 µl de medio DMEM no suplementado. Una vez transcurridos los 5 min se transfirieron 55 µl de la mezcla lipofectamina 2000 y medio DMEM no suplementado a la mezcla de DNA y se dejó incubando la reacción durante 30 min a temperatura ambiente. Se retiró el medio DMEM suplementado de las células N1E115, se realizaron dos lavados con 2 ml de PBS posteriormente se adicionó medio DMEM suplementado fresco a cada una de las cajas p70. Una vez transcurridos los 30 min de incubación, la mezcla de lipofectamina 2000 y DNA se transfirió a cada una de las cajas p70 y se incubaron las células durante 48 hrs a 37°C y 5% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo, las células se lisaron utilizando la solución amortiguadora de lisis (Tris HCl pH 8.0 1M, NaCl 1M, Complete 7X, Triton-X-100 1%, PMSF 100mM) y las proteínas se cuantificarán mediante el método de Bradford. Posteriormente, se cargaron 30 µg de proteína en geles de poliacrilamida al 10%: al terminar la corrida los geles se tiñeron con azul de Coomassie o bien se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa para realizar la inmunodetección en fase sólida de las proteínas de interés.

4 Inmunofluorescencia indirecta

Las células se cultivaron sobre cajas de 6 pozos p35 marca CorningTM hasta que alcanzaron una confluencia del 80%. Se retiró el medio de las cajas y se lavaron con 1 ml de PBS, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.5 por 10 min a temperatura ambiente, se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0.2% en PBS durante 15 min y se bloquearon en una solución de PBS con gelatina al 0.5%, y 1% de suero fetal de bovino durante 15 minutos. Se realizó otro lavado con PBS y las células se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Enseguida se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario respectivo. Se lavaron nuevamente con PBS antes de incubarse con DAPI (dilución 1:500) durante 6 minutos para teñir los núcleos. Se realizó un último lavado con PBS y agua Milli Q antes de montar las preparaciones sobre portaobjetos con VectaShield (Vector laboratories Inc.) y observarse sobre el microscopio confocal.

5 Obtención de extractos de proteínas nucleolares de células N1E115

Se sembraron las células sobre cajas p100 (CorningTM) hasta que alcanzaron el 80% de confluencia. Se retiró el medio y se lavaron las células con PBS. Se cosecharon con 1ml de PBS utilizando un gendarme y se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular en 1 ml de la solución amortiguadora TM (Tris-HCl pH 8.0 10mM, MgCl₂ 2mM, PMSF 0.5mM, Complete 1X); se mantuvo la suspensión celular por 10 min en hielo, se añadió 1 ml de Triton X-100 al 2% en PBS y se dejó incubando por 10 min. Enseguida se centrifugó la preparación a 5000 rpm durante 15 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante (fracción citoplasmática). Se resuspendió la pastilla nuclear en 1 ml de la solución amortiguadora de Sacarosa I (sacarosa 0.32M, CaCl₂ 3mM, Mg (COO)₂ 2mM, EDTA 0.1mM, Tris-HCl pH 8.0 10mM, DTT 1mM, PMSF 0.5mM NP40 0.5%) y 1ml de la solución amortiguadora de Sacarosa II (Sacarosa 2M, Mg (COO)₂ 5mM, EDTA 0.1mM, Tris-HCl pH 8.0 10mM, DTT 1mM, PMSF 0.5mM). Se preparó un gradiente y se centrifugaron las muestras a 16000 rpm durante 50 min a 4°C. Se retiró sobrenadante y se resuspendió la pastilla obtenida en 600 µl de la solución amortiguadora de Sacarosa III (Sacarosa 0.34M, MgCl₂ mM, EDTA 0.1mM, Tris HCL pH 8.0 10mM). Se separaron 250 µl para la obtención posterior de la fracción nuclear, utilizando la solución amortiguadora de lisis (Tris HCl pH 8.0 1M, NaCl 1M, Complete 7X, Triton-X-100 1%, PMSF 100mM). El volumen restante (350ul) se sometió a sonicación utilizando el dispositivo Soniprep 150 Sanyo. Se realizaron 5 ciclos de sonicación con una intensidad de 5 micrones durante 30 segundos con descanso de 30 segundos. Se preparó la suspensión nuclear en un gradiente utilizando cuatro volúmenes de la solución amortiguadora de Sacarosa IV (Sacarosa 0.88M, EDTA 0.1 mM, Tris HCL pH 8.0 10 mM) por cada volumen de suspensión nuclear. Se centrifugó el gradiente a 3000 g por 20 min y se lavó pastilla con 250 µl de la solución amortiguadora de sacarosa III y se centrifugó a 2000 g por 2 min. Se recuperó el sobrenadante que corresponde a la fracción nucleolar.

6 Anticuerpos

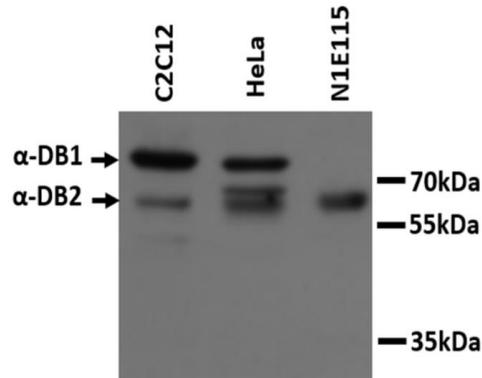
Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal anti- α -distrobrevina (C-6, sc-271874; Santa cruz Biotechnology); anticuerpo monoclonal anti- α -distrobrevina (610766 clona 23; BD Transduction Laboratories); anticuerpo policlonal anti- α -distrobrevina (ABN61, Millipore); anticuerpo policlonal anti B23 (C-19-R, sc-6013-R; Santa cruz Biotechnology); anticuerpo policlonal anti-coilina (H-300, sc-32860; Santa Cruz Biotechnology); anticuerpo policlonal anti-Nopp140 (N-20, sc-10688; Santa Cruz Biotechnology); anticuerpo policlonal anti-fibrilarina (ab5821, Santa Cruz Biotechnology); y anticuerpo policlonal anti-nucleoporina (p62 H-122, sc-25523; Santa Cruz Biotechnology).

Resultados

Las células N1E115 expresan exclusivamente la isoforma α -DB2

Con la finalidad de ahondar sobre las funciones nucleares de la α -DB decidimos utilizar la línea neuronal N1E115 (neuroblastoma de ratón), debido a la interacción que establece esta proteína con la disbindina, proteína implicada en la formación de neuritas y biogénesis de vesículas sinápticas (Ghiani C and Dell'Angelica). Debido a la existencia de diferentes isoformas de la α -DB generadas por *splicing* alternativo o uso alternativo de promotores (Ceccarini, Macioce et al. 2002), fue necesario determinar que isoformas se expresan en las células N1E115. Para esto, se obtuvieron extractos totales de células N1E115 y mediante el uso un anticuerpos específico para la α -DB se detectó una banda que migra entre los marcadores de 55 y 70 kDa, que corresponde con el peso estimado para la isoforma α -DB 2 (Fig. 8A). Se corrió a la par un gel con extractos totales de células C2C12 y HeLa como control, en donde se observa diferentes patrones de bandeo que corresponden con la expresión de las isoformas α -DB 1 (~87 kDa) y α -DB 2 (~59 kDa) (Fig. 8A). Por otra parte, mediante la utilización de oligonucleótidos específicos para el mensajero de la α -DB2, se realizó un ensayo de PCR cuantitativo en tiempo y se obtuvo un amplicón que corrobora la expresión exclusiva de la isoforma α -DB 2 en las células N1E115 (Fig. 8B),

A



B

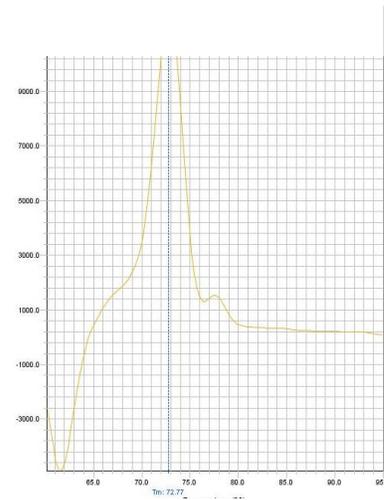


Figura 8. Las células N1E115 expresan la isoforma α -DB2. (A) Se muestra un ensayo de inmunodetección en fase sólida donde se observa la expresión de diferentes isoformas de la α -DB en las células C2C12, HeLa y N1E115; se utilizó un anticuerpo específico para la α -DB. Las células N1E115 expresan exclusivamente la isoforma α -DB2. (B) Curva de la amplificación por PCT tiempo real del RNA mensajero que corresponde con la secuencia de la α -DB2.

La α -DB se localiza en los nucléolos y cuerpos de Cajal de las células neuronales N1E115

El núcleo es un organelo complejo organizado en diferentes dominios no membranosos que realizan funciones específicas. Por lo tanto, con la finalidad de inferir la función nuclear de la α -DB 2, decidimos analizar su localización subnuclear en las células N1E115 mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

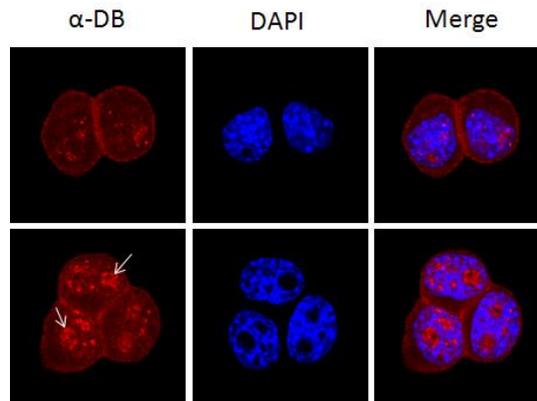


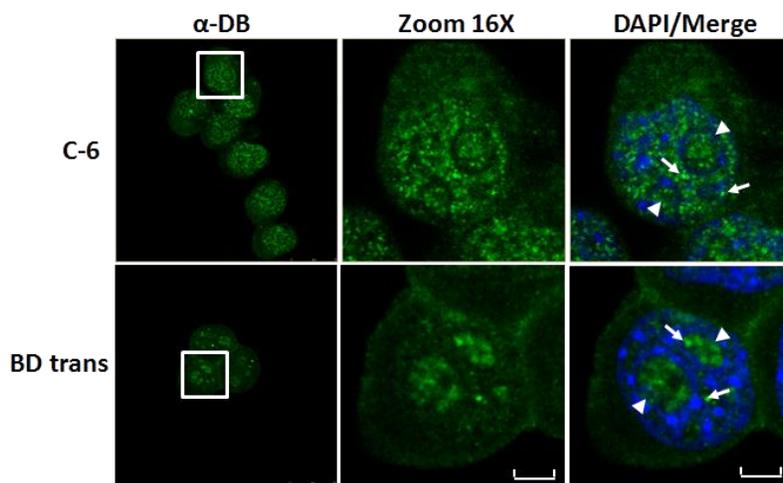
Figura 9. Localización subnuclear de la α -DB2 en las células N1E115. Se muestra la localización subcelular de la α -DB mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Se utilizó un anticuerpo específico contra la α -DB, seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado FITC. Se utilizó DAPI para teñir los núcleos. Se puede observar la presencia de la α -DB en el núcleo y específicamente en ciertas regiones nucleares donde se observa un aumento de la intensidad de la fluorescencia (flechas blancas).

En la figura 9 se observa que α -DB se localiza en cuerpos nucleares prominentes que asemejan los nucléolos, organelos nucleares carentes de membrana lipídica encargados de la biogénesis de los ribosomas (Montgomery 1898; Boisvert, van Koningsbruggen et al. 2007; Sirri, Urcuqui-Inchima et al. 2008); así como en otros cuerpos nucleares relativamente más pequeños que podrían corresponder con los cuerpos de Cajal. Para definir si la localización subnuclear de la α -DB es específica se utilizó un segundo anticuerpos anti-DB para reproducir los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (C-6). En la Fig. 10A se aprecia que la fluorescencia generada por este anticuerpo anti- α -DB tiñó los mismos dos cuerpos nucleares (cuerpos prominentes señalados con la cabeza de flecha y cuerpos pequeños indicados por flechas largas). Para definir de manera precisa la identidad d las estructuras nucleares que contienen a la α -DB2, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia doble utilizando anticuerpos dirigidos contra la α -DB2 y contra las proteínas nucleolares Nopp140 ó B23 (Meier and Blobel 1992), o contra coilina, proteína

marcadora de los cuerpos de Cajal. En la Figura 11 se observa la colocalización de la α -DB2 con las proteínas marcadoras de los nucléolos y los cuerpos de Cajal.

Para confirmar definitivamente la presencia de la α -DB 2 en el nucléolo se obtuvieron extractos nucleolares de las células N1E115 y se sometieron a inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos contra la α -DB2. En la Figura 10B se observa la banda correspondiente a la α -DB2 en los extractos totales, citoplasmáticos y nucleares e importantemente, en el preparado de nucléolos. La pureza del preparado de nucléolos se verifico utilizando proteínas marcadoras de nucléolo y del poro nuclear. De acuerdo a lo esperado, B23 está presente en el extracto de núcleo y se enriquece en el extracto nucleolar, mientras que Nup62 está presente en el preparado de núcleos pero ausente en el de nucléolo.

A



B

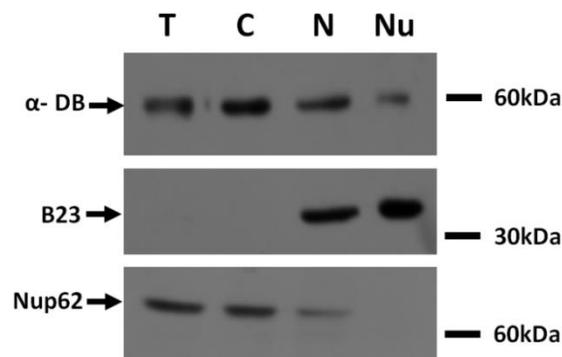


Figura 10. (A) La α -DB2 se localiza en diferentes cuerpos nucleares de las células N1E115. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran la localización subcelular de la α -DB2. Se utilizaron dos diferentes anticuerpos primarios específicos para la α -DB (C-6 y 610766; ver Materiales y Métodos). Se reveló la señal con anticuerpos secundarios anti-ratón acoplados a FITC. utilizó DAPI para teñir núcleos (color azul). Las flechas largas y las cabezas de flecha indican zonas específicas del núcleo que podrían corresponder con los cuerpos de Cajal y los nucléolos respectivamente. Escala 5 μ m. (B) Se obtuvieron extractos totales (T), citoplásmicos (C), nucleares (N), y nucleolares (Nu). La detección de las proteínas B23 y Nup62 se utilizó para definir la pureza de los extractos nucleolares. Se rescato la banda inmunoreactiva que corresponde con la α -DB2 (~59 kDa) en los extractos de nucléolo.

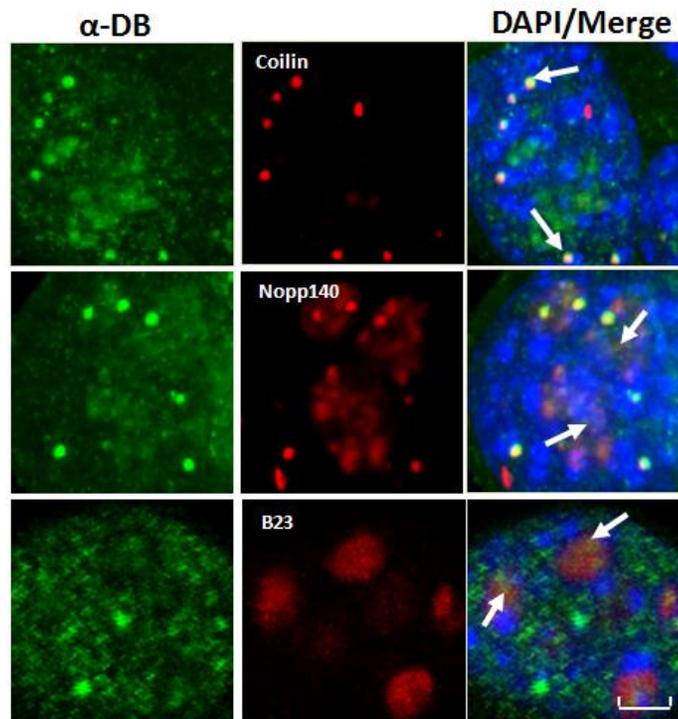


Figura 11. Colocalización de la α -DB2 con proteínas marcadoras de nucléolo y cuerpos de Cajal en las células N1E115. Se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para analizar la localización subcelular de la α -DB2 con respecto a las proteínas de nucléolo (Nopp140 y B23) y cuerpos de Cajal (coilina), utilizando anticuerpos primarios específicos, seguido del uso de anticuerpos secundarios anti-ratón acoplado a FITC (α -DB2, color verde) y anti-conejo acoplado a TRITC (Nopp140, B23 y coilina, color rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (color azul). Se puede observar la colocalización de la α -DB2 con las proteínas de nucléolo y cuerpos de Cajal. Escala 5 μ m.

Para determinar si la localización nucleolar de la α -DB2 es tipo celular específica se analizó la localización subnuclear de esta proteína en tres diferentes líneas celulares: C2C12 (mioblastos de ratón), HeLa (células epiteliales cancerosas de cervix humano) y MDCK (células de riñón de perro). En la Figura 12 se observa que la α -DB2 se distribuye

en el núcleo de las tres diferentes líneas celulares, donde colocaliza en cierta medida con la proteína nucleolar B23.

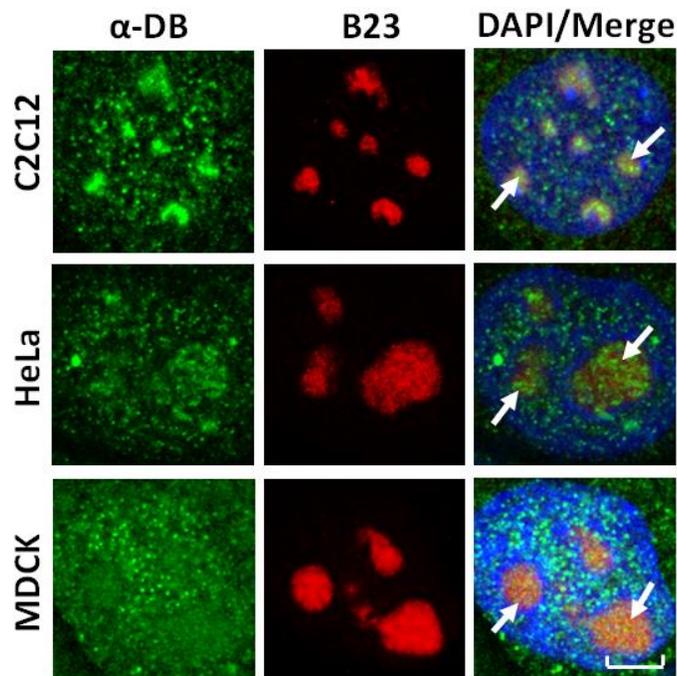


Figura 12. Localización subnuclear de la α -DB 2 en diferentes líneas celulares. Se muestran imágenes de inmunofluorescencia de las células C2C12, HeLa y MDCK. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos contra la α -DB 2 y la proteína B23, y anticuerpos secundarios anti-ratón acoplados a FITC ó anti-conejo acoplados TRITC respectivamente. Las células se contra-tiñeron con DAPI para visualizar el núcleo. Se aprecia la colocalización de la α -DB2 (verde) con la proteína nucleolar B23 (rojo) en las tres líneas celulares antes mencionadas. Escala 5 μ m.

La desorganización de los cuerpos de Cajal con UV provoca la redistribución conjunta de la α -DB2 y la coilina

Si la α -DB2 está íntimamente relacionada con el funcionamiento de los cuerpos de Cajal es posible que la desorganización de estas estructuras afecte su localización nuclear. Por lo tanto, irradiamos las células N1E115 con luz ultravioleta (UV) a una dosis no letal (30J/m^2) (Cioce, Boulon et al. 2006) y observamos el impacto de este tratamiento sobre la α -DB2 a diferentes tiempos post-irradiación mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta. En la Figura 13 se aprecia claramente que la irradiación con luz UV provocó un incremento en el número y tamaño de los cuerpos de Cajal a 6 h post-irradiación, y de manera interesante, la α -DB 2 se re-distribuyó junto con la coilina en estos cuerpos

nucleares alterados. Pasadas 12 h del tratamiento, los cuerpos de Cajal retoman su tamaño y número original y la α -DB2 recupera su localización normal. En su conjunto, estos resultados sugieren la relación funcional de la α -DB2 con los cuerpos de Cajal.

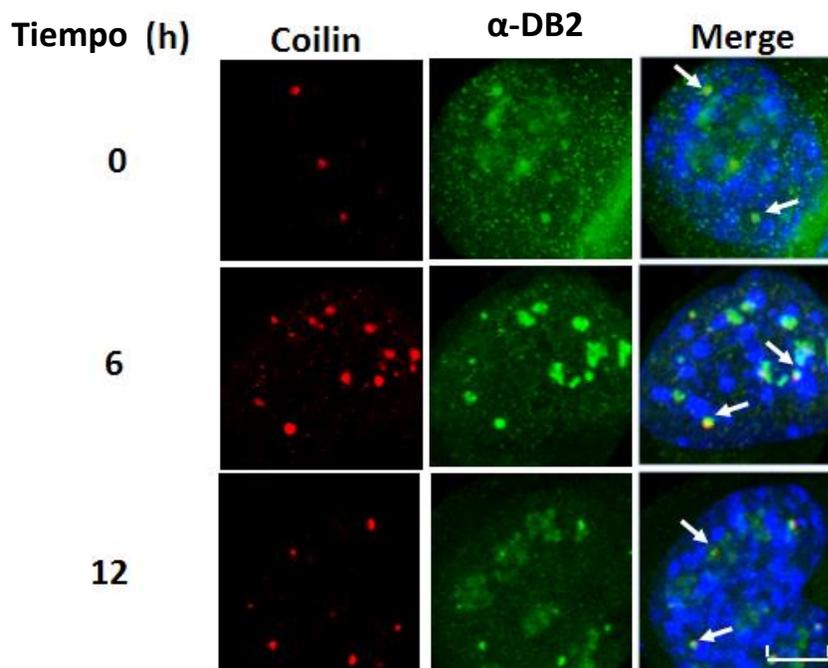


Figura 13. La distribución subnuclear de la coilina y la α -DB2 se alteran en las células N1E115 irradiadas con UV. Las células se sometieron a irradiación con luz UV ($30\text{J}/\text{m}^2$) y se fijaron a los diferentes tiempos indicados posteriores a la irradiación. Enseguida, las células se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos específicos contra la coilina (rojo) y la α -DB2 (verde) y se contra-tiñeron con DAPI para visualizar los núcleos. La α -DB2 se redistribuye junto con la coilina en los cuerpos de Cajal alterados a las 6 h post-irradiación. La localización normal tanto de coilina como de la α -DB2 se recuperó a las 12 h posteriores a la irradiación.

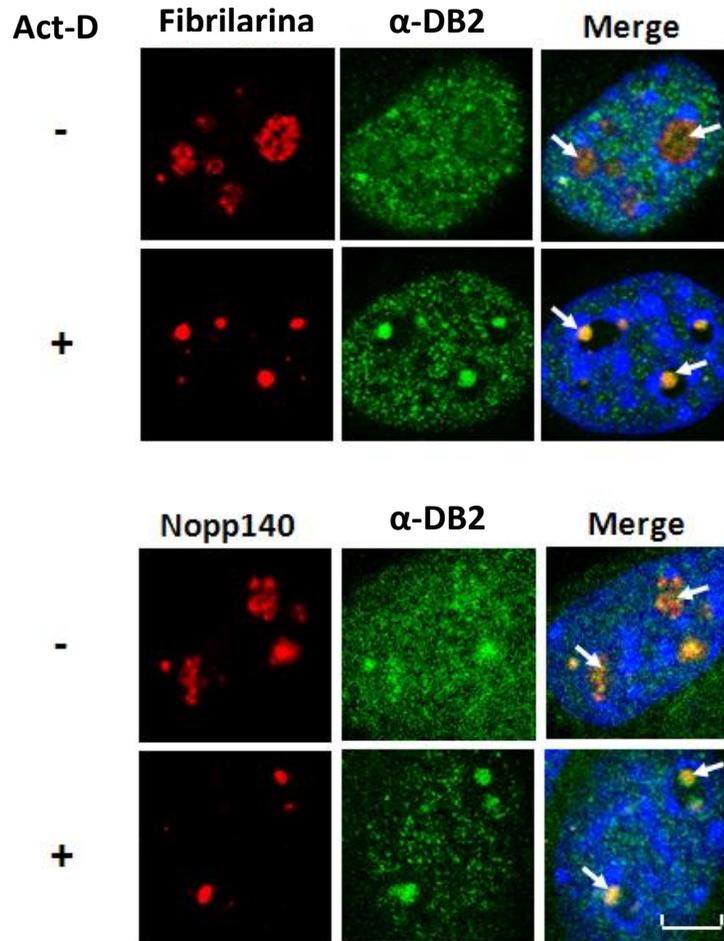


Figura 14. La desorganización de los nucléolos mediada por la Actinomicina D (Act-D) altera la distribución subnuclear de la α -DB2. Las células N1E115 se trataron con Act-D (0.01ug/ml) durante 3 h y se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos específicos contra la α -DB2 y las proteínas nucleolares fibrilarina y Nopp140. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a TRITC y FITC respectivamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. El tratamiento con la actinomicina D fragmento los nucléolos y una fracción de la α -DB2 se redistribuyó junto con las proteínas nucleolares hacia los nucléolos fragmentados. Escala 5 μ m.

La desorganización de los nucléolos inducida por la actinomicina D altera la localización subnuclear de la α -DB2

Con la finalidad de evidenciar la posible participación de la α -DB2 en la plasticidad de los nucléolos decidimos inducir la desorganización de estos cuerpos nucleares mediante tratamiento de las células N1E115 con actinomicina D, inhibidor de la RNA polimerasa I (Boisvert, van Koningsbruggen et al. 2007; Boulon, Westman et al. 2010). Dosis bajas de la

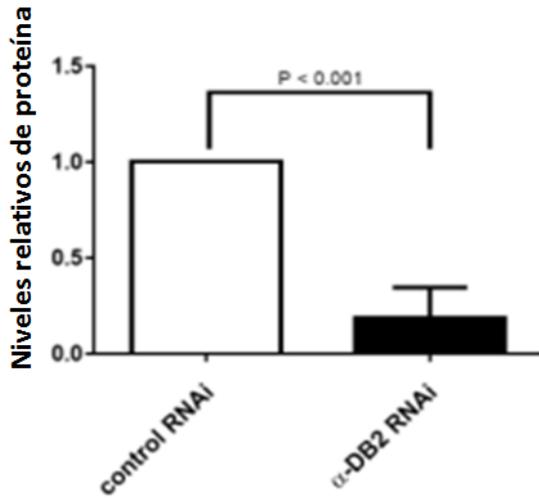
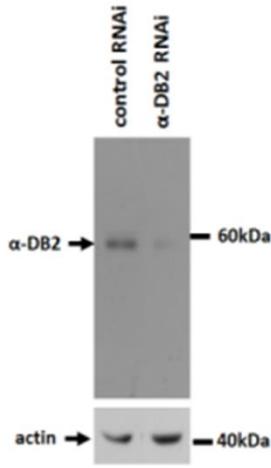
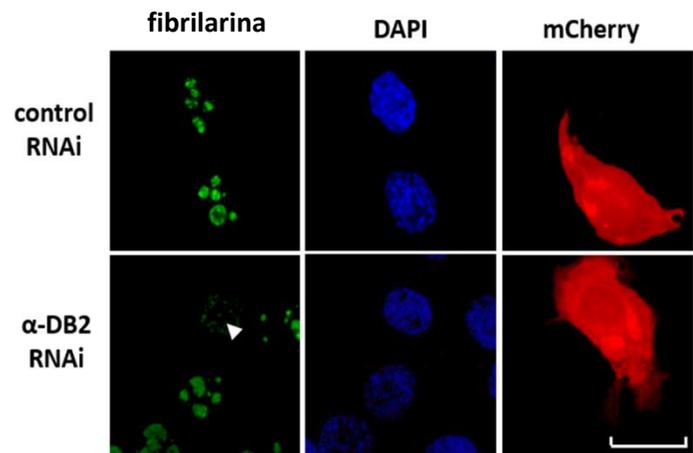
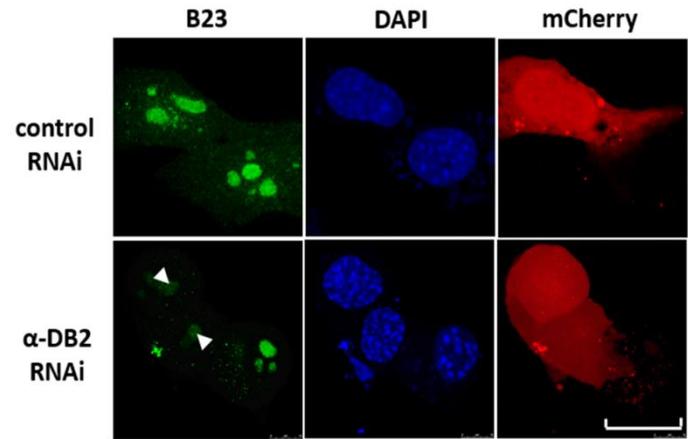
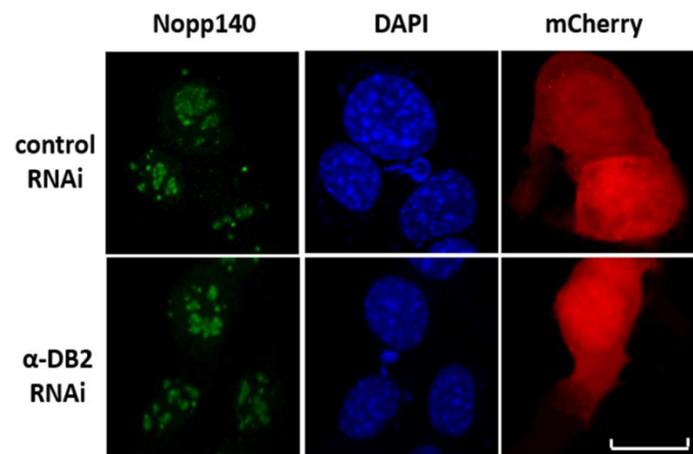
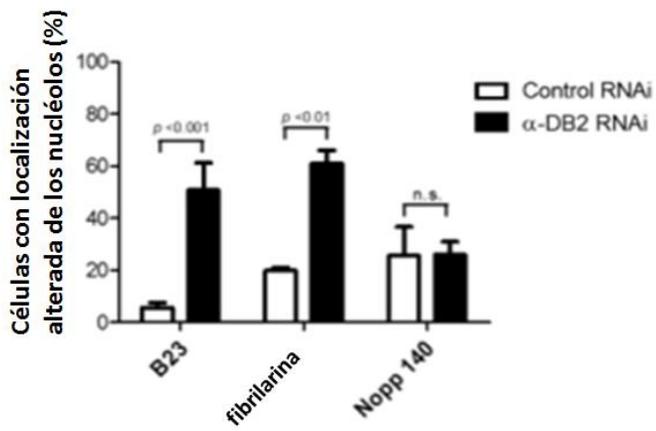
actinomicina D inhiben específicamente la RNA polimerasa I mientras que dosis mayores afectan también la RNA polimerasas II (Carmo-Fonseca, Pepperkok et al. 1992; Shav-Tal, Blechman et al. 2005; Lindstrom 2009). Para monitorear el efecto del tratamiento sobre la estructura de los nucléolos se llevo a cabo la inmunotinción de los nucléolos con anticuerpos contra las proteínas fibrilarina y Nopp140. Se puede observar en la Figura 14 que los nucléolos se fragmentan en cuerpos más pequeños como respuesta a la actinomicina D, y de manera sobresaliente, una fracción de la α -DB2 se redistribuye junto con las proteínas nucleolares en los nucléolos fragmentados. Estos datos sugieren la relación funcional de la α -DB2 con el nucléolo.

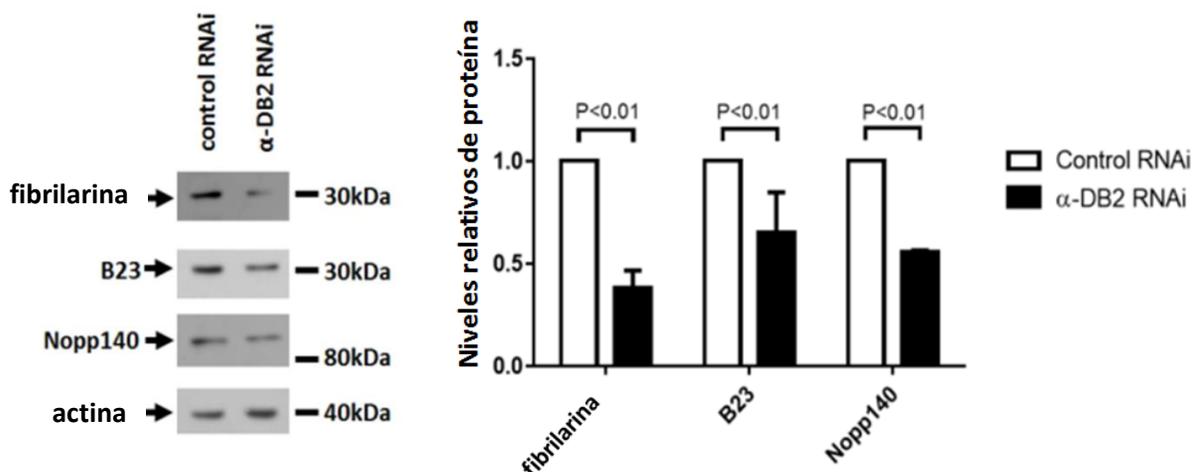
La disminución de la expresión de la α -DB 2 altera la estructura de los nucléolos y la expresión de varias proteínas nucleolares

Si la α -DB2 lleva a cabo alguna función nucleolar, es predecible que su deficiencia altere la organización/funcionamiento de los nucléolos. Para probar esta idea, transfectamos las células N1E115 con un vector que expresa un RNA interferente (RNAi) dirigido contra el RNA mensajero de la α -DB2. Como se observa en la Figura 15A, se obtuvo una disminución de $\sim 80\%$ en los niveles de esta proteína, y de manera notable, la deficiencia de la α -DB 2 alteró la estructura de los nucléolos, en comparación con las células no transfectadas o transfectadas con un RNAi irrelevante (RNAi control). Este efecto se evidencio mediante la inmunotinción de los nucléolos con anticuerpos dirigidos contra las proteínas fibrilarina y B23 (Figura 15C). Así mismo se apreció una disminución en la inmunotinción de estas dos proteínas nucleolares en las células con bajos niveles de α -DB2. En contraste, los nucléolos teñidos para Nopp140 no mostraron alteración alguna en las células con bajos niveles de α -DB2, en comparación con las células no transfectadas o transfectadas con el RNAi control.

Con la finalidad de probar si la desorganización nucleolar presente en las células con deficiente expresión de la α -DB2 afecta los niveles de las proteínas nucleolares, se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección en fase sólida utilizando extractos totales de las células N1E115 y anticuerpos específicos para las proteínas Nopp140, B23 y fibrilarina. Observamos una disminución en los niveles de las tres proteínas nucleolares analizadas en

las células que expresan el RNAi contra la α -DB2, en comparación con las células no transfectadas o transfectadas con un RNAi irrelevante (Figura 15B). En su conjunto, estos resultados indican que la α -DB2 es crítica para mantener la estructura de los nucléolos y para conservar niveles adecuados de las proteínas nucleolares analizadas.

A**B****C**



D

Figura 15. La estructura de los nucléolos y los niveles de varias proteínas nucleolares se altera en las células N1E115 deficientes en la expresión de la α -DB2. (A) Se obtuvieron extractos totales de células N1E115 transfectadas con vectores que expresa un RNA interferente (RNAi) contra la α -DB2 o un RNAi control. Los lisados celulares se sometieron a ensayos de inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos específicos contra la α -DB2 y actina. Panel inferior. Se cuantificaron los niveles de la α -DB2 utilizando la actina como control de carga y se observó una disminución del 80% en sus niveles. (B) La distribución de las proteínas nucleolares Nopp140, B23 y fibrilarina se analizó mediante microscopia confocal en las células que expresan el RNAi control o el RNAi contra la α -DB2. C Se observó que existe un número mayor de células que presentaron una localización alterada de las proteínas nucleolares B23 y fibrilarina en los cultivos transfectados con el RNAi contra la α -DB2, en comparación con aquellos transfectadas con el RNAi control. Escala 5 μ m.

La proteína α -DB2 interacciona con B23 y esta asociación favorece la localización nucleolar de α -DB2

Es posible que la α -DB2 llegue al nucléolo y/o se mantenga en este organelo nuclear mediante su interacción con proteínas nucleolares. Para probar experimentalmente esta hipótesis el M. en C., Marco Laredo Cisneros llevó a cabo ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos para α -DB2. Interesantemente, la proteína B23 se rescató en los inmunoprecipitados de α -DB2, pero no las proteínas Nopp140, fibrilarina (Figura 16, panel superior). B23 funciona como proteína transportadora desde y hacia los nucléolos (Valdez, Perlaky et al. 1994; Li, Dobrowolska et al. 1996; Lindstrom 2012); por lo tanto es posible que este implicada también en el

transporte nucleolar de la α -DB2. Consistente con esta idea, el M. en C. Marco Laredo Cisneros demostró que la sobreexpresión de B23 en las células N1E115 incrementa la señal fluorescente de la α -DB2 en el nucléolo, lo que implica que su tráfico hacia el nucléolo es más eficiente (Figura 16, panel inferior abajo).

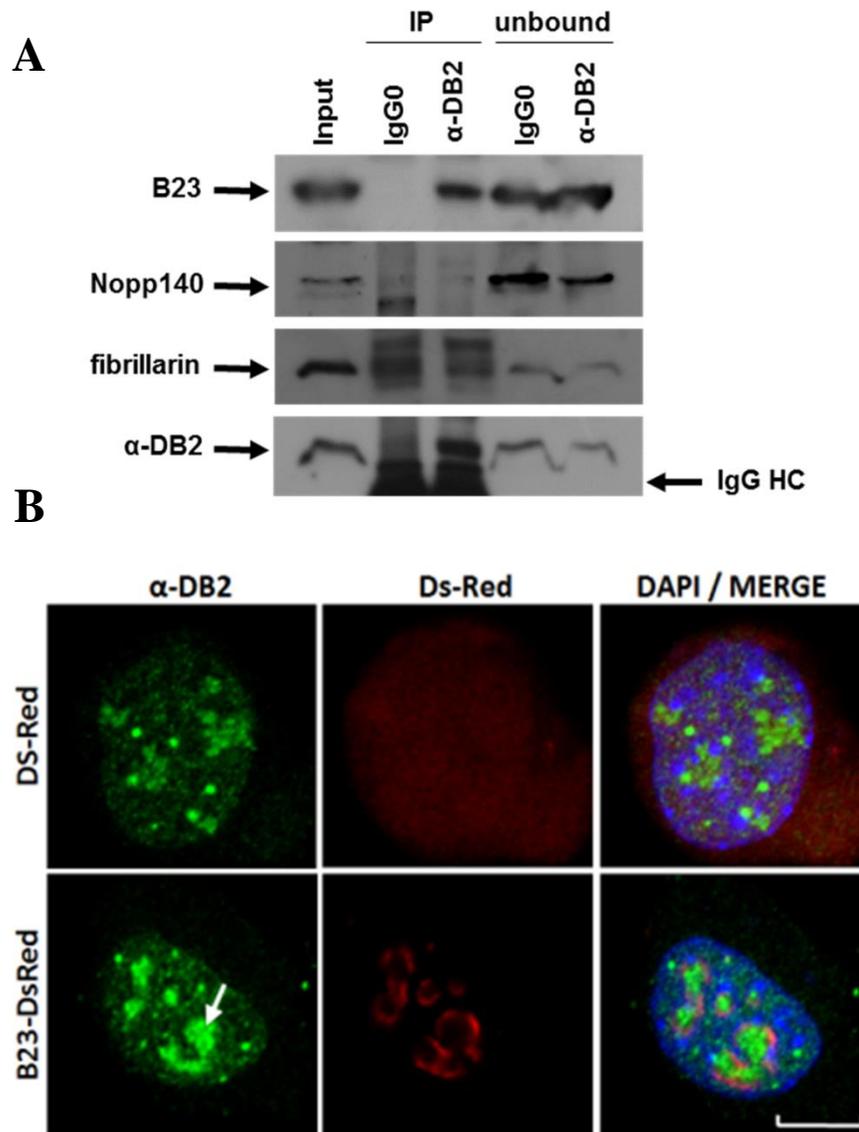


Figura 14. B23 se asocia con y favorece la acumulación nucleolar de α -DB2. (A) Se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos contra la α -DB2, y los inmunoprecipitados se revelaron mediante inmunodetección en fase sólida con anticuerpos contra Nopp140, B23 ó fibrilarina. Se puede observar que el anticuerpo anti- α -DB2 precipita α -DB2 y B23, pero no a las proteínas Nopp140 y fibrilarina. (B) Se transfectaron células N1E115 utilizando un plásmido que sobreexpresa la proteína B23 fusionada a la proteína reportera Ds-Red (rojo), y las células transfectadas se sometieron a ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpos primario contra la α -DB2 y un anticuerpo secundario

acoplado a TRITC (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se observa que la sobre-expresión de B23 resulta en una acumulación nucleolar de α -DB2. Figura tomada de la tesis del M. en C. Marco Laredo Cisneros.

Discusión

La proteína α -DB fue identificada por primera vez formando parte del complejo de proteínas asociadas a la distrofina (CPAD); su función como componente de este complejo es la de modular la señalización que ocurre a través de la membrana plasmática, y contrario a lo esperado, no ejecuta función estructural alguna (Yoshida and Ozawa 1990; Tadayoni, Rendon et al. 2011). Existen diferentes isoformas de la α -DB que son generadas por el uso alternativo de promotores y por *splicing* alternativo, de las cuales, las más estudiadas son la α -DB1 y la α -DB2 (Blake, Tinsley et al. 1995). Esta variedad de isoformas puede significar que cada una de ellas lleva a cabo funciones específicas; no obstante, no existen estudios que hayan abordado esta idea.

De manera novedosa, nuestro grupo de investigación identificó la presencia de la α -DB1 en el núcleo de diferentes líneas celulares (Fuentes-Mera, Rodriguez-Munoz et al. 2006; Gonzalez-Ramirez, Morales-Lazaro et al. 2008), lo que implica la existencia de una ruta de importe nuclear para esta proteína y la posibilidad de que desempeñe alguna función nuclear. Estudios recientes de nuestro laboratorio establecieron que la α -DB1 es transportada al núcleo mediante el reconocimiento por parte de las importinas α 2/ β 1 de una señal de localización nuclear (NLS), localizada en el dominio ZZ. (Aguilar, Wagstaff et al.). La presencia de la α -DB 1 en el núcleo es fisiológicamente relevante, ya que interacciona con la lamina nuclear a través de su asociación específica con la lamina B1 para mantener la arquitectura nuclear (Aguilar, Wagstaff et al.).

Con la finalidad de ahondar sobre las funciones nucleares de la α -DB1 decidimos utilizar la línea neuronal N1E115. Como un primer paso establecimos mediante ensayos de RT-PCR e inmunodetección en fase sólida que las células N1115 expresan específicamente la isoforma α -DB2.

Con la finalidad de inferir la función nuclear de la α -DB2 en las células N1E115, decidimos analizar su localización sub-nuclear, tomando en cuenta que el núcleo está organizado en dominios que ejecutan funciones específicas. Mediante ensayos de inmunofluorescencia se localizó a la α -DB2 en dos tipos de dominios nucleares, unos cuerpos prominentes que semejaban los nucléolos y otros cuerpos más pequeños que por su apariencia podrían corresponder con los cuerpos de Cajal. Subsecuentes ensayos de co-localización, utilizando anticuerpos contra proteínas marcadoras de nucléolos (Nopp140, fibrilarina y B23) y cuerpos de Cajal (coilina) confirmaron la presencia de la α -DB2 en estas estructuras nucleares. La localización de la α -DB2 en los nucléolos y cuerpos de Cajal es específica ya que obtuvimos resultados similares utilizando dos diferentes anticuerpos dirigido contra esta proteína (C-6 y 610766). Además, dicha ubicación subcelular no es tipo celular específica, ya que se reprodujeron los resultados de su localización nucleolar en las líneas celulares C2C12, MDCK y HeLa. La presencia de la α -DB 2 en la fracción nucleolar pura aislada a partir de cultivos de células de N1E115 dio el soporte definitivo a nuestras conclusiones.

El nucléolo es un organelo intranuclear especializado en la biogénesis y ensamblaje de los complejos ribosomales (Montgomery 1898; Boisvert, van Koningsbruggen et al. 2007; Sirri, Urcuqui-Inchima et al. 2008). Esto lo hace en conjunto con los cuerpos de Cajal, por lo que se requiere una comunicación entre estos dos organelos intranucleares que se logra mediante el transporte de ciertas proteínas del nucléolo hacia los cuerpos de Cajal, y viceversa (Gall 2003; Cioce and Lamond 2005; Morris 2008; Matera, Izaguire-Sierra et al. 2009; Nizami, Deryusheva et al. 2010). Por su parte, la coilina es una fosfoproteína esencial para el mantenimiento de los cuerpos de Cajal (Carmo-Fonseca, Ferreira et al. 1993; Liu, Wu et al. 2009; Broome, Carrero et al.); se une a DNA y funciona además como RNasa durante el procesamiento del RNA ribosomal (RNAr) (Broome and Hebert ; Broome, Carrero et al. 2013). La presencia de la α -DB2 en ambos dominios, nucléolos y cuerpos de Cajal, sugiere que esta proteína está involucrada en la comunicación entre ambos compartimentos.

Con la finalidad de evidenciar si la presencia de la α -DB es relevante para la funcionalidad de estos cuerpos nucleares, decidimos tratar a las células N1E115 con actimomicina D ó irradiarlas con UV para inducir la desorganización de los nucléolos y los

cuerpos de Cajal respectivamente. De manera interesante, observamos que en la α -DB2 se redistribuye junto con las proteínas nucleolares Nopp140, fibrilarina y B23 en los nucléolos fragmentados que se forman como consecuencia del tratamiento con actinomomicina D. Por otra parte, las células irradiadas con UV exhiben un incremento en el número y tamaño de los cuerpos de Cajal y de manera notable, la α -DB 2 colocaliza junto con la coilina en estos cuerpos nucleares desorganizados. En su conjunto, nuestros resultados sugieren que la α -DB2 está involucrada en la estructura y dinámica de los nucléolos y cuerpos de Cajal. Consistente con esta idea, la generación de un modelo celular con la expresión de la α -DB2 disminuida evidenció alteraciones en la localización y expresión de las proteínas nucleolares B23 y fibrilarina. Por lo tanto, es posible que la α -DB2 funcione como una proteína de andamiaje para la correcta localización y/o el mantenimiento de estas proteínas en el nucléolo.

La localización nucleolar de varias proteínas está determinada por su interacción con B23, la cual funciona como una molécula acarreadora (Lechertier, Sirri et al. 2007). B23 es una fosfoproteína que se une a DNA, funciona como chaperona y tiene actividad de ribonucleasa (RNAsa) (Herrera, Correia et al. 1996; Hingorani, Szebeni et al. 2000; Huang, Negi et al. 2005). La proteína B23 posee además una secuencia que interactúa con la secuencia de localización nucleolar (SLNo) presente en ciertas proteínas nucleolares (Lechertier, Sirri et al. 2007). Demostramos que la α -DB2 interacciona con B23 *in vivo*, y que la sobreexpresión de esta última realza la localización nucleolar de la α -DB2. Estos resultados implican que el transporte de la α -DB2 hacia el nucléolo es mediado por B23. Un análisis *in silico* de la secuencia primaria de la α -DB2, utilizando el algoritmo en línea *Nucleolar localization sequence detector* (www.compbio.dundee.ac.uk/www-nod/), identifico una SLNo putativa en su dominio ZZ. No obstante, son necesarios estudios posteriores para probar la funcionalidad de esta secuencia.

Conclusión

1.- La localización nucleolar de la α -DB2 es crítica para el mantenimiento tanto de la estructura nucleolar como de los niveles de las proteínas nucleolares B23, fibrilarina y Nopp140.

2.- La localización nucleolar de la α -DB2 depende de la proteína nucleolar B23.

La presencia de la α -DB2 en los cuerpos de Cajal y los nucléolos sugiere su participación en la comunicación que se establece entre estos dos tipos de cuerpos nucleares durante la biogénesis ribosomal.

Bibliografía

- Aaronson, R. P. and G. Blobel (1975). "Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(3): 1007-11.
- Aguilar, A., K. M. Wagstaff, et al. "Nuclear localization of the dystrophin-associated protein alpha-dystrobrevin through importin alpha2/beta1 is critical for interaction with the nuclear lamina/maintenance of nuclear integrity." FASEB J.
- Albrecht, D. E. and S. C. Froehner (2002). "Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses." Neurosignals **11**(3): 123-9.
- Albrecht, D. E. and S. C. Froehner (2004). "DAMAGE, a novel alpha-dystrobrevin-associated MAGE protein in dystrophin complexes." J Biol Chem **279**(8): 7014-23.
- Andrade, L. E., E. K. Chan, et al. (1991). "Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin." J Exp Med **173**(6): 1407-19.
- Austin, C. M. and M. Bellini (2009). "The dynamic landscape of the cell nucleus." Mol Reprod Dev **77**(1): 19-28.
- Benson, M. A., S. E. Newey, et al. (2001). "Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain." J Biol Chem **276**(26): 24232-41.
- Blake, D. J. and E. Martin-Rendon (2002). "Intermediate filaments and the function of the dystrophin-protein complex." Trends Cardiovasc Med **12**(5): 224-8.
- Blake, D. J., R. Nawrotzki, et al. (1998). "beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 241-6.
- Blake, D. J., R. Nawrotzki, et al. (1996). "Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein." J Biol Chem **271**(13): 7802-10.
- Blake, D. J., J. M. Tinsley, et al. (1995). "Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions." Trends Biochem Sci **20**(4): 133-5.

- Blake, D. J., A. Weir, et al. (2002). "Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle." Physiol Rev **82**(2): 291-329.
- Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, et al. (2007). "The multifunctional nucleolus." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 574-85.
- Boudonck, K., L. Dolan, et al. (1999). "The movement of coiled bodies visualized in living plant cells by the green fluorescent protein." Mol Biol Cell **10**(7): 2297-307.
- Boulon, S., B. J. Westman, et al. (2010). "The nucleolus under stress." Mol Cell **40**(2): 216-27.
- Boveri (1909). "Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualit 3, 181-268 (1909)." Lt. Arch. Zellforsch **3**: 181-268.
- Broome, H. J., Z. I. Carrero, et al. (2013). "Phosphorylation regulates coilin activity and RNA association." Biol Open **2**(4): 407-15.
- Broome, H. J. and M. D. Hebert (2012). "In vitro RNase and nucleic acid binding activities implicate coilin in U snRNA processing." PLoS One **7**(4): e36300.
- Butler, M. H., K. Douville, et al. (1992). "Association of the Mr 58,000 postsynaptic protein of electric tissue with Torpedo dystrophin and the Mr 87,000 postsynaptic protein." J Biol Chem **267**(9): 6213-8.
- Cajal, S. R. y. (1903). "Un sencillo metodo de coloracion selectiva del reticulo protoplasmico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados y invertebrados." Trab Lab Invest Biol **2**: 129-221.
- Campbell, K. P. and S. D. Kahl (1989). "Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein." Nature **338**(6212): 259-62.
- Carmo-Fonseca, M., J. Ferreira, et al. (1993). "Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis--evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure." J Cell Biol **120**(4): 841-52.
- Carmo-Fonseca, M., R. Pepperkok, et al. (1992). "Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies." J Cell Biol **117**(1): 1-14.
- Carr, C., G. D. Fischbach, et al. (1989). "A novel 87,000-Mr protein associated with acetylcholine receptors in Torpedo electric organ and vertebrate skeletal muscle." J Cell Biol **109**(4 Pt 1): 1753-64.
- Ceccarini, M., M. Grasso, et al. (2007). "Association of dystrobrevin and regulatory subunit of protein kinase A: a new role for dystrobrevin as a scaffold for signaling proteins." J Mol Biol **371**(5): 1174-87.
- Ceccarini, M., P. Macioce, et al. (2002). "Expression of dystrophin-associated proteins during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells." Neuromuscul Disord **12**(1): 36-48.
- Cioce, M., S. Boulon, et al. (2006). "UV-induced fragmentation of Cajal bodies." J Cell Biol **175**(3): 401-13.
- Cioce, M. and A. I. Lamond (2005). "Cajal bodies: a long history of discovery." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 105-31.
- Dwyer, N. and G. Blobel (1976). "A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei." J Cell Biol **70**(3): 581-91.
- Ehmsen, J., E. Poon, et al. (2002). "The dystrophin-associated protein complex." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2801-3.
- Enigk, R. E. and M. M. Maimone (1999). "Differential expression and developmental regulation of a novel alpha-dystrobrevin isoform in muscle." Gene **238**(2): 479-88.

- Ervasti, J. M. and K. P. Campbell (1991). "Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex." Cell **66**(6): 1121-31.
- Ervasti, J. M. and K. P. Campbell (1993). "A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin." J Cell Biol **122**(4): 809-23.
- Ervasti, J. M., K. Ohlendieck, et al. (1990). "Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle." Nature **345**(6273): 315-9.
- Fawcett, D. W. (1966). "On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates." Am J Anat **119**(1): 129-45.
- Fuentes-Mera, L., R. Rodriguez-Munoz, et al. (2006). "Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix." Exp Cell Res **312**(16): 3023-35.
- Gall, J. G. (2003). "The centennial of the Cajal body." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(12): 975-80.
- Gall, J. G., M. Bellini, et al. (1999). "Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes." Mol Biol Cell **10**(12): 4385-402.
- Gerace, L., A. Blum, et al. (1978). "Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution." J Cell Biol **79**(2 Pt 1): 546-66.
- Gonzalez-Ramirez, R., S. L. Morales-Lazaro, et al. (2008). "Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis." J Cell Biochem **105**(3): 735-45.
- Herrera, J. E., J. J. Correia, et al. (1996). "Sedimentation analyses of the salt- and divalent metal ion-induced oligomerization of nucleolar protein B23." Biochemistry **35**(8): 2668-73.
- Hingorani, K., A. Szebeni, et al. (2000). "Mapping the functional domains of nucleolar protein B23." J Biol Chem **275**(32): 24451-7.
- Holzfeind, P. J., H. J. Ambrose, et al. (1999). "Tissue-selective expression of alpha-dystrobrevin is determined by multiple promoters." J Biol Chem **274**(10): 6250-8.
- Huang, N., S. Negi, et al. (2005). "Protein NPM3 interacts with the multifunctional nucleolar protein B23/nucleophosmin and inhibits ribosome biogenesis." J Biol Chem **280**(7): 5496-502.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-80.
- Jin, H., S. Tan, et al. (2007). "The dystrotelin, dystrophin and dystrobrevin superfamily: new paralogues and old isoforms." BMC Genomics **8**: 19.
- Kramarcy, N. R., A. Vidal, et al. (1994). "Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M(r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin)." J Biol Chem **269**(4): 2870-6.
- Kumaran, R. I., R. Thakar, et al. (2008). "Chromatin dynamics and gene positioning." Cell **132**(6): 929-34.
- Lechertier, T., V. Sirri, et al. (2007). "A B23-interacting sequence as a tool to visualize protein interactions in a cellular context." J Cell Sci **120**(Pt 2): 265-75.
- Li, D., G. Dobrowolska, et al. (1996). "The physical association of casein kinase 2 with nucleolin." J Biol Chem **271**(26): 15662-8.

- Lindstrom, M. S. (2009). "Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation." Biochem Biophys Res Commun **379**(2): 167-70.
- Lindstrom, M. S. (2012). "Elucidation of motifs in ribosomal protein S9 that mediate its nucleolar localization and binding to NPM1/nucleophosmin." PLoS One **7**(12): e52476.
- Liu, J. L., Z. Wu, et al. (2009). "Coilin is essential for Cajal body organization in *Drosophila melanogaster*." Mol Biol Cell **20**(6): 1661-70.
- Lyssand, J. S., J. L. Whiting, et al. (2010). "Alpha-dystrobrevin-1 recruits alpha-catulin to the alpha1D-adrenergic receptor/dystrophin-associated protein complex signalosome." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21854-9.
- Matera, A. G., M. Izaguire-Sierra, et al. (2009). "Nuclear bodies: random aggregates of sticky proteins or crucibles of macromolecular assembly?" Dev Cell **17**(5): 639-47.
- Meier, U. T. and G. Blobel (1992). "Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm." Cell **70**(1): 127-38.
- Mizuno, Y., T. G. Thompson, et al. (2001). "Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6156-61.
- Montgomery, T. (1898). "Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus." J Morphol **15**: 265-582.
- Morris, G. E. (2008). "The Cajal body." Biochim Biophys Acta **1783**(11): 2108-15.
- Newey, S. E., M. A. Benson, et al. (2000). "Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex." Curr Biol **10**(20): 1295-8.
- Newey, S. E., E. V. Howman, et al. (2001). "Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle." J Biol Chem **276**(9): 6645-55.
- Nizami, Z., S. Deryusheva, et al. (2010). "The Cajal body and histone locus body." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(7): a000653.
- Ohlendieck, K., J. M. Ervasti, et al. (1991). "Dystrophin-glycoprotein complex is highly enriched in isolated skeletal muscle sarcolemma." J Cell Biol **112**(1): 135-48.
- Peters, M. F., K. F. O'Brien, et al. (1997). "beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations." J Biol Chem **272**(50): 31561-9.
- Platani, M., I. Goldberg, et al. (2002). "Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent." Nat Cell Biol **4**(7): 502-8.
- Platani, M., I. Goldberg, et al. (2000). "In vivo analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells." J Cell Biol **151**(7): 1561-74.
- Rabl, C. (1885). "Über Zellteilung." Morphol. Jahrb **10**: 214-330.
- Raska, I., L. E. Andrade, et al. (1991). "Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies." Exp Cell Res **195**(1): 27-37.
- Rees, M. L., C. F. Lien, et al. (2007). "Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues." Neuromuscul Disord **17**(2): 123-34.
- Roberts, R. G. (2001). "Dystrophins and dystrobrevins." Genome Biol **2**(4): REVIEWS3006.
- Sadoulet-Puccio, H. M., C. A. Feener, et al. (1997). "The genomic organization of human dystrobrevin." Neurogenetics **1**(1): 37-42.

- Sadoulet-Puccio, H. M., T. S. Khurana, et al. (1996). "Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane." Hum Mol Genet **5**(4): 489-96.
- Sadoulet-Puccio, H. M., M. Rajala, et al. (1997). "Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12413-8.
- Schirmer, E. C., L. Florens, et al. (2003). "Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics." Science **301**(5638): 1380-2.
- Schneider, R. and R. Grosschedl (2007). "Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression." Genes Dev **21**(23): 3027-43.
- Shao, L., Y. Shuai, et al. (2011). "Schizophrenia susceptibility gene dysbindin regulates glutamatergic and dopaminergic functions via distinctive mechanisms in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(46): 18831-6.
- Shav-Tal, Y., J. Blechman, et al. (2005). "Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition." Mol Biol Cell **16**(5): 2395-413.
- Sirri, V., S. Urcuqui-Inchima, et al. (2008). "Nucleolus: the fascinating nuclear body." Histochem Cell Biol **129**(1): 13-31.
- Spector, D. L. (2003). "The dynamics of chromosome organization and gene regulation." Annu Rev Biochem **72**: 573-608.
- Starr, D. A. and M. Han (2003). "ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning." J Cell Sci **116**(Pt 2): 211-6.
- Stewart, M. (2007). "Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 195-208.
- Strambio-De-Castillia, C., M. Niepel, et al. (2010). "The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(7): 490-501.
- Tadayoni, R., A. Rendon, et al. (2011). "Dystrophin Dp71: The Smallest but Multifunctional Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene." Mol Neurobiol.
- Takizawa, T., K. J. Meaburn, et al. (2008). "The meaning of gene positioning." Cell **135**(1): 9-13.
- Terry, L. J., E. B. Shows, et al. (2007). "Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport." Science **318**(5855): 1412-6.
- Titeux, M., V. Brocheriou, et al. (2001). "Human synemin gene generates splice variants encoding two distinct intermediate filament proteins." Eur J Biochem **268**(24): 6435-49.
- Tschochner, H. and E. Hurt (2003). "Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm." Trends Cell Biol **13**(5): 255-63.
- Valdez, B. C., L. Perlaky, et al. (1994). "Identification of the nuclear and nucleolar localization signals of the protein p120. Interaction with translocation protein B23." J Biol Chem **269**(38): 23776-83.
- Wagner, K. R., J. B. Cohen, et al. (1993). "The 87K postsynaptic membrane protein from Torpedo is a protein-tyrosine kinase substrate homologous to dystrophin." Neuron **10**(3): 511-22.
- Worman, H. J. and J. C. Courvalin (2005). "Nuclear envelope, nuclear lamina, and inherited disease." Int Rev Cytol **246**: 231-79.
- Yoshida, M. and E. Ozawa (1990). "Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma." J Biochem **108**(5): 748-52.